

Nowe strategie ułatwiające zarządzanie zagrożeniami mikotoksynowymi

Alexandros YIANNIKOURIS¹, JULES TAYLOR-PICKARD²

¹*Coordinator of Glycomics Research*

*Alltech North American Center of Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition, Alltech Inc., Nicholasville, Kentucky, USA.*² ALLTECH. INC., NICHOLASVILLE, KENTUCKY, USA

Streszczenie.

Autorzy omówili skutki zanieczyszczenia pasz dla świń mykotoksynami. Przedstawiono wyniki badań uwidaczniające korzystną rolę ścian komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w ograniczeniu toksycznego wpływu mikotoksyn. Plastyczność struktury β -D-glukanów wykazujących się różną stereochemią jest niewątpliwie podstawową przyczyną dużej ich skuteczności wobec mikotoksyn. Duża zmienność współczynnika powinowactwa wśród mikotoksyn jest wynikiem ich różnic strukturalnych i fizyko-chemicznych. Sugerowano, że β -D-glukany mają duże powinowactwo do mikotoksyn wykazujących się podobieństwem strukturalnym i fizyko-chemicznym do aflatoksyn, deoksynivalenolu i zearalenonu i mogą stanowić substancję kluczową w pomniejszaniu ryzyka obecności mikotoksyn. Wykazano, że zastosowanie materiału organicznego pochodzącego ze ścian komórek drożdży, jakim jest Mycosorb® mogłoby pomóc w procesie inaktywowania mikotoksyn w przewodzie pokarmowym i łagodzenie ich szkodliwego wpływu na zwierzęta. Biorąc pod uwagę ich strukturalną konformację stwierdzono, że glukany nie włączają się w procesy interakcji ze składnikami żywieniowymi. Zasygnalizowano, jako ściany komórek jako materiały organiczne, są bezpieczne dla środowiska, ponieważ są biodegradowalne po wydaleniu przez zwierzęta.

Summary

Novel Strategies to Manage the Mycotoxin Menace

Paper presents significant factors of mycotoxins as a factor which might predispose livestock to infectious disease possibly resulting in feed refusal and decreased productivity. By their immunosuppressive properties mycotoxins may facilitate the entrance of pathogens that may overshadow the primary cause of the infection due to the toxin itself. Beneficial role of yeast - *Saccharomyces cerevisiae* was discussed. It was demonstrated that cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* is limiting the toxicological impact of mycotoxins. The plasticity of the structure of β -D-glucan - from yeast cell wall - exhibiting diverse stereochemistry was undoubtedly responsible for the affinity of a large range of mycotoxins. Affinity rates varied widely between toxins due to their structural and physico-chemical disparities. β -D-glucans may have strong affinities for mycotoxins exhibiting 'aflatoxin-like,' 'deoxynivalenol-like' or 'zearalenone-like' structures and represent a key tool for counteracting mycotoxin risk. The use of organic material from yeast cell walls such as Mycosorb® (Alltech Inc.) could help sequester mycotoxins in the digestive tract when they are added to the diet and thus mitigate the harmful impact of mycotoxins on animals. Considering their structural conformation, glucans are not implicated in interactions with nutrients. Finally, as organic materials, glucans are environmentally safe because of their biodegradable properties after excretion by the animal.

Key words: swine, mycotoxins, yeast, Mycosorb®

W wyniku mających miejsce światowych kryzysów takich jak: encefalopatie prionowe, salmonellozy, listeriozy oraz stwierdzanie obecności pestycydów i innych składników chemicznych takich jak dioksyny w środkach spożywczych czy paszach, stosowanie steroidowych stymulatorów wzrostu wobec zwierząt gospodarskich, czy stosowanie GMO spowodowało zwiększenie wrażliwości konsumentów na pojęcia dotyczące bezpieczeństwa żywnościowego. Ryzyko związane z obecnością czynników zakaźnych i pasożytniczych jest doskonale rozumiane, lecz ryzyko wynikające z obecności substancji niepożądanych typu mikotoksyny i ich metabolity w paszach nie jest właściwie oceniane. Większość ludzi wychodzi z założenia, że substancje naturalne są bezpieczne. Zanieczyszczenie środków spożywczych czy pasz naturalnymi mikotoksynami, może powodować wiele problemów zdrowotnych a nawet stanów chorobowych. Grzyby pleśniowe produkujące te mikotoksyny mogą być obecne podczas wegetacji roślin jak i podczas magazynowania materiałów roślinnych. Grzyby te mogą produkować mikotoksyny działające szkodliwie wobec ludzi lub zwierząt pobierających zanieczyszczone produkty. Tego rodzaju stany zatrucia mogą powodować padnięcia wśród zwierząt, ale i niekiedy przypadki śmierci u ludzi (Pfohl-Leszkowicz, 2000). Historycznie rzecz biorąc, bardzo wyraźnie widać, że ryzyko mikotoksykologiczne istniało od momentu zorganizowanej produkcji rolniczej (Pittet, 1998). Są dowody o mających miejsce przypadkach zatrucia sporzysmem opisane w Starym Testamencie (Schoental, 1984) i fuzariotoksynami takimi jak toksyna T-2 i zearalenon, które były odpowiedzialne za upadek cywilizacji Etrusków (Schoental, 1991) i kryzys ateński mający miejsce w piątym wieku przed naszą erą (Schoental, 1994). Sądzi się, że niektóre egipskie grobowce zawierały ochratoksynę A, która była prawdopodobnie przyczyną śmierci kilku archeologów (Pfohl-Leszkowicz, 2000). Kolejny przypadek odnotowano dopiero w roku 1960 w formie mikotoksykozy, która wystąpiła jako rolnicze wydarzenie w Wielkiej Brytanii i spowodowała upadki wśród indyków w liczbie około 100 000. Ptaki padały wśród objawów martwicy wątroby o ciężkim przebiegu oraz towarzyszącymi przerostami kanalików żółciowych. Zostało to spowodowane aflatoksynami. W kolejnych latach zostały odkryte liczne mikotoksyny a wśród nich ostatnią dużą grupę stanowiły, fumonizyny odkryte w 1988 roku. Występują również tzw. wtórne zagrożenia w wyniku przenoszenia mikotoksyn i ich metabolitów na produkty spożywcze pochodzenia zwierzęcego takie jak mleko, mięso czy jaja.

