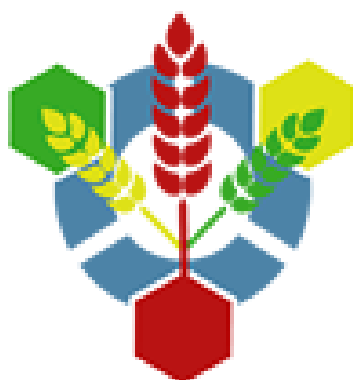


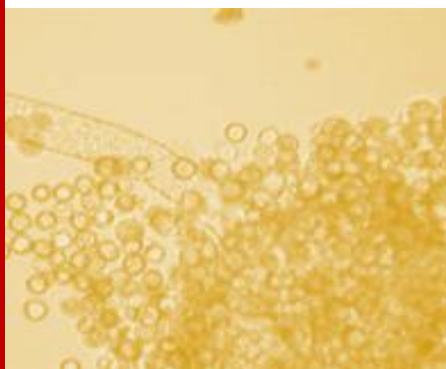
**Red nacional sobre las micotoxinas y hongos
toxigénicos y de sus procesos de descontaminación**

Libro de resúmenes VII Workshop Micofood

Granada, 29-30 septiembre 2022



Micofood



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



**FACULTAD
DE CIENCIAS**

ISSN: 2444-3158

Editado en Granada por: Red Nacional sobre las micotoxinas y hongos toxigénicos y de sus procesos de descontaminación.

María del Mar Delgado Povedano, Maykel Hernández Mesa y Francisco J. Lara

Micofood 2022

Contenido

COMITÉ CIENTÍFICO Y ORGANIZADOR	1
PATROCINADORES	2
PROYECTO MICOFOOD	3
BIENVENIDA	4
PROGRAMA	5
ÍNDICE DE RESÚMENES	9
PRESENTACIONES ORALES	11
PÓSTERES	32

Comité científico

Ana María García Campaña (Universidad de Granada)

Laura Gámiz Gracia (Universidad de Granada)

Jordi Mañes Vinuesa (Universitat de València)

Laura Righetti (Universidad de Parma)

Giuseppe Meca (Universitat de València)

Misericordia Jiménez Escamilla (Universitat de València)

Mar Rodríguez Jovita (Universidad de Extremadura)

Vicente Sanchis Almenar (Universitat de Lleida)

Agustín Ariño Moneva (Universidad de Zaragoza)

Covadonga Vázquez Estévez (Universidad Complutense de Madrid)

Elena González-Peñas (Universidad de Navarra)

Adela López de Cerain (Universidad de Navarra)

Luis González Candelas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas)

Alberto Cepeda Sáez (Universidad de Santiago de Compostela)

Francisco Javier Cabañes Saenz (Universitat Autònoma de Barcelona)

Comité organizador

Laura Gámiz Gracia (Universidad de Granada)

Ana M^a García Campaña (Universidad de Granada)

Francisco J. Lara Vargas (Universidad de Granada)

Maykel Hernández Mesa (Universidad de Granada)

M^a del Mar Delgado Povedano (Universidad de Granada)

Laura Carbonell Rozas (Universidad de Granada)

M^a del Mar Aparicio Muriana (Universidad de Granada)

José Vega Hidalgo (Universidad de Granada)

Jordi Mañes Vinuesa (Universitat de València)

Jorge Calpe Ruano (Universitat de València)

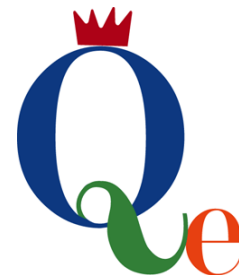
Patrocinadores



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Facultad de Ciencias



Empresas colaboradoras



Proyecto Micofood

El objetivo de la red de excelencia trata de profundizar en la evaluación del riesgo, mejora de la calidad y seguridad alimentaria, y en definitiva proteger y promover la salud de la población, focalizándose en el estudio de distintos aspectos relativos a los hongos toxigénicos y a sus metabolitos las micotoxinas (MTs) con los siguientes objetivos concretos:

- ✓ Caracterizar las especies productoras de micotoxinas más relevantes de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, en materias primas destinadas a la alimentación humana y animal.
- ✓ Establecer métodos rápidos, específicos y fiables para la detección de los hongos micotoxigénicos.
- ✓ Desarrollar métodos de análisis multi-micotoxinas en alimentos y fluidos biológicos.
- ✓ Evaluar la exposición de la población a través de los valores de contaminación de los alimentos de la dieta y los compuestos presentes en fluidos biológicos humanos
- ✓ Comprobar el empleo de diferentes tratamientos térmicos en la estabilidad y contenido de micotoxinas durante la fabricación y/o el procesado de alimentos y/o su posterior almacenamiento.
- ✓ Emplear compuestos naturales para reducir la presencia de hongos toxigénicos y sus respectivas micotoxinas en materias primas destinadas a la alimentación humana y animal.
- ✓ Caracterizar el peligro de las combinaciones de micotoxinas más frecuentemente encontradas en los estudios de exposición.
- ✓ Caracterizar las rutas de síntesis y su regulación genética y ambiental con el fin de evitar la contaminación en origen.

Ajustado a los objetivos del Nuevo Programa Marco de la UE para la Investigación e la Innovación “Horizonte Europa”, en concreto dentro del clúster “Alimentación, bioeconomía, recursos naturales, agricultura y medioambiente”, MICOFOOD pretende profundizar la relación entre los investigadores, la industria alimentaria y la administración sanitaria con objeto de abordar y en lo posible minimizar los problemas provocados por la presencia de los hongos toxigénicos en los alimentos, así como favorecer la implantación y actuaciones de las medidas de gestión de la calidad.

El coordinador de la red:

Dr. Jordi Mañes Vinuesa

Bienvenida

Estimados compañeros,

Tras estos difíciles años de pandemia, que ha impuesto tantas restricciones en cuanto a reuniones científicas y sociales, para nosotros es un placer poder celebrar de forma totalmente presencial esta VII Reunión de la Red MICOFOOD en la Facultad de Ciencias de Granada, y daros la bienvenida a nuestra ciudad. Es una nueva oportunidad de compartir los resultados de nuestra investigación en un campo multidisciplinar como es el de las micotoxinas y hongos toxigénicos, pero también de reencontrarnos personal y socialmente.

Durante estos dos días (29 y 30 de septiembre), tendremos la oportunidad de comprobar cómo nuestros grupos, con líneas de investigación tan diversas y de campos tan diferentes como la toxicología, química analítica, veterinaria, microbiología, etc. siguen realizando investigación de alto nivel, reflejada en las cuarenta comunicaciones orales y póster presentadas. Así, hemos intentado elaborar un programa científico que dé cabida a todos los grupos y todas las líneas de investigación, incluyendo aquellas más novedosas, como son las técnicas ómicas, que tantas posibilidades ofrecen.

Resaltar la importante participación de los jóvenes investigadores (pre y posdoctorales) que representan el futuro de la red. Es grato comprobar cómo algunos compañeros que participaron en las primeras reuniones de la Red como jóvenes investigadores, hoy se han convertido en profesionales consagrados. Contaremos además con la presencia de ponentes nacionales e internacionales de prestigio y representantes del sector industrial, y de casas comerciales que nos mostrarán los avances analíticos más importantes en este campo.

La organización de esta reunión no ha sido fácil ya que, a diferencia de ediciones anteriores, la red no contaba con la financiación necesaria. Por ello, queremos agradecer sinceramente a todos los participantes el esfuerzo realizado para venir hasta Granada (sabemos que algunos no lo tenéis fácil) y colaborar así en la continuación de nuestra Red. Asimismo, agradecemos la colaboración de los distintos patrocinadores y colaboradores, sin cuyas aportaciones económicas la realización de esta reunión hubiera sido muy difícil, así como a la Facultad de Ciencias por facilitar sus instalaciones y a la Universidad de Granada por su apoyo.

No podemos olvidar el aspecto social de la reunión, casi tan importante como el científico. Esperamos que disfrutéis de la ciudad de Granada, de sus paseos, de sus vistas y, como no, de sus tapas, y que os llevéis un grato recuerdo de vuestra estancia.

Esperamos que estos días sirvan para compartir conocimientos, intercambiar experiencias, establecer nuevos lazos y dar un nuevo impulso a la Red, todo ello en el ambiente de compañerismo que siempre ha caracterizado a esta Red.

Laura Gámiz Gracia y Ana M. García Campaña

Programa científico

JUEVES 29 DE SEPTIEMBRE DE 2022

8:45-9:30 – ACREDITACIÓN y ENTREGA DE DOCUMENTACIÓN	
9:30-9:45 – INAUGURACIÓN DEL WORKSHOP	
Sesión I: Biomonitorización. Aproximaciones ómicas	
Moderadores: Ana M. García Campaña y Ana Rosa Ballester Frutos	
09:45-10:30	CONFERENCIA INAUGURAL High resolution MS and metabolomics: new opportunities for mycotoxin research <u>Dra. Laura Righetti</u> (Food and Drug Department, University of Parma, Parma, Italy ; Wageningen University & Research, Wageningen, The Netherlands)
10:30-10:45	Extending the mycobolome coverage by UPLC–HRMS/MS for human exposure biomonitoring <u>M.M. Delgado-Povedano</u> , R. Pero-Gascon, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, M. De Boevre, S. De Saeger (University of Granada)
10:45-11:00	El micobioma como predictor de diabetes tipo II <u>L. Sinisterra-Loaiza</u> (Universidad Santiago de Compostela)
11:00-11:30	Café
Sesión II: Toxicología y hongos toxigénicos	
Moderadores: Adela López de Cerain y M^a Luisa Fernández Cruz	
11:30-11:45	Fermented whey protects gene expression of apoptotic genes in the stomach and colon of Wistar rats after exposure to aflatoxin B1 and ochratoxin A <u>M. Alonso-Garrido</u> , S. Baraketi, Y. Barchouchi, G. Font, L. Manyes (University of Valencia)
11:45-12:00	Can fermented whey modulate AFB1- and OTA-induced toxicity in vivo? <u>M. Frangiamone</u> , A. Yemelin, A. Cimbalo, L. Antelo, E. Thines, L. Manyes (University of Valencia)
12:00-12:15	Modelling the physical adsorption of <i>Fusarium</i> mycotoxins <u>X. Pascari</u> , S. Marin, V. Sanchis, F. Molino, A.J. Ramos (University of Lleida)
12:15:12:30	In vivo genotoxicity evaluation of aflatoxin B1 and sterigmatocystin alone and in combination M. Alonso-Jauregui, E. González-Peñas, A. Azqueta, A. López de Cerain, <u>A. Vettorazzi</u> (Universidad de Navarra)
12:30-12:45	Characterization of non-ochratoxigenic black <i>Aspergilli</i> from Spanish grapes <u>G. Castellá</u> , J. Marqués, A. Miralles, M. Pérez, M.R. Bragulat, F.J. Cabañes (Universitat Autònoma de Barcelona)
12:45-13:15	From MS data to Biology insights. Agilent software tool to afford the challenge <u>Jaume Morales</u> (Agilent Technologies)
13:30-15:00	Comida (Cafetería Facultad de Ciencias)

Sesión III : Análisis y control

Moderadores: Laura Gámiz Gracia y Marta Herrera Sánchez

15:00-15:15	Generation of high-affinity antibodies for patulin analysis H. Duncan, J.V. Mercader, C. Agulló, A. Abad-Somovilla, A. Abad-Fuentes (IATA-CSIC)
15:15-15:30	Multi-mycotoxin determination and occurrence study in apple puree samples L. Carbonell-Rozas, L. Van der Cruyssen, L. Righetti, C. Dall'Asta (University of Parma)
15:30-15:45	Determination of aflatoxins in cacao powder and cocoa-derivatives by high-performance liquid chromatography G. Salas, S. Lorán, T. Juan, J.J. Carramiñana, A. Herrera, C. Yagüe, M. Martínez-Pineda, A. Ariño, M. Herrera (Universidad de Zaragoza-CITA)
15:45-16:00	Crop management and mycotoxin contamination in corn B. Borràs-Vallverdú, A.J. Ramos, C. Cantero-Martínez, S. Marín, V. Sanchis, J. Fernández-Ortega (University of Lleida)
16:00-16:15	Effect of climate change interacting abiotic factors on the growth and mycotoxins production by <i>Aspergillus carbonarius</i> on a grape-based media B. Llobregat, A.R. Ballester, L. González-Candelas, C. Cervini, C. Verheecke-Vaessen, A. Medina (IATA-CSIC)
16:15-16:45	Bruker timsTOF: the benefit of 4th dimension high-resolution MS for complex samples analysis Miguel Ángel Pérez Alonso (Bruker)
16:45-17:45	Reunión de coordinación de la red
18:30-20:30	Visita guiada por el centro histórico de la ciudad *
20:30	Cóctel en el Carmen de la Victoria

*La visita comenzará en la Facultad de Ciencias y finalizará en el Carmen de la Victoria

Sesión IV. Estrategias de reducción, prevención y preservación I	
Moderadores: Mar Rodríguez Jovita y Vicente Sanchis Almenar	
10:00-10:15	<i>Penicillium</i> in semihard cheese and <i>Lactobacilli</i> with antifungal activity T.M. López-Díaz , J. Ramos-Pereira, J. Mareze, D. Fernández, J.A. Santos (University of Leon)
10:15-10:30	Actividad antifúngica de extractos de suero de leche fermentados por bacterias ácido lácticas J.M. Quiles , R. Torrijos, F. Illueca, C. Lafuente, A. Molina, G. Meca, J. Mañes (Universitat de València)
10:30-10:45	Desarrollo de masa madre deshidratada como producto industrial mediante el uso de bacterias ácido lácticas J. Calpe , C. Lafuente, C. Luz, V. Dopazo, L. Musto, A. Molina, G. Meca (Universitat de València)
10:45-11:00	Reducción de ocratoxina A y aflatoxina B1 mediante bacterias ácido lácticas durante la elaboración del pan L. Escrivá , N. Mpaka, M. Riolo, L. Musto, A. Molina, C. Lafuente, G. Meca (Universitat de València)
11:00-11:30	Café
Sesión V. Estrategias de reducción, prevención y preservación II	
Moderadores: Covadonga Vázquez Estévez y Giuseppe Meca de Caro	
11:30-11:45	Modes of action of <i>Debaryomyces hansenii</i> and rosemary essential oil against ochratoxigenic <i>Penicillium nordicum</i> in a dry-cured sausage model system E. Roncero , J. Delgado, M. Rodríguez, I. Martín, M.J. Andrade (University of Extremadura)
11:45-12:00	Impact of biocontrol agents on the proteome of <i>Penicillium nordicum</i> related to the meat substrate M. Álvarez , J. Delgado, E. Cebrián, J.J. Córdoba, F. Núñez (University of Extremadura)
12:00-12:15	¿Es <i>Hanseniaspora uvarum</i> U1 un buen agente para controlar <i>Aspergillus flavus</i>? C. Melguizo , J. Gil-Serna, C. Vázquez, B. Patiño (Universidad Complutense de Madrid)
12:15-12:45	Micotoxinas: Avances en la Preparación de Muestras Nicole Menéndez (JASCO Spain)
12:45-13:15	Experiencias en el control de micotoxinas en la industria alimentaria: caso Lactalis Puleva Luis Enrique García Ayuso (Director de Calidad de Lactalis Puleva, S.L.)
13:30-14:00	CEREMONIA DE CLAUSURA DEL CONGRESO Entrega de premios a mejor presentación oral y poster
14:00	Aperitivo de despedida (Facultad de Ciencias)

