

KATARZYNA SZOŁTYSEK

TOKSYCZNE METABOLITY GRZYBA *PENICILLIUM ROQUEFORTI*

Z Zakładu Technologii Przemysłu Spożywczego Instytutu Technologii
Przemysłu Chemicznego i Spożywczego
Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. inż. J. Ziobrowski

*Dokonano przeglądu piśmiennictwa światowego na temat poznanych dotychczas toksycznych metabolitów grzyba *Penicillium roqueforti*, przedstawiono ich ogólną charakterystykę, omówiono warunki powstawania, metody izolacji, a także dokonano oceny toksyczności ostrej.*

WSTĘP

Penicillium roqueforti jest przedstawicielem rodzaju *Penicillium* zaliczanego do grzybów niedoskonałych (*Fungi imperfecti*) grupy *Asymetrica*. Jego duże znaczenie przemysłowe wynika z powszechnego zastosowania na świecie do produkcji sera typu Roquefort oraz innych rodzajów serów. Zarodniki *P. roqueforti* dodawane są w momencie formowania skrzepu [8]; w czasie dojrzewania sera następuje ich rozwój i tworzenie się szaroniebieskiej grzybni. Jest ona odpowiedzialna za zmiany o charakterze proteolitycznym i lipolitycznym podczas dojrzewania sera, powodując swoiste cechy organoleptyczne.

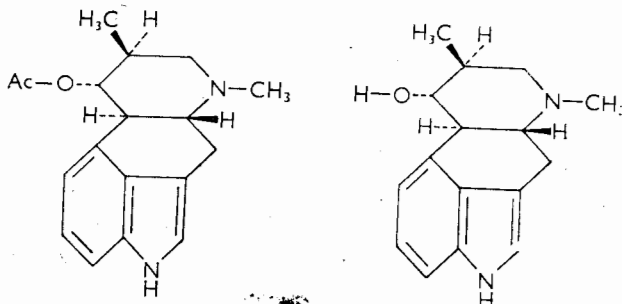
Już w roku 1958 Taber i Vining [14], a następnie Bekmakhamowa [2] donosili o zdolności *P. roqueforti* do produkcji alkaloidów. Dopiero jednak niedawno alkaloidy te wyizolowano i scharakteryzowano [1, 5, 6, 7, 12, 15, 16]. Mogą one zhażeć się także w serach, a tym samym stwarzać niebezpieczeństwo dla konsumentów.

Podział i ogólna charakterystyka substancji toksycznych

Spośród wyodrębnionych dotychczas toksycznych metabolitów wyróżnić można grupę alkaloidów rokfortyny [11] oraz niealkaloid PR-toksynę, zaliczaną do tzw. seskwiterpenoidów [1, 4, 5, 11, 16]. Do grupy alkaloidów rokfortyny należą następujące związki:

- roktortyna A czyli 6,9-dwumetylo-7-0-acetylergolina
- roktortyna B czyli 6,9-dwumetylo-7-hydroxylergolina
- roktortyna C (dokładnej struktury związku jeszcze nie określono)
- isofumigoklawina A czyli 9-acetoksy-6,8-dwumetyloergolina
- isofamigoklawina B czyli 6,8-dwumetyloergolina-9-d.

Zaliczane są one do grupy alkaloidów szeregu indolu, a budowa chemiczna dwóch pierwszych związków wg Ohmomo, Utawaga i Abe [6] oraz Scots, Merrien, Polonsky [10] przedstawia się następująco:



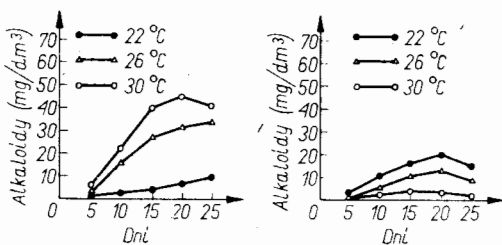
Isofumogoklawina A, będąca stereoisomerem fumigoklawiny [9, 10, 11] posiada szereg właściwości fizycznych bardzo zbliżonych do rokfortyny A, co dodatkowo sugeruje możliwości posiadania w swej budowie identycznych z nią komponentów [11]. Kennedy [9] wykonał analizę spektralną takich związków jak rokfortyna (A, B, C) oraz isofumigoklawina A i B, przy użyciu spektrometru Varian MAT — 311, przedstawiając uzyskane widma tych związków.