Mikotoksyny są wtórnymi metabolitami produkowanymi przez grzyby pleśniowe należące najczęściej do trzech rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* infestujących ziarna zbóż jak również materiał paszowy przed, w trakcie, jak i po żniwach. Zboża jak i pasze w sposób naturalny stykają się ze sporami grzybów pleśniowych. Zanieczyszczenie grzybami pleśniowymi roślin i biosynteza mikotoksyn zależy od stanu zdrowotnego roślin przed żniwami, od warunków meteorologicznych, techniki, terminu żniw oraz stopnia zawilgocenia materiału paszowego przed jego magazynowaniem lub wykorzystaniem do produkcji pasz. Zależnie od rodzaju grzyba pleśniowego, stopień przyrostu tego grzyba zależy od liczby czynników fizyko-chemicznych a szczególnie od tzw. aktywności wody, temperatury, obecności tlenu, rodzaju substratu i warunków pH. Gryzonie, ptaki i insekty ułatwiają proces zanieczyszczania przez fizyczne uszkodzenie materiału roślinnego, co powoduje wejście spory grzyba pleśniowego do organizmu roślinnego (CAST, 2003). W ten sposób mikotoksyny mogą być obecne w środkach spożywczych i paszach pochodzenia roślinnego. Konieczność wyeliminowania mikotoksyn z łańcucha żywnościowego wymusza opracowanie strategii zarządzania i efektywnej kontroli jakości środków spożywczych i pasz, poprzez odpowiednie metody pobierania próbek, wykrywanie oraz opracowanie

metodologicznych oznaczeń ilościowych. Niemniej jednak, jest bardzo trudno określić dokładnie stopień (stężenie) zanieczyszczenia mikotoksynami w dużej ilości materiału roślinnego, z powodu nierównego ich rozproszczenia oraz dużej zmienności związanej z ogólną procedurą izolacji mikotoksyn. Używając nawet akceptowalnych toków postępowania wobec próbek, istnieją jednak zmienności związane z użytymi procedurami mielenia/mieszania/homogenizacji i ekstrakcji związku. Ponadto z racji wytwarzania silnego tła przez matrycę roślinną, co powoduje utrudnienia diagnostyczne wynikające ze zmienności jej budowy, może przyczyniać się do faktycznego maskowania obecności mikotoksyn. Z powodu tych zmienności, trudno jest określić ze 100% pewnością, faktyczne stężenia mikotoksyn w materiale roślinnym (Liu *et al.*, 2005). Mikotoksyny te często są w stanie przejść niepostrzeżenie przez konwencjonalne rutynowe metody wykrywania i wtedy dostają się do przetworzonych środków spożywczych lub spożywanych bezpośrednio. Przyjmując założenia, że proces ekstrakcji przy wykorzystaniu reakcji solwolizy do dalszej analizy przy użyciu techniki chromatografii gazowej wobec próbek, wykorzystując kwas trójfluorooctowy, powodował uwolnienie dodatkowo 58% deoksyniwalenolu i wzrost odzysku od 9 do 88%, to należy zweryfikować uzyskane wyniki w stosunku do wartości uzyskiwanych w sposób konwencjonalny (Zhou *et al.*, 2007). Te formy specyficznej interakcji wpływają na procesy sprzęgania lub maskowania mikotoksyn przez kowalentne łączenie z bardziej polarnymi molekułami, jak np. glukoza (Berthiller *et al.*, 2005). Sprzęganie mikotoksyn do glikozydów i glukuronidów jest fragmentem biosyntezy mającej miejsce w organizmie roślinnym, podczas której ma miejsce metabolizowanie/detoksykacja mikotoksyn (Engelhart *et al.*, 1988). Także zwierzęta są zdolne do tworzenia tego rodzaju koniugatów co zostało stwierdzone u świń w moczu i żółci (Corley *et al.*, 1985). W tej sytuacji transformacja stanowi metodę alternatywną dla procesów metabolicznych oraz nie jest przypisana dla konkretnych mikotoksyn lecz eksperymentalnie przy użyciu spektrometru cieczowo-masowego stwierdzono obecność zearalenonu-4- β -D-glukopiranozydu u świń po strawieniu materiału paszowego ale również jest obecny w naturalnie zanieczyszczonych próbkach pszenicy (Schneweis *et al.*, 2002). Ponadto, istotne jest to, że całkowite stężenie mikotoksyn obecnych w paszach jest niskie, poniżej norm. Te niskie wartości wywołują stany chroniczne, które są nieznanne z racji braku naukowych danych na ten temat. Mogą jednak powodować spadek aktywności układu immunologicznego i zmniejszenie odporności na choroby zakaźne (Richard *et al.*, 1978).

Obecność grzybów pleśniowych w środkach spożywczych i paszy powoduje określone zmiany organoleptyczne oraz zmiany wartości żywieniowej paszy i stwarza możliwości zatrucia. Skutki biologiczne, z racji obecności mikotoksyn, zależą od dawki i liczby mikotoksyn, czasu narażenia i wrażliwości zwierząt. Mikotoksyny mogą wywoływać specyficzne zmiany stanu zdrowotnego, co opisano poniżej, mogą wchodzić w jakąś formę interakcji (synergizm) w przypadku infestacji złożonej (Smith *et al.*, 1997), i/lub, oddziałują na status układu immunologicznego u zwierząt, przyczyniając się do wystąpienia chorób zakaźnych oraz powodować spadki efektów produkcyjnych u zwierząt gospodarskich. Ponadto, ewentualna obecność mikotoksyn w żywności pochodzenia zwierzęcego, może powodować określone efekty zdrowotne u ludzi spożywających tą żywność. Wydalanie mikotoksyn i ich metabolitów w mleku jest jedną z form pozbywania się tych substancji z organizmu zwierząt. Proces ten może być wynikiem przesączenia międzykomórkowego, biernej dyfuzji przez błony komórkowe lub aktywnego transportu przy udziale pęcherzyków wydzielniczych w komórkach. Aflatoksyna B₁ (AFB₁), ochratoksyna (OTA), zearalenon (ZEA) i ich metabolity a w szczególności aflatoksyna M₁ (AFM₁), stanowią określone ryzyko dla konsumentów z racji ich obecności w mleku. Maksymalne stężenie AFM₁ w mleku stwierdza się w dwa dni od pobrania aflatoksyn z paszą (Whitlow *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2002). Ci sami autorzy dokumentowali, że po czterech dniach od daty

zaprzestania podawania pasz z mikotoksynami nie stwierdza się w mleku obecności tych metabolitów. Przetawiony mechanizm transferu mikotoksyn nie wymaga przystosowywania się.

U świń podawanie pasz zanieczyszczonych w sposób naturalny deoksyniwalenolem (DON) powoduje określone stany kliniczne takie jak spadek żerności i spadek przyrostów m.c. podczas przyjmowania dawek mniejszych niż 2 mg/kg paszy (Rotter *et al.*, 1994; Trenholm *et al.*, 1984). Obecność DON-u w wartościach około 1.3 mg/kg paszy powoduje u tuczników spadek żerności z objawami odmowy przyjęcia paszy. Objaw całkowitej odmowy przyjmowania paszy ma miejsce w momencie obecności tej mikotoksyny w stężeniach wyższych niż 12 mg/kg paszy, a objawy wymiotów mają miejsce dopiero przy stężeniach wyższych niż 20 mg/kg paszy. Najczęstszymi objawami występującymi podczas zatrucia tą mikotoksyną są: spadek przyrostów, zmniejszenie apetytu, wymioty oraz uszkodzenia błony śluzowej przewodu pokarmowego. W sytuacji naturalnego zanieczyszczenia pasz mikotoksynami problem jest bardziej skomplikowany, co jest spowodowane obecnością z reguły kilku mikotoksyn w wartościach wywołujących stany chroniczne. Pasje zanieczyszczone ZEA są przyczyną rodzenia martwych płodów, śmiertelności u noworodków, mumifikacji płodów, rozkroczości poporodowej prosiąt, poronień, powtórek rui i innych nieprawidłowości (Diekman *et al.*, 1992). OTA doprowadza do istotnych zmian czynnościowych nerek u świń wraz z osłabieniem aktywności proksymalnej cewkowej części kanalików nerki, zmianą sposobu wydalania moczu oraz zwiększeniem udziału glukozy w moczu (CAST, 2003). OTA jest również w stanie zwiększyć wrażliwość zwierząt na czynniki zakaźne takie jak, *Salmonella cholerasuis*, *Serpulina hyodysenteriae* lub *Campylobacter coli* (Stoev *et al.*, 2000). Ogólnie rzecz biorąc można stwierdzić, że mikotoksyny są w stanie zwiększyć stopień wrażliwości na czynniki zakaźne, są przyczyną zmniejszenia żerności i spadku przyrostów masy ciała. Mikotoksyny, jako związki chemiczne o właściwościach immunosupresyjnych, mogą ułatwiać wnikanie do organizmu czynników chorobotwórczych, które stają się czynnikiem wnikającym stany chorobowe wywołane przez metabolity grzybów pleśniowych.

