



universität
wien

DIPLOMARBEIT

BIOSYNTHESE EINES CYCLOHEXADEPSIPEPTIDS

zur Erlangung des akademischen Grades
Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)
am Department of Pharmacology and Toxicology
der Universität Wien

Verfasser: Friedrich Singer
Matrikelnummer: 9709104
Studienrichtung: Pharmazie (A449)
Begutachter: ao. Univ. Prof. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

Wien, im April 2008

Danksagung

Bei Frau ao. Univ. Prof. Dr. Rosa Lemmens-Gruber bedanke ich mich herzlich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Department of Pharmacology and Toxicology, für die Vergabe des Diplomarbeitsthemas, sowie für die hervorragende und geduldige wissenschaftliche Betreuung. Sie hat mich beim Verfassen dieser Arbeit sehr unterstützt.

Auch Frau Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp danke ich für die Bereitstellung des Analysearbeitsplatzes und für die gute Unterstützung.

Besonderer Dank gilt auch Frau Mag. Dr. Sonja Prinz für die gute Betreuung bei der praktischen Durchführung der Arbeit und vor allem für die Unterstützung und ständige Hilfe bei allen Fragen.

Ich danke weiters Herrn Peter Höflich für die gute technische Betreuung während des gesamten Arbeitsablaufes.

Allgemein danke ich auch den Mitarbeitern des Departments of Pharmacology and Toxicology und des Departments of Pharmacognosy für all die guten Tipps im Zuge der praktischen Laborarbeit.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester Mag. Doris Singer für die stetige Unterstützung während dieser Zeit.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	1
Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	6
1.1. Mykotoxine	6
1.1.1. Wichtigste Toxine niederer Pilze	9
1.2. Mykotoxine von <i>Fusarium sp.</i>	10
1.2.1. <i>Fusarium</i>	10
1.2.2. <i>Fusarium</i> infektion am Mais	12
1.2.2.1. <i>Fusarium</i> -Toxine	13
1.3. <i>Aspergillus</i> und seine Toxine	14
1.3.1. <i>Aspergillus niger</i>	14
1.4. Ziel der Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1. Material/Chemikalien	18
2.1.1. Externer Standard/Reinsubstanzen	18
2.1.2. Lösungs-, Eluierungsmittel	19
2.1.3. Apparaturen und Zubehör	19
2.2. Nährmedien	22
2.2.1. Mais / Polenta	22
2.2.2. SNA- Kulturmedium	23
2.2.3. Kulturmedium nach Czapek-Dox	23
2.2.4. Sabouraud-2%-Glucose-Bouillon	24
2.2.5. Pepton	24
2.2.6. Hefe	24
2.3. Rohperlit – Chemische Analyse	25
2.3.1. Perlit	25
2.4. Kontrolle des pH-Wertes einer Perlit/dest. H ₂ O Suspension	26
2.5. Methode	27
2.5.1. Probenvorbereitung	27

2.6. Steigerung der Mykotoxinproduktion und Wachstum des <i>Fusariums</i> durch Kokontamination mit <i>Aspergillus niger</i>	29
2.7. Probenaufreinigung	30
2.7.1. Extraktion	30
2.8. UV-Messung	33
2.8.1. UV-Stabilitätskontrolle	33
2.9. HPLC-Messung	36
2.9.1. Externe Kalibration	36
2.9.2. HPLC isokratische Analysen-Methoden	37
3. Resultate	39
3.1. BEA-Bildung in Mais/Polenta-hältigem Nährmedium	39
3.1.1. BEA Bildung in Abhängigkeit der Konzentration der Vorstufen	39
3.1.2. BEA Bildung in Abhängigkeit einer Ko-Inokulation mit <i>Aspergillus niger</i>	40
3.1.3. Aus dem Rohextrakt isolierte Kristalle mit <i>Aspergillus niger</i> Kontamination	41
3.2. <i>Fusarium</i> Kultivierung im CD-Medium	44
3.2.1. CD-Medium mit Perlit	44
3.2.2. CD-Medium ohne Perlit	47
3.2.3. Hefe, CD Nährlösung und Perlit	47
3.2.4. Pepton mit CD und Perlit	48
3.3. S2G mit und ohne Perlit	50
3.3.1. S2G ohne Perlit	50
3.3.2. S2G mit Perlit	50
3.4. Änderungen der Methode	52
4. Zusammenfassung	55
5. Literatur	56
6. Lebenslauf	60

Abkürzungsverzeichnis:

BEA: Beauvericin

CD: Czapek-Dox

DAD: diode array detection

HPLC: high performance liquid chromatography

S2G: Sabouraud-2%-Glucose-Bouillon

SNA: spezieller Nährstoffarmer Agar

AS: Aminosäure

1. Einleitung

1.1. Mykotoxine

Auf der Erde gibt es etwa 250.000 bis 300.000 Pilzarten. Da jährlich etwa 1.000 Arten neu erläutert werden, ist anzunehmen, dass viele Giftpilze noch nicht bekannt sind (ROTH et al. 1984).

Mykotoxine sind toxische Stoffwechselprodukte, sekundäre Metabolite (Schlegel, 1992), die von Pilzen einschließlich Hefen gebildet werden (Hunnius, 1998).

Oft haben Mykotoxine auch antibiotische Eigenschaften, wie z.B. Patulin oder Citrinin (ROTH et al. 1984).

Unter den Sekundärmetaboliten hat die Gruppe der Antibiotika große industrielle und pharmazeutische Bedeutung. Oft ist aber die Funktion der Sekundärmetabolite im Lebenszyklus von solchen Produzenten unklar (Peeters, 1988).

Industriell werden z.B. Pektinasen, wie Pektinesterasen oder Pektinglykosidasen, zur Spaltung von Pektinen, Schleimstoffen, in der Saftproduktion eingesetzt. Viele Früchte enthalten diese Schleimstoffe, die beim Pressen Gallerten bilden. Pektinasen werden in der Regel aus Kulturen von Schimmelpilzen (*Penicillium*, *Aspergillus niger*) gewonnen (Hunnius, 1998).

Ungünstige klimatische Bedingungen und unzureichendes Nahrungsangebot können auch Faktoren für Pilzwachstum, speziell für die Mykotoxinproduktion, sein (Teuscher, 1994).

Ein Konkurrenzkampf der Pilze mit anderen Organismen ist möglicherweise auch Ursache für die Bildung von Mykotoxinen (Marquardt und Schäfer, 2004).

Mykotoxine treten vor allem in Lebensmitteln und Verzehrprodukten auf und können nach Genuss zu Organschäden wie Leber- und Nierenschäden führen. Einige dieser Toxine sind auch als Kanzerogene bekannt (Hunnius, 1998).

Aflatoxine, Derivate des Cumarins, die von manchen Stämmen des *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* und anderen Pilzen gebildet werden, gehören zu den bekanntesten Schimmelpilztoxinen. Diese können in allen „verpilzten“ Lebensmitteln (Erdnüssen, Getreiden, Ölfrüchten, Futtermitteln) enthalten sein und haben kanzerogene Eigenschaften (Schlegel, 1992).

Viele Mykotoxine sind gegen Hitze und Säuren stabil. Daher werden sie durch die Nahrungszubereitung nicht zerstört. Sie werden jedoch durch Laugen inaktiviert. Einige Vertreter, z. B. die Aflatoxine, sind nicht gegen UV-Licht beständig (ROTH et al. 1984).

Beauvericin ist ein cyclohexadepsipeptidisches Mykotoxin mit insektizider Wirkung. Es kann auch Apoptose in Säugetierzellen induzieren. Weiters ist es ein Cholesterol-Acyltransferase-Inhibitor, der programmierten Zelltod (ähnlich wie bei Apoptose) induziert und Zytolyse bewirkt, begleitet von einer Veränderung in DNA Fraktionen. BEA wird von vielen *Fusarium*arten (*F. poliferatum*, *F. semitectum*, und *F. subglutinans*) gebildet. In der Natur wächst der Schimmelpilz gerne am Korn (Logrieco et al. 1998).

Beauvericin weist eine Kanal bildende Aktivität in Membranen auf, die mit "inside-out patches" an ventrikulären Myozyten und synthetischen Membranen mit Hilfe der Patch-Clamp Technik untersucht wurde. Unter Wirkung von BEA wurden verschiedene Öffnungsstadien an Kanälen aufgezeigt. Durch die Patch-Clamp Methode und mit fluoreszenzmikroskopischen Verfahren wurde gezeigt, dass der BEA Kanal kationenselektiv ist. Gezeigt wurde die Leitfähigkeit für K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Na^+ . Die Pore wird durch La^{3+} geblockt. In Myozyten wird $[K^+]_i$ reduziert. Dagegen wird $[Na^+]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$ gesteigert, was zur Zytolyse führt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass BEA kationenselektive Kanäle in Lipidmembranen bildet, was die ionische Homöostase beeinflussen kann (Kouri et al. 2003, 2005).

Es wurde gezeigt, dass BEA die Kontraktionskraft senkt (Lemmens-Gruber et al. 2000) und dass es eine Wirkung auf die Aktionspotentialparameter des Papillarmuskels des Meerschweinchenherzens hat. Die kationenselektive Kanalbildung in Zellmembranen wird gezeigt. Patch-Clamp und fluoreszenzmikroskopische Techniken wurden eingesetzt, um die Wirkung in enzymatisch isolierten, ventrikulären Myozyten zu untersuchen. Unter Applikation von $10\mu M$ verursacht BEA einen großen $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg in FURA 2AM-beladenen Kardiomyozyten, was zu Zellverkleinerung führt. Die Wirkung konnte teilweise durch Vorbehandlung mit Ryanodin gehemmt werden und war größtenteils stark abhängig von externem Ca^{2+} . Durch Ni^{2+} (5mM) wurde der $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg gehemmt. BEA verursachte auch einen starken Anstieg von $[Mg^{2+}]_i$. Unter pH_i -Beobachtung mit BCECF wurde gezeigt, dass BEA eine zytosolische Übersäuerung bewirkt. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie zeigte mitochondriale Depolarisation in TMRM-beladenen Kardiomyozyten, was die Wirkung von klassischen mitochondrialen Entkopplern zeigte. Das NADH-autofluorisierende Signal folgte einem zweiphasigen Muster, im Gegensatz zur NADH Antwort auf die Entkoppler FCCP und des K^+ -Ionophors Valinomycin. Vermutet wird, dass BEA möglicherweise über seine ionophoren Eigenschaften als ein atypischer mitochondrialer Entkoppler agiert (Kouri et al. 2005).

Am Feld werden Getreidesorten und Mais mit Feldpilzen der Gattung *Fusarium* befallen. Dabei spielen die Lagerpilze wie *Aspergillus*, *Penicillium* eine unbedeutendere Rolle (Aflatoxine, Ochratoxin A)

(<http://www13.ages.at/servlet/sls/Tornado/web/ages/content/9DCC03D05D979BFFC1256E23004F6DD9>).

In Deutschland ist etwa die Hälfte des Erntegutes mit *Fusarium* nachweisbar befallen. Fast alle *Fusariengattungen* bilden Toxine. Doch erst bei unsachgemäßer Lagerung setzt die Toxinproduktion ein (Mücke und Lemmen, 2004).

1.1.1. Wichtigste Toxine niederer Pilze:

Toxingruppe Toxin	Vorkommen Pilze	Vorkommen Nahrungsmittel	Toxische Wirkung
<i>Aspergillus</i>-Toxine			
Aflatoxine	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Erdnüsse, Ölsaaten Korn	lebertoxisch und kanzerogen für die Leber versch. Tierarten und Mensch
Sterigmatocystin	<i>A. nidulans</i> <i>A. versicolor</i>	Getreide	toxisch u. kanzerogen für die Leber von Ratten
Ochratoxin	<i>A. ochraceans</i>	Getreide, Kaffee (grün)	toxisch für die Nieren, kanzerogen
<i>Penicillium</i>-Toxine			
Luteoskyrin	<i>Penicillium islandicum</i>	Reis	toxisch und wahrscheinlich kanzerogen für die Leber von Ratten
Patulin	<i>P. articae</i> , <i>P. claviformi</i>	Äpfel u. Apfelprodukte	Ödem; toxisch für die Leber von Ratten
<i>Fusarium</i>-Toxine			
Zearalenon	<i>Giberella zeae</i>	Mais	besitzt ausgeprägte östrogene und anabole Wirkung
Fusarenon	<i>Fusarium</i> -Arten	Getreide	kanzerogen, zellschädigend, hauttoxisch; stören das Immunsystem, das Nervensystem und die Blutbildung

Abb. 1 Toxine niederer Pilze (Hunnius, 1998)

1.2. Mykotoxine von *Fusarium sp.*:

Die Witterung (warme und feuchte Bedingungen) fördert zur Blütezeit die *Fusarien*infektion (<http://www13.ages.at/servlet/sls/Tornado/web/ages/content/9DCC03D05D979BFFC1256E23004F6DD9>).

1.2.1. *Fusarium*

Systematik: Deuteromycota

Familie: Tuberculariaceae



Abb. 2a *Fusarium*kultur



Abb. 2b (*Fusarium* Konidium 400x vergrößert)
(<http://schimmel-schimmelpilze.de>)

Fusarien-Konidien sind von sichelförmigem Aussehen. Sie haben Makrokonidien auf kurzem, unregelmäßig verzweigten Konidiophoren oder einzellige Mikrokonidien. Das Mycel bildet derbwandige Dauerorgane, Chlamydosporen, aus. Die Farbe ist weiss. Oft auch hellgelb bis rosa. *Fusarien*arten findet man weltweit. Sie sind Bodenbewohner und maßgeblich am Abbau zellulosehaltiger Pflanzenreste beteiligt (Mücke und Lemmen, 2004). Sporen von *Fusarien* werden in erster Linie durch Tiere verbreitet, anders als bei Schimmelpilzen wie *Aspergillus* oder *Penicillium*, welche sich in erster Linie durch den Wind verbreiten. Dabei werden die *Fusarien*-Sporen in sogenannten Sporodochien gebildet, mit einer Art Klebstoff umhüllt, der dann so an Fellen oder Federn haften bleiben kann. Auch

befallen *Fusarien* gerne Wurzeln und unterirdische Pflanzenteile. Die Sporen besitzen keine Farbstoffeinlagerungen wie Melanine oder Carotinoide, und so sind sie nicht gegen die Einwirkung von UV-Licht geschützt (<http://schimmel-schimmelpilze.de>).

