



MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Bestimmung der Gehalte an Ochratoxin A in Kaffee“

verfasst von / submitted by

Tomasz Luckos, Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the
degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2017 / Vienna, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	2
2. Mykotoxine	4
2.1 Aflatoxine.....	5
2.2 Fumonisine	5
2.3 Trichothecene.....	6
2.4 Zearalenone	7
3. Ochratoxin A	7
3.1 Physikochemische Eigenschaften von OTA.....	8
3.2 Toxizität.....	9
3.2.1 Nephrotoxizität	9
3.2.2 Kanzerogenität	10
3.2.3 Immunotoxizität.....	10
3.3 Pharmakokinetik.....	11
3.3.1 Absorption und Metabolismus.....	11
3.3.2 Distribution	12
3.3.3 Halbwertszeit	13

3.3.4	Exkretion	13
4.	Ochratoxin A produzierende Pilzgattungen	14
5.	Ökophysiologische Faktoren und deren Einfluss auf die Ochratoxin A-Produktion.....	16
6.	Gesetzliche Regelungen in Nahrungs- und Futtermitteln.....	17
6.1	Europäische Maßnahmen	17
6.1.1	Verordnung (EWG) 315/93.....	17
6.1.2	Verordnung (EG) 1881/2006	18
6.1.3	Einfuhrkontrollen für bestimmte Erzeugnisse aus Drittstaaten.....	22
6.1.4	Tierernährung und Futtermittel	22
6.2	Nationale Vorgaben	23
7.	Extraktionstechniken	23
7.1	Ultraschall-Extraktion.....	24
7.2	Beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE).....	24
7.3	Festphasenextraktion (SPE)	24
7.4	Extraktion und clean-up mit Immunoaffinitätssäulen.....	25
8.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	26

9. Detektionstechniken	27
9.2 Fluoreszenzdetektor (FLD)	27
10. OTA in Kaffee	29
10.1 Der Effekt unterschiedlicher Zubereitungsmethoden	30
10.2 Instantkaffee und Kaffeeersatz	34
10.3 Röstungsmethoden und deren Einfluss auf die OTA- Reduktion	35
10.4 Grüner Kaffee	40
11. Laboruntersuchung	42
11.1 Chemikalien und Reagenzien	42
11.2 Materialien	42
11.3 Proben-Liste	43
11.4 Vorbereitung der Standards	43
11.5 Extraktion und Reinigungsprozedur	44
11.6 Messung	45
11.7 Ergebnisse	46
12. Conclusio	47
13. Literaturverzeichnis	49

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Strukturformel von Deoxynivalenol (12,13-epoxy-3 α ,7 α ,15-trihydroxytrichothec-9-en-8-on) [Sobrova et al. 2010].....	6
Abbildung 2: Strukturformel von Ochratoxin A [https://de.wikipedia.org/wiki/Ochratoxine#/media/File:Ochratoxin_A.svg]	8
Abbildung 3: Metabolite von OTA [MAK Value Documentation in German language, 2003].....	12
Abbildung 4: Schritte einer Festphasenextraktion (SPE). © Fa. Gerstel [Dr. Oliver Lerch, GERSTEL GmbH & Co. KG, GERSTEL Aktuell – Dezember 2012]	25
Abbildung 5: Schema einer HPLC-Anlage (http://lac.chem.polimi.it/analisi_hplc.php)	27
Abbildung 6: Prinzip des Fluoreszenzdetektors (http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/detektoren/fluoresz/fluoreszenz1gr1102.gif).....	28
Abbildung 7: OTA-Gehalt der mit 2 μ g OTA/l bzw. 4 μ g OTA/l angereicherten Proben [Santini et al.]	32
Abbildung 8: OTA-Konzentration (ng/L) in den fünf verschiedenen mit 4 μ g OTA/l versetzten Kaffeeproben (Santini et al.)	33
Abbildung 9: Schema eines Trommelrösters [http://www.origo-kaffee.de/images/his_1.png].....	37
Abbildung 10: Geradengleichung der Standards SIV 25 – SIV 1000.....	44
Abbildung 11: Vergleich des Chromatogramms der Probe Nr.5 (oben) und des Standards 50ng/ml (unten)	46

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln.....	19-20
Tabelle 2: AGES Überblick über österreichrelevante Mykotoxin – Höchst - und Richtwerte.....	Error! Bookmark not defined. 23
Tabelle 3: Röstungsarten von Kaffeebohnen.....	36
Tabelle 4: Einfluss der Trommelröstung auf den Restgehalt von OTA	39
Tabelle 5: Einfluss der Heißlufttröstung auf den Restgehalt von OTA	39
Tabelle 6: AUC der einzelnen Standards.....	44
Tabelle 7: Durchschnittlicher OTA-Gehalt der Proben	47

Abkürzungsverzeichnis

³H	Tritium
3-MCPD	3-Monochlorpropan-1,2-diol
ALARA	as low low as reasonably achievable
ASE	Accelerated Solvent Extraction
ATA	Alimentäre Toxische Aleukie
atm	physikalische Atmosphäre – Druckeinheit
AUC	Area Under the Curve
a_w	“activity of water” - Wasseraktivität
BEN	Balkan endemic nephropathy
C°	Grad Celcius
Da	Dalton – atomare Masseinheit
DAD	Dioden-Array-Detektor
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DON	Deoxynivalenol
ECD	Elektrochemischer-Detektor
EG	Europäische Gemeinschaft
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization
FLD	Fluoreszenzdetektor
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
HPLC	High Perfomance Liquid Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
K°	Grad Kelvin

mE	meines Erachtens
Mpa	Megapascal – Druckeinheit
NIRS	Near-Infrared Spectroscopy
OTA	Ochratoxin A
OTB	Ochratoxin B
Otα	Ochratoxin α
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCB	Polychlorierte Biphenyle
ppb	parts per billion
RI	Refractive Index
RP-HPLC	Reverse-Phase-HPLC
SPE	Solid Phase Extraction
UV	Ultraviolett
UV/Vis	Ultraviolett/Visible
VO	Verordnung

Abstract

The occurrence of ochratoxin A (OTA) in different brands of coffee beans from Austrian supermarkets, with a total sample size of 20, was assessed. The OTA was extracted from the samples with acetonitrile and the clean-up was performed with immunoaffinity columns. A HPLC-equipment with a fluorescence detector was used for the measurement of the samples. Optimal chromatographic conditions were selected as follows: mobile phase composed by water:acetonitrile (65:35; v:v) with a flow-rate of 0.2ml/min. The excitation wavelength was set to 333 nm and the emission wavelength to 443 nm. Those parameters resulted in a retention time between 2.5 and 3.5 minutes. All samples contained OTA with a mean contamination level of 1.785 µg/kg and a relative standard deviation of 2.60%. Even though all of the samples contained OTA below the European legal limits of 5 µg/kg, they still have a minor contribution to OTA daily intake.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 20 Kaffeebohnen-Proben aus österreichischen Supermärkten auf ihren Ochratoxin A (OTA) Gehalt untersucht. Zur Extraktion von OTA wurde dabei Acetonitril verwendet und das clean-up fand mit Hilfe von Immunoaffinitätssäulen statt. Für die Messung der aufbereiteten Proben wurde ein HPLC-Equipment mit Fluoreszenzdetektor benutzt. Die optimalen chromatographischen Bedingungen wurden wie folgt gewählt: mobile Phase bestehend aus Wasser:Acetonitril (65:35; v:v) mit einer Flussrate von 0.2ml/min. Die Anregungswellenlänge betrug 333 nm und die Emissionswellenlänge 443 nm. Diese Parameter resultierten in einer Retentionszeit von 2.5 bis 3.5 Minuten. Alle untersuchten Proben enthielten OTA bei einem Durchschnittsgehalt von 1.785 µg/kg und einer relativen Standardabweichung von 2.60%. Auch wenn alle Proben einen OTA Gehalt unter dem von der EU zugelassenen Höchstwert von 5 µg/kg aufwiesen, tragen sie dennoch zu einer täglichen OTA-Aufnahme bei.

1. Einleitung

Vom Segen und Fluch der Schimmelpilze

Schimmelpilze sind in vielerlei Hinsicht von Nutzen für den Menschen. So werden sie etwa in der Biotechnologie für die Herstellung von Penicillin herangezogen. Ohne Schimmelpilze müssten wir auf zahlreiche beliebte Lebensmittel wie Camembert oder ungarische Salami verzichten. Schließlich leisten Schimmelpilze auch in der biologischen Schädlingsbekämpfung wertvolle Dienste. [Kück et al., 2009]

Nichtsdestotrotz können zahlreiche, teils weit verbreitete Pilzarten, die auf landwirtschaftlichen Erzeugnissen wachsen, die Gesundheit von Mensch und Tier negativ beeinflussen. Sie produzieren beim Wachstum, der Ernte, beim Transport oder der Lagerung des Nahrungsmittels eine Vielzahl an Mykotoxinen, wie etwa Aflatoxine, Ochratoxine, Fumonisine, Trichothecene oder Zearalenone. Dabei handelt es sich um toxische Sekundärmetabolite, welche unerwünschte Auswirkungen auf den Organismus haben. Diese reichen von einfachen allergischen Reaktionen über Immunsuppression bis hin zu Krebserkrankungen. [Selvaraj et al. 2015] In der Medizin wird terminologisch bei den von Pilzen hervorgerufenen Erkrankungen von Mensch und Tier – abhängig von der pathogenen Wirkung – zwischen Mykose, Allergose und Mykotoxikose unterschieden. [Gedek, 2006]

Im Laufe der Geschichte forderten durch Mykotoxine hervorgerufene Epidemien unzählige Menschenleben. So starben allein im vergangenen Jahrtausend hunderttausende Menschen durch die Aufnahme von Mutterkornalkaloiden an Ergotismus. Die Mutterkornvergiftung gilt heute mitunter als eine der ältesten bekannten Mykotoxikosen. [Macholz in Macholz/Lewerenz, 2013]

Wie lang die Ursache dieser Erkrankung der Wissenschaft verborgen blieb, lässt sich sehr gut bei *Theodor Otto Heusinger* nachlesen, der 1856 in seinem Werk „Über den Ergotismus, insbesondere sein Auftreten im neunzehnten Jahrhundert“ einleitend schrieb: „*Mit dem Namen Ergotismus belegt man eine Krankheit, deren Ursprung hauptsächlich, wenn nicht*

ausschliesslich, in dem Genusse kranker Brodfrüchte zu suchen ist. Die Krankheit ist gewis sehr alt, Cäsar, Celsus, Galenus erwähnen schon Krankheiten, die man wol nicht mit Unrecht den Ergotismusformen zugezählt hat. [...] Im Mittelalter, wo eine Art des Ergotismus mehre Male in Frankreich sehr verheerend auftrat, schrieb man die Krankheit, wie es der Zeitgeist mit sich brachte, übernatürlichen Einflüssen zu; man betrachtete das St. Antonfeuer als eine Strafe des Himmels, gab sich gar nicht die Mühe nach materiellen Ursachen zu suchen und hielt deshalb auch eifriges Gebet für das einzige Mittel, um vor dem schrecklichen Uebel bewahrt zu bleiben. [...] Freilich sind leider bis auf den heutigen Tag die ursächlichen Verhältnisse des Ergotismus im Allgemeinen auch noch nicht so genau erörtert, wie man es sich wünschen möchte; [...] In einem Punkte haben aber in der letzten Zeit alle Beobachter übereingestimmt: In der Annahme nämlich, dass die Hauptursache des Ergotismus im Genuss verdorbener Speisen zu suchen sei.“

Heutzutage sind hunderte unterschiedliche Mykotoxine bekannt, die teilweise nur unter ganz bestimmten Bedingungen, etwa nur bei gewissen Temperaturen und in besonderen Entwicklungsphasen des Pilzes entstehen. [Klaffke in Frede, 2010] Sowohl die hohe Anzahl als auch die Diversität in Struktur und Wirkung der Mykotoxine stellen noch heute große Hürden für Wissenschaft und Verbraucherschutz dar. [Degen, 2017] Hinzu kommt, dass Mykotoxine oftmals geruch- und farblos sind und in sehr geringen Konzentrationen auftreten (ppb), weshalb eine analytische Detektion notwendig ist, um Kontaminationen festzustellen [Vieira 2015].

Nahrungsmittel werden wohl niemals gänzlich frei von jeglicher natürlicher Kontamination durch Mykotoxine sein. (Degen, 2017) Ziel muss es daher sein, der Entstehung von Mykotoxinen zum einen vorzubeugen und zum anderen ihren Risiken und Gefahren für Tier und Mensch durch effektive Durchsetzung und Kontrolle gesetzlich reglementierter Höchstgehalte zu begegnen.

Viele Länder sind bereits diesen Weg gegangen. In welcher Form dies geschehen ist und welche Erfolge damit inner- und außerhalb Europas zu verzeichnen sind, soll im Zuge dieser Arbeit noch näher diskutiert werden.

Nach dieser kurzen Problemdarstellung soll nun zunächst näher auf Mykotoxine im Allgemeinen sowie deren wichtigste Vertreter im Speziellen eingegangen werden.

Im Anschluss wird eine nähere Auseinandersetzung mit Ochratoxin A (OTA) als wichtigstem Mykotoxin der Gruppe der Ochratoxine erfolgen, die gleichsam das Herzstück der vorliegenden Arbeit bilden soll.

2. Mykotoxine

Mykotoxine sind vereinfacht gesprochen Pilzgifte. Sie sind sekundäre Stoffwechselprodukte, die scheinbar keine Rolle für das normale Wachstum des Pilzes spielen und oftmals charakteristisch für den Pilz sind. Sie werden vor allem durch die verschiedenen Spezies der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* und *Alternaria* produziert [Vettorazzi und López de Cerain, 2016].

Ihre Struktur variiert von einem einzelnen heterozyklischen Ring mit einem Molakulargewicht von 50 Da bis zu sechs oder acht Ringen mit einem Molakulargewicht von über 500 Da. In ihrer relativ kleinen Molekulargröße liegt die größte Gefahr, da das menschliche Immunsystem nicht in der Lage ist, sie aufzuspüren. [Pitt, 2000]. Nach einer Schätzung der FAO, sind bis zu 25 Prozent der Weltproduktion von Nahrungsmitteln mit Mykotoxinen belastet und ca. 20 Prozent der Getreideernten innerhalb der EU enthalten messbare Konzentrationen an Mykotoxinen.[<http://www.ages.at/themen/rueckstaende-kontaminanten/mykotoxine/>].(02.08.2017)

Bei der Lebensmittelverarbeitung kann es zwar zu einer Reduktion der Mykotoxine kommen, da sie aber weitgehend hitzestabil sind, werden sie nicht komplett zerstört. Bei der Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln kann es somit zu einer Intoxikation kommen.

Dabei sind grundsätzlich vier Arten der Toxizität der Mykotoxine zu unterscheiden: akut, chronisch, mutagen und teratogen. Die Symptome von Mykotoxikosen sind dabei so unterschiedlich wie die Mykotoxine selbst. Bei

einer akuten Vergiftung sind die Symptome meist Leber und Nierenschäden, welche in Extremfällen sogar zum Tod führen können. Je nach Art des Mykotoxins kann es aber auch zur Beeinträchtigung des Immun- oder des Nervensystems kommen. Zu den chronischen Auswirkungen zählt hauptsächlich die Entstehung von Krebs. Mutagene und teratogene Auswirkungen durch die Beeinflussung der DNA-Replikation sind ebenfalls möglich. Manche Toxine verursachen vor dem Tod nur wenige Symptome, während andere schlimme Hautnekrosen oder starke Immundefizienz zur Folge haben. [Pitt, 2000]

2.1 Aflatoxine

Die Hauptproduzenten der Aflatoxine sind die Spezies *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*, welche besonders in Regionen mit feuchtem und warmem Klima auftreten. Sie besitzen teratogene, mutagene und kanzerogene Eigenschaften. Die am häufigsten vorkommenden Aflatoxine in Lebensmitteln sind Aflatoxin B₁, B₂, G₁ und G₂. Dabei ist Aflatoxin B₁ das vorherrschende und toxischste. Es wurde von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als Group-I Karzinogen klassifiziert, da es beim Menschen Leberzellkarzinome verursacht [IARC, 2012]. Ein weiteres Aflatoxin, das M₁, ist ein Hauptmetabolit des B₁ und kommt in der Milch von Tieren, welche verunreinigtes Futter zu sich genommen haben, vor [Nimal Selvaraj et al. 2015].

