

# TOXINERZEUGUNG VON FUSARIUMARTEN UND IHR VORKOMMEN IN LANDWIRTSCHAFTLICHEN PRODUKTEN

Von

R. LÁSZTITY und L. WÖLLER

Lehrstuhl für Biochemie und Lebensmitteltechnologie, Technische Universität

Budapest

(Eingegangen am 3. Oktober 1974)

Pflanzenpathologisch ist das *Fusarium* eine der wichtigsten Pilzgattungen. Durch die *Fusarium*arten wurden in den letzten Jahren in der ganzen Welt schwere Wirtschaftsverluste verursacht, bzw. werden einerseits durch die phytotoxische Wirkung der Toxine im Pflanzenbau, andererseits durch die zootoxische Wirkung der *Fusarium*-Toxine in der Viehzucht große Schwierigkeiten herbeigeführt.

In der klassischen Periode der Erforschung der toxischen Wirkung der *Fusarium*arten wurden diese biologisch aktiven Substanzen nach der toxischen Wirkung unterteilt. Nach den an Tieren beobachteten Symptomen wurden mehrere Toxingruppen berücksichtigt, wie z. B. der »oestrogene Faktor« oder der »emetic Faktor«. Zu dieser Zeit wurden die verschiedenen Tierkrankheiten herbeiführenden chemischen Stoffe noch nicht isoliert, es war lediglich nachgewiesen, daß in Gegenwart von *Fusarium*pilzen gewisse Krankheiten vorkommen.

Die Anfänge der *Fusarium*-Toxinforschungen sind mit dem Namen CHRISTENSENS [1] verknüpft, der mit seinen Mitarbeitern nach einer Arbeit von fast drei Jahrzehnten zu grundlegenden Feststellungen gelangte. Mehrere perfekte Formen der *Gibberella zeae* erzeugen Stoffe, die an verschiedenen Tierarten oestrogene Symptome verursachen. An jungen Schweinen wurden Vulvaaufschwellung, Scheidenvorfall und Eutervergrößerung beobachtet, während bei jungen Ratten in Virginitätszustand Gebärmuttervergrößerung verursacht wurde. Nach Feststellungen ungarischer Forscher führt das Toxin des *Fusarium graminearum* Pseudo-oestrus herbei; von PÁLYUSIK und Mitarbeitern [2] wurde die abträgliche Wirkung des Toxins auf die Spermatogenese von Gänserichen beobachtet.

Die grundlegenden Ergebnisse der toxikologischen Forschungen mit *Fusarium graminearum* werden von MIROCHA und CHRISTENSEN [3] veröffentlicht. Sie stellen fest, daß der auf Maisnährboden gezüchtete *Fusarium*-Stamm die Toxine F-1, F-2, F-3 mit östrogener Wirkung erzeugt. Von dem F-1 wurde festgestellt, daß es eine mit dem Ergosterin identische Substanz sei, während das Östrogen F-2 chemisch als 6-(10-Hydroxy-6-oxy-trans-1-undecil)- $\beta$ -

Resorzilsäure-Lakton bestimmt wurde. Die genannten Forscher setzten sich zum weiteren Forschungsziel, die bisher unbekannte chemische Struktur des Toxins F-3 zu klären.

Nach den bisherigen Ergebnissen darf ausgesagt werden, daß der letztere toxische Stoff, durch den vermutlich die Unfruchtbarkeit der Rinder, Schweine und des Geflügels verursacht wird, dem Toxin F-2, das Zearalenon genannt wird, chemisch sehr ähnlich ist. Diese Ähnlichkeit wird auch durch den Umstand bewiesen, daß F-3 sich bei dem chemischen Ausgewinnen des Zearalenons aus den Myzelien herauslöst und bei den gleichen Nachweisverfahren gut unterscheidbar vorhanden ist.

Aufgrund der Versuche mit den Toxinen von *Fusarium graminearum* darf festgestellt werden, daß in der Toxizität des mit *Fusarium* infizierten Maises das Zearalenon (Toxin F-2) die Hauptrolle spielt.

Es kommt oft vor, daß mit *Fusarium graminearum* infizierter Mais auf Tiere nicht toxisch wirkt. In solchen Fällen läßt sich jedoch die Gegenwart von Zearalenon chemisch nicht nachweisen. Diese überraschende Beobachtung wird durch die Versuche von PRENTICE und Mitarbeitern [4] erklärt, die die Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Biosynthese des Zearalenons bezweckten. Es ist aus früheren Erfahrungen bekannt, daß durch das *Fusarium graminearum* nur Toxin erzeugt wird, wenn es in einem gewissen Abschnitt der Inkubationszeit bei niedriger Temperatur gehalten wird. Die Versuche von PRENTICE beruhten auf dieser Beobachtung; die in sterilen Mais geimpften Pilzkulturen wurden verschiedene Zeit lang bei verschiedenen Temperaturen im Inkubator gehalten, sodann wurde der Grad der Biosynthese des Zearalenons und des Ergosterins geprüft. Während einer Inkubation von drei Wochen bei 12 °C wurden durch die Kulturen 3500 ppm Zearalenon, jedoch kein Ergosterin erzeugt. Unter gleichen Bedingungen verschob sich die Toxinproduktion der Pilzstämme bei 25 °C dem Ergosterin zu, es wurde aber kein Zearalenon gefunden. Weitere Versuchsergebnisse zeigen, daß die Pilze auch bei höherer Temperatur Zearalenon erzeugen können, wenn während der Inkubationszeit auch eine Periode mit niedrigerer Temperatur eingeschaltet war. Von den Temperaturen von 12, 27 und 32 °C stellt die Temperatur von 12 °C für die Zearalenonproduktion die Optimaltemperatur dar. Mit längerer Inkubationszeit nimmt auch die Toxinerzeugung zu. Es kann also festgestellt werden, daß die Zearalenonproduktion durch Temperatur und Inkubationszeit wesentlich beeinflußt wird.