Viele von ihnen sind Erreger von Krankheiten höherer Pflanzen, wie z.B. die Ährenpilze. Fast alle *Fusarien* bilden Toxine, wobei die Toxinbildung meist erst durch unsachgemäße Lagerung einsetzt.

*Fusarien*toxine sind Moniliformin, Zearalenon, Fumonisine, Fusarin C und die große Gruppe der Trichothecene (Mücke und Lemmen, 2004).

Trichothecene sind weitere toxische Metabolite. Sie weisen eine akute Toxizität auf. Durch kontaminierte Lebensmittel führen sie oft zu Magen-Darm-Trakt-Erkrankungen (z.B.: Vomitoxin) (<http://schimmel-schimmelpilze.de>).

Kultur	<i>Fusarium sp.</i>	Mykotoxine
Mais	<i>F. subglutinans, F. graminearum</i> (<i>F. proliferatum, F. poae</i>)	Moniliformin, Beauvericin, Zearalenon, Deoxynivalenol (Vomitoxin), 15-Acetyl-deoxynivalenol, Fumonisine, Nivalenol
Weizen	<i>F. graminearum, F. avenaceum,</i> <i>F. poae</i>	Zearalenon, Deoxynivalenol (Vomitoxin), 15-Acetyl-deoxynivalenol, Nivalenol
Hafer	<i>F. graminearum, F. avenaceum,</i> <i>F. poae</i> (<i>F. tricinctum, F. sporotrichioides,</i> <i>F. langsethiae</i>)	Zearalenon, Deoxynivalenol (Vomitoxin), 3-Acetyl-deoxynivalenol, Nivalenol, T-2 Toxin, HT-2 Toxin

Tab. 3 Mykotoxinvorkommen auf Korn

(<http://www13.ages.at/servlet/sls/Tornado/web/ages/content/9DCC03D05D979BFFC1256E23004F6DD9>)

1.2.2. *Fusarium*infektion am Mais:

Infektionsverlauf pflanzenpathogener *Fusarien*:

Primärinfektion findet an der Blüte durch Verletzungen wie Hagel oder Zünslerfraß statt. Die Sekundärinfektion breitet sich von der Spindel in die Körner aus, befällt aber nur einige Kolben

(<http://www13.ages.at/servlet/sls/Tornado/web/ages/content/9DCC03D05D979BFFC1256E23004F6DD9>).

Von der Gattung *Aspergillus* gibt es ca. 150 Arten. Das Grundpilzgeflecht ist meist weiß. Durch die wechselnde Farbe der Fruchtkörper kommt es zu verschiedenen färbigen Schimmeln. Vorkommen: Erde, Textilien, feuchte Tapeten, Lebensmittel u.v.m.

Fast alle dieser Arten sind wegen ihrer intensiven Sporenbildung Allergieauslöser (http://www.imwl.de/PILZINFO/Schimmelpilze/hauptteil_schimmelpilze.htm), (Mücke und Lemmen, 2004).



Abb. 4 Weizeninfektion mit *F. subglutinans*
(<http://www.lfl.bayern.de/ipz/weizen/08468/>)

1.2.2.1. *Fusarium*-Toxine

Beauvericin

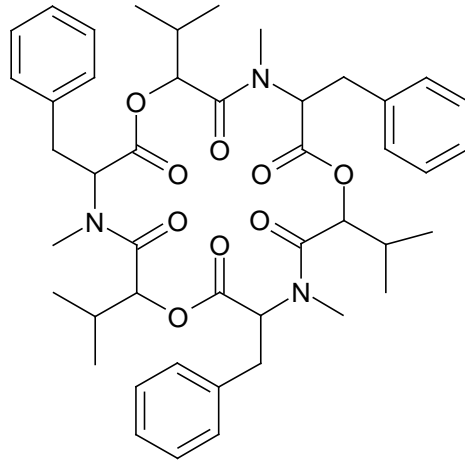


Abb. 5 BEA Struktur (Josephs, 1999)

Struktur:

Beauvericin gehört zu den Hexadepsipeptiden. Es enthält Peptid- und Esterbindungen in ringförmiger Struktur. Beauvericin setzt sich aus jeweils 3 Einheiten N-Methyl-L-Phenylalanin und D- α -Hydroxyisovaleriansäure zusammen. Isoliert wurde Beauvericin erstmals aus den insektenpathogenen Pilzen *Beauveria bassiana* und *Paecilomyces fumosoroseum*. Beauvericin hat antibiotische und insektizide Eigenschaften. Enniatine sind dem Beauvericin verwandt. Enniatine wurden erstmals aus *Fusarium*-stämmen isoliert. An der Stelle von Phenylalanin stehen die Aminosäuren Isoleucin, Valin oder Leucin. Sie sind auch N-methyliert (Peeters, 1988).

1.3. *Aspergillus* und seine Toxine

1.3.1. *Aspergillus niger*

Familie: Aspergillaceae

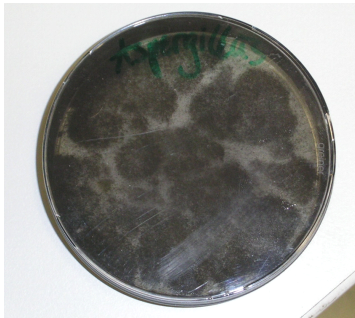


Abb. 6 *Aspergillus*kultur

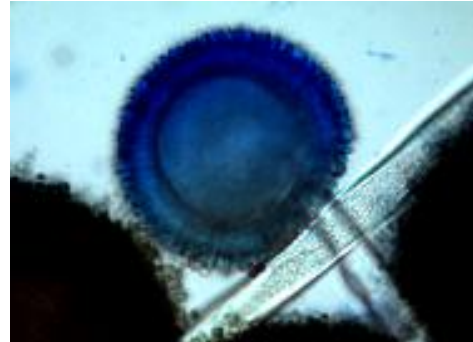


Abb. 7 *Aspergillus niger* 400x vergrößert
(<http://schimmel-schimmelpilze.de>)

Aspergillus niger gehört zu den Gießkannenschimmelpilzen. Er ist ein weltweit verbreiteter Lebensmittelverderber sowie Materialzerstörer und kommt im Erdboden vor. Der Schimmelpilz kann Papier, Packstoffe, Leder, Farben, Kunststoffe und Gläser zerstören. *Aspergillus*arten findet man fast überall, in Baumwollstoffen, auf Hanf, Jute, in Trockenfrüchten (Nüsse, Rosinen,...), in Marmelade, auf Brot, im Keller, im Badezimmer,..... Manche Arten von *Aspergillus* bilden Stoffwechselprodukte, die für den Menschen und für das Tier toxisch sind, das sind Mykotoxine wie z.B.: Aflatoxine, Fumagillin, Gliotoxin. Sie führen zu Lebensmittelvergiftungen, allergischen Reaktionen oder befallen Organe wie Lunge, Magen, Darm und das Nervensystem. Die Krankheitsbilder sind unter dem Begriff Aspergillosen zusammengefasst. *Aspergillus* wird auch Gießkannenschimmel genannt. Die Aspergillen werden in verschiedene Untergruppen unterteilt (<http://schimmel-schimmelpilze.de>).

- Wachstumsmaximum: 45-47°C
- Wachstumsoptimum: 35-37°C
- Wachstumsminimum: 6-8°C
- Der pH-Wert liegt zwischen 1,5-9,8 (toleriert stark saure und alkalische Umgebung) (Mücke und Lemmen, 2004), (Roth et al. 1990).

- Krankheitsauslöser:
Aspergillus-Pneumonie, Mykosen der Haut, Allergien; selten Befall der Organe; bei Immunabwehr geschwächten Personen verursacht er schwere Krankheitssymptome wie Lungenaspergillose. Auch ist er an Gehörgangsmykosen beteiligt.
- Einige Toxine: Naphthochinone, Nigrallin
- In der Industrie benötigt man *Aspergillus niger* zur Zitronensäureproduktion und zur Produktion von Enzymen wie Amylasen, Pektinasen, Proteasen, Cellulasen, Lipasen und Katalasen
(http://www.imwl.de/PILZINFO/Schimmelpilze/hauptteil_schimmelpilze.htm).

1.4. Ziel der Arbeit:

1.

In dieser Arbeit wurde mit mehreren Nährmedien (Mais, Czapek-Dox mit und ohne Perlit, mit und ohne S2G, Polenta, Hefe) gearbeitet, um festzustellen, auf welchem Agarmedium der *Fusarium*stamm am günstigsten wächst und BEA bildet.

2.

Es stellt sich die Frage, ob der verwendete *Fusarium*stamm das Mykotoxin Beauvericin aus in Mais enthaltenen Vorstufen bildet oder vermehrt aus den zugeführten Aminosäuren verwendet. Folglich wurde der Versuch mit mehreren Aminosäurenkonzentrationen durchgeführt.

Es wurden drei Säurevorstufen (L-Methionin, L-Phenylalanin, D- α -Hydroxyisovaleriansäure) in verschiedenen Konzentrationen (0g/l, 0,5g/l, 1g/l, 1,5g/l und 2g/l) zugegeben. Das Interesse gilt der Konzentration, in welcher der Schimmelpilz am meisten das Mykotoxin Beauvericin bildet. Gemessen wurde das vorgereinigte und isolierte Beauvericin an einem HPLC-Gerät mit einem DAD.

3.

Weitere Aufgabe war es, den *Fusarium*stamm auf einem „nicht organischen Medium“, dem Czapek-Dox Kulturmedium mit Perlit wachsen zu lassen anstatt auf organischem Mais Medium.

4.

In weiterer Folge wurde untersucht, ob der *Fusarium*stamm auch im wässrigen Medium, ohne Perlit, wächst und dann eventuell auch Beauvericin produziert.

Die Verbesserung der Selektivität der analytischen Methode für Beauvericin in Mais und anderen Nährmedien im niedrigen $\mu\text{g}/\text{kg}$ Bereich war ebenfalls ein Arbeitsziel.

5.

Weiters stellte sich die Frage, ob es gelingt, den *Fusarium*stamm durch Kokontamination mit einem anderen Schimmelpilzstamm, dem *Aspergillus niger*, zur vermehrten Beauvericin Produktion anzuregen. Aufgrund eines möglichen Konkurrenzkampfes der beiden Schimmelpilze könnten beide mehr Mykotoxine produzieren oder sich sogar gegenseitig hemmen. Die Mykotoxine des *Aspergillus niger* könnten aber auch wegen seiner vielen Mykotoxine das Messergebnis beeinflussen.

2. Material und Methoden

2.1. Material/Chemikalien:

2.1.1. Externe Standard/Reinsubstanzen

Beauvericin

(C₄₅H₅₇N₃O₉), Sigma, Steinheim-Deutschland, B-7510, 5mg, Lot 043K1468, Reinheit: 99%

BEA ist ein Mykotoxin und zeigt cytotoxische und insektizide Eigenschaften.

Der Schmelzpunkt von Beauvericin beträgt 93-94°C.

Der LD₅₀ Wert bei Laborratten beträgt ≥ 100mg/kg p.o. und ≥ 10mg/kg i.p.

(Schumacher, 1997)

Vorstufen

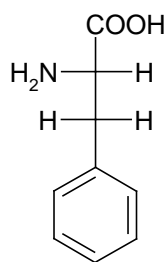


Abb. 8a

L-Phenylalanin,
Molekulgewicht: 165,19
Fluka
Reinheit: 99%
Steinheim, Deutschland

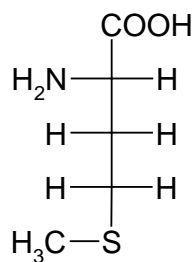


Abb. 8b

L-Methionin,
Molekulgewicht: 149, 21
Fluka
Reinheit: ≥99,5%
Steinheim, Deutschland

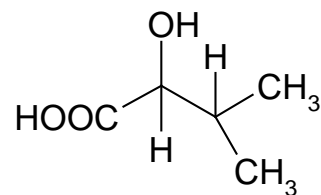


Abb. 8c

D-α-Hydroxyisovaleriansäure,
Molekulgewicht: 118,13
Fluka
Reinheit: ≥98%
Steinheim, Deutschland

2.1.2. Lösungs-, Eluierungsmittel

Acetonitril

für HPLC-Analyse, J.T.Baker; Reinheit: $\geq 99,8\%$; Leuven, Niederlande

Wasser

destilliert/autoklaviert; IKA-DEST M3000

Chloroform

Pro analysis, J.T.Baker; Reinheit: 99%; Leuven, Niederlande

Methanol

Pro analysis, Merck; $> 99,5\%$, Buchs, Schweiz

Dichlormethan

J.Z.Baker; $\geq 99,5\%$; Deventer, Holland

Perlit

Granuperl Standard S 0-6; Strobachgasse, Wien

2.1.3. Apparaturen und Zubehör:

Konidienzählung:

Bürker-Türk-Zählkammer

Tiefe Depth Profondeur 0,100mm; 0,0025mm²

10 Deckgläser für Haemacytometer 20x26mm

Roth, Karlsruhe

Eluierungshilfen

MycoSep® 224 AflaZon, RomerLabs

Multifunctional Colums

Kieselgel₆₀

Merck

Korngröße 0,063-0,200mm

70-230 mesh ASTM

Darmstadt, Deutschland

Zerkleinerungs- und Lösungshilfen

Ultra-Turrax

Polytron PT 3000

2.2.1.4.2. Schüttler

Müller-Scherr GFL 3017

Zentrifuge

Zentrifuge 400 Function Line (Heraeus Instruments)

Probenvorreinigung

Filterpapier

Schleicher & Schuell Micro Science; 595 Rundfilter/Filter Paper Circles O 150mm

Rotovapor

Heidolph VV2001

Heidolph WB 2001 (H₂O-Bad)

Zur Beimpfung

Arbeitsbank (Laminarflow)

EHRET GmbH u Co KG

Brutschränke

Memmert

UV-Vermessung

Spektrophotometer

Beckmann DU 640

HPLC

HPLC-Gerät im ersten Durchgang:

Perkin Elmer series 200 autosampler

Perkin Elmer series 200 pump

Perkin Elmer DAD 200 (Diode Array Detector)

Perkin Elmer series 200 Peltier Column Oven

Perkin Elmer series 200 Vacuum Degaser

Software: Turbochron Workstation Version 6.1.2.0.1, Perkin Elmer Instruments

HPLC Gerät für einen weiteren Durchgang

Perkin Elmer series 200 autosampler

Perkin Elmer series 200 Lc pump

Perkin Elmer DAD 235C

Software: Turbochron Workstation Version 6.2, Perkin Elmer Instruments

2.2. Nährmedien:

2.2.1. Mais / Polenta:

Zea mays gehört zur Familie der Poaceae (Hunnius, 1998).

