

Dr hab. Wanda KAWECKA
 Dr inż. Joanna RACHTAN-JANICKA
 Mgr inż. Anna WROŃSKA
 Inż. Klaudia DYMERSKA
 Katedra Żywności Funkcjonalnej i Towaroznawstwa
 Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji
 SGGW w Warszawie

WYSTĘPOWANIE MIKOTOKSYNY DEOKSYNIWALENOLU W SUROWCACH I PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH®

W artykule przedstawiono charakterystykę budowy i działania deoksyniwalenolu będącego wtórnym metabolitem grzybów strzępkowych z rodzaju *Fusarium*. Najwięcej mikotoksyny produkują komórki grzybów należące do gatunków *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*. Optymalne podłoże dla rozwoju grzybni z zarodników tych grzybów stanowią ziarna zbóż we wszystkich strefach geograficznych. Deoksyniwalenol (DON) może być produkowany w komórkach grzybni zarówno w okresie przedżniwnym, późniwnym oraz w czasie przechowywania, transportu i przetwarzania ziarna zbóż. Według wielu autorów oprawań naukowych DON wykazuje silne działanie toksyczne u ludzi i zwierząt.

Słowa kluczowe: trichoteceny, zboża, toksyczność.

WSTĘP

Mikotoksyny są wtórnymi metabolitami grzybów strzępkowych. Wykazują toksyczne działanie w stosunku do organizmu człowieka, zwierząt i roślin. Stanowią zanieczyszczenie pasz, a także żywności na wszystkich etapach łańcucha żywieniowego. Główne ich klasy obejmują: aflatoksyny, trichoteceny, fumonizyny, zearalenon, ochratoksyny.

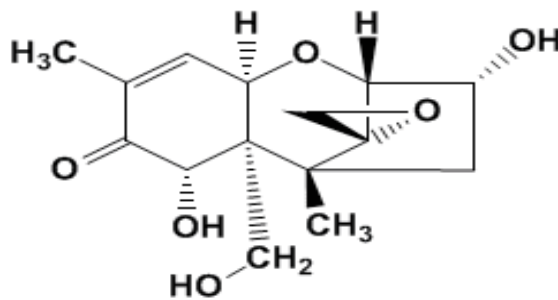
Mikotoksyny należące do trichotecenów stanowią dużą grupę chemicznie różnorodnych związków, które dzieli się pod względem różnic w ich budowie na 4 typy: A, B, C, D. Deoksyniwalenol (DON) zaliczony jest do typu B. Do jego głównych producentów należą grzyby pleśniowe *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*, które są dominującymi gatunkami zakażającymi pszenicę i inne zboża na całym świecie. Przewaga grzybów z rodzaju *Fusarium* zależy przede wszystkim od warunków klimatycznych, zwłaszcza od podwyższonej temperatury i wilgotności w danym regionie geograficznym. Grzybnia *F. graminearum* rozwija się na zbożach w ciepłych, wilgotnych rejonach takich jak USA, podczas gdy grzybnia *F. culmorum* częściej poraża zboża w chłodniejszych rejonach Europy Północnej i w Kanadzie.

Deoksyniwalenol jako wtórny metabolit komórek grzybni w/w grzybów wykazując działanie toksyczne u ludzi i u wielu gatunków zwierząt był notowany w ziarnach zbóż na całym świecie. W zależności od dawki i częstotliwości narażenia, DON może mieć wpływ na układ odpornościowy zarówno jako czynnik immunosupresyjny jak i immunostymulujący.

Celem artykułu jest przybliżenie budowy i działania deoksyniwalenolu (DON) – wtórnego metabolitu grzybów strzępkowych, wykazującego silne działanie toksyczne u ludzi i zwierząt.

CHARAKTERYSTYKA I BUDOWA CHEMICZNA MIKOTOKSYNY DON

Deoksyniwalenol, znany również pod nazwą womitotoksyna, został po raz pierwszy wyizolowany w 1972 roku z grzybni szczepu *F. graminearum* porażającej ziarna jęczmienia [4]. DON jest 3, 7, 15-trihydroksy-12, 13-epoksytrichoteceno-9-en-8-ketonem o masie 296 u i wzorze strukturalnym $C_{15}H_{20}O_6$ (rys.1).



Rys. 1. Budowa chemiczna deoksyniwalenolu.
 (<http://www.biosite.dk/leksikon/deoxynivalenol.htm>).

