

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum.....</b>	<b>2</b>
2.1	Allgemeines zu Mykotoxinen.....	2
2.2	Bedeutung und Vorkommen der Gattung <i>Alternaria</i> .....	3
2.2.1	Allgemeines zu <i>Alternaria</i> -Spezies .....	4
2.2.2	Vorkommen von <i>Alternaria</i> -Spezies .....	4
2.2.3	<i>Alternaria</i> -Toxine .....	8
2.2.3.1	Toxizität von <i>Alternaria</i> -Extrakten.....	8
2.3	Charakterisierung von Alternariol .....	10
2.3.1	Erstbeschreibung.....	10
2.3.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften.....	10
2.3.3	Biologische Eigenschaften.....	11
2.3.3.1	Toxizität .....	11
2.3.3.2	Weitere Eigenschaften .....	12
2.3.4	Bildung, Vorkommen und Metabolismus.....	12
2.3.4.1	Alternariol-bildende Schimmelpilze.....	12
2.3.4.2	Biosynthese von Alternariol .....	13
2.3.4.3	Totalsynthese von Alternariol.....	15
2.3.4.4	Vorkommen in pflanzlichen Produkten .....	16
2.3.4.5	Vorkommen von Alternariol in der Umwelt sowie carry-over in Lebensmittel tierischen Ursprungs .....	22
2.3.4.6	Metabolismus von Alternariol .....	22
2.4	Verfahren zum Nachweis von Alternariol .....	23
2.4.1	Extraktion und Reinigung .....	23
2.4.2	Detektion und Quantifizierung von Alternariol .....	26
2.4.2.1	Dünnschichtchromatographie .....	26
2.4.2.2	Gaschromatographie .....	26
2.4.2.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	27
2.4.2.4	Immunologische Nachweisverfahren.....	33
2.4.2.4.1	Enzymimmunologische Verfahren .....	33
2.5	Rechtliche Regelungen .....	34

<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>35</b>
3.1	Materialien und Geräte.....	35
3.1.1	Chemikalien und Biochemika.....	35
3.1.2	Mykotoxine.....	36
3.1.3	Immunreagenzien.....	36
3.1.4	Puffer und Lösungen.....	37
3.1.5	Nährmedien.....	37
3.1.6	Geräte und Sonstiges.....	38
3.1.7	Probenmaterial .....	39
3.2	Methodik.....	40
3.2.1	Herstellung der Immunreagenzien.....	40
3.2.1.1	Herstellung der Alternariol-Konjugate .....	40
3.2.1.1.1	Überprüfung und Quantifizierung von Alternariol.....	40
3.2.1.1.2	Derivatisierung von Alternariol.....	41
3.2.1.1.2.1	Durchführung der Derivatisierung.....	42
3.2.1.1.2.2	Überprüfung und Charakterisierung der Derivate .....	42
3.2.1.1.3	Kopplung mittels Formaldehyd .....	43
3.2.1.1.4	Kopplung mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol.....	44
3.2.1.1.5	Überprüfung und Charakterisierung der mittels Formaldehyd bzw. 1,1'- Carbonyldiimidazol hergestellten Konjugate.....	45
3.2.1.1.6	Kopplung mittels reduktiver Alkylierung unter Verwendung von Natriumperjodat .....	45
3.2.1.1.6.1	Herstellung eines Alternariol-BSA-HRP-Konjugates .....	46
3.2.1.1.6.2	Überprüfung der Konjugatfraktionen.....	47
3.2.1.2	Gewinnung spezifischer Antikörper (polyklonale-Anti-Alternariol-Antikörper).....	47
3.2.1.2.1	Immunisierung .....	47
3.2.1.2.2	Serumgewinnung .....	48
3.2.1.2.3	Kontrolle des Immunisierungsverlaufs und Ermittlung optimaler Immunreagenzien.....	48
3.2.1.2.4	Aufbereitung der Antiseren.....	49
3.2.1.3	Monoklonale-Anti-Alternariol-Antikörper .....	50
3.2.2	Acetylierung von Alternariol, Alternariolmonomethylether und Altenuen.....	50
3.2.3	Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntests mit pAk-AOH....	50