2.2 Fumonisine

Fumonisine bestehen aus einer Kette von 20 Kohlenstoffmolekülen und zwei Seitenketten die durch hydrophile Esterverbindungen verbunden sind. Ihre Struktur ähnelt der von Sphingosinen, einem essentiellen Phospholipid in Zellmembranen. Ihre Toxizität beruht auf der Konkurrenz mit den Sphingosinen. Entdeckt wurden Fumonisine in den 80er Jahren in Folge der Untersuchung der Leukoenzephalomalazie bei Pferden [Marasas et al. 1988].

Die toxische Wirkung ist von Tier zu Tier unterschiedlich und beim Menschen noch nicht komplett erforscht. Vieles deutet jedoch darauf hin, dass Fumonisine eine Rolle bei der Entstehung von Magenkrebs spielen. Die IARC stuft Fumonisin B1 als kanzerogen, jedoch weder mutagen noch genotoxisch ein. Des Weiteren verändert es die Proliferationsfunktion von Zellen [Maras et al. 1981]. Die Produktion erfolgt hauptsächlich durch *F. moniliforme* und eng verwandte Spezies, welche vorwiegend im Mais auf der ganzen Welt vorkommen [Pitt und Hocking, 1997].

2.3 Trichothecene

Auch Trichothecene werden in Lebensmitteln hauptsächlich von Stämmen der Fusarienpilze gebildet und kommen vor allem auf Getreide und Mais vor. Sie scheinen keine kanzerogenen Eigenschaften zu besitzen, könnten jedoch synergistisch mit Aflatoxinen wirken [IARC, 1993]

Die zwei bedeutendsten Mykotoxine innerhalb der Trichothecene sind Deoxynivalenol (DON, Abb. 1) und Nivalenol aus der Gruppe der Typ B Trichothecene, wobei letzteres weniger häufig vorkommt. Auch über dessen Toxizität ist wenig bekannt. Beide Mykotoxine werden vor allem durch *F. graminearum*, aber auch durch *F. crookwellense* und *F. culmorum* gebildet [Bottalico et al. 2002].

DON wird wegen seiner stark Brechreiz auslösenden Wirkung auch als Vomitoxin bezeichnet.

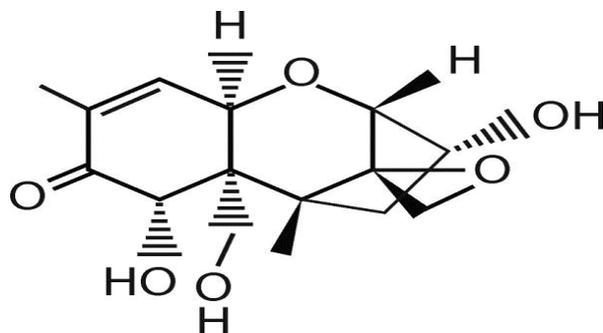


Abbildung 1: Strukturformel von Deoxynivalenol (12,13-epoxy-3 α ,7 α ,15-trihydroxytrichothec-9-en-8-on) [Sobrova et al. 2010]

Es ist wohl der gängigste Kontaminant von Getreide und kann in bis zu 90% aller Proben nachgewiesen werden. Zudem ist DON äußerst hitzestabil und hält Temperaturen zwischen 170° und 350°C aus. Es ist allerdings wasserlöslich, weshalb seine Konzentration beim Kochen – jedoch nicht beim Frittieren – gesenkt werden kann. Obwohl DON weit verbreitet ist, stellt es keine große Gefahr für die Gesundheit dar. In den meisten Fällen verursacht es lediglich kurze Übelkeit mit Erbrechen. Es kann jedoch auch zu Durchfall, Unterleibsschmerzen, Kopfschmerzen, Krämpfen, Appetitlosigkeit, Schüttelfrost und Fieber führen [Sobrova et al. 2010].

2.4 Zearalenone

Zearalenone sind Mykotoxine mit Östrogenwirkung. Wie Fumonisine und Trichothecene werden auch sie durch verschiedene Stämme der Fusarienpilze gebildet, insbesondere durch *F.graminearum*, *F. culmorum* und *F. roseum*.

Ihre hormonelle Wirkung übertrifft die anderer natürlich vorkommender nicht-steroidaler Östrogene wie der von Soja-Isoflavonen [Hueza et al. 2014]. Sie können eine Vielzahl an Veränderungen der weiblichen Fortpflanzung verursachen. Die Symptome beinhalten Hyperämie, ödemartige Schwellungen der Vulva bei Jungsauern, Unfruchtbarkeit, Fetusresorption und Fehlgeburten [Pitt, 2000].

3. Ochratoxin A

Ochratoxin A (OTA) bekam seinen Namen von dem Pilz, aus welchem es isoliert wurde. 1965 entdeckten van der Merwe und seine Kollegen die Verbindung in Südafrika in dem Pilz *Aspergillus ochraceus* [Van der Merwe et al. 1965]. Seine Strukturformel lautet N-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-3,4-dihydro-1H-isochromen-7-yl]carbonyl]-L-phenylalanine, dabei handelt es sich um ein Dihydroisokumarin, welches über eine α -Amidbindung an die Aminosäure

L-β-Phenylalanin gebunden ist (Abb. 2) [Stock, 2004]. Die Summenformel ist $C_{20}H_{18}ClNO_6$.

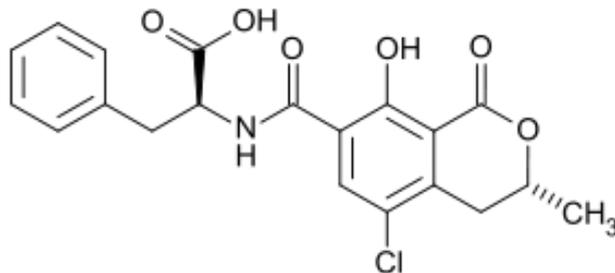


Abbildung 2: Strukturformel von Ochratoxin A
[https://de.wikipedia.org/wiki/Ochratoxine#/media/File:Ochratoxin_A.svg]

Andere Metabolite des Pilzes, das Ochratoxin B (OTB) - das dechlorinierte Derivat des OTA, und das Ochratoxin C - das Ethylester-Derivat von OTA, wurden kurz darauf ebenfalls identifiziert, [Khoury und Atoui, 2010]. Bei Lebensmittelkontaminationen spielen die Derivate jedoch eine eher untergeordnete Rolle. Hier ist OTA aufgrund seiner Verbreitung und dem höheren toxischen Potential von größerer Bedeutung.

3.1 Physikochemische Eigenschaften von OTA

Aufgrund der phenolischen Hydroxylgruppe im Dihydroisokoumarinring sowie der Carboxylgruppe des Phenylalanin verhält sich OTA wie eine schwache organische Säure mit einem pKs-Wert von 7.1 [Stock, 2004; Khoury und Atoui, 2010]. Das Molekulargewicht beträgt 403.8g/mol. Reines OTA ist eine feste, farblose bis weiße, kristalline Masse. Es besitzt jedoch unter UV-Licht eine blaue Fluoreszenz bei basischen Bedingungen bzw. eine grüne bei sauren [Budavari, 1989]. Bei einem sauren bzw. neutralen pH-Wert ist es schwer löslich in Wasser und leicht löslich in Dimethylsulfoxid, Ethanol, Chloroform. Während es unter basischen Bedingungen allgemein in allen basischen Lösungen gut löslich ist [Khoury und Atoui, 2010]. Dieser Umstand wird für die Analytik von OTA genutzt, indem eine Mischung aus einer wässrigen $NaHCO_3$ -Lösung mit Methanol zur Extraktion benutzt wird. Da

OTA unempfindlich gegenüber Hitze ist, kann es auch noch in geröstetem Kaffee nachgewiesen werden. Zwar liegt der Schmelzpunkt zwischen 168-173°C, doch Boudra et al. haben gezeigt, dass es beim Kochen selbst bei Temperaturen von 250°C nicht vollständig zerstört wird [Boudra et al. 1995]. Bei dunkler und kühler Lagerung kann es über längere Zeit verlustlos aufbewahrt werden, bei einer Exposition gegenüber fluoreszierendem Licht erfolgt jedoch ein Abbau.[Khoury und Atoui, 2010].

3.2 Toxizität

Es sind mehrere adverse Wirkungen von OTA bekannt. Unter anderem Nephrotoxizität, Hepatotoxizität, Neurotoxizität, Immunotoxizität, Kanzerogenität und Teratogenität. Die toxische Wirkung variiert jedoch je nach Spezies, Geschlecht und Zelltyp. [Pavlovic, 2013]

3.2.1 Nephrotoxizität

Aufgrund seiner nephrotoxischen Eigenschaften wurde OTA in den vergangenen Jahrzehnten immer wieder mit der Balkan Nephropathie (englisch: Balkan endemic nephropathy, BEN), einer Form der interstitiellen Nephritis, in Verbindung gebracht. Die ersten Hypothesen, dass OTA für die BEN verantwortlich war, wurden in den 1970er Jahren aufgestellt. Im Zuge mehrerer Feldstudien wurden Lebensmittel in den betroffenen Gebieten analysiert und es wurden darin tatsächlich erhöhte OTA-Werte gefunden. Erst Jahre später stellte sich heraus, dass die Vergiftung durch Aristolochiasäure die primäre Ursache dieser Erkrankung ist. [Pavlovic, 2013]

Die Annahme, OTA sei für BEN verantwortlich gewesen, ist insofern nicht verwunderlich, als OTA in allen Nichtwiderkäuern nephrotoxisch wirkt. So spielt es etwa eine wichtige Rolle in der Entstehung der Schweine-Nephropathie, einer Erkrankung, welche die Degeneration der Nieren-Tubuli, eine Atrophie des tubulären Epithels und interstitielle Fibrose in der

Nierenrinde verursacht. Wenn OTA auch – wie heute als gesichert gilt - nicht die primäre Ursache von BEN war, so wird ihm doch eine wesentliche Rolle in der Entwicklung dieser Krankheit zugeschrieben [Elling et al. 1985]. Das Ochratoxin gelangt wahrscheinlich über das organische Anionen Transport System in die proximalen Tubuluszellen, wo es angereichert und deren Funktion einschränkt, was zu Glukosurie und Enzymurie führen kann [Anzai et al. 2010].

3.2.2 Kanzerogenität

In diversen Tierversuchen wurde bestätigt, dass es nach oraler Aufnahme von OTA zur Entstehung von Nieren- und Lebertumoren kommt. Eine solche Evidenz fehlt jedoch beim Menschen bis heute. Epidemiologische Studien haben jedoch gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von BEN und einer erhöhten Mortalität durch Harntrakttumore gibt. Wie bereits erwähnt, wiesen Lebensmittel in den BEN-Endemiegebieten eine höhere OTA-Belastung im Vergleich zu Nicht-Endemiegebieten auf [Pavlovic et al.1979; 1993]. Obwohl es keine Evidenz für die Bindung von OTA an DNA gibt, stuft die International Agency for Research on Cancer IARC OTA als “möglicherweise kanzerogen für Menschen” ein [IARC 1993]

3.2.3 Immunotoxizität

OTA kann die Aktivität natürlicher Killerzellen hemmen und die Produktion von Interferon stören. Es vermag ebenfalls eine suppressive Wirkung auf die T- und B-Zell-Lymphozytenspiegel zu nehmen, sowie die Produktion von Interleukin 2 und dessen Rezeptoren zu blockieren. Bei vielen Tierspezies führt eine OTA-Aufnahme zu unterschiedlichen Effekten auf die Immunantwort [Lea et al. 1989].

3.3 Pharmakokinetik

3.3.1 Absorption und Metabolismus

Bei den meisten Tierspezies beginnt die Absorption von OTA bereits im Magen [Roth et al., 1988]. Jedoch gibt es auch Spezies mit einer effizienten Absorption im proximalen Jejunum. Diese kann gegen einen Konzentrationsgradienten stattfinden und hängt vom pH-Wert der Mukosa ab. OTA, welches auf diese Weise aufgenommen wird, ist fettlöslich und in nichtionisierter Form [Kumagai und Aibara, 1982; Kumagai, 1988].

Bei Wiederkäuern wird die Absorption aus den Vormägen ebenfalls vom pH-Wert beeinflusst. Die höhere Bioverfügbarkeit bei einem niedrigen pH-Wert im Pansen kann aber nicht nur durch eine verbesserte Absorption erklärt werden. Sie könnte ebenfalls an einer Veränderung der Mikrobiota liegen, welche zu einer verminderten Abbaurate von OTA zu $OT\alpha$ durch Carboxypeptidase und Chymotrypsin A führt [XIAO et al. 1991].

Bei Ratten wird OTA vor allem in Duodenum, Jejunum und dem Pankreas zu $OT\alpha$, dem Hauptmetabolitem, hydrolysiert. In der Leber und den Nieren hingegen, wird OTA in die R- und S-Epimere des 4- und 10-hydroxyochratoxin A metabolisiert. Diese Reaktion wird dabei durch das Cytochrom P450 induziert [Hietanen et al. 1991]. Das wenig toxische 4R-OH-Epimer wird vorwiegend in den Lebermikrosomen von Ratten und Menschen gebildet, das 4S-OH-Epimer bei Schweinen und das 10-OH-Epimer bei Hasen [Suzuki et al. 1977; Hietanen et al. 1991; Størmer et al. 1983]

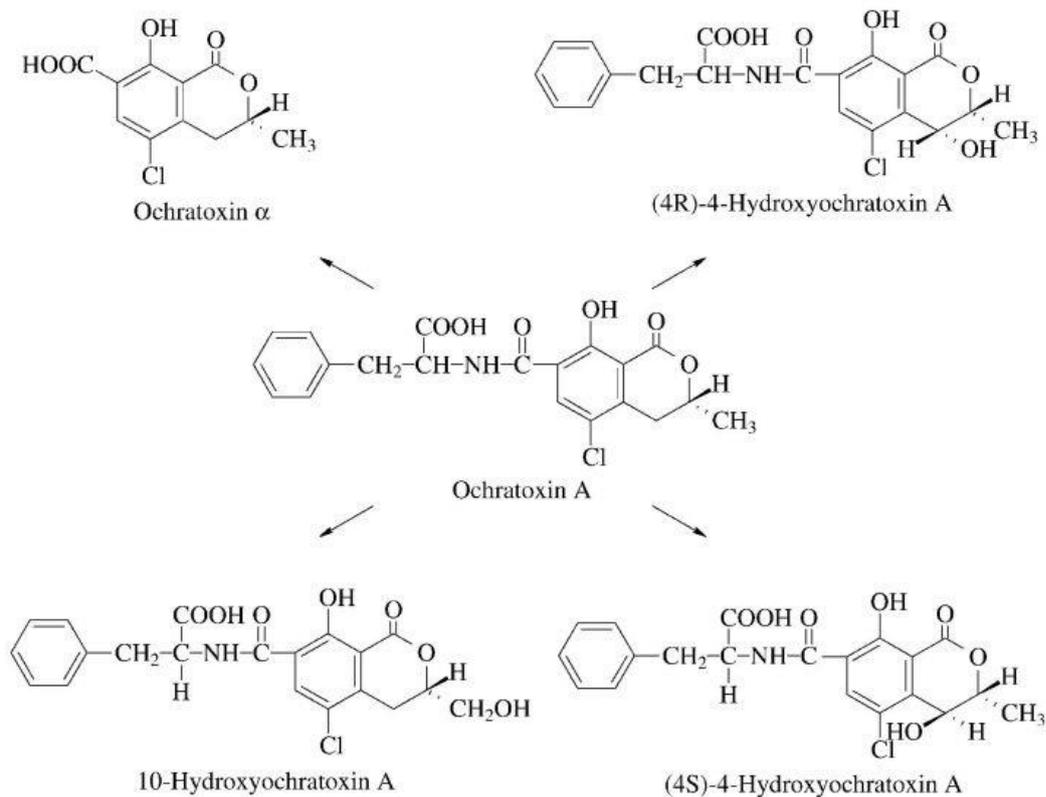


Abbildung 3: Metabolite von OTA [MAK Value Documentation in German language, 2003]

3.3.2 Distribution

Sobald OTA in den Blutkreislauf gelangt, bindet es an Serumproteine, vor allem Albumin, und andere nicht näher charakterisierte Makromoleküle mit einer Größe von 20 kDa. Die Erythrozyten enthalten nur Spuren von OTA [Galtier et al., 1980]. Bereits bei einer Konzentration von 10-20 ng/ml Serum findet eine Sättigung dieser Bindung statt. Der Anteil an ungebundenem OTA liegt im humanen Plasma bei nur ca. 0.02% [Hult & Fuchs, 1986]. Die Konzentration in Plasma und Gewebe ist jedoch abhängig von mehreren Faktoren: Dauer der Aufnahme, Dosis, Halbwertszeit von OTA, Dauer der OTA-freien Diät vor Aufnahme und davon ob die natürlich vorkommende oder die kristalline Form von OTA aufgenommen wurde [Kuiper-Goodman und Scott, 1989]. Die maximale Serumkonzentration bei Ratten und Schweinen wird nach 10-48h Stunden erreicht [Suzuki et al. 1977; Galtier, 1978; Galtier et al. 1981; Mortensen et al., 1983].