Índice de resúmenes

PRESENTACIONES ORALES

HIGH RESOLUTION MS AND METABOLOMICS: NEW OPPORTUNITIES FOR MYCOTOXIN RESEARCH. <i>Laura Righetti. University of Parma, and Wageningen University & Research</i>	12
EXTENDING THE MYCOBOLOME COVERAGE BY UPLC–HRMS/MS FOR HUMAN EXPOSURE BIOMONITORING. <i>María del Mar Delgado Povedano et al. University of Granada</i>	13
EL MICOBIOMA COMO PREDICTOR DE DIABETES TIPO II. <i>L. Sinisterra-Loaiza. Universidad Santiago de Compostela.</i>	14
FERMENTED WHEY PROTECTS GENE EXPRESSION OF APOTOTIC GENES IN THE STOMACH AND COLON OF WISTAR RATS AFTER EXPOSURE TO AFLATOXIN B1 AND OCHRATOXIN A. <i>M. Alonso-Garrido et al. University of Valencia</i>	15
CAN FERMENTED WHEY MODULATE AFB1- AND OTA-INDUCED TOXICITY IN VIVO? <i>M. Frangiamone et al. University of Valencia</i>	16
MODELLING THE PHYSICAL ADSORPTION OF <i>Fusarium</i> MYCOTOXINS. <i>X. Pascari et al. University of Lleida</i>	17
IN VIVO GENOTOXICITY EVALUATION OF AFLATOXIN B1 AND STERIGMATOCYSTIN ALONE AND IN COMBINATION. <i>A. Vettorazzi et al. Universidad de Navarra</i>	18
CHARACTERIZATION OF NON-OCRATOXIGENIC BLACK <i>Aspergilli</i> FROM SPANISH GRAPES <i>G. Castellá et al. Universitat Autònoma de Barcelona</i>	19
GENERATION OF HIGH-AFFINITY ANTIBODIES FOR PATULIN ANALYSIS. <i>A. Abad-Fuentes. IATA-CSIC</i>	20
MULTI-MYCOTOXIN DETERMINATION AND OCCURRENCE STUDY IN APPLE PUREE SAMPLES. <i>L. Carbonell-Rozas et al. University of Parma</i>	21
DETERMINATION OF AFLATOXINS IN CACAO POWDER AND COCOA-DERIVATIVES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. <i>G. Salas et al. Universidad de Zaragoza-CITA</i>	22
CROP MANAGEMENT AND MYCOTOXIN CONTAMINATION IN CORN. <i>B. Borràs-Vallverdú et al. University of Lleida</i>	23
EFFECT OF CLIMATE CHANGE INTERACTING ABIOTIC FACTORS ON THE GROWTH AND MYCOTOXINS PRODUCTION BY <i>Aspergillus carbonarius</i> ON A GRAPE-BASED MEDIA. <i>B. Llobregat et al. IATA-CSIC</i>	24
<i>Penicillium</i> IN SEMIHARD CHEESE AND <i>Lactobacilli</i> WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY. <i>T.M. López-Díaz et al. University of Leon</i>	25

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE SUERO DE LECHE FERMENTADOS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS. <i>J.M. Quiles y col. Universitat de València</i>	26
DESARROLLO DE MASA MADRE DESHIDRATADA COMO PRODUCTO INDUSTRIAL MEDIANTE EL USO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS. <i>J. Calpe y col. Universitat de València</i>	27
REDUCCIÓN DE OCRATOXINA A Y AFLATOXINA B1 MEDIANTE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DURANTE LA ELABORACIÓN DEL PAN. <i>L. Escrivá y col. Universitat de València</i>	28
MODES OF ACTION OF <i>Debaryomyces hansenii</i> AND ROSEMARY ESSENTIAL OIL AGAINST OCHRATOXIGENIC <i>Penicillium nordicum</i> IN A DRY-CURED SAUSAGE MODEL SYSTEM. <i>E. Roncero et al. University of Extremadura</i>	29
IMPACT OF BIOCONTROL AGENTS ON THE PROTEOME OF <i>Penicillium nordicum</i> RELATED TO THE MEAT SUBSTRATE. <i>M. Álvarez et al. University of Extremadura</i>	30
¿ES <i>Hanseniaspora uvarum</i> U1 UN BUEN AGENTE PARA CONTROLAR <i>Aspergillus flavus</i> ? <i>C. Melguizo y col. Universidad Complutense de Madrid</i>	31

PÓSTERES

P1. PROTOCOLO UNIVERSAL PARA LA DETECCIÓN POR PCR DE ESPECIES PRODUCTORAS DE OCRATOXINA A. <i>B. Patiño y col. Universidad Complutense</i>	33
P2. IMPACT OF CLASSIFICATION OF WHEAT KERNELS USING NEAR INFRARED HYPERSPECTRAL IMAGING ON DEOXYNIVALENOL REDUCTION. <i>S. Marín y col. Universidad de Lleida</i>	34
P3. TOXICOLOGICAL EFFECT OF AFB1 AND OTA IN MALE RATS THROUGH A METABOLOMIC APPROACH. <i>A. Cimbalo y col. Universitat de València</i>	35
P4. POTENCIAL DE <i>Kluyveromyces lactis</i> KCB21_L2 PARA DETOXIFICAR AFLATOXINA B1, OCRATOXINA A Y FUMONISINA B1. <i>C. Gómez-Albarrán y col. Universidad Complutense</i>	36
P5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ACEITUNAS CON APLICACIÓN IN VITRO DE LOS EXTRACTOS FERMENTADOS CONTRA LOS PRINCIPALES PATÓGENOS DEL OLIVO. <i>G. Meca y col. Universitat de València</i>	37
P6. BIOPRESERVACIÓN DE PANES MEDIANTE LA ADICIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN MASAS MADRE. <i>V. D'Opazo y col. Universidad de Valencia</i>	38
P7. BIOPRESERVACIÓN DE PAN DE MOLDE MEDIANTE EL USO DE MASAS MADRE. <i>J. Calpe Ruano y col. Universitat de València</i>	39

P8. BIOCONSERVACIÓN DE PAN EMPLEANDO UN INGREDIENTE A BASE DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA CERVECERA FERMENTADO POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS. <i>C. Luz y col. Universitat de València</i>	40
P9. ESTUDIO <i>in vitro</i> DE UN RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO CON METABOLITOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CONTRA PATÓGENOS DE CÍTRICOS. <i>V. D'Opazo y col. Universidad de Valencia</i>	41
P10. FERMENTACIÓN DEL SALVADO DE ARROZ POR BACTERIAS LÁCTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE UN INGREDIENTE BIOACTIVO APLICABLE EN PAN. <i>C. Luz y col. Universitat de València</i>	42
P11. OCCURRENCE OF MAJOR MYCOTOXINS AND THEIR DIETARY EXPOSURE FROM NUTS, DRIED FRUITS AND TRADITIONAL FOODS FROM ALGERIA. <i>A. Belasi y col. Universidad de Tizi Ouzou</i>	43
P12. DISTRIBUTION AND STABILITY OF AFLATOXIN M1 DURING THE PROCESSING AND RIPENING OF RAW SHEEP'S MILK CHEESE. <i>T. Juan y col. CITA</i>	44
P13. A HIGH-SENSITIVE ANALYTICAL PROCEDURE FOR THE DETERMINATION OF EMERGENT MYCOTOXINS IN FORAGE SAMPLES. <i>N. Campillo y col. Universidad de Murcia</i>	45
P14. ESTUDIO SOBRE LA BIOACUMULACIÓN DE MICOTOXINAS EMERGENTES EN ÓRGANOS Y TEJIDOS HUMANOS. <i>N. Arroyo-Manzanares y col. Universidad de Murcia</i>	46
P15. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE MICOTOXINAS REGULADAS Y EMERGENTES MEDIANTE HPLC-Q-TOF-MS EN ORINA HUMANA. <i>P. Vila-Donat y col. Universidad de Valencia</i>	47
P16. UNRAVELLING THROUGH TRANSCRIPTOMICS THE ROLE OF FUNCTIONAL FOOD AGAINST AFB1 AND OTA IMMUNE TOXICITY IN VITRO. <i>L. Manyes y col. Universitat de València</i>	48
P17. DEVELOPMENT OF A MULTI-TOXIN UPLC-MS/MS METHOD FOR 50 MYCOTOXINS AND TROPANE ALKALOIDS IN CEREAL COMMODITIES. <i>P. de la Iglesia y col. WATERS</i>	49
P18. DETERMINATION OF EMERGING MYCOTOXINS IN CHICKEN FEED AND EGGS FROM ALGERIA. <i>L. Gámiz-Gracia y col. Universidad de Granada</i>	50
P19. ACUTE AND SUBACUTE EFFECTS IN RAINBOW TROUT EXPOSED VIA FEED TO MYCOTOXINS. <i>M.L. Fernández-Cruz y col. INIA - CSIC</i>	51
P20. <i>Aspergillus carbonarius</i> MUTANTS DEFECTIVE IN OCHRATOXIN A PRODUCTION AS POTENTIAL BIOCONTROL AGENTS. <i>B. Llobregat y col. IATA - CSIC</i>	52
P21. PRELIMINARY REPORT ON THE OCCURRENCE OF AFLATOXINS IN RICE CONSUMED IN THE WEST OF ALGERIA. <i>C. Khelifa Mahdjoubi y col. Universidad de Granada</i>	53

Presentaciones orales

HIGH RESOLUTION MS AND METABOLOMICS: NEW OPPORTUNITIES FOR MYCOTOXIN RESEARCH.

L. Righetti^{1,2}

¹*Food and Drug Department, University of Parma, Parma, Italy*

²*Wageningen University & Research, Wageningen, The Netherlands.*

laura.righetti@wur.nl

Fusarium Head Blight, the most common fungal disease that strongly affects *Triticum spp.*, causes grain yield losses and accumulation of toxic secondary metabolites called mycotoxins. The use of resistant cultivars is considered the most promising approach to counteract mycotoxins accumulation. An in-depth investigation of the plant response to infection is essential for developing possible strategies to facilitate precise breeding. However, the host resistance mechanisms are still poorly understood. In the past decade, untargeted metabolomic strategies have been applied to decipher biological pathways involved in the plant defense. At the same time, metabolic profiling has been used to investigate the mycotoxins biotransformation occurring in plant.

Both approaches are essential to understand what the mycotoxin does to plant but also what the plant enzymes machinery does to mycotoxins.

This talk will cover the use of advanced MS-based approaches in the omics domain to investigate the plant-mycotoxins interplay, including the use of Ion Mobility MS and MS Imaging techniques.

Keywords: mycotoxins; mass spectrometry; imaging; metabolomics; cereals

EXTENDING THE MYCOBOLOME COVERAGE BY UPLC–HRMS/MS FOR HUMAN EXPOSURE BIOMONITORING

M.M. Delgado-Povedano¹, R. Pero-Gascon², L. Gámiz-Gracia¹, A.M. García-Campaña¹,

M. De Boevre², S. De Saeger²

¹*Av. Fuente Nueva s/n (University of Granada, Department of Analytical Chemistry) Spain;*

²*Ottergemsesteenweg 460 (Ghent University, CoE in Mycotoxicology and Public Health) Belgium.*

mmdelgado@ugr.es

Human biomonitoring is increasingly applied to effectively assess human exposure to food contaminants. Among contaminants, mycotoxins are a major global food safety issue and so far only a few biomarkers for mycotoxin exposure (aflatoxin B1-lysine and deoxynivalenol-glucuronides) have been validated. Consequently, to better understand the impact of mycotoxins on human health, the discovery and validation of potential mycotoxin biomarkers in human biofluids is necessary. The aim of this study was to develop and validate a non-targeted workflow to extend the mycobolome coverage in human biofluids. A method based on ultra-performance liquid chromatography–high-resolution tandem mass spectrometry (UPLC–HRMS/MS) followed by a library search is proposed to determine mycotoxins and their metabolite biomarkers in human serum and urine. UPLC–HRMS/MS parameters were optimized for the determination of 42 mycotoxin to achieve the highest sensitivity and mycobolome coverage. UNIFI software (Waters®) was used to perform peak processing and identity confirmation by using a library. This library containing LC–HRMS/MS information for 176 potential mycotoxin biomarkers was integrated in the workflow. Serum preparation was based on protein precipitation, while for urine, salting-out liquid-liquid extraction was used. The method was validated by spiking the samples with the 42 mycotoxin standards. The developed approach is being used for the non-targeted screening of mycotoxins and their metabolites in samples from 81 Belgian adults. So far, enniatins have been detected in serum samples among others.

Keywords: human exposure, mycobolome, biomonitoring, mass spectrometry, biofluids

Acknowledgements: MM.D.P is grateful for a Postdoc contract (DOC_00230) to the Junta de Andalucía and a “José Castillejo” grant (CAS21/00383) to the Ministry of Universities. R.P.G. is supported by a FWO Junior postdoct fellowship (12D4423N). Financial support was obtained through the iBOF from Flanders [grant number BOFIBO2021001102] and Project PID2021-127804OB-I00 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 ‘A way to make Europe’.

EL MICOBIOMA COMO PREDICTOR DE DIABETES TIPO II

L. Sinisterra-Loaiza

Laboratorio de Higiene, Inspección Y Control De Alimentos, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad Santiago de Compostela, 27002, Lugo España.

Laura.sinisterra@usc.es

En los últimos años, la prevalencia de enfermedades no transmisibles como la diabetes tipo II y la obesidad han aumentado de forma alarmante. Una vez que se diagnostican, son difíciles de revertir y la carga para los sistemas de salud se hace cada vez más gravosa. Por tanto, es necesario disponer de herramientas que permitan un diagnóstico precoz así que la búsqueda de nuevos biomarcadores es una prioridad en las investigaciones del campo de la salud.

