

**Analytische Untersuchungen zu ausgewählten
biosynthetischen Vorläufern des Mykotoxins
Aflatoxin B₁ in Lebensmitteln**

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades (Dr. rer. nat.) des
Fachbereichs Chemie, Fakultät für Mathematik, Informatik,
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

Institut für Lebensmittelchemie

vorgelegt von

Kim Lara Gützkow

Hamburg, 2026

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2020 bis November 2024 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Dr. Ronald Maul am Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch in Kiel angefertigt. Herr Prof. Dr. Sascha Rohn übernahm die formale akademische Betreuung an der Universität Hamburg und der TU Berlin.

1. Gutachter: Prof. Dr. Sascha Rohn

2. Gutachter: Dr. Ronald Maul

Disputation: 31.07.2026

Freigabe Dissertation: 11.08.2026

I Publikationsliste

Beiträge zur kumulativen Dissertation

Gützkow, K. L., Ebmeyer, J., Kröncke, N., Kampschulte, N., Böhmert, L., Schöne, C., Schebb, N. H., Benning, R., Braeuning, A., & Maul, R. (2021). Metabolic fate and toxicity reduction of aflatoxin B1 after uptake by edible *Tenebrio molitor* larvae. *Food and Chemical Toxicology*, 155, 112375. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112375>

Gützkow, K. L., Al Ayoubi, C., Soler Vasco, L., Rohn, S., Maul, R. (2022). Analysis of ochratoxin A, aflatoxin B1 and its biosynthetic precursors in cheese – method development and market sample screening. *Food Control*, 109241. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109241>

Rehagel, C., Maul, R., Gützkow, K. L., & Akineden, Ö. (2022). Enzyme immunoassays for the detection of mycotoxins in plant-based milk alternatives: pitfalls and limitations. *Mycotoxin Research*, 38(4), 265-274. <https://doi.org/10.1007/s12550-022-00467-x>

Gützkow, K. L., Lencioni, A., Schwake-Anduschus, C., Müller, A., Kabisch, J., Grundmann, V. L., Stöckl, M., & Maul, R. (2024). Comprehensive investigation of undesired substances and microbial contamination in plant-based drinks. *Food Control*, 110599. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110599>

Gützkow, K. L., Maul, R., Rohn, S., & Schmidt-Heydt, M. (2025). *Aspergillus versicolor* as producer of known and novel aflatoxin precursors on hard cheese. *Food Control*, 176, 111337. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.111337>

Vorträge

Gützkow, K. L., Al Ayoubi, C., Kampschulte, N., Soler Vasco, L., Rohn, S., Schebb, N. H., Maul, R., Investigation of aflatoxin B1 and its biosynthetic precursors in cheese, 43rd *Mycotoxin Workshop*, 30.05. – 01.06.2022, Toulouse, Frankreich.

Gützkow, K. L., Kampschulte, N., Rohn, S., Schebb, N. H., Maul, R., Untersuchungen von Ochratoxin A, Aflatoxin B1 und dessen biosynthetischen Vorläufern in Käse, *Arbeitstagung der Regionalverbände Nord und Nordost, Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh*, 20.03. – 21.03.2023, Hannover.

Gützkow, K. L., Rohn, S., Schmidt-Heydt, M., Schwake-Anduschus, C., Maul, R., Mykotoxine in Hartkäse und pflanzlichen Drinks und methoxy-STC als neuartiger Kontaminant, *53. Deutsche Lebensmittelchemietage*, 22.09. – 24.09. 2025, Halle (Saale).

Posterpräsentationen

Gützkow, K. L., Al Ayoubi, C., Kampschulte, N., Rohn, S., Schebb, N. H., Maul, R., Untersuchungen von Aflatoxin B₁ und seinen biosynthetischen Vorläufern in Käse, *50. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, 19.09. – 21.09.2022, Hamburg.

Gützkow, K. L., Lie, K. K., Rohn, S., Maul, R., Investigations of OTA, aflatoxin B₁ and its biosynthetic precursors, *44th Mycotoxin-Workshop*, 05.06. – 07.06.2023, Celle.

Gützkow, K. L., Lencioni, A., Schwake-Anduschus, C., Müller, A., Kabisch, J., Grundmann, V. L., Stöckl, M., Maul, R., Umfassende Untersuchung unerwünschter Stoffe und mikrobiologischer Kontamination in pflanzlichen Drinks, *Arbeitstagung des Regionalverbands Nord, Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh*, 22.04. – 23.04.2024, Bremerhaven.

Gützkow, K. L., Rohn, S., Schmidt-Heydt, M., Maul, R., Confirmation of *Aspergillus versicolor* as Producer of Mycotoxins on Hard Cheese, *45th Mycotoxin-Workshop*, 02.06. – 05.06.2024, Wien.

Gützkow, K. L., Barkmeyer, I., Maul, R., Untersuchungen zum *in vitro* Metabolismus von natürlichen Kontaminanten unter Verwendung von Fischlebermikrosomen, *Arbeitstagung des Regionalverbands Nord, Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh*, 10.03. – 11.03.2025, Kiel.

Gützkow, K. L., Barkmeyer, I., Maul, R., Investigations of the *in vitro* metabolism of natural contaminants using fish liver microsomes, *46th Mycotoxin-Workshop*, 25.05. – 28.05.2025, Martina Franca, IT.

II Inhaltsverzeichnis

I	Publikationsliste	I
	Beiträge zur kumulativen Dissertation	I
	Vorträge	I
	Posterpräsentationen	II
II	Inhaltsverzeichnis	III
III	Abkürzungsverzeichnis	VI
IV	Abbildungsverzeichnis	VIII
V	Tabellenverzeichnis	IX
	Kurzfassung	1
	Abstract	3
	Einleitung	5
1	Theoretischer Hintergrund	9
1.1	Mykotoxine	9
1.1.1	Aflatoxine	11
1.1.2	Sterigmatocystin	14
1.1.3	Ochratoxine	17
1.1.4	Bewertung und Einstufung	18
1.1.5	Kombinationstoxizität	21
1.2	Analytik von Mykotoxinen	22
1.2.1	Probenvorbereitung	23
1.2.2	Chromatografische Trennung	25
1.2.3	Detektion	26
1.2.4	Matrixeffekte und interne Standards	27
1.2.5	Enzymimmunoassays	28
1.3	Käse	29
1.3.1	Hartkäse	32
1.4	Pflanzliche Drinks	33
1.5	Tierernährung	36

2	Zielsetzung.....	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Pflanzliche Lebensmittel – Pflanzliche Drinks	41
3.1.1	Comprehensive investigation of undesired substances and microbial contamination in plant-based drinks (Publikation I)	41
3.1.2	Enzyme immunoassays for the detection of mycotoxins in plant-based milk alternatives: pitfalls and limitations (Publikation II)	43
3.2	Mykotoxintransfer aus Futtermitteln.....	45
3.2.1	Mykotoxinvorkommen in Futtermitteln (unveröffentlicht)	45
3.2.2	Metabolic fate and toxicity reduction of aflatoxin B ₁ after uptake by edible <i>Tenebrio molitor</i> larvae (Publikation III)	56
3.2.3	Untersuchungen zum Transfer von Sterigmatocystin in Milch (unveröffentlicht)	58
3.3	Tierische Lebensmittel – Käse.....	64
3.3.1	Analysis of ochratoxin A, aflatoxin B ₁ and its biosynthetic precursors in cheese – Method development and market sample screening (Publikation IV)	64
3.3.2	Laborvergleichsuntersuchung zur unabhängigen Validierung der Analysenmethode für Käse (unveröffentlicht)	66
3.3.3	<i>Aspergillus versicolor</i> as producer of known and novel aflatoxin precursors on hard cheese (Publikation V)	69
4	Zusammenfassende Diskussion	71
4.1	Pflanzliche Lebensmittel – Pflanzliche Drinks	71
4.1.1	Mykotoxinvorkommen in pflanzlichen Drinks.....	71
4.1.2	Mykotoxinanalyse in pflanzlichen Drinks	73
4.2	Mykotoxintransfer aus Futtermitteln.....	75
4.2.1	Mykotoxinvorkommen in Futtermitteln (unveröffentlicht)	75
4.2.2	AFB ₁ Verbleib in <i>Tenebrio molitor</i> Larven	79
4.2.3	Untersuchungen zum Transfer von Sterigmatocystin in Milch (unveröffentlicht)	84
4.3	Tierische Lebensmittel – Käse.....	88
4.3.1	Mykotoxinanalyse in Käsematrix	88
4.3.2	Mykotoxinvorkommen in Käse.....	90

4.3.3	Mykotoxinbildner in Grana-Typ Käse	93
5	Schlussfolgerungen und Ausblick	98
6	Literaturverzeichnis	102
7	Anhang	141
7.1	Ergänzende Informationen zu den Publikationen (<i>Supplemental Material</i>) 141	
7.1.1	Publikation I	141
7.1.2	Publikation III	152
7.1.3	Mykotoxinvorkommen in Futtermitteln	164
7.1.4	Sterigmatocystin Transferversuch	173
7.1.5	Publikation IV	176
7.2	Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe	179
	Eidesstattliche Versicherung	181

III Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AFB ₁	Aflatoxin B ₁
AFB ₂	Aflatoxin B ₂
AFG ₁	Aflatoxin G ₁
AFG ₂	Aflatoxin G ₂
aflP	Gen im Aflatoxin-Biosyntheseweg-Gencluster (früher: omtA)
AFM ₁	Aflatoxin M ₁
AFP ₁	Aflatoxin P ₁
AFQ ₁	Aflatoxin Q ₁
BMDL10	untere Konfidenzgrenze der Benchmark-Dosis für 10 % Response
CYP	Cytochrom-P450
DAD	Dioden-Array-Detektor
DHOMSTC	Dihydro-O-methyl-Sterigmatocystin
DHSTC	Dihydrosterigmatocystin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DON	Deoxynivalenol
ECD	Elektroneneinfangdetektor (engl.: electron capture detector)
EFSA	European Food Safety Authority
EIA	Enzymimmunoassays
FA	Ameisensäure (engl.: formic acid)
FID	Flammenionisationsdetektor
FLD	Fluoreszenz Detektor
GHS	global harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
γH2AX	Phosphorylierte Form der Histonvariante H2AX
HBGV	gesundheitsbasierter Richtwert
HCl	Salzsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
IAC	Immunoaffinity Column
IARC	International Agency for Research on Cancer
IS	Interner Standard
KG	Körpergewicht
LC	Liquid Chromatography
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)

Methoxy- STC	Methoxysterigmatocystin
MOE	Margin of Exposure
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
OMSTC	O-Methylsterigmatocystin
OTA	Ochratoxin A
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged, Safe
RP	Reversed-Phase
SPE	Solid Phase Extraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
STC	Sterigmatocystin
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolettstrahlung
VerA	Versicolorin A
VO	Verordnung
ZEN	Zearalenon

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biosyntheseweg von Aflatoxin B ₁ , G ₁ , B ₂ und G ₂ modifiziert nach Theumer et al. (2018).....	12
Abbildung 2: Strukturformeln von (a) Sterigmatocystin und (b) Methoxysterigmatocystin.....	16
Abbildung 3: Strukturformeln von Ochratoxin A, Ochratoxin B und Ochratoxin C.	17
Abbildung 4: Der allgemeine Herstellungsprozess von pflanzlichen Drinks nach Mäkinen et al. (2016).	35
Abbildung 5: Quantifizierte Mykotoxinkonzentrationen (analysiert mit HPLC-MS/MS) in Futtermittelrohstoffen. Konzentrationen unterhalb der LOQ, aber oberhalb der LOD wurden unter Verwendung des lower bound Ansatzes auf die LOD gesetzt.	50
Abbildung 6: Quantifizierte Mykotoxinkonzentrationen (analysiert mit HPLC-MS/MS) in Mischfuttermitteln. Konzentrationen unterhalb der LOQ, aber oberhalb der LOD wurden unter Verwendung des lower bound Ansatzes auf die LOD gesetzt.	53

V Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht zur EFSA-Bewertung, IARC-Einstufung und zum regulatorischen Status von AFB ₁ , STC, Methoxy-STC und OTA.	20
Tabelle 2: Methodenvalidierungsparameter für Haferkörner, einschließlich Wiederfindungsrate, relative Standardabweichung innerhalb eines Tages (intraday) und zwischen verschiedenen Tagen (interday), LOD und LOQ.....	48
Tabelle 3: Methodenvalidierungsparameter für Mischfuttermittel, einschließlich Wiederfindungsrate, relative Standardabweichung innerhalb eines Tages (intraday) und zwischen verschiedenen Tagen (interday), LOD und LOQ.....	48
Tabelle 4: Konzentrationen quantifizierter Mykotoxine in Futtermittelrohstoffen.....	51
Tabelle 5: Konzentrationen quantifizierter Mykotoxine in Mischfuttermitteln.	54
Tabelle 6: Versuchsablauf der STC Transferstudie in Milchkühen.	59
Tabelle 7: Methodenvalidierungsparameter für Milch, einschließlich Wiederfindungsrate, relative Standardabweichung innerhalb eines Tages (intraday) und zwischen verschiedenen Tagen (interday), LOD und LOQ.....	61
Tabelle 8: Methodenvalidierungsparameter für Urin, einschließlich Wiederfindungsrate, relative Standardabweichung innerhalb eines Tages (intraday) und zwischen verschiedenen Tagen (interday), LOD und LOQ.....	61
Tabelle 9: Quantifizierte STC Konzentrationen im Urin der Milchkühe.	63
Tabelle 10: Messergebnisse sowie vom Nationalen Referenzlabor für Mykotoxine und Pflanzentoxine in Lebens- und Futtermitteln des Bundesinstituts für Risikobewertung bereitgestellte statistische Auswertung und Z-Scores der Laborvergleichsuntersuchung zur Bestimmung von OTA und AFM ₁ in Hartkäse sowie in Schimmelweiskäse.....	67
Tabelle 11: Konzentrationen quantifizierter Mykotoxine in Futtermittelrohstoffen, Mischfuttermitteln und Hafer.	164
Tabelle 12: Analytische Parameter der quantitativen Bestimmung der Analyten mit HPLC-MS/MS; ESI (+) und (-) Modus; multiple reaction monitoring mode; das zweite Produktionsverfahren wurde zur Qualifikation für die Bestätigung der Identität jedes Analyten verwendet.....	171
Tabelle 13: Konzentrationen der Dotierungslösung für die Methodenvalidierung zur Mykotoxinanalytik in Mischfuttermittel und Hafer	172
Tabelle 14: Konzentrationen der Dotierungslösung für die Methodenvalidierung zur Mykotoxinanalytik in Milch.....	173
Tabelle 15: Konzentrationen der Dotierungslösung für die Methodenvalidierung zur Mykotoxinanalytik in Urin.	173

Tabelle 16: Analytische Parameter der quantitativen Bestimmung der Analyten mit HPLC-MS/MS; ESI (+) und (-) Modus; multiple reaction monitoring mode; das zweite Produkt-Ion wurde zur Qualifikation für die Bestätigung der Identität jedes Analyten verwendet.....	173
Tabelle 17: Liste der verwendeten Gefahrstoffe.	179
Tabelle 18: GHS Kennzeichnung und Bedeutung gemäß VO (EG) 1272/2008 (Europäische Kommission, 2008).	180

Kurzfassung

Mykotoxine stellen aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, ihrer Stabilität sowie ihres toxischen Potenzials eine anhaltende Herausforderung für die Lebens- und Futtermittelsicherheit dar. Neben den in bestimmten Lebensmitteln regulierten Mykotoxinen wie Aflatoxin B₁ (AFB₁) und Ochratoxin A (OTA) gelangen zunehmend auch toxisch relevante, jedoch bislang nicht regulierte biosynthetische Vorläufer von AFB₁ wie Sterigmatocystin (STC) in den Fokus der Wissenschaft. STC ist als genotoxisches und potenziell kanzerogenes Mykotoxin eingestuft, für das aufgrund fehlender Daten bislang keine Höchstgehalte festgelegt wurden, während für das strukturell verwandte Methoxysterigmatocystin (Methoxy-STC) toxikologische Hinweise vorliegen, jedoch bislang keine Risikobewertung oder regulatorische Einordnung erfolgt ist.

Die hier präsentierten Arbeiten umfassten die Untersuchung des Vorkommens ausgewählter Mykotoxine in verschiedenen Lebensmittel- und Futtermittelmatrices, die Entwicklung analytischer Methoden zur Multimykotoxinbestimmung, deren Anwendung auf Lebens- und Futtermittel sowie die Untersuchung des Transfers von STC bei Wiederkäuern. Hierzu wurden sensitive LC-MS/MS-Methoden zur simultanen Detektion mehrerer Mykotoxine etabliert und für die Quantifizierung von Aflatoxinen, STC und OTA in Käse, Futtermitteln, pflanzlichen Drinks, Milch und Urin validiert.

Pflanzliche Drinks zeigten Mykotoxinkontaminationen in Abhängigkeit von den eingesetzten Rohstoffen, was die Bedeutung rohstoff- und verarbeitungsabhängiger Einflussfaktoren hervorhebt. Zusätzlich zeigte sich, dass die analytische Erfassung von Mykotoxinen in pflanzlichen Drinks aufgrund starker Matrixeffekte methodisch anspruchsvoll ist. Enzymimmunologische Screeningverfahren erwiesen sich hierbei als matrixabhängig und nur eingeschränkt geeignet, während LC-MS/MS-Analysen eine verlässlichere qualitative und quantitative Bewertung ermöglichen.

In Futtermitteln wurden häufig OTA und STC, aber auch AFB₁, detektiert, wobei überwiegend Mehrfachkontaminationen auftraten. Ein Transferversuch mit STC in Milchkühen zeigte keinen relevanten Übergang von STC in die sekretierte Rohmilch, während geringe Mengen STC im Urin einzelner Tiere gefunden wurden. Dies liefert erste Hinweise auf einen vom bekannten AFB₁-Transfer abweichenden toxikokinetischen Verlauf von STC bei Wiederkäuern, trotz der strukturellen Ähnlichkeit beider Toxine. Gleichzeitig verdeutlicht dies den bestehenden Forschungs- und Bewertungsbedarf, insbesondere im Hinblick auf Metabolismus, Ausscheidung und mögliche Kombinationseffekte gemeinsam vorkommender Mykotoxine.

Marktstichproben von verschiedenen Käsesorten, zeigten insbesondere für geriebenen Grana-Typ Käse ein erhöhtes Mykotoxinkontaminationsrisiko mit STC und OTA, sowie den erstmaligen Nachweis von Methoxy-STC als natürlichem

Lebensmittelkontaminanten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Methoxy-STC kein quantitativ geringes relevantes Intermediat, sondern regelmäßiger Bestandteil des Sekundärstoffwechselprofils von *Aspergillus versicolor* sein könnte.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass bislang wenig betrachtete Mykotoxine wie STC und Methoxy-STC in bestimmten Lebensmittelgruppen eine relevante Expositionsquelle darstellen können und dass neben dem Vorkommen einzelner Mykotoxine auch kombinatorische Expositionen sowie matrixabhängige analytische Einflussfaktoren für zukünftige Risikobewertungen stärker berücksichtigt werden sollten.

Abstract

Mycotoxins remain a persistent challenge for food and feed safety due to their ubiquitous occurrence, their stability, and their toxic potential. In addition to mycotoxins such as aflatoxin B₁ (AFB₁) and ochratoxin A (OTA), which are regulated in certain foods, toxicologically relevant but so far non-regulated biosynthetic precursors of AFB₁, such as sterigmatocystin (STC), are increasingly becoming a focus of scientific research. STC is classified as a genotoxic and potentially carcinogenic mycotoxin for which no maximum limits have yet been established due to insufficient data, while for the structurally related methoxysterigmatocystin (methoxy-STC) toxicological indications are available, but no risk assessment or regulatory classification has yet been carried out.

The studies presented herein comprised the investigation of the occurrence of selected mycotoxins in various food and feed matrices, the development of analytical methods for multi-mycotoxin determination, their application to food and feed, as well as the investigation of the transfer of STC in ruminants. For this purpose, sensitive LC–MS/MS methods for the simultaneous detection of multiple mycotoxins were established and validated for the quantification of aflatoxins, STC, and OTA in cheese, feed, plant-based drinks, milk, and urine.

Plant-based drinks showed mycotoxin contamination depending on the raw materials used, highlighting the importance of raw material- and processing-dependent influencing factors. In addition, the analytical determination of mycotoxins in plant-based drinks proved to be methodologically challenging due to pronounced matrix effects. Enzymatic immunological screening methods were found to be matrix-dependent and only of limited suitability, whereas LC–MS/MS analyses enabled a more reliable qualitative and quantitative assessment.

In feed, OTA and STC, but also AFB₁, were frequently detected, with multiple contaminations predominating. A transfer experiment with STC in dairy cows showed no relevant transfer of STC into raw milk, whereas small amounts of STC were detected in the urine of individual animals. This provides initial indications of a toxicokinetic course of STC in ruminants that differs from the known transfer of AFB₁, despite the structural similarity of both toxins. At the same time, these findings highlight the need for further investigations, particularly with regard to metabolism, excretion, and possible combination effects of co-occurring mycotoxins.

Market samples of different cheese types showed an increased risk of mycotoxin contamination with STC and OTA, particularly in grated grana-type cheese, as well as the first detection of methoxy-STC as a natural food contaminant. The results indicate that methoxy-STC may not represent a quantitatively negligible intermediate, but rather a regular component of the secondary metabolite profile of *Aspergillus versicolor*.

Overall, the results demonstrate that previously less considered mycotoxins such as STC and methoxy-STC can represent a relevant source of exposure in certain food groups, and that in addition to the occurrence of individual mycotoxins, combined exposures as well as matrix-dependent analytical influencing factors should be more strongly considered in future risk assessments.

Einleitung

Die Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit stellt einen wichtigen Bestandteil des gesundheitlichen Verbraucherschutzes in der Europäischen Union dar. Das Vertrauen in sichere Lebensmittel ist für Verbraucherinnen und Verbraucher ein wesentliches Kriterium bei Kaufentscheidungen. Laut dem aktuellen Eurobarometer zur Lebensmittelsicherheit geben 72 % der EU-Bürgerinnen und Bürger an, persönlich stark an Lebensmittelsicherheit interessiert zu sein, und nahezu die Hälfte berücksichtigt sie als entscheidenden Faktor beim Lebensmitteleinkauf (European Commission Directorate-General for Communication, 2019, 2022, 2025). Das Bewusstsein für das Thema Lebensmittelsicherheit ist in den letzten Jahren stark angestiegen. Gleichzeitig zählen chemische Kontaminanten, einschließlich Toxinen, zu den am häufigsten genannten spontanen Sorgen im Zusammenhang mit Lebensmitteln (European Commission Directorate-General for Communication, 2025). Die rechtliche Grundlage des europäischen Lebensmittelrechts ist in der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 festgehalten. Diese definiert Lebensmittelsicherheit als Voraussetzung für das Inverkehrbringen von Lebensmitteln und legt fest, dass Lebensmittel nicht gesundheitsschädlich oder für den Verzehr ungeeignet sein dürfen. Die primäre Verantwortung für die Einhaltung dieser Anforderungen liegt bei den Lebensmittel- und Futtermittelunternehmern entlang der gesamten Produktions-, Verarbeitungs- und Vertriebskette. Zusätzlich sind Unternehmer verpflichtet, bei begründetem Verdacht auf gesundheitliche Risiken unverzüglich Rückruf- und Informationsmaßnahmen einzuleiten (Europäische Kommission, 2002b).

Ein bedeutendes Mittel zur Umsetzung des gesundheitlichen Verbraucherschutzes stellen gesetzlich festgelegte Höchstgehalte für unerwünschte Stoffe dar. Während Rückstände, z. B. von Pflanzenschutzmitteln oder Tierarzneimitteln, durch gezielte Anwendung im Lebensmittel verbleiben, handelt es sich bei Kontaminanten um Stoffe, die unbeabsichtigt ins Lebensmittel gelangen. Hierzu gehören unter anderem Umweltkontaminanten, Prozesskontaminanten sowie toxische Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, insbesondere Mykotoxine (Belitz et al., 2008). Die Festlegung von Höchstgehalten für Kontaminanten setzt voraus, dass diese Stoffe analytisch sicher erfasst, toxikologisch bewertet und ihr Vorkommen in relevanten Lebensmitteln qualitativ und quantitativ beschrieben wurden (Belitz et al., 2008; Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit, 2024). Daher werden Höchstgehalte für Kontaminanten in der Europäischen Union produktspezifisch festgelegt. Die aktuell gültige Kontaminantenverordnung (EU) 2023/915 enthält verbindliche Höchstgehalte für einige regulierte Mykotoxine, wie Aflatoxine und Ochratoxin A, jedoch nicht für alle bekannten oder potenziell relevanten Mykotoxine (Europäische Kommission, 2023b). Für zahlreiche weitere Pilzsekundärmetabolite fehlen bislang ausreichende Daten zur

Exposition und Toxizität, sodass sie regulatorisch nicht berücksichtigt werden können. Daher hat sich der Begriff *emerging mycotoxins* für Mykotoxine, die weder routinemäßig überwacht noch gesetzlich reguliert sind, deren Auftreten in Lebens- und Futtermitteln jedoch zunehmend dokumentiert wird, etabliert (Rossi et al., 2020; Vaclavikova et al., 2013). Häufig als *emerging* Mykotoxine werden unter anderem Enniatine, Beauvericin, Alternaria-Toxine und Sterigmatocystin beschrieben (Gallo et al., 2021; Khoshal et al., 2019; Kolawole et al., 2024; Kovalsky et al., 2016; Sirianusornsak et al., 2022). Diese Toxine kommen häufig gemeinsam mit regulierten Mykotoxinen vor und ihr Vorkommen wird von klimatischen Bedingungen, landwirtschaftlichen Praktiken und geografischen Faktoren beeinflusst (Gruber-Dorninger et al., 2017; Kovalsky et al., 2016; Sirianusornsak et al., 2022).

Die zunehmende Bedeutung solcher Kontaminanten wird auch in der Europäischen Union aufgegriffen, die mit der „Farm-to-Fork-Strategie“ der Europäischen Kommission das Ziel, ein faires, gesundes und nachhaltiges Lebensmittelsystem zu etablieren, das entlang der gesamten Wertschöpfungskette ein hohes Schutzniveau für Verbraucherinnen und Verbraucher gewährleistet, verfolgt. Hierbei wird die Stärkung wissenschaftlicher Grundlagen für die Risikobewertung von chemischen Gefahren in Lebensmitteln, einschließlich bislang unzureichend untersuchter Kontaminanten, genannt (Europäische Kommission, 2020).

Sowohl *emerging* Mykotoxine als auch das Vorkommen regulierter Mykotoxine in bislang wenig beachteten Lebensmittelgruppen kann eine besondere Herausforderung für die Lebensmittelsicherheit darstellen. Die Erhebung belastbarer Daten zu Vorkommen, Exposition, Transfermechanismen und toxikologischen Eigenschaften bildet daher eine grundlegende Voraussetzung für eine Risikobewertung und eine mögliche zukünftige regulatorische Einordnung.

Die Kontamination von Lebens- und Futtermitteln mit Mykotoxinen ist ein anhaltendes globales Problem, das selbst bei guter landwirtschaftlicher Praxis, sowie optimierten Lagerungs- und Verarbeitungspraktiken teils unvermeidbar ist. Dies stellt eine große Herausforderung für die Lebensmittelsicherheit dar (Alshannaq & Yu, 2017; Marin et al., 2013; Pitt, 2000). Weltweit kann die Prävalenz gesundheitsrelevanter und regulierter Mykotoxine, wie Aflatoxine, Deoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZEN), Fumonisine, Orchartoxin A (OTA) und T-2- und HT-2-Toxinen, in Nahrungspflanzen in einigen Fällen bis zu 60-80 % erreichen (Eskola et al., 2020). Ein weiteres Risiko für die Verbrauchergesundheit stellt der mögliche Transfer von Mykotoxinen aus Futtermitteln in Lebensmittel tierischen Ursprungs, wie Milch, Fleisch und Fisch, dar (Tolosa et al., 2021). Viele Mykotoxine sind aufgrund ihrer Hitzestabilität, sowie ihrer Stabilität gegenüber physikalischen und chemischen Behandlungen während der

Lebensmittelverarbeitung kaum zu reduzieren oder zu entfernen (Marin et al., 2013; Pitt, 2000).

Mykotoxine können akute und chronische toxische Wirkungen beim Menschen und bei Tieren haben, unter anderem hepatotoxische, genotoxische, kanzerogene, nephrotoxische und immunmodulatorische Effekte (Bryden, 2012; Bezerra da Rocha et al., 2014; Smith et al., 2016). Die toxischen Eigenschaften einzelner Mykotoxine können sich zudem bei gleichzeitiger Exposition verstärken, da synergistische oder additive Wirkungen für verschiedene Mykotoxinkombinationen beschrieben wurden (Golli-Bennour et al., 2010; Zhou et al., 2017; Zingales et al., 2024).

Mykotoxinbildende Schimmelpilze der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* können Lebensmittel entlang der gesamten Produktionskette kontaminieren, von der Vorernte über die Lagerung bis hin zur Verarbeitung (Bennett & Klich, 2003; Krska et al., 2008; Tanaka et al., 1988).

Mykotoxinbildende Schimmelpilze unterscheiden sich nicht nur zwischen den Gattungen, sondern auch innerhalb einzelner Gattungen deutlich hinsichtlich ihrer ökologischen Präferenzen, wie der Temperatur. Während viele *Penicillium* Arten an gemäßigte Temperaturen angepasst sind und die höchste Mykotoxinbildung im Bereich von 15 – 25 °C beschrieben wird, bevorzugen viele *Aspergillus* Arten höhere Temperatur und können auch bei Temperaturen über 30 °C wachsen und Mykotoxine bilden (Al-Zaban, 2023; Camardo Leggieri et al., 2017). Innerhalb der Gattung *Aspergillus* bestehen zudem artspezifische Unterschiede. Für einzelne Spezies wurden breite Temperaturspektren für Wachstum und OTA Bildung bis je nach Spezies zu 45 °C berichtet (Alborch et al., 2011). *Aspergillus versicolor* als Sterigmatocystin (STC) Produzent weist dagegen ein Wachstums- und Toxinproduktionsoptimum im moderaten Temperaturbereich (20 – 25 °C) auf und kann damit unter Bedingungen, wie sie während der Reifung von Hart- und Schnittkäse auftreten, ein relevantes Kontaminationspotenzial besitzen (Camardo Leggieri et al., 2017). Diese unterschiedlichen ökologischen Anpassungen können beeinflussen, welche Pilzarten sich unter bestimmten Produktions-, Reifungs- oder Lagerbedingungen durchsetzen, und bestimmen damit auch das Risiko für das Auftreten spezifischer Mykotoxine in unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes mit (Battilani et al., 2010; Casquete et al., 2017).

Fermentierte Lebensmittel wie Käse können aufgrund des beteiligten mikrobiellen Reifungsprozesses ein potenzielles Risiko für Mykotoxinkontaminationen darstellen. Filamentöse Pilze wie *Penicillium* Arten werden in manchen Käsesorten zur Aromaentwicklung eingesetzt (Gaborit et al., 2001; Gripon, 1993; Panelli et al., 2012). Allerdings können auch mykotoxinbildene Spezies wie *Aspergillus versicolor*, *Penicillium verrucosum* oder *Penicillium nordicum* während der Reifung oder Lagerung

auf dem Käselaib wachsen und Mykotoxine wie OTA oder STC produzieren (Benkerroum, 2016; Dobson, 2017; Hymery et al., 2014; Kure & Skaar, 2019; Sengun et al., 2008). Aflatoxin B₁ (AFB₁) kann in Form des monohydroxylierten Metaboliten Aflatoxin M₁ (AFM₁) als Transferprodukt aus kontaminiertem Futter in die Milch und damit in den Käse gelangen (Akbar et al., 2020; Flores-Flores & González-Peñas, 2018a, 2018b; Flores-Flores et al., 2015; Tolosa et al., 2021).

Neben klassischen Milchprodukten gewinnen zunehmend auch pflanzliche Drinks, insbesondere auf Mandel-, Hafer- und Sojabasis, an Bedeutung, was unter anderem auf veränderte Ernährungsstile und Nachhaltigkeitsaspekte zurückzuführen ist (Giugliano et al., 2023; Haas et al., 2019; Lopez et al., 2020; Sethi et al., 2016; Silva et al., 2020). Sie werden häufig als gesundheitsbewusste Alternative zu Kuhmilch wahrgenommen, können jedoch auch mit verschiedenen Mykotoxinen kontaminiert sein. Besonders relevant sind hierbei rohstoffabhängige Mykotoxinkontaminationen, da bestimmte Mykotoxine charakteristisch für einzelne Ausgangsrohstoffe sind, wie Aflatoxine in Mandeln oder Trichothecene und Sterigmatocystin in Hafer (Diaz Nieto et al., 2018; Hamed et al., 2019; Miró-Abella et al., 2017; Mol et al., 2015; Pavlenko et al., 2024).

Daher sind sensitive analytische Methoden, die den Nachweis mehrerer Mykotoxine in komplexen Lebensmittelmatrixen wie Käse oder pflanzlichen Drinks gleichzeitig ermöglichen, notwendig. Die Analyse wird durch niedrige Kontaminationsgehalte, strukturell diverse Mykotoxine sowie Matrixinterferenzen erschwert (Shephard, 2019; Stroka & Maragos, 2016; Yazdanpanah, 2011). LC-MS/MS-Methoden ermöglichen eine simultane, selektive und empfindliche Identifizierung und Quantifizierung mehrerer Toxine und ermöglichen ein umfassendes Monitoring (Capriotti et al., 2012; Rahmani et al., 2009; Turner et al., 2009; Vargas Medina et al., 2021).

Trotz zahlreicher Studien für einzelne Mykotoxine wie AFB₁, bestehen weiterhin Wissenslücken über das gemeinsame Vorkommen verschiedener Mykotoxine insbesondere Aflatoxinen mit ihren biosynthetischen Vorstufen, wie Sterigmatocystin. Aufgrund des toxischen Potentials dieser Mykotoxine sowie zusätzlicher Expositionen durch neue Lebensmittel wie pflanzliche Drinks sind Daten über Verbreitung, Konzentration und gleichzeitiges Vorkommen erforderlich, um die Entwicklung von Minimierungsstrategien zu unterstützen und eine Grundlage für zukünftige Risikobewertungen und präventive Maßnahmen in der Lebensmittelproduktion zu schaffen.

1 Theoretischer Hintergrund

1.1 Mykotoxine

Mykotoxine sind toxische sekundäre Metabolite, die von verschiedenen filamentösen Pilzen gebildet werden (Anli & Alkis, 2010; Fox & Howlett, 2008; Magan & Aldred, 2007). Abhängig von der Definition der Klassifizierung sind derzeit etwa 300 bis 400 Mykotoxine bekannt (Bennett & Klich, 2003; Berthiller et al., 2007; Hussein & Brasel, 2001). Die häufigsten Kontaminationen von Lebens- und Futtermitteln erfolgen durch mykotoxinbildende Schimmelpilze der Gattungen *Aspergillus*, *Fusarium* und *Penicillium* (Marin et al., 2013; Sweeney & Dobson, 1998). Schimmelpilze können landwirtschaftliche Erzeugnisse zu verschiedenen Zeiten, z. B. bereits auf dem Feld oder während der Lagerung, befallen und unter den verschiedensten klimatischen Bedingungen die Mykotoxine bilden (Krska et al., 2008; Marin et al., 2013; Sweeney & Dobson, 1998). Da diese toxigenen Pilze ubiquitär sind, treten trotz verschiedener Kontroll- und Reduktionsbemühungen weltweit in Nahrungs- und Futtermitteln, wie z. B. Getreide, Milchprodukten oder Nüssen, Mykotoxinkontaminationen auf (Bryden, 2012; Murphy et al., 2006). In der Europäischen Union wurden zur Lebensmittelsicherheit für verschiedene Mykotoxine in unterschiedlichen Lebensmitteln spezifische Höchstgehalte festgelegt (Europäische Kommission, 2023b). Die häufig zitierte FAO-Schätzung, wonach etwa 25 % der weltweit produzierten Nahrungsmittel von Mykotoxinkontaminationen in einem regulatorisch relevanten Bereich betroffen sind, wird von Eskola et al. (2020) im Kontext von Proben diskutiert, bei denen rund 20 % der an der Quelle beprobten Rohwaren oberhalb der unteren regulatorischen EU-Höchstgehalte bzw. der Codex-Alimentarius-Richtwerte lagen, während für lebensmitteltaugliches Getreide unter 10 % beobachtet wurden. Davon zu unterscheiden ist das tatsächliche Vorkommen oberhalb analytischer Nachweisgrenzen, das bei bis zu 60–80 % liegen kann (Eskola et al., 2020). Die Mykotoxinbildung kann entlang der gesamten Lebensmittelkette auftreten, von der Vorernte über die Ernte und Trocknung bis hin zur Lagerung. Schlechte landwirtschaftliche Praktiken sowie unsachgemäße Verarbeitung, Verpackung und Lagerbedingungen fördern das Wachstum von Schimmelpilzen und erhöhen somit das Risiko der Toxinbildung (Marin et al., 2013). Pilze, die vorwiegend während der Lagerung auf den Lebens- und Futtermitteln wachsen, sind *Aspergillus* und *Penicillium* Arten, während *Fusarium* Arten zu den Pilzen gehören, die eine Pflanze bereits auf dem Feld infizieren (Bennett & Klich, 2003; Krska et al., 2008; Tanaka et al., 1988). Obwohl von über 400 Pilzmetaboliten mit toxigenem Potenzial berichtet wurden (Mousavi Khaneghah et al., 2019), kontaminieren nur vergleichsweise wenige Mykotoxine regelmäßig Lebens- und Futtermittel. Zu diesen zählen Aflatoxine,

Ochratoxine, Fusariumtoxine wie ZEN sowie Trichothecene (Boevre et al., 2012; Bryden, 2012; Pereira et al., 2014). Dabei ist zwischen toxikologisch besonders relevanten, aber vergleichsweise selten nachgewiesenen Mykotoxinen, wie AFB₁ und STC (Prävalenz in untersuchten Futtermitteln: 22 % und 16 %) (dsm-firmenich, 2025; European Food Safety Authority, 2004a, 2013), und häufig vorkommenden Mykotoxinen mit insgesamt moderaterer toxikologischer Bewertung, wie Enniatin B, Beauvericin sowie DON (Prävalenz in untersuchten Futtermitteln: 69 %, 65 % und 82 %) (dsm-firmenich, 2025; European Food Safety Authority, 2004b; Francesca Maranghi et al., 2018), zu unterscheiden.

Mykotoxine können beim Menschen und bei Tieren in Abhängigkeit von Dosis und Expositionsdauer sowohl akute als auch chronische Wirkungen verursachen. Akute Effekte treten typischerweise nach hoher Dosis auf (z. B. Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö bis hin zu schweren systemischen Verläufen), während chronische Wirkungen nach wiederholter Exposition gegenüber niedrigeren Dosen u. a. hepatotoxische, genotoxische, immunsuppressive, estrogen, nephrotoxische, teratogene oder karzinogene Effekte umfassen können (Alshannaq & Yu, 2017; Bryden, 2012; Bezerra da Rocha et al., 2014; Smith et al., 2016). Mykotoxinkontaminationen stellen eine große Herausforderung für die Lebensmittelsicherheit weltweit dar, da selbst unter Anwendung guter landwirtschaftlicher, Lagerungs- und Verarbeitungspraktiken eine Kontamination oft als unvermeidliches und unvorhersehbares Problem gilt (Marin et al., 2013; Pitt, 2000). Aufgrund der Stabilität der Mykotoxine gegenüber Hitze, sowie physikalischen und chemischen Behandlungen sind diese schwierig unschädlich zu machen (Alshannaq & Yu, 2017). Auch mittelbar stellen Mykotoxine eine Gefahr für die Lebensmittelsicherheit dar, da sie durch den sogenannten „*carry-over*“-Effekt aus kontaminierten Futtermitteln in Produkte tierischen Ursprungs wie Milch, Fleisch oder Eier übergehen und somit die Sicherheit der menschlichen Verbraucher beeinträchtigen können (Becker-Algeri et al., 2016; Richard, 2007).

Obwohl allgemein Schimmelpilze als unerwünscht in Lebensmitteln angesehen werden, ist bei verschiedenen Fleisch- und Käseprodukten das Wachstum einer Mikrobiota, welche für die geografische Umgebung charakteristisch ist, aus der das Lebensmittel stammt, wichtig insbesondere für die Entwicklung charakteristischer Geschmacks- und Aromastoffe (Altafini et al., 2021; Capozzi et al., 2017). Zur Bildung bestimmter Aromen werden einige Schimmelpilze Lebensmitteln absichtlich zugesetzt, wie bei Blauschimmelkäse z. B. Roquefort und Gorgonzola, Käse, der mit Oberflächenschimmel gereift ist, wie Camembert oder Brie (Dall'Asta et al., 2008; Galli et al., 2016; Marín et al., 2015), und Fleischprodukten wie Schinken, Speck oder Trockenwürsten (Altafini et al., 2021).

Bereits bei geringen Konzentrationen können Mykotoxine aufgrund ihrer toxikologischen Wirkungen negative Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch und Tier haben (Bryła et al., 2018).

1.1.1 Aflatoxine

Aflatoxine, wovon AFB₁ das bisher stärkste bekannte natürlich vorkommende Karzinogen ist, werden von verschiedene *Aspergillus* Arten produziert. Die größte landwirtschaftliche Bedeutung haben *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* (Cary et al., 2009; Theumer et al., 2018). *A. flavus* ist an warme und trockene Bedingungen angepasst, weshalb Kulturen in tropischen und subtropischen Regionen besonders häufig und stark kontaminiert sind, während gemäßigte Gebiete infolge des Klimawandels zunehmend an Bedeutung gewinnen könnten (Battilani et al., 2016; Payne, 1998).

Aflatoxine sind Difurocumarinderivate, von denen AFB₁, B₂, G₁ und G₂, sowie der monohydroxylierte Metabolit AFM₁ am häufigsten vorkommen (Mishra & Das, 2003). Der Aflatoxin-Biosyntheseweg umfasst mindestens 23 enzymatische Reaktionen und beinhaltet mindestens 15 strukturell charakterisierte Zwischenprodukte (Theumer et al., 2018; Yu, 2012; Yu et al., 2004). Mehrere dieser Intermediate wurden in kontaminierten Lebens- und Futtermitteln nachgewiesen (Streit et al., 2013; Varga et al., 2013). Obwohl der Biosyntheseweg in weiten Teilen aufgeklärt ist, sind einzelne Reaktionsschritte sowie die Funktion einzelner Cluster-Gene weiterhin nicht abschließend charakterisiert (Yu, 2012; Yu et al., 2004).

Die reaktiven Bereiche des AFB₁ sind zum einen die Doppelbindung in 8,9-Position am Furofuranring, sowie der Lactonring im Cumaringerüst, der leicht hydrolysiert werden kann und daher anfällig für Transformationen ist (Mishra & Das, 2003). Versicolorin A (VerA) ist die erste biosynthetische Vorstufe von AFB₁, die einen Furofuranring enthält (Abbildung 1) (Gauthier et al., 2020). Die beiden biosynthetischen Vorstufen STC und VerA, die eine dem AFB₁ ähnliche Struktur aufweisen, besitzen statt der Cumarineinheit des AFB₁ eine Xanthoneinheit (Diaz Nieto et al., 2018; Wong et al., 1977).

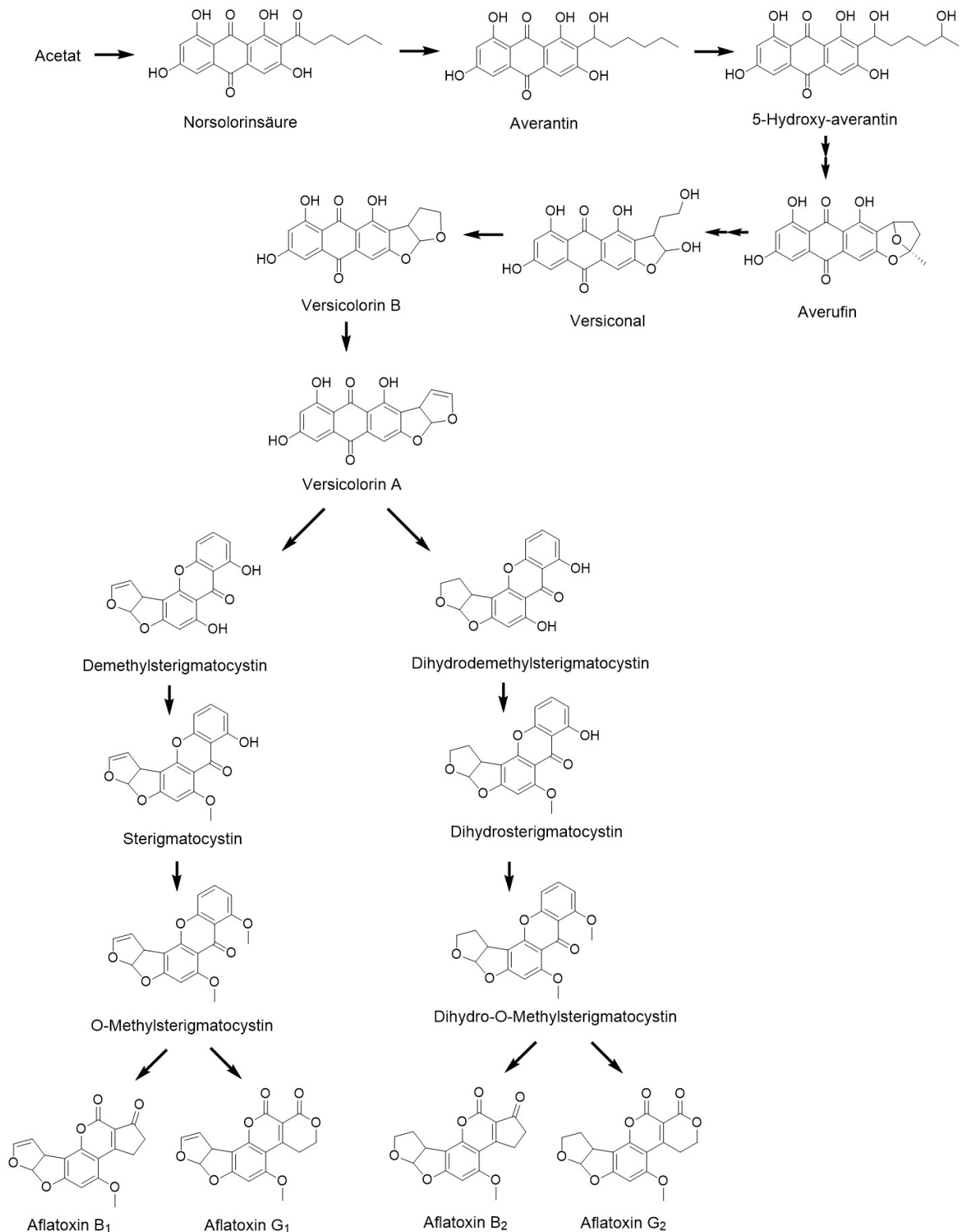


Abbildung 1: Biosyntheseweg von Aflatoxin B₁, G₁, B₂ und G₂ modifiziert nach Theumer et al. (2018).

AFB₁ führt zu Mutagenität, Hepatotoxizität, Immuntoxizität und Karzinogenität (Ostry et al., 2017; Rushing & Selim, 2019). Innerhalb der Aflatoxine gilt AFB₁ als besonders toxisch. Die Genotoxizität beruht nicht auf der Verbindung selbst, sondern auf dem

ersten Schritt des AFB₁ Metabolismus zum AFB₁-8,9-Epoxid. Das AFB₁-8,9-Epoxid reagiert mit zellulären Nukleophilen, insbesondere mit DNA, und bildet dabei kovalente DNA-Addukte wie 8,9-dihydro-8(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB₁. Diese DNA-Läsionen können bei unvollständiger oder fehlerhafter Reparatur bzw. während der Replikation Mutationen induzieren (Benkerroum, 2020; Dai et al., 2017; Dunn et al., 1982; Mishra & Das, 2003; Raney, Harris, et al., 1992). Das genotoxische Potential von AFB₁, welches abhängig von den Bioaktivierungseigenschaften der Zellen ist, kann durch mehrere Metabolismuswege, die sich nicht gegenseitig ausschließen und möglicherweise kombiniert stattfinden, entstehen (Theumer et al., 2018).

Im Phase I-Metabolismus wird AFB₁ durch hepatische mikrosomale Cytochrom-P450-Enzyme (CYP450) zu dem reaktiven und elektrophilen exo-AFB₁-8,9-Epoxid (AFBO) bioaktiviert (Deng et al., 2018; Dohnal et al., 2014; Guengerich et al., 1998; Guengerich et al., 1996; Rawal et al., 2010), welches kovalent an Proteine und DNA bindet (Eaton & Gallagher, 1994; Johnson & Guengerich, 1997; McLean & Dutton, 1995; Stark et al., 1979). Diese Addukte führen zu chronischer und akuter Zytotoxizität und können DNA-Mutationen verursachen. Zur Ausscheidung von Aflatoxinen über die Galle oder den Harn werden diese exogenen Verbindungen nach oxidativen Phase I-Reaktionen im Phase II-Metabolismus häufig mit Glucuronsäure, Sulfat oder Glutathion konjugiert, wobei die Glutathion-S-Transferasen eine zentrale Rolle spielen (Cabaret et al., 2011; Fatemi et al., 2006; Guengerich et al., 1998; Guengerich et al., 1996; Raney, Meyer, et al., 1992).

Die Toxizität von AFB₁ ist abhängig vom Metabolismus, welcher durch Epoxidierung zum toxischen AFBO, durch Ketoreduktion zum weniger toxischen Aflatoxicol, durch Hydroxylierung zum schwach toxischen AFM₁ und AFQ₁, sowie durch Demethylierung zu AFP₁ führen kann (Deng et al., 2018; Karabulut et al., 2014; McLean & Dutton, 1995; Wu et al., 2009; Yunus et al., 2011). Die speziesabhängig sehr unterschiedliche toxische Wirkung von AFB₁ steht im Zusammenhang mit den unterschiedlichen CYP450-Isoenzymen und deren Beteiligung am AFB₁-Metabolismus (Deng et al., 2018; Dohnal et al., 2014; Rawal et al., 2010; Wu et al., 2009) sowie der Konzentrationen hepatischer Glutathion-S-Transferasen (Raney, Meyer, et al., 1992; Yabe et al., 1988). Die Einstufung von AFB₁ durch die International Agency for Research on Cancer (IARC) sowie die Bewertungsansätze der EFSA sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

Aufgrund der toxikologischen Relevanz ist für die Risikoeinordnung entscheidend, welche Expositionsszenarien aus dem Vorkommen von Aflatoxinen in Futtermitteln und Lebensmitteln resultieren. Verschiedene Getreidearten wie Mais, Reis, Gerste und Sorghum, sowie Nüsse und ölhaltige Samen, wie Erdnüsse, Pistazien, Mandeln,

Haselnüsse, Cashewkerne, Paranüsse und Baumwollsaamen können mit Aflatoxinen kontaminiert sein, wobei regionale Unterschiede in der Belastung auftreten (Alshannaq & Yu, 2017; Bennett & Klich, 2003; Boevre et al., 2012; European Food Safety Authority, 2007; Rushing & Selim, 2019). Gewürze, wie Kreuzkümmel, Pfeffer und Chili (Ali et al., 2015; Prella et al., 2014; Rushing & Selim, 2019; Tansakul et al., 2013), und getrocknete Früchte, wie Feigen, Datteln, Rosinen und Aprikosen können mit Aflatoxinen kontaminiert sein (Ghali et al., 2010; Heshmati et al., 2017; Kabak, 2016; Kollia et al., 2014; Masood et al., 2015; Rushing & Selim, 2019).

Einige Mykotoxine können neben dem direkten Verzehr kontaminierter Lebensmittel auch indirekt über Gewebe oder Milch und -produkte in die menschliche Nahrungskette gelangen, wenn Tiere mit beispielweise aflatoxinkontaminiertem Futter gefüttert wurden. Laktierende Tiere metabolisieren das AFB₁ zu monohydroxyliertem AFM₁, welches aus dem kontaminierten Futter (AFB₁) z. B. in die Milch (AFM₁) übergeht (*carry-over*) (Akbar et al., 2020; Flores-Flores & González-Peñas, 2018a, 2018b; Flores-Flores et al., 2015; Tolosa et al., 2021). Nicht nur Milch, sondern auch Milchprodukte wie Käse können mit AFM₁ kontaminiert sein, da AFM₁ eine Affinität zu Casein besitzt und dadurch im Käsebruch angereichert wird (Alshannaq & Yu, 2017; Barbiroli et al., 2007), wobei ein erheblicher Anteil mit der Molke abgetrennt wird (ca. 40–44 %) (Govaris et al., 2001).

1.1.2 Sterigmatocystin

STC wurde erstmals aus *Aspergillus versicolor* isoliert (Rank et al., 2011) und wird von mehr als 55 Pilzspezies produziert (Rank et al., 2011). *A. versicolor* und *Aspergillus nidulans* werden als häufigste Quellen für STC-Kontaminationen in Lebens- und Futtermitteln beschrieben (European Food Safety Authority, 2013), während andere Pilzspecies der Gattung *Aspergillus*, wie *A. flavus*, *A. parasiticus* oder *A. ochraceus*, STC nur als Vorläufer im AFB₁-Biosyntheseweg (Abbildung 1) produzieren und es in der Regel nicht in größeren Mengen akkumulieren (Diaz Nieto et al., 2018; Frisvad et al., 2005; Rank et al., 2011; Sweeney & Dobson, 1999; Yu et al., 2004). Die Biosynthesewege der Aflatoxine und von STC zeigen eine weitgehende Übereinstimmung der beteiligten Gene bzw. Enzymfunktionen, wobei sich die letzten beiden Reaktionsschritte unterscheiden (Abbildung 1) (Yu et al., 2004). Die 25 identifizierten an der Aflatoxinbiosynthese beteiligten Gene liegen innerhalb einer 70-kb DNA Region in der Pilz-DNA (Townsend, 1986; Yu et al., 1995; Yu et al., 2004). Die Umwandlung von STC zu O-Methylsterigmatocystin (OMSTC) und Dihydrosterigmatocystin (DHSTC) zu Dihydro-O-methylsterigmatocystin (DHOMSTC) erfolgt durch das Enzym O-Methyltransferase A (Yu, 2012; Yu et al., 1993) kodiert

durch das Gen *aflP* (Yu et al., 2004), welches in *A. parasiticus*, *A. flavus* und weiteren aflatoxigenen sowie nicht-aflatoxigenen *Aspergillus*-Arten nachgewiesen wurde (Klich et al., 1995; Yu, 2012). Aufgrund des Fehlens des *aflP*-Genorthologs produziert *Aspergillus nidulans* STC als Endprodukt anstelle des AFB₁ (Yu, 2012; Yu et al., 2004). STC wurde in verschiedenen Studien als karzinogen (European Food Safety Authority, 2013; S. Huang et al., 2014; Pfeiffer et al., 2014), vor allem hepatokarzinogen (Liu et al., 2014), genotoxisch (Gao et al., 2015) und zytotoxisch (Bünger et al., 2004) beschrieben. In Kombination mit andere Mykotoxinen, könnte das gemeinsame Vorkommen in geringen Konzentrationen z. B. in Lebensmitteln die toxischen Wirkungen der einzelnen Mykotoxine verstärken (Diaz Nieto et al., 2018; Zouaoui et al., 2016). Die IARC-Einstufung sowie die zentralen Bewertungsansätze der EFSA für STC sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bisher sind keine Höchstgehalte in der EU für STC festgelegt (Diaz Nieto et al., 2018).

Von den biosynthetischen Vorstufen des AFB₁ besitzen nur STC und Versicolorin A (VerA) ein genotoxisches Potential (Theumer et al., 2018). Je nach toxikologischer Endpunktbetrachtung weisen diese Aflatoxinvorläufer im Vergleich zu AFB₁ ein ähnliches und sogar teilweise stärkeres genotoxisches Potential und karzinogene Kapazität auf (Tabata, 2022; Theumer et al., 2018). Dies ist vermutlich auf unterschiedliche genotoxische Wirkmechanismen, an denen spezifische Bioaktivierungswege beteiligt sind, zurückzuführen (Theumer et al., 2018).

In der Literatur werden zwei verschiedene mögliche Mutagenitätsmechanismen von STC beschrieben. Bei dem ersten Reaktionsweg würde eine Epoxidgruppe, ähnlich wie bei AFB₁ (Deng et al., 2018), gebildet werden, wobei eine metabolische Aktivierung an der gleichen Stelle der Difurangruppe wie für das AFB₁ angenommen werden kann (Applebaum et al., 1982; Kiessling, 1986; Wong et al., 1977). Unter Bildung von STC-N7-Guanin-Addukten würde dies beispielweise kovalent an die DNA gebunden werden (Diaz Nieto et al., 2018; Essigmann et al., 1979; Gopalakrishnan et al., 1992). Die zweite Möglichkeit wäre eine Hydroxylierung des aromatischen Rings zu einem Catechol, welches mit der DNA reagieren könnte (Pfeiffer et al., 2014). Pfeiffer et al. (2014) zeigten in *in vitro*-Untersuchungen mit Lebermikrosomen von Menschen und Ratten, dass hauptsächlich das Catechol und nur geringe Mengen des Epoxids gebildet wurden, was darauf hindeutet, dass der Epoxidstoffwechselweg weniger bedeutend als der Catecholstoffwechselweg ist.

Durch Pilzbefall insbesondere nach der Ernte kann STC in Getreide und Getreideprodukten (Hafer, Roggen, Weizen, Mais, Reis) (Alkadri et al., 2014; Bertuzzi et al., 2017; Mol et al., 2015; Ok et al., 2016; Tian & Liu, 2004; Uhlig et al., 2013; Veršilovskis & Bartkevičs, 2012; Veršilovskis et al., 2008), aber auch in grünen

Kaffeebohnen, Gewürzen (El-Kady et al., 1995; Saxena & Mehrotra, 1989; Yogendrarajah et al., 2014), Nüssen, Hülsenfrüchten (Soja, Erdnüsse) (Abia et al., 2013; Manizan et al., 2018; Nomura et al., 2018; Ogara et al., 2017; Warth et al., 2012) sowie auf der Oberfläche des Käselaibs, während der Reifung und Lagerung, vorkommen (Battilani et al., 2009; Lund et al., 1995; Mol et al., 2015; Northolt et al., 1980; Veršilovskis & De Saeger, 2010).

Eine Exposition gegenüber STC kann auch durch eine Innenraumkontamination von z. B. feuchten Häusern, mit *A. versicolor* erfolgen (Diaz Nieto et al., 2018; Engelhart et al., 2002; Jakšić Despot & Šegvić Klarić, 2014; Nielsen et al., 1999; Tuomi et al., 2000).

1.1.2.1 Methoxysterigmatocystin

Methoxysterigmatocystin (Methoxy-STC) ist strukturell eng mit STC verwandt und unterscheidet sich lediglich durch das Vorhandensein einer Methoxygruppe (Abbildung 2). *Aspergillus*-Arten wie *Aspergillus versicolor* bilden Methoxy-STC, teilweise in deutlich höheren Mengen als STC (Nielsen, 2002; Nielsen et al., 1999). Aflatoxin produzierende Spezies wie *A. flavus* hingegen synthetisieren Methoxy-STC nicht (Schamann et al., 2022).

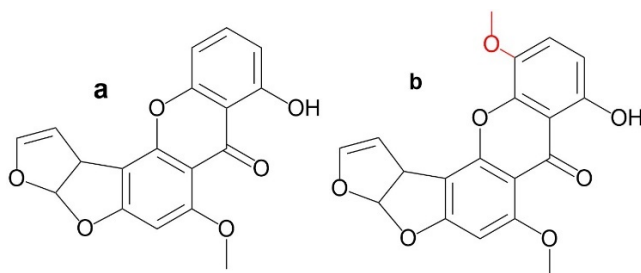


Abbildung 2: Strukturformeln von (a) Sterigmatocystin und (b) Methoxysterigmatocystin.

Methoxy-STC zeigt in Zellassays mutagene Eigenschaften (Jakšić et al., 2020; Jakšić et al., 2012) und eine zehnmal stärkere Zytotoxizität als STC (Dabelić et al., 2021), welches vermutlich auf durch die Methoxygruppe verbesserten Bioverfügbarkeit zurückzuführen ist (Dabelić et al., 2021; Jakšić et al., 2012). STC und Methoxy-STC sind genotoxisch, wobei STC ein höheres Potential aufweist. Die Kombinationen dieser Toxine führt in nicht-zelltoxischen Konzentrationen zu additiven bis antagonistischen zytotoxischen und genotoxischen Effekten in Zellkulturexperimenten (Dabelić et al., 2021). Pfeiffer et al. (2014) zeigten, dass hepatische Mikrosomen von Menschen und Ratten STC und Methoxy-STC überwiegend zu Catechol metabolisieren, was zu den toxischen und genotoxischen Effekten dieser Mykotoxine beitragen könnte. *In vivo* Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass Methoxy-

STC gemeinsam mit STC zur Toxizität von durch *Aspergillus versicolor* kontaminierten Lebensmitteln beitragen kann (Ohtsubo et al., 1978).

Für Methoxy-STC liegen derzeit keine EFSA-Bewertung und keine IARC-Einstufung vor.

Methoxy-STC wurde bislang nicht als möglicher Lebensmittelkontaminant beschrieben, jedoch lässt sich vermuten, dass unter bestimmten Bedingungen einige Pilze dieses Toxin in Kombination mit STC bilden können. Aufgrund des relevanten mutagenen und toxischen Potenzial von Methoxy-STC, ist es somit auch im lebensmitteltoxikologischen Kontext von Bedeutung.

1.1.3 Ochratoxine

Ochratoxine, von denen das am häufigsten vorkommende und toxischste Ochratoxin A ist, werden von verschiedenen Pilzspezies der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*, wie *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum* und *Penicillium nordicum* gebildet (Bui-Klimke & Wu, 2015; El Khoury & Atoui, 2010; European Food Safety Authority, 2020). OTA besitzt einen Chlor-Substituenten, welcher vermutlich für die Toxizität relevant ist, während Ochratoxin B die nicht chlorierte Form und Ochratoxin C den Ethylester von OTA darstellt (Abbildung 3) (European Food Safety Authority, 2020).

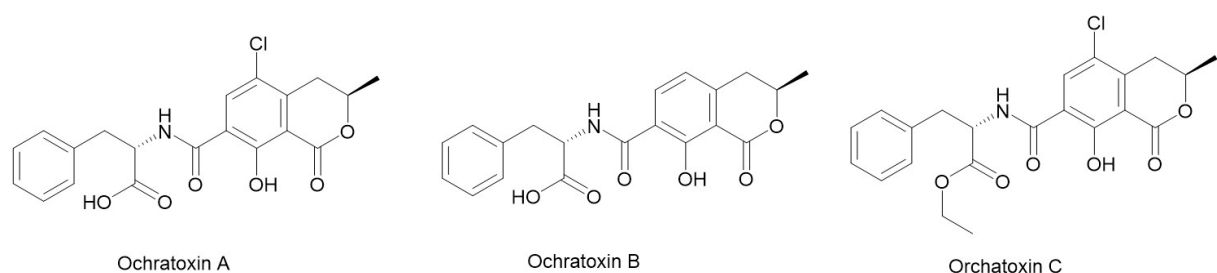


Abbildung 3: Strukturformeln von Ochratoxin A, Ochratoxin B und Ochratoxin C.

Der Biosyntheseweg der Ochratoxine ist nicht vollständig bekannt, nur dass der Phenylalaninanteil aus dem Shikimatweg und der Dihydroisocoumarinanteil aus dem Polyketidweg stammt ist geklärt (Heussner & Bingle, 2015).

OTA ist akut nephrotoxisch und hepatotoxisch und führt bei einer chronischen Exposition zu schweren Nierenschäden, ebenso ist es sowohl für Mensch als auch Tier als immunotoxisch, genotoxisch, neurotoxisch, teratogen und embryotoxisch beschrieben, wobei die Toxizität ja nach Geschlecht und Art variiert (Heussner & Bingle, 2015; Malir, Ostry, & Novotna, 2013; Malir et al., 2016; Malir, Ostry, Pfohl-Leszkowicz, et al., 2013; Mantle, 2002; O'Brien et al., 2001; Pfohl-Leszkowicz &

Manderville, 2007; Pitt, 2000; Sava et al., 2006; Sava et al., 2007; Weidenbach & Petzinger, 2004). Des Weiteren deuten verschiedene Studien darauf hin, dass sowohl OTA als auch AFB₁ die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Niaz et al., 2020; Qureshi et al., 2015).

Das hauptsächliche Zielorgan der toxischen Wirkung von OTA ist die Niere (Duarte et al., 2011; Hagelberg et al., 1989; International Agency for Research on Cancer, 1993; Krogh, 1972; Kuiper-Goodman & Scott, 1989; World Health Organization, 2002). Die nephrotoxische Wirkung von OTA bei Tieren hängt vermutlich mit oxidativem Stress zusammen. Zusätzlich ist OTA in höheren Dosen immun- und neurotoxisch, sowie teratogen (European Food Safety Authority, 2020). Zusätzlich hemmt OTA die makromolekulare Synthese und mitochondriale Atmung und erhöht die Lipidperoxidation (Bui-Klimke & Wu, 2015; Kuiper-Goodman & Scott, 1989; Marquardt & Frohlich, 1992). Obwohl der genotoxische Wirkmechanismus nicht abschließend geklärt ist, wird vermutet, dass DNA-Schäden eher durch oxidativen Stress als durch eine direkte Wechselwirkung mit OTA verursacht werden (European Food Safety Authority, 2020). Die Bioaktivierung von OTA erfolgt durch Cytochrom-P450-Enzyme zu einem Benzochinon-Elektrophil und zu Radikalen durch Peroxidasen. Diese Elektrophile bilden mit Desoxyguanosin Addukte (El Khoury & Atoui, 2010; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2008; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

Die IARC-Einstufung sowie die zentralen Bewertungsansätze der EFSA für OTA sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Verschiedene Getreide, wie Mais, Weizen, Reis, Hafer, sowie Produkte auf Getreidebasis, z. B. Brot, Mehl und Teigwaren, aber auch Tee, Kaffee, Milch, Käse, Fleischprodukte und Trockenfrüchte sind typische mit OTA kontaminierte Lebensmittel (Chen et al., 2018; Fink-Gremmels, 2005; Gagliano et al., 2006). Kürzlich wurde OTA vor allem auch in geriebenem Hartkäse gefunden (Altafini et al., 2021).

Der Hauptproduzent von OTA in gelagertem Getreide ist *P. verrucosum*, während *P. nordicum* in gereiften Fleischprodukten, wie Salami oder Schinken, als Hauptproduzent von OTA identifiziert wurde (El Khoury & Atoui, 2010; Geisen et al., 2004; Larsen et al., 2001; Lund & Frisvad, 2003; Pitt, 1987).

1.1.4 Bewertung und Einstufung

Da die toxikologische Bewertung (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA)) und Einstufung (Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC)) der in dieser Arbeit betrachteten Mykotoxine zwischen den Substanzen deutlich variieren, sind die zentralen Bewertungen und Einstufungen in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

Die EFSA leitet, sofern die Datenlage dies erlaubt, gesundheitsbasierte Richtwerte („health-based guidance values“ (HBGV) z. B. „tolerable daily intake“ (TDI), „tolerable weekly intake“ (TWI), akute Referenzdosis (ARfD)) ab, die eine direkte Einordnung von Expositionsdaten ermöglichen. Für genotoxisch-karzinogene Stoffe werden in der Regel keine HBGV abgeleitet, stattdessen erfolgt die Risikobeschreibung häufig mittels „margin of exposure“ (MOE) Ansatz. Dabei wird die geschätzte Exposition ins Verhältnis zu einem Referenzpunkt wie der BMDL10 (untere Konfidenzgrenze der Benchmark-Dosis für eine 10 %-Response) gesetzt.

Die IARC-Einstufungen basieren auf der Gefahrenidentifikation und beschreiben die Evidenz für eine karzinogene Wirkung beim Menschen bzw. im Tierversuch.

Tabelle 1: Übersicht zur EFSA-Bewertung, IARC-Einstufung und zum regulatorischen Status von AFB₁, STC, Methoxy-STC und OTA.

Mykotoxin	EFSA Bewertung	IARC Gruppierung	Regulatorischer Status
AFB₁	Genotoxisch und kanzerogen; keine HBGV; MOE-Ansatz; Referenzpunkt: BMDL10 = 0.4 µg/kg KG/Tag (Ratte)	Gruppe 1 (kanzerogen für Menschen) (International Agency for Research on Cancer, 2002)	Reguliert (EU- Höchstgehalte je Matrix); VO (EU) 2023/915; Richtlinie 2002/32/EG
STC	Genotoxisch und kanzerogen; keine HBGV; MOE-Ansatz prinzipiell; Risikobewertung nicht möglich wegen unzureichender Expositionsdaten; Referenzpunkt: BMDL10 = 0.16 mg/kg KG/Tag (Ratte)	Gruppe 2B (möglicherweise kanzerogen für Menschen) (International Agency for Research on Cancer, 1987)	Toxikologische Hinweise vorhanden, aber keine regulatorische Einordnung
Methoxy- STC	-	-	Toxikologische Hinweise vorhanden, aber keine regulatorische Einordnung
OTA	Genotoxisch (<i>in vitro/in vivo</i> ; Mechanismus nicht abschließend geklärt); keine HBGV; MOE-Ansatz; Referenzpunkt: BMDL10 = 4.73 µg/kg KG/Tag (nicht neoplastisch, Schwein) und 14.5 µg/kg KG/Tag (neoplastisch, Ratte)	Gruppe 2B (möglicherweise kanzerogen für Menschen) (International Agency for Research on Cancer, 1993)	Reguliert (EU- Höchstgehalte je Matrix); VO (EU) 2023/915; Empfehlung 2006/576/EG

HBGV: gesundheitsbasierter Richtwert; BMDL10: untere Konfidenzgrenze der Benchmark-Dosis für 10 % Response; MOE: Margin of Exposure; KG: Körpergewicht

1.1.5 Kombinationstoxizität

Die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Mykotoxinen können die individuelle Toxizität verändern, welches zu unterschiedlichen toxischen Endergebnissen im Vergleich zu den Einzelsubstanzen führen kann (Crudo et al., 2019).

Verschiedene Faktoren, wie die Molekülstruktur, Anzahl der Mykotoxine und die Absorptionsrate, beeinflussen die Wechselwirkungen zwischen gemeinsam vorkommenden Mykotoxinen. Als synergistisch bzw. antagonistisch werden Wechselwirkungen, die größer bzw. kleiner sind als die Summe der Einzeleffekte beschrieben. Bei keiner Wechselwirkung innerhalb einer Mykotoxinmischung hingegen handelt es sich um additive Wirkungen (Karsauliya et al., 2022; Speijers & Speijers, 2004; Zingales et al., 2024).

Die Risikobewertung einer Mykotoxinexposition erfolgt in der Regel auf Grundlage toxikologischer Daten aus Studien zur Exposition gegenüber Einzelsubstanzen und berücksichtigt damit die Auswirkungen einer gleichzeitigen Exposition gegenüber mehreren Mykotoxinen nicht. Durch die vielseitige Ernährung des Menschen ist eine Exposition von komplexen und verschiedenen Kombinationen von Mykotoxinen möglich, die aus unterschiedlichen Lebensmitteln stammen, welche von verschiedenen mykotoxinbildenden Pilzen kontaminiert wurden (Carballo et al., 2019; Stoev, 2023; Zingales et al., 2024). Zingales et al. (2024) nehmen an, dass die Toxizität von Mykotoxinmischungen anhand der individuellen Wirkungen schwierig vorherzusagen ist, da die individuell beobachtete toxische Wirkung durch die Wechselwirkungen zwischen den Bestandteilen verstärken oder verringern können.

Mehrere Studien zeigen additive oder synergistische Wechselwirkungen zwischen gemeinsam vorkommenden Mykotoxinen bereits bei niedrigen Expositionsniveaus im Bereich von *no-effect*-Leveln (Grenier & Oswald, 2011; Francesca Maranghi et al., 2018; Smith et al., 2016; Tammer et al., 2007). Dies lässt auf ein potenzielles Problem der Unterschätzung des tatsächlichen Gesundheitsrisikos schließen (Zingales et al., 2024).

Hou et al. (2018) zeigten in Alveolarmakrophagen von Schweinen, dass die Kombination von AFB₁ und OTA die Immuntoxizität verstärken könnte. In Vero-Zellen wurden hingegen für AFB₁ und OTA additive Wirkungen bezüglich der Genotoxizität und Zytotoxizität im Vergleich zu den einzelnen Mykotoxinen beschrieben (Golli-Bennour et al., 2010). Eine weitere Kombinationstoxizitätsstudie zeigte für die Kombination aus AFB₁ und DON additive Effekte und bei einer tertiären Mischung aus AFB₁, DON und ZEN sogar synergistische Effekte in der Leberkarzinomzelllinie HepG2 (Zhou et al., 2017). Für andere Mykotoxine, wie die *Alternaria*-Toxine, wurden gleichermaßen additive, synergistische oder antagonistische Wirkungen in

Abhängigkeit von der Konzentration, Expositionszeit und Art der untersuchten Kombinationen, beschrieben (Crudo et al., 2019).

Zingales et al. (2024) zeigten, dass die Koexposition von STC, OTA und Patulin in Sphäroidmodellen im Vergleich zur Einzelstoffexposition eine erhöhte Zytotoxizität und hauptsächlich synergistische Wechselwirkungen aufwiesen.

AFB₁ zeigte verschiedene genotoxische Potentiale in unterschiedlichen Zelllinien in Abhängigkeit von den Fähigkeiten der Zellen Phase I- und II-Metabolite zu bilden (Theumer et al., 2018). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Aflatoxine durch CYPs bioaktiviert werden zu müssen, um DNA-Schäden hervorrufen zu können (Oda et al., 2001). Für die Genotoxizität von AFB₁ in Zellen mit geringer CYPs-Bioaktivierungskapazität können CYPs-unabhängige Aktivierungsmechanismen von AFB₁ relevant sein, z. B. durch die Prostaglandin-H-Synthase (Battista & Marnett, 1985) und/oder die Induktion von oxidativem Stress (Guindon et al., 2007; Parveen et al., 2014). Demnach besitzen Aflatoxine verschiedene unabhängige genotoxische Wirkmechanismen bedingt durch spezifische Bioaktivierungspfade. Da diese Wege sich vermutlich nicht ausschließen, können, abhängig von den Bioaktivierungseigenschaften der Zellen, bei einigen Verbindungen mehrere Wege für die Genotoxizität verantwortlich sein (Theumer et al., 2018). Aufgrund der Abhängigkeit der toxischen Wirkung der einzelnen Mykotoxine vom Zellmodell und der verwendeten Konzentrationen, ist die Bewertung von Kombinationswirkungen nicht einfach (Crudo et al., 2019).

Die Voraussetzungen für ein gemeinsames Vorkommen von AFB₁ und dessen biosynthetischen Vorläufer wie STC sowie OTA sind durch die Biosynthese bzw. die Tatsache, dass Futter- und Lebensmittel von mehreren Pilzen kontaminiert werden können, gegeben (Reddy et al., 2010; Streit et al., 2012).

1.2 Analytik von Mykotoxinen

Die Analytik der Mykotoxine ist aufgrund geringen Kontaminationsgehalte, komplexer Lebensmittelmatrices, der großen Vielfalt chemischer Strukturen und des gemeinsamen Vorkommens verschiedener Mykotoxine herausfordernd (Shephard, 2019; Stroka & Maragos, 2016; Yazdanpanah, 2011). Da Mykotoxine in Lebens- und Futtermitteln häufig in sehr geringen Konzentrationen vorkommen, sind empfindliche analytische Methoden erforderlich. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD/LOQ) sollten daher möglichst niedrig angesetzt werden, um in zukünftigen Überwachungsprogrammen Daten für eine aussagekräftige Risikobewertung zu liefern, vor allem wenn keine spezifischen Höchstgehalte festgelegt sind. Entsprechend sind spezifische Extraktions-, Reinigungs-, Trennungs-, und

Nachweismethoden erforderlich, basierend auf einer Probenvorbereitung, chromatografischer Trennung gefolgt von einer Detektion (Krska et al., 2008), wie Dünnschichtchromatographie (TLC), Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) in Verbindung mit FLD-, UV-, DAD- oder MS-Detektion, Gaschromatographie (GC) in Verbindung mit ECD-, FID- oder MS-Detektion, Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC) oder Enzymimmunoassay (ELISA) (Alshannaq & Yu, 2017; Krska et al., 2008; Turner et al., 2015).

1.2.1 Probenvorbereitung

Durch die begrenzte Empfindlichkeit und Spezifität spektrometrischer Detektoren ist eine Aufreinigung des zu analysierenden Stoffes aus einer Vielzahl gemeinsam extrahierter Matrixbestandteile und manchmal eine Aufkonzentrierung erforderlich (Shephard, 2019). Die chemischen Eigenschaften der Mykotoxine, die Beschaffenheit der Lebensmittelmatrix und die verwendete Nachweismethode sind die Hauptfaktoren zur Auswahl der Extraktions- und Aufreinigungsmethode (Alshannaq & Yu, 2017; Ridgway & Scientific, 2012).

Für eine flüssige Lebensmittelmatrix, z. B. Milch, erfolgt meist eine Flüssig-Flüssig-Extraktion, während für feste Materialien, z. B. Getreide, eine Fest-Flüssig-Extraktion zur Abtrennung der Mykotoxine verwendet wird, meist mit einer Mischung aus organischem Lösungsmittel, z. B. Methanol oder Acetonitril, und Wasser in einem sauren Milieu (Alshannaq & Yu, 2017; Krska, 1998; Pereira et al., 2014; Rahmani et al., 2009; Ridgway & Scientific, 2012; Turner et al., 2009). Durch die Verwendung eines sauren Lösungsmittels können die Bindungen zwischen dem Analyten und anderen Lebensmittelkomponenten wie Proteine oder Zucker aufbrechen und somit die Extraktionseffizienz verbessern (Alshannaq & Yu, 2017; Rahmani et al., 2009). Proben mit hohem Lipidgehalt können zusätzlich mit unpolaren Lösungsmitteln wie Hexan entfettet werden (Turner et al., 2009).

Um die Spezifität und Sensitivität der Mykotoxinanalytik zu erhöhen, ist häufig eine Aufreinigung des Extraktes erforderlich (Alshannaq & Yu, 2017; Turner et al., 2009). Die am häufigsten verwendeten Methoden sind Festphasenextraktion (SPE), Multifunktions-Cleanup-Säulen (one-step columns, z. B. MycoSep™) und Immunaффinitätssäulen (IAC), da diese Verfahren schnell, effizient und reproduzierbar sind. SPE und One-step-Säulen ermöglichen dabei eine eher breit angelegte Aufreinigung, während IAC typischerweise eine hohe, aber zielanalytenspezifische Selektivität aufweisen und je nach Mykotoxin in unterschiedlichen Varianten eingesetzt werden können (Alshannaq & Yu, 2017; Hu et al., 2016; Spanjer et al., 2008). Bei der SPE erfolgt die Trennung des im Extrakt gelösten Analyten (mobile Phase) mit der

stationären Phase, an der die Mykotoxine adsorbieren und anschließend mit einem organischen Lösungsmittel eluiert werden (Pereira et al., 2014; Rahmani et al., 2009; Sáez et al., 2004). Die IAC enthält eine aktivierte stationäre Phase, an die spezifische Antikörper für bestimmte Mykotoxine gebunden sind. Beim Durchlaufen des Extraktes durch die Säule, bindet das Mykotoxin selektiv an die Antikörper, während die restlichen Matrixkomponenten wie bei der SPE durch einen Waschschrift entfernt werden und anschließend der Analyt durch ein Lösungsmittel eluiert wird (Pereira et al., 2014).

Jedoch ist gerade für eine Multimykotoxinmethode auf Basis einer Flüssigchromatografie, gekoppelt an MS, eine genaue und präzise Bestimmung und Identifizierung von Mykotoxinen möglich, ohne dass stark selektive Reinigungsverfahren erforderlich sind (Krska et al., 2008). Insbesondere IAC sind für Multimethoden nur eingeschränkt geeignet, da sie zielanalytspezifisch nur einzelne Mykotoxine oder Mykotoxingruppen anreichern und andere Analyten abtrennen würden. Das Probenaufreinigungsverfahren hängt auch von der Selektivität der MS-Geräte ab, da ein *single-stage* MS im *Selected Ion Monitoring* eine stärkere Reinigung zur Beseitigung von chromatografischen Interferenzen erfordert, während bei einem *multi-stage* MS im *Selected/Multiple Reaction Monitoring* (SRM/MRM) diese Interferenzen möglicherweise nicht sichtbar wären, Matrixeffekte wie Ionensuppression jedoch weiterhin auftreten können (Krska et al., 2008; Zöllner & Mayer-Helm, 2006).

Ein Kompromiss zwischen diesen spezialisierten gezielten Aufreinigungen und gar keiner Aufreinigung ist die „quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe“ (QuEChERS) Methode, ursprünglich zur Pestizidanalytik entwickelt und bietet eine allgemeinere, unspezifische Aufreinigung, wie die Entfernung von Zuckern und Lipiden (Anastassiades et al., 2019; Dzuman et al., 2014; Koesukwiwat et al., 2014; Shephard, 2019). Bei QuEChERS erfolgt eine Lösungsmittelextraktion (Yogendrarajah et al., 2013), z. B. mit Acetonitril, anschließend werden Magnesiumsulfat und Natriumchlorid zugesetzt, wobei das Magnesiumsulfat zur Entfernung des Wassers aus der organischen Phase und das Natriumchlorid zur Verringerung der polaren Störungen verwendet wird (Ridgway & Scientific, 2012). QuEChERS, als schnelle, kostengünstige und einfache Methode (Pereira et al., 2014; Shephard, 2019), wurde zur Analyse mehrerer Mykotoxine in verschiedenen Lebensmittelmatrixen, wie Getreide, Getreideprodukten, Milch, Käse, Kaffee oder Gewürzen verwendet (Desmarchelier et al., 2014; Frenich et al., 2011; Rodríguez-Cañás et al., 2023; Romero-González et al., 2011; Sun et al., 2016; Zhou et al., 2016).

Nach Extraktion und ggf. Aufreinigung folgt in der Regel die chromatografische Trennung der Analyten.

1.2.2 Chromatografische Trennung

Zur Mykotoxinanalyse in Lebens- und Futtermitteln werden verschiedene chromatografische Methoden wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) in Verbindung mit Ultraviolett- (UV), Diodenarray- (DAD), Fluoreszenz- (FLD) oder Massenspektrometrie- (MS) Detektoren eingesetzt (Alshannaq & Yu, 2017; Pereira et al., 2014; Rahmani et al., 2009; Shephard, 2019).

Zwar umfasst die Flüssigchromatographie (LC) eine Vielzahl leistungsstarker analytischer Methoden, die den Einsatz unterschiedlicher chromatographischer Trennmechanismen, die Verwendung von Elutionsgemischen oder -gradienten, schnellere Trennmedien und multidimensionale Trennverfahren ermöglichen (Turner et al., 2009). Aufgrund fehlender struktureller Informationen, der Koelution strukturell ähnlicher Mykotoxine und der Herausforderung, eine große Anzahl von Analyten in einem einzigen Lauf zu erfassen (Rahmani et al., 2009), sind komplexere Detektionstechniken wie die Massenspektrometrie erforderlich. Sie bietet eine hohe Empfindlichkeit und Selektivität, sowie die Fähigkeit, koeluierende Verbindungen anhand ihrer Molekülmassen zu differenzieren, was für die Multi-Mykotoxin-Analyse von Bedeutung ist (Capriotti et al., 2012; Vargas Medina et al., 2021).

Für die LC von Mykotoxinen wird überwiegend der Umkehrphasen-Elutionsmodus (*reverse phase*, RP) unter Verwendung von C18- oder C8-Stationärphasen verwendet, wobei polare und ionisierbare Mykotoxine durch alternative Modi wie Hydrophile Interaktionschromatographie oder kombinierte Ansätze aus Ion-Pair-Chromatographie und RP teilweise effizienter getrennt werden können (Danezis et al., 2016; Hallas-Møller et al., 2016; Scarpino et al., 2013; Vargas Medina et al., 2021). Zur Optimierung der Retention und Trennleistung in der Flüssigchromatographie und zur Anpassung an die nachfolgende MS-Detektion sind, vor allem bei Multimethoden, die Wahl der Säule und der Zusatz von Modifikatoren in der mobilen Phase relevant (Li et al., 2018). Die chromatografische Trennung wird von dem organischen Modifikator, wie Acetonitril oder Methanol, nur geringfügig beeinflusst, während jedoch die Zugabe von Ammoniumacetat oder Ammoniumformiat zu einer Erhöhung der Ionensignale führen kann (Vargas Medina et al., 2021).

Zur nachfolgenden Identifikation und Quantifizierung wird häufig Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) eingesetzt.

1.2.3 Detektion

Das Massenspektrometer ionisiert Moleküle, trennt und identifiziert sie anhand ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) (Alshannaq & Yu, 2017; Spanjer et al., 2008) und stellt durch die hohe Sensitivität, Selektivität und die Bereitstellung chemisch-struktureller Informationen eine zuverlässige Bestätigungsmethode der Identität des Analyten dar (Lattanzio et al., 2008; Li et al., 2013; Liao et al., 2011; Malachová et al., 2014; Martínez-Domínguez et al., 2016).

Die MS/MS unter Einsatz von Triple-Quadrupolen und hybriden Quadrupol-Ionenfallen ist die am häufigsten angewandte Methode zur Quantifizierung und Identifizierung von Mykotoxinen. Diese beiden Analysatoren können im „multiple reaction monitoring“ (MRM) Modus betrieben werden, wodurch eine hohe Selektivität und gesteigerte Empfindlichkeit ermöglicht wird. Zur korrekten Identifikation und Quantifizierung von Mykotoxinen mittels MS/MS sollte ein *precursor*-Ion sowie mindestens zwei Produktionen (entsprechende Transitionen) erfasst werden. Bei einem *triple quadrupole* MS erfolgt, zuerst die Ionisierung, der in der Flüssigchromatografie (LC) separierten Verbindungen und anschließend wird im ersten Quadrupol nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) selektiert. Diese ausgewählten Vorläuferionen (*precursor ion*) gelangen in die Kollisionszelle, die mit Inertgas z. B. Stickstoff, gefüllt ist, und werden durch Kollision fragmentiert. Die fragmentierten Produktionen (*product ions*) werden im letzten Quadrupol erneut anhand des m/z selektiert.

Diese Analytik stellt derzeit die zentrale Methode für die quantitative Analyse von Mykotoxinen in Lebensmittelproben dar, deren Anwendbarkeit jedoch insbesondere durch das Fehlen geeigneter, markierter interner Standards (IS) für die Vielzahl der Mykotoxin-Verbindungen sowie durch die aufwendige, analytabhängige Optimierung der Messparameter eingeschränkt wird (Vargas Medina et al., 2021).

1.2.3.1 Ionisationsverfahren

Ein zentraler Schritt der MS-Detektion ist die Ionisation, die die Signalintensität und Selektivität maßgeblich beeinflusst. Bei der Entwicklung von LC-MS-Methoden zur Analyse einzelner oder mehrerer Mykotoxin-Klassen wird für Multimethoden überwiegend die Elektrospray-Ionisation (ESI) eingesetzt, seltener kommt die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) in Einzelsubstanz- bzw. spezifischen Anwendungen zum Einsatz (Vargas Medina et al., 2021).

Bei der ESI wird durch eine enge Kapillare, an der eine hohe Spannung (3 – 5 kV) angelegt ist, die Probenlösung geleitet und durch das elektrostatische Feld an der Spitze der Kapillare, werden die Ionen einer bestimmten Polarität (bspw. negative Ionen, wenn positive Ionen analysiert werden sollen) von der Flüssigkeitsoberfläche

zur Wand der Kapillare ablenkt und dort neutralisiert. Die Ionen mit entgegengesetzten Ladung wandern nach unten in Richtung der Flüssigkeitsfront, wodurch das Spray einen Kegel (Taylor-Kegel) bildet (Kostiainen & Kauppila, 2009; Taylor, 1964). Sobald die elektrostatische Abstoßung an der Oberfläche die Oberflächenspannung der Flüssigkeit an der Kegelspitze übersteigt, bricht das Spray auf, und es entstehen kleine elektrisch geladene Tröpfchen. Diese bewegen sich in Richtung der *interface plate* (Gegenelektrode). Während ihres Fluges verdunstet das Lösungsmittel, wodurch sich die Tröpfchen verkleinern. Dadurch vergrößert sich das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und zugleich nimmt die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zu. Erreicht das Tröpfchen einen bestimmten Radius (Rayleigh-Grenze) (Kostiainen & Kauppila, 2009; Rayleigh, 1882), wird die Ladungsdichte an seiner Oberfläche so groß, dass die elektrostatischen Abstoßungskräfte die Oberflächenspannung des Tröpfchens übersteigen (Gomez & Tang, 1994; Kostiainen & Kauppila, 2009) und viele kleinere geladene Tropfen gebildet werden. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis die Tröpfchen so weit verkleinert sind, dass sie Ionen in die Gasphase emittieren können (Kostiainen & Kauppila, 2009).

Bei der ESI werden neben geladenen Analyten in der Gasphase auch große Mengen geladener Eluentenmoleküle (aus Lösungsmittel und Additiven) erzeugt, die als Reagenzionen in Gasphasen-Ionen-Molekül-Reaktionen wirken. Diese sind meist protonierte oder deprotonierte Moleküle des Lösungsmittels oder Additivs und können neutrale Analyten in der Gasphase durch Protonentransferreaktionen ionisieren, wenn die Protonenaffinität des Analyten die des Eluentenmoleküls (positiver Ionenmodus) oder die Protonenaffinität des deprotonierten Eluentenmoleküls die des Analyten (negativer Ionenmodus) übersteigt (Kostiainen & Kauppila, 2009).

Aufgrund der hohen chemischen Vielfalt der Mykotoxine müssen bei der LC-MS-Analyse sowohl geeignete Ionisationsmodi als auch die mögliche Bildung von Addukten während des Ionisationsprozesses berücksichtigt werden. Für Multianalysen werden daher häufig Multi-Trace-Methoden entwickelt, die ein Umschalten der Polarität zwischen positivem und negativem Ionisationsmodus beinhalten (Panasiuk et al., 2019; Vargas Medina et al., 2021).

1.2.4 Matrixeffekte und interne Standards

Matrixeffekte resultieren aus der unterschiedlichen Ionisierung während des Elektronenspray-Prozesses zwischen einer reinen Lösung und einer Lösung die eine Vielzahl von Komponenten enthält und sind besonders für *dilute-and-shoot* Methoden relevant. Dies kann zu einer erhöhten oder supprimierten Signalintensität und somit zu einer schlechteren Wiederholbarkeit und geringeren Genauigkeit führen. Durch die

Verwendung von *matrix-matched* Standards, wobei die Standards mit einem Extrakt eines Blindmaterials hergestellt werden, oder durch Verwendung isotoopenmarkierter interner Standards für eine Stabilisotoopenverdünnungsmethode können die Matrixeffekte teilweise berücksichtigt werden (Krska & Molinelli, 2007; Shephard, 2019; Sulyok et al., 2007; K. Zhang et al., 2019).

Viele Elemente weisen eine natürliche Verteilung sowohl stabiler als auch radioaktiver Isotope, wie natürlicher Kohlenstoff aus C-12 (98 %), C-13 (1.1 %) und radioaktivem C-14, auf. Bei bekannter Summenformel kann die natürliche Isotoopen Verteilung der gesamten Verbindungen aus der relativen Häufigkeit der einzelnen Elemente berechnet werden. Bei der Zugabe eines isotoopenmarkierten Standards zu einer Probe, erfolgt eine Angleichung mit dem Analyten und anschließend bleibt das Verhältnis der Isotopologen stabil während der Probenaufarbeitung, da ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften nahezu identisch sind. Bei der Detektion mittels Massenspektrometrie ist eine Unterscheidung der Isotopologe möglich und ermöglicht somit die Berechnung des Gehaltes des Analyten aufgrund der bekannten Mengen des eingesetzten internen Standards. Ein strukturell verschiedener interner Standard kann den Analyten nicht in gleicher Weise abbilden und dadurch systematische Fehler und Ungenauigkeiten verursachen. Ursache ist, dass ein strukturell verschiedener interner Standard während Probenvorbereitung und Messung (z. B. Extraktion, Aufreinigung, Ionisierung) andere Wiederfindungen bzw. Signalveränderungen zeigen kann als der Analyt. Ein isotoopenmarkierter interner Standard (Isotopologe) verhält sich dagegen weitgehend identisch zum Analyten, sodass Verluste oder Matrixeffekte des Analyten durch entsprechende Effekte des Isotopologen kompensiert werden können. Somit erfolgt bei der Verwendung eines isotopologischen Standards eine genauere Quantifizierung durch die Kompensation der Verluste und Erhöhung der Spezifität der Bestimmung (Rychlik & Asam, 2008).

1.2.5 Enzymimmunoassays

Enzymimmunologische Verfahren wie der enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) basieren auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an Antigene, z. B. Mykotoxine, und werden als kommerzielle Kits oder Teststreifen häufig als schnelle Screening-Tools in Lager- und Produktionsanlagen für Qualitätskontrollen eingesetzt. ELISA kann in unterschiedlichen Formaten umgesetzt werden (u. a. direkte und kompetitive Ansätze), wovon in der Mykotoxinanalytik überwiegend ein kompetitiver direkter ELISA eingesetzt wird (Chu, 1996; Kos et al., 2016). Dabei konkurriert das freie Mykotoxin in der Probe mit einem enzymmarkierten Toxin (Toxin-Enzym-Konjugat) um die Bindung an eine begrenzte Anzahl spezifischer Antikörperstellen

(Pittet, 2005; Turner et al., 2009). Die gemessene Farbreaktion hängt von der Menge des gebundenen Enzymkonjugats ab und ist damit invers zur Mykotoxinkonzentration in der Probe (Yao et al., 2015). ELISA-Verfahren ermöglichen mit einfacher Ausstattung und kurzer Analysedauer einen hohen Probendurchsatz und Vor-Ort-Anwendungen (Nguyen et al., 2019; Zhang et al., 2023). Die quantitative Aussagekraft kann jedoch durch die Kreuzreaktionen strukturell verwandter Mykotoxine sowie durch matrixabhängige Effekte eingeschränkt sein, wodurch insbesondere in komplexen Matrices Fehlinterpretationen möglich sind (Alshannaq & Yu, 2017; Li et al., 2014; Nguyen et al., 2019; Zachariasova et al., 2014). Kreuzreaktivitäten werden in der Praxis teils gezielt genutzt, z. B. um den Summenparameter von Aflatoxinen (AFB₁, Aflatoxin B₂ (AFB₂), Aflatoxin G₁ (AFG₁) und Aflatoxin G₂ (AFG₂)) zu bestimmen, bei diesem ELISA binden die Antikörper gegen AFB₁ auch AFB₂, AFG₁ und AFG₂ (Kim et al., 2011; Li et al., 2009; Nguyen et al., 2019). Aufgrund möglicher Fehlinterpretationen sollten positive ELISA-Ergebnisse, insbesondere bei komplexen Matrices, durch geeignete chromatographische Bestätigungsmethoden (z. B. LC-MS/MS) verifiziert werden (Alshannaq & Yu, 2017; Shephard, 2019).

1.3 Käse

Käse sind gemäß Käseverordnung frische oder in unterschiedlichen Graden der Reife befindliche Erzeugnisse, die aus dickgelegter Käsereimilch hergestellt werden. Käsereimilch umfasst die zur Käseherstellung bestimmte Milch und kann unter Mitverwendung definierter Milcherzeugnisse (z. B. Sahne- oder Molkenbestandteile) eingesetzt werden. Für die Beschreibung/Kennzeichnung werden u. a. Fettgehaltsstufen bzw. der Fettgehalt in der Trockenmasse herangezogen und es erfolgt eine Einteilung in Käsegruppen über den Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse (z. B. Hart-, Schnitt-, Weichkäse) (Bundesminister für Ernährung, 1965). Je nach Koagulationsprinzip lassen sich Käse grundlegend in säurekoagulierte, labkoagulierte sowie säure-/wärmekoagulierte Käse einteilen (Johnson & Law, 2010; Kindstedt, 2013). Für labkoagulierte Käse umfasst der Herstellungsprozess typischerweise die Schritte Dicklegen, Bruchschneiden, Erwärmen, Molkenabtrennung, Formen, Pressen, Salzen und eine anschließende Reifung (Johnson & Law, 2010; Kosikowski & Mistry, 1997). Die Prozessschritte der ersten Herstellungsphase sind dabei besonders entscheidend, da sie die chemischen Ausgangsbedingungen zu Beginn der Reifung festlegen und damit den Reifeverlauf sowie die Selektion der Mikrobiota maßgeblich beeinflussen (Kindstedt, 2013). Die Herstellung von Käse beinhaltet mehrere biochemische Prozesse, bei denen

Kuh-, Ziegen- oder Schafmilch unter Zugabe von Natriumchlorid und Gerinnungszusätzen und einer Mikrobiota aus filamentösen Pilzen, Hefen und Bakterien verwendet wird (Kindstedt, 2013; Mousavi Khaneghah et al., 2021). Im ersten Schritt wird die Milch durch Gerinnung, aufgrund von Ansäuerung und Proteolyse, in feste Bruchstücke (Käsebruch) und flüssige Molke überführt (Aranda et al., 2025; Benkerroum, 2016; Qiao et al., 2022; Sarmast et al., 2021). Der Käsebruch, bestehend aus Kasein und Milchfett, wird von der Molke getrennt und je nach Käsesorte erhitzt, gesalzen und gepresst, um die unterschiedlichen Formen und Texturen zu erhalten. Anschließend erfolgt die Reifung, wobei die Veränderung der organoleptischen Eigenschaften zu dem Käse spezifischen Merkmalen, wie Geschmack, Aroma und Textur, stattfindet (Benkerroum, 2016; Kindstedt, 2013; Morandi et al., 2022).

Während der Käseherstellung entstehen die spezifischen Eigenschaften des Endproduktes durch mehrere Mikroorganismen (Banjara et al., 2015), beginnend mit der Startermikrobiota, hauptsächlich aus Milchsäurebakterien wie *Lactococcus lactis* (Gkatzionis et al., 2014), welche durch die Produktion von Milchsäure den Herstellungsprozess anstößt und die Synärese des Käsebruchs ermöglicht (Camardo Leggieri et al., 2017; Cogan & Hill, 1993). Im Verlauf der weiteren Herstellung verändert sich das Substrat durch den Wasserverlust des Bruchs sowie den Anstieg des Salzgehalts und des pH-Werts (Camardo Leggieri et al., 2017; Malacarne et al., 2006). Anschließend wird die sekundäre Mikrobiota, die aus der Umgebung, z. B. aus Reifekammern, stammt oder wie bei Blauschimmelkäse gezielt hinzugefügt wird (De Santi et al., 2010), dominant. Zur Ausbildung der sensorischen Eigenschaften des Käses tragen salztolerante Bakterien, Hefen und filamentöse Pilze durch ihre proteolytischen und lipolytischen Aktivitäten bei (Cakmakci et al., 2012; Camardo Leggieri et al., 2017; De Santi et al., 2010; Milani et al., 2014; Schiavano et al., 2012). Als Reifungskulturen werden Pilze wie *Penicillium camemberti* und *Penicillium roqueforti* eingesetzt (Gaborit et al., 2001; Gripon, 1993; Panelli et al., 2012), auch andere Pilze, die beispielsweise Mykotoxine produzieren, können den Käse befallen (Battilani et al., 2007; Camardo Leggieri et al., 2017; Comi et al., 2013; Rodríguez et al., 2012).

Milchprodukte können über verschiedene Wege mit Mykotoxinen kontaminiert werden; entweder indem eine Kontamination der Milch, infolge der Aufnahme von kontaminiertem Futter durch die Kuh oder durch eine direkte Pilzkontamination der Milchprodukte, welche die Mykotoxine produzieren können, auftreten (Hymery et al., 2014; O'Brien et al., 2004; van Egmond, 1983).

Bei der Aufnahme von AFB₁ kontaminiertem Futter von Wiederkäuern wird ein Teil des aufgenommenen AFB₁ im Pansen zu Aflatoxinol abgebaut, während der Rest im Verdauungstrakt durch passive Diffusion absorbiert und in der Leber zu dem Metaboliten AFM₁ hydroxyliert wird, welches anschließend in Milch und Urin ausgeschieden wird (Mousavi Khaneghah et al., 2021). Hierbei liegt die Transferrate ungefähr zwischen 2 und 6 %. Da bei der Käseherstellung ein Großteil der wässrigen Phase als Molke abgetrennt wird, kommt es zu einem Konzentrationseffekt, beispielsweise wird für Cheddar eine typische Ausbeute von etwa 10 kg Käse pro 100 kg Milch beschrieben (Fox et al., 2017). Aufgrund der Bindungsaffinität von AFM₁ an Milchproteine, kann im Vergleich zu Molke eine deutlich höhere Konzentration im Käse vorliegen (Aranda et al., 2025; Flores-Flores et al., 2015; Kamkar et al., 2008; Manetta et al., 2009; Morandi et al., 2022; Muñoz et al., 2010; Rico-Munoz et al., 2019).