Durch die starke Bindung an Albumin, spielt dieses eine wesentliche Rolle in der Distribution von OTA. Es limitiert nämlich den Transfer des Ochratoxins aus dem Blut in die Leber- und Nierenzellen und hemmt somit die Ausscheidung [Ringot et al. 2006]. Bereits 1985 konnten Kumagai et al. in einer Studie an Ratten mit Albuminmangel zeigen, dass diese OTA um bis zu 20 bis 70 mal schneller aus dem Körperkreislauf eliminieren konnten als Artgenossen ohne solch einen Mangel [Kumagai et al. 1985].

3.3.3 Halbwertszeit

Die Serum-Halbwertszeit von OTA variiert je nach Spezies. So beträgt diese bei Rhesusaffen 510 Stunden [Hagelberg et al., 1989], 72-120 Stunden bei Schweinen [Galtier et al., 1981; Mortensen et al., 1983], 55-120 Stunden bei Ratten [Galtier et al., 1979; Ballinger et al., 1986; Hagelberg et al., 1989] bis 4.1 Stunden bei Hühnern [Galtier et al., 1981].

Studer-Rohr et al. führten im Jahr 2000 einen Versuch am Menschen durch, wobei nach einer Gabe von 395 ng ³H-markierten OTA eine Halbwertszeit von 35.55 Tagen bei einer renalen Clearance von 0,11ml/min ermittelt wurde [Studer-Rohr et al., 2000]. Durch den Plasma- und Serumgehalt an OTA kann man Rückschlüsse auf eine längerwährende Exposition ziehen, während der Urinergehalt Hinweise auf eine kürzlich erfolgte OTA-Aufnahme liefert [Gilbert et al. 2001].

3.3.4 Exkretion

Die Ausscheidung von OTA erfolgt hauptsächlich über die biliäre Exkretion und glomeruläre Filtration. Da OTA dem enterohepatischen Kreislauf unterliegt, ist die Exkretion langsam, was wiederum Auswirkungen auf die chronischen Effekte des Toxins hat [Aoudia et al., 2008].

Bei den Ausscheidungsprodukten handelt es sich meist um Ochratoxin- α , Ochratoxin-A und ein 4R-OH-Ochratoxin A-Epimer. Im Urin von Albino-

Ratten haben diese 25–27%, 6%, und 1–1.5% der verabreichten OTA-Dosis ausgemacht [Storen et al., 1982].

4. Ochratoxin A produzierende Pilzgattungen

Ochratoxine werden durch mehrere Spezies der zwei Pilzgattungen *Aspergillus* und *Penicillium* produziert. Durch das ubiquitäre Vorkommen dieser zwei Pilzgattungen ist die Kontamination von Lebensmitteln mit Ochratoxinen großflächig. Am meisten betroffen ist Getreide, jedoch lässt sich OTA auch in Kaffee und Kakaobohnen, Gewürzen, Nüssen, Trockenfrüchten, sowie Bier und Wein nachweisen. Im Vergleich zu OTA ist eine OTB-Kontamination sehr selten. [WHO, 1990]

Dabei ist die Kontamination klimaabhängig. So sind *Aspergillus*-Spezies eher in wärmeren Regionen zu finden, während *Penicillium* in kälteren Regionen auftritt. Jahrelang nahm man an, dass es nur eine *Penicillium*-Spezies gäbe, die OTA produziert, nämlich *P. viridicatum*. Diese Spezies wurde später richtigerweise als *P. verrucosum* identifiziert. Heutzutage weiß man, dass es neben *P. verrucosum* noch eine weitere OTA produzierende *Penicillium* Spezies gibt – *P. nordicum*. Die Spezies sind oft nur schwer voneinander zu unterscheiden und benötigen molekulare Methoden zur Identifikation, wodurch es in der Vergangenheit zur fehlerhaften Erkennung kam [Cabañes et al. 2010]. Laut Pitt produziert *P. verrucosum* OTA fast ausschließlich in den gemäßigten Zonen, wo es vor allem in Weizen und Gerste, aber auch in Fleischprodukten nachgewiesen werden kann [Pitt, 1987]. Auf der anderen Hand produziert *A. carbonarius* OTA in Trauben und Wein, *A. ochraceus* bildet das Mykotoxin in Kaffeebohnen [Bayman; aus: Pitt, J. I. 2000]. Daneben existieren noch weitere Spezies, wie z.B. *A. steynii*, die Kaffeebohnen kontaminieren und nachweislich OTA produzieren [Gil-Serna et al. 2014]. Die meisten der OTA-produzierenden *Aspergillus*-Spezies sind einer der folgenden zwei Sektionen zuzuordnen: Sektion *Circumdati* (*A. ochraceus* Gruppe) (*A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. auricomus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum* und *A. sulfureus*) und Sektion *Nigri* (*A. niger* und *A. carbonarius*) [Wang et al. 2016; Bayman et al. 2002].

Die optimale Temperatur für die OTA-Produktion variiert von Spezies zu Spezies. So liegt sie bei *A. ochraceus* etwa zwischen 25°C und 30°C, während ein griechischer *A. carbonarius*-Stamm eher Temperaturen von 30°C bis 35°C bevorzugt [Paterson und Lima, 2011]. Optimal für die OTA-Produktion ist aber auch eine Wasseraktivität von 0.90 – 0.98 a_w , wobei sie auch schon ab $<0.85 a_w$ stattfinden kann. Der Pilz selbst kann sogar unter dem Wert von 0.80 a_w noch wachsen. Die Produktion von OTA ist bei so geringer Wasseraktivität allerdings nicht mehr möglich. Ab Werten unter 0.76-0.78 a_w findet auch kein Pilzwachstum mehr statt. [Paterson und Lima, 2011; Paterson et al. 2014].

Bei Ihren Untersuchungen der Produktion von OTA durch diverse *Aspergillus* und *Penicillium* Spezies in Feigen in Kalifornien im Jahr 2001 konnten Bayman et al. in 57% aller Proben *A. ochraceus* nachweisen. Jedoch produzierte keines der *A. ochraceus* Isolate OTA über der Detektionsgrenze von 0.01 µg/ml. Überraschenderweise korrelierte die Konzentration an OTA mit dem Vorhandensein von *A. alliaceus*. [Bayman et al. 2002]. Bereits 1996 publizierte Varga et al. eine Studie, in der verschiedene *Aspergillus*-Stämme auf ihre OTA-Produktion untersucht wurden. In dieser konnte eine OTA-Produktion in 9 von 27 *A. ochraceus*-Stämmen und in einem von fünf *A. alliaceus*-Stämmen nachgewiesen werden. [Varga et al. 1996]. Zudem gibt es diverse Studien, wonach auch eine Vielzahl anderer *Aspergillus*-Spezies OTA produzieren, darunter *A. wentii*, *A. auricomus*, *A. versicolor*, *A. sclerotioniger*, *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. westerdijkiae*, *A. fumigatus*, *A. Neopetromyces muricatus* und *A. sepultus* [Varga et al. 1996; Wang et al. 2016; Frisvad et al. 2004; Bayman et al. 2002; Rizzo et al. 2002].

Obgleich eine hohe Anzahl an Pilzspezies zur OTA-Produktion fähig ist, so werden Lebensmittel meist nur von einigen wenigen Spezies kontaminiert. *A. ochraceus* und *P. verrucosum* etwa finden sich häufig in trocken gelagerten Lebensmitteln und Zerealien, *A. niger* und *A. carbonarius* dagegen in Wein, Weintrauben und Rosinen, *A. westerdijkiae*, *A. steynii* und *A. ochraceus* sind vielfach für die Kontamination von Kaffeebohnen verantwortlich [Noonim et al. 2008].

Abhängig von Klima und Region werden die Lebensmittel von verschiedenen Spezies befallen, so haben z.B. Martins et al. bei der Untersuchung von 60 Kaffeebohnenproben aus Brasilien, in 83.3% aller Proben *A. niger*, in 53.3% *A. ochraceus* und in 25.0% *A. flavus* vorgefunden. Interessant war auch, dass insgesamt 91.7% aller Proben von mindestens einem Pilz befallen waren [Martins et al. 2003].

5. Ökophysiologische Faktoren und deren Einfluss auf die Ochratoxin A-Produktion

Da man befallene Lebensmittel nicht mehr von einem Toxin „säubern“ kann, hat die Prävention einer Mykotoxin-Kontaminierung an Bedeutung gewonnen. Es werden Vorgehensweisen des Hazard Analysis Critical Control Point-Konzepts (HACCP) entwickelt, um die entscheidenden Punkte, an welchen Mykotoxine in die Nahrungskette gelangen, zu identifizieren und in der Folge einer Kontamination entsprechend vorzubeugen. Vorhersagemodelle zur Pilzproliferation, Sporenausbreitung und zum sichtbaren Schimmelwachstum können genutzt werden, um die optimalen Lagerbedingungen zu bestimmen. [Astoreca et al. 2007]

Zusätzlich gilt es umweltbedingte Faktoren wie Temperatur und Wasseraktivität zu kontrollieren und herauszufinden, welche Bedingungen das Pilzwachstum und die Toxinproduktion fördern.[Astoreca et al. 2007]

Astoreca et al. haben hierzu eine Studie durchgeführt, in der sie die Wachstumsbedingungen von sechs verschiedenen *A. niger* und zwei *A. carbonarius* Stämmen untersuchten. Zu diesem Zweck wurden zunächst jeweils zwei Stämme aus Erdnussamen, Kaffeebohnen, Mais (*A. niger*) und getrockneten Weintrauben (*A. carbonarius*) isoliert. In weiterer Folge sollten die Effekte von Wasseraktivität (Bereich von 0.85-0.995), Temperatur (15, 25, 30°C) und Inkubationszeit (7, 14 bzw. 21 Tage) beobachtet werden. Astoreca et al. verzeichneten bei einer Wasseraktivität von nur 0.85–0.91 a_w keine signifikante OTA-Produktion. Der optimale Wert lag hier bei etwa 0,97-0,99 a_w . Die Temperatur spielte dagegen eine wesentlich geringere Rolle,

sowohl bei 15°C als auch bei 25°C und 30°C konnte eine OTA-Produktion nachgewiesen werden. Ein allgemeines speziesübergreifendes Optimum konnte hier nicht festgestellt werden, da jeder Stamm eine bestimmte Temperatur bevorzugt. Zusätzlich vermochten Astoreca et al. Die Produktion von OTA bereits nach 7 Tagen Inkubationszeit nachzuweisen. Diese erreichte ihr Maximum nach 14 Tagen und nahm nach 21 Tagen sogar bereits ab. Die Abnahme führten Astoreca et al. Darauf zurück, dass die Stämme bei Erschöpfung die funktionelle Phenylalanin Gruppe wieder entfernen, oder die Produktion aufgrund von mangelnden Nährstoffen im Medium gestoppt wurde. Durch die Studie gelang es dem Forscherteam aufzuzeigen, dass der größte Faktor bei der OTA-Produktion die Wasseraktivität und weniger die Temperatur oder die Inkubationszeit ist. [Astoreca et al. 2007]

6. Gesetzliche Regelungen in Nahrungs- und Futtermitteln

6.1 Europäische Maßnahmen

Auf europäischer Ebene reichen gesetzliche Maßnahmen zum Zwecke der Eindämmung und Kontrolle der Mykotoxinkontamination lang zurück. Auf der Suche nach einschlägigen Rechtsakten auf europäischer Ebene stößt man schnell auf einen schier unendlichen Dschungel an Verordnungen, Richtlinien und – für die Mitgliedstaaten rechtlich nicht verbindlichen – Empfehlungen und Stellungnahmen. Für die Zwecke dieser Arbeit sei innerhalb dieser großen Spannbreite an Maßnahmen nun in aller Kürze auf die wichtigsten legislativen Schritte auf Gemeinschafts- bzw Unionsebene eingegangen.

6.1.1 Verordnung (EWG) 315/93

„Kontaminanten können auf jeder Stufe von der Herstellung bis zum Verbrauch in die Lebensmittel gelangen. Für den Schutz der öffentlichen Gesundheit ist es erforderlich, diese Kontaminanten in toxikologisch

vertretbaren Grenzen zu halten. In allen Fällen, in denen durch die gute Fachpraxis noch niedrigere Werte erreicht werden können, sind diese neuen Werte zu beachten.“ So heißt es in den Erwägungsgründen der Verordnung (EWG) Nr. 315/93 vom 8. Februar 1993 zur Festlegung von gemeinschaftlichen Verfahren zur Kontrolle von Kontaminanten in Lebensmitteln. Art 1 Abs 1 definiert sodann den Begriff „Kontaminant“ als „Stoff, der dem Lebensmittel nicht absichtlich hinzugefügt wird, jedoch als Rückstand der Gewinnung (einschließlich der Behandlungsmethoden in Ackerbau, Viehzucht und Veterinärmedizin), Fertigung, Verarbeitung, Zubereitung, Behandlung, Aufmachung, Verpackung, Beförderung oder Lagerung des betreffenden Lebensmittels oder infolge einer Verunreinigung durch die Umwelt im Lebensmittel vorhanden ist.“

Konkrete Höchstmengen sind in der Verordnung selbst ebenso wenig aufgezählt wie jene Stoffe, die als „Kontaminant“ im Sinne von Art 1 gelten sollen. Art 2 Abs 3 kündigt jedoch die Festlegung von Höchstwerten für bestimmte Kontaminanten in Form einer nicht erschöpfenden Gemeinschaftsliste insofern an, als dies erforderlich ist, um das Inverkehrbringen von gesundheitsschädigenden Lebensmitteln zu vermeiden.

6.1.2 Verordnung (EG) 1881/2006

Gestützt auf die obige EWG-Verordnung wurde im Rahmen der Europäischen Gemeinschaft einige Jahre später die Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln erlassen. (Auf die Vorgänger dieser Verordnung ist mangels Relevanz und zum Zwecke besserer Übersichtlichkeit an dieser Stelle nicht eigens einzugehen.)

Gemäß Art 1 der Verordnung dürfen die in ihrem Anhang aufgezählten Lebensmittel nicht in den Verkehr gebracht werden, wenn sie einen der dort gelisteten Kontaminanten in einer Menge enthalten, die die festgelegte Höchstmenge überschreitet. Abschnitt 2 des Anhangs, der sich den

Mykotoxinen widmet, legt unter Punkt 2.1 zunächst Höchstgrenzen für Aflatoxine in diversen Lebensmitteln fest. Unter Punkt 2.2 folgen sodann die entsprechenden Höchstgehalte für Ochratoxin A.

