

- [3] C. A. Hutchinson III, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, M. Smith, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 6551.
[4] A. Razin, T. Hirose, K. Itakura, A. D. Riggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4268.
[5] M. J. Zoller, M. Smith, *Methods Enzymol.* 100 (1983) 468.
[6] G. Winter, A. R. Fersht, A. J. Wilkinson, M. Zoller, M. Smith, *Nature (London)* 299 (1982) 756.
[7] G. Dalbadie-McFarland, L. W. Cohen, A. D. Riggs, D. Morin, K. Itakura, J. H. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 6409.
[8] I. S. Sigal, B. G. Harwood, R. Arentzen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 7175.
[9] A. J. Wilkinson, A. R. Fersht, D. M. Blow, G. Winter, *Biochemistry* 22 (1983) 3581.
[10] R. Wallace, M. Schold, M. J. Johnson, P. Dembek, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 3647.
[11] M. M. Waye, G. Winter, A. J. Wilkinson, A. R. Fersht, *EMBO J.* 2 (1983) 1827.
[12] A. R. Fersht, R. Jakes, *Biochemistry* 14 (1975) 3350.
[13] G. L. E. Koch, *Biochemistry* 13 (1974) 2307.
[14] M. J. Irwin, J. Nyborg, B. R. Reid, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* 105 (1976) 577.
[15] G. Winter, G. L. E. Koch, B. S. Hartley, D. G. Barker, *Eur. J. Biochem.* 132 (1983) 383.
[16] a) T. N. Bhat, D. M. Blow, P. Brick, J. Nyborg, *J. Mol. Biol.* 122 (1982) 407; b) T. N. Bhat, P. Brick, D. N. Blow, unveröffentlicht.
- [17] J. Rubin, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* 145 (1981) 489.
[18] A. R. Fersht, J. S. Ashford, C. J. Bruton, R. Jakes, G. L. E. Koch, B. S. Hartley, *Biochemistry* 14 (1975) 1.
[19] A. R. Fersht, R. S. M. Mulvey, G. L. E. Koch, *Biochemistry* 14 (1975) 13.
[20] A. R. Fersht, *Biochemistry* 14 (1975) 5.
[21] R. Jakes, A. R. Fersht, *Biochemistry* 14 (1975) 3344.
[22] P. Dessen, G. Zaccai, S. Blanquet, *J. Mol. Biol.* 159 (1982) 651.
[23] R. S. Mulvey, A. R. Fersht, *Biochemistry* 16 (1977) 4005.
[24] A. R. Fersht, *Proc. R. Soc. London Ser. B* 187 (1974) 397.
[25] A. R. Fersht: *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, New York 1977.
[26] A. J. Wilkinson, A. R. Fersht, D. M. Blow, P. Carter, G. Winter, *Nature (London)* 307 (1984) 187.
[27] G. Lowe, G. Tansley, *Tetrahedron* 40 (1984) 113.
[28] W. J. Albery, J. R. Knowles, *Angew. Chem.* 89 (1977) 295; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16 (1977) 285.
[29] H. G. Mannherz, H. Schenk, R. S. Goody, *Eur. J. Biochem.* 48 (1974) 287.
[30] M. Jaslin, L. Regan, P. Schimmel, *Nature (London)* 306 (1983) 441.
[31] J. E. Villafranca, H. E. Howell, D. H. Voet, M. S. Strobel, R. C. Ogden, J. N. Abelson, J. Kraut, *Science* 222 (1983) 782.
[32] R. Jaenicke, *Angew. Chem.* 96 (1984) 385; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 395.

Mycotoxine aus Schimmelpilzen – Waffen ungebetener Tischgenossen von Mensch und Tier: Strukturen, Wirkungen, Biosynthese und Schutzmöglichkeiten**

Von Burchard Franck*

Neben den Antibiotica sind die Mycotoxine die zweite große Gruppe von Wirkstoffen aus Mikroorganismen. Man kennt schon über 300 Mycotoxine, die sich 25 Strukturtypen zuordnen lassen. Sie werden von etwa 350 Schimmelpilzen mit annähernd 10 000 Stämmen produziert. Durch die Neigung der Mycotoxin-bildenden Schimmelpilze, sich aggressiv auf Nahrungsmitteln auszubreiten, können sie epidemieartig auftretende Mycotoxikosen verursachen. – Nach Isolierung, Strukturbestimmung und Feststellung der biologischen Wirkungen gelang es, die Biosynthese der Mycotoxine weitgehend aufzuklären. Danach lassen sich die Mycotoxine auf nur drei Gruppen von biogenetischen Schlüsselbausteinen zurückführen: Polyketide, Isopentenylpyrophosphat und Aminosäuren. Mycotoxine sind zumeist unipolar, chemisch recht beständig, werden in hohen Konzentrationen gebildet und enthalten – im Gegensatz zu den Antibiotica – keine Zucker. Mycotoxine rufen eine enorme Vielfalt toxisch-pharmakologischer Wirkungen hervor, z. B. Leberdegeneration, Hämorrhagie, Carcinomentstehung. Kumulationsneigung im Säugetierorganismus und lange Inkubationszeiten erschweren die Erkennung der Mycotoxikosen und machen schon geringste Konzentrationen in der Nahrung zum Risiko. So darf das besonders gefährliche Aflatoxin B₁, den schwierig zu kontrollierenden Grenzwert von 5 ppb (5 µg/kg) in der Nahrung nicht überschreiten.

1. Einleitung

Jeder weiß, was passiert, wenn man Fruchtsaft einige Tage offen stehen lässt (Abb. 1): Durch die immer in der Luft vorhandenen Keime bilden sich Kolonien von Schimmelpilzen. Zumeist handelt es sich dabei um Aspergillus-

und Penicillium-Arten. Wir sind dann nicht mehr geneigt, diesen Saft zu trinken. Ein Instinkt mahnt uns zur Vorsicht, und das ist wichtig, denn viele der genannten Pilze bilden Stoffwechselprodukte, die für Menschen und Säugetiere gefährlich sind. Man nennt diese Giftstoffe Mycotoxine.

Die Mycotoxine unterscheiden sich in ihrer biologischen Aktivität von den gegen Bakterien gerichteten Antibiotica. Mit den Mycotoxinen und Antibiotica verfügen die Mikroorganismen über wirksame Mittel zur Verdrängung anderer Lebewesen von ihren Nahrungsquellen. In Abbildung 1

[*] Prof. Dr. B. Franck

Organisch-chemisches Institut der Universität
Orléansring 23, D-4400 Münster

[**] Erweiterte und ergänzte Fassung einer Adolf-Windaus-Gedächtnis-Vorlesung an der Universität Göttingen.

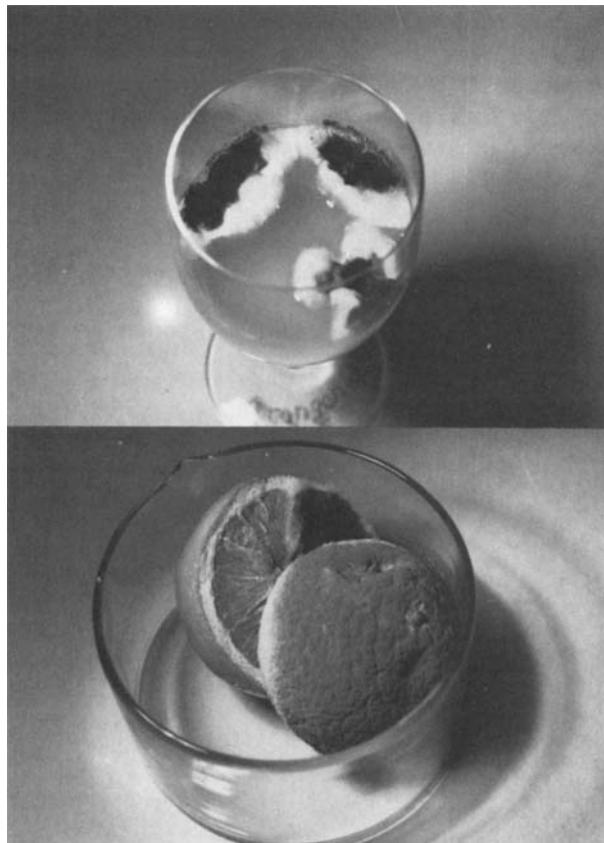


Abb. 1. *Aspergillus niger* auf Orangensaft (oben) und Mischinfektion von *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten auf einer Apfelsine (unten).

haben die Schimmelpilze ihren Verdrängungskampf bereits gewonnen, da der Mensch auf den Genuss der von ihnen überzogenen Nahrungsmittel verzichten wird.

Einige typische Kennzeichen von Mycotoxinen und Antibiotika sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Mycotoxine werden von den rasch wachsenden und sich aggressiv ausbreitenden Schimmelpilzen gebildet, Antibiotika zumeist von Streptomyzeten. Während sich die Streptomyzeten mit schwer abbaubaren Reststoffen wie Cellulose und Chitin begnügen können, konkurrieren die Schimmelpilze mit den höheren Organismen um Nahrungs- und Futtermittel. Daher sind Menschen und Säugetiere in starkem Maße durch Mycotoxine gefährdet.

Penicillin G und Streptomycin als bedeutenden Antibiotika entspricht das Aflatoxin B₁ 1 als gefährlichstes Mycotoxin.

Die Gefährlichkeit der Mycotoxine und der durch sie verursachten Krankheiten, der *Mycotoxicosen*, wurde lange Zeit unterschätzt („Neglected Diseases“)^[1]. Diese Situation änderte sich ab 1960 schlagartig mit der epochema-

Tabelle 1. Vergleich von Mycotoxinen und Antibiotica.

	Mycotoxine	Antibiotica
Wirksam gegen:	höhere Organismen (z. B. Säugetiere)	Bakterien (z. B. pathogene Bakterien)
Bildung überwiegend durch:	Schimmelpilze	Streptomyzeten
Bevorzugte Nährmedien:	leicht abbaubar (z. B. Nahrungsmittel)	schwer abbaubar (z. B. Cellulose, Chitin)
Typische Beispiele:	Aflatoxin B ₁ 1	Streptomycin, Penicillin G

chenden Aufklärung einer Massenvergiftung junger Truthähne durch verschimmeltes Erdnußfutter auf Farmen in Süd- und Ostengland^[2,3]. Das Erdnußmehl war von dem Schimmelpilz *Aspergillus flavus* befallen, der die – auch für Menschen hochtoxischen – Leberkrebs-verursachenden Aflatoxine bildet^[3]. Seither konnten durch intensive interdisziplinäre Untersuchungen weitere Mycotoxine als Urheber gefährlicher Krankheiten nachgewiesen werden. Hierdurch machte die physiologische, toxikologische und lebensmittelchemische Einordnung der Mycotoxine rasche Fortschritte^[4–11]. Gleichzeitig fand man eine Fülle nicht vorhersehbarer Erkenntnisse mit stimulierenden Auswirkungen auf weite Bereiche der bioorganischen Chemie. Dabei zeichnen sich drei Schwerpunkte und vorrangige Forschungsziele ab, mit denen sich dieser Fortschrittsbericht befassen wird: 1) Strukturen und biologische Aktivität, 2) Biosynthese, 3) Schutz vor Giftwirkungen.

2. Entwicklungsstand der Mycotoxin-Forschung

Bisher sind über 300 Mycotoxine bekannt, die sich 25 Strukturtypen zuordnen lassen^[4]. Sie werden von 350 Schimmelpilzen gebildet, zu denen jeweils bis zu 100 Stämme gehören, so daß man auf ungefähr 10000 Mycotoxinbildner kommt, die unsere Nahrungsmittel bedrohen. Dies ist jedoch immer noch als ein bescheidener Anfang anzusehen, der mit dem Entwicklungsstand der Antibiotica-Forschung vor 30 Jahren vergleichbar ist^[12].