Opracowano trzy poziomy kontroli mikotoksyn (Jouany *et al.*, 2007); (i) pierwszy etap kontroli odbywa się jeszcze przed wykryciem porażenia grzybami pleśniowymi. Dlatego ocena wzrostu grzybów pleśniowych zawiera badania integralności ziarna z oceną możliwości dostępu grzybnicy do substancji odżywczych zawartych w ziarnie oraz kontrolę warunków środowiska. Dobra praktyka rolnicza może zostać zastosowana poprzez wprowadzenie płodozmianów, odpowiedniej uprawy ziemi, stosowania nawozów sztucznych, przestrzegania okresów wysiewu ziarna, stosowania fungicydów i roślinnych olejków eterycznych, nadzoru obecności owadów, gryzoni, chwastów, stosowania roślin GMO czy wprowadzenia konkurencyjnych szczepów grzybów pleśniowych nie toksynotwórczych. To nowe podejście zostało zaproponowane z momentem wyizolowania szczepów *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus*, nie produkujących aflatoksyn, które w sposób naturalny w drodze konkurencji mają wyeliminować szczepy toksynotwórcze (Cotty *et al.*, 1994). Szczepy te zajmują te same nisze ekologiczne, które wcześniej zajmowały szczepy toksynotwórcze i przez to zmniejszają stopień ryzyka zanieczyszczenia mikotoksynami. Model ten mógłby zostać wykorzystany do oceny stopnia ryzyka, jaki mógłby mieć miejsce; (ii) Podczas okresu zanieczyszczenia materiału roślinnego grzybami pleśniowymi jest możliwe rozpoczęcie produkcji mikotoksyn. W efekcie zsynchronizowanie żniw z fizjologicznym stanem roślin oraz technologią zbioru może mieć pierwszorzędny wpływ. Czyszczenie i zapobieganie kontaktowi z ziemią, poziom wilgoci przed i podczas magazynowania oraz temperatura materiału roślinnego i otoczenia są głównymi czynnikami decydującymi o rozwoju grzybów pleśniowych i syntezie mikotoksyn;

(iii) W końcu trzeci etap, polegający na doprowadzeniu do spadku stężenia mikotoksyn na podstawie oznaczenia stopnia zanieczyszczenia, jeżeli mieści się ono w granicach dopuszczalnych przez prawo. Stosowane są metody fizyczne takie jak czyszczenie ziarna przez mycie wodą lub węglanem sodu by zmniejszyć zanieczyszczenie kukurydzy mikotoksynami fuzaryjnymi, sortowanie ręczne zanieczyszczonych ziaren na podstawie zmian fizycznych ziarna lub w wyniku oceny fluorescencyjne. Inne techniki dezaktywacji mikotoksyn, to wysokie temperatury, promienie UV, promienie Rentgena, promieniowanie mikrofalowe lub wyekstrahowanie mikotoksyn rozpuszczalnikami (Scott, 1998). Suszenie jest podstawowym krokiem w procesie utrzymania suchej paszy, a warunki beztlenowe są niezbędne w przetwarzaniu paszy wilgotnej. Różne odczynniki chemiczne takie jak kwasy, zasady (amoniak, wodorotlenek sodu), oksydanty (nadtlenuk wodoru, ozon), czynniki redukujące (wodorosiarczyny), środki chlorowane i formaldehydy są używane by zdegradować mikotoksyny w paszach a szczególnie aflatoksyny. Ich stosowanie może stanowić dodatkową gwarancję, jeżeli jest wysokie ryzyko. W końcu stosując czynniki biologiczne można zastosować określone enzymy w celu pozbycia się mikotoksyn i wygenerowania wtórnych nietoksycznych metabolitów, (co nie zawsze jest możliwe). Tego rodzaju podejście ma rację bytu w przypadku zastosowania określonych mikroorganizmów do detoksykacji mikotoksyn (*Corynebacterium rubrum*) w zanieczyszczonych paszach lub do ich biotransformacji (*Rhizopus*, *Aspergillus*, *Eurotium*, Nakazato *et al.*, 1990). Jakkolwiek, te biologiczne procesy są ogólnie powolne i mało wydajne.

Jednakże ryzyko obecności mikotoksyn jest nieuniknione i brak jest praktycznych rozwiązań by całkowicie uniknąć zanieczyszczenia pasz mikotoksynami. Dlatego nieorganiczne materiały takie jak glinki, bentonity czy glinokrzemiany, znane ze swych właściwości adsorpcyjnych, były jako pierwsze stosowane w celu redukcji właściwości toksycznych aflatoksyn (Grant i Phillips, 1998). Te nieorganiczne materiały (uwodniony glinokrzemian sodowo wapniowy [HSCAS], montmorylonity, zeolity, cholestyramina) wykazały ograniczoną skuteczność przeciw innym mikotoksynom. Ponadto zmniejszyły aktywność biologiczną wielu substancji odżywczych i mogą zawierać dioksyny czy metale ciężkie. W efekcie mogą one wywoływać odwrotny efekt żywieniowy z racji dużego udziału w diecie oraz interakcji z niektórymi mikroelementami i witaminami. Niektóre z tych lepszycy nie ulegają biodegradacji i mogą wpływać na retencję użytych środków terapeutycznych. Stosowane glinki są przyczyną zmniejszenia przyczepności do podłoża, powiększając ryzyko wypadków zwierząt jak i ludzi obsługi. Wybrane szczepy bakterii kwasu mlekowego, propionibakterie oraz bifidobakterie mają taką strukturę ściany bakteryjnej, która może wiązać mikotoksyny (Ahokas *et al.*, 1998) i ograniczać ich biodostępność, w organizmie zwierząt. W efekcie mikotoksyny są wydalane z kałem. Organiczny materiał, jakim są ściany drożdży (Devegowda *et al.*, 1998) może być zaproponowany, jako alternatywne rozwiązanie problemów związanych z mikotoksynami w świetle przewodu pokarmowego bez obniżenia właściwości odżywczych pozostałych składników pokarmowych lub niekorzystnego wpływu na środowisko. Ich skuteczność jest związana z dużą powierzchnią działania. To jest bardzo ważne dla zrozumienia procesów biodegradacji mikotoksyn, czyli uwolnienia się organizmu od metabolitów. Istotniejsze, niż proste połączenia, było określenie bazowej interakcji kinetycznej zależnie od pojemności całkowitej, standaryzowanego tempa powinowactwa i oceny stereochemicznej. Te modele są wymagane w celu uzasadnienia roli ściany komórek drożdży w procesie detoksykacji materiału paszowego.

