

Optical detection of microbial infestation and mycotoxins in beans (*Phaseolus vulgaris* L.)

**Dissertation to obtain the doctoral degree of
Agricultural Sciences (Dr. sc. agr.)**

Faculty of Agricultural Sciences

University of Hohenheim

Institute of Agricultural Engineering 440e

Tropics and Subtropics Group

submitted by

Catalina Alejandra Acuña-Gutiérrez

from San José, Costa Rica

2023

6 Summary

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) belongs to a group of the Fabaceae family known as pulses, which are legumes used exclusively for the production of dry grains. Common beans are widely consumed because of their nutritional benefits, such as high protein and dietary fiber contents. Despite their growing commercial and nutritional relevance, research on microbiological spoilage and subsequent mycotoxin buildup has lagged behind compared to cereals. Mycotoxins are secondary metabolites produced by certain filamentous fungi that threaten animal and human health. These molecules can cause acute intoxications, chronic effects, and even cancer. Therefore, many countries have set thresholds to prevent them from entering the human diet. Traditional mycotoxin detection methods are time-consuming and often require highly skilled personnel. To address this, optical detection methods can help to provide fast and reliable results. Nonetheless, research in this area has mainly focused on cereals. Therefore, this study aimed to test the feasibility and reliability of optical detection methods to measure microbial infestation and mycotoxin contamination in common beans. This dissertation is composed of three parts that focus on describing the advances in research related to fungal contamination and mycotoxin accumulation in pulses, followed by the detection of *Fusarium verticillioides*, and its mycotoxin, fumonisin B₁, in common black beans using optical detection methods.

In the first part, a comprehensive review of the presence of mycotoxins in pulses was carried out to assess the state-of-the-art. For this purpose, data were extracted from the scientific reports reviewed and classified into different groups: by continent, country/region where the studies were conducted or the samples were collected, their income according to the World Bank classification, mycoflora studied (if mentioned) and the mycotoxin(s) detected. In addition, the particular research interest of each study, and the detection methods used were analyzed. From this analysis, we were able to determine the presence or absence of correlations between fungal infection and mycotoxin accumulation. Moreover, the potential effect of phenolic compounds on fungal growth and mycotoxin accumulation was discussed, with examples in common beans. Particular emphasis was placed on phomopsins, as this mycotoxin is mainly found in pulses, especially in lupin. In addition, the negative effect of mycotoxins on seed and seedling physiology was discussed, focusing on reports on pulses. Finally, the absence of research into development of new techniques for the rapid and reliable detection of mycotoxins in pulses was noted.

The second part compared the feasibility of near-infrared spectrometry (NIRS) and hyperspectral imaging (HSI) in the early detection of *Fusarium verticillioides* contamination in common black beans. To ensure that only *F. verticillioides* was present on the bean samples, grains were minimally invasively disinfected with chlorine gas (Cl₂) and then artificially inoculated with the fungus of interest. Samples were taken every 24 h (from 0 to 72 h) for measurement with HSI (500 to 900 nm) and NIRS (680 to 2,500 nm). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used as reference and calibration method to quantify fungal growth. This reference method made it possible to follow fungal development even when it was not visible to the naked eye (from 0 to 48 h). For optical measurements, calibration models were performed using partial least square regressions (PLSR). NIRS had a higher accuracy ($R^2 = 0.91$) than the HSI model ($R^2 = 0.86$). It was possible to relate the main wavelengths from the regression coefficients of the models to changes in proteins, starch, pigments or fumonisins.

For the third part, and considering the previous study in which the results showed that NIRS provided a better predictive model and had a broader wavelength range than HSI, we chose the first method to detect the presence of fumonisin B₁ (FB₁) in common black beans. To test the feasibility of NIRS, two artificial contamination methods (spread and submersion, n = 18 for each method) were performed on individual grains. The samples were contaminated with standard solutions at 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 mg kg⁻¹. After contamination, the samples, each consisting of 24 grains, were analyzed whole or milled with the NIRS in the wavelength range from 680 to 2,500 nm. As for the contamination process, the spread contamination gave a better linear adjustment ($R^2 = 0.99$). The calibration models (PLSR) were constructed considering the type of sample (ground or whole) and the contamination method. As a result, the spread contamination in combination with sample grinding gave the best result ($R^2 = 0.92$). Since the experiments were performed under strict laboratory conditions and the samples were homogeneous, it was possible to deduce from the regression coefficients that the wavelengths related to the fumonisin were 1,273, 1,282, 1,374, and 1,870 nm.