Erzeugnis	Höchstgehalt (µg/kg)
Unverarbeitetes Getreide	5.0
Aus unverarbeitetem Getreide gewonnene Erzeugnisse, einschließlich verarbeitete Getreideerzeugnisse und zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmtes Getreide	3.0
Getrocknete Weintrauben (Korinthen, Rosinen und Sultaninen)	10.0
Geröstete Kaffeebohnen sowie gemahlener gerösteter Kaffee außer löslicher Kaffee	5.0
Löslicher Kaffee (Instant-Kaffee)	10.0
Wein (einschließlich Schaumwein, ausgenommen Likörwein und Wein mit einem Alkoholgehalt von mindestens 15 Vol.-%) und Fruchtwein	2.0
Aromatisierter Wein, aromatisierte weinhaltige Getränke und aromatisierte weinhaltige Cocktails	2.0
Traubensaft, rekonstituiertes Traubensaftkonzentrat, Traubennektar, zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmter Traubenmost und zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmtes rekonstituiertes Traubenmostkonzentrat	2.0
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	0.50

Diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die eigens für Säuglinge bestimmt sind	0.50
Gewürze, inkl. getrocknete Gewürze: Piper spp. (Früchte, einschließlich weißer und schwarzer Pfeffer), Myristica fragrans (Muskat), Zingiber officinale (Ingwer), Curcuma longa (Gelbwurz) Capsicum spp. (getrocknete Früchte, ganz oder gemahlen, einschließlich Chili, Chilipulver, Cayennepfeffer und Paprika) Gewürzmischungen, die eine der oben genannten Gewürzsorten enthalten	15.0
Süßholz (Glycyrrhiza glabra, Glycyrrhiza inflata und andere Sorten), Süßholzwurzel, Zutat für Kräutertees	20.0
Süßholzextrakt, zur Verwendung in Lebensmitteln, in bestimmten Getränken und Zuckerwaren	80.0
Weizengluten, das nicht unmittelbar an die Verbraucher verkauft wird	8.0

Tabelle 1: VERORDNUNG (EG) Nr. 1881/2006 DER KOMMISSION, vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln, AGES Überblick über österreichrelevante Mykotoxin – Höchst - und Richtwerte (01.7.2017)

Die Verordnung greift in Erwägungsgrund 4 das ALARA-Prinzip („as low as reasonably achievable“) bzw Minimierungsgebot auf, das bereits in Art 2 Abs 2 der Verordnung (EG) Nr. 315/1993 seinen Niederschlag fand. Danach sollen Werte so festgelegt werden, wie bei guter Praxis vernünftigerweise erreichbar.

(https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/chemie/schimmelpilzgifte/et_hoechst_mengen_mykotoxine.htm)

Die nach wie vor geltende Verordnung, die ihrer Rechtsnatur entsprechend in den Mitgliedstaaten, mithin auch in Österreich, unmittelbar wirkt, wurde seit

ihrem Inkrafttreten nahezu 30-mal geändert. Da keine der Novellen die OTA-Höchstwerte für Kaffee zum Gegenstand hatten, sondern überwiegend jene für Gewürze (wie etwa auch Muskat, Ingwer und Kurkuma) sowie für Süßholz, kann eine nähere Auseinandersetzung mit den genannten Verordnungen an dieser Stelle unterbleiben.[Verordnung (EG) Nr. 1881/2006]

Die heute geltende OTA-Höchstmenge für Kaffee, wie sie in Tabelle 1 abgebildet ist, entspricht indes den Vorgaben der Stammfassung der VO aus 2006. Grundlage für die hier festgelegten Höchstgehalte ist ein Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums der EFSA für Kontaminanten in der Lebensmittelkette bezüglich Ochratoxin A in Lebensmitteln, das auf Ersuchen der Kommission am 4. April 2006 erstattet wurde.

Die EFSA leitete im Rahmen dieses Gutachten unter Berücksichtigung aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse eine tolerierbare wöchentliche OTA-Aufnahme (TWI) von 120 ng/kg Körpergewicht ab und ließ hier zudem erkennen, dass neben Getreide, Getreideerzeugnissen, Weintrauben und anderen Lebensmitteln, auch Röstkaffee in erheblichem Umfang zur allgemeinen Exposition des Menschen gegenüber Ochratoxin A beiträgt.

Bei Durchsicht der Tabelle fällt auf, dass für grünen Kaffee kein Höchstwert vorgesehen ist. Zwar wurde die Notwendigkeit der Festlegung eines diesbezüglichen Höchstgehaltes – wie Erwägungsgrund 24 zu entnehmen ist – auf Basis der Stellungnahme der EFSA aus 2006 ursprünglich in Erwägung gezogen, jedoch sieht der Anhang der Verordnung bis heute keinen solchen vor. Die Kommission nahm auf diese vermeintliche Regelungslücke in Erwägungsgrund 5 zur Verordnung (EU) Nr. 105/2010 vom 5. Februar 2010 Bezug, wo es heißt: „ [...] Grüner Kaffee und Bier werden bereits auf einer anderen, geeigneteren Stufe des Produktionsprozesses (nämlich bei geröstetem Kaffee bzw. Malz) auf OTA überwacht. [Verordnung (EU) Nr. 105/2010]

Zu bemerken ist, dass sich die im Anhang festgelegten Werte gemäß Art 1 Abs 2 der Verordnung prinzipiell nur auf die essbaren Anteile der Lebensmittel beziehen, wobei der Anhang selbst auch Ausnahmen von

dieser Regel vorsieht. Zuweilen sind die Grenzwerte auf die Trockenmasse oder das fertig zubereitete Erzeugnis zu beziehen. Hingewiesen sei auch auf das Verbot der Verwendung, Vermischung und Entgiftung gemäß Art 3, wonach Lebensmittel, die die festgelegten Kontaminationsgrenzmengen überschreiten, weder als Lebensmittelzutat verwendet (Abs 1), noch mit verkehrsfähigen Lebensmitteln gemischt werden dürfen (Abs 2). Schließlich dürfen Lebensmittel, die Mykotoxine enthalten, darunter auch mit Ochratoxin A kontaminierte geröstete Kaffeebohnen sowie kontaminierter gemahlener gerösteter Kaffee und Löscaffee, nicht durch chemische Behandlung entgiftet werden.

(https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/chemie/schimmelpilzgifte/et_hoehchst_mengen_mykotoxine.htm)

6.1.3 Einfuhrkontrollen für bestimmte Erzeugnisse aus Drittstaaten

Der Vollständigkeit halber sei darauf hingewiesen, dass die europäische Rechtsordnung auch verstärkte amtliche Kontrollen für die Einfuhr von Futtermitteln und Lebensmitteln nicht tierischen Ursprungs in die EU vorsieht. Soweit ersichtlich besteht diesbezüglich derzeit jedoch keine einschlägige Bestimmung für die Einfuhr von Kaffee aus Drittstaaten.

6.1.4 Tierernährung und Futtermittel

Zusätzlich gibt es die Richtlinie 2002/32/EG des europäischen Parlaments und Rates über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung. Die in der Richtlinie enthaltenen Mykotoxin-Höchstgehalte beziehen sich jedoch lediglich auf Aflatoxin B1 und das Mutterkorn. Hinsichtlich OTA gibt es nur eine Empfehlung der Kommission vom 17.08.2006:

Produkt	Richtwert in mg/kg Futtermittel mit 12% Wassergehalt
Einzelfuttermittel:	
-Getreide und Getreideprodukte	0.25
Mischfuttermittel für	
- Schweine	0.05
- Geflügel	0.1
- Katzen und Hunde	0.01

**Tabelle 2: AGES Überblick über österreichrelevante Mykotoxin – Höchst - und Richtwerte
(Stand 1.3.2017)**

6.2 Nationale Vorgaben

Obwohl einzelne Mitgliedsstaaten eigene Höchstmengen für Kaffee, Trockenfrüchte und Bier festlegen können, sind diese in Österreich mit der EU-Verordnung identisch (siehe Tabelle 1)

7. Extraktionstechniken

Für die im Zuge dieser Arbeit noch zu erörternde Studie wurde die einfache Methode der Extraktion von OTA aus Kaffeebohnen mittels Methanol gewählt mit anschließendem clean-up und Anreicherung in Immunoaffinitätssäulen gewählt. An dieser Stelle sei jedoch noch kurz auf alternative Extraktionsmöglichkeiten eingegangen um einen kurzen Überblick über deren Vor- und Nachteile zu verschaffen.

7.1 Ultraschall-Extraktion

Die Wirkung der Ultraschall-Extraktion basiert auf dem Phänomen der Kavitation. Hochfrequente Schallwellen, die sich in einer Flüssigkeit ausbreiten, erzeugen abwechselnd Hochdruck- und Niederdruckzyklen. Während eines Niederdruckzyklus werden Kavitationsblasen im Medium gebildet, welche über mehrere Zyklen wachsen bis Sie keine zusätzliche Energie mehr aufnehmen können und unter Ausbildung hoher Temperaturen (ca. 5000°K) und hohen Drucks (ca. 2000 atm) implodieren. In Folge der Implosionen können heterogene Flüssigkeiten emulgieren und Feststoffe in Flüssigkeiten dispergiert werden. Diese Methode ist kostengünstig und einfach. Die Vorteile der Ultraschall-Extraktion sind eine Steigerung der Extraktionsausbeute sowie die Verkürzung der Extraktionsdauer. [Cammann, 2001; Reinsch, 2006; <https://www.hielscher.com/de/ultrasonic-extraction-of-caffeine-and-other-active-compounds.htm>]

7.2 Beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE)

Die Beschleunigte Lösemittlextraktion (Accelerated Solvent Extraction, ASE) ist eine Technik zur Extraktion von festen und viskosen Proben. Dabei wird ein gebräuchliches Lösungsmittel bei erhöhter Temperatur (bis 200°C) und konstantem Druck (bis 20 MPa) verwendet. Durch diese Kombination sind schnelle und einfache Extraktionen möglich. Der automatische Ablauf erhöht die Produktivität und senkt den Lösungsmittelverbrauch. Eine Anwendung für nicht thermostabile Verbindungen ist jedoch aufgrund der erhöhten Temperatur nicht möglich (M. H. Gey, 2008; <http://www.analytica-world.com/de/produkte/127465/solventextraktion-accelerated-solvent-extraction-ase-dionex.html>)

7.3 Festphasenextraktion (SPE)

Die SPE (solid phase extraction) ist ein physikalischer Extraktionsprozess, der zwischen einer flüssigen und festen Phase stattfindet. Hierbei wird die

Probenlösung in ein Röhrchen mit einem Filter (Festphase) übergeführt. Der Analyt lagert sich im Filter ab während das Lösungsmittel diesen ungehindert passiert. Anschließend werden die für die Analyse ungewünschten Verbindungen rausgewaschen. Im letzten Schritt wird der Analyt aus dem Filter eluiert und das Eluat kann analysiert werden (siehe Abb. 4) [N.J.K. Simpson, 1998].

Mit Hilfe dieser Technik lassen sich Analyten leicht anreichern. Ein Nachteil ist jedoch, dass auch andere Matrixkomponenten, welche die gleiche Affinität zur Festphase besitzen, angereichert werden können [Reinsch, 2006].

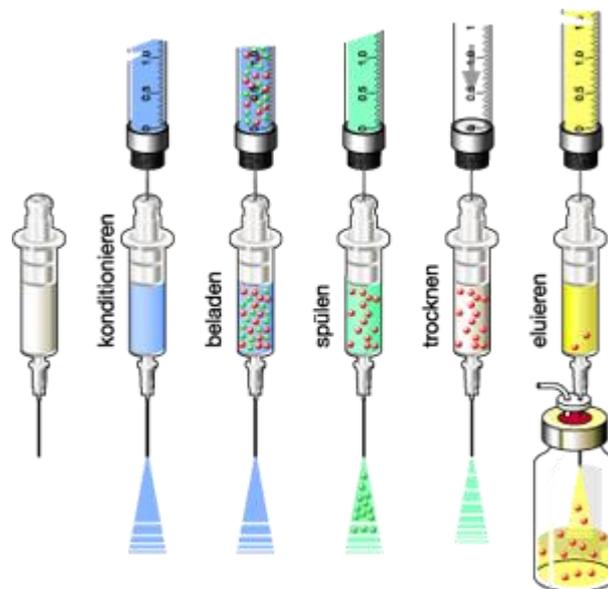


Abbildung 4: Schritte einer Festphasenextraktion (SPE). © Fa. Gerstel [Dr. Oliver Lerch, GERSTEL GmbH & Co. KG, GERSTEL Aktuell – Dezember 2012]

7.4 Extraktion und clean-up mit Immunoaffinitätssäulen

Mit Hilfe des clean-ups mit Immunoaffinitätssäulen lassen sich Analyten aus komplexen Matrizen anreichern. Die Funktionsweise basiert auf dem Prinzip der Immunoaffinität. Im Bettmaterial der Säulen befinden sich monoklonale Antikörper, die spezifisch gegen bestimmte Antigene gerichtet sind. Beim Auftragen der Probe wird der Analyt an den Antikörper gebunden und somit

aus der Probenlösung entfernt, während der Rest der Lösung in den Abfall gelangt. Beim Waschschrift mit einer alkoholischen Desorptionlösung denaturieren die Antikörper und der Analyt wird wieder frei. Im Anschluss kann dieser mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt werden. Auf diese Weise können z.B. Mykotoxine aus dem Lebensmittel isoliert werden [Zhao et al. 2003; <http://www.lctech.de/produkte/immunoaffinitaets-und-clean-up-saeulen/ochratoxin-a/otaclean.html>]

Jedoch sind Immunoaffinitätsäulen gerade durch Ihre hohe Spezifität in Ihrer Anwendung begrenzt. Die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Toxine ist bei dieser Extraktionstechnik schwierig. Durch Kreuzreaktivitäten kann es auch zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Hinzu kommt, dass die Säulen relativ kostenintensiv sind und nicht wiederverwendet werden können. [Koch et al. 1996, Reinsch, 2006].

8. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie **(HPLC)**

Die Chromatographie ist ein physikalisches Stofftrennungsverfahren, bei dem eine Stofftrennung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase erfolgt.

Innerhalb der Chromatographie bildet die Flüssigchromatographie jenes Spezialgebiet bei welchem eine Flüssigkeit als mobile Phase und ein Feststoff oder eine Flüssigkeit als stationäre Phase dienen. Dazu zählen die Dünnschicht-, Papier- und Säulenchromatographie.

Für diese Arbeit wurde ausschließlich die Reverse-phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) angewendet. Dabei handelt es sich um die in der Praxis die gängigste Methode, wobei eine unpolare stationäre Phase verwendet wird und die Elutionskraft sinkt mit steigender Polarität. Das Aufbau- und Funktionsschema einer HPLC-Anlage ist in Abbildung 5 dargestellt. Die theoretische Funktionsweise der HPLC,

sowie die Trennmechanismen und Säulenmaterialien werden an dieser Stelle nicht näher erläutert [Georg Schwedt, 1986; Aced und Möckel, 1991].

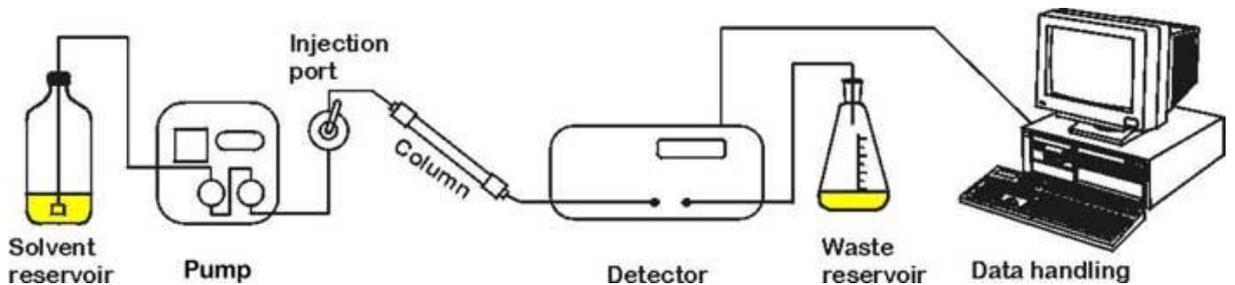


Abbildung 5: Schema einer HPLC-Anlage (http://lac.chem.polimi.it/analisi_hplc.php)

9. Detektionstechniken

Es gibt verschiedene Arten von Detektoren, die bei der HPLC zur Anwendung kommen:

- Ultraviolett/Visible-Detektor (UV/VIS)
- Brechungsindex-Detektor (RI)
- Elektrochemischer-Detektor (ECD)
- Dioden-Array-Detektor (DAD)
- Fluoreszenzdetektor (FLD)

Ein Detektor wird nach der Säule angebracht. Dieser misst sodann Änderungen einer chemischen oder physikalischen Eigenschaft in der mobilen Phase und sendet sie als elektrisches Signal an eine Auswertungseinheit [Reinsch, 2006].

9.2 Fluoreszenzdetektor (FLD)

Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften von OTA ist der zur OTA-Bestimmung am besten geeignete Detektor der Fluoreszenzdetektor. Er ist daher auch der einzige, der in dieser Arbeit näher beschrieben werden soll.