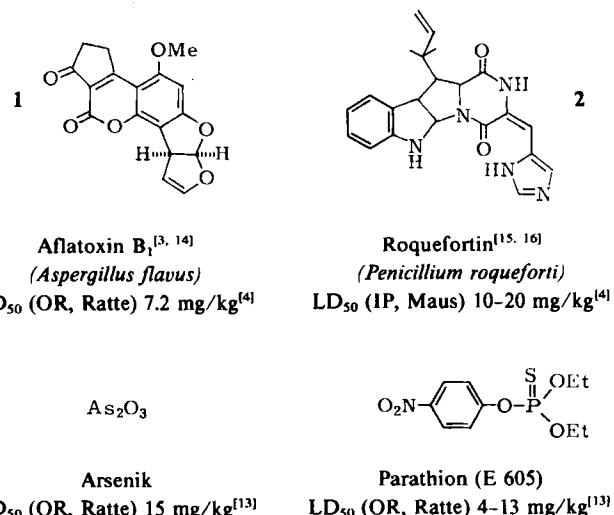


Abb. 2. Strukturen und Toxizitäten von zwei typischen Mycotoxinen und Vergleichstoxinen. OR bedeutet orale, IP intraperitoneale Applikation.

Abbildung 2 zeigt zwei typische Mycotoxine: Aflatoxin B₁ 1^[3, 14] und Roquefortin 2^[15, 16]. Zum Vergleich sind Toxizitätswerte von zwei bekannten Giften, Arsenik und Parathion, mit angegeben. Der Roquefortin-bildende Schimmelpilz *Penicillium roqueforti* wird zur Bereitung zahlreicher Typen von Blauschimmelkäse verwendet. Das Auftreten von Mycotoxinen beschränkt sich somit nicht auf Schimmelpilze, die als vermeidbare Infektion auf Nahrungsmitteln erscheinen. Glücklicherweise ist der Gehalt an Roquefortin im normalen Blauschimmelkäse so gering (< 7 ppm)^[17], daß die für einen Erwachsenen tödliche Dosis nur bei Aufnahme von 200 kg erreicht würde.

Aus Schimmelpilzen der menschlichen Nahrung ließen sich Mycotoxine mit mehr als zwanzig sehr verschiedenartigen, oft lebensbedrohenden Wirkungen (vgl. Tabelle 5), die vielfach mit einer Krebsauslösung verbunden sind, isolieren^[4,6]. Nach einer Schätzung der International Agency on Cancer^[18] haben 80% der Krebserkrankungen Umweltursachen, zu denen in nicht unbeträchtlichem Umfang die Mycotoxine beitragen.

Praktisch jedes Nahrungsmittel kann toxinbildende Schimmelpilze enthalten. Die meisten Nahrungsmittel in Tabelle 2 werden in vielen Ländern ständig auf ihren Mycotoxingehalt untersucht.

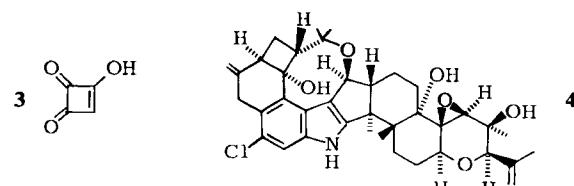
Tabelle 2. Durch Mycotoxin-bildende Schimmelpilze besonders gefährdete Nahrungsmittel.

Nüsse	Getreideprodukte	Fruchtprodukte	Tierische Nahrungsmittel
Erdnüsse	Reis	Tomatensaft	Milch
Paranüsse	Mais	Apfelsaft	Käse
Walnüsse	Roggen	Orangensaft	Eiproducte
Haselnüsse	Weizen	Wein	Wurst
Mandeln	Sojabohnen	Fruchtmus	Leber
Pistazienkerne	Cornflakes	Fruchtgelee	Niere

Der Mensch ist zweifach durch Mycotoxine gefährdet, zum einen direkt durch Verzehr von Nahrungsmitteln, die mit toxinbildenden Schimmelpilzen infiziert sind, zum anderen wegen der hohen Persistenz der Mycotoxine im Stoffwechsel indirekt durch Verzehr von Fleisch, Milch oder Eiern von Tieren, deren Futter Schimmelpilz-Kolonien enthielt („Carry-over“). Das gilt besonders für Leber und Niere, in denen Mycotoxine angereichert sein können^[19].

3. Strukturen, biologische Aktivität, Mycotoxikosen

Wie es für Naturstoffe des sekundären Stoffwechsels typisch ist, treten Mycotoxine überwiegend als komponentenreiche Gruppen strukturverwandter Verbindungen auf, bei denen es sich vielfach um Regiosomere, Diastereomere und Enantiomere handelt. Außerdem sind die Mycotoxine durch eine große Variationsbreite von Strukturen und chemischen Eigenschaften gekennzeichnet. Dies wird z. B. durch das gut wasserlösliche, hochtoxische Moniliformin **3**^[20] aus *Fusarium moniliforme* und das komplizierte,

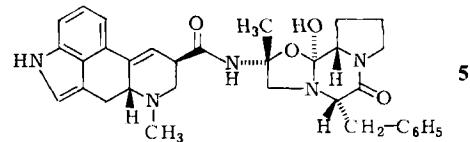


lipophile, tremorgene Penitrem A **4** aus *Penicillium crustosum*^[21,22] demonstriert. Daher erfordern Isolierung und Reinigung von Mycotoxinen den intensiven Gebrauch modernster Trennungsmethoden^[23].

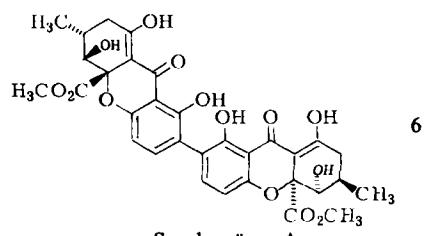
3.1. Ergotismus

Die Strukturaufklärung von Mycotoxinen begann mit den Urhebern der am längsten bekannten Mycotoxikose,

des *Ergotismus*. Sie wird durch den auf Getreideähren auftretenden Fadenpilz *Claviceps purpurea* verursacht, der die als Mutterkorn bekannten, schwarzen Sclerotien bildet^[24]. Diese gerieten in das Brotgetreide und verursachten epidemieartig auftretende Massenvergiftungen, die in Europa seit dem Mittelalter bekannt sind^[25,26]. Chemische Untersuchungen, seit gut einhundert Jahren, führten schließlich zur Aufklärung von zwei Mycotoxin-Gruppen, den Mutterkorn-Alkaloiden^[27], z. B. Ergotamin **5**, und den gelben Ergochromen^[28], z. B. Secalonsäure A **6** (Abb. 3).



Ergotamin
LD₅₀ (IV, Maus) 62 mg/kg^[13]
periphere Gefäßverengung, Gangrän und Nekrose der Extremitäten^[27]



Secalonsäure A
LD₅₀ (IV, Maus) < 50 mg/kg^[31]
Lebernekrose^[37]

Abb. 3. Ergotismus: Urheber und Wirkungsweise. IV bedeutet intravenöse Applikation.

Die mit brennenden Schmerzen in den Extremitäten verbundene Mycotoxikose Ergotismus wurde früher als St.-Antonius-Feuer bezeichnet. Tatsächlich bewirkte die Pilgerfahrt zum Grab des Schutzheiligen St. Antonius in Padua nicht selten eine Heilung vom Ergotismus, da sie den Kranken aus dem Gebiet herausführte, in dem das Brot mit Mutterkorn verunreinigt war^[29].

Daß außer den schon länger bekannten Mutterkorn-Alkaloiden^[27] auch die noch stärker toxischen und in größerer Menge im Mutterkorn enthaltenen Ergochrome^[28,30,31] an dessen Wirkung beteiligt sind^[32], wurde erst relativ spät, nach der Aufklärung dieser neuen Naturstoffgruppe, gefunden. Das ist darauf zurückzuführen, daß die Ergochrome sechs bis zehn Chiralitätszentren enthalten und als Diastereomerengemische auftreten, deren Trennung erst mit modernen chromatographischen Methoden gelang. So konnten durch unseren Arbeitskreis von 1964–1966 neun sterisch einheitliche Ergochrome isoliert und einschließlich ihrer absoluten Konfigurationen an insgesamt 78 Chiralitätszentren strukturell aufgeklärt werden^[33–35]. Durch Untersuchungen anderer Arbeitskreise kamen weitere fünf Ergochrome hinzu^[36]. Erstaunlich ist der Befund, daß das von Steyn^[37] in Pretoria isolierte toxische Prinzip des Maispilzes *Penicillium oxalicum* das Enantiomer der Secalonsäure A **6**, die Secalonsäure D **7**, ist. **7** hat an allen sechs Chiralitätszentren entgegengesetzte Konfiguration wie **6** (Abb. 4). Dieser Befund ist einzigartig und ebenso merkwürdig, als wenn man etwa das Enantiomer **9** eines Steroidhormons, z. B. Cortison **8**, als Naturstoff nachweisen würde.

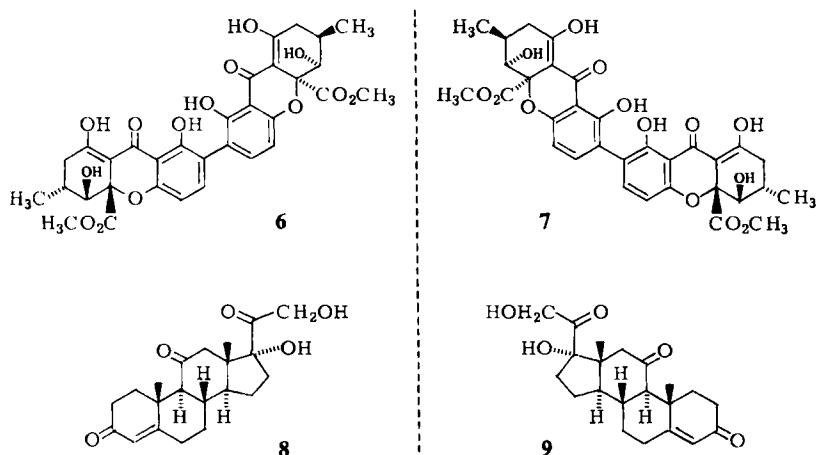


Abb. 4. Enantiomere Ergochrome und Steroide. Secalonsäure A **6** und D **7** wurden in der Natur gefunden; das Enantiomer **9** von Cortison **8** ist kein natürliches Produkt. Die gestrichelte Linie markiert die SpiegelEbene.

3.2. Alimentäre toxische Aleukie (ATA)

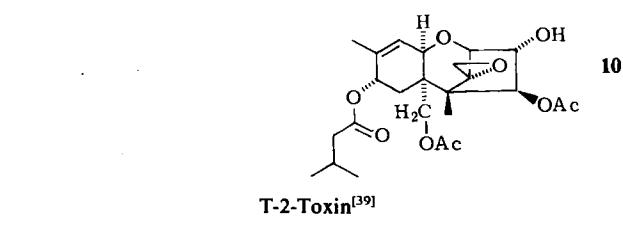
Eine weitere schwere Mycotoxikose, die durch einen auf Getreide wuchernden Schimmelpilz verursacht wird, ist die *alimentäre toxische Aleukie* („ATA“)^[38]. Diese Krankheit ist gekennzeichnet durch fortschreitende Schädigung des hämatopoietischen Systems, das die Bildung der roten und weißen Blutkörperchen bewirkt. Die ATA beginnt mit Hautzerstörungen, Hämorrhagie, Entzündungen und Sepsis (Abb. 5). Im Endstadium zeigen sich Schrumpfung des Knochenmarks und starke Abnahme der Leucocyten und Erythrocyten. Die Mortalität beträgt bei dieser Mycotoxikose 60%.



Abb. 5. Anfangsstadium der alimentären toxischen Aleukie (ATA) bei einem 15jährigen Jungen (aus [41a]).

Die Aufklärung der ATA als Mycotoxikose ergab sich bei der Untersuchung eines ausgedehnten Ausbruchs 1944 im südlichen Ural; dieser Ausbruch betraf ein Gebiet von 500 km Länge und ca. 300 km Breite. Das Nahrungsgesetz war dort mit toxischen Fusarienarten infiziert, die Mycotoxine vom Typ des „T-2-Toxins“ **10**^[39] bilden (Abb. 6). T-2-Toxin **10** inhibiert die Proteinsynthese nach einem ähnlichen Mechanismus wie Stickstoff-Lost. Da das erste Mycotoxin dieser Art von Freeman und Morrison^[39b] aus *Trichothecium roseum* isoliert wurde, nannte man sie „Trichothecene“. Die mehr als 50 bisher bekannten Trichothecene sind eine der bedeutendsten Mycotoxingruppen^[40].