In conclusion, the optical detection methods used in this study were able to reliably detect the presence of *F. verticillioides* and FB₁. Nevertheless, and because the tests performed in the present study were carried out under controlled laboratory conditions, there is still a need to validate the results with naturally contaminated samples. Further research is encouraged to develop a broader spectral database that includes contamination with various fungi and mycotoxins in pulses to

Summary

update research in this field and provide rapid detection methods that contribute to improved food safety.

7 Zusammenfassung

Die Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) gehört zu einer Gruppe von Hülsenfrüchten (Fabaceae), die ausschließlich für die Produktion von Trockenkörnern verwendet werden. Aufgrund ihrer ernährungsphysiologischen Vorteile, wie dem hohen Gehalt an Proteinen und Ballaststoffen, werden Bohnen sehr häufig konsumiert. Trotz ihrer zunehmenden kommerziellen und ernährungsphysiologischen Bedeutung ist die Forschung über den Verderb durch Mikroorganismen und die anschließende Bildung von Mykotoxinen im Vergleich zu Getreide zurückgeblieben. Mykotoxine sind sekundäre Metaboliten, die von bestimmten filamentösen Pilzen produziert werden und die Gesundheit von Mensch und Tier gefährden. Diese Moleküle können akute Vergiftungen, chronische Schäden und sogar Krebs verursachen. Daher haben viele Länder Grenzwerte festgelegt, um zu verhindern, dass sie in der menschlichen Ernährung vorkommen. Herkömmliche Mykotoxin-Nachweisverfahren sind zeitaufwändig und erfordern oft hochqualifiziertes Personal. Optische Nachweismethoden können hier Abhilfe schaffen und schnelle und zuverlässige Ergebnisse liefern. Die Forschung auf diesem Gebiet hat sich jedoch hauptsächlich auf Getreide konzentriert. Ziel dieser Studie war es daher, die Durchführbarkeit und Zuverlässigkeit optischer Nachweismethoden für die Messung des mikrobiellen Befalls und der Mykotoxinkontamination von Ackerbohnen zu testen. Diese Dissertation besteht aus drei Teilen, deren Schwerpunkt auf der Beschreibung von Fortschritten in der Forschung im Zusammenhang mit Pilzkontamination und Mykotoxinbildung in Hülsenfrüchten liegt, gefolgt vom Nachweis von *Fusarium verticillioides* und seinem Mykotoxin Fumonisin B₁ in schwarzen Bohnen mit Hilfe optischer Nachweisverfahren.

Im ersten Teil wurde eine umfassende Übersicht über das Vorkommen von Mykotoxinen in Hülsenfrüchten erstellt, um den Stand der Technik zu bewerten. Zu diesem Zweck wurden Daten aus den ausgewerteten wissenschaftlichen Berichten gesammelt und in verschiedene Gruppen eingeteilt: Kontinent, Land/Region, in dem die Studien durchgeführt oder die Proben entnommen wurden, Einkommen nach der Klassifizierung der Weltbank, untersuchte Mykoflora (falls erwähnt) und nachgewiesene Mykotoxine. Darüber hinaus wurden das besondere Forschungsinteresse jeder Studie und die verwendeten Nachweismethoden analysiert. Anhand dieser Analyse konnten wir feststellen, ob ein Zusammenhang zwischen Pilzbefall und Mykotoxinakkumulation besteht oder nicht. Außerdem wurde die potenzielle Wirkung phenolischer Verbindungen auf das Pilzwachstum und die Mykotoxinakkumulation anhand von

Beispielen aus Gartenbohnen diskutiert. Besonderes Augenmerk wurde auf Phomopsine gelegt, da dieses Mykotoxin hauptsächlich in Hülsenfrüchten, insbesondere in Lupinen, vorkommt. Des Weiteren wurden die negativen Auswirkungen von Mykotoxinen auf die Physiologie von Saatgut und Keimlingen angesprochen, wobei der Schwerpunkt auf Berichten über Hülsenfrüchte lag. Schließlich wurde das Fehlen von Forschungsarbeiten zur Entwicklung neuer Techniken für den schnellen und zuverlässigen Nachweis von Mykotoxinen in Hülsenfrüchten hervorgehoben.

