Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

Četvrti simpozijum o mikotoksinima, Sarajevo, 14 juni 1991

Ožegović, Ladislav (urednik)

1996.

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/handle/123456789/824

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

SPECIJALNA IZDANJA
VOL. CIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Vol. 17

ČETVRTI SIMPOZIJUM O MIKOTOKSINIMA

(Sarajevo, 14 Juni 1991)

Redakcioni odbor
Seid Huković, Ladislav Ožegović, Džemal Rezaković

Glavni urednik
Ladislav Ožegović
Redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO 1996

UPOREĐIVANJE DVA RAZLIČITA POSTUPKA EKSTRAKCIJE T-2 TOKSINA IZ TEČNE FERMENTACIONE PODLOGE UPOTREBLJENE ZA KULTIVACIJU TOKSIKOGENIH FUSARIA

ALEKSANDRA BOČAROV-STANČIĆ, P. RADOŠEVIĆ I J. BOŽO

Tehnološki institut "Servo Mihalj", Zrenjanin
Vojnomedicinska akademija, Beograd

Apstrakt. Pet toksinogenih sojeva *Fus. sporotrichioides* uzgajano je na polusintetskoj tekućoj podlozi APYA (50 g/l saharoze, 1 g/l peptona, 1 g/l autolizata kvasca tri dana na temperaturi od 28°C, na rotirajućoj mućkalici (220 obrtaja/minut). T-2 toksin je ekstrahiran iz fermentativne podloge na dva načina: (1) pomoću etilacetata i (2) pomoću uglja. U ovom slučaju ugalj u prahu je stalno mešan sa filtratom kulture, filtriran, ispran dejoniziranom vodom i tada potopljen u etanolu.

U svim slučajevima dobivene su veće količine T-2 toksina istim sojem plesni upotrebom organskog otapala (etilacetata), ali je ekstrakcija sa ugljem u prahu davala čistije pripravke T-2 toksina.

U V O D

U naučnoj literaturi je opisan veći broj postupaka za proizvodnju T-2 toksina u čistoj kulturi. Jedan od najčešće korišćenih je kultivacija toksikogenih izolata *Fusarium spp.* na vlažnom sterilisanom zrnu žitarica. Mada se na ovaj način mogu postići visoki prinosi T-2 toksina, proces je dugotrajan (4-6 nedelja), zahteva nisku temperaturu (8-12°C) (Smalley i Strong, 1974; Joffe i Yagen, 1977) i prečišćavanje toksina je dosta komplikovano usled prisustva većeg broja interferirajućih supstanci. Fermentacija u sintetičkim ili polusintetičkim podlogama (Gregory i sar., 1952; Ueno i sar., 1973) ima veći broj prednosti: kraću kultivaciju (do 5 dana), višu temperaturu (25-28°C), prisustvo pratećih materija u mnogo manjem obimu i mogućnost preciznijeg definisanja faktora koji mogu uticati na prinos ovog trihotecena (aeracija npr.).

Međutim, čistoća preparata T-2 toksina ne zavisi samo od uslova kultivacije mikroorganizma producenta već u velikoj meri i od primenjenog postupka ekstrakcije.

Shodno tome, cilj ovog rada je bio poređenje dve metode ekstrakcije T-2 toksina iz prefermentisane proizvodne podloge: 1) organskim rastvaračem, tj. etilacetatom i 2) aktivnim ugljem kao specifičnim adsorbensom.

MATERIJAL I METODE

Mikroorganizmi

U ovom istraživanju je upotrebljeno 5 izolata *Fusarium sporotrichioides*: ITM-391 (leg. A. Bottalico), ITM-496 (leg. A. Bottalico), M-1-1 (leg. Y. Ueno), KF-38/1 (leg. Y. Chelkowski) i R-2301 (leg. Y. Bauer), dobijenih ljubaznošću prof. dr M. Muntañola-Cvetković. Kod ovih kultura je već prethodno bilo dokazano da posjeduju sposobnost biosinteze T-2 toksina pri kultivaciji na čvrstim prirodnim podlogama (Bočarov-Stančić i sar., 1986, a i Bočarov-Stančić i Muntañola-Cvetković, 1988), kao i pri submerznoj kultivaciji (Ueno i sar., 1975; Bočarov-Stančić i Muntañola-Cvetković, 1988). Štok kulture organizama su čuvane na krompir-saharoznom agaru (KSA) na 4°C i subkultivisane su na istoj podlozi tokom 7 dana na 28°C.

Podloga

Tečna podloga (SPAK) sa 50 g/l saharoze (Merck), 1 g/l peptona-1 (Torlak) i 1 g/l autolizata kvasca-NAV (Ohly Gmbh) (pH 6,0) je korišćena za biosintezu T-2 toksina.

Uslovi kultivacije

Erlenmajer tikvice od 500 ml sa 250 ml podloge su sterilisane tokom 25 minuta na 120°C. Količina inokuluma je iznosila 5% v/v. Kultivacija je obavljena tokom 3 dana na 28°C i rotacionoj mućkalici (220 o/min.). Broj ponavljanja je iznosio tri.