Określone punkty topnienia [4, 6, 7, 10, 11] dla rokfortyny ogółem oraz isofumigoklawiny A i B są prawie identyczne (w granicach 225°C do 228°C), a skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{25} = -764^\circ$. Wyjątkowa zbieżność otrzymanych przez tych badaczy wyników przemawia za identycznością wyizolowanych przez nich związków.

Powstawanie, metody wyodrębniania i otrzymywania substancji toksycznych

Tworzenie się substancji toksycznych stwierdzono podczas hodowli węgłnej grzybni *Penicillium roqueforti* na pożywkach płynnych [6, 7, 9]. Pożywkę zaszczipiano zarodnikami otrzymanymi metodą powierzchniową na pożywce stałej, z materiału wyizolowanego z różnych gatunków sera z przerostem *P. roqueforti*.

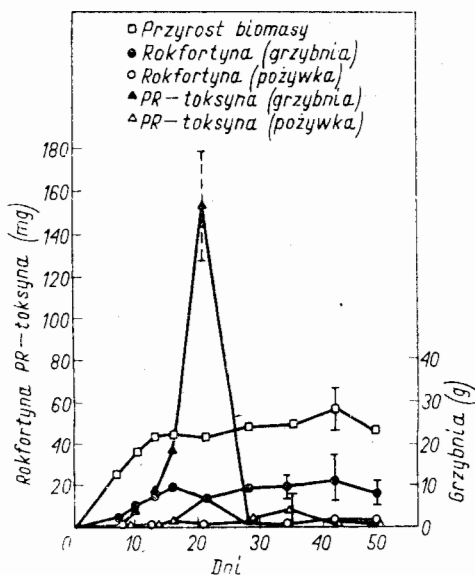
Optymalne warunki hodowli różniły się nieznacznie w zależności od rodzaju otrzymywanego związku. I tak: najbardziej przydatną pożywką dla otrzymywania rokfortyny A i C okazała się pożywka będąca modyfikacją pożywki MGS [7] o składzie: mannitol — 30 g, glukoza — 10 g, KH_2PO_4 — 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3 g, kwas bursztynowy — 10 g oraz woda wodociągowa — 1 dm³. Hodowlę prowadzono przez 25 dni w temperaturach: 22°, 26° oraz 30°C. Przebieg tworzenia się rokfortyny A i C w wyżej opisanych warunkach przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Dynamika biosyntezy rokfortyny A i C w warunkach hodowli węgłnej wg Scotta [9].

Jak widać z ryc. 1 najbardziej optymalną temperaturą hodowli dla rokfortyny C była temperatura 30°C, w której 20. dnia hodowli miało miejsce maksymalne nagromadzenie rokfortyny w ilości około 40—50 mg/dm³. Rokfortyna A osiągała swoje maksimum (około 20 mg/dm³) także 20. dnia hodowli przy optymalnej temperaturze równej 22°C.

Jeśli chodzi o warunki produkcji innych, wymienionych wcześniej metabolitów *P. roqueforti*, jak i isofumigoklawina A, PR-toksyna, stwierdzono [6, 9, 11], że największe ich ilości powstają, gdy używana jest pożywka składająca się z sacharozy — 15%, ekstraktu drożdżowego — 2% z dodatkiem niezbędnych mikroelementów, a temperatura hodowli wynosi 25°C. Warunki te sprzyjają także tworzeniu rokfortyny ABC.



Ryc. 2. Przebieg tworzenia się rokfortyny ABC oraz PR-toksyny wg Scotta [9].

Największe nagromadzenie rokfortyny uzyskano w tym przypadku około 16 dnia hodowli w ilości 100 mg/dm³ pożywki. Jeśli chodzi o PR-toksynę to tworzyła się ona w ilościach około 770 mg/dm³ 21 dnia hodowli. Obecność jej stwierdzono tylko w pożywce, co świadczy o jej zewnątrzkomórkowym charakterze.