Materiały i metody

Produkcja biomasy drożdżowej. Cztery szczepy *S. cerevisiae* były oceniane: typowy szczep dziki *wt292*, mutant typu *fks1*, mutant typu *mnn9* i *sc1026* (Alltech, Inc., KY, USA). Zostały wyhodowane w medium YPD (1% (w/v) wyciąg drożdży, 2% (w/v) pepton bakteriologiczny i 2% (w/v) glukozę) w 30°C, wstrząsany w 200 rpm. Wzrost tych kultur został zatrzymany przy 2×10^7 komórek/ml.

Izolowanie ścian komórek i ich charakterystyka. Ściany komórki zostały porozrywane szklanymi paciorkami a następnie odizolowane (Marudzi *al et.*, 1998). Kwantyfikacja mannanów i glukanów została osiągnięta podczas hydrolizy 2 N H₂SO₄ o 100°C w ciągu 4 h. Przy użyciu metody enzymatycznej została określona zawartość chityn (Popolo *et al.*, 1997), stosunek mannanów/glukanów, który wynosił 1.25, 2.09, 2.18 i 0.21 w ścianach komórek *wt292*, *fks1*, *sc1026* i *mnn9*, odpowiednio. Szczepy *wt292* i *mnn9* miały wysoką zawartość β-D-glukanów, odpowiednio średnio 45 i 75%, natomiast zawartość całkowitych ścian komórkowych w szczepach *fks1* i *sc1026* wyniosła ~ 30%. Zarówno szczepy *mnn9* i *fks1* wykazały wysokie zawartości chityn 9.7 i 5.8 %, odpowiednio, w porównaniu do ~ 2% dla *wt292* i *sc1026*.

Alkaliczna ekstrakcja węglowodanów ze ściany komórek drożdży. Ściany komórki *S. cerevisiae* frakcjonowano wstrząsając podczas alkalicznej ekstrakcji w roztworze zawierającym 1M NaOH i 0.5 % NaBH₄ podczas 24 h w temperaturze 37°C, metodą opisaną przez Flota (1991) i Catley (1988). Zawiesina została odwirowana (10,000 g przez 5 min) a supernatant i frakcja stała zostały zebrane. Supernatant został dializowany (1:10 0, v/v) na błonach celulozo-esterowych (MWCO: 6 do 8,000) w roztworze o pH 7.4 zawierającym 0.02 M Tris/HCl przez 16 h w 4°C z użyciem mieszadła magnetycznego. β-D-glukan, który został oddzielony od mannanów używając kolumn sefarozowych z konkwaliną, został eluowany w roztworze o pH 7.4 zawierającym 0.02 M Tris/HCl i 0.5 M NaCl oraz być przechowywany w -20°C do momentu wykorzystania. Peletki z kolei zostały dokładnie umyte przy użyciu roztworu zawierającym 1 ml 75% etanolu/buforu 10 mM Hepes o pH 7.1 zawieszono w roztworze o pH 8.5 zawierającym 2 ml 0.1 M Tris/HCl i przechowywano w temp. -20°C do momentu użycia.

Ilościowa analiza węglowodanów ściany komórkowej. Analizy zostały wykonane trzykrotnie przy użyciu systemu Dionex Bio - LC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) z impulsowym detektorem amperometrycznym zaopatrzonym w złotą elektrodę. Oddzielenie węglowodanów zostało wykonane na CarboPac PA1 anionowo-wymiennej kolumnie (4 x 250 mm) zaopatrzonej w prekolumnę. Wymywanie zostało wykonane przy pomocy 18 mM NaOH w 1 ml/min w temperaturze 20-22°C.

Oznaczanie mikotoksyn. Mikotoksyny zostały oznaczane z zastosowaniem izokratycznego HPLC HP -1090 Serii II HPLC (Hewlett - Packard Co.) z detektorem UV połączonym z detektorem fluorescencji typu HP -1046A (Ex. = 280 nm; Em. = 460 nm). Zastosowano kolumnę C18 i do C8 Nucleosil Spherisorb ODS-2 (4 x 150 mm) z prekolumną przy przepływie 0.8 ml/min.

Oszacowanie pojemności mikotoksynowej ścian komórek drożdży w badaniach in vitro. Do wszystkich próbek *in vitro* wprowadzono adsorbent w ilości 100 µg/ml do próbek, w których umieszczano mikotoksyny w dawce 2, 4, 6, 8, 10 lub 20 µg/ml rozpuszczone w wodzie i wstrząsane w 200 rpm. podczas 1.5 h w temperaturze 37°C, po wcześniejszym odwirowaniu przy 5,000g. Ilość przechwyconych mikotoksyn była określana przez odejmowanie ilości mikotoksyny znajdującej w supernatancie z próbek doświadczalnych od ilości stwierdzanej w próbkach kontrolnych bez adsorbenta. Oprogramowanie DataFit

7.1 (© Oakdale) zostało wykorzystane do przedstawienia graficznego wyników doświadczenia, konfigurując regresję krzywoliniową (dopasowywanie do krzywej) i obliczanie danych statystycznych (Yiannikouris *et al.*, 2003).

Dyfrakcyjny szerokokątny obraz rentgenowski β -D-glukanów. Laminaryna, jest to rozpuszczalny w wodzie, o liniowym charakterze jednołańcuchowy (1 \rightarrow 3)- β -D-glukan z krótkim łańcuchem bocznym (1 \rightarrow 6)- β -D-glukanem, wyekstrahowany z *Laminaria digitata* i kurdlan, nierozpuszczalny jednołańcuchowy (1 \rightarrow 3)- β -D-glukan wyekstrahowany z *Alcaligenes faecalis*, został zbadany przy użyciu promieni Rentgena w ich pół-krystalicznej formie i w formie uwodnionej (Yiannikouris *et al.*, 2004d). Sypka laminaryna i kurdlan zostały uwodnione przez rozpuszczenie w BaCl₂ ($a_w = 0.9$ w temperaturze 25°C, podczas od 5 do 8 dni) aż równowaga mokrej masy próbki została osiągnięta. Zostały wykonane pomiary dyfrakcji promieniami Rentgena używając wyposażenie typu Inel X-ray G 3,000 (Nuessli *et al.*, 2003).