Analize

Biomasa mikroorganizama je odvojena od prefermentisane podloge filtriranjem kroz Filtrak 388 filter papir. Suva težina micelije je determinisana sušenjem do konstantne težine na 105°C i meren je pH. Sirovi toksin je izolovan: 1) ekstrakcijom iz 100 ml filtrata pomoću etilacetata (3 x 50 ml) u levkovima za odvajanje i 2) ekstrakcijom iz 100 ml filtrata pomoću 1 g aktivnog uglja (Merck) (Ueno i sar., 1975). U poslednjem slučaju, nakon jednog sata mućkanja na 28°C i 220 o/min., ugalj je odvojen filtriranjem na vakuumu kroz Filtrak 388 i ispran sa 20 ml destilovane vode. Aktivni ugalj sa adsorbovanim T-2 toksinom je zatim potopljen

tokom noći u 20 ml metanola, profiltriran i još jednom ispran sa 10 ml metanola tokom jednog sata uz stalno mešanje, pa su obe metanolske frakcije na kraju objedinjene. Sirovi T-2 toksin je uparen do suva, rastvoren u 1000 μl hloroforma i količina mu je određena tankoslojnom hromatografijom na pločama (Kiselgel G; 0,25 mm) razvijanim u smeši hloroform-metanol (95+5 v/v). Razvijene ploče su prskane 25% sumpornom kiselinom i zagrevane 10 minuta na 130°C. Kvantifikacija toksina je izvršena vizuelnim poređenjem pod UV-svetlom sa poznatim količinama standarda T-2 toksina. Naknadno je izvršeno ponovno pranje aktivnog uglja vakuum filtracijom acetonom i metanolom, a T-2 toksin je u filtratu određen na prethodno navedeni način.

Tabela br. 1 PRINOS T-2 TOKSINA KOD IZOLATA Fusarium sporotrichioides U ZAVISNOSTI OD PRIMENJENOG POSTUPKA EKSTRAKCIJE

Kultura	Ekstr.	pH	Suvi ostatak (g/100 ml)	Prinos T-2	
				(mg/l)	(%)
ITM-496	1	4,07	0,529	15	100
	2			0	0
ITM-391	1	3,56	0,480	150	100
	2			105	70
M-1-1	1	3,37	0,358	300	100
	2			185	61
KF-38/1	1	3,97	0,549	135	100
	2			95	70
R-2301	1	3,95	0,365	120	100
	2			88	73

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati prikazani u tabeli 1 pokazuju znatan pad pH vrednosti tokom kultivacije u SPAK: od početnih 6,2 do 3,56-4,07, što je izrazitije nego u našim prethodnim istraživanjima (Bočarov-Stančić i Muntañola-Cvetković, 1988). Uočena pojava je verovatno posledica povećane aeracije primenjene u sadašnjem istraživanju. Naime, umesto uobičajenih 200 o/min, korišćenjem 220 o/min. postignut je ne samo veći pad pH i povećanje biomase mikroorganizama (suva masa micelija od 3,58-5,49 g/l) nego i brži ulazak u stacionarnu fazu kada se po pravilu (Ueno i sar., 1974) naglo povećava biosinteza T-2 toksina. Shodno tome, proces fermentacije je skraćen sa 5 dana, kada je, prema Ueno i sar. (1975) i našim ranijim istraživanjima (Duletić i sar., 1988), produkcija T-2 toksina mak-

simalna za svega tri dana kultivacije. Takođe, upotrebom metode ekstrakcije etil-acetatom postignuti prinosi istog mikotoksina od 15-300 mg/l su u većini slučajeva viši nego kod istih sojeva fusaria kultivisanih u SPK, 28°C, 200 o/min., tokom 5 dana. Npr. *F. sporotrichoides* M-1-1 (poznati producent T-2 toksina) je u uslovima našeg eksperimenta biosintetisao 300 mg/l sirovog T-2, prema Ueno i sar. (1975) 151 mg/l, a prema našem prethodnom ispitivanju, 120 mg/l (Bočarov-Stančić i Muntañola-Cvetković, 1988).

Dobijeno povećanje prinosa T-2 toksina se, međutim, ne može objasniti isključivo povećanjem aeracije. Naime, izvršena je jedna manja modifikacija originalne podloge (50 g/l saharoze + 1 g/l peptona + 1 g/l ekstrakta kvasca = SPK) koja, prema Ueno i sar. (1975), obezbeđuje sve neophodne elemente za produkciju visokih nivoa trihotecena. Ekstrakt kvasca (iz SPK) je zamenjen autolizatom kvasca s obzirom da je usled odsustva termičkog tretmana poslednji sigurno bogatiji izvor aminokiselina i drugih faktora rasta, što su i dokazala naša prethodna istraživanja (Bočarov-Stančić i sar., 1989 a).

