

(Fortsetzung)

Natürliche Substrate			Endgültiges Ergebnis des Aflatoxinnachweises
Chloroformextrakte der Kultur- flüss. bzw. des Mycels <sup>a</sup>			
2	3a	3d	
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	(+)	—
—	—	(+)	—
(—)	(+)	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	(+)	—
—	—	(+)	—
—	—	—	—
—	—	—	—
(—)	(—)	(+)	—
—	—	—	—

Prof. Dr. H. J. Rehm  
 Institut für Mikrobiologie  
 Westfälische-Wilhelms-Universität  
 D-4400 Münster (Westf.)  
 Piusallee 7  
 Bundesrepublik Deutschland

## Zweifel über das Vorkommen von Aflatoxin bei der Gattung *Penicillium*

H. K. FRANK

Mitteilung aus der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung, Karlsruhe (BRD)

Eingegangen am 23. Juni 1972

### Doubts about Aflatoxin Formation by *Penicillium*

*Summary.* 218 isolates of the genus *Penicillium* corresponding to 41 species, were investigated on their ability to produce aflatoxins and antibiotic substances. No strain was found to be aflatoxinogen. 14 strains, however, produced fluorescing metabolites mistakable with aflatoxins in TLC. 31 strains were found to be antibiotic against *B. subtilis*.

*Zusammenfassung.* Es wurden 218 Isolate der Gattung *Penicillium*, die 41 verschiedenen Arten angehörten, auf ihre Fähigkeit Aflatoxine und antibiotische Substanzen zu produzieren untersucht. Aflatoxine wurden von keinem Stamm gebildet, wohl aber produzierten 14 Isolate Substanzen, die unter Umständen mit Aflatoxinen bei der DSC verwechselt werden können. 31 Stämme waren gegenüber *B. subtilis* antibiotisch aktiv.

Penicillien zählen neben den Aspergillen zu den häufigsten Besiedlern und Verderbern von Lebens- und Futtermitteln [1, 2]. Im Zusammenhang mit der Suche nach Aflatoxinen wurde schon mehrfach berichtet, daß neben *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus* auch andere Arten oder Gattungen diese Toxine bilden können [3—6]. In jüngster Zeit werden Zweifel an diesen Befunden laut, da man mit der Verbesserung der Analytik immer häufiger auf Substanzen stößt, die Aflatoxine auf dem Dünnschicht-Chromatogramm vortäuschen können. So ist z. B. der Verfasser 1968 einem solchen Irrtum zum Opfer gefallen, als er Aflatoxin M<sub>1</sub> bei *A. tamaris* von Muskatnüssen nachgewiesen zu haben glaubte [7], was sich aber schließlich als falsch herausstellte [8].

Um diese für die Lebensmittelhygiene bedeutsame Frage klären zu helfen, wurden 41 Arten der Gattung *Penicillium* (218 Stämme), die 1965 von verschiedenen Lebensmitteln isoliert wurden [9] auf Aflatoxinbildung hin untersucht. Da Aflatoxine antibiotisch aktiv sind [10] und sich in einem wasserhaltigen Medium ausbreiten können [11, 5, 12] wurde auch der Einfluß der Isolate auf ein Bakterium untersucht, um eventuelle Korrelationen zwischen diesen Eigenschaften zu erfassen.

Für den Aflatoxinnachweis wurden die Pilze auf 10 g Weizengrieß, der mit 5 ml 0,1%iger Hefeextraktlösung autoklaviert worden war, 6 Tage bei 30° C kultiviert. Substrat und Pilz wurden zusammen extrahiert und nach der früher [13] mitgeteilten Methode dünnschichtchromatographisch auf Aflatoxine geprüft. Als Standard stand eine selbst hergestellte Lösung der Aflatoxine B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> und M<sub>1</sub> in Chloroform zur Verfügung. Die antibiotische Aktivität wurde mit Hilfe des Blättchentestes direkt aus dem zellfreien Kulturfiltrat (Czapek-Nährlösung) nach 28 Tagen Oberflächkultur bei 25° C gegen *Bacillus subtilis* ATCC 6633 als Testkeim festgestellt.