3.2.3.1	Überprüfung der Anwendbarkeit der Alternariol-HRP-Konjugate .....	51
3.2.3.2	Auswahl geeigneter Kombinationen von Antiserum zu Alternariol-BSA-HRP-Konjugat .....	51
3.2.3.3	Durchführung des kompetitiven direkten simultanen EIAs (Beschichtung mit Antiserum) .....	52
3.2.3.4	Durchführung des kompetitiven direkten simultanen EIAs (Doppelantikörpertechnik) .....	53
3.2.4	Entwicklung eines kompetitiven indirekten EIAs mit pAk-AOH (pAk-EIA) .....	53
3.2.4.1	Durchführung .....	53
3.2.4.2	Optimierung der Nachweisempfindlichkeit .....	54
3.2.5	Entwicklung eines kompetitiven indirekten EIAs mit mAk-AOH (mAk-EIA) .....	55
3.2.5.1	Durchführung .....	55
3.2.5.2	Optimierung der Nachweisempfindlichkeit .....	56
3.2.6	Charakteristika der indirekten Testsysteme .....	58
3.2.6.1	Ermittlung der Sensitivität der Testsysteme .....	58
3.2.6.2	Ermittlung der Spezifität der Testsysteme .....	58
3.2.7	Überprüfung der Anwendbarkeit der kompetitiven indirekten EIAs zum Nachweis von Alternariol .....	59
3.2.7.1	Erarbeitung einer geeigneten Probenvorbereitung .....	59
3.2.7.2	Bestimmung der Wiederfindung und der Reproduzierbarkeit .....	60
3.2.7.3	Durchführung und Auswertung der EIAs zum Nachweis von Alternariol .....	60
3.2.7.4	Immunchemischer Nachweis von Alternariol in Lebensmitteln .....	61
3.2.7.4.1	Nachweis von Alternariol in Getränken .....	61
3.2.7.4.2	Nachweis von Alternariol in Obst und Gemüse bzw. daraus hergestellter Erzeugnisse .....	61
3.2.7.5	Nachweis von Alternariol in <i>Alternaria</i> -Myzelextrakten nach kultureller Anreicherung .....	63
3.2.7.6	Vergleich der Ergebnisse des indirekten kompetitiven EIAs mit pAk- bzw. mAk-AOH .....	63
3.2.8	Untersuchung mittels HPLC .....	63
3.2.8.1	Probenuntersuchung .....	64

4	Ergebnisse .....	66
4.1	Herstellung der Immunreagenzien .....	66
4.1.1	Überprüfung und Quantifizierung von Alternariol .....	66
4.1.2	Derivatisierung von Alternariol mittels Bernsteinsäureanhydrid .....	67
4.1.3	Herstellung und Überprüfung der Konjugate .....	67
4.1.4	Gewinnung spezifischer Antiseren .....	71
4.1.4.1	Immunisierungsverlauf .....	71
4.2	Entwicklung eines kompetitiven direkten EIAs .....	72
4.3	Entwicklung von zwei indirekten EIAs mit poly- bzw. monoklonalen Antikörpern .....	73
4.3.1	Optimierung des Testsystems mit polyklonalen Antikörpern (pAk-EIA) .....	73
4.3.2	Optimierung des Testsystems mit monoklonalen Antikörpern (mAk-EIA) .....	75
4.3.3	Sensitivität und Reproduzierbarkeit .....	78
4.3.4	Spezifität .....	78
4.4	Überprüfung der Anwendbarkeit der kompetitiven indirekten EIAs zum Nachweis von Alternariol .....	80
4.4.1	Probenvorbereitung .....	80
4.4.2	Wiederfindung und Reproduzierbarkeit .....	82
4.4.3	Bestimmung von Alternariol in Lebensmitteln .....	86
4.4.3.1	Apfelerzeugnisse .....	87
4.4.3.2	Erdbeerkonfitüre .....	88
4.4.3.3	Tomatenprodukte .....	89
4.4.3.4	Weißwein .....	89
4.4.4	Bestimmung von Alternariol in Tomaten .....	92
4.4.5	Nachweis des Alternariol-Bildungsvermögen eines <i>Alternaria</i> -Stammes auf Malzextraktagar und in Hefeextrakt-Glucose-Bouillon mittels EIA .....	93
4.5	Vergleich der mittels pAk- und mAk-EIA ermittelten Alternariol- Konzentrationen .....	93
4.6	Untersuchung mittels HPLC .....	94
4.6.1	Methodenvergleich von EIA und HPLC zum Nachweis von Alternariol .....	94
4.6.1.1	Untersuchung der HPLC-Fractionen .....	97

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>99</b>
5.1	Antikörper gegen Alternariol und Entwicklung enzymimmunchemischer Nachweisverfahren.....	99
5.2	Anwendbarkeit des pAk- bzw. mAk-EIAs .....	101
5.3	Vergleich der mittels pAk- und mAk-EIA ermittelten Alternariol- Konzentrationen .....	104
5.4	Methodenvergleich von EIA und HPLC zum Nachweis von Alternariol .....	105
5.5	Vorkommen von Alternariol in verschiedenen Lebensmitteln .....	105
5.6	Abschätzung der Gefährdung des Verbrauchers durch Alternariol belastete Lebensmittel.....	108
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>141</b>