Wykorzystanie technik molekularnych. Modelowanie molekularne było wykonane przy użyciu programu komputerowego typu Silicon Graphics z pakietem Accelrys (Accelrys, Inc, San Diego, CA, USA) i InsightII, Biopolymer, Analysis, Docking oraz przy użyciu modułu Discover. Do badań porównawczych ligandu polisacharydowego przystosowano pole siłowe CFF91 w warunkach próżniowych ($\epsilon=1$). Konstrukcja najbardziej wysoce prawdopodobnych zgodności dla łańcucha (1 \rightarrow 3)- β -D-glukanu została wykonana zgodnie z opisem w poprzedniej pracy (Yiannikouris *et al.*, 2004d). Wartości dwuściennych kątów $[\varphi, \psi]$ i $[\varphi, \psi, \omega]$ dla połączeń (1 \rightarrow 3)- i (1 \rightarrow 6)- β - pomiędzy dwoma glukozami zostały zbadane wykorzystując ich rotacje (od -180° do +180°) a ich minimalne struktury energii oceniane były przed ich elongacją do 5,868 Da, czyli polimeru porównywalnego do cząsteczki laminaryny.

Badania przy użyciu Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (Nuclear Magnetic Resonance - NMR) zależności pomiędzy ZEA i czystymi β -D-glukanami. Pięćdziesiąt $\mu\text{g/ml}$ związków było dodawanych do 10 ml Milli-Q^{uf+} wody, wstrząsano przy rpm = 640 podczas 1.5 h przy 39°C i następnie ochładzano w kąpeli 2-propanolu i przetrzymywano w temperaturze -30°C wysuszając przed zamrożeniem. Proszek zawierający kompleks [laminaryna + ZEA] był rozpuszczany w 500 ml DMSO-*d*₆ do momentu uzyskania stężenia 1 mg/ml dla obu cząsteczek. Pomiary NMR zostały wykonane w spektrometrze typu Bruker Avance 400 (300 K). Widmo ¹H NMR dla kompleksu [laminaryna + ZEA] zostało zarejestrowane i porównane z widmami każdego ze składników kompleksu w tych samych warunkach (Yiannikouris *et al.*, 2004d).

Techniki molekularne a interakcje pomiędzy mikotoksynami a β -D-glukanami. Cząsteczki ZEA, AFB₁, DON i PAT (patulina) zostały rozrysowane przy użyciu NMR i promieni rentgena oraz z wykorzystaniem danych z prac Panneerselvam *et al.*, 1996 i Cordier *et al.*, 1990 (Figura 1). Kompleks [ZEA + β -D-glukany] sformowano poprzez ręczne osadzenie cząsteczek mikotoksyn w miejscach udostępnionych przez polimer (1³)- β -D-glukanu. Translacja rotacji dodatkowo jak również w dół i w górę podczas osadzania mikotoksyn w β -D-glukanie została zarchiwizowana w celu znalezienia wszystkich możliwych ustawień przestrzennych interakcji w ciągu 10,000 iteracji (kolejnych wykonanych pętli) zminimalizowanych procedur (Yiannikouris *et al.*, 2004d).

Wyniki i Dyskusja

Zbadano chemiczne mechanizmy zaangażowane w aktywność sekwestracji komponentów ścian komórek *Saccharomyces cerevisiae* z kilkoma głównymi mikotoksynami. Podczas badań *in vitro* porównano ściany komórkowe drożdży różnego pochodzenia pod względem zawartości glukanu, mannanu czy chityny. Ocena powinowactwa została określona przy użyciu równania Hilla i submodelu określającego sposób przebiegu interakcji pomiędzy poziomem mikotoksyn obecnych w pożywce a poziomem mikotoksyn sekwestrowanych. Krzywe przedstawiające, w sposób graficzny, ilościowy stosunek mikotoksyn przechwyconych do mikotoksyn podawanych zostały opracowane zgodnie z równaniem Hilla przy n miejscach podanych do równania (1) w Tabeli 1, z $R^2=0.993$ (Yiannikouris *et al.*, 2003). Równanie (1) zostało wykorzystane do opracowania dwóch submodeli: (i) w równaniu (2) wzięto pod uwagę całkowitą wartość β -D-glukanów w ścianach komórkowych zdolnych adsorbować ZEA (Yiannikouris *et al.*, 2004a); (ii) w równaniu (3) wzięto pod uwagę ilość i właściwości rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w zasadach β -D-glukanów biorących udział w procesach adsorpcji (Yiannikouris *et al.*, 2004b). Każde równanie prowadziło do określenia tempa powinowactwa A (4) wobec obydwu form rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych glukanów dodawanych do takich samych stężeń glukozy. Została wykazana korelacja między ilością β -D-glukanów obecnych w ścianach komórek a skutecznością tworzenia kompleksów ($R^2 = 0.889$; RSD = 0.534 $\mu\text{g/mL}$; $A \approx 30\%$). Ściany komórkowe pochodzące od szczepów *wt292* i *mnn9* zawierały wyższy poziom β -D-glukanów i wykazywały większe powinowactwo do tworzenia większych kompleksów ilościowych z ZEA niż szczepy, *fks1* i *sc1026*. Wyższe wartości chityny w szczepach *mnn9* i *fks1* są wynikiem zwiększonej ilości nierozpuszczalnych β -D-glukanów, mniejszej elastyczności ogólnej struktury, co spowodowało spadek w dostępie ZEA do miejsc chemicznie aktywnych w β -D-glukanach. W ten sposób przedstawione szczepy wykazały się mniejszą zdolnością tworzenia kompleksu niż można było oczekiwać z obecności β -D-glukanów (Yiannikouris *et al.*, 2004a).

Fracje nierozpuszczalne w roztworze alkalicznym miały większe powinowactwo dla adsorpcji ZEA (do 50%) aniżeli frakcje rozpuszczalne (około 16%). Uzyskiwane wyniki poszczególnych frakcji oraz wartości uzyskane z proponowanego równania (3) ($R^2 = 0.969$; RSD = 0.296 $\mu\text{g/ml}$) sugerują, że szczepy *mnn9* i *wt292* (odpowiednio $A = 50.4$ i 35.9% dla frakcji nierozpuszczalnych w zasadach) miały najwyższą skuteczność adsorpcji ZEA (Fig. 2). Eliminacja, choć w części, chityn uzyskiwanych podczas alkalicznej ekstrakcji ze ścian komórek drożdży poprawiła półtorakrotnie pojemność (wydajność) frakcji β -D-glukanów nierozpuszczalnych w zasadach a pochodzących ze szczepu *mnn9* będących adsorbentem ZEA w porównaniu ze szczepem *wt292* (Yiannikouris *et al.*, 2004b).