Inhaltsstoffe:

- Maisstärke, 2-3% Saponine, bis 13% Gerbstoffe, fettes und ätherisches Öl (mit ca. 18% Carvacrol), Harz, Bitterstoffe, gummiartige Stoffe, Kalium, Kalzium, Phosphor, Eisen, Fluor, Magnesium, Natrium, Kieselsäure, Selen, B-Vitamine, zellschützende Carotinoide, Phenolsäuren
(Hunnius, 1998), (<http://www.uni-bielefeld.de/paedagogik/Seminare/moeller02/05gemuese/mais.html>).

Früchte:

- Die Früchte stehen als geordnete Karyopsen in langen Reihen auf der Oberfläche der weiblichen Ähren. Das Aussehen ist hornartig und gelb. Auch gibt es weiße, blaue und purpurne Karyopsen (Die Grosse Enzyklopädie der Heilpflanzen, 1999).

2.2.2. SNA-Kulturmedium (spezieller Nährstoffarmer Agar):

Der SNA Agar wird für die Aufzucht, die Aufbewahrung und den Transport isolierter *Fusarium*stämme verwendet.

Zusammensetzung	Firma	Einwaage in g
KH ₂ PO ₄	Sigma	1,0
KNO ₃	Sigma	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	0,5
KCl	Sigma	0,5
Glucose	Sigma	0,2
Sucrose	Sigma	0,2
Agar	Sigma	20
		ad 1l H ₂ O
		(pH 7 mit 1N NaOH)

Tab. 9 SNA-Kulturmedium

2.2.3. Kulturmedium nach Czapek-Dox (modifiziert):

Zusammensetzung	Firma	Einwaage in g
NaNO ₃	Merk	3
KH ₂ PO ₄	Sigma	1
KCl	Sigma	0,5
MgSO ₄ *7 H ₂ O	Sigma	0,5
Fe ₂ SO ₄ *7 H ₂ O	Heilmittel Werke Wien	0,01
Glucose	Sigma	40
H ₂ O		ad 1l

Tab. 10 CD-Kulturmedium

2.2.4. Sabouraud-2%-Glucose-Bouillon (Diagnostica Merck)

Zusammensetzung	Firma	Einwaage in g
Pepton aus Fleisch	Diagnostica Merck	5
Pepton aus Casein		5
Glucose 20g		30g/l lösen, autoklavieren bei 121°C für 15 min. pH: 5,6 +/- 0,1 klar und bräunlich

Tab. 11 S2G-Bouillon

2.2.5. Pepton (Peptonwasser gepuffert, Oxoid)

Wie Mais und Hefe ist auch Pepton ein komplexer, undefinierter Nährboden. Proteine werden mit Pepsin behandelt, und ein Teil der Peptidbindungen wird gespalten. Es besteht dann zu 30%(w) aus freien Aminosäuren, Di-, Tri- und Polypeptiden (Schlegel, 1992).

2.2.6. Hefe (Bacto™ Yeast Extract, BECTON DICKINSON)

Hefen gehören zu den Protoascomyceten und zählen zu komplexen, undefinierten Nährboden. Pilze und Bakterien bilden α -Amylasen und können dadurch Stärke abbauen. Alkoholbildende Hefen können keine Amylasen bilden oder ausscheiden (Schlegel, 1992).

2.3. Rohperlite – Chemische Analyse:

SiO₂	70-80%
Al₂O₃	10-15%
Fe₂O₃	0-3%
CaO	0-2%
MgO	0-1%
SO₃	-----
K₂O	2-5%
Na₂O	1-4%
TiO₂	0-0,5%
P₂O	0-0,1%
MnO	0-0,2%

Tab. 12 Rohperlite

2.3.1. Perlite (Obsidian od. Vulkangas)

Perlite ist ein leichtes Silikatgestein und wird in einem Vertikalofen thermisch behandelt. Dabei dehnt sich das Gestein um das 10-20 fache aus. Wegen des hohen Luftporengehalts ist der Verwendungszweck sehr vielfältig.

Eigenschaften: mineralisch, frei von organischen oder umweltbelastenden Bestandteilen,
unverrottbar, inert, wärme-, kälte-dämmend

Verwendung: Baustoff-, Kühl-, Feuerfest-, Füllstoffindustrie, Landwirtschaft/Gartenbau

Lebensmittelindustrie, Pharmaindustrie, Umweltschutz

(<http://www.thiele-granit.de>).

2.4. Kontrolle des pH-Wertes einer Perlit/dest. H₂O Suspension

Bakterien wachsen eher im alkalischen Medium, Pilze/Schimmelpilze im sauren Bereich um pH 6.

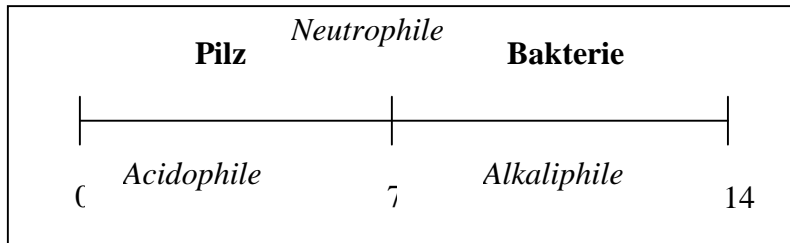


Abb. 13 pH-Wachstumsskala (Schlegel, 1992).

H₂O hat einen pH-Wert von ca. 5,90. Mit Perlit schlägt der pH-Wert gegen pH 4. Da Pilze eher im Sauren wachsen, ist das nicht der Grund, warum bei den Versuchen mit CD und Perlit kein Wachstum vorhanden war. Zum Vergleich war das Mycel-Wachstum bei den anderen Versuchen mit Perlit, siehe Sabouraud-2%-Glucose-Bouillon und Hefe, vorhanden.

2.5. Methode

2.5.1. Probenvorbereitung:

Säurevorstufen und Medien:

Die Säurevorstufen L-Phenylalanin, L-Methionin und D- α -Hydroxyisovaleriansäure wurden in geeigneter Konzentration (0g/l, 0,5g/l, 1g/l, 1,5g/l und 2g/l) in H₂O dest. gelöst.

Berechnung der Säurevorstufenkonzentration:

$\frac{\text{Molgewicht der entsprechenden Aminosäure}}{\text{Molgewicht aus der Summe aller Aminosäuren}} \times \text{gewollter AS Konz.} = X \text{ g AS/1l H}_2\text{O}$
--

Mais und Polenta

50g Mais/Polenta wurde in einen 500ml Kolben gewogen, mit 30ml der entsprechenden Säurevorstufenlösung (0g/l, 0,5g/l, 1g/l, 1,5g/l und 2g/l) versetzt, mit Parafilm verschlossen und, um den Mais/die Polenta zu quellen, einen Tag stehen gelassen.

CD:

CD-Medium mit Perlit:

10g Perlit (Perlit Granuperl Standard S 0-6) wurde in einen 500ml Kolben gewogen, mit 50ml der entsprechenden Säurevorstufenlösung (0g/l, 0,5g/l, 1g/l, 1,5g/l und 2g/l) versetzt. Dann wurden 50ml des modifizierten CD-Mediums zugegeben.

CD-Medium ohne Perlit:

100ml des modifizierten CD-Mediums wurden, ohne Säurevorstufen (0g/l), in einen 500ml Kolben gegeben.

Modifiziertes CD-Medium mit Pepton/Hefe und Perlit:

100ml CD-Medium, 5g Pepton/5g Hefe und 80g Perlit wurden jeweils in einem 500ml Kolben vereinigt. Es wurde keine Säurevorstufe (0g/l) zugegeben.

S2G:

S2G und/ohne Perlit:

100 ml S2G-Bouillon wurde ohne Säurevorstufen (0g/l) mit/ohne 80g Perlit, jeweils in einem 500ml Kolben, direkt gegeben.

Autoklavierung:

Alle Nährmedien und Perlit wurden vor der Beimpfung bei 121°C/20min autoklaviert. Mais und Polenta wurden 2mal bei 121°C/20min autoklaviert.

Beimpfung:

Beimpft wurde mit 1ml einer *Fusarium*suspension. Die Suspension wurde mit destilliertem und autoklaviertem H₂O hergestellt. Die Anzucht des *Fusarium*stammes wurde auf einem SNA-Agar durchgeführt.

Die *Fusarium*konidien wurden mit der Bürker-Türk-Zählkammer ausgezählt. Zur Inokulation wurde eine wässrige Konidiensuspension mit einer Konzentration von 10⁷ Konidien/ml hergestellt (Hugo Peeters, 1988).

Auf Grund des massiven Wachstums von *Aspergillus niger* betrug die Sporenkonzentration des *Aspergillus*-Inokulums weniger als 10⁷ Sporen/ml. Die Beimpfung wurde immer unter keimfreien Sterilbedingungen unter der Laminar Flow Werkbank gemacht.

Inkubation:

Inkubiert wurde im Brutschrank drei Wochen lang unter diffusem Licht, in der ersten Woche bei 28°C, in der zweiten und dritten Woche bei 20°C.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden alle Maisproben in der zweiten und dritten Woche während der Inkubation unter Sterilbedingungen, jeweils mit 5ml destilliertem und

autoklaviertem Wasser begossen. Der Mais/die Polenta trocknet im Trockenschrank schnell und so wird das Mycel-Wachstum verlangsamt. Das Mycel-Wachstum kann sogar zum Stillstand kommen.

Trocknung der Proben:

Alle Proben wurden bei 40°C im Trockenschrank getrocknet.

Mais/Polenta sollte nur bei 40°C bis max. 50°C getrocknet werden, da sich der Mais/die Polenta im Trockenschrank bei höherer Temperatur am Ende der Trocknungsphase durch Oxidation ins Bräunliche verfärbt. Das wirkt sich auf die Farbe des Filtrates und auf das Messergebnis aus.

Auch Perlit verändert seine Farbe ins Gräuliche. Hier kann man die Verfärbung durch Filtration beseitigen.

2.6. Steigerung der Mykotoxinproduktion und Wachstum des *Fusariums* durch Kokontamination mit *Aspergillus niger*:

Es wurde untersucht, ob das Wachstum der *Fusarien* am Mais durch *Aspergillus niger* gefördert wird und so auch mehr Beauvericin produziert. Weitere Auslöser für mehr Mykotoxinbildung können auch viele Stressfaktoren wie Hitze, Kälte, niedrige/hohe Luftfeuchtigkeit, wechselnder pH-Wert,.... sein (Hunnius 1998).

2.7. Probenaufreinigung

2.7.1. Extraktion:

Mais und Polenta

Der kontaminierte Mais/die kontaminierte Polenta wurden jeweils bei 40°C so lange als nötig getrocknet und anschließend vermahlen. Je 20,00g jeder Probe wurde in einem 250ml Erlenmeyerkolben zur Aufreinigung eingewogen.

Diese Proben wurden mit 80,00ml Acetonitril/Wasser (84:16) versetzt und mit Parafilm verschlossen. 5 Minuten wurden die Proben mit dem Ultra-Turrax (10.000 Umdrehungen/min) zu einer Suspension homogenisiert, um eine disperse Verteilung zu erhalten.

Filtrierte wurde durch einen Faltenfilter mit 15cm Durchmesser (Schleicher&Schüll) in einem Schliffkolben.

CD mit und ohne Perlit:

Getrocknet wurden die kontaminierten CD-Proben mit Perlit bei 40°C so lange als nötig. Hier wurde jeweils die gesamte Menge der Proben analysiert.

Die gesamten trockenen Proben (CD-Medium mit Perlit) wurden mit 80,00ml Acetonitril/Wasser (84:16) vermengt und am Schüttler bei 150 r.p.m. 90 Minuten lang zur Probenelution geschüttelt.

Der Perlit kann noch vor der Elution mit dem Ultra-Turrax zu einer Suspension homogenisiert werden und nach der Filtration zentrifugiert werden.

CD-Medium ohne Perlit wurde filtrierte und zur Trockenphase gebracht. Der Rückstand wurde mit 80,00ml Acetonitril/Wasser (84:16) im Kolben wieder gelöst.

Filtrierte wurden alle Proben durch einen Faltenfilter mit 15cm Durchmesser (Schleicher&Schüll) in einem Schliffkolben.

Modifiziertes CD-Medium mit Perlit und Pepton/Hefe

Getrocknet wurden die kontaminierten Proben bei 40°C so lange als nötig. Hier wurde jeweils die gesamte Menge der Probe analysiert.