U postupku dobijanja što čistijih preparata T-2 toksina iz prefermentisane produkcione podloge, od velikog je značaja sama ekstrakcija kao korak koji prethodi prečišćavanju. Iz tog razloga upotrebljen je, pored ranije korišćenog postupka sa organskim rastvaračima (Bočarov-Stančić i sar., 1986; Bočarov-Stančić i sar., 1989,) postupak baziran na primeni aktivnog uglja, koji su koristili Ueno i sar. (1975) u slučaju rada sa desetolitarskim količinama tečne podloge. Izvesne modifikacije su izvršene samo u smislu da je produženo vreme adsorpcije i desorpcije toksina, dok su svi ostali parametri ostali nepromenjeni. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1, vidi se da su u svim slučajevima (ekstr. 2) dobijeni niži prinosi T-2 toksina: od 27-39% nego pri upotrebi etilacetata (ekstr. 1). Uočeno sniženje bi se moglo možda izbeći posebnom obradom aktivnog uglja i povećanjem količine metanola kao desorpcionog sredstva, što je i dokazano naknadnim eluiranjem T-2 toksina sa aktivnog uglja kada su dobijeni prinosi 100%.

Submerzna kultivacija producenata T-2 toksina je odabrana s obzirom da se, prema podacima iz literature (Ueno i sar., 1979), čisti T-2 toksin i drugi trihoteceni mogu dobiti jednostepenom kolonskom hromatografijom, dok je pri njihovoj stacionarnoj kultivaciji neophodno prečišćavanje dvostepenom kolonskom hromatografijom.

COMPARISON OF TWO DIFFERENT EXTRACTION METHODS FOR T-2 TOXIN FROM LIQUID FERMENTATION MEDIUM USED FOR TOXICOGENIC FUSARIA CULTIVATION

Summary

Five toxicogenic strains of *Fusarium sporotrichioides* were cultivated in semi-synthetic liquid medium SPYA (sucrose 50 g/l, peptone-1 1 g/l; yeast autolisate 1 g/l) for 3 days at 28°C on a rotary shaker (220 rpm).

T-2 toxin was extracted from fermentation medium in two ways: 1) by the mean of ethylacetate, and 2) by the mean of active charcoal. In the latter case powdered charcoal was mixed continuously with culture filtrate, filtrated, washed with deionized water, and than immersed in methanol.

In all cases higher yields of T-2 toxin were obtained in the same fungal strain by the use of organic solvent (ethylacetate), but the extraction method with powdered charcoal yielded cleaner T-2 toxin preparations.

LITERATURA

Bočarov-Stančić, A., Duletić, S., Franić-Mihajlović, D. (1989 a): *Uticaj sastava hranjive podloge na biosintezu T-2 toksina kod toksikogenih izolata Fusarium sporotrichioides*. VI kongres mikrob. Jug., Maribor, Zbornik povzetkov, 105.

Bočarov-Stančić, A., Duletić, S., Muntañola-Cvetković, M. (1989 b): *Uticaj vještačkog održavanja kultura roda Fusarium na njihov toksikogeni potencijal*. Poseb. izd. ANUBiH, LXXX, Odjelj. med. nauka, 14, 37-42.

Bočarov-Stančić, A., Jovanović, Đ., Muntañola-Cvetković, M. (1986 a): *Biosinteza DAS i T-2 toksina kod izolata roda Fusarium sa poljoprivrednih kultura iz Jugoslavije*. Poseb. izd. ANUBiH, LXXX, Odjelj. med. nauka, 12, 129-145.

Bočarov-Stančić, A., Muntañola-Cvetković, M. (1988): *Ispitivanje biosinteze T-2 toksina u čistoj kulturi u različitim laboratorijskim uslovima*. Arh. hig. rada toksikol., 39, 227-233.

Bočarov-Stančić, A., Muntañola-Cvetković, M., Oberan, Lj. (1986 b): *Proizvodnja DAS i T-2 toksina kod izolata roda Fusarium sa pšenice*. Poseb. izd. ANUBiH, LXXX, Odjelj. med. nauka, 12, 147-160.

Duletić, S., Bočarov-Stančić, A., Muntañola-Cvetković, M. (1988): *Ispitivanje uticaja ekoloških faktora na biosintezu T-2 toksina kod odabranih sojeva Fusarium sporotrichioides*. IV kongr. ekol. Jug., Ohrid, Plen. ref. i saopštenja, 492-493.

Gregory, K. F., Allen, O. N., Richer, A. J., Peterson, W. T. (1952): Am. J. Bot., 39, 405.

Joffe, C. J., Yagen, B. (1977): *Comparative study of the yield of T-2 toxin produced by Fusarium poae, F. sporotrichioides, and F. sporotrichioides var. tricinctum from different sources*. Mycopathologia, 60, 93-97.

Smalley, E. B., Strong, F. M. (1974): *Toxic trichothecenes*. U: Micotoxins (I. F. H. Purchase ed.), Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, 199-228.

Ueno, Y., Sato, N., Ishii, K., Sakai, K., Tsumada, H., Enomoto, M. (1973). *Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of Fusarium species*. Appl. Microbiol., 25, 699-704.

Ueno, Y., Sawano, M., Ishii, K. (1975): *Production of trichothecene mycotoxins by Fusarium species in shake culture*. Appl. Microbiol., 30, 4-9.