FLD können bis zu 1000-mal sensitiver als der UV/VIS-Detektor arbeiten. Wie der Name schon verrät, erfassen FLD Verbindungen, die fluoreszieren, oder von welchen fluoreszierende Derivate hergestellt werden können. Zu diesem Zweck wird die Probe in der Durchflussmesszelle mit UV-Strahlung bestrahlt. Das daraufhin emittierte Licht wird senkrecht zur Einstrahlungsquelle gemessen. Ist kein Fluorophor in der Probe vorhanden, ist das Hintergrundsignal gleich null.

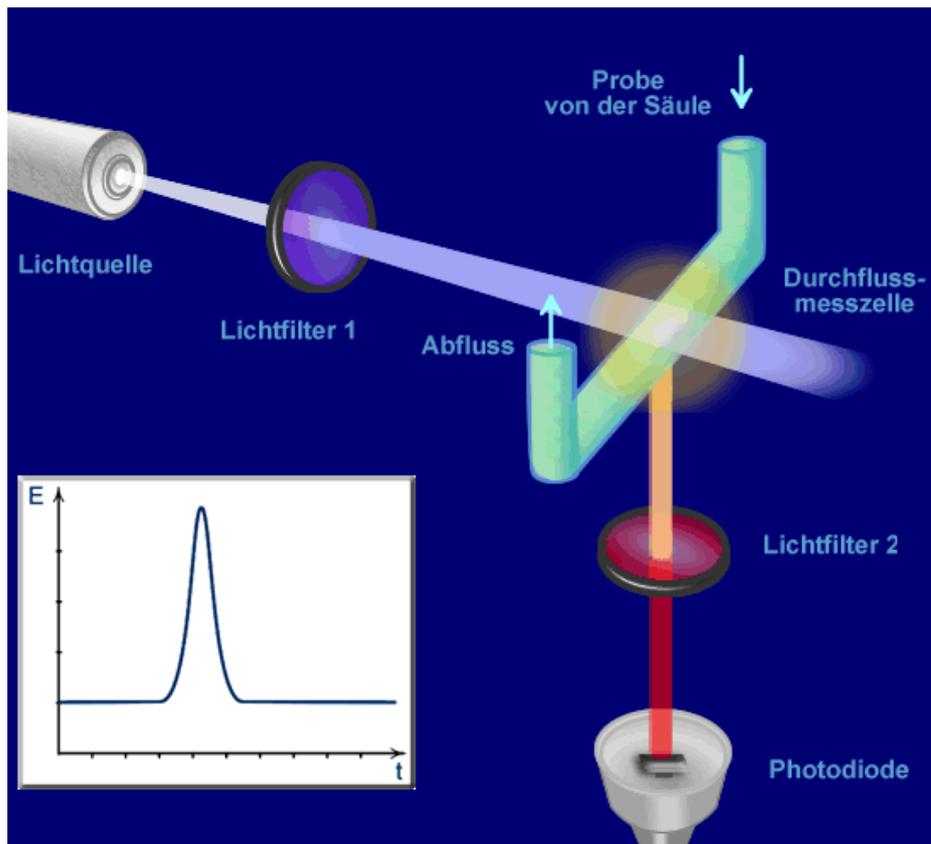


Abbildung 6: Prinzip des Fluoreszenzdetektors

(<http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/detektoren/fluoresz/fluoreszenz1gr1102.gif>)

Mit FLD nachweisbare Verbindungen sind hauptsächlich konjugierte cyclische Verbindungen, wobei bestimmte Substituenten am Aromaten, wie -COOH, -NO₂ und SH-Gruppen, zu einer Fluoreszenzlöschung führen können (Quenching). Quenching kann jedoch auch durch die Verwendung eines ungeeigneten Lösungsmittels, durch die Zufuhr von Sauerstoff oder unerwünschte Begleitstoffe sowie durch zu hohe Temperaturen verursacht werden. [J.W. Dolan, 2016; <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/>

10. OTA in Kaffee

Bei OTA handelt es sich um eine sehr stabile Verbindung, die bei der haushaltsüblichen Zubereitung sowie beim Kaffeerösten nicht zerstört wird. Der Befall mit Schimmelpilzen und die damit verbundene OTA-Kontamination kann bereits auf dem Feld erfolgen, findet jedoch meist während der Lagerung statt. Durch carry-over ist auch eine Kontamination von tierischen Erzeugnissen möglich.[Krogh et al. 1974

Im Gegensatz zu Aflatoxinen, die insbesondere in Produkten aus subtropischen und tropischen Klimazonen nachzuweisen sind, tritt OTA auch in gemäßigten Klimazonen auf. In der Stellungnahme der EFSA von 2006 wird von einer täglichen OTA-Gesamtaufnahme von 2-3 ng/kg KG ausgegangen. Die durchschnittliche OTA-Belastung von geröstetem Kaffee liegt bei 0.72 µg/kg, von Getreide bei 0.29 µg/kg und von Bier und Wein bei 0.03 µg/kg. Werden den durchschnittlichen Belastungswerten verschiedener Lebensmittel die üblichen Verzehrsmengen zugrunde gelegt, so ergibt sich für den Verbraucher eine wöchentliche OTA-Aufnahme von 15-20 ng/kg KG. Bei hohem Konsum können sogar Werte von 40-60 ng/kg KG erreicht werden [EFSA, 2006]. Die EFSA hat aufgrund dieser Werte eine tolerierbare wöchentliche Aufnahme (TWI) von 120 ng/kg KG bzw. eine tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI) von 17 ng/kg KG für OTA festgelegt. Als Grundlage für die Berechnung der Werte diente eine von Krogh et al. durchgeführte Studie. Untersucht wurden dabei die nephrotoxischen Auswirkungen von OTA an Säuen. Die OTA-Dosen in Höhe von 0, 8, 40 und 160 µg OTA/kg KG/Tag wurden über einen Zeitraum von 90 Tagen verabreicht. Der LOAEL (lowest-observed-adverse-effect-level) betrug hierbei 8 µg OTA/kg KG/Tag. Für die Extrapolation von Mensch zu Tier wurde ein Unsicherheitsfaktor von 450 verwendet. [EFSA, 2006; Krogh et al. 1974; Kuiper-Goodman et al. 2010]

10.1 Der Effekt unterschiedlicher Zubereitungsmethoden

Im Jahre 2011 führten Santini et al. eine Studie durch, im Zuge derer sie die Auswirkungen der unterschiedlichen Zubereitungsmethoden von Kaffee auf dessen OTA-Gehalt untersuchten. Bei den ausgewählten Methoden handelte es sich durchwegs um gängige und traditionelle Formen der Zubereitung, die weltweit Anwendung finden. Für die Untersuchungen wurde ein mit 2 µg OTA/l bzw. 4 µg OTA/l angereichertes Kaffeepulver verwendet, das wie folgt weiterverarbeitet wurde:

- Amerikanischer Kaffee

Für die Zubereitung des amerikanischen Kaffees wurde ein Filter mit 10 g des kontaminierten Kaffeepulvers befüllt und dieses anschließend mit 320 ml heißem Wasser aufgegossen. Das Wasser sickerte langsam durch den Filter in einen Behälter und wurde anschließend analysiert.

- Türkischer Kaffee

Für die Zubereitung des Türkischen Kaffees wird ein sogenannter Ibrik, ein üblicherweise aus Kupfer oder Messing bestehendes Gefäß mit langem Griff, verwendet. Als Grundzutat dienten auch hier 10 g des kontaminierten Kaffeepulvers, welches in 100 ml Wasser getaucht wurde. Das Wasser wurde zunächst langsam auf 100°C erhitzt. Nachdem 5 ml kaltes Wasser hinzugefügt worden waren, wurde dieser Erhitzungsprozess wiederholt. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Vorgangs diente der obere Teil des Gemischs der Analyse.

- Neapolitanischer Kaffee

Auch zur Herstellung dieses Kaffees wird eine spezielle aus zwei Behältern bestehende Kanne herangezogen. Die Zubereitungsart ähnelt jener des amerikanischen Kaffees, wobei letztere mehr Wasser erfordert. Beim neapolitanischen Kaffee erhitzten Santini et al. daher nur 50 ml Wasser in der Kanne. Kocht dieses Wasser erst, wird die Kanne auf den Kopf gestellt, wobei die Flüssigkeit durch das Kaffeepulver und einen metallischen Filter läuft und in den zweiten Behälter der Kanne gelangt.

- Moka

Die zur Zubereitung benötigte Mokakanne wird oft irreführend auch als Espressokanne bezeichnet obwohl sich mit ihr kein Espresso zubereiten lässt. Der in der Kanne erzeugte Druck ist nicht ausreichend für die Herstellung eines echten Espressos. Die Mokakanne wird vor allem in Italien verwendet und besteht aus einem Kessel, einem metallischen Filter und einem Kannenoberteil, welches als Kühler dient. Das kochende Wasser wird durch den in der Kanne entstandenen Druck über den Filter und somit das Kaffeepulver in den Kühler gedrückt, wo der Kaffee sich sammelt. Für die Zubereitung wurden 10 g Kaffeepulver und 50 ml Wasser verwendet.

- Espresso

Für die Herstellung eines Espresso wird eine Espressomaschine benötigt, in welcher heißes Wasser bei einem Druck von ca. 9 bar durch feines Kaffeepulver – hier wiederum 10 g kontaminiertes Pulver – gepresst wird. Die Durchlaufzeit beträgt dabei ca. 25 Sekunden.

Santini et al. extrahierten das OTA unter Verwendung von Ochraprep® Immunoaffinitätssäulen. Die Messung wurde mithilfe einer HPLC-Anlage und einem Fluoreszenzdetektor durchgeführt.

Die Studie ergab, dass durch die neapolitanische Methode am wenigsten OTA aus dem Kaffepulver extrahiert wurde, nämlich 46.5% bzw 40,7% in den Proben mit 2 µg OTA/l bzw. 4 µg OTA/l. Im amerikanischen Kaffee wurde wiederum die höchste Menge an OTA gefunden – 81.0% bzw 70.0%. Santini et al. schlossen aus ihren Untersuchungsergebnissen, dass die Zubereitungsart keinen Einfluss auf den Transfer von OTA aus dem Pulver zum Fertiggkaffee hat. Begründend führten sie aus, dass aus keiner der angereicherten Proben mehr als 81% des OTA extrahiert wurden [Santini et al. 2011]. Bei näherer Betrachtung der Zahlen mutet diese Erklärung mE jedoch unbefriedigend an. Abbildung 7 lässt erkennen, dass es, insbesondere bei Vergleich der napolitanischen oder türkischen Methode mit dem amerikanischen Filterkaffee, mitunter erhebliche Unterschiede in der Extraktion von OTA gab.

Coffee drink	Ochratoxin A (2 µg/L)	RSD%	Ochratoxin A (4 µg/L)	RSD%
(A)				
Moka	120 ± 6.1	5.1	203 ± 15.1	7.4
Neapolitan	93 ± 5.1	5.5	163 ± 12.3	7.5
Turkish	99 ± 5.9	5.9	168 ± 16.1	9.5
Espresso	145 ± 9.8	6.7	242 ± 21.3	8.8
American	162 ± 7.8	4.8	280 ± 27.9	9.9
(B)				
Moka	115 ± 7.4	6.4	218 ± 9.6	4.4
Neapolitan	96 ± 6.2	6.4	171 ± 14.8	8.6
Turkish	101 ± 6.9	6.8	165 ± 11.2	6.8
Espresso	152 ± 8.4	5.5	238 ± 17.3	7.3
American	168 ± 8.8	5.2	287 ± 21.2	7.4

Abbildung 7: OTA-Gehalt der mit 2 µg OTA/l bzw. 4 µg OTA/l angereicherten Proben [Santini et al.]

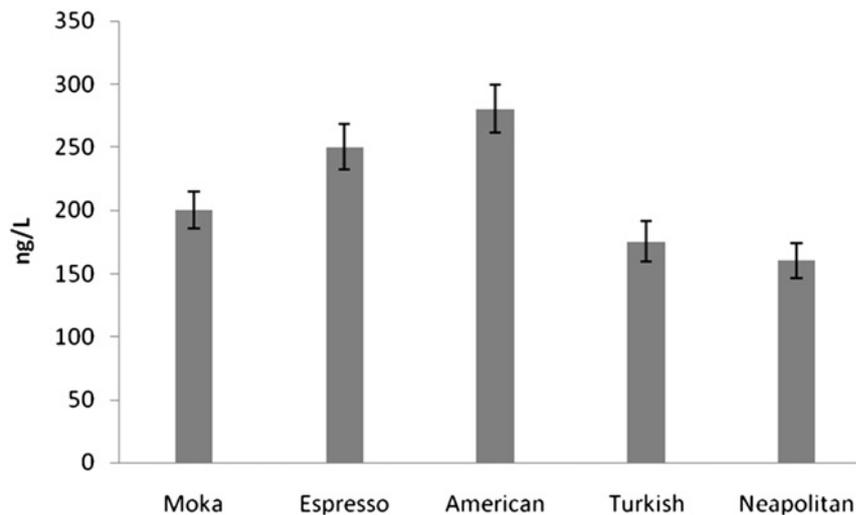


Abbildung 8: OTA-Konzentration (ng/L) in den fünf verschiedenen mit 4 µg OTA/l versetzten Kaffeeproben (Santini et al.)

Eine ähnliche Untersuchung wurde von Pérez de Obanos et al. durchgeführt. Hierbei wurden jedoch nur drei Zubereitungsarten untersucht: Espresso, Moka und „auto-drip“ (amerikanischer Kaffee). Auch im Zuge dieser Studie konnten man eine Reduktion des OTA-Gehaltes beobachten. Beim Espresso war jedoch gegenüber den anderen beiden Zubereitungsarten eine deutlich höhere Reduktion des OTA, nämlich um 49.8%, zu verzeichnen. Bei Moka betrug sie dagegen lediglich 32,1%, bei amerikanischem Kaffee nur 14,5 %. Hinsichtlich des letzten Ergebnisses erzielten die Forscher damit eine Übereinstimmung mit einer von Leoni et al. durchgeführten Studie aus dem Jahre 2000, im Zuge derer eine Extraktion von 86% des OTA aus dem Kaffeepulver in den Kaffee gemessen wurde, wobei die Zubereitungsart jener des amerikanischen Kaffees entsprach [Leoni et al. 2000].

Zu beachten ist freilich auch, dass trotz der von Perez de Obanos et al. festgestellten stärkeren OTA-Reduktion im Espresso, dessen OTA-Konzentration infolge der bei der Zubereitung geringeren Wassermenge dennoch die höchste war. [Pérez de Obanos et al.]

10.2 Instantkaffee und Kaffeeersatz

Nachdem fast 50% der weltweiten Kaffeeproduktion zu Instantkaffee verarbeitet wird, stellt sich auch die Frage nach der OTA-Belastung solcher Produkte [Mussatto et al. 2011]. Ebenso von Interesse sind die diesbezüglichen Werte bei Kaffeeersatzprodukten, welche teils aus Getreide, teils aus Kaffeebohnen bestehen.

Eben diesem Thema widmeten sich Casal et al., die im Jahre 2014 in Porto, Portugal, die OTA-Werte derartiger Produkte im Zuge einer Studie bestimmten.

Zu diesem Zweck zogen sie 40 Proben portugiesischer Herkunft aus dreierlei Produktgruppen heran: Instantkaffee, Mischungen aus Getreide und Kaffee sowie nur aus Getreide bestehende Kaffeeersatzprodukte. Letztere enthielten vor allem Gerste, Gerstenmalz, Roggen und die gemeine Wegwarte (auch Zichorie oder Chicorée genannt).

Während bei 35 der insgesamt 40 Proben ein OTA-Gehalt zwischen 0.15 und 11.8 µg/kg festgestellt werden konnte, enthielten die übrigen fünf Proben OTA gegebenenfalls nur in Dosen unterhalb der Nachweisgrenze.. Die Werte der Instant-Kaffeeproben schwankten deutlich zwischen nicht detektierbaren OTA-Mengen bis zum Höchstwert von 11.8 µg/kg. Der OTA-Gehalt in den Mischungen aus Getreide und Kaffee lag zwischen 0.15 und 6.5 µg/kg, jener der Kaffeeersatzprodukte sogar nur zwischen 0.05 und 1.3 µg/kg. Insgesamt lagen bis auf eine Instantkaffee-Probe, die den bereits erwähnten OTA-Wert von 11.8 µg/kg aufwies, alle Proben unter dem zugelassenen Höchstgehalt von 10 µg/kg (bzw. 3 µg/kg für verarbeitetes Getreide beim Kaffeeersatz) [Casal et al. 2014].