Ulega topnieniu w temperaturze 151÷153°C [11, 13]. Krystalizuje w postaci bezbarwnych igieł. Jest rozpuszczalny w wodzie i w rozpuszczalnikach polarnych m. in. w octanie etylu, acetonitrylu, mieszaninie metanolu z wodą [5, 6].

WARUNKI WYTWARZANIA DON PRZEZ GRZYBY Z RODZAJU *FUSARIUM*

Czynniki środowiskowe

Wytwarzanie DON w uprawach polowych związane jest ze stresem rośliny i zależy od złożonych interakcji wielu czynników takich jak aktywność wody, temperatura,

obecność tlenu [16]. W roku 2003 Doohan i wsp., wykazali, że wytwarzaniu trichotecenów grupy B, a w tym DON przez grzyby *F. culmorum* i *F. graminearum* sprzyjają: podwyższenie wilgotności i temperatury otoczenia [7, 8]. Według Ramirez i wsp. (2006), największa ilość DON jest produkowana przez *F. graminearum* w temperaturze 30°C przy aktywności wody wynoszącej >0,995 [18].

WPLYW DON NA ORGANIZM CZŁOWIEKA I ZWIERZĄT

Według Wache i wsp. (2009) DON wykazuje działanie toksyczne zarówno u ludzi jak i u zwierząt. Wysokie dawki DON powodują biegunkę, wymioty, leukocytozę, zaburzenia w układzie krzepnięcia krwi prowadząc niejednokrotnie do zejścia śmiertelnego [21]. Niskie dawki DON działające przez długi okres czasu mogą być przyczyną zmniejszenia przyrostu masy ciała, zaburzeń wchłaniania składników pokarmowych, zmian neurohormonalnych oraz zaburzeń w funkcjonowaniu układu odpornościowego [17]. Turner i wsp. (2011) do toksycznych efektów DON zaliczają ponadto teratogenność [20], a Königs i wsp. (2007) dołączają zmiany w sercu i nerkach [12].

Pestka (2010) podaje, że istnieją dowody na toksyczne działanie u ludzi. Występujące w Chinach epidemie z objawami zapalenia żołądka i jelit (1984-1991) zostały później powiązane z fuzariozą zbóż, które zawierały DON i/lub inne trichoteceny [16]. Według Instanes i Hetland (2004) głównym celem toksycznego działania DON na organizm ludzki i zwierzęcy jest układ odpornościowy [10]. Wache i wsp. (2009) dowodzą, że w zależności od dawki i częstotliwości narażenia, DON może mieć działanie immunosupresyjne lub immunostymulujące [21].

Wysokie dawki DON mogą zagrażać aktywnie działającym się komórkom, w tym komórkom szpiku kostnego, węzłom chłonnych, śledziony, grasicy i błony śluzowej jelit, co prowadzi do zmniejszenia liczby krążących limfocytów i tłumienia lub opóźniania odpowiedzi przeciwciał na antygeny. Wache i wsp. (2009) wśród tych antygenów wymieniają RNA, wirusy i bakterie takie jak *Salmonella enteridis* i *Listeria monocytogenes* [21].

Według Döll i wsp. (2009) obecność DON powoduje indukcję cytokin prozapalnych głównie interleukiny 6 (IL-6) bezpośrednio związanej z różnicowaniem się limfocytów B i stymulacją wydzielania IgA. Zwiększenie ilości cytokin jest wynikiem aktywacji kinaz białkowych (MAPKs) poprzez działanie miogenu jakim jest DON [6]. Instanes i Hetland (2004) w prowadzonych badaniach stwierdzili, że DON powodował wzrost poziomu IL-2, IL-4 i IL-5 w hodowli mysich limfocytów T oraz wydzielenie IL-1 β , IL-6 i TNF- α przez mysie makrofagi [10]. Według innych autorów, wzmożona produkcja cytokin prozapalnych w ekspozycji na DON może częściowo przyczynić się do zaburzeń apetytu i spadku wagi, poprzez bezpośredni wpływ na ośrodkowy układ nerwowy lub pośrednio przez zakłócenie syntezy hormonu wzrostu [17].