Diese Proben wurden mit 80,00ml Acetonitril/Wasser (84:16) versetzt und mit Parafilm verschlossen. 5 Minuten lang wurden die Proben mit dem Ultra-Turrax (10.000 Umdrehungen/min) zu einer Suspension homogenisiert, um eine disperse Verteilung zu erhalten.

Filtriert wurde durch einen Faltenfilter mit 15cm Durchmesser (Schleicher&Schüll) in einem Schliffkolben.

S2G mit Perlit:

Getrocknet wurde die kontaminierte Probe bei 40°C so lange als nötig. Hier wurde jeweils die gesamte Menge der Probe analysiert.

Diese Probe wurde mit 80,00ml Acetonitril/Wasser (84:16) versetzt und mit Parafilm verschlossen. 5 Minuten lang wurde die Probe mit dem Ultra-Turrax (10.000 Umdrehungen/min) zu einer Suspension homogenisiert, um eine disperse Verteilung zu erhalten.

Filtriert wurde durch einen Faltenfilter mit 15cm Durchmesser (Schleicher&Schüll) in einem Schliffkolben.

S2G-Lösung ohne Perlit:

Nach der Behandlung mit dem Ultra-Turrax, (5 min bei 10.000 Umdrehungen/min) wurde die Lösung filtriert und das Filtrat in zwei Teile zu je 50ml geteilt. Filtriert wurde durch einen Faltenfilter mit 15cm Durchmesser (Schleicher&Schüll) in einem Schliffkolben.

Das Filtrat 1 wurde zur Trockene gebracht. Getrocknet wurde die kontaminierte Probe bei 40°C so lange als nötig. Diese Probe wurde mit 80,00ml Acetonitril/Wasser (84:16) versetzt und mit Parafilm verschlossen.

Das Filtrat 2 wurde fünfmal mit je 30ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 50ml Wasser gewaschen und schließlich mit Natriumsulfat getrocknet. Das Extrakt wurde zur Trockenphase gebracht. Dann wurde es in AcCN/H₂O (85:15) aufgenommen.

Erster Aufreinigungsschritt:

7-8ml dieses Filtrates wurden in eine Eprovette übergeführt und durch eine MycoSeptm #224 Kartusche gepresst. Das restliche übergeführte Filtrat wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

Ein Aliquot von 4,00ml der Probe wurde aus der MycoSeptm #224 Kartusche entnommen und im Spitzkolben am Rotovapor bei 40°C zur Trockenphase gebracht.

Zweiter Aufreinigungsschritt:

Verwenden kann man sowohl eine LC-SI Silica SPE Kolonne als auch eine „normale Pipette“ mit Watte.

100mg KG₆₀ wurde 4 mal mit je 1ml Chloroform in die LC-SI Silica SPE Kartusche/normale Pipette gewaschen, um das Silikagel luftbläschenfrei in die Kartusche überzuführen.

Die Probe wurde 3 mal in 250µl Chloroform gelöst und jeweils nacheinander auf das Kieselgel der LC-SI Silica SPE Kolonnen/normale Pipette aufgebracht. Das vierte Mal wurde mit 250µl Chloroform nachgespült.

Mit 600µl Chloroform/Methanol (97:3) wurde die BEA Probe in einen Spitzkolben eluiert. Unter vermindertem Druck wurde die Probe durch einen Rotavapor bei 40°C zur Trockenphase gebracht und im Exsikkator bis zur Vermessung aufbewahrt.

Die Proben wurden jeweils in 250µl Acetonitril/Wasser (90:10) gelöst und 20µl der Proben wurden jeweils mittels HPLC-DAD vermessen.

2.8. UV-Messung

2.8.1. UV-Stabilitätskontrolle

Beauvericin wurde als Stammlösung in Methanol oder als Eichlösung in AcCN/H₂O (9:1) aufbewahrt. Kontrolliert wurde, ob innerhalb eines Monats Veränderungen am UV-Spektrum aufgetreten waren. Besonders wichtig waren dabei die Wellenlängen 195nm und 210nm, da diese zur Vermessung mittels HPLC dienten.

Bei der Wellenlänge von 195nm (genauer 192nm) befindet sich von Beauvericin das Maximum im UV-Spektrum, bei der Wellenlänge 210nm (genauer 209nm) eine Schulter, die beide zu vermessen waren (Krska et al, 1996).

Laut Literatur werden Beauvericinanalysen am HPLC mit DAD bei zwei Wellenlängen vermessen.

Beispiele:

192nm und 225nm (Krska et al, 1996)

192nm und 209nm (Schumacher, 1997)

192nm und 225nm (Josephs et al., 1999)

Prüflösungen zur UV-Vermessung waren:

1. Vom 3.8.2005: 1,00mg BEA in AcCN/H₂O (9:1), davon wurden 100µg auf 2ml verdünnt, dann auf 5ml
2. Vom 4.8.2005: 1,03mg BEA in AcCN/H₂O (9:1), davon wurden 50µl auf 5ml verdünnt

Auswertungen fanden am 4., 8., 11., 15., 22., 29. August 2005 statt, wobei es mit der Zeit, (ab dem 22.8.2005), weil Lösungsmittel während der Messung verdampfte, zu einem laufenden Konzentrationsanstieg der Prüflösungen kam. Ab diesem Zeitpunkt könnte sich das Ergebnis dadurch verfälscht haben. Ergebnisse liegen aber ohne ungewöhnlichen Fehler vor.

Zu beobachten war, dass das UV-Spektrum über ein Monat konstant blieb. Auffällig war jedoch, dass die Messungen bei der Wellenlänge von 210nm viel genauer ausfielen, da es bei einer Wellenlänge von 195nm zu einem „Geräterauschen“ durch verschiedene Parameter kommen kann. Bei einigen Geräten in diesem Bereich ist die Messgenauigkeit erschöpft.