Korelacja pomiędzy ilością β -D-glukanów w ścianach komórek a powstałych kompleksów została przedstawiona dla AFB₁, DON, PAT i w mniejszym zakresie wobec OTA (wartości R^2 pomiędzy 0.980 i 1.000 oraz RSD poniżej 0.855 $\mu\text{g/ml}$) (Tabela 2). Dla wszystkich tych mikotoksyn, ściany komórkowe szczepów drożdży *wt292* i *mnn9* z większym udziałem β -D-glukanów są skuteczniejszym kompleksem dla większej liczby mikotoksyn o wyższym powinowactwie niż szczepy *fks1* i *sc1026*. Z kolei wyższa zawartość chityn w szczepach *mnn9* i *fks1* powoduje spadek rozpuszczalności β -D-glukanów, zmniejszenie elastyczności ogólnej struktury i to powoduje zmniejszenie chemisorpcji β -D-glukanów. W ten sposób udokumentowano, że badane szczepy drożdży wykazały się mniejszą zdolnością tworzenia kompleksów niż to można byłoby sądzić z zawartości β -D-glukanów (Yiannikouris *et al.*, 2004a). Różnice pomiędzy mikotoksynami zostały również zarejestrowane i można je przypisać różnicom stereochemicznym, ładunku elektrycznego, rozpuszczalności, natury i wielkości zróżnicowania pomiędzy poszczególnymi mikotoksynami (Fig. 1). Ich

powinowactwo dla wiążących miejsc w strukturach 3D obecne w β -D-glukanach jest różne i mieści się w zakresie od 95.0 do 12.2% co powoduje określone ich uszeregowanie: AFB₁ > DON > ZEA > PAT > OTA. Inne badania dowodzą o znacznej skuteczności w unieczynnianiu toksyny T-2 i inny endofitycznych toksyn. Ekstrakcje glukanów z nieuszkodzonych ścian komórek drożdży towarzyszyło zwiększenie potencjału detoksykacji mikotoksyn. Występujące różnice zależały od struktury ekstrahowanych frakcji oraz udziału frakcji glukanów rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych. Struktura glukanów występujących w szczepach *mnn9* i *wt292* była najbardziej skuteczna w wyłapywaniu ZEA ($R^2 = 0.969$; RSD = 0.296 $\mu\text{g/ml}$, Fig. 2). Z kolei eliminacja części chityn podczas pozyskiwania ścian komórkowych drożdży poprawia skuteczność aktywności sekwestracyjnej o 150% (Yiannikouris *et al.*, 2004b).

Mechanizm kształtowania kompleksów

Potwierdzenie chemicznej interakcji pomiędzy mikotoksynami a sekwestrantami udowodniono wykorzystując badania nad przebiegiem procesów molekularnych, ponieważ powinowactwo zależało nie tylko od ilości β -D-glukanów obecnych w ścianach komórek drożdży, ale również od ich budowy i współzależności strukturalnych określonych przez pojedynczą i/lub potrójną helisą. β -D-glukany są określane jako struktury potrójne o ściśle upakowanej helisie z naprzemiennie istniejącymi regionami tzw. przypadkowej spirali pojedynczych helis i potrójnych helis (Kogan, 2000). Uzyskane wyniki są kompatybilne z wartościami otrzymanymi wcześniej oraz odnoszą się do budowy ściany błony komórkowej drożdży. Z kolei fakt nierozpuszczalności β -D-glukanów w środowisku alkalicznym pełni bezpośrednią rolę w utrzymywaniu sztywności i integralności ścian błony komórkowej drożdży. W przeciwieństwie do glukanów nierozpuszczalnych w środowisku alkalicznym, glukany rozpuszczalne w zasadach mają ściany bardziej elastyczne (Fleet, 1991). Przy użyciu dyfrakcyjnego szerokokątowego obrazu rentgenowskiego opisano budowę przestrzenną kurdlanu jako (1 \rightarrow 3)- β -D-glukan i zaliczono do klastrów zbudowanych z czterech łańcuchów o potrójnych helisach (Chuah *et al.*, 1983). Łańcuchy te mają upakowane helisy o skoku wynoszącym 1.56 nm oraz o odcinkach gdzie skok ten wynosił 0.60 nm co w efekcie powoduje określenie ich jako elementów sześć β -D-glukopiranozanu w wyniku skręcenia helisy. Organizacja przestrzenna została oceniona przy użyciu pomiaru kąta dyfrakcji wynoszącego 2Q oraz siateczkowej odległości (*di*) i to wszystko zostało porównane do dobrze znanego paramylonu wyekstrahowanego z *Poria cocos* i innych nierozpuszczalnych molekuł (1 \rightarrow 3)- β -D-glukanu, które miały niższe wartości *di* niż maksymalne wartości *di* uzyskiwane z kurdlanu i wynosiły odpowiednio 1.36 (Chuah *et al.*, 1983) i 1.50 nm. W konsekwencji wykazano, że kurdlan powoduje silniejsze rozluźnienie struktur potrójnej helisy w porównaniu z paramylonem (Marchessault i Deslandes, 1979). W związku z tym, że stwierdzone zwiększenie odstępów do wartości 1.62 uzyskane dla laminaryny w obu poziomach postawionotezę, że laminaryna jest zbudowana z luźno upakowanych potrójnych i/lub pojedynczych helis. Uzupełniające się badania jądrowego rezonansu magnetycznego i obrazu rentgenowskiego (Chuah *et al.*, 1983), zostały wykorzystane do oszacowania całkowitej stabilności modelowanych cząsteczek o strukturze najbardziej stabilnej, co pozwoliło na opracowanie statystycznego prawdopodobieństwa każdej konformacji. Te łańcuchy helikalne zostały określone przez wykorzystanie elementów sześć β -D-glukopiranozanu w wyniku skręcenia helisy. Eksperymenty wielkocząsteczkowe wykonane *in vitro* oraz badania NMR udowodniły (Yiannikouris *et al.*, 2003; 2004a-d), że warunki środowiskowe takie jak pH i naturalne rozpuszczalniki mogą zmniejszyć stabilność geometryczną β -D-glukanów, a przez to zmniejsza się ich zdolność do tworzenia kompleksów z mikotoksynami. Czynniki te wpływają na rozluźnienie ich struktur i przyczyniają się do

powstawania form o strukturze pojedynczej helisy, co zależy od warunków otoczenia, prowadząc do dynamicznego zachowania β -D-glukanów. W ten sposób, środowiskowe warunki takie jak pH i naturalne rozpuszczalniki mogą zmniejszać stabilność oraz zmieniać geometrię β -D-glukanów (Yiannikouris *et al.*, 2004c).

Specyficzną interakcję pomiędzy mikotoksynami a sekwestrantem zbadano przy użyciu modelowania molekularnego *in silico*. Cząsteczki ZEA, AFB₁, DON i PAT zostały zbudowane przy użyciu NMR i dyfrakcji rentgenowskiej (Panneerselvam *et al.*, 1996; Cordier *et al.*, 1990; Marchessault and Deslandes, 1979). Kompleks [ZEA + β -D-glukan] został stworzony przez ręczne pozycjonowanie cząsteczek mikotoksyn we wszelkich możliwych miejscach oferowanych przez polimer (1 \rightarrow 3)- β -D-glukanu (Yiannikouris *et al.*, 2004d). Konsekwencją tego było wyprodukowanie *in silico* kilku modeli cząsteczek mikotoksyn uwieczonych wewnątrz ukształtowanych struktur helikalnych (1 \rightarrow 3)- β -D-glukanów, które były mocno stabilizowane przez odgałęzienia łańcucha (1 \rightarrow 6)- β -D-glukanu.