WYSTĘPOWANIE DEOKSYNIWALENOLU W SUROWCACH I PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Występowanie DON w żywności stanowi zagrożenie w skali światowej. Wynika to w głównej mierze z obecności toksyny w ziarnach pszenicy stanowiącej podstawę do wyrobów pszennych przeznaczonych dla osób w każdej strefie wiekowej na wszystkich kontynentach. W Argentynie odnotowano obecność DON na poziomie 5,0 $\mu\text{g/g}$ w pszenicy i w pszennych produktach spożywczych (9). Podobne wyniki uzyskali Bensassi i wsp. w północnej Tunezji gdzie 83% próbek pszenicy durum było skażone przez DON na poziomie 7.2–5.4 $\mu\text{g/g}$ [2]. Deoksyniwalenol znajdował się w też w innych zbożach uprawianych na terenach Ameryki, Afryki i Azji (4). W badaniach prowadzonych w latach 1979-1995 w Kanadzie zanieczyszczenia kukurydzy dotyczyły od 13% do 100% upraw przy średnim poziomie DON 0,16-1,4 $\mu\text{g/kg}$. W Urugwaju w latach 1993-1995 wykryto obecność DON w pszenicy, jęczmieniu i w kukurydzy. W 3% badanych próbek pszenicy i w 9% próbek jęczmienia poziom DON był wyższy od 1,0 $\mu\text{g/g}$ [9]. Adejumo i wsp. (2007) stwierdzili, że 22.2% badanych próbek kukurydzy pochodzących z Nigerii zawierało DON na poziomie 9.6-745.1 $\mu\text{g/kg}$ [1].

W Japonii, wysokie stężenia DON stwierdzono w kukurydzy, pszenicy i w jęczmieniu [16]. W badaniach pszenicy, owsa, jęczmienia i kukurydzy prowadzonych w Nowej Zelandii, DON został wykryty w 57% próbek, przy czym najwyższe skażone były ziarna pszenicy (12 $\mu\text{g/g}$) [4]. Cerveró i wsp. (2007) w swoich badaniach prowadzonych w Hiszpanii analizowali obecność DON w produktach spożywczych wytwarzanych na bazie kukurydzy: w płatkach kukurydzianych, kukurydzy w zalewie konserwowej, w kukurydzy mrożonej oraz w pieczonych i w smażonych przekąskach kukurydzianych. Spośród analizowanych próbek 68% z nich zawierała DON, a jego poziom wahał się od 29 do 195 $\mu\text{g/kg}$. Najwyższy poziom DON stwierdzono w próbkach kukurydzy konserwowej pakowanej do puszek. Wysokie skażenia DON występowały także w płatkach kukurydzianych (średnia 91 $\mu\text{g/kg}$) [3]. Obecność DON w kukurydzy ekstrudowanej, kukurydzy smażonej, popcornie i w mące kukurydzianej w Indonezji potwierdziły badania Setyabudi i wsp. (2012). We wszystkich badanych próbkach autorzy wykazali obecność DON. Stężenia tej mikotoksyny wahały w przedziale od 47 do 348 $\mu\text{g/kg}$. Tylko w 29% próbkach popcornu, 22% próbkach smażonej kukurydzy i 14% próbkach kukurydzy ekstrudowanej stężenie DON było niższe od 100 $\mu\text{g/kg}$. Wszystkie próbki mąki kukurydzianej, 67% próbek smażonej kukurydzy, 57% próbek popcornu i 43% próbek kukurydzy ekstrudowanej zawierały DON w zakresie 100-200 $\mu\text{g/kg}$ [15, 19].

METODY DETEKCJI DON W SUROWCACH I PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

W celu spełnienia wymagań prawodawstwa w zakresie bezpieczeństwa żywności i pasz, rozwój wiarygodnych, a także wrażliwych metod analizy trichotecenów stał się

tematem priorytetowym. Szczegółowe wytyczne dotyczące pobierania próbek dla oznaczeń toksyn wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* w środkach spożywczych, zostały opublikowane w rozporządzeniu Unii Europejskiej oraz przez Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration (GIPSA) podlegającej Departamentowi Rolnictwa Stanów Zjednoczonych [14].

Lattanzio i wsp. (2009) do najlepszych metod analitycznego oznaczania poziomu trichotecenów zawartych w zbożach i produktach zbożowych, w tym DON zaliczają metody chromatograficzne i immunometryczne. Wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) – jest najczęściej stosowaną metodą analizy mikotoksyn. Chromatografia cieczowa z detektorem mas (LC-MS) – pozwala na jednoczesne oznaczenie trichotecenów typu A i typu B. Oprócz wysokiej czułości, MS2 zapewnia najwyższy stopień pewności identyfikacji analitu. Metoda ta może być stosowana zgodnie z ostatnimi wytycznymi UE w celu uzyskania danych bez dwuznaczności. LC-MS2 jest potężnym narzędziem do identyfikacji i kwantyfikacji zamaskowanych mikotoksyn sprzężonych z innymi związkami polarnymi (np. glukozą), które nie są wykrywane przez rutynowe metody analityczne, a mogą być uwolnione po spożyciu przez hydrolizę w przewodzie pokarmowym [13].