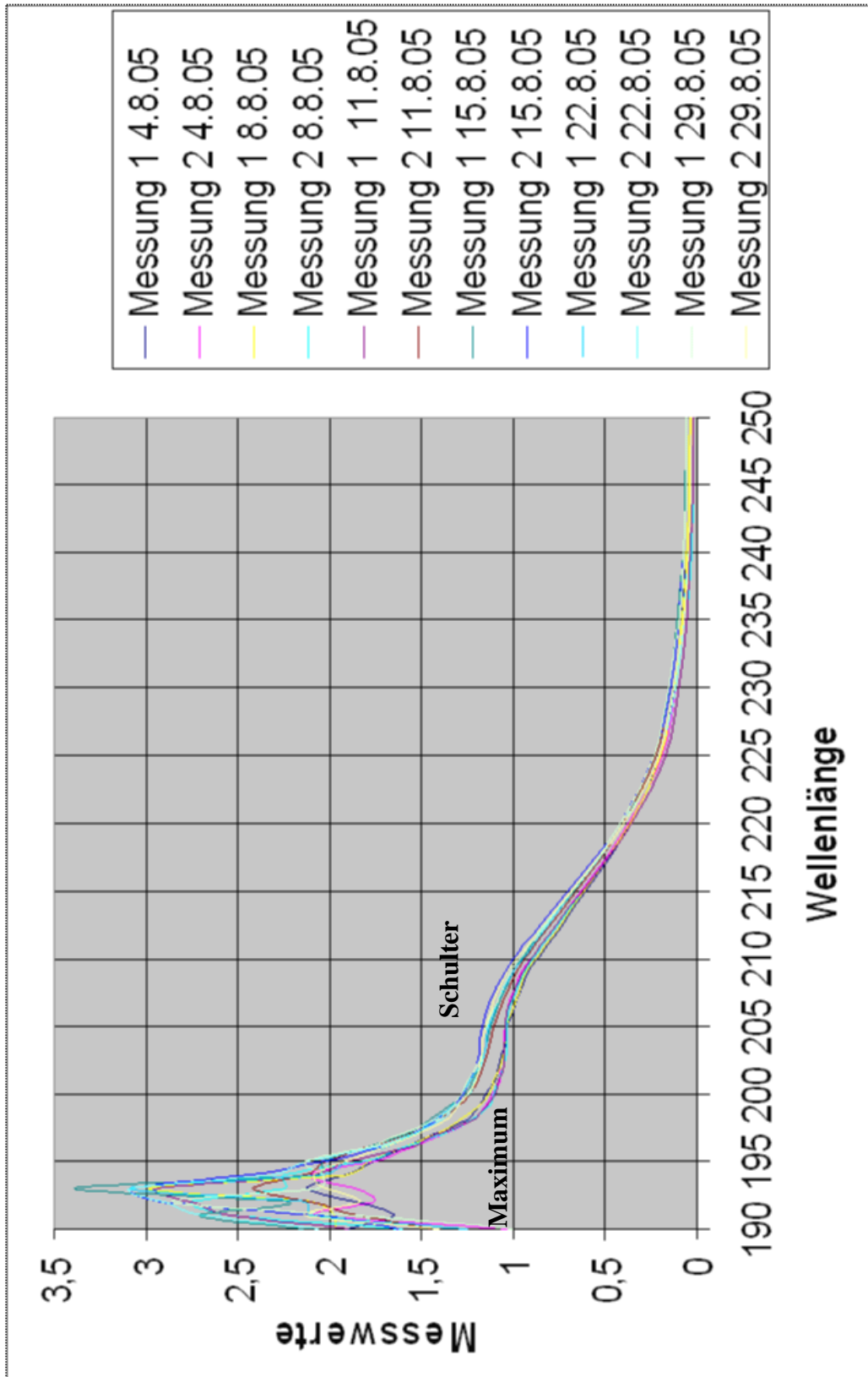


Abb. 14 UV-Messungen im Bereich 190-250nm

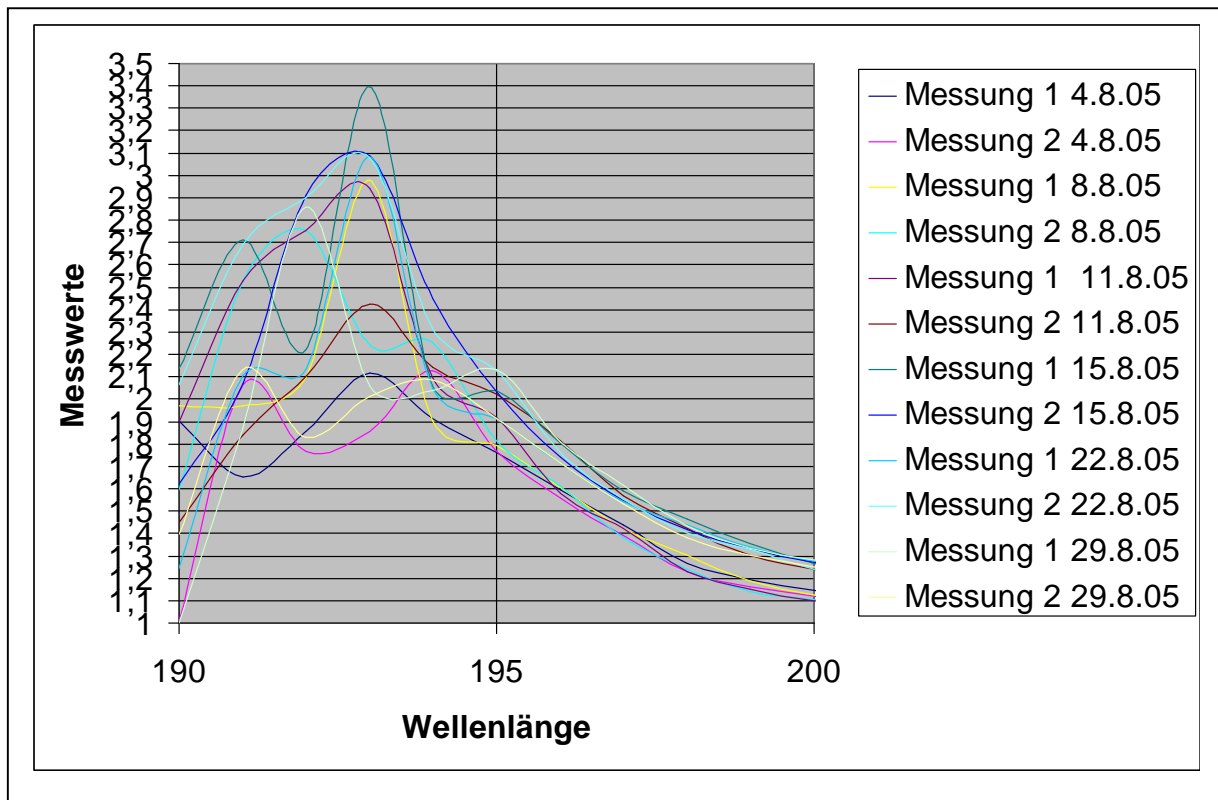


Abb. 15 UV-Messungen im Bereich 190-200nm

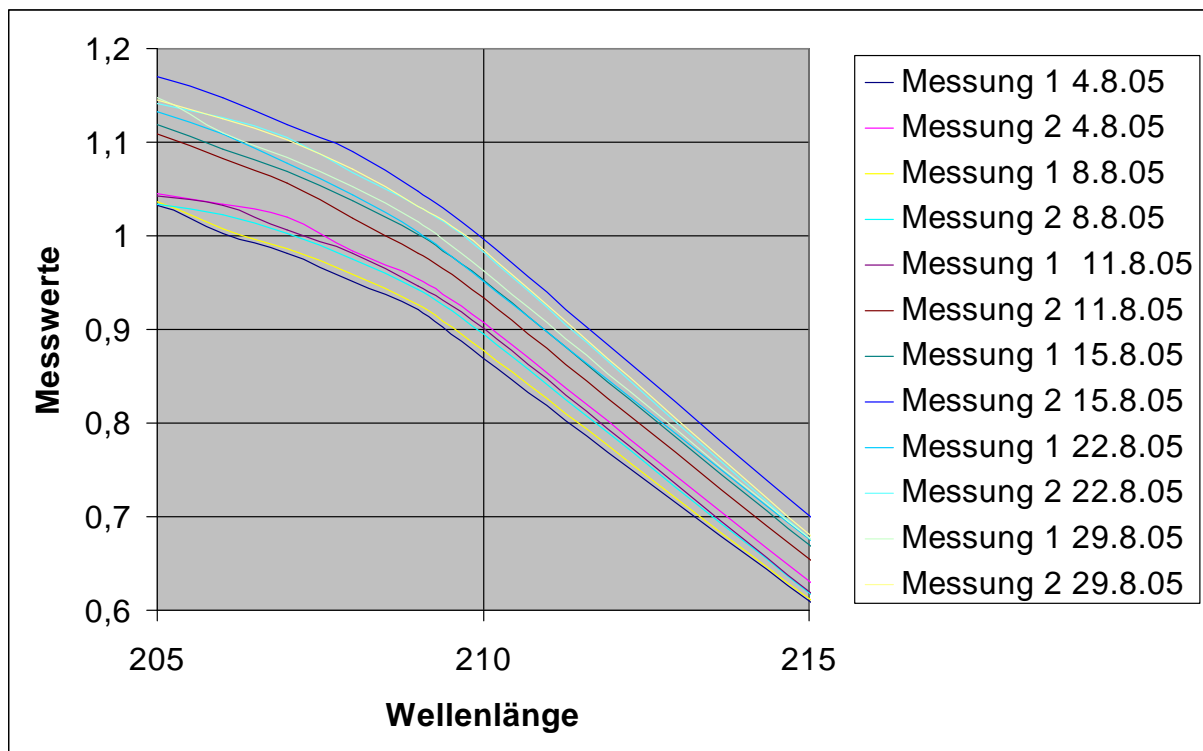


Abb. 16 UV-Messungen im Bereich 205-215nm

2.9. HPLC-Messung

2.9.1. Externe Kalibration:

Zum Aufstellen einer externen Kalibrationsgeraden wurde mit den Kalibrationslösungen aus der Stammlösung gearbeitet. Die Stammlösung bestand aus 1,00mg Beauvericin, das in 1,00ml Methanol gelöst wurde. Aus der Stammlösung wurden die Kalibrationslösungen zu 1ml in AcCN/H₂O (90:10) in den Konzentrationen 10µl, 30µl, 50µl, 70µl und 100µl ad 1ml AcCN/H₂O (90:10) hergestellt. (Schumacher,1997).

Stammlösung	1mg BEA/1ml MeOH
Kalibrationslösung 1	10µl Stammlösung ad 1ml AcCN/H ₂ O dest. 9:1
Kalibrationslösung 2	30µl Stammlösung ad 1ml AcCN/H ₂ O dest. 9:1
Kalibrationslösung 3	50µl Stammlösung ad 1ml AcCN/H ₂ O dest. 9:1
Kalibrationslösung 4	70µl Stammlösung ad 1ml AcCN/H ₂ O dest. 9:1
Kalibrationslösung 5	100µl Stammlösung ad 1ml AcCN/H ₂ O dest. 9:1

Tab. 17 Liste der Stamm- und Kalibrationslösungen

2.9.2. HPLC isokratische Analysen-Methoden:

Für eine isokratische Vermessung der Proben am HPLC equilibriert man 15min lang bei einer Flussrate von 1,2ml/min mit einem Lösungsmittelgemisch aus 90% AcCN und 10% H₂O. Vermessen wurde 30min lang bei gleicher Flussrate und mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch.

Step (Programmschritte)	Time (min) (Zeitverlauf)	Flow (ml/min) (Flussrate)	Solvent A (%) (Acetonitril)	Solvent B (%) (Dest.Wasser)	Curve (Kurvenverlauf)
0 (Equilibrierung)	15	1,2	90	10	0,0
1 (Trennung)	30	1,2	90	10	0,0
2 (Spülen)	5	1,2	100	0	1,0
3 (Spülen)	5	1,2	100	0	0,0

Tab. 18 isokratische Methode

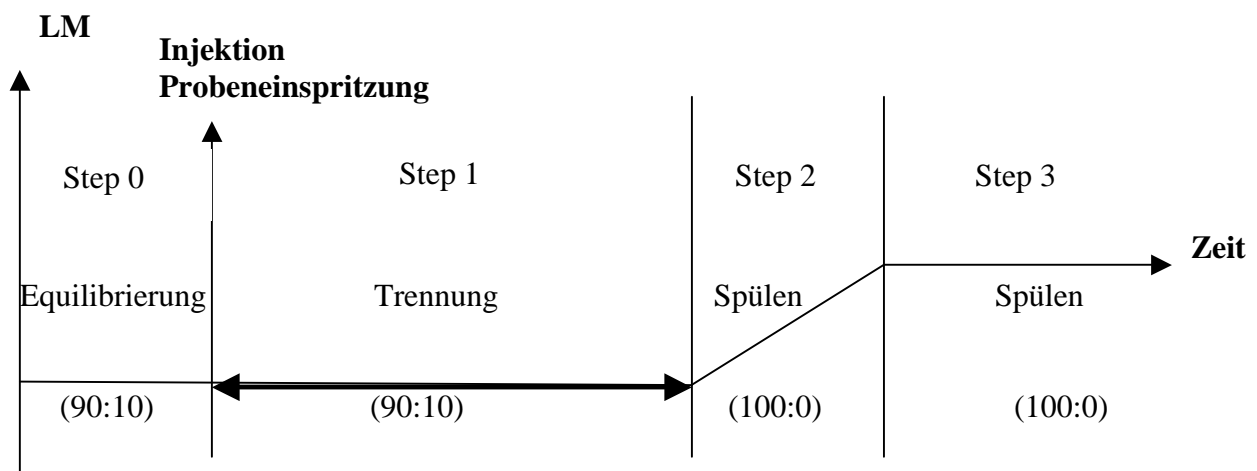


Abb. 19 isokratischer HPLC-DAD Programmverlauf

Die gelb markierten Zeilen beschreiben das Solventgemisch während der HPLC-Messung (90:10). „Step 1“ ist der Messzeitraum, der 30min lang andauert. Im „Step 2“ ändert sich das Solventgemisch, daher auch der Kurvenverlauf (1,0).

Flussrate (Flow)	1,2 ml/Minute
Mobile Phase	Acetonitril/H ₂ O dest. (90:10)
Stationäre Phase	HPLC-Säule LiChroCART50-4, RP 18a
Temperatur	Raumtemperatur
Detektor	DAD Messung von 195nm und 210nm
Kanal A (Solvent A)	Acetonitril
Kanal B (Solvent B)	Dest. Wasser

Tab. 20 HPLC-Messparameter

3. Resultate

3.1. BEA-Bildung in Mais/Polenta-hältigem Nährmedium

3.1.1. BEA Bildung in Abhängigkeit der Konzentration der Vorstufen

Mais

Während der Aufzucht in den drei Wochen zeigte sich:

Das Schimmelpilzwachstum ist lichtabhängig. Mehrmaliger Platzwechsel der Kolben im Brutschrank, von hinten nach vor und retour, bewirkte homogeneres Wachstum.

In der ersten Woche war ein Hauch eines weißen Überzuges an *Fusariummycel* zu erkennen, der sich in der zweiten Woche mehr als verdoppelte. Ab der dritten Woche war die Maisprobe vom weißen Mycel vollkommen umhüllt.

In den ersten Versuchsschritten verloren die Maisproben zusehend an Flüssigkeit und so wurden die Proben im folgenden Durchgang, pro Woche, mit je 5ml H₂O dest. gegossen.

Vor der HPLC Analyse war das Probenausssehen im Kolben eine orange, leicht rötliche, feste bis ölige Substanz, oft glänzend schimmernd. Bei einer Probe (1,5g/l AS) haben sich an der Glaswand farblose bis weißliche Kristalle ausgebreitet.

Polenta

Bei einer AS-Konzentration von 1,5g/l kam es während des Wachstums zu einer Kontamination von einem anderen Schimmelpilz. Diese Probe wurde nochmals neu bearbeitet und vermessen (zeigt aber, dass auf einer verkleisterten und fast trockenen Polenta Schimmelpilzwachstum doch stattfindet). Das Aussehen der Polenta nach dreiwöchiger Wachstumsphase war verkleistert und eingetrocknet, ohne nennenswerten *Fusarium*wachstum.

Probenausssehen nach Isolierung:

Im Kolben war eine dunkelorange, ölige bis feste Substanz zu erkennen.

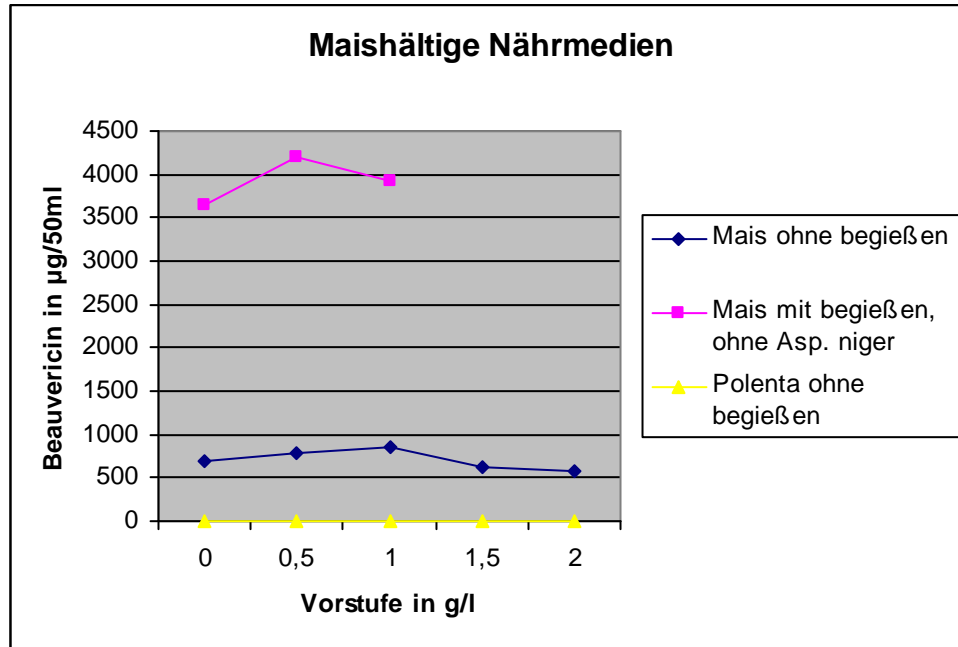


Abb. 21 Maishältige Nährmedien

3.1.2. BEA Bildung in Abhängigkeit einer Ko-Inokulation mit *Aspergillus niger*

Gezeigt hat sich, dass es unter Einfluss des *Aspergillus niger* zu einer drastischen Erhöhung der BEA Konzentration kommen kann. Ebenso, dass Flüssigkeitszugabe zur Probe, während der Wachstumszeit die Produktion von BEA ebenfalls positiv beeinflussen kann. Maximalproduktion von BEA ist bei den Vorstufen 0,5 und 1,0g/l zu finden. (Tab. gelb markiert)

Es kam, durch Oxidation, zu einer tieferen Verfärbung der Proben. Auch durch die schwarze Farbe des *Aspergillus niger* war das Aussehen des Eluates dunkler. Das Probenausssehen nach der Isolierung ging auch ins Dunklere (rot). Das nicht verwendete Filtrat verfärbte sich im Kühlschrank bei der Lagerung ins Tiefrote. Durch Verunreinigungen, bedingt durch *Aspergillus niger*, konnte BEA zuerst nicht vermessen werden.

Um das Vorhandensein von BEA zu überprüfen, wurden alle Eluationsfiltrate jeder Säurevorstufe miteinander vereinigt. Nach einer gewissen Zeit bildeten sich im Rohextrakt Schlieren und kleine BEA-Kristalle.

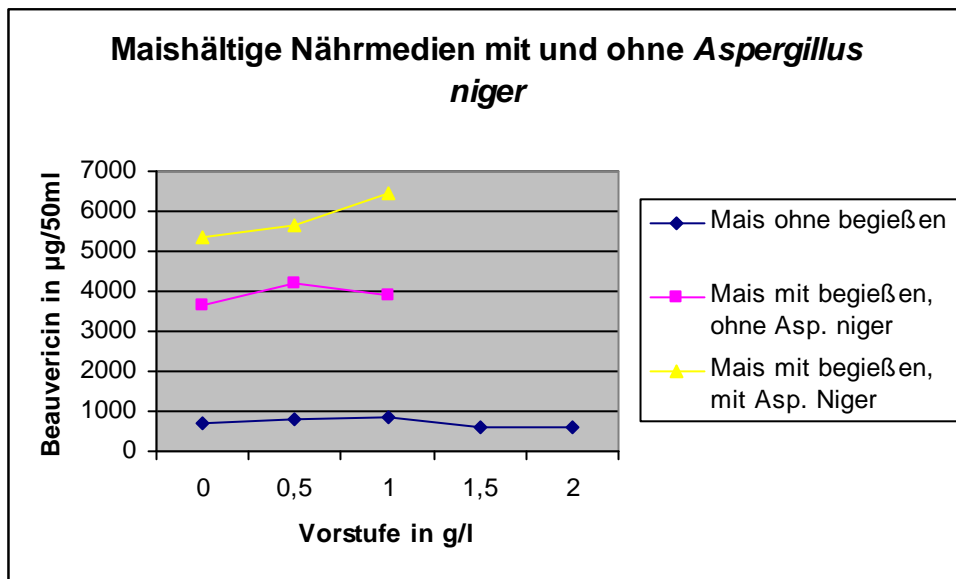


Abb. 22 Maishältige Nährmedien mit und ohne *Aspergillus niger*

Säurevorstufen	Mais ohne H ₂ O-Zugabe	Mais mit H ₂ O-Zugabe	Mais mit <i>Aspergillus</i> kokontaminiert mit H ₂ O-Zugabe	Polenta ohne H ₂ O-Zugabe
	µg/50g	µg/50g	µg/50g	µg/50g
0,0g/l	689,33	3650	5364	3,76
0,5g/l	786,92	4205	5644	3,42
1,0g/l	857,19	3912	6462	2,87
1,5g/l	622,61			2,81
2,0g/l	582,42			2,81

Tab. 23 Mais und Polenta Ergebnisse

3.1.3. Aus dem Rohextrakt isolierte Kristalle mit *Aspergillus niger* Kontamination (vermessen isokratisch mit AcCN/H₂O 90:10)

Wegen mangelhafter Ergebnisse wurden alle Extrakte aller kontaminierten Maisproben zu einem Rohextrakt vermischt. Nach einiger Zeit entstanden darin am Kolbengrund Schlieren bzw. Kristalle. Diese wurden auf BEA untersucht. Endresultat war 650µg/50g.