Postępowanie preparatywne przy otrzymywaniu i oczyszczaniu omawianych substancji zależy od tego, czy są one wydzielane do podłoża, czy też nagromadzane wewnątrz komórki. Po inkubacji oddziela się grzybnię od pożywki przez sączenie lub wirowanie [11]. Badane związki najczęściej ekstrahuje się kolejno: acetonem, chloroformem i metanolem, zaś z płynu pożywkowego wydziela się je za pomocą octanu etylowego [6, 7, 12]. Otrzymane ekstrakty oczyszcza się na drodze chromatografii kolumnowej wg techniki opracowanej przez Wei'a, Stilla, Smalley'a [15] lub chromatografii na żelu krzemionkowym, a następnie elucji ich za pomocą układu etanol — metanol (dla wszystkich alkaloidów rokfortyny) lub etanol — benzen (dla PR-toksyny).

Omówione wyżej badania stanowiły jeden z kierunków; drugi z nich dotyczył izolowania wymienionych na wstępie substancji toksycznych bezpośrednio z serów. Zbadano 16 rodzajów serów z 7 krajów (Danii, Anglii, Finlandii, RFN, Włoch, Kanady, Francji) stwierdzając w nich obecność rokfortyny ABC w ilości powyżej 6,8 ppm, isofumigoklawiny A powyżej 4,7 ppm, a isofumigoklawiny jedynie śladowe ilości [3, 11].

Widmo tych związków w UV w spektrofotometrze Unicam SP 800 B były identyczne z widmami analogicznych związków otrzymanych na drodze hodowli wglębnej pleśni. W obu przypadkach były to więc te same związki, co dodatkowo potwierdziły szczegółowe badania ich struktury chemicznej [11].

Токсичность остра LD₅₀ метаболитов производимых через *P. roqueforti*

Ze względu na fakt występowania omawianych substancji w dość dużych stężeniach w serach liczni badacze podjęli badania histologiczne dotyczące ich toksyczności [1, 17]. Ponieważ, jak stwierdzono, PR-toksyna występująca w serze reaguje także z obecnym tam amoniakiem oraz wolnymi aminokwasami badaniami objęto dodatkowo jej pochodne, jak: PR-iminę (jako produkt reakcji PR-toksyny z amoniakiem) oraz produkty jej reakcji z L-leucyną oraz L- α -alaniną. Toksyczność ostrą tych związków (LD₅₀) oznaczano na dwóch gatunkach myszy obu płci. Badania *Arnolda*, *Scotta*, *Mcbuire'a*, *Harwiga* [1] wykazały, że największą toksycznością odznaczała się PR-toksyna, dla której wartość LD₅₀ wynosiła 72÷140 mg/kg w zależności od rodzaju i płci myszy. Mniejszą toksyczność wykazywała rokfortyna ABC (LD₅₀ = 163÷184). Dwukrotne obniżenie toksyczności zaobserwowano w przypadku pochodnych PR-toksyny i produktów jej reakcji z wolnymi aminokwasami oraz amoniakiem (LD₅₀ = 100÷300).

Jak już podkreślano wcześniej — podczas dojrzewania sera w wyniku degradacyjnych zmian w białkach, polegających przede wszystkim na stopniowym hydrolitycznym rozpadzie białek powstają w nim znaczne ilości aminokwasów, a także — w wyniku dalszego rozkładu aminokwasów — pewne ilości amoniaku. Tworząca się więc w serze silnie toksyczna PR-toksyna reaguje z tymi związkami, w wyniku czego następuje istotna redukcja siły jej toksyczności. Jest to bardzo istotne ze względu na potencjalne niebezpieczeństwo toksycznego działania serów z przerostem niebieskiej pleśni na organizm ludzki. Niemniej jednak badania na tym gruncie nie zostały jeszcze zakończone i problem pozostaje otwarty. Wśród dostępnego piśmiennictwa przedmiotu istnieje jedynie drobna zmianka o badaniach tego rodzaju podjętych także na materiale ludzkim [3], lecz brak jest bardziej szczegółowych danych.

K. Шолтысек

ТОКСИЧЕСКИЕ МЕТАБОЛИТЫ ГРИБА *PENICILLIUM ROQUEFORTI*

Резюме

Как следует из проведённого обзора научной литературы, проблема токсических метаболитов *Penicillium roqueforti* появилась относительно недавно. Из проведённых до настоящего времени исследований следует, что плесень *P. roqueforti* образует многочисленные токсические соединения, которых нали-

чие обнаруживается также в сырах, изготовленных при участии этого гриба. Токсичность этих веществ исследовалась только на животных, однако не исключено, что оказывают они вредное действие также на организм человека.