Die Ergebnisse der Untersuchung decken sich weitgehend mit den Ergebnissen, die bereits Leoni et al. (0.17 – 6.29 µg/kg), Vecchio et al. (0.32 – 6.40 µg/kg) und Drunday und Pacin (Median von 0.43 µg/kg) erzielt haben. Hier lagen ebenfalls alle Werte unterhalb des zugelassenen Höchstgehalts. Darüber hinaus konnten Vecchio et al. keinen signifikanten Unterschied zwischen normalem und entkoffeiniertem Kaffee feststellen. Bezieht man die Werte von Vecchio et al. (0.32 – 6.40 µg/kg), unter der Annahme eines

Kaffeeconsums von drei bis fünf Tassen pro Tag, auf eine Person mit durchschnittlichem Körpergewicht, würde der Konsum nur zu ca. 0.7% bis maximal 6.3% zu der laut EFSA tolerierbaren wöchentlichen OTA-Aufnahme beitragen [Leoni et al. 2000; Vecchio et al. 2012; Drunday und Pacin, 2013].

Bei der von Casal et al untersuchten Probe, deren OTA-Menge über dem zugelassenen Höchstgehalt lag, handelte es sich um eine Hausmarke. Sie stach mit ihrer hohen OTA-Konzentration von 11.8 µg/kg deutlich hervor, zumal die Instantkaffeeprobe mit dem zweithöchsten Wert nur noch 5.9 µg/kg enthielt. Es ist möglich, dass hierbei Rohmaterialien geringerer Qualität verwendet wurden. Diese Vermutung legt auch das ermittelte Ergebnis der Hausmarken gegenüber den klassischen Marken nahe: Erstere wiesen allgemein einen höheren OTA-Gehalt auf [Casal et al. 2014].

10.3 Röstungsmethoden und deren Einfluss auf die OTA-Reduktion

Die Röstung der Kaffeebohnen bestimmt primär die Qualität des Kaffees und beeinflusst dessen Geschmack. Sie vermag jedoch auch den Gehalt an Toxinen zu reduzieren. Die Kaffeebohnen werden bei einer Temperatur von max. 250°C geröstet. Im Grunde löst die hohe Temperatur die Maillard-Reaktion aus, welche Geschmack und Textur der Bohnen beeinflusst. Während dieses Prozesses verändern diese ihre Farbe von Gelb hin zu immer dunkler werdenden Brauntönen [Tabelle 3, Sivetz, 1991]. Durch das Trocknen der Bohne kommt es zum Verdampfen des enthaltenen Wassers, wodurch sich die Bohne aufbläht und porös wird. Entweicht der Dampf, kommt es zu einem hörbarem Knacken, dem sogenannten „crack“. Dieses Geräusch gilt als wichtiger Indikator des Röstprozesses.

Temperatur °C	Art der Röstung	Farbe	Masseverlust
226	englisch	sehr hellbraun	13,5%
232	amerikanisch	hellbraun	15,0%
238	europäisch	braun	16,5%
246	Espresso	dunkelbraun	20%
254	verbrannt	schwarz	>25%

Tabelle 3: Röstungsarten [Sivetz, 1991]

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Methoden der Röstung, die Trommelröstung und die Heißlufttröstung. Diese sollen in der Folge kurz dargestellt werden, bevor die Rolle der Röstung für die OTA-Menge in Kaffee näher beleuchtet werden soll.

9.3.1 Trommelröstung

Die Trommelröstung ist eher langsam, verspricht aber die bessere Qualität des Endprodukts. Die Bohnen werden zunächst in eine sich horizontal drehende Trommel gefüllt. Die Bohnen selbst kommen hierbei nicht in Kontakt mit der Flamme, sondern werden lediglich von den heißen Wänden der Trommel geröstet. Der Vorgang dauert zwischen 8 und 25 Minuten, die Temperatur bewegt sich zwischen 180° und 240°C. Je nach Größe der Trommel kann man hier Chargengrößen von wenigen Kilogram bis hin zu einigen Tonnen verwenden. Sobald der gewünschte Röstgrad erreicht wurde, müssen die Bohnen schnell abgekühlt werden, um weitere Röstung zu vermeiden. Dies geschieht auf einem Kühlsieb, wo die Bohnen mittels Luftabsaugung gekühlt werden [www.kaffeezentrale.de/wissen/kaffeeeroestung/; <https://beans.at/de/kaffeewissen/kaffeeeroestung/kaffeeeroestvorgang/>].

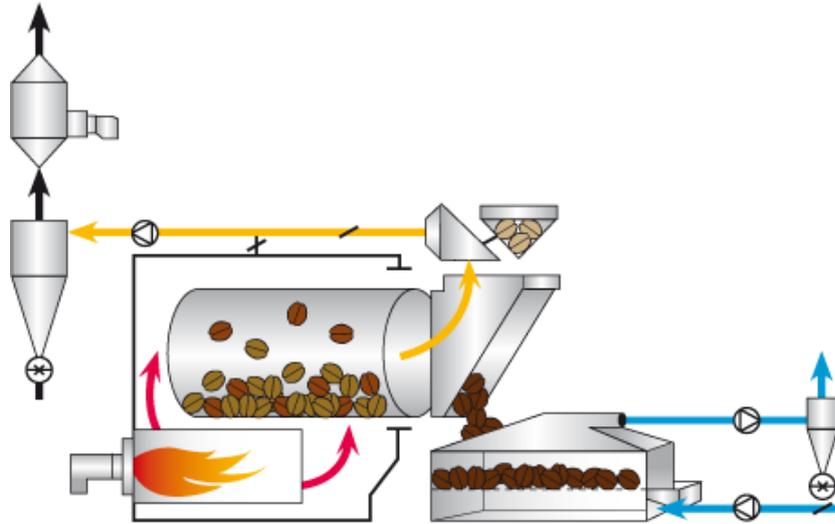


Abbildung 9: Schema eines Trommelrösters [http://www.origo-kaffee.de/images/his_1.png]

10.3.2 Heißluftfröstung

Das Verfahren der Heißluftfröstung ist schneller und effektiver als die Trommelröstung, hat jedoch negative Auswirkungen auf die Qualität der Bohnen. Wie der Name verrät werden hierbei die Bohnen durch Heißluft mit bis zu 600°C erhitzt. Die Dauer des Vorgangs verkürzt sich durch diese Methode auf nur ca. 2-5 Minuten. Die Kühlung erfolgt ebenfalls zumeist auf Kühlsieben mittels kühlerer Außenluft, teilweise wird aber auch Wasser zur Kühlung verwendet [<https://beans.at/de/kaffeewissen/kaffeeeroestung/kaffeeeroestvorgang>, <http://www.kaffeezentrale.de/wissen/kaffeeeroestung>].

10.3.3 Einfluss der Röstung auf die OTA-Reduktion

Ursprünglich ging man davon aus, dass OTA während der Röstung abgebaut wird. Erst Tsubouchi et al. wiesen OTA im Jahre 1987 auch in Röstkaffee nach. Die ersten Ergebnisse der Untersuchungen über die Auswirkungen der Röstung divergierten jedoch stark. Während die einen von einer hundertprozentigen Reduktion berichteten, meinten andere gar keine Reduktion feststellen zu können [Pittet, 1999]. Die abweichenden Ergebnisse wurden den unterschiedlichen Bedingungen der Röstung und Kontamination zugeschrieben [La Pera et al. 2008].

Castellanos-Onorio et al., die sich in einer im Jahre 2011 durchgeführten Studie mit den Wirkungen der Röstung auf den OTA-Gehalt von Kaffee beschäftigten, nennen das Absieben der Schale, den thermischen Abbau oder die Isomerisation zu anderen Diastereomeren, als mögliche Gründe der OTA-Reduktion während des Röstprozesses. In ihrer Studie wandten sie zwei verschiedene Röstmethoden an um deren Auswirkungen auf den OTA-Gehalt zu untersuchen. Hierfür isolierten sie zunächst *A. westerdijkiae* aus mexikanischen Kaffeebohnen um auf Kartoffel-Dextrose-Agar Kulturen anzulegen. Diese wurden wiederum auf grüne Kaffeebohnen aufgetragen und bei 25°C für teils 3, teils 9 Tage inkubiert. Der Gehalt der Bohnen betrug schlussendlich 5.3 µg/kg (3 Tage) und 57.2 µg/kg (9 Tage) OTA, was in etwa einer natürlichen Kontamination grüner Kaffeebohnen entspricht (Romani et al. konnten in 106 von 162 Proben grüner Kaffeebohnen OTA im Bereich von 0-48 µg/ kg nachweisen [Romani et al. 2000]). Vor der Röstung wurden die Kaffeebohnen getrocknet bis sie einen Feuchtigkeitsgehalt von 12% hatten. Zur Röstung wurden sowohl ein Trommelröster als auch ein Heißlufttröster verwendet. Auf ersterem wurden die Proben von jeweils 200 g bei 230°C für 3, 6, 9, 12 und 15 Minuten geröstet und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Beim Heißlufttröster wurde dieselbe Menge an Proben, ebenfalls bei einer Temperatur von 230°C, jedoch nur für 0.8, 1.7, 2.6, 3.5 und 4.3 Minuten behandelt. Die Dauer der Röstung wurde so gewählt, um die verschiedenen Röstungsgrade von hell bis dunkelbraun zu erzielen. [Castellanos-Onorio et al. 2011].

Nach Messung der Proben konnte kein prozentueller Unterschied der Reduktion zwischen den beiden Kontaminationsstufen festgestellt werden. Die Trommelröstmethode stellte sich jedoch als die effektivere dar. Mit steigendem Grad der Röstung kam es zu einer stärkeren Reduktion (siehe Tabelle 4) – bei der dunkelsten Röstung konnte immerhin eine Reduktion von 96% (Trommelröstung) beziehungsweise 75% (Heißlufttröstung) beobachtet werden. Der Einfluss der Röstdauer auf den Restgehalt von OTA ist in den Tabellen 4 & 5 dargestellt. Wie hier deutlich zu erkennen ist, findet der größte Reduktionsanstieg zwischen mittlerem und dunklem Röstgrad statt. Der Unterschied zwischen den beiden Röstmethoden konnte durch einen Querschnitt der Bohnen erklärt werden: bei den mit der Trommelröstmethode

behandelten Bohnen konnte man feststellen, dass diese gleichmäßig bis ins Innere geröstet worden waren, während bei der kürzeren Heißluftfröstung hingegen nur die äußere Schicht geröstet wurde, wodurch ein temperaturbedingter OTA-Abbau im Inneren der Bohne nicht stattfinden konnte [Castellanos-Onorio et al. 2011].

Röstmethode Trommelröstung	Röstgrad	Ochratoxin A Reduktion %	
Röstdauer (min)		5.3 µg/ kg	57.2 µg/ kg
0	-	0.0	0.0
3	sehr hell	18.2	3.8
6	hell	25.1	15.1
9	mittel	59.5	67.9
12	dunkel	87.0	89.6
15	sehr dunkel	97.2	95.1

Tabelle 4: Einfluss der Trommelröstung auf den Restgehalt von OTA in den Kaffeebohnen [Castellanos-Onorio et al. 2011].

Röstmethode Heißluftfröstung	Röstgrad	Ochratoxin A Reduktion %	
Röstdauer (min)		5.3 µg/ kg	57.2 µg/ kg
0	-	0.0	0.0
0.9	hell	7.4	9.3
1.7	mittel	36.0	30.9
2.6	dunkel	72.4	64.3
3.5	sehr dunkel	77.6	73.4
4.3	sehr dunkel	79.2	81.3

Tabelle 5: Einfluss der Heißluftfröstung auf den Restgehalt von OTA in den Kaffeebohnen [Castellanos-Onorio et al. 2011].

Somit kann zwar eine deutliche Reduktion von OTA durch Röstung erfolgen, jedoch ist zu beachten, dass der Restgehalt an OTA vom Grad der ursprünglichen Kontamination abhängt. Um den zugelassenen OTA-Höchstgehalt in geröstetem Kaffee von 5.0 µg/kg nicht zu übersteigen, darf bei einer dunklen Trommelröstung die ursprüngliche Kontamination nicht über 42.0 µg/kg liegen. Bei der Heißlufttröstung muss diese sogar unter 15 µg/kg sein. Bei helleren Röstungen müsste die Kontamination dementsprechend noch geringer sein [Castellanos-Onorio et al. 2011].

Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch in anderen Studien beobachten. So konnten Pérez de Obanos et al. nach einer Heißlufttröstung von 5 Minuten bei 260°C eine durchschnittliche Reduktion von 66.5% beobachten während La Pera et al. nach 3 Minuten bei 200°C eine Verminderung im Bereich von 65-100% erzielten [Pérez de Obanos et al. 2005; La Pera et al. 2008].

Den Ergebnissen zufolge kann man bei der industriellen Verarbeitung zwar eine deutliche Reduktion erreichen, der Restgehalt an OTA ist jedoch von der ursprünglichen Kontamination abhängig und kann, vor allem bei geringerem Röstgrad, die zugelassenen Höchstwerte überschreiten. Man darf sich also nicht auf eine Eliminierung von OTA durch die Röstung verlassen. Das Vermeiden einer Kontamination hat immer noch höchste Priorität [Castellanos-Onorio et al. 2011].

10.4 Grüner Kaffee

Es gibt zwar definierte Höchstgehalte für geröstete Kaffeebohnen und löslichen Kaffee, doch für grüne Kaffeebohnen gibt es diese nicht. Eine frühzeitige Erkennung einer OTA-Kontamination ist äußerst hilfreich um das Risiko für den Endverbraucher zu minimieren. Nachdem der Pilzbefall auf dem Feld oder während der Trocknung und Lagerung stattfindet, macht es Sinn grüne Kaffeebohnen zu untersuchen bevor diese exportiert und weiterverarbeitet werden. Die Herkunft der Bohne könnte hierbei schon Informationen über eine mögliche Kontamination verraten. Stichproben grüner Kaffeebohnen verschiedener Herkunft zeigten, dass manche Gebiete stärker befallen sind, jedoch kein Land frei von Kontamination [Taniwaki,

2006]. Während Stack et al. 1983 keinen Zusammenhang zwischen Toxinproduktion und Herkunftsland finden konnten, beobachteten Romani et al. eine erhöhte Befallhäufigkeit in Proben aus Afrika und Asien [Stark et al. 1983, Romani et al. 2000]. Sie untersuchten 162 Proben unterschiedlicher Herkunft. OTA wurde dabei in 76 der 84 afrikanischen Proben in einem Bereich von 0.5 bis 48 µg/ kg. Hingegen enthielten nur 19 der 60 Proben aus Amerika OTA mit einem Durchschnittsgehalt von 0.5 µg/ kg mit nur zwei Proben die über 3 µg/ kg lagen. Der Durchschnitt der Asiatischen Proben lag bei 1.06 µg/ kg, dabei waren 11 von 18 Proben kontaminiert. Die am stärksten kontaminierte Probe mit 48 µg/ kg stammt aus dem Kongo, wo auch die höchste Durchschnittskonzentration gemessen wurde. Die Probenanzahl von 7 reicht jedoch nicht aus um mit Sicherheit eine allgemein erhöhte Kontamination in kongolesischen Gebieten zu bestätigen [Romani et al. 2000].

Taradolsirithitikul et al. haben 2016 mithilfe von NIRS (near infrared spectroscopy) 200 Bohnenproben aus Thailand analysiert und einen Kontaminationsbereich von 0-1.906 µg/ kg festgestellt. Sie waren die ersten die NIRS zum Nachweis von OTA in grünen Kaffeebohnen verwendet haben [Taradolsirithitikul et al. 2016].

11. Laboruntersuchung

Um herauszufinden, inwiefern Kaffee, der in Österreich vermarktet wird, mit OTA belastet ist, wurden 20 verschiedene Proben aus österreichischen Supermärkten auf Ihren OTA-Gehalt untersucht. Darunter waren sowohl Bioprodukte als auch Nicht-Bioprodukte. Die genaue Herkunft der Bohnen ist leider unbekannt, da von den Herstellern keine entsprechenden Verpackungsangaben angeführt werden.