Wnioski

Podstawą badań była potrzeba uzupełniania i wspomaganie z pełnym zrozumieniem dróg postępu w żywieniu, co jest potrzebne do wdrożenia naszego rozumowania o korzystnej roli ścian komórek *Saccharomyces cerevisiae* w ograniczeniu toksycznego wpływu mikotoksyn. Plastyczność struktury β -D-glukanów wykazujących się różną stereochemią jest niewątpliwie podstawową przyczyną dużej ich skuteczności wobec mikotoksyn. Duża zmienność współczynnika powinowactwa wśród mikotoksyn jest wynikiem ich różnic strukturalnych i fizyko-chemicznych. Niemniej jednak sugerujemy, że β -D-glukany mają duże powinowactwo do mikotoksyn wykazujących się podobieństwem strukturalnym i fizyko-chemicznym do aflatoksyn, deoksyniwalenolu i zearalenonu i mogą stanowić substancję kluczową w pomniejszaniu ryzyka obecności mikotoksyn. Zastosowanie materiału organicznego pochodzącego ze ścian komórek drożdży, jakim jest Mycosorb® (Alltech Inc.) mogłoby pomóc w procesie sekwestrowania mikotoksyn w przewodzie pokarmowym i łagodzenie ich szkodliwego wpływu na zwierzęta. Ponadto, biorąc pod uwagę ich strukturalną konformację można stwierdzić, że glukany nie włączają się w procesy interakcji ze składnikami żywieniowymi. W końcu, jako materiały organiczne, są bezpieczne dla środowiska, ponieważ są biodegradowalne po wydaleniu przez zwierzęta.

Tabela 1. Modele określające i oceniające stopień adsorpcji ZEA przez β -D-glukany obecne w ścianie komórkowej *S. cerevisiae*, według równania Hilla

Wyrażenie modelu:

$$T_{bound} = f(T_{added})$$

Równanie Hilla
z n niewiadomymi (1)

$$T_{bound} = [T_{bound}^{MAX} \cdot (T_{added})^n] / [KD + (T_{added})^n]$$

Równanie Hilla
z n niewiadomymi
biorąc pod uwagę ilość
 β -D-glukanów (2)

$$T_{bound} = (Glucans \times T_{bound}^{MAX} \cdot (T_{added})^n) / ((Glucans \times KD) + (T_{added})^n)$$

Równanie Hilla
z n niewiadomymi
biorąc pod uwagę ilość
rozpuszczalnych
i nierozpuszczalnych w
zasadach β -D-glukanów
(3)

$$T_{bound} = \alpha \cdot [T_{bound}^{MAX} \cdot (T_{added})^n] / [\alpha \cdot KD + (T_{added})^n]$$

$$i \quad \alpha = (S_{ol} + a \cdot I_{nsol}) \cdot \beta - D - glucans$$

Tempo powinowactwa,
w procentach (4)

$$A = T_{bound}^{MAX} / 2 \cdot \sqrt[2]{KD}$$

^a a = zmienna wartość odróżniająca rolę spełnianą przez β -D-glukany nierozpuszczalne w zasadach w porównaniu z rozpuszczalnymi w zasadach; I_{nsol} = ilość β -D-glukanów nierozpuszczalnych w zasadach (%); S_{ol} = ilość β -D-glukanów rozpuszczalnych w zasadach (%); KD = stała asocjacji w porównaniu z ilością toksyn początkowo dodanych; T_{bound} = ilość związanych toksyn ($\mu\text{g/ml}$); T_{added} = ilość toksyn dodanych ($\mu\text{g/mlm}$); T_{bound}^{max} = maksymalna ilość związanej toksyny ($\mu\text{g/ml}$).

Tabela 2. Ocena biologicznych wskaźników sekwestracji AFB₁, PAT, DON, OTA i ZEA używając współczynnika Hilla łączącego sumę rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych frakcji β -D-glukanów pozyskanych z czterech szczepów *S. cerevisiae*

	<i>Szczep</i>	AFB ₁	PAT	DON	OTA	ZEA
Powinowactwo (%)	<i>wt292</i>	95.0	26.7	94.8	13.6	35.9
	<i>fks1</i>	37.7	26.4	50.5	12.2	17.4
	<i>sc1026</i>	45.0	26.9	64.4	12.4	22.2
	<i>mnn9</i>	72.5	37.0	84.0	13.9	50.4
R^2 (HMN)	<i>wt292</i>	1.000	0.995	0.999	0.989	0.948
	<i>fks1</i>	0.995	0.995	0.999	0.994	0.980
	<i>sc1026</i>	1.000	0.999	0.998	0.980	0.955
	<i>mnn9</i>	0.999	0.994	0.999	0.997	0.991

R^2 = Współczynnik determinacji; HMN = model równania Hilla z n niewiadomymi

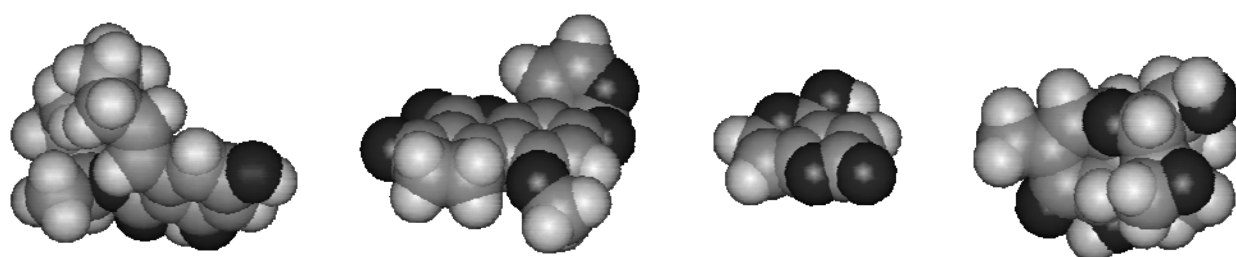


Figura 1. Komputerowo generowane obrazy procesu konformacji podczas minimalizacji energii cząsteczek ZEA, AFB₁, PAT i DON.

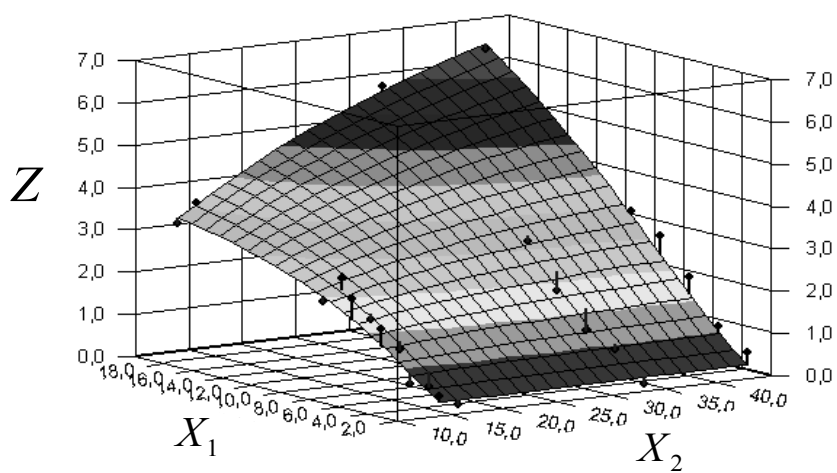


Figura 2. Graficzna prezentacja relacji pomiędzy zawartością β -D-glukanu i sekwestrowanego ZEA. X_1 = suma całkowitego ZEA dodana do medium ($\mu\text{g/ml}$); X_2 = zawartość β -D-glukanu

w ścianach komórek czterech szczepów testowanych (%); Z = ilość ZEA sekwestrowana przez ściany komórek drożdży ($\mu\text{g/ml}$).