Bei Engpässen in der Reinheitskontrolle und Beschaffung von Nahrungsmitteln, besonders unter feuchtwarmen, tropischen Klimabedingungen, bildet die durch Trichothecene verursachte Mycotoxikose ATA eine erhebliche Gefährdung der Bevölkerung, wie derzeit anscheinend in Kambodscha^[41].



T-2-Toxin^[39]

(*Fusarium culmorum*)

Hämorrhagie, Sepsis, Abnahme der roten und weißen Blutkörperchen,
Schrumpfung des Knochenmarks,
Hemmung der Proteinsynthese (ähnlich den alkylierenden Stoffen wie Stickstoff-Lost),
Schädigung des hämatopoietischen Systems^[4, 38]

Abb. 6. Alimentäre toxische Aleukie: Urheber sowie deren Herkunft und Wirkungsweise.

3.3. Aflatoxikose

Die nach Ergotismus und ATA als dritte und gefährlichste Mycotoxikose erkannte Epidemie ist die *Aflatoxikose*. Unmittelbar nachdem die Aflatoxine des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus* als Ursache der „Turkey-X-Disease“^[2, 3] identifiziert waren, begannen intensive Untersuchungen darüber, ob diese hochwirksamen Mycotoxine auch Mycotoxikosen beim Menschen bewirken^[42, 43]. Dies erforderte die Durchführung umfangreicher und aufwendiger Screening-Programme. Dazu wurde an einigen Stellen in Afrika und Asien die tägliche Aflatoxinaufnahme in Nahrungsmitteln, die auf den Märkten und in Familienhaushalten gesammelt waren, bestimmt^[44]. Es ergab sich ein eindeutiger, statistischer Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Leberkrebs und der Aflatoxinaufnahme. Typische Beispiele sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Eine Leberkrebshäufigkeit von zwei Fällen auf 100 000 Menschen pro Jahr ist als normal anzusehen. Diese Häufigkeit wurde im trockenen Hochland beobachtet, wo es

verhältnismäßig einfach ist, die Schimmelpilzinfektion der Nahrung und damit deren Aflatoxingehalt gering zu halten. In solchen Gebieten ist die tägliche Aflatoxinaufnahme geringer als etwa 5 ng/kg Körpergewicht. Verdopp-

Tabelle 3. Häufigkeit von Leberkrebs (Fälle pro 100 000 Menschen pro Jahr) und Aflatoxinaufnahme (ng/kg Körpergewicht pro Tag) in Afrika und Asien [44].

Gebiet	Leberkrebs- häufigkeit	Aflatoxin- aufnahme
Kenya - Hochlage	0.7	3.5
Thailand - Songkla	2.0	5.0
Swaziland - Hochlage	2.2	5.1
Kenya - Mittlere Höhe	2.9	5.8
Swaziland - Mittlere Höhe	4.0	8.9
Kenya - Tiefland	4.2	10.0
Thailand - Ratburi	6.0	45.0
Swaziland - Tiefland	9.7	43.1
Mosambik - Inhambane	13.0	222.4

lung der Aflatoxinaufnahme auf 10 ng/kg, wie in den feuchteren Tieflandgebieten von Kenya, erhöht auch die durchschnittliche Leberkrebshäufigkeit um 100%. Obwohl sich die lineare Beziehung zur Krebshäufigkeit bei höherer Aflatoxinaufnahme nicht fortsetzt, ist doch die Wirkung dieser Mycotoxine klar erkennbar. Ähnlich wie für Leberkrebs scheint auch eine Beziehung zwischen der Aflatoxinaufnahme und der in Indien auftretenden „Childhood Cirrhosis“ zu bestehen^[46] (Abb. 7).

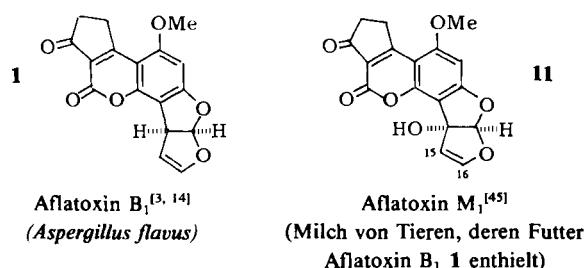


Abb. 7. Menschliche Aflatoxikose: Urheber sowie deren Herkunft und Wirkungsweise. 1 und 11 bewirken Leberkrebs bzw. „Indian Childhood Cirrhosis“. Nach Bildung des 15,16-Epoxids werden 1 und 11 an RNA und andere lebenswichtige Makromoleküle gebunden [47].

Von den etwa 20 bisher bekannten Aflatoxinen verdienen Aflatoxin B₁ 1 und das etwa ebenso stark cancerogene Aflatoxin M₁ 11 besondere Beachtung. 11 ist ein Hydroxylierungsprodukt im Stoffwechsel von Säugetieren, deren Futter 1 enthielt. Aflatoxin M₁, 11 in Kuhmilch kommt als Urheber der schweren Lebercirrhose von Kleinkindern in Indien und Afrika in Betracht. Die Wirkungsweise der Aflatoxine, an der ein 15,16-Epoxid und Cytochrom P-450 beteiligt sind, wird derzeit intensiv untersucht^[47, 48].

3.4. „Cardiac Beriberi“

Eine vierte Mycotoxikose wird durch ein Toxin des ostasiatischen Reispilzes *Penicillium citreoviride* verursacht^[49]. Es handelt sich um das Polyenlacton Citreoviridin 12^[50] (Abb. 8). Man bezeichnete diese Mycotoxikose als „Cardiac Beriberi“, weil ihre Symptome der durch Vitamin-B₁-

Mangel hervorgerufenen Avitaminose Beriberi ähneln. Sie beginnt mit Störungen der Herzaktivität und setzt sich fort mit Atembeschwerden (Dyspnoe), Übelkeit und Erbrechen. Die „Cardiac Beriberi“ war endemisch unter der reisessenden Bevölkerung Südostasiens, bis ihre Ursache erkannt und durch Vermeidung von Pilzinfektionen im Reis weitgehend ausgeschlossen wurde. Zuvor, z. B. 1908^[49], registrierte man allein in Japan jährlich mehr als 10 000 tödliche Fälle. Die Wirkung des Citreoviridins, welche anscheinend^[52] auf einer Hemmung der ATP-Synthese in den Mitochondrien beruht, kann unter bestimmten Bedingungen durch Vitamin B₁ aufgehoben werden^[49].

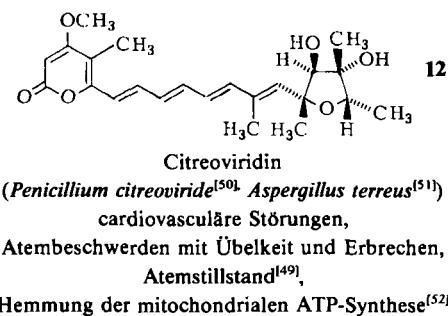
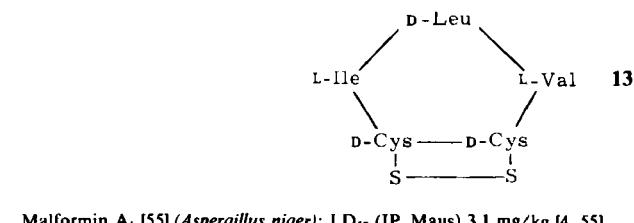


Abb. 8. „Cardiac Beriberi“: Urheber sowie deren Herkunft und Wirkungsweise.

Nachdem bis vor kurzem angenommen wurde, daß sich das Vorkommen von Citreoviridin 12 auf den südostasiatischen Reispilz beschränkt, fanden wir 1980^[51], daß dieses gefährliche Mycotoxin zusammen mit zwei neuen, strukturverwandten Mycotoxinen auch von dem überall im Erdbooden sowie auf Getreidearten und zuckerhaltigen Nahrungsmitteln verbreiteten Schimmelpilz *Aspergillus terreus* gebildet wird. Dabei erreicht die Citreoviridin-Menge in *A. terreus* extrem hohe Werte – bis zu 2% des Trockenmycels.

Die Kenntnis, daß *Aspergillus terreus* Mycotoxine bildet, ist auch deswegen wichtig, weil dieser Schimmelpilz unter anderem in der Biotechnologie zur Herstellung von Itaconsäure dient^[53, 54]. Ebenso wie bei anderen derartigen „Nutzschimmelpilzen“, die auch Mycotoxine bilden, ist bei der anschließenden Reinigung der Nutzprodukte besondere Sorgfalt nötig. Dies gilt auch für den zur Gewinnung von Citronensäure^[54] verwendeten Schimmelpilz *Aspergillus niger*, der eine Gruppe toxischer Cyclopeptide, z. B. das stereochemisch interessante Malformin A₁ 13^[55], bildet.

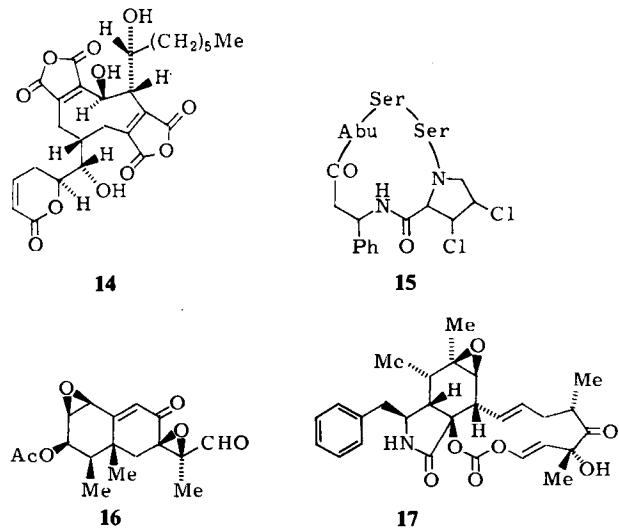


Malformin A₁ [55] (*Aspergillus niger*); LD₅₀ (IP, Maus) 3.1 mg/kg [4, 55].

3.5. Weitere Mycotoxine und mögliche Urheber von Mycotoxikosen

Außer den Mycotoxinen, die als Urheber epidemisch auftretender Mycotoxikosen erkannt sind, erfordern auch die übrigen aufgeklärten und noch nicht aufgeklärten Toxine von Schimmelpilzen alle Aufmerksamkeit. Genannt

seien aus der Sicht besonderer Strukturen und wegen gefährlicher biologischer Aktivität (siehe Tabelle 5) Rubratoxin B 14^[56], Islanditoxin 15^[57], PR-Toxin 16^[58,59] und Cytochalasin E 17^[60] (Abu = 2-Aminobuttersäure).



4. Wirksamkeitskriterien der Mycotoxine

Es wäre wünschenswert, die bisher untersuchten Mycotoxine nach ihrer biologischen Aktivität zu klassifizieren. Bei näherer Betrachtung ist dies jedoch nicht einfach, weil sehr unterschiedliche Kriterien zu berücksichtigen sind (Tabelle 4).

Zweifellos ist die akute Toxizität aufschlußreich für die Einschätzung eines Mycotoxins. Jedoch beginnen die toxi-

Tabelle 4. Kriterien zur Bewertung der biologischen Aktivität von Mycotoxinen.

- 1) Akute Toxizität (LD_{50})
- 2) Spezifische pharmakologische Wirkungen
- 3) Cancerogene und mutagene Wirkungen
- 4) Kumulationseffekte
- 5) Aggressivität des Schimmelpilzes, der das Mycotoxin bildet
- 6) Verursachung von Mycotoxikosen

schen Wirkungen von Mycotoxinen schon weit unterhalb der letalen Konzentration, so daß die Gefährlichkeit vor allem durch die Art der pharmakologischen Wirkungen bestimmt wird. Ferner spielt die Art der LD_{50} -Bestimmung eine Rolle. Im allgemeinen findet man bei der für Mycotoxine besonders aufschlußreichen oralen Applikation etwas kleinere Toxizitäten als bei intraperitonealer, intravenöser oder subcutaner Applikation. Dennoch ermöglicht die Anordnung nach der akuten Toxizität, wie sie in Tabelle 5 für 18 in diesem Beitrag behandelte Mycotoxine gewählt wurde, eine brauchbare Orientierung.