K. Szotysek

TOXIC METABOLITES OF *PENICILLIUM ROQUEFORTI* FUNGUS

Summary

A survey of the pertinent literature showed that the problem of the toxic metabolites of *Penicillium roqueforti* has arisen only recently. The investigations reported as yet demonstrated that the mould produces numerous toxic substances which are present also in the cheese produced with this mould. The toxicity of these substances has been studied as yet only in experimental animals but it is not impossible that they exert a harmful effect also on the human organism.

PÍSMIENICTWO

1. Arnold D.L., Scott P.M., Mc Guire P.F., Harwig J., Nera E.A.: Acute toxicity studies on roquefortine and PR-toxin, metabolites of *Penicillium roqueforti*, in the mouse. *Fd Cosmet. Toxicol.*, 1978, 16, 369. — 2. Bekmakhanova N.E.: Testing different substrates used for selecting microscopic fungi, potential producers of alkaloids. *Mikol. Fistopatol.* 1974, 8, 152. — 3. Krusch O., Lompe A., Engel G., Milczewski K.E.: Die gesundheitliche Unbedenklichkeit von *Penicillium caseicolum*, *P. camemberti* und *P. roqueforti*. *Milchwissenschaft*, 1977, 32, 713. — 4. Moreau S., Gaudemer A., Lablache-Combier A., Biguet J.: Metabolites de *Penicillium roqueforti*: PR-toxine et metabolites associes. *Tetrahedron*, 1976, 32, 833. — 5. Moule Y., Moreau S., Bousquet J.: Relationships between the chemical structure and the biological propertier of some eremophilane compounds related to PR-toxin. *Chemico-Biol. Interactions*, 1977, 17, 185. — 6. Ohmomo S., Utagawa T., Abe M.: Identification of roquefortine C produced by *Penicillium roqueforti*. *Agric. Biol. Chem.*, 1977, 41, 2097. — 7. Ohmomo S., Miyazaki K., Ohashi T., Abe M.: On the mechanism for the formation of indole alkaloids in *Penicillium concavo-rugulosum*. *Agric. Biol. Chem.*, 1977, 41, 1707. — 8. Pijanowski E.: Zarys chemii i technologii mleczarstwa. P.W.R.iL., Warszawa, 1971, 2, 414. — 9. Scott P.M., Kennedy B.P.C., Harwig J., Blanchfield B.J.: Study of conditions for production of roquefortine and other metabolites of *Penicillium roqueforti*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1977, 33, 249. — 10. Scott P.M., Merrien M.A., Polansky J.: Roquefortine and isofumigaclavine, metabolites from *Penicillium roqueforti*. *Experientia*, 1976, 32, 140. — 11. Scott P.M., Kennedy B.P.C.: Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*. *J. agric. Fd. Chem.*, 1976, 24, 865. — 12. Spilsbury J.F., Wilkinson S.: The isolation of festuclavine and two new clavine alkaloids from *Aspergillus fumigatus* Fres., *J. Chem. Soc.*, 1961, 28, 2085. — 13. Slopek S.: *Immunologia praktyczna*. PZWL, Warszawa 1978, 213. — 14. Taber W., Vining L.C.: Tryptophan as a precursor of ergot alkaloids. *Can. J. Microbiol.*, 1958, 4, 611. — 15. Wei R.D., Still P.E., Smalley E.B., Schnoes H.K., Strong F.M.: Isolation adn partial characterization of a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Appl. Microbiol.*, 1973, 25, 111. — 16. Wei R.D., Schnoes H.K., Hari P.A., Strong F.M.: The structure of PR-toxin a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Tetrahedron*, 1975, 31, 109. — 17. Weil C.S.: Tables for convenient calculation of median effective dose (LD₅₀ or ED₅₀) and instructions in their use. *Biometrics*, 1952, 8, 249.

Wrocław, dn. 15.07.1981 r.

51-649 Wrocław, ul. Bacciarellego 75/16