Die physiologische und morphologische Variabilität der Mikroorganismen wird oft auch durch die Zusammensetzung des Nährbodens beeinflußt. Auch bei den Fusarien muß daran gedacht werden. Es wurden jedoch keine Untersuchungen zur Klärung des Zusammenhangs zwischen Toxinproduktion des *Fusariums* und der Nährboden-Zusammensetzung vorgenommen. Die Ergebnisse von CALDWELL und Mitarbeitern [5] verdienen jedoch Auf-

merksamkeit; sie wiesen für mehrere Fusariumarten Zearalenonproduktion nach, die bisher nur bei *Fusarium graminearum* beobachtet wurde.

Verschiedene Fusariumarten wurden isoliert und auf im Autoklav wärmebehandeltem Mais gezüchtet. Die Inkubation wurde bei 16 °C drei Wochen lang fortgesetzt, dann wurden die Kulturen mit absolutem Äthanol extrahiert. Aus den Extrakten wurde durch Dünnschichtchromatographie das Zearalenon in folgenden Fällen nachgewiesen: *F. roseum*, *F. roseum* »culmorum«, *F. roseum* »equiseti«, *F. roseum* »gibbosum«, *F. roseum* »graminearum« und *F. tricinctum*. Es sei auch erwähnt, daß unter den gleichen Bedingungen bei anderen Fusariumarten — *F. moniliforme*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *F. solani* — keine Toxinentwicklung beobachtet wurde. Den genannten Verfassern gegenüber wurde für *F.*-moniliforme auch ein positives Ergebnis erhalten. Es wurde auch ein *F.*-moniliforme-Stamm gefunden, der F-3 erzeugte, von MIROCHA und Mitarbeitern wurde sogar nachgewiesen, daß dieser Stamm Zearalenon in bedeutender Menge (8 mg F-2/g Mais) erzeugen kann. Auch von WÖLLER und Mitarbeitern [6] wurde bewiesen, daß *F. culmorum* unter gewissen Bedingungen Zearalenon erzeugt.

Von den Fusariumarten, die biologisch aktive Stoffe entwickeln, beschäftigte das *Fusarium tricinctum* zahlreiche Forscher. YATER und Mitarbeiter [7] erzielten in der Erforschung der Toxinproduktion hervorragende Ergebnisse. Die von ihnen isolierten *F.*-*tricinctum*-Stämme wurden 10 bis 12 Wochen lang bei 3 °C auf einem Sabouraud-Nährboden gezüchtet. Bei der Züchtung bei niedriger Temperatur gingen die Forscher davon aus, daß in den Staaten Pretoria, Wisconsin und Madison der USA die Mykotoxikose des Hornviehs stets zur Zeit der Winterweide beobachtet wurde, wenn die Temperatur zwischen 7 und 15 °C schwankt.

Die Toxine wurden durch Äthylacetat-Extraktion aus den Myzelien des *F. tricinctum* und von dem Nährboden gewonnen. Es wurde nachgewiesen, daß die Kultur drei Toxine von unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung im Mengenverhältnis 87 : 8 : 3 enthielt. Es handelte sich um Butenolid, eine unbekannte Verbindung und um das Toxin T-2. Inzwischen wurde von BAMBURG und Mitarbeitern [8] festgestellt, daß die unbekannte Verbindung Diacetoxy-scirpenol ist, mit von dem Toxin F-2 abweichender chemischer Struktur.

Durch *F. tricinctum* und *F. nivale* werden vor allem Süßgräser geschädigt und das erzeugte Toxin führte oft zur Erkrankung des Hornviehs. Wegen der in den USA beobachteten Fusariotoxikose wurden von GILGAN und Mitarbeitern [9] die toxischen Stoffe von *F. tricinctum* untersucht. Es wurden mehrere giftige Verbindungen isoliert, die in ihrer Mehrzahl verschiedene substituierte Folgeprodukte von Verbindungsgruppen mit Scirpengerüst darstellen. Eines der von diesen Forschern bestimmten Toxine war Diacetoxy-scirpenol. Durch weitere Forschungen wurde geklärt, daß in der Erkrankung

des Viehs eine sehr ähnliche Verbindung auch eine Rolle spielte, die von BAMBURG und Mitarbeitern [10] als Toxin T-2 bezeichnet wurde: nach der chemischen Struktur wurde sie als 4,15-diacetoxy-8-(3-Methylbutirilhydroxy)-12,13-Epoxy-9-Trichotechzen-3-al gekennzeichnet. In den metabolischen Produkten des *F. tricinctum*-Stammes wurde von den genannten Verfassern auch ein drittes Toxin gefunden, von dem es sich herausstellte, daß es sich von dem Toxin T-2 nur in einer Acetoxy-Gruppe unterscheidet.

Von YATES und Mitarbeitern [11] wurde aus *F. tricinctum* auch eine Verbindung mit von den Toxinen mit Scirpengerüst abweichenden Eigenschaften isoliert, nämlich Butenolid, d. h. 4-Acetamido-2-hydroxy-2-buttersäure- $\gamma$ -laktone. Auch bei dem Butenolid wurden die toxischen Eigenschaften nachgewiesen, es blieb jedoch ungeklärt, ob dieses allein die »Schwingelfuß-erkrankung« des Viehs verursacht.