Weitere Kriterien der biologischen Aktivität von Mycotoxinen, die nicht aus der akuten Toxizität abgeleitet werden können, sind cancerogene und mutagene Wirkungen. Außerdem kann ein Mycotoxin durch seine Fähigkeit, sich im Organismus langfristig an sensiblen Stellen anzureichern, weit gefährlicher sein, als man es aufgrund seiner möglicherweise geringen akuten Toxizität erwarten würde. Von besonderer Bedeutung ist die Verursachung von Mycotoxikosen. Dies hängt von zusätzlichen Faktoren ab, z. B. von der Fähigkeit des Schimmelpilzes, der das betreffende Mycotoxin bildet, sich auf Nahrungsmitteln aggressiv auszubreiten. Charakteristische Beispiele sind die Mycotoxine Ergotamin 5 und Secalonsäure A 6 des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea*. Obwohl deren akute Toxizität vergleichsweise gering ist, rufen sie die verheerende Mycotoxikose Ergotismus hervor, welche die europäische Bevölkerung während vieler Jahrhunderte terrorisierte. Schließlich ist die biologische Aktivität der Mycotoxine nicht nur negativ einzuschätzen.

So fanden einige Mycotoxine in geeigneter Dosierung nützliche medizinische und sonstige Verwendung. Ergotamin 5 wird als Tartrat unter dem Namen Gynergen® in der Geburtshilfe sowie wegen seiner α -blockierenden, gefäßverengenden Wirkung als Mittel gegen Migräne eingesetzt^[97]. Wie japanische Patentanmeldungen entnommen werden kann, befinden sich die ebenfalls vom Mutterkornpilz und anderen Schimmelpilzen gebildeten Ergochrome, z. B. die Secalonsäuren A 6 und D 7, in der Erprobung als Tumорhemmstoffe. Nach der besonders umfangreichen, neuesten

Tabelle 5. Herkunft und biologische Aktivität [4] von 18 Mycotoxinen (A. = *Aspergillus*; Cl. = *Claviceps*; F. = *Fusarium*; P. = *Penicillium*).

Mycotoxin	Typischer Produzent	LD_{50} [mg/kg]	Toxizität [a]	R.	M.	H.	Biologische Aktivität
Penitrem A 4	<i>P. cyclopium</i>	1.05		IP			Tremor-erzeugend
Rubratoxin B 14	<i>P. rubrum</i>	3.0		IP			Anorexie, Gelbsucht
Malformin A ₁ 13	<i>A. niger</i>	3.1		IP			gastrointestinale Blutungen, Leber- und Nierenschädigung
Islanditoxin 15	<i>P. islandicum</i>	3.6		SC			Leberdegeneration
Emodin 34	<i>P. islandicum</i>	3.7				OR	Anorexie, Diarrhoe
T-2-Toxin 10 [b]	<i>F. culmorum</i>	4				OR	Hämorrhagie, Hautnekrosen
Moniliformin 3	<i>F. moniliforme</i>	4				OR	Hämorrhagie der Haut, Darmblutungen
Patulin 29	<i>P. patulum</i>	5			IP		Carcinogen, Mitosegift, Atemhemmung
PR-Toxin 16	<i>P. roqueforti</i>	5.8		IP			Lungen- und Nierenödeme, Leberdegeneration
Aflatoxin B ₁ 1 [b]	<i>A. flavus</i>	7.2		OR			Lebercarcinom
Citreoviridin 12 [b]	<i>P. citreoviride</i>	7.5				IP	Cardiovasculäre Störungen, Atemstillstand
Cytochalasin E 17	<i>A. clavatus</i>	9.1		OR			Kreislaufkollaps, Lebernekrose
Roquefortin 2	<i>P. roqueforti</i>	15-20		IP			Atonie, Entkräftung
Ochratoxin A 30	<i>A. ochraceus</i>	22		OR			Gewichtsverlust, Anorexie
Secalonsäure A 6 [b]	<i>Cl. purpurea</i>	50		IP			Lebernekrose
Sterigmatocystin 48	<i>A. versicolor</i>	60		IP			chronische Leber- und Nierenschädigung
Ergotamin 5 [b]	<i>Cl. purpurea</i>	62		IV			Vasoconstriction, Emesis, Nekrosen
Zearalenon 32	<i>F. roseum</i>	?					Östrogen, Anabolicum

[a] Versuchstiere: R. (Ratte), M. (Maus), H. (Hähnchen); Applikation: IP (intraperitoneal), SC (subcutan), OR (oral), IV (intravenös). [b] Urheber gefährlicher Mycotoxikosen.

Anmeldung^[98] zeigen Selaconsäure-Derivate mit Phthalimidomethyl- und Maleimidomethyl-Gruppen in 4,4'-Position Antitumorwirkung. Eines dieser Derivate konnte z. B. die Überlebenszeit von Mäusen, denen ein Ehrlich-Ascites-Tumor implantiert war, um über 300% verlängern.

Zearalenon 32, das trotz geringer akuter Toxizität den Mycotoxinen anzurechnen ist, wird wegen seiner östrogenen und anabolischen Wirkung in der Tieraufzucht verwendet^[99, 100]. Es kann die Gewichtszunahme von Jungtieren erheblich beschleunigen. Ein Ralgro® genanntes, kommerziell verfügbares Gemisch der aus 32 hergestellten epimeren Zearalenole bewirkt z. B. als 12 mg-Implantat bei Lämmern eine Gewichtsvermehrung um 23% und verringert die benötigte Futtermenge. Diese wegen hoher Beständigkeit und „Carry-over“ in Fleischnahrungsmittel bedenkliche Anwendung von Zearalenon ist schwer zu kontrollieren, denn sowohl Dosierung als auch Nachweisempfindlichkeit (Tabelle 8) sind gering.

5. Biosynthese

Als sekundäre Stoffwechselprodukte mit vielen neuartigen Strukturen führten die Mycotoxine der Schimmelpilze zu einer Fülle neuer Erkenntnisse über die Naturstoff-Biosynthese^[61]. Dies vertiefte das Verständnis von Stoffwechselzusammenhängen und das der Funktion von Schlüsselbausteinen^[62] der Biosynthese. Für die Organische Chemie eröffnen sich dadurch Möglichkeiten zur Ausführung einfacher biomimetischer Synthesen^[63].

5.1. Schlüsselbausteine der Mycotoxin-Biosynthese

Die Erforschung der Mycotoxin-Biosynthese fiel in eine Zeit, in der die dafür benötigte Methodik mit der Entwicklung leistungsfähiger Markierungssynthesen, der Verfügbarkeit radioaktiver und stabiler Isotope sowie moderner Methoden zu deren Positionsbestimmung einen hohen Stand erreicht hatte. Hinzu kam, daß sich die Schimmelpilze mit ihrer vergleichsweise besonders verlässlichen, reproduzierbaren Metabolitenbildung sowie der auch bei nicht aufgebrochenen Zellen guten Zugänglichkeit der Enzyme für markierte Vorstufen als hervorragende Objekte für Biosyntheseversuche erwiesen.

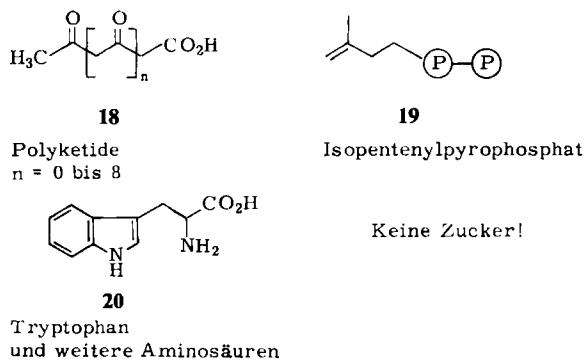


Abb. 9. Wichtigste Schlüsselbausteine der Mycotoxin-Biosynthese.

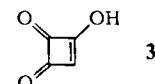
So wurden rasche Fortschritte erzielt. Das wichtigste Ergebnis: Die Biosynthese von allen bekannten Mycotoxinen kann auf sehr wenige biogenetische Schlüsselbausteine, die in Abbildung 9 zusammengefaßt sind, zurückgeführt

werden. Eine herausragende Rolle spielen die Di- bis Decaketide **18**, die zwei bis zehn Acetyleinheiten enthalten. Aus diesen Polyketiden werden Mycotoxine mit einem weiten Spektrum biologischer Wirkungen auf außerordentlich vielseitige Weise aufgebaut. Weiterhin entstehen zahlreiche Mycotoxine entweder ausschließlich aus Isopentenylpyrophosphat **19** oder aus diesem in Kombination mit Tryptophan **20** und weiteren Aminosäuren.

Eine Eigentümlichkeit der Mycotoxin-Biosynthese ist darin zu sehen, daß im Gegensatz zu anderen Naturstoffgruppen mikrobiologischer Herkunft, z. B. den Antibiotica, praktisch *keine Zucker* als Biosynthese-Vorstufen oder -Bausteine bekannt wurden.

5.2. Biosynthese von Moniliformin

Bis vor kurzem begann die Reihe der durch Cyclisierung von Polyketiden gebildeten Naturstoffe beim Tetraketid **18**, $n=2$. Nach jüngsten Markierungsexperimenten unseres Arbeitskreises kommt für die Biosynthese des strukturell besonders einfachen Mycotoxins Moniliformin **3** ein Diketid **18**, $n=0$, als Vorstufe in Betracht^[6,7].



Moniliformin (*Fusarium moniliforme*, *Gibberella fujikuroi*); LD₅₀ (OR, Hähnchen) 4.0 mg/kg [4]; pK_a 0.88±0.03 [66].

Das von Cole et al.^[20] isolierte und von Springer et al.^[65] strukturell aufgeklärte, hochacide Moniliformin 3 wird von dem in Maisfutter besonders häufig auftretenden Schimmel pilz *F. moniliforme* gebildet, und zwar in hohen Konzentrationen von bis zu 33 g/kg Mais^[64]. Diese 33 g Moniliformin würden ausreichen, um mehr als 200 000 Hähnchenküken zu töten. *Fusarium moniliforme* und *Gibberella fujikuroi* zeichnen sich dadurch aus, daß sie Moniliformin nur auf festem Maisnährboden bilden, den sie aggressiv wachsend, schnell und vollständig in weißes Mycel umwandeln.