Aus dem Rohextrakt wurden weiße Schlieren/Kristalle entnommen und in 250µl Chloroform zu einer Suspension gelöst. Davon wurden 10µl zur Trockenphase gebracht, in 250µl AcCN/H₂O (90:10) zu einer Suspension gelöst und vermessen.

Aus dem Rohextrakt isolierte Kristalle mit *Aspergillus* (vermessen isokratisch mit AcCN/H₂O 90:10)

BEA-Gehalt in Rohextrakt	650µg BEA/50g Rohextrakt
--------------------------	--------------------------

Tab. 24 Rohextrakt

Das *Aspergillus*wachstum war während der drei Wochen nicht extrem aufgefallen. Das Mycel war nur etwas grünlicher als bei den Proben ohne *Aspergillus niger*.

Durch Abänderung der Parameter (siehe Ende, 3.4. Änderung der Parameter) wurde eine Trennung erzielt.

Die Verwendung eines „aktiveren“ *Aspergillus*stamms durch Überimpfung und frischer Aufzucht auf einem spezifischen Nährmedium bewirkte besseres Wachstum.

Bei der Überimpfung auf Mais-Proben ist zu achten, dass der *Aspergillus*stamm schneller und intensiver wächst als der *Fusarium*stamm. Bei dreiwöchigem Wachstum der Probe könnte daher der *Aspergillus*stamm erst in der zweiten Woche überimpft werden.

UV-Spektrum einer BEA HPLC-Messung mit DAD

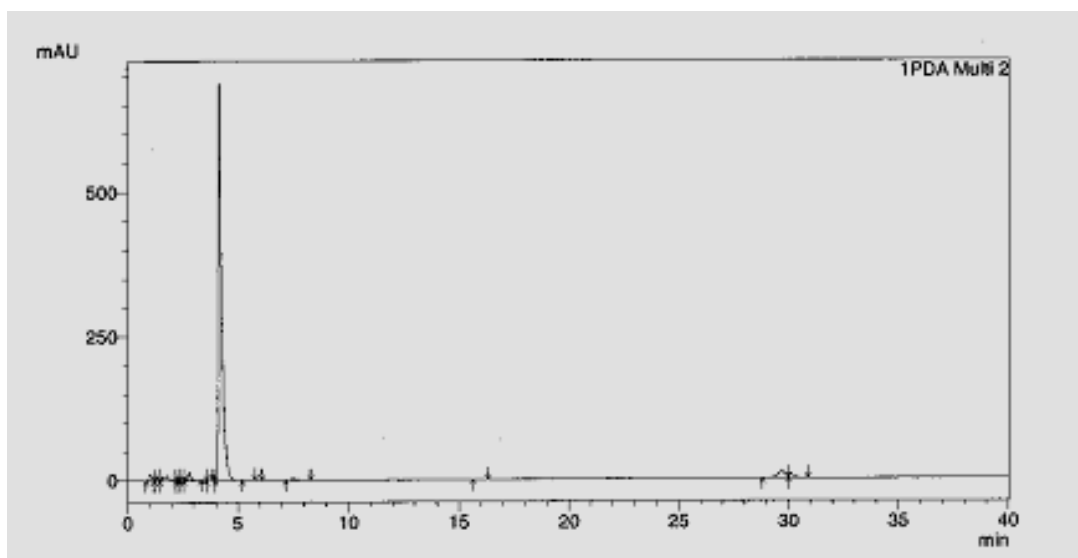


Abb. 25 Rohextrakt-Probe von den „Kristallen“, aufgenommen auf Shimadzu, Vorsäule: Hypersil Guard Column ODS 5µm, 4 x 4mm, Säule: LiChroCART 250-4 HPLC Cartridge, LiChrospher 100, RP 18e (5µm)



Abb. 26 Bsp. des Aussehens der Proben Mais mit *Aspergillus*

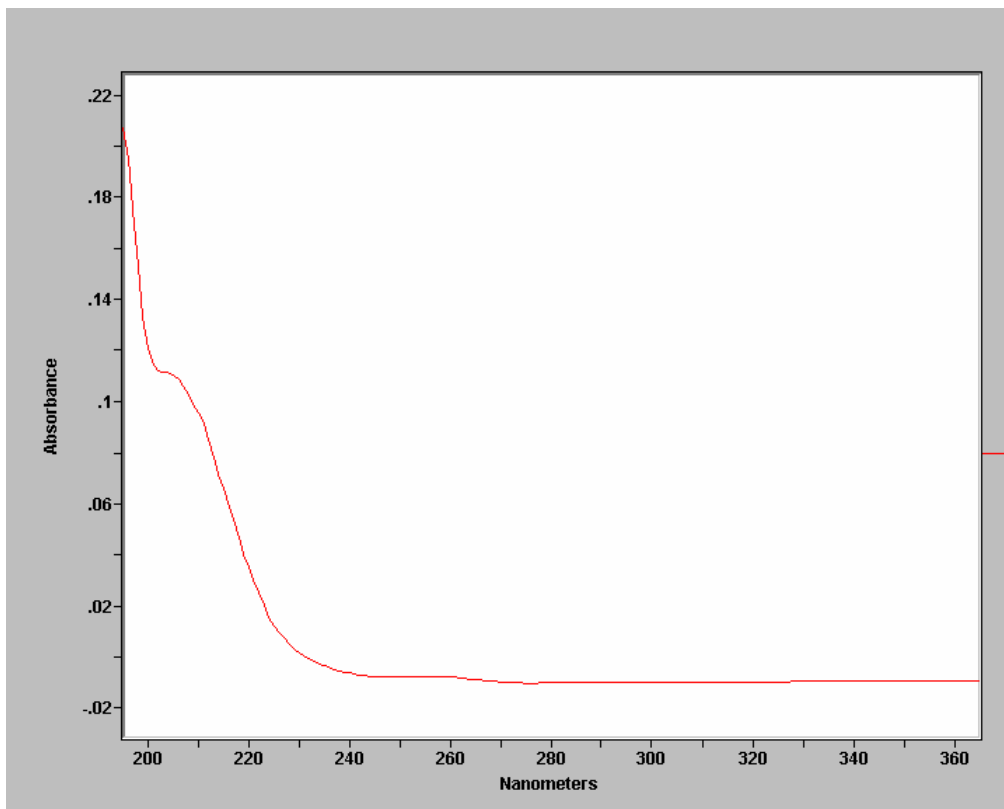


Abb. 27 UV-Spektrum von Beauvericin von einer Maisprobe

3.2. *Fusarium* Kultivierung in CD-Medium

3.2.1. CD-Medium mit Perlit

Makroskopisch war weder im ersten noch im zweiten Durchgang ein *Fusarium*wuchs erkennbar.

Probenaussehen nach Isolierung:

Zu erkennen war makroskopisch anfangs kein Vorhandensein von irgendeiner Substanz, dann weiße Schlieren bis vereinzelt weiße Kristalle.

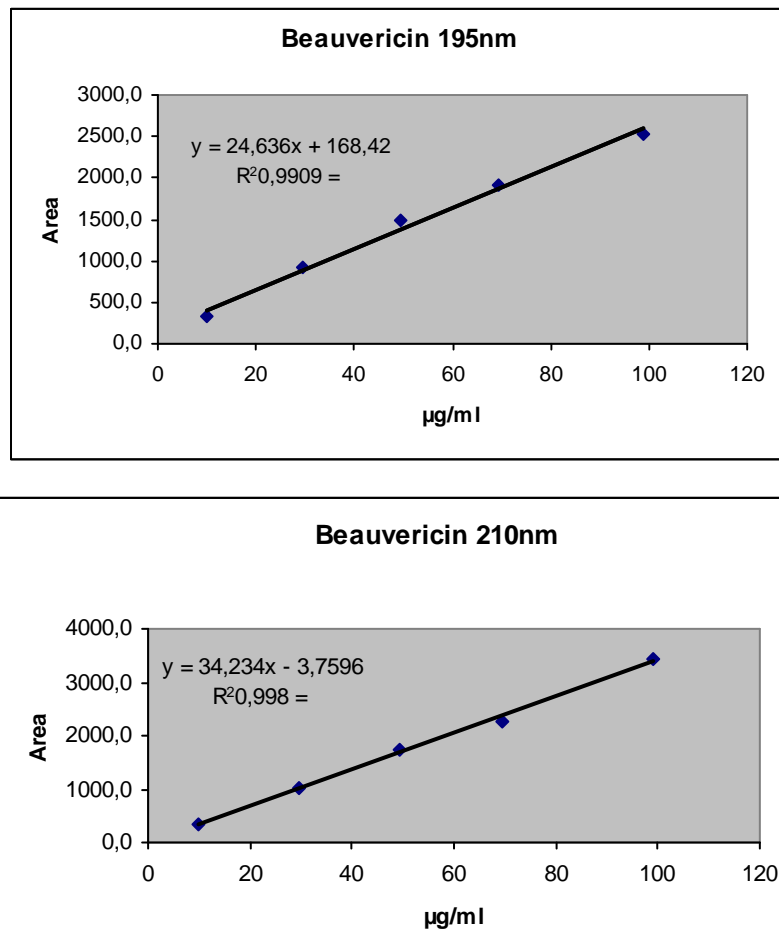


Abb. 28 Eichgeraden zur Vermessung

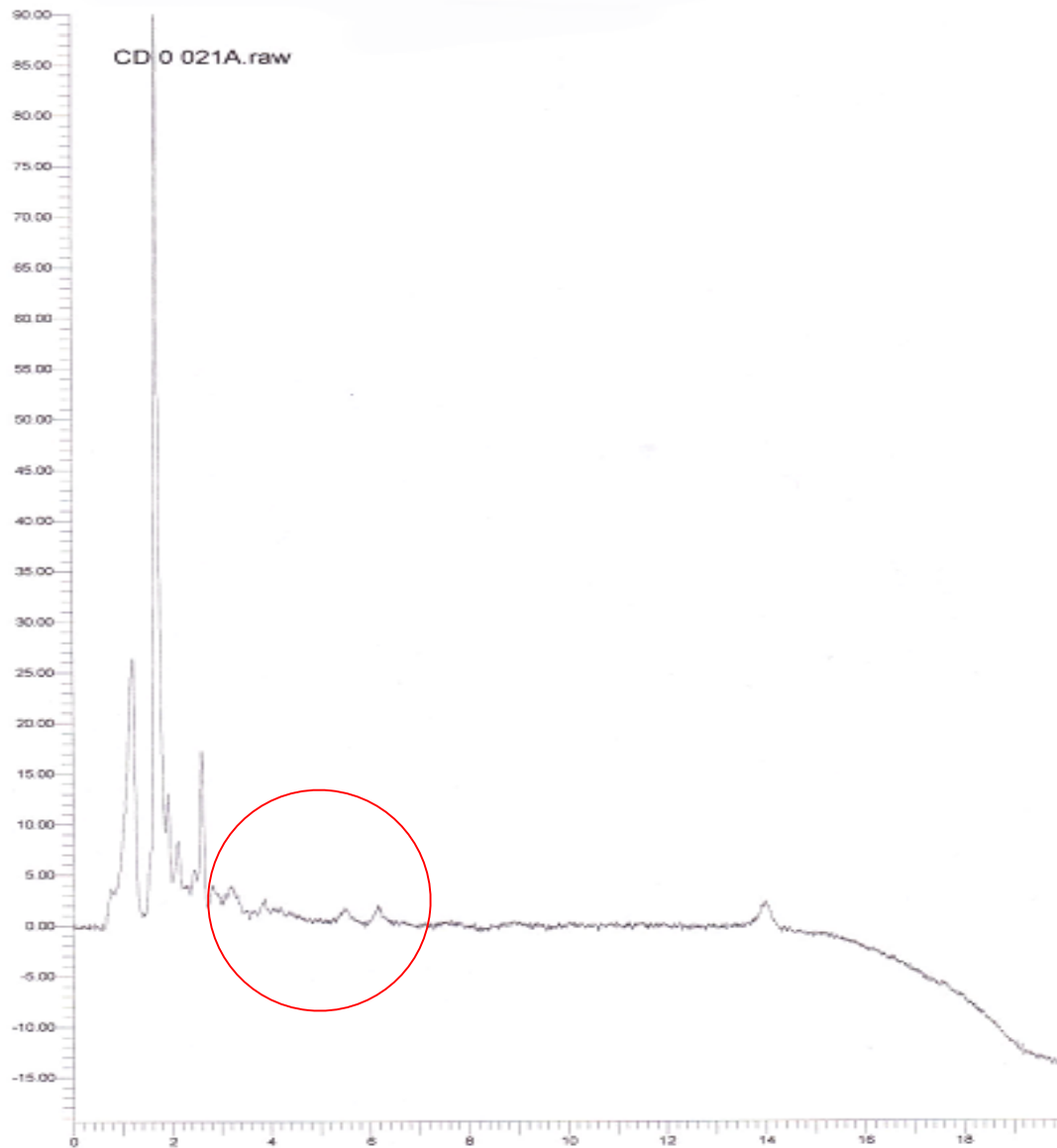


Abb. 29 CD Ergebnis, Isokratische Messmethode

Flussrate (Flow)	1,2 ml/Minute
Mobile Phase	Acetonitril/H ₂ O dest. (90:10)
Stationäre Phase	HPLC-Säule LiChroCART50-4, RP 18a
Temperatur	Raumtemperatur
Detektor	DAD Messung von 195nm und 210nm
Kanal A (Solvent A)	Acetonitril
Kanal B (Solvent B)	Dest. Wasser

Abb. 30 Parameter der isokratischen Messmethode

Der rote Kreis markiert den BEA-Retentionsbereich (ca. 3,7 bis 4,1) bei der CD-Medium Analyse. Während der Versuche konnte keine nennenswerte BEA-Produktionsverbesserung erzielt werden. Produktionsmaximum befindet sich wieder bei der Vorstufe 1,0g/l.