Durch die ungünstige Veränderung der Getreideernte in Japan im Jahre 1963 wurde die Aufmerksamkeit auf die Toxinproduktion durch *F. nivale* gelenkt. Es wurden aus Kulturen auf Reis drei verschiedene, auch für den menschlichen Organismus schädliche, giftige Stoffe von MOROOKA und TATSUNO [12] sowie TSUNODA und Mitarbeitern [13] isoliert. Die chemische Struktur von Fusarenon, Fusarenon-X und Nivaleol wurde nicht beschrieben, es handelt sich jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach um ein scirpenartiges (sesquiterpenoides) Grundgerüst. Diese Toxine weichen von den Gliedern der durch *F. tricinctum* erzeugten, im Vorstehenden beschriebenen Toxingruppe ab. Ihre Wirkung macht sich vorwiegend im Knochenmark, in Milz, Lymphknoten bemerkbar und ruft dort verschiedene schädliche Erscheinungen hervor. Die Verwendung von mit scirpenartigen Toxinen infizierten Lebensmitteln und Futter ist einstweilen ungelöst, da sich die Toxine durch Wärmewirkung, gelind wirkende chemische Behandlung gar nicht verändern lassen.

Neuerdings wird aus Japan von der Erzeugung der toxischen Substanz *F. solani* berichtet [14], die besonders an Bohnen und Getreidepflanzen erscheint. Die Struktur des erzeugten Toxins wurde später auch mitgeteilt. Die biologische Wirkung zeigt sich darin, daß besonders bei Hühnern Schnabelausartungen, Zellenwucherungen hervorgerufen werden. Bei Verfütterung von mit *F. solani* infizierter Nahrung wurde erst nur Freßunlust, im weiteren Verenden beobachtet.

Die für Mensch und Tier schädlichsten Toxine werden durch die zu der Sporotrichoella-Gruppe gehörenden *F. sporotrichoides* und *F. nivale*, ferner durch *F. tricinctum* erzeugt. Von SARKISOW und Mitarbeitern [15] wurde die Toxinproduktion der *F. sporotrichoella* an Hirsen und Getreide untersucht und nachgewiesen, daß die Hämolyse und Herzlähmung verursachenden Substanzen das sog. Sporofusarin und Lipotoxol sind. In ihrer Struktur sind diese Verbindungen dem Zyklopentanoperhydrophenanthren sehr ähnlich. Von den Verfassern wurde festgestellt, daß sich die genannten Toxine auf Wir-

kung einer Alkalibehandlung zersetzen und das infizierte Getreide wird im Prinzip verwendbar. Nach SPESIWZE [16] sind die Zeichen der durch *F. sporotrichoella* verursachten Fusariotoxikose Erbrechen, Darmentzündung, in schwereren Fällen Verenden. Neuerdings werden von VOLINTIR und Mitarbeitern [17] auch genitalbiologische Störungen bei Schweinen diesen Toxinen zugeschrieben.

Die bisherigen Kenntnisse über die Toxinerzeugung der Fusarium-Pilzarten zusammengefaßt, läßt sich feststellen, daß durch diese einerseits genetische Toxine erzeugt werden, die für die Gattung *Fusarium* kennzeichnend sind, andererseits können einzelne Arten sowohl genetische als auch spezifische Toxine erzeugen. So kann z. B. das T-2 mit Scirpengerüst als das genetische Toxin des *F. tricinctum* gelten, letzteres kann jedoch unter gewissen Bedingungen auch Toxin F-2 erzeugen, das bekanntlich für *F. graminearum* kennzeichnend ist. Schließlich werden die metabolischen Produkte der Fusariumarten, die am häufigsten eine Fusariotoxikose verursachen, auch tabellarisch zusammengefaßt (s. Tabelle 1).

Bei unseren Forschungen versuchten wir, uns über die Häufigkeit der Fusariuminfektion und deren Einflußfaktoren vorhergehend zu informieren. Es wurde der Bereitung des als Teststoff von erforderlicher Reinheit verwendbaren Toxins F-2 eine große Sorgfalt zugewandt. Es wurde untersucht, welche von den vorkommenden Fusariumarten Toxin F-2 erzeugen, schließlich wurden anfängliche Untersuchungen zur Isolierung der neben dem Toxin F-2 vorkommenden anderen toxischen Komponenten und zu der annähernden Bestimmung von deren Struktur eingeleitet.

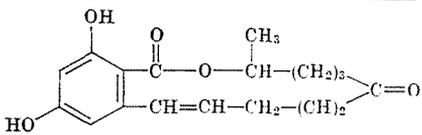
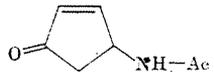
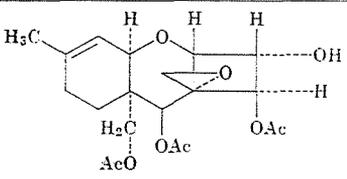
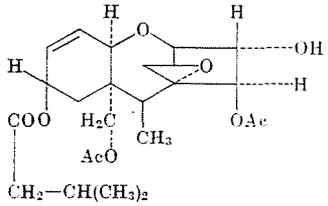
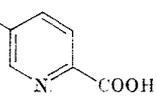
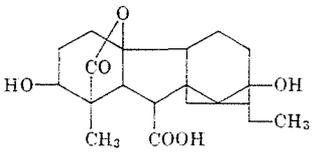
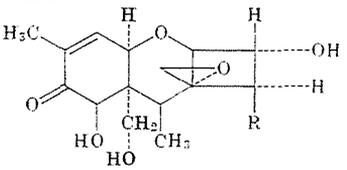
### Geprüfte Substanzen und Untersuchungsmethoden