Um die von der Struktur des Moniliformins 3 nahegelegte Biosynthese aus einer Ketidvorstufe wie **22** zu prüfen, verfütterten wir $[1-^{14}\text{C}]$, $[2-^{14}\text{C}]$ Acetat und $[2-^{14}\text{C}]$ Ma-

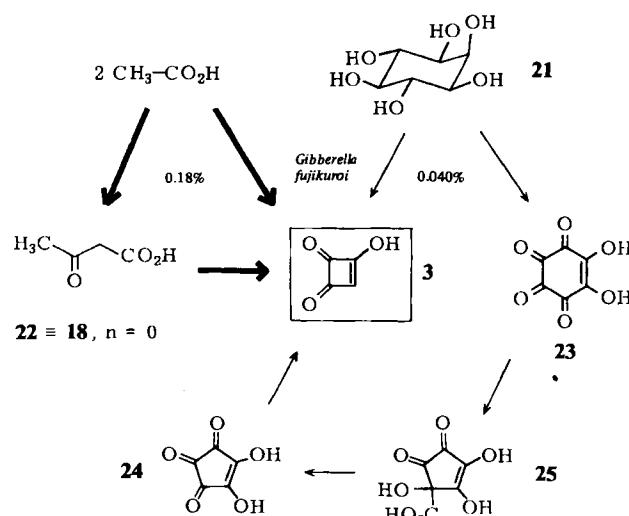


Abb. 10. Biosynthesewege und Inkorporationsergebnisse für das Mycotoxin Moniliformin 3.

lonat an Festkulturen von *G. fujikuroi*^[67]. Außerdem prüfen wir einen alternativen Biosyntheseweg (Abb. 10) und in weiterem Zusammenhang damit den Einbau einer Reihe zusätzlicher, radioaktiv markierter Vorstufen, welche die Möglichkeiten anderer Aufbauwege für Moniliformin abdecken. Als alternativer Biosyntheseweg für Moniliformin wurde die Bildung aus dem in vielen Schimmelpilzen vorkommenden Mesoinosit 21 über Rhodizonsäure 23 und Croconsäure 24 in Betracht gezogen. 23 und 24, die durch oxidative Umwandlung und Benzilsäureumlagerung entstehen könnten, sind ebenfalls Naturstoffe. Inkorporationsversuche mit [$U-^{14}\text{C}$]Mesoinosit 21 erbrachten jedoch ebenso wie Versuche mit weiteren Vorstufen nur sehr niedrige Einbauwerte, so daß nunmehr der Biosyntheseweg über das Diketid 22 \equiv 18, $n=0$, als der wahrscheinlichste gelten kann. Der Inkorporationswert von 0.18% für Acetat liegt zwei Zehnerpotenzen oberhalb der Signifikanzgrenze und ist in Anbetracht der zahlreichen acetatbedürftigen Stoffwechselbereiche und der Applikation an eine Festkulatur vergleichsweise hoch und aussagekräftig.

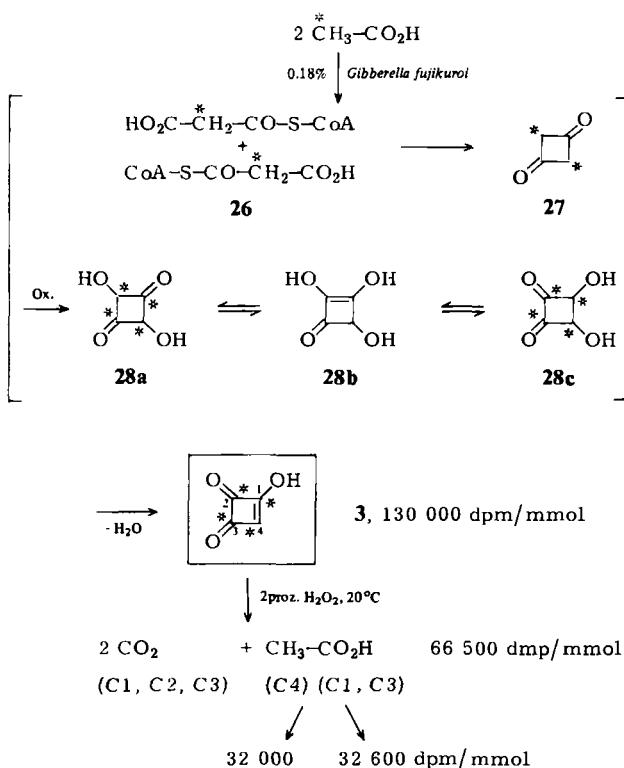


Abb. 11. Bildung und Abbau von radioaktivem Moniliformin 3 aus [$2-^{14}\text{C}$]Acetat [67]. dpm bedeutet Zerfälle pro Minute („decompositions per minute“).

Die Biosynthese von Moniliformin 3 aus Acetat verläuft somit wahrscheinlich über Malonyl-Coenzym A 26 und 1,3-Butandion 27 (Abb. 11). Durch Oxidation an den reaktiven Methylengruppen von 27 würde eine durch die tautomeren Formen 28a–28c zu beschreibende Zwischenstufe gebildet, deren Dehydrierung zu 3 führt. Ein oxidativer Abbau des nach Verfütterung von [$2-^{14}\text{C}$]Acetat an *Gibberella fujikuroi* erhaltenen radioaktiven Moniliformins 3 ergab für alle C-Atome gleiche spezifische Radioaktivitäten. Dies ist in Einklang mit dem Biosynthese-Verlauf (Abb. 11) über die Zwischenstufe 28, die in mehreren tautomeren Formen vorliegen kann.

5.3. Mycotoxine aus anderen Polyketiden

In Abbildung 12 ist die Biosynthese von zwei weiteren Mycotoxinen, die aus Tetra- und Pentaketidvorstufen 18, $n=2$ bzw. 3 mit nachfolgenden funktionellen Veränderungen hervorgehen, zusammengefaßt. Es handelt sich um das carcinogene, in verschimmeltem Apfelsaft auftretende Mycotoxin Patulin 29 aus *Penicillium patulum*^[68] und um das hepatotoxische Ochratoxin 30 aus *Aspergillus ochraceus*^[69].

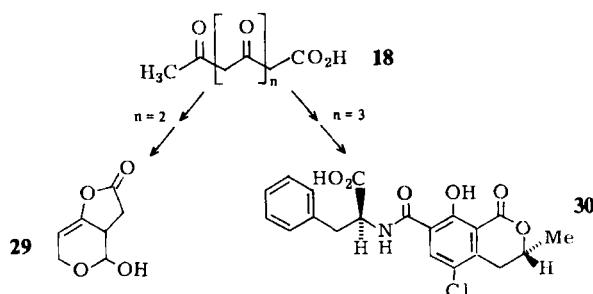


Abb. 12. Polyketidvorstufen der Mycotoxine Patulin 29 und Ochratoxin 30 [61].

Gegenüber diesen kleineren Polyketiden ist die Vielfalt der Kondensationsmöglichkeiten z. B. beim Nonaketid 31 ($\equiv 18, n=7$) stark erhöht. Als Beispiele sind in Abbildung 13 zwei Mycotoxine mit je zwei Ringen gezeigt, die aus den Konformeren 31b und 31c der offenkettigen Vorstufe 31a entstehen. Es handelt sich um das Polyen-Mycotoxin Citreoviridin 12, den Urheber der „Cardiac Beriberi“ (Abb. 8) und um Zearalenon 32 mit starker Östrogenwirkung. Zur Aufklärung der Biosynthese von 12 waren zunächst Inkorporationsversuche mit ^{14}C -markiertem Acetat und Methionin an *Penicillium citreoviride* durchgeführt worden^[70]. Sie zeigten die Herkunft der vier C-Methylgruppen an den Positionen 4, 12, 14 und 16 aus Methionin sowie einiger Ketten-C-Atome aus Essigsäure in Einklang mit der Polyketid-Vorstellung an. Nachdem wir gefunden

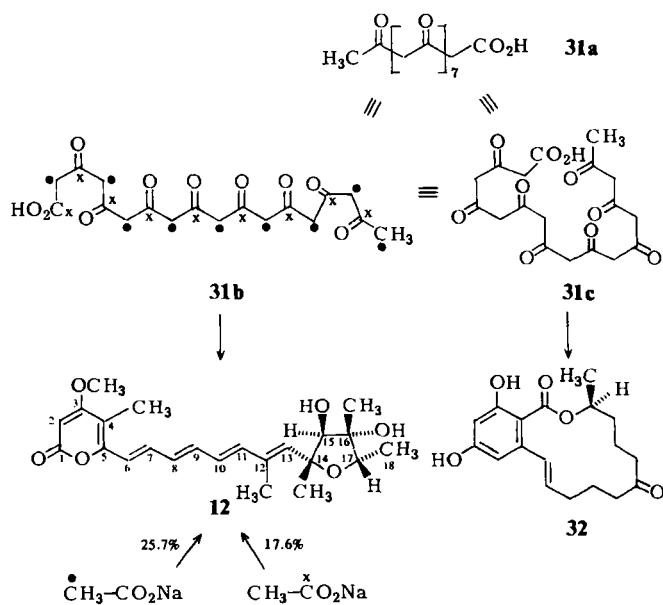


Abb. 13. Biosynthese der Mycotoxine Citreoviridin 12 und Zearalenon 32 [72] aus dem Nonaketid 31 ($\equiv 18, n=7$). ●, X siehe Text.

hatten, daß Citreoviridin **12** in besonders hoher Konzentration auch von dem Schimmelpilz *Aspergillus terreus* gebildet wird, nutzten wir diese Erkenntnis für Inkorporationen mit [1-¹³C]- und [2-¹³C]Acetat und anschließender ¹³C-NMR-spektroskopischer Auswertung^[51]. Durch Applikation der Vorstufen in vergleichsweise hohen Konzentrationen von 0.2% zur Nährlösung der Schimmelpilzkulturen ließen sich für die ¹³C-markierten Acetate hohe Einbauquoten von 17.6 bzw. 25.7% erzielen, was eine zuverlässige ¹³C-NMR-spektroskopische Positionsbestimmung ermöglichte.

Danach stammen die geradzahligen C-Atome (●) in der Polyketidkette des Citreoviridin-Vorläufers **31b** aus den Methylgruppen der Acetatbausteine und die ungeradzahligen C-Atome (×) aus den Carboxygruppen. Die C-Atome der C-Methylgruppen und der Methoxygruppe von **12** zeigten im ¹³C-NMR-Spektrum keine signifikanten Signale, entsprechend ihrer Herkunft aus dem C₁-Pool des Organismus. Diese Befunde konnten kürzlich mit *P. citreoviride* bestätigt werden^[71].

5.4. Secoanthrachinone

Die Aufklärung der Biosynthese von Mycotoxinen des Octaketid-Typs **33** ($\equiv \mathbf{18}$, $n=6$) führte zur Entdeckung zuvor unbekannter Ringöffnungsreaktionen von Anthrachinonen (Abb. 14). Hierbei entsteht aus dem Octaketid-Konformer **33b** zunächst das recht toxische Emodin **34**^[73] (siehe Tabelle 5) des Reispilzes *Penicillium islandicum*. Die Vermutung, daß die Ergochrome, z. B. Secalonsäure A **6**, über **34** aus einem Octaketid hervorgehen, konnten wir bereits kurz nach der Strukturaufklärung dieser Mycotoxine beweisen^[74,75].

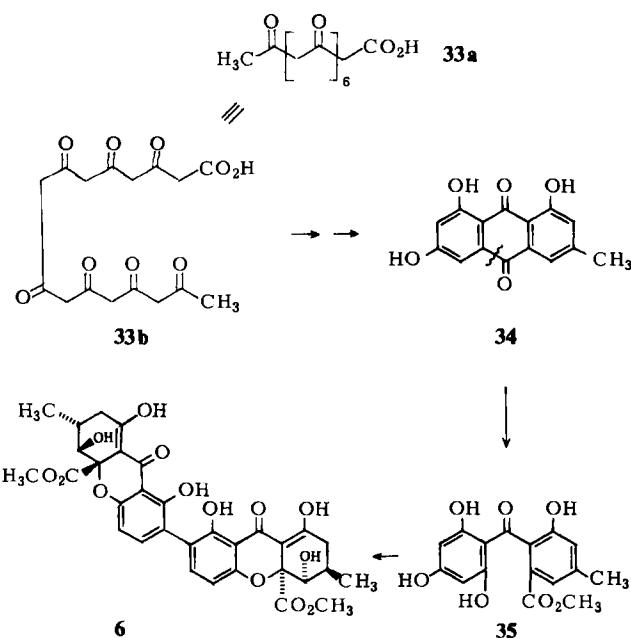


Abb. 14. Biosynthese der Mycotoxine Emodin **34** und Secalonsäure A **6** aus einem Octaketid **33** ($\equiv \mathbf{18}$, $n=6$).

Dabei entsteht durch oxidative Ringöffnung des Anthrachinons zunächst eine Benzophenon-carbonsäure **35**, die nach funktionellen Umwandlungen zum Xanthonderivat

cyclisiert und schließlich oxidativ zu **6** dimerisiert. Abbildung 15 zeigt einige der zahlreichen Inkorporationsversuche zum Beweis der Ergochrom-Biosynthese^[63]. Sie dienten zugleich der Klärung der für das Verständnis des Ringöffnungsmechanismus wichtigen Frage, ob Emodin **34** oder Emodianthon **36** die bessere Biosynthesevorstufe ist^[76].