Säurevorstufen	BEA ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)
0,0g/l	2,81
0,5g/l	3,62
1,0g/l	3,90
1,5g/l	3,62
2,0g/l	3,62

Tab. 31 CD Ergebnisse

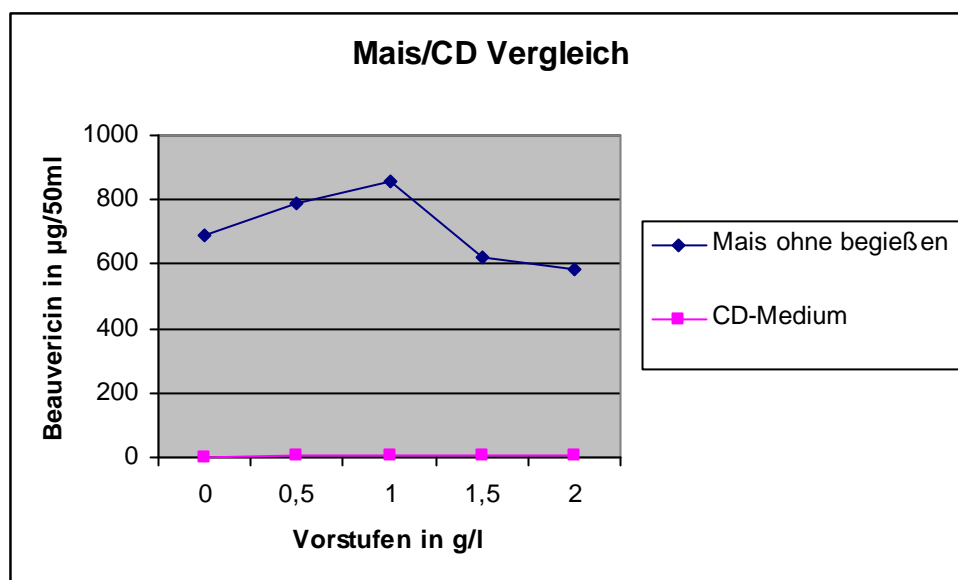


Abb. 32 Vergleich Mais mit CD-Nährlösung

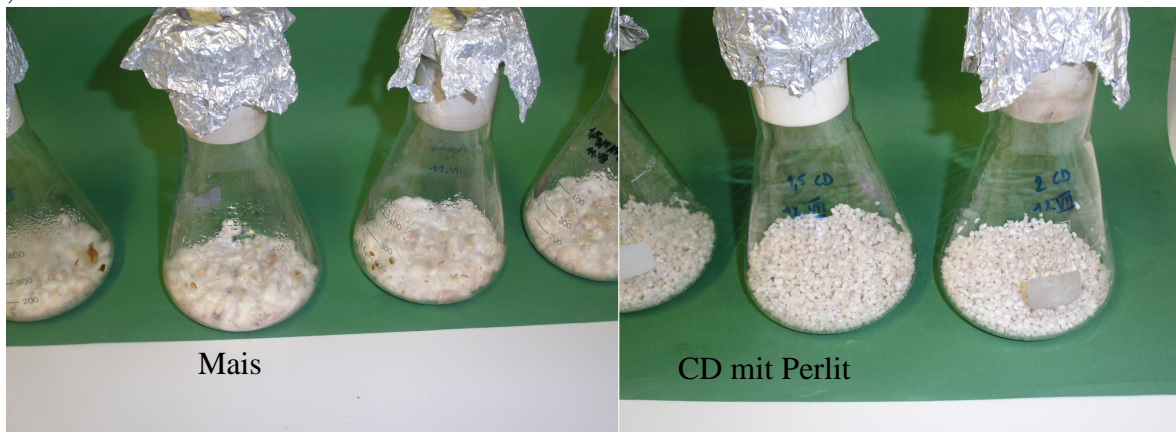


Abb. 33 Beispiele des Probenaussehens von Maisproben und Proben Mit CD-Nährmedium und Perlit

3.2.2. CD-Medium ohne Perlit:

Nach drei Wochen war kein wesentliches Wachstum erkennbar, außer vereinzelt ein Millimeter große Nester von *Fusarium subglutinans*.

Probenaussehen nach Isolierung:

Zu erkennen war makroskopisch anfangs kein Vorhandensein von irgendeiner Substanz, dann weiße Schlieren bis vereinzelt weiße Kristalle.

3.2.3. Hefe, CD Nährlösung und Perlit

Das weiße *Fusarium*mycel war ab dem dritten Tag makroskopisch zu erkennen und wuchs während der drei Wochen kontinuierlich an der Flüssigkeitsoberfläche heran.

Auch hier hat sich gezeigt, dass mit dem Nährmedium Hefe das Mykotoxin BEA produzierbar, isolierbar und analysierbar ist. Auch wenn die Ausbeute von BEA ($50,96\mu\text{g}/100\text{ml}$) nicht so hoch ausfällt, als bei dem Nährmedium Mais ($689,33\mu\text{g}/50\text{g}$, $3650\mu\text{g}/50\text{g}$ [begossen], $5364\mu\text{g}/50\text{g}$ [begossen, mit *Aspergillus niger*]). Teilziel meiner Arbeit ist aber, ein nicht organisches Nährmedium für das *Fusarium*wachstum zu finden. Bei

dem CD-Nährmedium wäre das der Fall, bei Hefe handelt es sich, wie beim Nährmedium Mais oder S2G, wieder um ein organisches Medium.

3.2.4. Pepton mit CD und Perlit

Das weiße *Fusarium*mycel war ab dem dritten Tag makroskopisch gut zu erkennen und wuchs während der drei Wochen kontinuierlich an der Flüssigkeitsoberfläche heran. Kein Beauvericin konnte vermessen werden.

Da in den Proben kein BEA nachgewiesen werden konnte, wurde zur Absicherung mit BEA-Reinsubstanz überspritzt. Weiters wurde durch Methodenänderungen versucht, die Quantifizierung von BEA zu ermöglichen, was hier ohne Erfolg blieb.

Probenausssehen nach Isolierung:

Im Kolben war minimal eine gelblich-orange, honigartige Substanz erkennbar.

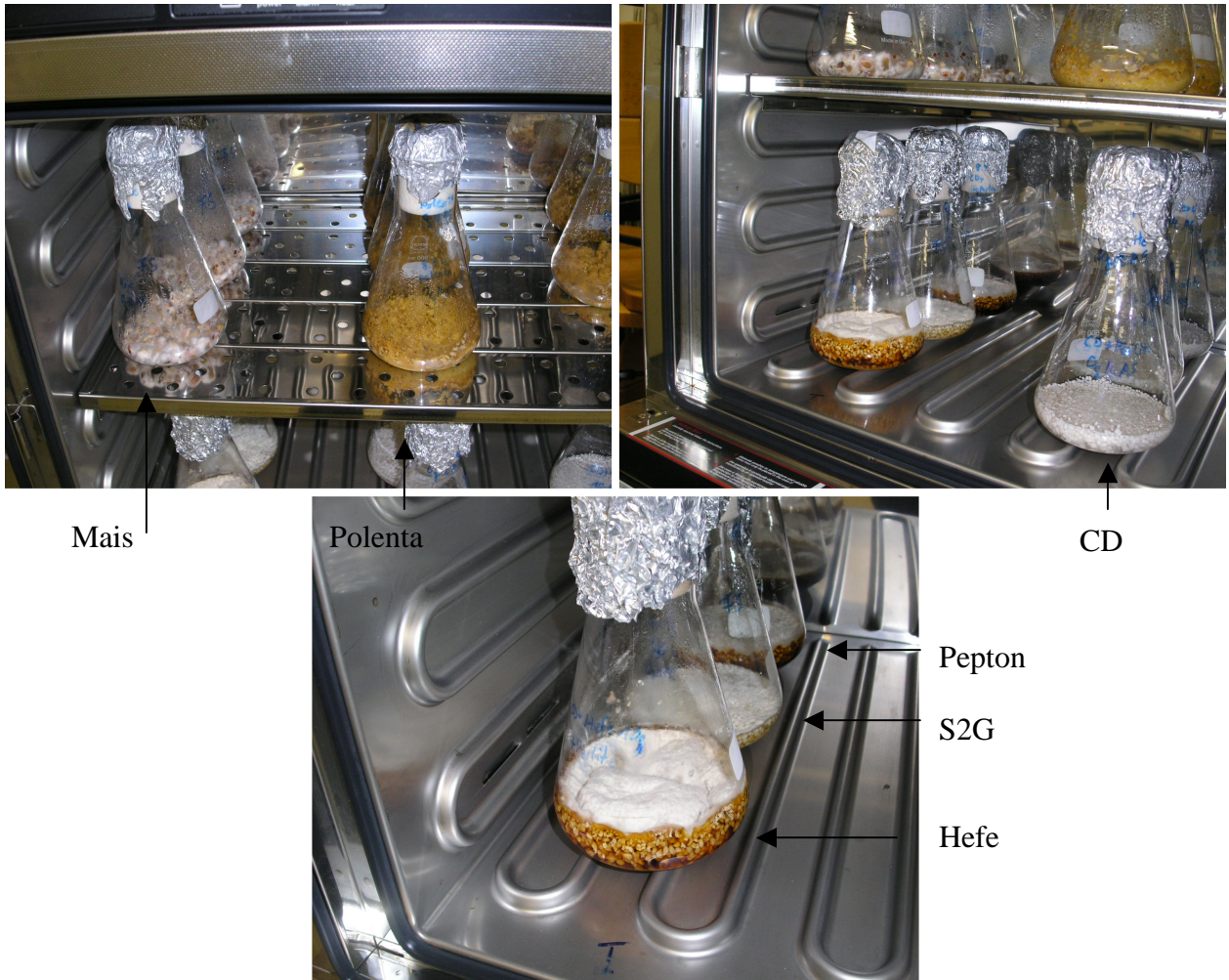


Abb. 34 Bilder von den Proben

3.3. S2G mit und ohne Perlit

3.3.1. S2G ohne Perlit

Bei der S2G ohne Perlit war das *Fusarium*wachstum innerhalb der drei Wochen massiv, doch kein Gehalt an Beauvericin war messbar. In der ersten Woche bildete sich das Mycel in der Lösung massiv aus. Durch die orange Farbe der Lösung was das Mycel auch in dieser Farbe. Ab der zweiten Woche blieben Schollen des Mycels an der Glaswand kleben. Hier war das *Fusarium*wachstum sehr gut.

Probenausssehen nach Isolierung:

Im Kolben war eine gelbe, ölige bis feste Substanz zu erkennen.



Abb. 35 Probenausssehen von S2G-Proben und CD-Proben in Lösung

3.3.2. S2G mit Perlit

Hier hat sich gezeigt, dass mit dem Nährmedium S2G mit Perlit das Mykotoxin BEA produzierbar, isolierbar und analysierbar ist. Auch zeigt sich, dass die Ausbeute von 568,82µg/100ml relativ hoch ist, wie es auch beim Nährmedium Mais (689,33µg/50g, 3650µg/50g [begossen], 5364µg/50g [begossen, mit *Aspergillus niger*]) der Fall ist. Teilziel

meiner Arbeit ist aber, ein nicht organisches Nährmedium für das *Fusarium*wachstum zu finden. Bei dem CD-Nährmedium wäre das der Fall, bei S2G handelt es sich, wie beim Nährmedium mit Mais, wieder um ein organisches Medium.

In der ersten Woche stand die Probe im hinteren, dunkleren Teil des Brutschrankes. Das Wachstum war nicht so rasant wie bei der Probe ohne Perlit. In der zweiten Woche bekam die Probe mehr diffuses Licht und begann zu wuchern, wie die Probe ohne Perlit. Das Mycel wuchs nur an der Bouillonoberfläche und war an der Oberfläche weiss wie bei den Maisproben.

S2G ohne Perlit	S2G mit Perlit
0,00 µg BEA/100ml	568,82 µg BEA/100ml

Tab. 36 BEA Produktion in S2G mit und ohne Perlit

Probenausssehen nach Isolierung:

Im Kolben war eine orange-braune, ölige bis feste Substanz zu erkennen.

3.4. Änderungen der Methode:

Bei der Vermessung der Probe sind Trennungprobleme aufgetreten. Beauvericin überlagerte sich mit Verunreinigungen aus Mais. Durch Veränderungen in der Equilibrierung (Solvent A%:Solvent B%) und Verlängerung der Trennzeit (30 à 45 à 60) ist es gelungen, Beauvericin isokratisch erfolgreich zu vermessen. Durch Verlängerung der Trennzeit trennten sich die Peaks (BEA und Verunreinigung) von einander und wurden vermessen. Durch die Veränderungen im „Step 0“ wurde die Trennung ins Gleichgewicht gebracht.

1.

Step (Programmschritte)	Time (min) (Zeitverlauf)	Flow (ml/min) (Flussrate)	Solvent A (%) (Acetonitril)	Solvent B (%) (Dest.Wasser)	Curve (Kurvenverlauf)
0 (Equilibrierung)	15	1,2	90	10	0,0
1 (Trennung)	30	1,2	90	10	0,0
2 (Spülen)	5	1,2	100	0	1,0
3 (Spülen)	5	1,2	100	0	0,0

2.