Im zweiten Teil wurde die Durchführbarkeit der Nahinfrarotspektrometrie (NIRS) und der hyperspektralen Bildgebung (HSI) für die Früherkennung von *Fusarium verticillioides*-Kontaminationen in schwarzen Bohnen verglichen. Um sicherzustellen, dass nur *F. verticillioides* auf den Bohnenproben vorhanden war, wurden die Körner minimalinvasiv mit Chlorgas (Cl_2) desinfiziert und dann künstlich mit dem interessierenden Pilz inokuliert. Alle 24 Stunden (von 0 bis 72 Stunden) wurden Proben für Messungen mit HSI (500 bis 900 nm) und NIRS (680 bis 2.500 nm) entnommen. Als Referenz- und Kalibrierungsmethode zur Quantifizierung des Pilzwachstums wurde die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) verwendet. Mit dieser Referenzmethode war es möglich, die Pilzentwicklung auch dann zu verfolgen, wenn sie mit bloßem Auge nicht zu erkennen ist (von 0 bis 48 Stunden). Für die optischen Messungen wurden Kalibrierungsmodelle unter Verwendung partieller Kleinstquadratregressionen (PLSR) durchgeführt. NIRS hatte eine höhere Genauigkeit ($R^2 = 0,91$) als das HSI-Modell ($R^2 = 0,86$). Anhand der Regressionskoeffizienten der Modelle konnten wir die Hauptwellenlängen mit Veränderungen bei Proteinen, Stärke, Pigmenten oder Fumonisin in Verbindung bringen.

Für den dritten Teil und in Anbetracht der vorangegangenen Studie, in der die Ergebnisse zeigten, dass NIRS ein besseres Vorhersagemodell lieferte und einen breiteren Wellenlängenbereich als HSI hatte, wählten wir die erste Methode, um das Vorhandensein von Fumonisin B₁ (FB₁) in gewöhnlichen schwarzen Bohnen nachzuweisen. Um die Durchführbarkeit von NIRS zu testen, wurden zwei künstliche Kontaminationsmethoden (Ausbringung und Eintauchen, $n = 18$ für jede Methode) an einzelnen Körnern durchgeführt. Die Proben wurden mit Standardlösungen von 0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 und 10,0 mg kg⁻¹ kontaminiert. Nach der Kontamination wurden die Proben, die jeweils aus 24 Körnern bestanden, ganz oder gemahlen mit dem NIRS im Wellenlängenbereich von 680 bis 2.500 nm analysiert. Bezüglich des Kontaminationsprozesses ergab die gestreute Kontamination eine bessere lineare Anpassung ($R^2 = 0,99$). Die Kalibrierungsmodelle (PLSR) wurden unter Berücksichtigung der Art der Probe (gemahlen oder ganz) und des

Kontaminationsverfahrens erstellt. Das Ergebnis war, dass die gestreute Kontamination in Kombination mit dem Mahlen der Probe das beste Ergebnis lieferte ($R^2 = 0,92$). Da die Versuche unter strengen Laborbedingungen durchgeführt wurden und die Proben homogen waren, konnte aus den Regressionskoeffizienten abgeleitet werden, dass die Wellenlängen 1.273, 1.282, 1.374 und 1.870 nm im Zusammenhang mit dem Fumonisin stehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Studie eingesetzten optischen Nachweismethoden das Vorhandensein von *F. verticillioides* und FB₁ zuverlässig nachweisen konnten. Da die Tests in der vorliegenden Studie unter kontrollierten Laborbedingungen durchgeführt wurden, müssen die Ergebnisse jedoch noch mit natürlich kontaminierten Proben validiert werden. Weitere Forschungsarbeiten werden angeregt, um eine breitere Spektraldatenbank zu entwickeln, die die Kontamination mit verschiedenen Pilzen und Mykotoxinen in Hülsenfrüchten umfasst, damit die Forschung auf diesem Gebiet auf den neuesten Stand gebracht werden kann und schnelle Nachweismethoden angeboten werden können, die zur Verbesserung der Lebensmittelsicherheit beitragen.