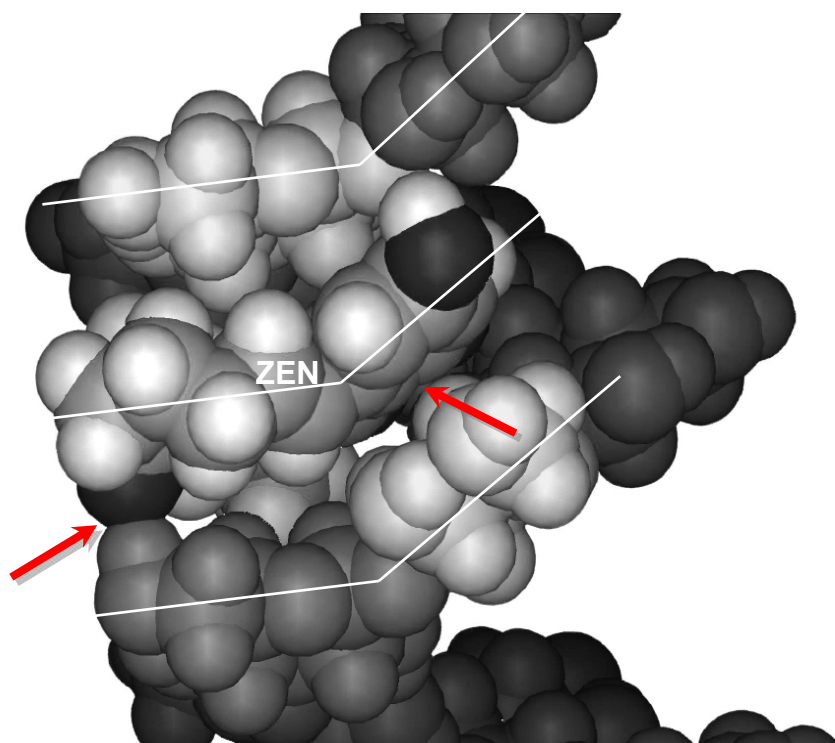


Figura 3. Komputerowo generowany obraz osadzania ZEA do pojedynczego łańcucha helisy (1→3)-β-D-glukanu. Strzałki wskazują wiązania wodoru biorącego udział w interakcji. Linie podświetlające to uzupełniający geometryczny efekt przestrzenny między ZEA a (1→3)-β-D-glukanem

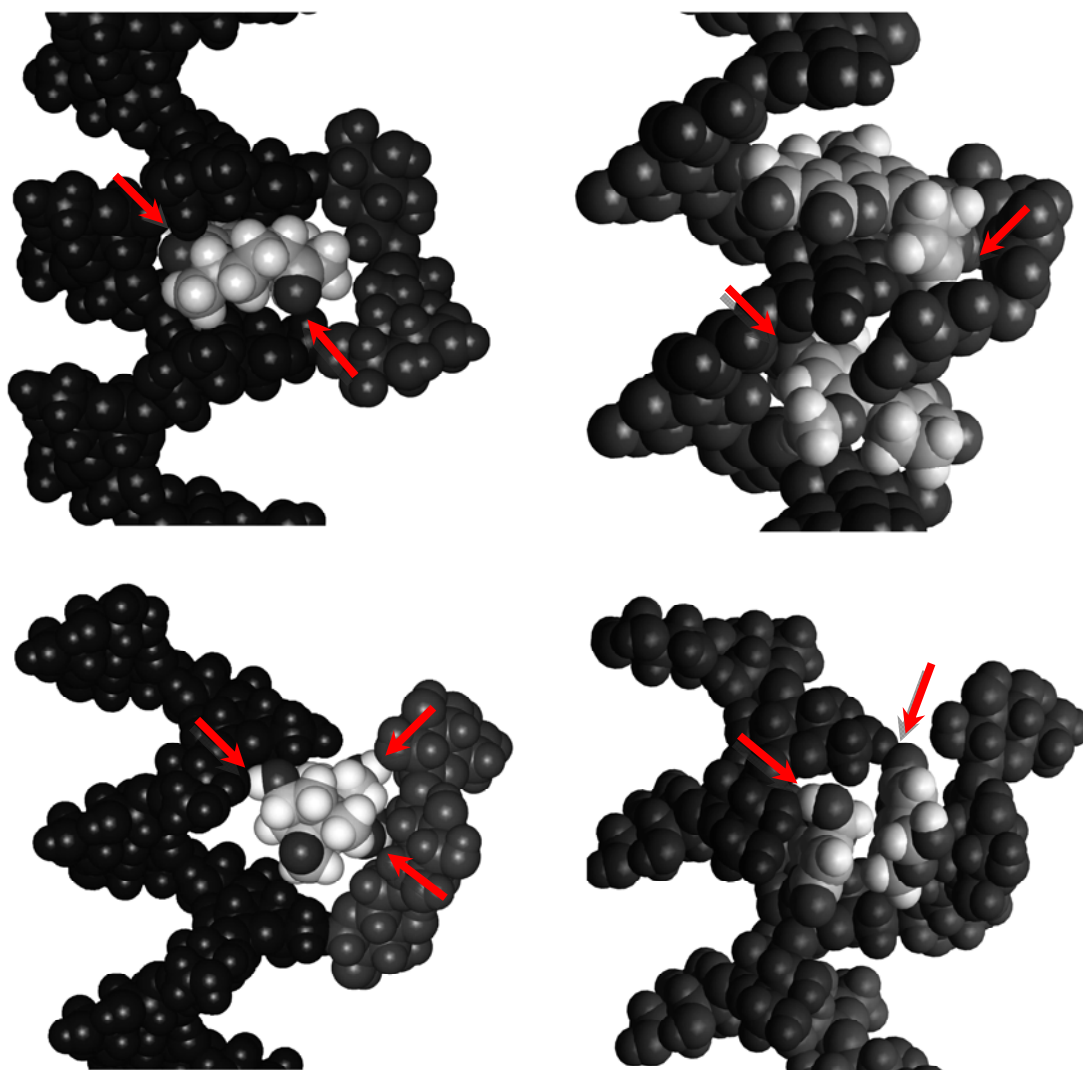


Figura 4. Komputerowo generowany obraz osadzania ZEA (część górna fig. po lewej), AFB₁ (część górna fig. po prawej), DON (część dolna fig. po lewej) i PAT (część dolna fig. po prawej) do łańcucha pojedynczej helisy (1→3)-β-D-glukanu z odgałęzieniem (1→6)-β-D-glukanu. Strzałki wskazują wiązania wodoru biorącego udział w interakcji

Piśmiennictwo w redakcji.