Für Käse sind derzeit keine Mykotoxinhöchstgehalte von der Europäischen Kommission festgelegt. Für AFM₁ ist ein Höchstgehalt von 0,05 µg/kg in Milch festgelegt (Europäische Kommission, 2008), sodass die Kontrolle des Rohstoffes Milch auch für daraus hergestellte Produkte von Bedeutung ist.

Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten von STC und AFB₁ könnte ein Transfer (*carry-over*) aus kontaminiertem Futter in Milch grundsätzlich denkbar sein. Hierbei ist ein Metabolit mit einer Struktur analog zu AFM₁ und gebildet durch einen vergleichbaren Mechanismus denkbar. Bisher sind jedoch keine ausreichenden Daten bezüglich der *carry-over*-Raten von STC bei Wiederkäuern, die mit STC kontaminiertes Futter erhalten haben, in die Milch oder zur Übertragung von STC und dessen Metabolite in andere tierische Produkte, wie Fleisch und Eier, vorhanden (Biancardi & Dall'Asta, 2015; European Food Safety Authority, 2013). Für OTA ist ein Transfer aus dem Futter in die Wiederkäuermilch aufgrund der hydrolytischen Aktivität der Pansenbakterien vernachlässigbar (Blank, 2002; Fink-Gremmels, 2008b; Kure & Skaar, 2019; Mobashar et al., 2010; Shreeve et al., 1979).

Neben dem *carry-over* kann eine Mykotoxinkontamination von Käse jedoch auch durch eine direkte Kontamination und *in situ* Bildung während der Herstellung und Reifung entstehen (Hymery et al., 2014; O'Brien et al., 2004). Käse kann mit verschiedenen Mykotoxinen wie STC, Patulin, Roquefortin, Citrinin, Cyclopiazonsäure und Aflatoxinen, vor allem mit AFM₁ und OTA kontaminiert sein (Altafini et al., 2021; Aminul et al., 2018; Aranda et al., 2025; Griffin et al., 2021; Hymery et al., 2014; Mohammadi et al., 2022; Morandi et al., 2022; Mousavi Khaneghah et al., 2021; Sengun et al., 2008).

Diese Mykotoxine treten in Käse aufgrund direkter Kontamination durch die *in situ* Bildung durch mykotoxinbildende Pilze auf, die während der Produktion in

Reifekammern auf dem Käse wachsen (Benkerroum, 2016; Dobson, 2017; Hymery et al., 2014; Sengun et al., 2008). Hierbei sind luftgetragene Sporen eine primäre Kontaminationsquelle (Garnier et al., 2017; Kure & Skaar, 2019; Kure et al., 2004; Montagna et al., 2004). In diesem Zusammenhang sind Pilzarten wie *Penicillium verrucosum*, *P. nordicum* und *Aspergillus versicolor*, die OTA oder STC produzieren, besonders relevant (Dobson, 2017; Hymery et al., 2014; Kure & Skaar, 2019; Scott, 1989; Sengun et al., 2008).

Verschiedene *Penicillium* Arten gewährleisten durch die Biosynthese von OTA die Abgabe von Chlor aus der Zelle (Arroyo et al., 2005), daher sind Pilzstämme die viel OTA produzieren besser an salzreiche Umgebungen, wie z. B. die Käserinde, angepasst (Abdel-Hadi et al., 2012; Aranda et al., 2025; Bhatnagar et al., 2018; Cheeseman et al., 2014; Paterson & Lima, 2011).

OTA wurde in verschiedenen Käsesorten wie Blauschimmelkäse, gereiftem Käse, Grana-Typ Käse nachgewiesen (Altafini et al., 2021; Camardo Leggieri et al., 2017; Iha et al., 2013; Peng et al., 2018; Pietri et al., 2022).

Die Bedingungen im Reiferaum (Temperatur, Wasseraktivität) begünstigen vermutlich das Pilzwachstum und die Mykotoxinbildung (Camardo Leggieri et al., 2018; Decontardi et al., 2017; Pardo et al., 2006). Jedoch korreliert sichtbares Pilzwachstum nicht immer mit der Mykotoxinkonzentration im Käse (Aminul et al., 2018; Aranda et al., 2025; Cavaliere et al., 2006; Mohammadi et al., 2022; Rico-Munoz et al., 2019). Nach derzeitigem Wissenstand findet keine starke Migration der Mykotoxine von der Rinde in das Käseinnere statt. Für Aflatoxine konnte eine Migration von 2 bis 4 cm (Blanco et al., 1988; Sweeney & Dobson, 1998) und für STC eine Migration bis 0,5 cm ins Käseinnere nachgewiesen werden (Dobson, 2017; Engel & Teuber, 1980; Lafont et al., 1979).

Im Folgenden werden insbesondere gereifte Käse betrachtet, da hier die Rinde und Reifungsumgebung als Eintragspfad für Mykotoxine eine besondere Rolle spielen.

1.3.1 Hartkäse

Grana-Typ Käse ist ein traditioneller italienischer Hartkäse, hergestellt aus nicht pasteurisierter Kuhmilch mit einem Reifezeitraum von 9 Monaten bis zu vier Jahren. Als geschützte Ursprungsbezeichnung sind der *Grana Padano* und *Parmigiano Reggiano* weit bekannt und von großer wirtschaftlicher Bedeutung in Italien (Camardo Leggieri et al., 2020).

Während der Reifung ist das Wachstum filamentöser Pilze auf der Oberfläche von Grana-Typ Käse verbreitet und akzeptiert, da es zur Entwicklung des charakteristischen Geschmacks und Aromas beitragen kann, durch den Abbau von

Lipiden und Proteinen durch die Schimmelpilze. Gleichzeitig kann die Oberflächenmikrobiota einen schützenden Effekt vor pathogenen oder verderbnisverursachenden Mikroorganismen ausüben (Camardo Leggieri et al., 2020; Ropars et al., 2012). Jedoch können auch Mykotoxin bildende Pilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* auf dem Käse wachsen und zu einer unerwünschten Kontamination führen (wie in Abschnitt 1.3 erläutert). Um die sich entwickelnden Schimmelbeläge zu entfernen, werden die Käselaibe während der Reifung in Intervallen gebürstet (Camardo Leggieri et al., 2020).

Grana-Typ Käse wird neben ganzen Laiben und Teilstücken auch als geriebenes Produkt vermarktet. Gemäß produktspezifischen Richtlinien dürfen geriebene Grana-Typ Produkte bis zu 18 % Rindenanteil enthalten (Europäische Kommission, 2023a). Da Mykotoxine vor allem auf der Rinde durch oberflächliches Schimmelpilzwachstum gebildet werden können und der Gehalt zum Käseinneren hin abnehmen, könnte die Verwendung von Rinde in geriebenen Produkten zu erhöhten Mykotoxingehalten beitragen (Dobson, 2017; Pietri et al., 2022).

1.4 Pflanzliche Drinks

Der Konsum von pflanzlichen Drinks nimmt stetig zu. Dafür gibt es verschiedene Gründe, wie Laktoseintoleranz, Veränderung der Ernährungsweisen hin zum Flexitarismus oder Vegetarismus (Giugliano et al., 2023; Haas et al., 2019; Lopez et al., 2020; Sethi et al., 2016; Silva et al., 2020).

In pflanzenbasierten Drinks wurden verschiedene Mykotoxine wie Aflatoxine, DON, ZEN und OTA nachgewiesen (Hamed et al., 2019; Miró-Abella et al., 2017; Pavlenko et al., 2024), wobei die in den Getränken gefundenen Toxine gut mit den Literaturdaten zum Vorkommen dieser Toxine in den jeweiligen Rohstoffen übereinstimmen (Miró-Abella et al., 2017). Bezüglich Hafer stellen die Trichothecene die relevanteste Toxin-Gruppe dar, wobei T2 und HT2 derzeit im Hinblick auf ihr toxisches Potenzial diskutiert werden und STC aufgrund seines häufigen Vorkommens in Hafer und Mandeln hier relevant ist (Diaz Nieto et al., 2018; Mol et al., 2015).

Für pflanzliche Drinks sind derzeit keine spezifischen Mykotoxinhöchstgehalte festgelegt. Für die Einordnung der Befunde könnten vergleichend bestehende Höchstgehalte für eine ähnliche Produktkategorie herangezogen werden. Für AFM₁ beträgt der Höchstgehalt in Milch 0.05 µg/kg (Europäische Kommission, 2023b). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass Höchstgehalte stoff- und matrixspezifisch auf Basis toxikologischer Daten abgeleitet werden und nicht auf andere Mykotoxine übertragbar sind, beispielweise weist AFM₁ als Metabolit von AFB₁ eine geringere toxikologische Potenz auf (European Food Safety Authority et al., 2020).

Pflanzliche Drinks werden durch die Zerkleinerung pflanzlicher Materialien, wie Getreide, Hülsenfrüchte, Ölsaaten oder Nüsse, deren Extraktion mit Wasser und anschließender Homogenisierung hergestellt, wobei eine Flüssigkeit die durch ähnliches Aussehen und Konsistenz Kuhmilch imitieren soll (Sethi et al., 2016). Die verschiedenen pflanzlichen Drinks weisen unterschiedliche Eigenschaften bezüglich Geschmackes, Textur und Nährstoffzusammensetzung auf (Sethi et al., 2016; Xie et al., 2023). Für die Herstellung von pflanzlichen Drinks werden am häufigsten pflanzliche Rohstoffe wie Getreide (Hafer, Reis), Hülsenfrüchte (Sojabohnen, Erdnüsse) und Nüsse (Mandeln, Haselnüsse) verwendet (Kerstner & Garda-Buffon, 2024; Munekata et al., 2020).

Pflanzliche Drinks sind kolloidale Suspensionen oder Emulsionen, die aufgelöste und zerkleinerte Pflanzenmaterialien enthalten. Die Herstellung erfolgt durch Mahlen des Rohmaterials zu einem Slurry und anschließendem Abseihen zur Entfernung grober Partikel (Mäkinen et al., 2016). Die einzelnen Herstellungsverfahren der unterschiedlichen Drinks variieren, jedoch basieren diese auf einer allgemeinen Vorgehensweise für die Verarbeitungsmethoden (Abbildung 4).

Die wässrige Extraktion der pflanzlichen Drinks kann mittels einem Trockenverfahren (Trockenvermahlung der Rohstoffe und Extraktion des Mehls mit Wassers) oder Nassverfahren (Einweichen und Nassvermahlen der pflanzlichen Rohstoffe) erfolgen (Reyes-Jurado et al., 2023). Nach der Extraktion folgt die Abtrennung grober Partikel des Mahlabfallproduktes durch Filtration, Dekantieren oder Zentrifugieren (Diarra et al., 2005; Lindahl et al., 2001; Mäkinen et al., 2016). Stärkehaltige Rohwaren wie Getreide bilden bei Erhitzung oberhalb der Gelatinierungstemperatur eine dicke gallertartige Struktur aus, die zu einer erhöhten unerwünschten Viskosität führt. Daher werden vor oder nach Abtrennung der groben Partikel, α - und β -Amylasen eingesetzt, um die Stärke zu hydrolysieren und die angestrebte Viskosität zu erhalten. Die Produkte der Stärkehydrolyse sind verschiedene Polysaccharide, Maltose und Glucose, die zu einer erhöhten Süße des Haferdrinks ohne Zuckerzusatz führen (Lindahl et al., 2001; Mäkinen et al., 2016; Mitchell et al., 1990; Tano-Debrah et al., 2005). Anschließend kann eine Standardisierung und/oder Zugabe von weiteren Zutaten wie Zucker, Öl, Aromen, Verdickungsmittel, Emulgatoren oder Stabilisatoren, sowie eine Mikronährstoffanreicherung (wie Kalzium, B-Vitamine und Vitamin D) je nach Produkttyp erfolgen. Zur Verbesserung der Suspension und mikrobiologischer Stabilität wird der pflanzliche Drinks homogenisiert und pasteurisiert oder ultrahocherhitzt (Mäkinen et al., 2016).

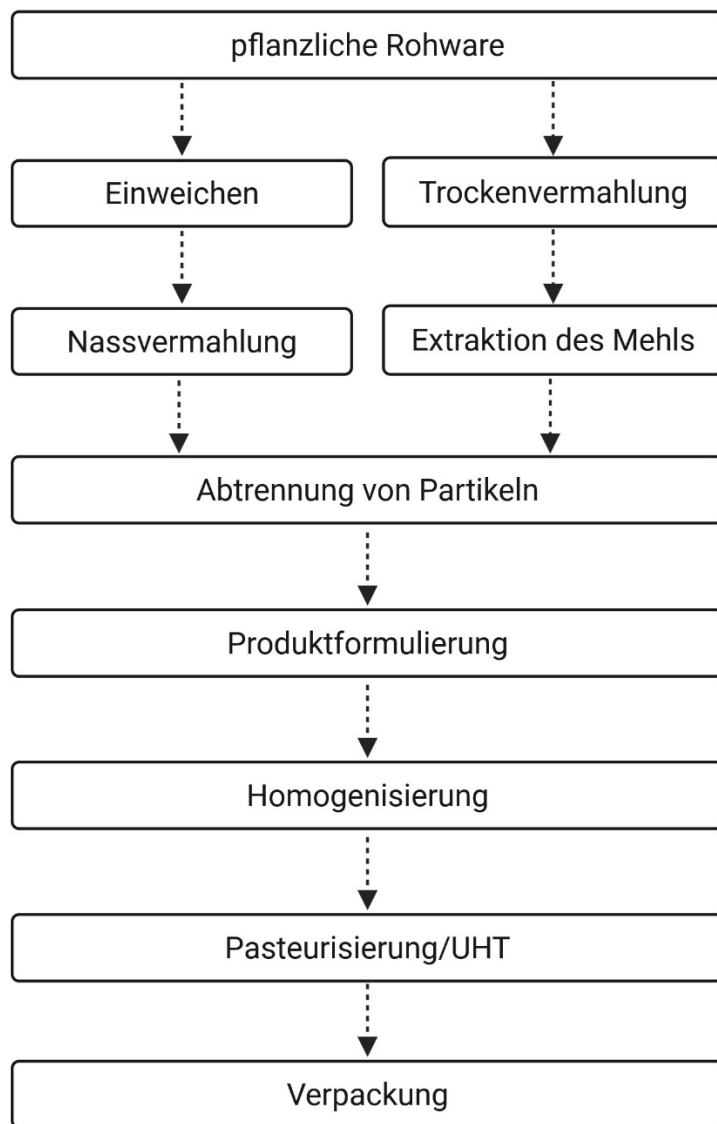


Abbildung 4: Der allgemeine Herstellungsprozess von pflanzlichen Drinks nach Mäkinen et al. (2016).

Die pflanzlichen Rohstoffe werden vor der Herstellung durch Entspelzen, Einweichen, Blanchieren, Dämpfen oder Backen teilweise vorbehandelt, um die Nährstoffqualität und die organoleptischen Eigenschaften zu verbessern und unangenehme Gerüche zu beseitigen (Debruyne, 2006; Haas et al., 2019; Mäkinen et al., 2016; Xie et al., 2023). Um den „bohnenähnlichen“ Geschmack von Sojadrinks zu vermeiden, werden durch Blanchieren die Trypsininhibitoren und Lipoxygenase in den Sojabohnen inaktiviert (Giri & Mangaraj, 2012). Zur Verstärkung des Aromas und Geschmacks, können manche Rohwaren, wie Mandeln, geröstet werden, dadurch verringert sich jedoch die Löslichkeit der Proteine und die Extraktionsausbeute (Hinds et al., 1997; Mäkinen et al., 2016; Rustom et al., 1991). Bei nuss- oder ölsaatenbasierten Drinks (z. B. Mandel- und Haselnussdrinks) können neben ganzen Kernen auch

vorbehandelte Rohwaren eingesetzt werden, beispielsweise wird bei Mandeln Blanchieren zur Entfernung der Haut verwendet. Zudem werden in Formulierungsansätzen definierte Rohstoff-zu-Wasser-Verhältnisse bzw. Pastenanteile zur Einstellung der Produkteigenschaften verwendet, wodurch sich die Matrix gegenüber der Verarbeitung ganzer Kerne verändern kann (Reyes-Jurado et al., 2023).

1.5 Tierernährung

Wie bereits beschrieben, stellen Mykotoxine weltweit ein Risiko für die Lebens- und Futtermittelsicherheit dar und betreffen schätzungsweise 60 – 80 % der global produzierten Nahrungspflanzen (Eskola et al., 2020). Durch den Klimawandel könnte es zu einer weiteren Verschiebung und Ausweitung von Kontaminationen hinsichtlich der geographischen Verteilung als auch dem Vorkommen relevanter Mykotoxine kommen (Battilani et al., 2016; Kos et al., 2023). Um gesundheitliche Beeinträchtigungen bei Nutztieren sowie eine Übertragung entlang der Lebensmittelkette zu verringern, hat die Europäische Union Höchstgehalte und Richtwerte für einige Mykotoxine in bestimmten Futtermitteln festgelegt (Europäische Kommission, 2002a, 2006, 2013). Überschreiten Futtermittel diese Grenzwerte für Mykotoxine, dürfen sie nicht mehr für die Tierernährung verwendet werden. Eine gezielte Verdünnung oder Vermischung kontaminierter Rohwaren zur nachträglichen Unterschreitung der Höchstgehalte ist nicht zulässig (Europäische Kommission, 2002a).

Mykotoxine können bei Nutztieren bereits bei niedrigen Expositionsniveaus akute und chronische gesundheitliche Beeinträchtigungen verursachen, wie hepatotoxische, nephrotoxische, immunmodulatorische, reproduktionstoxische sowie wachstumshemmende Effekte, was sowohl die Tiergesundheit als auch die Leistungsfähigkeit negativ beeinflussen kann (Bryden, 2012; Bezerra da Rocha et al., 2014). Daher sind zur Reduktion von Mykotoxinbelastungen verschiedene Dekontaminationsmethoden, physikalische, chemische und biologische Verfahren, in Futtermitteln entwickelt worden (Li et al., 2020). Physikalische Methoden wie Adsorption oder thermische Behandlung weisen häufig eine begrenzte Wirksamkeit auf (Diao et al., 2015; Var et al., 2008). Chemische Verfahren, wie Säuren, Basen, Oxidationsmittel und Aldehyde zur Modifikation der Struktur von Mykotoxinen, sind aufgrund möglicher Rückstände und Veränderungen der Futtermittelzusammensetzung kritisch zu betrachten (Freitas-Silva & Venâncio, 2010). Beide Verfahren führen zu Verlusten wichtiger Nährstoffe, wodurch ihre Anwendung eingeschränkt wird (Li et al., 2020). Wohingegen Biotransformationsmethoden, durch

Bakterien, Pilze, Pflanzen und Tiere sowie isolierte Enzyme (Ben Taheur et al., 2019; Hathout & Aly, 2014; Ji et al., 2016; Loi et al., 2017; McCormick, 2013), eine hohe Spezifität aufweisen, wenige Nebenprodukte erzeugen und unter milden Bedingungen zur Detoxifikation von einigen Mykotoxinen führen können (Ji et al., 2016; Wang et al., 2019; Zhu et al., 2017). Hierbei rücken auch Insekten zunehmend als biologische Methode zur Reduktion mykotoxinbelasteter Futtermittel in den Fokus. Verschiedene Insektenarten sind in der Lage, organische Neben- und Reststoffe effizient in hochwertige Biomasse für die Tierernährung umzuwandeln (Gold et al., 2018; Smetana et al., 2016), wodurch niedrigwertige oder nicht mehr direkt nutzbare Substrate aufgewertet werden können. Da Nebenströme häufig mit Mykotoxinen belastet sein können, stellt sich die Frage nach einer möglichen Akkumulation oder metabolischen Transformation dieser Kontaminanten in den Insekten (van der Fels-Klerx et al., 2018). Verschiedenen Insektenarten, wie *Hermetia illucens* (schwarze Soldatenfliege), *Musca domestica* (Stubenfliege), *Tenebrio molitor* (Mehlkäfer) und *Alphitobius diaperinus* (Glänzenschwarzer Getreideschimmelkäfer), wiesen auf mykotoxinbelasteten Substraten in der Regel keine relevanten akuten Effekte auf Wachstum oder Überleben auf und es trat keine relevante Akkumulation der untersuchten Mykotoxine in den Insekten auf (Bosch et al., 2017; Camenzuli et al., 2018; Meijer et al., 2019; Niermans et al., 2023; Tao et al., 2025). Teilweise wird lediglich eine unvollständige Wiederfindung der ursprünglich im Substrat enthaltenen Mykotoxine beobachtet, was auf metabolische Transformationsprozesse hindeutet (Niermans et al., 2021; Niermans et al., 2024). Somit könnten Insekten unter bestimmten Bedingungen zur Verwertung mykotoxinbelasteter Futtermittel beitragen, indem sie kontaminierte Substrate metabolisieren und in Insektenbiomasse überführen, ohne selbst relevante Mengen der untersuchten Mykotoxine zu akkumulieren (Niermans et al., 2021). Insekten könnten so im Kontext zirkulärer Produktionssysteme eine wichtige Rolle spielen. Aufgrund der teilweise unvollständigen Massenbilanz einzelner Mykotoxine sowie der bislang begrenzten Kenntnis über Art, Struktur und toxikologische Relevanz möglicher Transformationsprodukte ist eine abschließende Bewertung dieser Prozesse derzeit nicht möglich.

2 Zielsetzung

Mykotoxine sind toxische Sekundärmetabolite von filamentösen Schimmelpilzen, die verschiedene Lebens- und Futtermittel kontaminieren können. Aufgrund ihrer Toxizität, insbesondere der potenziellen Karzinogenität und der Möglichkeit, dass gemeinsam auftretende Mykotoxine synergistische oder additive Effekte haben können, stellen verschiedene Mykotoxine wie Aflatoxine, OTA, STC sowie Methoxy-STC eine bedeutende Herausforderung für die Lebensmittelsicherheit und ein gesundheitliches Risiko für den Menschen dar. Neben den wenigen gut charakterisierten und regulierten Mykotoxinen sollen dabei auch bislang weniger betrachtete Begleittoxine, biosynthetische Vorläufer und strukturell verwandte Mykotoxine berücksichtigt werden, da diese in realen Matrices gemeinsam auftreten und die Gesamtexposition beeinflussen können. Während einzelne Mykotoxine in bestimmten Lebensmitteln bereits dokumentiert wurden, wie AFB₁ in Käse, gibt es wenige Daten über das gleichzeitige Vorkommen mehrerer Mykotoxine in verschiedenen Käsesorten sowie über die Pilzarten, die für deren Bildung verantwortlich sind. Für pflanzliche Drinks, deren Marktanteil in den letzten Jahren stark gewachsen ist, sind Daten über mögliche Mykotoxinbelastungen limitiert. Matrixeffekte sollten zudem als potenzieller Einflussfaktor auf die analytische Bestimmung und die Ableitung von Expositionsdaten berücksichtigt werden.

Ein erstes Ziel dieser Arbeiten war die Entwicklung und Validierung einer sensitiven und robusten LC-MS/MS-basierten Methode zur simultanen Identifizierung und Quantifizierung von mehreren Mykotoxinen, einschließlich AFB₁, STC und OTA, in komplexen Lebensmittelmatrices wie Käse und pflanzlichen Drinks. Dabei sollten belastbare, quantitative Daten als Grundlage für Expositionsabschätzungen und eine zukünftige Risikobewertung, insbesondere auch für nicht regulierte bzw. bislang nur unzureichend bewertete Mykotoxine wie STC und Methoxy-STC, erzeugt werden. Hierauf aufbauend zielte die Arbeit darauf ab, Marktproben zu untersuchen, um die Vorkommen, Konzentration und das gleichzeitige Auftreten der Mykotoxine in verschiedenen pflanzlichen Drinks zu erfassen. Ergänzend sollte geprüft werden, inwieweit enzymimmunologische Screeningverfahren zur Mykotoxinbestimmung in pflanzlichen Drinks geeignet sind und welche Grenzen sich insbesondere durch matrixbedingte Interferenzen und potenzielle Kreuzreaktionen ergeben. Darüber hinaus sollten entlang der Futtermittel-Lebensmittel-Kette das Vorkommen relevanter Mykotoxine in Futtermitteln sowie Transfer- und Verbleibsprozesse in Tiermodellen untersucht werden, einschließlich des Verbleibs von AFB₁ in *Tenebrio molitor* Larven als potenziell relevante Proteinquelle in der Tierernährung. Schließlich sollten Marktproben verschiedener Käsesorten untersucht werden, um Vorkommen,

Konzentration und gleichzeitiges Auftreten relevanter Mykotoxine zu erfassen. Ein besonderer Fokus lag hier auf Grana-Typ Käse, welcher vermutlich ein erhöhtes Risiko für Mykotoxinkontaminationen aufgrund von intensiver Lagerung aufweist. Zudem sollten die Pilzspezies, die für die Mykotoxinproduktion in diesen Käsen verantwortlich sein können, identifiziert und die Mykotoxinproduktion und das Mykotoxinprofil in Abhängigkeit von der Matrix untersucht werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen zur Entwicklung von Strategien zur Minimierung der Mykotoxinbelastung in Hartkäse und pflanzlichen Drinks beitragen und eine Grundlage für präventive Maßnahmen in der Lebensmittelproduktion schaffen.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Dissertation anhand ausgewählter wissenschaftlicher Publikationen, die in den traditionellen und namhaften Fachzeitschriften *Food Control*, *Mycotoxin Research* und *Food and Chemical Toxicology* veröffentlicht wurden, sowie ergänzender unveröffentlichter Untersuchungen dargestellt. Die Arbeiten umfassen die analytische Untersuchung von Mykotoxinen, einschließlich Begleittoxinen und biosynthetischen Vorstufen, in Käse und pflanzlichen Drinks sowie Fragestellungen zu Vorkommen, möglichen Matrixeffekten, Screeningansätzen und Transferprozessen (AFB₁-Transferuntersuchungen in *Tenebrio molitor*). Ein Schwerpunkt war dabei die Entwicklung und Validierung sensitiver LC-MS/MS-Methoden zur simultanen quantitativen Bestimmung von AFB₁, STC und OTA in den genannten komplexen Lebensmittelmatrixen. Die Publikationen beschreiben zudem Erkenntnisse aus Marktprobenanalysen, die Aufschluss über die Verbreitung und Konzentration der Mykotoxine in verschiedenen Käsesorten und pflanzlichen Drinks geben. Zudem wird beschrieben, inwieweit enzymimmunologische Testsysteme (ELISA) als Screeningansatz geeignet sind und welche Grenzen sich durch matrixbedingte Interferenzen und potenzielle Kreuzreaktionen ergeben. Darüber hinaus werden Ergebnisse aus der Mykobiomanalyse und dem Inokulationsexperiment dargestellt, die dazu beitragen, die für die Mykotoxinbildung verantwortlichen Pilzspezies zu identifizieren. Der Fokus liegt auf der Aufklärung relevanter Kontaminationsquellen und der Bereitstellung einer wissenschaftlich fundierten Basis für zukünftige Strategien zur Minimierung von Mykotoxinbelastungen.

3.1 Pflanzliche Lebensmittel – Pflanzliche Drinks

3.1.1 Comprehensive investigation of undesired substances and microbial contamination in plant-based drinks (Publikation I)

Kim Lara Gützkow, Alena Lencioni, Christine Schwake-Anduschus, Alexandra Müller, Jan Kabisch, Vanessa Grundmann, Melanie Stöckl, Ronald Maul

Food Control, 2024, 166, 110599

Impact Factor: 6.3 (2024)

DOI: 10.1016/j.foodcont.2024.110599

Synopse

Der Markt für nicht-milchbasierte Alternativen gewinnt zunehmend an Bedeutung, was insbesondere auf die wachsende Verbreitung vegetarischer Ernährungsformen, eine stärkere Sensibilisierung für Tierwohlaspekte sowie ökologische Überlegungen bezüglich der Lebensmittelproduktion zurückzuführen ist. Zu den am häufigsten konsumierten pflanzlichen Drinks zählen Produkte auf Mandel-, Hafer- und Sojabasis, deren potenzielle Kontamination je nach pflanzlichem Ursprung deutliche Unterschiede aufweisen kann.

Gegenstand dieser Arbeiten war die Untersuchung unerwünschter Stoffe in pflanzlichen Drinks auf Hafer-, Mandel- und Sojabasis anhand verschiedener Kontaminanten, darunter Mykotoxine, Schwermetalle, Rückstände von Pflanzenschutzmitteln sowie mikrobiologische Parameter. Ziel war es, eine Übersicht über die Belastungssituation handelsüblicher pflanzlicher Drinks, die als ökologisch zertifiziert vermarktet werden, zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden zwei Chargen verschiedener Marken analysiert. Die chemische Analytik umfasste die Bestimmung von Schwermetallen mittels ICP-MS sowie Mykotoxinen und Pflanzenschutzmittelrückständen mittels LC-MS/MS. Ergänzend wurden mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt, darunter Gesamtkeimzahlbestimmungen und der Ausschluss potenziell pathogener Keime. Da in den ursprünglich untersuchten Proben Kontaminationen mit Mykotoxinen in Hafer- und Mandeldrinks festgestellt wurden, wurde der Probensatz erweitert, um diese Analysenergebnisse zu verifizieren und mögliche chargenübergreifende Unterschiede zu erfassen.

Die praktischen Arbeiten zu dieser Publikation wurden in Kooperation mit verschiedenen Einrichtungen durchgeführt: Das Institut für Lebensmittel- und

Bioverfahrenstechnik des Max Rubner-Instituts führte die Elementanalytik mittel ICP-MS durch. Am Institut für Sicherheit und Qualität bei Getreide des Max Rubner-Instituts wurden die Mykotoxine Zearalenon, Deoxnivalenol, T2 und HT-2, sowie die Pflanzenschutzrückstände untersucht. Das Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Instituts untersuchte die mikrobiologischen Parameter. Die Mykotoxinanalytik und die statistische Auswertung wurden am Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch des Max Rubner-Instituts durchgeführt.

Der Eigenanteil betrug 20 % und umfasste die experimentelle Durchführung, Datenanalyse sowie das Verfassen des Originalmanuskripts.

This article was originally published in Food Control, 166, 110599 by Gützkow, K. L., Lencioni, A., Schwake-Anduschus, C., Müller, A., Kabisch, J., Grundmann, V. L., Stöckl, M., & Maul, R., Comprehensive investigation of undesired substances and microbial contamination in plant-based drinks, 2024. © 2024 Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110599>



Comprehensive investigation of undesired substances and microbial contamination in plant-based drinks

K.L. Gützkow^{a,1}, A. Lencioni^{c,1}, C. Schwake-Anduschus^b, A. Müller^c, J. Kabisch^d, V.L. Grundmann^b, M. Stöckl^e, R. Maul^{a,*}

^a Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Kiel, Germany

^b Department of Safety and Quality of Cereals, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Detmold, Germany

^c Department of Food Technology and Bioprocess Engineering, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Karlsruhe, Germany

^d Department of Microbiology and Biotechnology, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Kiel, Germany

^e Department of Nutritional Behaviour, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Karlsruhe, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Vegetarian beverages
Non-dairy alternatives
Mycotoxins
Heavy metals
Pesticide residues
Food safety
Pathogens

ABSTRACT

There is a growing market relevance of non-dairy alternatives mainly driven by issues concerning an increasing prevalence of vegetarianism, awareness of animal welfare and ecological impact of food production. Among the most popular plant-based drinks (PBDs) are almond-, oat- and soy-based products. As the likeliness of contamination of PBDs varies markedly depending on their plant origin, in a survey of selected most common organic-products from the German market mycotoxins, residues of plant protection products, heavy metals, and microbial contamination have been monitored. The results showed that, with one exception, all products were commercially sterile, free of pathogenic microorganisms and contained at most trace amounts of plant protection agent residues. For nickel especially, soy-based drinks showed elevated levels of up to 315 µg/kg and these products also had the highest cadmium levels of up to 7.2 µg/kg. Oat and almond based drinks contained up to 159 and 54 µg/kg Ni and 1.4 and 0.6 µg/kg Cd respectively. By contrast, for mycotoxins, the soy-based drinks showed almost no detectable contamination, while up to 2.1 µg/L T2+HT2-toxin and 5.5 µg/L deoxynivalenol were quantified in oat-based drinks and up to 130 ng/L aflatoxin B₁ (AFB₁) were found in almond-based drinks. Additionally, oat- as well as almond-based drinks frequently contained up to 263 ng/L and 70 ng/L of the emerging mycotoxin and AFB₁ precursor sterigmatocystin.

In particular, the mycotoxins in oat- and almond-based drinks and heavy metals in soy-based drinks should be further investigated and minimized, as PBDs represent a novel and additional source of the overall human exposure to these contaminants.

1. Introduction

For a variety of reasons, the consumption of plant-based drinks (PBDs), whose use is similar to milk, is growing steadily, especially in European countries. The reasons include increased environmental awareness and a growing proportion of vegetarians and flexitarians (Dittmann A, Storcksdieck genannt Bonsmann, & Hoffmann, 2023). Globally, sales of PBDs are forecast to double from 16.8 billion dollars in 2019 to 34.6 billion dollars in 2029 (vegconomist, 2019). In Germany, sales of PBDs are forecast to increase from 610 million in 2022 to 1.21

billion euros in 2027 (Statista, 2022). The variety of products has changed from rather plain products with little processing and few food additives to more complex products in terms of flavouring, vitaminisation and techno-functional properties, like stability, viscosity and foaming.

The most important raw materials used for the production of such PBDs are soy, oats and almonds, based on market data (POSpulse, 2021). According to a recent market survey, oat-based drinks are the most popular milk alternative in Germany. Despite its promising market relevance, limited data is available, especially on the chemical and microbiological contamination status/safety of the PBDs. This is due to

* Corresponding author. Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103, Kiel, Germany.

E-mail address: Ronald.maul@mri.bund.de (R. Maul).

¹ Authors contributed equally to the manuscript.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110599>

Received 6 December 2023; Received in revised form 15 March 2024; Accepted 23 May 2024

Available online 29 May 2024

0956-7135/© 2024 Published by Elsevier Ltd.

Abbreviations

Cfu	colony forming unit(s)
PBDs	plant-based drinks
VRBD	Violet Red Bile Dextrose Agar
DRCM	Differential Reinforced Clostridial Medium
ALOA	Agar Listeria acc. to Ottaviani and Agosti
SSA	Salmonella Shigella Agar
PEMBA	Polymyxin Pyrivate Egg yolk Mannitol Bromothymolblue Agar
TBX	Tryptone-Bile-X-Glucuronate Agar

the lack of regulatory limits, e.g. for contaminants such as heavy metals or mycotoxins in the products, but also to the lack of validated analytical protocols for the specific matrices that can be applied in coordinated monitoring programmes of food control authorities.

In the reports of the few studies carried out on the presence of mycotoxins in PBDs aflatoxins, deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN) and ochratoxin A (OTA) were detected in various samples (Hamed, Abdel-Hamid, Gámiz-Gracia, García-Campaña, & Arroyo-Manzanares, 2019; Miró-Abella, et al., 2017). In addition, Miro-Abella et al. (2017) was able to detect aflatoxins, deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN) and ochratoxin A (OTA) in some samples, highlighting that in all cases the toxins found in the drinks correlated well with literature data on the presence of these toxins in the respective raw materials. Juan, Mañes, Juan-García, and Moltó (2022) investigated a set of PBDs from the Spanish market and documented the frequent occurrence of emerging mycotoxins such as the enniatins. With regard to oats, the trichothecene mycotoxins are the most relevant groups of toxins, with T2 and HT2 being currently under discussion with regard to their toxic potential. In addition, the aflatoxin B₁ (AFB₁) precursor sterigmatocystin (STC) is a compound of interest due to its mutagenic potential as well as its frequent occurrence in oats and almonds (Diaz Nieto, Granero, Zon, & Fernandez, 2018; Mol, Pietri, MacDonald, Anagnostopoulos, & Spanjere, 2015). As there are no specific legal limits for mycotoxins in PBDs, the limit of detection (LOD) for further monitoring programmes should be as low as possible in order to provide data for a meaningful risk assessment. For aflatoxins, the European legal limit of 50 ng/L for aflatoxin M₁ (AFM₁) in milk could be used as a target.

Because of their presence in the environment, toxic heavy metals like lead (Pb), cadmium (Cd) and nickel (Ni) occur as residues in foods and were therefore investigated in this study (European Food Safety Authority, 2009, 2010; 2020b).

The presence of inorganic toxic elements has been reported in PBDs raw materials such as Ni in nuts (Babaahmadifooladi & Jaxsens, 2021; Babaahmadifooladi et al., 2020). Leaching in the PBDs during production can lead to increased exposure, and potentially cause serious health problems (Afonne & Ifediba, 2020). So far, only few data on non-essential/toxic elements have been generated for a set of selected PBDs showing different contamination levels with Pb, Ni and Cd (Fioravanti, Rebellato, Milani, Morgano, & Bragotto, 2023; Marquès et al., 2022). For rice-based drinks, analysis of arsenic contamination would also be interesting. However, since rice-based drinks were excluded from this study due to their lower market relevance in Germany, we refrained from measuring arsenic in oat-, almond- and soy-based drinks.

From a microbiological point of view, plant-based milk alternatives can promote bacterial growth. They contain free monosaccharide sugars like fructose and glucose (Moore, et al., 2023), which are metabolized by a range of different microorganism species and could lead to a strong increase of the bacterial load associated with sensory losses or, under certain circumstances, to cases of foodborne disease. For this reason, commercially available PBDs are heat-treated to the point where they are considered as microbiologically safe. However, there is still some

risk of contamination in the finished product. Since only limited data are available for the German market, the microbiological load of commercially available PBDs should be estimated as part of these investigations.

Various crops are protected against pathogens and undesired co-plants of weeds and herbs during agronomy cultivation by applying pesticides, herbicides and fungicides. Few studies have been published so far on residues in plant-based beverages and to date, little is known about the contamination status of beverages from oats, almonds and soy beans. In one recent study of Giugliano et al. (2023) from northern Italy, low residue levels of plant protection chemicals were detected in few soy, oats and rice beverages. Schäfer et al. (2023) analysed soy- and rice-based drinks as infant formulae revealing the presence of small amounts of some critical pesticides like chlorate or trifluoroacetic acid. As part of this investigations, the safety aspects of oat-, almond- and soy-based drinks were analysed for the presence of fungicides, herbicides and pesticide residues, including the most commonly detected substances within the raw materials.

As the existing data on chemical and microbial contaminants in PBDs are fragmented, resulting from rather arbitrary sampling or restricted to only one group of undesirable compounds, the aim of the present study was to assess the most critical contaminants and residues in a closed set of samples.

As the main source of contamination for the final products is likely to be the raw commodities, only unsweetened products with little or no additives were selected for sampling, these represent the majority of the product group at approximately two thirds. To be as representative as possible, the three best-selling products and a selection of six brands of each product were sampled in two batches.

The analytical focus was on microbial and chemical contaminants and residues known to occur in the raw materials oats, almonds and soy.

2. Materials & methods

2.1. Sample collection and storage

In order to determine the safety aspects of the PBDs, six different products were selected from each of the three drink types. Two batches of each of these six products were purchased, resulting in 12 samples per drink type (3 PBD types x 6 brands x 2 batches). The samples were selected on the basis of market research with Innova to cover the market for non-fortified and unsweetened products as representatively as possible, as two thirds of the products on the German market are into this category.

As PBDs are available in food retail outlets throughout Germany, sampling in the Southern German region was considered sufficient. This took place between December 2021 and February 2022. The Tetra Paks were delivered to the laboratories in their original sealed condition and homogenized before processing. All products were analysed before the expiry date and the remaining samples were stored at −20 °C.

During the analysis of the original sample set of the project, different levels of mycotoxins were found in the oat- and soy-based drinks. To verify these analytical results and to exclude the possibility of isolated cases, the original sample set was extended by 25 oat- and 12 almond-based drinks. For this purpose, additional oat- and almond-based drink samples were purchased from supermarkets in Detmold and Kiel in November and December 2022. In addition to the organic products, there were also samples of conventional products. There was no restriction to unsweetened and non-fortified products. It was important for the extended sampling that the products were “pure”, i.e. there was no mixture of raw materials.

2.2. Mycotoxin analysis

2.2.1. Sample preparation

For analysing AFB₁, STC and OTA (Sigma- Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) the sample preparations were carried out as

follows. 62 µL of an IS mixture containing $^{13}\text{C}_{17}$ -AFB $_1$, $^{13}\text{C}_{18}$ -STC, and $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA (biopure™, Romer Labs Deutschland GmbH, Butzbach, Germany) (concentrations shown in the [Supplementary Information Table S3](#)) was added to 5 mL of the PBD sample, and the samples were extracted with 4.938 mL of Acetonitril (ACN) (Supelco® Merck KGaA, Darmstadt, Germany) containing 0.1 % formic acid (FA) (VWR International GmbH (Darmstadt, Germany)). After shaking for 10 min (IKA-VIBRAX VXR, IKA ®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany), 0.5 g sodium chloride (NaCl) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 2 g anhydrous magnesium sulphate (MgSO $_4$) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were added and the samples were shaken for another 5 min. Subsequently, the samples were centrifuged at 10,000×g for 7 min at room temperature (Avanti JXN-30, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany), 4 mL of supernatant was transferred in a centrifugation tube and 4 mL of n-heptane (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) were added. After shaking for 5 min (IKA-VIBRAX VXR, IKA ®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany), the n-heptane phase was discarded. ACN phase was transferred stepwise by repeated filling and evaporation into a 2 mL reagent tube containing 100 µL DMSO (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) as keeper solvent and the ACN was evaporated until only the DMSO proportion remained (Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). A total of 200 µL ACN containing 0.1 % FA were added to the residual liquid and vortexed. After additional sonicating for 10 min (Transsonic 460, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany), 300 µL of H $_2$ O (PURELAB flex 3, ELGA LabWater, Veolia Water Technologies Deutschland GmbH, Celle Germany) was added and the samples were sonicated again for 10 min and vortexed afterwards. The extracts were filtered using a regenerated cellulose 0.45-µm syringe filter unit (ProSense B-V., Munich, Germany) and either measured directly or stored at 4 °C until LC-MS analysis.

For the analysis of DON, ZEN, T2- and HT2-toxin a volume of 2 mL of the PBD was pipetted into a centrifuge tube and the weight was recorded. A volume of 100 µL internal standard solution ($^{13}\text{C}_{15}$ -DON, $^{13}\text{C}_{18}$ -ZEN, $^{13}\text{C}_{24}$ -T2, $^{13}\text{C}_{22}$ -HT2 at 200 ng/mL in acetonitrile) was added and vortexed briefly. After 8 mL of acetonitrile were added and again vortexed briefly, the mixture was extracted in an ultrasonic bath. The solution was centrifuged at 4000×g for 5 min. For the removal of matrix components, 3 mL of the extract was cleaned on a special column (BEKOLut Mycotoxin, BEKOLut GmbH & Co. KG, Bruchmühlbach-Miesau, Germany). Then 1 mL of the purified extract was concentrated to dryness and redissolved in 1 mL of the HPLC eluent (5 mM ammonium acetate in methanol/water 1/9 v/v). This solution was transferred to a vial using a 0.2 µm regenerated cellulose syringe filter and stored at 4 °C in the dark until analysed.

2.2.2. Instrumentation and parameters

The analysis of AFB $_1$, STC and OTA was performed on a 1290 Infinity II LC system (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn, Germany). Analytes were separated on a Gemini reversed phase C18 analytical column, 100 × 3.0 mm, 5.0 µm (Phenomenex®, Aschaffenburg, Germany), at an oven temperature of 35 °C, while the injection volume was 4 µL. LC separation was performed using a gradient elution of water (with 0.1 % formic acid, 300 mg/L ammonium formate) and methanol (with 0.1 % formic acid, 300 mg/L ammonium formate) and a flow rate of 0.5 mL/min. The gradient programme started at 5 % organic solvent for 0.8 min, raising to 50 % by minute 1.5, to 55 % by minute 2.5, to 70 % by minute 5.5, to 76 % by minute 6.5, and to 95 % by minute 15.5. Starting from minute 17.0, the organic percentage reverted to the starting conditions of 5 % by minute 17.5 and was kept until the end of the run at 19.5 min. MS detection was conducted using a triple quadrupole MS (QTRAP 6500 +, Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Germany) operating in both positive and negative electro spray ionisation (ESI) mode and measuring in multiple reaction mode (MRM) with the following settings: curtain gas 40, collision gas medium, temperature 350 °C, the $\pm$ ion spray voltage 4500 V, nebuliser gas flow of 50, heater gas flow of 45, and dwell

time varied. Data acquisition and evaluation was performed with Analyst Software, V. 1.7.2, and MultiQuant Software, V. 3.0.3, AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Germany.

ZEN and the trichothecene toxins DON, T2- and HT2-toxin were analysed separately on a HPLC system (Prominence LC 20, Shimadzu, Duisburg, Germany) coupled to a mass spectrometer (4000QTrap, ABSciex, Darmstadt, Germany). The method, which operates in negative and positive electrospray mode, detects the analytes listed in [Table S2](#) with their respective MRM transitions and the following general settings: curtain gas, 28 psi; CAD gas medium; IS, 4500 V; temperature, 350 °C; gas 1, 50 psi; and gas 2, 75 psi. The separation of the analytes with an injection volume of 20 µL is carried out on an analytical column packed with reversed-phase material (Luna Phenyl-Hexyl 5 µm; i.d. 2.0 mm and length 150 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) in a column oven at 25 °C. A flowrate of 0.4 mL/min was used with eluents A containing 5 mM ammonium acetate/methanol/acetic acid (89/10/1 v/v/v) and B consisting of 5 mM ammonium acetate/methanol/acetic acid (2/97/1 v/v/v), starting at 5 % B, from 1 min to 10 min reaching 95 % B, holding time to 15 min with 95 % B, within 17 min to 5 % B, end at 20 min with 5 % B.

Analytical parameters of quantitative determination of the mycotoxins with the HPLC-MS/MS are shown in [Table S 2](#) in the supplementary information.

2.3. Residues of fungicides, herbicides and pesticides

2.3.1. Sample preparation

The treatment and analytical characterisation of the PBDs samples was carried out according to the European Standards multimethod for the determination of pesticide residues in foods of plant origin after extraction with an acetonitrile-water mixture (DIN EN 15662). The procedure corresponds to the modular QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged, Safe) method as follows: 50 µL of the internal standard solution (triphenylphosphate in acetonitrile, 10 µg/mL) was added to 10 g of the sample and diluted with 10 mL ultrapure water (Milli-Q IQ 7000, Merck, Darmstadt, Germany). Then 10 mL acetonitrile (LC grade, Honeywell, Riedel de Haen) were given into the sample. After shaking for 15 min (shaker GFL 3006, GFL Lauda, Lauda-Koenigshofen, Germany), a salt mixture (SupelTM QuE Citrate, Supelco, Merck, Darmstadt, Germany) was added, immediately shaken vigorously for 1 min and centrifuged at −10 °C and 4816×g for 5 min (X3FR Multifuge, Thermo Fisher, Osterode, Germany). A volume of 8 mL of the extract was left at −18 °C for at least 2 h and centrifuged again at −10 °C within 5 min to separate frozen fat. A PSA-salt mixture (SupelTM QuE PSA/MgSO $_4$, Supelco, Merck, Darmstadt, Germany) has been added to 6 mL of the extract and shaken vigorously by hand for 30 s. After repeated centrifugation, 40 µL of 5 % formic acid in acetonitrile was added to 4 mL of the purified extract and shaken. The sample was filtered through a membrane (Sartorius Minisart SRP, hydrophobic, 15 mm, Sartorius) into an autosampler vial and stored in a cool dark place until measurement.

2.3.2. Instrumentation and parameters

An injection volume of 10 µL of the sample was analysed for the presence of a selection of fungicides, herbicides and pesticides using an HPLC system (Prominence LC 20, Shimadzu, Duisburg, Germany) coupled to a mass spectrometer (4000QTrap, ABSciex, Darmstadt, Germany). The method, which operates in positive electrospray mode, detects the analytes listed in [Table S 2](#) with their respective MRM transitions with the following general settings: curtain gas, 28 psi; CAD gas medium; IS, 5500 V; temperature, 315 °C; gas 1, 50 psi; and gas 2, 75 psi. The analytes included in the detection methods were selected on the basis of their ranking in use in agronomy in Germany, as this method was routinely available in the laboratory.

The separation of the analytes was carried out on an analytical column packed with reversed-phase material (ZORBAX Eclipse XDB-C18 3.5 µm; i.d. 2.1 mm and length 150 mm, Agilent, Waldbronn,

Germany) in a column oven at 30 °C. An isocratic flow of 0.2 mL/min over 60 min was used. The eluent was 20 % water and 80 % methanol both containing 0.1 mM ammonium formate.

2.4. Heavy metals

2.4.1. Sample preparation and instrumentation parameters

Concentrations of heavy metals (^{207}Pb , ^{112}Cd , ^{58}Ni) were measured by ICP-MS (iCAP Q, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, United States).

5 g of each drink was microwave-digested (MWS-1, Berghof Products + Instruments GmbH, Eningen, Germany) with 5 mL of concentrated nitric acid (HNO_3) (65 % v/v) and 1 mL of hydrochloric acid (HCl) (30 % v/v) (Merck, Darmstadt, Germany). Heating was performed in successive steps: linear temperature increased up to 80 °C in 5 min; 10 min at 80 °C; linear temperature increased up to 180 °C in 10 min; 20 min at 180 °C. All samples were analysed in triplicate. A set of digestion blanks and a set of reference material was prepared with each sample batch. The samples were diluted in different levels depending on the mineral content. Measurement of the samples was carried out in 2 % (v/v) HNO_3 using standard mode or collision mode with a dwell time of 10 ms and Argon 5.0 as plasma gas and Hydrogen as collision gas (Linde AG, Dortmund, Germany). $^{103}\text{Rhodium}$ was used as internal standard. Standard addition was used for calibration. The limit of quantification (LOQ) was calculated based on the measured values of the blanks ($n = 39\text{--}40$), where by $\text{LOQ} = \text{mean} + 10 \times \text{standard deviation}$. Cabbage NCS ZC73012a (Cd, Ni) and Kidney beans NCS ZC73019 (Pb) were used as reference material ($n = 40$) to verify the precision and accuracy of the ICP-MS measurement (Table S 4).

2.5. Microbiological analyses

For the detection and enumeration of microorganisms, a volume of 25 mL of each sample was taken aseptically and added in a sterile stomacher bag (VWR, Darmstadt, Germany) with 225 mL of buffered peptone water (BPW; VWR, Darmstadt, Germany) according to ISO 6887-1:1999 (International Organisation for Standardisation, 1999) and homogenized in a stomacher (Stomacher 400; Seward, United Kingdom) for 120 s, 200 rpm at room temperature. For enumeration of bacteria, tenfold serial dilutions were performed using buffered sodium chloride/peptone solution (VWR, Darmstadt, Germany) and aliquots (0.1 mL) of the appropriate dilutions were spread plated.

Hygiene parameters were quantitatively analysed using the following indicator bacteria, agar media and incubation conditions to determine the cell counts: total viable counts (TVC) on plate count agar

(Oxoid Ltd., Hampshire, UK) for 72 h at 30 °C, Enterobacteriaceae on violet red bile dextrose (VRBD) agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 24 h at 37 °C, sulphite-reducing clostridia on differential reinforcement clostridial medium (DRCM) agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), using AnaeroGen packs (Oxoid Ltd., UK) for an anaerobic atmosphere for 72 h at 30 °C. In addition, TVC was incubated also at 50 °C to determine the number of heat-tolerant bacteria. The incubation was carried out aerobically and anaerobically for 72 h. Results were expressed as log colony-forming unit (cfu) mL^{-1} . Data were exported from Excel 2010 (Microsoft, Redmond) to SigmaPlot 11 (Systat Software, Inc., San Jose) for analysis, including descriptive statistics, means, standard deviations, and box plots.

3. Results and discussion

3.1. Mycotoxins contamination in plant-based drinks

All mycotoxins except OTA were detected in at least one drink. Summarised values for all detected mycotoxins are shown in Table 1 (all concentrations are given in Table S 3 in the supplementary information). Few mycotoxins were detected in soy-based drinks and, if so, only low concentrations of the toxins tested were found (Fig. 1). In contrast, almost all oat- and almond-based drinks contained detectable levels of at least one mycotoxin.

96 % of the almond-based drinks were contaminated with AFB_1 , while 66 % contained detectable amounts of its biosynthetic precursor STC (Fig. 3). This suggest that the mycotoxins originate from raw materials, as ABF_1 contamination is a well-known issue especially in almonds (European Food Safety Authority, 2020a).

In the oat-based drinks, T2/HT2 toxins, STC , but no AFB_1 were frequently found (Fig. 2).

Presently, for mycotoxins no transfer rate from raw commodity to the final drink can be estimated as no data for the mycotoxin content of the raw materials are available. Additionally, varying transfer rates should be expected depending on the respective manufacturing processes for each of the analysed drinks.

By contrast, Miró-Abella, et al. (2017) detected AFB_1 up to 0.3 $\mu\text{g/L}$ and OTA up to 0.2 $\mu\text{g/L}$ in two oat-based drinks, while Hamed et al. (2019) and Juan et al. (2022) found no aflatoxins in oat-based drinks, similar to the results obtained in this study. However, all previous studies suffer from rather high detection limits, which could explain the low number of samples found positive for mycotoxins in general. Particularly, for aflatoxins a frequent contamination of almonds has been reported (European Food Safety Authority, 2007), however, the contents are often at a low to moderate level. There is currently no

Table 1
Summary of the mycotoxin contents in the plant-based drinks listed by analyte.

Toxin	Plant-based drink	No. of drinks	Number of samples with detectable levels ^a	Mean [ng/L]	Median [ng/L]	90th percentile [ng/L]	Maximum [ng/L]
AFB_1	Oat	37	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	Almond	24	23	18.1	9.38	48.9	130
	Soy	12	1	0.87	0.00	0.00	10.5
STC	Oat	37	25	15.4	7.34	28.2	263
	Almond	24	16	8.89	2.00	22.7	70.3
	Soy	12	2	0.33	0.00	1.80	2.00
DON	Oat	37	33	692	150	1455	5458
	Almond	24	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	Soy	12	1	12.5	0.00	0.00	150
ZEN	Oat	37	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	Almond	24	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	Soy	12	1	44.2	0.00	0.00	530
T2/HT2	Oat	37	29	397	300	1056	2147
	Almond	24	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	Soy	12	2	98.3	0.00	270	880

^a The methods used detect the analytes at the following limits of detection (LOD): AFB_1 : 2 ng/L, STC : 2 ng/L, OTA: 288 ng/L, DON: 0.15 $\mu\text{g/L}$, ZEN: 0.15 $\mu\text{g/L}$, T2-Toxin: 0.15 $\mu\text{g/L}$, HT2-Toxin: 0.15 $\mu\text{g/L}$; The limit of quantification (LOQ) is 3.3 times the LOD. Samples with contents below the LOQ but above the LOD were uniformly set to the value of the LOD for the evaluation (lower bound).

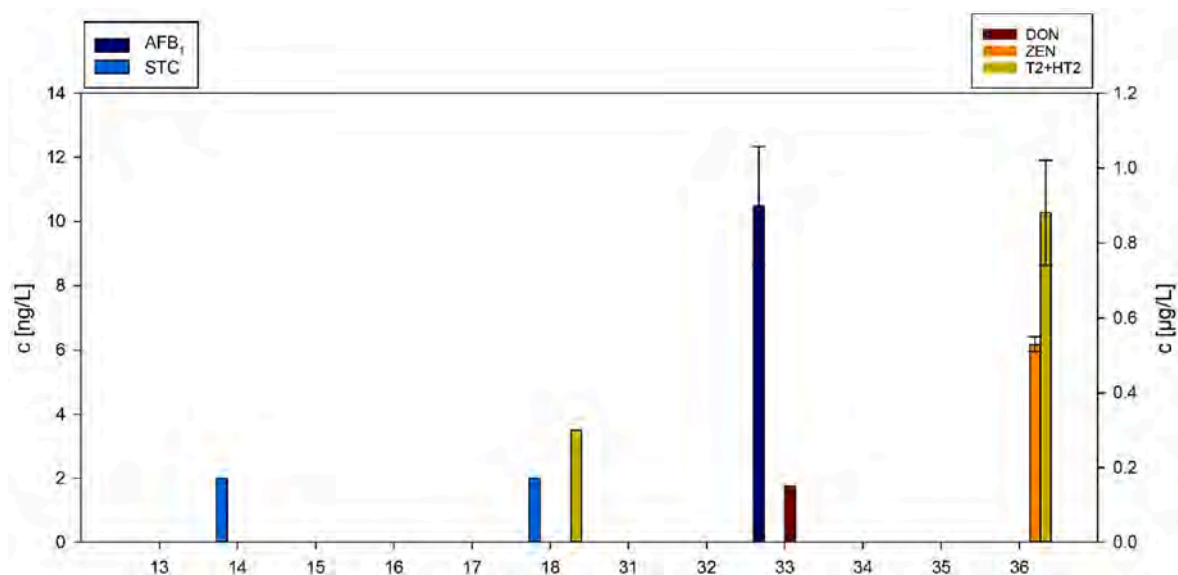


Fig. 1. Mycotoxins found in soy-based drinks are shown for each analysed sample. AFB₁ and STC concentrations refer to the left y-axis and DON, ZEN and T-2 + HT-2 concentrations to the right y-axis. Concentrations below LOQ but above LOD were set to LOD using the lower bound approach. LOD: AFB₁: 2 ng/L, STC: 2 ng/L, OTA: 288 ng/L, DON: 0.15 µg/L, ZEN: 0.15 µg/L, T2 toxin: 0.15 µg/L, HT2 toxin: 0.15 µg/L; LOQ is 3.3 times the LOD.

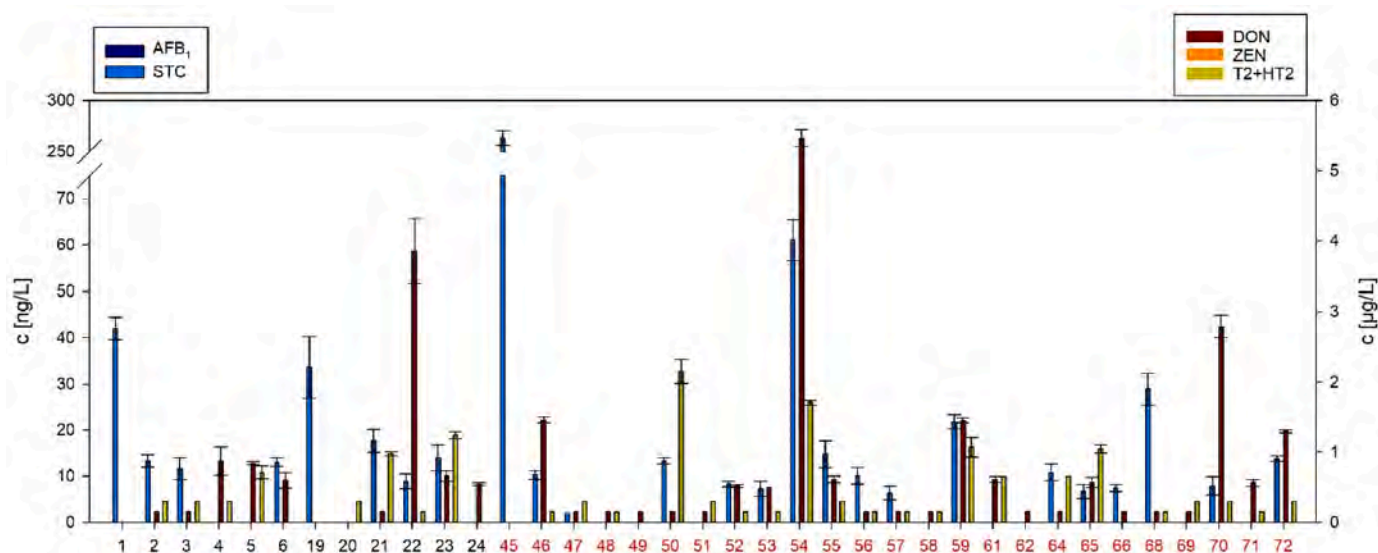


Fig. 2. Mycotoxins found in oat-based drinks are shown for each analysed sample. AFB₁ and STC concentrations refer to the left y-axis and DON, ZEN and T-2 + HT-2 concentrations to the right y-axis. Concentrations below LOQ but above LOD were set to LOD using the lower bound approach. LOD: AFB₁: 2 ng/L, STC: 2 ng/L, OTA: 288 ng/L, DON: 0.15 µg/L, ZEN: 0.15 µg/L, T2 toxin: 0.15 µg/L, HT2 toxin: 0.15 µg/L; LOQ is 3.3 times the LOD. (No. 1–24 first sample set; No. 45–72 additional sample set).

published data on STC in PBDs. However, previous data regarding the presence of STC in various raw materials such as oats and almonds (Diaz Nieto, et al., 2018; Mol et al., 2015) is coherent with the occurrence of this toxin in the analysed PBDs.

Since the present data for AFB₁ and STC clearly demonstrate that there is no fixed ratio between AFB₁ and STC, the two *Aspergillus* toxins should be considered and evaluated as separate mycotoxins. Although the fungal species being responsible for the initial contamination of the raw material remain unknown in the present investigation, it must be assumed that almonds are infested by mould species such as *A. flavus* and *A. parasiticus* (Alshannaq & Yu, 2017) and *A. nidulans* (Rodrigues, Venâncio, & Lima, 2012) forming both toxins. While oats are more likely to be spoiled by *A. versicolor* (Versilovskis & De Saeger, 2010), which does not produce AFB₁ from STC.

In some cases, the oat drinks with high STC levels were also contaminated with the trichothecene mycotoxins DON, T2 and HT2. In contrast, drinks 1, 19 and 45 with high STC levels were practically free of trichothecenes. Therefore, a direct correlation between the contamination levels of the different toxins in individual products cannot be derived from the data. Two or more toxins were found in more than half of the products with detectable levels of mycotoxins. Overall, the results indicate a correlation between the toxins found in the drinks and the literature data on the presence of these toxins in the respective raw materials (Miró-Abella, et al., 2017), e.g. aflatoxins in almonds (European Food Safety Authority, 2007) and T2/HT2 toxins in oats (Pettersson, et al., 2011).

In a survey of raw oats from 2005 to 2009, the mean value for the sum of T2 and HT2 toxin was found to be 94 µg/kg (Pettersson, et al.,

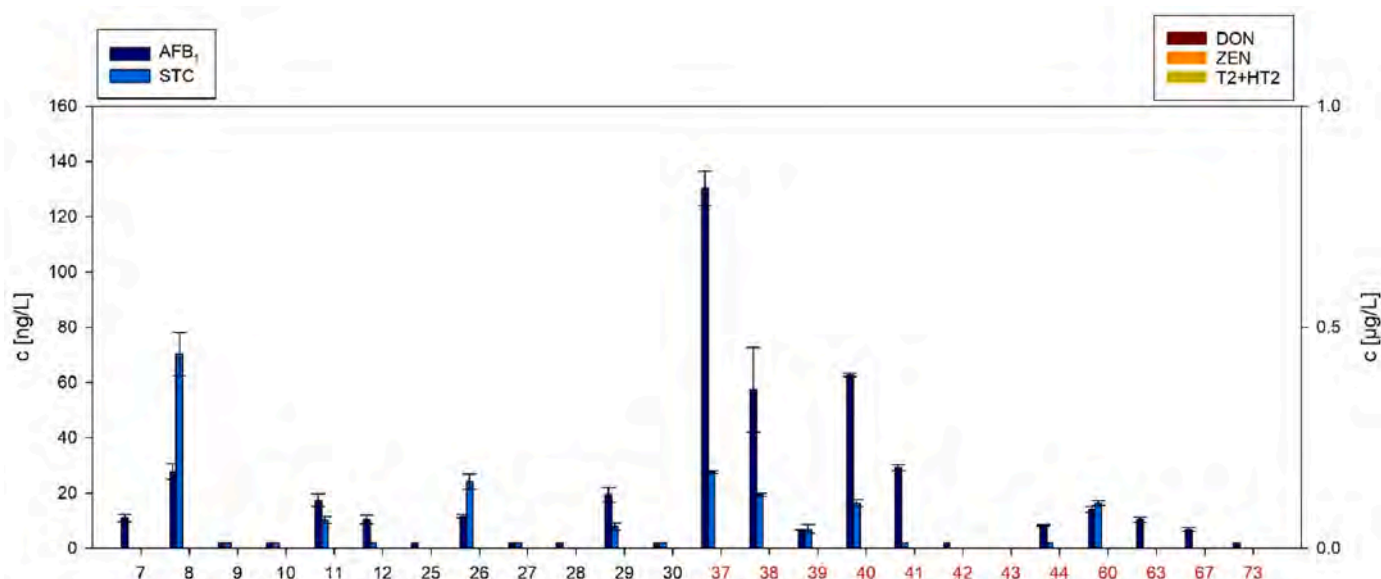


Fig. 3. Mycotoxins found in almond-based drinks are shown for each analysed sample. AFB₁ and STC concentrations refer to the left y-axis and DON, ZEN and T-2 + HT-2 concentrations to the right y-axis. Concentrations below LOQ but above LOD were set to LOD using the lower bound approach. LOD: AFB₁: 2 ng/L, STC: 2 ng/L, OTA: 288 ng/L, DON: 0.15 µg/L, ZEN: 0.15 µg/L, T2 toxin: 0.15 µg/L, HT2 toxin: 0.15 µg/L; LOQ is 3.3 times the LOD. (No. 7–30 first sample set; No. 37–73 additional sample set).

2011). As approximately 100 g of oats are used to produce 1 L of drink, the complete transfer of an oat material with the mean content would result in 9.4 µg/L T2 and HT2 toxin in the drink. The mean value found in the drinks of this study is 0.4 µg/L, indicating that either the toxin is not transferred to the drink to a great extent or the raw material used for production had a lower toxin content, e.g. due to a dehulling step reducing the toxin content by more than 80 % (Schwake-Anduschus, et al., 2010). Data from the German food monitoring 2019 showed that 76 % of ground almond samples taken from the market were positive in AFB₁ with a mean content of 1.06 µg/kg (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2021). As for almond-based drinks approximately 50 g almonds are used for preparation of 1 L drink, a theoretical mean content of 53 ng/L AFB₁ could be derived. In the present study, 18 ng/L mean AFB₁ content were detected. Here the transfer appears to be more intense than for T2 and HT2 toxin and probably no further cleaning steps were undertaken during drink production. Direct comparison of two different lots of the same product provides no indication that the contamination situation of products of the same brand is particularly similar (Table S3). Thus, the status of the raw commodity and not the production site seems to determine the level of the investigated mycotoxins in the PBDs.

For the assessment of the contamination status, the values for the tolerable daily intake (TDI) or the tolerable weekly intake (TWI) calculated by the EFSA were used. Additionally, it was assumed that the body weight for an average adult person is 65 kg and that there are two possible consumption scenarios: The first scenario (low consumption) was set at a consumption level of 100 mL PBD per day. This scenario refers to people that do not fully substitute cow's milk through PBDs in their diet and therefore consume only a moderate amount of PBDs, e. g. by adding it to their coffee instead of cow's milk. The second scenario (high consumption) is standing for a consumption level of 500 mL PBD per day, which represents the consumption behaviour of people that are substituting cow's milk completely with PBDs in their diet and use PBDs on a wider range, e. g. also for cooking or as a beverage itself.

For the mycotoxins AFB₁, DON and T2/HT2 a preliminary assessment has been derived. Product no. 37 with the highest AFB₁ content of all samples of 130 ng/L is an almond-based drink with a declared almond content of 4 %. Since other ingredients are not expected to contribute to any AFB₁ entering the product, it can be assumed that the

raw almonds can be considered as responsible for the entire AFB₁ load. Assuming that the toxin is completely leached from the almond to the drink, 40 g of almonds have contained 130 ng of AFB₁, or 3.3 µg/kg in the raw almonds respectively. If the actual transfer rate was only 33 % instead of 100 %, the raw material would have had a content of 9.8 µg/kg and would therefore no longer have been marketable, since the relevant maximum content is 8.0 µg/kg according to APPENDIX I, number 1.1.9 of EU regulation No. 2023/915. However, this is a theoretical deduction as it was not feasible to analyse the raw materials used for production. In order to estimate the proportion of mycotoxins that are transferred from the raw material to the final drink, an evaluation of transfer factors would be mandatory. In addition, there is no information available about the respective manufacturing processes for each of the analysed drinks, which could have an impact on the transfer of the toxins.

Since no safe levels (e.g. as a TDI) can be given for mutagenic compounds such as AFB₁, a minimization concept needs to be aimed for in all foods (ALARA principle). Similarly, for STC, which is also mutagenic in model studies (Diaz Nieto, et al., 2018; Theumer et al., 2018), application of the ALARA principle might be advisable, although not enough data and no toxicological assessment exist yet. A further critical consideration is advisable, especially since STC was determined more frequently and sometimes in higher concentrations than AFB₁ in the almond- and oat-based drinks examined.

Several PBDs samples were found to be contaminated with multiple mycotoxins. For instance, in most of the almond-based drink samples AFB₁ and STC were detected together. As STC is a biosynthetic precursor of AFB₁, the two compounds have common structural domains and both possess mutagenic effects. When different substances are present together in the human body, they may interact and potentially influence the toxic effects. In comparison to the toxicity of individual components, their combined effects may be additive or even more than additive (synergistic) (Bloch, et al., 2023; Delfosse et al., 2021; Elcombe, Evans, & Bellingham, 2022).

Currently, there is limited data available on the combined toxicity. In a recent study, Alonso-Jauregui et al. (2023) examined the combined toxicity of AFB₁ and STC in Wistar rats and observed a potential toxicokinetic interaction (Alonso-Jauregui, et al., 2023). Furthermore, Beisl et al. (2021) showed possible interactions due to co-exposure of the

mycotoxins cereulide and deoxynivalenol in human intestinal cells. Additionally, [Vejdovsky, Warth, Sulyok, and Marko \(2016\)](#) were able to show cytotoxic interactions for several combinations of *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins including enniatin B, aurofusarin, deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and tenuazonic acid, with in some cases even exhibiting additive effects.

For the *Fusarium* mycotoxins DON, T2 and HT2-toxin, calculation of the TDI exhaustion is possible due to the consumption of the PBDs investigated in the present study. Here, it must be added as previously mentioned that the number of samples analysed is relatively small and there is no data on a realistic intake of PBDs by different population groups that would make a complete assessment possible.

Based on the highest levels found of around 2.1 µg/L T2/HT2 and an assumed low daily consumption of 100 mL per day, an intake results of 210 ng T2/HT2. Consequently, high consumption, an uptake of 1050 ng T2/HT2 can be derived. Daily consumption of a drink with the highest measured concentration would result in exhaustion of the tolerable daily intake of 1300 ng T2/HT2 for an adult of 16 % (low) or 81 % (high) with an assumed body weight of 65 kg ([European Food Safety Authority, 2017](#)).

The acute reference dose (ARfD), above which acute adverse effects are possible, is 15 times higher for T2/HT2 than the TDI (ARfD: 0.3 µg/kg body weight/day) ([European Food Safety Authority, 2017](#)). The higher assumed consumption amount would lead to an exploitation of about 5.5 %, resulting from the intake of 500 mL of the oat-based drink (for a 65 kg person).

For DON, with the maximum measured DON content of 5.5 µg/L in an oat drink, the contribution to the TDI (1 µg/kg body weight) is less than 1 % for the low consumption. An exploitation of 4.2 % of the TDI for DON is calculated for an intake volume of 500 mL.

Overall, the analysis of the mycotoxin contamination showed that 71 % of oat-based drinks were contaminated with T2/HT2 toxins and the majority of the oat- and almond-based samples contained AFB₁ or its precursor STC. Using the highest values of T2/HT2 toxins measured in this study along with a daily consumption of 500 mL such a highly contaminated oat-based drink can exceed 80 % of the TDI level for T2/HT2 toxin. Therefore, the consumption of PBDs represents an additional potential route of entry for the mycotoxins AFB₁, STC and T2/HT2 toxins into the human diet. As comprehensive consumption data especially for vulnerable consumer groups is still lacking, more in depth risk assessment is still precluded. However, as soon as PBDs are used to replace conventional milk in the diet of infants and small children, the exploitation of the TDI could even exceed 100 %.

3.2. Residues of fungicides, herbicides and pesticides in plant-based drinks

As part of the investigations of the safety aspects of PBDs, samples of oat-, almond- and soy-based drinks were analysed for the presence of fungicides, herbicides and pesticide residues. The most commonly used active substances included in the detection method were selected on the basis of their ranking in use in agronomy in Germany, as this method was routinely available in the laboratory.

Among the PBDs tested, low levels of fluopyram were detected in two almond-based drink samples from different batches of one manufacturer. The residues were well below the limit of quantification. None of the other substances tested were detectable in any of the other beverages.

The PBDs analysed for residues of plant protection agents were of organic biological production, where the use of synthetic chemical fungicides is not allowed. The route of entry of small amounts of fluopyram into the product tested positive cannot be verified from this study. Fluopyram is a new fungicide and is not considered toxicologically critical for humans and animals (LD50 in rats >2000 mg/kg body weight). However, its persistence in water, soil and the environment appear to be high ([Rathod, Shah, Parmar, & Kalasariya, 2022](#)). In addition, the detected fungicide fluopyram is regulated in various nuts,

including almonds, in regulation (EU) 2017/978 ([Commission Regulation \(EU\), 2017](#)). In the European Union, the maximum residue level for fluopyram is 0.05 mg/kg in almonds. Nonetheless, transfer factors for the transfer of these undesirable substances from almonds to almond-based drinks are not yet published. Manufacturers of almond-based drinks declare approximately 4–6 % almonds in the drinks. However, it would be similarly interesting to have a look at drinks from conventional production where crop protection products may have been in use. In the recent study by [Giugliano et al. \(2023\)](#) from northern Italy, low levels of residues of fipronil sulfone, piperonyl butoxide and pirimiphos methyl were found in 4 soy, 3 oat and 4 rice beverages. These findings, all in conventionally beverages, were all very low and were not considered to be of health concern to consumers. In another study, residue analysis of toxicologically critical pesticides and metabolites from the EU market revealed one soy- and one rice-based drink as positive samples ([Schäfer, et al., 2023](#)). The authors reported the detection of low levels of chlorate, perchlorate, phosphonic acid, trifluoroacetic acid and thiocyanate. Interestingly, the study included organic and non-organic beverages, both of which showed residues. Keeping in mind the few published papers, it can be concluded that especially conventionally but also organically produced PBDs should be further investigated for residues of pesticides to improve the data base. Particularly the contamination status of PBDs manufactured from conventionally produced crops could be deviating from the results of the present study.

3.3. Heavy metals contamination in plant-based drinks

The average contents of heavy metals in the PBDs samples of oat, almond and soy are presented in [Table 2](#) (all concentrations are shown in [Table S 3](#) in the supplementary information). The contents of Pb in all tested PBDs were below the limit of quantification (2.67 µg/kg), with only four soy-based drinks above the limit of detection. In contrast, [Astolfi, Marconi, Protano, and Canepari \(2020\)](#) found higher levels of Pb contamination, with a mean of 3 µg/kg, in soy-, oat-, and almond-based drinks. However, similar to the results obtained in this study, [Karasakal \(2020\)](#) did not detect any Pb concentrations in soy- or almond-based drinks above the LOD (17 µg/kg). [Redan et al. \(2023\)](#) also did not detect any Pb contamination in oat- and soy-based drinks above the LOQ (6 µg/kg). Furthermore, [Marques et al. \(2022\)](#) and [Fioravanti et al. \(2023\)](#) obtained similar results, detecting only traces of Pb in almond-, oat-, and soy-based drinks.

For Cd, the drinks from 4 producers (sample 1, 3, 5, 6, 19, 21, 23 and 24) of oat-based as well as from one producer of almond-based drinks (sample 8 and 26) showed contents slightly above the limit of quantification (0.32 µg/kg). Higher contents of Cd were detected in soy-based drinks with a range from slightly below the limit of quantification (sample 34) up to 7.15 ± 0.04 µg/kg (sample 36) ([Table S 3, Fig. 4](#)). [Astolfi et al. \(2020\)](#) and [Redan et al. \(2023\)](#) found similar levels of cadmium in almond- (mean 0.4 µg/kg; mean 2 µg/kg), oat- (mean 0.5 µg/kg; mean 2 µg/kg), and soy-based drinks (mean 3 µg/kg; mean 3.9 µg/kg) to the results of this study. However, [Karasakal \(2020\)](#) did not detect any cadmium contamination above the LOD in soy- and almond-based drinks. [Fioravanti et al. \(2023\)](#) found up to 4 µg/kg of Cd in almond-based drinks, while soy- and oat-based drinks had Cd levels below the limit of quantification.

The average contents of Ni were tested above the limit of quantification (6.16 µg/kg) for all tested PBD samples. Here, the lowest Ni contents were detected in the almond-based drinks followed by the oat-based drink samples ([Fig. 5](#)). The highest average contents of Ni were measured in soy-based drinks with up to 315 µg/kg (sample 33) ([Fig. 5](#)).

In general, the contents of heavy metals were unobtrusive in all PBD samples, especially Pb and Cd being determined below or around the limit of quantification. However, higher contents of Ni were found in soy-based drinks, due to the occurrence of Ni in the raw products. Especially, in nitrogen fixing plants such as legumes Ni plays a role in

Table 2

Summary of the heavy metals contents in the plant-based drinks listed by analyte.

Toxin	Plant-based drink	No. of drinks	Number of samples with detectable levels ^a	Mean [$\mu\text{g/kg}$]	Median [$\mu\text{g/kg}$]	90th percentile [$\mu\text{g/kg}$]	Maximum [$\mu\text{g/kg}$]
Pb	Oat	12	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	Almond	12	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	Soy	12	4	0.31	0.00	0.93	0.93
Cd	Oat	12	12	0.62	0.42	1.35	1.43
	Almond	12	7	0.13	0.11	0.44	0.57
	Soy	12	12	2.40	1.93	5.56	7.15
Ni	Oat	12	12	95.8	95.5	128	159
	Almond	12	12	30.4	29.9	45.1	53.7
	Soy	12	12	201	176	302	315

^a The methods used detect the analytes at the following limits of detection (LOD): Pb 0.93 $\mu\text{g/kg}$, Cd 0.11 $\mu\text{g/kg}$, Ni 2.15 $\mu\text{g/kg}$; and limits of quantification (LOQ): Pb 2.67 $\mu\text{g/kg}$, Cd 0.32 $\mu\text{g/kg}$, Ni 6.16 $\mu\text{g/kg}$. Samples with contents below the LOQ but above the LOD were uniformly set to the value of the LOD for the evaluation (lower bound).

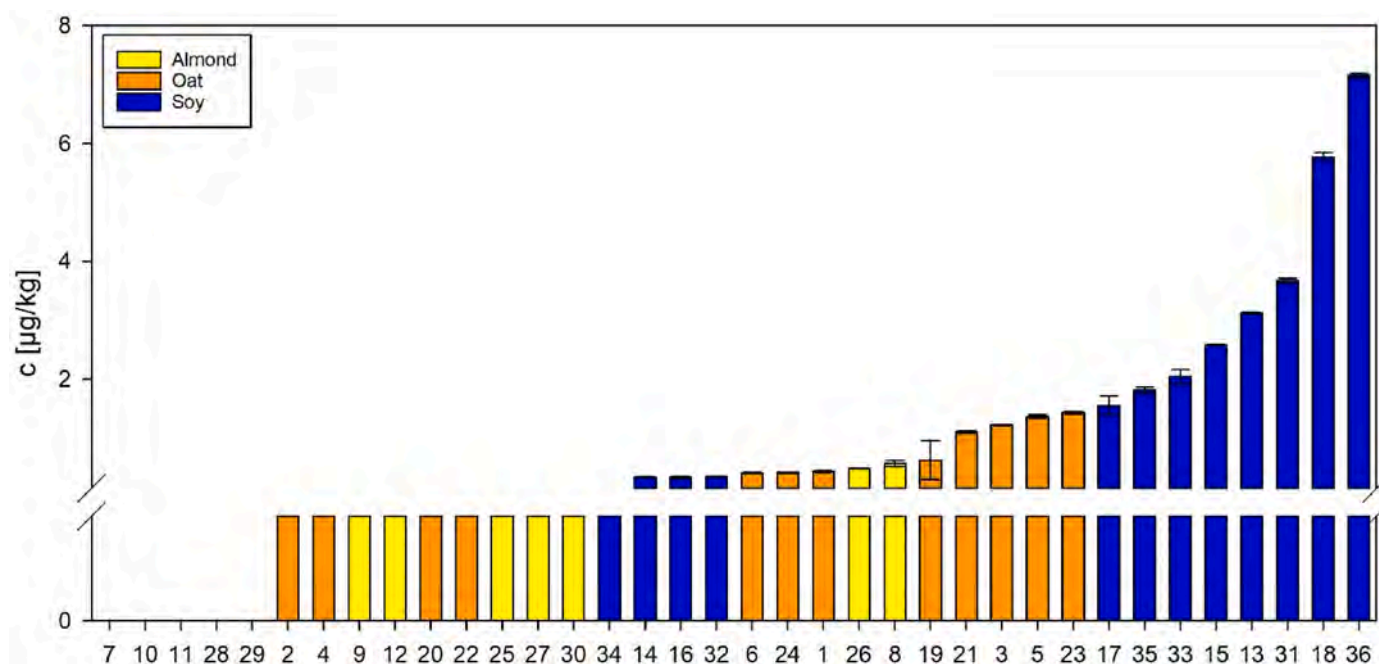


Fig. 4. Cadmium concentrations found in PBDs are shown for each analysed sample. Concentrations below LOQ but above LOD were set to LOD using the lower bound approach. LOD: 0.11 $\mu\text{g/kg}$; LOQ: 0.32 $\mu\text{g/kg}$.

nitrogen metabolism as a structural component of essential enzymes (Lavres, Castro Franco, & de Sousa Câmara, 2016). Therefore, Ni is found in higher quantities in various soy products which are thereby major contributors of chronic exposure to Ni (Babaahmadifooladi & Jacsens, 2021). In good accordance with our analyses, Babaahmadifooladi et al. (2020) detected average Ni contents of 227 $\mu\text{g/kg}$ in soy-based drinks, 170 $\mu\text{g/kg}$ in soy desserts and 425 $\mu\text{g/kg}$ in tofu, respectively. Fioravanti et al. (2023) obtained comparable results, reporting Ni levels of up to 100 $\mu\text{g/kg}$ in almond-based drinks, 244 $\mu\text{g/kg}$ in oat-based drinks, and 128 $\mu\text{g/kg}$ in soy-based drinks.

To assess the contamination status with heavy metals, the same scenarios and values described in section 3.1 for mycotoxin assessment were used. The measured heavy metal contents were generally inconspicuous. In all tested samples, the content of Pb was below the limit of quantification (2.67 $\mu\text{g/kg}$) and except for four soy-based samples, all contents of Pb were below the limit of detection of 0.93 $\mu\text{g/kg}$. Since the EFSA no longer specifies a tolerable daily intake (TDI) for Pb, the targeted value for Pb intake should be near to zero (European Food Safety Authority, 2010). Since the measured Pb contents were all around the limit of detection or below, the measured PBDs pose only a low risk for Pb exposure. However, since there is no threshold of Pb-induced negative health effects, especially children should avoid even marginal

exposure in order to exclude the potential risk of neurodevelopmental effects (European Food Safety Authority, 2010).

For the heavy metals, especially Cd and Ni appear to have the highest relevance. In the oat-based and almond-based samples, the contents of Cd were around the limit of quantification (0.32 $\mu\text{g/kg}$) or below, whereas in the soy-based samples higher amounts were detected. The tolerable weekly intake (TWI) for Cd of 2.5 $\mu\text{g/kg}$ body weight (European Food Safety Authority, 2009) gets exploited to 3 % in case of the low consumption scenario of 100 mL per day, for the high consumption scenario (500 mL per day), the exploitation of the TWI would amount to 15 %, using the highest measured amount of Cd in this study (7.15 ± 0.04 $\mu\text{g/kg}$ in a soy-based drink) and assuming a person with a body weight of 65 kg. Therefore, the health hazard of the tested PBDs relating to Cd is expected to be rather low.

For Ni, the measured contents were above the limit of quantification (6.16 $\mu\text{g/kg}$) in all tested samples. The highest Ni content in the tested PBDs was found in a soy-based drink with 315 $\mu\text{g/kg}$. Assuming that a person weighing 65 kg would consume 100 mL of this soy-based drink on a daily basis (low consumption), the exploitation of the TDI for Ni of 13 $\mu\text{g/kg}$ body weight (European Food Safety Authority, 2020b) would amount to 4 %. In case of the high consumption scenario, the TDI for Ni is exploited by 19 %. Therefore, we consider the tested PBDs as a low

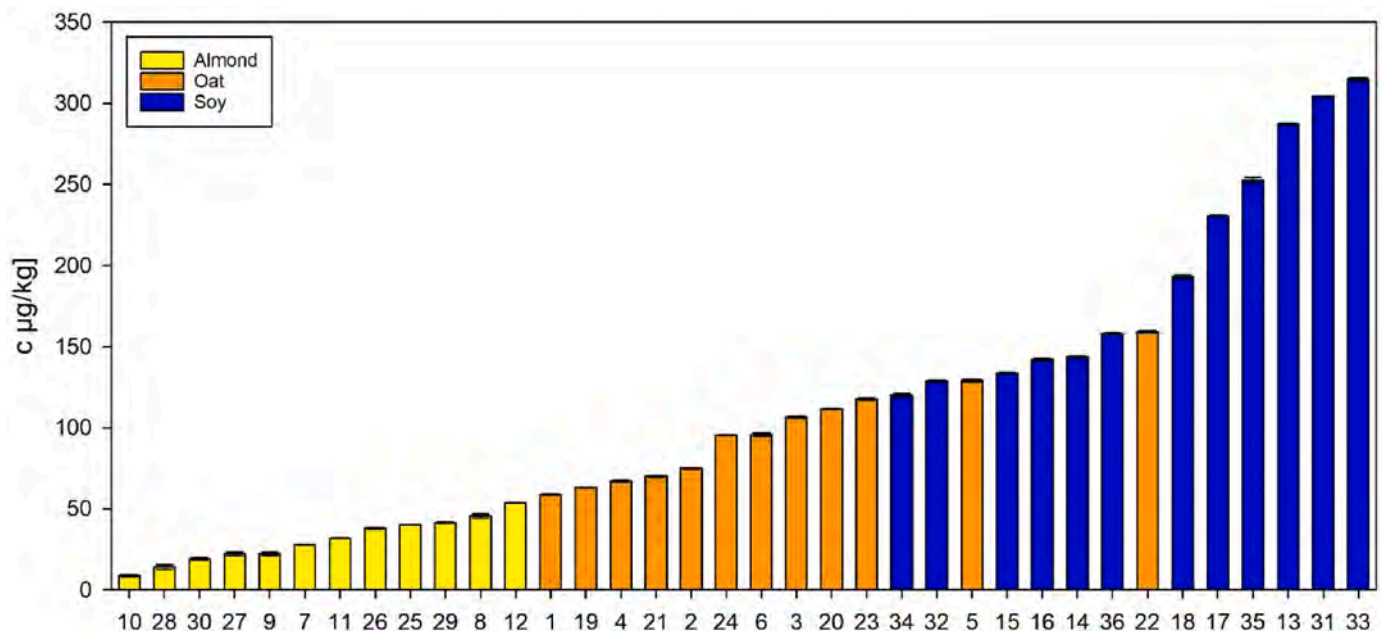


Fig. 5. Nickel concentrations found in PBDs are shown for each analysed sample. Concentrations below LOQ but above LOD were set to LOD using the lower bound approach. LOD: 2.15 µg/kg; LOQ: 6.16 µg/kg.

health hazard for adults regarding Ni. Children would exploit the TDI with lower doses of Ni because of their lower body weight, especially in the case of soy-based drinks. Furthermore, for adults who consume other soy products additionally to soy-based drinks, the TDI for Ni could be exploited to a greater extent, since it is known that soy products can contain more Ni than other foods and the intake of Ni can sum up over the day by different Ni-containing products (European Food Safety Authority, 2020b; Llorent-Martínez, de Córdova, Ruiz-Medina, & Ortega-Barrales, 2012).

3.4. Microbiological contaminations in plant-based drinks

Because of the nutrient compositions of PBDs, they provide an ideal growth medium for microorganisms, just like cow's milk and are therefore heat-treated during production, which should characterize them as microbiologically safe (Bartula, Bogley, Callanan, & Bacillus, 2023). In a recent study it was suggested that PBDs may present a significant risk for listeriosis and salmonellosis and post-opening recommendations should be carefully considered (Bartula, et al., 2023). The investigations of Bartula et al. (2023) revealed that *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Paenibacillus* spp. and *Bacillus subtilis* were able to grow in PBDs (coconut, almond, cashew) in part at higher rates than in cow's milk at 8 °C and 20 °C.

Pathogens or spoilage bacteria enter the processing chain through contaminated raw materials such as nuts, oats, rice and soy. Furthermore, inadequate hygiene management in processing plants can lead to cross-contamination. Moreover, heat-resistant spore-forming bacteria are able to survive the pasteurization process (Huemmer, Klijn, Vogelsang, & Langeveld, 1998; Pinto et al., 2018; Tabit & Buys, 2011). After spore germination in the product, the bacteria multiply and can also produce toxins. Recently, an almond-based drink could be identified behind a case of botulism in Australia (FSN, 2023). In 2022, food recalls with regard to oat-based drink or products thereof were reported. In one case, oat-based drink contaminated with *Bacillus cereus* has led to sickness of at least two people in two European countries (FSN, 2022).

Furthermore, there is also a risk of microbial cross-contamination during the production of PBDs. In the USA, there was a major recall of nutritional and beverage products including PBDs due to the potential for microbial contamination, including *Cronobacter sakazakii* (FDA,

2022). The contamination occurred in the production process so that the impacted products did not meet commercial sterility specifications.

Compared to ultrahigh temperature processed (UHT) or pasteurised milk, there is currently only limited information available on the microbiological quality of PBDs.

The results showed that one sample of oat-based drink was contaminated with an aerobic mesophilic bacterial count of $\log_{10}$ 2.94 cfu mL⁻¹ with no detectable colonies on VRBD, DRCM, ALOA, SSA, PEMBA and TBX while the rest of the samples were negative and were thus considered to be commercially sterile. Further sample analysis of identical batch numbers from the oat-based drink manufacturer (n = 5) showed no growth of microorganisms.

Our investigations showed that all examined products with one exception were sterile and microbiologically safe. In one case of oat-based drink, however, a low level of contamination could be detected, whereby no spore forming bacteria were involved. This could be an indication of an inefficient pasteurization or a recontamination after heat treatment and/or that compared to the outbreak events in 2022 (FDA, 2022; FSN, 2022), that perhaps the processing of oat milk poses a potential risk. Due to the limited data available, this should be monitored in future. Because of the nutritional conditions, the plant material and storing conditions usually without chilling, producers should pay attention to a correct heat treatment and exclude recontamination during processing.

In general, the analysed samples showed minimal microbial contamination, with only once a very low total bacterial count and no presence of pathogenic bacteria. This indicates an effective control by the manufacturers during processing, packaging, and raw material selection.

4. Conclusion

To sum up, mycotoxin contamination with T2/HT2 toxins was detected in 71 % of the oat-based drinks examined. Consumption of 500 mL of a highly contaminated oat-based drink can exceed 80 % of the TDI level for T2/HT2 toxin based on the highest values measured. In most oat- and almond-based samples, AFB₁ or its precursor, the mutagenic emerging toxin STC could be detected. Pb and Cd levels were predominantly below the limits of quantification, while Ni was

detectable in all samples, with the highest amounts found in soy-based drinks. However, the overall heavy metal content was of rather low concern. As it's not only the aforementioned mycotoxins that have mutagenic potential but also heavy metals like Ni can be carcinogenic to humans, potential synergistic effects across the contaminant classes should be considered in the future (Åkerlund, et al., 2018). Microbiologically, the samples had either no or a very low total bacterial count with the absence of pathogenic bacteria. Crop protection residues were also only found in trace amount. However, as the study focused on products claiming to be organic, the situation in PBDs based on conventionally produced crops could be deviating. Overall, no significant differences were observed among the two different batches tested that were produced by the same manufacturer with regards to chemical and microbiological contaminants, as well as crop protection residues.

In conclusion, this study raises concerns mainly regarding the human intake of mycotoxins, particularly, T2- and HT2-toxin, AFB₁ and STC resulting from consumption of PBDs. By contrast, microbial contamination and crop protection residues appear to be under good control with respect to the processing, packaging steps and selection of raw material. However, due to the additional potential entry of the mycotoxins AFB₁, STC and T2/HT2 toxins as well as Ni into the human diet, PBDs should be further investigated with respect to a potential risk to the consumer. Additionally, consumption data need to be collected enabling a true and differentiated risk assessment. The observed pattern of contamination correlates well with the known occurrence in the respective raw commodities. As there are varying processing conditions to be used by the PBD producers that might lead to a reduced toxin transfer into the final drink, there is a potential for minimization through the adaptation of the manufacturing processes and the selection of low contaminated raw materials.

CRedit authorship contribution statement

K.L. Gützkow: Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **A. Lencioni:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **C. Schwake-Anduschus:** Writing – review & editing, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **A. Müller:** Writing – review & editing, Formal analysis, Data curation. **J. Kabisch:** Writing – original draft, Investigation, Conceptualization. **V.L. Grundmann:** Investigation. **M. Stöckl:** Writing – original draft, Conceptualization. **R. Maul:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ingrid Ebert, Annemarie Regier and Susanne Schering for excellent technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110599>.

References

- Afonne, O. J., & Ifediba, E. C. (2020). Heavy metals risks in plant foods – need to step up precautionary measures. *Current Opinion in Toxicology*, 22, 1–6.
- Åkerlund, E., Cappellini, F., Di Bucchianico, S., Islam, S., Skoglund, S., Derr, R., et al. (2018). Genotoxic and mutagenic properties of Ni and NiO nanoparticles investigated by comet assay, γ-H2AX staining, Hprt mutation assay and ToxTracker reporter cell lines. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 59(3), 211–222.
- Alonso-Jauregui, M., López de Cerain, A., Azqueta, A., Rodríguez-Garraus, A., Gil, A. G., González-Peñas, E., et al. (2023). In vivo Genotoxicity and toxicity assessment of sterigmatocystin individually and in mixture with aflatoxin B1. *Toxins*, 15(8), 491.
- Alshannaq, A., & Yu, J.-H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 632.
- Astolfi, M. L., Marconi, E., Protano, C., & Canepari, S. (2020). Comparative elemental analysis of dairy milk and plant-based milk alternatives. *Food Control*, 116, Article 107327.
- Babaahmadifooladi, M., & Jaxsens, L. (2021). Chronic dietary exposure to nickel from selected foods consumed in Belgium. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 38(1), 95–112.
- Babaahmadifooladi, M., Jaxsens, L., De Meulenaer, B., & Du Laing, G. (2020). Nickel in foods sampled on the Belgian market: Identification of potential contamination sources. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(4), 607–621.
- Bartula, K., Bogley, M., Callanan, M., & Bacillus, L. (2023). Growth of food-borne pathogens *Listeria* and *Salmonella* and spore-forming *Paenibacillus* and *Bacillus* in commercial plant-based milk alternatives. *Food Microbiology*, 109.
- Beisl, J., Varga, E., Braun, D., Warth, B., Ehling-Schulz, M., Favero, G., et al. (2021). Assessing mixture effects of cereulide and deoxynivalenol on intestinal Barrier Integrity and uptake in differentiated human Caco-2 cells. *Toxins*, 13, 189.
- Bloch, D., Diel, P., Epe, B., Hellwig, M., Lampen, A., Mally, A., et al. (2023). Basic concepts of mixture toxicity and relevance for risk evaluation and regulation. *Archives of Toxicology*, 97(11), 3005–3017.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). (2021). *Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2019. Monitoring*. Berlin: Gemeinsamer Bericht des Bundes und der Länder. In: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/01_lm_mon_dokumente/01_Monitoring_Berichte/2019_lm_monitoring_bericht.pdf?__blob=publicationFile&v=5.
- Delfosse, V., Huet, T., Harrus, D., Granell, M., Bourguet, M., Gardia-Parège, C., et al. (2021). Mechanistic insights into the synergistic activation of the RXR–PXR heterodimer by endocrine disruptor mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(1), Article e2020551118.
- Diaz Nieto, C. H., Granero, A. M., Zon, M. A., & Fernandez, H. (2018). Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 460–470.
- Dittmann, A. W. L., Storcksdieck genannt Bonsmann, S., & Hoffmann, I. (2023). What percentage of people adhere to vegetarian and vegan diets in Germany? An exploration of the research situation. *Ernährungs Umschau*, 70(7), 80–93, 2023.
- Elcombe, C. S., Evans, N. P., & Bellingham, M. (2022). Critical review and analysis of literature on low dose exposure to chemical mixtures in mammalian in vivo systems. *Critical Reviews in Toxicology*, 52(3), 221–238.
- COMMISSION REGULATION (EU) 2017/978 of 9 June 2017 amending Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for fluopyram; hexachlorocyclohexane (HCH), alpha-isomer; hexachlorocyclohexane (HCH), beta-isomer; hexachlorocyclohexane (HCH), sum of isomers, except the gamma isomer; lindane (hexachlorocyclohexane (HCH), gamma-isomer); nicotine and profenofos in or on certain products.
- European Food Safety Authority. (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA Journal*, 5(3), 446.
- European Food Safety Authority. (2009). Cadmium in food - scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA Journal*, 7(3), 980.
- European Food Safety Authority. (2010). Scientific opinion on lead in food. *EFSA Journal*, 8(4), 1570.
- European Food Safety Authority. (2017). Appropriateness to set a group health based guidance value for T2 and HT2 toxin and its modified forms. *EFSA Journal*, 15(1), Article e04655.
- European Food Safety Authority. (2020a). Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal*, 18(3), Article e06040.
- European Food Safety Authority. (2020b). Update of the risk assessment of nickel in food and drinking water. *EFSA Journal*, 18(11), Article e06268.
- FDA. (2022). *Lyons Magnus Voluntarily recalls 53 nutritional and beverage products due to the potential for microbial contamination*. <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/lyons-magnus-voluntarily-recalls-53-nutritional-and-beverage-products-due-potential-microbial>.
- Fioravanti, M. I. A., Rebellato, A. P., Milani, R. F., Morgano, M. A., & Bragotto, A. P. A. (2023). Toxic inorganic elements in plant-based beverages: Total concentration, dietary exposure and bioaccessibility. *Journal of Food Composition and Analysis*, 123, Article 105565.
- FSN. (2022). Oatly recalls drink because of *Bacillus cereus*; 2 sick with 27 other complaints filed. *Food Safety News*. <https://www.foodsafetynews.com/2022/04/oatly-recalls-drink-because-of-bacillus-cereus-2-sick-with-27-other-complaints-filed/#more-213286>.