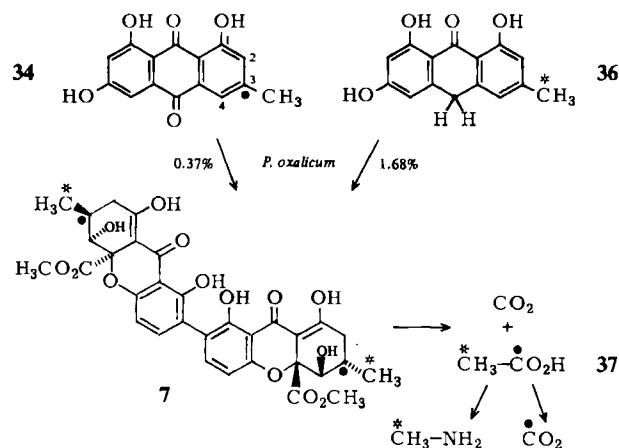


Abb. 15. Inkorporationsversuche zur Biosynthese des Ergochroms Secalonsäure D **7** im Schimmelpilz *Penicillium oxalicum* [76].

Um das Einbauverhältnis von Emodin **34** und Emodianthon **36** unabhängig von Wachstumsschwankungen der Pilzkulturen zu bestimmen, wurden vergleichende Inkorporationsversuche durchgeführt (Abb. 15). Hierzu stellten wir durch Totalsynthese Emodin **34** und Emodianthon **36** her, die an C-3 bzw. in der C-Methylgruppe mit ¹⁴C markiert waren, und „verfütterten“ sie als Gemisch in einem Versuchsansatz an den Schimmelpilz *Penicillium oxalicum*.

Die Markierungspositionen von **34** und **36** waren so gewählt, daß sich die ¹⁴C-Markierung aus dem anschließend isolierten Biosyntheseprodukt Secalonsäure D **7** durch Kuhn-Roth-Oxidation als Essigsäure herausspalten ließ. In dieser „Kuhn-Roth-Essigsäure“ **37** waren durch die Radioaktivität der Carboxy- und der Methylgruppe die gewünschten Informationen über die Einbauwerte von Emodin **34** und Emodianthon **36** gespeichert. Sie konnten nach Schmidt-Abbau der Essigsäure zu **CO₂** und Methyl-

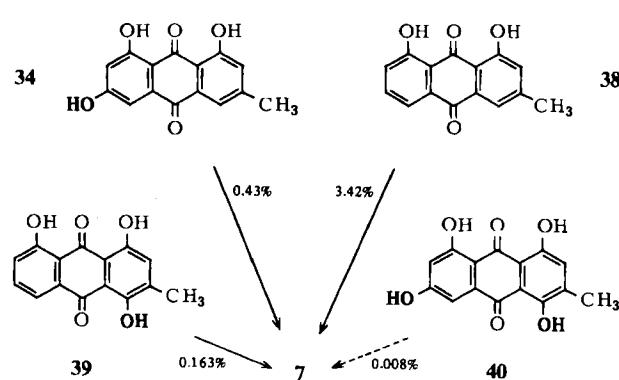
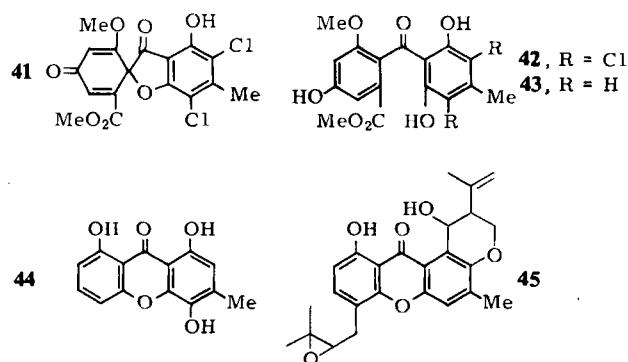


Abb. 16. Konkurrenzinkorporation von Emodin **34** und drei ähnlichen Anthrachinon-Vorstufen **38-40** in das Ergochrom Secalonsäure D **7** durch *Penicillium oxalicum* [77].

amin sowie dessen Oxidation zu CO_2 zu 0.37% bzw. 1.68% bestimmt werden. Die Radioaktivität des bei der Kuhn-Roth-Oxidation neben Essigsäure gebildeten Kohlendioxids lag unterhalb der Signifikanzgrenze. Somit ergab sich, daß das Ergochrom Secalonsäure D 7 direkt unter Ringöffnung aus zwei Molekülen eines Anthrachinons hervorgeht, wobei sich Emodinanthon 36 gegenüber Emodin 34 als der 4.5mal bessere Vorläufer erwies.

Durch ähnliche Konkurrenzinkorporationen unterschiedlich isotopenmarkierter Anthrachinon-Naturstoffe mit *Penicillium oxalicum* wurde außerdem die Inkorporation verwandter Anthrachinon-Naturstoffe 38–40 mit der von Emodin 34 verglichen (Abb. 16)^[63, 77]. Demnach wird 34 als Biosynthese-Vorstufe für Secalonsäure D 7 von Chrysophanol 38 noch übertrffen, während Islandicin 39, dessen Hydroxylierungsmuster dem von 7 besonders ähnlich ist, geringeren Einbau aufweist. Dagegen konnte Catenarin 40 als Vorstufe ausgeschlossen werden. Wie schon bei anderen Biosyntheseuntersuchungen zeigt sich auch hier, daß es bei der Bildung von Naturstoffen in den Organismen Haupt- und Nebenwege gibt, die sich zu einem *Stoffwechselnetzwerk* zusammenfügen, an dessen Knotenpunkten die biogenetischen *Schlüsselbausteine* stehen^[62, 78].

Mit der bei der Ergochrom-Biosynthese 1968 zuerst gefundenen oxidativen Ringöffnung^[74, 75] erwiesen sich die Anthrachinon-Naturstoffe als reaktive Stoffwechselzwischenprodukte. Dies bestätigte sich anschließend durch den Nachweis, daß weitere Naturstoffe, z. B. das spirocyclische Antibioticum Goedin 41^[63, 79], die Benzophenone Dihydrogeodin 42^[79] und Sulochrin 43^[80] sowie die Xanthone Ravenelin 44^[81] und Thajixanthon 45^[82], aus Anthrachinon-Vorstufen hervorgehen und somit die neue biogenetische Naturstoffgruppe der *Secoanthrachinone* bilden.



Schließlich zeigten eindrucksvolle Untersuchungen mehrerer Arbeitskreise über die Biosynthese der Aflatoxine^[83], daß auch deren Grundgerüst unter oxidativer Ringöffnung einer Anthrachinon-Vorstufe gebildet wird (Abb. 17). Hierbei entsteht aus dem Decaketid 46 ($\equiv 18$, $n=8$) über dessen gefaltete Konformation 46b in mehrstufiger Reaktionsfolge das Anthrachinon Versicolorin A 47, aus dem Sterigmatocystin 48 durch oxidative Ringöffnung, innere Rotation der Benzophenon-Zwischenstufe und Xanthon-Ringschluß hervorgeht^[84, 85]. Oxidative Umwandlungen im Phenolring von 48 ergeben dann das Cumarin-System von Aflatoxin B₁ 1.

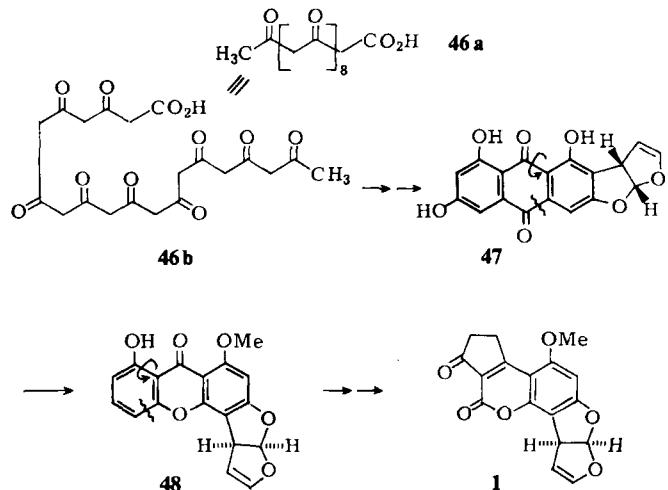


Abb. 17. Biosynthese von Aflatoxin B₁ 1 aus dem Decaketid 46 ($\equiv 18$, $n=8$).

5.5. Isoprenoide Mycotoxine

Gegenüber den Mycotoxinen aus Polyketiden 18, $n=0 \dots 8$ treten die Mycotoxine aus anderen Biosynthese-Vorstufen nach Anzahl und Strukturvielfalt – jedoch nicht nach physiologischer Bedeutung – etwas zurück. Zwei Beispiele der von Isopentenylpyrophosphat 19 (Abb. 9) als nächsthäufiger Biosynthese-Vorstufe abgeleiteten Mycotoxine sind T-2-Toxin 10^[86] aus *Fusarium culmorum* und PR-Toxin 16^[87] aus *Penicillium roqueforti* (Abb. 18). Die Biosynthese dieser aus drei Isoprenbausteinen 19 konstruierten Sesquiterpen-Mycotoxine nimmt ihren Ausgang von den unterschiedlich gefalteten Isomeren 50 und 51 des Farnesylpyrophosphats 49.

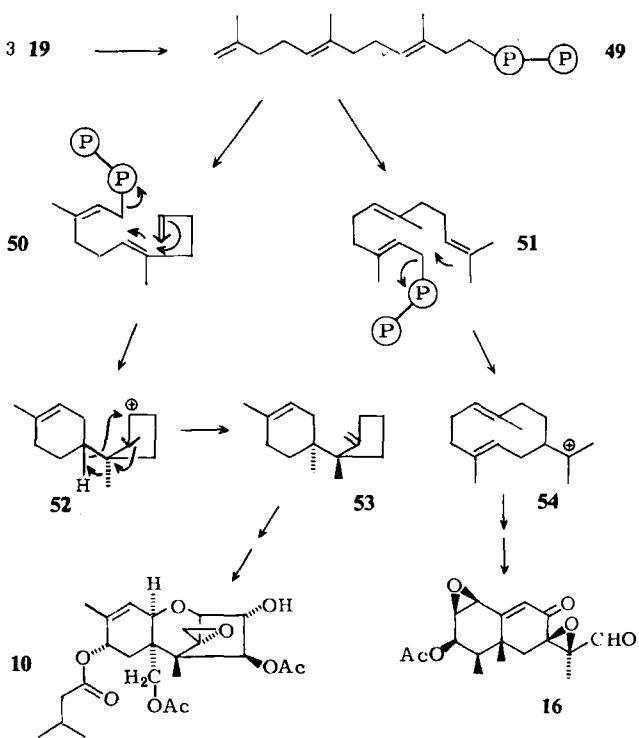


Abb. 18. Biosynthese der Sesquiterpen-Mycotoxine T-2-Toxin 10 und PR-Toxin 16 aus Isopentenylpyrophosphat 19 [86, 87].

von Pyrophosphat induziert Ringschlüsse zu **52** bzw. **54**^[86,87]. Es folgen Methylwanderungen und neben der Einführung weiterer funktioneller Gruppen die Bildung der physiologisch aktiven Epoxidgruppen zum T-2-Toxin **10** und PR-Toxin **16**.

Nach Polyketiden **18** und Isopentenylpyrophosphat **19** bilden Aminosäuren, insbesondere Tryptophan **20**, die dritte Gruppe von Biosynthese-Bausteinen der Mycotoxine (Abb. 9). Die zumeist cyclischen Peptid-Mycotoxine, z. B. Malformin A, **13** oder Roquefortin **2**, zeichnen sich vielfach infolge nur weniger polarer Gruppen oder Substitution mit Isoprenresten (Prenylgruppen) durch lipophiles Verhalten aus. Hierin zeigt sich ein weiterer genereller Unterschied der Mycotoxine zu den Antibiotica (Tabelle 1): Während Antibiotica vielfach durch Zucker oder durch andere polare Gruppen überwiegend gut wasserlöslich sind, ist der meist unpolare Charakter^[*] der Mycotoxine zusätzlich durch Prenylgruppen, die in dieser Hinsicht fast als „Antizucker“ erscheinen, verstärkt.