En este contexto, el estudio de la microbiota humana se está revelando como una fuente de información muy valiosa, por lo que se está determinando también su capacidad como predictores. La microbiota bacteriana es objeto de múltiples ensayos pero otros grupos de microorganismos, como los hongos, son más desconocidos, aunque se puedan encontrar fácilmente en el cuerpo humano, en piel, fosas nasales, vagina y colonizan a su paso todo el tracto gastrointestinal.

Así, el objetivo de este trabajo ha sido investigar si el microbioma fúngico se puede utilizar como predictor de diabetes tipo II en humanos obesos.

Se incluyeron 90 adultos hombres y mujeres, de entre 45 y 70 años, con un IMC superior a 29,9 del noroeste de España. Se recogieron muestras fecales y se procedió a la extracción del ADN usando kits comerciales. Se realizó un análisis de cuantificación relativa mediante PCR y comparativa entre grupos de individuos. Se seleccionaron primers universales de caracterización de hongos (uni y pluricelulares) en la región 18s como son ITS3 e ITS4.

Sí se revelaron diferencias entre el micobioma intestinal de individuos obesos prediabéticos y obesos con regulación normal de la glucosa. Estos alentadores resultados son el preámbulo de una línea de investigación que pretende utilizar las capacidades predictoras de enfermedades del micobioma humano, sobre el que hay un conocimiento muy limitado.

Keywords: biomarcador, obesidad, diabetes tipo II, micobiota, PCR

FERMENTED WHEY PROTECTS GENE EXPRESSION OF APOTOTIC GENES IN THE STOMACH AND COLON OF WISTAR RATS AFTER EXPOSURE TO AFLATOXIN B1 AND OCHRATOXIN A

M. Alonso-Garrido, S. Baraketi, Y. Barchouchi, G. Font, L. Manyes

Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Ave. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain.

manuel.alonso-garrido@uv.es

Aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA) are well known to human health as the most toxic secondary metabolites produced by fungi. They are a risk to public health due to their occurrence in food and feed, being contaminated wheat one of the main concerns in food safety. Fermented whey (FW) is a by-product of the dairy industry, especially cheese. It contains bioactive compounds with important antimicrobial and antiviral properties. It has been shown that fermented whey can interact with these mycotoxins significantly reducing their occurrence. For 28 days, 7 groups with 5 Wistar male rats each were exposed to contaminated feed with AFB1 and OTA, individually and in combination, with or without FW. Later, rats were sacrificed and RNA was extracted from tissues samples of stomach and colon for transcriptional analysis. The selected genes were markers of the apoptotic pathway: tumor suppressor protein (p53), Bcl-2 Associated protein X (Bax), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and nuclear factor kappa of activated B cells (NF- κ B). In stomach, RT-qPCR showed repression of p53, BAX and NF- κ B, especially after treatment with AFB1 and the mycotoxin mixture. In contrast, Bcl-2 reported a significant increase in its expression in the OTA-treated group. The combined treatment of mycotoxins and FW reduced the alteration of the expression of all genes compared to the control, especially for the groups treated with AFB1 or OTA. In colon, NF- κ B was significantly overexpressed. AFB1 or OTA combined with FW, reported a similar gene expression to the control group for all genes. While the addition of FW to AFB1 and OTA showed an upregulation for the tested genes. These data confirm the beneficial effect of FW against mycotoxins at transcriptional level in the digestive system and its possible application in feed as a preservative.

Keywords: whey, aflatoxin B1, ochratoxin A, qPCR, *in vivo*

Acknowledgements: Spanish Ministry of Science and Innovation Project (PID2019-108070RB-I00-ALI) PhD grant (BES-2017-081328).

CAN FERMENTED WHEY MODULATE AFB1- AND OTA-INDUCED TOXICITY *in vivo*?

M. Frangiamone¹, A.Yemelin³, A. Cimbalo¹, L. Antelo², E. Thines^{2,3}, L. Manyes¹

¹*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universitat de València, Vicent Andrés Estellés s/n, Burjassot, Spain*

²*Mikrobiology and Biotechnology, Hanns-Dieter-Hüsch-Weg 17, 55128 Mainz, Germany*

³*Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung gGmbH (IBWF), Erwin-Schrödinger-Str. 56, D-67663 Kaiserslautern, Germany*

massimo2.frangiamone@uv.es

Due to the globalization, mycotoxins have been considered a major risk to human health being the main contaminants of foodstuffs. Among them, aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA) are the most toxic and studied. Dietary exposure to AFB1 and OTA has been associated with several human and animal diseases, including hepatotoxicity and nephrotoxicity. In this context, carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) and kidney injury molecule 1 (KIM-1) are typical biomarkers of liver and kidney damage, respectively. Fermented Whey (FW), derived from milk whey fermentation, contains several bioactive compounds (such as organic and phenolic acids) that show antifungal, antioxidant and immunomodulatory properties. Thus, FW may be considered a plausible candidate against AFB1- and OTA-toxicity. In view of this, a 28 days *in vivo* study was performed in 70 rats divided in 7 groups (10 rats for each, 5 males and 5 females) fed with: 1) control diet; 2) AFB1 (5±0.6 mg/kg); 3) OTA (10.2±1.1 mg/kg); 4) AFB1 and OTA (8.8±1.5 and 10.9±0.2 mg/kg respectively); 5) FW (1%) and AFB1 (6.1±1.4 mg/kg); 6) FW (1%) and OTA (6.1±0.3 mg/kg); 7) FW (1%) with AFB1 and OTA (8.4±0.3 mg/kg and 8.4±0.4 mg/kg respectively). RNA extraction was performed from rat liver and kidney tissue and 3 biological replicates were considered. The potential beneficial effect of FW against AFB1- and OTA-contaminated feed will be investigated by analyzing the alteration in gene expression of CPS1 (liver) and KIM-1 (kidney) from each experimental group. For this purpose, the relative and absolute quantification of these biomarkers is being carried out using qPCR and droplet digital PCR (ddPCR) techniques, respectively. These results will contribute to a better understanding of FW activity against AFB1- and OTA-toxicity at molecular level *in vivo*.

Keywords: mycotoxins, qPCR, ddPCR, liver, kidney

Acknowledgements: This work was supported by Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2019-108070RB-I00-ALI).

MODELLING THE PHYSICAL ADSORPTION OF *Fusarium* MYCOTOXINS

X. Pascari, S. Marin, V. Sanchis, F. Molino, A.J. Ramos

Applied Mycology Unit, Food Technology Department, University of Lleida, UTPV-XaRTA, Agrotecnio, Av. Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain

xenia.pascari@udl.cat

Fusarium mycotoxins represent an important concern in the food and feed chain due to their ubiquitous presence in cereals and the ability of the fungus to accumulate high concentrations of these toxins. As mycotoxins are heat-stable compounds and chemical detoxification is forbidden in the EU, fewer options remain to counteract their toxic effects in contaminated feed. Among the most common methods used to reduce mycotoxins bioavailability, the inclusion of a binder that would be able to decrease their gastrointestinal absorption is frequently employed. Modelling the *in vitro* physical adsorption of binders is a great tool to identifying the mechanisms of the process. The present work aims to evaluate the nature of fumonisin B₁ (FB1) and zearalenone (ZEN) adsorption in simulated gastric and intestinal juices by a commercial clay-based binder. The two mycotoxins were tested at seven concentration levels: between 1 and 10 mg/L for FB1 and 0.1 and 5 mg/L for ZEN. The dose of the binder was always kept at 0.2%. To plot the adsorption isotherms, the obtained distribution of the adsorbed concentration was adjusted to three mathematical models, namely Langmuir, Freundlich and Redlich-Peterson. Besides the coefficient of determination (R^2), the goodness of fit was estimated by calculating the non-linear Chi square (χ^2), residual sum of squares error (SSE), root mean square error (RMSE) and the hybrid fractional error function. The results showed a good fit to the three models for ZEN in both gastric and intestinal simulated juices, while modelling the FB1 adsorption was only possible in intestinal juice. In simulated gastric juice a 100% adsorption of FB1 in all tested concentrations made the fitting impossible.

Keywords: fumonisin B₁, Zearalenone, adsorbent

Acknowledgements: RTC2019-007143-2 project, funded by MCIN/AEI/10.13039/50110001103. X.P. thanks the University of Lleida for her postdoctoral contract.

IN VIVO GENOTOXICITY EVALUATION OF AFLATOXIN B1 AND STERIGMATOCYSTIN ALONE AND IN COMBINATION

M. Alonso-Jauregui¹, E. González-Peñas², A. Azqueta¹, A. López de Cerain¹, A. Vettorazzi¹

¹*Universidad de Navarra, School of Pharmacy and Nutrition, Department of Pharmacology and Toxicology, Research Group MITOX, Pamplona, Spain*

²*Universidad de Navarra, School of Pharmacy and Nutrition, Department of Pharmaceutical Technology and Chemistry, Research Group MITOX, Pamplona, Spain*

avettora@unav.es

Aflatoxin B1 (AFB1) and sterigmatocystin (STER) are two mycotoxins produced by the same fungi. Indeed both mycotoxins are structurally related and part of the same biosynthetic route. AFB1 is highly regulated worldwide due to its known hepatocarcinogenic potential and wide human exposure. STER is currently not regulated, however some studies point to a similar genotoxic potential than AFB1. Furthermore, recent human biomonitoring studies demonstrate human exposure to STER.

For all these reasons, a combined oral study composed of the micronucleus (MN) test (OECD TG 474) and the comet assay (OECD TG 489) has been carried with both mycotoxins (alone and in combination) in Wistar rats. The selected doses were 0.25 mg/kg for AFB1, 20 mg/kg for STER and the combination of both. Genotoxic data have been interpreted together mycotoxin levels in plasma, liver and kidney.

Mycotoxin levels were detected in plasma, liver and kidney of treated animals confirming exposure in the target organs. Both mycotoxins induced very similar response alone and in combination in terms of DNA damage response (micronuclei induction and % DNA in tail in the comet assay).

Keywords: aflatoxin, sterigmatocystin, micronucleus, comet, rat

CHARACTERIZATION OF NON-OCHRATOXIGENIC BLACK *Aspergilli* FROM SPANISH GRAPES

G. Castellá, J. Marqués, A. Miralles, M. Pérez, M.R. Bragulat, F.J. Cabañes

Veterinary Mycology Group, Department of Animal Health and Anatomy, Veterinary Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Gemma.Castella@uab.cat

OTA is produced during the infection of grapes in vineyards by toxigenic strains of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*, commonly known as black *aspergilli*. OTA production consistency varies in these species. Many studies have shown that *A. carbonarius* is the main responsible source of OTA in wine, grapes, and raisings from main viticultural regions worldwide. Nowadays, prevention of the growth of OTA-producing fungi is the most effective strategy for controlling the entry of OTA in grapes. Despite the use of preventive strategies or chemical controls, the use of biological control agents (BCAs) is a promising eco-friendly approach. So, an effective strategy for reducing OTA in grape could be the application of non ochratoxigenic strains of *Aspergillus* section *Nigri* in the vineyards to outcompete naturally toxigenic *A. carbonarius* strains in the field, in a similar way that the nontoxigenic *A. flavus* strains are used nowadays to control aflatoxin contamination in different crops [1]. In this study, a total of 175 strains of *Aspergillus* section *Nigri* isolated from wine and liquor grapes from different viticultural regions of Spain were studied. OTA production was analyzed in all strains using a previously described HPLC screening method [2]. Fifty-four strains were morphologically identified as belonging to the uniseriate species and 121 as *A. niger* aggregate. Based on the calmodulin sequences, among the uniseriate group, *A. japonicus*, and *A. uvarum* were found. Within the *A. niger* aggregate, *A. brasiliensis*, *A. niger*, *A. tubingensis*, and *A. welwitschiae* and were found. None of the strains were able to produce OTA, so these strains are susceptible to be assessed as potential BCAs against *A. carbonarius*.

[1] Ehrlich, K.C. 2014. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology* 5, 50.

[2] Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes F.J. 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int J Food Microbiol.* 71: 139-44.

Keywords: *Aspergillus* section *Nigri*, biological control agents, grape

Acknowledgments: This research was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad of the Spanish Government (PID2020-116152RB-I00).

GENERATION OF HIGH-AFFINITY ANTIBODIES FOR PATULIN ANALYSIS

Hadyn Duncan¹, Josep V. Mercader¹, Consuelo Agulló², Antonio Abad-Somovilla²,
Antonio Abad-Fuentes¹

¹*Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA), Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Agustí Escardino 7, Paterna 46980, Valencia, Spain.*

²*Department of Organic Chemistry, University of Valencia, Doctor Moliner 50, Burjassot 46100, Valencia, Spain.*

aabad@iata.csic.es; <http://www.haptens-antibodies.com/en/>

Rapid immunoanalytical methods greatly contribute to strengthening the safety of our food supply by efficiently monitoring chemical contaminants. Accordingly, high-affinity and specific antibodies have been generated for almost all of the internationally regulated mycotoxins with the only exception of patulin, a mycotoxin mainly produced by *Penicillium expansum* for which such a goal has not yet been achieved. Accordingly, no point-of-need tests are commercially available for patulin immunodiagnosics in food.

Previous attempts to develop rapid immunoanalytical approaches for patulin failed to demonstrate that the obtained antibodies were able to recognize free patulin in solution by standard competitive ELISA [1]. Accordingly, it remains controversial whether the approaches described to date for the generation of anti-patulin antibodies may result in specific, high-affinity binders suitable for the development of rapid tests for food immunoanalysis.

In the present study, three functionalized derivatives conforming to generally accepted rules in hapten design were firstly tested in order to generate suitable antibodies for the sensitive immunodetection of patulin. However, these conventional bioconjugates were unable to elicit the desired immune response, so an alternative strategy that takes advantage of the high electrophilic reactivity of patulin was explored. The obtained adduct was used to produce antibodies with nanomolar affinity values. These results demonstrated for the first time that targeting the adduct resulting from the reaction of patulin with a thiol-containing compound is a promising approach for developing user-friendly immunoanalytical techniques for this elusive mycotoxin.

[1] (a) M. Mehl et al. Immunological determination of the mykotoxine patuline. *Pharmazie* 41 (1986) 147-148. (b) L.J. McElroy et al. The production of polyclonal antibodies against the mycotoxin derivative patulin hemiglutarate. *Can. J. Microbiol.* 39 (1993) 861-863. (c) F. Sheu et al. The synthesis of antigens and the product of antibodies against patulin derivatives. *J. Food Drug. Anal.* 7 (1999) 65-72. (d) H. Mhadhbi et al. Studies on the affinity chromatography purification of anti-patulin polyclonal antibodies by enzyme linked immunosorbent assay and electrophoresis. *Food Addit. Contam.* 22, (2005) 1243-1251. (e) M. de Champdoré et al. A new competitive fluorescence assay for the detection of patulin toxin. *Anal. Chem.* 79 (2007) 751-757.