- FSN. (2023). Almond milk linked to botulism case was missing storage details. *Food Safety News*. <https://www.foodsafetynews.com/2023/02/almond-milk-linked-to-botulism-case-was-missing-storage-details/>.
- Giugliano, R., Musolino, N., Ciccotelli, V., Ferraris, C., Savio, V., Vivaldi, B., et al. (2023). Soy, rice and oat drinks: Investigating chemical and biological safety in plant-based milk alternatives. *Nutrients*, 15(10), 2258.
- Hamed, A. M., Abdel-Hamid, M., Gámiz-Gracia, L., García-Campana, A. M., & Arroyo-Manzanares, N. (2019). Determination of aflatoxins in plant-based milk and dairy products by Dispersive liquid–liquid Microextraction and high-performance liquid chromatography with Fluorescence detection. *Analytical Letters*, 52(2), 363–372.
- Huemer, I. A., Klijn, N., Vogelsang, H. W. J., & Langeveld, L. P. M. (1998). Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *International Dairy Journal*, 8(10–11), 851–855.
- Juan, C., Mañes, J., Juan-García, A., & Moltó, J. C. (2022). Multimycotoxin analysis in oat, rice, almond and soy beverages by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Applied Sciences*, 12.
- Karasakal, A. (2020). Determination of trace and major elements in vegan milk and Oils by ICP-OES after microwave digestion. *Biological Trace Element Research*, 197(2), 683–693.
- Lavres, J., Castro Franco, G., & de Sousa Câmara, G. M. (2016). Soybean seed treatment with nickel improves biological nitrogen Fixation and Urease Activity. *Frontiers in Environmental Science*, 4.
- Llorent-Martínez, E. J., de Córdova, M. L. F., Ruiz-Medina, A., & Ortega-Barrales, P. (2012). Analysis of 20 trace and minor elements in soy and dairy yogurts by ICP-MS. *Microchemical Journal: Devoted to the Application of Microtechniques in All Branches of Science*, 102, 23–27.
- Marquès, M., Correig, E., Capdevila, E., Gargallo, E., González, N., Nadal, M., et al. (2022). Essential and non-essential trace elements in milks and plant-based drinks. *Biological Trace Element Research*, 200(10), 4524–4533.
- Miró-Abella, E., Herrero, P., Canela, N., Arola, L., Borrull, F., Ras, R., et al. (2017). Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 229, 366–372.
- Mol, H. G. J., Pietri, A., MacDonald, S. J., Anagnostopoulos, C., & Spanjere, M. (2015). Survey on sterigmatocystin in food. *EFSA Supporting Publications*, 12(3), 774E.
- Moore, S. S., Costa, A., Pozza, M., Vamerali, T., Niero, G., Censi, S., et al. (2023). How animal milk and plant-based alternatives diverge in terms of fatty acid, amino acid, and mineral composition. *NPJ Sci Food*, 7(1), 50.
- Pettersson, H., Brown, C., Hauk, J., Hoth, S., Meyer, J., & Wessels, D. (2011). Survey of T-2 and HT-2 toxins by LC-MS/MS in oats and oat products from European oat mills in 2005–2009. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 4(2), 110–115.
- Pinto, C. L. O., Souza, L. V., Meloni, V. A. S., Batista, C. S., Silva, R., Martins, E. M. F., et al. (2018). Microbiological quality of Brazilian UHT milk: Identification and spoilage potential of spore-forming bacteria. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 20–26.
- POSpulse. (2021). *Auf welche Alternativen zu konventioneller Milch greifst du zurück?* Statista.
- Rathod, P. H., Shah, P. G., Parmar, K. D., & Kalasariya, R. L. (2022). The fate of fluopyram in the soil–water–plant Ecosystem: A review. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, 260(1).
- Redan, B. W., Zulkic, J., Hryshko, J., Boyer, M., Wan, J., Sandhu, A., et al. (2023). Analysis of eight types of plant-based milk alternatives from the United States market for target minerals and trace elements. *Journal of Food Composition and Analysis*, 122, Article 105457.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., & Lima, N. (2012). Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. *Food Research International*, 48(1), 76–90.
- Schäfer, A.-K., Scherbaum, E., Ebert, N., Barth, A., Mack, D., Wildgrube, C., et al. (2023). Analysis of analytically Challenging compounds – including toxicologically critical pesticides and metabolites – in infant formulae and milk from the EU/EFTA-Market. *Aspects of food control and animal health*, 15, 1–14.
- Schwake-Anduschus, C., Langenkamper, G., Unbehend, G., Dietrich, R., Martlbauer, E., & Munzing, K. (2010). Occurrence of Fusarium T-2 and HT-2 toxins in oats from cultivar studies in Germany and degradation of the toxins during grain cleaning treatment and food processing. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 27(9), 1253–1260.
- Statista. (2022). *Pro-Kopf-Absatz von Milchersatzprodukten in Deutschland in den Jahren 2014 bis 2022 und einer Prognose bis 2027*. Statista (in Kilogramm) [Graph].
- Tabit, F. T., & Buys, E. M. (2011). Incidence and survival of *Bacillus sporothermodurans* during processing of UHT milk. *British Food Journal*, 113(4–5), 505–518.
- Theumer, M. G., Henneb, Y., Khoury, L., Snini, S. P., Tadrist, S., Canlet, C., et al. (2018). Genotoxicity of aflatoxins and their precursors in human cells. *Toxicology Letters*, 287, 100–107.
- vegonomist. (2019). *Prognose des Umsatzes mit pflanzlichen Milchprodukten und Milchalternativen weltweit in den Jahren 2019 bis 2019 (in Milliarden US-Dollar)*. Statista.
- Vejdovsky, K., Warth, B., Sulyok, M., & Marko, D. (2016). Non-synergistic cytotoxic effects of Fusarium and Alternaria toxin combinations in Caco-2 cells. *Toxicology Letters*, 241, 1–8.
- Veršilovskis, A., & De Saeger, S. (2010). Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and analytical methods – an overview. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(1), 136–147.

3.1.2 Enzyme immunoassays for the detection of mycotoxins in plant-based milk alternatives: pitfalls and limitations (Publikation II)

Christina Rehagel, Ronald Maul, Kim Lara Gützkow, Ömer Akineden

Mycotoxin Research, 2022, 274, 38:265

Impact Factor: 4.08 (2022)

DOI: 10.1007/s12550-022-00467-x

Synopse

Der zunehmende Konsum pflanzlicher Milchalternativen geht mit einer steigenden Vielfalt an Rohstoffen und Produktformulierungen einher. Da pflanzliche Ausgangsmaterialien potenziell mit Mykotoxinen kontaminiert sein können, sind geeignete Analysenstrategien zur schnellen und einfachen Überprüfung dieser Produkte relevant.

Gegenstand der Arbeit war die Untersuchung der Anwendbarkeit enzymimmunologischer Testverfahren zur Bestimmung ausgewählter Mykotoxine in pflanzlichen Milchalternativen. Analysiert wurden handelsübliche Produkte auf Basis unterschiedlicher pflanzlicher Rohstoffe auf das Vorkommen von Aflatoxin B₁, Sterigmatocystin, Ochratoxin A, Deoxynivalenol sowie T-2/HT-2-Toxinen. Ziel war es, die Eignung von Enzymimmunoassays für die direkte Analyse dieser Produktmatrix zu prüfen und mögliche Einschränkungen durch matrixbedingte Interferenzen aufzuzeigen.

Hierzu wurden insgesamt 54 pflanzliche Milchalternativen ohne vorherige Probenaufarbeitung mittels kommerziell verfügbarer Enzymimmunoassays untersucht. Ergänzend erfolgten vergleichende Analysen ausgewählter Proben mittels LC-MS/MS als referenzanalytisches Verfahren, um die eingesetzten Screeningmethoden zu überprüfen.

Die Arbeitsgruppe für Milchwissenschaften, Institut für Veterinär-Lebensmittelwissenschaften an der Justus-Liebig-Universität Gießen führte die enzymimmunologischen Untersuchungen durch. Die LC-MS/MS-Analytik und statistische Auswertung wurden am Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch des Max Rubner-Instituts durchgeführt.

Der Eigenanteil betrug 10 % und umfasste die Mitarbeit an der experimentellen Untersuchung, die formale Datenanalyse, die Erstellung von Visualisierungen sowie die Mitarbeit am Originalentwurf des Manuskripts.

This article was originally published in *Mycotoxin Research*, 274, 38:265 by Rehagel, C., Maul, R., Gützkow, K. L., & Akineden, Ö, Enzyme immunoassays for the detection of mycotoxins in plant-based milk alternatives: pitfalls and limitations, 2022. © 2022 Springer Nature <https://doi.org/10.1007/s12550-022-00467-x>



Enzyme immunoassays for the detection of mycotoxins in plant-based milk alternatives: pitfalls and limitations

Christina Rehagel¹ · Ronald Maul² · Kim Lara Gützkow² · Ömer Akineden¹

Received: 22 July 2022 / Revised: 15 August 2022 / Accepted: 16 August 2022 / Published online: 2 September 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Plant-based milk alternatives (PBMA) are a potential source of mycotoxin uptake. To ensure food safety, simple and rapid testing methods of PBMA for mycotoxins are therefore required. This study investigated the applicability of enzyme immunoassay (EIA) methods for direct testing of PBMA without sample extraction. Mycotoxin analyses included aflatoxin B₁ (AFB₁), sterigmatocystin (STC), ochratoxin A (OTA), deoxynivalenol (DON), and T-2/HT-2-toxin (T-2/HT-2). It was found that the PBMA matrix negatively affected the EIA to varying degrees, thus affecting the reliability of the results. A dilution of PBMA of at least 1:8 was necessary to overcome matrix interference. This resulted in calculated detection limits of 0.4 µg/L (AFB₁), 2 µg/L (STC), 0.08 µg/L (OTA), 16 µg/L (DON), and 0.4 µg/L (T-2/HT-2). After analysis of 54 PBMA products from German retail stores, positive results in at least one test system were obtained for 23 samples. However, most positive results were near the calculated detection limit. Control analyses of selected samples by LC–MS/MS for AFB₁, STC, and OTA qualitatively confirmed the presence of trace amounts of STC in some samples, but quantitative agreement was poor. It was concluded that the high diversity of ingredients used in PBMA led to a highly variable degree of sample matrix interference even in a 1:8 dilution. Since the use of higher dilutions conflicts with the need to achieve low detection limits, the application of EIA for routine mycotoxin analysis in PBMA for mycotoxins requires further study on the development of a feasible sample preparation method.

Keywords Mycotoxins · Plant-based milk alternatives · Immunoassay · Matrix interferences

Introduction

The consumption of plant-based milk alternatives (PBMA) has increased in Germany and other industrialised countries around the world in recent years. In addition to being “vegan”, these products are commonly advertised with claims regarding health, animal welfare, and sustainable agriculture. (Janssen et al. 2016). Persistence Market Research (PMR) reported that the global market for PBMA is currently estimated at US\$ 12.1 billion and is expected to

reach US\$ 29.5 billion by 2031, growing with a compound annual growth rate of 9.5% (PMR 2021). In 2020, the revenue for PBMA in Germany was US\$ 452 million, which corresponds to a total consumption of around 250 million km (Statista 2021). Further forecasts showed that German consumption of PBMA will increase to nearly 535 million km by 2026 (Statista 2021). Considering this rapidly increasing consumption, it is of great importance to ensure the food safety of these products. However, PBMA are not specifically addressed by European Union regulation (EC) No. 1881/2006 which lays down maximum levels (MLs) for mycotoxins (EC 2006).

PBMA presently available from the German market are an aqueous slurry of various plant materials; the main ingredients are cereals, pseudo cereals, legumes, nuts and seeds, but some also contain sugar, cocoa, or edible oil. Some products additionally contain additives (stabilisers, emulsifiers) and flavours (McClements et al. 2019; Sethi et al. 2016).

In addition to control of raw materials, a rapid and sensitive system of analysis for finished PBMA is required

✉ Christina Rehagel
Christina.Rehagel@vetmed.uni-giessen.de

¹ Dairy Sciences, Institute of Veterinary Food Science, Justus-Liebig-University Giessen, Ludwigstrasse 21, 35390 Giessen, Germany

² Department Safety and Quality of Milk and Fish Products, Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Hermann-Weigmann-Strasse 1, 24103 Kiel, Germany

to verify the safety of such products. Published surveys on contaminants in PBMA in general are scarce. All contaminants typical for the raw products, i.e. heavy metals or environmental and natural toxins in general, need to be considered also for PBMA. So far, there are only a few published studies, all with very limited sample size, which report investigations of PBMA for mycotoxins. Although no study specific for the German market exists, data from other European countries clearly demonstrate that PBMA may be contaminated by multiple mycotoxins belonging to different chemical groups including trichothecenes and aflatoxins (Arroyo-Manzanares et al. 2019; Hamed et al. 2017, 2019; Juan et al. 2022; Miró-Abella et al. 2017).

Published studies on the occurrence of mycotoxins in PBMA exclusively utilised liquid chromatography coupled with either tandem mass spectrometry or fluorescence detection. While these methods are convenient in a laboratory environment, they are less suitable for rapid on-site quality control at the production site. For liquid food materials, EIA appear to be a suitable tool for rapid on-site testing and have been used for decades for the analysis of aflatoxin M₁ in cow's milk (Pecorelli et al. 2020). Therefore, this study aimed at exploring the possibility to employ a set of in-house EIA methods for different mycotoxins, analysing PBMA directly without any sample preparation.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Mycotoxin standards of OTA, AFB₁, STC, and DON were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany); T-2 toxin was from Biopure (Tulln, Austria). After dissolving the mycotoxin standards in methanol (OTA, AFB₁, DON, T-2) or acetonitrile (STC), the concentration and purity of all stock solutions (except T-2) were checked by UV spectroscopy (Shimadzu, Duisburg, Germany), using published data (Cole and Schweikert 2003; Cole et al. 2003) for comparison and calculation. ¹³C-labelled standard solutions for AFB₁, STC, and OTA were obtained from Biopure™ (Romer Labs Deutschland GmbH, Butzbach, Germany). All other reagents and chemicals used were at least of analytical grade. Methanol (LC–MS grade) and acetonitrile (ACN) (LC–MS grade) were purchased from Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). n-Heptane, dimethylsulfoxide (DMSO), ACN (HPLC grade), and anhydrous magnesium sulphate (MgSO₄) were purchased from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany), while ammonium formate (NH₄COOH) and acetic acid (HAc) were from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Formic acid (FA) was from VWR International GmbH (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained through the use of a water

purification device (PURELAB flex 3, ELGA LabWater, Veolia Water Technologies Deutschland GmbH, Celle Germany). AflaTest_{WB} SR⁺ immunoaffinity columns (IAC) were purchased from VICAM (Milford, USA) and contained monoclonal antibodies that specifically bind aflatoxins (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂) and STC. According to the manufacturer, the column capacity was 1000 ng for total aflatoxins and recovery for B₁, B₂, G₁, and G₂ was ≥ 90% for spiking level of 2 ng and 500 ng.

Sample materials

A total of 54 samples of various PBMA products, with the majority (*n* = 34) of these labelled as of “organic produce”, were purchased from retail shops and specialised “organic food” stores in the area of Giessen, Hesse, Germany, in 2020. All products were purchased as offered, in original packaging. According to product information, the products originated from 17 different manufacturers from eight countries in Europe; the majority was from German producers (*n* = 28). The main ingredients were water and vegetable raw materials of a content ranging from 8.7 to 17% for cereal-based or pseudocereal-based PBMA (oat, rice, spelt, millet, buckwheat), 2.3–8.4% for nut-based products (hazelnut, almond, coconut, cashew), 4–10% for products based on legumes (soy bean, pea, lupine), 3% for hemp-based products, and 4.9–21% for PBMA consisting of ingredient mixtures (oat + almond, rice + almond, rice + coconut, rice + coconut + cashew). In addition, a few products contained minor amounts of sunflower or rapeseed oil, cocoa, sugar, and salt. Most of the PBMA without claims of organic produce contained stabilisers and emulsifiers. All products were heat-treated, mostly by ultra-high temperature treatment (> 135 °C); a few were pasteurised. The remaining shelf life of ultra-high temperature-treated PBMA products was > 4 months and for pasteurised PBMA products > 2 weeks at the time of purchase.

EIA analysis

Sample pretreatment

Before opening, each package of PBMA was manually shaken to mobilise sedimented particles. Then, a portion for follow-up analyses of about 50 mL was transferred into plastic test tubes and frozen at − 18 °C. Material from products containing stabilisers or emulsifiers was centrifuged (3000×g, 10 min, 20 °C). Then, sample material was diluted with EIA buffer solution as required for each test system, and dilutions ranging from 1:2 to 1:20. For AFB₁, T-2/HT-2, and STC analysis, sample dilutions and toxin standard curves were prepared in phosphate buffered saline (PBS; 0.01 mol/L; pH 7.2) containing 10% methanol. For DON analysis, samples were diluted in PBS (pH 7.2). For

OTA analysis, samples were diluted with aqueous NaHCO_3 solution (0.13 mol/L).

Effect of sample matrix on EIA standard curve

Since no certified toxin-negative PBMA material was available, the extent of sample matrix interference was assessed by comparing toxin standard curves made in EIA buffer solution with toxin standard curves made with diluted PBMA. For this series of experiments, one sample each from every major product group was selected. The minimal dilution which yielded standard being congruent with the buffer solution standard curve was then used for analyses of the remaining sample materials.

Analysis of artificially contaminated sample material

As an additional quality control, six PBMA materials were artificially contaminated with the mycotoxins under study by adding 20–100 μL of toxin standard solution per millilitre of sample at appropriate concentrations (OTA 0.2–0.8 $\mu\text{g/L}$; AFB_1 , T-2/HT-2 1–4 $\mu\text{g/L}$; STC 4–16 $\mu\text{g/L}$; DON 30–120 $\mu\text{g/L}$). Four replicates of all standard and sample solutions were analysed, and each PBMA sample was analysed in a single dilution.

EIA test procedure

For mycotoxin analysis of PBMA samples, EIA were performed using microtiter plates (MaxiSorp, Nunc, Roskilde, Denmark) as described earlier for AFB_1 (Gathumbi et al. 2001), STC (Wegner et al. 2016), OTA (Schneider et al. 2001), DON (Curtui et al. 2003), and T-2/HT-2 (Esgin et al. 1989). All EIA were performed based on competitive direct test format, using the double antibody method for DON and T-2/HT-2. The EIA absorbance values at 450 nm were measured using a microplate reader (Tecan Sunrise, Crailsheim, Germany) and evaluated by Magellan calculation software (Tecan, Crailsheim, Germany). EIA absorbance values of standard concentrations were normalised by dividing the mean absorbance values of the standard or diluted sample solution (B) by the absorbance value of the blank (B_0) and then multiplying by 100 ($B/B_0 \times 100$).

Control analyses for AFB_1 , STC, and OTA by LC–MS/MS

Sample pretreatment

For the control analyses, five samples which had yielded highly positive results in EIA were selected for LC–MS/MS analysis for AFB_1 , STC, and OTA. Four of these samples (MA11, MA25, MA31, MA54) contained cocoa in addition

to their main ingredient, and one sample contained black rice (MA48). For these series of experiments, extracts for AFB_1 and STC analyses were prepared by liquid–liquid partitioning (LLP) of a 10-mL test portion twice with each 40 mL of ethyl acetate. The two organic phases from each sample were collected and combined, the solvent removed in a rotary evaporator at 50 °C, then the residue dissolved with 10 mL of methanol. One millilitre of the extract was transferred to a conical flask and evaporated at 50 °C in a rotary evaporator. The residue was dissolved in 2 mL of PBS containing 10% methanol and analysed by EIA. The calculated limit of detection (LOD) in LLP extracts was 0.1 $\mu\text{g/L}$ for AFB_1 and 0.2 $\mu\text{g/L}$ for STC, respectively.

Further purification of the LLP extracts was done using IAC columns. A 5-mL portion of the LLP extract was diluted with 20 mL PBS (pH 7.2), solid particles removed by centrifugation ($3000 \times g$, 10 min, 20 °C), then the supernatant was filtered through a paper filter. The filtered solution was passed through an IAC column, following the manufacturers' instructions. Toxins were eluted from the column with two, and consecutively added 1.5-mL portions of methanol. The methanolic eluate was collected in a conical flask and 1 mL was used for LC–MS/MS analysis. The remaining solvent (2 mL) was removed in a rotary evaporator at 50 °C and the residue dissolved with 2 mL of 10% methanol/PBS for EIA analysis. Based on the cut-off value of the EIA standard curves, the calculated LOD for IAC extracts was 0.04 $\mu\text{g/L}$ for AFB_1 and 0.06 $\mu\text{g/L}$ for STC, respectively.

LC–MS/MS analysis

The analysis was performed on a 1290 Infinity II LC system (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn, Germany). Analytes were separated on a Gemini reversed phase C18 analytical column, 100×3.0 mm, 5.0 μm (Phenomenex®, Aschaffenburg, Germany), at an oven temperature of 35 °C, while the injection volume was 4 μL . LC separation was performed using a gradient elution of water (with 0.1% formic acid, 300 mg/L ammonium formate) and methanol (with 0.1% formic acid, 300 mg/L ammonium formate) and a flow rate of 0.5 mL/min. The gradient programme started at 5% organic solvent for 0.8 min, raising to 50% by minute 1.5, to 55% by minute 2.5, to 70% by minute 5.5, to 76 by minute 6.5, and to 95% by minute 15.5. Starting from minute 17.0, the organic percentage reverted to the starting conditions of 5% by minute 17.5 and was kept until the end of the run at 19.5 min. MS detection was conducted using a triple quadrupole MS (QTRAP 6500+, Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Germany) operating in both positive and negative electro spray ionisation (ESI) mode and measuring in multiple reaction mode (MRM) with the following settings: curtain gas 40, collision gas medium, temperature 350 °C, the $\pm$ ion spray voltage 4500 V, nebuliser

gas flow of 50, heater gas flow of 45, and dwell time varied. The analytical parameters for AFB₁, STC, and OTA are shown in Table 1.

For sample preparation, 62 µL of the IS mixture was added to 1 mL of the PBMA sample, and the samples were extracted with 938 µL of ACN containing 0.1% FA. After shaking for 10 min (IKA-VIBRAX VXR, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Germany), 0.1 g NaCl and 0.4 g MgSO₄ were added and shaken for another 5 min. The samples were centrifuged at 10,000×g for 7 min at room temperature (Avanti JXN-30, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany). A total of 0.8 mL of supernatant was transferred in a tube and 0.8 mL of n-heptane added. After shaking for 5 min (IKA-VIBRAX_VXR, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Germany), the n-heptane phase was discarded. ACN phase was transferred into a 2-mL reagent tube containing 100 µL DMSO as keeper solvent and the ACN was evaporated until only the DMSO proportion remained (Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). A total of 200 µL ACN with 0.1% FA were added to the residual liquid and vortexed. After additional sonicating for 10 min (Transsonic 460, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany), 300 µL of H₂O was added and the samples were sonicated again for 10 min and vortexed afterwards. The extracts were filtered using a regenerated cellulose 0.45-µm syringe filter unit (ProSense B.V., Munich, Germany). The LLP and IAC extracts were diluted 1/1 with water before the LC–MS/MS analysis.

Results and discussion

Given their high sensitivity, EIA seem to be a convenient tool for mycotoxin testing in liquid sample materials such as PBMA. However, it was observed that the highly variable composition of PBMA and their high content of non-soluble material exerted the matrix influence which did effect each

individual test system to varying degrees. This study was also impeded by the fact that no defined reference material, either mycotoxin-free or with certified mycotoxin content, is available for PBMA or comparable matrices. Therefore, we first subjected a larger number ($n=54$) of PBMA products to EIA analyses at different dilutions with buffer solution. Selected materials from each major group of products were then used to establish toxin standard curves in matrix (Fig. 1). PBMA up to a dilution of 1:4 yielded strongly left-shifted standard curves with depressed B₀ values, indicating that false-positives and overestimation of the toxin content were major issues. Except for the STC-EIA, toxin standards prepared in 1:8 diluted PBMA matrix resulted in standard curves which were nearly identical with the buffer solution standard curve, observed for all different matrices. Therefore, a minimum dilution factor of 8 was applied for all subsequent analyses. In the STC-EIA, an even higher dilution (1:20) was required to eliminate left-shifted standard curves. The necessity to dilute PBMA for EIA analyses negatively affected the achievable, calculated detection limit in sample matrix. The LOD summarised in Table 2 were considered to be still in a relevant concentration range for DON and T-2/HT-2 while for AFB₁, STC, and OTA, they were probably insufficient.

Adding toxin standard solution to PBMA material before dilution yielded results which were still quite variable, depending on both type of matrix and spiking level (Table 3). This indicates that even at a 1:8 dilution (STC-EIA: 1:20), some remaining matrix interference could cause up to 50% deviation from the nominal value. A possible reason for these matrix interferences are the proteins contained in PBMA. For example, Wang et al. (2015) investigated the influence of fish proteins on competitive indirect EIA and demonstrated that fish proteins interfere with immunological reactions by binding to both primary antibodies and enzyme-labelled secondary antibodies.

When the EIA results of mycotoxin analysis for all 54 samples were grouped according to the main ingredients

Table 1 Analytical parameters of quantitative determination of the analytes and their isotopically labelled internal standards with the HPLC–MS/MS; ESI (+) mode; multiple reaction monitoring mode; the second product ion was used as a qualifier for the confirmation of identity for each analyte; for all analytes, compound optimisation with the LC–MS was performed

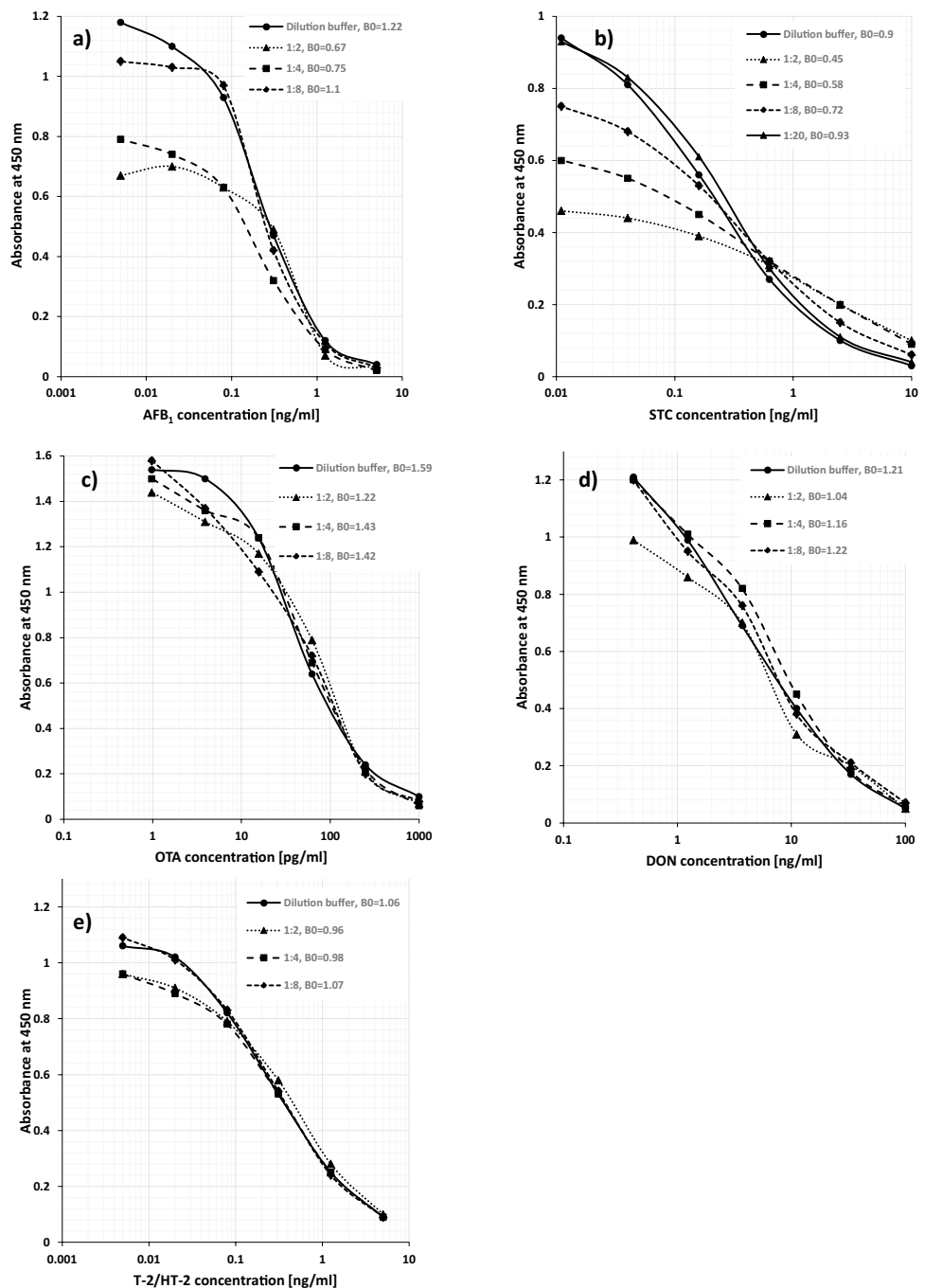
Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	DP ^a (V)	CE ^b (eV)	CXP ^c (V)
AFB ₁	313.0	285.0	111	33	16
		241.0	111	49	26
¹³ C-Aflatoxin B ₁	330.0	301.0	111	33	16
STC	325.0	310.0	96	33	18
		281.0	96	49	32
¹³ C-Sterigmatocystin	343.0	297.0	96	49	32
OTA	404.0	239.1	31	29	14
		357.9	31	19	24
¹³ C-Ochratoxin A	424.1	250.1	31	29	14

^aDP declustering potential

^bCE collisions energy

^cCXP collision cell exit potential

Fig. 1 Example of PBMA sample matrix effects on EIA toxin standard curves (only oat-based PBMA shown), indicating the absorbance value of the blank (B_0) of each standard curve. **a)** AFB₁: standard curves made in matrix at dilutions with test buffer of 1:2 and 1:4 resulted in a depression of the absorbance at 450 nm. At a dilution of 1:8, the standard curve was almost fully congruent with the standard curve in buffer solution. **b)** STC: strong absorbance signal depression for standard curves made in matrix at dilutions of up to 1:8, at a 1:20 dilution, standard curve which was almost congruent with standard curve in buffer solution. **c)** OTA. **d)** DON. **e)** T-2/HT-2. Each of the six standard curve data points represents the mean absorbance at 450 nm of four replicate wells. The coefficients of variation ranged from 3 to 10% and did not differ between all curves



(Table 4), it became clear that the EIA for DON and T-2/HT-2 in general yielded results which were plausible in view of the trichothecene frequency in cereals. However, with regard to T-2/HT-2, there were two exceptions: one soy-based sample and one hemp-based sample showing a weak positive result for T-2/HT-2. The fact that no studies on the occurrence of mycotoxins in hemp seeds are currently available makes a plausibility assessment difficult in this case. Even though the occurrence of T-2/HT-2 in soy is not common, it cannot be completely excluded. Other study results show that, in

addition to cereals susceptible to T-2/HT-2, these toxins can also occur in soybean from Argentina (Barros et al. 2011). With these two exceptions, trichothecene mycotoxins were detected in cereal-containing PBMA samples only. The levels measured for these samples corresponded well with contamination data for oats specifically (EFSA 2017; Curtui et al. 2009), and for cereals in general (Gottschalk et al. 2009). Furthermore, they are in good agreement with the results reported by Miró-Abella et al. (2017). Considering that the total amount of solids in these products typically ranged from 5 to 10%, the

Table 2 Cross-reactions and standard curve parameters of the mycotoxin EIA and calculated detection limit in PBMA

Test system	Known relevant cross-reactions	Standard curve		Minimum sample dilution factor for EIA analysis	Calculated detection limit in PBMA $\mu\text{g/L}$
		IC ₅₀ value, mean* $\pm$ SD, $\mu\text{g/L}$	Cut-off value (IC ₂₀), mean* $\pm$ SD, $\mu\text{g/L}$		
AFB ₁	AFB _{1/2} , AFG _{1/2} , AFM ₁ , AFB _{2a} , AFG _{2a} , AFP ₁ , AFQ ₁ , Aflatoxicol (Gathumbi et al. 2001)	0.14 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01	8	0.4
STC	O-methylsterigmatocystin (Wegner et al. 2016)	0.29 $\pm$ 0.09	0.08 $\pm$ 0.02	20	2
OTA	OTA, OTB (Schneider et al. 2001)	0.04 $\pm$ 0.007	0.01 $\pm$ 0.004	8	0.08
DON	DON and its 8-ketotrichothecene analogues (Curtui et al. 2003)	5.15 $\pm$ 0.92	1.67 $\pm$ 0.48	8	16
T-2/HT-2	T-2, HT-2 (Esgin et al. 1989)	0.23 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.01	8	0.4

* 16–27 plates performed for each test in a period of 12 months, except T-2/HT-2 (5 tests)

concentration of these toxins in the cereal ingredients should be about 10–20-fold higher, in a range roughly between 100 and 800 $\mu\text{g/kg}$ for DON, and between 4 and 80 $\mu\text{g/kg}$ for T-2/HT-2. This would be well within the range of reported data for these toxins in European oat.

The AFB₁-EIA showed a positive result for AFB₁ in one sample based on black whole grain rice, in addition to three pea- or oat-based products with cocoa. On the other hand, almonds are known to potentially contain aflatoxins (Kanik and Kabak 2019), but the AFB₁-EIA gave negative results for this group of products. The reason for these findings could be that the LOD for this toxin in these matrices did not allow sufficiently sensitive analysis. Assuming that the raw materials complied with European Union regulation

1881/2006, the aflatoxin levels which could be expected in PBMA based on soy or almonds would probably be below 0.4 $\mu\text{g/L}$, which is the calculated LOD of the AFB₁-EIA. A similar situation was observed for the STC-EIA (LOD 2 $\mu\text{g/L}$), which gave positive results in just one soy-based PBMA and in two oat-based products. The few positive results in the OTA-EIA (LOD 0.08 $\mu\text{g/L}$) for PBMA based on soy or oat were found for the same samples. All these three products contained cocoa, in addition to the main ingredient. Furthermore, a weakly positive result for OTA was found in the sample based on black whole grain rice.

Further work on elucidation of matrix effects therefore focussed on products containing cocoa as an ingredient and the product based on black whole grain rice. In fact,

Table 3 EIA results for four different PBMA product groups, artificially contaminated with mycotoxins. For each concentration level, one sample from each category was spiked

Test system	Toxin added, $\mu\text{g/L}$	Toxin found, in % of added amount					
		Soy	Oat	Almond	Coconut	Mean	RSD ^a , %
AFB ₁	1	80	133	119	83	104	26
	2	90	86	133	128	109	25
	4	97	83	88	156	106	34
STC	4	123	89	148	107	117	25
	8	115	92	142	94	111	23
	16	127	89	142	92	113	26
OTA	0.2	146	85	84	61	94	36
	0.4	114	75	77	69	84	20
	0.8	124	89	91	83	97	18
DON	30	76	104	110	65	89	22
	60	89	133	117	100	110	19
	120	88	129	113	94	106	19
T-2/HT-2	1	64	103	84	63	79	19
	2	79	101	64	66	78	17
	4	87	65	57	56	66	14

^aRelative standard deviation

Table 4 EIA results for four categories of PBMA ($n = 54$)

		Soy ($n = 7$)	Almond ($n = 7$)	Oat ($n = 14$)	Single ^a and mixed ^b ingredients ($n = 26$)
AFB ₁	n positive/ n	0/7	0/7	2/14	2/26
	Range	-	-	-	0.6–0.8
STC	n positive/ n	1/7	0/7	2/14	0/26
	Range	-	-	-	-
OTA	n positive/ n	1/7	0/7	2/14	1/26
	Range	-	-	0.2–0.4	-
DON	n positive/ n	0/7	0/7	3/14	2/26
	Range	-	-	16–22	17–43
T-2/HT-2	n positive/ n	1/7	0/7	12/14	8/26
	Range	-	-	0.4–4	0.4–1

^aSpelt, millet, rice, buckwheat, hazelnut, cashew, pea (with/without cocoa), lupin, hemp^bOat + almond, rice + almond, rice + coconut, rice + coconut + cashew

these products yielded the highest results in the AFB₁-EIA, STC-EIA, or OTA-EIA. Two products were oat-based, one was based on soy, and another was based on peas, but all contained cocoa according to package labels. Although cocoa is known to be susceptible to aflatoxins and OTA contamination (Copetti et al. 2011; Gilmour and Lindblom 2008; Raters and Matissek 2003), it seemed unlikely that the high levels in the EIA were caused by the low percentage of cocoa (< 1.5%) in the product; for this reason, these

samples were additionally analysed by LC–MS/MS. In an initial attempt to improve the detection limit by lowering the sample dilution factor, extracts were prepared by LLP of these samples with ethyl acetate, followed by a further clean-up step on IAC columns. The results of this comparison analysis (Table 5) showed virtually no agreement between EIA and LC–MS/MS. Furthermore, the EIA results for diluted sample and sample extracted by LLP or IAC also gave fully inconsistent results. LLP extracts were

Table 5 Comparison of EIA and LC–MS/MS results for AFB₁, STC, and OTA in diluted sample, in extracts after liquid–liquid partitioning (LLP), and in LLP extracts plus IAC clean-up for five selected PBMA samples

Sample no.	Sample description	AFB ₁ , µg/L		STC, µg/L		OTA, µg/L	
		EIA	LC–MS/MS	EIA	LC–MS/MS	EIA	LC–MS/MS
MA11	Sample (soy drink cocoa)	< 0.4	< 0.002	2	< 0.005	0.7	< 0.288
MA11	LLP extract	0.3	< 0.002	2	< 0.002	n.a	< 0.288
MA11	IAC extract	< 0.04	< 0.002	0.09	< 0.002	n.a	< 0.288
MA25	Sample (oat drink cocoa)	0.5	< 0.002	3	< 0.005	0.4	< 0.288
MA25	LLP extract	0.3	< 0.002	2	< 0.002	n.a	< 0.288
MA25	IAC extract	< 0.04	< 0.002	0.08	< 0.002	n.a	< 0.288
MA31	Sample (oat drink cocoa)	0.5	< 0.002	3	< 0.002	0.2	< 0.288
MA31	LLP extract	0.4	< 0.002	2	< 0.002	n.a	< 0.288
MA31	IAC extract	< 0.04	< 0.002	0.07	< 0.002	n.a	< 0.288
MA48	Sample (black whole grain rice)	0.6	< 0.002	< 2	< 0.002	0.1	< 0.288
MA48	LLP extract	0.2	< 0.002	1	< 0.002	n.a	< 0.288
MA48	IAC extract	< 0.04	< 0.002	0.1	< 0.002	n.a	< 0.288
MA54	Sample (pea drink cocoa)	0.8	< 0.002	< 2	0.06	< 0.08	< 0.288
MA54	LLP extract	0.2	< 0.002	2	< 0.002	n.a	< 0.288
MA54	IAC extract	< 0.04	< 0.002	0.2	< 0.002	n.a	< 0.288

n.a. not analysed, LOD limit of detection (EIA for samples: AFB₁, 0.4 µg/L; STC, 2 µg/L; OTA, 0.08 µg/L; EIA for LLP extracts: AFB₁, 0.1 µg/L; STC, 0.2 µg/L; EIA for IAC extracts: AFB₁, 0.04 µg/L; STC, 0.06 µg/L; LC–MS/MS for sample preparation as described above in LC–MS/MS analysis: AFB₁, 0.002 µg/L; STC, 0.002 µg/L; OTA, 0.288 µg/L), LOQ limit of quantification (LC–MS/MS for sample preparation, calculated for the conventional clean up without LLP or IAC, as described above in LC–MS/MS analysis: AFB₁, 0.008 µg/L; STC, 0.005 µg/L; OTA, 0.95 µg/L)

still positive, albeit at lower levels, in the tests for AFB₁ and STC. IAC extracts were all EIA negative for AFB₁, but still weakly positive for STC. Sample MA54, which had been negative in diluted sample material, were tested positive for STC by EIA in LLP and IAC extracts. This indicates

that at least for cocoa-containing samples, the EIA are not applicable to PBMA without significant improvement of the sample preparation method. Further work will study on a broader sample matrix basis, whether similar discrepancies are to be expected for other PBMA products. The costlier

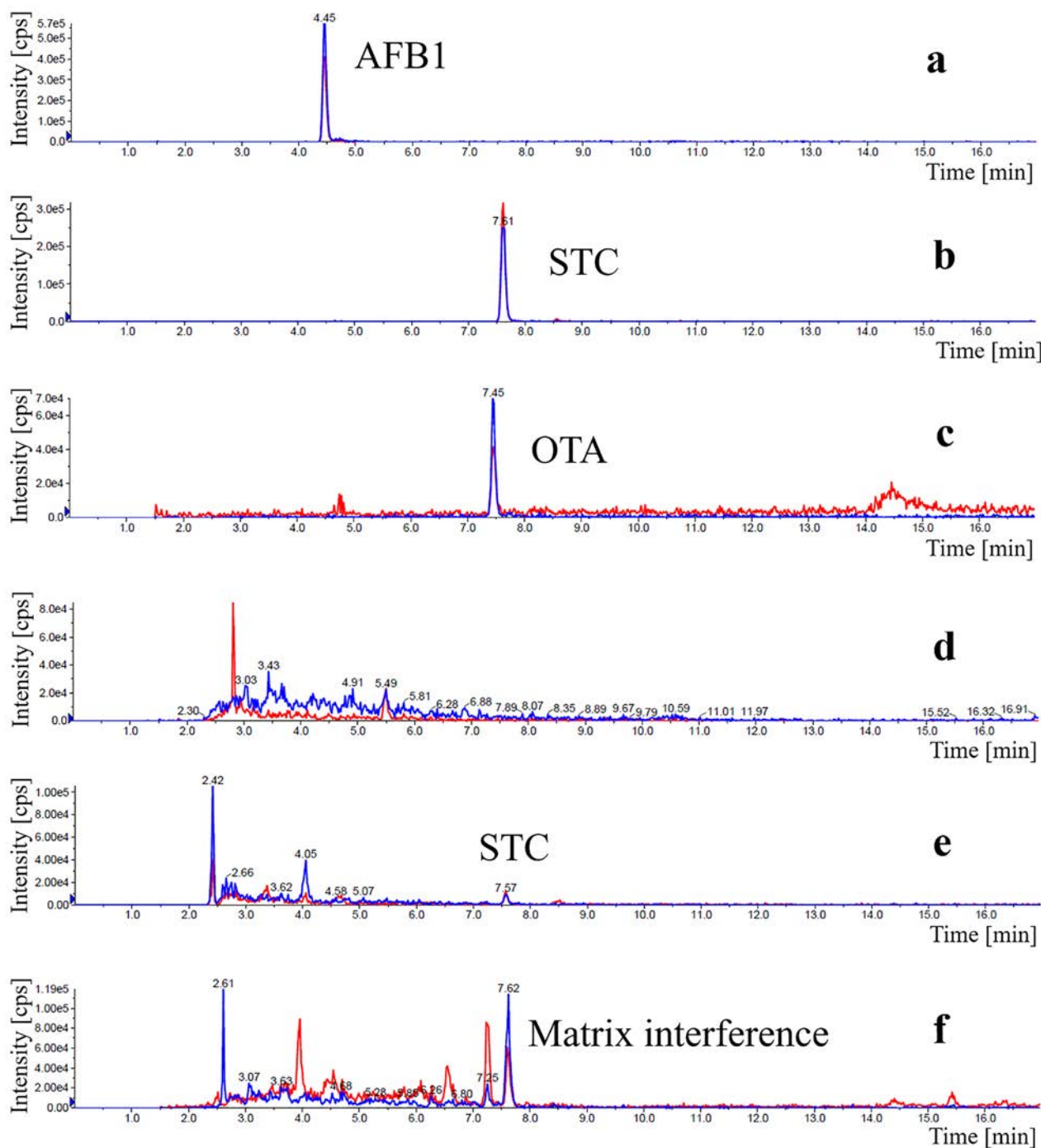


Fig. 2 LC-MS/MS chromatograms in ESI (+) mode of an AFB₁ **a**, STC **b**, and OTA **c** reference and of a STC positive soy-based PBMA sample (MA11) containing cocoa (**d–f**). Extract ion chromatograms in the multi-

ple reaction monitoring mode (MRM) showing mass transitions (m/z) **a**, **d** 313.0 → 285.0; **b**, **e** 325.0 → 310.0; and **c**, **f** 404.0 → 239.1

and time-consuming LC–MS/MS analysis achieves lower LOQ. Thus, traces of STC were detected in the comparative LC–MS/MS analysis in some samples (Fig. 2), indicating that the further work is warranted to clarify the contamination situation. Although LC–MS/MS analysis revealed the presence of a peak showing both typical mass transitions for OTA in some PBMA, OTA contamination could not be confirmed. Due to the small retention time shift of 0.2 min compared to the OTA standard, the peak was caused by a matrix interference (Fig. 2). Additionally, an OTA adduct can be out-ruled as the mass spectrum does not show the typical pattern for a chlorine-containing compound (data not shown).

Our data suggest that there is the possibility of a mycotoxin contamination in PBMA that can contribute to the overall mycotoxin exposure. This finding might be of interest for consumer groups that consume particularly high amounts of these drinks. However, currently, there are no PBMA consumption data available for Germany. Thus, an estimation of the contribution to the overall exposure is not feasible at this point.

In conclusion, this study showed that the PBMA matrix is highly complex and presents a challenge for EIA methods, although not all test systems were found to be equally susceptible to matrix interference. In any case, careful study of the effectiveness of sample treatment is required for each EIA and should be followed by broad validation studies. Before EIA could be recommended for general routine screening of PBMA, such studies should include all relevant varieties of composition and all product groups. Unlike milk, analysis of PBMA after dilution with buffer has a high risk of false-positive or false-negative results.

Acknowledgements We thank Margit Kessler and Renate Stumpf for their excellent technical assistance.

Author contribution Conceptualisation: Christina Rehagel; formal analysis and investigation: Christina Rehagel, Ronald Maul, Kim Lara Gützkow; writing—original draft preparation: Christina Rehagel, Ronald Maul, Kim Lara Gützkow; writing—review and editing: Christina Rehagel; Ömer Akineden; validation: Christina Rehagel; visualisation: Christina Rehagel, Kim Lara Gützkow; supervision: Ömer Akineden, Ronald Maul; project administration: Ömer Akineden.

Declarations

Conflict of interest All authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated

otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Arroyo-Manzanares N, Hamed AM, García-Campaña AM, Gámiz-Gracia L (2019) Plant-based milks: unexplored source of emerging mycotoxins. A proposal for the control of enniatins and beauvericin using UHPLC-MS/MS. *Food Addit Contam Part B* 12:296–302. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1663276>
- Barros G, García D, Oviedo M, Ramirez M, Torres A, Lattanzio V, Pascale M, Chulze S (2011) Survey of T-2 and HT-2 toxins in soybean and soy meal from Argentina using immunoaffinity clean-up and high performance liquid chromatography. *World Mycotoxin J* 4:189–197. <https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1272>
- Cole RJ, Schweikert MA (2003) Handbook of secondary fungal metabolites, vol 1. Academic Press, New York
- Cole RJ, Jarvis BB, Schweikert MA (2003) Handbook of secondary fungal metabolites, vol 3. Academic Press, New York
- Copetti MV, Iamanaka BT, Pereira JL, Fungaro MH, Taniwaki MH (2011) Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *Int J Food Microbiol* 148:141–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.020>
- Curtui V, Seidler C, Dietrich R, Märklbauer E, Schneider E, Usleber E (2003) Bestimmung von Deoxynivalenol in Brot und Bier. *Mycotoxin Res* 19:144–148
- Curtui V, Usleber E, Trebstein A, Lauber U, Hocke K, Dietrich R, Märklbauer E, Majerus P, Zimmer M, Klaffke H, Gareis M, Betsche T, Langenkämper G (2009) Improvement and validation of analytical methods for type A trichothecenes (T-2 toxin and HT-2 toxin) and occurrence of these mycotoxins in foods from the German market. Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE). Available from: https://service.ble.de/ptdb/index2.php?detail_id=88841&site_key=145&stichw=trichothecene&zeilenzahl_zaeher=4#newContent. (Accessed on 04 Jul 2022)
- EC - European Commission (2006) Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union L* 364/5. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>. (Accessed on 26 Jan 2022)
- EFSA - European Food Safety Authority (2017) Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *EFSA J* 15(8):4972. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4972>
- Esgin S, Märklbauer E, Terplan G (1989) Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von T-2 Toxin in Milch. *Arch Lebensm Hyg* 40:109–112
- Gathumbi JK, Usleber E, Märklbauer E (2001) Production of ultra-sensitive antibodies against aflatoxin B₁. *Lett Appl Microbiol* 32:349–351. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00914.x>
- Gilmour M, Lindblom M (2008) Management of ochratoxin A in the cocoa supply chain: a summary of work by the CAOBISCO/ECA/FCC working group on ochratoxin A. In: Leslie JF, Bandyopadhyay R, Visconti A (eds) *Mycotoxins: Detection Methods. Management, Public Health and Agricultural Trade*, CABI, Wallingford, pp 231–243
- Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K (2009) Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Addit Contam* 26:1273–1289. <https://doi.org/10.1080/02652030903013260>
- Hamed AM, Arroyo-Manzanares N, García-Campaña AM, Gámiz-Gracia L (2017) Determination of Fusarium toxins in functional

- vegetable milks applying salting out assisted liquid-liquid extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A* 34:2033–2041. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1368722>
- Hamed AM, Abdel-Hamid M, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM, Arroyo-Manzanares N (2019) Determination of aflatoxins in plant-based milk and dairy products by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Lett* 52:363–372. <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1467434>
- Janssen M, Busch C, Rödiger M, Hamm U (2016) Motives of consumers following a vegan diet and their attitudes towards animal agriculture. *Appetite* 105:643–651. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.06.039>
- Juan C, Mañes J, Juan-García A, Moltó JC (2022) Multimycotoxin analysis in oat, rice, almond and soy beverages by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Appl Sci* 12:3942. <https://doi.org/10.3390/app12083942>
- Kanik T, Kabak B (2019) Aflatoxins in almonds: monitoring and exposure assessment. *J Food Saf* 39:e12646. <https://doi.org/10.1111/jfs.12646>
- McClements DJ, Newman E, McClements IF (2019) Plant-based milks: a review of the science underpinning their design, fabrication, and performance. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18:2047–2067. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12505>
- Miró-Abella E, Herrero P, Canela N, Arola L, Borrull F, Ras R, Fontanals N (2017) Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem* 229:336–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.078>
- Pecorelli I, Guarducci N, von Holst C, Bibi R, Pascale M, Ciasca B, Logrieco AF, Lattanzio VMT (2020) Critical comparison of analytical performances of two immunoassay methods for rapid detection of aflatoxin M₁ in milk. *Toxins* 12:270. <https://doi.org/10.3390/toxins12040270>
- PMR - Persistence Market Research (2021) Plant-based milk market outlook (2021–2031). Available online: <https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/plant-based-milk-market.asp>. (Accessed on 03 May 2022)
- Raters M, Matissek R (2003) Neue Studien zur Analytik und zum Vorkommen von Ochratoxin A in Kakao und kakaohaltigen Erzeugnissen Abschlussbericht Projektzeitraum: 01.07.2000–31.12.2002 Projekt Nr. 33 der Stiftung der Deutschen Kakao- und Schokoladenwirtschaft. Available online: <http://www.yumpu.com/de/document/view/5973570/neue-studien-zur-analytik-und-zum-vorkommen-von-ochratoxin-a-in->. (Accessed on 12 May 2022)
- Schneider E, Usleber E, Dietrich R, Märklbauer E (2001) Entwicklung eines hochempfindlichen Enzymimmuntests zum Nachweis von Ochratoxin A. *Mycotoxin Res* 17A:170–173
- Sethi S, Tyagi SK, Anurag RK (2016) Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *J Food Sci Technol* 53:3408–3423. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2328-3>
- Statista (2021) Statista consumer market outlook. Total consumption of milk substitutes in Germany from 2013 to 2026. Available online: <https://www.statista.com/forecasts/1277954/milk-substitute-germany-consumption>. (Accessed on 03 May 2022)
- Wang X, Lin H, Cao L, Zhang X, Sui J (2015) The matrix interference to the immunoassay of food samples: the effect of some proteins in aquatic products. *Food Agr Immunol* 27:230–241. <https://doi.org/10.1080/09540105.2015.1086317>
- Wegner S, Bauer JI, Dietrich R, Märklbauer E, Usleber E, Gottschalk C, Gross M (2016) A highly specific competitive direct enzyme immunoassay for sterigmatocystin as a tool for rapid immuno-chemotaxonomic differentiation of mycotoxigenic *Aspergillus* species. *Lett Appl Microbiol* 64:124–130. <https://doi.org/10.1111/lam.12702>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3.2 Mykotoxintransfer aus Futtermitteln

3.2.1 Mykotoxinvorkommen in Futtermitteln (unveröffentlicht)

Neben der direkten Exposition über pflanzliche Lebensmittel sind auch Futtermittel relevant, da Mykotoxinkontaminationen nicht nur die Tiergesundheit beeinträchtigen (Bryden, 2012; Bezerra da Rocha et al., 2014; Smith et al., 2016), sondern über *carry-over* in tierische Lebensmittel auch indirekt zur Exposition des Menschen beitragen können (Tolosa et al., 2021). Getreide und pflanzliche Futtermittelrohstoffe sind besonders anfällig für eine Kontamination mit Mykotoxinen, da toxische Schimmelpilze sowohl während des Anbaus als auch während Ernte, Lagerung und Verarbeitung auftreten können (Bennett & Klich, 2003; Krska et al., 2008; Marin et al., 2013; Tanaka et al., 1988). Neben Einzelfuttermitteln sind insbesondere Mischfuttermittel von besonderer Relevanz, da sie aus unterschiedlichen Rohstoffen bestehen und somit ein erhöhtes Risiko für Mehrfachkontaminationen aufweisen (Hu et al., 2016).

Während für einige regulierte Mykotoxine wie AFB₁ in verschiedenen Futtermitteln Höchstgehalte existieren (Europäische Kommission, 2002a), liegen für andere toxikologisch relevante Mykotoxine wie OTA nur Richtwerte (Europäische Kommission, 2006) und für STC bislang keine Vorgaben vor. Dennoch wird STC zunehmend in Futtermitteln und Futtermittelrohstoffen nachgewiesen (Biancardi & Dall'Asta, 2015; Panasiuk et al., 2019; Warth et al., 2012) und aufgrund seiner genotoxischen und kanzerogenen Eigenschaften als gesundheitlich relevant eingestuft (European Food Safety Authority, 2013; Zingales et al., 2020b). Auch OTA ist ein häufig detektiertes Mykotoxin in Futtermitteln (dsm-firmenich, 2023, 2024, 2025) und steht im Zusammenhang mit nephrotoxischen Effekten bei Tieren sowie einer möglichen Übertragung entlang der Nahrungskette (European Food Safety Authority, 2020).

Vor diesem Hintergrund ist eine sensitive, matrixübergreifend einsetzbare Analytik erforderlich, um das Vorkommen einzelner Mykotoxine sowie von Mehrfachkontaminationen in Futtermitteln erfassen zu können. Ziel war es daher, das Vorkommen von AFB₁, STC, OTA und weiteren Mykotoxinen in Futtermittelrohstoffen, Mischfuttermitteln und Haferproben zu untersuchen und somit einen ersten Eindruck der Mykotoxinverteilung zu erhalten.

3.2.1.1 Probennahme

Verschiedene Mischfuttermittel- und Einzelfuttermittelproben wurden freundlicherweise von mehreren Futtermittelherstellern aus Norddeutschland zur Verfügung gestellt und umfassten 18 Mischfutter- sowie 34 Einzelfuttermittelproben, die im Jahr 2022 gesammelt wurden. Zudem wurden 19 Fischfuttermittelrohstoffe und

41 Fischfutterproben aus dem Jahr 2021 vom *Institute of Marine Research* in Bergen, Norwegen, für Analysezwecke bereitgestellt. Darüber hinaus wurden 97 Haferproben, die verschiedene Sorten sowie ökologischen und konventionellen Anbau repräsentierten, im Jahr 2022 von verschiedenen Versuchsstationen in Deutschland bezogen.

3.2.1.2 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung für die Mischfuttermittel wurde an die Methode von Gützkow et al. (2022) angelehnt und wie folgt angepasst. Da die Mischfuttermittel in Form von Pellets vorlagen, wurden 10 g Probe mit 20 mL Wasser für 30 min eingeweicht und anschließend 5 g dieser Suspension als Einwaage für die Extraktion nach verwendet. Es wurde nur 2.5 mL Wasser hinzugeben, geschüttelt und anschließend 0.5 g Natriumchlorid und 2 g Magnesiumsulfat hinzugefügt, erneut geschüttelt und weiter entsprechend Gützkow et al. (2022) verfahren.

Die Probenaufarbeitung für die Futtermittelrohstoffe und Haferproben erfolgte nach der Methode von Gützkow et al. (2022).

3.2.1.3 Messtechnik und Parameter

Die Mykotoxinanalytik wurde an einem 1290 Infinity II LC-System (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt, unter Verwendung einer Gemini Reversed-Phase-C18-Analysensäule, 100 × 3,0 mm, 5,0 µm (Phenomenex®, Aschaffenburg, Deutschland), einer Ofentemperatur von 35 °C und einem Injektionsvolumen von 4 µL. Es wurde eine Gradientenelution aus Wasser (mit 0.1 % Ameisensäure, 300 mg/L Ammoniumformiat) und Methanol (mit 0.1 % Ameisensäure, 300 mg/L Ammoniumformiat) mit einer Flussrate von 0.5 mL/min verwendet. Das Gradientenprogramm begann bei 5 % organischem Lösungsmittel für 0.8 min, stieg bis Minute 1.5 auf 50 %, bis Minute 2.5 auf 55 %, bis Minute 5.5 auf 70 %, bis Minute 6.5 auf 76 % und bis Minute 15.5 auf 95 %. Ab Minute 17.0 wurde der organische Anteil bis Minute 17.5 auf die Startbedingungen von 5 % zurückgeführt und bis zum Ende des Laufs bei 19.5 min beibehalten.

Für die Detektion wurde ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (QTRAP 6500+, Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt, das sowohl im positiven als auch im negativen Elektrospray-Ionisationsmodus (ESI) betrieben wurde und im Multiple-Reaction-Monitoring-Modus (MRM) mit folgenden Einstellungen maß: Curtain Gas 40, Collision Gas medium, Temperatur 350 °C, ± Ionenspray-Spannung 4500 V, Zerstäuber-Gasfluss 50, Heizgasfluss 45, variable Verweilzeit. Die Datenerfassung und -auswertung erfolgte mit Analyst Software, Version 1.7.2, und MultiQuant Software, Version 3.0.3, AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland.

Die analytischen Parameter der quantitativen Bestimmung der Mykotoxine mittels HPLC-MS/MS sind in Tabelle 12 im Anhang dargestellt.

3.2.1.4 Validierungsparameter

Die Validierung der analytischen Methode für Futter- und Haferproben, einschließlich z. B. Leistungsmerkmale, orientierte sich an der Guideline for performance criteria and validation procedures of analytical methods (Joint Research Centre et al., 2011).

Für die Validierung der Futtermittelproben wurden mehrfach 15 g eines AFB₁-, STC- und OTA-freien Mischfuttermittels mit 150 µL einer Mykotoxinmischung (enthaltend AFB₁, STC und OTA; Konzentrationen siehe Tabelle 13 im Anhang) auf zwei verschiedenen Konzentrationen dotiert und über Nacht abgedampft. Ein Niveau entsprach der erwarteten Nachweisgrenze (niedrige Dotierungskonzentration), das andere lag im unteren Drittel des Kalibrierbereichs (Dotierungskonzentration). Anschließend wurden 30 mL H₂O zugegeben, die Suspension 30 min quellen gelassen, homogenisiert und wie in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben weiter extrahiert.

Für die Validierung der Haferproben wurden mehrfach 2.5 g AFB₁-, STC- und OTA-freier gemahlener Haferkörner mit 20 µL einer Mykotoxinmischung (enthaltend AFB₁, STC und OTA; Konzentrationen siehe Tabelle 13 im Anhang) mit zwei verschiedenen Konzentrationen dotiert und über Nacht abgedampft. Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben.

Zur Bestätigung der Zuverlässigkeit und Konsistenz der analytischen Methode wurden die Inter- und Intraday-Präzision validiert. Proben wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen dotiert und extrahiert: jeweils fünf Proben an Tag 1 und Tag 3 sowie zehn Proben an Tag 2; alle Proben wurden an Tag 3 analysiert.

Weiterhin wurde die Wiederfindungsrate für sowohl Futtermittel- als auch Hafermatrix unter Verwendung der höheren Dotierungskonzentration bestimmt, jeweils mit fünf Replikaten pro Matrix. Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1.2 für Futtermittelproben bzw. wie in Abschnitt 3.2.1.2 für Haferproben beschrieben, wobei der interne Standard während des Extraktionsschrittes zugegeben wurde.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) und der Bestimmungsgrenze (LOQ) erfolgte gemäß Wenzl et al. (2016) unter Verwendung von jeweils zehn AFB₁-, STC- und OTA-freien Mischfutter- und Haferproben. Ein zusätzlicher Satz von zehn Proben wurde mit der niedrigen Dotierungskonzentration versetzt, um die Genauigkeit zu validieren (Wenzl et al., 2016). Für die LOD/LOQ-Bestimmung überschritt die höchste Kalibrierkonzentration nicht das Zehnfache der erwarteten LOD. Der lineare Bereich der Methode wurde aus dem verwendeten Kalibrierkonzentrationsbereich abgeleitet, sofern der Korrelationskoeffizient der linearen Regression (gewichtet mit 1/x) über 0.99 lag.

3.2.1.5 Ergebnisse

3.2.1.5.1 Methodenvalidierung

Die entwickelte Methode zur Mykotoxinanalytik in Käse (Gützkow et al., 2022) wurde für zwei weitere Matrices validiert und angepasst. Aufgrund der Zusammensetzung und Darreichungsform der Mischfuttermittelproben in Form von Pelletes, wurde um eine Homogenisierung und Extraktion zu ermöglichen, die Proben vorab mit Wasser eingeweicht und anschließend der homogenisierte Probenbrei entsprechend Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben extrahiert. Die Validierungsparameter umfassen Wiederfindungsraten, Präzision zwischen den Tagen (interday) und innerhalb eines Tages (intraday), sowie die Bestimmungs- (LOQ) und Nachweisgrenzen (LOD). Die Methodenvalidierungsparameter für Haferkörner sind in Tabelle 2 und für Mischfuttermittel in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Methodenvalidierungsparameter für Haferkörner, einschließlich Wiederfindungsrate, relative Standardabweichung innerhalb eines Tages (intraday) und zwischen verschiedenen Tagen (interday), LOD und LOQ.

Analyt	Wiederfindungsrate [%]	RSD ^a intraday [%]	RSD ^a interday [%]	LOD [$\mu\text{g/kg}$]	LOQ [$\mu\text{g/kg}$]
AFB ₁	97.76 $\pm$ 5.56	4.83	7.88	0.01	0.03
STC	96.32 $\pm$ 11.52	9.57	20.27	0.07	0.24
OTA	102.53 $\pm$ 6.68	5.30	13.10	0.22	0.73

^a RSD: relative Standardabweichung

Tabelle 3: Methodenvalidierungsparameter für Mischfuttermittel, einschließlich Wiederfindungsrate, relative Standardabweichung innerhalb eines Tages (intraday) und zwischen verschiedenen Tagen (interday), LOD und LOQ.

Analyte	Recovery rate [%]	RSD ^a intraday [%]	RSD ^a interday [%]	LOD [$\mu\text{g/kg}$]	LOQ [$\mu\text{g/kg}$]
AFB ₁	78.75 $\pm$ 8.72	13.49	15.99	0.08	0.27
STC	61.63 $\pm$ 8.39	13.71	11.81	0.07	0.23
OTA	77.60 $\pm$ 4.56	10.99	12.16	0.25	0.83

^a RSD: relative Standardabweichung

Die Validierungsergebnisse zeigen, dass die Methode für beide untersuchten Futtermittelmatrixen (Mischfuttermittel und Getreide) geeignet ist, wobei die Validierungsparameter zwischen den Matrices variieren. Aufgrund der Matrixkomplexität sind die Wiederfindungsraten von dem Mischfuttermittel in Vergleich

zu Hafer geringer und die Bestimmungsgrenze im Mischfuttermittel im Vergleich zum Hafer höher.

3.2.1.5.2 Mykotoxinvorkommen

Es wurden Futtermittelrohstoffe, Mischfuttermittel und Haferproben auf verschiedene Mykotoxine (siehe Tabelle 11 im Anhang) untersucht.

Die Untersuchung von 53 Futtermittelrohstoffproben zeigte vermutlich aufgrund der vielen verschiedenen Matrices ein heterogenes Kontaminationsmuster. In 14 Proben (26 %) wurden Mykotoxine nachgewiesen, überwiegend in niedrigen Konzentrationen zwischen LOD (AFB₁ 0.08 µg/kg, STC 0.07 µg/kg, OTA 0.25 µg/kg)) und maximal 0.7 µg/kg AFB₁, 3.8 µg/kg STC und 2.5 µg/kg OTA. STC wurde in 9 Proben (17 %), OTA in 11 Proben (21 %) und AFB₁ nur in 3 Proben (6 %) detektiert. Eine Mehrfachkontamination lag in 8 Proben (13 %) vor. Einige Kontaminationen lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze (7 Proben für OTA, 2 Proben für STC, 1 Probe für AFB₁) und konnten somit nur qualitativ erfasst werden. Die Ergebnisse aller Proben sind in Tabelle 11 im Anhang aufgeführt. Die positiven Futtermittelrohstoffproben sind in Tabelle 4 aufgeführt und alle in Abbildung 5 dargestellt. Höhere Kontaminationsgehalte waren in Weizengluten, Reiskleie und Sonnenblumenprodukten zu finden, während Proben aus Erbsen, Sojaextraktionsschrot und Weizenkleie überwiegend unbelastet waren oder nur nicht quantifizierbare Gehalte aufwiesen.

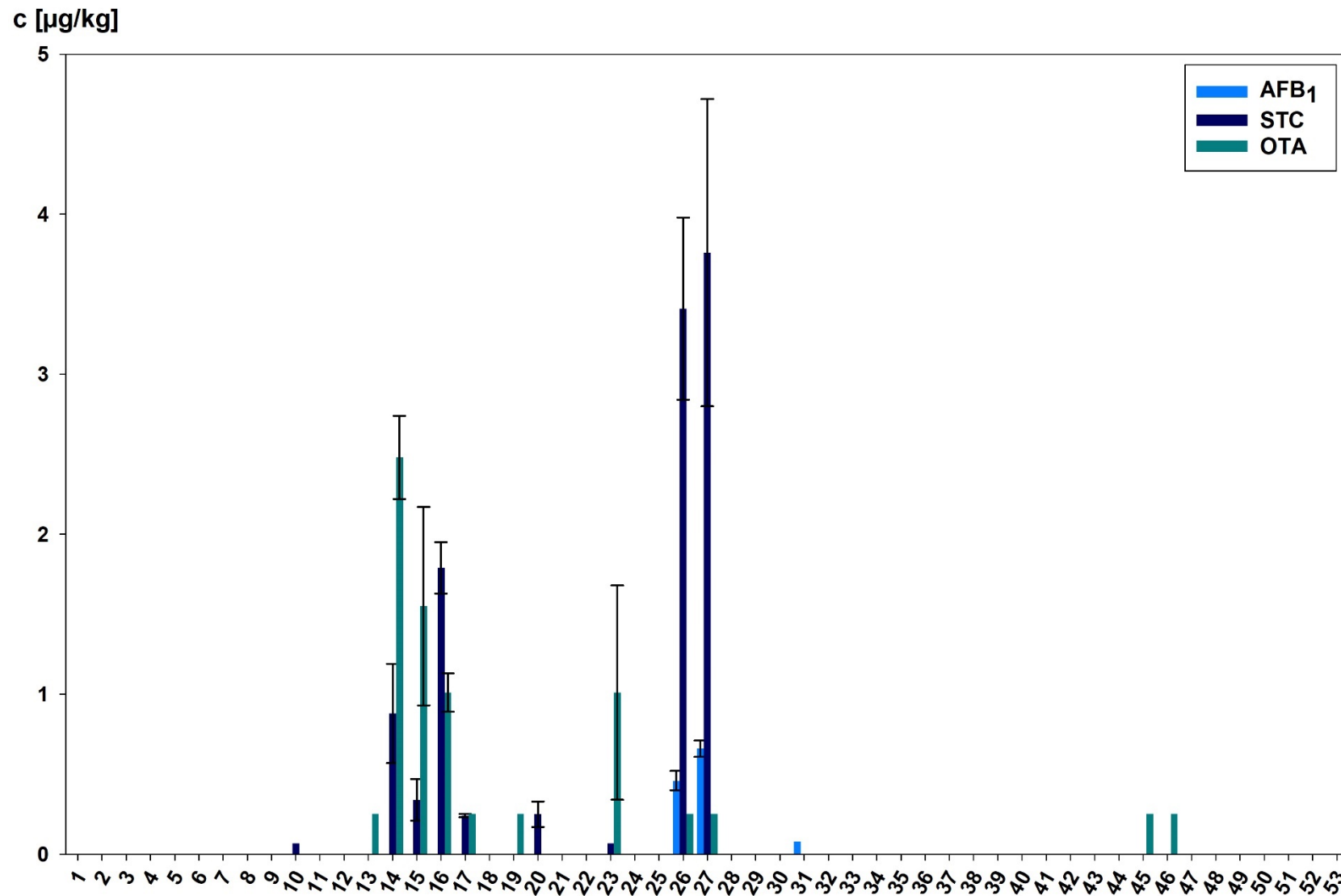


Abbildung 5: Quantifizierte Mykotoxinkonzentrationen (analysiert mit HPLC-MS/MS) in Futtermittelrohstoffen. Konzentrationen unterhalb der LOQ, aber oberhalb der LOD wurden unter Verwendung des lower bound Ansatzes auf die LOD gesetzt.

Tabelle 4: Konzentrationen quantifizierter Mykotoxine in Futtermittelrohstoffen.

No.	Futtermittelrohstoff	AFB ₁ [$\mu\text{g/kg}$]	STC [$\mu\text{g/kg}$]	OTA [$\mu\text{g/kg}$]
10	Roggen	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
13	Sonnenblume	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
14	Sonnenblume	< LOD	0.88 $\pm$ 0.31	2.48 $\pm$ 0.26
15	Weizengluten	< LOD	0.34 $\pm$ 0.13	1.55 $\pm$ 0.62
16	Weizengluten	< LOD	1.79 $\pm$ 0.16	1.01 $\pm$ 0.12
17	Weizengluten	< LOD	0.241 $\pm$ 0.01	LOD < x < LOQ
19	Weizenkleie	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
20	Weizenkleie oxidiert	< LOD	0.25 $\pm$ 0.08	< LOD
23	Getreidekleie	< LOD	LOD < x < LOQ	1.01 $\pm$ 0.67
26	Reiskleie oxidiert	0.46 $\pm$ 0.06	3.41 $\pm$ 0.57	LOD < x < LOQ
27	Reiskleie	0.66 $\pm$ 0.05	3.76 $\pm$ 0.96	LOD < x < LOQ
31	Sojabohnenextraktions-schrot	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
45	Erbsenmehl	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
46	Erbsenmehl	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ

LOQ: Bestimmungsgrenze (AFB₁ 0.27 $\mu\text{g/kg}$, STC 0.23 $\mu\text{g/kg}$, OTA 0.83 $\mu\text{g/kg}$), LOD: Nachweisgrenze (AFB₁ 0.08 $\mu\text{g/kg}$, STC 0.07 $\mu\text{g/kg}$, OTA 0.25 $\mu\text{g/kg}$).

Bei den 59 analysierten Mischfuttermittelproben wurde in 32 Proben (54 %) mindestens ein Mykotoxin nachgewiesen. Die detektierten Konzentrationen lagen zwischen LOD (AFB₁ 0.08 $\mu\text{g/kg}$, STC 0.07 $\mu\text{g/kg}$, OTA 0.25 $\mu\text{g/kg}$) und maximal 0.34 $\mu\text{g/kg}$ AFB₁ bzw. 1.63 $\mu\text{g/kg}$ STC. AFB₁ wurde in 20 Proben (34 %), STC in 18 Proben (31 %) und OTA in 13 Proben (22 %), jedoch nur unterhalb der Bestimmungsgrenze, nachgewiesen. Mehrfachkontaminationen konnten in 17 Proben (31 %) gefunden werden. Viele Kontaminationsgehalte lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze (13 Proben für OTA, 14 Proben für STC, 15 Probe für AFB₁) und konnten somit nur qualitativ erfasst werden. Der Hauptteil der nur qualitativ erfassbaren Mykotoxinkontaminationen wurde in Fischfutterproben gefunden, während einzelne quantifizierbare Mykotoxingehalte in Rinderfutter, Schweinefutter und Insektenfutter bestimmt wurden. Die Ergebnisse aller Proben sind in Tabelle 11 im Anhang

aufgeführt. Die positiven Mischfuttermittelproben sind in Tabelle 5 aufgeführt und alle in Abbildung 6 dargestellt.

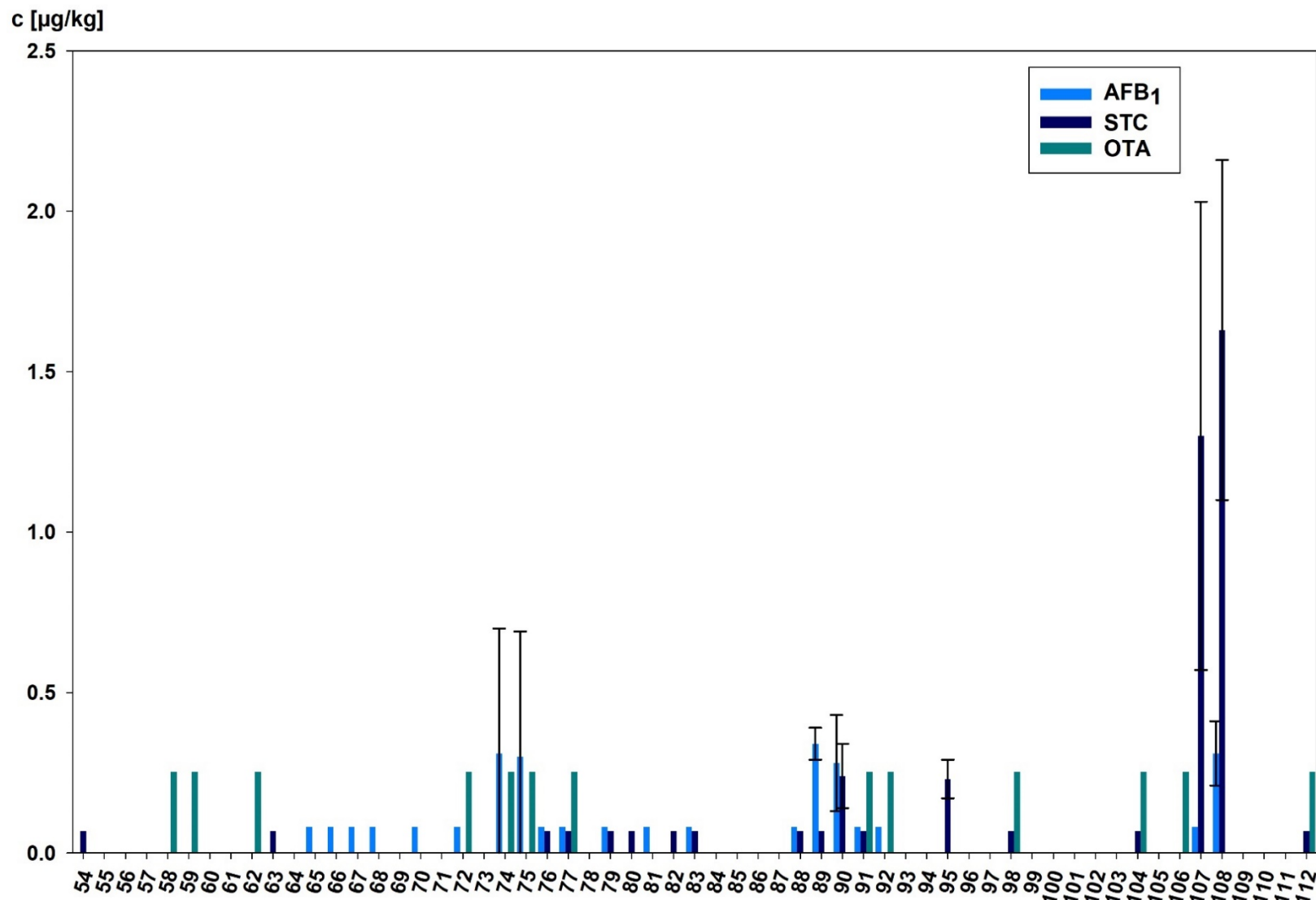


Abbildung 6: Quantifizierte Mykotoxinkonzentrationen (analysiert mit HPLC-MS/MS) in Mischfuttermitteln. Konzentrationen unterhalb der LOQ, aber oberhalb der LOD wurden unter Verwendung des lower bound Ansatzes auf die LOD gesetzt.

Tabelle 5: Konzentrationen quantifizierter Mykotoxine in Mischfuttermitteln.

No.	Mischfuttermittel	AFB ₁ [$\mu\text{g/kg}$]	STC [$\mu\text{g/kg}$]	OTA [$\mu\text{g/kg}$]
54	Fischfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
58	Fischfutter	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
59	Fischfutter	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
62	Fischfutter	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
63	Fischfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
65	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
66	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
67	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
68	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
70	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
72	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	LOD < x < LOQ
74	Fischfutter	0.31 $\pm$ 0.39	< LOD	LOD < x < LOQ
75	Fischfutter	0.30 $\pm$ 0.39	< LOD	LOD < x < LOQ
76	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	< LOD
77	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ
79	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	< LOD
80	Fischfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
81	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
82	Fischfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
83	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	< LOD
88	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	< LOD
89	Fischfutter	0.34 $\pm$ 0.05	LOD < x < LOQ	< LOD
90	Fischfutter	0.28 $\pm$ 0.15	0.24 $\pm$ 0.10	< LOD
91	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ
92	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	LOD < x < LOQ

Fortsetzung von Tabelle 5: Konzentrationen quantifizierter Mykotoxine in Mischfuttermitteln.

No.	Mischfuttermittel	AFB ₁ [$\mu\text{g/kg}$]	STC [$\mu\text{g/kg}$]	OTA [$\mu\text{g/kg}$]
95	Rinderfutter	< LOD	0.23 $\pm$ 0.06	< LOD
98	Rinderfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ
104	Schweinefutter	< LOD	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ
106	Insektenfutter	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
107	Insektenfutter	LOD < x < LOQ	1.30 $\pm$ 0.73	< LOD
108	Insektenfutter	0.31 $\pm$ 0.10	1.63 $\pm$ 0.53	< LOD
112	Insektenfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ

LOQ: Bestimmungsgrenze (AFB₁ 0.27 $\mu\text{g/kg}$, STC 0.23 $\mu\text{g/kg}$, OTA 0.83 $\mu\text{g/kg}$), LOD: Nachweisgrenze (AFB₁ 0.08 $\mu\text{g/kg}$, STC 0.07 $\mu\text{g/kg}$, OTA 0.25 $\mu\text{g/kg}$).

In den 97 Haferproben wurden lediglich in zwei Proben STC im Bereich zwischen LOD (0.07 μg STC/kg) und LOQ (0.24 μg STC/kg) nachgewiesen und keine weiteren Mykotoxine detektiert.

Des Weiteren wurden über alle 209 untersuchten Proben hinweg zusätzlich noch *O*-Methyl-STC in 6 Proben und Citrinin in 13 Proben identifiziert.

3.2.2 Metabolic fate and toxicity reduction of aflatoxin B₁ after uptake by edible *Tenebrio molitor* larvae (Publikation III)

Kim Lara Gützkow, Johanna Ebmeyer, Nina Kröncke, Nadja Kampschulte, Linda Böhmert, Cindy Schöne, Nils Helge Schebb, Rainer Benning, Albert Braeuning, Ronald Maul

Food and Chemical Toxicology, 2021, 155, 112375

Impact Factor: 5.57 (2021)

DOI: 10.1016/j.fct.2021.112375

Synopse

Das wachsende Interesse an Insekten als alternative Proteinquelle für Lebensmittel und Futtermittel geht zunehmend auch mit Fragen bezüglich der Lebens- und Futtermittelsicherheit einher. Bislang ist unzureichend geklärt, in welchem Umfang Mykotoxine aus kontaminierten Substraten von Insekten aufgenommen, metabolisiert oder ausgeschieden werden und welche Bedeutung dies für die Nutzung von Insekten in der Lebensmittel- und Futtermittelkette haben könnte.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des metabolischen Verbleibs von AFB₁ nach Aufnahme durch essbare Larven des Mehlkäfers *Tenebrio molitor*.

Es wurde ein Fütterungsversuch mit AFB₁-kontaminiertem Getreidemehl durchgeführt, gefolgt von einer umfassenden massenbilanziellen Erfassung von AFB₁ und dessen Metaboliten in Larven und Rückständen mittels LC-MS/MS. Zusätzlich wurden *in vitro* toxikologische Untersuchungen durchgeführt, um das verbleibende genotoxische Potenzial der Larven nach AFB₁ Aufnahme zu bewerten.

Die Arbeiten zu dieser Publikation wurden in Kooperation mit verschiedenen Einrichtungen durchgeführt: Der Fütterungsversuch mit den Insekten erfolgte an der Hochschule Bremerhaven, die Toxizitätsuntersuchungen in Zellkulturexperimenten am Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung Lebensmittelsicherheit und die mikrosomalen *in vitro*-Experimente am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Bergischen Universität Wuppertal. Die Mykotoxinanalytik sowie die statistische Auswertung wurden am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Abteilung Sicherheit in der Lebensmittelkette durchgeführt.

Der Eigenanteil betrug 20 % und umfasste die experimentelle Untersuchung, die Dateninterpretation, die Erstellung von Visualisierungen sowie das Verfassen des Originalmanuskripts.

This article was originally published in Food and Chemical Toxicology, 155, 112375 by Gützkow, K. L., Ebmeyer, J., Kröncke, N., Kampschulte, N., Böhmert, L., Schöne, C., Schebb, N. H., Benning, R., Braeuning, A., & Maul, R., Metabolic fate and toxicity reduction of aflatoxin B1 after uptake by edible Tenebrio molitor larvae, 2021. © 2021 Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112375>



Metabolic fate and toxicity reduction of aflatoxin B1 after uptake by edible *Tenebrio molitor* larvae

Kim Lara Gützkow^{a,b,1}, Johanna Ebmeyer^{c,1}, Nina Kröncke^d, Nadja Kampschulte^e,
Linda Böhmert^c, Cindy Schöne^a, Nils Helge Schebb^e, Rainer Benning^d, Albert Braeuning^c,
Ronald Maul^{a,b,*}

^a German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Department Safety in the Food Chain, Max-Dohrn-Str. 8-10, 10589 Berlin, Germany

^b Max Rubner-Institute, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Department Safety and Quality of Milk and Fish Products (MRI), Hermann-Weigmann-Straße 1, 24103 Kiel, Germany

^c German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Department Food Safety, Max-Dohrn-Str. 8-10, 10589 Berlin, Germany

^d University of Applied Sciences Bremerhaven, An der Karlstadt 8, 27568 Bremerhaven, Germany

^e University of Wuppertal, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Chair of Food Chemistry, Gaußstraße 20, 42119 Wuppertal, Germany

ARTICLE INFO

Handling editor: Dr. Jose Luis Domingo

Keywords:

Aflatoxin B1
Tenebrio molitor
Phase I metabolites
Genotoxicity
Mutagenicity

ABSTRACT

The use of insects as food and feed is gaining more attention for ecological and ethical reasons. Despite the high tolerance of edible yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae to aflatoxin B1 (AFB1), the metabolic fate of the toxin along with its toxic potential in the insect is uncertain. The present study aimed at investigating the AFB1 mass balance and the metabolite formation in a feeding trial with AFB1-contaminated grain flour. *T. molitor* larvae tolerated the AFB1 level of 10,700 µg/kg in the feed, however, weight gain was decreased by 15% over a 4-weeks feeding period. The investigation of the phase I metabolite pattern revealed the formation of AFM1 and a novel presumably monohydroxylated compound in larvae extracts that was not formed by reference incubation with rat, bovine or porcine liver microsomes. Mass balance quantification of ingested AFB1 revealed that 87% of the initial toxin remain undetected in larval body or residue. Analysis of histone H2Ax phosphorylation in human liver cells as a surrogate for genotoxicity showed that extracts from exposed larvae did not exhibit an elevated toxic potential. Although toxicological uncertainties remain due to the undetected transformation products, the resulting mutagenicity of the edible larvae appears to be low.

1. Introduction

The importance of insects as new source for animal-based protein is evident and has been reviewed by different authors (Dobermann et al., 2017; van Raamsdonk et al., 2017). Due to their low CO₂ and water footprint many reared insects are considered as particularly efficient and

ecologically advantageous (Dobermann et al., 2017; Varelas, 2019). Their nutritional value is high with respect to protein and fat composition, whilst, the demand in feed is low as e.g. sidestream products from the food industry can easily be used for insect rearing (Dobermann et al., 2017; Varelas, 2019). Main species already used for feed and food production are crickets, grasshoppers and larvae of the yellow

Abbreviations: ACN, acetonitrile; AFB1, Aflatoxin B1; AFM1, Aflatoxin M1; AF-OH, unknown monohydroxylated Aflatoxin metabolite; AFP1, Aflatoxin P1; AFQ1, Aflatoxin Q1; ANOVA, analysis of variance; au, arbitrary unit; BLM, bovine liver microsomes; BSA, bovine serum albumin; CE, collisions energy; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMSO, dimethyl sulfoxide; DP, declustering potential; ESI, electrospray ionisation; FA, formic acid; FBS, fetal bovine serum; HAC, acetic acid; HESI, heated electrospray ionisation; HPLC, high performance liquid chromatography; HRMS, high resolution mass spectrometry; iRLM, phenobarbital induced rat liver microsomes; IS, isotopically labelled standard; HPLC-MS, high performance liquid chromatography mass spectrometry; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; *m/z*, mass-to-charge ratio; MgSO₄, magnesium sulphate; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NH₄COOH, ammonium formate; PBS, phosphate-buffered saline; PBS-T, PBS supplemented with 0.1% Tween 20; PLM, pig liver microsomes; PRM, parallel reaction monitoring; RT, retention time.

* Corresponding author. Max Rubner-Institute, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Department Safety and Quality of Milk and Fish Products (MRI), Hermann-Weigmann-Straße 1, 24103 Kiel, Germany.

E-mail address: Ronald.maul@mri.bund.de (R. Maul).

¹ contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112375>

Received 6 April 2021; Received in revised form 23 June 2021; Accepted 25 June 2021

Available online 27 June 2021

0278-6915/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

mealworm as well as black soldier fly. However, different safety issues need to be addressed before the use of each insect species as feed and food can be recommended (Dobermann et al., 2017; van Raamsdonk et al., 2017). Microbial as well as chemical contaminations may occur. With respect to residues and contaminants, mainly heavy metals, environmental contaminants (e.g. dioxins or polycyclic aromatic hydrocarbons) and biotoxins (esp. mycotoxins) have to be considered (van der Fels-Klerx et al., 2018).

Aflatoxins belong to the most widely distributed mycotoxins formed by different *Aspergillus* sp.. Aflatoxin B1 (AFB1), the most prominent aflatoxin representative, is one of the most potent naturally occurring genotoxic carcinogens. AFB1s carcinogenic properties to humans are mainly based on the genotoxic properties of its metabolite(s). Activation of AFB1 is based on cytochrome P450 (CYP)-mediated formation of AFB1-8,9-epoxide. AFB1-8,9-epoxide is highly reactive and binds to DNA, proteins and glutathione. The formation of DNA adducts, such as the pro-carcinogenic AFB1-N⁷-guanine adducts, may result in G-to-T transversions and is thus responsible for AFB1s mutagenic properties (Degen and Neumann, 1981; Eaton et al., 2010). AFB1-8,9-epoxide can be detoxified by the epoxide hydrolase or by conjugation with glutathione catalysed by glutathione S-transferases (Eaton et al., 2010). Besides by epoxide formation, CYP enzymes also catalyse AFB1 hydroxylation resulting in the monohydroxylated metabolites AFQ1, AFM1 and AFP1 (Fig. 1). These may undergo further phase II detoxification. AFM1, AFP1 and AFQ1 are considered to be less mutagenic than AFB1. Thus, hydroxylation towards AFM1, AFP1 and AFQ1 may be seen as a detoxification pathway. However, AFM1 can also be converted to the 8,9-epoxide and then bind to DNA and proteins. Thus, AFM1 shows genotoxic properties, too, with a lower potency compared to AFB1. The liver-carcinogenic potency of AFM1 compared to AFB1 is reduced approx. by factor 10 (EFSA et al., 2020).

Different species show different susceptibilities towards AFB1-mediated toxicity. Presumably, due to the varying species-specific metabolic activities the susceptibility to AFB1 toxicity can differ among species by up to two orders of magnitude (Eaton et al., 2010; Wong and Hsieh, 1980). Whilst for mammals and poultry metabolic conversion of AFB1 is relatively well investigated, data on its metabolic fate in insects are sparse.

The metabolism of AFB1 has been studied for different insects, namely the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) and the black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae (Camenzuli et al., 2018). For the yellow mealworm (*T. molitor*) there is only one study concerning the tolerance to and accumulation of AFB1, not considering the metabolism (Bosch et al., 2017). No accumulation of AFB1 was detected for both, *A. diaperinus* and *H. illucens* by Camenzuli et al. (2018). Only small amounts of metabolites, aflatoxicol for both, AFM1 only for *A. diaperinus* and AFP1 only for *H. illucens*, were found in the residue (Camenzuli et al., 2018). The mass balance indicates a considerable amount of AFB1 lost in different insect species, which cannot be explained by the

metabolites found so far (Bosch et al., 2017; Camenzuli et al., 2018). However, this gap in mass balance is not unexpected as e.g. in rats and mice mass balance experiments also failed to detect large parts of the ingested toxin (Degen and Neumann, 1981). Camenzuli et al. (2018) suggest, that different insect species, depending on their capacity to metabolise AFB1, metabolise and excrete AFB1 differently.

For *T. molitor* as well as more recently for *H. illucens* and *A. diaperinus* it was shown that to a certain extent AFB1 metabolites such as AFM1, AFP1, AFQ1 and aflatoxicol can be detected in extracts of the larvae (Bosch et al., 2017; Camenzuli et al., 2018). Meijer et al. (2019) showed that AFP1 and aflatoxicol play a much more important role in *H. illucens* as compared to extracts obtained from rat liver enzyme incubation. However, the overall recovery of the initially applied AFB1 was low in this as well as in some previous studies. This analytical disappearance can possibly be attributed to the formation of various adducts of bio-activated AFB1 derivatives.

So far, no detailed studies have been conducted on the missing mass share of AFB1 in *T. molitor* or in most of the other studies investigating the *in vivo* fate of AFB1 following oral absorption. As it is extremely challenging to comprehensively monitor all transformation products and adducts in parallel, the remaining toxic potential of ingested AFB1 in the consuming organism is hard to estimate based on chemical analysis alone.

The toxicity of AFB1 or its metabolites should be reduced or almost negligible as soon as the compounds have bound to protein, glutathione or DNA. By contrast, to date unknown metabolites could still exert acute toxic or mutagenic effects. Consequently, if significant amounts of toxin cannot be recovered, the metabolite identification and quantification can be supported by *in vitro* toxicological investigation. This approach does not provide information on the chemical nature of bound or transformed toxin, however it allows estimating the remaining toxic potential of the undetected substance share.

For obtaining data for an initial risk estimation of insects reared on AFB1-containing feed, the aim of the present study was to investigate the fate of AFB1 from grains in edible *T. molitor* larvae, by two different approaches. First, we performed HPLC-MS/MS measurements focusing on previously described metabolites assisted by *in vitro* metabolic assays for analytical comparison, and second, by means of effect-based toxicological *in vitro* cell culture assays.

2. Materials & methods

2.1. Materials and chemicals

Analytical standards for AFB1 (certified purity > 98%), AFM1 (certified purity 90–95%) were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). ¹³C-labelled standards for AFB1 and AFM1 were purchased from Romer Labs (Getzersdorf, Austria). Methanol, acetonitrile (ACN), acetic acid (HAc), formic acid (FA), ammonium formate

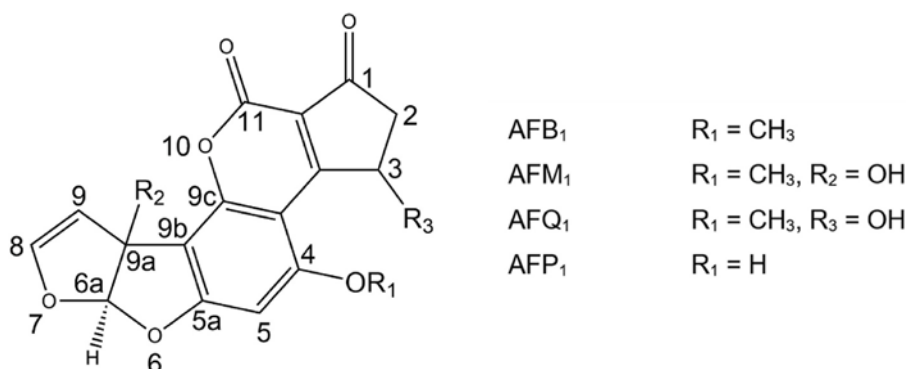


Fig. 1. Molecular structure of AFB1, AFM1, AFQ1 and AFP1 with numbering according to (Brown et al., 2009).

(NH₄COOH), hexane and magnesium sulphate (MgSO₄) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ethylacetate was purchased from Fisher Scientific (Schwerte, Germany). Double-deionised water was obtained through the use of a water-filtering machine (Milli-Pore, Merck, Darmstadt, Germany).

Phenobarbital-induced male Sprague Dawley rat liver microsomes (iRLM) were purchased from BioIVT (West Sussex, United Kingdom). Microsomes from bovine and pig liver were prepared in-house by gradual centrifugation of tissue homogenates at 9000×g and 100,000×g (Lake, 1987). Glucose-6-phosphate and glucose-6-phosphate-dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) was from Carl Roth (Karlsruhe, Germany).

HepaRG cells were obtained from Biopredic International (Saint Gregoire, France). William's E medium, FBS and insulin were purchased at PAN Biotech (Aidenbach, Germany). Penicillin/streptomycin solution was purchased from Capricorn Scientific (Ebsdorfergrund, Germany). Hydrocortisone hemisuccinate, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) and sodium dodecylsulfate were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). 2-Propanol was purchased from Roth (Karlsruhe, Germany). The primary anti-phospho-histone H2A.X (Ser139), clone JBW301 antibody [1:500 in 1% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline supplemented with 0.1% Tween 20 (PBS-T)] was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and the secondary antibody Alexa Fluor 647 Goat Anti-Mouse IgG (H + L) (1:400 in 1% BSA in PBS-T) was purchased from Life technologies (Carlsbad, California, USA).

2.2. Insect rearing, feed preparation, and feeding experiment

T. molitor larvae of own breeding were initially allowed to grow on wheat bran and selected after 6 weeks on medium size (approx. 1 cm). For exposure experiments each feeding group contained 100 individuals, with an average weight of 7.80 ± 0.9 mg per individual. Larvae were kept in 400 mL glass beakers and incubated at 25 °C with a humidity of 75% with no day/night rhythm for light, temperature and humidity for a 4-week period. Larval stages of *T. molitor* in particular do not require light or even have photophobic behavior under natural or laboratory conditions (Balfour and Carmichael, 1928; Cortes Ortiz et al., 2016; Howard, 1955).

The wheat meal was spiked with a target concentration of AFB1 of approximately 10,000 µg/kg, representing a high but naturally occurring contamination level (Kamala et al., 2018). The feed was homogenised by shaking overnight in a turbula mixer (WAB GmbH, Nidderau-Heldenbergen, Germany).

Each feeding group was fed with portions of 5–6 g of feed as soon as the feed had been consumed. The exact amount of feed was recorded separately for every larval replicate (Table S1). One feeding group, six biological replicates, obtained the spiked wheat meal and as a control the other feeding group, also six biological replicates, obtained non-spiked wheat meal.

For the analysis for each feeding group six replicates, larvae and residue samples were obtained. After harvest and fasting for 24 h, the larvae were stored at −18 °C before freeze-drying in a Beta 1–8 LDplus freeze-dryer (CHRIST, Osterode am Harz, Germany). The residue (combination of faeces and residual feed present in the beakers after the experiments) was kept separately and analysed for its mycotoxin content.

2.3. HPLC-MS/MS instrumentation and parameters

Analyses of feed, larvae and residue samples were performed on a NEXERA X2 HPLC system (Shimadzu Corp., Duisburg, Germany) coupled to a Q-Trap 6500+ system (Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Germany) operating in positive electrospray ionisation (ESI) mode and

measuring in multiple reaction mode (MRM) with the following settings: curtain gas 40, CAD medium, temperature 300 °C, the positive ion spray voltage 4500.0 V, GS1 60, GS2 35 and dwell-time varied. Analytes were separated on a polar guard-coated C₁₈ column, 100 × 2.1 mm, 5 µm, (ProteCol®, BGB Analytik Vertrieb GmbH, Rheinfelden, Germany). HPLC separation was performed using a gradient elution of water (0.1% FA, 300 mg/L NH₄COOH; Eluent A) and methanol (0.1% FA, 300 mg/L NH₄COOH; Eluent B).

After an initial period of 0.8 min at 15% B, the proportion of B was linearly increased to 60% at 4.0 min, 65% at 6.0 min, 80% at 8.5 min. At 11.0 min, the proportion of B reached 95%, which was held until 12.0 min. At 12.5 min, the proportion of B was lowered to 15%. At a total time of 15.5 min, the method ended.

The flow rate was set to 0.5 mL/min, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 5 µL. For most substances, either reference standards were available (AFB1, AFM1) or matrix samples known to contain the respective analytes AFB-OH, AFQ1 and AFP1 were analysed for verification of the MS parameters. Additionally, selected reaction monitoring transitions were incorporated for the analysis of N-acetylcysteine-AFB1, monoalcohol and dialcohol derivatives of AFB1, AFB1 lysine adducts and AFB1-glucuronides based on literature data (Guengerich et al., 2001, 2002; Scholl et al., 1997, 2006). The analytical parameters of quantitative determination of the analytes with the HPLC-MS/MS are shown in Table 1.

2.4. UHPLC-HRMS instrumentation and parameters

Analyses of residue and phenobarbital-induced rat microsome samples were performed on an UltiMate 3000 series UHPLC system (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) coupled to a high-resolution hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer Q Exactive Focus system (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) equipped with a heated electrospray ionisation (HESI) source. Analytes were separated on a C₁₈ column, 150 × 2.1 mm, 1.9 µm, (Hypersil Gold™, Thermo fisher, Waltham, MA, USA). Eluent A consisted of H₂O, 0.1% FA and 315 mg/L NH₄COOH, eluent B was composed of methanol, 0.5% water, 0.1% FA and 315 mg/L NH₄COOH. After an initial period of 1.0 min at 5% B, the proportion of B was linearly increased to 50% at 7.0 min, 80% at 7.5 min. At 7.6 min, the proportion of B reached 100% which was held until 10.0 min. At 10.1 min, the proportion of B was lowered to 5%. At a total time of 15.0 min, the method ended. The flow rate was set to 300 µL/min, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 5 µL. Mass spectrometric detection was performed in positive HESI mode with a quadrupole isolation window of 0.4 m/z, ion spray voltage of 4000 V, capillary temperature of 275 °C, sheath gas flow rate of 45 au, sweep gas flow rate of 2 au and a resolution of 70,000 (@ 200m/z) for the full scan HRMS data of AFB1, AFM1 and AFP1. For further confirmation via HRMS product ion spectra measurements in PRM mode with a resolution of 17,500 (@ 200m/z), collision energy of 40 eV and mass accuracy of 2 ppm were performed. HRMS experiments were achieved with Xcalibur software Version 4.0 (Thermo Fisher, Waltham, USA).

2.5. Preparation stock and working solutions

Both a standard mix (AFB1, AFM1) and an isotopically labelled standard (IS) mix (AFB1, AFM1) were prepared in ACN with 1% HAC. The standard mix diluted by ACN with 1% HAC served as calibration mix as well as spiking solution for validation. Calibration solutions were prepared by adding 90 µL H₂O, 80 µL ACN with 1% HAC, 10 µL of one out of ten calibration stock solutions and 20 µL of the IS solution.

2.6. Sample extraction

Two hundred milligrams of homogenised samples were weighed in triplets into 15-mL Falcon tubes and extracted using 1.5 mL H₂O and 1.5 mL ACN containing 1% FA. The samples were sonicated for 10 min in an

Table 1

Analytical parameters of quantitative determination of the analytes with the HPLC-MS/MS; ESI(+) mode; multiple reaction monitoring mode (MRM); declustering potential (DP); collisions energy (CE); the second product ion was used as a qualifier for the confirmation of identity for each analyte.

Analyte	Precursor ion (m/z)	DP (V)	Product ion 1 (m/z)	CE (eV)	Product ion 2 (m/z)	CE (eV)	Product ion 3 (m/z)	CE (eV)
AFB1	313.0	25	285.1	31	128.0	87	–	–
Aflatoxin G1	329.1	25	243.1	37	311.1	29	–	–
AFM1	329.1	66	273.1	33	229.0	55	–	–
Aflatoxicol	315.0	25	287.0	35	271.0	40	297.0	30
AFQ1	329.1	25	301.0	35	285.0	40	311.0	30
AFP1	299.0	25	271.0	35	240.0	40	212.0	45
N-acetylcysteine-Aflatoxin B1	492.2	30	329.1	25	271.1	40	–	–
dialcohol derivatives of AFB1	351.1	60	333.1	35	–	–	–	–
monoalcohol derivatives of AFB1	349.1	60	331.1	35	–	–	–	–

ultrasonic bath (Bandelin, Berlin, Germany), shaken for 30 min (Vibramax 100, Heidolph, Schwabach, Germany) and centrifuged (30 min; 4500×g; room temperature) (Heraeus™ Megafuge™ 16, Thermo Scientific, Schwerte, Germany). To 1 mL of supernatant 100 µL IS and 100 µL H₂O were added. Phase separation of organic and water phase was achieved by addition of 250 mg anhydrous MgSO₄, shaking for 30 s (VXR B, IKA, Staufen, Germany) and centrifugation at 14,000×g for 30 min at 10 °C (Microfuge R, Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Three hundred microliters of supernatant were transferred into a HPLC crimp vial, mixed with 300 µL H₂O and measured directly.