Die Untersuchungen wurden an von den landwirtschaftlichen Betrieben des Landes beschafften, vermutlich mit *Fusarium* infizierten Weizen-, Mais- und Mischfutter-Proben durchgeführt. Seit dem Jahr 1970 wurden mehrere hundert Proben analysiert, von denen bei über 200 Proben die Infektion nachgewiesen wurde. Für die Herstellung des als Teststoff benutzten Toxinpräparats F-2 wurden einerseits Extrakte aus infizierten Rohstoffen, andererseits Extrakte der durch Fermentation aus reinen *Fusarium*kulturen bereiteten Myzelien benutzt.

### Bereitung des Toxinpräparats F-2

Für Toxinherstellung wurde zum Teil die von dem landwirtschaftlichen Betrieb zur Verfügung gestellte infizierte Mais-Lieferung verwendet, wobei der Rohauszug durch Chloroformextraktion gewonnen wurde. Die Extraktion

Tabelle I

Fusariumart	Toxin	Chemische Struktur
F. graminearum F. culmorum F. moniliforme F. tricinctum F. roseum	Zearalenon	
F. tricinctum	Butenoloid = 4-azetamido-4-hydroxy- -2-Buttersäure-Lakton	
F. scirpi F. tricinctum F. equiseti	Diazetoxyscirpenol	
F. tricinctum	Toxin T-2 = 4-β-(3-Methylbutyryl- -oxy)-4,15-dimethoxy- scirp-9-en-3-ol, Sporofusariogenin	
F. oxisporum	Fusarinsäure	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_2-\text{H}_2\text{C}$ 
F. moniliforme	Gibberellinsäure (Gibberellin A2)	
Giberella fujikuroi	Anhydrofusarinsäure	—
F. nivale	Nivalenol R = OH Fusarogenol R = OAc Fusarogenon	
F. tricinctum F. solani	4-Desazetoxo-T-2 Solaniol	— —

wurde 6 Stunden lang fortgesetzt und dabei wurden 5 kg Rohstoff verarbeitet. Das Extrakt wurde in einem Rotations-Vakuumverdampfer eingedampft und das gewonnene Präparat später weiter gereinigt.

Bei dieser Maisprobe wurden die Krankheitserreger von den infizierten Maiskolben isoliert und in eine reine Kultur gebracht. Die von Myzelien durchdrungenen, schimmeligen Körner wurden 5 Min. lang in 70prozentigem Äthanol gewaschen, dann in einem Prüfröhrchen auf Kartoffel-agar-Nährboden gesetzt. Die nach 5 Tagen auf der Kornoberfläche erschienenen Myzelien wurden weiter in Prüfröhrchen aufbewahrt, sodann wurden zwecks genauer Identifikation Monosporenkulturen hergestellt. Die Kulturen wurden bei Zimmertemperatur in einem geschlossenen Raum gehalten. Die so gewonnene reine Kultur war *F. graminearum*, dessen morphologische Beschreibung früher bereits veröffentlicht wurde [18].

Aus der reinen Kultur wurden durch Fermentation Myzelien in größerer Menge bereitet. Die Fermentationsbedingungen wurden bereits beschrieben [19]. Aus der Fermentbrühe wurden die Myzelien durch Filtration erhalten und bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet; die pulverisierte trockene Myzelienmenge wurde in einem Soxhlet-Extraktor mit Dichlormethan extrahiert und das überflüssige Lösemittel im Wasserbad abdestilliert.

Bei der Reinigung wurde der ölige Rückstand in 50 ml Azetonitril gelöst. Um die farbigen (bordeauxroten) Pigmente zu entfernen, wurde die acetonitrilige Phase mit 50 ml Petroläther zweimal durchgerüttelt. Nach Eindampfen wurde der Rest in 5 ml Chloroform aufgefangen und auf einer Aluminiumoxydsäule von 40×2 cm chromatographiert. Für die Isolierung wurde Chloroform benutzt. Während des Fraktionierens des Toxins F-2 wurde die Säule mit UV-Licht beleuchtet und das Ablösen des Toxins von der chromatographischen Säule wurde visuell verfolgt.

Die toxinhaltigen Chloroformlösungen wurden gesammelt und eingedampft, sodann aus dem Chloroform in Petroläther umkristallisiert. Es wurde eine geringe Menge (einige mg) gelber, kristallinischer Substanz erhalten, die durch die bisherigen Untersuchungen (Schmelzpunkt, UV-Spektrum) identifiziert und als Standard F-2 in den weiteren Versuchen benutzt wurde.

Die biologische Aktivität des Toxins wurde durch Versuche an Ratten nachgewiesen. Es wurden Hautproben gemacht, F-2 wurde in Form von intramuskulären Injektionen in den Organismus von vier Wochen alten Rattenweibchen im Virginitätszustand eingetragen.

Von dem Toxin F-2 wurden vier Versuchstieren jeden dritten Tag fünfmal 30  $\gamma$  verabreicht; vier Ratten aus demselben Bestand wurden als Kontrollgruppe beobachtet. Am Ende des Versuchszyklus (am 18. Tag) wurde Uterusvergrößerung beobachtet und durch Gewichtsmessungen nachgewiesen. Die Uteri hatten im Mittel ein um 35% höheres Gewicht als bei der Kontrollgruppe.