Tabelle 1. Vorkommen Aflatoxin-vortäuschender Stoffwechselprodukte und antibiotischer Aktivitäten bei 218 Isolaten aus 41 Arten der Gattung *Penicillium*

Zahl der geprüften Stämme	Art	antibiotisch aktive Stämme	Stämme mit Aflatoxin-vortäuschenden Substanzen	Zahl der geprüften Stämme	Art	antibiotisch aktive Stämme	Stämme mit Aflatoxin-vortäuschenden Substanzen
	<b>Monovercillata</b>				<b><i>Asymm.-Fasciculata</i></b>		
1	<i>P. purpurrescens</i>	0	0	3	<i>P. ochraceum</i>	0	3
1	<i>P. implicatum</i>	0	0	14	<i>P. viridicatum</i>	1	6
1	<i>P. citreo-viride</i>	0	0	2	<i>P. olivino-viride</i>	0	0
2	<i>P. roseo-purpureum</i>	0	0	2	<i>P. palitans</i>	0	0
1	<i>P. adametzi</i>	1	0	24	<i>P. cyclopium</i>	2	2
3	<i>P. charlesii</i>	0	0	2	<i>P. puberulum</i>	0	0
30	<i>P. caseiperdens</i>	0	0	3	<i>P. martensii</i>	0	1
	<b>Asymmetrica</b>			3	<i>P. aurantio-virens</i>	0	0
	<b><i>Asymm.-Divaricata</i></b>			13	<i>P. expansum</i>	3	1
1	<i>P. baarnense</i>	0	0	2	<i>P. urticae</i>	2	1
1	<i>P. soppi</i>	1	0	1	<i>P. corymbiferum</i>	0	0
1	<i>P. canescens</i>	0	0		<b>Biverticillata-Symmetrica</b>		
2	<i>P. nigricans</i>	0	0	3	<i>P. funiculosum</i>	1	0
	<b><i>Asymm.-Velutina</i></b>			4	<i>P. purpurogenum</i>	1	0
3	<i>P. corylophilum</i>	2	0	2	<i>P. rubrum</i>	0	0
5	<i>P. citrinum</i>	1	0	1	<i>P. variabile</i>	0	0
1	<i>P. steckii</i>	0	0	1	<i>P. rugulosum</i>	0	0
8	<i>P. chrysogenum</i>	3	0		<i>P. herquei</i>	0	0
6	<i>P. meleagrinum</i>	3	0				
10	<i>P. notatum</i>	7	0				
1	<i>P. cyaneo-fulvum</i>	1	0				
3	<i>P. digitatum</i>	1	0				
8	<i>P. roquefortii</i>	0	0				
22	<i>P. brevi-compactum</i>	1	0				
6	<i>P. stoloniferum</i>	0	0				
	<b><i>Asymm.-Lanata</i></b>						
19	<i>P. caseicolum</i>	0	0				
1	<i>P. commune</i>	0	0				