2.6.1. Feed extraction

Sample preparation for the analysis of spiked wheat flour was carried out as described above. However, extraction was done using 2 mL H₂O and 2 mL ACN with 1% FA. After the centrifugation for 30 min 100 µL of supernatant was diluted 1:2000 with a H₂O/ACN with 1% FA (50:50) solution prior to the addition of 100 µL to 1 mL of the diluted extract.

2.6.2. Larvae sample extraction

Before extraction larval samples were grinded in a Planetary Micro Mill, Pulverisette 7 premium line (FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Germany). Additionally, 2 mL of hexane was added to the extraction process to remove the fat fraction as described above. Estimation of LOD was carried out via analysis of ten blank (i.e. virtually aflatoxin free) samples as described by (Wenzl et al., 2016). The LOD for AFB1 is 1.1 µg/kg, and 1.6 µg/kg for AFM1. Due to varying dilutions used, the LOQs for this method were calculated to be 3.5 µg/kg for AFB1 and 5.4 µg/kg for AFM1.

2.6.3. Residue sample extraction

For the analysis of residue samples 100 µL of crude extract was first diluted 1:500 with a H₂O/ACN with 1% FA (50:50) solution. To 1 mL of the diluted extract 100 µL IS and H₂O was added and the extraction was continued as described above. Estimation of LOD was carried out via analysis of ten blank (i.e. virtually aflatoxin free) samples as described by (Wenzl et al., 2016). The LOD for AFB1 is 0.9 µg/kg and 1.4 µg/kg for AFM1. Due to varying dilutions used, the LOQs for this method were calculated to be 2.9 µg/kg for AFB1 and 4.6 µg/kg for AFM1.

2.7. Recovery

Spiking experiments at a level of 13.2 µg/kg AFB1 for the larval and 10.8 mg/kg for the residue samples were performed to determine the recovery within these. The recovery rate found in the larval samples were determined as 103 ± 10% for AFB1 (n = 3), while a recovery rate of 86 ± 6% for AFB1 was found in the residue samples (n = 3).

2.8. Mass balance calculation

The calculation of the total recovery of AFB1 fed to the insect larvae is based on measured contents in the larvae and the residue (consisting of frass and not consumed feed), the total amount of residue collected,

and the final weight of the larvae (Table S1). The mass balance is calculated for the amount of AFB1 present in the feed in relation to the amount of AFB1 and AFM1 present in larval bodies and residue. For other potential metabolites based on their MS peak areas, only estimated amounts could be given due to the lack of standard substances. Changes in molar mass due to metabolic conversion are neglected as for phase I metabolites the impact on the result is minimal.

2.9. Microsomal in vitro experiments

The protein levels in the preparations were determined using the bicinchoninic acid (BCA) method and bovine serum albumin as the reference protein for quantification.

Incubations for qualitative AFB1 metabolite formation were carried out in potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4, final assay volume: 200 µL) with a substrate, i.e. AFB1, concentration of 10 µM and 2 mg microsomal protein/mL. After 10 min preincubation at 37 °C in an orbital shaker, the reactions were started by the addition of a glucose-6-phosphate-dehydrogenase-based NADPH-generating system (1 mM final NADPH concentration). The reactions were stopped by the addition of 600 µL ice-cold ethyl acetate after 60 min of incubation at 37 °C. Subsequently, the metabolites were extracted by means of liquid/liquid extraction with 600 µL ethyl acetate twice. The combined organic phases were evaporated to dryness in an N₂-current. Prior to HPLC-MS/MS analysis, the extracts were reconstituted in 200 µL acetonitrile/water (50/50) mixture by vortexing for 1 min. The solution was either used directly for UHPLC-HRMS analysis or diluted 20-fold in an acetonitrile/water (50/50) mixture for HPLC-MS/MS analysis.

2.10. Cell culture and treatment

In vitro toxicity testing was performed in the human hepatoma cell line HepaRG, which is a well-known hepatocyte model showing high activities of xenobiotic-metabolising enzymes (Guillouzo et al., 2007). A total of 9000 HepaRG cells per cavity of a 96-well plate were cultured in William's E medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 5 µg/mL insulin, 5 × 10⁻⁵ M hydrocortisone hemisuccinate and 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, termed proliferation medium, at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Cell culture medium was changed every 2–3 days. Two weeks after seeding, proliferation medium was changed to differentiation medium consisting of proliferation medium supplemented with 1.7% DMSO. Cells were maintained for another two weeks in differentiation medium to allow the cells to differentiate into hepatocyte- and bile duct epithelial-like cells.

Differentiated cells were incubated for 47 h (MTT assay) or 24 h (γH2Ax assay) with extracts of the larvae control group spiked with 0, 0.9 or 2.6 µM aflatoxin B1, with extracts of larvae exposed to 10,700 µg AFB1 per kg wheat flour, with extracts of residues of the control group spiked with 0, 0.9 or 2.6 µM AFB1, or with extracts of residues of larvae exposed to 10,700 µg AFB1 per kg wheat flour. Feed uptake of the individual feeding groups is shown in Table S1. The larvae/residue control

groups correspond to uptake of the total AFB1 in the larvae exposure experiment. All extracts were diluted 1:100 in differentiation medium resulting in incubation medium containing 0.5% ACN. Additionally, cells were treated with AFB1 reference solutions in a concentration range of 0–16 μ M. Medium with 0.5% ACN served as vehicle control.

2.11. MTT cell viability assay

Cell viability was analysed by the MTT assay. For cell viability analysis, 10 μ L/well of MTT solution (5 mg/mL dissolved in phosphate-buffered saline (PBS)), was added to the cells after 47 h of treatment and incubated for another 1 h at 37 °C. The supernatant was removed, 130 μ L/well desorption solution (0.7% sodium dodecyl sulphate in 2-propanol) was added in order to dissolve the formed blue-coloured formazan, and cells were shaken for 30 min before measuring in a spectrophotometer at a wavelength of 590 nm.

2.12. Analysis of histone H2Ax phosphorylation

The genotoxic potential was investigated by analysing the phosphorylation of the histone H2Ax, then called γ H2Ax. H2Ax phosphorylation occurs after DNA double-strand breaks and thus, γ H2Ax is a surrogate for DNA double-strand breaks resulting from exposure to genotoxic compounds.

γ H2Ax staining was performed after 24 h of incubation as described before (Ebmeyer et al., 2019) with the following antibodies: primary anti- γ H2Ax antibody [anti-phospho-histone H2A.X (Ser139), 1:500 in 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS supplemented with 0.1% Tween 20 (PBS-T)] and secondary antibody [Alexa Fluor 647 Goat Anti-Mouse IgG (H + L), 1:400 in 1% BSA in PBS-T]. DNA quantification using DAPI staining was routinely included in the staining protocol as described in (Ebmeyer et al., 2019), but was not used in data evaluation since DNA from the larvae extracts might falsify the results. Quantitative analysis was performed at a Celldiscoverer 7 instrument (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) analysing three pictures per well with an Axiocam 506 and a Planachromat 5x/0.35 objective using the following wavelengths: 653/668 nm (Ex/Em, Alexa Fluor 647) and 353/465 nm (Ex/Em, DAPI). Quantitative analysis was performed by analysing the intensity of γ H2Ax staining automatically in all pictures using ZEN 2.6 blue edition software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.13. Statistical evaluation

Statistical analysis for toxicity experiments was done using Sigma Plot 14.0. Group comparisons were performed by one-way ANOVA followed by the Holm-Sidak post-hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Data for larval weight gain was tested for significance with a one-way ANOVA test followed by a Tukey-Kramer post-hoc analysis and was performed by using GraphPad Prism 7.04.

3. Results

In first instance, the aim of the present study was to investigate the tolerance of *T. molitor* larvae towards a high level of AFB1 in feed over a 33-day feeding period. The survival rate was almost 100% in both groups (10,700 μ g/kg AFB1 and control wheat), i.e. only one larva from the control group and four larvae from the AFB1 treatment group out of in total 600 individuals per group died during the trial. Weight gain was significantly lower in the exposure group ($p < 0.01$) and the exposed larvae reached only 85% of the weight gain as it was recorded for the larvae of the control group. The control larvae were 3.8-fold heavier after the feeding trial compared to their initial weight, whilst the AFB1 exposed individuals were only 3.2 times as heavy when the experiment was terminated. The life weight of groups of 100 individuals was monitored having in average increased from 1.451 ± 0.028 g to 5.440 ± 0.113 g for larvae fed on control diet compared to an increase from

1.438 ± 0.008 g to 4.647 ± 0.112 g for exposed larvae groups.

3.1. Metabolite formation

To compare the metabolism of AFB1 between different species, in addition to the feeding experiments with *T. molitor*, microsomal *in vitro* phase I metabolism experiments were conducted with phenobarbital induced rat liver microsomes (iRLM), bovine liver microsomes (BLM) and pig liver microsomes (PLM). Here the BLM and PLM represent the normal state of the liver, whereas the iRLM elicit intense metabolite formation. Phenobarbital induces, among others, the expression of phase I and phase II enzymes and thus was used to ensure an intense metabolite formation (Czekaj, 2000).

In order to obtain chromatographic retention times and characteristic mass spectra for a variety of typical AFB1 phase I metabolites, AFB1 was incubated *in vitro* using liver microsomes and subsequently analysed by HPLC-MS/MS and UHPLC-HRMS. Three clear signals in HPLC-MS/MS were obtained for the metabolism of AFB1 by iRLM (Fig. S4 and Table 2). In addition to AFM1 (as confirmed also by co-chromatography with a commercial standard), a further monohydroxylated metabolite, characterised as AFQ1 via HRMS spectra, with a retention time (RT) of 4.35 min was observed. AFP1, the O-demethylated product of AFB1, was detected at lower amounts at RT 4.70 min. The obtained exact masses as well as characteristic fragments, confirmed by HRMS spectra (AFM1: Fig. S6; AFP1: Fig. S8; AFQ1: Fig. S9), in conjunction with literature data (Dahms and Gurtsoo, 1976; Metcalfe et al., 1981; Murcia and Diaz, 2020) led to the assignment of the metabolites. The retention times serve also as reference for qualitative identification of metabolites formed in the insect feeding experiment. All spectra are shown in the supplementary information.

From the metabolisation of AFB1 by BLM and PLM emerge two signals in the HPLC-MS/MS chromatogram with RT 4.44 min and 4.70 min, which could be confirmed as the metabolites AFM1 and AFP1 (Table 2; Fig. S 2 and Fig. S 3). Additionally, for PLM there was an unknown signal with RT 4.94 min for the transition of precursor ion 299.0 m/z and product ion 240.0 m/z . Considering this transition, this signal might indicate a demethylated product of AFB1, which was not present in the insect samples.

The presence of AFB1 metabolites formed by *T. molitor* was studied separately in the larvae and residue, including the feed. Three signals were obtained for the larvae as well as the residue by HPLC-MS/MS (Fig. 2 and Fig. 3). In addition to AFM1, a further metabolite with RT 3.86 min in the larvae and 3.90 min in the residue was observed. Considering similarity of its HRMS spectrum the AFM1 and AFQ1 spectra this previously unknown metabolite is probably a further monohydroxylated AFB1 (Table 2). In the following this metabolite is referred to as AF-OH.

Table 3 shows the m/z ratios of quasi molecular ions and the corresponding dominating product ions as well as their relative abundance observed for the HRMS spectra (collision energy of 40 eV) of AFB1 and

Table 2

Overview on the AFB1 metabolite detection in larvae and residue from the *T. molitor* AFB1 exposure group (fed 33 days with wheat meal spiked with 10,700 μ g/kg AFB1), extracts of *in vitro* phase I metabolism assays of AFB1 by bovine liver microsomes (BLM), pig liver microsomes (PLM) and phenobarbital induced rat liver microsomes (iRLM). Feed presented to the *T. molitor* larvae was free of any metabolites. Results obtained from HPLC-MS/MS analysis in ESI(+) mode using the multiple reaction monitoring mode (MRM) (specific mass transitions given in Table 1).

	RT [min]	iRLM	BLM	PLM	residue	larvae	feed
AFB1	4.95	+	+	+	+	+	+
AFQ1	4.35	+	–	–	–	–	–
AFM1	4.44	+	+	+	+	+	–
AFP1	4.70	+	+	+	+	+	–
AF-OH	3.90	–	–	–	+	+	–

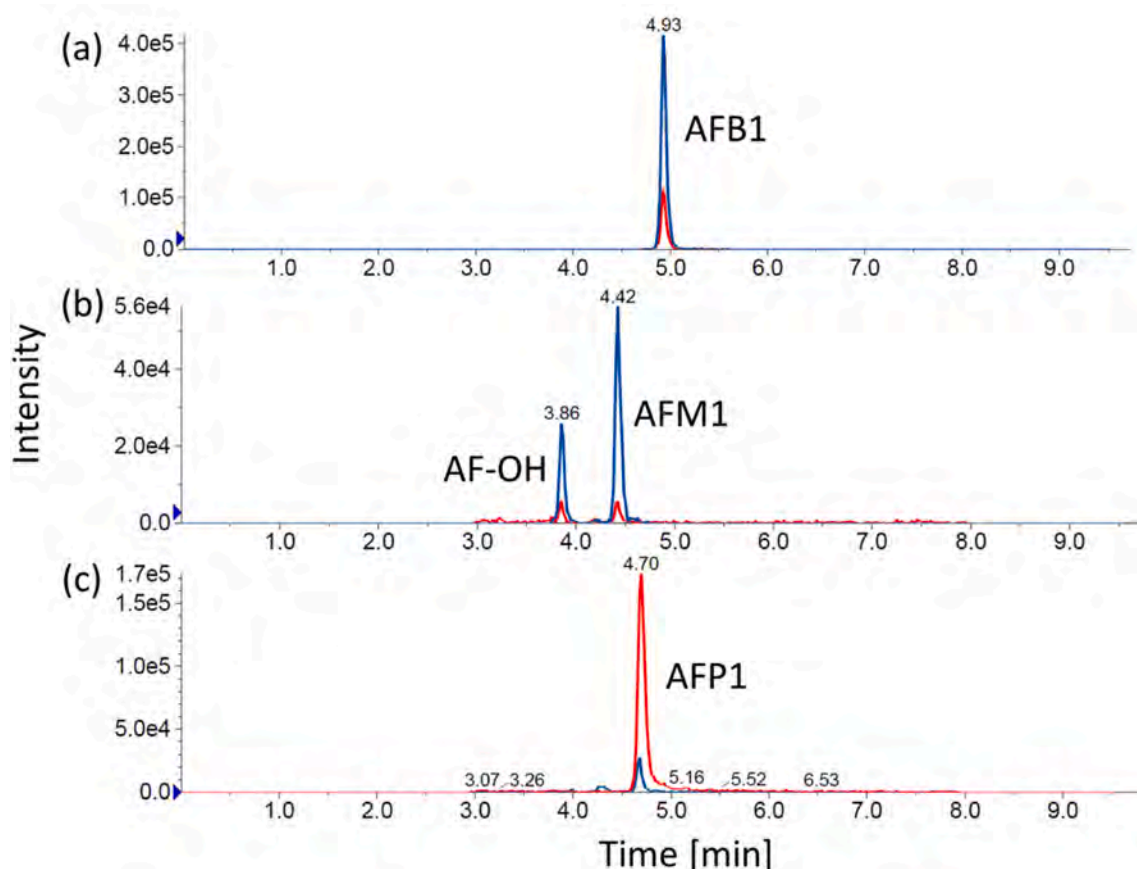


Fig. 2. HPLC-MS/MS chromatogram in ESI(+) mode of the extract of *T. molitor* larvae AFB1 exposure group (fed 33 days with wheat meal spiked with 10,700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1). Extract ion chromatograms in the multiple reaction monitoring mode (MRM) showing mass transitions [m/z] (a) 313.0 $\rightarrow$ 285.1; (b) 329.1 $\rightarrow$ 273.1 and (c) 299.0 $\rightarrow$ 240.0.

its metabolites AFM1, AFP1, AFQ1 and AF-OH. The complete HRMS spectra of AFB1, AFM1, AF-OH, AFP1 and AFQ1 are shown in the supplementary information from Figs. S5–S9.

The HRMS spectrum of the novel unknown metabolite AF-OH shows an almost identical fragment ion distribution as AFM1. The high similarity is observed for both, the mass to charge ratio of the fragments as well as their relative abundance. For only two of the five most abundant fragments a deviating relative intensity is recorded (Table 3). The main product ion of AFM1 has an m/z of 229.0495, whereas this product ion of AF-OH has only a relative abundance of 56% and the main product ion of AF-OH has the m/z of 273.0755.

In order to derive a mass balance of AFB1 intake and recovery in larvae and residue a HPLC-MS/MS based quantification of AFB1 and AFM1 was performed by external calibration using commercially available standards with isotopically labelled internal standards. The novel metabolite AF-OH was tentatively quantified by using the calibration of AFM1.

Mass balance calculation was based on the AFB1 concentrations in the spiked feed that the larvae were reared on, the amount of feed taken up as well as residue and larvae masses, set in relation to the concentrations of AFB1 and its metabolites quantified in larvae and residue. In the feed, prepared from blank wheat flour spiked with a target concentration of approximately 10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1, the AFB1 concentration was analysed to be 10,700 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In average, 9.4 g feed were given to each *T. molitor* group and 2.7 g of residue as well as 1.7 g of insect dry matter was obtained at the termination. The average mass balance of AFB1, e.g. the relative amount of AFB1, AFM1 and AF-OH compared to the initial AFB1 content, was 0.08% in the larvae and 12.8% in the residue (Table 4). Feed uptake, residue and insect dry matter of the

individual feeding groups are shown in Table S 1. Additionally, the metabolites N-acetylcysteine-AFB1, as well as dialcohol and mono-alcohol derivatives of AFB1 were monitored based on specific mass transitions adapted from the literature. However, none of the other metabolites could be found and also no additional relevant peaks could be identified. Thus, around 87% of the mass balance of AFB1 were missing.

Due to the different metabolism resulting in different susceptibilities of the various species, the extent and pattern of metabolite formation varies species-dependently (Table 5).

Most intense conversion as reflected by the decrease of the substrate AFB1 was observed for BLM, while iRLM, despite phenobarbital induction, showed lower decrease of AFB1 and PLM showed the least conversion of AFB1. Likewise, in the *T. molitor* extracts AFB1 from the feed was intensely metabolised. The *in vitro* phase I metabolism of BLM led to the highest amounts of AFM1. Comparing the species, BLM produced the largest proportion of qualified metabolites, followed by *T. molitor*. While BLM mainly converted AFB1 into AFM1, the metabolism detected from the *T. molitor* feeding trial led to almost equal shares of AFM1, AF-OH and AFP1. AFM1 represents a major metabolite in all investigated model systems except for iRLM, where only trace amounts of AFM1 were found and mainly AFQ1 was formed. The novel metabolite AF-OH was only discovered in *T. molitor*.

3.2. Toxicological evaluation

Cell viability analysis revealed a background cytotoxic potential of extracts from the larvae control group and its residue, even without AFB1 treatment, resulting in 73% (untreated larvae, Fig. 4 B) or 89%

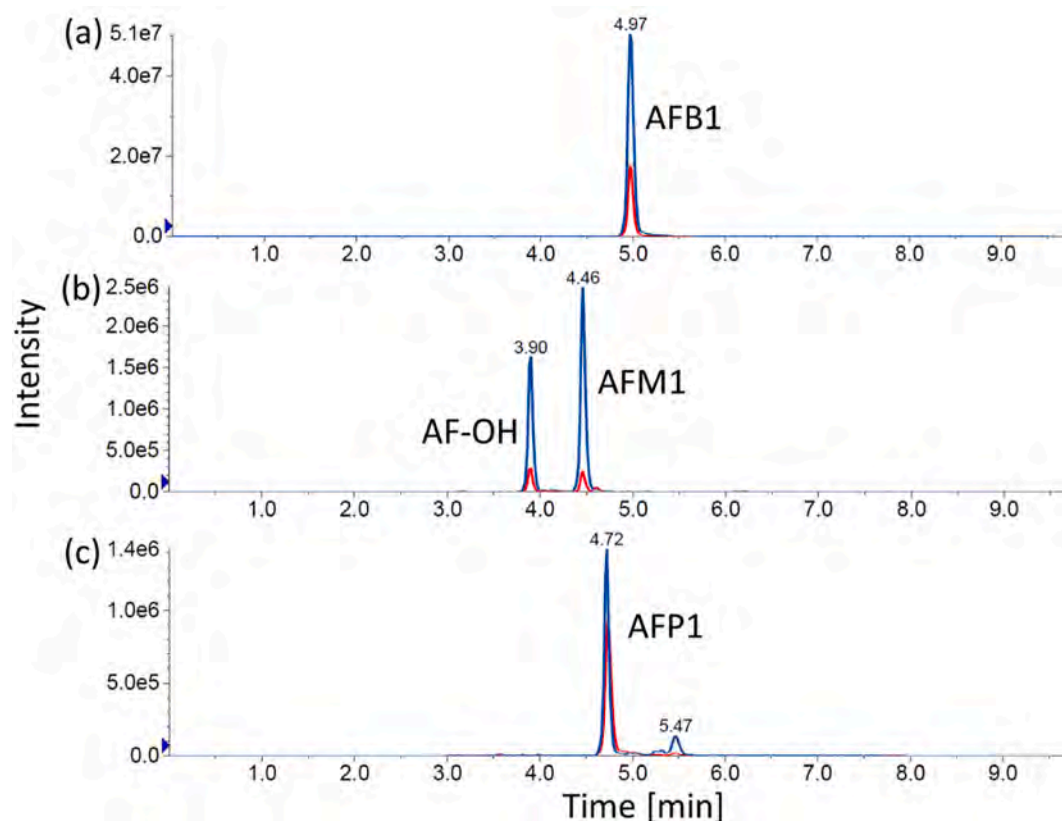


Fig. 3. HPLC-MS/MS chromatogram in ESI(+) mode of the extract of the residue of the *T. molitor* larvae AFB1 exposure group (fed 33 days with wheat meal spiked with 10,700 µg/kg AFB1). Extract ion chromatograms in the multiple reaction monitoring mode (MRM) showing mass transitions [*m/z*] (a) 313.0 → 285.1; (b) 329.1 → 273.1 and (c) 299.0 → 240.0.

Table 3

Relative abundance (RA), precursor ion [*M*+*H*]⁺ [*m/z*] and the five main product ions from the HRMS product ion spectra in HESI(+) mode of AFB1, AFM1, AF-OH, AFQ1 and AFP1 with an isolation window of 0.4 *m/z*, collisions energy of 40 eV. HRMS product ion spectra are shown in the supplementary information in Fig. S 5 to Fig. S 9.

	AFB1		AFM1		AF-OH		AFQ1		AFP1	
	<i>m/z</i>	RA [%]	<i>m/z</i>	RA [%]	<i>m/z</i>	RA [%]	<i>m/z</i>	RA [%]	<i>m/z</i>	RA [%]
precursor	313.0707 ^a	4	329.0656 ^a	<1	329.0656 ^a	<1	329.0656 ^a	5	299.0550 ^a	6
product ion 1	285.0753	25	273.0755	98	273.0755	100	283.0599	54	271.0598	62
product ion 2	269.0440	65	259.0600	52	258.0521	38	268.0364	38	240.0653	100
product ion 3	253.0491	15	229.0495	100	229.0495	56	240.0415	46	212.0704	84
product ion 4	241.0491	100	217.0859	18	217.0858	10	206.0573	50	201.0545	42
product ion 5	214.0622	46	203.0702	22	202.0623	14	177.0545	100	187.0753	40

^a calculated monoisotopic mass.

Table 4

Quantification results including standard deviation of AFB1, AFM1 and tentative for AF-OH (using the AFM1 calibration) in the larvae and residue from the *T. molitor* larvae AFB1 exposure group (fed 33 days with wheat meal spiked with 10,700 µg/kg AFB1) obtained by linear regression of calibration for AFB1 and AFM1. During the trial, in average 9.4 g feed were given to each *T. molitor* group and 2.7 g of residue as well as 1.7 g of insect dry matter was obtained at the termination. Results obtained from HPLC-MS/MS analysis in ESI(+) mode using the multiple reaction monitoring mode (MRM) (specific mass transitions given in Table 1).

	AFB1 [µg/kg]	AFM1 [µg/kg]	tentative quantification of AF-OH [µg/kg]	mass balance AFB1 [%]
larvae	48.9 ± 4.6	11.7 ± 1.6	4.2 ± 0.8	0.08 ± 0.008
residue	4719 ± 396.5	220.9 ± 220.9	281.3 ± 70.7	12.8 ± 1.2

Table 5

Relative share of AFB1 metabolites detected in the larvae and residue from the *T. molitor* larvae AFB1 exposure group (fed 33 days with wheat meal spiked with 10,700 µg/kg AFB1), in the feed as well as in microsomal *in vitro* phase I metabolism assays (AFB1 concentration of 10 µM and 2 mg microsomal protein/mL) using bovine liver microsomes (BLM), pig liver microsomes (PLM) and phenobarbital induced rat liver microsomes (iRLM). Estimations derived from HPLC-MS/MS analysis. ++ = main, + = high amount, o = low amount, tr = traces, - = non-detectable. More details on the semi-quantitative results are giving in the supplementary data Fig. S 10.

metabolite	PLM	BLM	iRLM	residue	larvae
AFM1	++	++	tr	++	+
AFP1	o	o	o	+	++
AFQ1	-	-	++	-	-
AF-OH	-	-	-	+	+

viability (residue of untreated larvae, Fig. 4 C). Spiking of the larvae control group extracts or its residue with 0.9 and 2.6 μM AFB1 led to a slight, concentration-dependent decrease of cell viability down to 53% (larvae) and 73%, respectively (residue, Fig. 4 B, C). The larvae control group spiked with 2.6 μM AFB1 corresponds to complete uptake of the total AFB1 fed in the larvae exposure experiment. Since AFB1 amounts in the residue account only for 12.8% of the initial fed AFB1 (compare Table 4) and transformation of AFB1 in the residue is not expected due to missing enzymes, it is concluded that at least 87.2% of the AFB1 were taken up by the larvae, which would correspond to 2.3 μM incubations in the *in vitro* cell viability and γH2Ax formation experiments. Treatment of cells with extracts from the larvae exposure group resulted in cell viabilities of 60–75% (Fig. 4 B), thus ranging between the non-spiked and the spiked larvae control group. The residues of the exposure group resulted in cell viabilities of 77–88% (Supplementary Data Fig. 4 C), thus again in between the corresponding non-spiked and spiked residue control group.

The γH2Ax assay showed a concentration-dependent and statistically significant phosphorylation of H2Ax by AFB1 alone, AFB1-spiked extracts of larvae control group extracts, and AFB1-spiked extracts of residues of the control group, up to 970% of the values obtained with the vehicle control (Fig. 5 A, B, C). The γH2Ax formation was stronger for the extracts, as compared to the AFB1 standard solutions. This might depend on an increased background signal of the staining due to the present matrix. By contrast, extracts of the larvae exposure groups or the residues of the exposure groups showed γH2Ax signals in the range of the non-spiked extracts of blank/untreated larvae, indicating a detoxification of AFB1 by *T. molitor* larvae. Both comparisons, larvae exposure groups vs. non-spiked larvae control group, and residues of exposure group vs. non-spiked residues of control group, showed no statistically significant differences. A tendency for higher remaining genotoxic potential in the residues might be explained by the higher remaining content of AFB1 in the residues, as compared to the larvae ($12.8 \pm 1.2\%$ of initial AFB1 content in residue vs. $0.08 \pm 0.008\%$ in larvae, compare Table 4).

4. Discussion

As shown in previous studies, *T. molitor* tolerates high amounts of toxin in feed. Even though the AFB1 levels reported by Camenzuli et al. (2018) and Bosch et al. (2017) have even been exceeded by around 20 times in the present study, the survival rate was unaffected and weight gain was only slightly diminished (approx. 15%). The results of Mancini et al. (2020) also showed that the mortality and growth rate of *T. molitor*

larvae fed with AFB1 contaminated diets (concentrations of AFB1 of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) did not differ significantly and no accumulation of mycotoxins was found (Mancini et al., 2020).

In a study concerning two different insects, the navel orangeworm (*Amyelois transitella*) and corn earworm (*Helicoverpa zea*), even higher concentrations of AFB1 from 1 mg/kg up to 100 mg/kg in the feed were used (Niu et al., 2009) without pronounced negative effects. However, with respect to insect exposure only acute effects such as mortality rate or weight gain are recorded. Chronic long-term effects as shown for humans or mammals are not considered in insects due to the much shorter life cycle. Dose-finding for our feeding experiment was based on Kamala's study, where a maximum contamination of 50 mg/kg AFB1 was found in harvested maize (Kamala et al., 2018). In order to investigate realistic, naturally occurring contaminations, we decided to stay below this value with using an AFB1 concentration of about 10 mg/kg feed.

The EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens authors suggest that for the sum of AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 in the novel food *T. molitor* larvae for human consumption, a specification of $\leq 0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ does not raise safety concerns (EFSA et al., 2021).

Mancini et al. (2020) used very low levels of AFB1 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in their exposure experiments with *T. molitor* larvae and therefore only found levels of AFB1 below the LOD in the larvae (Mancini et al., 2020). They did not study the larval residue, but speculated that there must be potentially relevant metabolites.

The theoretical transfer rate of AFB1 from the feed (10,700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1) to *T. molitor* larvae (approximately 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1) derived from the present study would be 0.47%. Larvae obtained in the feeding trial would exceed the limit of 0.4 μg AFB1/kg edible *T. molitor* larvae suggested by the EFSA by a factor of 125 (EFSA et al., 2021). Assuming a linear correlation of the derived transfer rate (i.e. a constant transfer of 0.47% of the feed-derived AFB1 to the larvae), feed (complete diet) for *T. molitor* larvae intended for subsequent human consumption containing up to 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1 might yield AFB1 levels of below the EFSA limit of 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Nonetheless, it should be pointed out that levels of the genotoxic carcinogen AFB1 in food and feed should generally be kept as low as possible.

4.1. Metabolite formation

In vitro metabolic experiments utilising liver microsomes from three different species were conducted in order to re-evaluate the heterogeneity of hepatic AFB1 transformation, and to obtain chromatographic and mass spectrometric information on the principal phase I

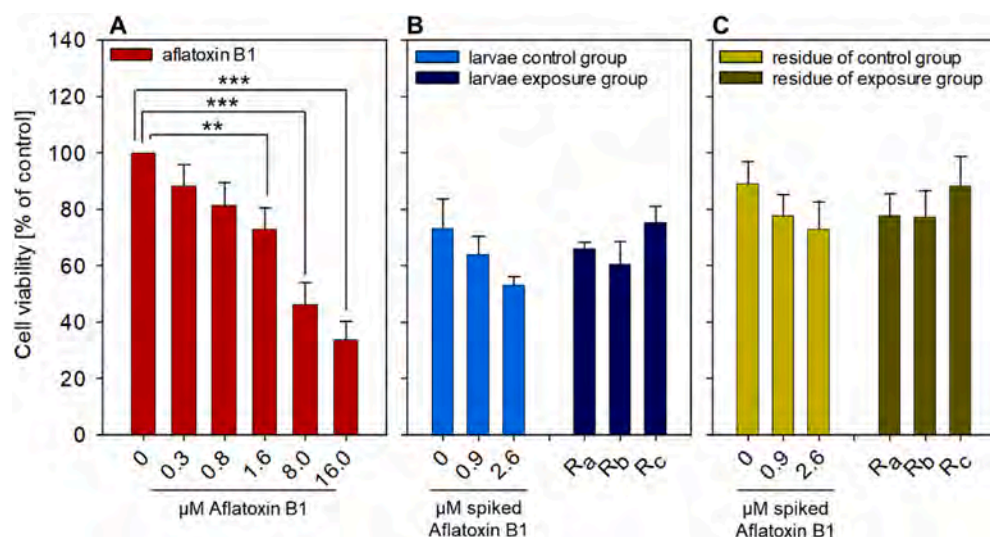


Fig. 4. HepaRG cell viability after treatment with AFB1 solution (A), extracts of larvae control group spiked with AFB1 or larvae exposure group (B) or extracts of the residue of control group spiked with Aflatoxin B1 or the residue of exposure group (C). Cell viability was analysed by the MTT assay. The results are shown as mean + SD of three separate experiments with three replicates each. R_a , R_b and R_c represent three different lots of larvae/residue exposure groups. Significant differences were analysed by one-way ANOVA followed by the Holm-Sidak post-hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

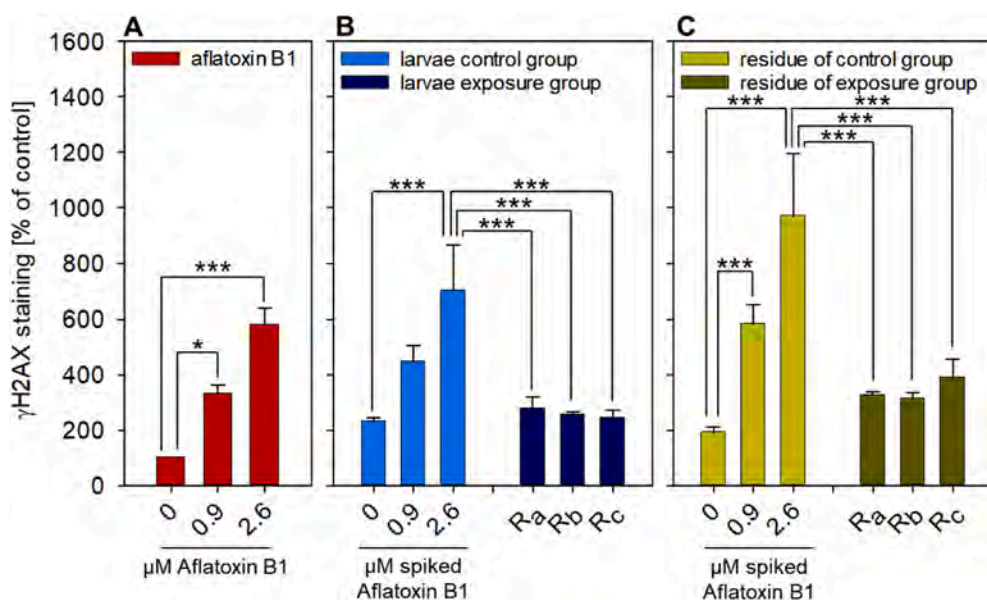


Fig. 5. γ H2AX formation in HepaRG cells. A: γ H2AX formation after treatment with AFB1 standard solution as a reference control. B: γ H2AX formation after treatment with extracts from larvae control groups spiked with different concentrations of AFB1 (light blue) or with extracts of larvae exposed to 10,700 μ g AFB1 per kg wheat flour. C: (B) γ H2AX formation after treatment with extracts of the residues of control groups spiked with different concentrations of AFB1 (light green) or with extracts of the residues of larvae exposed to 10,700 μ g AFB1 per kg wheat flour (dark green). γ H2AX formation was analysed by staining with a primary anti- γ H2AX antibody and a fluorescence-conjugated secondary antibody. Quantitative evaluation was performed by measuring the staining intensity. Results are shown as mean + SD of three separate experiments with three replicates each. R_a, R_b and R_c represent three different lots of larvae/residue exposure groups. Significant differences were analysed by one-way ANOVA followed by the Holm-Sidak post-hoc test (* p < 0.05, *** p < 0.001). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the

reader is referred to the Web version of this article.)

metabolites.

Amongst the three microsomal models, the most intense metabolism was observed for BLM even compared with iRLM originating from phenobarbital pre-treated animals. This finding is remarkable as the induction also enhances the amount of CYP1A2 in the rat liver (Sakuma et al., 1999). CYP1A2 is besides CYP3A4 the most important enzyme for phase I metabolism of AFB1 (Ueng et al., 1995). Thus, despite the CYP induction in iRLM and considering the fact that equal amounts of microsomal protein were used in the assays, the conversion of AFB1 caused by BLM (monitored by substrate peak decrease and metabolite peak formation) is much more intense than for iRLM. The metabolites of AFB1 were found in different proportions in the different species assays as shown in Table 5. *In vitro* phase I metabolism by the BLM led to the highest amounts of AFM1 considering the species studied here. AFM1, AFP1 and traces of AFQ1 and aflatoxicol have been described in bovine liver tissue which is basically in line with the present findings, although in the present assays AFM1 formation was much more dominant (Kuilmann et al., 1998; Larsson et al., 1989).

From *in vitro* incubations using iRLM the AFB1 metabolites AFQ1, AFP1 and AFM1 could be identified. AFQ1 was the main metabolite found in iRLM, whereas only some AFP1 and traces of AFM1 were found. Degen et al. described AFQ1 as the main metabolite of AFB1 in rats, next to the formation of AFM1 and AFP1 (Degen and Neumann, 1978, 1981). As also the metabolite pattern formed by iRLM incubation aligns well with literature data, despite the lacking of reference compounds for AFQ1 and AFP1 the assignment of retention times and MS fragmentation pattern along with HRMS fragment spectra for these metabolites is feasible.

The main metabolite identified in PLM was AFM1, but also some AFP1 was found (Table 5). The additional signal at RT 4.94 min with the mass transitions of AFP1 is most likely an artefact originating from in-source demethylation of the very abundant AFB1. PLM have not been used to study AFB1 metabolism so far. However, from *in vivo* exposure experiments the excretions of AFB1, AFM1 and aflatoxicol has been described in urine and faeces of pigs after oral AFB1 exposure (Lüthy et al., 1980; Thieu and Pettersson, 2009).

In general, the observed pattern of phase I metabolites is in line with previous *in vitro* and *in vivo* studies.

For the larvae and the residue of *T. molitor* AFM1, AFP1 and the new,

yet unidentified, monohydroxylated metabolite AF-OH were discovered as metabolites of AFB1 (Table 5). Comparing the proportions of metabolites compared to remaining AFB1 in the larvae and the residue, the total amount of metabolites is clearly higher in the residue than in the larvae, based on peak area in the HPLC-MS analysis. This finding indicates that a certain amount of toxin was not taken up by the larvae and remained unchanged in the residue mixed with the frass and most of the formed metabolites were also excreted. Interestingly, AFP1 was causing the most abundant metabolite signal in the larvae, whilst in residue all three metabolites showed similar abundances (Table 5). These data indicate that AFP1 might be excreted slower than the two other metabolites.

Even though no distinct fragment structures can be assigned by HRMS, it becomes obvious that AFM1 and the novel AF-OH metabolite show high similarity in the fragment pattern, whilst the AFQ1 daughter ion spectrum shows clearly different mass fragments (Table 3). The product ions of AFM1 and AF-OH are very similar concerning the mass to charge ratio (m/z), but the relative abundances of these product ions differ greatly (Table 3). The main product ion of AFM1 has an m/z of 229.0495. For the metabolite AF-OH this product ion (m/z 229.0495) has only a relative abundance of 56% and the main product ion of AF-OH has the m/z of 273.0755, which also has a high relative abundance for AFM1. The two product ions that differ in the mass to charge ratio have the m/z of 259.0600 for AFM1 and 258.0521 of AF-OH and 203.0702 for AFM1 and 202.0623 for AF-OH, their calculated elemental composition differs by one hydrogen atom. Concerning these two product ions the relative abundances are roughly the same for both AFM1 and AF-OH. These similarities of the HRMS spectra lead to the conclusion that AFM1 and AF-OH might both be two metabolites monohydroxylated at different positions. One explanation for the high similarities could be that AF-OH and AFM1 are cis/trans isomers. The strongly deviating retention times (3.90 min for AF-OH and 4.44 min for AFM1), however, render this hypothesis unlikely again and suggest a structural difference larger than a cis/trans isomerism, namely a hydroxyl group at a different position in the AFB1 backbone.

To form similar product ions like AFM1 in the HRMS spectrum, the monohydroxylation has to occur on the same part of the molecule as for AFM1. Hydroxylation could occur at carbon atoms 5, 5a, 8, 9, 9 b and 9c (Fig. 1) of AFB1. It can be suggested that monohydroxylation at position

9 is most probable, due to molecular stability. For a comprehensive structural identification of the novel metabolite an isolation and purification of the compound would be necessary. However, the absolute amount of all metabolites in the insect tissue is low. Thus, an extraction from the larvae of the feeding trial would not lead to sufficient amounts of AF-OH for structural elucidation by e.g. NMR. Moreover, neither tissue homogenates nor recombinant enzymes that can be used as models for *in vitro* metabolite generation for rodents, livestock animals or humans, are available for insects. Further studies on the formation of the unknown metabolite AF-OH are necessary for structure elucidation.

T. molitor larval metabolism efficiently converts AFB1 into different phase I metabolites. Considering all quantified metabolites, the average mass balance of AFB1 was 0.08% in the larvae and 12.8% in the residue (Table 4). Therefore, around 87% of the initial toxin amount is missing to the mass balance of AFB1. Metabolites with no standard solutions of certified purity being available were excluded from the mass balance calculation. However, also a semi-quantitative inclusion of e.g. AFP1 based on the assumption of a mass spectrometric response identical to AFB1 would not lead to a relevant change in the mass balance due to the very low abundance of the metabolite peaks. The published mass balance values of AFB1 for different insect species differ greatly: Camenzuli et al. (2018) found a mass balance for AFB1 in *H. illucens* between 11 and 18% and in the *A. diaperinus* between 56 and 80% (Camenzuli et al., 2018). In a study by Bosch et al. (2017) the mass balance also indicates a considerable amount of AFB1 lost, which was 89.0–95.6% in the *T. molitor* and 83.0–95.1% in the *H. illucens*, but they only searched for the metabolite AFM1, which only could be detected in the residue of *T. molitor* (Bosch et al., 2017). Since taking the metabolites in consideration the mass unaccounted for could not be explained, Camenzuli et al. (2018) suggest that different insect species, depending on their capacity to metabolise AFB1, metabolise and excrete AFB1 differently (Camenzuli et al., 2018).

In order to explain the missing AFB1 in the mass balance, Meijer et al. (2019) suggest that the enzymes in live larval cells possibly first convert AFB1 into Aflatoxinol and AFP1, which then act as precursors for other metabolites, which could be reactive and bind to other proteins (Meijer et al., 2019). The interactions between aflatoxins and macromolecules such as the DNA being most causative for the acute toxicity of AFB1 as well as the mutagenic effects of AFB1 are formed via the reactive intermediate AFB1-exo-8,9 epoxide (Benkerroum, 2020). AFB1-exo-8,9 epoxide is formed in e.g. human liver by oxygenation mainly by the cytochrome P450 enzymes CYP1A2 and CYP3A4 (Yang et al., 2012). Those CYP enzymes have not been described in insects yet and it remains uncertain whether insects possess enzymes with a similar substrate specificity (Feyereisen, 1999). Assuming that these CYP enzymes are missing in insects the activation of AFB1 to its epoxide might be less abundant and therefore, covalent binding of AFB1 to proteins might play a bigger role in *T. molitor*. We further assume that AFB1 once bound covalently to matrix protein, loses its toxic potential because the binding will not be reverted in the gastro intestinal tract. AFB1 covalently bound to the matrix might be the responsible for the missing AFB1 in the mass balance due to the missing extractability.

Thus, also for *T. molitor* large proportions of AFB1 may be transformed into glutathione, protein and/or DNA adducts. In addition, glucose conjugates could be considered in future investigation as insects are known to metabolise certain xenobiotics via glucosyltransferases (Bock, 2016). In general, the metabolism in *T. molitor* differs from mammals or other species as it can also be seen from the novel phase I metabolite.

4.2. Toxicological evaluation

The low recovery of ingested AFB1 in the larvae and residue raises the question of potentially remaining toxicity of the larvae after harvesting. Thus, toxicity experiments were performed in HepaRG cells as a metabolically competent model for human hepatocytes.

It must be noted that the informative value of the cytotoxicity data might be considered limited, due to the rather unspecific nature of the endpoint cell death. In order to confirm detoxification of AFB1 by the larvae, phosphorylation of histone H2AX (γ H2Ax), a surrogate for DNA damage, was monitored as a more specific endpoint addressing genotoxicity as the primary mode of action of AFB1.

As expected, free AFB1 clearly reduced cell viability and induced γ H2Ax formation, indicating DNA damage. By contrast, cytotoxicity and γ H2Ax formation were barely observed when cells were incubated with extracts from larvae reared with AFB1-containing feed. Enhanced γ H2Ax formation for residue extracts, as compared to larvae extracts, is congruent with the presence of higher AFM1 and remaining un-metabolised AFB1 in the residue. This is also in line with data from the literature. Guyonnet et al. described that intense phase I metabolism leading to the formation of AFM1, AFQ1 or AFP1 in general is associated with reduced genotoxic effects in the rat (Guyonnet et al., 2002). It should be noted that γ H2Ax formation might also occur in the context of apoptosis or mitosis; however, the clear connection between exposure to the model genotoxic carcinogen AFB1 and the γ H2Ax response of HepaRG cells, along with the lack of effect following treatment with *T. molitor*-metabolised AFB1, strongly suggest that the present results constitute a valid surrogate for genotoxic effects of AFB1 or its metabolites.

In total, toxicological testing of larvae and residue extracts showed a detoxification of AFB1 by *T. molitor*. It has been previously described that CYP-mediated metabolism leads to a reduction of AFB1 toxicity to insects themselves (Niu et al., 2008; Zeng et al., 2006, 2013). However, to the best of our knowledge, we are the first who analysed and observed a reduction of AFB1 toxicity to human liver cells via its metabolism by larvae of *T. molitor*.

5. Conclusion

Insects such as *T. molitor* are much more resistant to acute toxic effects of AFB1 than several other mammal or poultry species. Although a novel phase I metabolite was detected in *T. molitor* larvae, it cannot be stated whether or not metabolism is responsible for the elevated insect larvae tolerance. The novel metabolite needs to be investigated further, in order to estimate its contribution to AFB1 detoxification.

In general, the amount of unmetabolised AFB1 and phase I metabolites in larvae is low compared to the amount of AFB1 presumably taken up by the larvae and the initial amount in the feed. Although a significant amount of ingested AFB1 cannot be recovered in larvae or residue, the lacking toxin amount is transformed or bound in a way that it does no longer exert its mutagenicity. Consequently, feeding AFB1 contaminated grains to *T. molitor* larvae could be an alternative to excluding the material from further agricultural use. However, establishing a maximum level for AFB1 in feed for edible insects designated for subsequent human consumption would be required. Whilst direct food use of the larvae could still be impossible due to the remaining AFB1 a use of exposed larvae as feed for poultry or fish should be of low risk for resulting food items. By contrast, direct feeding of the highly AFB1 contaminated maize would be detrimental for livestock animals and food produced thereof.

However, additional toxicological testing and further analytical metabolite characterisation will be necessary to draw final conclusions about the safety of insects reared on AFB1-containing substrates.

CRedit authorship contribution statement

Kim Lara Gützkow: Investigation, Data interpretation, Visualization, Writing – original draft. **Johanna Ebmeier:** Investigation, Data interpretation, Visualization, Writing – original draft. **Nina Kröncke:** Investigation, Data interpretation, Writing – original draft. **Nadja Kampschulte:** Investigation, Data interpretation, Writing – original draft. **Linda Böhmert:** Writing – review & editing. **Cindy Schöne:**

Investigation, Data interpretation. **Nils Helge Schebb:** Conceptualization, Data interpretation, Writing – review & editing. **Rainer Benning:** Conceptualization, Data interpretation, Writing – review & editing. **Ronald Maul:** Conceptualization, Data interpretation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

Author Johanna Ebmeier thanks Anja Köllner for her skillful technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112375>.

References

- Balfour, C.E., Carmichael, L., 1928. The light reactions of the meal worm (*Tenebrio molitor* linn). *Am. J. Psychol.* 40, 576–584.
- Benkerroum, N., 2020. Chronic and acute toxicities of aflatoxins: mechanisms of action. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 17, 423.
- Bock, K.W., 2016. The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochem. Pharmacol.* 99, 11–17.
- Bosch, G., Fels-Klerx, H.J.V., Rijk, T.C., Oonincx, D., 2017. Aflatoxin B1 tolerance and accumulation in black soldier fly larvae (*hermetia illucens*) and yellow mealworms (*Tenebrio molitor*). *Toxins* 9.
- Brown, K.L., Bren, U., Stone, M.P., Guengerich, F.P., 2009. Inherent stereospecificity in the reaction of aflatoxin B1 8,9-epoxide with deoxyguanosine and efficiency of DNA catalysis. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 913–917.
- Camenzuli, L., Van Dam, R., de Rijk, T., Andriessen, R., Van Schelt, J., Van der Fels-Klerx, H.J.I., 2018. Tolerance and excretion of the mycotoxins aflatoxin B(1), zearalenone, deoxynivalenol, and ochratoxin A by *Alphitobius diaperinus* and *hermetia illucens* from contaminated substrates. *Toxins* 10.
- Cortes Ortiz, J.A., Ruiz, A.T., Morales-Ramos, J.A., Thomas, M., Rojas, M.G., Tomberlin, J.K., Yi, L., Han, R., Giroud, L., Jullien, R.L., 2016. Chapter 6 - insect mass production technologies. In: Dossey, A.T., Morales-Ramos, J.A., Rojas, M.G. (Eds.), *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Academic Press, San Diego, pp. 153–201.
- Czekaj, P., 2000. Phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 genes. *Acta Biochim. Pol.* 47, 1093–1105.
- Dahms, R., Gurtoo, H.L., 1976. Metabolism of aflatoxin B1 to aflatoxins Q1, M1 and P1 by mouse and rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 15, 11–20.
- Degen, G.H., Neumann, H.-G., 1978. The major metabolite of aflatoxin B1 in the rat is a glutathione conjugate. *Chem. Biol. Interact.* 22, 239–255.
- Degen, G.H., Neumann, H.-G., 1981. Differences in aflatoxin B1 -susceptibility of rat and mouse are correlated with the capability in vitro to inactivate aflatoxin B1 - epoxide. *Carcinogenesis* 2, 299–306.
- Dobermann, D., Swift, J.A., Field, L.M., 2017. Opportunities and hurdles of edible insects for food and feed. *Nutr. Bull.* 42, 293–308.
- Eaton, D.L., Beima, K.M., Bammler, T.K., Riley, R.T., Voss, K.A., 2010. 9.24 - hepatotoxic mycotoxins. In: McQueen, C.A. (Ed.), *Comprehensive Toxicology*, second ed. Elsevier, Oxford, pp. 527–569.
- Ebmeier, J., Braeuning, A., Glatt, H., These, A., Hessel-Pras, S., Lampen, A., 2019. Human CYP3A4-mediated toxicification of the pyrrolizidine alkaloid lasiocarpine. *Food Chem. Toxicol.* 130, 79–88.
- Feyereisen, R., 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 507–533.
- Guengerich, F.P., Cai, H., McMahon, M., Hayes, J.D., Sutter, T.R., Groopman, J.D., Deng, Z., Harris, T.M., 2001. Reduction of aflatoxin B1 dialdehyde by rat and human aldo-keto reductases. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 727–737.
- Guengerich, F.P., Arneson, K.O., Williams, K.M., Deng, Z., Harris, T.M., 2002. Reaction of aflatoxin B1 oxidation products with lysine. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 780–792.
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., 2007. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* 168, 66–73.
- Guyonnet, D., Belloir, C., Suschetet, M., Siess, M.-H., Le Bon, A.-M., 2002. Mechanisms of protection against aflatoxin B1 genotoxicity in rats treated by organosulfur compounds from garlic. *Carcinogenesis* 23, 1335–1341.
- Howard, R.S., 1955. The biology of the grain beetle *Tenebrio molitor* with particular reference to its behavior. *Ecology* 36, 262–269.
- Kamala, A., Shirima, C., Jani, B., Bakari, M., Sillo, H., Rusibamayila, N., De Saeger, S., Kimanya, M., Gong, Y.Y., Simba, A., 2018. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Tanzania during 2016. *World Mycotoxin J.* 11, 311–320.
- Kuilman, M.E.M., Maas, R.F.M., Judah, D.J., Fink-Gremmels, J., 1998. Bovine hepatic metabolism of aflatoxin B1. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2707–2713.
- Lake, B.G., 1987. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. *Biochemical Toxicology: A Practical Approach* 183–215.
- Larsson, P., Pettersson, H., Tjälve, H., 1989. Metabolism of aflatoxin B1 in the bovine olfactory mucosa. *Carcinogenesis* 10, 1113–1118.
- Lüthy, J., Zweifel, U., Schlatter, C., 1980. Metabolism and tissue distribution of [14C] aflatoxin B1 in pigs. *Food Chem. Toxicol.* 18, 253–256.
- Mancini, A., Dreassi, E., Botta, M., Tarchi, F., Francardi, V., 2020. Bioaccumulation risk assessment of aflatoxin B1, ochratoxin and fumonisin B1 in *Tenebrio molitor* larvae. *Redia* 103, 101–108.
- Meijer, N., Stoopen, G., van der Fels-Klerx, H.J., van Loon, J.J.A., Carney, J., Bosch, G., 2019. Aflatoxin B1 conversion by black soldier fly (*hermetia illucens*) larval enzyme extracts. *Toxins* 11.
- Metcalfe, S.A., Colley, P.J., Neal, G.E., 1981. A comparison of the effects of pretreatment with phenobarbitone and 3-methylcholanthrene on the metabolism of aflatoxin B1 by rat liver microsomes and isolated hepatocytes in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 35, 145–157.
- Murcia, H., Diaz, G.J., 2020. Dealing with aflatoxin B1 dihydrodiol acute effects: impact of aflatoxin B1-aldehyde reductase enzyme activity in poultry species tolerant to AFB1 toxic effects. *PLoS One* 15, e0235061.
- Niu, G., Wen, Z., Rupasinghe, S.G., Zeng, R.S., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A., 2008. Aflatoxin B1 detoxification by CYP321A1 in *Helicoverpa zea*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 69, 32–45.
- Niu, G., Siegel, J., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2009. Comparative toxicity of mycotoxins to navel orangeworm (*Amyelois transitella*) and corn earworm (*Helicoverpa zea*). *J. Chem. Ecol.* 35, 951–957.
- Sakuma, T., Ohtake, M., Katsurayama, Y., Jarukamjorn, K., Nemoto, N., 1999. Induction of CYP1A2 by phenobarbital in the livers of aryl hydrocarbon-responsive and -nonresponsive mice. *Drug Metabol. Dispos.* 27, 379–384.
- Scholl, P.F., Musser, S.M., Groopman, J.D., 1997. Synthesis and characterization of aflatoxin B1 mercapturic acids and their identification in rat urine. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1144–1151.
- Scholl, P.F., McCoy, L., Kensler, T.W., Groopman, J.D., 2006. Quantitative analysis and chronic dosimetry of the aflatoxin B1 plasma albumin adduct lys-AFB1 in rats by isotope dilution mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 44–49.
- EFSA, Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J.K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Leblanc, J.-C., Nebbia, C.S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vlemminckx, C., Marko, D., Oswald, I.P., Piersma, A., Routledge, M., Schlatter, J., Baert, K., Gergelova, P., Wallace, H., 2020. Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal* 18, e06040.
- Thieu, N.Q., Pettersson, H., 2009. Zearalenone, deoxynivalenol and aflatoxin B1 and their metabolites in pig urine as biomarkers for mycotoxin exposure. *Mycotoxin Res.* 25, 59–66.
- EFSA, Turck, D., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K.I., Kearney, J., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H.J., Naska, A., Pelaye, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsaouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M., Marchelli, R., Neuhäuser-Berthold, M., Poulsen, M., Prieto Maradona, M., Schlatter, J.R., van Loveren, H., Verwer, E., Knutsen, H.K., 2021. Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* 19, e06343.
- Ueng, Y.-F., Shimada, T., Yamazaki, H., Guengerich, F.P., 1995. Oxidation of aflatoxin B1 by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 218–225.
- van der Fels-Klerx, H.J., Camenzuli, L., Belluco, S., Meijer, N., Ricci, A., 2018. Food safety issues related to uses of insects for feeds and foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 1172–1183.
- van Raamsdonk, L.W.D., van der Fels-Klerx, H.J., de Jong, J., 2017. New feed ingredients: the insect opportunity. *Food Addit. Contam. Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 34, 1384–1397.
- Varelas, V., 2019. Food wastes as a potential new source for edible insect mass production for food and feed: a review. *Fermentation* 5.
- Wenzl, T., Haedrich, J., Schaechtele, A., Piotr, R., Stroka, J., Eppe, G., Scholl, G., 2016. Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Food and Feed. Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Luxembourg.
- Wong, Z.A., Hsieh, D.P.H., 1980. The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B1 in the monkey, rat, and mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 115–125.
- Yang, X.-J., Lu, H.-Y., Li, Z.-Y., Bian, Q., Qiu, L.-L., Li, Z., Liu, Q., Li, J., Wang, X., Wang, S.-L., 2012. Cytochrome P450 2A13 mediates aflatoxin B1-induced cytotoxicity and apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 300, 138–148.
- Zeng, R.S.L., Niu, G., Wen, Z., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2006. Toxicity of aflatoxin B1 to *helicoverpa zea* and bioactivation by cytochrome P450 monooxygenases. *J. Chem. Ecol.* 32, 1459–1471.
- Zeng, R.S., Wen, Z., Niu, G., Berenbaum, M.R., 2013. Aflatoxin B1: toxicity, bioactivation and detoxification in the polyphagous caterpillar *Trichoplusia ni*. *Insect Sci.* 20, 318–328.

3.2.3 Untersuchungen zum Transfer von Sterigmatocystin in Milch (unveröffentlicht)

Durch den möglichen Transfer von Mykotoxinen aus kontaminierten Futtermitteln in Lebensmittel tierischen Ursprungs, ist eine indirekte Exposition des Menschen möglich (Becker-Algeri et al., 2016; Richard, 2007; Tolosa et al., 2021). Hierbei sind Milch und Milchprodukte besonders relevant, da bestimmte Mykotoxine aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften sowie ihres Metabolismus im Tier in die Milch übergehen können (Flores-Flores et al., 2015).

Im Gegensatz zum Verbleib von AFB₁ in Insektenlarven ist für Wiederkäuer ein *carry-over* in Form des monohydroxylierten Metaboliten AFM₁ nach Aufnahme von AFB₁ über kontaminierte Futtermittel, teilweiser Abbau im Pansen, Metabolisierung des resorbierten Anteils in der Leber zu AFM₁ und anschließendem Übergang in die Milch beschrieben (Akbar et al., 2020; Flores-Flores & González-Peñas, 2018a, 2018b; Flores-Flores et al., 2015; Mousavi Khaneghah et al., 2021; Tolosa et al., 2021). Bei der Weiterverarbeitung der Milch kann es aufgrund der Affinität von AFM₁ zu Milchproteinen zu einer zusätzlichen Anreicherung kommen (Alshannaq & Yu, 2017; Barbiroli et al., 2007; Govaris et al., 2001). Zum Transfer anderer toxikologisch relevanter Mykotoxine liegen hingegen nur begrenzte Daten vor. Für OTA wurde gezeigt, dass bei Wiederkäuern überwiegend eine ruminale Detoxifikation erfolgt, sodass ein Übergang in die Milch in der Regel vernachlässigbar ist (Blank, 2002; Fink-Gremmels, 2008b; Hult et al., 1976; Mobashar et al., 2010; Shreeve et al., 1979). Für STC sind bislang keine Daten bezüglich Untersuchungen zum Transferverhalten, zur Bioverfügbarkeit sowie zum möglichen Metabolismus in Wiederkäuern vorhanden.

STC besitzt eine ähnliche chemische Struktur zu AFB₁ und ist ein direkter biosynthetischen Vorläufer, besitzt jedoch vermutlich unterschiedliche toxikokinetische Eigenschaften und Bioaktivierungswege zu AFB₁ (Applebaum et al., 1982; Kiessling, 1986; Pfeiffer et al., 2014; Wong et al., 1977). Pfeiffer et al. (2014) beschrieben für STC überwiegend die Bildung von Catechol-Metaboliten und nur geringe Mengen eines Epoxides, was auf einen vom AFB₁ möglicherweise verschiedenen Stoffwechselweg hindeutet. Daher sind Untersuchungen zur Toxikokinetik von STC unter realistischen Expositionsbedingungen erforderlich. Um das potenzielle Risiko einer indirekten Exposition des Menschen bewerten zu können, sind insbesondere Daten zum möglichen Transfer von STC in Milch notwendig.

Ziel des vorliegenden Transferversuchs war es daher, den Übergang von STC aus kontaminiertem Futter in Milch und Urin von Milchkühen zu untersuchen und erste Hinweise auf einen möglichen Transfer und den Metabolismus von STC zu erhalten.

3.2.3.1 Versuchsaufbau und Probennahme

Auf der Versuchsstation Schädtkbek des Max Rubner-Instituts wurde vom 20.10. bis zum 23.11.2021 eine Transferstudie mit vier Milchkühen durchgeführt. Der Versuchsablauf wird in Tabelle 6 dargestellt. Die vier Milchkühe erhielten über 14 Tage eine orale STC-Bolusgabe ($60 \mu\text{g}$ STC/Tag). Die tägliche Dosis wurde auf zwei Gaben aufgeteilt und den Tieren nach dem morgendlichen und abendlichen Melken (8:00 und 17:30 Uhr) verabreicht. Während dieser 14-tägigen Supplementierung und der anschließenden Ausschleichphase wurden regelmäßig Milchproben und Urinproben gewonnen, um den Transfer des STC in die Rohmilch untersuchen zu können.

Tabelle 6: Versuchsablauf der STC Transferstudie in Milchkühen.

		Supplementierung														Ausschleichphase					
Tag	-6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	19	21	35
Proben																					
Milch	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						
Urin								x						x							

3.2.3.2 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung für die Urin- und Milchproben wurde an die Methode von Gützkow et al. (2022) angelehnt und wie folgt angepasst. Es wurden 5 mL Urin mit $62 \mu\text{L}$ internen Standard, $255 \mu\text{L}$ Salzsäure (HCl) ($c=4.06 \text{ mol/L}$) und $100 \mu\text{L}$ β -Glucuronidase ($c=25000 \text{ U/mL}$) versetzt und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 4.938 mL Acetonitril (ACN) mit 0.1% Ameisensäure (FA) hinzugegeben, geschüttelt und 0.5 g Natriumchlorid und 2 g Magnesiumsulfat hinzugefügt, erneut geschüttelt und weiter entsprechend Gützkow et al. (2022) verfahren.

Für die Probenaufarbeitung für die Milchproben wurden zu 5 mL Milch $62 \mu\text{L}$ interner Standard und 4.938 mL ACN mit 0.1% FA zugegeben und geschüttelt. Anschließend wurden 0.5 g Natriumchlorid und 2 g Magnesiumsulfat hinzugefügt, erneut geschüttelt und weiter entsprechend Gützkow et al. (2022) verfahren.

3.2.3.3 Messtechnik und Parameter

Die Mykotoxinanalytik wurde an einem 1290 Infinity II LC-System (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt, unter Verwendung einer Gemini Reversed-Phase-C18-Analysensäule, $100 \times 3,0 \text{ mm}$, $5,0 \mu\text{m}$ (Phenomenex®, Aschaffenburg, Deutschland), einer Ofentemperatur von 35°C und einem Injektionsvolumen von $4 \mu\text{L}$. Es wurde eine Gradientenelution aus Wasser (mit 0.1% Ameisensäure, 300 mg/L Ammoniumformiat) und Methanol (mit 0.1%

Ameisensäure, 300 mg/L Ammoniumformiat) mit einer Flussrate von 0.5 mL/min verwendet. Das Gradientenprogramm begann bei 5 % organischem Lösungsmittel für 0.8 min, stieg bis Minute 1.5 auf 50 %, bis Minute 2.5 auf 55 %, bis Minute 5.5 auf 70 %, bis Minute 6.5 auf 76 % und bis Minute 15.5 auf 95 %. Ab Minute 17.0 wurde der organische Anteil bis Minute 17.5 auf die Startbedingungen von 5 % zurückgeführt und bis zum Ende des Laufs bei 19.5 min beibehalten.

Für die Detektion wurde ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (QTRAP 6500+, Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt, das sowohl im positiven als auch im negativen ESI-Modus betrieben wurde und im MRM-Modus mit folgenden Einstellungen maß: Curtain Gas 40, Collision Gas medium, Temperatur 350 °C, $\pm$ Ionenspray-Spannung 4500 V, Zerstäuber-Gasfluss 50, Heizgasfluss 45, variable Verweilzeit. Die Datenerfassung und -auswertung erfolgte mit Analyst Software, Version 1.7.2, und MultiQuant Software, Version 3.0.3, AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland.

Die analytischen Parameter der quantitativen Bestimmung der Mykotoxine mittels HPLC-MS/MS sind in Tabelle 16 im Anhang dargestellt.

3.2.3.4 Validierungsparameter

Die Validierung der analytischen Methode für Milch- und Urinproben orientierte sich an der *Guideline for performance criteria and validation procedures of analytical methods* (Joint Research Centre et al., 2011).

Für die Validierung der Analytik von Urin- und Milchproben wurden mehrfach 5 mL AFB₁-, STC- und OTA-freie Milch bzw. Urin mit 25 μ L einer Mykotoxinmischung (enthaltend AFB₁, STC und OTA; Konzentrationen siehe Tabelle 14 für Milch und Tabelle 15 für Urin im Anhang) dotiert und wie in 3.2.3.2 beschrieben weiter extrahiert. Zur Bestätigung der Zuverlässigkeit und Konsistenz der analytischen Methode wurden die Inter- und Intraday-Präzision validiert. Proben wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen dotiert und extrahiert: jeweils fünf Proben an Tag 1 und Tag 3 sowie zehn Proben an Tag 2; alle Proben wurden an Tag 3 analysiert.

Weiterhin wurde die Wiederfindungsrate für sowohl Milch als auch Urin unter ebenfalls durch Dotierung mit 25 μ L der Mykotoxinlösung bestimmt, jeweils mit fünf Replikaten pro Matrix. Die Probenvorbereitung erfolgte wie in 3.2.3.2 beschrieben, wobei der interne Standard erst zur Messlösung zugegeben wurde.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) und der Bestimmungsgrenze (LOQ) erfolgte gemäß Wenzl et al. (2016) unter Verwendung von jeweils zehn AFB₁-, STC- und OTA-freien Milch- und Urinproben. Ein zusätzlicher Satz von zehn Proben wurde mit der niedrigen Aufstockungskonzentration versetzt, um die Genauigkeit zu

validieren (Wenzl et al., 2016). Für die LOD/LOQ-Bestimmung überschreitet die höchste Kalibrierkonzentration nicht das Zehnfache der erwarteten LOD. Der lineare Bereich der Methode wurde aus dem verwendeten Kalibrierkonzentrationsbereich abgeleitet, sofern der Korrelationskoeffizient der linearen Regression (gewichtet mit 1/x) über 0.99 lag.

3.2.3.5 Ergebnisse

3.2.3.5.1 Methodenvalidierung

Die entwickelte Methode zur Mykotoxinanalytik in Käse (Gützkow et al., 2022) wurde für zwei weitere Matrices – Milch und Urin – validiert und angepasst. Aufgrund der möglichen Phase-II Metabolisierung von STC in der Kuh, wurden die Urinproben vor der Extraktion mit β -Glucuronidase und Sulfatase inkubiert um mögliche Konjugate zu spalten und entsprechend Abschnitt 3.2.3.2 beschrieben extrahiert. Die Validierungsparameter umfassen Wiederfindungsraten, Präzision zwischen den Tagen (interday) und innerhalb eines Tages (intraday), sowie die Bestimmungs- (LOQ) und Nachweisgrenzen (LOD). Die Methodenvalidierungsparameter für Milch sind in Tabelle 7 und für Urin in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 7: Methodenvalidierungsparameter für Milch, einschließlich Wiederfindungsrate, relative Standardabweichung innerhalb eines Tages (intraday) und zwischen verschiedenen Tagen (interday), LOD und LOQ.

Analyt	Wiederfindungsrate [%]	RSD ^a intraday [%]	RSD ^a interday [%]	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
AFB ₁	70.71 ± 3.67	4.70	5.60	0.0044	0.015
STC	66.77 ± 3.29	7.00	8.43	0.0042	0.014
OTA	67.65 ± 3.43	5.90	7.14	0.25	0.82

^a RSD: relative Standardabweichung

Tabelle 8: Methodenvalidierungsparameter für Urin, einschließlich Wiederfindungsrate, relative Standardabweichung innerhalb eines Tages (intraday) und zwischen verschiedenen Tagen (interday), LOD und LOQ.

Analyte	Recovery rate [%]	RSD ^a intraday [%]	RSD ^a interday [%]	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
AFB ₁	75.84 ± 6.99	7.60	12.65	0.060	0.20
STC	73.59 ± 5.78	7.20	14.52	0.050	0.17
OTA	72.07 ± 5.92	8.10	9.19	0.78	2.57

^a RSD: relative Standardabweichung

Die Validierungsergebnisse zeigen, dass die angepasste LC-MS/MS Methode zur Untersuchung von AFB₁, STC und OTA in Milch und Urin geeignet ist. Die Wiederfindungsraten von AFB₁, STC und OTA waren in Milch etwas geringer als in Urin, während die LOD und LOQ in Milch niedriger waren (Tabelle 7 und Tabelle 8).

3.2.3.5.2 Transferproben

Im Rahmen des Transferversuchs wurden insgesamt 168 Milchproben (vier Milchkühe, zwei Melkzeiten pro Tag über den gesamten Versuchszeitraum) sowie acht Urinproben (vier Tiere an zwei Versuchstagen) auf STC und auf potenzielle monohydroxylierte STC-Metabolite untersucht. Die Mituntersuchung potenziell monohydroxylierter STC-Metabolite erfolgte vor dem Hintergrund vorangegangener *in vitro*-Mikrosomen-Tests, die Anhaltspunkte dafür lieferten, dass eine AFM₁-analoge Hydroxylierung von STC prinzipiell bei Rindern möglich sein könnte.

In keiner der analysierten Milchproben konnte weder STC oberhalb der Nachweisgrenze (0.01 ng/mL) noch ein potenziell monohydroxylierter STC-Metabolit detektiert werden. Dies galt sowohl für die Supplementierungsphase als auch für die Ausschleichphase.

Die Untersuchung der Urinproben zeigte ein heterogenes Bild. Am ersten Versuchstag (Tag 7 der Supplementierung) konnten bei keinem der vier Tiere STC Gehalte oberhalb der Nachweisgrenze festgestellt werden. Alle Proben lagen unterhalb der LOD. Am zweiten Versuchstag (Tag 13 der Supplementierung) wurden in zwei der vier untersuchten Urinproben geringe STC Konzentrationen nachgewiesen. Bei den Kühen Nr. 3522 und Nr. 3580 wurden STC-Gehalte von 0.18 ± 0.02 ng/mL bzw. 0.20 ± 0.05 ng/mL bestimmt. In den Urinproben der beiden anderen Tiere (Nr. 3618 und Nr. 3621) waren auch an diesem Versuchstag kein STC oberhalb der Nachweisgrenze detektierbar (Tabelle 9). Monohydroxylierte STC-Metabolite waren in den Urinproben ebenfalls nicht detektierbar.

Tabelle 9: Quantifizierte STC Konzentrationen im Urin der Milchkühe.

Nr.	Kuh-Nr.	Versuchstag	STC [ng/mL]
AZU-STC-001	3522	7	< LOD
AZU-STC-002	3580	7	< LOD
AZU-STC-003	3618	7	< LOD
AZU-STC-004	3621	7	< LOD
AZU-STC-005	3522	13	0.18 ± 0.02
AZU-STC-006	3580	13	0.20 ± 0.05
AZU-STC-007	3618	13	< LOD
AZU-STC-008	3621	13	< LOD

Die Ergebnisse des Transferversuchs zeigen, dass in keiner der 168 untersuchten Milchproben STC nachgewiesen werden konnte, während in zwei von acht Urinproben sehr geringe STC-Konzentrationen (0.18 bzw. 0.20 ng/mL) am späteren Probenahmezeitpunkt detektiert wurden.

3.3 Tierische Lebensmittel – Käse

3.3.1 Analysis of ochratoxin A, aflatoxin B₁ and its biosynthetic precursors in cheese – Method development and market sample screening (Publikation IV)

Kim Lara Gützkow, Carine Al Ayoubi, Laura Soler Vasco, Sascha Rohn, Ronald Maul

Food Control, 2022, 143, 109241

Impact Factor: 6.0 (2022)

DOI: 10.1016/j.foodcont.2022.109241

Synopse

Der Befall von Käse während der Produktion oder Lagerung mit *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten kann zur Bildung verschiedener Mykotoxine wie Ochratoxin A, Aflatoxinen sowie deren teilweise mutagenen biosynthetischen Vorstufen, darunter Sterigmatocystin, führen. Daten über das gemeinsame Vorkommen dieser Toxine in Käse sind bislang nur begrenzt vorhanden.

Gegenstand dieser Arbeiten war die Entwicklung und Validierung einer LC-MS/MS Methode zur simultanen Identifizierung und Quantifizierung der toxikologisch hochrelevanten Verbindungen OTA, AFB₁, STC und VerA. Die Methode basiert auf einem modifizierten QuEChERS-Ansatz unter der Verwendung von Dimethylsulfoxid als Keeper-Reagenz sowie einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse. Anschließend wurde ein Marktscreening verschiedener Hart-, Schnitt- und Weichkäsesorte durchgeführt, um das Vorkommen der genannten Mykotoxine in unterschiedlichen Produktkategorien unter Berücksichtigung möglicher Zusammenhänge zwischen Käsesorte, Verarbeitungsprozess und Reifegrad, sowie dem Mykotoxinnachweis, zu erfassen.

Alle praktischen Arbeiten wurden am Max Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch durchgeführt.

Der Eigenanteil betrug 40 % und umfasste die experimentelle Durchführung, Dateninterpretation, Visualisierung und das Verfassen des Originalmanuskripts.

This article was originally published in Food Control, 143, 109241 by Gützkow, K. L., Al Ayoubi, C., Soler Vasco, L., Rohn, S., & Maul, R., Analysis of ochratoxin A, aflatoxin

B1 and its biosynthetic precursors in cheese – Method development and market sample screening, 2022. © 2022 Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109241>



Analysis of ochratoxin A, aflatoxin B1 and its biosynthetic precursors in cheese – Method development and market sample screening

Kim Lara Gützkow^a, Carine Al Ayoubi^b, Laura Soler Vasco^b, Sascha Rohn^c, Ronald Maul^{a,*}

^a Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103, Kiel, Germany

^b Toxalim (Research Center in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, 31027, Toulouse, France

^c Technische Universität Berlin, Institute of Food Technology and Food Chemistry, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355, Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Sterigmatocystin

Hard cheese

Natural contamination

LC-MS

ABSTRACT

The presence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi during cheese production may lead to the formation of ochratoxin A, aflatoxins, as well as their partly mutagenic biosynthetic precursors. However, data about the presence of these toxins in final cheese is scarce. In the present study, a quantification method for the toxicologically highly relevant compounds ochratoxin A (OTA), aflatoxin B1 (AFB1), sterigmatocystin (STC), and versicolorin A (VerA) was developed and applied for a market screening of hard, semi-hard, and soft cheese samples. The developed method was based on a QuEChERS approach with dimethylsulfoxide as keeper reagent. This stable isotope dilution assay for OTA, AFB1 and STC achieves high sensitivity (limits of detection: 0.02 µg/kg for AFB1, 0.01 µg/kg for STC and 0.37 µg/kg for OTA). However, in certain hard cheese types, the toxins showed matrix binding effects, leading to reduced recovery rates. When applying the method to market samples, detectable amount of STC in eight out of ten grated hard cheese samples up to 4.99 µg/kg and OTA in three of these samples up to 26.56 µg/kg were revealed. Only three out of the 53 further samples contained detectable amounts of mycotoxin. Thus, it can be assumed that the state of maturation and the process of grating favours the presence of OTA and STC in cheese, based on the market screening of 62 market samples. More comprehensive data are required to draw more detailed conclusions of the parameters determining the susceptibility of certain cheese types for mycotoxin contamination.

1. Introduction

Growth of toxin-forming moulds on dairy products, mainly during maturation and storage of cheese stored at low to ambient temperatures can be a serious threat to product and consumer safety. Mould growth causes quality and thus, economic losses due to discoloration, poor appearance, and off-flavours (Versilovskis, Van Peteghem, & De Saeger, 2009). For some cheeses, e.g. Camembert or Roquefort, the presence of moulds are acceptable or even required and often added as adjunct-starter cultures, since they are involved in the maturation process. They play a key role in the flavour and texture development of the cheese (Benkerroum, 2016). However, with regard to consumer safety, the capability of some fungal species to produce secondary toxic metabolites known as mycotoxins is of more concern (Scott & Van Egmond, 1989, pp. 193–259). The growth of mycotoxigenic fungi resulting in the presence of mycotoxins in cheese, can be due to direct contamination

(Benkerroum, 2016; Danchuk, Voloshchuk, Midyk, Danchuk, & Ushkalov, 2020; Dobson, 2017; Hymery et al., 2014; Sengun, Yaman, & Gonul, 2008; Versilovskis et al., 2009) or occur in the cheese production plants during ripening and storage (Garnier, Valence, & Mounier, 2017; Heussner & Bingle, 2015; Kure & Skaar, 2019; Kure, Skaar, & Brendehaug, 2004; Montagna et al., 2004). The most frequent genera of toxin forming fungi found on cheese are *Penicillium* followed by *Aspergillus* (Anelli et al., 2019; Garnier, Valence, & Mounier, 2017; Garnier, Valence, et al., 2017; Marín, Palmero, & Jurado, 2015; Ropars, Cruaud, Lacoste, & Dupont, 2012), like *Penicillium verrucosum* (Kure & Skaar, 2019), *Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus versicolor* (Dobson, 2017; Scott, 1989). The most important mycotoxins produced by *Aspergillus* or *Penicillium* species contaminating cheese are sterigmatocystin (STC) (Fig. 1), aflatoxins, penicillic acid, roquefortine, and ochratoxin A (OTA) (Fig. 2) (Hymery et al., 2014; Sengun et al., 2008). STC is a biosynthetic precursor in the biosynthesis of aflatoxin B1 (AFB1) (Tabata, 2022, pp. 575–585; Zingales, Fernandez-Franzon, & Ruiz, 2020) (Fig. 1).

* Corresponding author.

E-mail address: ronald.maul@mri.bund.de (R. Maul).

Abbreviations*A. nidulans* *Aspergillus nidulans**A. versicolor* *Aspergillus versicolor*

ACN acetonitrile

AFB1 aflatoxin B1

AFB2 aflatoxin B2

AFM1 aflatoxin M1

BMDL₁₀ Benchmark dose lower confidence limit 10%

CIT Citrinin

CONTAM Panel Panel on Contaminants in the Food Chain

DMSO dimethylsulfoxide

EFSA European Food Safety Authority

FA formic acid

HAc acetic acid

HPLC high performance liquid chromatography

IAC immunoaffinity column

IARC International Agency for Research on Cancer

IS internal standard

LC-MS liquid-chromatography-mass spectrometry

LOD limit of detection

LOQ limit of quantification

MgSO₄ magnesium sulphate

MOE margin of exposure

MRM multiple reaction mode

OTA ochratoxin A

P. citrinum *Penicillium citrinum**P. expansum* *Penicillium expansum**P. verrucosum* *Penicillium verrucosum*

PDO protected designation of origin

QuEChERS quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe

RSD relative standard deviation

SPE solid-phase extraction

STC sterigmatocystin

VerA versicolorin A

Especially the *Aspergillus* species found on cheese, like *A. nidulans* and *A. versicolor*, may accumulate STC but lack the capability to proceed the biosynthesis to AFB1 and AFG1 (Biancardi & Dall'Asta, 2015; European Food Safety Authority, 2013). However, other biosynthetic precursors of aflatoxin like versicolorin A (VerA) could also be present in cheese. Similar to the highly hepatotoxic and carcinogenic AFB1 also for STC and VerA similar effects have been reported. Depending on the toxicological endpoint, compared to AFB1 the STC effect is equally strong or up to two orders of magnitude weaker (European Food Safety Authority et al., 2020; Tabata, 2022, pp. 575–585; Theumer et al., 2018).

The International Agency for Research on Cancer (IARC) classified aflatoxins as group 1 (International Agency for Research on Cancer, 2002), carcinogenic to humans, and STC as well as OTA as group 2B, possibly carcinogenic to humans (International Agency for Research on Cancer, 1987; 1993).

Despite some reports on toxin forming fungi on cheese and dairy products, only a limited number of surveys on the occurrence of STC in foods were carried out that also confirms the occurrence of STC in cheese (Abd Alla, Metwally, Mehriz, & Abu Sree, 1996; Northolt, Van Egmond, Soentoro, & Deijl, 1980; Versilovskis & De Saeger, 2010; Versilovskis et al., 2009). Also, for OTA several studies report the presence of the toxin particularly in ripened cheese (Altafini et al., 2021; Biancardi,

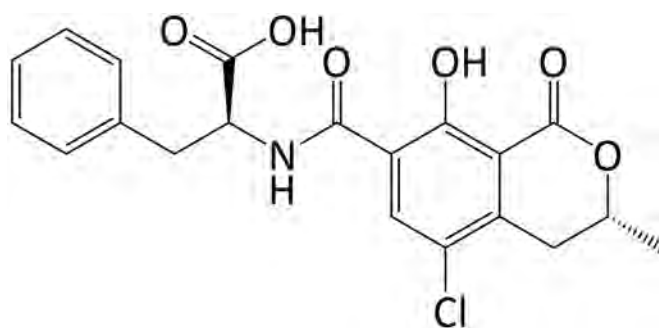


Fig. 2. Chemical structure of OTA (European Food Safety Authority, 2020).

Piro, Galaverna, & Dall'Asta, 2013; Pattono, Grosso, Stocco, Pazzi, & Zeppa, 2013). Likewise for AFM1 the occurrence in cheese was documented frequently. However, AFM1 is contaminating already the milk as a metabolite formed in dairy cattle fed with AFB1 contaminated feed (Becker-Algeri et al., 2016). In contrast, presence of AFB1 has only been confirmed for cheese and milk (Sakin, Tekeli, Yipel, & Kürekci, 2018;

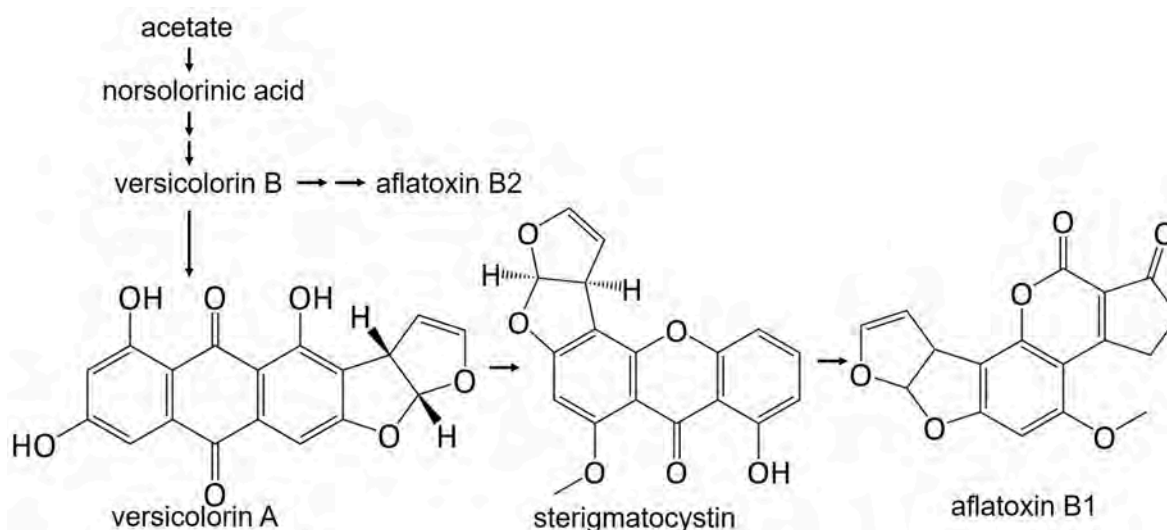


Fig. 1. Biosynthetic pathway of aflatoxin, adapted from Tabata (2022, pp. 575–585), Theumer et al. (2018).

Scaglioni, Becker-Algeri, Drunkler, & Badiale-Furlong, 2014).

Even though the occurrence of mycotoxins like STC and OTA in foods like cheese is an issue, no maximum levels for cheese or dairy products have been set yet, except for aflatoxin M1 (AFM1) in milk (0.05 µg/kg) (European Commission, 2006). The European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM Panel) reported in their scientific opinions of STC and OTA in food that more occurrence data for STC in food and more data on OTA in cheese are needed along with reliable analytical methods for their quantification (European Food Safety Authority, 2013, 2020).

Predominately, liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) methods are used for mycotoxin analysis in food and feed, due to the high sensitivity and specificity (European Food Safety Authority, 2020, 2013; European Food Safety Authority et al., 2020). For sample clean-up and analyte purification, a solid-phase extraction (SPE), an immunoaffinity column (IAC) or a modified QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) method are typically used (Marley et al., 2015; Sasaki, Hossain, Abe, Uchigashima, & Goto, 2014; Versilovskis & De Saeger, 2010). Especially for methods using the QuEChERS approach, stable isotope labelled internal standards are frequently used to compensate for analyte loss during sample extraction and clean-up (Rychlik & Asam, 2008). Particularly, for contaminant analysis in milk and dairy products, analyte loss is critical due to the binding to milk protein (Barbiroli et al., 2007; Granados-Chinchilla, 2016, pp. 265–286).

Due to their toxicity and occurrence, aflatoxins and their biosynthetic precursors (European Food Safety Authority, 2013; European Food Safety Authority et al., 2020; Tabata, 2022, pp. 575–585; Theumer et al., 2018) as well as OTA (European Food Safety Authority, 2020) are considered to be the most relevant and yet least studied mycotoxins in cheese. Consequently, a mutual study of these mycotoxins is advisable, particularly since synergistic effects have been discussed but have not been studied yet (Frangiamone, Cimbalo, Alonso-Garrido, Vila-Donat, & Manyes, 2022).

As aflatoxin analysis in dairy matrices is challenging because of their capability to stick to milk protein (Barbiroli et al., 2007; Granados-Chinchilla, 2016, pp. 265–286), the first aim of the present study was to develop a simultaneous, sensitive and robust quantification method based on a modified QuEChERS method by Gützkow et al. (2021). Secondly, a screening of market samples of various types of cheese was conducted for providing insight on the mycotoxin occurrence and distribution. Furthermore, the created data could possibly be useful for an extended risk assessment of STC and OTA and to identify approaches to reduce mycotoxin contamination in cheese.

2. Materials & methods

2.1. Material and chemicals

Analytical standards for AFB1 and STC were purchased from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). AFM1 was purchased from R-Biopharm AG (Darmstadt, Germany). Analytic standard for OTA and ¹³C-labelled standards for AFB1, STC, OTA and AFM1 were from Biopure™ (Romer Labs Deutschland GmbH, Butzbach, Deutschland). VerA standard was self-produced and purified as described elsewhere (Gauthier et al., 2020). The purity and concentration of the produced standard was determined by HPLC-DAD (Ultimate 3000, Fischer Scientific, Courtaboeuf, France) at 290 nm according to Theumer et al. (2018) and by reading the absorbance at 290 nm ($\epsilon_{25^\circ\text{C}}^{\text{EtOH}} = 25,825$) and 450 nm ($\epsilon_{25^\circ\text{C}}^{\text{EtOH}} = 7585$), respectively.

Methanol (LC-MS grade) and acetonitrile (ACN) (LC-MS grade) were purchased from Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). *n*-Heptane, dimethylsulfoxide (DMSO), ACN (HPLC grade), and anhydrous magnesium sulphate (MgSO₄) were purchased from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany), while ammonium formate (NH₄COOH) and acetic acid (HAc) were from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Formic acid (FA) was from VWR International GmbH (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained through the use of a water purification device (PURELAB flex 3, ELGA LabWater, Veolia Water Technologies Deutschland GmbH, Celle Germany).

2.2. Preparation stock and working solutions

The stock solutions were acquired as certified reference solutions for OTA and AFM1 as well as all isotopically labelled standards (AFB1, STC, OTA, AFM1) or as solid substances (AFB1, STC) which were dissolved completely in ACN. VerA was also dissolved completely in ACN. For quantification of the mycotoxins, a standard mix (AFB1, STC, OTA, VerA) with ACN with 1% HAc was prepared. The standard mix diluted by ACN with 1% HAc served as calibration mix as well as spiking solution for validation. The isotopically labelled standard (IS) mix (AFB1, STC, OTA) was prepared in ACN with 1% HAc. Calibration solutions were prepared by mixing 300 µL H₂O, 188 µL ACN with 1% HAc, 50 µL of the calibration stock solutions and 62 µL of the internal standard (IS) solution. The concentrations of the IS and calibration solutions are shown in Table 1. A separate calibration as well IS solution were used for AFM1, since AFM1 was only monitored qualitatively.

2.3. Sample collection and storage

62 market samples of different cheese types (10 blue cheese, 6 grated semi-hard cheese, 12 hard cheese, 10 grated grana-type cheese (Parmigiano Reggiano and Grana Padano), 8 spreadable cheese, 13 semi-hard cheese, and 3 soft cheese with red smear) were purchased in local stores in Kiel, Germany and Hamburg, Germany between March 2021 and September 2021. All products were either purchased shrink wrapped or bought at a fresh food counter and analysed before the shelf life was exceeded. The unopened packages were stored at 4 °C. After milling (when necessary), the ground samples as well as the remaining samples were stored at –20 °C.

2.4. Sample preparation

The final sample preparation protocol was optimised as follows. Samples of planed or whole piece of cheese were milled with liquid nitrogen in a mortar grinder (R 100, Retsch GmbH, Haan, Germany). 2.5 g of homogenised cheese were weighed in triplets into 50-mL centrifugation tube. After adding 62 µL of IS mix samples were extracted with 4.938 mL ACN with 0.1% FA and 5 mL saturated MgSO₄ solution. After shaking for 30 min (IKA-VIBRAX VXR, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Germany), samples were centrifuged at 10,000×g for 7 min at room temperature (Avanti JXN-30, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany). 4 mL of supernatant were transferred in a 15-mL centrifugation tube and 4 mL of *n*-heptane added. After shaking for 5 min (IKA-VIBRAX_VXR, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Germany), the *n*-heptane phase was discarded. ACN phase was transferred stepwise by repeated filling and evaporation into a 2 mL reagent tubes containing 100 µL DMSO as keeper solvent and the ACN was evaporated until only the DMSO proportion remained (Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). 200 µL ACN with 0.1% FA were added to the

Table 1
Internal standard and analyte concentration in calibration mixes.

Analyte	IS ^a concentration in final calibration mix [ng/mL]	Lowest calibration concentration [ng/mL]	Highest calibration concentration [ng/mL]
AFB1	0.493	0.05	10.00
STC	0.486	0.05	10.00
OTA	3.11	0.35	10.03
VerA	n.a.	0.35	9.98
AFM1	0.3	0.02	2.50

^a IS: internal standard.

residual liquid and vortexed. After additional sonicating for 10 min (Transsonic 460, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany), 300 μ L of H₂O were added and the samples were sonicated again for 10 min and vortexed afterwards. The extracts were filtered using a regenerated cellulose 0.45 μ m syringe filter unit (ProSense B.V., Munich, Germany) and either measured directly or stored at 4 °C until LC-MS analysis.

2.5. Instrumentation and parameters

Analysis of cheese samples was performed on a 1290 Infinity II LC system (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn, Germany). Analytes were separated on a Gemini reversed phase C18 analytical column, 100 $\times$ 3.0 mm, 5.0 μ m, (Phenomenex®, Aschaffenburg, Germany) at an oven temperature of 35 °C, while the injection volume was 4 μ L. LC separation was performed using a gradient elution of water (with 0.1% FA, 300 mg/L ammonium formate) and methanol (with 0.1% FA, 300 mg/L ammonium formate) and a flow rate of 0.5 mL/min. The gradient program started at 5% organic solvent for 0.8 min, raising to 50% by minute 1.5, to 55% by minute 2.5, to 70% by minute 5.5, to 76 by minute 6.5 and to 95% by minute 15.5. Starting from minute 17.0, the organic percentage reverted to the starting conditions of 5% by minute 17.5 and was kept until the end of the run at 19.5 min. MS detection was conducted using a triple quadrupole MS (QTRAP 6500+, Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Germany) operating in both positive and negative electro spray ionisation (ESI) mode and measuring in multiple reaction mode (MRM) with the following settings: curtain gas 40, collision gas medium, temperature 350 °C, the $\pm$ ion spray voltage 4,500 V, nebulizer gas flow of 50, heater gas flow of 45 and dwell time varied. Beside the mycotoxins quantified with this method (Table 2), the mass transitions of some mycotoxins, biosynthetic precursors and metabolites included in the method were measured qualitatively only: in ESI positive mode aflatoxin M1 (compound optimisation), aflatoxin G1 (adapted from Gützkow et al., 2021), O-methylsterigmatocystin, dihydrosterigmatocystin, dihydro-O-methylsterigmatocystin (adapted from Xie et al., 2018), aflatoxin B2, aflatoxin G2 (adapted from Kunz et al., 2020), aspertoxin (adapted from Adekoya et al., 2019), 9-hydroxy-STC, 12c-hydroxy-STC, 9.11-dihydroxy-STC and 9.12c-dihydroxy-STC (adapted from Pfeiffer, Fleck, & Metzler, 2014); in ESI negative mode versicolorin B, versiconol, norsolorinic acid, averantin, hydroxyaverantin, averufin, oxoaverantin, hydroxyversicolorone, versiconal hemiacetal acetate, versiconol acetate (adapted from Xie et al., 2018), cyclopiazonic acid (compound optimisation), and citrinin (CIT) (adapted from Braun, Ezekiel, Marko, & Warth, 2020) (Table S1). Each sample was measured twice.

Table 2

Analytical parameters of quantitative determination of the analytes and their isotopically labelled internal standards with the HPLC-MS/MS; ESI (+) and (−) mode; multiple reaction monitoring mode; the second product ion was used as a qualifier for the confirmation of identity for each analyte; for all analytes compound optimisation with the LC-MS was performed.

Analyte	Precursor ion [<i>m/z</i>]	Product ions [<i>m/z</i>]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
AFB1	313.0	285.0	111	33	16
		241.0	111	49	26
¹³ C-Aflatoxin B1	330.0	301.0	111	33	16
		310.0	96	33	18
STC	325.0	281.0	96	49	32
		297.0	96	49	32
¹³ C-Sterigmatocystin	343.0	239.1	31	29	14
		237.9	31	19	24
OTA	404.0	250.1	31	29	14
		309.1	−130	−35	−15
¹³ C-Ochratoxin A	424.1	252.1	−130	−45	−15
		273.0	116	33	16
VerA	337.1	229.0	116	53	26
		288.0	116	33	16
¹³ C-Aflatoxin M1	345.9				

^a DP: declustering potential.

^b CE: collisions energy.

^c CXP: collision cell exit potential.

2.6. Validation

The determination of validation procedure including e.g. performance criteria was oriented with regard to the ‘Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods’ (Joint Research Centre, Institute for Health Consumer Protection, Bratinova, Simoneau, & Raffael, 2011).

For the validation, 2.5 g of blank blue or hard cheese material (i.e. virtually AFB1, STC, OTA, and VerA free) were weighed into centrifugation tubes and spiked with 50 μ L of a multi-mycotoxin mix containing AFB1, STC, OTA, and VerA. Two different mixes were used to obtain either a concentration in the range of the expected limit of detection (low spiking concentration) or a concentration of around 40% of the existing maximum levels and guideline values for all foods in European legislation (spiking concentration, Table 4). Since some studies suggest a similar toxicity of STC and AFB1 (Theumer et al., 2018), the same concentrations were chosen for spiking. Concentrations are given in Table 4. After spiking, samples were left to evaporate over night before further sample preparation the following day. On three different days, samples were spiked on a homogenised cheese sample that was tested to contain no detectable mycotoxin levels. On days 1 and 2, samples were spiked in triplicate, whereas on day 3, ten samples were spiked accordingly. All samples were analysed the following day. For the investigation of overall recovery rate considering analyte loss during the entire sample preparation, three additional samples were spiked as described for precision analysis with also AFM1 being included for comparison. However, extraction was done omitting the IS during extraction step. After concentrating of the ACN phase, during reconstitution with 300 μ L ACN with 0.1% FA the 62 μ L IS mix were added. After vortexing and sonicating 238 μ L of H₂O were added, and again the samples were sonicated and vortexed. The extracts were filtered via a 0.45 μ m syringe filter unit and measured directly.

Determination of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) was conducted via ten blank samples according to Wenzl et al. (2016). Subsequently according to Wenzl et al. (2016), the results were verified for accuracy using 10 blank samples spiked near the LOD (‘low spiking concentration’ in Table 4) as determined before. For the determination of LOD and LOQ via blank samples, the highest calibration concentration did not exceed 10 times the expected LOD (Wenzl et al., 2016). In case of a sufficient correlation coefficient of the linear plot with a weighting of 1/*x* (*r* > 0.99), the linear range was derived from the used calibration concentration range.

2.7. Data analysis

Data acquisition and evaluation were performed with Analyst Software, V. 1.7.2, and MultiQuant Software, V. 3.0.3, AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Germany.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

The first aim of the study was to establish, optimise and partly validate a multi-analyte HPLC-MS/MS method for AFB1, STC, OTA, and VerA as well as various biosynthesis precursors of AFB1 in cheese. Due to the lack of commercially available standard substances for the biosynthesis precursors of AFB1, the validation only was performed for AFB1, STC, OTA, and VerA.

Initially, the sample extract evaporation step was performed without addition of DMSO as keeper agent, resulting in very low recoveries for the analytes (29% for AFB1, 2.0% for STC, 8.5% for OTA, 1.9% for VerA). The overall recovery rates of all analytes raised significantly as soon as DMSO was included as keeper reagent (68% for AFB1, 53% for STC, 50% for OTA, 17% for VerA), presumably due to the fact of remaining residual volume during the concentration of the sample extracts preventing the formation of insoluble analyte matrix complexes. Although the IS compensates for the loss of substance when drying the sample extract, the use of DMSO as a keeper in the concentration step is mandatory to achieve the highest sensitivity. Additionally, true recovery rates were calculated in two ways for a more differentiated investigation of analyte loss during extraction and the subsequent clean-up steps. In a first approach blank samples were spiked with the four toxins dissolved in ACN and the toxins were allowed to settle until the organic solvent has evaporated in a few hours. In the second approach, the extraction solution was added to the blank samples containing both, the native toxins for spiking and IS. Results show that between spiking and sample extraction a binding of toxins to the matrix occurs as the calculated recovery rates decreased significantly, when the native toxins were left to dry on the cheese matrix compared to the setup where native toxins and IS were added simultaneously (Table 3). With regard to the real situation in cheese samples, where the toxins are present in the sample for a longer period of time before a sample is analysed, it was expected that using an IS fully compensates for analyte losses during sample preparation but a certain proportion of toxin may remain undetected being bound to the cheese matrix. However, it appears as if such a loss is mainly occurring for hard and ripened cheese as using soft blue cheese does not result in intense substance loss during extraction. Thus, recovery of the four toxins is probably varying due to different water, protein and fat proportions in the sample (Table 3). The binding of mycotoxins, such as AFM1, to dairy proteins have been shown in previous studies (Barbiroli et al., 2007; Granados-Chinchilla, 2016, pp. 265–286). Therefore, the recovery in cheese is an issue. Especially for

VerA (recovery 17%), where the sample extraction losses cannot be compensated, due to the lack of commercially available IS. As the recovery rates vary between different cheese types, for the market screening of cheese samples no correction for the recovery rate was carried out, even though especially for hard cheese a certain underestimation of the true toxin content might result.