Die Hautprobe brachte positive Ergebnisse. Aufgrund der beiden verschiedenen biologischen Tests sowie der Ergebnisse der parallel durchgeführten chemischen Analysen wurde die aus *Fusarium graminearum* gewonnene Substanz als Standardverbindung F-2 angenommen.

### *Dünnschichtchromatographische Isolierung der Fusarium-Toxine*

Die Dünnschicht-Platten wurden aus Kieselgel GF<sub>254</sub> hergestellt und eine Stunde lang bei  $100 \pm 2^\circ\text{C}$  aktiviert. Auf die Platten wurden  $2 \mu\text{l}$  Standardlösung aufgebracht, die  $10 \gamma$  F-2 entsprechen. Gleichzeitig wurden auch  $20 \mu\text{l}$  eines aus mit *Fusarium* infiziertem Mais gewonnenen Extrakts aufgetropft. Vergleichsweise wurde auch ein Gemisch von Standardtoxin und von aus Mais extrahiertem Toxin untersucht.

Für die Entwicklung der dünnschichtchromatographischen Platten wurden drei verschiedene Lösemittelgemische verwendet: Gemisch von Toluol—Äthylacetat—Ameisensäure im Verhältnis von 6 : 3 : 1; Benzol—Methanol—Essigsäure im Verhältnis von 24 : 2 : 1 und Chloroform—Äthylalkohol im Verhältnis von 95 : 5. Die  $R_f$ -Werte der drei verschiedenen Entwicklergemische waren 0,78, 0,42 bzw. 0,50. Die beste Trennung wurde mit dem Entwickler Toluol—Äthylacetat—Ameisensäure (TEF) erhalten.

Das Sichtbarmachen des Toxins (F-2) wurde im UV-Licht durchgeführt. Auf Wirkung der UV-Strahlung mit der Wellenlänge von 310 nm fluoreszierte das Toxin in grünlicher Farbe. Es kann bereits eine Stoffmenge von 0,5 bis  $1 \gamma$  nachgewiesen werden.

Die phenoligen Hydroxylgruppen des Toxins F-2 ermöglichen auch die Sichtbarmachung mit Eisen(III)-chlorid, diese Reaktion ist jedoch weniger empfindlich, in dieser Weise können Toxinmengen über  $10 \gamma$  nachgewiesen werden. Eine ähnliche Empfindlichkeit des Nachweisens läßt sich auch erreichen, wenn als Reagenz ein Gemisch von konzentrierter Schwefelsäure und 96prozentigem Äthanol im Verhältnis 3 : 2 verwendet wird. Wird nach Besprühen die Dünnschichtplatte 20 Min. lang bei einer Temperatur von  $100^\circ\text{C}$  gehalten, ist das Toxin als brauner Fleck sichtbar.

Für die bessere Trennung wurde das Dünnschichtverfahren mit zweidimensionalem Entwickeln wiederholt. In der einen Richtung wurde das beschriebene Toluol—Äthylacetat—Ameisensäure-System angewandt, in der zweiten Richtung ein Gemisch von Benzol—Äthylacetat—Essigsäure (85 : 10 : 5) verwendet, bei dem das Zearalenon  $0,52 R_f$  ergab. Bei der zweidimensionalen Trennung wurden 4 bis 8 gut unterscheidbare UV-aktive Flecke nachgewiesen, verhältnismäßig nahe zueinander. Charakteristische Chromatogramme werden in den Abbildungen 1 und 2 gezeigt.

*Gaschromatographische Untersuchung der gereinigten Extrakte*

Das Zearalenon und seine Derivate wurden auch nach dem gaschromatographischen Verfahren untersucht. Aus 0,5 ml chromatographischem, gereinigtem Extrakt wurde nach SHOTWELL [20] Trimethylsilyläther gebildet (0,1 ml Extrakt + 0,1 ml Pyridin + 0,1 ml Chlortrimethylsilan + 0,2 ml Hexamethyltrisilan). Es wurde ein Packardscher Gaschromatograph benutzt, durch

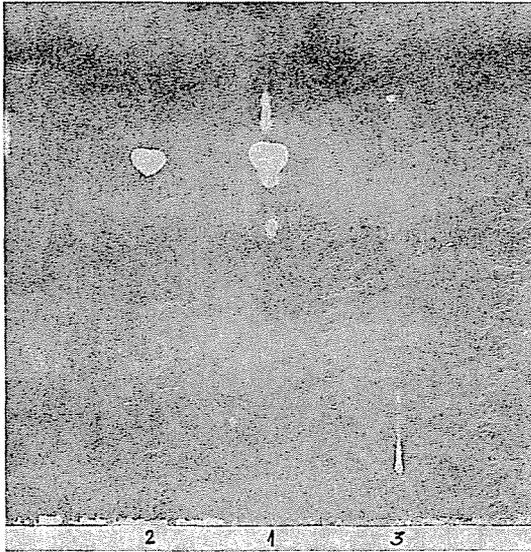


Abb. 1. Im UV-Licht aufgenommenes Dünnschicht-Chromatogramm von Zearalenon-Toxin  
1. Gemischtes Toxin; 2. Standard-Zearalenon; 3. Ergosterin, Fließmittel (TEF)

Flammenionisationsdetektierung auf einer Säule von 150 cm Länge, die aus 5% Trennflüssigkeit SE-30 und aus Trägersubstanz Chromosorb W 60/80 bereitet war. Die Temperatur der Säule betrug 238 °C, die des Verdampfungsraumes 280 °C, als Schlep gas wurde Stickstoff (25 ml/min.) benutzt.