11.1 Chemikalien und Reagenzien

- 1 mg Ochratoxin A-Standard von Sigma-Aldrich (USA)
- Methanol
- Phosphate-buffered saline (PBS) von Sigma-Aldrich (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
- HPLC-Grade H₂O
- Acetonitril

11.2 Materialien

- Proben clean-up mit Agilent Bond Elut – Mycotoxin – Solid Phase Extraction columns von Agilent Technologies (USA)
- Autosampler vials
- Zentrifugen vials
- Kaffee-Filter
- Mixer
- Shimadzu Nexera X2 Liquid Chromatograph
- RF-20AXS Fluoreszenzdetektor

11.3 Proben-Liste

1. Jacobs momente, caffè crema classico
2. Echt blo. Hochlandkaffee aus bio. Landwirtschaft, 100% Arabica
3. Segafredo zanetti, Selezione Crema
4. Ja! Natürlich, Hochlandkaffee, gemahlen, 100% Arabica
5. Tchibo, Espresso mailänder Art, elegante Röstung
6. Jacobs momente, Caffè crema classico, fresh
7. Lavazza, Cremoso Espresso
8. Café Intencion, Café crema, 100% arabica, fair-trade
9. Tchibo, Café crema, mild
10. Lavazza, Dolce, caffè crema
11. EZA, bio Kaffee organico, mild, fair-trade
12. Spar natur pur, Bio-Kaffee, fair-trade
13. Tchibo, Privat Kaffee, Latin Bio
14. Jacobs momente, Caffè crema intenso
15. Segafredo Zanetti, Selezione Oro
16. Lavazza, perfetto Espresso
17. Julius Meinl, Espresso Wiener Crema
18. EZA, Espresso organico, fair-trade
19. Spar natur pur, Bio-Espresso, fair-trade
20. Natur aktiv, bio café Latino, fair –trade

11.4 Vorbereitung der Standards

Die OTA-Standard-Lösung (0.1 mg/mL) wurde in einer Lösung aus Methanol und PBS (50:50, v/v) vorbereitet. Die Kalibrierungskurve war für den Bereich von 0.5 bis 1000 ng OTA/ml geplant. Da jedoch auch nach mehrfachem Herstellen neuer Standards, bei den Lösungen im Bereich von 0.5-5 ng/ml Messungenauigkeiten problematisch waren, wurden diese für die Erstellung der Kalibrierungskurve nicht berücksichtigt (siehe Tabelle 6). Das Ergebniss war eine Kalibrierungskurve mit vier Bezugspunkten und der Geradengleichung $y = 8564,7x - 140647$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0.998 (siehe Abb. 10).

Standard	ng/ml	AUC
SIV 0,5	0,5	21988
SIV 1	1	26638
SIV 5	5	35773
SIV 25	25	128988
SIV 50	50	297857
SIV 100	100	644847
SIV 1000	1000	8429294

Tabelle 6: Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) der einzelnen Standards, rot gekennzeichnete Standards wurden für die Berechnung der Kalibrierungskurve verwendet.

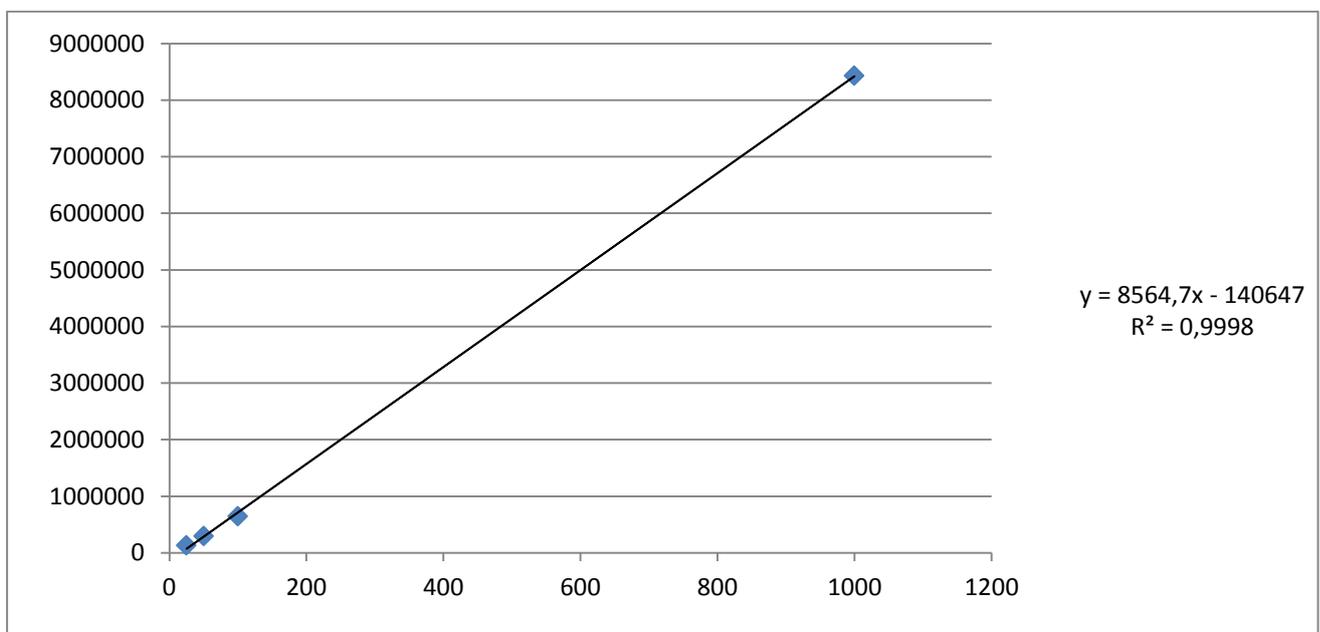


Abbildung 10: Geradengleichung der Standards SIV 25 – SIV 1000

11.5 Extraktion und Reinigungsprozedur

Es wurden 10 g der Kaffeebohnen abgewogen und anschließend in einem normalen Haushaltsmixer für 2 Minuten gemahlen. Aus dem entstandenen Pulver wurde das OTA, durch Homogenisierung mit 40 mL Acetonitril:H₂O (60:40, v/v) für 2 Minuten, extrahiert. Danach wurde das Extrakt durch handelsübliche Kaffefilter gefiltert und 4 mL des Filtrats wurden mit 44 mL

phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7.4 verdünnt.

Die erhaltene Lösung wurde mit Hilfe der Solid-Phase-Extraction Säulen gereinigt. Hierzu wurden 4 ml der Lösung in die Säulen appliziert und passierten diese mit einer Flussgeschwindigkeit von 2-3 ml/min. Die Säule wurde anschließend mit 10 mL PBS bei selber Flussgeschwindigkeit gewaschen. Um auch den letzten Tropfen des Puffers aufzusammeln, wurde Luft durch die Säule gedrückt. Das gebundene OTA wurde anschließen langsam mit 1.5 ml Methanol eluiert. Im nächsten Schritt wurde das Eluat im Konzentrator für 90 min bei Raumtemperatur konzentriert, bis etwa 150 µl Lösung übrigblieben. Vor der anschließenden Analyse wurde das verbleibende Eluat mit 500 µl Methanol:H₂O (50:50, v/v) verdünnt. Die somit gereinigte und vorbereitete Probe wurde in Autosampler vials transferiert und für die Messung in die HPLC geladen.

11.6 Messung

Das HPLC Equipment welches für die Analyse verwenden wurde wer ein Shimadzu Nexera X2 Liquid Chromatograph mit einem RF-20AXS Fluoreszenzdetektor. Die analytische Säule war eine Fortis Phenyl 150 mm x 2.1 mm und wurde bei Raumtemperatur verwendet. Eine Lösung aus Acetonitril:H₂O (35:65, v/v) diente als mobile Phase bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.2 ml/min. Das Injektionsvolumen der Probe betrug 20 µl.

Die Einstellungsparameter des Fluoreszenzdetektors waren eine Anregungswellenlänge von 333 nm und eine Emissionswellenlänge von 443 nm. Die Retentionszeit unter diesen Bedingungen betrug zwischen 2.5-3.5 min. Die beste Vergleichbarkeit wurde erzielt indem die Output-Einstellung auf eine niedrige Sensitivität mit einer 16-fachen Verstärkung gestellt worden sind. Alle Kaffeproben wurden mindestens zweimal vorbereitet und gemessen.

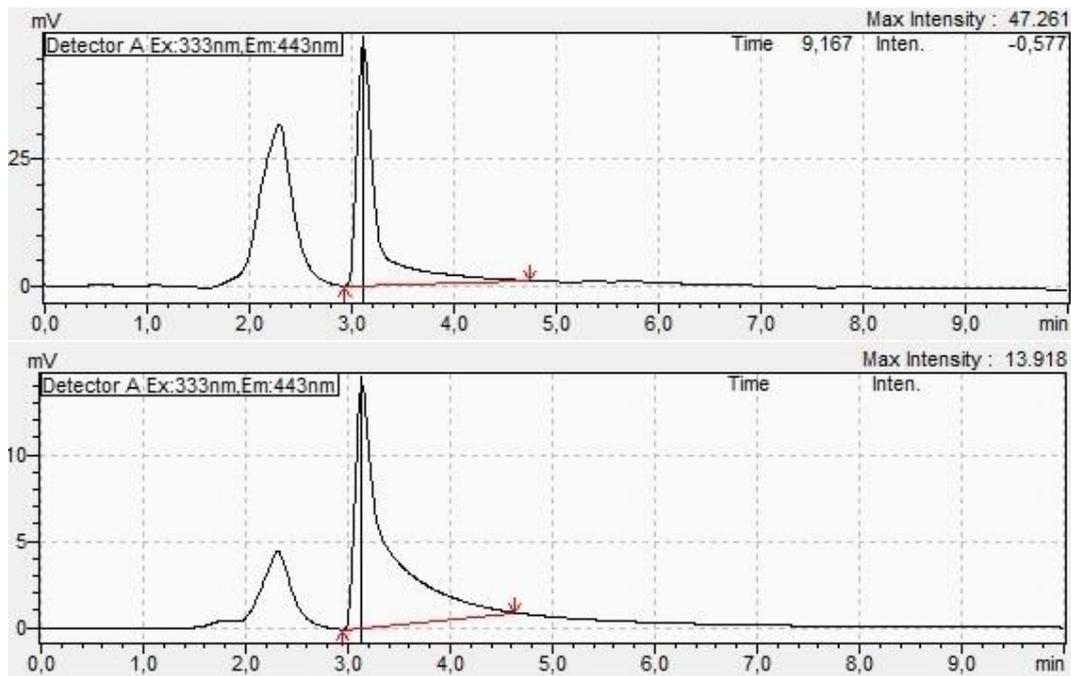


Abbildung 11: Vergleich des Chromatogramms der Probe Nr.5 (oben) und des Standards 50ng/ml (unten)

11.7 Ergebnisse

Der OTA-Gehalt der Proben war den anderer Studien ähnlich. Keine der Proben überschritt den von der EU zugelassenen Höchstwert von 5 µg/kg, allerdings betrug die Kontaminationsrate 100% - jede Probe war kontaminiert (siehe Tabelle 7). Die Durchschnittskontamination betrug 1.785 µg/kg bei einer relativen Standardabweichung von 2.60%.

Unter der Annahme, dass eine Person mit dem Durchschnittsgewicht von 70 kg bis zu fünf Tassen Kaffee (10 g/Tasse) zu sich nimmt, würde Sie unter Berücksichtigung der Ergebnisse nur in etwa 7,5% der von der EFSA abgeleiteten tolerierbaren täglichen Aufnahme von OTA (17 ng/kg KG/Tag) erreichen. Da der Kaffeekonsum in Österreich mit 240 ml/Tag [Österreichischer Ernährungsbericht 2012], deutlich niedriger ausfällt, lässt sich sagen, dass er zwar zur OTA-Aufnahme beiträgt, aber in keinen gesundheitsgefährdenden Dosen.

Proben Nr.	Durchschnittliches OTA µg/kg	RSD
1	1.831	3,00%
2	1.806	2,01%
3	1.772	3,30%
4	1.821	2,18%
5	1.757	1,48%
6	1.767	0,71%
7	1.793	1,73%
8	1.766	1,24%
9	1.760	0,98%
10	1.751	0,92%
11	1.723	1,16%
12	1.762	0,05%
13	1.836	4,07%
14	1.858	4,10%
15	1.822	3,13%
16	1.843	0,05%
17	1.736	1,40%
18	1.777	0,47%
19	1.776	0,05%
20	1.749	0,34%

Tabelle 7: Durchschnittlicher OTA Gehalt der Proben aus beiden Messungen, RSD= relative Standardabweichung

12. Conclusio

Die Forschung auf dem Gebiet der Mykotoxine hat in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse gebracht – alte Mythen und eventuell falsche Rückschlüsse wurden aufgeklärt und beseitigt. Die Reduktion von OTA durch verschiedene Röst- und Zubereitungsmethoden wurde nachgewiesen. Neue, günstigere und schnellere Nachweismethoden wurden entwickelt und auch die Hygiene und Kontrollstandards wurden auf den neuesten Stand gebracht. Jedoch kann selbst all dies eine Kontamination auf dem Feld bzw. bei der Lagerung nicht verhindern. Darüber hinaus sind bei Weitem nicht alle chronischen Effekte von OTA im Detail geklärt. Auch die Frage, ob OTA eine

kanzerogene Wirkung beim Menschen hat, ist noch nicht abschließend beantwortet.

Das Vorkommen von OTA in jeder einzelnen untersuchten Probe, mit einer Durchschnittskonzentration von 1.785 µg/kg, zeigt, wie leicht es zu einer Kontamination kommen kann und wie wichtig hohe Standards in der Produktion und Lagerung sowie bei Kontrollen sind. Derzeit gibt es keinen Grund zur Annahme, dass ein moderater Kaffeekonsum in Österreich, eine mögliche toxische Wirkung durch OTA auslösen kann. Weitere Forschung ist nötig, um einen genaueren Einblick auf die toxischen Wirkungen von OTA und seinen Metaboliten zu gewähren.

13. Literaturverzeichnis

A. Pérez De Obanos , E. González-Peñas & A. López De Cerain, Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion, *Food Additives & Contaminants*, 2005, 22:5, 463-471

Ages - Überblick über österreichrelevante Mykotoxin – Höchst - und Richtwerte (Stand 1.3.2017)

André el Khoury und Ali Atoui, Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status, *Toxins* 2010, 2, 461-493

Antonello Santini , Rosalia Ferracane , Petra Mikusová , Stefan Eged , Antonia Srobárová, Giuseppe Meca, Jordi Mañes, Alberto Ritieni , Influence of different coffee drink preparations on ochratoxin A content and evaluation of the antioxidant activity and caffeine variations, *Food Control* 22 (2011) 1240-1245

Aoudia, N., Tangni, E.K., Larondelle, Y. Distribution of ochratoxin A in plasma and tissues of rats fed a naturally contaminated diet amended with micronized wheat fibres: Effectiveness of mycotoxin sequestering activity. *Food Chem. Toxicol.* 2008;46: 871-878. .

Ariane Vettorazzi, Adela López de Cerain, Mycotoxins as Food Carcinogens, *Environmental Mycology in Public Health, Fungi and Mycotoxins Risk Assessment and Management.* pages 261 -298 , 2016

Astoreca , C. Magnoli, C. Barberis, S.M. Chiacchiera, M. Combina, A. Dalcero, Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from different substrates in Argentina, *Science of the Total Environment* 388 (2007) 16–23

Ballinger, M.B., Phillips, T.D. & Kubena, L.F. (1986) Assessment of the distribution and elimination of ochratoxin A in the pregnant rat. 1. *Food Saf.*, 8, 11–24.

Bayman P, Baker JL, Doster MA, Michailides TJ, Mahoney NE., Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*, *Appl Environ Microbiol.* 2002 May;68(5):2326-9.

Bottalico, A., Perrone, G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 611–624, 2002.

Boudra, H.; Le Bars, P.; Le Bars, J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 1156–1158.

Budavari, S. *The Merck Index*, 11th ed.; Rahway, N.J., Ed.; Merck & Co.: Rahway, NJ, USA, 1989; pp. 30–31.