Typisches Beispiel eines unpolaren, prenylsubstituierten Peptid-Mycotoxins ist Roquefortin **2** aus *Penicillium roqueforti* (Abb. 19). Den interessantesten Teilschritt seiner Biosynthese^[88,89] bildet die mit einem weiteren Ringschluß gekoppelte Einführung einer Dimethylallyl-Gruppe in das Diketopiperazin **56** aus Tryptophan **20** und Histidin **55**. Zur Erklärung kommt, wie analoge chemische Reaktionen nahelegen^[90], die enzymatische Einführung eines Isopentenylrestes durch **19** am Stickstoff oder an C-2 des Indolteils in Betracht. Sigmatrope Umlagerung des Isopentenylrestes nach C-3 und Cyclisierung des 3H-Indols zur Aminalgruppierung in Roquefortin **2** schließen sich an.

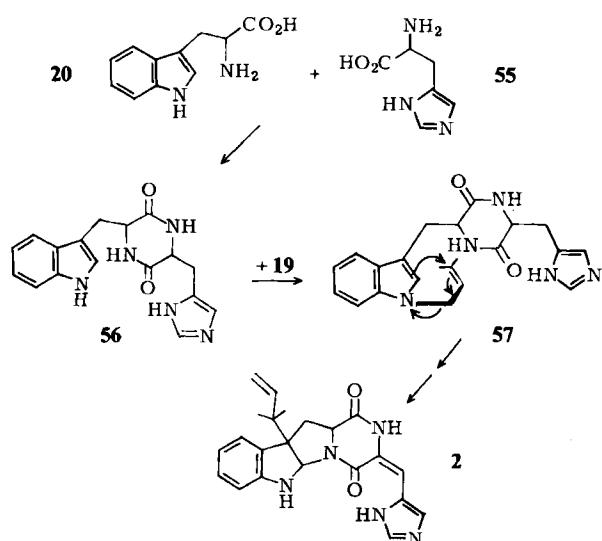


Abb. 19. Bausteine und Verlauf der Biosynthese von Roquefortin **2**.

6. Schutz vor Mycotoxinen

Die Kenntnis der Ursachen von Mycotoxikosen hat zur Entwicklung vielfältiger Schutzmaßnahmen gegen Mycotoxine in Nahrungsmitteln geführt^[7] (Tabelle 6).

[*] Eine Ausnahme bildet das stark polare Mycotoxin Moniliiformin 3.

Tabelle 6. Maßnahmen zur Vermeidung und zur Desaktivierung von Mycotoxinen in Nahrungsmitteln.

- 1) Abwehr toxinbildender Schimmelpilze
- 2) Auslesen infizierter Früchte
- 3) Chemische Desaktivierung
 - Erhitzen
 - UV-Bestrahlung
 - Oxidation
 - Ansäuern
 - Zusatz von Basen
- 4) Biologische Desaktivierung
 - Reaktion mit Nahrungsbestandteilen
 - Passage durch Nutz- und Schlachtvieh
 - Abbau durch Mikroorganismen
 - Abbau durch Inhibitoren im Stoffwechsel

Zweifellos kommt der Abwehr oder Minimierung toxinbildender Schimmelpilze in Nahrungsmitteln und der daraus resultierenden Vermeidung von Mycotoxinen die größte Bedeutung zu^[91]. Demgegenüber haben die drei anderen Maßnahmen bei beträchtlichem technischem Aufwand schwerwiegende Nachteile wie Unvollständigkeit, Geschmacksveränderung und mögliche Bildung neuer, toxikologisch schwer kontrollierbarer Folgeprodukte. Für die besonders gefährlichen Aflatoxine wurden in zahlreichen Ländern während der letzten Jahre gesetzlich kontrollierte Maximal-Konzentrationen in Nahrungsmitteln festgelegt (Tabelle 7).

Tabelle 7. Gesetzliche Aflatoxin-Kontrolle in zehn Ländern (Stand 1977; nach [92]).

Land	Nahrungsmittel	Aflatoxin-Grenzwert [µg/kg] [a, b]
Bundesrepublik Deutschland	alle Nahrungsmittel	5 B ₁ 10 G
Dänemark	Erd- und Paranüsse	0
Frankreich	alle Nahrungsmittel	5 B ₁
Großbritannien	Erdnüsse	50 B ₁
Indien	Erdnussmehl	30 B ₁
Italien	Erdnussprodukte	50 B ₁
Japan	alle Nahrungsmittel	0
Niederlande	Erdnussprodukte	0
Polen	alle Nahrungsmittel	0
USA	Erdnussprodukte	15 G

[a] B₁ = Höchster Grenzwert für Aflatoxin B₁. [b] G = Höchster Grenzwert für die Gesamtmenge der Aflatoxine.

Die angegebenen Aflatoxin-Grenzwerte orientieren sich unter anderem am heutigen Entwicklungsstand der Nachweisanalytik sowie am „No-effect-level“, der nach Auswertung von Tierversuchen durch Friedmann^[93] bei einer täglichen Aufnahme von $9.6 \cdot 10^{12}$ Molekülen pro kg Körpergewicht = 5 ng/kg liegen soll.

Akzeptiert man die Annahme eines Schwellenwertes der carcinogenen Wirkung, so wäre dieser für einen Erwachsenen von 75 kg Körpergewicht mit 375 ng Aflatoxin B₁ 1 erreicht. In 100 g Nahrungsmitteln, die den in vielen Ländern geltenden Vorschriften gerade noch entsprechen (Tabelle 7), können jedoch bis zu 5000 ng Aflatoxin B₁ 1 enthalten sein. Hieraus ergibt sich, daß das Verständnis des Schwellenwertes der Aflatoxin-Wirkung wie auch die Kontrollanalytik dringend weiterer Entwicklung bedürfen.

Eine umfassende Sichtung der verfügbaren Methoden zur Multimycotoxin-Analyse in Nahrungsmitteln wurde von der „IUPAC Commission on Food Chemistry“ mitgeteilt^[23]. Danach besteht die Analyse einer Nahrungsmittel-

probe, deren Menge mindestens 25 g betragen sollte, aus fünf Teilschritten von gleicher Bedeutung: Extraktion, Anreicherung, Trennung, Identifizierung und quantitative Bestimmung. Wichtigste Methoden für die zumeist mit der Identifizierung verbundene Trennung sind Dünnschichtchromatographie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und FDI-Massenspektrometrie.

Günstigerweise kann die Identifizierungsmethode von Patterson und Roberts^[101], die sich als besonders leistungsfähig herausgestellt hat, ohne aufwendige Apparaturen „vor Ort“ angewendet werden. Es handelt sich um eine Kombination von Systemen zur zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie auf Silicagel. Das Verfahren soll HPLC-Methoden durch höhere Empfindlichkeit überlegen sein und sich dadurch auszeichnen, daß es den einzelnen Mycotoxinen gute „chromatographische Fenster“ gibt. Die Nachweisgrenzen variieren mit dem Mycotoxin und dem untersuchten Nahrungsmittel (Tabelle 8). So beträgt z. B. für Aflatoxin B₁ in Milchkonzentraten die derzeit unterste Nachweisgrenze 300 ng/kg, was etwa dem „No-effect-level“ entspricht.

Tabelle 8. Nachweisgrenzen in ng/kg für Mycotoxine in Nahrungsmitteln nach Patterson und Roberts [101].

Nahrungsmittel	Aflatoxin B ₁ 1	Sterigmatocystin 48	T-2-Toxin 10	Zearalenon 32
Erdnußmehl	100	—	—	—
Mais	100	1000	20000	2000
Weizen	200	1000	20000	2000
Milch- konzentrate	300	2000	20000	10000

Für Futtermittel sind etwas höhere Aflatoxin-Grenzwerte zugelassen – in der Bundesrepublik Deutschland 10–50 µg/kg^[94], da beim „Carry-over“ in Milch und Fleisch aus Nutz- und Schlachtvieh mit einer Abnahme der Aflatoxinwirkung um den Faktor 100 gerechnet wird. Diese kann sowohl durch Ausscheidung der Aflatoxine als auch durch entgiftende Metabolisierung bewirkt werden. In Abbildung 20 sind einige in Tierversuchen gefundene, nur noch

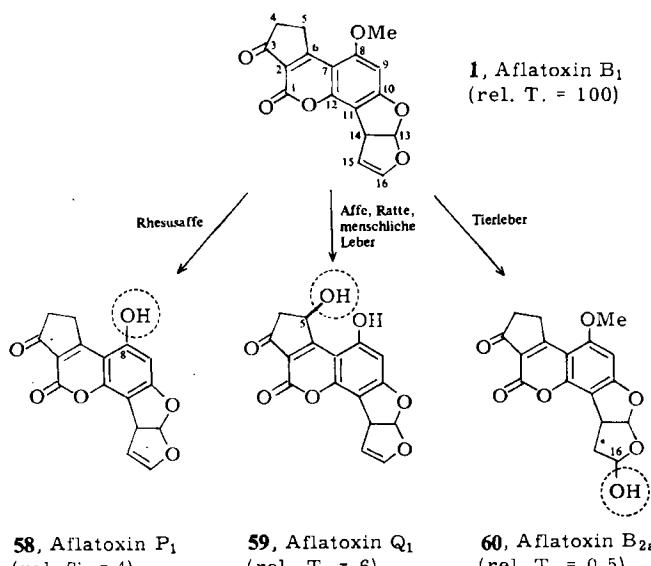


Abb. 20. Strukturen und relative Toxizitäten (rel. T.) [4] einiger Metabolite von Aflatoxin B₁. Strukturänderungen sind durch Umkreisung hervorgehoben.

schwach toxische Stoffwechselprodukte von Aflatoxin B₁ 1 zusammengestellt^[4].

Es ist bemerkenswert, daß Hydroxylierung oder Freisetzung von Hydroxygruppen an den C-Atomen 5, 8 und 16 von Aflatoxin B₁ 1 die akute Toxizität erheblich herabsetzt, während Hydroxylierung an C-14 zu Aflatoxin M₁ 11 in Kuhmilch tragsicherweise kaum die Toxizität und die Neigung zur Lebercarcinombildung vermindert^[95, 96].

7. Ausblick

Obwohl die Erforschung der Mycotoxine, z. B. der Mutterkorn-Alkaloide, bereits vor der Antibiotica-Ära begann, stand sie bisher an Intensität zurück. Das Interesse an medizinisch nutzbaren Antibiotica überwog. Hier zeichnet sich ein Wandel ab, seitdem erkannt wurde, daß es neben den Krankheiten, die durch Antibiotica geheilt werden können, zahlreiche weitere gibt, die sich durch Kenntnis und Vermeidung von Mycotoxinen verhindern lassen.

Grundsätzlich sollte es einfacher sein, das Eindringen von Schimmelpilzen in Nahrung und Futter zu verhindern als bakterielle Infektionen des Menschen zu verhüten. Dem steht jedoch noch immer unsere traditionelle Großzügigkeit und Unerfahrenheit gegenüber den aggressiven Nahrungsmittel-Schimmelpilzen im Wege. Hinzu kommt, daß manche Mycotoxikosen infolge langer Inkubationszeiten nur durch moderne statistische Methoden erkennbar sind und zum Teil erst mit dem Rückgang anderer Krankheiten und der Zunahme der durchschnittlichen Lebenserwartung relevant wurden.

Meinen Mitarbeitern, deren Namen in den Literaturzitaten genannt sind, sowie unserer Mikrobiologin, Frau Cornelia Peters, danke ich für erfolgreiche Zusammenarbeit. Die Untersuchungen wurden vom Landesamt für Forschung in Nordrhein-Westfalen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie großzügig gefördert.