Do szybkiego monitoringu DON i T-2 w zbożach w wielu ośrodkach wykorzystuje się metody immunoenzymatyczne. Procedura do metody ELISA nie wymaga specjalnego oczyszczenia i analizuje mikotoksynę bezpośrednio po ekstrakcji z próbek. Uzyskanie wyników tą metodą jest krótsze w czasie w porównaniu do metod chromatograficznych, jednak czułość oznaczeń przy niskich stężeniach DON jest znacznie niższa. Z tego względu ELISA może być stosowana w ograniczonym zakresie badań produktów spożywczych na zawartość DON [13]. Do alternatywnych metod selektywnego i ilościowego oznaczania DON w pszenicy należy zastosowanie biosensorów optycznych oparte na zasadzie powierzchniowego rezonansu plazmonowego [14].

PODSUMOWANIE

Trichoteceny stanowią najliczniejszą grupę mikotoksyn fuzaryjnych. Przytoczone w pracy badania na obecność trichotecenów wykazały obecność DON na całym świecie głównie w zbożach takich jak pszenica, jęczmień i kukurydza. Dzięki wysokiej stabilności termicznej, DON może tworzyć się w surowcach i w produktach spożywczych i przez układ pokarmowy przenikać do różnych tkanek w organizmie człowieka. Obecność DON w produktach zbożowych jest szczególnie niebezpieczna dla osób, których dieta zawiera znacznie więcej produktów uzyskanych na bazie pszenicy i innych zbóż w porównaniu do standardowej diety. Podobnym ryzykiem zagrożone są dzieci z uwagi na niewielką masę ciała.

Szkodliwe działanie deoksyniwalenolu na poziomie komórkowym polega na hamowaniu syntezy białka. Według doniesień wielu cytowanych autorów prac głównym celem toksycznego działania DON na organizm człowieka i zwierząt są limfocyty odpowiedzialne za prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego. W zależności od dawki

i częstotliwości narażenia, DON może mieć działanie immunosupresyjne lub immunostymulujące na układ odpornościowy.

W celu ochrony konsumenta przed ryzykiem narażenia na deoksyniwalenol i inne mikotoksyny, Komisja Europejska ustanowiła limity dotyczące dopuszczalnych poziomów tych związków w surowcach i produktach zbożowych.

Całkowite wyeliminowanie problemu występowania mikotoksyn, a w tym deoksyniwalenolu w paszach, ziarnach zbóż i produktach zbożowych nie jest jednak możliwe. W związku z tym opracowano metody, które pozwalają na ustalenie bezpiecznej ilości tych związków w żywności i w paszach. Współczesne techniki analizy ilościowej mikotoksyn zdominowała wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), ze względu na wysoką czułość i dokładność. Jednak HPLC, podobnie jak pozostałe techniki chromatograficzne (chromatografia cieczowa i gazowa) są w niewielkim stopniu przydatne do analiz rutynowych, albowiem wymagają poniesienia wysokich kosztów na wyposażenie laboratorium i szkolenia pracowników. Jako szybkie techniki przesiewowe stosuje się obecnie metody immunoenzymatyczne (ELISA) które pozwalają wstępnie ocenić badany surowiec lub produkt odnośnie jego skażenia przez DON.

LITERATURA

- [1] ADEJUMO T. O., HETTER U., KARLOVSKY P. 2007. *Occurrence of Fusarium species and trichothecenes in Nigerian maize*. International Journal of Food Microbiology, 116, 3, 350-357.
- [2] BENSASSI F., ZAIED CH., ABID S., HAJLAOUI M. R., BACHA H. 2010. *Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia*. Food Control, 21, 3, 281-285.
- [3] CERVERÓ M. C., CASTILLO M. A., MONTES R., HERNÁNDEZ, E. 2007. *Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available cornbased foods in Spain*. Rev. Iberoam. Miccol., 24, 1, 52-55.
- [4] DESJARDINS A. E. 2006. *Fusarium mycotoxins*. Chemistry, Genetics and Biology. APS Press, Saint Paul.
- [5] DÖLL S., DÄNICKE S. 2011. *The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding*. Preventive Veterinary Medicine, 102, 2, 132-145.
- [6] DÖLL S., SCHRICKX J. A., DÄNICKE S., FINK-GREMMELS J. 2009. *Deoxynivalenol-induced cytotoxicity, cytokines and related genes in unstimulated or lipopolysaccharide stimulated primary porcine macrophages*. Toxicology Letters, 184, 2, 97-106.
- [7] DOOHAN F. M., BRENNAN J., COOKE B. M., 2003. *Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic to cereals*. European Journal of Plant Pathology, 109, 7, 755-768.
- [8] FARAHANY E. M., JINAP S. 2011. *Influence of noodle processing (industrial protocol) on deoxynivalenol*. Food Control, 22, 11, 1765-1769.