Step (Programmschritte)	Time (min) (Zeitverlauf)	Flow (ml/min) (Flussrate)	Solvent A (%) (Acetonitril)	Solvent B (%) (Dest.Wasser)	Curve (Kurvenverlauf)
0 (Equilibrierung)	15	1,2	80	20	0,0
1 (Trennung)	45	1,2	90	10	1,0
2 (Spülen)	5	1,2	100	0	1,0
3 (Spülen)	5	1,2	100	0	0,0

3.

Step (Programmschritte)	Time (min) (Zeitverlauf)	Flow (ml/min) (Flussrate)	Solvent A (%) (Acetonitril)	Solvent B (%) (Dest.Wasser)	Curve (Kurvenverlauf)
0 (Equilibrierung)	15	1,2	70	30	0,0
1 (Trennung)	60	1,2	90	10	1,0
2 (Spülen)	5	1,2	100	0	1,0
3 (Spülen)	5	1,2	100	0	0,0

4.

Step (Programmschritte)	Time (min) (Zeitverlauf)	Flow (ml/min) (Flussrate)	Solvent A (%) (Acetonitril)	Solvent B (%) (Dest.Wasser)	Curve (Kurvenverlauf)
0 (Equilibrierung)	15	1,2	60	40	0,0
1 (Trennung)	60	1,2	90	10	1,0
2 (Spülen)	5	1,2	100	0	1,0
3 (Spülen)	5	1,2	100	0	0,0

5.

Step (Programmschritte)	Time (min) (Zeitverlauf)	Flow (ml/min) (Flussrate)	Solvent A (%) (Acetonitril)	Solvent B (%) (Dest. Wasser)	Curve (Kurvenverlauf)
0 (Equilibrierung)	15	1,2	50	50	0,0
1 (Trennung)	60	1,2	90	10	1,0
2 (Spülen)	5	1,2	100	0	1,0
3 (Spülen)	5	1,2	100	0	0,0

Abb. 37 Abänderungen der Methode

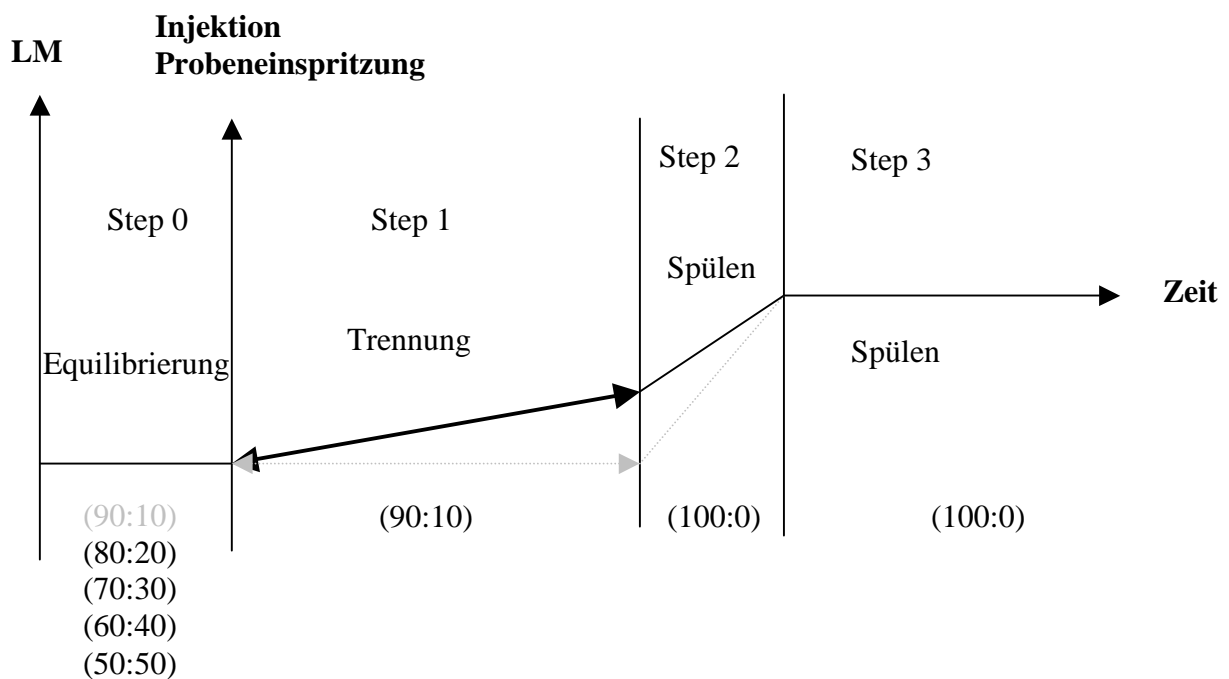


Abb. 38 Veränderungen des isokratischen HPLC-DAD Programmverlaufes

Durch Änderung des Solventgemisches ändert sich auch der Kurvenverlauf (1,0).

4. Zusammenfassung

Die Arbeit beschäftigt sich mit der Isolierung von Beauvericin und die Suche nach geeigneten Nährmedien. Das Interesse gilt auch der Feststellung von adäquaten Messmethoden für die Beauvericinanalyse und der Verbesserung des Wachstums des *Fusarium*stammes sowie der Produktion von dessen Mykotoxinen.

Mit Hilfe des Schimmelpilzes *Fusarium subglutinans* var. *sacchari* wird unter anderem das Mykotoxin Beauvericin während einer Inkubationszeit von 3 Wochen produziert. Dann wurde die Probe gereinigt und aus dieser Beauvericin isoliert und am HPLC-DAD extern mit isokratischer Analysenmethode mit Beauvericin als Standard vermessen.

Beauvericin gehört zu den Hexadepsipeptiden, setzt sich aus jeweils 3 Einheiten N-Methyl-L-Phenylalanin und D- α -Hydroxyisovaleriansäure zusammen und zeigt antibiotische, cytotoxische, insektizide Eigenschaften und Kanal-erzeugende Aktivität in Membranen. Es verändert die Aktionspotentialparameter des Papillarmuskels und senkt die Kontraktionskraft isolierter Muskelpräparate.

Fusarium subglutinans befällt am Feld Kornpflanzen. Mais wurde mit Säurevorstufen als Nährmedium verwendet. Säurevorstufen bei den Versuchen waren: L-Phenylalanin, L-Methionin und D- α -Hydroxyisovaleriansäure. Durch Triggern mit *Aspergillus niger* und wöchentliches Gießen der Kulturmedien wurde versucht, die Beauvericinproduktion des Schimmelpilzes anzuregen.

Weitere Nährmedien waren: Polenta mit Säurevorstufen, mit und ohne Perlit modifiziertes Czapek-Dox Kulturmedium, Sabouraud-2%-Glucose-Bouillon mit und ohne Perlit, Hefe mit CD Nährlösung und Perlit und Pepton mit CD Nährlösung und Perlit.

Folgende Erkenntnisse waren zu gewinnen: Durch Triggern mit *Aspergillus niger* konnte tatsächlich die Beauvericinproduktion am Korn angeregt werden.

Gezeigt hat sich auch, dass die BEA-Konzentrationen bei den Maisproben in den Säurevorstufen 0,5 und 1,0 g/l am positivsten ausfallen.

Wöchentliches Gießen der Kulturen verbesserte die Beauvericinproduktion um das 4-5 fache. Mit der Nährbouillon Sabouraud-2%-Glucose mit Perlit konnte 568,82 μ g BEA/100ml isoliert werden. Hefe mit CD Nährlösung und Perlit brachte den Wert 50,96 μ g BEA/100ml.

5. Literatur

- <http://www13.ages.at/servlet/sls/Tornado/web/ages/content/9DCC03D05D979BFFC1256E23004F6DD9>
AGES, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
Mykotoxine in der Landwirtschaft, Richard Öhlinger, CC Cluster Chemie Linz, Wels, 4.9.2004
- <http://schimmel-schimmelpilze.de/schimmelpilz/aspergillus-niger.html>
- <http://schimmel-schimmelpilze.de>
- http://www.rbgsyd.nsw.gov.au/conservation_research/pland_pathology_research/Soilborne_plant_diseases/Laboratory_techniques/Media
- <http://www.lfl.bayern.de/ipz/weizen/08468/>
- [http://www.vis-ernaehrung.bayern.de/de/left/fachinformationen/verbraucherschutz/unerwuenschte_sstoffe/fusarientoxine.htm](http://www.vis-ernaehrung.bayern.de/de/left/fachinformationen/verbraucherschutz/unerwuenschte_stoffe/fusarientoxine.htm)
- <http://www.uni-bielefeld.de/paedagogik/Seminare/moeller02/05gemuese/mais.html>
- http://www.imwl.de/PILZINFO/Schimmelpilze/hauptteil_schimmelpilze.htm
- <http://www.thiele-granit.de>
- <http://www.aeiou.at/aeiou.encyclop.m/m053503.htm>
- http://www.kantonslabor-bs.ch/infos_berichte.cfm?Labor.Command=detail&Labor.Jahr=2000&Labor.ID=17

- <http://www.landwirt.com/Bericht/2085-225-Artikel/Fusariumtoxine-durch-zeitgerechte-Ernte-und-Reinigung-vermeiden.html>
- http://www.laborweij.de/seiten/specials_fusarien.html

- **Die Grosse Enzyklopädie der Heilpflanzen, 1999**
Die Grosse Enzyklopädie der Heilpflanzen, Kaiser-Verlag, ISBN 3-7043-9002-X, S.626

- **Hunnius** pharmazeutische Wörterbuch,- 8.,neu bearb. Und erw. Aufl./ von Artur Burger und Helmut Wachter.- Berlin; New York; de Gruyter, 1998
ISBN 3-11-015792-6 brosch.
ISBN 3-11-015793-4 Gb.
S.932-933, 1490

- **Josephs, R. D. (1999)**
Development, application and characterisation of analytical methods for the determination of agriculturally important *Fusarium* mycotoxins, Diss. TU Wien
S.29, 68, 125-126

- **K. Kouri, M. Lemmens, R. Lemmens-Gruber (2003)**
Beauvericin- induced channels in ventricular myocytes and liposomes
Biochimica et Biophysica Acta Volume:1609 S.203-210

- **K. Kouri, M. R. Duchon and R. Lemmens-Gruber (2005)**
Effects of Beauvericin on the Metabolic State and Ionic Homeostasis of Ventricular Myocytes of the Guinea Pig. Chemical Research in Toxicology
Volume:18 Issue:11 S.1661-1668

- **R. Krska, R. Schuhmacher, M. Grasserbauer, P.M. Scott (1996)**
Determination of the *Fusarium* mycotoxin beauvericin at µg/kg levels in corn by high-performance liquid chromatography with diode-array detection; Journal of Chromatography A. Volume:746 Issue:2 S.233-238
- **Logrieco, A. Moretti, A. Ritieni, J. Chelkowski, C. Altomare, A. Bottalico, G. Randazzo (1993)**
Natural Occurrence of Beauvericin in Preharvest *Fusarium subglutinans* Infected Corn Ears in Poland
J. Agric. Food Chem. Volume:41 S.2149-2152
- **Logrieco, A. Moretti, G. Castella, M. KostECKI, P. Golinski, A. Ritieni and J. Chelkowski (1998)**
Beauvericin Production by *Fusarium* Species; Appl. Environ Microbiol
Volume:64 Issue:8 S.3084-3088
- **Marquardt, Schäfer (2004)**
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart ISBN: 3-8047-1777-2
Lehrbuch der Toxikologie. 2. Auflage S.1039-1046
- **G. Munkvold, H.M. Stahr, A. Logrieco, A. Moretti, A. Ritieni (1998)**
Occurrence of Fusaproliferin and Beauvericin in *Fusarium*-Contaminated Livestock Feed in Iowa
Appl Environ Microbiol. 64 S.3923-3926
- **Mücke und Lemmen (2004)**
Schimmelpilze; 3 Auflage; ecomed Biowissenschaften
ISBN: 3-609-68001-6 S.25-26, 29
- **Peeters H. (1988)**
Die Biosynthese des Beauvericin: Reinigung und Charakterisierung des multifunktionellen Enzyms Beauvericinsynthetase aus *Beauveria Bassiana* S.9-10, Diss.

- **Roth, Frank, Kormann (1984)**
Giftpflanzen/Pflanzengifte; Ecomed Verlagsgesellschaft mbH Landsberg,
ISBN:3-609-64810-4 IV-3.M-8

- **Roth, Frank, Kormann: Giftpilze, Pilzgifte, Schimmelpilze, Mykotoxine (1990)**
Landsberg am Lech ecomed Verlagsgesellschaft mbH
ISBN: 3-609-64730-2 S.176

- **Schlegel, 1992**
Allgemeine Mikrobiologie, Hans G. Schlegel, 7.
Thieme Verlag, ISBN 3 13 444607 3 S.195, 371, 471

- **Schumacher Rainer (1997)**
Development and application of modern analytical methods for the determination
of selected *Fusarium mycotoxins* in cereals with special emphasis on quality
assurance Diss. TU-Wien S.59, 63

- **Eberhard Teuscher (1994)**
Biogene Gifte; Verlag: Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York;
2. Auflage ISBN: 3-437-30747-9 S.65

6. Lebenslauf

Geburtsdatum: 27.07.1978

Eltern: Brigitte und Dr. Friedrich Singer

Schulbildung: 4 Jahre Volksschule in Wien XII
Realgymnasium Rosasgasse / Wien XII
Matura 1997

Bundesheer 1997 / 1998

Universitätsstudium seit: 1998

Im Zeitraum von Jänner 2006 bis 2007 wurde der praktische Teil der vorliegenden Diplomarbeit ausgeführt.