Ein eingegangen am 24. April 1984 [A 496]

- [1] a) J. Forgacs, W. T. Carll, *Adv. Vet. Sci.* 7 (1962) 273; b) R. W. Detry, E. B. Lillehoj, A. Ciegler in A. Ciegler, S. Cadis, S. J. Ajl: *Microbial Toxins*, Vol. 6, Academic Press, New York 1971, S. 6.
- [2] W. P. Blount, *Turkeys* 9 (1961) 52, 55, 61.
- [3] L. A. Goldblatt: *Aflatoxin*, Academic Press, New York 1969.
- [4] R. J. Cole, R. H. Cox: *Handbuch of Toxic Fungal Metabolites*, Academic Press, New York 1981.
- [5] I. F. H. Purchase: *Mycotoxins*, Elsevier, Amsterdam 1974.
- [6] T. D. Wyllie, L. G. Morehouse: *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook*, Vol. 1–3, Marcel Dekker, New York 1978.
- [7] J. Reiβ: *Mycotoxine in Lebensmitteln*, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart 1981.
- [8] F. Kiermeier, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 167 (1978) 115.
- [9] J. V. Rodricks, C. W. Hesselkine, M. A. Mehlmann: *Mycotoxins in Human and Animal Health*, Pathox Publ. Inc., Park Forest, IL 1977.
- [10] W. B. Turner: *Fungal Metabolites*, Academic Press, New York 1971; W. B. Turner, D. C. Aldridge: *Fungal Metabolites II*, Academic Press, New York 1983.
- [11] a) E. Lück, D. Groll, *Chem. Unserer Zeit* 5 (1971) 24; b) R. Weber, *ibid.* 17 (1973) 146.
- [12] R. Reiner: *Antibiotica*, Thieme, Stuttgart 1974.
- [13] *The Merck Index*, Merck & Co., Rahway, NJ 1983.
- [14] T. Asao, G. Büchi, M. M. Abdel-Kader, S. B. Chang, E. L. Wick, G. N. Wogan, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 882.
- [15] S. Ohmomo, T. Sato, T. Utagawa, M. Abe, *Agric. Biol. Chem.* 39 (1975) 1333.
- [16] P. M. Scott, M.-A. Merrien, J. Polonsky, *Experientia* 32 (1976) 140.
- [17] P. M. Scott, B. P. C. Kennedy, *J. Agric. Food Chem.* 24 (1975) 865.
- [18] P. S. Steyn in [9], S. 421.
- [19] L. Leistner, C. Eckardt in [7], S. 297.

- [20] P. I. Cole, J. W. Kirksey, H. G. Cutler, B. L. Doupnik, J. C. Peckham, *Science* 179 (1973) 1324.
- [21] B. J. Wilson, C. H. Wilson, A. W. Hayes, *Nature (London)* 220 (1968) 77.
- [22] A. E. de Jesus, C. P. Gorst-Allman, P. S. Steyn, F. R. van Heerden, R. Vleggaar, P. L. Wessels, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1983, 1847.
- [23] P. S. Steyn, *Pure Appl. Chem.* 53 (1981) 891.
- [24] M. Savonius: *Pilze*, Emil Vollmer Verlag, Wiesbaden 1973, S. 63.
- [25] G. Barger: *Ergot and Ergotism*, Gurney and Jackson, London 1931.
- [26] S. J. van Rensburg, B. Altenkirk in [5], S. 69.
- [27] A. Hofmann: *Die Mutterkornalkaloide*, Enke, Stuttgart 1964.
- [28] B. Franck, H. Flasch, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 30 (1973) 151.
- [29] Siehe [6], Vol. 3, S. 1.
- [30] B. Franck, *Angew. Chem.* 81 (1969) 269; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 8 (1969) 251.
- [31] B. Franck, *Abh. Rhein.-Westf. Akad. Wiss. N* 219 (1972) 43.
- [32] M. Yamazaki, Y. Maebayashi, K. Miyaki, *Chem. Pharm. Bull.* 19 (1971) 199.
- [33] B. Franck, E. M. Gottschalk, U. Ohnsorge, F. Hüper, *Chem. Ber.* 99 (1966) 3842.
- [34] B. Franck, G. Baumann, *Chem. Ber.* 99 (1966) 3863.
- [35] B. Franck, G. Baumann, *Chem. Ber.* 99 (1966) 3875.
- [36] Siehe [4], S. 646; R. Andersen, G. Büchi, B. Kobbe, A. L. Demain, *J. Org. Chem.* 42 (1977) 352.
- [37] P. S. Steyn, *Tetrahedron* 26 (1970) 51.
- [38] a) A. Z. Joffe in [5], S. 229; b) A. Z. Joffe in [6], Vol. 3, S. 21.
- [39] a) J. R. Bamberg, N. V. Riggs, F. M. Strong, *Tetrahedron* 24 (1968) 3329; b) G. G. Freeman, R. I. Morrison, *Nature (London)* 162 (1948) 20.
- [40] Y. Ueno: *Trichothecenes. Chemical, Biological and Toxicological Aspects*, Elsevier, Amsterdam 1983.
- [41] a) *Chem. Eng. News (Washington)* 60 (1982) (49), 6; b) L. R. Ember, *ibid.* 62 (1984) (2), 8.
- [42] E. LeBreton, C. Frayssinet, J. Boy, *C. R. Acad. Sci.* 255 (1962) 784.
- [43] W. H. Butler in [5], S. 1.
- [44] S. J. van Rensburg in [9], S. 699.
- [45] C. W. Holzapfel, P. S. Steyn, I. F. H. Purchase, *Tetrahedron Lett.* 1966, 2799.
- [46] R. C. Shank in [6], Vol. 3, S. 9; P. Robinson, *Clin. Pediatr.* 6 (1967) 57.
- [47] D. H. Swenson, J.-K. Lin, E. C. Miller, J. A. Miller, *Cancer Res.* 37 (1977) 172.
- [48] G. N. Wogan in [9], S. 29; H. Yoshizawa-Nakaki, T. Masuda, Y. Oma- ta, Y. Ueno in *Proc. V. Int. IUPAC Symp. on Mycotoxins and Phycotoxins*, Wien 1982, S. 330.
- [49] Y. Ueno in [5], S. 283.
- [50] N. Sakabe, T. Goto, Y. Hirata, *Tetrahedron Lett.* 1964, 1825.
- [51] B. Franck, H.-P. Gehrken, *Angew. Chem.* 92 (1980) 484; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 (1980) 461.
- [52] E. Linnett, A. D. Mitchell, M. D. Osselton, L. J. Mulheirn, R. B. Beechey, *Biochem. J.* 1970 (1978) 503.
- [53] J. Jakubowska in J. E. Smith, J. A. Pateman: *Genetics and Physiology of Aspergillus*, Academic Press, New York 1977.
- [54] H.-J. Rehm: *Industrielle Mikrobiologie*, Springer, Berlin 1980.
- [55] M. Bodanzky, G. L. Stahl, *Bioorg. Chem. Ser. One* 4 (1975) 93; K. An- zai, R. W. Curtis, *Phytochemistry* 4 (1965) 263.
- [56] a) M. O. Moss, F. V. Robinson, A. B. Wood, *J. Chem. Soc. C* 1971, 619; b) G. Büchi, K. M. Snader, J. D. White, J. Z. Gougoutas, S. Singh, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 6638.
- [57] S. Marumo, *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 23 (1959) 428.
- [58] R. Wei, H. K. Schnoes, P. A. Hart, F. M. Strong, *Tetrahedron* 31 (1975) 109.
- [59] F. Baert, M. Foulon, G. Odou, S. Moreau, *Acta Crystallogr. B* 36 (1980) 402.
- [60] G. Büchi, Y. Kitaura, S. Yuan, H. E. Wright, J. Clardy, A. L. Demain, T. Glinsukon, N. Hunt, G. N. Wogan, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 5423.
- [61] P. S. Steyn: *The Biosynthesis of Mycotoxins. A Study in Secondary Metabolism*, Academic Press, New York 1980.
- [62] B. Franck, *Angew. Chem.* 91 (1979) 453; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18 (1979) 429.
- [63] B. Franck in [61], S. 157.
- [64] C. J. Rabie, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, A. Lübben, R. Vleggaar, *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (1982) 517.
- [65] J. P. Springer, J. Clardy, R. J. Cole, J. W. Kirksey, R. K. Hill, R. M. Carlson, J. L. Isidor, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 2267.
- [66] H.-D. Scharf, H. Frauendorf, W. Pinske, *Chem. Ber.* 111 (1978) 168.
- [67] G. Breipohl, Dissertation, Universität Münster 1982.
- [68] R. B. Woodward, G. Singh, *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 758.
- [69] K. J. van der Merve, P. S. Steyn, L. Fourie, *J. Chem. Soc.* 1965, 7083.
- [70] D. W. Nagel, P. S. Steyn, N. P. Ferreira, *Phytochemistry* 11 (1972) 3215.
- [71] P. S. Steyn, R. Vleggaar, P. L. Wessels, M. Woudenberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1982, 2175.
- [72] W. H. Urry, H. L. Wehrmeister, E. B. Hodge, P. H. Hidy, *Tetrahedron Lett.* 1966, 3109.
- [73] S. Gatenbeck, *Acta Chem. Scand.* 12 (1958) 1985.
- [74] B. Franck, F. Hüper, D. Gröger, D. Erge, *Chem. Ber.* 101 (1968) 1954.
- [75] D. Gröger, D. Erge, B. Franck, U. Ohnsorge, H. Flasch, F. Hüper, *Chem. Ber.* 101 (1968) 1970.
- [76] B. Franck, H. Backhaus, M. Rolf, *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 1185.
- [77] B. Franck, G. Bringmann, G. Flohr, *Angew. Chem.* 92 (1980) 483; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 (1980) 460.
- [78] B. Franck, *Angew. Chem.* 94 (1982) 327; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 343.
- [79] H. Fujimoto, H. Flasch, B. Franck, *Chem. Ber.* 108 (1975) 1224.
- [80] S. Gatenbeck, L. Malmström, *Acta Chem. Scand.* 23 (1969) 3493.
- [81] A. J. Birch, J. Baldas, J. R. Hlubucek, T. J. Simpson, P. W. Westerman, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1976, 898.
- [82] J. S. E. Hoikka, R. D. Lapper, T. J. Simpson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1974, 2135.
- [83] P. S. Steyn, R. Vleggaar, P. L. Wessels in [61], S. 105.
- [84] D. P. H. Hsieh, R. Singh, R. C. Yao, J. W. Bennet, *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (1978) 980.
- [85] K. G. R. Pachler, P. S. Steyn, R. Vleggaar, P. L. Wessels, De B. Scott, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1976, 1182.
- [86] a) C. Tamm, W. Breitenstein in [61], S. 69; b) B. A. Achilladelis, P. M. Adams, J. R. Hanson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1972, 1425.
- [87] S. Moreau, J. Biguet, A. Lablache-Combier, F. Baert, M. Foloun, C. Delfosse, *Tetrahedron* 36 (1980) 2989.
- [88] K. D. Barrow, P. W. Colley, D. E. Tribe, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1979, 225.
- [89] R. Vleggaar, P. L. Wessels, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1980, 160.
- [90] G. Casnati, R. Marchelli, A. Pochini, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1974, 754.
- [91] W. Mücke, H. Schulze in [7], S. 489.
- [92] L. Stoloff in [9], S. 7.
- [93] L. Friedmann, *Proc. 5th Int. Congr. Pharmacology*, San Francisco 1972, Vol. 2, Karger, Basel 1973, S. 30.
- [94] H. K. Frank in [9], S. 759.
- [95] R. Allcroft, R. B. A. Carnaghan, *Chem. Ind. (London)* 1963, 50.
- [96] G. N. Wogan, S. Pagialunga, *Food Cosmet. Toxicol.* 12 (1974) 381.
- [97] E. Schröder, C. Rufer, R. Schmiechen: *Pharmazeutische Chemie*, Thieme, Stuttgart 1982.
- [98] M. Shibukawa, C. Shibuya, K. Ishii Eur. Pat.-Anm. EP 64199 (Asahi Chemical Industry); *Chem. Abstr.* 98 (1983) 173189v.
- [99] R. N. Hurd in [9], S. 383.
- [100] M. C. Calhoun, M. Shelton, B. W. Berry, *Tex. Agric. Exp. Sta. Prog. Rep.* 1973, 3179.
- [101] D. S. P. Patterson, B. A. Roberts, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62 (1979) 1265.