The validation parameters investigated are shown in Table 4. For AFB1, STC, OTA, and VerA, good intraday variation, but higher interday variation were achieved. Food matrix components can interfere with the ionisation of the analytes, causing changes in responses in the LC-MS (Versilovskis et al., 2009). However, relatively low LOD and LOQ were achieved (Table 4). Versilovskis et al. (2009) showed similar LOD and LOQ for STC in cheese (0.03 µg/kg and 0.1 µg/kg), as compared to the results obtained in the present study (Table 4), even though, those authors used solid phase extractions (SPE) for sample clean-up instead of a QuEChERS-based method. Furthermore, Versilovskis, et al. (2009) achieved a recovery rate of 97% for STC when using a spiking concentration of 5 µg/kg, being similar to the recovery rate of STC obtained in the present study, when spiking simultaneously with the extraction solvent (Table 3). In comparison, Marley, et al. (2015) reported less sensitive LOD and LOQ for STC in cheese (0.2 µg/kg and 0.6 µg/kg), despite using IAC for sample clean-up. For OTA, similar LOD and LOQ (0.5 µg/kg and 1 µg/kg) as well as a similar recovery rate (84.5%) has been reported like in the present study (Table 4). However, those researchers also used an IAC cleanup (Altafini et al., 2021). Pattono et al. (2013) achieved lower LOD (0.17 µg/kg) and LOQ (0.54 µg/kg) and a higher recovery rate (94%) for OTA in cheese by adjusting the extraction solvent to a lower pH value using sulphuric acid. Also, Kokkonen et al. (2015) reported better LOD and LOQ values (0.3 µg/kg and 0.6 µg/kg) for OTA in cheese. However, the data were derived from spikes blank extract neglecting the sample extraction and clean-up process and were solely based on a signal-to-noise ratio of more than 3:1 for LOD (Kokkonen, Jestoi, & Rizzo, 2005). Additionally, less sensitive LOD, LOQ, and recovery rate for AFB1 (LOD 0.8 µg/kg, LOQ 1.6 µg/kg and recovery 132%) were described for cheese by Kokkonen et al. (2005). Škrbić, Antić, and Živančev (2015) presented recovery rates of 71–80% for AFM1 in hard cheese. However, the definition of hard cheese is wide and especially ripened Parmigiano Reggiano and Grana Padano are characterised by a very hard and dry consistency (Dipartimento delle Politiche Competitive della Qualità Agroalimentare Ippiche e Della Pesca, 2019; Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, 2017). Thus, our results for recovery rates of 91% (AFB1) and 107% (AFM1) regarding the extraction efficiency from blue cheese as well as 46% (AFB1) and 48% (AFM1) recovery rate from grana-type hard cheese ripened for more than one year, are in line with the results by Škrbić et al. (2015) being situated in the middle of blue cheese and ripened hard cheese. So far, no studies about VerA in cheese were published.

AFB1, STC, OTA, and VerA exhibited good linearity in the covered range, which reached for AFB1 from approximately 1 to 390% of regulated maximum levels valid in Germany (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 19.03.2010).

3.2. Occurrence of different mycotoxins in commercial cheese samples

A first overview on the types of mycotoxins present in the 62 commercial cheese samples analysed is given in Table 5. For four out of the seven sample groups, no mycotoxins were detected. In eleven samples of the sample groups “grana-type cheese, grated”, “semi-hard cheese”, and “spreadable cheese”, mycotoxins were detected above their LOD (Table 6), with STC being detectable in all cases accompanied by OTA in three of these samples.

STC was determined below its LOQ (0.04 µg/kg) in two spreadable cheeses (No. 9, refined with pepper; No. 10, refined with mushrooms). One semi-hard cheese (No. 11, refined with pepper) contained STC slightly above the LOQ with 0.08 ± 0.02 µg/kg. The other eight

Table 3
Recovery determined using different sample preparations.

Analyte	Recovery with DMSO and IS ^a [%]		Recovery with DMSO and IS (simultaneous spiking) ^b [%]	
	Blue cheese	Hard cheese	Blue cheese	Hard cheese
AFB1	91.1 ± 7.4	46.1 ± 9.3	110.8 ± 9.3	113.4 ± 4.3
STC	69.1 ± 2.2	37.5 ± 9.8	105.7 ± 1.9	99.6 ± 3.0
OTA	87.8 ± 7.6	32.2 ± 10.4	118.4 ± 3.9	128.1 ± 15.5
AFM1	107.7 ± 11.1	47.9 ± 10.3	112.4 ± 8.1	130.4 ± 16.2

^a Spiking of blank samples and allowing toxins to settle, IS was added to sample during sample extraction and 100 µL DMSO was added to the tube before concentration of the ACN phase.

^b Spiking solution and IS were added to sample simultaneously to the extraction solvent (ACN 0.1%FA) and 100 µL DMSO was added to the tube before concentration of the ACN phase.

Table 4

Method validation parameters including relative standard deviation intraday and interday, LOD and LOQ in spiked blank blue cheese, both spiking concentrations, linear range of calibration and correlations coefficient.

Analyte	RSD ^a intraday [%]	RSD ^a interday [%]	LOD ^b [µg/kg]	LOQ ^c [µg/kg]	low spiking concentration [µg/kg]	Spiking concentration [µg/ kg]	Lower linear range [µg/kg]	Upper linear range [µg/kg]	Correlation coefficient (r)
AFB1	2.3	22.4	0.02	0.07	0.06	0.80	0.008	7.80	0.9990
STC	7.2	15.0	0.01	0.04	0.05	0.80	0.020	7.80	0.9995
OTA	1.7	28.5	0.37	1.21	0.17	3.76	0.137	7.82	0.9977
VerA	9.2	21.1	0.04	0.14	0.11	3.76	0.137	7.79	0.9968

^a RSD: relative standard deviation.

^b LOD: limit of detection.

^c LOQ: limit of quantification.

Table 5

Qualitative overview of the mycotoxin detects in 62 market samples.

Sample group	Number of samples	No. of Samples > LOD ^a (percent of positive samples)			
		AFB1 ^b	STC ^c	OTA ^d	VerA ^e
blue cheese	10				
grated semi-hard cheese	6				
hard cheese	12				
grana-type cheese, grated	10		8 (80)	3 (30)	1 (10)
spreadable cheese	8		2 (25)		
semi-hard cheese	13		1 (8)		
Soft cheese with red smear	3				

^a LOD: limit of detection.

^b AFB1: aflatoxin B1.

^c STC: sterigmatocystin.

^d OTA: ochratoxin A.

^e VerA: versicolorin A.

Table 6

Concentrations of quantified mycotoxins found in analysed market samples.

Sample group	Sample	No. ^a	STC ^b [µg/kg]	OTA ^c [µg/kg]	VerA ^d [µg/kg]
grana-type cheese, grated	Grana Padano PDO ^e	1	0.84 ± 0.12	< LOD ^g	< LOD ^g
	Parmigiano Reggiano PDO ^e	2	4.99 ± 0.72	26.56 ± 1.64	< LOQ ^f
	Parmigiano Reggiano PDO ^e	3	0.30 ± 0.04	< LOQ ^f	< LOD ^g
	Grana Padano PDO ^e	4	0.09 ± 0.01	< LOD ^g	< LOD ^g
	Parmigiano Reggiano PDO ^e	5	0.18 ± 0.02	< LOD ^g	< LOD ^g
	Grana Padano PDO ^e	6	0.92 ± 0.07	4.84 ± 0.48	< LOD ^g
	Grana Padano PDO ^e	7	0.21 ± 0.02	< LOD ^g	< LOD ^g
	Grana Padano PDO ^e	8	0.77 ± 0.04	< LOD ^g	< LOD ^g
spreadable cheese	spreadable cheese refined with mushrooms	9	< LOQ ^f	< LOD ^g	< LOD ^g
	spreadable cheese refined with pepper	10	< LOQ ^f	< LOD ^g	< LOD ^g
semi-hard cheese	semi-hard cheese refined with pepper	11	0.08 ± 0.02	< LOD ^g	< LOD ^g

^a No.: number.

^b STC: sterigmatocystin.

^c OTA: ochratoxin A.

^d VerA: versicolorin A.

^e PDO: protected designation of origin.

^f LOQ: limit of quantification.

^g LOD: limit of detection.

contaminated samples were grated grana-type cheese, either Parmigiano Reggiano of protected designation of origin (PDO) or Grana Padano PDO. In six of these cheeses (No. 1, No. 3, No. 4, No. 5, No. 7, No. 8), only STC below 1 µg/kg was determined. Grana-type cheeses No. 3 and 6 also contained OTA in addition to STC. Here, the concentration of OTA in No. 3 was below LOQ. No. 6, however, showed a high OTA concentration of 4.84 ± 0.48 µg/kg (Table 6). In sample No. 2, STC and OTA were found in the highest concentrations of 4.99 ± 0.72 µg/kg for STC and 26.56 ± 1.64 µg/kg for OTA, respectively. Also, this was the only sample in which VerA was found, however, below its LOQ (0.14 µg/kg) (Table 6). Several studies described OTA contamination in ripened cheese (Biancardi et al., 2013; Dall'Asta et al., 2008; Pattono et al.,

2013; Sakin et al., 2018). Recently, Altafini, et al. (2021) investigated hard cheese, including parmesan, for OTA contamination. Even though most samples were below the LOQ (1 µg/L), some showed a concentration level of OTA ranging up to 7.5 µg/kg and even one sample provided a value as high as 22.4 µg/kg (Altafini et al., 2021). These are similar concentrations to the levels found in the present grana-type cheese samples with one at 4.84 µg/kg (No. 6) and one at 26.56 µg/kg (No. 2) (Table 6).

No data concerning VerA in cheese has been published yet. Further investigations on occurrence of VerA in cheese are necessary. According to the validation parameters, VerA occurrence can be monitored in wide concentration, however, with less sensitivity than STC or AFB1.

Although only one sample showed VerA contamination between LOD and LOQ, due to its toxicity VerA should be considered in future mycotoxin monitoring programs in cheese.

Furthermore, in the two STC-free grana-type cheese samples only the biosynthetic precursor versicolorin B was found.

Additionally, cyclopiazonic acid was found in one blue cheese and in two different semi-hard cheese defined with pepper and CIT was found in one semi-hard cheese defined with pepper. Several *Penicillium* species including *P. verrucosum* have been described to produce CIT in cheese (Bailly, Querin, Le Bars-Bailly, Bernard, & Guerre, 2002; Dobson, 2017). None of the further mycotoxins (listed in Table S1) investigated could be detected in any of the 62 samples. AFM1 was monitored only qualitatively as the focus was on fungal spoilage during cheese production and ripening. According to pre-experiments, LOD and recovery of AFM1 in cheese were similar to the LOD and recovery for AFB1 (Carvajal-Moreno, Vargas-Ortiz, Hernández-Camarillo, Ruiz-Velasco, & Rojo-Callejas, 2019). Also, the slope of the linear regression can be equated with the sensitivity of the analysis. Comparing the slope of the linear regression of AFM1 (2.33) to the slope of the linear regression of AFB1 (2.44) resulted in a similar sensitivity for both toxins in the present LC-MS/MS analysis. Therefore, similar LOD and LOQ can be assumed. Škrbić et al. (2015) showed LOQ for AFM1 of 0.02 µg/kg in hard cheese and 0.125 µg/kg in white cheese, which are similar to the LOQ for AFB1 achieved in the present study (Table 4). However, quantifiable concentrations of AFM1 could not be detected safely in any of the samples. Only the highly contaminated hard cheeses showed possible trace amounts of AFM1. AFM1, mainly known to be a metabolite of AFB1 in dairy animals, is also produced by some fungi (Yabe et al., 2012). As STC and OTA were detected together in some cases, the samples might have been contaminated with two different fungi, where one fungus may have produced STC which also could be capable of forming trace amounts of AFB1 and AFM1.

No mycotoxins could be found in the analysed blue cheese samples (Table 5). Kokkonen et al. (2005) investigated 21 blue cheeses, including blue-white mould cheese, and also did not detect AFB1 or OTA.

Dall'Asta et al. detected OTA in about one third of blue cheese samples. Additionally, they showed that the contamination was linked to the moulded spots in the cheese, indicating ochratoxigenic moulds, which could be confirmed by an increase in OTA concentration during storage (Dall'Asta et al., 2008). However, Dall'Asta et al. (2008) did not clarify whether the OTA was produced by the *Penicillium* strains used as starter culture or by contaminating moulds. In contrast to the study by Dall'Asta et al. (2008) in none of the blue cheese samples analysed by Altafini et al. (2021) OTA was detected, which is consistent with the results of the present study. Derived from the initial screening including only about ten separate samples of each sample group no full risk assessment associated with the consumption of e.g. grated hard cheese is feasible. However, a comparison of the data obtained in the present study with the margin of exposure (MOE) concept as suggested by EFSA and the generally assumed overall human exposure to OTA allows to contextualise these values.

Considering the median upper bound value for the total mean dietary OTA exposure of 5.09 ng/kg body weight per day as derived by EFSA for an adult weighing 70 kg (European Food Safety Authority, 2020) this would be reached by the consumption of 73.6 g of cheese No. 6 or 13.4 g of cheese No. 2 alone.

One regular portion of grated hard cheese No. 6 and No. 2 that can be assumed to weigh 25 g (according to manufacturer's declaration values between 10 and 30 g/portion can be found) (Open Food Facts, 2022), would contain 0.12 µg and 0.66 µg OTA in total and result in an uptake of 1.7 and 9.49 ng/kg body weight respectively. Applying the MOE values for an adult to the Benchmark dose lower confidence limit 10% (BMDL₁₀) of 14.5 ng OTA/kg body weight per day calculated from increased combined incidences of kidney tumours in male rats (European Food Safety Authority, 2020), theoretical MOEs of 8,529 and 1,528

can be derived for one portion of cheese 6 and 2, if consumed daily. If the MOE is calculated for mean OTA concentrations of 3.23 µg/kg for all hard cheese samples using the upper bound approach for samples < LOD, the value would be 12,609. As MOE values below 10,000 may be seen as an indicator of potential health concern, the present data, albeit being just a single spotlight, the contribution of (grated) hard cheese to the overall OTA exposure could be of relevance.

Concerning the localisation of mycotoxin contamination in semi-hard and hard cheese some studies have shown that STC is mostly found on the exterior of the cheese and rind and not in the inner of the cheese loaf (Lafont, Siriwardana, & Lafont, 1979; Northolt et al., 1980). In 1981, van Egmond et al. presented similar data, where STC was found in different hard cheeses (Van Egmond & Northolt, 1981). However, no further comprehensive data have been published so far. STC is mainly found in hard cheese in the range of 10 up to 63 µg/kg as shown in an earlier study (Abd Alla et al., 1996). Further, STC was found up to 330 µg/kg in the outer layer of cheese wheels (Lafont et al., 1979) and in some cheeses even up to 600 µg/kg (Northolt et al., 1980). Occasionally, STC was also detected in soft and semi-hard cheese in a range of 0.52 up to 1.23 µg/kg (Versilovskis et al., 2009). The STC contamination of hard cheese could be possible during cheesemaking or cheese storage, because most of them do not contain any typical STC-producing moulds in the initial milk (Versilovskis et al., 2009). Apart from hard cheese samples, STC was only detectable in refined cheeses, albeit in contents below the LOQ. This finding suggests that the spores or the toxin possibly originated from the ingredients used for refining. *A. versicolor* and thus STC can be found in many different food (European Food Safety Authority, 2013). Further studies on the origin of STC contamination in cheese are therefore necessary.

However, in the present study, OTA was only detected in samples where STC was present, too. The authors of the present study are not aware of any fungi that have been reported to produce both toxins simultaneously, implying that the contamination of these cheese samples should be caused by spoilage with different fungal species. Nevertheless, some STC-producing fungi belong to the *Aspergillus* section *circumdati* and therefore, could possess the ability to produce OTA as well (Gil-Serna, Vázquez, Sardiñas, González-Jaén, & Patiño, 2011; Rank et al., 2011).

The occurrence of OTA in cheese is very likely due to environmental contamination leading to fungal growth on the cheese surface, because the OTA transfer from feed to ruminants milk is negligible due to the hydrolytic activity of rumen bacteria (Kure & Skaar, 2019). During ripening and ageing of the cheese the growth of uncontrolled moulds on the rind may occur causing possibly mycotoxin production (Camardo Leggieri, Pietri, & Battilani, 2020). The maturing time should also be considered of a certain role in the growth of mycotoxigenic moulds, if the contamination occurs in the maturing chambers (Altafini et al., 2021). Similar to STC, the possible migration of OTA from the rind into the interior of the cheese loaf is not very far (Coton et al., 2019; Pattono et al., 2013). Grated hard cheese can contain a certain proportion of cheese rind. According to the specifications for Grana Padano and Parmigiano Reggiano cheese, the grated cheese products obtained from those may contain up to 18% from the rind (Dipartimento delle Politiche Competitive della Qualità Agroalimentare Ippiche e Della Pesca, 2019; Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, 2017), which might explain the dominating presence of mycotoxins in grated cheese types also in the present study. In addition, grating of cheese increases the surface area enormously, which leads to a greater risk of fungal spoilage due to the facilitated infestation and growth. Thus, it is suggested that fungal growth on the surface followed by migration of the mycotoxins into the interior of the cheese loaf is the most likely explanation for the measured mycotoxin contents in hard cheese types especially if there is a permitted proportion of rind in grated hard cheese. However, Altafini, et al. (2021) could not detect OTA in grana-type cheeses packaged as whole pieces including the rind. Therefore, the possibility of fungal infection only in the grated state due

to the large surface area cannot be completely excluded. In line with the present data, [Biancardi, et al. \(2013\)](#) detected OTA up to 54.07 µg/kg in grated cheese samples and [Altafini et al. \(2021\)](#) found OTA up to 22.4 µg/kg in grated hard cheese samples, indicating a great risk of grated hard cheese contamination by mycotoxins. Considering the analysed samples from whole cheese, in the present small scale screening the likeliness of contamination with aflatoxins, STC and other biosynthetic precursors or OTA appears to be low. However, the frequency mycotoxin contamination among the grated hard cheeses was noteworthy and further investigations should be considered.

4. Conclusion

The developed analytical method reaches sufficient sensitivity and reproducibility to detect especially AFB1 and its precursor STC but also OTA in low amounts. However, the recovery of OTA in hard cheese is limited. Therefore, a certain underestimation in such matrix needs to be considered. Still, the method is suitable for mycotoxin monitoring in cheese. Although in most types of cheese the frequency of mycotoxin detection in the present study was low, particularly in grated hard cheese the proportion of positives was above 50% and thus, not negligible.

As for OTA and STC previous studies could not provide any evidence for the transfer of these toxins in milk and also no AFM1 as the typical representative of an aflatoxin transfer from feed to milk could be detected in the present study, fungal infestation during cheese production has to be assumed. Moreover, the finding that only specific types of cheese appear to be prone of mycotoxin contamination provides a first indication that different factors such as the duration of maturation, the geographical origin or the process of grating might be causative for the toxin presence. Two samples with particularly high OTA levels of 4.8 µg/kg and 27 µg/kg were identified. When such contamination levels would frequently occur in commercial cheese samples, certain hard cheese types could contribute significantly to the overall human OTA exposure. By contrast, cheese types with short maturation times seem to be less

susceptible for OTA or *Aspergillus* toxin contamination.

In order to clarify whether cheese represents a significant source of toxin exposure, monitoring efforts should be undertaken focusing on ripened cheese types. In addition, the impact of grating on OTA and STC presence and formation should be studied. Such data is mandatory for the risk assessment but also to identify critical control points during cheese processing to enable technological and/or hygienic measures for toxin prevention in cheese.

Funding

This research was supported in part by the ANR grant “Versitox” (ANR-18-CE21-0009).

CRediT authorship contribution statement

Kim Lara Gützkow: Investigation, Data interpretation, Visualization, Writing – original draft. **Carine Al Ayoubi:** Investigation, Writing – review & editing. **Laura Soler Vasco:** Resources, Writing – review & editing. **Sascha Rohn:** Writing – review & editing. **Ronald Maul:** Conceptualization, Data interpretation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

The authors thank Prof. Dr. Jan Fritsche for proofreading the manuscript and Dr. Stefan Nöbel for consultations considering cheese technology aspects.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109241>.

Appendix A

Table S1

Analytical parameters of quantitative determination of the analytes with the HPLC-MS/MS; ESI (+) and (–) mode; multiple reaction monitoring mode; the second product ion was used as a qualifier for the confirmation of identity for each analyte.

Analyte	Precursor ion [m/z]	Product ions [m/z]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]	Reference
Aflatoxin M1	329.0	273.0	116	33	16	^d
		229.0	116	53	26	
O-Methylsterigmatocystin	339.1	324.1	96	33	18	Xie et al. (2018)
		306.1	96	49	32	
Dihydrosterigmatocystin	327.1	312.0	96	33	18	Xie et al. (2018)
		271.1	96	49	32	
Dihydro-O-methylsterigma to cystin	341.1	326.1	96	33	18	Xie et al. (2018)
		313.1	96	49	32	
Aflatoxin B2	315.0	259.0	25	39	28	Kunz et al. (2020)
		287.1	25	25	26	
Aflatoxin G1	329.0	243.1	25	37	28	Gützchow et al. (2021)
		311.0	25	29	16	
Aflatoxin G2	331.0	313.0	121	33	42	Kunz et al. (2020)
		245.1	121	41	10	
Aspertoxin	355.1	322.1	96	33	18	Adekoya et al. (2019)
		340.1	96	30	20	
9-hydroxy-STC ^e	341.0	326.0	96	33	18	Pfeiffer et al. (2014)
		313.0	96	33	18	
12c-hydroxy-STC ^e	341.0	313.0	96	33	18	Pfeiffer et al. (2014)
		285.0	96	33	18	
9.11-dihydroxy-STC ^e	357.0	342.0	96	33	18	Pfeiffer et al. (2014)

(continued on next page)

Table S1 (continued)

Analyte	Precursor ion [m/z]	Product ions [m/z]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]	Reference
9,12c-dihydroxy-STC ^e	357.0	329.0	96	33	18	Pfeiffer et al. (2014)
		329.0	96	33	18	
		301.0	96	33	18	
Versicolorin B	339.1	311.1	−130	−35	−15	Xie et al. (2018)
		283.1	−130	−45	−15	
		341.1	−130	−35	−15	
Versiconol	359.1	329.1	−130	−45	−15	Xie et al. (2018)
		325.1	−130	−35	−15	
		284.1	−130	−45	−15	
Norsolorinic acid	369.1	353.1	−130	−35	−15	Xie et al. (2018)
		325.0	−130	−45	−15	
		369.1	−130	−35	−15	
Averantin	371.1	342.1	−130	−45	−15	Xie et al. (2018)
		284.1	−130	−35	−15	
		295.1	−130	−45	−15	
Hydroxyaverantin	387.1	367.1	−130	−35	−15	Xie et al. (2018)
		355.1	−130	−45	−15	
		339.1	−130	−35	−15	
Hydroxyversicolorone	383.1	294.1	−130	−45	−15	Xie et al. (2018)
		337.1	−130	−35	−15	
		355.1	−130	−45	−15	
Versiconal hemiacetal acetate	399.1	341.1	−130	−35	−15	Xie et al. (2018)
		383.1	−130	−45	−15	
		139.9	−130	−38	−15	
Versiconol acetate	401.1	179.9	−130	−34	−11	d
		249.1	−50	−24	−7	
		205.0	−50	−33	−7	
Cyclopiazonic acid	335.0					
Citrinin	281.0					Braun et al. (2020)

^a DP: declustering potential.^b CE: collisions energy.^c CXP: collision cell exit potential.^d Compound optimisation with den LC-MS was performed to improve the sensitivity of the analysis.^e STC: sterigmatocystin.

References

- Abd Alla, E. A. M., Metwally, M. M., Mehriz, A. M., & Abu Sree, Y. H. (1996). Sterigmatocystin: Incidence, fate and production by *Aspergillus versicolor* in Ras cheese. *Food*, 40(6), 310–313.
- Adekoya, I., Njobeh, P., Obadina, A., Landschoot, S., Audenaert, K., Okoth, S., et al. (2019). Investigation of the metabolic profile and toxigenic variability of fungal species occurring in fermented foods and beverage from Nigeria and South Africa using UPLC-MS/MS. *Toxins*, 11(2).
- Altafini, A., Roncada, P., Guerrini, A., Minkoumba Sonfack, G., Fedrizzi, G., & Caprai, E. (2021). Occurrence of ochratoxin A in different types of cheese offered for sale in Italy. *Toxins*, 13(8), 540.
- Anelli, P., Haidukowski, M., Epifani, F., Cimmarusti, M. T., Moretti, A., Logrieco, A., et al. (2019). Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. *Food Microbiology*, 78, 62–72.
- Bailly, J. D., Querin, A., Le Bars-Bailly, S., Bernard, G., & Guerre, P. (2002). Citrinin production and stability in cheese. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1317–1321.
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., Cattaneo, T., et al. (2007). Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 532–540.
- Becker-Algeri, T. A., Castagnaro, D., de Bortoli, K., de Souza, C., Drunkler, D. A., & Badiale-Furlong, E. (2016). Mycotoxins in bovine milk and dairy products: A review. *Journal of Food Science*, 81(3), R544–R552.
- Benkerroum, N. (2016). Mycotoxins in dairy products: A review. *International Dairy Journal*, 62, 63–75.
- Biancardi, A., & Dall'Asta, C. (2015). Determination of sterigmatocystin in feed by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 32(12), 2093–2100.
- Biancardi, A., Piro, R., Galaverna, G., & Dall'Asta, C. (2013). A simple and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ochratoxin A in hard cheese. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 64(5), 632–640.
- Joint Research Centre, Institute for Health Consumer Protection, Bratinova, S., Simoneau, C., & Raffael, B. (2011). *Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials*. Publications Office.
- Braun, D., Ezekiel, C. N., Marko, D., & Warth, B. (2020). Exposure to mycotoxin-mixtures via breast milk: An ultra-sensitive LC-MS/MS biomonitoring approach. *Frontiers of Chemistry*, 8.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. (19.03.2010). *Verordnung zur Begrenzung von Kontaminanten in Lebensmitteln (Kontaminanten-Verordnung - KmV)*.
- Camardo Leggieri, M., Pietri, A., & Battilani, P. (2020). Modelling fungal growth, mycotoxin production and release in grana cheese. *Microorganisms*, 8(1), 69.
- Carvajal-Moreno, M., Vargas-Ortiz, M., Hernández-Camarillo, E., Ruiz-Velasco, S., & Rojo-Callejas, F. (2019). Presence of unreported carcinogens, Aflatoxins and their hydroxylated metabolites, in industrialized Oaxaca cheese from Mexico City. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 128–138.
- Coton, M., Auffret, A., Poirier, E., Debaets, S., Coton, E., & Dantigny, P. (2019). Production and migration of ochratoxin A and citrinin in Comté cheese by an isolate of *Penicillium verrucosum* selected among *Penicillium* spp. mycotoxin producers in YES medium. *Food Microbiology*, 82, 551–559.
- Dall'Asta, C., De Dea Lindner, J., Galaverna, G., Dossena, A., Neviani, E., & Marchelli, R. (2008). The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chemistry*, 106(2), 729–734.
- Danchuk, O., Voloshchuk, N., Midyk, S., Danchuk, V., & Ushkalov, V. (2020). Mycotoxins in milk and dairy products. *Food Science and Technology*, 14(3).
- Dipartimento delle Politiche Competitive della Qualità Agroalimentare Ippiche e Della Pesca. (2019). Modifica del disciplinare di produzione della denominazione «Grana Padano» registrata in qualità di denominazione di origine protetta. *Gazz. Uff.*, 249, 11–16.
- Dobson, A. D. W. (2017). Chapter 23 - mycotoxins in cheese. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese* (4th ed., pp. 595–601). San Diego: Academic Press.
- European Commission. (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 364, 5–24.
- European Food Safety Authority. (2013). Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA Journal*, 11(6), 3254.
- European Food Safety Authority. (2020). Outcome of a public consultation on the risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Supporting Publications*, 17(5), 1845E.
- European Food Safety Authority, Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., et al. (2020a). Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal*, 18(3), Article e06040.
- Frangiamone, M., Cimbalo, A., Alonso-Garrido, M., Vila-Donat, P., & Manyes, L. (2022). In vitro and in vivo evaluation of AFB1 and OTA-toxicity through immunofluorescence and flow cytometry techniques: A systematic review. *Food and Chemical Toxicology*, 160, Article 112798.
- Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017). Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms*, 5(3), 42.
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., et al. (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 191–197.
- Gauthier, T., Duarte-Hospital, C., Vignard, J., Boutet-Robinet, E., Sulyok, M., Snini, S. P., et al. (2020). Versicolorin A, a precursor in aflatoxins biosynthesis, is a food contaminant toxic for human intestinal cells. *Environment International*, 137, Article 105568.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M. T., & Patiño, B. (2011). Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus*

- section Circumdati. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*, 22(2), 343–345.
- Granados-Chinchilla, F. (2016). *Insights into the interaction of milk and dairy proteins with aflatoxin m1. Milk proteins—from structure to biological properties and health aspects*. In G. Isabel (Ed.).
- Gützchow, K. L., Ebmeyer, J., Kröncke, N., Kampschulte, N., Böhmert, L., Schöne, C., et al. (2021). Metabolic fate and toxicity reduction of aflatoxin B1 after uptake by edible *Tenebrio molitor* larvae. *Food and Chemical Toxicology*, 155, Article 112375.
- Heussner, A. H., & Bingle, L. E. H. (2015). Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins*, 7(10), 4253–4282.
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G., et al. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 437–456.
- International Agency for Research on Cancer. (1987). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *Overall evaluations of carcinogenicity: An Update of IARC Monographs*, 1 (42).
- International Agency for Research on Cancer. (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 56, 489–521.
- International Agency for Research on Cancer. (2002). *Aflatoxins. IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to human*. 82 pp. 171–300.
- Kokkonen, M., Jestoi, M., & Rizzo, A. (2005). Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants*, 22(5), 449–456.
- Kunz, B. M., Wanko, F., Kemmlin, S., Bahlmann, A., Rohn, S., & Maul, R. (2020). Development of a rapid multi-mycotoxin LC-MS/MS stable isotope dilution analysis for grain legumes and its application on 66 market samples. *Food Control*, 109, Article 106949.
- Kure, C. F., & Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 14–19.
- Kure, C. F., Skaar, I., & Brendehaug, J. (2004). Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 93(1), 41–49.
- Lafont, P., Siriwardana, M. G., & Lafont, J. (1979). Contamination of cheeses by mycotoxins. *Medecine et Nutrition*, 15, 257–262.
- Marín, P., Palmero, D., & Jurado, M. (2015). Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. *International Journal of Dairy Technology*, 68(4), 565–572.
- Marley, E., Brown, P., Mackie, J., Donnelly, C., Wilcox, J., Pietri, A., et al. (2015). Analysis of sterigmatocystin in cereals, animal feed, seeds, beer and cheese by immunoaffinity column clean-up and HPLC and LC-MS/MS quantification. *Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 32(12), 2131–2137.
- Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali. (2017). Proposta di modifica del disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta «Parmigiano Reggiano». *Gazz. Uff.*, 185, 94–100.
- Montagna, M. T., Santacroce, M. P., Spilotros, G., Napoli, C., Minervini, F., Papa, A., et al. (2004). Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in Southern Italy. *Mycopathologia*, 158(2), 245–249.
- Northolt, M. D., Van Egmond, H. P., Soentoro, P., & Deijl, E. (1980). Fungal growth and the presence of sterigmatocystin in hard cheese. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 63(1), 115–119.
- Open Food Facts. (2022). *Grana Padano*, 2022.
- Pattono, D., Grosso, A., Stocco, P. P., Pazzi, M., & Zeppa, G. (2013). Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. *Food Control*, 33(1), 54–57.
- Pfeiffer, E., Fleck, S. C., & Metzler, M. (2014). Catechol formation: A novel pathway in the metabolism of sterigmatocystin and 11-methoxysterigmatocystin. *Chemical Research in Toxicology*, 27(12), 2093–2099.
- Rank, C., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Varga, J., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2011). Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology*, 115(4), 406–420.
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., & Dupont, J. (2012). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 199–210.
- Rychlik, M., & Asam, S. (2008). Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(2), 617–628.
- Sakin, F., Tekeli, İ. O., Yipel, M., & Kürekci, C. (2018). Occurrence and health risk assessment of aflatoxins and ochratoxin A in Sürk, a Turkish dairy food, as studied by HPLC. *Food Control*, 90, 317–323.
- Sasaki, R., Hossain, M. Z., Abe, N., Uchigashima, M., & Goto, T. (2014). Development of an analytical method for the determination of sterigmatocystin in grains using LCMS after immunoaffinity column purification. *Mycotoxin Research*, 30(2), 123–129.
- Scaglioni, P. T., Becker-Algeri, T., Drunkler, D., & Badiale-Furlong, E. (2014). Aflatoxin B1 and M1 in milk. *Analytica Chimica Acta*, 829, 68–74.
- Scott, P. (1989). Mycotoxigenic fungal contaminants of cheese and other dairy products. *Mycotoxins in dairy products*, 193–259.
- Scot, O. M., & Van Egmond, H. P. (1989). *Mycotoxins in dairy products - mycotoxigenic fungal contaminants of cheese and other dairy products*. Elsevier Applied Science.
- Sengun, I., Yaman, D., & Gonul, S. (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese: A review. *World Mycotoxin Journal*, 1(3), 291–298.
- Škrbić, B., Antić, I., & Živančev, J. (2015). Presence of aflatoxin M1 in white and hard cheese samples from Serbia. *Food Control*, 50, 111–117.
- Tabata, S. (2022). Mycotoxins: Aflatoxins and related compounds. In P. L. H. McSweeney, & J. P. McNamara (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)*. Oxford: Academic Press.
- Theumer, M. G., Henneb, Y., Khoury, L., Snini, S. P., Tadrist, S., Canlet, C., et al. (2018). Genotoxicity of aflatoxins and their precursors in human cells. *Toxicology Letters*, 287, 100–107.
- Van Egmond, H. P., & Northolt, M. (1981). Contamination of ripening cheese with *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin. In *Proceedings of the 4th Meeting on Mycotoxins in Animal Disease* (pp. 90–92). Weybridge, UK: ADAS.
- Versilovskis, A., & De Saeger, S. (2010). Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and analytical methods – an overview. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(1), 136–147.
- Versilovskis, A., Van Peteghem, C., & De Saeger, S. (2009). Determination of sterigmatocystin in cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 26(1), 127–133.
- Wenzl, T., Haedrich, J., Schaechtele, A., Piotr, R., Stroka, J., Eppe, G., et al. (2016). Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in food and feed. In *Luxembourg: Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)*.
- Xie, H., Wang, X., Zhang, L., Wang, T., Zhang, W., Jiang, J., et al. (2018). Monitoring metabolite production of aflatoxin biosynthesis by orbitrap fusion mass spectrometry and a D-optimal mixture design method. *Analytical Chemistry*, 90(24), 14331–14338.
- Yabe, K., Chihaya, N., Hatabayashi, H., Kito, M., Hoshino, S., Zeng, H., et al. (2012). Production of M-/GM-group aflatoxins catalyzed by the *OrdA* enzyme in aflatoxin biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology*, 49(9), 744–754.
- Zingales, V., Fernandez-Franzon, M., & Ruiz, M. J. (2020). Sterigmatocystin: Occurrence, toxicity and molecular mechanisms of action - a review. *Food and Chemical Toxicology*, 146, Article 111802.

3.3.2 Laborvergleichsuntersuchung zur unabhängigen Validierung der Analysenmethode für Käse (unveröffentlicht)

Zur unabhängigen Validierung der entwickelten Methode wurde an einer Laborvergleichsuntersuchung zur Bestimmung von OTA und AFM₁ in Hartkäse sowie in Schimmelweichkäse vom Nationalen Referenzlabor für Mykotoxine und Pflanzentoxine in Lebens- und Futtermitteln des Bundesinstituts für Risikobewertung teilgenommen. Hierbei wurden zwei Käseproben als Dispersion („slurry“), einmal Hartkäse und Weichkäse, sowie zwei Dünnschichtkontrollstandards, einmal für OTA und AFM₁, jeweils unbekannter Konzentrationen analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchung mittels der publizierten Methode sowie die vom Nationalen Referenzlabor für Mykotoxine und Pflanzentoxine in Lebens- und Futtermitteln des Bundesinstituts für Risikobewertung bereitgestellte statistische Auswertung der Laborvergleichsuntersuchung sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Messergebnisse sowie vom Nationalen Referenzlabor für Mykotoxine und Pflanzentoxine in Lebens- und Futtermitteln des Bundesinstituts für Risikobewertung bereitgestellte statistische Auswertung und Z-Scores der Laborvergleichsuntersuchung zur Bestimmung von OTA und AFM₁ in Hartkäse sowie in Schimmelweichkäse.

Messgröße	Hartkäse		Weichkäse		Standard
	OTA	AFM ₁	OTA	AFM ₁	OTA
Mittelwert der Ergebnisse	4.57 µg/kg	0.70 µg/kg	4.68 µg/kg	0.67 µg/kg	3.72 ng/mL
Zugewiesener Wert (robuster Mittelwert der Ergebnisse der Teilnehmer)	5.97 µg/kg	1.00 µg/kg	5.16 µg/kg	0.64 µg/kg	5.45 ng/mL
Robuste Standardabweichung	1.20 µg/kg	0.43 µg/kg	1.16 µg/kg	0.23 µg/kg	1.06 ng/mL
Robuste Wiederholbarkeits-Standardabweichung	0.19 µg/kg	0.04 µg/kg	0.14 µg/kg	0.04 µg/kg	0.06 ng/mL
Ziel-Standardabweichung	1.49 µg/kg	0.25 µg/kg	1.29 µg/kg	0.16 µg/kg	1.36 ng/mL
Relative Reproduzierbarkeits-Standardabweichung [%]	20.07	43.31	22.41	36.30	19.44
Relative Ziel-Standardabweichung [%]	25	25	25	25	25
Gesamtzahl der Labore mit Ergebnissen	20	19	20	18	19
Anzahl der für die statistische Auswertung verwendeten Ergebnisse	20	19	20	18	18
Z-Score	-0.94	-1.21	-0.38	0.19	-1.27

Die analysierten Mittelwerte liegen nah an den zugewiesenen Werten (robuster Mittelwert der Ergebnisse aller teilnehmenden Labore), wobei die Z-Scores aller Ergebnisse innerhalb des akzeptierten Bereichs (± 2) liegen. Dies deutet auf eine gute Übereinstimmung der Methode mit den Ergebnissen anderer Labore hin und bestätigt deren Genauigkeit und Präzision. Die höheren relativen Reproduzierbarkeits-Standardabweichungen bei AFM₁ (36.30 % im Weichkäse, 43.31 % in Hartkäse) im Vergleich zu OTA (20.07 % im Hartkäse, 22.41 % im Weichkäse) verdeutlichen, dass

geringe Konzentrationen von Mykotoxinen in komplexen Matrices, wie Milchprodukten, schwerer zu analysieren sind.

3.3.3 *Aspergillus versicolor* as producer of known and novel aflatoxin precursors on hard cheese (Publikation V)

Kim Lara Gützkow, Ronald Maul, Sascha Rohn, Markus Schmidt-Heydt

Food Control, 2025, 176, 111337

Impact Factor: 6.3 (2025)

DOI: 10.1016/j.foodcont.2025.111337

Synopse

Diese Publikation befasst sich mit der Identifikation und Charakterisierung von Pilzarten, die zur Bildung von Sterigmatocystin (STC) und verwandten biosynthetischen Vorstufen auf Grana-Typ Käse beitragen können. Ausgangspunkt der Untersuchung war der in Publikation IV wiederholte Nachweis hoher STC- und OTA-Gehalte in geriebenen Grana-Typ Käseproben. Ziel der Studie war es, die an der Kontamination beteiligten Schimmelpilzarten zu identifizieren und deren Fähigkeit zur Mykotoxinbildung auf authentischem Grana-Typ Käse zu untersuchen.

Hierzu wurden geriebene Grana-Typ Marktproben auf das Vorkommen von Mykotoxinen analysiert. Bei einem positiven Befund wurden Pilzisolat aus den kontaminierten Proben gewonnen und mittels Sequenzierung der ITS-Region sowie des Calmodulin-Gens taxonomisch identifiziert.

Anschließend wurde in einem Inokulationsexperiment die Fähigkeit ausgewählter Isolate zur Mykotoxinbildung auf *Parmigiano Reggiano* unter definierten Bedingungen untersucht, um den potenziellen Einfluss der Matrix auf das Mykotoxinbildungsvermögen einzuschätzen. Im Vergleich mit den zuvor analysierten Marktproben sollten Unterschiede im Mykotoxinprofil in Abhängigkeit von Matrix und Umweltbedingungen erfasst werden.

Die Arbeiten zu dieser Publikation wurde in Kooperation mit Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse des Max Rubner-Instituts durchgeführt. Hier wurden die Stammidentifizierung und Inokulation durchgeführt. Die Mykotoxinanalytik und die statistische Auswertung wurden am Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch des Max Rubner-Instituts durchgeführt.

Der Eigenanteil betrug 45 % und umfasste die experimentelle Durchführung, Datenanalyse, Visualisierung und das Verfassen des Originalmanuskripts.

This article was originally published in Food Control, 176, 111337 by Gützkow, K. L., Maul, R., Rohn, S., & Schmidt-Heydt, M., *Aspergillus versicolor* as producer of known and novel aflatoxin precursors on hard cheese, 2025. © 2025 Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.111337>



Aspergillus versicolor as producer of known and novel aflatoxin precursors on hard cheese

Kim Lara Gützkow^{a,*}, Ronald Maul^a, Sascha Rohn^b, Markus Schmidt-Heydt^c

^a Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Kiel, Germany

^b Technische Universität Berlin, Institute of Food Technology and Food Chemistry, Berlin, Germany

^c Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Department of Safety and Quality of Fruit and Vegetables, Karlsruhe, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Aspergillus versicolor
Hard cheese
Ochratoxin A
Sterigmatocystin
Methoxy-sterigmatocystin
Grana-type cheese

ABSTRACT

Although, mycotoxins like sterigmatocystin (STC) and ochratoxin A (OTA) have been identified as regular contaminants in grated grana-type cheeses, limited research has been conducted to determine the responsible fungi. In 7 out of 9 grated grana-type cheese samples STC was detected by HPLC-MS/MS analysis, with two of these also containing OTA. Notably, methoxy-STC was detected for the first time in food matrix, raising concerns due to the toxic and mutagenic effects similar to those of STC, highlighting important implications for food safety. The mycobiome analysis of fungi isolated from cheese confirmed *Aspergillus versicolor* as the main producer of STC. An inoculation experiment using grated *Parmigiano Reggiano* and the isolated *A. versicolor* strain confirmed the production of STC together with some biosynthetic precursors. Furthermore, these results suggest that environmental factors and substrate composition influence mycotoxin biosynthesis and might have an impact beyond genetic predispositions. However, OTA was not detected in the inoculation experiment, suggesting that the presence of additional mycotoxins in grated grana-type cheese originated from further fungal contamination.

1. Introduction

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by various filamentous fungi (Anli & Alkis, 2010; Fox & Howlett, 2008; Magan & Aldred, 2007). Although filamentous fungi are generally considered as undesirable in food, some are essential for developing characteristic flavours in some types of cheese, such as Camembert and to protect the product from bacterial colonisation and subsequent proteolysis. These fungi may be present because of a natural microbiota or added intentionally (Capozzi et al., 2017; Galli et al., 2016). However, most cheese types such as (semi-)hard cheese do not have a protective microbiota on the surface and represent a potential habitat for harmful fungi during their ripening period. Thus, especially fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* have the potential to spoil cheese and may cause mycotoxin contamination (Lund et al., 1995; Montagna et al., 2004) with compounds such as aflatoxins, ochratoxin A (OTA), sterigmatocystin (STC), citrinin, or patulin (Hymery et al., 2014; Sengun et al., 2008). These mycotoxins occur in cheese due to direct contamination from *in situ* formation by mycotoxigenic fungi growing on the cheese during the production in ripening chambers (Benkerroum, 2016; Dobson, 2017;

Hymery et al., 2014; Sengun et al., 2008). Hereby, airborne spores are a primary contamination source (Garnier et al., 2017; Kure & Skaar, 2019; Kure et al., 2004; Montagna et al., 2004). In this context, fungal species such as *Penicillium verrucosum*, *P. nordicum*, and *Aspergillus versicolor*, which produce OTA or STC, are particularly relevant (Dobson, 2017; Hymery et al., 2014; Kure & Skaar, 2019; Scott, 1989; Sengun et al., 2008). *A. versicolor*, a member of the *Aspergillus* section *Versicolores*, is commonly found in indoor environments, particularly those with moisture issues. It is known to produce STC at temperatures below 25 °C and therefore also below conditions typical for aflatoxin formation (Jaksić Despot et al., 2017; Ježak et al., 2016; Liang et al., 2011; M. Piontek, 2007; Marlena Piontek, Łuszczynska, & Lechów, 2016). Some *Aspergillus* species produce several metabolites of concern during their biosynthesis of STC but are unable to further synthesise AFB₁ (Diaz Nieto et al., 2018; Yu et al., 2004).

In Europe, a notable increase in production and consumption of grated cheese, primarily from long-ripened varieties, can be recorded. For example, 25 % of the total Italian hard cheese production is destined for grated cheese (Pietri et al., 2022). Popular and widespread Italian long-ripened hard cheeses are grana-type cheeses such as *Grana Padano*

* Corresponding author.

E-mail address: KimLara.Guetzkow@mri.bund.de (K.L. Gützkow).

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.111337>

Received 13 January 2025; Received in revised form 21 March 2025; Accepted 4 April 2025

Available online 4 April 2025

0956-7135/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

and *Parmigiano Reggiano* (Simone Decontardi et al., 2018). Grana-type cheese is a traditional Italian hard cheese, produced from unpasteurised cow's milk, aged for a period ranging from at least nine months up to four years (Camardo Leggeri et al., 2020). In commercial grated hard cheese products up to 18 % of cheese rind are permitted to be co-processed (Dipartimento delle Politiche Competitive della Qualità Agroalimentare Ippiche e Della Pesca, 2019; Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, 2017). Additionally, ripening environment like humid caves or cellars are considered as particularly traditional and thus, determinants for high quality products. However, such rooms can hardly be kept clear of undesired microorganism as well; a certain humidity is needed for microbial growth (Anelli et al., 2019).

A previous study described mycotoxins occurrence of more than 60 different hard, semi-hard, and soft cheese market samples using HPLC-MS/MS analysis (Gützchow et al., 2022). All grated grana-type cheese samples contained mycotoxins, with some samples exhibiting even high levels of STC (up to 5 µg/kg) and OTA (up to 27 µg/kg). Furthermore, similar studies have reported a high occurrence of STC and OTA in grana-type cheese, particularly in grated samples (Altafini et al., 2021; Pietri et al., 2022).

Some studies describe mycotoxins such as citrinin, STC, OTA, and aflatoxins in cheese (Båth et al., 2012; S. Decontardi et al., 2017; Dobson, 2017; Ostry et al., 2013; Pattono et al., 2013; Sengun et al., 2008), but mostly without characterization of the mycobiota, whereas other studies report toxigenic fungal species on cheese surfaces without measuring mycotoxin content (De Santi et al., 2010; El-Fadaly et al., 2015; Yuvaşen et al., 2018). Thus, the correlation between specific mycotoxins and the fungal species responsible for their production remains largely unexplored, albeit, understanding the dependency of fungal growth and toxin formation is crucial for management and minimisation of product contamination. Therefore, further investigations of the occurrence of mycotoxins in grated grana-type cheese samples, along with a mycobiome analysis of the contaminated samples to identify the fungal species responsible for the mycotoxin contamination, are necessary.

Hence, the present study aimed at investigating the occurrence of mycotoxins in grated grana-type cheese, identifying the fungal species responsible for mycotoxin contamination through mycobiome analysis, and analysing a possible effect of matrix compositions on mycotoxin formation. The contamination with toxically relevant mycotoxins in grated grana-type cheese market samples was analysed using a previously developed and validated HPLC-MS/MS method (Gützchow et al., 2022). A mycobiome analysis was then performed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region and the calmodulin genes of the isolates, followed by a comparative analysis of the resulting sequences with the *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sequence database, and by microscopic characterization, in order to identify the fungal species responsible for mycotoxin contamination. Additionally, to investigate the matrix effect of the culture medium composition on mycotoxin formation, an inoculation experiment using the isolated fungal species from the grana-type cheese samples, comparing mycotoxin formation on grated *Parmigiano Reggiano*, was carried out in order to verify the toxin formation capability on an authentic substrate.

Consequently, this study provides insights into mycotoxin contamination in grated grana-type cheese by linking the occurrence of specific mycotoxins to their potential fungal sources. Furthermore, combining these results with an analysis of the impact of culture medium compositions on mycotoxin production of these fungi could support the development of strategies to minimise mycotoxin contamination in grana-type cheese products.

2. Materials & methods

2.1. Sample collection

A total of nine samples of grated grana-type cheese and a portion of

an authentic *Parmesan* loaf were purchased from local stores in Kiel, Germany, between May and September 2022 and April 2023, respectively. All products were shrink wrapped and analysed before the declared shelf life was exceeded. The unopened packages were stored at 4 °C.

2.2. Mycotoxin analysis

2.2.1. Sample preparation

For the analysis of AFB₁, STC, OTA (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), methoxy-STC, and the biosynthetic precursors of AFB₁, the sample preparation was conducted as follows. 62 µL of an internal standard (IS) mixture containing ¹³C₁₇-AFB₁, ¹³C₁₈-STC, and ¹³C₂₀-OTA (biopure™, Romer Labs Deutschland GmbH, Butzbach, Germany) was added to 2.5 g of the cheese sample (concentrations shown in Table A. 1). Samples were extracted using 4.938 mL of acetonitrile (ACN), containing 0.1 % formic acid (FA) and 5 mL saturated magnesium sulphate (MgSO₄) solution, shaken for 30 min (Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany), and centrifuged at 10,000 × g for 7 min at room temperature (Avanti JXN-30, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany). For defatting, 4 mL of supernatant and 4 mL of n-heptane were mixed and shaken for 5 min (Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany). Afterwards, the n-heptane phase was discarded. 100 µL dimethyl sulfoxide (DMSO) as a keeper solvent were added and the ACN phase was evaporated (Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). To the residual liquid, 200 µL ACN containing 0.1 % FA were added, mixed, and sonicated for 10 min (Transsonic 460, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany). 300 µL of H₂O (PURELAB flex 3, ELGA LabWater, Veolia Water Technologies Deutschland GmbH, Celle Germany) were added. Samples were sonicated again for 10 min, mixed, filtered using a regenerated cellulose 0.45 µm syringe filter unit (ProSense B.V., Munich, Germany), and either measured directly or stored at 4 °C until HPLC-MS/MS analysis.

2.2.2. Preparation stock and working solutions

The stock solutions were acquired as certified reference solutions for OTA as well as all isotopically labelled standards (¹³C₁₇ AFB₁, ¹³C₁₈ STC, ¹³C₂₀ OTA) (biopure™, Romer Labs Deutschland GmbH, Butzbach, Germany) or as solid substances (AFB₁, STC (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), methoxy-STC (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany) which were dissolved in ACN. VerA was isolated and kindly provided by INRAE, Toulouse. For quantification of the mycotoxins, a standard mix (AFB₁, STC, OTA, VerA) as well as an IS mix (AFB₁, STC, OTA) were prepared with ACN containing 1 % acetic acid (HAc). The concentrations of the IS and calibration solutions are shown in the appendix in Table A. 4.

2.2.3. Instrumentation and parameters

The analysis of the mycotoxins was performed on a 1290 Infinity II LC system (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn, Germany), separated on a Gemini reversed phase C18 analytical column, 100 × 3.0 mm, 5.0 µm (Phenomenex Inc., Aschaffenburg, Germany), at an oven temperature of 35 °C, with an injection volume of 4 µL. LC separation was performed using a gradient elution of water (with 0.1 % FA, 300 mg/L ammonium formate) and methanol (MeOH) (with 0.1 % FA, 300 mg/L ammonium formate). The flow rate was 0.5 mL/min and the gradient programme started at 5 % organic solvent for 0.8 min, raising to 50 % by minute 1.5, to 55 % by minute 2.5, to 70 % by minute 5.5, to 76 % by minute 6.5, and to 95 % by minute 15.5. Starting from minute 17.0, the organic percentage reverted to the starting conditions of 5 % by minute 17.5 and was kept until the end of the run at 19.5 min. For detection, a triple quadrupole MS (QTRAP 6500+, Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Germany) operating in both positive and negative electro spray ionisation (ESI) mode, measuring in multiple reaction mode (MRM) with the following settings: curtain gas 40, collision gas

medium, temperature 350 °C, the $\pm$ ion spray voltage 4500 V, nebuliser gas flow of 50, heater gas flow of 45, varying dwell time was used. Data acquisition and evaluation was performed with Analyst Software, V. 1.7.2, and MultiQuant Software, V. 3.0.3, AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Germany.

Analytical parameters of quantitative determination of the mycotoxins with the HPLC-MS/MS are shown in Table A. 2.

2.3. Mycobiome analysis

2.3.1. Sample preparation of grated grana-type cheese samples

25 mL of a NaCl-Tween 20 solution were added to 5 g of each cheese sample and shaken for 1 h. 100 μ L of this solution were plated on malt extract glucose agar (MG) (Table A. 3) and Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) to selectively inhibit bacterial growth (DRBC) and obtain a comprehensive fungal profile (MG). Additionally, 100 μ L of a 1/1 dilution and 100 μ L of a 1/10 dilution of the cheese suspension, both mixed with NaCl-Tween 20, were plated on the MG agar and the DRBC agar. Also, a portion of each cheese sample was applied to MG and DRBC agar plates, as well as in empty petri dishes. The samples were incubated at 25 °C for 8 d. All experiments were carried out in biological triplicates. After the incubation period, 25 mL of H₂O was added to 5 g of the grated cheese sample and shaken for 1 h. 100 μ L aliquots of this solution were plated on potato dextrose agar (PDA) (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) and DRBC agar. 1 g of the grated cheese sample was added to a PDA and a DRBC agar plate, as well as 5 g of cheese sample as the negative control in empty petri dishes. The samples were incubated at 25 °C for 9 d.

In case of fungal growth, spores were collected from the agar plates and transferred into 200 μ L of NaCl-Tween 80-agar (Table A. 3). 20 μ L of this suspension were plated on a PDA plate and incubated at 25 °C.

Three agar plugs overgrown with mycelium, each weighing 250 mg, were punched out from each plate and extracted with 700 μ L of trichloromethane for 45 min. Following, the agar plugs were removed and the trichloromethane was evaporated to dryness (SpeedVac Concentrator Savant SPD1010, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) for 20 min. The residue was dissolved in 40 μ L of MeOH, and 10 μ L of this solution were applied to a thin-layer chromatography (TLC) plate (precoated plate SIL G-25/silica gel 60; MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany), which was developed isocratically (Automatic Developing Chamber, CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG & Co. GmbH, Berlin, Germany) using toluene/ethyl acetate/FA (60/30/10). For detection the TLC plate was sprayed with an AlCl₃-solution (20 g AlCl₃ · 6 H₂O in 100 mL MeOH), incubated for 15 min at 80 °C and photographed at 254 and 366 nm.

In order to verify the results, the samples were also analysed by HPLC-DAD (detection at 326 nm) for the formation of STC. Isolates of the samples were prepared on PDA and yeast extract supplemented (YES) agar (Table A. 3), dissolved in MeOH, and filtered through a PTFE filter (0.2 μ m, Phenomenex Inc., Aschaffenburg, Germany).

2.3.2. Fungal isolation and identification of sterigmatocystin-producing fungi

Samples showing STC formation in TLC and HPLC-DAD analyses were grown on MG agar plates and characterized microscopically (C-Plan-Apochromat 63x/1.40 Axio Imager M2, Zeiss, Jena, Germany). Apart from spore shape and size, morphological features like conidia chain length, branching, shade of spore colour and spore septation have been used for identification as well. To identify the sterigmatocystin producing fungi at species-level, genomic DNA (gDNA) was isolated and the internal transcribed spacer regions (ITS_1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'; ITS_4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'; expected insert 595 bp) and calmodulin gene sequences (Calmodulin-cmd5_for: 5'-CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC-3'; Calmodulin-cmd6_rev: 5'-CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG-3'; expected insert 584 bp) have been

amplified by PCR and sequenced by Sanger sequencing as follows:

First, a spore suspension in NaCl-Tween 80-agar (Table A. 3) was prepared. Three times 50 μ L of this suspension were inoculated onto a PDA plate coated with cellophane foil and incubated at 25 °C for seven days. To 200 mg of the grown colony, stainless steel balls (diameter: 5 mm, IKA Single-Use Crushing, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany), 700 μ L of buffer AP1 (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), and 7 μ L of RNase A solution (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) were added, and the samples were shredded twice for 30 s in a FastPrep™-24 5G (MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Germany). After incubation at 65 °C for 10 min (Eppendorf ThermoMixer®, Eppendorf SE, Hamburg, Germany), 150 μ L of buffer P3 (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) were added. Samples were mixed and incubated on ice for 5 min. After centrifuging at 17,000×g for 5 min, the supernatant was pipetted onto a QIAshredder spin column (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) and centrifuged at 17,000×g for 2 min. The filtrate was added to 700 μ L of buffer AW1 (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) and mixed. Subsequently, the sample was loaded on a DNeasy mini spin column (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) and centrifuged at 6150×g for 1 min. 500 μ L of buffer AW2 (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) were added, centrifuged at 6150×g for 1 min, and the flow-through was discarded. Again, 500 μ L of buffer AW2 (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) were added, and the column was centrifuged at 17,000×g for 2 min and the flow-through was discarded. Afterwards, the column was transferred, 100 μ L of buffer AE (preheated to 65 °C) (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) were added, and the sample was incubated at room temperature for 5 min. Finally, the elution of the gDNA was carried out at 9600×g for 2 min.

A PCR (C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Germany) of the obtained gDNA with ITS1/4 primers, respectively the Calmodulin-cmd5/cmd6 primers for the calmodulin gene (Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH, Ebersberg, Germany) at 50 °C and 33 cycles was carried out, followed by a control with gel electrophoresis on a 1 % agarose gel (Peglab PerfectBlue Mini L, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany). The PCR product (each 500–600 bp) was cleaned (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) and the concentrations measured (NanoDrop™ One UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany). Subsequently, to 5 μ L of the purified PCR product, adjusted to a concentration of 5 ng/ μ L, 5 μ L of the ITS1 primer respectively the Calmodulin-cmd5 primer (Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH, Ebersberg, Germany) with a concentration of 5 pmol/ μ L were added for sequencing the PCR product (Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH, Ebersberg, Germany). The sequence information obtained from the sanger sequencing high quality supreme runs was then compared with the NCBI nucleotide sequence database. The results were selected based on the highest score in relation to the sequence coverage in the database.

2.4. Inoculation experiment with grated Parmigiano Reggiano

The portion of a *Parmigiano Reggiano* loaf was wiped with ethanol (96 %) and approximately 3 cm was removed under sterile conditions from all sides. The inner core was finely grated with a sterile grater, transferred into sterile tubes, and stored at 4 °C to obtain a cheese matrix, assumed to be practically free of natural contamination.

In the inoculation experiment, the identified *A. versicolor* isolate was cultivated on PDA agar plates. Subsequently, a 50 mL NaCl-Tween 80-agar spore suspension (Table A. 3) with a spore count of 10⁻⁴ spores/mL (determined with a counting chamber) was produced from the colonies. Afterwards, 5 g of grated *Parmigiano Reggiano* was amalgamated with 5 mL of the spore suspension, in addition to the sterile NaCl-Tween 80 solution with cheese alone, which served as a control, with each condition replicated, six times. The mixtures were then subjected to

shaking for a duration of 1 h 2.5 g of the cheese Tween suspension with spores and 2.5 g of the cheese Tween suspension without spores were applied to PDA plates and empty petri dishes (VWR International GmbH, Darmstadt, Germany), with each application replicated six times. For comparison, 2.5 g of grated *Parmigiano Reggiano* was distributed on six PDA plates and six empty petri dishes, and 250 µL of NaCl-Tween 80-agar with spores of *A. versicolor* were plated onto six PDA plates. All samples were incubated at 25 °C for 10 d.

For the mycotoxin analysis with HPLC-MS/MS, all PDA plate samples were prepared according to the sample preparation method described in section 2.3.1.

For the analysis of samples containing only cheese as the culture medium, a slurry was first prepared from two replicates (each 2.5 g) with 5 mL of H₂O, homogenized (ULTRA-TURRAX®, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) for 1 min, and stored at −18 °C until analysis. The sample preparation of the slurry was as follows. 62 µL of an IS mixture containing ¹³C₁₇-AFB₁, ¹³C₁₈-STC, and ¹³C₂₀-OTA (biopure™, Romer Labs Deutschland GmbH, Butzbach, Germany) and 1.938 mL ACN containing 0.1 % FA were added to 4 g of the slurry. After shaking for 15 min (Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany), 0.2 g NaCl, and 0.8 g MgSO₄ were added. Samples were shaken again for 5 min and centrifuged at 10,000×g for 7 min at room temperature (Avanti JXN-30, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany). 2 mL of supernatant were transferred and 2 mL of n-heptane added. After shaking for 5 min (Multi Reax, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany), the n-heptane phase was discarded. Subsequently, the ACN phase was further prepared following the protocol for the sample preparation method described in section 2.2.1.

For the analysis of the culture medium plate samples the sample were prepared according to the protocol for the sample preparation method described in section 2.2.1 using 2.5 g agar plate sample each.

3. Results and discussion

3.1. Mycotoxin contamination in grated grana-type cheese

In seven of the nine analysed grana-type cheese samples, STC with concentrations up to 1.93 ± 0.2 µg/kg (Sample Nos. 1, 2, 3, 6, 7, 8, and

9) was detected (Fig. 1). Additionally, two of these samples also contained OTA with concentrations of 1.99 ± 0.16 µg/kg (No. 3) and 12.88 ± 1.16 µg/kg (No. 7), respectively (Table 1). For none of the analysed samples an AFB₁ contamination could be detected. Only in the two sliced, not grated, grana-type cheese samples (Nos. 4 and 5), a mycotoxin contamination was not detected.

Apart from samples No. 4, 5, 10, and 11, all other grana-type cheese samples contained methoxy-STC (semi-quantified using external calibration, estimated limit of detection and limit of quantification values according to signal-to-noise method (Sanagi et al., 2019)) with concentrations ranging from 0.13 to 0.77 µg/kg. This finding is remarkable as the mutagenic methoxy-STC has not been reported as a food contaminant before, though it is known to be produced by *Aspergillus*

Table 1

Mycotoxin levels found in grana-type cheese samples quantified by HPLC-MS/MS.

Sample	Sample No.	STC ^a [µg/kg]	OTA ^b [µg/kg]	methoxy-STC [µg/kg]
Grana Padano PDO ^c	1	0.81 ± 0.05	< LOD	0.65 ± 0.03
Grana Padano PDO ^c	2	1.64 ± 0.13	< LOD	0.76 ± 0.03
Grana Padano PDO ^c	3	0.46 ± 0.05	1.99 ± 0.16	0.13 ± 0.01
Parmigiano Reggiano PDO ^c	4	< LOD	< LOD	< LOD
Grana Padano PDO ^c	5	< LOD	< LOD	< LOD
Grana Padano PDO ^c	6	1.23 ± 0.13	< LOD	0.77 ± 0.01
Parmigiano Reggiano PDO ^c	7	0.65 ± 0.04	12.88 ± 1.16	0.16 ± 0.001
Grana Padano PDO ^c	8	1.93 ± 0.20	< LOD	0.56 ± 0.001
Grana Padano PDO ^c	9	0.57 ± 0.04	< LOD	0.27 ± 0.002

^a STC: sterigmatocystin.

^b OTA: ochratoxin A.

^c PDO: protected designation of origin, LOD: AFB₁: 0.02 µg/kg, STC: 0.01 µg/kg, OTA: 0.37 µg/kg, methoxy-STC (estimated): 0.01 µg/kg, LOQ: AFB₁: 0.07 µg/kg, STC: 0.04 µg/kg, OTA: 1.21 µg/kg, methoxy-STC (estimated): 0.02 µg/kg.

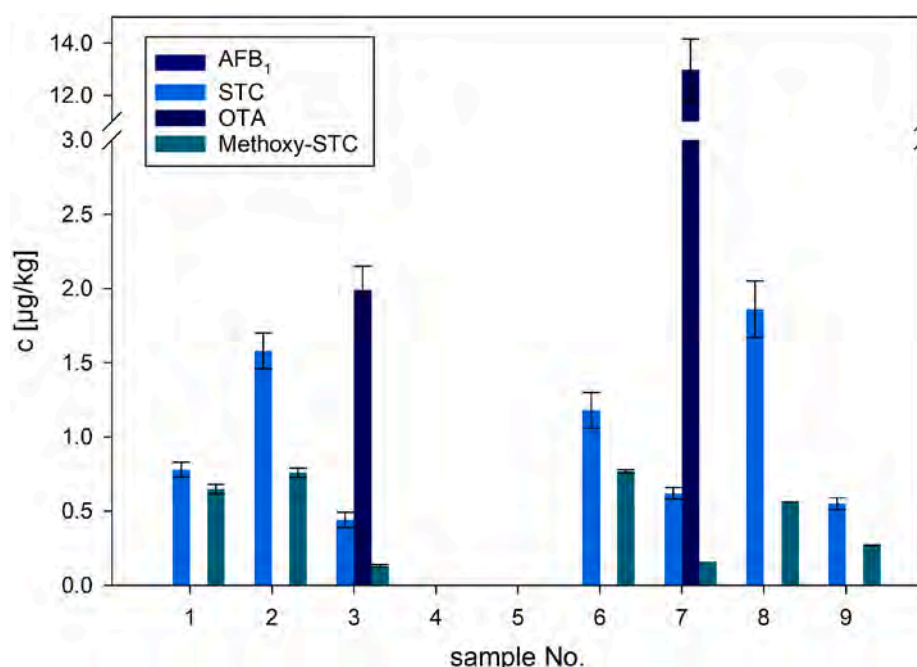


Fig. 1. Quantified mycotoxin concentrations (analysed with HPLC-MS/MS) found in grana-type cheese samples.

species, such as *A. versicolor*, often even at higher levels than STC itself (K. Nielsen, 2002; K. F. Nielsen et al., 1999). Despite some prior reports where especially ripened cheese showed a high prevalence of AFM₁ (Mousavi Khaneghah et al., 2021), the bovine metabolite of AFB₁ as well as VerA as main biosynthetic precursor of STC (qualitatively analysed according to the previous study by Gützow et al. (2022)) have not been found in any of the samples.

The results obtained in the present study confirm those of a previous investigation, which detected STC levels of up to nearly 5 µg/kg in all grated grana-type cheese samples and OTA levels of up to nearly 27 µg/kg in three samples (Gützow et al., 2022). Additionally, Pietri et al. (2022) reported similar findings in their study on the occurrence of OTA and STC in grated grana-type cheeses. In that study, 94 % samples out of 107 contained STC and nearly 47 % contained OTA, with levels up to 25 µg/kg for OTA and 7 µg/kg for STC. Moreover, STC was detected in all samples contaminated with OTA. STC was reported multiple times as a contaminant in cheese, predominantly in the outer area of cheese wheels and the rind (Abd Alla et al., 1996; Lafont et al., 1979; Northolt et al., 1980; Van Egmond & Northolt, 1981; Versilovskis et al., 2009). Other studies also reported the presence of mycotoxins, such as OTA, in grated cheeses (Altafini et al., 2021; Biancardi et al., 2013). Mycotoxin occurrence of STC and OTA in cheese is due to contamination during ripening, resulting from fungal growth and subsequent mycotoxin production on the cheese surface (Biancardi et al., 2013; Camardo Leggieri et al., 2017). De Santi et al. (2010) also reported a contamination of cheese rinds by fungi such as *A. versicolor* from the pit environment. The majority of mycotoxins produced by various *Penicillium* species on cheese remain nearby the mycelium layer. However, the mycotoxin STC, produced by *A. versicolor*, and OTA, produced by *P. verrucosum*, are largely transferred into the cheese rind (Camardo Leggieri et al., 2020). Pietri et al. (2022) analysed 16 grana-type cheese rinds, revealing high OTA and STC contaminations up to 370 µg/kg and 24 µg/kg, respectively. However, the mycotoxin levels decreased significantly from the surface (0–1.5 mm) to the inner parts of the cheese rind (1.5–4.5 mm), indicating that rind inclusion during cheese grating significantly increases mycotoxin contamination. According to the specifications for *Grana Padano* and *Parmigiano Reggiano* cheese, grated cheese products obtained from these may contain up to 18 % of the rind (Dipartimento delle Politiche Competitive della Qualità Agroalimentare Ippiche e Della Pesca, 2019; Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, 2017), potentially contributing to mycotoxin contamination. Based on the own findings (Gützow et al., 2022) and in accordance with literature reports by Altafini et al. (2021); Biancardi et al. (2013); Camardo Leggieri et al. (2017); Pietri et al. (2022) contamination is due to fungal growth during the ripening and storage period. However, typical hard cheese ripening temperatures are too low for fungal growth of

aflatoxin producing fungi as well as aflatoxin production, therefore no AFB₁ was detected in any sample. Temperatures below 20 °C significantly reduces the growth rate of *Aspergillus flavus*, whereas storage between 0 °C and 10 °C inhibits the growth of *A. flavus* completely, thus preventing aflatoxin formation (Al-Zaban, 2023; Garcia-Cela et al., 2019; Liu et al., 2017; Schmidt-Heydt et al., 2010).

3.2. Mycobiome screening and identification of sterigmatocystin-producing fungi

For selected grana-type cheese samples, a general mycobiome screening was carried out as described in section 2.3. Five grana-type cheese samples (Nos. 2, 3, 4, 6, and 8) showed fungal growth on both DRBC agar plates and PDA (exemplary shown for sample No. 6, which contained the strain used in the subsequent inoculation experiment, in Fig. 2). To identify fungal colonies capable of mycotoxin production, spores were collected from the positive samples, incubated, and analysed using TLC and HPLC-DAD.

TLC analysis indicated a potential STC formation in fungal colonies from samples No. 3, 6, and 8 (Fig. 3). The presence of STC was confirmed by HPLC-DAD analysis (detection at 326 nm) in colonies from samples No. 6 and 8 (Table 2).

All fungal colonies from samples No. 3, 6, and 8 identified as potential mycotoxin producers by TLC and HPLC-DAD analysis were isolated and examined microscopically (the strain used for the subsequent inoculation experiment identified as *Aspergillus versicolor* 6-4 and the other fungal colonies are shown in Figure A. 1).

Afterwards, gDNA isolation with subsequent sequencing of the ITS region and part of the calmodulin gene of the corresponding colonies from samples No. 6 and 8 was performed for molecular biological species identification in addition to detailed microscopic characterization. These analyses resulted in the unambiguous identification of isolates No. 6-2a, 6-2b, 6-4, and 8-4b as *A. versicolor* (exemplified in Fig. 4).

Simone Decontardi et al. (2018) investigated the mycobiota of Italian grana-type cheeses, such as *Grana Padano* and *Parmigiano Reggiano*. Of the 104 strains isolated from cheese rind and ripening room air, 94 were identified as *Penicillium* spp. and 10 were *Aspergillus* spp., including five strains of *A. versicolor*. These findings are in accordance with the results of the present study, which identified the presence of *A. versicolor* on grana-type cheese. Similarly, Montagna et al. (2004) found predominantly *Penicillium* spp. in 122 cheese samples, but also *Aspergillus* spp., including *A. versicolor*, especially in long ripened cheese.

3.3. Inoculation experiment of grated Parmigiano Reggiano

The ability of the two fungal isolates identified as *A. versicolor* (6-2a

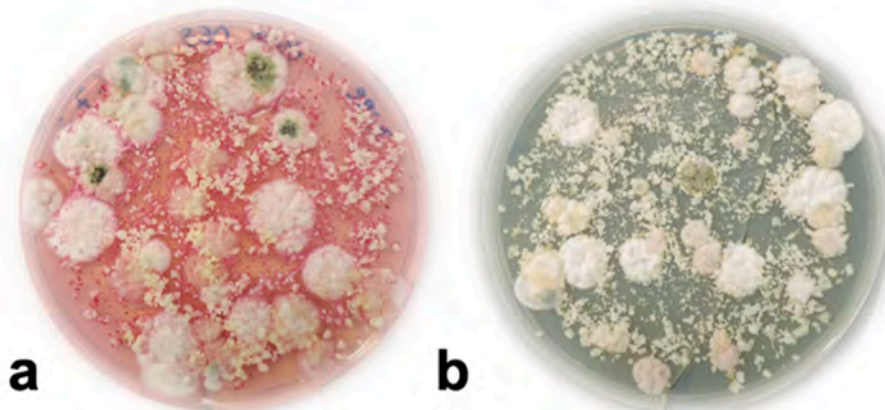


Fig. 2. Fungal growth of grana-type cheese No. 6 on DRBC agar plate (a) and PDA (b), incubated at 25 °C for nine days.

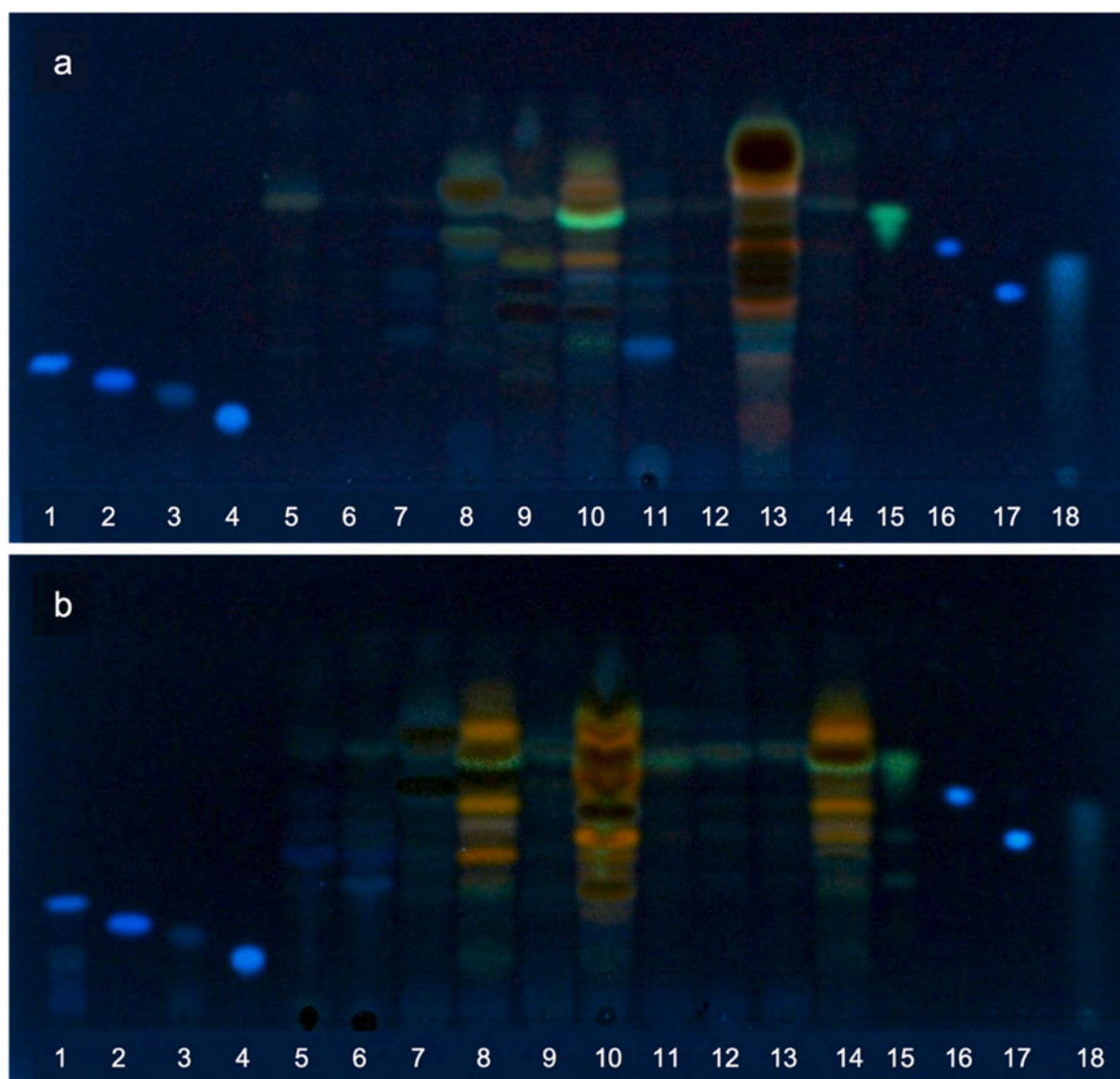


Fig. 3. TLC analysis of fungal colonies from samples No. 2, 3, 4, 6 and 8; a: 1: AFB₁ 150 ng; 2: AFB₂ 50 ng; 3: AFG₁ 50 ng; 4: AFG₂ 150 ng; 5: 2-1; 6: 2-2; 7: 2-3; 8: 2-4; 9: 3-1; 10: 3-2; 11: 3-3; 12: 3-4; 13: 4-1; 14: 4-2; 15: STC 1.5 µg; 16: OTA 75 ng; 17: OTB 250 ng; 18: CIT 200 ng; b: 1: AFB₁ 150 ng; 2: AFB₂ 50 ng; 3: AFG₁ 50 ng; 4: AFG₂ 150 ng; 5: 4-3; 6: 4-4; 7: 6-1; 8: 6-2; 9: 6-3; 10: 6-4; 11: 8-1; 12: 8-2; 13: 8-3; 14: 8-4; 15: STC 1.5 µg; 16: OTA 75 ng; 17: OTB 250 ng; 18: CIT 200 ng (silica gel layer plates, solvent: toluene/ethyl acetate/formic acid (60/30/10), detection: AlCl₃-solution, 254 nm).

Table 2

HPLC-DAD analysis (detection at 326 nm) of fungal colonies isolated from samples No. 6 and 8 (incubated on YES agar and PDA agar at 25 °C for nine days).

Sample No.	STC [µg/mL]	
	YES Agar	PDA
6-2a	368.98	451.12
6-2b		213.57
6-4	877.25	745.63
8-1	437.43	828.90
8-4a	1419.46	691.27
8-4b		880.14

and 6-4) to produce STC has been confirmed by HPLC-DAD (detection at 326 nm) analysis. As strain 6-4 exhibited higher STC formation on both culture media (YES Agar and PDA), it was selected for the inoculation experiment on grated *Parmigiano Reggiano* (Fig. 5).

As none of the six replicates of the negative control, respectively the samples without added spore suspension, exhibited any fungal growth

(grated *Parmigiano Reggiano* on PDA, grated *Parmigiano Reggiano* in empty Petri dish, and grated *Parmigiano Reggiano* suspension with Tween 80 in empty Petri dish, grated *Parmigiano Reggiano* suspension with Tween 80 on PDA), it can be assumed that the *Parmigiano Reggiano* used for the inoculation experiment was free from a fungal contamination. No mycotoxins, such as STC or their biosynthetic precursors, were detected in any of these samples using HPLC-MS/MS analysis.

All samples with a spore suspension from the previously isolated strain *A. versicolor* 6-4 exhibited significant fungal growth (grated *Parmigiano Reggiano* with spore suspension in empty Petri dish, grated *Parmigiano Reggiano* with spore suspension on PDA, and spore suspension on PDA) (Fig. 6). The HPLC-MS/MS analysis of these samples confirmed the presence of STC and the biosynthetic precursor dihydro-STC (DHSTC).

Given that some *Aspergillus* species, such as *Aspergillus nidulans*, are known to lack the genetic capacity to continue the metabolism from STC to AFB₁ (Ehrlich, Yu, & Cotty, 2005; Yu et al., 2004), it seems possible that *A. versicolor* may have a similar genetic limitation, which would explain the absence of AFB₁ in the samples incubated with this species.

The relative amounts of STC and its biosynthetic precursors



Fig. 4. On YES agar isolated and microscopically (C-Plan-Apochromat 63x/1.40 Axio Imager M2) characterized fungal colonies of an *Aspergillus versicolor* strain isolated from the grated grana-type cheese samples.

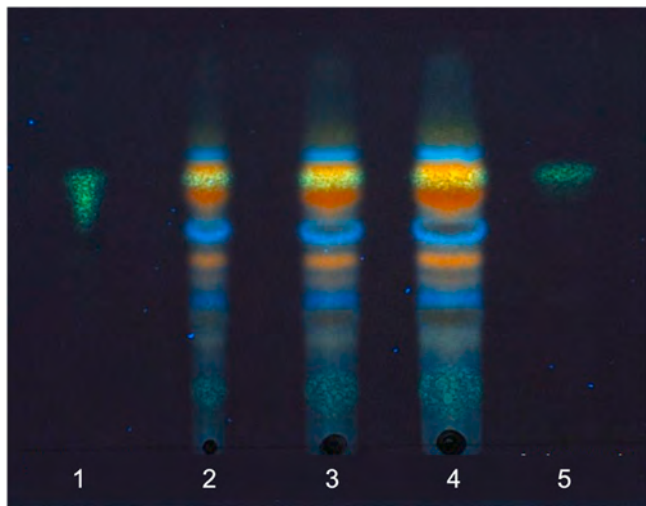


Fig. 5. TLC analysis for STC formation of strain No. 6-4; 1: STC 1.5 μ g; 2: *A. versicolor* 6-4 5 μ L; 3: *A. versicolor* 6-4 10 μ L; 4: *A. versicolor* 6-4 20 μ L; 5: STC 1 μ g (silica gel layer plates, solvent: toluol/ethyl acetate/formic acid (60/30/10), detection: AlCl_3 -solution, 254 nm).

produced by *A. versicolor* 6-4 on various culture media (plain PDA, plain grated *Parmigiano Reggiano*, and a combination of both) are shown in Table 3. Moreover, the HPLC-MS/MS chromatograms of the STC and methoxy-STC standard solutions, along with their respective transitions in grana-type cheese incubated with the *A. versicolor* strain 6-4, are presented in Figure A. 2. The concentration of STC was 5415 ± 721 μ g/kg on plain PDA, 1276 ± 457 μ g/kg on grated *Parmigiano Reggiano*, and significantly lower at just 1.95 ± 1.4 μ g/kg on grated *Parmigiano Reggiano* combined with PDA. For VerA, only trace amounts were determined in grated *Parmigiano Reggiano*, slightly higher amounts were found on plain PDA, and it was not detectable on the combined medium. All three media showed comparable levels of methoxy-STC. Additionally, the fungus showed similar formation of DHSTC and versicolorin B (VerB) on grated *Parmigiano Reggiano* and plain PDA. By contrast, VerA, VerB, and DHSTC were not detectable on the combination of *Parmigiano Reggiano* and PDA. Comparisons of the three culture media indicated that the *A. versicolor* 6-4 strain produced higher mycotoxin levels on plain PDA and grated *Parmigiano Reggiano* compared to the combination of both media as substrate. Therefore, the biosynthesis develops sinks at different sites of the cascades, depending on the environment, i.e. available nutrients. Thus, it seems to be not only

dependent on the genetic predisposition what kind of intermediates accumulate, but the more pronounced impact is due to the substrate, triggering the activity of the biosynthetic genes involved in the formation of the respective metabolite. This finding is consistent with several studies that highlight the significant impact of extrinsic and intrinsic growth parameters on mycotoxin biosynthesis (Priesterjahn et al., 2020; Schmidt-Heydt et al., 2012). Sánchez-Montero et al. (2019) showed that the composition of the growth medium significantly influenced OTA toxin production by *Penicillium nordicum* and *P. verrucosum*. Similarly, Ahmad, Ahmad, Hamid, Abdin, and Javed (2013) found that specific nutrient concentrations and combinations influenced AFB₁ production by *A. flavus*. These findings support the hypothesis of the present study that substrate availability plays a crucial role in biosynthesis outcomes. Moreover, Coton et al. (2019) highlighted that additional to the impact of the nutritional matrix of cheese and YES medium, the growth environment also affects mycotoxin formation by *Penicillium* spp. Abiotic factors such as temperature, water activity, or oxidative stress were reported to influence different mycotoxin production across various species (Alborch et al., 2011; Casquete et al., 2018; Geisen et al., 2017; Ritter et al., 2011; Schmidt-Heydt et al., 2015; Wang et al., 2019). Thus, external conditions also have an important influence on the biosynthesis. Casquete et al. (2017) also demonstrated that pH, water activity, and temperature influence both growth and aflatoxin production of different *A. flavus* strains on cheese-based media. Ozturkoglu-Budak et al. (2023) further showed that mycotoxin production was significantly higher and greater in quantity in culture media than in cheese media, also demonstrating that the matrix composition significantly impacts biosynthetic activity. They reported factors such as free fatty acids, antimicrobial, and antifungal compounds influencing mycotoxin production (Ozturkoglu-Budak et al., 2023). Overall, the results obtained in the present study, along with existing literature, reinforces the idea that environmental and substrate factors are critical in determining the biosynthetic pathways and their efficiencies, potentially outweighing genetic predisposition.

The only metabolite being novel to food matrix, Methoxy-STC, is structurally similar to STC, differing only by the addition of a methoxy group (Fig. 7). Methoxy-STC was detected in all inoculated samples and almost all grated grana-type cheese samples. Methoxy-STC is produced by *Aspergillus* species, such as *A. versicolor*, often at higher concentration than STC (K. Nielsen, 2002; K. F. Nielsen et al., 1999), but not by aflatoxin producing *Aspergillus* species such as *A. flavus* (Schamann et al., 2024). Jakšić et al. (2012) reported that methoxy-STC has mutagenic properties in the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay. Furthermore, they suggest that the methoxy group may enhance the bioavailability of methoxy-STC. Dabelić et al. (2021) showed that methoxy-STC

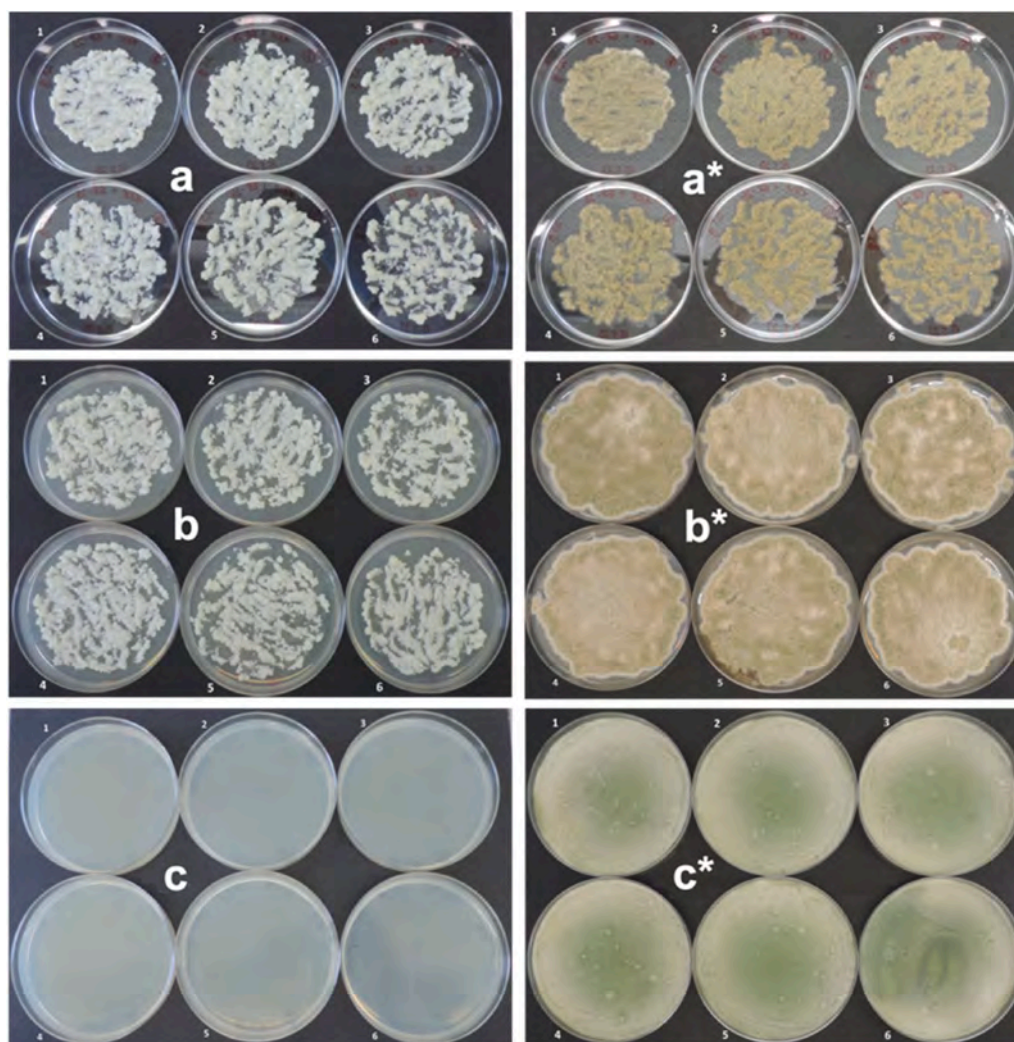


Fig. 6. Inoculation samples of sterile grated *Parmigiano Reggiano* with the isolated strain *A. versicolor* 6-4, before incubation a: grated *Parmigiano Reggiano* in empty Petri dish, b: grated *Parmigiano Reggiano* with spore suspension on PDA, c: spore suspension on PDA, and *after incubation at 25 °C for 10 days.

Table 3

Relative amounts of STC and its biosynthetic precursors produced by *A. versicolor* 6-4 on various culture media combined with parmesan (incubated at 25 °C for 10 days). ++ = high amount, + = moderate amount, o = low amount, - = not detected.

Sample	STC ^a	Dihydro-STC	methoxy-STC
spore suspension on PDA	++	+	++
grated Parmesan with spore suspension on PDA	+	-	++
grated Parmesan with spore suspension in empty Petri dish	++	+	++

is ten times more cytotoxic than STC in HepG2 and A549 cells, presumably due to better bioavailability caused by the methoxy group. Both mycotoxins are genotoxic, inducing single and double DNA strand breaks. However, STC exhibits a higher genotoxic potential than methoxy-STC. Moreover, combinations of these toxins at non-cytotoxic concentrations result in additive to antagonistic cytotoxic and genotoxic effects in cell culture experiments (Dabelić et al., 2021). Furthermore, Pfeiffer, Fleck, and Metzler (2014) demonstrated that hepatic microsomes from humans and rats predominantly metabolise STC and methoxy-STC into catechol, which may contribute to the toxic and

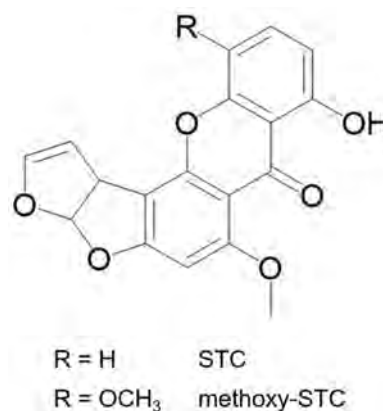


Fig. 7. Chemical structure of STC and methoxy-STC.

genotoxic effects of these mycotoxins.

It is surprising to see a very pronounced formation of methoxy-STC under the chosen model conditions in this study as methoxy-STC has never been described as a potential food contaminant before. Nevertheless, the few available toxicological investigations raise concerns

about the mutagenic potential of methoxy-STC that might even exceed the toxicity of STC.

As OTA was not detected in these inoculated samples, it can be assumed that additional mycotoxins, such as OTA, found in grated grana-type cheese samples, originated from spoilage with other different fungi.

Furthermore, compared to the commercial samples from which the *A. versicolor* 6-4 strain was originally isolated, only the highly contaminated inoculated samples contained detectable amounts of the biosynthetic precursors due to the level of contamination.

In summary, STC was detected above the LOQ (0.04 µg/kg) in seven out of nine grana-type cheese market samples. Additionally, OTA was found in two of these samples. HPLC-MS/MS analysis confirmed the production of STC, methoxy-STC, and biosynthetic precursors, like dihydro-STC, versicolorin A and B, in grated Parmigiano Reggiano inoculated with the *A. versicolor* strain 6-4 isolated from one of the commercial cheese samples; OTA was not detected in these inoculated samples. Plain PDA and grated *Parmigiano Reggiano* showed higher mycotoxin levels compared to the combination of both as a culture medium. Notably, only the highly contaminated inoculated samples, and not the commercial samples, contained detectable amounts of the biosynthetic precursors.

4. Conclusion

In conclusion, the mycobiome analysis suggested *A. versicolor* as a producer of STC in the commercial grana-type cheese samples. The STC formation by the isolated *A. versicolor* strain on authentic *Parmigiano Reggiano* could be confirmed by inoculation and HPLC-MS/MS analysis. This study provides novel insights by identifying methoxy-STC as a potential contaminant in grana-type cheese. The occurrence of methoxy-STC in both market and inoculated grana-type cheese samples, raises concerns about its toxicity, as some studies suggest it may have mutagenic and toxic potentials similar to or greater than those of STC. Especially, since methoxy-STC has not been described as a potential food contaminant before, it bears the potential of being overlooked e.g. in targeted MS/MS analyses. As *A. versicolor* produces both toxic compound at the same time, all commodities that have been reported to be prone of STC contamination, should be tested for methoxy-STC as well.

Appendix

Table A. 1

Internal standard, analyte concentration in calibration mixes and limit of detection and quantification.

Analyte	IS ^a concentration in final calibration mix [ng/L]	Lowest calibration concentration [ng/L]	Highest calibration concentration [ng/L]	LOD ^b [µg/kg]	LOQ ^c [µg/kg]
AFB ₁	493	50	10,000	0.02	0.07
STC	486	50	10,000	0.01	0.04
OTA	3110	350	10,030	0.37	1.21
VerA	–	350	9983	0.04	0.14

^a IS: internal standard, ^b LOD: limit of detection, ^c LOQ: limit of quantification.

Table A. 2

Analytical parameters of quantitative determination of the analytes with the HPLC-MS/MS; ESI (+) and (–) mode; multiple reaction monitoring mode; the second product ion was used as a qualifier for the confirmation of identity for each analyte.

Analyte	Precursor ion [m/z]	Product ions [m/z]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
Aflatoxin B ₁	313.0	285.0	111	33	16
		241.0	111	49	26
¹³ C ₁₇ -Aflatoxin B ₁	330.0	301.0	111	33	16
Sterigmatocystin	325.0	310.0	96	33	18
		281.0	96	49	32

(continued on next page)

Additional mycotoxins like OTA found in previous grated grana-type cheese samples originate from spoilage with further fungi, such as of the species *Penicillium* that was also identified within the mycobiome analyses of selected cheese samples. The observed differences in mycotoxin formation by *A. versicolor* on grana-type cheese, culture media and combinations suggest that environmental and substrate factors, such as nutrient availability, critically influence biosynthetic processes, potentially outweighing the impact of genetic predisposition on the accumulation of intermediates. Further investigations should focus on specific environmental conditions and substrate compositions that have the potential to influence mycotoxin biosynthesis. In order to minimise the risk of mycotoxin contamination, storage conditions could be optimised and the use of protective cultures in order to mitigate fungal contamination could be investigated. Furthermore, the inclusion of rind in grated products should be avoided and an adequate removal of rind prior to consumption should be ensured. Such investigations have the potential to contribute to a reduction of the risk of mycotoxin contamination and to enhance the safety of grana-type cheese for consumption.

CRediT authorship contribution statement

Kim Lara Gützkow: Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Ronald Maul:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Conceptualization. **Sascha Rohn:** Writing – review & editing, Conceptualization. **Markus Schmidt-Heydt:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Investigation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

The author would like to sincerely thank Nicole Mischke, Karla Hell and Adetoye Adeyemo for their excellent technical assistance.

Table A. 2 (continued)

Analyte	Precursor ion [<i>m/z</i>]	Product ions [<i>m/z</i>]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
¹³ C ₁₈ -Sterigmatocystin	343.0	297.0	96	49	32
Ochratoxin A	404.0	239.1	31	29	14
		357.9	31	19	24
¹³ C ₂₀ -Ochratoxin A	424.1	250.1	31	29	14
Aflatoxin M ₁	329.0	273.0	116	33	16
		229.0	116	53	26
O-Methylsterigmatocystin	339.1	324.1	96	33	18
		306.1	96	49	32
Dihydrosterigmatocystin	327.1	312.0	96	33	18
		271.1	96	49	32
Dihydro-O-methyl sterigmatocystin	341.1	326.1	96	33	18
		313.1	96	49	32
Aflatoxin B ₂	315.0	259.0	25	39	28
		287.1	25	25	26
Aflatoxin G ₁	329.0	243.1	25	37	28
		311.0	25	29	16
Aflatoxin G ₂	331.0	313.0	121	33	42
		245.1	121	41	10
Aspertoxin	355.1	322.1	96	33	18
		340.1	96	30	20
Aflatoxicol	315	287	25	35	28
		271	25	40	26
		297	25	30	26
Methoxy-Sterigmatocystin	355	340	96	33	18
		327	96	33	18
Versicolorin A	337.1	309.1	-130	-34	-15
		252.1	-130	-45	-15
Versicolorin B	339.1	311.1	-130	-35	-15
		283.1	-130	-45	-15
Versiconol	359.1	341.1	-130	-35	-15
		329.1	-130	-45	-15
Norsolorinic acid	369.1	325.1	-130	-35	-15
		284.1	-130	-45	-15
Averantin	371.1	353.1	-130	-35	-15
		325.0	-130	-45	-15
Hydroxyaverantin	387.1	369.1	-130	-35	-15
		342.1	-130	-45	-15
Averufin	367.1	284.1	-130	-35	-15
		295.1	-130	-45	-15
Oxoaverantin	385.1	367.1	-130	-35	-15
		355.1	-130	-45	-15
Hydroxyversicolorone	383.1	339.1	-130	-35	-15
		294.1	-130	-45	-15
Versiconal hemiacetal acetate	399.1	337.1	-130	-35	-15
		355.1	-130	-45	-15
Versiconol acetate	401.1	341.1	-130	-35	-15
		383.1	-130	-45	-15
Cyclopiazonic acid	335.0	139.9	-130	-38	-15
		179.9	-130	-34	-11
Citrinin	281.0	249.1	-50	-24	-7
		205.0	-50	-33	-7

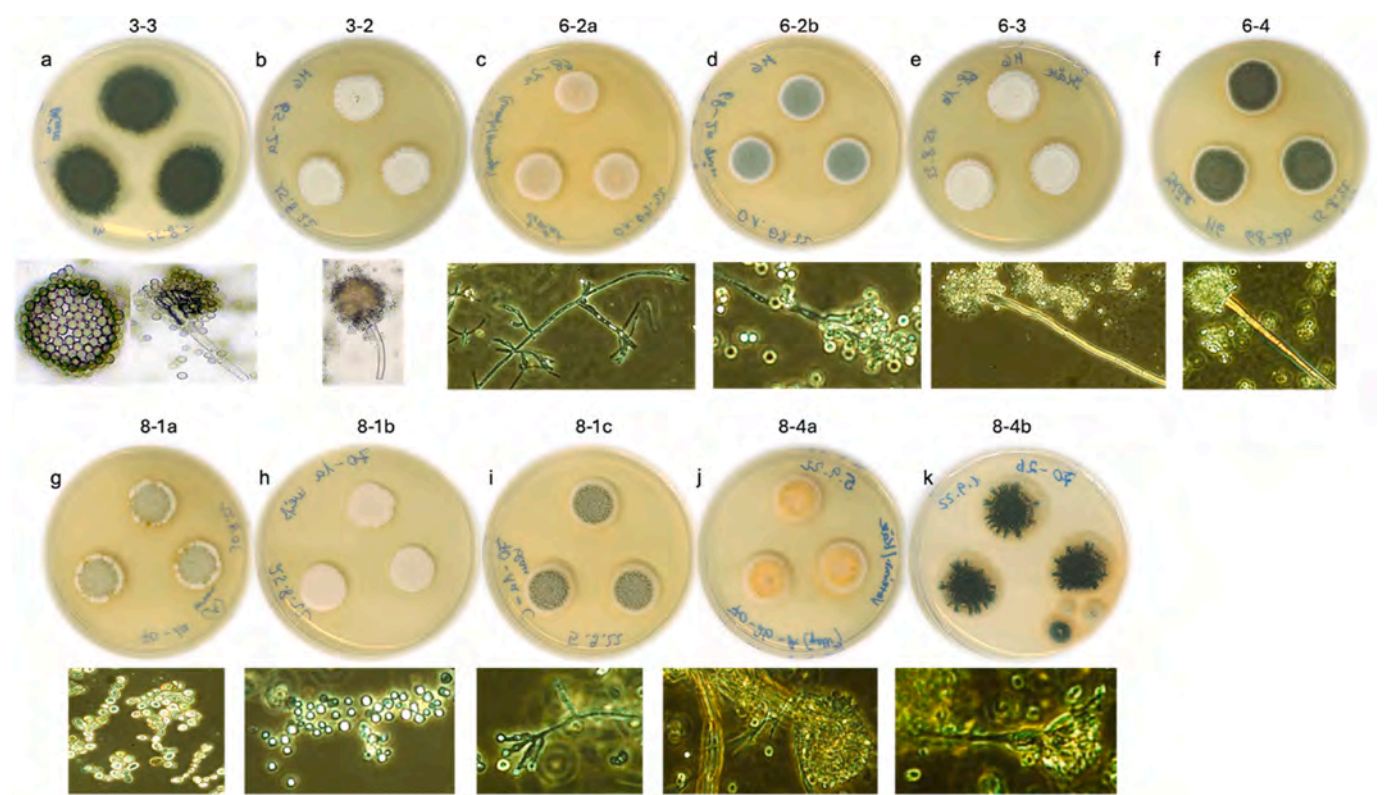


Fig. A. 1. On MG agar isolated and microscopically (here with a Leitz microscope, Aristoplan, ocular 10x/26 mm, objective 40×) examined fungal colonies of different species isolated from cheese samples.

Table A. 3
Composition of self-prepared culture media.