Dr. Oliver Lerch, GERSTEL GmbH & Co. KG, GERSTEL Aktuell – Dezember 2012

Drunday Vanesa, Pacin Ana; Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation, *Food Control* 30 (2013) 675-678

E. Martinez, M. Gros, S. Lacorte, D. Barcelo, „Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels“, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 181-188.

EFSA, Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food, *The EFSA Journal* (2006) 365, 1 - 56

Elling, F.; Nelsen, J.P.; Lillehoj, E.B.; Thomassen, M.S.; Stormer, F.C. Ochratoxin A induced porcine nephropathy: Enzyme and ultrastructural changes after short-term exposure. *Toxicol* 1985, 23, 247–254.)

Elmadfa I. et al. *Österreichischer Ernährungsbericht 2012*. 1. Auflage, Wien, 2012.

EMPFEHLUNG DER KOMMISSION vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, T-2- und HT-

2- Toxin sowie von Fumonisin in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen, (2006/576/EG)

Environmental Health Criteria 105, Selected mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot, World Health Organization, Geneva, 1990

Francisco Javier Cabañes, Maria Rosa Bragulat, and Gemma Castellá, Ochratoxin A Producing Species in the Genus *Penicillium*, Toxins (Basel). 2010 May; 2(5): 1111–1120

G. Aced, H.L. Möckel, Liquidchromatographie, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim; New York; Basel; Cambridge 1991.

Galtier, P. (1978) Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology—Ochratoxin A. Vet. Sci. Commun., 1, 349–358.

Galtier, P., Alvinerie, M. & Charpentreau, J.L. (1981) The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. Food Cosmet. Toxicol., 19, 735–738.

Galtier, P., Camguilhem, R. & Bodin, G. (1980) Evidence for in vitro and in vivo interaction between ochratoxin A and three acidic drugs. Food Cosmet. Toxicol., 18, 493–496.

Galtier, P., Charpentreau, J.L., Alvinerie, M. & Labouche, C. (1979) The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. Drug Metabol. Disposition, 7, 429–434.

Georg Schwedt, „Chromatographischen Trennmethode“, 2. verbesserte und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York 1986.

Gilbert, J., Brereton, P., MacDonald, S., 2001. Assessment of dietary exposure to ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. Food Addit. Contam. 12, 1088–1093

Gil-Serna, J.; Vázquez, C.; Sandino, F.G.; Valle, A.M.; González-Jaén, M.T.; Patiño, B. Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. Food Res. Int. 2014, 61, 127–131.

H. Xiao, R.R. Marquardt, A.A. Frohlich, G.D. Philips, T.G. Vitti, Effect of hay and a grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen sheep, *J. Anim. Sci.* 69 (1991) 3706–3714.

Hagelberg, S., Hult, K. & Fuchs, R. (1989) Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J. Appl. Toxicol.*, 9, 91–96.

Hietanen E, Bartsch H, Béréziat JC, Castegnaro M, Michelon J., Characterization of the cytochrome P450 isozyme that metabolizes ochratoxin A, using metabolic inducers, inhibitors and antibodies., *IARC Sci Publ.* 1991;(115):297-304.

Hult, K. & Fuchs, R. (1986) Analysis and dynamics of ochratoxin A in biological systems. In: Steyn, P.S. & Vleggaar, R., eds, *Mycotoxins and Phycotoxins*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, pp. 365–376.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 56 (1993)

International Agency for Research on Cancer, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monograph 56. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1993

Isis M. Hueza, Paulo Cesar F. Raspantini, Leonila Ester R. Raspantini, Andreia O. Latorre and Silvana L. Górnjak, Zearalenone, an Estrogenic Mycotoxin, Is an Immunotoxic Compound, *Toxins (Basel)*. 2014 Mar; 6(3): 1080–1095.

John W. Dolan, How Does It Work? Part V: Fluorescence Detectors, *LCGC North America*, Volume 34, Issue 9, pg 710–719: Sep 01, 2016

Jonathan Nimal Selvaraj, Lu Zhou, Yan Wang, Yang Liu, Mycotoxin detection- Recent trends at global level, *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14(11): 2265-2281.

K. Cammann, „Instrumentelle Analytische Chemie“, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg; Berlin 2001

Krogh P., Axelsen NH., Elling F., Gyrd-Hansen N., Hald B. Hyldgaard-Jensen J., Larsen AE., Madsen A., Mortensen HP., Moller T., Petersen OK., Ravnskov U. Rostgaard M., Aalund O., Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A contaminated feed. *Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica Suppl.*, 1974;246:1–21.

Kuiper-Goodman, T. & Scott, P.M. (1989) Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.*, 2, 179–248.

T. Kuiper-Goodman, C. Hilts, S.M. Billiard, Y. Kiparissis, I.D.K. Richard, S. Hayward, Health risk assessment of ochratoxin A for all age-sex strata in a market economy, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2010 Feb; 27(2): 212–240.

Kumagai, S. & Aibara, K. (1982) Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 64, 94–102.

Kumagai, S. (1988) Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 26, 753–758.

L. Pallaroni, C. von Holst, „Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry“, *J.Chromatogr. A* 993 (2003) 39-45.

La Pera L, Avellone G, Lo Turco V, Di Bella G, Agozzino P, Dugo G. Influence of roasting and different brewing processes on the ochratoxin A content in coffee determined by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD). *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2008 Oct;25(10):1257-63

Lea, T.; Steien. K.; Stormer. C. Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopathologia* 1989, 107, 153–159

Leoni, L. A. B., Soares, L. M. V., & Oliveira, P. L. C. (2000). Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. *Food Additives and Contaminants*, 17, 867–870.

M. H. Gey, Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage 2008

M. Koch, S. Steinmeyer, R. Tiebach, R. Weber, P. Weyerstahl, „Bestimmung von

M. Zhao, Y. Liu, Y. Li, X. Zhang, W. Chang, „Development and characterization of an immunoaffinity column for selective extraction of bisphenol A from serum samples“, J. Chromatogr. B 783 (2003) 401-410.

M.J. Pitout, The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes, Biochem. Pharmacol. 18 (1969) 485–491.

Madhyastha, M.S., Marquardt R.R. & Frohlich, A.A. (1992) Hydrolysis of ochratoxin A by the microbial activity of digesta in the gastrointestinal tract of rats. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 23, 468–472.

MAK Value Documentation in German language, Ochratoxin A, 2003, The MAK Collection for Occupational Health and Safety. 1–35.

Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Coetzer JAW, Thiel PG, van der Lugt JJ. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B, isolated from *Fusarium moniliforme*. Onderstepoort J Vet Res 1988; 55: 197-203

Marasas WFO, Wehner FC, van Rensburg SJ, van Schalkwyk DJ. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, southern Africa. Phytopathology 1981, 71:792-6

Martins, M. L. ; Martins, H. M. ; Gimeno, A., Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea Arabica*), Food Additives and Contaminants, 01 December 2003, Vol.20(12), p.1127-1131

Mortensen, H.P., Hald, B. & Madsen, A. (1983) Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. 5. Ochratoxin A in pig blood. Acta Agric. Scand., 33, 235–239.

N.J.K. Simpson, Solid Phase Extraction – Principles, Strategies and Applications, Marcel Dekker, New York, 1998.

Naohiko Anzai, Promsuk Jutabha, and Hitoshi Endou, Molecular Mechanism of Ochratoxin A Transport in the Kidney, *Toxins* (Basel). 2010 Jun; 2(6): 1381–1398.

Noonim, P.; Mahakarnchana kul, W.; Varga, J.; Samson, R.A. Aspergilli and ochratoxin A in coffee. In *Aspergillus in the Genomic Era*; Varga, J., Samson, R.A., Eds.; Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 2008; pp. 213 – 231.

O. Castellanos-Onorio, O. Gonzalez-Rios, B. Guyot, Tachon A. Fontana, J.P. Guiraud, S. Schorr-Galindo, N. Durand, M. Suárez-Quiroz, Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*), *Food Control* 22 (2011) 1184-1188

Ochratoxin A in Röstkaffee“, *Deutsche Lebensmittelrundschau* 92. Jahrg. Heft 2 1996, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Panchita Taradolsirithitikul, Panmanas Sirisomboon and Cheewanun Dachoupanan Sirisomboon, Qualitative and quantitative analysis of ochratoxin A contamination in green coffee beans using Fourier transform near infrared spectroscopy, *J Sci Food Agric* 97 (4), 1260-1266. 2016 Jul 15

Parker, R.W., Phillips, T.D., Kubena, L.F., Russell, L.H. & Heidelbaugh, N.D. (1982) Inhibition of pancreatic carboxypeptidase A: A possible mechanism of interaction between penicillic acid and ochratoxin A. *J. Environ. Sci. Health*, B17, 77–91.

Pavlina Sobrova, Vojtech Adam, Anna Vasatkova, Miroslava Beklova, Ladislav Zeman, and Rene Kizek, Deoxynivalenol and its toxicity, *Interdiscip Toxicol.* 2010 Sep; 3(3): 94–99.

Pavlovic Nikola M. Balkan endemic nephropathy—current status and future perspectives, *Clin Kidney J.* 2013 Jun; 6(3): 257–265.

Pavlovic, M., Pleština, R & Krogh, P. (1979) Ochratoxin A contamination of foodstuffs in an area with Balkan (endemic) nephropathy. *Acta pathol. microbiol. scand. B*, 87,243-246

Pitt J.I., Hocking A.D., Fungi and Food Spoilage, 2nd ed. London ; New York : Blackie Academic & Professional, 1997

Pitt JI, Toxigenic fungi and mycotoxins, Br Med Bull. 2000;56(1):184-92.

Pitt JI. *Penicillium vindicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. Appl Environ Microbiol 1987; 53 266-9

Pittet A, Tornare D, Huggett A, Viani R. 1996. Liquid Chromatographic Determination of Ochratoxin A in pure and Adulterated Soluble Coffee Using an Immunoaffinity Column Cleanup Procedure. J. Agric. Food Chem. 44: 3564-3569 IN: La Pera L, Avellone G, Lo Turco V, Di Bella G, Agozzino P, Dugo G. Influence of roasting and different brewing processes on the ochratoxin A content in coffee determined by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD). Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2008 Oct;25(10):1257-63

Reinsch Martin, Entwicklung von Analyseverfahren zur Bestimmung von Ochratoxin A in Lebensmitteln, 2006, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Richtlinie 2002/32/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 7. Mai 2002 über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung

Ringot Diana, Chango Abalo, Schneider Yves-Jacques, Larondelle Yvan, Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update, Chemicobiological Interactions, Volume 159, Issue 1, 5 January 2006, Pages 18-46

Rizzo, A.; Eskola, M.; Atroshi, F. Ochratoxin A in Cereals, Foodstuffs and Human Plasma. Europ. J. Plant Pathol. 2002, 108, 631–637.

Romani S, Sacchetti G, Chaves López C, Pinnavaia GG, Dalla Rosa M. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. J Agric Food Chem. 2000 Aug;48(8):3616-9.

Roth, A., Chakor, K., Creppy, E.E., Kane, A., Röschenthaier, R. & Dirheimer, G. (1988) Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. Toxicology, 48, 293–308.

R.R.M. Paterson, N. Lima, Further mycotoxin effects from climate change, *Food Research International* 44 (2011) 2555–2566

R.R.M. Paterson, N. Lima, M.H. Taniwaki, Coffee, mycotoxins and climate change, *Food Research International* 61 (2014) 1–15

S. Kumagai, Ochratoxin A: plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats *Food Chem. Toxicol.*, 23 (1985), pp. 941-943

Selvaraj JN, ZHOU Lu, WANG Yan, ZHAO Yue-ju, XING Fu-guo, DAI Xiao-feng, LIU Yang, Mycotoxin detection- Recent trends at global level. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14(11): 2265-2281.

Sivetz, M.: Growth in use of automated fluid bed roasting of coffee beans; *ASIC 14th*; San Francisco; 313-318; 1991

Solange I. Mussatto, Ercília M. S. Machado, Silvia Martins, José A. Teixeira, Production, Composition, and Application of Coffee and its Industrial Residues, *Food Bioprocess Technol* (2011) 4:661-672

Stack, M. E.; Mislivec, P. B.; Denizel, T.; Gibson, R.; Pohland, A. E. Ochratoxins A and B, xanthomegnin, viomellein and vioxanthin production by isolates of *Aspergillus ochraceus* from green coffee beans. *J. Food Protect.* 1983, 46 (11), 965-968. *IN*: Romani S, Sacchetti G, Chaves López C, Pinnavaia GG, Dalla Rosa M. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. *J Agric Food Chem.* 2000 Aug;48(8):3616-9.

Stock, Stephanie, Das Mykotoxin Ochratoxin A : Untersuchungen zu in vitro Genotoxizität und Metabolismus, 2004, urn:nbn:de:hebis:26-opus-21889

Storen O., Holm H, Størmer F.C., Metabolism of ochratoxin A by rats, 1982. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 785–789.

Størmer F.C., Storen, O., Hansen, C.E., Pedersen, J.I. & Aasen, A.J., Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes., 1983, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1183–1187.

Studer-Rohr I., Schlatter J., Dietrich D.R., Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans, Arch Toxicol. 2000;74:499-510.

Susana Casal, Tiago Vieira, Rebeca Cruz, Sara C. Cunha, Ochratoxin A in commercial soluble coffee and coffee substitutes, Food Research International 61 (2014) 56–60

Suzuki, S., Satoh, T. & Yamazaki, M., The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats, 1977, Jpn. J. Pharmacol., 27, 735–744.

Theodor Otto Heusinger, Über den Ergotismus, insbesondere sein Auftreten im neunzehnten Jahrhundert: Inaug.-Diss, Koch, 1856

T.N. Gopinandhan , G.S. Kannan , P. Panneerselvam , K. Velmourougane , Y. Raghuramulu & J. Jayarama (2008) Survey on ochratoxin A in Indian green coffee destined for export, Food Additives & Contaminants: Part B, 1:1, 51-57

Taniwaki MH. 2006. An update on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in coffee. Adv Exp Med Biol. 2006;571:189-202. *IN:* T.N. Gopinandhan , G.S. Kannan , P. Panneerselvam , K. Velmourougane , Y. Raghuramulu & J. Jayarama (2008) Survey on ochratoxin A in Indian green coffee destined for export, Food Additives & Contaminants: Part B, 1:1, 51-57

Tiago Vieira, Sara Cunha, Susana Casal, Analysis of the Mycotoxin Ochratoxin A in Coffee, Coffee in Health and Disease Prevention, pp.1023-1031, 2015

Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., Scott D.B., Theron J.J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* wilh. Nature. 1965;205:1112–1113. doi: 10.1038/2051112a0.

Varga, J.; Kevei, E.; Rinyu, E.; Téren, J.; Kozakiewicz, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 1996, 62, 4461–4464.

Vecchio, A., Mineo, V., & Planeta, D. (2012). Ochratoxin A in instant coffee in Italy. *Food Control*, 28, 220–223.

Verordnung (EWG) Nr. 315/93 des Rates vom 8. Februar 1993 zur Festlegung von gemeinschaftlichen Verfahren zur Kontrolle von Kontaminanten in Lebensmitteln

Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006

Verordnung (EU) Nr. 105/2010 der Kommission vom 5. Februar 2010 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Ochratoxin A

Xiao, H., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Philips, G.D., Vitti, T.G., 1991. Effect of hay and grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 69, 3706–3714.

Yan Wang, Liuqing Wang, Fei Liu, Qi Wang, Jonathan Nimal Selvaraj, Fuguo Xing, Yueju Zhao and Yang Liu, Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms, *Toxins (Basel)*. 2016 Mar; 8(3): 83

<http://www.analytica-world.com/de/produkte/127465/solventextraktion-accelerated-solvent-extraction-ase-dionex.html> (15.07.2017)

http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/detektoren/fluoresz/fluor1m75ht0201.vscml.html (17.06.2017)

<http://www.kaffeezentrale.de/wissen/kaffeeeroestung> (01.07.2017)

<http://www.lctech.de/produkte/immunoaffinitaets-und-clean-up-saeulen/ochratoxin-a/otaclean.html>

https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/chemie/schimmelpilzgifte/et_hoehchstmengen_mykotoxine.htm

<https://beans.at/de/kaffeewissen/kaffeeeroestung/kaffeeeroestvorgang> (01.07.2017)

<https://www.hielscher.com/de/ultrasonic-extraction-of-caffeine-and-other-active-compounds.htm> (15.07.2017)