- [9] GONZÁLEZ-OSNAYA L., CORTÉS C., SORIANO J. M., MOLTÓ J. C., MAÑES J. 2011. *Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialized in Spain*. Food Chemistry, t. 124, 1, 156-161.
- [10] INSTANES CH., HETLAND G. 2004. *Deoxynivalenol (DON) is toxic to human colonic, lung and monocytic cell lines, but does not increase the IgE response in a mouse model for allergy*. Toxicology, t. 204, 1, 13-21.
- [11] KLUCZEK J. P., KOJDER A. 2000. *Mikotoksyny w zarysie*. Wyd. Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej, Bydgoszcz.
- [12] KÖNIGS M., LENCZYK M., SCHWERDT G., HOLZINGER H., GEKLE M., HUMPF H-U. 2007. *Cytotoxicity, metabolism and cellular uptake of the mycotoxin deoxynivalenol in human proximal tubule cells and lung fibroblasts in primary culture*. Toxicology, 240, 1-2, 48-59.
- [13] LATTANZIO V. M. T., PASCALE M., VISCONTI A. 2009. *Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals*. Trends in Analytical Chemistry, 28, 6, 758-768.
- [14] MARTINS M. L., MARTINS H. M. 2002. *Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (Zea mays) by Fusarium graminearum*. Food Chemistry, 79, 3, 315-318.
- [15] MENEELY J.P., RICCI F., VAN EGMOND H. P., ELLIOTT CH. T. 2011. *Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food*. Trends in Analytical Chemistry, 30, 2, 193-203.
- [16] PESTKA J. J. 2010. *Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance*. Arch. Toxicol, 84, 9, 663-679.
- [17] PINTON P., NOUGAYRÈDE J-P., DEL RIO J-C., MORENO C., MARIN D. E., FERRIER L., BRACARENSE A-P., KOLF-CLAUW M., OSWALD I. P. 2009. *The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression*. Toxicology and Applied Pharmacology, 237, 1, 41-48.
- [18] RAMIREZ M. L., CHULZE S., MAGAN N. 2006. *Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinian strains of Fusarium graminearum on irradiated wheat grain*. International Journal of Food Microbiology, 106, 3, 291-296.
- [19] SETYABUDI F.M.C.S., NURYONO N., WEDHASTRI S., MAYER H.K., RAZZAZI-FAZELI E. 2012. *Limited survey of deoxynivalenol occurrence in maize kernels and maize-products collected from Indonesian retail market*. Food Control, 24, 1-2, 123-127.
- [20] TURNER P. C., HOPTON R. P., WHITE K. L. M., FISHER J., JANET E. CADE J. E., WILD CH. P. 2011. *Assessment of deoxynivalenol metabolite profiles in UK adults*. Food and Chemical Toxicology, 49, 1, 132-135.
- [21] WACHÉ Y. J., HBABI-HADDIOUI L., GUZYLACK-PIRIOU L., BELKHELFA H., ROQUES CH., OSWALD I. P. 2009. *The mycotoxin Deoxynivalenol inhibits the cell surface expression of activation markers in human macrophages*. Toxicology, 262, 3, 239-244.

OCCURRENCE OF DEOXYNIVALENOL IN RAW MATERIALS AND FOOD PRODUCTS

SUMMARY

This paper presents the characteristics of the constitution and operation of deoxynivalenol which is a secondary metabolite of fungi of the genus Fusarium. Fungi of the genus Fusarium graminearum and Fusarium culmorum produce mycotoxins at most. The optimal substrate for mycelial growth of these fungi spores are the grains in all geographical areas. Deoxynivalenol (DON) can be produced in the cells of the mycelium on grains before harvest, after harvest, during storage, transport and processing. According to many authors of scientific papers, DON has a strong toxic effect in humans and animals.

Key words: trichothecenes, cereals, toxicity.