### Ergebnis

In keinem Falle wurden Aflatoxine gefunden. Bei 14 Isolaten fanden sich jedoch blau oder blaugrün fluoreszierende Flecken auf dem DSC, die bei dem einen oder anderen Laufmittelsystem (vgl. 13) im  $R_f$ -Bereich von Aflatoxin B<sub>1</sub> oder G<sub>1</sub> lagen. In drei Fällen (*P. expansum* und *P. martensi*) gaben die verwechslungsfähigen Substanzen eine für Aflatoxine typische Reaktion mit 50%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. In der Tabelle 1. sind die Arten entsprechend der Einteilung der Gattung durch Raper u. Thom zusammengestellt. Schwerpunktmäßig tritt eine antibiotische Aktivität in der Gruppe der *Asymmetrica-Velutina* auf, was wegen der dort bekannten Penicillin-Produzenten nicht verwundert. Weitere Fälle finden sich in der Gruppe der *Asymmetrica-Fasciculata*, wo wichtige Patulin-Produzenten zu finden sind. In der gleichen Gruppe sind auch die Aflatoxin-vortäuschenden Substanzen konzentriert. Die Funde der „H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Positiven“ stehen in direkter Verwandtschaft zu *P. puberulum*, von dem ein Stamm 1963 von Hodges u. Mitarb. [3] isoliert wurde, der als Aflatoxin-Bildner beschrieben ist. Es wäre zu überprüfen, ob nicht in diesem Falle auch ein solches Aflatoxin-ähnliches Stoffwechselprodukt gebildet worden war.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen es fraglich erscheinen, ob bei der Gattung *Penicillium* das „Merkmal“ Aflatoxinbildung vorkommen kann.

### Literatur

1. Senser, F.: Lebensmit.-Chem. gerichtl. Chem. **23**, 210 (1969).
2. Christensen, C. M., Nelson, G. H., Mirocha, C. J., Bates, F.: Cancer Res. **28**, 2293 (1968).
3. Hodges, F. A., Zust, J. R., Smith, H. R., Nelson, A. A., Armbrecht, B. H., Campbell, A. D.: Science **145**, 1439 (1964).
4. Kulik, M. M., Holaday, Ch. E.: Mycopathol. Mycol. Appl. **30**, 137 (1967).
5. Hanssen, E.: Naturwissenschaften **56**, 90 (1969).
6. Kiermeier, F.: Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **146**, 262 (1971).
7. Frank, H. K.: Microbiology of Dried Foods. Proceedings of the sixth Intern. Symp. on Food Microbiol., S. 286—300, Bilthoven, June 1968.
8. Hesselstine, C. W.: Pers. Mitt. am 15. 1. 1969.
9. Frank, H. K.: Ein Beitrag zur Taxonomie der Gattung *Penicillium* Link, mit besonderer Berücksichtigung lebensmitteltechnologischer bedeutsamer Arten. Habil. schr. Fak. Allg. Wiss., TH München 1966.
10. Burmeister, H. R., Hesselstine, C. W.: Appl. Microbiol. **14**, 403 (1966).
11. Frank, H. K.: J. Food Sci. **33**, 98 (1968).
12. Kiermeier, F., Behringer, G.: Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **148**, 72 (1972).
13. Frank, H. K., Eyrich, W.: Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **138**, 1 (1968).

Prof. Dr. H. K. Frank  
 Bundesforschungsanstalt für  
 Lebensmittelfrischhaltung  
 D-7500 Karlsruhe 1  
 Engesserstraße 20  
 Bundesrepublik Deutschland

## Bildung Aflatoxin-ähnlicher Substanzen durch *Penicillium*-Arten

H. BÖSENBERG und E. BECKER

Mitteilung aus dem Hygiene-Institut der Universität Münster (BRD)

Eingegangen am 14. Juli 1972

### Production of Aflatoxin-like Substances by *Penicillium* Species

**Summary.** Investigations of semolina cultures of 60 penicillia molds showed in 23 cases fluorescent substances that had the appearance of aflatoxins in chromatography.

UV-absorption of these suspicious substances however excluded aflatoxin diagnosis.

Using the chromatogram — spectralphotometry is a sure possibility to distinguish aflatoxin-like substances from aflatoxin.

**Zusammenfassung.** Bei Untersuchung von Grießbrot-Kulturen mit 60 Pilzstämmen der Gattung *Penicillium* ließen sich 23mal fluoreszierende Substanzen isolieren, die sich bei der Chromatographie wie Aflatoxine verhielten. Die Überprüfung der UV-Absorption der verdächtigen Substanzen schloß eine Diagnose „Aflatoxine“ aus.

Mit Hilfe der Chromatogramm-Spektralphotometrie lassen sich Aflatoxin-ähnliche Substanzen leicht von Aflatoxinen abgrenzen.