*Analyse der IR-Spektren*

Um die durch Dünnschichtchromatographie getrennten Verbindungen eingehender kennenzulernen, wurden die IR-Spektren einzelner Komponenten mit Hilfe eines Spektrophotometers Zeiss UR-20 untersucht.

**Untersuchungsergebnisse und Auswertung**

Wie bereits gesagt, konnte bei der dünn schicht chromatographischen Untersuchung die wirksamste Trennung nach dem zweidimensionalen Verfahren erzielt werden. In sämtlichen Fällen wurden neben dem Toxin F-2 weitere

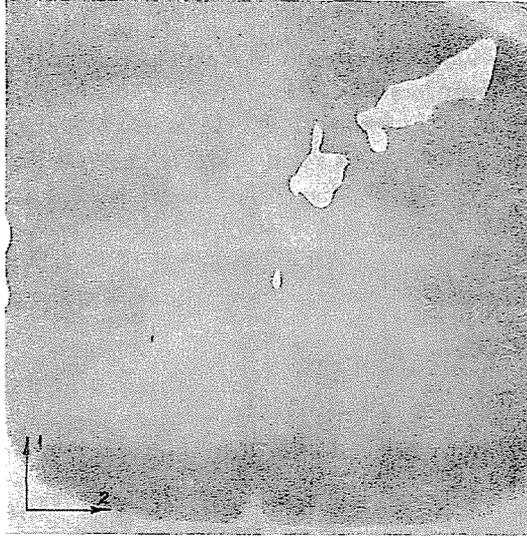


Abb. 2. Zweidimensionale DC des Toxins von *F. graminearum*

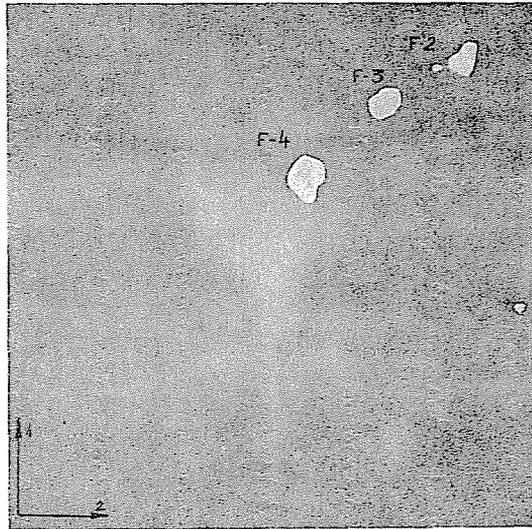


Abb. 3. Zweidimensionales Dünnschicht-Chromatogramm vom F-2 Toxin

UV-aktive Flecke nachgewiesen (s. Abb. 2 und 3). Von letzteren Flecken wurden drei mit absolutem Äthanol von der Dünnschicht eluiert, die konventionell Komponente F-2, F-3 und F-4 genannt wurden.

Bei der Analyse der IR-Spektren wurden folgende Feststellungen gemacht.

Die kennzeichnendsten Absorptionsspitzen des Toxins F-2 liegen bei den Wellenlängen 3400, 2950, 2935, 2860, 1690, 1618, 1580, 1450, 1430, 1390, 1360, 1320, 1260, 1200, 1170, 1100, 970, 890, 845  $\text{cm}^{-1}$ . Dies stimmt mit den von MIROCHA und Mitarbeitern [21] für Zearalenon veröffentlichten IR-Spektren gut überein. Eine charakteristische IR-Aufnahme ist in Abb. 4 gezeigt.

Im Spektrum der von uns als F-3 bezeichneten Verbindung zeigten sich dem Zearalenon gegenüber einige geringe Abweichungen. Obwohl die Spektren sich hinsichtlich der Absorptionsspitzen bei den Wellenlängen 3400 und 2860

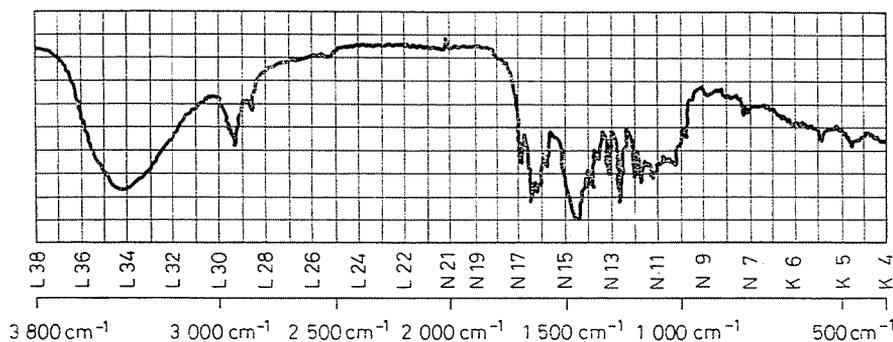


Abb. 4. IR-Spektrum von Zearalenon

$\text{cm}^{-1}$  ähnlich sind, fehlt bei der für die Keton- und Laktonfunktion kennzeichnenden Wellenlänge von 1670  $\text{cm}^{-1}$  die Absorption; weitere Abweichungen findet man bei den Wellenlängen 700 bis 900, wo die auf die kennzeichnenden Gerüstschwingungen des aromatischen Resorcylsäurerings deutenden Absorptionen fehlen. Diese Verhältnisse sind in Abb. 5 dargestellt.