Keywords: patulin, immunoassay, mycotoxin, rapid methods, food safety

MULTI-MYCOTOXIN DETERMINATION AND OCCURRENCE STUDY IN APPLE PUREE SAMPLES

L. Carbonell-Rozas¹, L. Van der Cruyssen², L. Righetti¹, C. Dall'Asta¹

¹*Department of Food and Drug, University of Parma, Parco Area delle Scienze, 43124 Parma, Italy.*

²*Department of Bioanalysis, University of Ghent, Campus Heymans, 9000 Ghent, Belgium.*

laura.carbonellrozas@unipr.it

Patulin (PAT) has been commonly investigated in apple samples and maximum contents of 25 µg/kg and 10 µg/kg in apple puree destined for adult and infant consumption, respectively, have been established by the European Commission [1]. However, *Alternaria alternata* mycotoxins such as alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME) and tentoxin (TEN), and aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) could be also potential contaminants apple-based products. Therefore, we propose a fast and simple solid liquid extraction (SLE) followed by liquid-chromatography coupled to tandem mass spectrometry detection (LC-MS/MS) for their simultaneous determination in apple puree samples. The chromatographic separation was performed using a C18 SunShell column (2.6 µm, 2.1 i.d. x 100 mm) and a mobile phase consisted of MeOH with 0.2 % acetic acid as solvent B and ultrapure water with 0.2 % acetic acid and 5 mM ammonium acetate as solvent A. All compounds were analyzed under selected reaction monitoring (SMR) conditions. The optimized method was successfully characterized in terms of linearity, precision, recoveries, matrix effect, and limits of detection (LODs) and quantification (LOQs). LOQs were below 0.1 µg/kg for AME, AFB1, AFB2 and TEN, 1 µg/kg for AOH, AG1, AG2 and 5 µg/kg for PAT. Finally, the proposed method was applied for the analysis of 100 apple puree samples to investigate how different parameters could influence the presence of these mycotoxins in such samples. The parameters evaluated were the apple degradation level, cultivation mode, geographical area, variety of apple, storage conditions, post-harvest treatment and processing steps.

To sum up, a novel methodology for a multi-mycotoxin determination in apple puree samples has been proposed and applied for their occurrence study. The results revealed worrying contents of the studied mycotoxins what demonstrate the need to control them in apple-based products, such as apple puree.

[1] Commission Regulation (EC) No. 1881/2006.

Keywords: apple puree, multi-mycotoxin method, occurrence study, food safety

Acknowledgements: The authors would like to thank Paola Battilani (Università Cattolica del S. Cuore, Piacenza) for providing the samples.

DETERMINATION OF AFLATOXINS IN CACAO POWDER AND COCOA-DERIVATIVES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

G. Salas¹, S. Lorán¹, T. Juan¹, J. J. Carramiñana¹, A. Herrera¹, C. Yagüe¹, M. Martínez-Pineda², A. Ariño¹, M. Herrera¹

¹*Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), Facultad de Veterinaria, 50013 Zaragoza, España.*

²*Facultad de Ciencias de la Salud y del Deporte (Universidad de Zaragoza), 22002 Huesca, España.*

herremar@unizar.es

Aflatoxins are mycotoxins that can appear in the food chain as a result of crops infection by *Aspergillus* moulds before or after harvest in different food commodities, such as cereals, dried fruits, nuts, cocoa beans and spices. As aflatoxins are known to be genotoxic and carcinogenic for humans (Group 1 by IARC), exposure through food should be kept as low as possible. In addition, climate change is expected to have an impact on the presence of aflatoxins in food in Europe and worldwide.

In the present work, 81 samples of cacao powder and 38 samples of intermediate and final products of cocoa manufacturing were analyzed by HPLC-PHRED-FLD. Regarding the samples of cacao powder, 45 (55.56%) presented aflatoxin concentrations higher than the limit of detection (0.02 µg/kg), with a mean and maximum values of 0.79 µg/kg and 3.33 µg/kg, respectively. A direct relationship was observed between the cocoa content of the positive samples and the aflatoxin concentrations. On the other hand, 22 (57.89%) of the cocoa-derivatives were positive for aflatoxins, showing a mean value of 1.32 µg/kg and a maximum concentration of 4.05 µg/kg. The highest prevalence of aflatoxins was found in intermediate products from the fermentation of cocoa pods, such as NIBS, cocoa paste or the beans themselves, while final products after processing showed lower aflatoxin incidence.

This work provides reliable data on aflatoxin contamination in cacao products and on the distribution of aflatoxins during cocoa processing. The results obtained can contribute to a better risk assessment of the presence of aflatoxins in food and the resulting human health impacts.

Keywords: aflatoxins, cocoa, liquid chromatography, risk

Acknowledgements: The authors thank the financial support of the Spanish State Research Agency (PID2019-106877RA-I00) and the Government of Aragón (Grupo A06_20R).

CROP MANAGEMENT AND MYCOTOXIN CONTAMINATION IN CORN

B. Borràs-Vallverdú¹, A.J. Ramos¹, C. Cantero-Martínez², S. Marín¹, V. Sanchis¹, J. Fernández-Ortega²

¹*Food Technology Department,* ²*Department of Crop and Forest Sciences*

AGROTECNIO-CERCA Center, University of Lleida, Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain

antonio.ramos@udl.cat

Corn, one of the most important cereals worldwide, can be contaminated with mycotoxins. Crop management can influence mycotoxin contamination. In this work, we studied how crop diversification, tillage management and nitrogen fertilization can affect fungal and mycotoxin contamination (deoxynivalenol, fumonisin B₁ and fumonisin B₂) at harvest. In addition, we discuss the effect of storage time and temperature on fungal and mycotoxin contamination of recently harvested corn before drying. At harvest, corn under intensive tillage presented a significantly higher DON contamination than no-till corn (2.69 and 0.47 µg DON/g maize, respectively). Few samples presented fumonisin contamination (14.28%). We hypothesize that this difference is due to the negative impact of long-term intensive tillage to soil, which causes: 1) soil crusting, and the subsequent formation of pools of water, that create elevate air-humidity conditions, promoting the growth of mycotoxin-producing fungi; 2) a reduction on *Lumbricus terrestris* population, an earthworm capable of reducing DON contamination. Hence, no-tillage would be a better crop management strategy not only in terms of preventing DON contamination in corn, but also from a soil quality preserving perspective. Regarding the fresh corn before drying, a DON significant increase was observed between storage days 0 and 5, but not between days 5 and 10. Storage time influenced water activity evolution, which dropped the fourth day, to levels we estimate are below the threshold for producing DON (around 0.91).

Keywords: corn; deoxynivalenol; fumonisin; tillage system; water activity

EFFECT OF CLIMATE CHANGE INTERACTING ABIOTIC FACTORS ON THE GROWTH AND MYCOTOXINS PRODUCTION BY *Aspergillus carbonarius* ON A GRAPE-BASED MEDIA

B. Llobregat^{1 2}, A.R. Ballester^{1*}, L. González-Candelas¹, C. Cervini², C. Verheecke-Vaessen², A. Medina^{2**}

¹*Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), CSIC. Calle Catedrático Agustín Escardino 7, Paterna 46980. Spain.*

ballesterar@iata.csic.es*

²*Applied Mycology Group, Environment and AgriFood Theme, Cranfield University, Cranfield, UK*

a.medinavaya@cranfield.ac.uk**

Ochratoxin A (OTA) is one of the most abundant food contaminating mycotoxins produced by *Aspergillus* and *Penicillium* genera. It is a potent nephrotoxic secondary metabolite, classified as a probable human carcinogen (Group 2B, IARC) thus, maximum regulatory limits (EC 1881/2006) have been established for its presence in different food products (e.g. cereals, coffee, cocoa, grapes, wine). *Aspergillus* section *Nigri*, commonly known as "black *Aspergilli*", are known to be responsible for OTA contamination of grapes. Among them, *A. carbonarius* has been identified as the main cause of OTA contamination in grape berries. Recent research under simulated climate change conditions has revealed that *A. carbonarius* spoilage, the expression of OTA-biosynthetic genes, and OTA production in grapes are likely to increase in Mediterranean areas due to the increase of the atmospheric CO₂ concentration. Hence, in this work, we have studied the effects of interacting abiotic factors including temperature (25, 30 and 37 °C), water activity (a_w; 0.9, 0.98), and elevated CO₂ (400 ppm vs 1,000 ppm) on fungal growth and production of OTA and other associated metabolites by *A. carbonarius* ITEM 5010 wild type strain and two mutants (ΔveA , Δpks) grown on a grape-based media. Preliminary results indicate that elevated CO₂ conditions do not have a large effect on growth but may result in increasing OTA production by *A. carbonarius* strains, as well as other potentially interesting secondary metabolites.

Keywords: *Aspergillus carbonarius*, Ochratoxin A, Climate Change, *veA*, *pks*.

***Penicillium* IN SEMIHARD CHEESE AND *Lactobacilli* WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY**

T.M. López-Díaz¹, J. Ramos-Pereira², J. Marezze², Fernández, D.³, J.A. Santos¹

¹*Dept. of Food Hygiene and Food Technology, c/Pedro Cármenes, s/n, Campus de Vegazana, 24007-León (Veterinary Faculty, U. of León,) Spain.*

²*Universidade Estadual de Londrina, Brasil.* ³*Food Science and Technology Institute (ICTAL), U. of León.*

teresa.lopez@unileon.es

Penicillium spp. is considered a major spoilage agent of cheese, with many of the species being also mycotoxigenic. Control is carried out at present with chemicals and by physical elimination of the mycelium. Looking at alternatives to these expensive practices, the use of lactic acid bacteria (LAB) with antifungal activity is an interesting possibility of biopreservation. In this study, the identification of *Penicillium* isolates (32) responsible of spoilage of Spanish ripened semihard cheese using a polyphasic approach was performed. In addition, the identification of anti-*Penicillium* LAB isolated from milk (57) and cheese (34) was carried out. A selection of the LAB isolates was tested also for antibacterial activity and further antifungal activity *in vitro* and in cheese slices. Among fungi, most isolates (21/32) belonged to the species *P. commune*. As for the LAB, *Lacticaseibacillus casei* (11/57), *L. paracasei* (9/57) and *L. rhamnosus* (5/57) were found in the milk samples (mainly goat and cow), while *Lactiplantibacillus plantarum* was the dominant species from cheese (25/32). Our LAB isolates showed a variable antifungal activity against several *Penicillium* strains producers of cyclopiazonic acid (CPA) and ochratoxin A (OTA), with a reduction on the mycotoxin production (particularly, of CPA) further to the growth effect. The most resistant mold was *P. commune* and the major species that exhibited inhibition against all *Penicillium* spp. tested was *L. plantarum*. In addition, a selection of LAB showed activity against several food pathogens. We keep working on this topic, to check the viability of using some of these strains as novel protective cheese cultures.

Keywords: *Penicillium*, *lactobacilli*, cheese, antifungal

Acknowledgements: FEDER 2014-2020 (Project RTA2015- 00018-C03-03 INIA, Spain).

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE SUERO DE LECHE FERMENTADOS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

J.M. Quiles, R. Torrijos, F. Illueca, C. Lafuente, A. Molina, G. Meca, J. Mañes

Laboratorio de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, España.

juan.quiles@uv.es

La creciente demanda de alimentos sin aditivos está promoviendo la aplicación de nuevas tecnologías como la biopreservación, la cual implica el uso de microorganismos y sustancias procedentes su metabolismo para aumentar la vida útil de los alimentos. Teniendo en cuenta que muchas bacterias ácido lácticas (BAL) poseen actividad antifúngica y que el suero lácteo es un residuo industrial de alto impacto medioambiental pero rico en nutrientes asimilables por BAL, este trabajo muestra como la reutilización de suero lácteo como medio fermentable de BAL puede ser una alternativa para biopreservar los alimentos. Para ello se aislaron BAL de suero de leche procedente de la fabricación del queso y se comprobó tanto de forma cualitativa la actividad antifúngica frente a hongos del género *Penicillium* de liofilizados de caldo MRS fermentado por cada una de las BAL seleccionadas. A continuación, se determinó cuantitativamente la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Fungicida (MFC) de los liofilizados procedentes de la fermentación de suero lácteo fermentado por las BAL seleccionadas. Se selecciono la BAL con mayor actividad antifúngica, identificada como *L. plantarum*, para estudiar la viabilidad de aplicar un recubrimiento formado por hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y liofilizado de suero lácteo fermentado por dicha bacteria para reducir el crecimiento de hongos del género *Penicillium* en quesos curados. Los ensayos demostraron la capacidad de dichos recubrimientos con dosis de extracto liofilizado comprendidas entre 25 y 100 mg/mL de liofilizado para reducir significativamente el crecimiento de *P. commune* CECT 20767 frente a quesos control sin tratamiento.

Keywords: biopreservación, bacterias ácido lácticas, actividad antifúngica, *Penicillium*, suero lácteo

Acknowledgements: Proyecto GO-ORLEANS (ValOrización de Residuos Lácteos mediante el desarrollo de ENvASe bioactivo) por grupos operativos de la Asociación Europea para la Innovación en materia de productividad y sostenibilidad agrícolas en el Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014-2020.

DESARROLLO DE MASA MADRE DESHIDRATADA COMO PRODUCTO INDUSTRIAL MEDIANTE EL USO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

J. Calpe, C. Lafuente, C. Luz, V. Dopazo, L. Musto, A. Molina, G. Meca

Laboratorio de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, España.