Culture medium	Composition
NaCl-Tween 80-Agar	9 g NaCl
	1 g Tween 80
	1 g Agar
	1 L distilled H ₂ O
Malt-Glucose-Agar	17 g malt extract
	5 g D(+)-glucose monohydrate
	16 g Agar
	1 L distilled H ₂ O
YES-Agar	adjust pH value to 7
	150 g D(+)-sucrose
	20 g yeast extract
	16 g Agar
	1 L distilled. H ₂ O

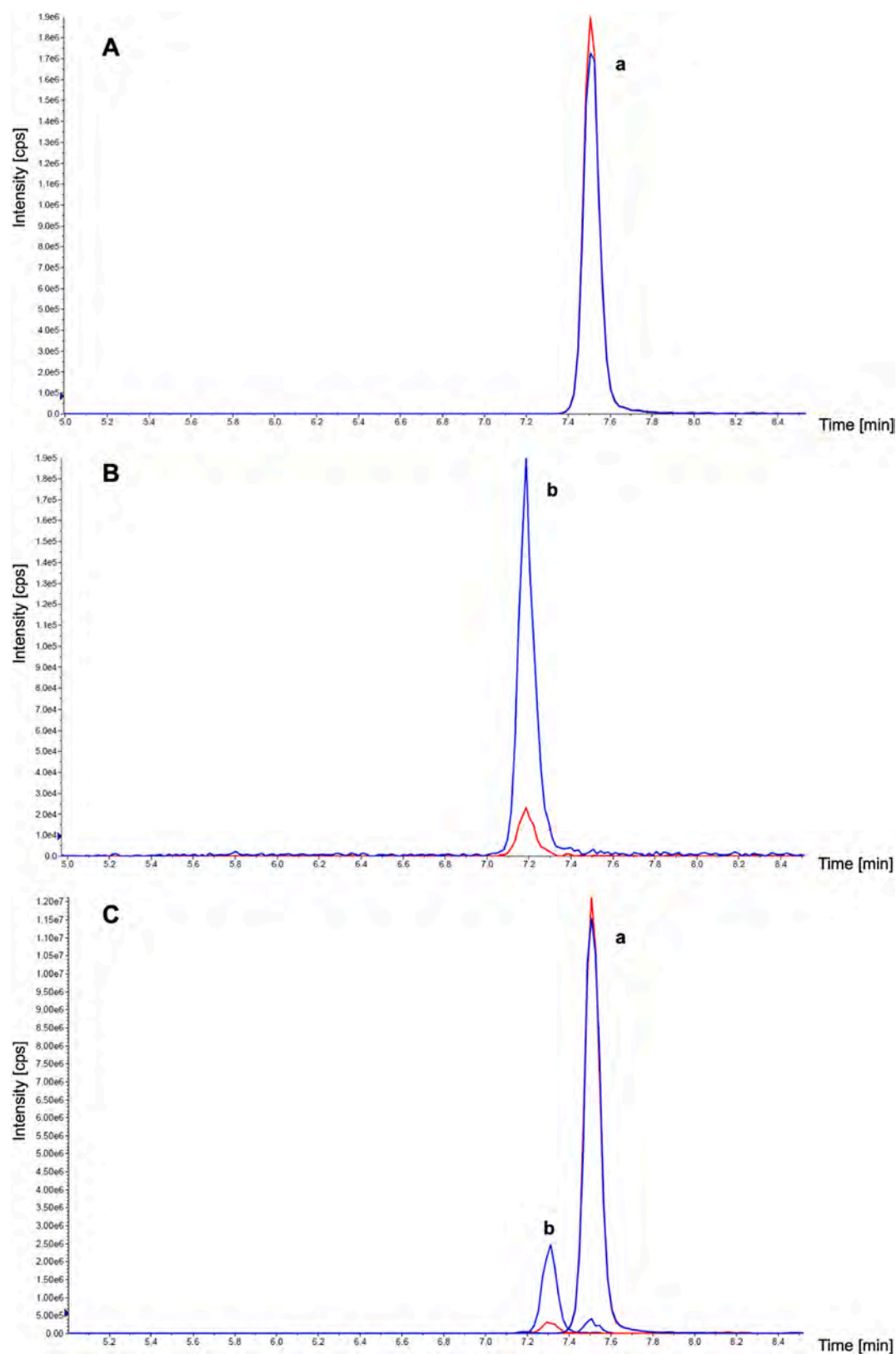


Fig. A. 2. HPLC-MS/MS chromatogram in ESI(+) mode of (A) STC standard solution, (B) methoxy-STC standard solution, (C) incubated grana-type cheese with strain 6-4. Extract ion chromatograms in the multiple reaction monitoring mode (MRM) showing mass transitions [m/z] (a) 325 → 310 (blue; quantifier); 325 → 281 (red; qualifier) and (b) 355 → 340 (blue; quantifier); 355 → 327 (red; qualifier).

Table A. 4

Internal standard and analyte concentration in calibration mixes.

Analyte	IS ^a concentration in final calibration mix [ng/mL]	Lowest calibration concentration [ng/mL]	Highest calibration concentration [ng/mL]
AFB ₁	0.493	0.05	10.00
STC	0.486	0.05	10.00
OTA	3.11	0.35	10.03
VerA	n.a.	0.35	9.98
Methoxy-STC	n.a.	0.05	10.00

^aIS: internal Standard, n.a.: not applicable.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Abd Alla, E. A. M., Metwally, M. M., Mehrez, A. M., & Abu Sree, Y. H. (1996). Sterigmatocystin: Incidence, fate and production by *Aspergillus versicolor* in Ras cheese. *Food*, 40(6), 310–313.
- Ahmad, M., Ahmad, M. M., Hamid, R., Abidin, M. Z., & Javed, S. (2013). Use of response surface methodology to study the effect of media composition on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, 29(1), 39–45.
- Al-Zaban, M. I. (2023). Impacts of temperature and water activity interactions on growth, aflatoxin B1 production and expression of major biosynthetic genes of AFB1 in *Aspergillus flavus* isolates. *Microorganisms*, 11(5), 1199.
- Alborch, L., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., & Cabañes, F. J. (2011). Temperature and incubation time effects on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus sclerotigen* and *Aspergillus lacticoffeatus* on culture media. *Letters in Applied Microbiology*, 52(3), 208–212.
- Altamini, A., Roncada, P., Guerrini, A., Minkoumba Sonfack, G., Fedrizzi, G., & Caprai, E. (2021). Occurrence of ochratoxin A in different types of cheese offered for sale in Italy. *Toxins*, 13(8), 540.
- Anelli, P., Haidukowski, M., Epifani, F., Cimmarusti, M. T., Moretti, A., Logrieco, A., et al. (2019). Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. *Food Microbiology*, 78, 62–72.
- Anli, E., & Alkis, İ. M. (2010). Ochratoxin A and brewing technology: A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1), 23–32.
- Båth, R., Persson, K. N., Schnürer, J., & Leong, S.-I. L. (2012). Microbiota of an unpasteurised cellar-stored goat cheese from northern Sweden. *Agricultural and Food Science*, 21(2), 197–203.
- Benkerroum, N. (2016). Mycotoxins in dairy products: A review. *International Dairy Journal*, 62, 63–75.
- Biancardi, A., Piro, R., Galaverna, G., & Dall'Asta, C. (2013). A simple and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ochratoxin A in hard cheese. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 64(5), 632–640.
- Camardo Leggeri, M., Decontardi, S., Bertuzzi, T., Pietri, A., & Battilani, P. (2017). Modeling growth and toxin production of toxigenic fungi signaled in cheese under different temperature and water activity regimes. *Toxins*, 9(1), 4.
- Camardo Leggeri, M., Pietri, A., & Battilani, P. (2020). Modelling fungal growth, mycotoxin production and release in grana cheese. *Microorganisms*, 8(1), 69.
- Capozzi, V., Fragasso, M., Romaniello, R., Berbegal, C., Russo, P., & Spano, G. (2017). Spontaneous food fermentations and potential risks for human health. *Fermentation*, 3(4), 49.
- Casquete, R., Benito, M. J., Córdoba, M. d. G., Ruiz-Moyano, S., Galván, A. I., & Martín, A. (2018). Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. *LWT*, 89, 179–185.
- Casquete, R., Benito, M. J., Córdoba, M. d. G., Ruiz-Moyano, S., & Martín, A. (2017). The growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system are influenced by physicochemical factors. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 6987–6996.
- Coton, M., Auffret, A., Poirier, E., Debaets, S., Coton, E., & Dantigny, P. (2019). Production and migration of ochratoxin A and citrinin in Comté cheese by an isolate of *Penicillium verrucosum* selected among *Penicillium* spp. mycotoxin producers in YES medium. *Food Microbiology*, 82, 551–559.
- Dabelić, S., Kifer, D., Jakšić, D., Kopjar, N., & Klarić, M. (2021). Sterigmatocystin, 5-methoxysterigmatocystin, and their combinations are cytotoxic and genotoxic to A549 and HepG2 cells and provoke phosphorylation of Chk2, but not Fancd2 checkpoint proteins. *Toxins*, 13(7).
- De Santi, M., Sisti, M., Barbieri, E., Piccoli, G., Brandi, G., & Stocchi, V. (2010). A combined morphologic and molecular approach for characterizing fungal microflora from a traditional Italian cheese (Fossa cheese). *International Dairy Journal*, 20(7), 465–471.
- Decontardi, S., Mauro, A., Lima, N., & Battilani, P. (2017). Survey of *Penicillia* associated with Italian grana cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 25–31.
- Decontardi, S., Soares, C., Lima, N., & Battilani, P. (2018). Polyphasic identification of *Penicillia* and *Aspergilli* isolated from Italian grana cheese. *Food Microbiology*, 73, 137–149.
- Diaz Nieto, C. H., Granero, A. M., Zon, M. A., & Fernandez, H. (2018). Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 460–470.
- Dipartimento delle Politiche Competitive della Qualità Agroalimentare Ippiche e Della Pesca. (2019). Modifica del disciplinare di produzione della denominazione «Grana Padano» registrata in qualità di denominazione di origine protetta. *Gazz. Uff.*, 249, 11–16.
- Dobson, A. D. W. (2017). Chapter 23 - mycotoxins in cheese. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese* (4th ed., pp. 595–601). San Diego: Academic Press.
- Ehrlich, K. C., Yu, J., & Cotty, P. J. (2005). Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 518–527.
- El-Fadaly, H. M., El-Kadi, S. M., Hamad, M. N., & Habib, A. A. (2015). Isolation and identification of Egyptian Ras cheese (Romy) contaminating fungi during ripening period. *Journal of Microbiology Research*, 5(1), 1–10.
- Fox, E. M., & Howlett, B. J. (2008). Secondary metabolism: Regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6), 481–487.
- Galli, B. D., Martin, J. G. P., da Silva, P. P. M., Porto, E., & Spoto, M. H. F. (2016). Sensory quality of Camembert-type cheese: Relationship between starter cultures and ripening molds. *International Journal of Food Microbiology*, 234, 71–75.
- García-Cela, E., Kiaitsi, E., Sulyok, M., Krška, R., Medina, A., Petit Damico, I., et al. (2019). Influence of storage environment on maize grain: CO₂ production, dry matter losses and aflatoxins contamination. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(1), 175–185.
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerne, L., Frotté, N., Baroncelli, R., et al. (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 191–197.
- Geisen, R., Touhami, N., & Schmidt-Heydt, M. (2017). Mycotoxins as adaptation factors to food related environments. *Current Opinion in Food Science*, 17, 1–8.
- Gützow, K. L., Al Ayoubi, C., Vasco, L. S., Rohn, S., & Maul, R. (2022). Analysis of ochratoxin A, aflatoxin B1 and its biosynthetic precursors in cheese – method development and market sample screening. *Food Control*, Article 109241.
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G., et al. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 437–456.
- Jakšić Despot, D., Kocsubé, S., Bencsik, O., Kecskeméti, A., Szekeres, A., Vágvolgyi, C., et al. (2017). New sterigmatocystin-producing species of *Aspergillus* section *Versicolores* from indoor air in Croatia. *Mycological Progress*, 16(1), 63–72.
- Jakšić, D., Puel, O., Canlet, C., Kopjar, N., Kosalec, I., & Klarić, M. S. (2012). Cytotoxicity and genotoxicity of versicolorins and 5-methoxysterigmatocystin in A549 cells. *Archives of Toxicology*, 86(10), 1583–1591.
- Ježak, K., Kozajda, A., Sowiak, M., Brzeźnicki, S., Bonczarowska, M., & Szadkowska-Stańczyk, I. (2016). The capability of fungi isolated from moldy dwellings to produce toxins. *International Journal of Occupational Medicine & Environmental Health*, 29(5).
- Kure, C. F., & Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 14–19.
- Kure, C. F., Skaar, I., & Brendehaug, J. (2004). Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 93(1), 41–49.
- Lafont, P., Siriwardana, M. G., & Lafont, J. (1979). Contamination of cheeses by mycotoxins. *Medecine et Nutrition*, 15, 257–262.
- Liang, Y., Zhao, W., Xu, J., & Miller, J. D. (2011). Characterization of two related exoantigens from the biodeteriogenic fungus *Aspergillus versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 217–226.
- Liu, X., Guan, X., Xing, F., Lv, C., Dai, X., & Liu, Y. (2017). Effect of water activity and temperature on the growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin biosynthetic genes and aflatoxin production in shelled peanuts. *Food Control*, 82, 325–332.
- Lund, F., Filtenborg, O., & Frisvad, J. C. (1995). Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology*, 12, 173–180.
- Magan, N., & Aldred, D. (2007). Why do fungi produce mycotoxins?. In *Food mycology* (pp. 135–148). CRC Press.
- Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali. (2017). Proposta di modifica del disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta «Parmigiano Reggiano». *Gazz. Uff.*, 185, 94–100.
- Montagna, M. T., Santacroce, M. P., Spilotros, G., Napoli, C., Minervini, F., Papa, A., et al. (2004). Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. *Mycopathologia*, 158(2), 245–249.
- Mousavi Khaneghah, A., Moosavi, M., Omar, S. S., Oliveira, C. A. F., Karimi-Dehkordi, M., Fakhr, Y., et al. (2021). The prevalence and concentration of aflatoxin M1 among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Food Control*, 125, Article 107960.
- Nielsen, K. (2002). Mould growth on building materials. *Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers: BioCentrum-DTU*. Technical University of Denmark.

- Nielsen, K. F., Gravesen, S., Nielsen, P. A., Andersen, B., Thrane, U., & Frisvad, J. C. (1999). Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia*, 145(1), 43–56.
- Northolt, M. D., Van Egmond, H. P., Soentoro, P., & Deijl, E. (1980). Fungal growth and the presence of sterigmatocystin in hard cheese. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 63(1), 115–119.
- Ostry, V., Malir, F., & Ruprich, J. (2013). Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, 5(9), 1574–1586.
- Ozturkoglu-Budak, S., Akal, H. C., & Öztürk, H.İ. (2023). Multi-mycotoxin production of cheese-derived fungal strains in vitro and in cheese models. *World Mycotoxin Journal*, 1–12.
- Pattono, D., Grosso, A., Stocco, P. P., Pazzi, M., & Zeppa, G. (2013). Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. *Food Control*, 33(1), 54–57.
- Pfeiffer, E., Fleck, S. C., & Metzler, M. (2014). Catechol Formation: A novel pathway in the metabolism of sterigmatocystin and 11-methoxysterigmatocystin. *Chemical Research in Toxicology*, 27(12), 2093–2099.
- Pietri, A., Leni, G., Mulazzi, A., & Bertuzzi, T. (2022). Ochratoxin A and sterigmatocystin in long-ripened grana cheese: Occurrence, wheel rind contamination and effectiveness of cleaning techniques on grated products. *Toxins*, 14(5), 306.
- Piontek, M. (2007). Strains of *Aspergillus versicolor* tiraboschi synthesizing sterigmatocystin and the differentiation of mycotoxin risk dependent on their productivity in housing buildings. *Mycotoxin Research*, 23(1), 34–38.
- Piontek, M., Łuszczynska, K., & Lechów, H. (2016). Occurrence of the toxin-producing *Aspergillus versicolor* tiraboschi in residential buildings. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(9), 862.
- Priesterjahn, E.-M., Geisen, R., & Schmidt-Heydt, M. (2020). Influence of light and water activity on growth and mycotoxin formation of selected isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Microorganisms*, 8(12), 2000.
- Ritter, A. C., Hoeltz, M., & Noll, I. B. (2011). Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* tested in different culture conditions. *Food Science and Technology*, 31.
- Sanagi, M. M., Ling, S. L., Nasir, Z., Hermawan, D., Wan Ibrahim, W. A., & Naim, A. A. (2019). Comparison of signal-to-noise, blank determination, and linear regression methods for the estimation of detection and quantification limits for volatile organic compounds by gas chromatography. *Journal of AOAC International*, 92(6), 1833–1838.
- Sánchez-Montero, L., Córdoba, J. J., Peromingo, B., Álvarez, M., & Núñez, F. (2019). Effects of environmental conditions and substrate on growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium nordicum*: Relative risk assessment of OTA in dry-cured meat products. *Food Research International*, 121, 604–611.
- Schamann, A., Soukup, S. T., Geisen, R., Kulling, S., & Schmidt-Heydt, M. (2024). Comparative analysis of the genomes and aflatoxin production patterns of three species within the *Aspergillus* section *Flavi* reveals an undescribed chemotype and habitat-specific genetic traits. *Communications Biology*, 7(1), 1134.
- Schmidt-Heydt, M., Graf, E., Stoll, D., & Geisen, R. (2012). The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiology*, 29(2), 233–241.
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C. E., Abdel-Hadi, A., Magan, N., & Geisen, R. (2010). The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Research*, 26(4), 241–246.
- Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., Schütz, P., & Geisen, R. (2015). Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. *International Journal of Food Microbiology*, 192, 1–6.
- Scott, P. (1989). Mycotoxigenic fungal contaminants of cheese and other dairy products. *Mycotoxins in dairy products*, 193–259.
- Sengun, I., Yaman, D., & Gonul, S. (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese: A review. *World Mycotoxin Journal*, 1(3), 291–298.
- Van Egmond, H. P., & Northolt, M. (1981). Contamination of ripening cheese with *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin. In *Proceedings of the 4th meeting on mycotoxins in animal disease* (pp. 90–92). Weybridge, UK: ADAS.
- Versilovskis, A., Van Peteghem, C., & De Saeger, S. (2009). Determination of sterigmatocystin in cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 26(1), 127–133.
- Wang, P., Chang, P.-K., Kong, Q., Shan, S., & Wei, Q. (2019). Comparison of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* at different temperatures and media: Proteome analysis based on TMT. *International Journal of Food Microbiology*, 310, Article 108313.
- Yu, J., Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., et al. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1253–1262.
- Yuvaşen, A., Macit, E., & Dertli, E. (2018). Microbial species playing roles for the production of traditional Kasar cheese during pre-maturation period. *LWT*, 91, 406–413.

4 Zusammenfassende Diskussion

4.1 Pflanzliche Lebensmittel – Pflanzliche Drinks

4.1.1 Mykotoxinvorkommen in pflanzlichen Drinks

Das Vorkommen von Mykotoxinen in pflanzlichen Drinks gelangt zunehmend in den Fokus der Lebensmittelsicherheit, da diese Produkte aufgrund veränderter Ernährungsgewohnheiten als Alternative zu Kuhmilch vermehrt konsumiert werden (Giugliano et al., 2023; Haas et al., 2019; Lopez et al., 2020; Sethi et al., 2016; Silva et al., 2020).

Im Gegensatz zu Milchprodukten tierischen Ursprungs, bei denen Mykotoxine entweder über den Transfer aus dem Futtermittel oder durch sekundäre Umweltkontaminationen während der Verarbeitung und Reifung in das Endprodukt gelangen können (Hymery et al., 2014; O'Brien et al., 2004; van Egmond, 1983), ist die Mykotoxinbelastung pflanzlicher Drinks auf die eingesetzten pflanzlichen Rohstoffe zurückzuführen (Miró-Abella et al., 2017).

Die Analyse von 73 pflanzlichen Drinks zeigte deutliche Unterschiede in den Kontaminationen zwischen verschiedenen Rohstoffgruppen. Während Sojagetränke kaum mit Mykotoxinen kontaminiert waren, stellten Hafer- und Mandeldrinks relevante Eintragswege für AFB₁, STC sowie T2/HT2-Toxine dar. Die Ergebnisse stimmen mit der bekannten Mykotoxinproblematik der jeweiligen Rohstoffe, eine AFB₁ Belastung in Mandeln (Bennett & Klich, 2003; Bhat et al., 2010; Boevre et al., 2012; Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2021; El tawila et al., 2013; European Food Safety Authority, 2007; European Food Safety Authority et al., 2020), sowie STC in Mandeln (Yassin et al., 2013), Hafer (Mol et al., 2016; Mol et al., 2015; Veršilovskis et al., 2008) und eine hohe T2/HT2 Toxin Prävalenz in Hafer (Edwards et al., 2009; Gottschalk et al., 2009; Kirinčič et al., 2015; Meng-Reiterer et al., 2016), überein.

AFB₁ wurde in 96 % der Mandeldrinks nachgewiesen, während 66 % gleichzeitig STC enthielten. Mandeln können mit verschiedenen *Aspergillus* Spezies kontaminiert sein (Rodrigues et al., 2012), weshalb möglicherweise verschiedene Toxine durch einen Befall mit verschiedenen Pilzen vorhanden sein können. In Haferdrinks hingegen wurden häufig STC und T2/HT2, aber kein AFB₁ gefunden. Einige *Aspergillus* Arten wie *A. nidulans* oder *A. versicolor*, besitzen nicht die genetische Fähigkeit, den Biosyntheseweg von STC zu AFB₁ fortzusetzen und akkumulieren daher STC (Ehrlich et al., 2005; Yu, 2012; Yu et al., 2004). In vielen pflanzlichen Drinks lagen Mehrfachkontaminationen vor. Mehr als die Hälfte der kontaminierten Drinks enthielten zwei oder mehr Mykotoxine, was zur toxischen Relevanz des Mykotoxinvorkommens in pflanzlichen Drinks beiträgt, da additive oder synergistische Effekte für mehrere

Mykotoxinkombinationen bekannt sind (Golli-Bennour et al., 2010; Hou et al., 2018; Zingales et al., 2024). Somit kann auch bei niedrigen Einzelkonzentrationen die kombinierte Exposition ein potenzielles Gesundheitsrisiko darstellen.

Die berechnete Ausschöpfung der tolerablen täglichen Aufnahme (TDI) zeigte für T2/HT2-Toxin bei einem hohen Konsumszenario (500 mL/Tag) eine Auslastung von bis zu 81 % (European Food Safety Authority, 2017), basierend auf dem höchsten nachgewiesenen Gehalt ($2.1 \mu\text{g/L}$). Bei AFB₁ und STC ist mangels TDI eine Minimierung gemäß ALARA-Prinzip (As Low As Reasonably Achievable) erforderlich. Obwohl die absoluten Mykotoxingehalte von AFB₁ und STC gering erscheinen, könnte der regelmäßige Konsum stark belasteter Produkte insbesondere bei Kindern oder für Personen, die Milch vollständig durch pflanzliche Drinks ersetzen, zu einer relevanten Exposition führen.

Ein weiterer relevanter Aspekt betrifft die bislang nur unzureichend beschriebenen Transferfaktoren von Mykotoxinen aus den pflanzlichen Rohstoffen in die Endprodukte. Die in pflanzlichen Drinks nachgewiesenen Mykotoxinkonzentrationen erlauben keine direkten Rückschlüsse auf die tatsächliche Belastung der eingesetzten Rohwaren, da Verarbeitungsschritte wie Mahlen, Einweichen, thermische Behandlung, enzymatische Hydrolyse und Filtration den Übergang einzelner Mykotoxine in das Endprodukt maßgeblich beeinflussen können (Mäkinen et al., 2016; Sethi et al., 2016; Silva et al., 2020). Da Mykotoxine wie AFB₁, OTA und STC gegenüber thermischen und technologischen Prozessen weitgehend stabil sind (Alshannaq & Yu, 2017), ist nicht von einer vollständigen Eliminierung während der Herstellung pflanzlicher Drinks auszugehen, sondern vielmehr von einer rohstoffabhängigen Verdünnung im Endprodukt. Bedingt durch die bekannten möglichen hohen Mykotoxingehalte der Rohwaren wie Mandeln (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2021; European Food Safety Authority, 2007; European Food Safety Authority et al., 2020) oder Hafer (Mol et al., 2016; Mol et al., 2015; Veršilovskis et al., 2008), könnte die Einhaltung gesetzlicher Höchstgehalte auf Rohwarenebene nicht zwangsläufig aus den Analysedaten der Endprodukte abgeleitet werden. Daher ist unklar, ob einzelne der untersuchten pflanzlichen Drinks aus Rohstoffen hergestellt wurden, die die geltenden Höchstgehalte für AFB₁ überschritten hätten, jedoch aufgrund geringer Transferquoten dennoch zu verkehrsfähigen Endprodukten führten. Diese Unsicherheit erschwert die Bewertung der tatsächlichen Exposition und verdeutlicht die Notwendigkeit, rohstoff- und produktspezifische Transferfaktoren zu erfassen, insbesondere für stark verarbeitete Lebensmittel wie pflanzliche Drinks. Studien an Getreide zeigen, dass gezielte Rohwarenbehandlungen die Mykotoxinbelastung bereits vor der Weiterverarbeitung reduzieren können. Für Hafer können mechanische

Aufbereitungsschritte wie Schälen oder Entspelzen insbesondere oberflächenassoziierte Mykotoxine wie z. B. *Fusarium* Toxine verringern (Schwake-Anduschus et al., 2010). Solche Maßnahmen könnten insbesondere für Produktgruppen mit hoher Prävalenz dieser Mykotoxine einen relevanten Beitrag zur Risikominimierung beitragen.

Zusätzlich wurden die pflanzlichen Drinks auf Rückstände von Pflanzenschutzmitteln, Schwermetallen und mikrobiologischen Kontaminanten untersucht. Pestizidrückstände wurden nur in Spuren gefunden, fast ausschließlich in biologisch produzierten Mandelgetränken, was den Eintrag über Umweltpersistenz vermuten lässt (Rathod et al., 2022). Die Schwermetallgehalte lagen zum Großteil im Bereich der Bestimmungsgrenze, wohingegen für Nickel höhere Konzentrationen, insbesondere in Sojadrinks, was mit der physiologischen Rolle von Nickel in Leguminosen übereinstimmt, detektiert wurden (Babaahmadifooladi & Jacxsens, 2021; Lavres et al., 2016). Mit Ausnahme einer Probe waren alle Produkte handelsüblich steril und frei von pathogenen Mikroorganismen.

Pflanzliche Drinks können eine zusätzliche Expositionsquelle für die Mykotoxine AFB₁, STC sowie T2/HT2 darstellen, vor allem bei kontinuierlichem Konsum größerer Mengen an pflanzlichen Drinks. Die Abhängigkeit der Kontamination von der verwendeten Rohwarenqualität, sowie fehlende Kenntnisse zu Transferfaktoren und das gemeinsame Vorkommen verschiedenen Mykotoxine, verdeutlichen, dass pflanzliche Drinks zukünftig in Monitoringprogramme einbezogen werden sollte, um eine belastbare Risikobewertung zu ermöglichen.

4.1.2 Mykotoxinanalyse in pflanzlichen Drinks

Neben dem Vorkommen verschiedener Mykotoxine in den Rohwaren und einem Übergang in die pflanzlichen Drinks, stellt auch die analytische Erfassung von Mykotoxinen in pflanzlichen Drinks eine Herausforderung dar, da diese Produkte komplexe Matrices mit Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und verschiedenen Zusatzstoffen aufweisen (Mäkinen et al., 2016; Sethi et al., 2016; Shephard, 2019; Stroka & Maragos, 2016; Yazdanpanah, 2011).

Daher wurde untersucht, inwieweit enzymimmunologische Schnelltests für die Bestimmung ausgewählter Mykotoxine in pflanzlichen Drinks geeignet sind und welche analytischen Einschränkungen sich im Vergleich zu chromatographisch-massenspektrometrischen Verfahren ergeben. Es wurde die Anwendbarkeit von Enzymimmunoassays (EIA) für den direkten Nachweis von AFB₁, STC, OTA, DON sowie T-2/HT-2-Toxinen in einer Vielzahl handelsüblicher pflanzlicher Drinks unterschiedlicher Rohstoffzusammensetzung untersucht. Die Analysen erfolgten ohne aufwendige Probenaufarbeitung, um den Einsatz der EIA als potenzielle

Screeningmethode zu bewerten. Die untersuchten pflanzlichen Drink-Matrices beeinflussten die EIA-Messungen in unterschiedlichem Ausmaß. Insbesondere Matrixeffekte führten zu Störungen der Signalantwort der EIA, sodass Verdünnungsschritte erforderlich waren, um auswertbare Messsignale zu erhalten. Diese Verdünnungen gingen jedoch mit einer Erhöhung der effektiven Nachweisgrenzen einher, wodurch die Sensitivität der EIA-Messungen eingeschränkt wurde. Zur analytischen Einordnung ausgewählter positiver EIA-Ergebnisse wurden ergänzende LC-MS/MS-Analysen durchgeführt. Dabei konnten einzelne Mykotoxine qualitativ bestätigt werden, jedoch zeigten sich deutliche Abweichungen zwischen den EIA-Signalen und den chromatographisch-massenspektrometrisch Ergebnissen. Diese Ergebnisse zeigen, dass immunologische Testergebnisse in pflanzlichen Drinks stark matrixabhängig sein können und eine Untersuchung der Notwendigkeit einer zusätzlichen Probenaufbereitung erforderlich ist.

Aufgrund der variablen Zusammensetzung der pflanzlichen Drinks, durch unterschiedliche pflanzliche Rohstoffe sowie Zusatzstoffe wie Öle, Emulgatoren, Stabilisatoren oder Kakao, stellen diese analytisch anspruchsvollen Matrices dar. Diese Inhaltsstoffe scheinen in immunologischen Testsystemen zu unspezifischen Effekten oder Kreuzreaktionen führen, deren Art und Ausmaß im Vorfeld nicht zuverlässig vorhergesagt werden kann.

Immunologische Schnelltests und ELISA-Systeme sind zwar als Screeningwerkzeuge weit verbreitet, ihre analytische Aussagekraft hängt jedoch von Antikörperspezifität, Zielanalyten und Probenmatrix ab (Alshannaq & Yu, 2017; Zhang et al., 2023).

Zhang et al. (2023) zeigten für verschiedene kommerzielle Teststreifen und ELISA-Kits zur Bestimmung von ZEN, OTA, DON, T-2-Toxin und Fumonisin B₁ in Getreidematrices hohe falsch-negative Ergebnisse sowie eine ausgeprägte Streuung der Messwerte insbesondere im Bereich niedriger Konzentrationen. Strukturell verwandte Mykotoxinderivate können zu Kreuzreaktionen führen und reale Probenmatrices können diese Effekte zusätzlich verstärken, was zu einer Über- oder Unterschätzung der Zielanalyten führen kann (Zhang et al., 2023). Zusätzlich können auch Kreuzreaktivitäten mit strukturell verwandten Metaboliten und modifizierter Mykotoxinen auftreten. Neben der Antikörperspezifität spielen dabei auch Matrixeffekte eine entscheidende Rolle, die in Pufferlösungen häufig unterschätzt werden (Nguyen et al., 2019).

Im Vergleich dazu bieten LC-MS/MS-basierte Verfahren eine höhere analytische Selektivität und durch den Einsatz isotoopenmarkierter interner Standards die Möglichkeit, Verluste zu kompensieren und robuste quantitative Ergebnisse zu erzielen (Capriotti et al., 2012; Turner et al., 2009; Vargas Medina et al., 2021)

Die Abweichungen zwischen EIA-Signalen und LC-MS/MS-Ergebnissen in pflanzlichen Drinks lassen vermuten, dass Produkte mit komplexen Zusammensetzungen analytische Interferenzen begünstigen, deren Art und Ausmaß im Vorfeld nicht zuverlässig vorhergesagt werden kann. Auch bei gut charakterisierten monoklonalen Antikörpern können geringe, aber relevante Kreuzreaktionen gegenüber nicht-Zielmykotoxinen auftreten (Garg et al., 2022).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass enzymimmunologische Verfahren für die Mykotoxinbestimmung in pflanzlichen Drinks derzeit nur als orientierende Screeningmethoden geeignet sind und ihre Resultate stets im Kontext der jeweiligen Matrix interpretiert werden müssen. Zwar bieten immunologische Tests den Vorteil einer schnellen und kostengünstigen Anwendung, ihre analytische Aussagekraft ist jedoch durch matrixabhängige Interferenzen sowie potenzielle Kreuzreaktionen limitiert, vor allem wenn sehr niedrige gesetzlich oder toxikologisch relevante Konzentrationen erfasst werden sollen. Die ergänzend durchgeführten LC-MS/MS-Bestätigungsanalysen leisten daher einen wesentlichen Beitrag zur analytischen Absicherung und zeigen, dass derzeit ohne chromatographisch-massenspektrometrische Verfahren Fehlinterpretationen bei der Mykotoxinbestimmung in pflanzlichen Drinks nicht ausgeschlossen werden können.

4.2 Mykotoxintransfer aus Futtermitteln

4.2.1 Mykotoxinvorkommen in Futtermitteln (unveröffentlicht)

Futtermittel stellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Rohstoffzusammensetzung komplexe Matrices dar. Das Mykotoxinvorkommen in Futtermitteln ist eng mit der Kontamination der eingesetzten pflanzlichen Rohstoffe verbunden (Bennett & Klich, 2003; Marin et al., 2013). Für die Einordnung des Mykotoxinvorkommens ist daher zunächst zu betrachten, inwieweit die eingesetzte Analysenmethode eine sensitive und zuverlässige Bestimmung in den untersuchten Futtermittelmatrixen ermöglicht.

4.2.1.1 Methodenvalidierung

Die zwischen Hafer und Mischfuttermitteln beobachteten Unterschiede in den Validierungsparametern verdeutlichen den Einfluss der Matrixzusammensetzung auf die analytische Leistungsfähigkeit der Methode. Die geringeren Wiederfindungsraten und höheren Bestimmungsgrenzen bei Mischfuttermitteln sind vermutlich auf deren höhere Matrixkomplexität zurückzuführen.

Für AFB₁ und OTA zeigen die LOD (0.01 µg/kg für AFB₁, 0.07 µg/kg für STC, 0.22 µg/kg für OTA) sowie die LOQ (0.03 µg/kg für AFB₁, 0.24 µg/kg für STC, 0.73 µg/kg für OTA) in Hafer eine hohe analytische Sensitivität und liegen in einem mit den Werten

anderer Studien vergleichbaren Bereich. Veršilovskis et al. (2008) zeigten in Hafer für STC eine LOD von 0.15 $\mu\text{g/kg}$ und eine LOQ von 0.30 $\mu\text{g/kg}$. Während Vidal et al. (2013) in Haferkleie eine LOD von 0.30 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$ und 0.2 $\mu\text{g OTA/kg}$, sowie eine LOQ von 0.90 $\mu\text{g AFB}_1/\text{kg}$ und 0.6 $\mu\text{g OTA/kg}$ berichten. Die Wiederfindungsraten schwankten je nach dotierter Konzentration für AFB₁ von 89 – 103 % und für OTA von 74 – 103 % (Vidal et al., 2013), wohingegen die Wiederfindungsraten dieser Methode weniger Streuung (siehe Tabelle 2) aufwiesen und somit auf eine höhere Richtigkeit und Präzision hindeuten.

Für Mischfuttermittel lagen die LOD (0.08 $\mu\text{g/kg}$ für AFB₁, 0.07 $\mu\text{g/kg}$ für STC, 0.25 $\mu\text{g/kg}$ für OTA) und LOQ (0.27 $\mu\text{g/kg}$ für AFB₁, 0.23 $\mu\text{g/kg}$ für STC, 0.83 $\mu\text{g/kg}$ für OTA) der jeweiligen Toxine höher als für Hafer, jedoch ausreichende niedrig, um relevante Kontaminationsgehalte zu erfassen. Für Futtermittel und Futtermittelrohstoffe konnten Binder et al. (2007) zwar etwas höhere Wiederfindungsraten (80 % für AFB₁, 85 % für OTA) als die Werte für diese Methode (78.75 % für AFB₁, 77.60 % für OTA) erreichen, jedoch war die Sensitivität geringer durch höhere LOQ-Werte (1 $\mu\text{g/kg}$ für AFB₁, 2 $\mu\text{g/kg}$ für OTA). Njobeh et al. (2012) untersuchten ebenfalls Mischfuttermittel und erzielten für AFB₁ eine Wiederfindungsrate (94 %) und LOD (0.05 $\mu\text{g/kg}$) sowie LOQ (0.15 $\mu\text{g/kg}$) in ähnlichen Bereich, wie die entwickelte Methode. Für OTA hingegen waren sowohl die Wiederfindungsrate (145 %), als auch LOD (2.7 $\mu\text{g/kg}$) und LOQ (4.6 $\mu\text{g/kg}$) deutlich unempfindlicher als die vorliegende Methode. Im Vergleich zu Driehuis et al. (2008), die eine LOQ von 50 $\mu\text{g/kg}$ für STC in Futtermittel für Milchkühe berichten, ist die entwickelte Methode für Mischfuttermittel sensibler bezüglich der STC Detektion. Kosicki et al. (2016) konnte für AFB₁ und OTA in Futtermittelrohstoffe geringfügig empfindlichere LOD (0.05 $\mu\text{g/kg}$ für AFB₁, 0.13 $\mu\text{g/kg}$ für OTA) und LOQ (0.15 $\mu\text{g/kg}$ für AFB₁, 0.40 $\mu\text{g/kg}$ für OTA) erreichen als in dieser Methode, was auf die geringe Komplexität der Matrix von Futtermittelrohstoffen im Vergleich zu fertig verarbeiteten Mischfuttermitteln zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die entwickelte Methode nach geeigneter Anpassung zuverlässig für die Analyse von AFB₁, STC und OTA in Hafer und Mischfuttermitteln anwendbar ist. Die erzielten Wiederfindungsraten, Präzisionswerte und Nachweisgrenzen liegen im Bereich der wenigen vergleichbarer Studien und übertreffen diese für einzelne Parameter, insbesondere hinsichtlich der Sensitivität für STC. Obwohl die Matrixkomplexität der Mischfuttermittel zu höheren LOQ- und LOD-Werten führte, ermöglicht die Methode dennoch eine sichere Detektion relevanter Kontaminationen. Damit stellt sie eine robuste und ausreichend sensitive Grundlage für das Monitoring von Mykotoxinen in Futtermitteln dar und bildet die Basis für die nachfolgenden Untersuchungen zum Vorkommen der Mykotoxine in Rohstoffen und Mischfuttermitteln.

4.2.1.2 Mykotoxinvorkommen

Die Ergebnisse der Futtermittelrohstoffe (STC 17 %, OTA 21 %, AFB₁ 6 %) zeigen im Vergleich zur aktuellen Untersuchung aller Futtermittelproben weltweit (STC 16 %, OTA 19 %, AFB₁ 22 %) (dsm-firmenich, 2025) eine ähnliche Prävalenz von STC und OTA, jedoch war die AFB₁-Prävalenz in den vorliegenden Proben niedriger als im dsm-firmenich Survey.

Die untersuchten Mischfuttermittelproben (STC 31 %, OTA 22 %, AFB₁ 34 %) weisen im Vergleich zu den Futtermittelrohstoffe (STC 17 %, OTA 21 %, AFB₁ 6 %) niedrigere Gehalte, dafür jedoch höheres Vorkommen von Mykotoxinen auf. Bei den Mischfuttermitteln zeigen die Ergebnisse eine ähnliche Prävalenz für AFB₁, ein vermehrtes Vorkommen von STC und eine niedrigere Prävalenz für OTA im Vergleich zu aktuellen Vorkommen von diesen Mykotoxinen in Mischfuttermitteln weltweit (STC 10 %, OTA 39 %, AFB₁ 33 %) (dsm-firmenich, 2025).

Im Vergleich über den Zeitraum von 2023 bis 2025 ist erkennbar, dass sowohl für STC, OTA und AFB₁ die Prävalenzen weltweit sowohl für alle Futtermittel, als auch für Mischfuttermittel jährlich ansteigen (dsm-firmenich, 2023, 2024, 2025). Im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen sind die nachgewiesenen Mykotoxingehalte hier deutlich höher (dsm-firmenich, 2023, 2024, 2025). Abidin et al. (2017) wiesen saisonabhängige größere Vorkommen sowie höhere Gehalte an OTA in Geflügelfutter (58 – 82 %), Mais (59 – 87 %), Sojabohnenmehl (50 – 81 %) und Sonnenblumenmehl (41 – 71 %), im Vergleich zu den untersuchten Proben, nach. In Wiederkäuerfutter wurden zwar STC-Konzentrationen (0.68 – 2.25 µg/kg) im ähnlichen Bereich wie in dieser Arbeit (0.07 – 1.63 µg/kg), jedoch enthielten alle Proben deutlich höhere AFB₁ Gehalte (29 – 240 µg/kg) (Biancardi & Dall'Asta, 2015). Die untersuchten Fischfutterproben enthielten zu 72 % sehr geringe AFB₁ Gehalte (0.08 – 0.34 µg/kg). Gonçalves-Nunes et al. (2015) fanden in Fischfutterrohstoffen wie Sojabohnenschalen (5.8 µg AFB₁/kg im Durchschnitt), Maiskleie (1.1 µg AFB₁/kg im Durchschnitt) und Getreide (7.4 µg AFB₁/kg im Durchschnitt) höhere AFB₁-Gehalte, jedoch in etwas geringer Probenanzahl (Sojabohnenschalen 40 % positiv, Maiskleie 33 % positiv, Getreide 60 % positiv). Von den untersuchten Fischfuttermitteln hingegen konnte nur in 16.7 % AFB₁ mit einem Mittelwert von 3.8 µg/kg nachgewiesen werden (Gonçalves-Nunes et al., 2015). Mwihi et al. (2020) fanden als Mykotoxin mit den höchsten Konzentrationen STC mit bis zu 3517 µg/kg in Fischfutter und Fischfutterrohstoffe, wobei nur 9 % der Proben eine STC-Kontamination aufwiesen. Bei AFB₁ waren es 29 % bei niedrigeren Gehalten von 14.7 – 43.6 µg/kg (Mwihi et al., 2020). Die Konzentrationen für STC und AFB₁ sind deutlich höher als für die in dieser Studie

untersuchten Fischfutterproben, auch wenn die Prävalenz mit 48 % STC und 72 % AFB₁ im Vergleich größer ist.

Mischfuttermittel sind häufiger mit mehreren Mykotoxinen (38.8 %), als mit nur einem Mykotoxin (8.8 %) kontaminiert (Hu et al., 2016). Hierbei konnten Hu et al. (2016) häufiger drei Mykotoxine, wie AFB₁, OTA, ZEN und AFB₁, OTA, STC, als zwei Mykotoxine in einer Probe nachweisen. Die Prävalenz von AFB₁ (32.5 %) und OTA (23.7 %) bestätigten die Ergebnisse der untersuchten Mischfuttermittel, wobei die von Hu et al. (2016) detektierten Konzentration höherer sind und auftraten wenn Weizen oder Mais in den Proben enthalten war. Aufgrund des Fehlens der Information bezüglich Inhaltsstoffe der untersuchten Mischfuttermittel kann dies leider nicht beurteilt werden. Kosicki et al. (2016) hingegen fanden in 69 % der Mischfuttermittel OTA mit bis zu 88 µg/Kg und in 5 % AFB₁ mit bis zu 1.31 µg/kg. Für Futtermittelrohstoffe wie Mais und Sojabohnenmehl berichten Nomura et al. (2018) Mittelwerte für STC von 1.2 µg/kg bzw. 0.63 µg/kg und bestätigen somit die STC Konzentrationen der in dieser Studie untersuchten Futtermittelrohstoffe. Für AFB₁ hingegen wiesen Nomura et al. (2018) höherer Gehalte in den Futtermittelrohstoffen (Mittelwert: Mais 3.9 µg/kg, Sojabohnenmehl 1.1 µg/kg) als in dieser Studie (max. 0.7 µg AFB₁/kg) nach. Im Vergleich fanden Nomura et al. (2018) bei den Mischfuttermitteln einen höheren Anteil an STC (43 %) und AFB₁ (47 %) mit ebenfalls höheren Konzentration (Mittelwert: 0.97 µg STC/kg und 1.6 µg AFB₁/kg) als in dieser Studie (AFB₁: 34 %, max. 0.34 µg/kg; STC: 31 %, max. 1.63 µg/kg).

Bei Getreidekörnern scheint Hafer anfällig für eine Kontamination mit STC zu sein (Mol et al., 2016). Bei den untersuchten Haferproben konnten nur in zwei der 97 Proben geringe Mengen STC, zwischen LOD (0.07 µg STC/kg) und LOQ (0.24 µg STC/kg), nachgewiesen werden. Wohingegen Mol et al. (2016) in 22 % der Haferkörnern bis zu 33 µg STC/kg detektiert haben. Auch Veršilovskis et al. (2008) fanden in 24 % der Haferproben STC zwischen 0.5 – 25 µg/kg. Zhao et al. (2020) berichten in Hafer eine Nachweisrate von 0.7 % für STC mit einem durchschnittlichen Gehalte von 0.1 µg STC/kg und bestätigen die Ergebnisse der in dieser Studie untersuchten Haferproben. Aufgrund variierender Analysenmethoden, unterschiedlicher Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und verschiedener Herkunft und Zusammensetzung der untersuchten Proben sind die bestimmten Prävalenzen und Mykotoxingehalte nur eingeschränkt direkt mit Literatur- und Survey-Daten vergleichbar, sodass die Gegenüberstellung primär der orientierenden Einordnung dient.

Insgesamt zeigt sich über alle untersuchten Matrices hinweg ein heterogenes Mykotoxinvorkommen, dass in Futtermittelrohstoffen mit 26 % und in Mischfuttermitteln mit 54 % deutlich unterschiedliche Prävalenzen aufweist. Während Futtermittelrohstoffe primär durch STC und OTA belastet waren, wurden in

Mischfuttermitteln vermehrt AFB₁ und STC gefunden. Die Gehalte der Kontaminationen waren überwiegend gering und lagen häufig zwischen LOD und LOQ, wobei Mehrfachkontaminationen sowohl in Rohstoffen (13 %) als auch in Mischfuttern (31 %) nachgewiesen wurden. In Hafer wurden lediglich zwei STC-Gehalte unter der Bestimmungsgrenze detektiert.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl Futtermittelrohstoffe als auch Mischfuttermittel relevante, wenn auch überwiegend niedrige Konzentrationen an AFB₁, STC und OTA enthalten können und Mehrfachkontaminationen regelmäßig auftreten.

Im Vergleich mit anderen Publikationen liegen die Gehalte zwar am unteren Rand der nachgewiesenen Konzentrationsbereiche, die Prävalenzen sind jedoch vergleichbar und unterstreichen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen. Die deutlich höhere Belastung in Mischfuttermitteln im Vergleich zu Rohstoffen lässt matrix- und prozessbedingte Eintragsquellen entlang der Produktionskette vermuten. Da ein großer Anteil der Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenzen liegen, ist ein sensibler analytischer Ansatz, wie die hier entwickelte Methode, erforderlich, um das tatsächliche Ausmaß der Kontaminationen erfassen zu können. Die Ergebnisse bestätigen, dass STC, OTA und AFB₁ relevante Kontaminanten im Futtermittelsektor darstellen und in zukünftigen Risikomanagementstrategien berücksichtigt werden sollten.

4.2.2 AFB₁ Verbleib in *Tenebrio molitor* Larven

Eigene Arbeiten konnten bestätigen, dass Futtermittel in unterschiedlichem Maße mit verschiedenen Mykotoxinen belastet sind. Daher stellt sich die Frage, was nach der Aufnahme mykotoxinbelasteter Futtersubstrate bei der Nutzung von Insekten als alternative Proteinquelle mit den Toxinen geschieht und ob daraus eine nicht vernachlässigbare Kontamination der Insektenbiomasse sowie der bei der Aufzucht anfallenden Rückstände (Frass/Substratreste) resultiert. Der Einsatz von Insekten als alternative Proteinquelle für Lebensmittel und Futtermittel gewinnt aufgrund ökologischer und ethischer Aspekte sowie einer ressourcenschonenden Lebensmittelproduktion zunehmend an Bedeutung (Dobermann et al., 2017; van Raamsdonk et al., 2017; Varelas, 2019). Während global häufig *Hermetia illucens* im Fokus steht, ist *Tenebrio molitor* unter mitteleuropäischen Bedingungen ebenfalls relevant, da für *T. molitor* bereits bei moderaten Aufzuchttemperaturen günstige Entwicklungsbedingungen beschrieben werden (Eberle et al., 2022), während *H. illucens* typischerweise höhere Temperaturen für optimale Aufzuchtbedingungen aufweist (Chia et al., 2018). Die Zucht und Gewinnung von essbaren Insekten als Lebens- und Futtermittel zeichnet sich durch einen niedrigen Wasser- und

Flächenverbrauch sowie eine hohe Effizienz in der Verwertung von Futtersubstraten aus. Gleichzeitig können auch Nebenströme der Lebensmittelindustrie als Substrate für die Insektenzucht genutzt werden (Dobermann et al., 2017; Varelas, 2019). Neben ernährungsphysiologischen und ökologischen Vorteilen rücken dabei auch lebens- und futtermittelsicherheitsrelevante Aspekte in den Fokus, da Insekten potenziell chemischen Kontaminanten wie Schwermetallen, persistenten Umweltkontaminanten oder Mykotoxinen ausgesetzt sein können (van der Fels-Klerx et al., 2018).

Die Empfindlichkeit gegenüber AFB₁-Exposition variiert stark zwischen verschiedenen Spezies, was vor allem auf artspezifische Unterschiede im Metabolismus zurückgeführt wird (Eaton et al., 2010; Wong & Hsieh, 1980).

Während der Metabolismus von AFB₁ in Säugetieren und Geflügel gut untersucht ist, liegen für Insekten bislang nur begrenzte Daten vor. Frühere Studien zum Verbleib von AFB₁ in Insekten beschränkten sich überwiegend auf Untersuchungen zur Toleranz, Akkumulation oder zum Nachweis einzelner bekannter Metaboliten und zeigten keine relevante Akkumulation, jedoch eine unvollständige Wiederfindung des aufgenommenen Toxins (Bosch et al., 2017; Camenzuli et al., 2018). Diese unvollständige Massenbilanz stellt eine zentrale Herausforderung für die analytische und toxikologische Einordnung dar, da sie sowohl durch eine Metabolisierung zu bislang unbekannten Transformationsprodukten als auch durch eine starke, potenziell irreversible Bindung von AFB₁ oder seiner bekannten Metabolite an die Insektenmatrix erklärt werden kann.

Daher ist nur die analytische Erfassung bekannter Metaboliten nicht ausreichend, um das verbleibende toxikologische Potenzial zuverlässig abzuschätzen. Die Kombination aus analytischen Verfahren und *in vitro*-Untersuchungen ist erforderlich, um den Verbleib und die potenzielle Relevanz nicht identifizierter Transformationsprodukte von AFB₁ in Insekten besser einordnen zu können (Camenzuli et al., 2018; Meijer et al., 2019).

Die Ergebnisse bestätigen die bekannte hohe Toleranz von *Tenebrio molitor* Larven gegenüber AFB₁-belastetem Futter, die auch für andere Insektenarten beschrieben wurde. Akute Endpunkte wie Mortalität oder Gewichtszunahme werden auch bei hohen Mykotoxinkonzentrationen häufig kaum beeinflusst, während chronische Langzeiteffekte aufgrund des kurzen Lebenszyklus von Insekten nur eingeschränkt erfassbar sind (Bosch et al., 2017; Camenzuli et al., 2018; Mancini et al., 2020; Niu et al., 2009). Die AFB₁ Konzentration des dotierten Getreides (10 mg/kg) wurde entsprechend gewählt, um ein Worst-Case-Szenario abzubilden, und orientierte sich an berichteten Maximalgehalten von AFB₁ in geerntetem Mais (bis 50 mg/kg) (Kamala et al., 2018).

Für die Risikoeinordnung können vorhandene Bewertungsansätze herangezogen werden. Für *Tenebrio molitor* als „novel food“ wird vom zuständigen EFSA-Panel eine Spezifikation für die Summe der Aflatoxine (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) vorgeschlagen (< 0.4 µg/kg), bei deren Einhaltung keine Sicherheitsbedenken gesehen werden (European Food Safety Authority et al., 2021). Die aus den Ergebnissen abgeleitete theoretische Transferrate (0.47 % aus dem Futter in die Larven) zeigt, dass die so erhaltenen AFB₁-Gehalte in den Larven (rund 50 µg/kg) die genannte Spezifikation um den Faktor 125 überschreiten würden. Unter der vereinfachenden Annahme eines linearen Zusammenhangs lässt sich daraus ableiten, dass AFB₁-Gehalte im Futtersubstrat von höchstens rund 85 µg/kg erforderlich wären, um AFB₁-Gehalte in den Larven unterhalb der EFSA-Spezifikationen (< 0.4 µg/kg) zu erwarten. Unabhängig davon ist zu berücksichtigen, dass AFB₁ als genotoxischer und kanzerogener Stoff grundsätzlich so niedrig wie möglich gehalten werden sollte (European Food Safety Authority et al., 2021).

Die *in vitro*-Untersuchungen mit Lebermikrosomen verschiedener Tierarten zeigen, dass sich sowohl das Ausmaß der Umsetzung als auch die relativen Anteile einzelner Phase-I-Metabolite zwischen den Tierarten deutlich unterscheiden. Diese artspezifischen Muster bestätigen den bekannten Metabolismus von AFB₁ in den einzelnen Tierarten, wobei Aflatoxin Q₁ (AFQ₁) als Hauptmetaboliten bei Ratten, AFM₁ und Aflatoxin P₁ (AFP₁) als relevante Metaboliten bei Rindern und AFM₁ und Aflatoxicol bei Schweinen auftritt (Degen & Neumann, 1978, 1981; Kuilman et al., 1998; Larsson et al., 1989; Lüthy et al., 1980; Thieu & Pettersson, 2009). Im Vergleich dazu zeigte sich für *Tenebrio molitor* ein deutlich abweichendes Metabolitenprofil, einschließlich der Bildung eines bislang nicht identifizierten monohydroxylierten Metaboliten. Da der Metabolit bislang nicht eindeutig strukturell aufgeklärt und nicht quantifiziert werden konnte, bleibt seine toxikologische Relevanz derzeit unklar. Selbst bei bekannter Struktur und Quantifizierung wären weitere Untersuchungen zur Toxizität und Bioverfügbarkeit erforderlich, um die toxikologische Relevanz einzuordnen. Die eingeschränkte strukturelle Charakterisierbarkeit des neuen Metaboliten verdeutlicht zugleich methodische Grenzen und den Bedarf an weiterführenden Untersuchungen zur metabolischen Transformation von Mykotoxinen in Insekten.

Die insgesamt geringe Wiederfindung von unverändertem AFB₁ und bekannten Metaboliten in Larven und dem Rückstand deutet darauf hin, dass ein erheblicher Anteil des aufgenommenen Toxins in analytisch nicht erfassbare Formen überführt wurde. Neben einer Metabolisierung kann hierfür auch eine starke Matrixbindung verantwortlich sein, sodass der Anteil im Rahmen der Extraktion nicht erfasst wird. Vergleichbare Beobachtungen einer unvollständigen Massenbilanz wurden bereits für andere Insektenarten beschrieben, wobei die berichteten Wiederfindungsraten

zwischen den Spezies erheblich variieren (Bosch et al., 2017; Camenzuli et al., 2018). Diese Unterschiede wurden auf artspezifische Unterschiede im Metabolismus und in der Exkretion von AFB₁ zurückgeführt (Camenzuli et al., 2018).

Zur Erklärung dieser „missing mass“ wird diskutiert, dass zunächst gebildete Metaboliten wie Aflatoxicol oder AFP₁ als Vorläufer reaktiver Zwischenprodukte dienen könnten, die kovalent an Makromoleküle binden und dadurch der analytischen Erfassung entzogen werden (Meijer et al., 2019). Hierbei ist das AFB₁-exo-8,9-Epoxid als reaktives Zwischenprodukt wichtig, da dessen kovalente Bindung an DNA und Proteine maßgeblich zur Toxizität und Mutagenität von AFB₁ beiträgt (Benkerroum, 2020). Die Bildung dieses Epoxids findet in Säugetieren hauptsächlich durch die Cytochrom-P450-Enzyme CYP1A2 und CYP3A4 statt (Yang et al., 2012).

Da entsprechende CYP-Enzyme bislang nicht für Insekten beschrieben wurden, bleibt unklar, in welchem Umfang klassische Bioaktivierungswege wie die Epoxidbildung in Insekten stattfindet (Feyereisen, 1999). Daher lässt sich vermuten, dass kovalente Bindungen von AFB₁ oder seinen Metaboliten an Proteine oder andere Matrixbestandteile im Insekt relevant sein und so zur beobachteten geringen Wiederfindung beitragen könnten. Darüber hinaus werden weitere Konjugationswege, etwa die Bildung von Glukosekonjugaten über Glucosyltransferasen vermutet, da diese Enzyme an der Metabolisierung von Xenobiotika in Insekten bekanntermaßen beteiligt ist (Bock, 2016).

Da die chemisch-analytische Erfassung nicht alle Transformationsprodukte von AFB₁ abbilden kann, wird die Bewertung des Verbleibs des Toxins durch toxikologische Untersuchungen ergänzt. Zur Abschätzung eines verbleibenden genotoxischen Potenzials wurde die Phosphorylierung von der Histonvariante H2AX (γ H2AX) als Surrogatmarker für DNA-Schädigungen herangezogen, da dieses Endpunkt den primären Wirkmechanismus von AFB₁ adressiert. Während freies AFB₁ erwartungsgemäß eine deutliche γ H2AX-Antwort induzierte, zeigten Extrakte aus Larven, die auf AFB₁-belastetem Futter gewachsen waren, keine erhöhte genotoxische Wirkung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dagegen wiesen Extrakte aus den Rückständen eine stärkere γ H2AX-Antwort auf, was auf die höheren Gehalte an AFM₁ und verbleibendem unmetabolisiertem AFB₁ im Rückstand zurückzuführen ist. Dies weist darauf hin, dass die Metabolisierung von AFB₁ in *Tenebrio molitor* mit einer Reduktion des genotoxischen Potenzials einhergeht. Vergleichbare Zusammenhänge zwischen intensiver Phase-I-Metabolisierung und verminderter Genotoxizität wurden bereits für Säugetiermodelle beschrieben (Guyonnet et al., 2002). Darüber hinaus ist bekannt, dass CYP-vermittelte Stoffwechselprozesse zur Verringerung der AFB₁-Toxizität für Insekten selbst beitragen können (Niu et al., 2008; Zeng et al., 2013; Zeng et al., 2006).

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass Insekten bei realistischen Expositionsniveaus in der Regel keine relevante Akkumulation von Mykotoxinen zeigen und akute Effekte auf Wachstum und Vitalität häufig ausbleiben, wobei artspezifische Unterschiede im Metabolismus eine wichtige Rolle spielen (Bosch et al., 2017; Camenzuli et al., 2018; Mancini et al., 2020; Niermans et al., 2023; Niermans et al., 2021; Niermans et al., 2024; Tao et al., 2025). Insekten als Futtermittel sind nicht isoliert zu betrachten, sondern als Teil einer komplexen Futter- und Lebensmittelkette. Während akute Effekte bei Insekten häufig ausbleiben, sind chronische Effekte, subletale Belastungen sowie mögliche Auswirkungen auf nachgeschaltete Tierarten bislang nur unzureichend untersucht. Die EU-Richtlinie 2002/32/EG über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung legt Höchstgehalte für einige Mykotoxine fest, um negative Effekte auf Tiergesundheit und Lebensmittelsicherheit zu vermeiden. Futtermittel deren Gehalt an einem unerwünschten Stoff den festgelegten Höchstgehalt überschreitet, dürfen nicht durch gezielte Verdünnung oder Vermischung zur Unterschreitung des Grenzwertes verwendet werden (Europäische Kommission, 2002a). Somit ist eine Nutzung stark AFB₁-belasteter Rohstoffe für die Insektenzucht, selbst bei nachgewiesener Metabolisierung und reduzierter genotoxischer Wirkung der resultierenden Insektenbiomasse, derzeit rechtlich nicht zulässig. Die geringe Massenbilanz von AFB₁ in *T. molitor* Larven sowie das reduzierte genotoxische Potenzial der Larvenextrakte lassen vermuten, dass die Metabolisierung von AFB₁ in Insekten mit Veränderungen des toxikologischen Profils einhergeht, die unter bestimmten Bedingungen eine potenziell detoxifizierende Wirkung entfalten können. Jedoch sind unbekannte Transformationsprodukte und artspezifische Metabolite bislang nur unzureichend toxikologisch bewertet und daher bestehen weiterhin Unsicherheiten (van der Fels-Klerx et al., 2018).

Das Wachstum von *Tenebrio molitor* auf stark AFB₁-belastetem Futter führt zu sehr geringen Anteilen von AFB₁ als freiem Toxin oder bekannten Phase-I-Metaboliten sowie zu einem sehr geringen verbleibenden genotoxischem Potenzial der Larven in den eingesetzten *in vitro*-Modellen. Daher lässt sich vermuten, dass die Nutzung AFB₁-belasteter Substrate über Insekten grundsätzlich möglich sein könnte, sofern regulatorische Rahmenbedingungen, insbesondere zur Festlegung maximal zulässiger AFB₁-Gehalte im Futtersubstrat, definiert werden und weiterführende Untersuchungen zu Metabolismus, Bioverfügbarkeit und möglichen Kombinationseffekten verschiedener Mykotoxine entlang der Futter- und Lebensmittelkette erfolgen.

4.2.3 Untersuchungen zum Transfer von Sterigmatocystin in Milch (unveröffentlicht)

Der mögliche Transfer von Mykotoxinen aus kontaminierten Futtermitteln in Lebensmittel tierischen Ursprungs kann zu einer indirekten Exposition des Menschen beitragen, wobei Milch und Milchprodukte besonders relevant sind (Becker-Algeri et al., 2016; Flores-Flores et al., 2015; Richard, 2007; Tolosa et al., 2021). Zur Einordnung eines möglichen Transfers von STC werden im Folgenden zunächst die Leistungsfähigkeit der eingesetzten Analysenmethode und anschließend die Ergebnisse des Transferversuchs diskutiert.

4.2.3.1 Methodenvalidierung

Die Validierungsergebnisse zeigen, dass die angepasste LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von AFB₁, STC und OTA in Milch und Urin geeignet ist. Die Wiederfindungsraten der drei Analyten waren in Milch etwas niedriger als in Urin, während für Milch niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erreicht wurden (Tabelle 7 und Tabelle 8). Für Milch waren die Wiederfindungsraten 70.7 % für AFB₁, 66.8 % für STC und 67.7 % für OTA. Diese Wiederfindungsraten sind vergleichbar mit anderen LC-MS/MS basierten Methoden zur Mykotoxinbestimmung in Milch. Andrade et al. (2013) berichteten für Muttermilch Wiederfindungsraten von 77.4 % für AFB₁ und 77.6 % für OTA, während Flores-Flores and González-Peñas (2017) für Kuhmilch Wiederfindungen von 88.5 % für AFB₁ und 84.7 % für OTA erzielten. L. C. Huang et al. (2014) konnten in Rohmilch eine Wiederfindungsrate von OTA von 95.9 % erreichen und Fan et al. (2015) sogar 100.7 % für AFB₁ in Milch. Die geringfügig niedrigeren Wiederfindungsraten der vorliegenden Methode sind vermutlich auf die gleichzeitige Multianalytenbestimmung ohne zusätzliche selektivere Aufreinigungsverfahren, wie beispielweise Immunoaffinitätssäulen, zurückzuführen.

Die erreichten LOD und LOQ für Milch weisen eine hohe analytische Sensitivität auf (Tabelle 7). Andrade et al. (2013) berichten eine LOQ von 0.01 ng/mL für OTA und 0.01 ng/mL für AFB₁, während Z. Zhang et al. (2019) eine LOD von 0.03 ng/mL und eine LOQ 0.1 ng/mL für OTA in Milch angaben, auch Flores-Flores and González-Peñas (2017) erreichten eine LOD im ähnlichen Bereich (0.02 ng/mL für AFB₁, 0.2 ng/mL für OTA). L. C. Huang et al. (2014) berichten für OTA eine LOD von 0.004 µg/kg und eine LOQ von 0.012 µg/kg, während Fan et al. (2015) für AFB₁ eine LOD von 0.005 µg/kg und eine LOQ von 0.1 µg/kg berichten. Die höheren LOD und LOQ für OTA und AFB₁ in der vorliegenden Methode sind vermutlich ebenfalls auf eine fehlende selektivere Probenaufreinigung im Vergleich zu den anderen Methoden zurückzuführen.

Für Urin waren die Wiederfindungsraten 75.8 % für AFB₁, 73.6 % für STC und 72.1 % für OTA. Solfrizzo et al. (2011) berichten Wiederfindungsraten von 60–80 % für OTA in Humanurin und etwa 71 % in Schweineurin. Z. Zhang et al. (2019) erzielten für OTA Wiederfindungen von 75–88 % in Urin von Milchkühen. Auch Takagi et al. (2018) berichteten für STC in Pferdeurin Wiederfindungen von 70–73 % und bestätigen die Ergebnisse der Studie, wohingegen Fushimi et al. (2014) Wiederfindungsraten von 90–93 % für STC in Rinderurin angeben.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Urin (LOD: AFB₁ 0.06 ng/mL, STC 0.05 ng/mL, OTA 0.78 ng/mL; LOQ: AFB₁ 0.20 ng/mL, STC 0.17 ng/mL, OTA 2.57 ng/mL) liegen höher als in Milch, was auf die erhöhte Matrixkomplexität sowie die enzymatische Hydrolysephase zurückzuführen ist. Fushimi et al. (2014) berichten für STC in Rinderurin eine LOD von 0.01 mg/kg, während Takagi et al. (2018), Z. Zhang et al. (2019) und Solfrizzo et al. (2011) niedrigerer Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für STC in Pferdeurin (LOD 0.05 ng STC/mL, LOQ 0.1 ng STC/mL), OTA in Rinder- (LOD 0.1 ng OTA/mL, LOQ 0.2 ng OTA/mL), Schweine- und Menschenurin (LOD 0.01 ng OTA/mL, LOQ 0.02 ng OTA/mL). Im Vergleich zu Studien die Immunoaffinitätssäulen einsetzen (Ahn et al., 2010; Debegnach et al., 2020), weist die vorliegende Methode erwartungsgemäß etwas höhere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen auf. Jedoch ermöglicht der Verzicht auf eine IAC-Aufreinigung eine simultane Bestimmung mehrerer Mykotoxine und potenzieller Metabolite bei akzeptabler Sensitivität und guter Reproduzierbarkeit.

Insgesamt zeigen die Validierungsergebnisse, dass die entwickelte Methode eine robuste, präzise und ausreichend sensitive Analytik für Milch- und Urinproben darstellt und somit für die Untersuchung des Transfers von STC im Rahmen der vorliegenden Tierstudie geeignet ist.

4.2.3.2 Transferproben

Die Ergebnisse des Transferversuchs zeigen, dass STC in keiner der 168 untersuchten Milchproben nachgewiesen wurde, während in zwei von acht Urinproben am späteren Probenahmezeitpunkt sehr geringe STC-Konzentrationen von 0.18 ng/mL beziehungsweise 0.20 ng/mL detektiert wurden. Monohydroxylierte STC-Metabolite waren weder in den Milch- noch in den Urinproben nachweisbar.

STC ist strukturell eng mit AFB₁ verwandt und stellt eine direkte biosynthetische Vorstufe dar, unterscheidet sich jedoch durch das Vorhandensein einer Xanthonstruktur anstelle der Cumarinstruktur von AFB₁ (Diaz Nieto et al., 2018; Wong et al., 1977; Yu et al., 2004). Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeit weisen beide Mykotoxine Unterschiede in ihrer Bioaktivierung und Metabolisierung auf. Während AFB₁ primär durch Cytochrom-P450-Enzyme zu einem hochreaktiven 8,9-Epoxid

metabolisiert wird (Deng et al., 2018; Dohnal et al., 2014; Guengerich et al., 1998; Guengerich et al., 1996; Rawal et al., 2010), erfolgt die metabolische Aktivierung von STC überwiegend über eine Hydroxylierung des aromatischen Rings zu Catechol-Metaboliten, während die Epoxidbildung eine untergeordnete Rolle spielt (Applebaum et al., 1982; Kiessling, 1986; Pfeiffer et al., 2014; Wong et al., 1977).

In vivo Daten zur Absorption, Metabolisierung und Exkretion von STC bei Wiederkäuern sind bislang äußerst begrenzt (European Food Safety Authority, 2013). Analog zu AFB₁ ist jedoch davon auszugehen, dass STC nach oraler Aufnahme zumindest teilweise im Gastrointestinaltrakt absorbiert wird. Bei einem Absorptionsversuch von STC in Grünmeerkatzenaffen, betrug die maximale Resorptionsrate aus dem Gastrointestinaltrakt nicht mehr als 30 % der applizierten Dosis (Steyn & Thiel, 1976). Im Gegensatz zu AFB₁, dessen *carry-over* in Milch in Form von AFM₁ gut dokumentiert ist (Akbar et al., 2020; Flores-Flores & González-Peñas, 2018a, 2018b; Flores-Flores et al., 2015; Tolosa et al., 2021), fehlen für STC bislang eindeutige Hinweise auf einen vergleichbaren Transfermechanismus in Milch (European Food Safety Authority, 2013).

Die fehlende Detektion von STC in allen Milchproben dieser Studie spricht dafür, dass entweder keine relevanten Mengen unmetabolisiertem STC vorlagen oder dass STC bzw. seine Metabolite nicht in die Milch abgegeben werden. van Egmond et al. (1978) untersuchten den Übergang von STC aus dem Futter in zwei Milchkühe, wobei über zwei Wochen etwa 5-10 mg STC pro Tag über das Futter aufgenommen wurde. Es konnte keine STC in der Milch (LOD 1 µg STC/kg Milch) nachgewiesen werden (European Food Safety Authority, 2013). Bei Wiederkäuern stellt der Pansen einen bedeutenden Faktor für die systemische Verfügbarkeit xenobiotischer Substanzen dar. Die ruminale Mikrobiota kann Mykotoxine teilweise metabolisieren oder in ihrer Bioverfügbarkeit reduzieren, wodurch der Übergang in den systemischen Kreislauf und folglich in die Milch beeinflusst wird (Blank, 2002; Fink-Gremmels, 2008b; Mobashar et al., 2010). Für OTA ist bekannt, dass die mikrobielle Aktivität im Pansen zu einer Detoxifikation beiträgt und der Transfer in die Milch dadurch nahezu vernachlässigbar wird (Hult et al., 1976; Shreeve et al., 1979). Für STC liegen bislang keine spezifischen Untersuchungen zur ruminalen Stabilität oder mikrobiellen Umwandlung bei Wiederkäuern vor (European Food Safety Authority, 2013).

Die Detektion sehr geringer STC-Konzentrationen im Urin einzelner Tiere am späteren Probenahmezeitpunkt deutet darauf hin, dass STC in geringem Umfang systemisch verfügbar gewesen sein muss und zum Teil renal ausgeschieden wurde. Die Proben wurden im Rahmen der validierten Methode enzymatisch mit β-Glucuronidase/Sulfatase inkubiert, sodass auch potenziell konjugierte STC-Formen miterfasst werden konnten. Die β-Glucuronidase katalysiert die Hydrolyse konjugierter

Mykotoxine, wie Sulfat- und Glucuronidkonjugate, welche für die Analytik mancher Mykotoxine, die überwiegend zu Phase-II-konjugierten Formen metabolisiert werden, relevant ist (Cao et al., 2018; Föllmann et al., 2016; Rodríguez-Carrasco et al., 2017; Slobodchikova et al., 2019; Solfrizzo et al., 2011; Vidal et al., 2018). Das STC-Glucuronid-Konjugat ist der einzige STC-Metabolit, der bisher bekanntermaßen mit dem Urin ausgeschieden wird (James J. Olson & Fun Sun Chu, 1993; James J Olson & Fun S Chu, 1993; Thiel & Steyn, 1973). Solche Konjugationsreaktionen erhöhen die Wasserlöslichkeit durch Erhöhung der Polarität und erleichtern die Ausscheidung aus dem Körper (Järvinen et al., 2022; Li et al., 2020; Sallustio, 2008; Woelflingseder et al., 2019).

Aufgrund der nicht vorhandenen Daten bezüglich der Absorptionsrate oder systemischen Bioverfügbarkeit von STC bei Wiederkäuern, lassen die sehr niedrigen im Urin gemessenen Konzentrationen vermuten, dass entweder eine geringe orale Bioverfügbarkeit von STC bei Wiederkäuern vorliegt oder eine rasche Metabolisierung und Exkretion stattgefunden hat.

Im Vergleich zu AFB₁, dessen Transfer in Milch bei Wiederkäuern zwischen 2 und 6 % beschrieben ist (Aranda et al., 2025; Flores-Flores et al., 2015; Kamkar et al., 2008; Manetta et al., 2009; Morandi et al., 2022; Muñoz et al., 2010; Rico-Munoz et al., 2019), scheint STC andere Voraussetzungen für einen möglichen *carry-over* in Milch aufzuweisen. Dies könnte sowohl auf Unterschiede in der Molekülstruktur als auch auf unterschiedliche Metabolisierungs- bzw. Bioaktivierungswege zurückzuführen sein (Applebaum et al., 1982; Deng et al., 2018; Kiessling, 1986; Pfeiffer et al., 2014; Theumer et al., 2018; Wong et al., 1977).

Der Transfer von Mykotoxinen in die Milch wird nicht ausschließlich durch die hepatische Metabolisierung bestimmt, sondern auch durch aktive Transportprozesse in der Milchdrüse (Borst & Elferink, 2002; Fink-Gremmels, 2008a; Herwaarden et al., 2005; Merino et al., 2006). Die Übertragung von Substanzen in die Milch wird durch Molekulargewicht, Lipophilie und Plasmaproteinbindung bestimmt. Polare Substanzen und große Moleküle können die Barriere nicht durch passive Diffusion überwinden und nur der ungebundene Anteil kann transportiert werden (Fink-Gremmels, 2008a). Ob STC oder dessen Metabolite, vergleichbar zu AFM₁ durch die Transporter in die Milch gelangen (Herwaarden et al., 2005), ist bisher nicht bekannt. Aufgrund von möglichen Unterschieden in der Transporteraffinität, Proteinbindung oder Struktur, könnte trotz struktureller Nähe zu AFB₁ kein nachweisbarer Übergang von STC in die Milch stattfinden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass STC unter den hier untersuchten Bedingungen kein relevantes Risiko für einen direkten Übergang aus Futtermitteln in Milch darstellt. Dennoch ist aufgrund des bekannten toxischen und kanzerogenen Potenzials von STC

(Bünger et al., 2004; European Food Safety Authority, 2013; Gao et al., 2015; S. Huang et al., 2014; Liu et al., 2014; Pfeiffer et al., 2014) sowie möglicher synergistischer Effekte mit anderen Mykotoxinen (Diaz Nieto et al., 2018; Zingales et al., 2024; Zouaoui et al., 2016) eine weiterführende toxikokinetische Charakterisierung erforderlich.

4.3 Tierische Lebensmittel – Käse

4.3.1 Mykotoxinanalyse in Käsematrix

Mykotoxine können tierische Lebensmittel sowohl indirekt über den *carry-over* aus kontaminiertem Futter in Milch und Milchprodukte als auch direkt durch Kontaminationen entlang der Herstellung und Reifung kontaminieren (Hymery et al., 2014; O'Brien et al., 2004; van Egmond, 1983).

Die Mykotoxinanalytik stellt aufgrund der geringen Konzentrationen, der Vielfalt an chemischen Strukturen und deren gemeinsamen Vorkommens eine Herausforderung dar (Shephard, 2019; Stroka & Maragos, 2016; Yazdanpanah, 2011). Viele Mykotoxine, wie Aflatoxine, binden an Milchprotein, wodurch die Extraktion und somit die Bestimmung erschwert wird (Barbiroli et al., 2007; Granados-Chinchilla, 2016). Zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität der Extraktion können in der Mykotoxinanalytik die Festphasenextraktion (SPE) oder Immunaффinitätssäulen (IAC) verwendet werden (Alshannaq & Yu, 2017; Hu et al., 2016; Spanjer et al., 2008; Turner et al., 2009). Durch den Einsatz von IAC oder SPE wird jedoch der Arbeits- und Zeitaufwand erhöht, weshalb als Kompromiss eine Methode basierend auf dem QuEChERS-Ansatz gewählt wurde. Zur Kompensation der Verluste und zur Erhöhung der Spezifität der Bestimmung wurden stabile isotoπenmarkierte interne Standards basierend auf dem Ansatz der Isotoπenverdünnungsanalytik (Rychlik & Asam, 2008) verwendet. Da sich der analytische Fokus auf wenige, toxikologisch charakterisierte Mykotoxine konzentriert, sind isotoπenmarkierte Standards bislang nur für ausgewählte Verbindungen kommerziell verfügbar und stehen insbesondere nicht für biosynthetische Vorläuferverbindungen zur Verfügung.

Die Methodenentwicklung zeigte, dass die simultane Quantifizierung von AFB₁, STC und OTA in Käse durch Matrixeffekte, wie die Affinität verschiedener Mykotoxine zu Milchproteinen (Barbiroli et al., 2007; Granados-Chinchilla, 2016), zu analytischen Verlusten führen kann. Durch den Einsatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Keeper-Reagenz während der Aufkonzentrierung konnten weitere Verluste während der Probenaufarbeitung reduziert werden, wodurch die Sensitivität trotz isotoπenmarkierter interner Standards nicht zusätzlich verringert wird. Innerhalb der inhomogenen Produktgruppe Käse, können die Wiederfindungsraten zwischen den Käsesorten variieren. In Abhängigkeit von der Matrixzusammensetzung, wies

Hartkäse, welcher einen geringeren Wassergehalt, sowie eine dichtere Protein- und Fettstruktur besitzt (Dipartimento delle Politiche Competitive della Qualità Agroalimentare Ippiche e Della Pesca, 2019; Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, 2017), höhere Verluste als Blauschimmelkäse auf. Isotopenmarkierte interne Standards können Extraktionsverluste nur ausgleichen, wenn eine Angleichung mit dem Analyten und somit das Prinzip der Isotopenverdünnungsanalyse möglich ist, gebundene Mykotoxinanteile können nicht erfasst werden und bei komplexen Matrices ist von einer potenziellen Unterschätzung auszugehen. In der Literatur wurden für verschiedene Mykotoxine, wie OTA, Zearalenon und Alternariol, eine Bindungsaffinität zu Serumalbumin beschrieben (Faisal et al., 2018; Fliszár-Nyúl et al., 2019; Hagelberg et al., 1989; Poór et al., 2014). Für Aflatoxine, wie AFM₁, sind Komplexbildungen mit Molkenproteinen oder Caseinen bekannt (Brackett & Marth, 1982; Carlos et al., 2024; Jiménez-Pérez et al., 2020; Kamkar et al., 2008). Poór et al. (2025) konnten eine höhere Affinität von AFM₁, ZEN und α -Zearalenol zu Casein im Vergleich zu den Molkenproteinen zeigen. Für die entsprechenden Rinderserumalbuminkomplexe waren die Bindungskonstanten noch höher, jedoch sind aufgrund der vergleichsweise geringen Rinderserumalbumin Konzentrationen in Kuhmilch diese Bindung nur von geringer praktischer Bedeutung (Poór et al., 2025).

Trotz dieser matrixbedingten Herausforderungen lagen die erreichten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für STC und AFB₁ im Bereich bzw. unterhalb bereits publizierter Methoden, während für OTA eine vergleichbare Sensitivität erreicht wurde, obwohl keine zeitaufwendige Immunaffinitätssäulen- oder Festphasenextraktion eingesetzt wurden (Altafini et al., 2021; Kokkonen et al., 2005; Marley et al., 2015; Pattono et al., 2013; Versilovskis et al., 2009). Somit bietet die entwickelte Methode eine ausreichende Sensitivität bei gleichzeitiger Effizienz für die Untersuchung relevanter Mykotoxine in Käse.

Die Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung, die der unabhängigen Validierung der entwickelten Methode diene, deuten auf eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Labore hin und bestätigen die Genauigkeit und Präzision der Methode. Die höheren relativen Reproduzierbarkeits-Standardabweichungen bei AFM₁ im Vergleich zu OTA verdeutlichen, dass geringe Konzentrationen von Mykotoxinen in komplexen Matrices wie Milchprodukten schwerer zu analysieren sind. Dies ist möglicherweise auf Proteinbindungen der Mykotoxine zurückzuführen. Die Laborvergleichsuntersuchung zeigt, dass die Ergebnisse der Methodvalidierung tendenziell höhere analytische Verluste beim Hartkäse aufweisen, womit eine Matrixabhängigkeit der Methode naheliegt und somit eine gewisse Unterschätzung des tatsächlichen Toxingehaltes möglich ist. Die robusten Standardabweichungen der

Messergebnisse liegen innerhalb der Zielwerte, was die Reproduzierbarkeit der Methode im Vergleich zu anderen Methoden bestätigt. Die entwickelte Methode liefert realistische, wenn auch möglicherweise unterschätzte Konzentrationswerte in komplexen Matrices, wie Käse. Insgesamt bestätigt die Laborvergleichsuntersuchung, dass die entwickelte QuEChERS-basierte Methode eine zuverlässige Alternative zu aufwändigeren Verfahren, wie der Verwendung von Immunaффinitätssäulen, darstellt und sie aufgrund der Sensitivität und Spezifität für Analysen verschiedener toxikologisch relevanter Mykotoxine in Käse geeignet ist.

4.3.2 Mykotoxinvorkommen in Käse

Das Vorkommen von Mykotoxinen in Käse hat Besorgnis bezüglich der Lebensmittelsicherheit und der Gesundheit der Verbraucher verursacht (Arce-López et al., 2024; Coton et al., 2019; Hymery et al., 2014). Faktoren wie die Verwendung von kontaminierter Milch, Umweltbedingungen und Lagerpraktiken können während der Käseproduktion das Wachstum von Mykotoxin bildenden Pilzen begünstigen und den Übergang von Mykotoxinen in den Käse ermöglichen (Pattono et al., 2013). Mykotoxine können auch im Endprodukt vorhanden sein, selbst wenn die Schimmelpilze von der Oberfläche des Käselaibs entfernt werden (Wang et al., 2023). Die Untersuchung von 62 handelsüblichen Käseproben zeigte eine heterogene Mykotoxinbelastung, wobei in den meisten Käsesorten keine Mykotoxine detektiert wurden, während bei den geriebenen Grana-Typ Käseproben in 80 % der Proben Mykotoxine nachgewiesen wurden.

STC wurde in allen positiven Proben, in niedrigen Konzentrationen (unter 1 $\mu\text{g/kg}$), nachgewiesen, nur eine Grana-Typ Käseprobe wies fast 5 $\mu\text{g/kg}$ STC auf. OTA wurde nur in Proben, die ebenfalls STC enthielten, jedoch in höheren Konzentrationen ($4.84 \pm 0.48 \mu\text{g/kg}$; $26.56 \pm 1.64 \mu\text{g/kg}$) gefunden. Die vergleichsweise hohen OTA-Gehalte liegen im Bereich der in anderen Studien für OTA in Käse berichteten Konzentrationen (Altafini et al., 2021; Biancardi et al., 2013; Pattono et al., 2013). Während ältere Studien zu Kontaminationen in den äußeren Käsebereichen deutlich höhere STC-Konzentrationen berichteten (Abd Alla et al., 1996; Lafont et al., 1979; Northolt et al., 1980; Van Egmond & Northolt, 1981), fanden Versilovskis et al. (2009) STC-Kontaminationen in ähnlichen Konzentrationen wie in der vorliegenden Publikation. Der gleichzeitige Nachweis von STC und OTA in denselben Proben spricht dafür, dass der Käse mit unterschiedlichen Schimmelpilzarten kontaminiert gewesen sein könnte, da STC- und OTA-bildende Arten in der Literatur überwiegend unterschiedlichen taxonomischen Gruppen zugeordnet werden (Gil-Serna et al., 2011; Rank et al., 2011).

Zahlreiche Vorkommen von OTA in geriebenem Grana-Typ Käse unterstreichen die Bedeutung dieses Toxins für die Bewertung von geriebenem Hartkäse (Pavicich et al., 2024; Rodríguez-Cañás et al., 2023).

Aufgrund der hydrolytischen Aktivität der Pansenbakterien ist nur ein minimaler Transfer von OTA aus dem Futter in die Milch von Wiederkäuern zu erwarten (Blank, 2002; Fink-Gremmels, 2008b; Mobashar et al., 2010; Shreeve et al., 1979), sodass das Vorkommen von OTA im Käse vermutlich auf Wachstum von Pilzen auf der Käseoberfläche zurückzuführen ist. Zusätzlich wurden trotz ausreichender analytischer Sensitivität keine Metabolite, wie AFM₁, nachgewiesen, die für einen Transfer von Toxinen aus dem Futter in die Milch sprechen würden. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Mykotoxinkontaminationen des Käses überwiegend auf Umweltkontamination während der Käseherstellung und Reifung zurückzuführen sind und nicht aus der Milch stammen. Gemäß den produktspezifischen Richtlinien für Grana-Typ Käse, dürfen geriebene Produkte bis zu 18 % Rindenanteil enthalten (Europäische Kommission, 2023a). Pietri et al. (2022) zeigten für Grana-Typ Käselaike, dass STC und OTA vor allem auf der Rinde gebildet werden und der Mykotoxingehalt von der Oberfläche zu den inneren Bereichen der Rinde deutlich abnimmt. Konsistent damit wurde auch berichtet, dass die Migration von Mykotoxinen in das Käseinnere nur in geringem Umfang erfolgt (Coton et al., 2019; Lafont et al., 1979; Northolt et al., 1980). Folglich kann die Verwendung kontaminierter Rinde bei der Herstellung geriebener Käseprodukte zu erhöhten OTA- und STC-Gehalten im Endprodukt führen (Pietri et al., 2022). *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten können die Käseoberfläche besiedeln und/oder in die Käsematrix eindringen, was zur Akkumulation von Mykotoxinen im Käse führen kann (Camardo Leggieri et al., 2020; Massarolo et al., 2024; Pavicich et al., 2024). Für STC wurde eine Migration bis 0.5 cm, für OTA bis 1.6 cm und für Aflatoxine bis 2–4 cm von der Käseoberfläche beschrieben (Blanco et al., 1988; Coton et al., 2019; Dobson, 2017; Sweeney & Dobson, 1998). Die Luft in der Produktionsanlage dient als primäre Quelle für die Schimmelpilzkontamination während der Reifung und Lagerung, während die Salzlake als Reservoir für Schimmelpilze wirken kann (Meucci et al., 2025).

Da die Mykotoxinbildung aufgrund unterschiedlicher ökologischer Szenarien auftreten kann, ist der Mechanismus der Mykotoxinproduktion in Käse noch nicht vollständig geklärt. Sie kann als chemisches Signal für Kommunikation sowie als Wettbewerbsstrategie dienen, oder um das Habitat gegen Mikroorganismen derselben trophischen Nische zu verteidigen. Zusätzlich zur Pilzgemeinschaft sind die physikochemischen Eigenschaften des Substrats entscheidend für die Mykotoxinproduktion (Aranda et al., 2025; Casquete et al., 2018; Elkak et al., 2012; Pascual et al., 1997). Bestimmende Faktoren für die Mykotoxinproduktion sind die

Temperatur (Casquete et al., 2018) und die Wasserverfügbarkeit, die das Wachstum und den Metabolismus der Pilze entscheidend beeinflusst (Gervats et al., 1988; Noori et al., 2012; Scott, 1981). Für die Sporenbildung in der Käsematrix ist das Zusammenspiel von Wasseraktivität und Temperatur über die Zeit entscheidend (Aranda et al., 2025; Camardo Leggieri et al., 2018; Erdogan et al., 2003; Iha et al., 2013). Da der Pilz während der Käsereifung ein geeignetes Umfeld für Sporulation, Wachstum und Mykotoxinproduktion hat, ist das Verständnis der Pilzsporulation als primäre Inokulumquelle für die Käsekolonisation entscheidend (Iha et al., 2013). Die Reduktion von Temperatur und Wasseraktivität während der Reifung und in der Käserinde kann das Wachstum und die Sporulation mykotoxinbildender Pilze begrenzen, jedoch ist die Mykotoxinbildung artspezifisch und kann unter bestimmten Bedingungen mehr oder weniger stark reduziert sein (Camardo Leggieri et al., 2018; Decontardi et al., 2017; Pardo et al., 2006).

Da nicht nur die Häufigkeit des Vorkommens, sondern auch die toxikologischen Eigenschaften der nachgewiesenen Mykotoxine die gesundheitliche Relevanz bestimmen, ist eine Bewertung der individuellen und kombinierten Wirkungen unerlässlich. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass Mehrfachkontaminationen eher die Regel als die Ausnahme sind und 60 - 100 % der Lebensmittel mehrere Mykotoxine enthalten können (Biomin, 2021; Streit et al., 2012; Zingales et al., 2024). Bislang sind Kombinationstoxizitäten unzureichend betrachtet worden. Da Interaktionen die Wirkung einzelner Substanzen sowohl verstärken als auch abschwächen können, ist die Toxizität von Mykotoxinmischungen schwer abzuschätzen (Karsauliya et al., 2022; Speijers & Speijers, 2004). Mehrere Studien zeigen, dass Mykotoxine nahe den *no effect* Levels überwiegend additive oder synergistische Effekte hervorrufen (Grenier & Oswald, 2011; F. Maranghi et al., 2018; Smith et al., 2016; Tammer et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass die tatsächliche gesundheitliche Belastung bei Mehrfachkontaminationen systematisch unterschätzt werden könnte. Zingales et al. (2024) zeigten, dass Mischungen aus STC und OTA in deutliche Synergismen aufweisen und eine höhere Zytotoxizität verursachen als die jeweiligen Einzeltoxine. Daher kann eine gemeinsame Exposition dieser Mykotoxine die tatsächliche toxische Belastung verstärken und die Konzentrationen wie sie in Käse nachgewiesen werden konnten, potenziell relevante gesundheitliche Effekte besitzen. Für STC in Kombination mit anderen Mykotoxinen werden ähnliche Verhaltensweisen beschrieben (Zingales et al., 2020a; Zouaoui et al., 2016).

Im Hinblick auf die Verbrauchersicherheit weisen Berechnungen nach dem Margin of Exposure Konzept (MOE) für OTA (European Food Safety Authority, 2020) darauf hin, dass einzelne hochbelastete Hartkäseportionen einen nicht zu vernachlässigenden Beitrag zur OTA Gesamtexposition leisten könnten. Bei täglicher Aufnahme einer

typischen Portionsgröße von 25 g (Open Food Facts, 2022) ergeben sich im Erwachsenenzenario theoretische MOE Werte unterhalb des von der EFSA verwendeten Orientierungswerts (MOE 10.000), wodurch ein potenzielles gesundheitliches Risiko nicht ausgeschlossen werden kann.

Das Fehlen gesetzlicher Höchstgehalte für OTA und STC in Käse stellt eine Lücke im europäischen Lebensmittelsicherheitskonzept dar und erschwert sowohl die Risikobewertung als auch den effektiven Verbraucherschutz. Im Gegensatz zu AFM₁, für das ein Höchstgehalt in Milch festgelegt ist, fehlen entsprechende Grenzwerte für OTA und STC sowohl für Milch als Rohstoff als auch für daraus hergestellte Milcherzeugnisse (Europäische Kommission, 2023b). Mehrere Studien, einschließlich der Ergebnisse dieser Publikation, zeigen, dass OTA und STC in Käse auftreten, insbesondere in geriebenem Grana-Typ Käse. Daher kann Käse, vor allem Produkte mit Rindenanteil, einen bedeutenden Beitrag zur OTA- und STC-Gesamtexposition leisten. Zusammen mit den Ergebnissen dieser Studie hebt dies die Relevanz einer möglichen Berücksichtigung von Mykotoxinen für regulatorische Rahmenbedingungen sowie von Grana-Typ Käse in zukünftigen Risikomanagementstrategien hervor.

Daher sind präventive Maßnahmen zur Kontrolle der Mykotoxinkontamination in Käse erforderlich. Um das Wachstum mykotoxinbildender Pilze und die Kontamination in der Käseherstellungskette zu minimieren, sind Implementierung guter Hygienepaxis, Pasteurisation, der Einsatz chemischer oder natürlicher Konservierungsstoffe sowie biologische Kontrolle denkbare technologische Ansätze (Cheong et al., 2014; Coton et al., 2019; Liewen & Marth, 1985; O’Sullivan et al., 2002). Wie bereits beschrieben, sind die Erkenntnisse über die Faktoren, die das Wachstum mykotoxinbildender Pilze bestimmen, begrenzt und somit die Entwicklung effektiver Strategien zur Eindämmung relevant. Hierfür müssen die im Käse vorhandenen Verbindungen, die die Genexpression von Mykotoxinen induzieren oder hemmen und die physikochemischen Faktoren, die die Mykotoxinproduktion beeinflussen, untersucht werden (Aranda et al., 2025).

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass insbesondere geriebener Grana-Typ Käse aufgrund des Herstellungsprozesses eine wesentliche Expositionsquelle für STC und OTA darstellen kann. Das regelmäßige gemeinsame Vorkommen von STC und OTA, die potenziellen Interaktionen sowie das Fehlen von Höchstgehalten verdeutlichen die Notwendigkeit einer sorgfältigen Risikobewertung und die Entwicklung präventiver Maßnahmen in der Käseherstellung.

4.3.3 Mykotoxinbildner in Grana-Typ Käse

Obwohl Mykotoxine wie STC und OTA als regelmäßige Kontaminanten in geriebenen Grana-Typ Hartkäsen identifiziert wurden (Altafini et al., 2021; Gützkow et al., 2022;

Pietri et al., 2022), liegen bislang nur begrenzte Untersuchungen zur Identifizierung potenziell verantwortlicher Schimmelpilze in Käse und Reifungsumgebungen vor, wobei eine parallele Quantifizierung der Mykotoxine im jeweils untersuchten Probenmaterial häufig nicht berichtet wird (De Santi et al., 2010; El-Fadaly et al., 2015; Yuvaşen et al., 2018).

Die Untersuchung geriebener Grana-Typ Käseproben bestätigte das häufige Vorkommen von STC und OTA in dieser Produktgruppe. In sieben von neun untersuchten Marktproben wurde STC nachgewiesen, während in zwei dieser Proben zusätzlich OTA detektiert wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen der ersten Publikation (Gützkow et al., 2022) und stimmen mit den Mykotoxinvorkommen in Hartkäse aus der Literatur überein (Altafini et al., 2021; Biancardi et al., 2013; Veršilovskis & De Saeger, 2010). In keiner der untersuchten Käseproben konnte AFB₁ nachgewiesen werden, was auf die ökologischen Anforderungen aflatoxinbildender *Aspergillus*-Arten, deren optimales Wachstum sowie Toxinbildung bei höheren Temperaturen erfolgt, als sie typischerweise während Reifung und Lagerung von Grana-Typ Käse vorliegen, zurückzuführen ist (Al-Zaban, 2023; Garcia-Cela et al., 2019; Liu et al., 2017; Schmidt-Heydt et al., 2010).

Die durchgeführte Mykobiomanalyse der isolierten Pilze aus den Käseproben identifizierte *Aspergillus versicolor* als Hauptproduzent von STC der mykotoxinbildenden Mykobiota. *A. versicolor* ist ein STC-Produzent der auf der Oberfläche von Käse während langer Reifezeiten beschrieben wird (Decontardi et al., 2018; Lund et al., 1995; Montagna et al., 2004).

In der durchgeführten Inokulationsstudie mit einem aus einer Grana-Typ Käsemarktprobe isolierten *A. versicolor* Stamm konnte dessen Fähigkeit STC sowie mehrere biosynthetische Vorstufen (Dihydrosterigmatocystin, Versicolorin B) direkt in der Käsematrix zu bilden bestätigt werden. Dabei zeigte sich ein Einfluss der Substratzusammensetzung auf die Mykotoxinbildung. Während auf einem synthetischen Nährmedium (*potato dextrose agar* (PDA)) und dem geriebenem *Parmigiano Reggiano* deutlich höhere Toxinmengen produziert wurden, war die Bildung in der Kombination beider Nährmedien geringer. Dies verdeutlicht die Bedeutung matrixabhängiger Faktoren für die Regulation der Mykotoxinbiosynthese, wie sie bereits für andere Pilze und Nährmedien beschrieben wurden (Priesterjahn et al., 2020; Schmidt-Heydt et al., 2012).

Von besonderer Relevanz ist der erstmalige Nachweis von Methoxy-STC als natürlichem Lebensmittelkontaminanten. Dieses Toxin wurde in nahezu allen untersuchten Grana-Typ-Marktproben sowie in sämtlichen inokulierten Käseproben in ähnlichen Konzentrationen wie STC detektiert. Obwohl Methoxy-STC bereits als Metabolit von *A. versicolor* beschrieben wurde, gibt es bislang keine Daten zu seinem

Vorkommen in Lebensmitteln (Nielsen, 2002; Nielsen et al., 1999). Die toxikologische Datenlage zu Methoxy-STC ist bislang begrenzt, in Zellkulturen wies Methoxy-STC mutagene und genotoxische Effekte auf, wobei teilweise additive Effekte in Kombination mit STC beobachtet wurden (Dabelić et al., 2021; Jakšić et al., 2020; Jakšić et al., 2012).

Solche Interaktionen können für verschiedene Mykotoxinkombinationen insbesondere bei Konzentrationen im Bereich der *no-effect* Levels zu einer Unterschätzung der tatsächlichen gesundheitlichen Belastung führen (Grenier & Oswald, 2011; Francesca Maranghi et al., 2018; Smith et al., 2016; Tammer et al., 2007; Zingales et al., 2024). Daher ist eine isolierte Bewertung von STC ohne Berücksichtigung begleitender Metabolite wie Methoxy-STC vermutlich nicht ausreichend.

Die strukturelle Ähnlichkeit von Methoxy-STC zu STC lässt vermuten, dass beide Substanzen vergleichbaren metabolischen Aktivierungswegen unterliegen könnten. Für STC erfolgt die Bioaktivierung primär über Hydroxylierung des aromatischen Rings zu reaktiven Catechol-Metaboliten, während die Epoxidbildung, im Gegensatz zu Aflatoxin B₁, eine untergeordnete Rolle spielt (Applebaum et al., 1982; Kiessling, 1986; Pfeiffer et al., 2014; Wong et al., 1977). Ob Methoxy-STC ähnliche oder möglicherweise abweichende toxikokinetische Eigenschaften aufweist, ist bislang nicht untersucht.

Da Methoxy-STC in allen gerieben Grana-Typ Käseproben zusätzlich zu STC detektiert wurde, lässt sich vermuten, dass es sich hierbei nicht um einen quantitativ wenig relevantes Intermediat, sondern um einen regelmäßig gebildeten Bestandteil des STC Biosyntheseprofils von *A. versicolor* handelt. Methoxy-STC wurde bereits in Umweltproben als typischer Sekundärmetabolit von *A. versicolor* beschrieben und teilweise in vergleichbaren oder sogar höheren Konzentrationen als STC nachgewiesen (Nielsen, 2002; Nielsen et al., 1999). Dennoch wurde Methoxy-STC bislang nicht als relevanter Lebensmittelkontaminant betrachtet und findet weder in Routineanalysen noch in regulatorischen Bewertungsansätzen Berücksichtigung. Daher weist das Vorkommen von Methoxy-STC in Käse auf ein bislang übersehenes Expositionspotenzial hin.

Der erstmalige Nachweis von Methoxy-STC als natürlicher Lebensmittelkontaminant wirft die Frage auf, weshalb dieses Mykotoxin bislang nicht in Lebensmitteln beschrieben wurde, obwohl es seit Jahrzehnten als Sekundärmetabolit von *Aspergillus versicolor* bekannt ist. Hierbei wird Methoxy-STC regelmäßig gemeinsam mit STC produziert und kann teilweise in vergleichbaren oder sogar höheren Konzentrationen auftreten (Nielsen, 2002; Nielsen et al., 1999). Das bislang fehlende Vorkommen in Lebensmitteln ist daher weniger auf eine tatsächliche Abwesenheit zurückzuführen, sondern vielmehr auf methodische und konzeptionelle Einschränkungen des

bisherigen Mykotoxinmonitorings. Lebensmittelanalytische Untersuchungen fokussieren sich überwiegend auf regulierte oder toxikologisch bewertete Mykotoxine wie Aflatoxine, OTA oder Fusariumtoxine, während strukturell verwandte oder modifizierte Mykotoxine häufig nicht betrachtet werden. Insbesondere für Mykotoxine ohne gesetzliche Höchstgehalte oder existierende Referenzstandards fehlen entsprechende Analysemethoden, wodurch begleitende Mykotoxine wie Methoxy-STC übersehen werden können (Kovalsky et al., 2016).