Das Spektrum der Verbindung F-4 weist wiederum eine große Ähnlichkeit mit den entsprechenden Absorptionen von F-3 auf, aber dieses Mal erscheinen wieder die für den aromatischen Ring kennzeichnenden Bande, ein Umstand, der darauf deutet, daß in der Verbindung das Resorcylsäurelaktone-Grundgerüst zu finden ist.

Bei der gaschromatographischen Untersuchung wurde bei einer Retentionszeit von 2,7 Min ein Peak gefunden, der als Zearalenon identifiziert wurde. Weitere niedrigere Peaks stellten sich bei den Werten von 3,1 und 3,4 Min. ein. Vergleicht man die gaschromatographischen und die dünnschichtchromatographischen Ergebnisse miteinander, so läßt sich feststellen, daß das von uns angewandte gaschromatographische Verfahren ein viel geringeres Auflösungsvermögen besitzt und weniger empfindlich ist.

Neben den Toxiuntersuchungen wurden gleichzeitig auch die Arten der Fusariumpilze geprüft, um festzustellen, welche Arten Toxin F-2 erzeugen.

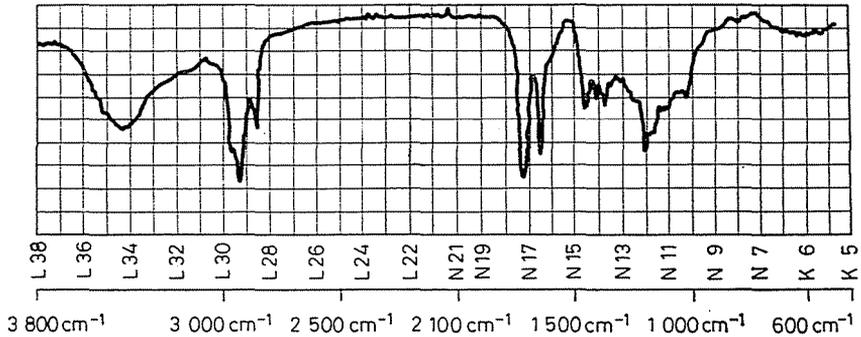


Abb. 5. IR-Spektrum vom F-3 Toxin

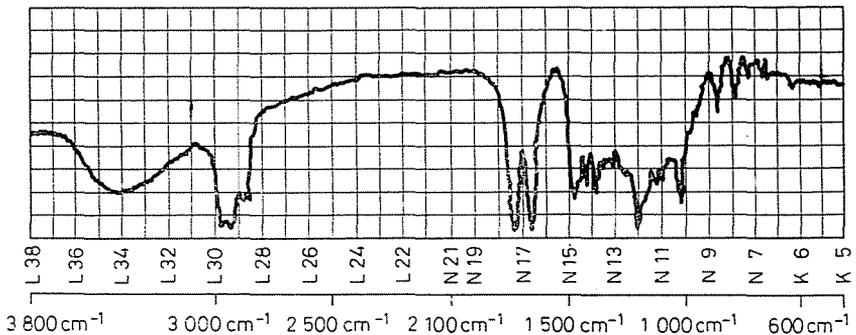


Abb. 6. IR-Spektrum vom F-4 Toxin

Nach den bisherigen Ergebnissen werden das Toxin und seine Derivate durch mehrere Pilzarten sowohl allein als auch bei gemeinsamem Vorkommen erzeugt. Die Pilzarten, die Toxin F-2 entwickeln, sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Wie bereits gesagt, wurden in Laufe unserer Untersuchungen seit dem Jahr 1970 über 200 Mais-, Weizen- und Mischfutter-Proben gefunden, in denen das Toxin Zearalenon in gesundheitsschädlicher Menge nachgewiesen wurde. Aus der Prüfung der Vorkommenshäufigkeit und der Lagerungsverhältnisse der infizierten Mais- und Weizen wurden einige Schlüsse allgemeiner Art gezogen.

Durch die parallelen mikrobiologischen und toxikologischen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß die mit *Fusarium*-Pilzen infizierten Mais- und Weizen bei der Ernte noch keine bedeutenden Toxinmengen enthalten. Die Toxinproduktion fällt vor allem auf die Lagerungszeit. In den eingelagerten Feldfrüchten wurde oft das Vorhandensein der *Fusarien* in vegetativer und Sporenform nachgewiesen, die Toxinprüfungen vor dem Verbrauch zeigten erhöhte Toxinmengen. Vergleicht man diese praktischen Erfahrungen mit den

Tabelle 2

## F-2-Toxinerzeugung verschiedener Fusariumarten

Fusariumart	Erzeugt F-2	Erzeugt kein F-2
<i>F. graminearum</i>	+	—
<i>F. culmorum</i>	+	—
<i>F. nivale</i>	—	+
<i>F. roseum</i>	+	—
<i>F. moniliforme</i>	+	—
<i>F. sporotrichoella</i>	—	+
<i>F. solani</i>	+	—
<i>F. tricinctum</i>	+	—
<i>F. oxysporum</i>	—	+
<i>F. equiseti</i>	—	+

bei der Fermentation reiner Kulturen der Fusariumarten angestellten Beobachtungen, erhält man ein klares Bild von der Wirkung eines der wichtigsten Faktoren, von der Wirkung der Temperaturbedingungen. Toxinerzeugung und niedrige Lagerungstemperatur in einer gewissen Periode stehen miteinander in eindeutigem Zusammenhang. Das ist für die meisten Toxin entwickelnden Fusariumarten bewiesen; so wurde durch die *F. sporotrichoella* besonders dann Toxin erzeugt, wenn das Getreide bzw. die Hirse unter dem Schnee überwinterten (bei mindestens  $-2^{\circ}\text{C}$ ), auch das *F. tricinctum* begann erst bei Temperaturen unter  $+5^{\circ}\text{C}$  Toxin zu entwickeln, ferner wird durch das *F. graminearum* nur F-2 erzeugt, wenn die Fermentation einige Tage lang bei Temperaturen unter  $7^{\circ}\text{C}$  vor sich geht.