Jorge.calpe@uv.es

El incremento de consumidores preocupados por la calidad de los productos ha provocado el aumento del interés por el pan de masa madre. La masa madre es una de las técnicas de biopreservación más antiguas, contiene una microflora rica en bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras que crecen de manera espontánea y fermentan la masa aportando las cualidades características de este producto y alargan su vida útil debido a los compuestos con actividad antifúngica generados. En este estudio se quieren emplear microorganismos previamente aislados que inoculándolos en la masa madre alargue la vida útil de los panes. Y ante la problemática de la costosa elaboración de la masa madre, estas se han sometido a 4 técnicas de secado. Primeramente, se ha llevado a cabo la evaluación la capacidad antifúngica de cepas aisladas empleadas en la elaboración de las masas madre y se determinó su actividad frente las especies fúngicas mediante ensayos *in vitro* frente 5 hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*. Además, se analizaron los compuestos con actividad antifúngica generados en la masa madre deshidratada y se estudió la capacidad bioconservante de las masas madre deshidratadas en la elaboración de panes contaminados con hongos. En cuanto a los resultados, los microorganismos aislados fueron capaces de inhibir el crecimiento fúngico de los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*. Y en las masas madre deshidratadas se analizaron que compuestos generados por las BAL son los involucrados en inhibir el crecimiento fúngico y se detectó mayor contenido de compuestos fenólicos y ácido láctico en la masa madre deshidratada a 40 °C a la cual se ha inoculado *Pediococcus pentosaceus*. Además de poseer gran contenido de alcoholes y aldehídos en la masa. Finalmente, se empleó la masa madre deshidratada en la elaboración de panes y se comprobó que el pan con masa madre deshidratada alargaba la vida útil del producto respecto a los panes control.

Keywords: masa madre, BAL, biopreservación, actividad antifúngica.

REDUCCIÓN DE OCRATOXINA A Y AFLATOXINA B1 MEDIANTE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DURANTE LA ELABORACIÓN DEL PAN

L. Escrivá¹, N. Mpaka¹, M. Riolo^{2,3}, L. Musto¹, A. Molina¹, C. Lafuente¹, G.Meca¹

¹*Laboratorio de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, España.*

²*Department of Agriculture, Food and Environment, University of Catania, 95123 Catania, Italy.*

³*Department of Agricultural Science, Mediterranean University of Reggio Calabria, 89122 Reggio Calabria, Italy.*

laura.escriva@uv.es

La aflatoxina B1 (AFB1) y la ocratoxina A (OTA) son algunas de las micotoxinas más importantes que muestran comúnmente contaminación post cosecha en cereales, pan y productos derivados. La descontaminación biológica de micotoxinas y hongos filamentosos que originan el deterioro de los alimentos a través de bacterias del ácido láctico (BAL) presenta un alto potencial y aplicabilidad a gran escala. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de varias LAB aisladas de suero de leche en la reducción de la concentración de AFB1 y OTA durante el proceso de elaboración del pan. Se evaluó la capacidad de doce cepas de BAL (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B9, B10, BS4, BS6, BS7) pertenecientes al género *Lactobacillus spp.* de reducir OTA y AFB1 *in vitro* tras 72 h de incubación en caldo MRS (37 °C). Las BAL más efectivas fueron liofilizadas y añadidas como ingrediente en la formulación de pan, con y sin levadura, evaluando la reducción de las micotoxinas respecto al control en masa y pan tras 4, 8 y 24 h de fermentación mediante análisis HPLC-qTOF/MS. Siete de las doce BAL redujeron AFB1 en MRS (11-35%), destacando la actividad de B3 (35%); mientras que todas las BAL redujeron OTA (12-40 %) siendo B3 (33%) y B10 (40%) las cepas más activas. Ambas BAL fueron liofilizadas y adicionadas en pan contaminado con las micotoxinas, alcanzando reducciones de AFB1 y OTA hasta 27 y 32% en masa, y hasta 55 y 34% en pan, respectivamente. Las cepas seleccionadas mostraron reducciones significativas de AFB1 y OTA durante la fermentación del pan, apuntando a una posible estrategia de descontaminación de micotoxinas en productos de panadería.

Keywords: micotoxinas, descontaminación, bacterias ácido lácticas, fermentación

Acknowledgements: Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-108070RB-100).

MODES OF ACTION OF *Debaryomyces hansenii* AND ROSEMARY ESSENTIAL OIL AGAINST OCHRATOXIGENIC *Penicillium nordicum* IN A DRY-CURED SAUSAGE MODEL SYSTEM

E. Roncero, J. Delgado, M. Rodríguez, I. Martín, M. J. Andrade

Food Hygiene and Safety, Meat and Meat Products Research Institute, Faculty of Veterinary Science, University of Extremadura, Avda. de las Ciencias s/n. 10003 Cáceres, Spain.

eroncerob@unex.es

Ochratoxin A (OTA) is the most worrying mycotoxin in the meat industry. The ecological conditions that undergo dry-cured meat products favour the development of ochratoxigenic species, mainly *Penicillium nordicum*. The autochthonous microbial population of dry-cured sausages and essential oils rich in active compounds can be used as biocontrol agents (BCAs) to control the hazard related to the OTA presence. The aim of this work was to evaluate the antifungal modes of action of *Debaryomyces hansenii* FHSCC253H (Dh) and rosemary essential oil (REO) to counteract the OTA production by *P. nordicum* BFE 856 (Pn856) in a culture medium simulating the dry-cured sausages “chorizo” (Chorizo Agar). The medium was thus inoculated with 10^6 spores/mL of Pn856 together with 10^6 cells/mL of Dh or REO (500 μ L/mL) by triplicate. A control batch containing only Pn856 was also performed. The plates were incubated at 12 °C for 15 days. Subsequently, OTA levels were quantified using a Q-Exactive mass spectrometer and a comparative analysis of the *P. nordicum* proteomic profile was carried out. The OTA levels showed significant decreases with respect to the control of 99.65 and 100% when Pn856 was co-inoculated with REO or Dh, respectively. REO caused a reduction in the abundance of some proteins related to the CWI pathway, such as chitinases, the synthesis of secondary metabolites and the ergosterol biosynthetic pathway. Similarly, the yeast caused a decrease in proteins linked to cell wall plasticity and secondary metabolite synthesis but increased those associated with ergosterol synthesis in *P. nordicum*, such as phosphomevalonate kinase. The use of REO and Dh seems to inhibit the OTA production in *P. nordicum* through two modes of action, and both BCAs could be thus proposed as an effective strategy for controlling the presence of OTA in dry-cured meat “chorizo”.

Keywords: “chorizo”, ochratoxin A, biocontrol agents, proteomics

Acknowledgements: PID2019-104260GB-I00 grant funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033. IB16045 project and GR21130 grant funded by Junta de Extremadura and by “European Union ERDF A way of making Europe”.10.13039/501100011033. Q-Exactive mass spectrometer to proteomic research was acquired by the grant UNEX-AE-3394 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe”. Dr. R. Geisen is acknowledged for the *P. nordicum* BFE 856 donation.

IMPACT OF BIOCONTROL AGENTS ON THE PROTEOME OF *Penicillium nordicum* RELATED TO THE MEAT SUBSTRATE

M. Álvarez, J. Delgado, E. Cebrián, J.J. Córdoba, F. Núñez

*University of Extremadura, Research Institute of Meat and Meat Products, Faculty of Veterinary
Science, Food Hygiene and Safety. Cáceres, Spain.*

maalvarezr@unex.es

Meat model systems have been widely used to study the effects of biocontrol agents (BCAs) on ochratoxin A (OTA) producing moulds, but the fungal behaviour can change when growing in the real product. The aim of this study was to test the similarities and differences provoked by the combination of *Debaryomyces hansenii* (Dh) and rosemary on the proteome of OTA-producing *Penicillium nordicum* growing in a dry-cured fermented sausage-based agar (SAgar) and in the real product (S). Then, 10⁶ cells/mL of Dh and 0.2 % (w/w) of fresh rosemary leaves (R) were added to SAgar containing 25 % (w/v) of lyophilised dry-cured fermented “salchichón” (Dh+R-SAgar) or to the “salchichón” dough before stuffing and ripening (Dh+R-S). *P. nordicum* was finally inoculated on the plate and sausage surface. The proteins were extracted from the mycelium in all batches and analysed using a Q-Exactive Plus. The OTA was reduced up to 63 % in Dh+R-SAgar and not detected in Dh+R-S. The enrichment analysis using ClueGo classified all the proteins decreased in abundance in terms and in general groups among which the carboxylic acid metabolic process in Dh+R-S (37.5 % of the terms per group) and the cellular amide metabolic process in SAgar (43.66 % of the terms per group) stood out. Dh+R altered the cell wall integrity pathway (CWI) but affecting different proteins depending on the meat substrate. Additionally, Dh+R-SAgar and Dh+R-S altered proteins from the PKS ER domain, probably involved in OTA biosynthesis. Although BCAs altered the whole fungal proteome in different ways as occurred on the CWI pathway, their effects on the OTA biosynthesis pathway were similar. This would validate the use of meat-based media to test the effect of BCAs on *P. nordicum* OTA production and their overall impact in the proteome.

Keywords: ochratoxin A, *Debaryomyces hansenii*, rosemary, PKS ER domain, cell wall integrity

Acknowledgements: PID2019-104260GB-I00 grant funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033. IB16045 project and GR21130 grant funded by Junta de Extremadura and by “European Union ERDF A way of making Europe”. M. Álvarez is recipient of the BES-2017-081340 grant funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ESF Investing in your future”. Q-Exactive was acquired by the grant UNEX-AE-3394 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe”.

¿ES *Hanseniaspora uvarum* U1 UN BUEN AGENTE PARA CONTROLAR *Aspergillus flavus*?

Clara Melguizo, Jéssica Gil-Serna, Covadonga Vázquez, Belén Patiño

Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid, España

claramel@ucm.es

Estudios recientes han demostrado que entre el 60% y el 80% de las cosechas mundiales están contaminadas por micotoxinas. Entre todas las micotoxinas se encuentra la aflatoxina B₁ (AFB₁), el carcinógeno natural más potente que existe. Debido al cambio climático, se observa un repunte en la incidencia de *Aspergillus flavus*, uno de los principales productores de esta toxina, en cultivos donde antes su presencia no era habitual como es el caso de los viñedos. Tradicionalmente, para el control de estos hongos se han utilizado fungicidas, pero en los últimos años se están buscando alternativas más sostenibles como el biocontrol.

En estudios previos de nuestro grupo, hemos caracterizado a la levadura epífita de uva *H. uvarum* U1 como potencial agente de biocontrol frente a *A. flavus*. El objetivo del presente trabajo fue llevar a cabo un análisis exhaustivo de los mecanismos implicados en la interacción entre el hongo y la levadura así como estudiar características de *H. uvarum* U1 que favorezcan su uso como agente de biocontrol.

Los resultados indican que *H. uvarum* U1 es capaz de formar biofilms moderadamente adherentes lo que le ayudarían a la hora de colonizar la superficie del sustrato. Asimismo, mantiene una tasa de viabilidad alta tras 4 meses y medio tras su liofilización, característica muy relevante para su posible manejo y aplicación industrial. Entre los mecanismos implicados en la interacción con *A. flavus*, se ha comprobado que puede producir compuestos volátiles que afectan significativamente a la capacidad para producir AFB₁ del hongo. Sin embargo, la competencia por nutrientes no parece ser un mecanismo implicado en la reducción del crecimiento de *A. flavus* en presencia de *H. uvarum* U1 ya que el índice de NOI obtenido ($\text{NOI}_{\text{AF/HU}}=0.33$ y $\text{NOI}_{\text{HU/AF}}=1$) indica una dominancia nutricional del hongo frente a la levadura.

Keywords: biocontrol, *A. flavus*, aflatoxina B₁, viñedo y *H. uvarum* U1

Acknowledgements: Este estudio ha sido financiado RTI 2018-097593-B-C21R.

Pósteres

P1. PROTOCOLO UNIVERSAL PARA LA DETECCIÓN POR PCR DE ESPECIES PRODUCTORAS DE OCRATOXINA A

M. García-Díaz, B. Patiño, C. Vázquez, J. Gil-Serna

*Universidad Complutense de Madrid (Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología),
Madrid, España.*

martga43@ucm.es

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina muy importante debido a su ubicuidad como contaminante natural en alimentos y piensos, así como a su alta toxicidad para animales y humanos. La detección temprana de especies potencialmente productoras de OTA en alimentos es esencial para evitar que dicha toxina entre en la cadena alimentaria. En este sentido las técnicas moleculares son una herramienta rápida y eficaz. En este trabajo, se ha diseñado un nuevo protocolo de PCR universal para detectar todas las especies productoras de OTA conocidas hasta el momento. Este método está basado en el gen que codifica para la halogenasa que se encuentra en el clúster de genes implicados en la biosíntesis de esta toxina.

Este protocolo ha sido ensayado con todas especies ocratoxígenas descritas del género *Aspergillus* sección *Nigri* (*Aspergillus carbonarius*, *A. welwitschiae* y *A. niger*), sección *Circumdati* (*Aspergillus steyni*, *A. westerdijkiae*, *A. pulvericola*, *A. elegans*, *A. cretensis*, *A. affinis*, *A. roseoglobosum*, *A. muricatus* y *A. subramanianii*), así como *Penicillium nordicum*. Para comprobar que se podía aplicar para la detección directa de estos hongos en matrices alimentarias se hicieron inoculaciones en avena con especies productoras de OTA (*A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. elegans*, *A. pulvericola*, *A. carbonarius*, *A. niger* y *A. welwitschiae*) y no productoras cercanas filogenéticamente (*A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. tubingensis*). Las muestras inoculadas se incubaron durante 48h a 28°C. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA genómico total y posterior protocolo de PCR específica para especies productoras de OTA. Los resultados mostraron que solo aparecía banda de amplificación positiva en las muestras contaminadas con una o varias especies productoras de OTA.

Hasta donde sabemos, este es el primer protocolo de PCR optimizado para la detección específica de todas las especies productoras de OTA directamente en los alimentos.

Keywords: *Aspergillus* section *Circumdati*, *Aspergillus* section *Nigri*, ochratoxin A, biosynthetic genes, *Penicillium*

Acknowledgements: Investigación financiada por RTI 2018-097593-B-C21R.

P2. IMPACT OF CLASSIFICATION OF WHEAT KERNELS USING NEAR INFRARED HYPERSPETRAL IMAGING ON DEOXYNIVALENOL REDUCTION

B. Escolà, M. Prim, F. Molino, A.J. Ramos, V. Sanchis, S. Marín

*Food Technology Department, AGROTECNIO-CERCA Center, University of Lleida, Rovira Roure
191, 25198 Lleida, Spain.*

sonia.marin@udl.cat

In recent years, the application of spectrometric techniques to mycotoxin analysis has been intensively investigated. In particular, imaging linked to these techniques is considered for its potential to manage this contamination, since it uses spatial recognition, which can deal with the heterogeneity within the lots for the implementation of cereal sorting. The objective of this study was the application of near-infrared hyperspectral image analysis (HSI-NIR) for the detection and discrimination of wheat grains contaminated with deoxynivalenol (DON) above the maximum limit set in the EU. Spectra corresponding to 600 individual wheat grains were processed, using a total of 2700 images. Wheat grains were individually analyzed by HPLC to obtain reference values. The previously calibrated and validated classification model was preliminarily applied on an independent data set (1200 images) showing a percentage of grains correctly classified according to the legal limit (1250 µg/kg) of 67-72%. Considering the concentration of DON, it was observed that while the mean concentration of grains classified as >1250 µg/kg was in the range 35,000-48,000 µg/kg, the mean concentration of the misclassified kernels was less than 10,000 µg/kg, suggesting that it would probably be possible to divert those kernels contaminated at extremely high levels.