Die Datenlage zu STC kann vor dem Hintergrund der historischen Entwicklung der Mykotoxinforschung betrachtet werden. STC wurde bereits 1954 beschrieben und damit vor der Entdeckung der Aflatoxine (1961) (Li et al., 2024). Ein Großteil der verfügbaren Daten zur Toxizität, Metabolisierung und Bioaktivierung stammt aus den 1970er- und 1980er-Jahren (Baertschi et al., 1989; Dunn et al., 1982; Essigmann et al., 1979; Kiessling, 1986; Mori et al., 1986; Ohtsubo et al., 1978; Purchase & Van der Watt, 1969; Steyn & Thiel, 1976; Terao, 1983; Thiel & Steyn, 1973; van Egmond et al., 1978; Vijayaraj Reddy et al., 1985). Mit der Identifikation von AFB₁ als hochpotentem Karzinogen verlagerte sich der Fokus der Forschung zunehmend auf Aflatoxine, während STC vermutlich in der Folge weniger intensiv weiterverfolgt wurde. Die European Food Safety Authority weist darauf hin, dass für STC Datenlücken bestehen, insbesondere im Hinblick auf Expositionsabschätzung, toxikokinetische Prozesse sowie Transferstudien bei Nutztieren (European Food Safety Authority, 2013). Moderne *in vivo* Studien, Transferuntersuchungen oder Expositionsdaten sind bislang kaum vorhanden. Dadurch wird eine Risikobewertung erschwert und stellt somit ein Hindernis für eine mögliche regulatorische Einordnung dar.

In den inokulierten Käseproben wurde kein OTA nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass die OTA-Kontamination der Marktproben nicht auf *A. versicolor* zurückzuführen ist, sondern auf eine Kontamination mit zusätzlichen Schimmelpilzen. Insbesondere *Penicillium verrucosum* und *Penicillium nordicum* gelten als relevante OTA-Produzenten in protein- und salzhaltigen Lebensmitteln wie Käse (Decontardi et al., 2017; Geisen et al., 2018; Lund et al., 1995). Dies verdeutlicht, dass die Mykotoxinkontamination geriebener Grana-Typ-Käse einen multifaktoriellen Prozess darstellt, bei dem unterschiedliche Pilzarten zu verschiedenen Zeitpunkten der Reifung und Verarbeitung beteiligt sein können.

Die Ergebnisse zeigen, dass *A. versicolor* ein wesentlicher STC-Produzent in Grana-Typ Käse ist und relevante Mykotoxinmengen *in situ* bilden kann. Zusätzlich tritt Methoxy-STC regelmäßig gemeinsam mit STC auf und stellt ein toxikologisch relevantes, bislang unbeachtetes Mykotoxin dar. Die Reifungsbedingungen sowie insbesondere die Verarbeitung unter Einbeziehung der Käserinde scheinen entscheidende Faktoren für das Kontaminationsrisiko zu sein und somit Maßnahmen

wie der Verzicht auf Rindenanteile und eine Kontrolle der Reifungsumgebung potenziell zur Reduktion der Mykotoxinbelastung beitragen könnten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung verdeutlichen exemplarisch, dass die Fokussierung auf einzelne Mykotoxine die tatsächliche Expositionssituation nur unvollständig abbildet. Während STC als potenziell kanzerogenes Mykotoxin eingestuft ist (International Agency for Research on Cancer, 1987), fehlen für Methoxy-STC bislang toxikologische Referenzwerte, und für beide Mykotoxine sind derzeit keine rechtlichen Höchstgehalte festgelegt.

Das gemeinsame Vorkommen von STC und Methoxy-STC in Lebensmitteln deutet darauf hin, dass Monitoring-Programme und Risikobewertungen künftig auch strukturell verwandte, bislang wenig betrachtete Mykotoxine berücksichtigen sollten.

Insgesamt unterstreichen die vorliegenden Ergebnisse die Notwendigkeit, das Konzept der Einzelsubstanzbewertung bei Mykotoxinen kritisch zu hinterfragen und bei regelmäßig gemeinsam auftretenden Mykotoxinen wie STC und Methoxy-STC eine ganzheitlichere Expositions- und Risikobetrachtung zu verfolgen.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt über verschiedene Lebensmittel- und Futtermittelmatrices hinweg ein heterogenes Mykotoxinvorkommen, wobei STC als häufig auftretender Kontaminant identifiziert wurde und damit die Relevanz nicht regulierter oder bislang weniger betrachteter Mykotoxine unterstreicht. In pflanzlichen Drinks wurden rohstoffabhängig relevante Einträge u. a. von AFB₁, STC und T-2/HT-2 nachgewiesen. Gleichzeitig verdeutlichen fehlende, rohstoff- und prozessspezifische Transferfaktoren die Unsicherheit, aus Endprodukt Daten auf Rohwarenbelastungen zu schließen.

Für Futtermittelrohstoffe und Mischfuttermittel wurde insgesamt überwiegend niedrige, aber regelmäßig auftretende Kontaminationen von AFB₁, STC und OTA nachgewiesen und das wiederholte Auftreten von Mehrfachkontaminationen beobachtet, was sensitive Multimethoden für eine realistische Erfassung erforderlich macht.

Die Untersuchungen zum AFB₁-Verbleib in *Tenebrio molitor* bestätigen einerseits die hohe Toleranz, zeigen andererseits jedoch, dass eine rein zielmetabolitenbasierte Betrachtung für die toxikologische Einordnung unzureichend sein kann und Transfer- und Umsetzungsprozesse in alternativen Proteinwertschöpfungsketten stärker berücksichtigt werden müssen.

Die STC-Transferstudie in Milchkühen liefert Hinweise darauf, dass im Unterschied zu AFB₁/AFM₁ kein relevanter Übergang in die Milch nachweisbar war, was die Bedeutung von Metabolismus und Bioverfügbarkeit bei Wiederkäuern für die Exposition tierischer Lebensmittel hervorhebt.

Für Käse zeigen die Ergebnisse, dass Kontaminationen insbesondere im Zusammenhang mit der Reifung und Umweltkontamination sowie der Einbeziehung von Rindenanteilen stehen können. Der wiederholte Nachweis von STC und Methoxy-STC sowie Hinweise auf Kontaminationen mit mehreren Pilzarten, verdeutlichen die Notwendigkeit, Monitoring- und Risikobewertungen um strukturell verwandte bzw. *emerging* Mykotoxine zu erweitern.

Die Arbeit zeigt, dass komplexe Matrices, wie pflanzliche Drinks, immunologische Screeningverfahren stark in ihrer Aussagekraft beeinflussen können und LC-MS/MS-basierte Multimethoden derzeit die verlässlichste Grundlage für belastbare qualitative und quantitative Aussagen darstellen.

Insgesamt unterstreicht die Arbeit, dass eine zukunftsfähige Mykotoxinbewertung nur durch eine ganzheitliche Betrachtung entlang der Kette, Rohware–Verarbeitung–Endprodukt, die Berücksichtigung kombinierter Expositionen sowie die Einbeziehung bislang wenig betrachteter Mykotoxine erreicht werden kann.

Mykotoxine stellen aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, ihrer chemischen Stabilität sowie ihres toxischen und teilweise kanzerogenen Potenzials weiterhin eine zentrale Herausforderung für die Lebens- und Futtermittelsicherheit dar (Bennett & Klich, 2003;

European Food Safety Authority, 2013, 2020; European Food Safety Authority et al., 2020; Marin et al., 2013). Besonders für nicht regulierte oder bislang wenig untersuchte Mykotoxine fehlen häufig belastbare Daten zu Exposition, Toxizität und Vorkommen, was die Ableitung robuster Referenzwerte und Risikomanagementmaßnahmen erschwert (European Food Safety Authority, 2013).

Für STC und Methoxy-STC sowie für komplexe Matrices ergeben sich konkrete Prioritäten für zukünftige Forschung und Monitoring. Relevant sind hierbei vor allem STC und Methoxy-STC, deren Vorkommen, toxikologische Relevanz und Bedeutung im Rahmen kombinierter Expositionen bislang nur unzureichend berücksichtigt wurden. Der erstmalige Nachweis von Methoxy-STC als natürlichem Lebensmittelkontaminanten in geriebenen Grana Typ-Käse, sowie das wiederholte gemeinsame Vorkommen von STC und Methoxy-STC in vergleichbaren Konzentrationsbereichen, deuten darauf hin, dass Methoxy-STC nicht nur ein quantitativ wenig relevantes Intermediat, sondern ein integraler Bestandteil des Sekundärstoffwechselprofils von *Aspergillus versicolor* sein könnte. Trotz bekannter Umweltfunde wurde Methoxy-STC bislang kaum in lebensmittelbezogenen Untersuchungen berücksichtigt. Für STC liegen zahlreiche frühe Untersuchungen vor, jedoch fehlen bis heute aktuelle toxikokinetische Daten, *in vivo*-Studien sowie belastbare Transfer- und Expositionsdaten, die für eine fundierte Risikobewertung erforderlich wären. Insbesondere fehlen Daten zu Bioverfügbarkeit, Metabolismus, Ausscheidung und möglichen Kombinationseffekten mit weiteren Mykotoxinen unter realistischen Expositionsbedingungen. Daher ist es erforderlich, Methoxy-STC und STC zukünftig in Monitoringprogramme einzubeziehen und die toxikologischen Eigenschaften vor allem von Methoxy-STC weitergehend zu untersuchen. Da die in dieser Arbeit beobachteten Kontaminationen in Käse überwiegend mit Reifung, Umweltkontamination und Rindenanteilen verknüpft waren, ist eine vergleichbare Relevanz auch für weitere oberflächenreifende bzw. -gelagerte tierische Erzeugnisse (z. B. Rohschinken) plausibel und sollte in künftigen Monitoringansätzen berücksichtigt werden. Da regulatorische und monitoringbezogene Schwerpunkte bislang häufig auf pflanzlichen Rohwaren sowie auf AFM₁ in Milch liegen, legen die hier gewonnenen Daten nahe, dass auch tierische Erzeugnisse, insbesondere gereifte Produkte, zur Gesamt-Exposition gegenüber STC und OTA beitragen können und daher für Expositionsabschätzungen und Risikobewertungen stärker berücksichtigt werden sollten.

Eine ausschließlich auf Einzelsubstanzen fokussierte Risikobewertung greift vermutlich zu kurz und zukünftig sollten daher kombinatorische Expositionsszenarien stärker berücksichtigt werden. In Käse, Futtermitteln und pflanzlichen Drinks wurden wiederholt Mehrfachkontaminationen nachgewiesen, die eher die Regel als die

Ausnahme darstellen und zu additiven oder synergistischen Effekten insbesondere im Bereich niedriger Konzentrationen führen können. Für verschiedene Mykotoxinkombinationen, wie STC in Kombination mit OTA, wurden verstärkte zytotoxische Effekte beschrieben. Dies lässt vermuten, dass die tatsächliche gesundheitliche Belastung bei gleichzeitiger Exposition gegenüber mehreren Mykotoxinen bislang unterschätzt werden könnte (Biomin, 2021; Grenier & Oswald, 2011; F. Maranghi et al., 2018; Smith et al., 2016; Streit et al., 2012; Tammer et al., 2007; Zingales et al., 2024). Dies gilt insbesondere für strukturell verwandte Mykotoxine mit ähnlichen Wirkmechanismen oder gemeinsamen Biosynthesewegen, wie Aflatoxine, STC und Methoxy-STC.

Die Analysedaten der pflanzlichen Drinks zeigen, dass aus Endproduktuntersuchungen nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die tatsächliche Belastung der eingesetzten Rohwaren gezogen werden können, da Transferfaktoren bislang kaum untersucht sind. Für eine realistische Expositionsabschätzung sind rohstoff- und produktspezifische Untersuchungen erforderlich, insbesondere zum Übergang einzelner Mykotoxine und zum Einfluss technologischer Verarbeitungsschritte.

Auch müssen die analytischen Herausforderungen bei der Erfassung von Mykotoxinen in komplexen Lebensmittelmatrices berücksichtigt werden. Die Untersuchungen zu pflanzlichen Drinks zeigen exemplarisch, dass rohstoff- und verarbeitungsabhängige Matrixeffekte einen erheblichen Einfluss auf die analytische Aussagekraft haben können. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass enzymimmunologische Screeningverfahren in diesen Matrices nur eingeschränkt einsetzbar sind und ohne chromatographisch-massenspektrometrische Bestätigung ein erhebliches Risiko für Fehlinterpretationen besteht. Insbesondere bei niedrigen Konzentrationen, Mehrfachkontaminationen oder dem Auftreten strukturell verwandter Metaboliten sind LC-MS/MS-basierte Methoden derzeit unerlässlich, um belastbare qualitative und quantitative Aussagen zu ermöglichen. Für ein realistisches Expositionsmonitoring werden LC-MS/MS-basierte Multimykotoxinmethoden weiterhin relevant sein, insbesondere um *emerging* Mykotoxine und bislang wenig untersuchte Metaboliten zuverlässig zu erfassen. Zukünftige analytische Strategien sollten daher verstärkt auf Multimykotoxinmethoden setzen und auch *emerging* Mykotoxine sowie bislang wenig untersuchte Metaboliten erfassen. Dafür sind zum einen matrixspezifische Probenaufarbeitungsstrategien für Screeningansätze und zum anderen harmonisierte Kriterien zur Validierung und Vergleichbarkeit von Multimethoden erforderlich.

Vor dem Hintergrund steigender Mykotoxinprävalenzen in Futtermitteln und Rohwaren (dsm-firmenich, 2023, 2024, 2025) sowie klimabedingter Veränderungen, die insbesondere AFB₁ Belastungen in gemäßigten Regionen, wie Europa, begünstigen

könnten (Battilani et al., 2016), gewinnt die frühzeitige Identifikation neuer oder bislang vernachlässigter Mykotoxine zusätzlich an Bedeutung.

Neben analytischen und toxikologischen Fragestellungen gewinnen präventive Ansätze zur Minimierung von Mykotoxinbelastungen zunehmend an Bedeutung. Ökologische und matrixabhängige Faktoren, wie Temperatur, Wasseraktivität und Substratzusammensetzung, beeinflussen sowohl Wachstum als auch Toxinproduktion mykotoxinbildender Pilze (Aranda et al., 2025; Camardo Leggieri et al., 2018; Casquete et al., 2018; Scott, 1981). Ein besseres Verständnis der Sporulation, der Interaktion innerhalb der Pilzgemeinschaft sowie der regulierenden Faktoren der Mykotoxinbiosynthese ist eine Voraussetzung, um Minimierungs- und Präventionsstrategien entlang der Käseherstellung und -reifung zu entwickeln.

Künftig sollten Mykotoxinexpositionen stärker entlang der gesamten Lebensmittelkette betrachtet werden, von der Rohware über Verarbeitungsschritte bis hin zum Endprodukt, und dabei analytische, toxikologische, ökologische sowie verarbeitungstechnische Einflussfaktoren gemeinsam berücksichtigt werden, um reale Expositionsszenarien adäquat abzubilden. Dazu gehört auch die Einbeziehung nicht regulierter oder *emerging* Mykotoxine, kombinierter Expositionen und matrixabhängiger Effekte, was leistungsfähige multianalytische Methoden voraussetzt und die Grundlage für zukünftige toxikologische Studien, Monitoringprogramme sowie die Weiterentwicklung analytischer und regulatorischer Konzepte bildet.

6 Literaturverzeichnis

- Abd Alla, E. A. M., Metwally, M. M., Mehriz, A. M., & Abu Sree, Y. H. (1996). Sterigmatocystin: Incidence, fate and production by *Aspergillus versicolor* in Ras cheese. *Food / Nahrung*, 40(6), 310-313. <https://doi.org/10.1002/food.19960400604>
- Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., & Magan, N. (2012). A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *Journal of The Royal Society Interface*, 9(69), 757-767. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0482>
- Abia, W. A., Warth, B., Sulyok, M., Krska, R., Tchana, A. N., Njobeh, P. B., Dutton, M. F., & Moundipa, P. F. (2013). Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control*, 31(2), 438-453. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.006>
- Abidin, Z., Khatoon, A., Arooj, N., Hussain, S., Ali, S., Manzoor, A. W., & Saleemi, M. K. (2017). Estimation of ochratoxin A in poultry feed and its ingredients with special reference to temperature conditions. *British Poultry Science*, 58(3), 251-255. <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1293797>
- Adekoya, I., Njobeh, P., Obadina, A., Landschoot, S., Audenaert, K., Okoth, S., De Boevre, M., & De Saeger, S. (2019). Investigation of the Metabolic Profile and Toxigenic Variability of Fungal Species Occurring in Fermented Foods and Beverage from Nigeria and South Africa Using UPLC-MS/MS. *Toxins (Basel)*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/toxins11020085>
- Ahn, J., Kim, D., Kim, H., & Jahng, K. Y. (2010). Quantitative determination of mycotoxins in urine by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(12), 1674-1682. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.505201>
- Akbar, N., Nasir, M., Naeem, N., Ahmad, M.-u.-D., Saeed, F., Anjum, F. M., Iqbal, S., Imran, M., Tufail, T., Shah, F.-u.-H., & Atif, M. (2020). Assessment of aflatoxin in milk and feed samples and impact of seasonal variations in the Punjab, Pakistan. *Food Science & Nutrition*, 8(6), 2699-2709. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1557>
- Al-Zaban, M. I. (2023). Impacts of Temperature and Water Activity Interactions on Growth, Aflatoxin B1 Production and Expression of Major Biosynthetic Genes of AFB1 in *Aspergillus flavus* Isolates. *Microorganisms*, 11(5), 1199. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051199>
- Alborch, L., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., & Cabañes, F. J. (2011). Temperature and incubation time effects on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus sclerotiorum* and *Aspergillus laticoffeatus* on culture media. *Letters in Applied Microbiology*, 52(3), 208-212. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02983.x>
- Ali, N., Hashim, N. H., & Shuib, N. S. (2015). Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in processed spices marketed in Malaysia. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(4), 518-532. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1011712>
- Alkadri, D., Rubert, J., Prodi, A., Pisi, A., Mañes, J., & Soler, C. (2014). Natural co-occurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. *Food Chemistry*, 157, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.052>

- Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Altafini, A., Roncada, P., Guerrini, A., Minkoumba Sonfack, G., Fedrizzi, G., & Caprai, E. (2021). Occurrence of Ochratoxin A in Different Types of Cheese Offered for Sale in Italy. *Toxins*, 13(8), 540. <https://doi.org/10.3390/toxins13080540>
- Aminul, M., Roy, S., Nabi, A., Solaiman, S., Rahman, M., Huq, M., Siddiquee, N. A., & Ahmed, N. (2018). Microbiological quality assessment of milk at different stages of the dairy value chain in a developing country setting. *International Journal of Food Microbiology*, 278, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.028>
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2019). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 86(2), 412-431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Andrade, P. D., da Silva, J. L. G., & Caldas, E. D. (2013). Simultaneous analysis of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and ochratoxin A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid-liquid extraction with low temperature purification (LLE-LTP). *Journal of Chromatography A*, 1304, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.049>
- Anli, E., & Alkis, İ. M. (2010). Ochratoxin A and Brewing Technology: A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1), 23-32. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00394.x>
- Applebaum, R. S., Brackett, R. E., Wiseman, D. W., & Marth, E. H. (1982). Aflatoxin: Toxicity to Dairy Cattle and Occurrence in Milk and Milk Products - A Review. *Journal of Food Protection*, 45(8), 752-777. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-45.8.752>
- Aranda, C., Rodriguez, R., Fernández-Baldo, M. A., & Durán, P. (2025). Mycotoxins in Cheese: Assessing Risks, Fungal Contaminants, and Control Strategies for Food Safety. *Foods*, 14(3), 351. <https://doi.org/10.3390/foods14030351>
- Arce-López, B., Coton, M., Coton, E., & Hymery, N. (2024). Occurrence of the two major regulated mycotoxins, ochratoxin A and fumonisin B1, in cereal and cereal-based products in Europe and toxicological effects: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 109, 104489. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104489>
- Arroyo, M., Aldred, D., & Magan, N. (2005). Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread. *International Journal of Food Microbiology*, 98(3), 223-231. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.07.004>
- Babaahmadifooladi, M., & Jacxsens, L. (2021). Chronic dietary exposure to nickel from selected foods consumed in Belgium. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 38(1), 95-112. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1833088>
- Baertschi, S. W., Raney, K. D., Harris, T. M., Shimada, T., & Guengerich, F. P. (1989). Comparison of rates of enzymatic oxidation of Aflatoxin B1, Aflatoxin G1, and Sterigmatocystin and activities of the epoxides in forming guanyl-N7 adducts

- and inducing different genetic responses. *Chemical Research in Toxicology*, 2(2), 11-122.
- Banjara, N., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2015). Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. *Current Microbiology*, 70(6), 792-800. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0790-1>
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., Cattaneo, T., & Iametti, S. (2007). Binding of Aflatoxin M1 to Different Protein Fractions in Ovine and Caprine Milk. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 532-540. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71536-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71536-9)
- Battilani, P., Costa, L. G., Dossena, A., Gullino, M. L., Marchelli, R., Galaverna, G., Pietri, A., Dall'Asta, C., Giorni, P., Spadaro, D., & Gualla, A. (2009). Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants. *EFSA Supporting Publications*, 6(9), 24E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2009.EN-24>
- Battilani, P., Formenti, S., Toscani, T., & Virgili, R. (2010). Influence of abiotic parameters on ochratoxin A production by a *Penicillium nordicum* strain in dry-cured meat model systems. *Food Control*, 21(12, Supplement), 1739-1744. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.08.003>
- Battilani, P., Pietri, A., Giorni, P., Formenti, S., Bertuzzi, T., Toscani, T., Virgili, R., & Kozakiewicz, Z. (2007). *Penicillium* Populations in Dry-Cured Ham Manufacturing Plants. *Journal of Food Protection*, 70(4), 975-980. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.4.975>
- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., 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), 24328. <https://doi.org/10.1038/srep24328>
- Battista, J. R., & Marnett, L. J. (1985). Prostaglandin H synthase-dependent epoxidation of aflatoxin B 1. *Carcinogenesis*, 6(8), 1227-1229. <https://doi.org/10.1093/carcin/6.8.1227>
- Becker-Algeri, T. A., Castagnaro, D., de Bortoli, K., de Souza, C., Drunkler, D. A., & Badiale-Furlong, E. (2016). Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. *Journal of Food Science*, 81(3), R544-R552. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13204>
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2008). *Lebensmittelchemie*. Springer.
- Ben Taheur, F., Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A., Ben Salah-Abbès, J., & Chaieb, K. (2019). Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes. *Toxicon*, 160, 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.02.001>
- Benkerroum, N. (2016). Mycotoxins in dairy products: A review. *International Dairy Journal*, 62, 63-75. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.07.002>
- Benkerroum, N. (2020). Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins: Mechanisms of Action. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 423. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020423>
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2007). Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.022>

- Bertuzzi, T., Romani, M., Rastelli, S., Mulazzi, A., & Pietri, A. (2017). Sterigmatocystin Occurrence in Paddy and Processed Rice Produced in Italy in the Years 2014–2015 and Distribution in Milled Rice Fractions. *Toxins*, 9(3), 86. <https://doi.org/10.3390/toxins9030086>
- Bezerra da Rocha, M. E., Freire, F. d. C. O., Erlan Feitosa Maia, F., Izabel Florindo Guedes, M., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>
- Bhat, R., Rai, R. V., & Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 57-81. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>
- Bhatnagar, D., Rajasekaran, K., Gilbert, M., Cary, J. W., & Magan, N. (2018). Advances in molecular and genomic research to safeguard food and feed supply from aflatoxin contamination. *World Mycotoxin Journal*, 11(1), 47-72. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2283>
- Biancardi, A., & Dall'Asta, C. (2015). Determination of sterigmatocystin in feed by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 32(12), 2093-2100. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1094709>
- Biancardi, A., Piro, R., Galaverna, G., & Dall'Asta, C. (2013). A simple and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ochratoxin A in hard cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(5), 632-640. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.763911>
- Binder, E. M., Tan, L. M., Chin, L. J., Handl, J., & Richard, J. (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3), 265-282. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.005>
- Biomin. (2021). The Global Mycotoxin Threat 2021.
- Blanco, J. L., Domínguez, L., Gómez-Lucía, E., Garayzabal, J. F. F., Goyache, J., & Suárez, G. (1988). Experimental aflatoxin production in Manchego-type cheese. *Journal of Applied Bacteriology*, 64(1), 17-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb02425.x>
- Blank, R. (2002). Die Bedeutung von Lebensmitteln tierischer Herkunft für die Mykotoxinaufnahme beim Menschen. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 14(2), 104-109. <https://doi.org/10.1065/uwsf2002.05.028>
- Bock, K. W. (2016). The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochemical Pharmacology*, 99, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.001>
- Boevre, M. D., Mavungu, J. D. D., Landschoot, S., Audenaert, K., Eeckhout, M., Maene, P., Haesaert, G., & Saeger, S. D. (2012). Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. *World Mycotoxin Journal*, 5(3), 207-219. <https://doi.org/10.3920/wmj2012.1410>
- Borst, P., & Elferink, R. O. (2002). Mammalian ABC Transporters in Health and Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 71(Volume 71, 2002), 537-592. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055>
- Bosch, G., Fels-Klerx, H. J. V., Rijk, T. C., & Oonincx, D. (2017). Aflatoxin B1 Tolerance and Accumulation in Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) and Yellow

- Mealworms (*Tenebrio molitor*). *Toxins*, 9(6).
<https://doi.org/10.3390/toxins9060185>
- Brackett, R. E., & Marth, E. H. (1982). Association of aflatoxin M1 with casein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 174(6), 439-441.
<https://doi.org/10.1007/BF01042721>
- Braun, D., Ezekiel, C. N., Marko, D., & Warth, B. (2020). Exposure to Mycotoxin-Mixtures via Breast Milk: An Ultra-Sensitive LC-MS/MS Biomonitoring Approach [Original Research]. *Frontiers in Chemistry*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00423>
- Bryden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1-2), 134-158. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>
- Bryła, M., Waśkiewicz, A., Ksieniewicz-Woźniak, E., Szymczyk, K., & Jędrzejczak, R. (2018). Modified Fusarium Mycotoxins in Cereals and Their Products—Metabolism, Occurrence, and Toxicity: An Updated Review. *Molecules*, 23(4), 963. <https://doi.org/10.3390/molecules23040963>
- Bui-Klimke, T. R., & Wu, F. (2015). Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(13), 1860-1869. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.724480>
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). (2021). *Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2019. Monitoring. Gemeinsamer Bericht des Bundes und der Länder* (15.3).
https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/01_Im_mon_dokumente/01_Monitoring_Berichte/2019_Im_monitoring_bericht.pdf?__blob=publicationFile&v=5
- Käseverordnung, (1965). https://www.gesetze-im-internet.de/k_sev/KäseV.pdf
- Bünger, J., Westphal, G., Mönnich, A., Hinnendahl, B., Hallier, E., & Müller, M. (2004). Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology*, 202(3), 199-211. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.05.007>
- Cabaret, O., Puel, O., Botterel, F., Pean, M., Bretagne, S., & Delaforge, M. (2011). Contribution of uniformly ¹³C-enriched sterigmatocystin to the study of its pulmonary metabolism. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(19), 2704-2710. <https://doi.org/10.1002/rcm.5068>
- Cakmakci, S., Gundogdu, E., Hayaloglu, A. A., Dagdemir, E., Gurses, M., Cetin, B., & Tahmas-Kahyaoglu, D. (2012). Chemical and microbiological status and volatile profiles of mouldy Civil cheese, a Turkish mould-ripened variety. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(11), 2405-2412.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03116.x>
- Camardo Leggieri, M., Decontardi, S., & Battilani, P. (2018). Modelling the sporulation of some fungi associated with cheese, at different temperature and water activity regimes. *International Journal of Food Microbiology*, 278, 52-60.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.023>
- Camardo Leggieri, M., Decontardi, S., Bertuzzi, T., Pietri, A., & Battilani, P. (2017). Modeling Growth and Toxin Production of Toxigenic Fungi Signaled in Cheese under Different Temperature and Water Activity Regimes. *Toxins*, 9(1), 4.
<https://doi.org/10.3390/toxins9010004>
- Camardo Leggieri, M., Pietri, A., & Battilani, P. (2020). Modelling Fungal Growth, Mycotoxin Production and Release in Grana Cheese. *Microorganisms*, 8(1), 69.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8010069>

- Camenzuli, L., Van Dam, R., de Rijk, T., Andriessen, R., Van Schelt, J., & Van der Fels-Klerx, H. J. I. (2018). Tolerance and Excretion of the Mycotoxins Aflatoxin B(1), Zearalenone, Deoxynivalenol, and Ochratoxin A by *Alphitobius diaperinus* and *Hermetia illucens* from Contaminated Substrates. *Toxins*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/toxins10020091>
- Cao, X., Li, X., Li, J., Niu, Y., Shi, L., Fang, Z., Zhang, T., & Ding, H. (2018). Quantitative determination of carcinogenic mycotoxins in human and animal biological matrices and animal-derived foods using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods. *Journal of Chromatography B*, 1073, 191-200. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.006>
- Capozzi, V., Fragasso, M., Romaniello, R., Berbegal, C., Russo, P., & Spano, G. (2017). Spontaneous Food Fermentations and Potential Risks for Human Health. *Fermentation*, 3(4), 49. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040049>
- Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R., & Laganà, A. (2012). Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 31(4), 466-503. <https://doi.org/10.1002/mas.20351>
- Carballo, D., Tolosa, J., Ferrer, E., & Berrada, H. (2019). Dietary exposure assessment to mycotoxins through total diet studies. A review. *Food and Chemical Toxicology*, 128, 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.033>
- Carlos, J.-P., Carlos, G.-C., Sergio, A.-S., Lorena, G.-R., Gabriela, R.-S., Mariano, G.-G., & Alma, C.-G. (2024). Evaluation of the pH effect on complex formation between bovine β -lactoglobulin and aflatoxin M1: a molecular dynamic simulation and molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 42(22), 12133-12143. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2268178>
- Cary, J. W., Ehrlich, K. C., Beltz, S. B., Harris-Coward, P., & Klich, M. A. (2009). Characterization of the *Aspergillus ochraceoroseus* aflatoxin/sterigmatocystin biosynthetic gene cluster. *Mycologia*, 101(3), 352-362. <https://doi.org/10.3852/08-173>
- Casquete, R., Benito, M. J., Córdoba, M. d. G., Ruiz-Moyano, S., Galván, A. I., & Martín, A. (2018). Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. *LWT*, 89, 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.053>
- Casquete, R., Benito, M. J., Córdoba, M. d. G., Ruiz-Moyano, S., & Martín, A. (2017). The growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system are influenced by physicochemical factors. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 6987-6996. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12865>
- Cavaliere, C., Foglia, P., Guarino, C., Marzoni, F., Nazzari, M., Samperi, R., & Laganà, A. (2006). Aflatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1135(2), 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.048>
- Cheeseman, K., Ropars, J., Renault, P., Dupont, J., Gouzy, J., Branca, A., Abraham, A.-L., Ceppi, M., Conseiller, E., Debuchy, R., Malagnac, F., Goarin, A., Silar, P., Lacoste, S., Sallet, E., Bensimon, A., Giraud, T., & Brygoo, Y. (2014). Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nature Communications*, 5(1), 2876. <https://doi.org/10.1038/ncomms3876>

- Chen, W., Li, C., Zhang, B., Zhou, Z., Shen, Y., Liao, X., Yang, J., Wang, Y., Li, X., Li, Y., & Shen, X. L. (2018). Advances in Biodetoxification of Ochratoxin A-A Review of the Past Five Decades [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01386>
- Cheong, E. Y. L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T. T., Nhiep, N. T., My Ho, H. T., Zwielehner, J., Bansal, N., & Turner, M. S. (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.011>
- Chia, S. Y., Tanga, C. M., Khamis, F. M., Mohamed, S. A., Salifu, D., Sevgan, S., Fiaboe, K. K. M., Niassy, S., van Loon, J. J. A., Dicke, M., & Ekesi, S. (2018). Threshold temperatures and thermal requirements of black soldier fly *Hermetia illucens*: Implications for mass production. *PLoS One*, 13(11), e0206097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206097>
- Chu, F. S. (1996). Recent Studies on Immunoassays for Mycotoxins. In *Immunoassays for Residue Analysis* (Vol. 621, pp. 294-313). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-1996-0621.ch022>
- Cogan, T. M., & Hill, C. (1993). Cheese Starter Cultures. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Volume 1 General Aspects* (pp. 193-255). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6_6
- Comi, G., Chiesa, L., Panseri, S., Orlic, S., & Iacumin, L. (2013). Evaluation of different methods to prevent *Penicillium nordicum* growth on and ochratoxin A production in country-style sausages. *World Mycotoxin Journal*, 6(4), 411-418. <https://doi.org/10.3920/WMJ2013.1548>
- Coton, M., Auffret, A., Poirier, E., Debaets, S., Coton, E., & Dantigny, P. (2019). Production and migration of ochratoxin A and citrinin in Comté cheese by an isolate of *Penicillium verrucosum* selected among *Penicillium* spp. mycotoxin producers in YES medium. *Food Microbiology*, 82, 551-559. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.026>
- Crudo, F., Varga, E., Aichinger, G., Galaverna, G., Marko, D., Dall'Asta, C., & Dellafiora, L. (2019). Co-Occurrence and Combinatory Effects of *Alternaria* Mycotoxins and Other Xenobiotics of Food Origin: Current Scenario and Future Perspectives. *Toxins*, 11(11), 640. <https://doi.org/10.3390/toxins11110640>
- Dabelić, S., Kifer, D., Jakšić, D., Kopjar, N., & Klarić, M. Š. (2021). Sterigmatocystin, 5-Methoxysterigmatocystin, and Their Combinations are Cytotoxic and Genotoxic to A549 and HepG2 Cells and Provoke Phosphorylation of Chk2, but not FANCD2 Checkpoint Proteins. *Toxins*, 13(7), 464. <https://doi.org/10.3390/toxins13070464>
- Dai, Y., Huang, K., Zhang, B., Zhu, L., & Xu, W. (2017). Aflatoxin B1-induced epigenetic alterations: An overview. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 683-689. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.034>
- Dall'Asta, C., De Dea Lindner, J., Galaverna, G., Dossena, A., Neviani, E., & Marchelli, R. (2008). The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chemistry*, 106(2), 729-734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.049>
- Danezis, G. P., Anagnostopoulos, C. J., Liapis, K., & Koupparis, M. A. (2016). Multi-residue analysis of pesticides, plant hormones, veterinary drugs and mycotoxins using HILIC chromatography – MS/MS in various food matrices. *Analytica Chimica Acta*, 942, 121-138. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.09.011>

- De Santi, M., Sisti, M., Barbieri, E., Piccoli, G., Brandi, G., & Stocchi, V. (2010). A combined morphologic and molecular approach for characterizing fungal microflora from a traditional Italian cheese (Fossa cheese). *International Dairy Journal*, 20(7), 465-471. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.004>
- Debegnach, F., Brera, C., Mazzilli, G., Sonogo, E., Buiarelli, F., Ferri, F., Rossi, P. G., Collini, G., & De Santis, B. (2020). Optimization and validation of a LC-HRMS method for aflatoxins determination in urine samples. *Mycotoxin Research*, 36(2), 257-266. <https://doi.org/10.1007/s12550-020-00389-6>
- Debruyne, I. (2006). Soy base extract: soymilk and dairy alternatives. In *Soy applications in foods* (pp. 111-134).
- Decontardi, S., Mauro, A., Lima, N., & Battilani, P. (2017). Survey of Penicillia associated with Italian grana cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.019>
- Decontardi, S., Soares, C., Lima, N., & Battilani, P. (2018). Polyphasic identification of Penicillia and Aspergilli isolated from Italian grana cheese. *Food Microbiology*, 73, 137-149. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.012>
- Degen, G. H., & Neumann, H.-G. (1978). The major metabolite of aflatoxin B1 in the rat is a glutathione conjugate. *Chemico-Biological Interactions*, 22(2), 239-255. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(78\)90129-1](https://doi.org/10.1016/0009-2797(78)90129-1)
- Degen, G. H., & Neumann, H.-G. (1981). Differences in aflatoxin B 1 -susceptibility of rat and mouse are correlated with the capability in vitro to inactivate aflatoxin B 1 - epoxide. *Carcinogenesis*, 2(4), 299-306. <https://doi.org/10.1093/carcin/2.4.299>
- Deng, J., Zhao, L., Zhang, N. Y., Karrow, N. A., Krumm, C. S., Qi, D. S., & Sun, L. H. (2018). Aflatoxin B1 metabolism: Regulation by phase I and II metabolizing enzymes and chemoprotective agents. *Mutation Research*, 778, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.10.002>
- Desmarchelier, A., Tessiot, S., Bessaire, T., Racault, L., Fiorese, E., Urbani, A., Chan, W.-C., Cheng, P., & Mottier, P. (2014). Combining the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and clean-up by immunoaffinity column for the analysis of 15 mycotoxins by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1337, 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.025>
- Diao, E., Li, X., Zhang, Z., Ma, W., Ji, N., & Dong, H. (2015). Ultraviolet irradiation detoxification of aflatoxins. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.001>
- Diarra, K., Nong, Z. G., & Jie, C. (2005). Peanut Milk and Peanut Milk Based Products Production: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(5), 405-423. <https://doi.org/10.1080/10408390590967685>
- Diaz Nieto, C. H., Granero, A. M., Zon, M. A., & Fernandez, H. (2018). Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 460-470. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.057>
- Dipartimento delle Politiche Competitive della Qualità Agroalimentare Ippiche e Della Pesca. (2019). Modifica del disciplinare di produzione della denominazione «Grana Padano» registrata in qualità di denominazione di origine protetta. *Gazz. Uff.*, 249, 11-16. https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2019-10-23&atto.codiceRedazionale=19A06572&elenco30giorni=false

- Dobermann, D., Swift, J. A., & Field, L. M. (2017). Opportunities and hurdles of edible insects for food and feed. *Nutrition Bulletin*, 42(4), 293-308. <https://doi.org/10.1111/nbu.12291>
- Dobson, A. D. W. (2017). Chapter 23 - Mycotoxins in Cheese. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 595-601). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00023-5>
- Dohnal, V., Wu, Q., & Kuca, K. (2014). Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Archives of Toxicology*, 88(9), 1635-1644. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1312-9>
- Driehuis, F., Spanjer, M. C., Scholten, J. M., & te Giffel, M. C. (2008). Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs of Dairy Cows and Estimation of Total Dietary Intakes. *Journal of Dairy Science*, 91(11), 4261-4271. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1093>
- dsm-firmenich. (2023). Worl Mycotoxin Survey. https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en/documents/REP_MTXsurvey_Q4_2023_EN_0124_AUE_doublePage.pdf&ved=2ahUKEwjU8bfQyLWRAxXG0wIH HbpEFFgQFnoECBkQAQ&usq=AOvVaw0iCLi81sfziWL3rI7935J0
- dsm-firmenich. (2024). Worl Mycotoxin Survey. <https://www.dsm-firmenich.com/anh/news/downloads/whitepapers-and-reports/dsm-firmenich-world-mycotoxin-survey-january-to-december-2024.html>
- dsm-firmenich. (2025). Worl Mycotoxin Survey. <https://www.dsm-firmenich.com/anh/news/downloads/whitepapers-and-reports/dsm-firmenich-world-mycotoxin-survey-january-to-september-2025.html>
- Duarte, S. C., Pena, A., & Lino, C. M. (2011). Human ochratoxin A biomarkers—From exposure to effect. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(3), 187-212. <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.529103>
- Dunn, J. J., Lee, L. S., & Ciegler, A. (1982). Mutagenicity and toxicity of aflatoxin precursors. *Environmental Mutagenesis*, 4(1), 19-26. <https://doi.org/10.1002/em.2860040104>
- Dzuman, Z., Zachariasova, M., Lacina, O., Veprikova, Z., Slavikova, P., & Hajslova, J. (2014). A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices. *Talanta*, 121, 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.064>
- Eaton, D. L., Beima, K. M., Bammler, T. K., Riley, R. T., & Voss, K. A. (2010). 9.24 - Hepatotoxic Mycotoxins. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (pp. 527-569). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01023-X>
- Eaton, D. L., & Gallagher, E. P. (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 34, 135-172.
- Eberle, S., Schaden, L.-M., Tintner, J., Stauffer, C., & Schebeck, M. (2022). Effect of Temperature and Photoperiod on Development, Survival, and Growth Rate of Mealworms, *Tenebrio molitor*. *Insects*, 13(4), 321. <https://doi.org/10.3390/insects13040321>
- Edwards, S., Barrier-Guillot, B., Clasen, P.-E., Hietaniemi, V., & Pettersson, H. (2009). Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production. *World Mycotoxin Journal*, 2(2), 173-179. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.1126>

- Ehrlich, K. C., Yu, J., & Cotty, P. J. (2005). Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 518-527. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02637.x>
- El Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, 2(4), 461-493. <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>
- El tawila, M. M., Neamatallah, A., & Serdar, S. A. (2013). Incidence of aflatoxins in commercial nuts in the holy city of Mekkah. *Food Control*, 29(1), 121-124. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.004>
- El-Fadaly, H. M., El-Kadi, S. M., Hamad, M. N., & Habib, A. A. (2015). Isolation and identification of Egyptian Ras cheese (Romy) contaminating fungi during ripening period. *Journal of Microbiology Research*, 5(1), 1-10.
- El-Kady, I. A., El-Maraghy, S. S. M., & Mostafa, M. E. (1995). Natural occurrence of mycotoxins in different spices in Egypt. *Folia Microbiologica*, 40(3), 297-300. <https://doi.org/10.1007/BF02814212>
- Elkak, A., El Atat, O., Habib, J., & Abbas, M. (2012). Occurrence of aflatoxin M1 in cheese processed and marketed in Lebanon. *Food Control*, 25(1), 140-143. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.033>
- Engel, G., & Teuber, M. (1980). Formation and distribution of sterigmatocystin in cheese inoculated with *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus nidulans* [Bildung und Verteilung von Sterigmatocystin in Kase nach Beimpfung mit *Aspergillus versicolor* und *Aspergillus nidulans*]. *Milchwissenschaft*, 35(12), 721-724.
- Engelhart, S., Looock, A., Skutlarek, D., Sagunski, H., Lommel, A., Färber, H., & Exner, M. (2002). Occurrence of Toxigenic *Aspergillus versicolor* Isolates and Sterigmatocystin in Carpet Dust from Damp Indoor Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3886-3890. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3886-3890.2002>
- Erdogan, A., Gurses, M., & Sert, S. (2003). Isolation of moulds capable of producing mycotoxins from blue mouldy Tulum cheeses produced in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1), 83-85. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00485-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00485-3)
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25 %. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), 2773-2789. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- Essigmann, J. M., Barker, L. J., Fowler, K. W., Francisco, M. A., Reinhold, V. N., & Wogan, G. N. (1979). Sterigmatocystin-DNA interactions: identification of a major adduct formed after metabolic activation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 179-183. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.179>
- Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit. (2024). *Chemische Kontaminanten in Lebens- und Futtermitteln* <https://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/chemical-contaminants-food-feed>
- RICHTLINIE 2002/32/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung, (2002a).
- VERORDNUNG (EG) Nr. 178/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit, (2002b).

- EMPFEHLUNG DER KOMMISSION betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratroxin A, T-2- und HT-2-Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen, (2006).
- VERORDNUNG (EG) Nr. 1272/2008 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES
über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006, (2008).
- EMPFEHLUNG DER KOMMISSION über das Vorhandensein der Toxine T-2 und HT-2 in Getreiden und Getreideerzeugnissen, (2013).
- COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system, (2020).
- Publication of an Application for Approval of an Amendment, Which is not Minor, to a Product Specification Pursuant to Article 50(2)(a) of Regulation (EU) No 1151/2012 of the European Parliament and of the Council on Quality Schemes for Agricultural Products and Foodstuffs, (2023a). [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:52023XC0609\(09\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:52023XC0609(09))
- Verordnung (EU) 2023/915 der Kommission vom 25. April 2023 über Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006, (2023b).
- European Commission Directorate-General for Communication. (2019). Special Eurobarometer - April 2019 "Food safety in the EU" Report. <https://doi.org/10.2805/661752>
- European Commission Directorate-General for Communication. (2022). Special Eurobarometer – March 2022 "Food safety in the EU" Report. <https://doi.org/10.2805/729388>
- European Commission Directorate-General for Communication. (2025). Eurobarometer report - March April 2025 Food safety in the EU. <https://doi.org/10.2805/7315555>
- European Food Safety Authority. (2004a). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal*, 2(3), 39. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.39>
- European Food Safety Authority. (2004b). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal*, 2(6), 73. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.73>
- European Food Safety Authority. (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA Journal*, 5(3), 446. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.446>
- European Food Safety Authority. (2013). Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA Journal*, 11(6), 3254. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3254>

- European Food Safety Authority. (2017). Appropriateness to set a group health based guidance value for T2 and HT2 toxin and its modified forms. *EFSA Journal*, 15(1), e04655. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4655>
- European Food Safety Authority. (2020). Outcome of a public consultation on the risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Supporting Publications*, 17(5), 1845E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1845>
- European Food Safety Authority, Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Leblanc, J.-C., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Marko, D., Oswald, I. P.,...Wallace, H. (2020). Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal*, 18(3), e06040. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040>
- European Food Safety Authority, Turck, D., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Kearney, J., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M.,...Knutsen, H. K. (2021). Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 19(1), e06343. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6343>
- Faisal, Z., Lemli, B., Szerencsés, D., Kunsági-Máté, S., Bálint, M., Hetényi, C., Kuzma, M., Mayer, M., & Poór, M. (2018). Interactions of zearalenone and its reduced metabolites α -zearalenol and β -zearalenol with serum albumins: species differences, binding sites, and thermodynamics. *Mycotoxin Research*, 34(4), 269-278. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0321-6>
- Fan, S., Li, Q., Sun, L., Du, Y., Xia, J., & Zhang, Y. (2015). Simultaneous determination of aflatoxin B1 and M1 in milk, fresh milk and milk powder by LC-MS/MS utilising online turbulent flow chromatography. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(7), 1175-1184. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1048311>
- Fatemi, F., Allameh, A., Dadkhah, A., Forouzandeh, M., Kazemnejad, S., & Sharifi, R. (2006). Changes in hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity and expression of its class-P during prenatal and postnatal period in rats treated with aflatoxin B1. *Archives of Toxicology*, 80(9), 572-579. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0076-2>
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 507-533. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.507>
- Fink-Gremmels, J. (2005). Conclusions from the workshops on Ochratoxin A in Food: Recent developments and significance, organized by ILSI Europe in Baden (Austria), 29 June–1 July 2005. *Food Additives & Contaminants*, 22(sup1), 1-5. <https://doi.org/10.1080/02652030500358415>
- Fink-Gremmels, J. (2008a). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(2), 172-180. <https://doi.org/10.1080/02652030701823142>
- Fink-Gremmels, J. (2008b). The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176(1), 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.034>
- Fliszár-Nyúl, E., Lemli, B., Kunsági-Máté, S., Dellafiora, L., Dall'Asta, C., Cruciani, G., Pethő, G., & Poór, M. (2019). Interaction of Mycotoxin Alternariol with Serum Albumin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2352. <https://doi.org/10.3390/ijms20092352>

- Flores-Flores, M. E., & González-Peñas, E. (2017). An LC–MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. *Food Chemistry*, 218, 378-385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.101>
- Flores-Flores, M. E., & González-Peñas, E. (2018a). Analysis of Mycotoxins in Peruvian Evaporated Cow Milk. *Beverages*, 4(2), 34. <https://doi.org/10.3390/beverages4020034>
- Flores-Flores, M. E., & González-Peñas, E. (2018b). Analysis of mycotoxins in Spanish milk. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 113-117. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13290>
- Flores-Flores, M. E., Lizarraga, E., López de Cerain, A., & González-Peñas, E. (2015). Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control*, 53, 163-176. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.020>
- Föllmann, W., Ali, N., Blaszkewicz, M., & Degen, G. H. (2016). Biomonitoring of Mycotoxins in Urine: Pilot Study in Mill Workers. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 79(22-23), 1015-1025. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1219540>
- Fox, E. M., & Howlett, B. J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6), 481-487. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.10.007>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). Cheese Yield. In *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 279-331). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_10
- Freitas-Silva, O., & Venâncio, A. (2010). Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: a review. *Drug Metabolism Reviews*, 42(4), 612-620.
- Frenich, A. G., Romero-González, R., Gómez-Pérez, M. L., & Vidal, J. L. M. (2011). Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(28), 4349-4356. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.005>
- Frisvad, J. C., Skouboe, P., & Samson, R. A. (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(5), 442-453. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.02.012>
- Fushimi, Y., Takagi, M., Uno, S., Kokushi, E., Nakamura, M., Hasunuma, H., Shinya, U., Deguchi, E., & Fink-Gremmels, J. (2014). Measurement of Sterigmatocystin Concentrations in Urine for Monitoring the Contamination of Cattle Feed. *Toxins*, 6(11), 3117-3128. <https://doi.org/10.3390/toxins6113117>
- Gaborit, P., Menard, A., & Morgan, F. (2001). Impact of ripening strains on the typical flavour of goat cheeses. *International Dairy Journal*, 11(4), 315-325. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00061-9)
- Gagliano, N., Donne, I. D., Torri, C., Migliori, M., Grizzi, F., Milzani, A., Filippi, C., Annoni, G., Colombo, P., Costa, F., Ceva-Grimaldi, G., Bertelli, A. A. E., Giovannini, L., & Gioia, M. (2006). Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: A morphological, biochemical and molecular study. *Toxicology*, 225(2), 214-224. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.004>
- Galli, B. D., Martin, J. G. P., da Silva, P. P. M., Porto, E., & Spoto, M. H. F. (2016). Sensory quality of Camembert-type cheese: Relationship between starter

- cultures and ripening molds. *International Journal of Food Microbiology*, 234, 71-75. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.025>
- Gallo, A., Ghilardelli, F., Atzori, A. S., Zara, S., Novak, B., Faas, J., & Fancello, F. (2021). Co-Occurrence of Regulated and Emerging Mycotoxins in Corn Silage: Relationships with Fermentation Quality and Bacterial Communities. *Toxins*, 13(3), 232. <https://doi.org/10.3390/toxins13030232>
- Gao, W., Jiang, L., Ge, L., Chen, M., Geng, C., Yang, G., Li, Q., Ji, F., Yan, Q., Zou, Y., Zhong, L., & Liu, X. (2015). Sterigmatocystin-induced oxidative DNA damage in human liver-derived cell line through lysosomal damage. *Toxicology in Vitro*, 29(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.08.007>
- Garcia-Cela, E., Kiaitsi, E., Sulyok, M., Krska, R., Medina, A., Petit Damico, I., & Magan, N. (2019). Influence of storage environment on maize grain: CO₂ production, dry matter losses and aflatoxins contamination. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(1), 175-185. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1556403>
- Garg, K., Villavicencio-Aguilar, F., Solano-Rivera, F., & Gilbert, L. (2022). Analytical Validation of a Direct Competitive ELISA for Multiple Mycotoxin Detection in Human Serum. *Toxins*, 14(11), 727. <https://doi.org/10.3390/toxins14110727>
- Gauthier, T., Duarte-Hospital, C., Vignard, J., Boutet-Robinet, E., Sulyok, M., Snini, S. P., Alassane-Kpembé, I., Lippi, Y., Puel, S., Oswald, I. P., & Puel, O. (2020). Versicolorin A, a precursor in aflatoxins biosynthesis, is a food contaminant toxic for human intestinal cells. *Environment International*, 137, 105568. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105568>
- Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A., & Färber, P. (2004). Development of a Real Time PCR System for Detection of *Penicillium nordicum* and for Monitoring Ochratoxin A Production in Foods by Targeting the Ochratoxin Polyketide Synthase Gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(4), 501-507. <https://doi.org/10.1078/0723202041438419>
- Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., & Touhami, N. (2018). Aspects of the Occurrence, Genetics, and Regulation of Biosynthesis of the Three Food Relevant *Penicillium* Mycotoxins: Ochratoxin A, Citrinin, and Patulin. In T. Anke & A. Schöffler (Eds.), *Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects* (pp. 413-433). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71740-1_14
- Gervats, P., Molin, P., Grajek, W., & Bensoussan, M. (1988). Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(5), 457-463. <https://doi.org/10.1002/bit.260310510>
- Ghali, R., Khelifa, K. H., Ghorbel, H., Maaroufi, K., & Hedilli, A. (2010). Aflatoxin determination in commonly consumed foods in Tunisia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2347-2351. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4069>
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M. T., & Patiño, B. (2011). Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*, 22(2), 343-345. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.06.018>
- Giri, S. K., & Mangaraj, S. (2012). Processing Influences on Composition and Quality Attributes of Soymilk and its Powder. *Food Engineering Reviews*, 4(3), 149-164. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9053-0>

- Giugliano, R., Musolino, N., Ciccotelli, V., Ferraris, C., Savio, V., Vivaldi, B., Ercolini, C., Bianchi, D. M., & Decastelli, L. (2023). Soy, Rice and Oat Drinks: Investigating Chemical and Biological Safety in Plant-Based Milk Alternatives. *Nutrients*, 15(10), 2258. <https://doi.org/10.3390/nu15102258>
- Gkatzionis, K., Yunita, D., Linforth, R. S. T., Dickinson, M., & Dodd, C. E. R. (2014). Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.016>
- Gold, M., Tomberlin, J. K., Diener, S., Zurbügg, C., & Mathys, A. (2018). Decomposition of biowaste macronutrients, microbes, and chemicals in black soldier fly larval treatment: A review. *Waste Management*, 82, 302-318. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.022>
- Golli-Bennour, E. E., Kouidhi, B., Bouslimi, A., Abid-Essefi, S., Hassen, W., & Bacha, H. (2010). Cytotoxicity and genotoxicity induced by aflatoxin B1, ochratoxin A, and their combination in cultured Vero cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 24(1), 42-50. <https://doi.org/10.1002/jbt.20310>
- Gomez, A., & Tang, K. (1994). Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Physics of Fluids*, 6(1), 404-414. <https://doi.org/10.1063/1.868037>
- Gonçalves-Nunes, E. M. C., Gomes-Pereira, M. M., Raposo-Costa, A. P., da Rocha-Rosa, C. A., Pereyra, C. M., Calvet, R. M., Alves-Marques, A. L., de Chagas Cardoso-Filho, F., & Sanches-Muratori, M. C. (2015). Screening of aflatoxin B1 and mycobiota related to raw materials and finished feed destined for fish. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(3), 595-600.
- Gopalakrishnan, S., Liu, X., & Patel, D. J. (1992). Solution structure of the covalent sterigmatocystin-DNA adduct. *Biochemistry*, 31(44), 10790-10801. <https://doi.org/10.1021/bi00159a021>
- Gottschalk, C., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., & Meyer, K. (2009). Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26(9), 1273-1289. <https://doi.org/10.1080/02652030903013260>
- Govaris, A., Roussi, V., Koidis, P. A., & Botsoglou, N. A. (2001). Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of Teleme cheese. *Food Additives & Contaminants*, 18(5), 437-443. <https://doi.org/10.1080/02652030120550>
- Granados-Chinchilla, F. (2016). Insights into the interaction of milk and dairy proteins with aflatoxin m1. *Milk Proteins—From Structure to Biological Properties and Health Aspects; Isabel, G., Ed*, 265-286.
- Grenier, B., & Oswald, I. (2011). Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin Journal*, 4(3), 285-313. <https://doi.org/10.3920/wmj2011.1281>
- Griffin, S., Magro, M., Farrugia, J., Falzon, O., Camilleri, K., & Valdramidis, V. P. (2021). Towards the development of a sterile model cheese for assessing the potential of hyperspectral imaging as a non-destructive fungal detection method. *Journal of Food Engineering*, 306, 110639. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110639>
- Gripon, J. (1993). Mould-ripened cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Volume 2 Major Cheese Groups* (pp. 111-136). Springer.
- Gruber-Dorninger, C., Novak, B., Nagl, V., & Berthiller, F. (2017). Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7052-7070.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03413>
- Guengerich, F. P., Johnson, W. W., Shimada, T., Ueng, Y.-F., Yamazaki, H., & Langouët, S. (1998). Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1), 121-128. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00289-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00289-3)
- Guengerich, F. P., Johnson, W. W., Ueng, Y. F., Yamazaki, H., & Shimada, T. (1996). Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environmental Health Perspectives*, 104(suppl 3), 557-562. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s3557>
- Guindon, K. A., Bedard, L. L., & Massey, T. E. (2007). Elevation of 8-Hydroxydeoxyguanosine in DNA from Isolated Mouse Lung Cells Following In Vivo Treatment with Aflatoxin B1. *Toxicological Sciences*, 98(1), 57-62. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm073>
- Gützkow, K. L., Al Ayoubi, C., Vasco, L. S., Rohn, S., & Maul, R. (2022). Analysis of ochratoxin A, aflatoxin B1 and its biosynthetic precursors in cheese – Method development and market sample screening. *Food Control*, 109241. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109241>
- Gützkow, K. L., Ebmeyer, J., Kröncke, N., Kampschulte, N., Böhmert, L., Schöne, C., Schebb, N. H., Benning, R., Braeuning, A., & Maul, R. (2021). Metabolic fate and toxicity reduction of aflatoxin B1 after uptake by edible *Tenebrio molitor* larvae. *Food and Chemical Toxicology*, 155, 112375. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112375>
- Guyonnet, D., Belloir, C., Suschetet, M., Siess, M.-H., & Le Bon, A.-M. (2002). Mechanisms of protection against aflatoxin B1 genotoxicity in rats treated by organosulfur compounds from garlic. *Carcinogenesis*, 23(8), 1335-1341. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.8.1335>
- Haas, R., Schnepps, A., Pichler, A., & Meixner, O. (2019). Cow Milk versus Plant-Based Milk Substitutes: A Comparison of Product Image and Motivational Structure of Consumption. *Sustainability*, 11(18), 5046. <https://doi.org/10.3390/su11185046>
- Hagelberg, S., Hult, K., & Fuchs, R. (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology*, 9(2), 91-96. <https://doi.org/10.1002/jat.2550090204>
- Hallas-Møller, M., Nielsen, K. F., & Frisvad, J. C. (2016). Production of the Fusarium Mycotoxin Moniliformin by *Penicillium melanoconidium*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), 4505-4510. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00298>
- Hamed, A. M., Abdel-Hamid, M., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A. M., & Arroyo-Manzanares, N. (2019). Determination of Aflatoxins in Plant-based Milk and Dairy Products by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Analytical Letters*, 52(2), 363-372. <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1467434>
- Hathout, A. S., & Aly, S. E. (2014). Biological detoxification of mycotoxins: a review. *Annals of Microbiology*, 64(3), 905-919. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0899-7>
- Herwaarden, A. E. v., Wagenaar, E., Karnekamp, B., Merino, G., Jonker, J. W., & Schinkel, A. H. (2005). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces

- systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis*, 27(1), 123-130. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi176>
- Heshmati, A., Zohrevand, T., Khaneghah, A. M., Mozaffari Nejad, A. S., & Sant'Ana, A. S. (2017). Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran: Dietary exposure risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 202-208. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.046>
- Heussner, A. H., & Bingle, L. E. H. (2015). Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins*, 7(10), 4253-4282. <https://doi.org/10.3390/toxins7104253>
- Hinds, M. J., Beuchat, L. R., & Chinnan, M. S. (1997). Properties of a thermal-processed beverage prepared from roasted partially defatted peanuts. *International Journal of Food Science and Technology*, 32(3), 203-211. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1997.00402.x>
- Hou, L., Gan, F., Zhou, X., Zhou, Y., Qian, G., Liu, Z., & Huang, K. (2018). Immunotoxicity of ochratoxin A and aflatoxin B1 in combination is associated with the nuclear factor kappa B signaling pathway in 3D4/21 cells. *Chemosphere*, 199, 718-727. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.009>
- Hu, X., Hu, R., Zhang, Z., Li, P., Zhang, Q., & Wang, M. (2016). Development of a multiple immunoaffinity column for simultaneous determination of multiple mycotoxins in feeds using UPLC–MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(22), 6027-6036. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9626-5>
- Huang, L. C., Zheng, N., Zheng, B. Q., Wen, F., Cheng, J. B., Han, R. W., Xu, X. M., Li, S. L., & Wang, J. Q. (2014). Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, 146, 242-249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.047>
- Huang, S., Wang, J., Xing, L., Shen, H., Yan, X., Wang, J., & Zhang, X. (2014). Impairment of cell cycle progression by sterigmatocystin in human pulmonary cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 66, 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.024>
- Hult, K., Teiling, A., & Gatenbeck, S. (1976). Degradation of Ochratoxin A by a Ruminant. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(3), 443-444. <https://doi.org/10.1128/aem.32.3.443-444.1976>
- Hussein, H. S., & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), 101-134. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G., & Coton, E. (2014). Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 437-456. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>
- Iha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A., & Trucksess, M. W. (2013). Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. *Food Control*, 29(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.058>
- International Agency for Research on Cancer. (1987). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *Overall evaluations of carcinogenicity: an update of IARC Monographs Volumes 1 to 42*.

- International Agency for Research on Cancer. (1993). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to human*, 56, 489–521.
- International Agency for Research on Cancer. (2002). Aflatoxins. *IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to human*, 82, 171-300.
- Jakšić, D., Čurtović, I., Kifer, D., Rašić, D., Kopjar, N., Micek, V., Peraica, M., & Klarić, M. Š. (2020). Single-Dose Toxicity of Individual and Combined Sterigmatocystin and 5-Methoxysterigmatocystin in Rat Lungs. *Toxins*, 12(11), 734. <https://doi.org/10.3390/toxins12110734>
- Jakšić, D., Puel, O., Canlet, C., Kopjar, N., Kosalec, I., & Klarić, M. Š. (2012). Cytotoxicity and genotoxicity of versicolorins and 5-methoxysterigmatocystin in A549 cells. *Archives of Toxicology*, 86(10), 1583-1591. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0871-x>
- Jakšić Despot, D., & Šegvić Klarić, M. (2014). A year-round investigation of indoor airborne fungi in Croatia. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 65(2), 209-217.
- Järvinen, E., Deng, F., Kiander, W., Sinokki, A., Kidron, H., & Sjöstedt, N. (2022). The Role of Uptake and Efflux Transporters in the Disposition of Glucuronide and Sulfate Conjugates [Review]. *Frontiers in Pharmacology, Volume 12 - 2021*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.802539>
- Ji, C., Fan, Y., & Zhao, L. (2016). Review on biological degradation of mycotoxins. *Animal Nutrition*, 2(3), 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.07.003>
- Jiménez-Pérez, C., Tello-Solís, S. R., Gómez-Castro, C. Z., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., Cruz-Borbolla, J., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2020). Spectroscopic studies and molecular modelling of the aflatoxin M1-bovine α -lactalbumin complex formation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 209, 111957. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111957>
- Johnson, M., & Law, B. (2010). The origins, development and basic operations of cheesemaking technology. *Technology of cheesemaking*, 68-97.
- Johnson, W. W., & Guengerich, F. P. (1997). Reaction of aflatoxin B1-exo-8,9-epoxide with DNA: Kinetic analysis of covalent binding and DNA-induced hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12), 6121-6125. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6121>
- Joint Research Centre, Institute for Health Consumer Protection, Bratinova, S., Simoneau, C., & Raffael, B. (2011). *Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials*. Publications Office. <https://doi.org/10.2788/49046>
- Kabak, B. (2016). Aflatoxins in hazelnuts and dried figs: Occurrence and exposure assessment. *Food Chemistry*, 211, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.141>
- Kamala, A., Shirima, C., Jani, B., Bakari, M., Sillo, H., Rusibamayila, N., De Saeger, S., Kimanya, M., Gong, Y. Y., & Simba, A. (2018). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Tanzania during 2016. *World Mycotoxin Journal*, 11(3), 311-320. <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2344>
- Kamkar, A., Karim, G., Aliabadi, F. S., & Khaksar, R. (2008). Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. *Food and Chemical Toxicology*, 46(6), 2236-2238. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.028>

- Karabulut, S., Paytakov, G., & Leszczynski, J. (2014). Reduction of aflatoxin B1 to aflatoxicol: A comprehensive DFT study provides clues to its toxicity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), 3134-3140. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6663>
- Karsauliya, K., Yahavi, C., Pandey, A., Bhateria, M., Sonker, A. K., Pandey, H., Sharma, M., & Singh, S. P. (2022). Co-occurrence of mycotoxins: A review on bioanalytical methods for simultaneous analysis in human biological samples, mixture toxicity and risk assessment strategies. *Toxicon*, 218, 25-39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.08.016>
- Kerstner, F., & Garda-Buffon, J. (2024). Mycotoxins in plant-based beverages: An updated occurrence. *Food Research International*, 194, 114863. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114863>
- Khoshal, A. K., Novak, B., Martin, P. G. P., Jenkins, T., Neves, M., Schatzmayr, G., Oswald, I. P., & Pinton, P. (2019). Co-Occurrence of DON and Emerging Mycotoxins in Worldwide Finished Pig Feed and Their Combined Toxicity in Intestinal Cells. *Toxins*, 11(12), 727. <https://doi.org/10.3390/toxins11120727>
- Kiessling, K.-H. (1986). Biochemical mechanism of action of mycotoxins. *Pure and Applied Chemistry*, 58(2), 327-338. <https://doi.org/10.1351/pac198658020327>
- Kim, S.-H., Cha, S.-H., Karyn, B., Park, S.-W., Son, S.-W., & Kang, H.-G. (2011). Production of Group Specific Monoclonal Antibody to Aflatoxins and its Application to Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Toxicological Research*, 27(2), 125-131. <https://doi.org/10.5487/TR.2011.27.2.125>
- Kindstedt, P. S. (2013). The Basics of Cheesemaking. *Microbiology Spectrum*, 1(1), 10.1128/microbiolspec.cm-0002-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.cm-0002-2012>
- Kirinčič, S., Škrjanc, B., Kos, N., Kozolc, B., Pirnat, N., & Tavčar-Kalcher, G. (2015). Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia – Official control of foods in the years 2008–2012. *Food Control*, 50, 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.034>
- Klich, M. A., Yu, J., Chang, P. K., Mullaney, E. J., Bhatnagar, D., & Cleveland, T. E. (1995). Hybridization of genes involved in aflatoxin biosynthesis to DNA of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic aspergilli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(3), 439-443. <https://doi.org/10.1007/BF00169941>
- Koesukwiwat, U., Sanguankaew, K., & Leepipatpiboon, N. (2014). Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. *Food Chemistry*, 153, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.029>
- Kokkonen, M., Jestoi, M., & Rizzo, A. (2005). Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants*, 22(5), 449-456. <https://doi.org/10.1080/02652030500089861>
- Kolawole, O., Siri-Anusornsak, W., Petchkongkaew, A., & Elliott, C. (2024). A systematic review of global occurrence of emerging mycotoxins in crops and animal feeds, and their toxicity in livestock. *Emerging Contaminants*, 10(3), 100305. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2024.100305>
- Kollia, E., Kanapitsas, A., & Markaki, P. (2014). Occurrence of aflatoxin B1 and ochratoxin A in dried vine fruits from Greek market. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(1), 11-16. <https://doi.org/10.1080/19393210.2013.825647>

- Kos, J., Anić, M., Radić, B., Zadavec, M., Janić Hajnal, E., & Pleadin, J. (2023). Climate Change—A Global Threat Resulting in Increasing Mycotoxin Occurrence. *Foods*, 12(14), 2704. <https://doi.org/10.3390/foods12142704>
- Kos, J., Hajnal, E. J., Jajić, I., Krstović, S., Mastilović, J., Šarić, B., & Jovanov, P. (2016). Comparison of ELISA, HPLC-FLD and HPLC-MS/MS methods for determination of aflatoxin M1 in natural contaminated milk samples. *Acta Chimica Slovenica*, 63(4).
- Kosicki, R., Błajet-Kosicka, A., Grajewski, J., & Twarużek, M. (2016). Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 215, 165-180. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.012>
- Kosikowski, F. V., & Mistry, V. V. (1997). Cheese and fermented milk foods. Volume 1: origins and principles.
- Kostiainen, R., & Kauppila, T. J. (2009). Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(4), 685-699. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.095>
- Kovalsky, P., Kos, G., Nährer, K., Schwab, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., Sulyok, M., & Krska, R. (2016). Co-Occurrence of Regulated, Masked and Emerging Mycotoxins and Secondary Metabolites in Finished Feed and Maize—An Extensive Survey. *Toxins*, 8(12), 363. <https://doi.org/10.3390/toxins8120363>
- Krogh, P. (1972). Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for Balkan endemic nephropathy. *Endemic nephropathy*, 266.
- Krska, R. (1998). Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of Fusarium mycotoxins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 815(1), 49-57. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00003-X)
- Krska, R., & Molinelli, A. (2007). Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(1), 145-148. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0797-3>
- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., & Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: an update. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25(2), 152-163. <https://doi.org/10.1080/02652030701765723>
- Kuilman, M. E. M., Maas, R. F. M., Judah, D. J., & Fink-Gremmels, J. (1998). Bovine Hepatic Metabolism of Aflatoxin B1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2707-2713. <https://doi.org/10.1021/jf980062x>
- Kuiper-Goodman, T., & Scott, P. M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 2(3), 179-248. <http://europepmc.org/abstract/MED/2692617>
- Kunz, B. M., Wanko, F., Kemmlein, S., Bahlmann, A., Rohn, S., & Maul, R. (2020). Development of a rapid multi-mycotoxin LC-MS/MS stable isotope dilution analysis for grain legumes and its application on 66 market samples. *Food Control*, 109, 106949. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106949>
- Kure, C. F., & Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.003>
- Lafont, P., Siriwardana, M. G., & Lafont, J. (1979). Contamination of cheeses by mycotoxins. *Médecine et Nutrition*, 15, 257-262.
- Larsen, T. O., Svendsen, A., & Smedsgaard, J. (2001). Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus Penicillium. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3630-3635. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3630-3635.2001>

- Larsson, P., Pettersson, H., & Tjälve, H. (1989). Metabolism of aflatoxin B1 in the bovine olfactory mucosa. *Carcinogenesis*, 10(6), 1113-1118. <https://doi.org/10.1093/carcin/10.6.1113>
- Lattanzio, V. M. T., Solfrizzo, M., & Visconti, A. (2008). Determination of trichothecenes in cereals and cereal-based products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(3), 320-330. <https://doi.org/10.1080/02652030701513792>
- Lavres, J., Castro Franco, G., & de Sousa Câmara, G. M. (2016). Soybean Seed Treatment with Nickel Improves Biological Nitrogen Fixation and Urease Activity [Original Research]. *Frontiers in Environmental Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00037>
- Li, P., Su, R., Yin, R., Lai, D., Wang, M., Liu, Y., & Zhou, L. (2020). Detoxification of Mycotoxins through Biotransformation. *Toxins*, 12(2), 121. <https://doi.org/10.3390/toxins12020121>
- Li, P., Zhang, Q., Zhang, W., Zhang, J., Chen, X., Jiang, J., Xie, L., & Zhang, D. (2009). Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut. *Food Chemistry*, 115(1), 313-317. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.052>
- Li, P., Zhang, Z., Hu, X., & Zhang, Q. (2013). Advanced hyphenated chromatographic-mass spectrometry in mycotoxin determination: Current status and prospects. *Mass Spectrometry Reviews*, 32(6), 420-452. <https://doi.org/10.1002/mas.21377>
- Li, W., Chen, Z., Li, X., Li, X., Hui, Y., & Chen, W. (2024). The Biosynthesis, Structure Diversity and Bioactivity of Sterigmatocystins and Aflatoxins: A Review. *Journal of Fungi*, 10(6), 396. <https://doi.org/10.3390/jof10060396>
- Li, W., Powers, S., & Dai, S. Y. (2014). Using commercial immunoassay kits for mycotoxins: 'joys and sorrows'? *World Mycotoxin Journal*, 7(4), 417-430. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1715>
- Li, X., Liu, B., Wang, F., Ma, X., Li, Z., Guo, D., Wang, Y., Wan, F., Deng, L., & Zhang, S. (2018). Determination of 16 Mycotoxins in Maize by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Letters*, 51(5), 702-716. <https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1344246>
- Liao, C.-D., Lin, H.-Y., Chiueh, L.-C., & Shih, D.-C. (2011). Simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in cereals by LC-MS/MS. *Journal of Food and Drug Analysis*, 19(3), 3.
- Liewen, M. B., & Marth, E. H. (1985). Growth and Inhibition of Microorganisms in the Presence of Sorbic Acid: A Review. *Journal of Food Protection*, 48(4), 364-375. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-48.4.364>
- Lindahl, L., Ahlden, I., Oste, R., & Sjöholm, I. (2001). *Homogeneous and stable cereal suspension and a method of making the same*.
- Liu, X., Guan, X., Xing, F., Lv, C., Dai, X., & Liu, Y. (2017). Effect of water activity and temperature on the growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin biosynthetic genes and aflatoxin production in shelled peanuts. *Food Control*, 82, 325-332. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.012>
- Liu, Y., Du, M., & Zhang, G. (2014). Proapoptotic activity of aflatoxin B1 and sterigmatocystin in HepG2 cells. *Toxicology Reports*, 1, 1076-1086. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.016>

- Loi, M., Fanelli, F., Liuzzi, V. C., Logrieco, A. F., & Mulè, G. (2017). Mycotoxin Biotransformation by Native and Commercial Enzymes: Present and Future Perspectives. *Toxins*, 9(4), 111. <https://doi.org/10.3390/toxins9040111>
- Lopez, S. H., Dias, J., Mol, H., & de Kok, A. (2020). Selective multiresidue determination of highly polar anionic pesticides in plant-based milk, wine and beer using hydrophilic interaction liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1625, 461226. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461226>
- Lund, F., Filtenborg, O., & Frisvad, J. C. (1995). Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology*, 12, 173-180. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80094-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80094-8)
- Lund, F., & Frisvad, J. (2003). *Penicillium verrucosum* in cereals indicates production of ochratoxin A. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 1117-1123.
- Lüthy, J., Zweifel, U., & Schlatter, C. (1980). Metabolism and tissue distribution of [¹⁴C]aflatoxin B1 in pigs. *Food and Cosmetics Toxicology*, 18(3), 253-256. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(80\)90103-0](https://doi.org/10.1016/0015-6264(80)90103-0)
- Magan, N., & Aldred, D. (2007). Why do fungi produce mycotoxins? In *Food Mycology* (pp. 135-148). CRC Press.
- Mäkinen, O. E., Wanhalinna, V., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2016). Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(3), 339-349. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761950>
- Malacarne, M., Summer, A., Panari, G., Pecorari, M., & Mariani, P. (2006). Caratterizzazione chimico-fisica della maturazione del Parmigiano-Reggiano. *Sci. Tec. Latt. Casearia*, 57, 215-228.
- Malachová, A., Sulyok, M., Beltrán, E., Berthiller, F., & Krska, R. (2014). Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *Journal of Chromatography A*, 1362, 145-156. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.037>
- Malir, F., Ostry, V., & Novotna, E. (2013). Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, 32(2), 19-33. <https://doi.org/10.3109/15569543.2013.782504>
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*, 8(7), 191. <https://doi.org/10.3390/toxins8070191>
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., & Novotna, E. (2013). Ochratoxin A: Developmental and Reproductive Toxicity—An Overview. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 98(6), 493-502. <https://doi.org/10.1002/bdrb.21091>
- Mancini, A., Dreassi, E., Botta, M., Tarchi, F., & Francardi, V. (2020). Bioaccumulation risk assessment of Aflatoxin B1, ochratoxin and fumonisin B1 in *T. molitor* larvae. *Redia*, 103, 101-108.
- Manderville, R., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2008). Bioactivation and DNA adduction as a rationale for ochratoxin A carcinogenesis. *World Mycotoxin Journal*, 1(3), 357-367. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.x039>
- Manetta, A. C., Giammarco, M., Giuseppe, L. D., Fusaro, I., Gramenzi, A., Formigoni, A., Vignola, G., & Lambertini, L. (2009). Distribution of aflatoxin M1 during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry*, 113(2), 595-599. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.091>

- Manizan, A. L., Oplatowska-Stachowiak, M., Piro-Metayer, I., Campbell, K., Koffi-Nevry, R., Elliott, C., Akaki, D., Montet, D., & Brabet, C. (2018). Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Côte d'Ivoire by UHPLC-MS/MS. *Food Control*, 87, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.032>
- Mantle, P. G. (2002). Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(3), 143-146. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00079-3](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00079-3)
- Maranghi, F., Tassinari, R., Narciso, L., Tait, S., Rocca, C., Felice, G., Butteroni, C., Corinti, S., Barletta, B., Cordelli, E., Pacchierotti, F., Eleuteri, P., Villani, P., Hegarat, L., Fessard, V., & Reale, O. (2018). In vivo toxicity and genotoxicity of beauvericin and enniatins. Combined approach to study in vivo toxicity and genotoxicity of mycotoxins beauvericin (BEA) and enniatin B (ENN). *EFSA Supporting Publications*, 15(5), 1406E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1406>
- Maranghi, F., Tassinari, R., Narciso, L., Tait, S., Rocca, C. L., Felice, G. D., Butteroni, C., Corinti, S., Barletta, B., & Cordelli, E. (2018). In vivo toxicity and genotoxicity of beauvericin and enniatins. Combined approach to study in vivo toxicity and genotoxicity of mycotoxins beauvericin (BEA) and enniatin B (ENN). *EFSA Supporting Publications*, 15(5), 1406E. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1406>
- Marín, P., Palmero, D., & Jurado, M. (2015). Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. *International Journal of Dairy Technology*, 68(4), 565-572. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12208>
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Marley, E., Brown, P., Mackie, J., Donnelly, C., Wilcox, J., Pietri, A., & Macdonald, S. (2015). Analysis of sterigmatocystin in cereals, animal feed, seeds, beer and cheese by immunoaffinity column clean-up and HPLC and LC-MS/MS quantification. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 32(12), 2131-2137. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1100331>
- Marquardt, R. R., & Frohlich, A. A. (1992). A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science*, 70(12), 3968-3988. <https://doi.org/10.2527/1992.70123968x>
- Martínez-Domínguez, G., Romero-González, R., & Garrido Frenich, A. (2016). Multi-class methodology to determine pesticides and mycotoxins in green tea and royal jelly supplements by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, 197, 907-915. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.070>
- Masood, M., Iqbal, S. Z., Asi, M. R., & Malik, N. (2015). Natural occurrence of aflatoxins in dry fruits and edible nuts. *Food Control*, 55, 62-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.041>
- Massarolo, K. C., Kupski, L., Furlong, E. B., & Drunkler, D. A. (2024). Distribution of mycotoxins during manufacture and storage of cheeses – A review. *International Journal of Dairy Technology*, 77(3), 680-690. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.13089>

- McCormick, S. P. (2013). Microbial Detoxification of Mycotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 907-918. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0321-0>
- McLean, M., & Dutton, M. F. (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. *Pharmacology & Therapeutics*, 65(2), 163-192. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)00054-7](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)00054-7)
- Meijer, N., Stoopen, G., van der Fels-Klerx, H. J., van Loon, J. J. A., Carney, J., & Bosch, G. (2019). Aflatoxin B1 Conversion by Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larval Enzyme Extracts. *Toxins*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/toxins11090532>
- Meng-Reiterer, J., Bueschl, C., Rechthaler, J., Berthiller, F., Lemmens, M., & Schuhmacher, R. (2016). Metabolism of HT-2 Toxin and T-2 Toxin in Oats. *Toxins*, 8(12), 364. <https://www.mdpi.com/2072-6651/8/12/364>
- Merino, G., Álvarez, A. I., Pulido, M. M., Molina, A. J., Schinkel, A. H., & Prieto, J. G. (2006). BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN (BCRP/ABCG2) TRANSPORTS FLUOROQUINOLONE ANTIBIOTICS AND AFFECTS THEIR ORAL AVAILABILITY, PHARMACOKINETICS, AND MILK SECRETION. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(4), 690-695. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.008219>
- Meucci, V., Lenzi, A., Armani, A., Pedonese, F., Ghimentì, L., & De Marchi, L. (2025). Assessing Ochratoxin A Contamination in Pre-Packaged Grated Cheese: Implications for Food Safety. *Foods*, 14(9), 1504. <https://doi.org/10.3390/foods14091504>
- Milani, E., Shahidi, F., Mortazavi, S. A., Vakili, S. A. R., & Ghoddusi, H. B. (2014). Microbiological, Biochemical and Rheological Changes Throughout Ripening of Kurdish Cheese. *Journal of Food Safety*, 34(2), 168-175. <https://doi.org/10.1111/jfs.12110>
- Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali. (2017). Proposta di modifica del disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta «Parmigiano Reggiano». *Gazz. Uff.*, 185, 94-100. https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2021-01-05&atto.codiceRedazionale=20A07198&elenco30giorni=true
- Miró-Abella, E., Herrero, P., Canela, N., Arola, L., Borrull, F., Ras, R., & Fontanals, N. (2017). Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 229, 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.078>
- Mishra, H. N., & Das, C. (2003). A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3), 245-264. <https://doi.org/10.1080/10408690390826518>
- Mitchell, C. R., Mitchell, P. R., & Nissenbaum, R. (1990). *Nutritional rice milk product*.
- Mobashar, M., Hummel, J., Blank, R., & Südekum, K.-H. (2010). Ochratoxin A in Ruminants—A Review on Its Degradation by Gut Microbes and Effects on Animals. *Toxins*, 2(4), 809-839. <https://doi.org/10.3390/toxins204809>
- Mohammadi, S., Behmaram, K., Keshavarzi, M., Saboori, S., Jafari, A., & Ghaffarian-Bahraman, A. (2022). Aflatoxin M1 contamination in different Iranian cheese types: A systematic review and meta-analysis. *International Dairy Journal*, 133, 105437. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105437>
- Mol, H. G. J., Mac Donald, S. J., Anagnostopoulos, C., Spanjer, M., Bertuzzi, T., & Pietri, A. (2016). European survey on sterigmatocystin in cereals, cereals-based

- products, beer and nuts. *World Mycotoxin Journal*, 9(4), 633-642. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2062>
- Mol, H. G. J., Pietri, A., MacDonald, S. J., Anagnostopoulos, C., & Spanjere, M. (2015). Survey on sterigmatocystin in food. *EFSA Supporting Publications*, 12(3), 774E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2015.EN-774>
- Montagna, M. T., Santacroce, M. P., Spilotros, G., Napoli, C., Minervini, F., Papa, A., & Dragoni, I. (2004). Investigation of Fungal Contamination in Sheep and Goat Cheeses in Southern Italy. *Mycopathologia*, 158(2), 245-249. <https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000041897.17673.2c>
- Morandi, S., Cremonesi, P., Arioli, S., Stocco, G., Silveti, T., Biscarini, F., Castiglioni, B., Greco, C., D'Ascanio, V., Mora, D., & Brasca, M. (2022). Effect of using mycotoxin-detoxifying agents in dairy cattle feed on natural whey starter biodiversity. *Journal of Dairy Science*, 105(8), 6513-6526. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21793>
- Mori, H., Sugie, S., Yoshimi, N., Kitamura, J., Niwa, M., Hamasaki, T., & Kawai, K. (1986). Genotoxic effects of a variety of sterigmatocystin-related compounds in the hepatocyte/DNA-repair test and the Salmonella microsome assay. *Mutation Research Letters*, 173(3), 217-222. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(86\)90039-4](https://doi.org/10.1016/0165-7992(86)90039-4)
- Mousavi Khaneghah, A., Fakhri, Y., Gahruie, H. H., Niakousari, M., & Sant'Ana, A. S. (2019). Mycotoxins in cereal-based products during 24 years (1983–2017): A global systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.007>
- Mousavi Khaneghah, A., Moosavi, M., Omar, S. S., Oliveira, C. A. F., Karimi-Dehkordi, M., Fakhri, Y., Huseyn, E., Nematollahi, A., Farahani, M., & Sant'Ana, A. S. (2021). The prevalence and concentration of aflatoxin M1 among different types of cheeses: A global systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Food Control*, 125, 107960. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107960>
- Munekata, P. E. S., Domínguez, R., Budaraju, S., Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Mallikarjunan, K., Roohinejad, S., & Lorenzo, J. M. (2020). Effect of Innovative Food Processing Technologies on the Physicochemical and Nutritional Properties and Quality of Non-Dairy Plant-Based Beverages. *Foods*, 9(3), 288. <https://doi.org/10.3390/foods9030288>
- Muñoz, K., Campos, V., Blaszkewicz, M., Vega, M., Alvarez, A., Neira, J., & Degen, G. H. (2010). Exposure of neonates to ochratoxin A: first biomonitoring results in human milk (colostrum) from Chile. *Mycotoxin Research*, 26(2), 59-67. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0040-0>
- Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C., & Bryant, C. M. (2006). Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, 71(5), R51-R65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x>
- Mwihia, E. W., Lyche, J. L., Mbuthia, P. G., Ivanova, L., Uhlig, S., Gathumbi, J. K., Maina, J. G., Eshitera, E. E., & Eriksen, G. S. (2020). Co-Occurrence and Levels of Mycotoxins in Fish Feeds in Kenya. *Toxins*, 12(10), 627. <https://doi.org/10.3390/toxins12100627>
- Nguyen, N. T., Varga, E., Maragos, C., Baumgartner, S., Adam, G., & Berthiller, F. (2019). Cross-reactivity of commercial and non-commercial deoxynivalenol-antibodies to emerging trichothecenes and common deoxynivalenol-derivatives. *World Mycotoxin Journal*, 12(1), 45-54. <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2363>

- Niaz, K., Shah, S. Z. A., Khan, F., & Bule, M. (2020). Ochratoxin A–induced genotoxic and epigenetic mechanisms lead to Alzheimer disease: its modulation with strategies. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(36), 44673-44700. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08991-y>
- Nielsen, K. (2002). *Mould growth on building materials. Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers*. BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark. <https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/2988232/phd-kfn.pdf>
- Nielsen, K. F., Gravesen, S., Nielsen, P. A., Andersen, B., Thrane, U., & Frisvad, J. C. (1999). Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia*, 145(1), 43-56. <https://doi.org/10.1023/A:1007038211176>
- Niermans, K., Hoek-van den Hil, E. F., van Dam, R., van der Fels-Klerx, H. J., & van Loon, J. J. A. (2023). Effects of the mycotoxins aflatoxin B1, deoxynivalenol and zearalenone on survival, biomass and toxin accumulation in *Musca domestica* larvae. *World Mycotoxin Journal*, 16(4), 349-358. <https://doi.org/10.1163/18750796-20222826>
- Niermans, K., Meyer, A. M., den Hil, E. F. H.-v., van Loon, J. J. A., & van der Fels-Klerx, H. J. (2021). A systematic literature review on the effects of mycotoxin exposure on insects and on mycotoxin accumulation and biotransformation. *Mycotoxin Research*, 37(4), 279-295. <https://doi.org/10.1007/s12550-021-00441-z>
- Niermans, K., Salari, S. P., Carney, J., Hoek-van den Hil, E. F., van der Fels-Klerx, H. J., & van Loon, J. J. A. (2024). Bioconversion of aflatoxin-contaminated groundnut press cake by larvae of black soldier fly *Hermetia illucens* results in a complete mass balance for aflatoxin B1. *npj Science of Food*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1038/s41538-024-00351-1>
- Niu, G., Siegel, J., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2009). Comparative toxicity of mycotoxins to navel orangeworm (*Amyelois transitella*) and corn earworm (*Helicoverpa zea*). *Journal of Chemical Ecology*, 35(8), 951-957. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9675-8>
- Niu, G., Wen, Z., Rupasinghe, S. G., Zeng, R. S., Berenbaum, M. R., & Schuler, M. A. (2008). Aflatoxin B1 detoxification by CYP321A1 in *Helicoverpa zea*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 69(1), 32-45. <https://doi.org/10.1002/arch.20256>
- Njobeh, P. B., Dutton, M. F., Åberg, A. T., & Haggblom, P. (2012). Estimation of Multi-Mycotoxin Contamination in South African Compound Feeds. *Toxins*, 4(10), 836-848. <https://doi.org/10.3390/toxins4100836>
- Nomura, M., Aoyama, K., & Ishibashi, T. (2018). Sterigmatocystin and aflatoxin B1 contamination of corn, soybean meal, and formula feed in Japan. *Mycotoxin Research*, 34(1), 21-27. <https://doi.org/10.1007/s12550-017-0295-9>
- Noori, N., Yahyaraeyat, R., Khosravi, A., Atefi, P., Akhondzadeh Basti, A., Akrami, F., Bahonar, A., & Misaghi, A. (2012). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil on Growth and Citrinin Production by *Penicillium citrinum* in Culture Media and Mozzarella Cheese. *Journal of Food Safety*, 32(4), 445-451. <https://doi.org/10.1111/jfs.12003>
- Northolt, M. D., Van Egmond, H. P., Soentoro, P., & Deijll, E. (1980). Fungal Growth and the Presence of Sterigmatocystin in Hard Cheese. *Journal of Association*

- of *Official Analytical Chemists*, 63(1), 115-119.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/63.1.115>
- O'Brien, E., Heussner, A. H., & Dietrich, D. R. (2001). Species-, sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B. *Toxicological Sciences*, 63(2), 256-264.
- O'Brien, N., O'Connor, T., O'Callaghan, J., & Dobson, A. (2004). Toxins in cheese. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Vol. 1, pp. 561-571). Elsevier.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P., & Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84(5), 593-604. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01457-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01457-8)
- Oda, Y., Aryal, P., Terashita, T., Gillam, E. M. J., Guengerich, F. P., & Shimada, T. (2001). Metabolic activation of heterocyclic amines and other procarcinogens in *Salmonella typhimurium* umu tester strains expressing human cytochrome P4501A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2D6, 2E1, and 3A4 and human NADPH-P450 reductase and bacterial O-acetyltransferase. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 492(1), 81-90.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00154-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00154-1)
- Ogara, I. M., Zarafi, A. B., Alabi, O., Banwo, O., Ezekiel, C. N., Warth, B., Sulyok, M., & Krska, R. (2017). Mycotoxin patterns in ear rot infected maize: A comprehensive case study in Nigeria. *Food Control*, 73, 1159-1168.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.034>
- Ohtsubo, K., Saito, M., Kimura, H., & Tsuruta, O. (1978). High incidence of hepatic tumours in rats fed mouldy rice contaminated with *Aspergillus versicolor* containing sterigmatocystin. *Food and Cosmetics Toxicology*, 16(2), 143.
[https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(78\)80194-1](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(78)80194-1)
- Ok, H. E., Tian, F., Hong, E. Y., Paek, O., Kim, S.-H., Kim, D., & Chun, H. S. (2016). Harmonized Collaborative Validation of Aflatoxins and Sterigmatocystin in White Rice and Sorghum by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Toxins*, 8(12), 371. <https://doi.org/10.3390/toxins8120371>
- Olson, J. J., & Chu, F. S. (1993). Immunochemical studies of urinary metabolites of sterigmatocystin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(2), 250-255. <https://doi.org/10.1021/jf00026a021>
- Olson, J. J., & Chu, F. S. (1993). Urinary excretion of sterigmatocystin and retention of DNA adducts in liver of rats exposed to the mycotoxin: An immunochemical analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(4), 602-606.
- Open Food Facts. (2022). *Grana Padano*. Retrieved 31.01.2022 from <https://de.openfoodfacts.org/produkt/8007559055125/grana-padano>
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33(1), 65-73. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>
- Panasiuk, L., Jedziniak, P., Pietruszka, K., Piatkowska, M., & Bocian, L. (2019). Frequency and levels of regulated and emerging mycotoxins in silage in Poland. *Mycotoxin Research*, 35(1), 17-25. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0327-0>
- Panelli, S., Buffoni, J. N., Bonacina, C., & Feligini, M. (2012). Identification of moulds from the Taleggio cheese environment by the use of DNA barcodes. *Food Control*, 28(2), 385-391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.022>
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2006). Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention – a review. *Food Additives & Contaminants*, 23(4), 398-410. <https://doi.org/10.1080/02652030500376102>

- Parveen, F., Nizamani, Z. A., Gan, F., Chen, X., Shi, X., Kumbhar, S., Zeb, A., & Huang, K. (2014). Protective Effect of Selenomethionine on Aflatoxin B1-Induced Oxidative Stress in MDCK Cells. *Biological Trace Element Research*, 157(3), 266-274. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9887-9>
- Pascual, S., Rico, J. R., De Cal, A., & Melgarejo, P. (1997). Ecophysiological factors affecting growth, sporulation and survival of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum*. *Mycopathologia*, 139(1), 43-50. <https://doi.org/10.1023/A:1006898724724>
- Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2011). Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International*, 44(9), 2555-2566. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.038>
- Pattono, D., Grosso, A., Stocco, P. P., Pazzi, M., & Zeppa, G. (2013). Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. *Food Control*, 33(1), 54-57. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.019>
- Pavicich, M. A., Compagnoni, S., Meerpoel, C., Raes, K., & De Saeger, S. (2024). Ochratoxin A and AFM1 in Cheese and Cheese Substitutes: LC-MS/MS Method Validation, Natural Occurrence, and Risk Assessment. *Toxins (Basel)*, 16(12). <https://doi.org/10.3390/toxins16120547>
- Pavlenko, R., Berzina, Z., Reinholds, I., Bartkiene, E., & Bartkevics, V. (2024). An Occurrence Study of Mycotoxins in Plant-Based Beverages Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Toxins*, 16(1), 53. <https://doi.org/10.3390/toxins16010053>
- Payne, G. A. (1998). Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. *Mycotoxins in agriculture and food safety*, 9, 279-306.
- Peng, W. X., Marchal, J. L. M., & van der Poel, A. F. B. (2018). Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. *Animal Feed Science and Technology*, 237, 129-153. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.01.017>
- Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 96-136. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.005>
- Pfeiffer, E., Fleck, S. C., & Metzler, M. (2014). Catechol formation: a novel pathway in the metabolism of sterigmatocystin and 11-methoxysterigmatocystin. *Chemical Research in Toxicology*, 27(12), 2093-2099. <https://doi.org/10.1021/tx500308k>
- Pfohl-Leskowicz, A., & Manderville, R. A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1), 61-99. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600137>
- Pietri, A., Leni, G., Mulazzi, A., & Bertuzzi, T. (2022). Ochratoxin A and Sterigmatocystin in Long-Ripened Grana Cheese: Occurrence, Wheel Rind Contamination and Effectiveness of Cleaning Techniques on Grated Products. *Toxins*, 14(5), 306. <https://doi.org/10.3390/toxins14050306>
- Pitt, J. I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 266-269. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.266-269.1987>
- Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 38(Supplement_1), 17-22. <https://doi.org/10.1080/mmy.38.s1.17.22>
- Pittet, A. (2005). Modern methods and trends in mycotoxin analysis.