Andererseits konnte auch nachgewiesen werden, daß die Gegenwart der Fusariumpilze nicht immer mit der Gegenwart von Toxin verbunden ist; auch diese Tatsache deutet also darauf hin, daß für die Aktivierung des toxin-erzeugenden Enzymsystems der Fusarium-Pilze eine niedrige Temperatur erforderlich ist.

Beim Anbau von Maisarten mit langer Vegetationszeit kann ein kühles, regnerisches Herbstwetter günstige Bedingungen für die Lebensfunktionen der Schimmelpilze schaffen. Durch wirksamen Pflanzenschutz und zweckmäßige Lagerungsbedingungen lassen sich jedoch die Produktionsverluste vermeiden oder einschränken.

## Zusammenfassung

Bei regnerischem Herbstwetter und unter ungünstigen Lagerungsbedingungen können einzelne landwirtschaftliche Produkte auch in Ungarn mit Fusariumpilzen stark infiziert werden. Von den Verfassern wurde seit dem Jahr 1970 in über zweihundert Fällen eine Fusa-

riuminfektion in Mais, Weizen, Mischfutter nachgewiesen. Die Fusarium-Toxine wurden nach Chloroformextraktion und säulenchromatographischer Reinigung auf dünn-schichtchromatographischem Wege nachgewiesen. Neben dem am häufigsten vorkommenden Toxin F-2 (Zearalenon) lassen sich auch andere UV-aktive toxische Verbindungen nachweisen. Von letzteren konnten die Verbindungen F-3 und F-4 isoliert und die IR-Spektren bestimmt werden. Nach den Untersuchungen haben letztere Substanzen eine dem Zearalenon ähnliche Struktur und toxische Wirkung.

### Literatur

1. CHRISTENSEN, C. M.: *Mycotoxins in Foodstuffs*. F. N. Wogan, ed., 9, M.I.T. Press, Cambridge Mass., (1965)
2. PÁLYUSIK, M.: *AGRIFORM*, Budapest (1972)
3. MIROCHA, C. J.—CHRISTENSEN, C. M.: *Mycotoxin in Foodstuffs*. M.I.T. Press, Cambridge, Mass. (1965)
4. PRENTICE, N.—DICKSON, A. D.: *Biotechnol. Bioeng.* **10**, 413 (1968)
5. CALDWELL, R. W.—TUIITE, I.: *Phytopathology* **53**, 1046 (1959)
6. WÖLLER, L.—BIRÓ-GOSZTONYI, M.: *Növényvédelem* **10**, 443 (1971)
7. YATES, S. G.—TOOKEY, H. L.—ELLIS, J. J.—BURKHARDT, H. J.: *Phytochemistry* **7**, 139 (1968)
8. BAMBURG, J. R.—RIGGS, N. V.—STRONG, F. M.: *Tetrahedron* **24**, 3329 (1968)
9. GILGAN, M. W.—SMALLEY, E. B.—STRONG, F. M.: *Arch. Biochem. Biophys.* **114**, 1 (1966)
10. BAMBURG, J. R.—MARASAS, W. F.—RIGGS, N. V.—SMALLEY, E. B.—STRONG, F. M.: *Biotechnol. Bioeng.* **10**, 445 (1968)
11. YATES, S. A.—TOOKEY, H. L.: *Australian J. Chem.* **18**, 53 (1965)
12. MOROOKA, N.—NAKANO, M. TATSUNO: *Japan. I. Med. Sci. Biol.* **23**, 89 (1966)
13. TSUNODA, M.—TOYAZAKI, N.: *Proc. Food. Res. Inst., Tokyo.* **23**, 89 (1968)
14. ISHII, K. K.—SAKAI, Y.—UENO, H.—TSUNODA, M.: *Enomoto Appl. Microbiol.* **22**, 718 (1971)
15. SARKISOW, A. M.: *Mikotiksicü, Szel'hozgiz*. Moskau, 1953
16. SPESIWZEWA, N. A.: *Mikosy i mikotoksikosy shiwotnych*. Moskau. Selchosgis, 453
17. VOLINTIR, V.—POPESCU, I.—VLAH, M.: *Revista de Zootehnieşi Medicina Veterinaria* **21**, 68 (1971)
18. BIRÓ-GOSZTONYI, M.—KOPPÁNYI, M.—WÖLLER, L.: *Növényvédelem* **4**, 151 (1971)
19. BIRÓ-GOSZTONYI, M.—KOPPÁNYI, M.—WÖLLER, L.: *Növényvédelem* **7**, 289 (1971)
20. SHOTWELL, O.—HESELTINE, L. C. W.—GOULDEN, L.: *Mario A. I. Assoc. Offic. Anal. Chemists* **52**, 81 (1969)
21. MIROCHA, C. J.—HARRISON, J.—NICHOLS, A. A.—MCCLINTOCK, M.: *Appl. Microbiol.* **16**, 797 (1968.b.)

Prof. Dr. Dr. Radomir LÁSZTITY }  
 Dr. László WÖLLER } H-1521, Budapest