Keywords: wheat, deoxynivalenol, imaging, infrared

Acknowledgements: This work was supported by project PID2020-114836RB-I00 funded by MCIN/AEI /10.13039/501100011033 and project PDC2021-121191-I00 funded by MCIN/AEI /10.13039/501100011033 and European Union Next GenerationEU/ PRTR.

P3. TOXICOLOGICAL EFFECT OF AFB1 AND OTA IN MALE RATS THROUGH A METABOLOMIC APPROACH

A. Cimbalo¹, O. Jlaiel², G. Font¹, L. Manyes¹

¹*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology. Faculty of Pharmacy. University of Valencia. Av. Vicent Andrés Esellés s/n. 46100 Burjassot, Spain.*

²*Ecole Polytechnique. Université Libre de Tunis. 32 Bis, 1002 Av. Kheireddine Pacha, Tunis 1002, Tunisia.*

alessandra.cimbalo@uv.es

In food safety, the presence of microscopic contaminants in food and feed such as mycotoxins, represent one of the major public health issues. Among these secondary metabolites, aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA) have been classified by IARC as carcinogenic and possibly carcinogenic to humans, respectively. The main objective of the present study was to investigate the toxic effect of AFB1 and OTA in rats' urine through a metabolomic approach. For this purpose, the study focused on the determination of differences in metabolic profiles of rats exposed to contaminated diets with AFB1 and OTA during 28 days. More specifically, a number of 20 male rats were divided into 4 different groups, depending on the administrated feed: without mycotoxins for the control, contaminated with AFB1, OTA and mix of both mycotoxins for the treated ones. For metabolomics analysis urine was collected after 3 weeks exposure. PCA analysis revealed that metabolomic profiles in urine samples were separated into 4 clusters depending on the treatments, especially for AFB1 and OTA when compared to the control. As for bioinformatics, pathway impact analysis reported that the most affected pathways by OTA and AFB1 were sphingolipid, taurine and hypotaurine, glycerophospholipid, cysteine and methionine metabolism and lysine degradation. The most significant metabolites involved in sphingolipid metabolism were C16 Sphinganine and Sphinganine which were upregulated especially in presence of individual treatment with mycotoxin whereas Sphinganine-phosphate was downregulated in all cases. One of the most outstanding results was the number of metabolites from the amino acids and hypoxanthine pathways, which were downregulated in all conditions, suggesting the toxic effect of mycotoxins. Moreover, it has been observed that these metabolites were implicated in several diseases such as hyperlysinemia I, alpha-aminoadipic aciduria, schizophrenia, Leukotriene C4- Synthesis Deficiency and Sjögren-Larsson Syndrome.

Keywords: metabolomics, mycotoxin, in vivo, HPLC-Q-TOF/MS

P4. POTENCIAL DE *Kluyveromyces lactis* KCB21_L2 PARA DETOXIFICAR AFLATOXINA B₁, OCRATOXINA A Y FUMONISINA B₁

C. Gómez-Albarrán, B. Patiño, C. Vázquez, J. Gil-Serna

Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, España.

caroli13@ucm.es

La detoxificación de micotoxinas utilizando microorganismos probióticos se considera la mejor estrategia para eliminar estos compuestos de alimentos, piensos o, incluso, en el organismo de seres humanos y animales. La capacidad de eliminación de las micotoxinas en microorganismos es dependiente de la concentración de micotoxinas, afectando en algunos casos las altas concentraciones de micotoxinas a la viabilidad celular de los microorganismos detoxificantes.

Estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo han demostrado que tanto células viables como inactivadas térmicamente de distintas levaduras y bacterias aisladas de kéfir son capaces de reducir de forma significativa la concentración de AFB₁, OTA y FB₁. A partir de estos resultados, se seleccionó la levadura *Kluyveromyces lactis* KCB21_L2, debido a que las células viables mostraron un mayor potencial detoxificador que las inactivadas térmicamente, lo que parece indicar un mecanismo activo de detoxificación. En este trabajo, se ha analizado su capacidad para detoxificar elevadas concentraciones de esas micotoxinas y si estos altos niveles afectaban a la viabilidad celular. Para ello, se han inoculado células viables de *K. lactis* en presencia de distintas concentraciones de AFB₁ (1, 10 y 100 µg/kg), OTA (0,5; 5 y 50 µg/kg) y FB₁ (100, 1000 y 2000 µg/kg) y a distintos pH (3, 5 y 7). El estudio de la viabilidad celular se realizó mediante un recuento de viables, mientras que la capacidad de detoxificación se midió mediante ELISA. Los resultados de este estudio indican que la mayoría de las concentraciones de AFB₁, OTA y FB₁ empleadas no afectan a la viabilidad celular de *K. lactis*. En todos los casos, se observó una reducción significativa de la micotoxina inicial en presencia de la levadura llegando a porcentajes de reducción de más del 80%.

Keywords: aflatoxina B₁, fumonisina B₁, ocratoxina A, detoxificación biológica, *Kluyveromyces lactis*

Acknowledgements: Trabajo financiado por el MICINN (RTI 2018-097593-B-C21). Carolina Gómez Albarrán es beneficiaria de una beca FPI del MICINN (PRE 2019-087768).

P5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ACEITUNAS CON APLICACIÓN IN VITRO DE LOS EXTRACTOS FERMENTADOS CONTRA LOS PRINCIPALES PATÓGENOS DEL OLIVO

M. Riolo^{1,2}, C. Luz³, E.I. Rovetto¹, G. Meca³, S.O. Cacciola¹

¹Department of Agriculture, Food and Environment, University of Catania, 95123 Catania, Italy.

²Department of Agricultural Science, Mediterranean University of Reggio Calabria, 89122 Reggio Calabria, Italy. ³Laboratorio de Ciencias de la Alimentación y Toxicología, Facultad de Farmacia,

Universitat de València, Burjassot, València.

Giuseppe.meca@uv.es

El olivo es uno de los cultivos más importantes en las regiones mediterráneas. Según datos del International Olive Oil Council, se cultivan más de 10 millones de hectáreas de olivo en todo el mundo y el 95% de ellas se encuentran en la cuenca Mediterránea. España, junto con Italia, son los principales productores de aceite y aceitunas de mesa. En la última década, como consecuencia del cambio climático, la globalización y la intensificación de los sistemas de cultivo, están aumentando las enfermedades de las plantas que afectan a la calidad del producto. La Directiva Europea 2009/128/CE tiene como objetivo minimizar los riesgos del uso de fungicidas sintéticos y de pesticidas en la agricultura. El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar diferentes bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de drupas de olivo, reconocidas como seguras (GRAS) y la investigación y caracterización de los compuestos de origen natural, como los metabolitos antifúngicos producidos por las lactobacterias. La caracterización de los ácidos orgánicos y fenólicos se realizó mediante los métodos HPLC y Q-TOF-MS, respectivamente. Así mismo, los compuestos orgánicos volátiles se realizaron por HS-SPME y posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Además de la caracterización en términos de ácidos orgánicos, fenólicos y compuestos volátiles, las diferentes bacterias lácticas y sus extractos fermentados se probaron in vitro contra los principales patógenos del olivo. Los resultados preliminares indican que las cepas *Lactiplantibacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* mostraron una alta actividad antifúngica contra *Colletotrichum spp.*, *Penicillium spp.*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. El análisis de componentes principales de los metabolitos producidos por las BAL ensayadas mostró que algunas cepas tenían una mayor cantidad de compuestos alcohólicos y cetónicos, lo que confirmó los resultados positivos de las pruebas *in vitro*. Se trata de resultados preliminares destinados a seleccionar las cepas que muestran una mayor actividad antifúngica para el desarrollo de un producto de aplicación *in vivo*.

Keywords: metabolitos, BAL, olivo, hongos, PCA

P6. BIOPRESERVACIÓN DE PANES MEDIANTE LA ADICIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN MASAS MADRE

F. Illueca¹, C. Lafuente¹, V. D'Opazo¹, A. Molina¹, M. Singh², L. Escrivá¹, G.Meca¹

¹*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia, España.*

²*Agrosup Dijon, L'Institut Agro Dijon, Universite Bourgogne Franche Comte, France.*

Francisco.illueca@uv.es

Actualmente, el consumidor busca sustituir conservantes de origen sintético por nuevos métodos de bioconservación. Uno de los más antiguos consiste en la fermentación de los alimentos. En el caso de los panes, existe una tendencia de elaborar panes de masa madre, que fermentan gracias a la propia microbiota de la harina y presentan unas características específicas. Además, también se utilizan habitualmente cultivos iniciadores que aceleran esta fermentación, normalmente bacterias ácido lácticas. En este trabajo se elaboraron panes de masa madre con la adición de cultivos iniciadores y se prepararon también como controles panes de masa madre espontánea y panes producidos con levadura comercial. A partir de ello, se estudió el impacto que tiene el cultivo iniciador sobre las propiedades del pan. También se analizaron los compuestos con actividad antifúngica producidos en los panes y se determinó el impacto que tiene la adición del cultivo iniciador en la masa madre sobre la fracción proteica de las masas y los panes. Por otra parte, se estudió la capacidad de bioconservación de las masas madre con un cultivo iniciador presentes en panes contaminados con hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Además, se analizó el impacto del cultivo sobre el contenido de micotoxinas presentes en estos panes. Los resultados mostraron diferencias significativas respecto a los controles en pH, acidez titulable y volumen específico. En cuanto a compuestos antifúngicos, se detectó mayor contenido fenólico total y ácido láctico en los panes con mayor cantidad de cultivo iniciador. Además, en éstos se apreció un mayor contenido de alcoholes y ésteres. Por otra parte, la adición de cultivos iniciadores produjo la hidrólisis de las proteínas encontradas en la banda de 50 kDa. Una mayor concentración de cultivo iniciador mostró un retraso de crecimiento fúngico y una reducción del contenido de AFB1 y AFB2 respecto al control.

Keywords: biopreservación, bacterias ácido lácticas, masa madre, *Aspergillus*, *Penicillium*

P7. BIOPRESERVACIÓN DE PAN DE MOLDE MEDIANTE EL USO DE MASAS MADRE

C. Lafuente, J. Calpe, V. D'Opazo, L. Musto, JM. Quiles, G. Meca

Laboratorio de Química de los alimentos y Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, España.

Jorge.calpe@uv.es

El deterioro de los alimentos causado por los hongos micotoxigénicos representa un problema importante en seguridad alimentaria, por lo que resulta fundamental establecer estrategias de prevención, vigilancia y control a lo largo de la cadena de suministro. Además, la población cada vez más está concienciada en aspectos sobre inocuidad alimentaria y salud, existiendo cierto rechazo al uso de aditivos sintéticos en las formulaciones de los productos de consumo, abriendo un nicho de mercado al uso de ingredientes y extractos naturales. La bioconservación es una aplicación biotecnológica preventiva que consiste en el uso de microorganismos o sus productos metabólicos en los alimentos para inhibir el crecimiento microbiano, con el objetivo de mejorar la seguridad alimentaria y prolongar la vida útil de los productos alimentarios. En ese sentido el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) es uno de los métodos más antiguos para preservar los alimentos, además de aportar unas cualidades organolépticas y nutricionales características mediante metabolitos como los ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, bacteriocinas o péptidos, entre otros; son utilizados como probióticos por la industria alimentaria. En este trabajo se evaluará el uso de masas madre para alargar la vida útil del pan de molde, a través del aislamiento de BAL y levaduras y posterior estudio de su potencial uso como bioconservante natural.

Keywords: vida útil, biopreservación, bacterias ácido lácticas, actividad antifúngica, pan de molde

P8. BIOCONSERVACIÓN DE PAN EMPLEANDO UN INGREDIENTE A BASE DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA CERVECERA FERMENTADO POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

C. Luz, L. Musto, R. Torrijos, C. Lafuente, A. Molina, F. Illueca, G. Meca

Laboratorio de Química de los alimentos y Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, España.

carlos.luz@uv.es

El bagazo de la cerveza es considerado el principal desecho de la industria cervecera. Es el producto resultante del proceso de prensado y filtración del mosto obtenido del grano de cebada malteado. Al ser un ingrediente rico en nutrientes, puede llegar a ser un buen sustrato para la fermentación de bacterias ácido lácticas (BALs). En este trabajo se desarrolló un ingrediente bioactivo a partir de medios de cultivo a base de bagazo de cerveza y levadura fermentados por BALs. Posteriormente, se introdujo este ingrediente en forma de polvo en el pan, con el objetivo de evaluar su actividad antifúngica. Para la determinación de la actividad antifúngica de los medios fermentados se emplearon una selección de hongos toxigénicos como *A. alternata*, *A. flavus*, *F. graminearum* y *P. commune*. Por otro lado, las BALs *Lactobacillus plantarum* H1 y L1 empleadas en este estudio fueron seleccionadas por su potencial antifúngico evidenciado en trabajos anteriores. Tanto en los medios fermentados como en el pan, los principales metabolitos derivados de la fermentación con actividad antifúngica (ácido láctico y ácido feniláctico) así como otros parámetros de interés como la actividad antioxidante y el contenido en polifenoles totales fueron analizados. Finalmente, se evaluó la actividad antifúngica del ingrediente fermentado en pan inoculado con *A. flavus* y *P. nordicum*, mediante el ensayo de vida útil del pan, el recuento de hongos, y la determinación de micotoxinas. Los resultados evidenciaron una actividad antifúngica de los medios a base de bagazo y levadura fermentados por las BALs. El medio con 15 % de bagazo y 1 % de levadura fermentado por L1 evidenciaron un 58.3 % de reducción del crecimiento de *A. alternata in vitro*, una reducción del crecimiento fúngico en pan, así como una reducción de la producción de aflatoxinas en los panes inoculados con *A. flavus*.