- Poór, M., Gömbös, P., Szabó, A., Zsidó, B. Z., Hetényi, C., Huber, T., Lukács, A., & Kunsági-Máté, S. (2025). Interaction of Mycotoxins with $\alpha(1)$ -Acid Glycoprotein (AGP) and Bovine Milk Proteins: Zearalenone, Zearalenols, and Sterigmatocystin Form Highly Stable Complexes with AGP. *Toxins (Basel)*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/toxins17040151>
- Poór, M., Li, Y., Matisz, G., Kiss, L., Kunsági-Máté, S., & Kőszegi, T. (2014). Quantitation of species differences in albumin–ligand interactions for bovine, human and rat serum albumins using fluorescence spectroscopy: A test case with some Sudlow's site I ligands. *Journal of Luminescence*, 145, 767-773. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.08.059>
- Prelle, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2014). Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices commercialized in Italy. *Food Control*, 39, 192-197. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.013>
- Priesterjahn, E.-M., Geisen, R., & Schmidt-Heydt, M. (2020). Influence of Light and Water Activity on Growth and Mycotoxin Formation of Selected Isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Microorganisms*, 8(12), 2000. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122000>
- Purchase, I. F. H., & Van der Watt, J. J. (1969). Acute toxicity of sterigmatocystin to rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 7, 135-139. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(69\)80295-6](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(69)80295-6)
- Qiao, Y., Zhang, K., Zhang, Z., Zhang, C., Sun, Y., & Feng, Z. (2022). Fermented soybean foods: A review of their functional components, mechanism of action and factors influencing their health benefits. *Food Research International*, 158, 111575. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111575>
- Qureshi, H., Hamid, S. S., Ali, S. S., Anwar, J., Siddiqui, A. A., & Khan, N. A. (2015). Cytotoxic effects of aflatoxin B1 on human brain microvascular endothelial cells of the blood-brain barrier. *Medical Mycology*, 53(4), 409-416. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv010>
- Rahmani, A., Jinap, S., & Soleimany, F. (2009). Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 202-251. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00079.x>
- Raney, K. D., Harris, T. M., Shimada, T., Guengerich, F. P., Kim, D. H., & Groopman, J. D. (1992). Oxidation of Aflatoxins and Sterigmatocystin by human liver microsomes: significance of Aflatoxin Q1 as a detoxication product of Aflatoxin B1. *Chemical Research in Toxicology*, 5(2), 202-210.
- Raney, K. D., Meyer, D. J., Ketterer, B., Harris, T. M., & Guengerich, F. P. (1992). Glutathione conjugation of aflatoxin B1 exo-and endo-epoxides by rat and human glutathione S-transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 5(4), 470-478.
- Rank, C., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Varga, J., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2011). Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology*, 115(4), 406-420. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.013>
- Rathod, P. H., Shah, P. G., Parmar, K. D., & Kalasariya, R. L. (2022). The Fate of Fluopyram in the Soil–Water–Plant Ecosystem: A Review. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 260(1). <https://doi.org/10.1007/s44169-021-00001-7>
- Rawal, S., Kim, J. E., & Coulombe, R. (2010). Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*, 89(3), 325-331. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.04.011>

- Rayleigh, L. (1882). XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 14(87), 184-186.
- Reddy, K. R. N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H. K., Abel, C. A., & Shier, W. T. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*, 29(1), 3-26. <https://doi.org/10.3109/15569541003598553>
- Reyes-Jurado, F., Soto-Reyes, N., Dávila-Rodríguez, M., Lorenzo-Leal, A. C., Jiménez-Munguía, M. T., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2023). Plant-Based Milk Alternatives: Types, Processes, Benefits, and Characteristics. *Food Reviews International*, 39(4), 2320-2351. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1952421>
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>
- Rico-Munoz, E., Samson, R. A., & Houbraken, J. (2019). Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiology*, 81, 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.016>
- Ridgway, K., & Scientific, R. (2012). Sample preparation for food contaminant analysis. *LC GC Europe-Solutions for Separation Scientist*, 25(2), 60.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., & Lima, N. (2012). Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. *Food Research International*, 48(1), 76-90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.02.007>
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Nuñez, F., & Córdoba, J. J. (2012). Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control*, 27(1), 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.03.009>
- Rodríguez-Cañás, I., González-Jartín, J. M., Alvarinho, R., Alfonso, A., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2023). Detection of mycotoxins in cheese using an optimized analytical method based on a QuEChERS extraction and UHPLC-MS/MS quantification. *Food Chemistry*, 408, 135182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135182>
- Rodríguez-Carrasco, Y., Moltó, J. C., Mañes, J., & Berrada, H. (2017). Development of microextraction techniques in combination with GC–MS/MS for the determination of mycotoxins and metabolites in human urine. *Journal of Separation Science*, 40(7), 1572-1582. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601131>
- Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J. L., Prestes, O. D., & Grió, S. L. (2011). Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(11), 1477-1485. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.034>
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., & Dupont, J. (2012). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 199-210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005>
- Rossi, F., Gallo, A., & Bertuzzi, T. (2020). Emerging mycotoxins in the food chain. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 13(1), 7-27. <https://doi.org/10.3233/mnm-190345>

- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 81-100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- Rustom, I. Y. S., López-Leiva, M. H., & Nair, B. M. (1991). A study of factors affecting extraction of peanut (*Arachis hypogaea* L.) solids with water. *Food Chemistry*, 42(2), 153-165. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(91\)90031-I](https://doi.org/10.1016/0308-8146(91)90031-I)
- Rychlik, M., & Asam, S. (2008). Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(2), 617-628. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1717-x>
- Sáez, J. M., Medina, Á., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo, R., & Jiménez, M. (2004). Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1029(1), 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.021>
- Sallustio, B. C. (2008). Chapter 3 Glucuronidation-Dependent Toxicity and Bioactivation. In J. C. Fishbein (Ed.), *Advances in Molecular Toxicology* (Vol. 2, pp. 57-86). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1872-0854\(07\)02003-6](https://doi.org/10.1016/S1872-0854(07)02003-6)
- Sarmast, E., Fallah, A. A., Jafari, T., & Mousavi Khaneghah, A. (2021). Impacts of unit operation of cheese manufacturing on the aflatoxin M1 level: A global systematic review and meta-analysis. *LWT*, 148, 111772. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111772>
- Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R., & Sánchez-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *NeuroToxicology*, 27(1), 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.07.004>
- Sava, V., Velasquez, A., Song, S., & Sanchez-Ramos, J. (2007). Adult Hippocampal Neural Stem/Progenitor Cells In Vitro Are Vulnerable to the Mycotoxin Ochratoxin-A. *Toxicological Sciences*, 98(1), 187-197. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm093>
- Saxena, J., & Mehrotra, B. S. (1989). Screening of spices commonly marketed in India for natural occurrence of mycotoxins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2(3), 286-292. [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(89\)90025-2](https://doi.org/10.1016/0889-1575(89)90025-2)
- Scarpino, V., Blandino, M., Negre, M., Reyneri, A., & Vanara, F. (2013). Moniliformin analysis in maize samples from North-West Italy using multifunctional clean-up columns and the LC-MS/MS detection method. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(5), 876-884. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.793825>
- Schamann, A., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., Kulling, S. E., & Soukup, S. T. (2022). Formation of B- and M-group aflatoxins and precursors by *Aspergillus flavus* on maize and its implication for food safety. *Mycotoxin Res*, 38(2), 79-92. <https://doi.org/10.1007/s12550-022-00452-4>
- Schiavano, G., Barbieri, E., Sisti, M., Gioacchini, A., Santi, M. d., Vallorani, L., Casadei, L., Piccoli, G., Guescini, M., Stocchi, V., & Brandi, G. (2012). Characterization of microflora and volatile organic compounds of Fossa (pit) cheese [Caratterizzazione della microflora e dei composti organici volatili del formaggio di Fossa.]. *Industrie Alimentari*, 51(524), 19-32.
- Schmidt-Heydt, M., Graf, E., Stoll, D., & Geisen, R. (2012). The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiology*, 29(2), 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.003>
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C. E., Abdel-Hadi, A., Magan, N., & Geisen, R. (2010). The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various

- combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Research*, 26(4), 241-246. <https://doi.org/10.1007/s12550-010-0062-7>
- Schwake-Anduschus, C., Langenkamper, G., Unbehend, G., Dietrich, R., Martlbauer, E., & Munzing, K. (2010). Occurrence of Fusarium T-2 and HT-2 toxins in oats from cultivar studies in Germany and degradation of the toxins during grain cleaning treatment and food processing. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 27(9), 1253-1260. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.487499>
- Scott, P. M. (1981). Toxins of Penicillium Species Used in Cheese Manufacture. *Journal of Food Protection*, 44(9), 702-710. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-44.9.702>
- Sengun, I., Yaman, D., & Gonul, S. (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal*, 1(3), 291-298. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.x041>
- Sethi, S., Tyagi, S. K., & Anurag, R. K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of food science and technology*, 53(9), 3408–3423. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2328-3>
- Shephard, G. S. (2019). Current Status of Mycotoxin Analysis: A Critical Review. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 99(4), 842-848. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0111>
- Shreeve, B. J., Patterson, D. S. P., & Roberts, B. A. (1979). The ‘carry-over’ of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows. *Food and Cosmetics Toxicology*, 17(2), 151-152. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(79\)90215-3](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90215-3)
- Silva, A. R. A., Silva, M. M. N., & Ribeiro, B. D. (2020). Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. *Food Research International*, 131, 108972. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108972>
- Sirianusornsak, W., Kolawole, O., Mahakarnchanakul, W., Greer, B., Petchkongkaew, A., Meneely, J., Elliott, C., & Vangnai, K. (2022). The Occurrence and Co-Occurrence of Regulated, Emerging, and Masked Mycotoxins in Rice Bran and Maize from Southeast Asia. *Toxins*, 14(8), 567. <https://doi.org/10.3390/toxins14080567>
- Slobodchikova, I., Sivakumar, R., Rahman, M. S., & Vuckovic, D. (2019). Characterization of Phase I and Glucuronide Phase II Metabolites of 17 Mycotoxins Using Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *Toxins*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/toxins11080433>
- Smetana, S., Palanisamy, M., Mathys, A., & Heinz, V. (2016). Sustainability of insect use for feed and food: Life Cycle Assessment perspective. *Journal of Cleaner Production*, 137, 741-751. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.148>
- Smith, M.-C., Madec, S., Coton, E., & Hymery, N. (2016). Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins*, 8(4), 94. <https://doi.org/10.3390/toxins8040094>
- Solfrizzo, M., Gambacorta, L., Lattanzio, V. M. T., Powers, S., & Visconti, A. (2011). Simultaneous LC–MS/MS determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B1 in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(9), 2831-2841. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5354-z>

- Spanjer, M. C., Rensen, P. M., & Scholten, J. M. (2008). LC–MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(4), 472-489. <https://doi.org/10.1080/02652030701552964>
- Speijers, G. J., & Speijers, M. H. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153(1), 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.046>
- Stark, A. A., Essigmann, J. M., Demain, A. L., Skopek, T. R., & Wogan, G. N. (1979). Aflatoxin B1 mutagenesis, DNA binding, and adduct formation in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(3), 1343-1347. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.3.1343>
- Steyn, M., & Thiel, P. G. (1976). Biliary excretion of sterigmatocystin by vervet monkeys. *Biochemical Pharmacology*, 25(3), 265-266. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(76\)90211-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(76)90211-2)
- Stoev, S. D. (2023). Foodborne Diseases Due to Underestimated Hazard of Joint Mycotoxin Exposure at Low Levels and Possible Risk Assessment. *Toxins*, 15(7), 464. <https://doi.org/10.3390/toxins15070464>
- Streit, E., Naehrer, K., Rodrigues, I., & Schatzmayr, G. (2013). Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2892-2899. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6225>
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O., & Oswald, I. P. (2012). Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed—Focus on Europe. *Toxins*, 4(10), 788-809. <https://doi.org/10.3390/toxins4100788>
- Stroka, J., & Maragos, C. M. (2016). Challenges in the analysis of multiple mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 847-862. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2038>
- Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2007). A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(5), 1505-1523. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1542-2>
- Sun, J., Li, W., Zhang, Y., Hu, X., Wu, L., & Wang, B. (2016). QuEChERS Purification Combined with Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Simultaneous Quantification of 25 Mycotoxins in Cereals. *Toxins*, 8(12), 375. <https://doi.org/10.3390/toxins8120375>
- Sweeney, M. J., & Dobson, A. D. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43(3), 141-158.
- Sweeney, M. J., & Dobson, A. D. W. (1999). Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175(2), 149-163. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00103-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00103-2)
- Tabata, S. (2022). Mycotoxins: Aflatoxins and Related Compounds. In P. L. H. McSweeney & J. P. McNamara (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)* (pp. 575-585). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00071-4>
- Takagi, M., Uno, S., Kokushi, E., Sato, F., Wijayagunawardane, M., & Fink-Gremmels, J. (2018). Measurement of urinary concentrations of the mycotoxins zearalenone and sterigmatocystin as biomarkers of exposure in mares.

- Reproduction in Domestic Animals*, 53(1), 68-73.
<https://doi.org/10.1111/rda.13054>
- Tammer, B., Lehmann, I., Nieber, K., & Altenburger, R. (2007). Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function. *Toxicology Letters*, 170(2), 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.02.012>
- Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U. S., Sugiura, Y., & Ueno, Y. (1988). Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(5), 979-983.
<https://doi.org/10.1021/jf00083a019>
- Tano-Debrah, K., Asiamah, K., Sakyi-Dawson, E., & Budu, A. (2005). Effect of malt enzyme treatment on the nutritional and physicochemical characteristics of cowpea-peanut milk. In (pp. 1–7). Pretoria University of Pretoria.
- Tansakul, N., Limsuwan, S., Böhm, J., Hollmann, M., & Razzazi-Fazeli, E. (2013). Aflatoxins in selected Thai commodities. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 6(4), 254-259. <https://doi.org/10.1080/19393210.2013.812148>
- Tao, W. C. W., Niermans, K., Weide, Y. B. N., van Dongen, K. C. W., Meijer, N., Hoek - van den Hil, E. F., & van der Fels-Klerx, H. J. (2025). Impact of aflatoxin B1-exposure on the genotoxic potential of larval extracts of the black soldier fly (*Hermetia illucens*), housefly (*Musca domestica*) and lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 117, 104724. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104724>
- Taylor, G. I. (1964). Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 280(1382), 383-397. <https://doi.org/10.1098/rspa.1964.0151>
- Terao, K. (1983). Sterigmatocystin-a Masked Potent Carcinogenic Mycotoxin. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 2(1), 77-110.
<https://doi.org/10.3109/15569548309006494>
- Theumer, M. G., Henneb, Y., Khoury, L., Snini, S. P., Tadriss, S., Canlet, C., Puel, O., Oswald, I. P., & Audebert, M. (2018). Genotoxicity of aflatoxins and their precursors in human cells. *Toxicology Letters*, 287, 100-107.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.02.007>
- Thiel, P. G., & Steyn, M. (1973). Urinary excretion of the mycotoxin sterigmatocystin by velvet monkeys. *Biochemical Pharmacology*, 22, 3267-3273.
- Thieu, N. Q., & Pettersson, H. (2009). Zearalenone, deoxynivalenol and aflatoxin B1 and their metabolites in pig urine as biomarkers for mycotoxin exposure. *Mycotoxin Research*, 25(2), 59-66. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0009-z>
- Tian, H., & Liu, X. (2004). Survey and analysis on sterigmatocystin contaminated in grains in China. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research*, 33(5), 606-608. <http://europepmc.org/abstract/MED/15612493>
- Tolosa, J., Rodríguez-Carrasco, Y., Ruiz, M. J., & Vila-Donat, P. (2021). Multi-mycotoxin occurrence in feed, metabolism and carry-over to animal-derived food products: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 158, 112661.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112661>
- Townsend, C. A. (1986). Progress toward a biosynthetic rationale of the aflatoxin pathway. *Pure and Applied Chemistry*, 58(2), 227-238.
<https://doi.org/10.1351/pac198658020227>

- Tuomi, T., Reijula, K., Johnsson, T., Hemminki, K., Hintikka, E.-L., Lindroos, O., Kalso, S., Koukila-Kähkölä, P., Mussalo-Rauhamaa, H., & Haahtela, T. (2000). Mycotoxins in Crude Building Materials from Water-Damaged Buildings. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1899-1904. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1899-1904.2000>
- Turner, N. W., Bramhmbhatt, H., Szabo-Vezse, M., Poma, A., Coker, R., & Piletsky, S. A. (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Analytica Chimica Acta*, 901, 12-33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.013>
- Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632(2), 168-180. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010>
- Uhlig, S., Eriksen, G. S., Hofgaard, I. S., Krska, R., Beltrán, E., & Sulyok, M. (2013). Faces of a Changing Climate: Semi-Quantitative Multi-Mycotoxin Analysis of Grain Grown in Exceptional Climatic Conditions in Norway. *Toxins*, 5(10), 1682-1697. <https://doi.org/10.3390/toxins5101682>
- Vaclavikova, M., Malachova, A., Veprikova, Z., Dzuman, Z., Zachariasova, M., & Hajslova, J. (2013). 'Emerging' mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chemistry*, 136(2), 750-757. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.031>
- van der Fels-Klerx, H. J., Camenzuli, L., Belluco, S., Meijer, N., & Ricci, A. (2018). Food Safety Issues Related to Uses of Insects for Feeds and Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1172-1183. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12385>
- van Egmond, H., Vreman, K., Deyll, W., & Paulsch, W. (1978). Het gehalte aan sterigmatocystine(n) in volle melk ten gevolge van het voeren van met sterigmatocystine gecontamineerd krachtvoer aan de koe. *Rijks Instituut voor de Volksgezondheid*, 45/78, 14.
- van Egmond, H. P. (1983). Mycotoxins in dairy products. *Food Chemistry*, 11(4), 289-307. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(83\)90076-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(83)90076-6)
- Van Egmond, H. P., & Northolt, M. (1981). Contamination of ripening cheese with *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin. Proceedings of the 4th Meeting on Mycotoxins in Animal Disease, Weybridge, UK.
- van Raamsdonk, L. W. D., van der Fels-Klerx, H. J., & de Jong, J. (2017). New feed ingredients: the insect opportunity. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 34(8), 1384-1397. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1306883>
- Var, I., Kabak, B., & Erginkaya, Z. (2008). Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. *Food Control*, 19(6), 592-598. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.06.013>
- Varelas, V. (2019). Food Wastes as a Potential new Source for Edible Insect Mass Production for Food and Feed: A review. *Fermentation*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation5030081>
- Varga, E., Glauner, T., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R., & Sulyok, M. (2013). Development and validation of a (semi-)quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(15), 5087-5104. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6831-3>

- Vargas Medina, D. A., Bassolli Borsatto, J. V., Maciel, E. V. S., & Lanças, F. M. (2021). Current role of modern chromatography and mass spectrometry in the analysis of mycotoxins in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 135, 116156. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116156>
- Veršilovskis, A., & Bartkevičs, V. (2012). Stability of sterigmatocystin during the bread making process and its occurrence in bread from the Latvian market. *Mycotoxin Research*, 28(2), 123-129. <https://doi.org/10.1007/s12550-012-0124-0>
- Veršilovskis, A., Bartkevičs, V., & Miķelsone, V. (2008). Sterigmatocystin presence in typical Latvian grains. *Food Chemistry*, 109(1), 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.066>
- Veršilovskis, A., & De Saeger, S. (2010). Sterigmatocystin: Occurrence in foodstuffs and analytical methods – An overview. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(1), 136-147. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900345>
- Versilovskis, A., Van Peteghem, C., & De Saeger, S. (2009). Determination of sterigmatocystin in cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 26(1), 127-133. <https://doi.org/10.1080/02652030802342497>
- Vidal, A., Claeys, L., Mengelers, M., Vanhoorne, V., Vervaet, C., Huybrechts, B., De Saeger, S., & De Boevre, M. (2018). Humans significantly metabolize and excrete the mycotoxin deoxynivalenol and its modified form deoxynivalenol-3-glucoside within 24 hours. *Scientific Reports*, 8(1), 5255. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23526-9>
- Vidal, A., Marín, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 133-138. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.020>
- Vijayaraj Reddy, M., Rick Irvin, T., & Randerath, K. (1985). Formation and persistence of sterigmatocystin-DNA adducts in rat liver determined via 32P-postlabeling analysis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 152(1), 85-96. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(85\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(85)90049-1)
- Wang, G., Li, E., Gallo, A., Perrone, G., Varga, E., Ma, J., Yang, B., Tai, B., & Xing, F. (2023). Impact of environmental factors on ochratoxin A: From natural occurrence to control strategy. *Environmental Pollution*, 317, 120767. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120767>
- Wang, N., Wu, W., Pan, J., & Long, M. (2019). Detoxification Strategies for Zearalenone Using Microorganisms: A Review. *Microorganisms*, 7(7), 208. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070208>
- Warth, B., Parich, A., Atehnkeng, J., Bandyopadhyay, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M., & Krska, R. (2012). Quantitation of Mycotoxins in Food and Feed from Burkina Faso and Mozambique Using a Modern LC-MS/MS Multitoxin Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9352-9363. <https://doi.org/10.1021/jf302003n>
- Weidenbach, A., & Petzinger, E. (2004). Ochratoxin A: toxicology of an abundant mycotoxin. *Curr. Top. Pharmacol*, 8, 235-250.
- Wenzl, T., Haedrich, J., Schaechtele, A., Piotr, R., Stroka, J., Eppe, G., & Scholl, G. (2016). *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Food and Feed*. P. O. o. t. E.

- Union. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/guidance-document-estimation-lod-and-log-measurements-field-contaminants-feed-and-food>
- Woelflingseder, L., Warth, B., Vierheilig, I., Schwartz-Zimmermann, H., Hametner, C., Nagl, V., Novak, B., Šarkanj, B., Berthiller, F., Adam, G., & Marko, D. (2019). The Fusarium metabolite culmorin suppresses the in vitro glucuronidation of deoxynivalenol. *Archives of Toxicology*, 93(6), 1729-1743. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02459-w>
- Wong, J. J., Singh, R., & Hsieh, D. P. (1977). Mutagenicity of fungal metabolites related to aflatoxin biosynthesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 44(3), 447-450.
- Wong, Z. A., & Hsieh, D. P. H. (1980). The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B1 in the monkey, rat, and mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 55(1), 115-125. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(80\)90227-6](https://doi.org/10.1016/0041-008X(80)90227-6)
- World Health Organization. (2002). Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty sixth report. *Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, 27-35.
- Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., & Kuca, K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*, 41(1), 1-7. <https://doi.org/10.1080/03602530802563850>
- Xie, A., Dong, Y., Liu, Z., Li, Z., Shao, J., Li, M., & Yue, X. (2023). A Review of Plant-Based Drinks Addressing Nutrients, Flavor, and Processing Technologies. *Foods*, 12(21), 3952. <https://doi.org/10.3390/foods12213952>
- Xie, H., Wang, X., Zhang, L., Wang, T., Zhang, W., Jiang, J., Chang, P.-K., Chen, Z.-Y., Bhatnagar, D., Zhang, Q., & Li, P. (2018). Monitoring Metabolite Production of Aflatoxin Biosynthesis by Orbitrap Fusion Mass Spectrometry and a D-Optimal Mixture Design Method. *Analytical Chemistry*, 90(24), 14331-14338. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03703>
- Yabe, K., Ando, Y., & Hamasaki, T. (1988). Biosynthetic relationship among aflatoxins B1, B2, G1, and G2. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), 2101-2106. <https://doi.org/10.1128/aem.54.8.2101-2106.1988>
- Yang, X.-J., Lu, H.-Y., Li, Z.-Y., Bian, Q., Qiu, L.-L., Li, Z., Liu, Q., Li, J., Wang, X., & Wang, S.-L. (2012). Cytochrome P450 2A13 mediates aflatoxin B1-induced cytotoxicity and apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 300(3), 138-148. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.010>
- Yao, H., Hruska, Z., & Di Mavungu, J. D. (2015). Developments in detection and determination of aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 8(2), 181-192. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1797>
- Yassin, M. A., El-Samawaty, A., Moslem, M. A., & El-Naggar, M. A. (2013). Mycobiota of almond seeds and the toxigenicity of some involved genera. *Life Sci J*, 10(4), 1088-1093.
- Yazdanpanah, H. (2011). Mycotoxins: analytical challenges. *Iran J Pharm Res*, 10(4), 653-654.
- Yogendrarajah, P., Jacxsens, L., De Saeger, S., & De Meulenaer, B. (2014). Co-occurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capsicum annum* L.) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium. *Food Control*, 46, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.043>
- Yogendrarajah, P., Van Poucke, C., De Meulenaer, B., & De Saeger, S. (2013). Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins

- in spices. *Journal of Chromatography A*, 1297, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.075>
- Yu, J. (2012). Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*, 4(11), 1024-1057. <https://doi.org/10.3390/toxins4111024>
- Yu, J., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Keller, N. P., & Chu, F. S. (1993). Cloning and characterization of a cDNA from *Aspergillus parasiticus* encoding an O-methyltransferase involved in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), 3564-3571. <https://doi.org/10.1128/aem.59.11.3564-3571.1993>
- Yu, J., Chang, P. K., Cary, J. W., Wright, M., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A., & Linz, J. E. (1995). Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6), 2365-2371. <https://aem.asm.org/content/aem/61/6/2365.full.pdf>
- Yu, J., Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A., Linz, J. E., Woloshuk, C. P., & Bennett, J. W. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1253-1262. <https://doi.org/10.1128/aem.70.3.1253-1262.2004>
- Yunus, A. W., Razzazi-Fazeli, E., & Bohm, J. (2011). Aflatoxin B1 in Affecting Broiler's Performance, Immunity, and Gastrointestinal Tract: A Review of History and Contemporary Issues. *Toxins*, 3(6), 566-590. <https://doi.org/10.3390/toxins3060566>
- Yuvaşen, A., Macit, E., & Dertli, E. (2018). Microbial species playing roles for the production of traditional Kasar cheese during pre-maturation period. *LWT*, 91, 406-413. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.075>
- Zachariasova, M., Cuhra, P., & Hajslova, J. (2014). Cross-reactivity of rapid immunochemical methods for mycotoxins detection towards metabolites and masked mycotoxins: the current state of knowledge. *World Mycotoxin Journal*, 7(4), 449-464. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1701>
- Zeng, R. S., Wen, Z., Niu, G., & Berenbaum, M. R. (2013). Aflatoxin B1: Toxicity, bioactivation and detoxification in the polyphagous caterpillar *Trichoplusia ni*. *Insect Science*, 20(3), 318-328. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12007>
- Zeng, R. S. L., Niu, G., Wen, Z., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2006). Toxicity of Aflatoxin B1 to *Helicoverpa zea* and Bioactivation by Cytochrome P450 Monooxygenases. *Journal of Chemical Ecology*, 32(7), 1459-1471. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9062-7>
- Zhang, K., Wong, J. W., Jia, Z., Vaclavikova, M., Trucksess, M. W., & Begley, T. H. (2019). Screening Multimycotoxins in Food-Grade Gums by Stable Isotope Dilution and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 97(3), 889-895. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-263>
- Zhang, Y.-y., Zhao, M.-j., Liu, C.-y., Ma, K., Liu, T.-y., Chen, F., Wu, L.-n., Hu, D.-j., & Lv, G.-p. (2023). Comparison of two commercial methods with a UHPLC–MS/MS method for the determination of multiple mycotoxins in cereals. *Food Chemistry*, 406, 135056. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135056>
- Zhang, Z., Fan, Z., Nie, D., Zhao, Z., & Han, Z. (2019). Analysis of the Carry-Over of Ochratoxin A from Feed to Milk, Blood, Urine, and Different Tissues of Dairy

- Cows Based on the Establishment of a Reliable LC-MS/MS Method. *Molecules*, 24(15), 2823. <https://doi.org/10.3390/molecules24152823>
- Zhao, Y.-R., Chen, Z.-H., Wang, Q.-S., Wang, X., & Wang, F.-H. (2020). Investigation on contamination of sterigmatocystin in oat and products in some areas of China. *Journal of Food Safety and Quality*, 11(5), 1674–1678.
- Zhou, H., George, S., Hay, C., Lee, J., Qian, H., & Sun, X. (2017). Individual and combined effects of Aflatoxin B1, Deoxynivalenol and Zearalenone on HepG2 and RAW 264.7 cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 103, 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.017>
- Zhou, Q., Li, F., Chen, L., & Jiang, D. (2016). Quantitative Analysis of 10 Mycotoxins in Wheat Flour by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with a Modified QuEChERS Strategy. *Journal of Food Science*, 81(11), T2886-T2890. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13524>
- Zhu, Y., Hassan, Y. I., Lepp, D., Shao, S., & Zhou, T. (2017). Strategies and Methodologies for Developing Microbial Detoxification Systems to Mitigate Mycotoxins. *Toxins*, 9(4), 130. <https://doi.org/10.3390/toxins9040130>
- Zingales, V., Esposito, M. R., Quagliata, M., Cimetta, E., & Ruiz, M.-J. (2024). Cytotoxic effects induced by combined exposure to the mycotoxins sterigmatocystin, ochratoxin A and patulin on human tumour and healthy 3D spheroids. *Food and Chemical Toxicology*, 192, 114951. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114951>
- Zingales, V., Fedeli, C., Fernández-Franzón, M., & Ruiz, M. J. (2020a). Cytotoxic effects of individual and combined sterigmatocystin and nivalenol on liver hepatocellular carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 143, 111473. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111473>
- Zingales, V., Fernandez-Franzon, M., & Ruiz, M. J. (2020b). Sterigmatocystin: Occurrence, toxicity and molecular mechanisms of action - A review. *Food Chem Toxicol*, 146, 111802. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111802>
- Zöllner, P., & Mayer-Helm, B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1136(2), 123-169. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.055>
- Zouaoui, N., Mallebrera, B., Berrada, H., Abid-Essefi, S., Bacha, H., & Ruiz, M.-J. (2016). Cytotoxic effects induced by patulin, sterigmatocystin and beauvericin on CHO–K1 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 89, 92-103. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.01.010>

7 Anhang

7.1 Ergänzende Informationen zu den Publikationen (*Supplemental Material*)

7.1.1 Publikation I

Comprehensive investigation of undesired substances and microbial contamination in plant-based drinks

Kim Lara Gützkow, Alena Lencioni, Christine Schwake-Anduschus , Alexandra Müller, Jan Kabisch, Vanessa Grundmann, Melanie Stöckl, Ronald Maul

DOI: 10.1016/j.foodcont.2024.110599

Table S 1: Internal standard, analyte concentration in calibration mixes and limit of detection and quantification.

Analyte	IS ^a concentration in final calibration mix [ng/L]	Lowest calibration concentration [ng/L]	Highest calibration concentration [ng/L]	LOD ^b [ng/L]	LOQ ^c [ng/L]
AFB ₁	493	50	10,000	2	8
STC	486	50	10,000	2	5
OTA	3,110	350	10,030	288	950

^a IS: internal standard, ^b LOD: limit of detection in original drink sample, ^c LOQ: limit of quantification in original drink sample

Table S 2: Analytical parameters of quantitative determination of the analytes with the HPLC-MS/MS; ESI (+) and (-) mode; multiple reaction monitoring mode; the second product ion was used as a qualifier for the confirmation of identity for each analyte.

Analyte	Precursor ion [<i>m/z</i>]	Product ions [<i>m/z</i>]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
Aflatoxin B ₁	313.0	285.0 241.0	111 111	33 49	16 26
¹³ C-Aflatoxin B ₁	330.0	301.0	111	33	16
Sterigmatocystin	325.0	310.0 281.0	96 96	33 49	18 32
¹³ C-Sterigmatocystin	343.0	297.0	96	49	32
Ochratoxin A	404.0	239.1 357.9	31 31	29 19	14 24
¹³ C-Ochratoxin A	424.1	250.1	31	29	14
Aflatoxin M ₁	329.0	273.0 229.0	116 116	33 53	16 26
O-Methylsterigmatocystin	339.1	324.1 306.1	96 96	33 49	18 32
Dihydrosterigmatocystin	327.1	312.0 271.1	96 96	33 49	18 32
Dihydro-O-methylsterigmatocystin	341.1	326.1 313.1	96 96	33 49	18 32
Aflatoxin B ₂	315.0	259.0 287.1	25 25	39 25	28 26
Aflatoxin G ₁	329.0	243.1 311.0	25 25	37 29	28 16
Aflatoxin G ₂	331.0	313.0 245.1	121 121	33 41	42 10
Aspertoxin	355.1	322.1	96	33	18

Analyte	Precursor ion [<i>m/z</i>]	Product ions [<i>m/z</i>]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
		340.1	96	30	20
Aflatoxicol	315	287	25	35	28
		271	25	40	26
		297	25	30	26
5-Methoxysterigmatocystin	355	340	96	33	18
		327	96	33	18
		324	96	33	18
Versicolorin A	337.1	309.1	-130	-34	-15
		252.1	-130	-45	-15
Versicolorin B	339.1	311.1	-130	-35	-15
		283.1	-130	-45	-15
Versiconol	359.1	341.1	-130	-35	-15
		329.1	-130	-45	-15
Norsolorinic acid	369.1	325.1	-130	-35	-15
		284.1	-130	-45	-15
Averantin	371.1	353.1	-130	-35	-15
		325.0	-130	-45	-15
Hydroxyaverantin	387.1	369.1	-130	-35	-15
		342.1	-130	-45	-15
Averufin	367.1	284.1	-130	-35	-15
		295.1	-130	-45	-15
Oxoaverantin	385.1	367.1	-130	-35	-15
		355.1	-130	-45	-15
Hydroxyversicolorone	383.1	339.1	-130	-35	-15
		294.1	-130	-45	-15
Versiconal hemiacetal acetate	399.1	337.1	-130	-35	-15
		355.1	-130	-45	-15
Versiconol acetate	401.1	341.1	-130	-35	-15
		383.1	-130	-45	-15
Cyclopiazonic acid	335.0	139.9	-130	-38	-15
		179.9	-130	-34	-11
Citrinin	281.0	249.1	-50	-24	-7
		205.0	-50	-33	-7
Deoxynivalenol	355.0	59.0	-45	-40	-1
		295.0	-45	-14	-9
¹³ C-Deoxynivalenol	370.0	59.2	-45	-40	-1
		310.1	-45	-14	-9
Zearalenon	317.0	174.8	-95	-36	-13
		131.1	-95	-42	-7

Analyte	Precursor ion [<i>m/z</i>]	Product ions [<i>m/z</i>]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
¹³ C-Zearalenon	335.0	185.0	-95	-36	-15
		140.0	-95	-44	-21
HT2	442.0	262.9	41	19	22
		215.0	41	19	18
¹³ C-HT2	464.1	278.0	41	19	22
		229.1	41	19	18
T2	484.0	305.0	56	19	18
		215.1	56	27	18
¹³ C-T2	508.1	322.1	56	19	18
		229.1	56	27	18
Azoxystrobin	404.1	372.0	76	21	18
		344.0	76	37	16
Beflubutamid	356.1	91.2	106	53	10
		65.1	106	105	6
Benzovindiflupyr	398.1	341.9	86	27	16
		322.0	86	35	14
Bifenox	359.0	309.9	61	17	14
		189.2	61	37	10
Bixafen	414.1	393.8	71	21	20
		266.1	71	35	10
Boscalid	343.0	307.0	96	31	12
		140.2	96	29	18
Bromuconazol	377.9	158.9	91	39	22
		70.1	91	47	8
Carfentrazon-ethyl	412.1	346.1	106	33	16
		365.9	106	27	16
Chlortoluron	213.1	72.1	67	39	6
		140.2	67	35	20
Clodinafop-propargylester	350.1	266.0	91	23	10
		91.1	91	45	10
Cyflufenamid	413.1	295.0	81	23	12
		241.2	81	35	8
Cyproconazol	292.2	70.1	76	43	6
		125.2	76	43	16
Cyprodinil	226.2	93.2	106	51	10
		77.2	106	71	8
Difenoconazol	406.1	251.1	96	37	10
		336.9	96	25	16
Diflufenican	395.1	266.0	101	35	10

Analyte	Precursor ion [<i>m/z</i>]	Product ions [<i>m/z</i>]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
		246.2	101	53	38
Fenpropidin	274.3	147.0	111	41	20
		117.1	111	73	0
Flufenacet	364.1	194.0	76	17	28
		152.1	76	29	20
Fluopyram	397.0	208.0	96	31	6
		145.2	96	79	20
Fluoxastrobin	459.1	426.9	86	25	22
		188.2	86	47	10
Fluxapyroxad	382.1	362.0	86	21	16
		341.9	86	31	16
Halauxifen-methyl	345.1	284.9	91	33	12
		250.2	91	45	10
Isopyrazam	360.2	320.0	101	31	14
		244.0	101	33	10
Isoxaben	333.2	165.0	76	27	24
		107.0	76	83	14
Kresoxim-methyl	314.2	223.0	71	25	10
		115.8	71	21	16
Mefenpyr-diethyl	390.1	327.0	51	27	14
		160.1	51	51	22
Mesosulfuron-methyl	504.1	182.2	96	35	26
		83.1	96	95	8
Metconazol	320.2	70.1	86	51	6
		125.2	86	57	16
Metrafenone	409.1	209.2	66	21	8
		226.9	66	29	8
Pendimethalin	282.1	212.0	51	17	34
		194.2	51	27	28
Picolinafen	377.1	238.1	106	45	8
		145.2	106	77	20
Pinoxaden	401.3	317.1	81	31	14
		57.2	81	57	4
Pirimicarb	239.2	72.2	66	37	8
		182.1	66	23	26
Prochloraz	376.1	307.9	56	17	14
		265.8	56	25	10
Proquinazid	373.0	330.8	86	21	16
		289.0	86	35	12

Analyte	Precursor ion [<i>m/z</i>]	Product ions [<i>m/z</i>]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
Prosulfocarb	252.1	91.2	71	35	10
		128.1	71	19	16
Prothioconazol	344.1	188.9	66	31	28
		125.0	66	57	0
Pyraclostrobin	388.1	194.0	71	19	6
		163.2	71	35	22
Pyriofenone	366.1	184.2	91	33	28
		208.9	91	35	8
Tebuconazol	308.2	125.2	91	55	16
		70.2	91	49	6
Triphenylphosphat	327.1	77.0	116	65	8
		152.2	116	55	20

^a DP: declustering potential, ^b CE: collisions energy, ^c CXP: collision cell exit potential

Table S 3: Concentrations of quantified contaminants found in analysed market samples.

Drink sample	No. ^a	Batch affiliation	AFB ₁ ^b [ng/L]	STC ^c [ng/L]	OTA ^d [ng/L]	DON ^e [µg/L]	ZEN ^f [µg/L]	T-2 ^g [µg/L]	HT-2 ^h [µg/L]	Pb ^k [µg/kg]	Cd ^l [µg/kg]	Ni ^m [µg/kg]
oat	1	1.1	< LOD ^j	42.01 ± 2.48	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.43 ± 0.01	58.80 ± 0.36
oat	2	2.1	< LOD ^j	13.29 ± 1.38	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	74.90 ± 0.24
oat	3	3.1	< LOD ^j	11.59 ± 2.38	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	1.22 ± 0.01	106.60 ± 0.62
oat	4	4.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.87 ± 0.20	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	66.98 ± 0.80
oat	5	5.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.84 ± 0.02	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	0.56 ± 0.09	< LOD ^j	1.36 ± 0.03	129.14 ± 0.78
oat	6	6.1	< LOD ^j	13.01 ± 0.93	< LOD ^j	0.60 ± 0.11	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.40 ± 0.01	95.72 ± 1.00
almond	7	7.1	11.00 ± 1.36	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	28.02 ± 0.08
almond	8	8.1	27.88 ± 2.77	70.32 ± 7.78	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.57 ± 0.05	45.47 ± 1.42
almond	9	9.1	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	22.29 ± 1.13
almond	10	10.1	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	8.85 ± 0.78
almond	11	11.1	17.48 ± 2.25	10.26 ± 1.28	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	31.86 ± 0.12
almond	12	12.1	10.41 ± 1.62	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	53.67 ± 0.21
soy	13	13.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	3.12 ± 0.01	287.22 ± 0.54
soy	14	14.1	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.33 ± 0.01	143.78 ± 0.68
soy	15	15.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	2.58 ± 0.01	133.61 ± 0.25
soy	16	16.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.33 ± 0.02	142.14 ± 0.79
soy	17	17.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	1.55 ± 0.16	230.76 ± 0.43
soy	18	18.1	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	5.77 ± 0.07	193.14 ± 1.29
oat	19	1.2	< LOD ^j	33.59 ± 6.64	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.62 ± 0.33	63.13 ± 0.16

Drink sample	No. ^a	Batch affiliation	AFB ₁ ^b [ng/L]	STC ^c [ng/L]	OTA ^d [ng/L]	DON ^e [μg/L]	ZEN ^f [μg/L]	T-2 ^g [μg/L]	HT-2 ^h [μg/L]	Pb ^k [μg/kg]	Cd ^l [μg/kg]	Ni ^m [μg/kg]
oat	20	2.2	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	111.40 ± 0.34
oat	21	3.2	< LOD ^j	17.65 ± 2.48	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	0.83 ± 0.03	< LOD ^j	1.10 ± 0.02	70.20 ± 0.41
oat	22	4.2	< LOD ^j	8.85 ± 1.58	< LOD ^j	3.85 ± 0.46	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	159.26 ± 0.53
oat	23	5.2	< LOD ^j	14.01 ± 2.71	< LOD ^j	0.66 ± 0.08	< LOD ^j	0.70 ± 0.05	0.54 ± 0.00	< LOD ^j	1.43 ± 0.02	117.71 ± 0.56
oat	24	6.2	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.54 ± 0.02	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.41 ± 0.01	95.36 ± 0.29
almond	25	7.2	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	40.14 ± 0.11
almond	26	8.2	11.68 ± 0.66	24.11 ± 2.81	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.48 ± 0.01	37.92 ± 0.35
almond	27	9.2	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	22.15 ± 1.38
almond	28	10.2	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	14.16 ± 1.32
almond	29	11.2	19.36 ± 2.70	7.89 ± 1.22	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	41.57 ± 0.64
almond	30	12.2	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	19.03 ± 0.65
soy	31	13.2	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	3.67 ± 0.04	304.08 ± 0.17
soy	32	14.2	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.34 ± 0.01	128.88 ± 0.64
soy	33	15.2	10.48 ± 1.84	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	2.04 ± 0.12	314.91 ± 0.99
soy	34	16.2	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	120.09 ± 1.08
soy	35	17.2	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	1.81 ± 0.06	252.61 ± 1.73
soy	36	18.2	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.53 ± 0.02	< LOQ ⁱ	0.73 ± 0.14	< LOD ^j	7.15 ± 0.04	158.16 ± 0.57
almond	37	19.1	130.30 ± 6.23	27.65 ± 0.42	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-

Drink sample	No. ^a	Batch affiliation	AFB ₁ ^b [ng/L]	STC ^c [ng/L]	OTA ^d [ng/L]	DON ^e [μg/L]	ZEN ^f [μg/L]	T-2 ^g [μg/L]	HT-2 ^h [μg/L]	Pb ^k [μg/kg]	Cd ^l [μg/kg]	Ni ^m [μg/kg]
almond	38	20.1	57.33 ± 15.34	19.40 ± 0.61	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
almond	39	21.1	6.76 ± 0.19	6.95 ± 1.58	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
almond	40	22.1	62.80 ± 0.62	16.41 ± 1.29	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
almond	41	23.1	29.15 ± 1.05	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
almond	42	24.1	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
almond	43	25.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
almond	44	26.1	8.39 ± 0.24	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
oat	45	27.1	< LOD ^j	263.37 ± 7.07	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
oat	46	28.1	< LOD ^j	10.26 ± 0.94	< LOD ^j	1.46 ± 0.04	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	47	29.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	48	30.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	49	31.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
oat	50	32.1	< LOD ^j	13.26 ± 0.66	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	0.72 ± 0.01	1.42 ± 0.17	-	-	-
oat	51	33.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	52	34.1	< LOD ^j	8.28 ± 0.62	< LOD ^j	0.52 ± 0.02	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	53	35.1	< LOD ^j	7.24 ± 1.66	< LOD ^j	0.50 ± 0.00	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	54	36.1	< LOD ^j	61.06 ± 4.40	< LOD ^j	5.46 ± 0.12	< LOD ^j	0.51 ± 0.00	1.20 ± 0.03	-	-	-
oat	55	37.1	< LOD ^j	14.70 ± 2.90	< LOD ^j	0.61 ± 0.05	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	56	38.1	< LOD ^j	10.05 ± 1.79	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	57	39.1	< LOD ^j	6.36 ± 1.49	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	58	40.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	-	-	-

Drink sample	No. ^a	Batch affiliation	AFB ₁ ^b [ng/L]	STC ^c [ng/L]	OTA ^d [ng/L]	DON ^e [μg/L]	ZEN ^f [μg/L]	T-2 ^g [μg/L]	HT-2 ^h [μg/L]	Pb ^k [μg/kg]	Cd ^l [μg/kg]	Ni ^m [μg/kg]
oat	59	41.1	< LOD ^j	21.78 ± 1.58	< LOD ^j	1.45 ± 0.03	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	0.92 ± 0.14	-	-	-
almond	60	42.1	14.07 ± 1.09	16.38 ± 0.87	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
oat	61	43.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.61 ± 0.04	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	0.50 ± 0.00	-	-	-
oat	62	44.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
almond	63	45.1	10.38 ± 0.87	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
oat	64	46.1	< LOD ^j	10.84 ± 1.78	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	0.50 ± 0.00	-	-	-
oat	65	47.1	< LOD ^j	6.70 ± 1.52	< LOD ^j	0.57 ± 0.07	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	0.90 ± 0.06	-	-	-
oat	66	48.1	< LOD ^j	7.44 ± 0.76	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
almond	67	49.1	6.93 ± 0.74	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-
oat	68	50.1	< LOD ^j	28.89 ± 3.45	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	69	51.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	70	52.1	< LOD ^j	7.88 ± 1.97	< LOD ^j	2.79 ± 0.16	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	71	53.1	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	0.56 ± 0.05	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	-	-	-
oat	72	54.1	< LOD ^j	13.76 ± 0.59	< LOD ^j	1.30 ± 0.02	< LOD ^j	< LOQ ⁱ	< LOQ ⁱ	-	-	-
almond	73	55.1	< LOQ ⁱ	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	< LOD ^j	-	-	-

^a No.: number, ^b AFB₁: aflatoxin B₁, ^c STC: sterigmatocystin, ^d OTA: ochratoxin A, ^e DON: deoxynivalenol, ^f ZEN: zearalenone, ^g T-2: T-2 toxin, ^h HT-2: HT-2 toxin, ⁱ LOQ: limit of quantification (AFB₁ 0.008 μg/L, STC 0.005 μg/L, OTA 0.950 μg/L, DON 0.495 μg/L, ZEN 0.495 μg/L, T-2 0.495 μg/L, HT-2 0.495 μg/L, Pb 2.67 μg/kg, Cd 0.32 μg/kg, Ni 6.16 μg/kg), ^j LOD: limit of detection (AFB₁ 0.002 μg/L, STC 0.002 μg/L, OTA 0.288 μg/L, DON 0.15 μg/L, ZEN 0.15 μg/L, T-2 0.15 μg/L, HT-2 0.15 μg/L, Pb 0.93 μg/kg, Cd 0.11 μg/kg, Ni 2.15 μg/kg), ^k Pb: lead, ^l Cd: cadmium, ^m Ni: nickel.

Table S 4: Mean values, certified values and used reference materials for the ICP-MS analysis.

Analyte	Mean measured [$\mu\text{g/kg}$]	SD ^a measured [$\mu\text{g/kg}$]	Certified value [$\mu\text{g/kg}$]	Reference material	n ^b
Cd ^c	20.28	1.52	18.0 - 24.0	Cabbage NCS ZC73012a	40
Pb ^d	617.81	196.02	590 - 730	Fresh Kidney beans NCS ZC73019	40
Ni ^e	375.62	36.44	300 - 700	Cabbage NCS ZC73012a	40

^aSD: standard deviation, ^bn: quantity, ^cCd: cadmium, ^dPb: lead, ^eNi: nickel.

7.1.2 Publikation III

Metabolic fate and toxicity reduction of aflatoxin B1 after uptake by edible Tenebrio molitor larvae

Kim Lara Gützkow, Johanna Ebmeyer, Nina Kröncke, Nadja Kampschulte, Linda Böhmert, Cindy Schöne, Nils Helge Schebb, Rainer Benning, Albert Braeuning, Ronald Maul

DOI: 10.1016/j.fct.2021.112375

Table S 5: insect rearing and food consumption data of *T. molitor* larvae. Two feeding groups, each six biological replicates (a – f), one control group, obtained non-spiked wheat meal, the other group obtained wheat meal spiked with 10,700 µg/kg AFB1. Each feeding group contained 100 individuals. The larvae were kept in 400 mL glass beakers and incubated at 25 °C with a humidity of 75 % with no day/night rhythm for light. The Start of the of the feeding experiment was 01.11.2018 and the end was 04.12.2018 (after harvest and fasting for 24 h). (*FCR = feed conversion ratio on a fresh matter basis; **ECI = efficiency of ingested food conversion on dry matter basis, ***LWGpFC = live weight [mg] gained per gram of food consumed).

feeding group		biomass larvae [g]	biomass larvae (moist) after harvest and fasting for 24 h [g]	Mortality	Live weight gain [g]	Dry weight gained [g]	food consumed [g]	Residue (feed and frass) [g]	Larvae dry matter [g]	FCR*	ECI** [%]	LWGpFC*** [g]
control	a	1.422	5.314	1	3.892	1.479	9.630	2.406	1.808	2.5	15.357	404.143
	b	1.444	5.502	0	4.058	1.542	9.730	2.376	1.780	2.4	15.848	417.055
	c	1.490	5.543	0	4.053	1.540	9.919	2.183	1.843	2.4	15.526	408.582
	d	1.436	5.398	0	3.962	1.505	9.784	2.336	1.733	2.5	15.388	404.939
	e	1.431	5.317	0	3.886	1.477	9.676	2.468	1.770	2.5	15.261	401.596
	f	1.481	5.569	0	4.088	1.553	9.961	2.192	1.851	2.4	15.596	410.407
AFB1	a	1.437	4.720	1	3.284	1.248	8.901	3.145	1.606	2.7	14.020	368.933
	b	1.430	4.713	0	3.283	1.248	9.075	3.023	1.625	2.8	13.746	361.748
	c	1.454	4.717	0	3.264	1.240	8.978	3.119	1.644	2.8	13.813	363.512
	d	1.435	4.530	0	3.095	1.176	8.856	3.189	1.606	2.9	13.280	349.485
	e	1.437	4.722	2	3.285	1.248	9.035	3.101	1.610	2.8	13.815	363.562
	f	1.437	4.477	1	3.040	1.155	8.831	3.270	1.609	2.9	13.081	344.238

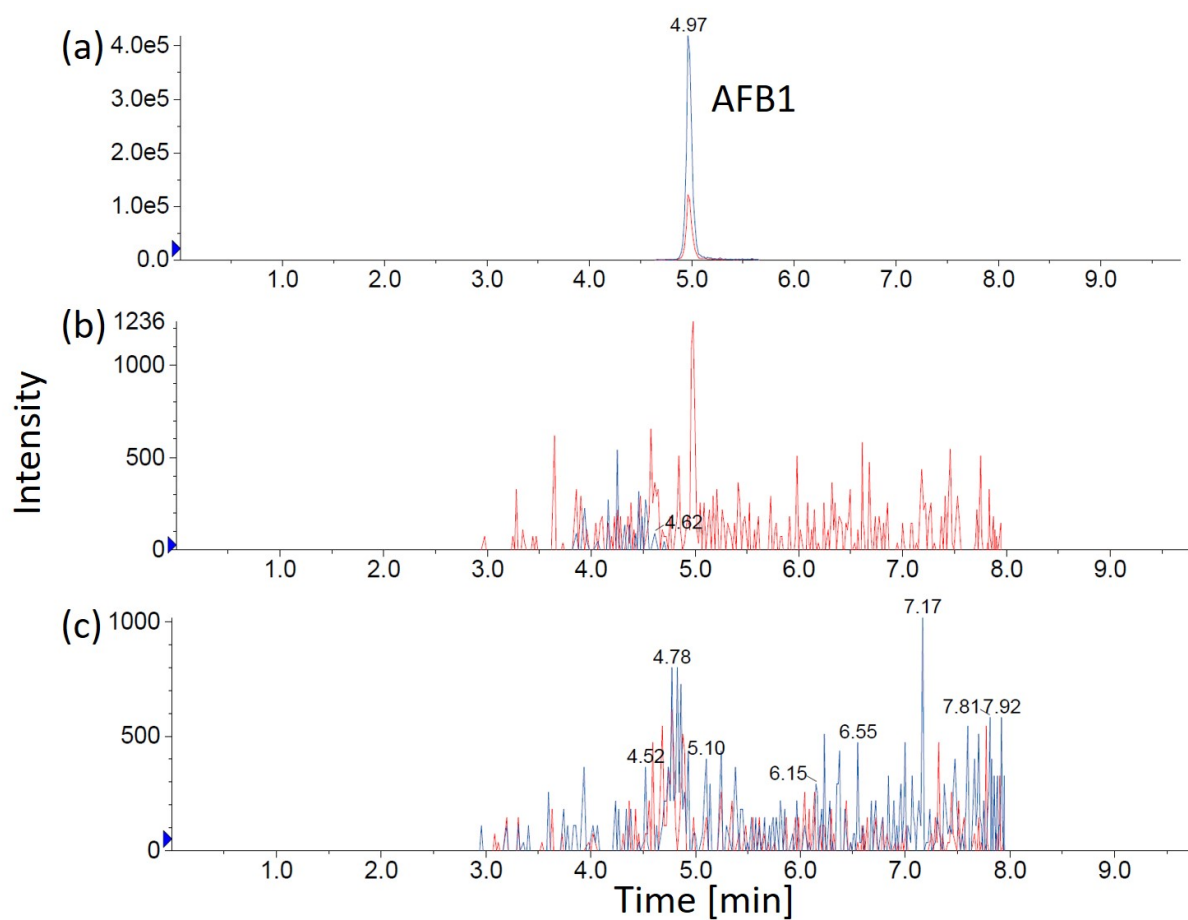


Fig. S 1: HPLC-MS/MS chromatogram in ESI(+) mode of the extract of the feed (wheat meal spiked with 10,700 $\mu\text{g/kg}$ AFB1) for the *T. molitor* larvae AFB1 exposure group. Extract ion chromatograms in the multiple reaction monitoring mode (MRM) showing mass transitions [m/z] (a) 313.0 $\rightarrow$ 285.1; (b) 329.1 $\rightarrow$ 273.1 and (c) 299.0 $\rightarrow$ 240.0.

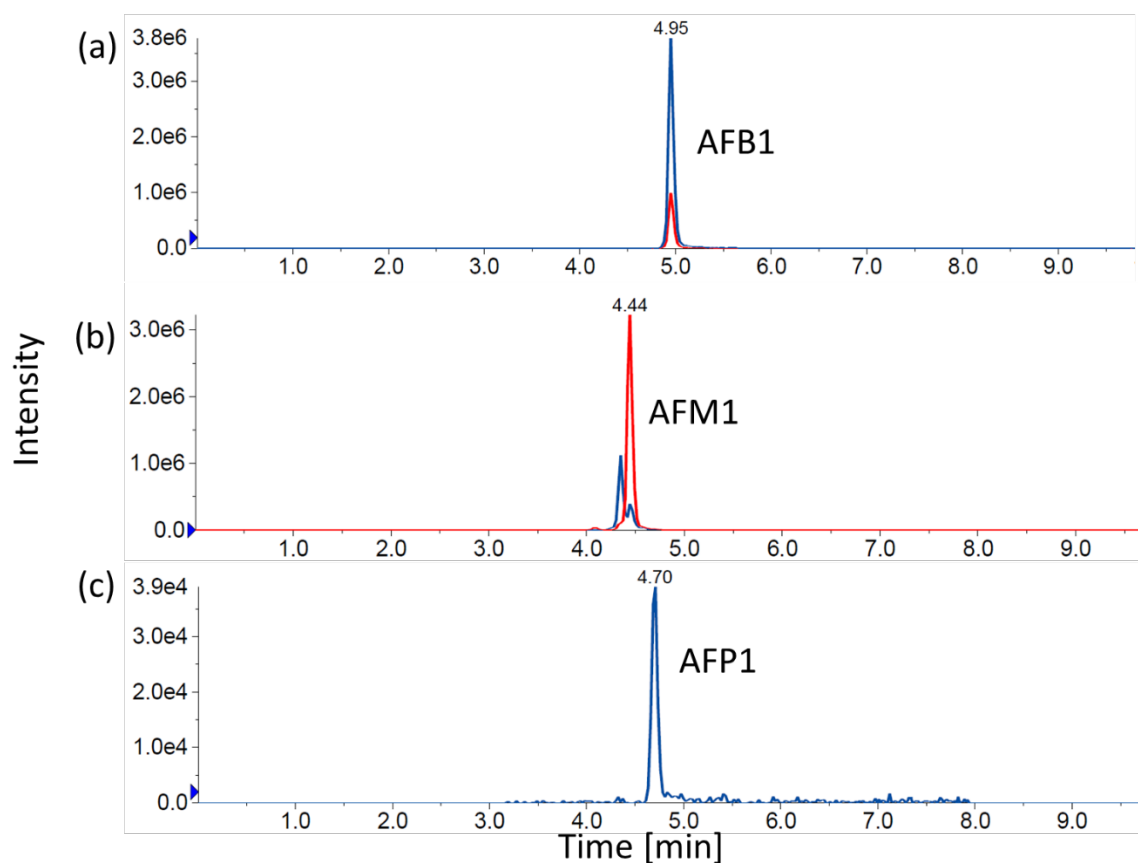


Fig. S 2: HPLC-MS/MS chromatogram in ESI(+) mode of the extract of the microsomal *in vitro* phase I metabolism of AFB1 by bovine liver microsomes (BLM). Extract ion chromatograms in the multiple reaction monitoring mode (MRM) showing mass transitions [m/z] (a) 313.0 $\rightarrow$ 285.1; (b) 329.1 $\rightarrow$ 273.1 and (c) 299.0 $\rightarrow$ 240.0.

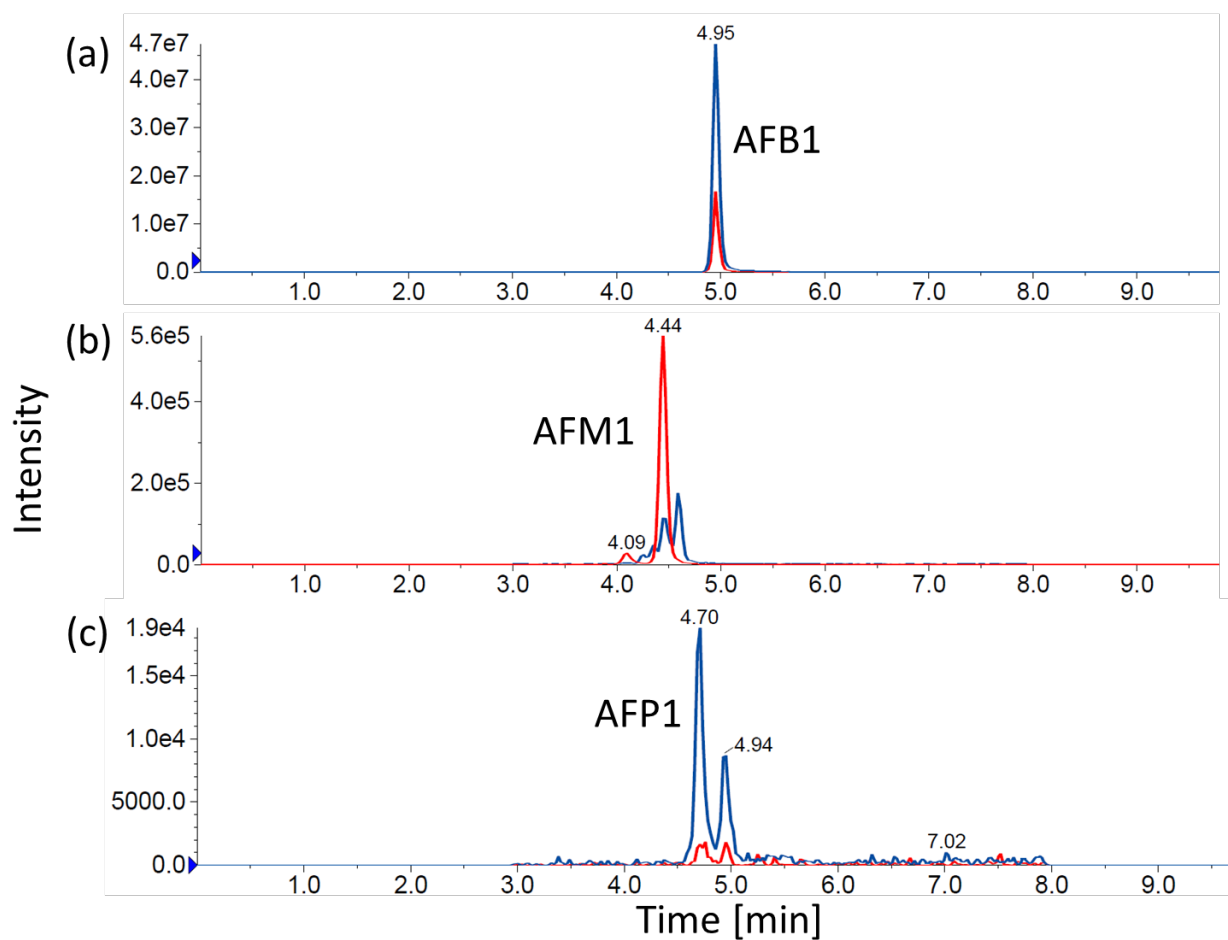


Fig. S 3: HPLC-MS/MS chromatogram in ESI(+) mode of the extract of the microsomal *in vitro* phase I metabolism of AFB1 by pig liver microsomes (PLM). Extract ion chromatograms in the multiple reaction monitoring mode (MRM) showing mass transitions [m/z] (a) 313.0 $\rightarrow$ 285.1; (b) 329.1 $\rightarrow$ 273.1 and (c) 299.0 $\rightarrow$ 240.0.

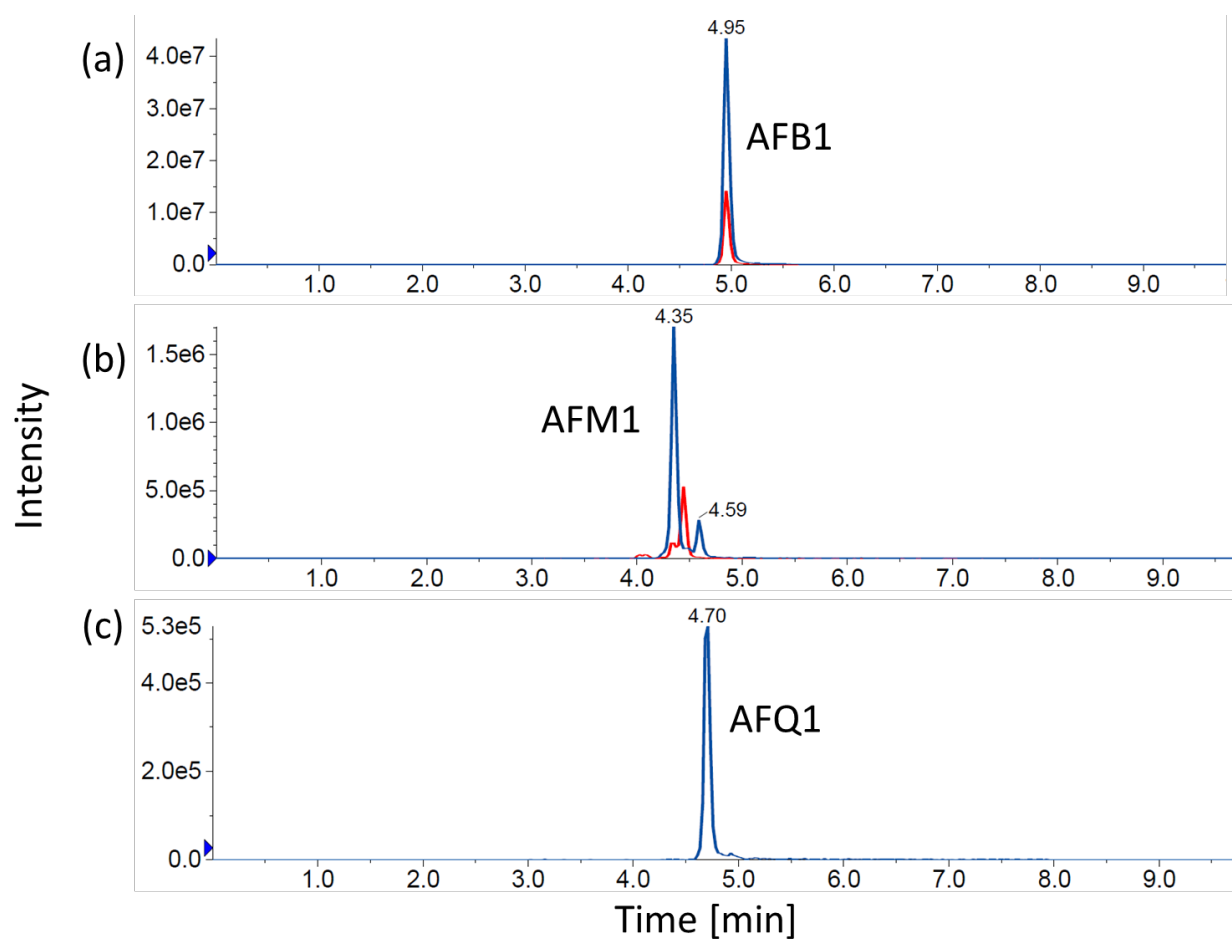


Fig. S 4: HPLC-MS/MS chromatogram in ESI(+) mode of the extract of the microsomal *in vitro* phase I metabolism of AFB1 by phenobarbital induced rat liver microsomes (iRLM). Extract ion chromatograms in the multiple reaction monitoring mode (MRM) showing mass transitions $[m/z]$ (a) $313.0 \rightarrow 285.1$; (b) $329.1 \rightarrow 273.1$ and (c) $299.0 \rightarrow 240.0$.

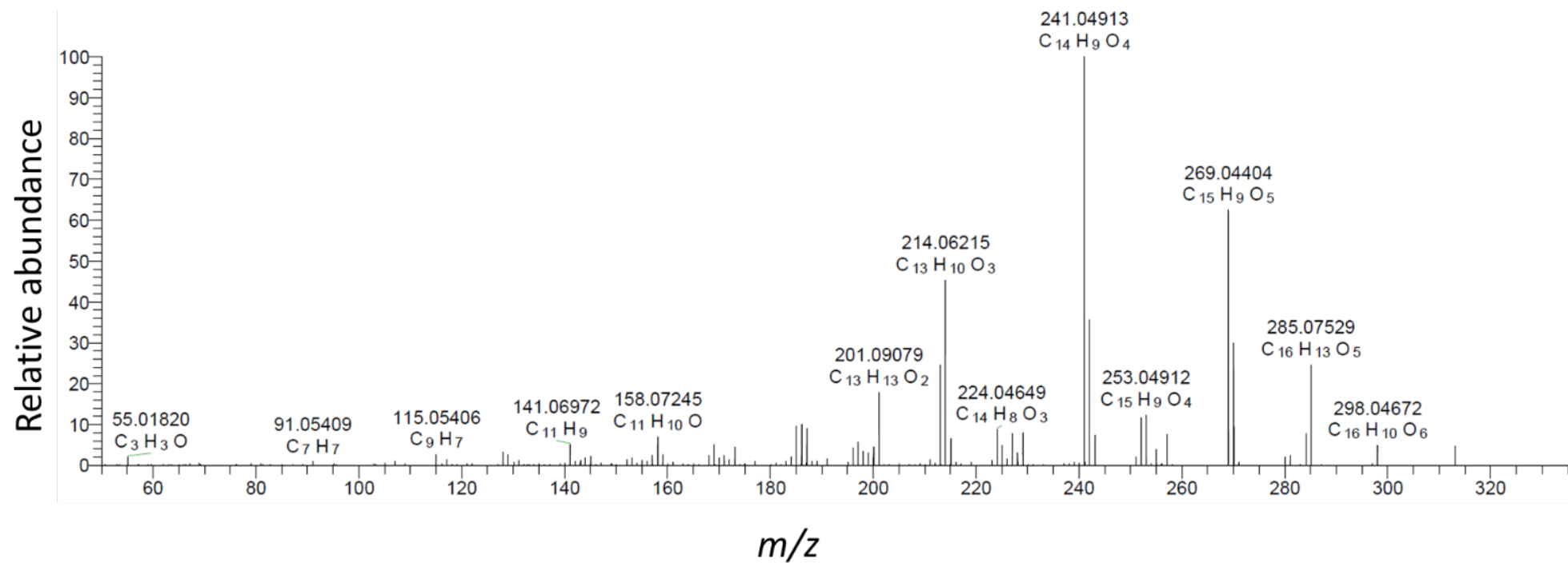


Fig. S 5: UHPLC- HRMS product ion spectrum in HESI(+) mode of AFB1 with an isolation window of 0.4 m/z , collisions energy of 40 eV, resolution of 17,500 and the precursor ion $[M+H]^+$ of 313.07 m/z .

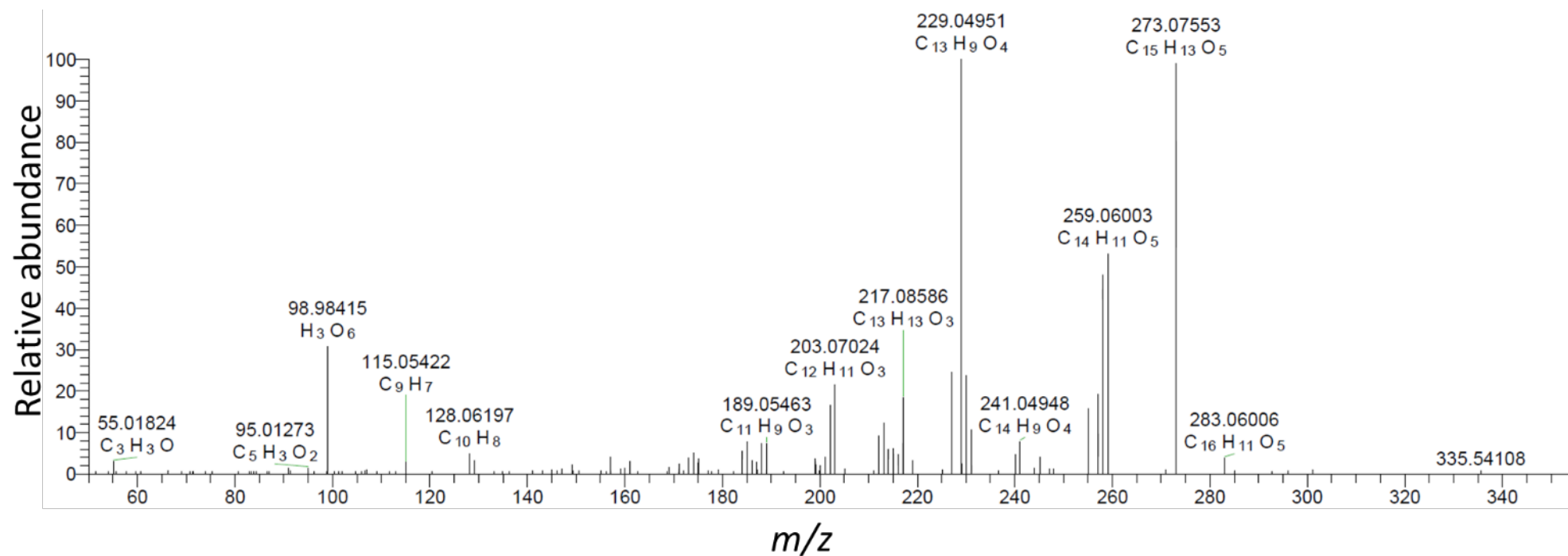


Fig. S 6: UHPLC- HRMS product ion spectrum in HESI(+) mode of AFM1 with an isolation window of 0.4 m/z , collisions energy of 40 eV, resolution of 17,500 and the precursor ion $[M+H]^+$ of 329.07 m/z .

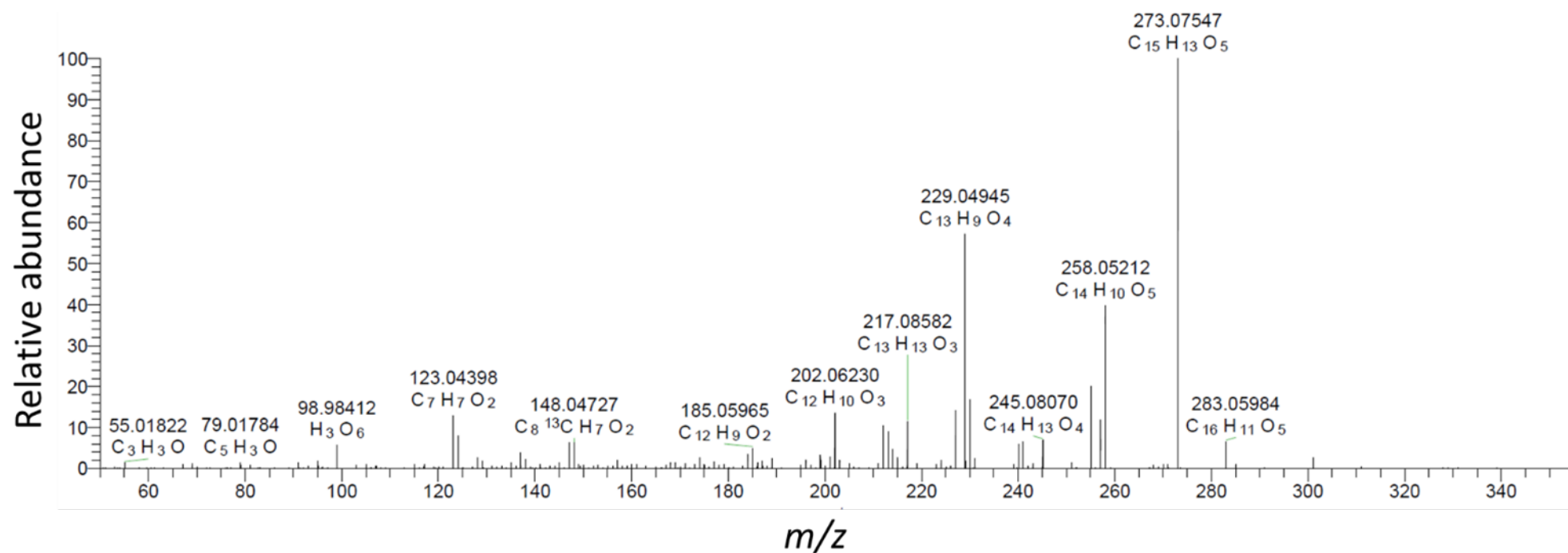


Fig. S 7: UHPLC- HRMS product ion spectrum in HESI(+) mode of AF-OH with an isolation window of 0.4 m/z , collisions energy of 40 eV, resolution of 17,500 and the precursor ion $[M+H]^+$ of 329.07 m/z .

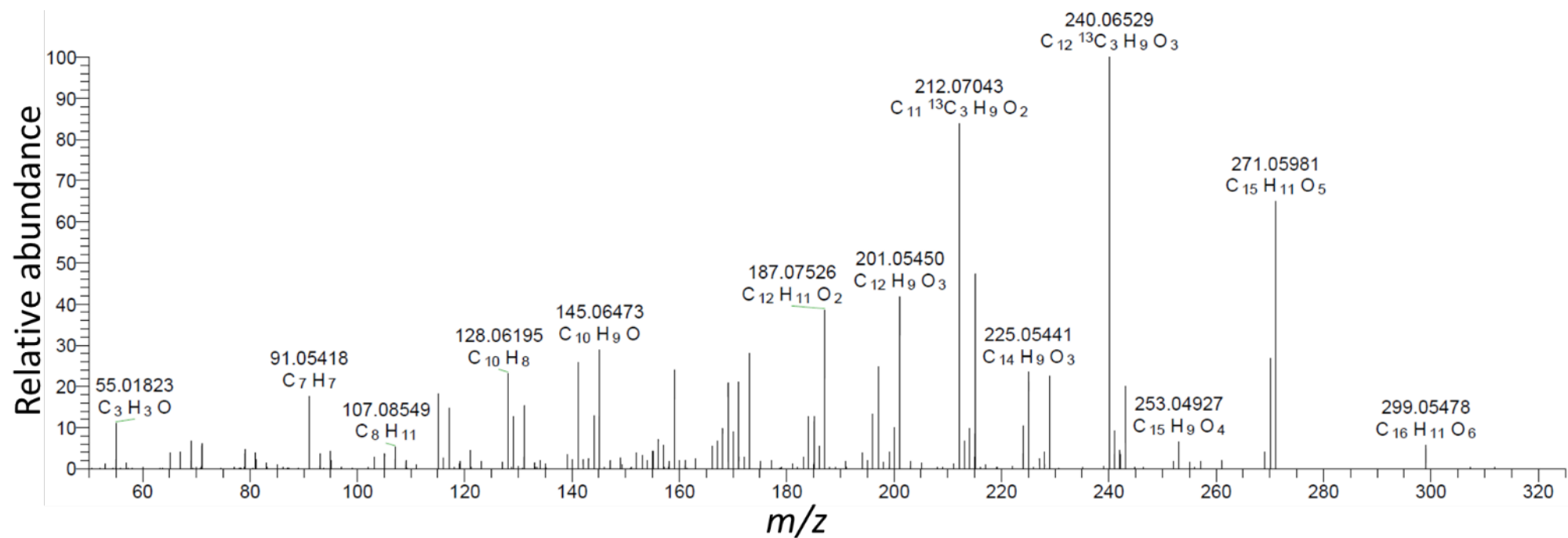


Fig. S 8: UHPLC- HRMS product ion spectrum in HESI(+) mode of AFP1 with an isolation window of 0.4 m/z , collisions energy of 40 eV, resolution of 17,500 and the precursor ion $[M+H]^+$ of 299.06 m/z .

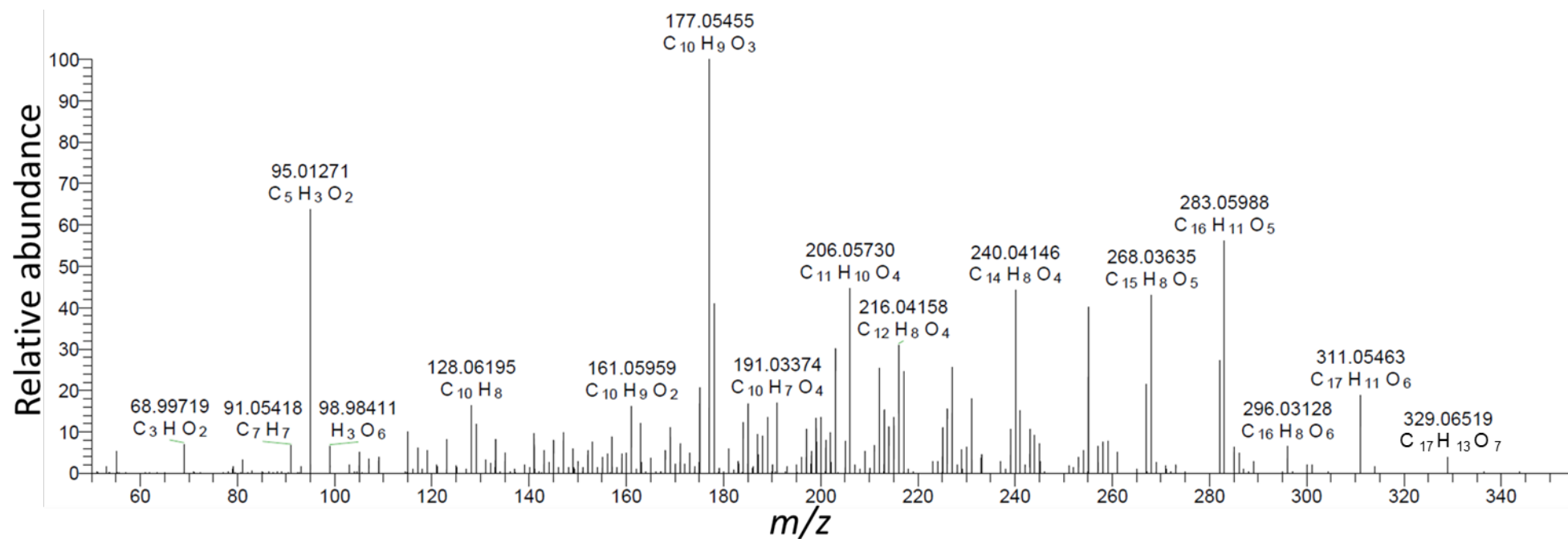


Fig. S 9: UHPLC- HRMS product ion spectrum in HESI(+) mode of AFQ1 with an isolation window of 0.4 m/z , collisions energy of 40 eV, resolution of 17,500 and the precursor ion $[M+H]^+$ of 329.07 m/z .

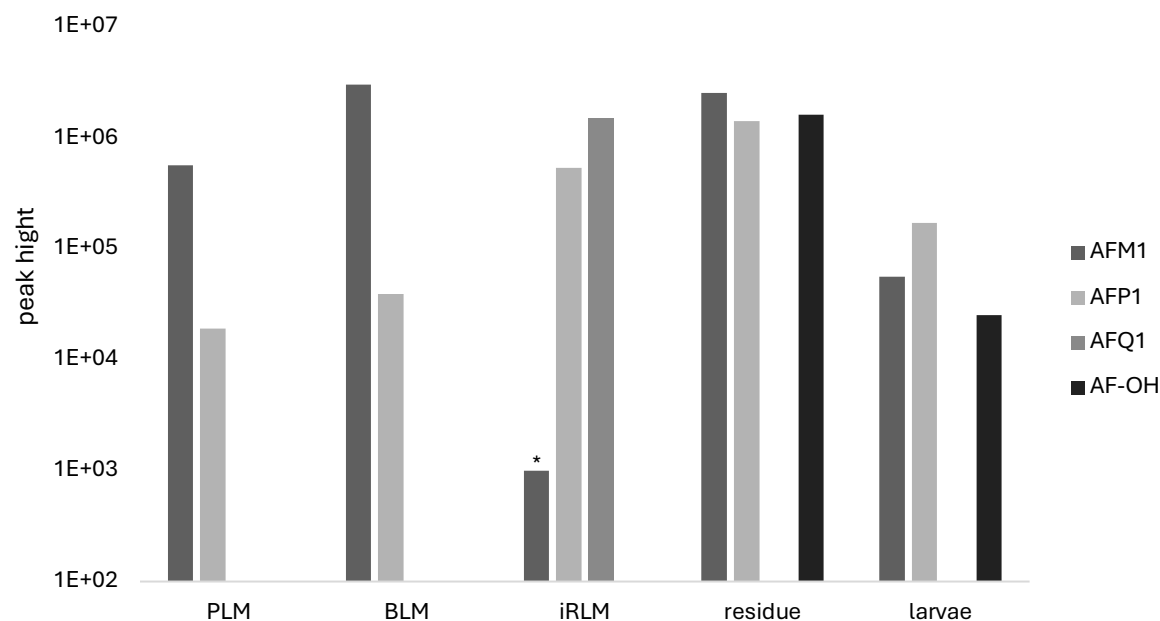


Fig. S 10: AFB1 metabolites as detected in the extracts of larvae and residue from the *T. molitor* AFB1 exposure group (fed 33 days with wheat meal spiked with 10,700 $\mu\text{g/kg}$ AFB1) as well as in microsomal *in vitro* phase I metabolism assays (AFB1 concentration of 10 μM and 2 mg microsomal protein/mL) using bovine liver microsomes (BLM), pig liver microsomes (PLM) and phenobarbital induced rat liver microsomes (iRLM). Displayed peaks heights derived directly from HPLC-MS/MS analysis. * the peak height of AFM1 in iRLM was only slightly higher than the background noise and was set at 1000 for better visualisation.

7.1.3 Mykotoxinvorkommen in Futtermitteln

Tabelle 11: Konzentrationen quantifizierter Mykotoxine in Futtermittelrohstoffen, Mischfuttermitteln und Hafer.

No.	Futtermittel	AFB ₁ [$\mu\text{g/kg}$]	STC [$\mu\text{g/kg}$]	OTA [$\mu\text{g/kg}$]
1	Mais	< LOD	< LOD	< LOD
2	Mais	< LOD	< LOD	< LOD
3	Mais	< LOD	< LOD	< LOD
4	Mais	< LOD	< LOD	< LOD
5	Mais	< LOD	< LOD	< LOD
6	Mais	< LOD	< LOD	< LOD
7	Roggen	< LOD	< LOD	< LOD
8	Roggen	< LOD	< LOD	< LOD
9	Roggen	< LOD	< LOD	< LOD
10	Roggen	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
11	Roggen	< LOD	< LOD	< LOD
12	Sonnenblumenextraktionsschrot	< LOD	< LOD	< LOD
13	Sonnenblumenkerne	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
14	Sonnenblumenkerne	< LOD	0.88 $\pm$ 0.31	2.48 $\pm$ 0.26
15	Weizengluten	< LOD	0.34 $\pm$ 0.13	1.55 $\pm$ 0.62
16	Weizengluten	< LOD	1.79 $\pm$ 0.16	1.01 $\pm$ 0.12
17	Weizengluten	< LOD	0.241 $\pm$ 0.01	LOD < x < LOQ
18	Weizengluten	< LOD	< LOD	< LOD
19	Weizenkleie	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
20	Weizenkleie oxidiert	< LOD	0.25 $\pm$ 0.08	< LOD
21	Weizenkleie	< LOD	< LOD	< LOD
22	Getreidekleie	< LOD	< LOD	< LOD
23	Getreidekleie	< LOD	LOD < x < LOQ	1.01 $\pm$ 0.67
24	Getreidekleie	< LOD	< LOD	< LOD
25	Haferkleie	< LOD	< LOD	< LOD
26	Reiskleie oxidiert	0.46 $\pm$ 0.06	3.41 $\pm$ 0.57	LOD < x < LOQ
27	Reiskleie	0.66 $\pm$ 0.05	3.76 $\pm$ 0.96	LOD < x < LOQ
28	Weizen	< LOD	< LOD	< LOD
29	Weizen	< LOD	< LOD	< LOD
30	Gerste	< LOD	< LOD	< LOD
31	Sojaextraktionsschrot	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
32	Sojaextraktionsschrot	< LOD	< LOD	< LOD
33	Sojaextraktionsschrot	< LOD	< LOD	< LOD

No.	Futtermittel	AFB ₁ [$\mu\text{g/kg}$]	STC [$\mu\text{g/kg}$]	OTA [$\mu\text{g/kg}$]
34	Sojamehl	< LOD	< LOD	< LOD
35	Sojaproteinkonzentrat	< LOD	< LOD	< LOD
36	Sojaproteinkonzentrat	< LOD	< LOD	< LOD
37	Sojaproteinkonzentrat	< LOD	< LOD	< LOD
38	Sojaproteinkonzentrat	< LOD	< LOD	< LOD
39	Sojaproteinkonzentrat	< LOD	< LOD	< LOD
40	Sojaproteinkonzentrat	< LOD	< LOD	< LOD
41	Sojaproteinkonzentrat	< LOD	< LOD	< LOD
42	Raps	< LOD	< LOD	< LOD
43	Raps-Extraktionsschrot	< LOD	< LOD	< LOD
44	Raps-Extraktionsschrot	< LOD	< LOD	< LOD
45	Erbсенmehl	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
46	Erbсенmehl	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
47	Ackerbohne	< LOD	< LOD	< LOD
48	Melasse	< LOD	< LOD	< LOD
49	Guarkernmehl	< LOD	< LOD	< LOD
50	Pflanzliches Eiweiβmehl	< LOD	< LOD	< LOD
51	Dinkelspelze	< LOD	< LOD	< LOD
52	Apfeltrester	< LOD	< LOD	< LOD
53	Chlorella	< LOD	< LOD	< LOD
54	Fischfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
55	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
56	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
57	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
58	Fischfutter	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
59	Fischfutter	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
60	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
61	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
62	Fischfutter	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
63	Fischfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
64	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
65	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
66	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
67	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
68	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
69	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD

No.	Futtermittel	AFB ₁ [$\mu\text{g/kg}$]	STC [$\mu\text{g/kg}$]	OTA [$\mu\text{g/kg}$]
70	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
71	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
72	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	LOD < x < LOQ
73	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
74	Fischfutter	0.31 $\pm$ 0.39	< LOD	LOD < x < LOQ
75	Fischfutter	0.30 $\pm$ 0.39	< LOD	LOD < x < LOQ
76	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	< LOD
77	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ
78	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
79	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	< LOD
80	Fischfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
81	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	< LOD
82	Fischfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
83	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	< LOD
84	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
85	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
86	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
87	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
88	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	< LOD
89	Fischfutter	0.34 $\pm$ 0.05	LOD < x < LOQ	< LOD
90	Fischfutter	0.28 $\pm$ 0.15	0.24 $\pm$ 0.10	< LOD
91	Fischfutter	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ
92	Fischfutter	LOD < x < LOQ	< LOD	LOD < x < LOQ
93	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
94	Fischfutter	< LOD	< LOD	< LOD
95	Viehfutter	< LOD	0.23 $\pm$ 0.06	< LOD
96	Viehfutter	< LOD	< LOD	< LOD
97	Viehfutter	< LOD	< LOD	< LOD
98	Viehfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ
99	Viehfutter	< LOD	< LOD	< LOD
100	Geflügelfutter	< LOD	< LOD	< LOD

No.	Futtermittel	AFB ₁ [$\mu\text{g/kg}$]	STC [$\mu\text{g/kg}$]	OTA [$\mu\text{g/kg}$]
101	Geflügelfutter	< LOD	< LOD	< LOD
102	Schweinefutter	< LOD	< LOD	< LOD
103	Schweinefutter	< LOD	< LOD	< LOD
104	Schweinefutter	< LOD	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ
105	Insektenfutter (proteinreich, fettarm)	< LOD	< LOD	< LOD
106	Insektenfutter (proteinreich, fettarm)	< LOD	< LOD	LOD < x < LOQ
107	Insektenfutter (proteinarm, fettreich)	LOD < x < LOQ	1.30 $\pm$ 0.73	< LOD
108	Insektenfutter (proteinarm, fettreich)	0.31 $\pm$ 0.10	1.63 $\pm$ 0.53	< LOD
109	Insektenfutter	< LOD	< LOD	< LOD
110	Insektenfutter	< LOD	< LOD	< LOD
111	Insektenfutter	< LOD	< LOD	< LOD
112	Insektenfutter	< LOD	LOD < x < LOQ	LOD < x < LOQ
113	Hafer, Vollkorn, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
114	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
115	Hafer, Vollkorn, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
116	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
117	Hafer, Vollkorn, konventioneller Anbau	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
118	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
119	Hafer, Vollkorn, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
120	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
121	Hafer, Vollkorn, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
122	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
123	Hafer, Vollkorn, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
124	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
125	Hafer, Vollkorn, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
126	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
127	Hafer, Vollkorn, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD

No.	Futtermittel			AFB ₁ [$\mu\text{g/kg}$]	STC [$\mu\text{g/kg}$]	OTA [$\mu\text{g/kg}$]
128	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
129	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
130	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
131	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
132	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
133	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
134	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
135	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
136	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
137	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
138	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
139	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
140	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
141	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
142	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
143	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
144	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
145	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
146	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
147	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
148	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
149	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
150	Hafer, Anbau	Kern,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD
151	Hafer, Anbau	Vollkorn,	konventioneller	< LOD	< LOD	< LOD

No.	Futtermittel	AFB ₁ [$\mu\text{g/kg}$]	STC [$\mu\text{g/kg}$]	OTA [$\mu\text{g/kg}$]
152	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
153	Hafer, Vollkorn, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
154	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
155	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
156	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
157	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
158	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
159	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
160	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
161	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
162	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
163	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
164	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
165	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
166	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
167	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
168	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
169	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
170	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
171	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
172	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
173	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
174	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
175	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
176	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
177	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
178	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
179	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
180	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
181	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD

No.	Futtermittel	AFB ₁ [$\mu\text{g/kg}$]	STC [$\mu\text{g/kg}$]	OTA [$\mu\text{g/kg}$]
182	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
183	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
184	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
185	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
186	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
187	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
188	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
189	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
190	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
191	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
192	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
193	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
194	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
195	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
196	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
197	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
198	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
199	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
200	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
201	Hafer, Vollkorn, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
202	Hafer, Kern, biologischer Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
203	Haferkleie, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
204	Haferflocken, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
205	Haferflocken, aus biologischem Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
206	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	LOD < x < LOQ	< LOD
207	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
208	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD
209	Hafer, Kern, konventioneller Anbau	< LOD	< LOD	< LOD

LOQ: Bestimmungsgrenze (Futter: AFB₁ 0.27 µg/kg, STC 0.23 µg/kg, OTA 0.83 µg/kg; Hafer: AFB₁ 0.03 µg/kg, STC 0.24 µg/kg, OTA 0.73 µg/kg), LOD: Nachweisgrenze (Futter: AFB₁ 0.08 µg/kg, STC 0.07 µg/kg, OTA 0.25 µg/kg; Hafer: AFB₁ 0.01 µg/kg, STC 0.07 µg/kg, OTA 0.22 µg/kg).

Tabelle 12: Analytische Parameter der quantitativen Bestimmung der Analyten mit HPLC-MS/MS; ESI (+) und (-) Modus; multiple reaction monitoring mode; das zweite Produktion wurde zur Qualifikation für die Bestätigung der Identität jedes Analyten verwendet.

Analyt	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
Aflatoxin B ₁	313.0	285.0 241.0	111 111	33 49	16 26
¹³ C ₁₇ -Aflatoxin B ₁	330.0	301.0	111	33	16
Sterigmatocystin	325.0	310.0 281.0	96 96	33 49	18 32
¹³ C ₁₈ -Sterigmatocystin	343.0	297.0	96	49	32
Ochratoxin A	404.0	239.1 357.9	31 31	29 19	14 24
¹³ C ₂₀ -Ochratoxin A	424.1	250.1	31	29	14
Aflatoxin M ₁	329.0	273.0 229.0	116 116	33 53	16 26
O-Methylsterigmatocystin	339.1	324.1 306.1	96 96	33 49	18 32
Dihydrosterigmatocystin	327.1	312.0 271.1	96 96	33 49	18 32
Dihydro-O-methylsterigmatocystin	341.1	326.1 313.1	96 96	33 49	18 32
Aflatoxin B ₂	315.0	259.0 287.1	25 25	39 25	28 26
Aflatoxin G ₁	329.0	243.1 311.0	25 25	37 29	28 16
Aflatoxin G ₂	331.0	313.0 245.1	121 121	33 41	42 10
Aspertoxin	355.1	322.1 340.1	96 96	33 30	18 20
Aflatoxicol	315	287 271 297	25 25 25	35 40 30	28 26 26
5-Methoxysterigmatocystin	355	340 327 324	96 96 96	33 33 33	18 18 18
Versicolorin A	337.1	309.1 252.1	-130 -130	-34 -45	-15 -15
Versicolorin B	339.1	311.1 283.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15
Versiconol	359.1	341.1 329.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15
Norsolorinic acid	369.1	325.1 284.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15
Averantin	371.1	353.1 325.0	-130 -130	-35 -45	-15 -15
Hydroxyaverantin	387.1	369.1	-130	-35	-15

Analyt	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
		342.1	-130	-45	-15
Averufin	367.1	284.1	-130	-35	-15
		295.1	-130	-45	-15
Oxoaverantin	385.1	367.1	-130	-35	-15
		355.1	-130	-45	-15
Hydroxyversicolorone	383.1	339.1	-130	-35	-15
		294.1	-130	-45	-15
Versiconal hemiacetal acetate	399.1	337.1	-130	-35	-15
		355.1	-130	-45	-15
Versiconol acetate	401.1	341.1	-130	-35	-15
		383.1	-130	-45	-15
Cyclopiazonic acid	335.0	139.9	-130	-38	-15
		179.9	-130	-34	-11
Citrinin	281.0	249.1	-50	-24	-7
		205.0	-50	-33	-7

Tabelle 13: Konzentrationen der Dotierungslösung für die Methodenvalidierung zur Mykotoxinanalytik in Mischfuttermittel und Hafer .

Analyt	niedrige Dotierungskonzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Dotierungskonzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
AFB ₁	0.006	0.12
STC	0.006	0.12
OTA	0.015	0.20
VerA	0.015	0.20

7.1.4 Sterigmatocystin Transferversuch

Tabelle 14: Konzentrationen der Dotierungslösung für die Methodenvvalidierung zur Mykotoxinanalytik in Milch.

Analyt	niedrige Dotierungskonzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Dotierungskonzentration [$\mu\text{g/mL}$]
AFB ₁	0.010	0.121
STC	0.010	0.121
OTA	0.070	0.181

Tabelle 15: Konzentrationen der Dotierungslösung für die Methodenvvalidierung zur Mykotoxinanalytik in Urin.

Analyt	niedrige Dotierungskonzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Dotierungskonzentration [$\mu\text{g/mL}$]
AFB ₁	0.030	0.121
STC	0.030	0.121
OTA	0.161	0.181

Tabelle 16: Analytische Parameter der quantitativen Bestimmung der Analyten mit HPLC-MS/MS; ESI (+) und (-) Modus; multiple reaction monitoring mode; das zweite Produkt-Ion wurde zur Qualifikation für die Bestätigung der Identität jedes Analyten verwendet.

Analyt	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
Aflatoxin B ₁	313.0	285.0 241.0	111 111	33 49	16 26
¹³ C ₁₇ -Aflatoxin B ₁	330.0	301.0	111	33	16
Sterigmatocystin	325.0	310.0 281.0	96 96	33 49	18 32
¹³ C ₁₈ -Sterigmatocystin	343.0	297.0	96	49	32
Ochratoxin A	404.0	239.1 357.9	31 31	29 19	14 24
¹³ C ₂₀ -Ochratoxin A	424.1	250.1	31	29	14
O-Methylsterigmatocystin	339.1	324.1 306.1	96 96	33 49	18 32
Dihydrosterigmatocystin	327.1	312.0 271.1	96 96	33 49	18 32
Dihydro-O-methylsterigmatocystin	341.1	326.1 313.1	96 96	33 49	18 32
Aspertoxin	355.1	322.1 340.1	96 96	33 30	18 20
5-Methoxysterigmatocystin	355	340 327 324	96 96 96	33 33 33	18 18 18
9/12c/11-hydroxy-STC, 1,2-oxid	341	326	96	33	18

Analyt	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
		313	96	33	18
12c-hydroxy-STC, STC-1,2-oxid	341	285	96	33	18
9/11-hydroxy-STC, 1,2-oxid	341	298	96	33	18
12c-hydroxy-STC	341	299	96	33	18
		271	96	33	18
STC-1,2-oxid	341	283	96	33	18
STC-1,2-dihydrodiol	359	341	96	33	18
		331	96	33	18
		313	96	33	18
9,11/9,12c-dihydroxy-STC	357	342	96	33	18
9,11/9,12c/11,12c-dihydroxy-STC	357	329	96	33	18
9,12c/11,12c-dihydroxy-STC	357	315	96	33	18
		301	96	33	18
		287	96	33	18
STC-glucosid	487	325	96	15	18
		310	96	15	18
		281	96	20	32
STC-sulfat	405	325	96	30	18
		310	96	30	18
		281	96	30	18
STC-gluthation	632.3	325	96	30	18
		310	96	30	18
		281	96	30	18
Demethyl-STC	311	294	96	40	25
		282	96	40	25
		265	96	40	25
		241	96	40	25
Versicolorin A	337.1	309.1	-130	-34	-15
		252.1	-130	-45	-15
Versicolorin B	339.1	311.1	-130	-35	-15
		283.1	-130	-45	-15
Versiconol	359.1	341.1	-130	-35	-15
		329.1	-130	-45	-15
Norsolorinic acid	369.1	325.1	-130	-35	-15
		284.1	-130	-45	-15
Averantin	371.1	353.1	-130	-35	-15
		325.0	-130	-45	-15
Hydroxyaverantin	387.1	369.1	-130	-35	-15
		342.1	-130	-45	-15
Averufin	367.1	284.1	-130	-35	-15
		295.1	-130	-45	-15
Oxoaverantin	385.1	367.1	-130	-35	-15
		355.1	-130	-45	-15

Analyt	Vorläuferion [<i>m/z</i>]	Produktion [<i>m/z</i>]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]
Hydroxyversicolorone	383.1	339.1	-130	-35	-15
		294.1	-130	-45	-15
Versiconal hemiacetal acetate	399.1	337.1	-130	-35	-15
		355.1	-130	-45	-15
Versiconol acetate	401.1	341.1	-130	-35	-15
		383.1	-130	-45	-15
STC-glucosid	485.0	323.0	-130	-35	-11
		308.1	-130	-35	-11
		279.1	-130	-35	-11

7.1.5 Publikation IV

*Analysis of ochratoxin A, aflatoxin B₁ and its biosynthetic precursors in cheese –
Method development and market sample screening*

Kim Lara Gützkow, Carine Al Ayoubi, Laura Soler Vasco, Sascha Rohn, Ronald Maul

DOI: 10.1016/j.foodcont.2022.109241

Table S1: Analytical parameters of quantitative determination of the analytes with the HPLC-MS/MS; ESI (+) and (-) mode; multiple reaction monitoring mode; the second product ion was used as a qualifier for the confirmation of identity for each analyte.

Analyte	Precursor ion [<i>m/z</i>]	Product ions [<i>m/z</i>]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]	Reference
Aflatoxin M1	329.0	273.0 229.0	116 116	33 53	16 26	^d
O-Methylsterigmatocystin	339.1	324.1 306.1	96 96	33 49	18 32	Xie et al. (2018)
Dihydrosterigmatocystin	327.1	312.0 271.1	96 96	33 49	18 32	Xie et al. (2018)
Dihydro-O-methyl-STC ^e	341.1	326.1 313.1	96 96	33 49	18 32	Xie et al. (2018)
Aflatoxin B2	315.0	259.0 287.1	25 25	39 25	28 26	Kunz et al. (2020)
Aflatoxin G1	329.0	243.1 311.0	25 25	37 29	28 16	Gützkw et al. (2021)
Aflatoxin G2	331.0	313.0 245.1	121 121	33 41	42 10	Kunz et al. (2020)
Aspertoxin	355.1	322.1 340.1	96 96	33 30	18 20	Adekoya et al. (2019)
9-hydroxy-STC ^e	341.0	326.0 313.0	96 96	33 33	18 18	Pfeiffer et al. (2014)
12c-hydroxy-STC ^e	341.0	313.0 285.0	96 96	33 33	18 18	Pfeiffer et al. (2014)
9.11-dihydroxy-STC ^e	357.0	342.0 329.0	96 96	33 33	18 18	Pfeiffer et al. (2014)
9.12c-dihydroxy-STC ^e	357.0	329.0 301.0	96 96	33 33	18 18	Pfeiffer et al. (2014)
Versicolorin B	339.1	311.1 283.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15	Xie et al. (2018)
Versiconol	359.1	341.1 329.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15	Xie et al. (2018)
Norsolorinic acid	369.1	325.1 284.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15	Xie et al. (2018)
Averantin	371.1	353.1 325.0	-130 -130	-35 -45	-15 -15	Xie et al. (2018)
Hydroxyaverantin	387.1	369.1 342.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15	Xie et al. (2018)
Averufin	367.1	284.1 295.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15	Xie et al. (2018)
Oxoaverantin	385.1	367.1 355.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15	Xie et al. (2018)
Hydroxyversicolorone	383.1	339.1 294.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15	Xie et al. (2018)
Versiconal hemiacetal acetate	399.1	337.1 355.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15	Xie et al. (2018)
Versiconol acetate	401.1	341.1 383.1	-130 -130	-35 -45	-15 -15	Xie et al. (2018)
Cyclopiazonic acid	335.0	139.9 179.9	-130 -130	-38 -34	-15 -11	^d

Analyte	Precursor ion [<i>m/z</i>]	Product ions [<i>m/z</i>]	DP ^a [V]	CE ^b [eV]	CXP ^c [V]	Reference
Citrinin	281.0	249.1	-50	-24	-7	(Braun et al., 2020)
		205.0	-50	-33	-7	

^a DP: declustering potential, ^b CE: collisions energy, ^c CXP: collision cell exit potential, ^d compound optimisation with den LC-MS was performed to improve the sensitivity of the analysis, ^e STC: sterigmatocystin

7.2 Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe

Im folgenden Verzeichnis (Tabelle 17) sind all verwendeten Chemikalien gemäß VO (EG) 1272/2008 unter Angabe ihrer CAS-Nummer und der Gefahrenbeurteilung (Tabelle 18) gemäß dem global harmonisierten System (GHS) aufgeführt (Europäische Kommission, 2008).

Tabelle 17: Liste der verwendeten Gefahrstoffe.

Substanz	CAS-Nummer	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
Aflatoxin B ₁	1162-65-8	08, 06	H300+H310+H330 - H340 - H350	P202 - P260 - P264 - P280 - P302+P352+P310 - P304+P340+P310
Aflatoxin M ₁	6795-23-9	08, 06	H300+H310+H330 - H340 - H350	P202 - P260 - P264 - P280 - P302+P352+P310 - P304+P340+P310 -
Ameisensäure	64-18-6	02, 05, 06	H226 - H290 - H302 - H331 - H314	P210 - P280 - P303+P361+P353 - P304+P340+P310 - P305+P351+P338
Ammoniumformiat	540-69-2	07	H319	P264 - P280 - P305+P351+P338 - P337+P313
Dimethylsulfoxid	67-68-5	-	-	-
Heptan	142-82-5	02, 08, 07, 09	H225 - H304 - H315 - H336 - H410	P210 - P233 - P273 - P301+P310 - P303+P361+P353 - P331
Magnesiumsulfat	7487-88-9	-	-	-
Methanol	67-56-1	02, 06, 08	H225 - H301+H311+H331 - H370	P210 - P233 - P280 - P301+P310 - P303+P361+P353 - P304+P340+P311
Natriumchlorid	7647-14-5	-	-	-
Ochratoxin A	303-47-9	06, 08	H300+H310+H330 - H350 - H360	P201 - P202 - P260 - P280 -

Salzsäure	7647-01-0	05, 07	H290 - H314 - H335	P302+P352+P310 - P304+P340+P310 P234 - P261 - P271 - P280 - P303+P361+P353 - P305+P351+P338
Sterigmatocystin	10048-13-2	06, 08	H301 - H351	P201 - P301+P310+P330
Stickstoff	7727-37-9	04	H281	P282 - P336+P315 - P403
β-Glucuronidase	9001-45-0	08	H334	P261 - P284 - P501

Tabelle 18: GHS Kennzeichnung und Bedeutung gemäß VO (EG) 1272/2008 (Europäische Kommission, 2008).

Kodierung	Bedeutung
02	Entzündbar
04	Gas
05	Korrosiv, ätzend
06	Akute Toxizität
07	Achtung
08	Gesundheitsgefahren
09	Gewässergefährdend

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.

Pinneberg, den 13.03.2026

Kim Lara Gützkow

Kim Lara Gützkow