Keywords: bagazo, bacterias ácido lácticas, hongos toxigénicos, actividad antifúngica, pan

P9. ESTUDIO *IN VITRO* DE UN RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO CON METABOLITOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CONTRA PATÓGENOS DE CÍTRICOS

V. D'Opazo¹, J. Calpe¹, A. Moreno¹, M. Riolo^{2,3}, G. Meca¹, J. Mañes¹

¹*Laboratorio de Química de los Alimentos y Toxicología, Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. España.*

²*Department of Agriculture, Food and Environment, University of Catania, 95123 Catania, Italy.*

³*Department of Agricultural Science, Mediterranean University of Reggio Calabria, 89122 Reggio Calabria, Italy.*

Victor.dopazo@uv.es

Diferentes productos fitosanitarios han demostrado ser efectivos contra la contaminación postcosecha de cítricos. No obstante, solo un bajo número de estos productos son de origen biológico, la mayoría son productos de origen sintético. La aplicación de estos productos en envases antimicrobianos es una de las técnicas más prometedoras a día de hoy. Dentro del marco propuesto por la EFSA de reducir el uso de conservantes sintéticos y de encontrar nuevos aprovechamientos a los residuos generados por la industria alimentaria, en este trabajo se trató de cumplir estos objetivos de dos maneras. Primero, se preparó un medio de cultivo de bacterias ácido lácticas que empleó desechos de la industria de los cítricos. Para ello se prepararon medios de cultivo que incorporaron pieles de naranja y de limón en su composición y se fermentaron con una serie de bacterias aisladas de diversos cítricos. La actividad antifúngica de estos medios fermentados se evaluó mediante el ensayo de la difusión en agar y mediante el estudio de la mínima actividad inhibitoria y mínima actividad antifúngica (MIC-MFC). Segundo, tras la evaluación se seleccionó el medio fermentado con mayor actividad antifúngica y se empleó, a distintas concentraciones, para la preparación de un bio-recubrimiento con quitosano que se estudió en un test *in vitro* contra diferentes hongos contaminantes de cítricos. Los resultados de la actividad antifúngica evidenciaron que el medio producido con piel de limón y fermentado por la bacteria 5L1 presentaba la mayor actividad contra el crecimiento de hongos. En cuanto al estudio de los recubrimientos el que incorporaba la máxima concentración de producto logró inhibir el crecimiento en placa contra todos los hongos estudiados. Con estos prometedores resultados se va a buscar en un futuro aplicar este tratamiento en pruebas para alargar la vida útil de distintos cítricos mediante el empleo de este recubrimiento.

Keywords: bacterias ácido lácticas, cítricos, hongos, postcosecha, recubrimiento

P10. FERMENTACIÓN DEL SALVADO DE ARROZ POR BACTERIAS LÁCTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE UN INGREDIENTE BIOACTIVO APLICABLE EN PAN

L. Musto, C. Luz, C. Lafuente, A. Molina, F. Illueca, J. Calpe, G. Meca

Laboratorio de Química de los alimentos y Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, España.

Carlos.luz@uv.es

El salvado de arroz (SA) es uno de los principales subproductos de la industria arrocera. La producción anual en España de arroz blanco es de 750 millones de kg aproximadamente, lo cual supone un deshecho de unos 60 millones de kg anuales de SA. Para propiciar el desarrollo de la economía circular, la industria alimentaria busca una aplicación que revalorice este subproducto.

En este estudio se elaboraron medios de cultivo a base de SA a diferentes porcentajes. Para la fermentación de los medios se aislaron dos cepas de *Lactobacillus plantarum*: H1 (de heces de bebé) y L1 (de leche materna). Tras la fermentación, fueron cuantificados el ácido láctico y el ácido feniláctico (PLA), mediante HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS-TOF respectivamente. También se evaluó la actividad antifúngica de los medios mediante un ensayo *in vitro* frente a las especies de hongos micotoxigénicos *A. flavus* y *P. nordicum*. Posteriormente, se seleccionó y liofilizó un medio de cultivo con el fin de obtener un ingrediente y aplicarlo en pan a distintas concentraciones. Finalmente se realizó un recuento de hongos *in vitro*. Para ello, los panes fueron contaminados con esporas de *A. flavus* y *P. nordicum*, y posteriormente almacenados. Tras el almacenamiento, se realizó el recuento microbiológico y la cuantificación de aflatoxinas en los panes contaminados mediante HPLC-ESI-MS-TOF.

Los resultados ofrecieron valores máximos de ácido láctico y PLA de 32.6 g/L y 32.4 mg/L respectivamente, así como porcentajes de reducción de crecimiento fúngico del 25 y 43% para *A. flavus* y *P. nordicum* respectivamente. Así, se seleccionó el medio con un 20% de salvado fermentado por *Lactobacillus plantarum* H1. Los panes con un 20% del ingrediente ofrecieron en el recuento microbiológico una reducción logarítmica con respecto del control de 0.7 y 0.9 para *A. flavus* y *P. nordicum* respectivamente, así como una reducción total de aflatoxinas del 96.6%.

Keywords: salvado de arroz, actividad antifúngica, bioconservación, bacterias lácticas, aflatoxinas

P11. OCCURRENCE OF MAJOR MYCOTOXINS AND THEIR DIETARY EXPOSURE FROM NUTS, DRIED FRUITS AND TRADITIONAL FOODS FROM ALGERIA

A. Belasli¹, D. Djenane¹, M. Herrera², A. Ariño²

¹*Laboratoire de Qualité et Sécurité des Aliments, Département Technologie Alimentaire (Université de Tizi-Ouzou) Algeria.*

²*Veterinary Faculty, Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (University of Zaragoza - CITA) Spain.*

azem.belasli@ummo.dz

Aflatoxins (AFs), ochratoxin A (OTA), deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) are among the most internationally important mycotoxins in food. Recent studies have confirmed the FAO's estimate that mycotoxins are present in 25% of the world's food crops. In economically developing countries like Algeria, the data dealing with this context are very scarce. In this study, mycotoxins were analysed by HPLC and screening methods in 198 samples collected from different regions of Algeria during 2019. The samples included nuts (peanuts, almonds, and walnuts), dried fruits (dates and figs) and traditional foods made from cereals, which were included in a dietary survey to calculate the food consumption. Then, dietary exposure to mycotoxins was estimated to assess the health risk for the Algerian population. In 41.4% of the samples, at least one mycotoxin was detected. The incidences of total AFs, aflatoxin B1, OTA and DON were 37.4%, 18.2%, 12.7% and 8.5%, respectively, while ZON was not detected in any sample. The maximum values recorded were, 6.21 µg/kg for total AFs, 5.25 µg/kg for aflatoxin B1, 0.79 µg/kg for OTA and 470 µg/kg for DON. Four peanut samples showed levels of aflatoxin B1 above the EC maximum limit set at 2.0 µg/kg. Based on the margin of exposure (MoE) approach, the dietary exposure in the lower bound scenario for aflatoxins B1 and G1 through the consumption of certain foods would pose a health risk for the average Algerian adult of 60 kg. However, in the upper bound scenario, the risk would be higher as exposure would be extended to all four aflatoxins. The estimated exposures to OTA, DON and ZON were considered safe for adult consumers.

Keywords: mycotoxins, nuts, dried fruits, Algerian traditional foods, dietary exposure

Acknowledgements: The authors thank the financial support of the Spanish State Research Agency (PID2019-106877RA-I00) and the Government of Aragón (Grupo A06_20R).

P12. DISTRIBUTION AND STABILITY OF AFLATOXIN M1 DURING THE PROCESSING AND RIPENING OF RAW SHEEP'S MILK CHEESE

T. Juan^{1,2}, M. Martínez-Pineda³, R. Bodas⁴, M. Herrera², J.R. Bertolín^{1,2}, D. Delgado⁴, C. Asensio-Vegas⁴, S. Lorán², J.J. Carramiñana², C. Yagüe^{2,3}, A. Ariño²

¹*Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), 50059 Zaragoza, Spain.*

²*Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), Facultad de Veterinaria, 50013 Zaragoza, Spain.* ³*Facultad de Ciencias de la Salud y del Deporte, 22002 Huesca, Spain.* ⁴*Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Área de Investigación Ganadera, 47071, Valladolid, Spain.*

tjuan@cita-aragon.es

Aflatoxin M1 (AFM1) is the hydroxylated metabolite of aflatoxin B1 (AFB1) and can be found in milk and dairy products obtained from livestock that have ingested contaminated feed. However, the available scientific information on the transfer of AFM1 from milk to dairy products is scarce, especially in the case of products made from sheep's milk. This study aimed to elucidate the distribution and fate of AFM1 in raw sheep's milk cheese and whey during cheese making as well as the stability of the toxin during cheese ripening.

Six batches of cheese were manufactured from naturally contaminated sheep's milk (AFM1 between 172 - 216 ng/L) obtained from dairy sheep exposed to an AFB1 challenge in feed. AFM1 in raw milk, whey and cheese was determined by a method based on immunoaffinity cleanup (IAC) and Ultra High Performance Liquid Chromatography (UPLC) coupled to fluorescence detector (FLD), with limits of detection of 0.92 ng/kg in milk and whey and 9.86 ng/kg in cheese. The carry-over rate of AFM1 was calculated as the percentage of the total amount of AFM1 in the starting raw milk that was present in the final products (whey and cheese at manufacturing, 60 and 120 days of ripening), taking into account the cheese yield. During cheese making, 45% of the AFM1 present in the sheep milk passed into the whey, while 55 % was retained in the curd. It has been reported that AFM1 tends to bind more to casein than to whey proteins, resulting in higher toxin content in curds than in whey. After 60- and 120-days ripening, the concentrations of AFM1 in cheese were 3.67 and 3.98 times higher, respectively, than in the initial milk. Sheep cheese has been shown to retain an important part of the aflatoxin M1 present in milk, so the impact of its consumption on public health should be examined.

Keywords: aflatoxin M1, sheep, cheese, whey, milk, carry-over

Acknowledgements: The authors thank the financial support of the Ministry of Science and Innovation (INIA RTA 2017-00085-C2) and the Government of Aragón (Grupo A06_20R).

P13. A HIGH-SENSITIVE ANALYTICAL PROCEDURE FOR THE DETERMINATION OF EMERGENT MYCOTOXINS IN FORAGE SAMPLES

N. Campillo¹, M. García-Nicolás¹, N. Arroyo-Manzanares¹, V. Rodríguez-Estévez², P. Viñas¹

¹*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", University of Murcia, E-30100 Murcia, Spain.*

²*Department Animal Production, Faculty of Veterinary, Campus Univ. Rabanales, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain.*

ncampi@um.es

Animal feeding stuffs contain a high proportion of forage crops, which under adverse growing, production or storage conditions, fungal spoilage with some degree of mycotoxin contamination is likely to occur. This work proposes the determination of the emerging mycotoxins enniatins (ENNs) and beauvericin (BEA) in forage samples, using a sample treatment based on dispersive magnetic solid phase extraction (DMSPE) and analysis by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Initially, all parameters related to the DMSPE step were optimised. Thus, the nature of the extractant phase was assessed by testing different types of nanomaterials. The best results were obtained using ferrite nanoparticles (Fe₃O₄) coated with polypyrrole (PPy). Subsequently, two different multivariate analyses were carried out for the optimization of adsorption (Fe₃O₄@PPy suspension volume, adsorption time and NaCl concentration) and desorption parameters (nature and volume of desorption solvent and desorption time) to consider possible interactions between variables at each step of the DMSPE. Validation of the method was carried out in terms of linear dynamic range, limits of detection and quantification, precision, trueness, and matrix effect. To check the applicability of the method, 84 forage samples were analysed, resulting in the detection of some of the ENNs studied and of BEA in most of them. ENNB showed the highest concentration in the samples.

Keywords: forage, emerging mycotoxins, dispersive magnetic solid phase extraction, mass spectrometry

Acknowledgements: The authors acknowledge the financial support of Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM, Fundación Séneca, Project 21665/PDC/21). M. García-Nicolás acknowledges a fellowship 21464/FPI/20 from Fundación Séneca.

P14. ESTUDIO SOBRE LA BIOACUMULACIÓN DE MICOTOXINAS EMERGENTES EN ÓRGANOS Y TEJIDOS HUMANOS

N. Arroyo-Manzanares, A. Castell, R.M. Palma-Manrique, N. Campillo, P. Viñas

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, “Campus Mare-Nostrum” de Excelencia Internacional, Universidad de Murcia, E-30100, Murcia, España.

natalia.arroyo@um.es

Las eniانتinas (A, A1, B y B1) y la beauvericina, conocidas como micotoxinas emergentes, se producen principalmente en cereales, entrando en la cadena alimentaria a través de su consumo. A pesar de no estar legisladas debido a la falta de estudios concluyentes sobre su toxicidad, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sugiere que se considere el peligro que puede suponer la exposición crónica de estas micotoxinas. Este trabajo tiene como objetivo su detección y cuantificación en diferentes órganos y tejidos humanos (hígado, riñón, pulmón, corazón, cerebro y grasa), con el fin de estudiar su bioacumulación en el organismo. Para ello, se propone un método analítico basado en una extracción líquido-líquido asistida por sal seguida de una microextracción líquido-líquido dispersiva y el análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.

El método propuesto se validó obteniendo bajos límites de cuantificación con recuperaciones por encima del 80,3 %. En los estudios de precisión del método se obtuvieron valores de desviación estándar relativa menores del 12 %. El método fue aplicado para el análisis de muestras procedentes de 29 autopsias forenses. Los resultados mostraron una mayor bioacumulación de estas micotoxinas en el hígado, especialmente de la eniانتina B. El pulmón fue el único órgano en el que se detectaron todas las micotoxinas estudiadas, aunque a concentraciones más bajas, mientras que en la grasa y el corazón únicamente se detectó la beauvericina en alguna de las muestras forenses analizadas.

Keywords: micotoxinas emergentes, bioacumulación, tejidos humanos, espectrometría de masas

Acknowledgements: The authors acknowledge the financial support of Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM, Fundación Séneca, Project 21665/PDC/21).

P15. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE MICOTOXINAS REGULADAS Y EMERGENTES MEDIANTE HPLC-Q-TOF-MS EN ORINA HUMANA

P. Vila-Donat, N. Dasí-Navarro, G. Font, M. Lozano, L. Manyes

Laboratorio de Química de los Alimentos y Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España.

pilar.vila@uv.es

La co-exposición a micotoxinas a través de la alimentación es frecuente, por lo que monitorizar la ingesta humana es una preocupación creciente. La toxicidad y efectos perjudiciales de las micotoxinas reguladas son ampliamente conocidos, en cambio, los efectos y presencia en alimentos de las micotoxinas emergentes están siendo estudiados actualmente. La biomonitorización mediante orina tiene como principal ventaja una recogida de muestras no invasiva. El objetivo de este trabajo es validar un método sensible, que sea capaz de determinar en orina simultáneamente la concentración de 10 micotoxinas (Eniatina A, Eniatina B, Eniatina A1, Eniatina B1, Beauvericina, Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2 y Ocratoxina A), además de realizar un cribado de otras micotoxinas presentes. La identificación metabolómica se realizó comparando las masas moleculares de los compuestos detectados en los espectros obtenidos tras ser procesados con el software MassHunter (Agilent) con los presentes en la base de datos METLIN. Para la optimización del método, se probaron diferentes procedimientos de extracción, y finalmente el método basado en QuEChERS y HPLC-Q-TOF-MS se validó en términos de linealidad, precisión y sensibilidad, límites de detección y cuantificación, recuperaciones y efecto matriz. Con las rectas matriz se obtuvieron coeficientes de regresión (R^2) de 0,998-0,999. Los límites de detección y cuantificación oscilaron entre 0,1-5,0 ng/ml y 0,3-15,0 ng/ml, respectivamente, y las recuperaciones fueron mayores del 70%. El método validado según la Decisión de la Comisión 2002/657/EC, es idóneo para su aplicación en estudios multi-micotoxinas de biomonitorización humana.

Keywords: biomonitorización, metabolómica, micotoxinas, orina, QuEChERS

Acknowledgements: Este estudio ha sido financiado por la Generalitat Valenciana (GV/2021/111). Nuria Dasí-Navarro agradece a la Generalitat Valenciana por el contrato (EDGJID/2021/112).

P16. UNRAVELLING THROUGH TRANSCRIPTOMICS THE ROLE OF FUNCTIONAL FOOD AGAINST AFB1 AND OTA IMMUNE TOXICITY *IN VITRO*

L. Manyes, G. Font, M. Lozano, M. Frangiamone

Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Carrer Vicent Andrés Estellés s/n. 46100 Burjassot, (Faculty of Pharmacy, Universitat de València), Spain.

lara.manyes@uv.es

The use of bioactive compounds has been recently proposed as a new food strategy to mitigate mycotoxins absorption and prevent their systemic effects on human and animal health. Pumpkin (P) is rich in carotenoids (β -carotene, lutein, lycopene and zeaxanthin) that play an important role to protect cells from oxidative stress and damage. Milk whey is an optimal source of functional compounds, such as antifungal peptides, and an excellent substrate for lactic acid bacteria fermentation, producing fermented whey (FW). The aim of this work is to study the protective effect of P and FW in combination against AFB1 and OTA immune toxicity at transcriptional level in human lymphoblastic Jurkat T cells using digested bread extracts. Jurkat cells were treated during 7 days to AFB1 and OTA (both chemical standards at 100 nM) individually and in combination being the control DMSO 0.1%. They were also exposed to four digested bread extracts: Control P-FW, AFB1 P-FW (196 nM), OTA PE-FW (1087 nM), AFB1-OTA P-FW (187+837 nM). RNA-sequencing analysis showed that AFB1-exposure resulted in 99 differentially expressed genes (DEGs) while 77 DEGs were obtained in OTA-exposure and 3236 DEGs in the combined AFB1-OTA exposure (p -value ≤ 0.05 and $\log_2FC \geq |1.0|$). These results show DNA damage induced by AFB1, metabolic reprogramming promoted by OTA, and cell death linked to oxidative stress triggered by the mixed exposure. When including the functional ingredients, AFB1 condition reduced DEGs to 34, but increased OTA to 3450, while the combined condition remained similar with 3264 DEGs. The main biological process related to AFB1 exposure was regulation of cell morphogenesis, to OTA was cellular response to cytokine stimulus, and to the combined condition, type I interferon signaling pathway. The overall gene expression of Jurkat T cells exposed to digested extracts significantly differs from the profile found after chemical standard mycotoxin exposure.

Keywords: mycotoxin, pumpkin, fermented whey, Jurkat, omics

Acknowledgements: This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2019-108070RB-I00-ALJ).

P17. DEVELOPMENT OF A MULTI-TOXIN UPLC-MS/MS METHOD FOR 50 MYCOTOXINS AND TROPANE ALKALOIDS IN CEREAL COMMODITIES

N. Dreolin, H. Foddy, S. Hird, P. Hancock, T. Jenkins

WATERS Corp., Stamford Avenue, Altrincham Road, Wilmslow, Cheshire, SK9 4AX, UK.

Nicola Dreolin@waters.com

Mycotoxins are naturally occurring, notoriously toxic compounds to both humans and animals. They can occur in high frequency and concentrations in cereals, and in other food and feedstuffs. The demand for testing for masked, modified, and emerging mycotoxins has significantly increased over the last decade, as ongoing studies provide a steady stream of insights about newly discovered mycotoxin metabolites - as do plant breeding efforts adapting to a changing climate. Hence, there is a need to extend the scope of analysis to cover these compounds not already legislatively regulated.

A multi-toxin UPLC-MS/MS method for 50 regulated and emerging mycotoxins, atropine, and scopolamine in cereal-based products was developed. A mixture of wheat, barley, rice, and maize flours were extracted using a simple “dilute-and-shoot” protocol, without clean-up or internal standards. Calibration curves were plotted using solvent standards and matrix-matched calibration. Coefficients of determination (R²) were almost all > 0.99. The calibration range covered three orders of magnitude for most analytes, and values for relative standard deviation (%RSDr) were ≤10% for all analytes. Matrix effect ranged from -100% to +83 %. Data was imported into the waters_connect for quantitation software and processed with the MS Quan app for an improved efficiency in data processing and review. Ion ratios and retention times from the spiked test portions agreed well with the criteria specified in the SANTE guidelines 12089/2016 for all compounds.

The sensitivity of the Xevo TQ-XS allows considerable dilution of the sample extract while still reaching extremely low limits of quantification - the lowest method limit of quantification (m-LOQ) was for aflatoxins (0.1 µg/kg).

Keywords: mycotoxins, multi-toxin method, dilute & shoot, LC-MS/MS

P18. DETERMINATION OF EMERGING MYCOTOXINS IN CHICKEN FEED AND EGGS FROM ALGERIA

C. Laouni¹, M. Hernández-Mesa², F.J. Lara², A. Messai¹, A.M. García-Campaña², L. Gámiz-Gracia²

¹ *Dept. of Agronomical Sciences, Faculty of Exact Sciences and Natural and Life Sciences, University of Biskra, Algeria;* ² *Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain*

lqamiz@uqr.es

Due to Algerians' increasing demand for sources of protein, poultry farming has become one of the country's most productive agricultural sectors. According to studies, mycotoxins can contaminate chicken feed and pose a serious danger to the production and quality of eggs in the commercial layer industry. Cereals make up the majority of chicken feed, therefore it is crucial to address the issue at its source. In this context this work has been focused on the detection of emerging mycotoxins (enniatins and beauvericin), in poultry feed and eggs from different locations from Algeria. Extraction of mycotoxins was performed by QuEChERS-based extractions, using acidified acetonitrile and methanol for feed and lyophilized eggs, respectively. The determination was achieved by UHPLC-MS/MS analysis using a gradient of 0.1% formic acid (aqueous) and methanol as mobile phase for separation, an ESI interface operating in positive mode and a triple quadrupole operating in MRM for detection. Matrix matched calibrations were carried out for both matrices, obtaining good linearity ($R^2 > 0.99$). The method performance was assessed in terms of recovery (from 87% to 107%), matrix effect (from -47% to -86%), precision (RSD < 15%) and limits of quantitation ($\leq 1.10 \mu\text{g kg}^{-1}$ for feed and $\leq 0.82 \mu\text{g kg}^{-1}$ for eggs). The analysis of 10 chicken feed samples and 35 egg samples showed that ENNB1 was the most common mycotoxin (9 samples) with contamination levels from 3.6 to 41.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, while BEA was detected only in one sample (12 $\mu\text{g kg}^{-1}$). However, eggs were not contaminated with any mycotoxins. These outcomes can be explained by the application of mycotoxins binder.

Keywords: poultry feed; eggs; enniatins; beauvericin

P19. ACUTE AND SUBACUTE EFFECTS IN RAINBOW TROUT EXPOSED VIA FEED TO MYCOTOXINS

A. Valdehita, D. Hernández-Moreno, E. Bernal-Algaba E, F. Torrent, M.L. Fernández-Cruz

Dpto. Medio Ambiente y Agronomía, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid

facruz@inia.csic.es

Due to the introduction of vegetables in fish feed in the recent decades, the presence of different mycotoxins has been identified. However, there are few data on the toxicity that these substances can cause in these organisms. The objective of this study has been to evaluate the acute toxicity and subacute effects of fifteen mycotoxins (enniatins, fumonisins, aflatoxins, zearalenone, ochratoxin-A, deoxinivalenol (DON) and metabolites and nivalenol) for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The tests were carried out following the Test Guideline of the OECD No. 203 of acute toxicity tests in fish, but administering the mycotoxins through the feed instead of via water. Limit dose tests were applied by administering 100 mg mycotoxin/kg of feed over 96 hours. During the assay, any clinical signs of toxicity such as feed refusal, abnormal swimming behavior, decreased reaction to stimuli, and abnormal buoyancy were recorded. In addition, the induction of ethoxy-resorufin-o-deethylase (EROD) and the induction of the enzyme glutathione-S-transferase (GST) were studied in the fish livers. None of the mycotoxins induced lethal effects. Only the fish treated with DON and its metabolites showed clinical effects, as fish vomited food after 2 hours of treatment. The EROD activity was inhibited by some of the mycotoxins and some effects were observed on the GST induction. To study the involvement of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) on the EROD activity inhibition, the fish cell line RTL-W1 was co-exposed to those mycotoxins and to β -naphthoflavone (bNF), which is an agonist of the AhR. The induction of EROD provoked by bNF was inhibited or reduced by some of these mycotoxins depending on the concentration assayed. Our results indicated that mycotoxins produced marked subacute effects that should be further studied at lower concentrations, more representative of the levels found in feed.

Keywords: mycotoxins, fish, feed, EROD, antagonism

Acknowledgements: RTA2015-00041-00-00 project.

P20. *Aspergillus carbonarius* MUTANTS DEFECTIVE IN OCHRATOXIN A PRODUCTION AS POTENTIAL BIOCONTROL AGENTS

B. Llobregat, L. González-Candelas, A.R. Ballester*

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Calle Catedrático Agustín Escardino 7, Paterna 46980. Spain.

ballesterar@iata.csic.es

Aspergillus carbonarius is one of the main species responsible for toxin contamination of grapes and their derivatives, wine, coffee, and cocoa. Ochratoxin A (OTA), the major mycotoxin produced by *A. carbonarius*, is a secondary metabolite classified as a possible human carcinogen due to its high nephrotoxic character and the immunosuppressive effects that it triggers. A polyketide synthase (*pks*) gene encodes the first enzyme in the OTA biosynthetic pathway. In addition, in filamentous fungi, both pathway-specific gene clusters and global regulatory factors are known to regulate secondary metabolism. In particular, the VELVET family of regulatory proteins (VeA, VelB, LaeA, among others) work to coordinate fungal growth and secondary metabolites production.

In the present study, we have characterized the competitive exclusion of *A. carbonarius* *veA*- and *pks*-gene deletion mutants against the wild-type strain and their effect on ochratoxin A production. The knockout mutants displaced the wild-type strain during both *in vitro* growth and infection of grapes. Consequently, the establishment of the non-mycotoxigenic producer reduced the amount of OTA. Although a non-mycotoxigenic strain can still infect the fruits, the risk of mycotoxin contamination of the fruits will be reduced and the final product will be safer for human and animal intake. This preliminary study raises the possibility of using non-mycotoxigenic strains of *A. carbonarius* as biocontrol agents.

Keywords: *Aspergillus carbonarius*, ochratoxin A, competitive exclusion, *pks*, velvet

Acknowledgements: RTI2018-093392-A-I00 (AEI/FEDER, UE), AGROALNEXT/2022/028 (GVA, NextGenerationEU), PID2021-126005OB-I00 (MCIN/AEI/FEDER, UE), JAEIntro2019-CSIC (JAEINT_19_01896), PRE2019-089326 y RYC-2017-22009.

P21. PRELIMINARY REPORT ON THE OCCURRENCE OF AFLATOXINS IN RICE CONSUMED IN THE WEST OF ALGERIA

C. Khelifa Mahdjoubi^{1,2}, A.M. García-Campaña², L. Gámiz-Gracia²

¹ *Dept. Biology, Faculty of Natural and Life Science, University of Oran 1, Algeria;*

² *Dept. Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain*

lgamiz@ugr.es

Aflatoxins (AFs) are toxic secondary metabolites naturally produced by a variety of *Aspergillus* species, being aflatoxins B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) and G2 (AFG2) contaminants of concern in cereals. European Union (EU) fixed maximum AFB1 levels at 2 µg/kg and 4 µg/kg for total AFs content (AFB1+AFB2 +AFG1+AFG2) in cereals intended for human consumption, while in Algeria the maximum limits are fixed to 10 µg/kg for total AFs. However, in Algeria there is a lack of specialized laboratories for the control of these contaminants in cereals, and the data on the presence of AFs are limited with the subsequent risk for the consumers.

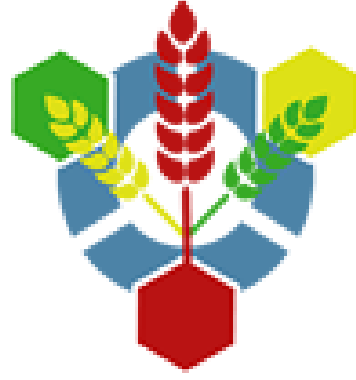
The aim of this study was to evaluate the incidence of AFs in rice samples from different markets in the west of Algeria, using an in-house validated analytical method based on a simple extraction using acetonitrile and determination by High Performance Liquid Chromatography coupled to Fluorescence Detection (HPLC-FLD) with online photoderivatization. The method provided recoveries in the range of 94–96%; relative standard deviations for intra-day and inter-day precision lower than 15% and limits of quantification from 0.068 to 0.099 µg/kg.

The analytical results revealed that 11 out of 30 samples (36.6%) were contaminated with at least one AF at concentrations from 0.13 to 0.86 µg/kg. Moreover, AFB1 was the most predominant AF, being present in 82% of the contaminated samples within the range of 0.13 to 0.65 µg/kg. None of the samples exceeded the permitted level for AFs set by both the EU and the Algerian authorities.

Considering the scarce information about the incidence of AFs in rice from Algeria and the high consumption of this cereal, it would be necessary to establish a continuous monitoring of these contaminants in Algerian rice with a higher number of samples and locations in order to evaluate the health risk associated, and to propose appropriate strategies to reduce AFs contamination in order to preserve the consumers health.

Keywords: aflatoxins, rice, HPLC-FLD, Algeria.

**Red nacional sobre las micotoxinas y hongos
toxigénicos y de sus procesos de descontaminación**



Micofood

