Oksidativni stres u plijesni roda Aspergillus

Presnec, Tomislava

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:897713

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Tomislava Presnec

Oksidativni stres u plijesni roda Aspergillus

završni rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

Završni rad

OKSIDATIVNI STRES U PLIJESNI RODA *ASPERGILLUS*

Nastavni predmet

Biokemija

Premetni nastavnik: izv. prof. dr. sc. Ivica Strelec

Student: **Tomislava Presnec** MB: 4009/14

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivica Strelec

Predano: 31.8.2015.

Pregledano: 4.9.2015.

Ocjena: **Potpis mentora**

_____ _____

OKSIDATIVNI STRES U PLIJESNI RODA *ASPERGILLUS*

Sažetak:

Oksidativni stres je fiziološko stanje u stanici okarakterizirano prekomjernim nakupljanjem reaktivnih vrsta kisika (ROS) koje stanični antioksidativni sustav nije u stanju ukloniti. U stanicama plijesni oksidativni stres je glavni pokretač biosinteze aflatoksina.

Cilj je ovog rada bio prikazati osnove oksidativnog stresa, te pojasniti na koji to način oksidativni stres dovodi do pojačane produkcije aflatoksina.

Ključne riječi: oksidativni stres, plijesni, *Aspergillus*

OXIDATIVE STRESS IN ASPERGILLUS

Summary:

Disequilibrium between reactive oxygen species (ROS) production and their removal by cellular antioxidants leads to oxidative stress, which is a prerequisite for the onset of aflatoxin biosynthesis in aspergillus.

The aim of this paper was to introduce the reader into the basis of oxidative stress, as well to explain how oxidative stress leads to increased aflatoxin biosynthesis.

Key words: oxidative stress, fungi, *Aspergillus*

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. Oksidativni stres 2

2.2. Slobodni radikali 2

2.2.1 Reaktivne vrste kisika 2

2.2.2 Utjecaj reaktivnih vrsta kisika na stanicu 3

2.3. Plijesni roda *Aspergillus* 4

2.3.1. Aflatoksini 4

2.3.2. Biosinteza aflatoksina 5

2.4. Antioksidativna obrana stanica plijesni 6

2.4.1. Superoksid dizmutaza (SOD) 6

2.4.2. Katalaza (CAT) 6

2.4.3. Glutation peroksidaza (GPX) 7

3. ZAKLJUČAK 8

4. LITERATURA 9

1. UVOD

Aspergillus parasiticus i *Aspergillus flavus* su najraširenije plijesni roda *Aspergllus* koje proizvode aflatoksin B1, poznati hepatokarcinogen. Aflatoksini su toksični metaboliti koji ulaze u lanac ljudske prehrane i uzrokuju zdravstvene probleme. Biosinteza aflatoksina u aflatoksikogenim vrstama *Aspergillusa* uzrokovana je oksidativnim stresom. Oksidativni stres koji se događa tijekom rasta i nakon klijanja konidija ujedno potiče i obranu stranice (Reverberietal, 2005.; Mates, 2000.).

Cilj ovog rada je bio saznati kako oksidativni stres utječe na produkciju aflatoksina u pojedinim plijesnima roda *Aspergillus* te koji su to antioksidativni enzimi koji štite stanice plijesni od povećane količine reaktivnih vrsta kisika.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Oksidativni stres

Oksidativni stres je fiziološko stanje u stanici okarakterizirano prekomjernim nakupljanjem reaktivnih vrsta kisika (ROS) koje stanični antioksidativni sustav nije u stanju ukloniti. Uslijed povećane količine ROS dolazi do oksidacije (oštećenja) sastavnih molekula stanice, što onda može pokrenuti različite metaboličke procese u stanici, te čak dovesti do smrti stanice. U stanicama plijesni oksidativni stres dovodi do pojačane produkcije aflatoksina (Reverberi i sur., 2008; Luschchak, 2011.).

2.2. Slobodni radikali

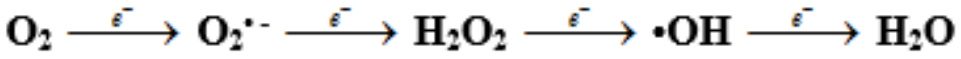
Slobodni radikali su reaktivne kemijske vrste koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona koji uzrokuju primanje ili davanje elektrona drugim molekulama. Nastaju tijekom oksidacijsko-redukcijskih reakcija raznih biokemijskih procesa kao što su prijenos elektrona u lancu prijenosa elektrona (stanično disanje), ß-oksidacija masnih kiselina, fagocitoza, kao i djelovanjem određenih oksidaza koje koriste kisik kao kosupstrat, pri čemu se molekularni kisik reducira i nastaje superoksidni anion (Luschchak, 2011.).

U slobodne radikale ubrajamo reaktivne vrste kisika (ROS), reaktivne vrste dušika (RNS), te druge organske radikale nastale djelovanjem ROS ili RNS (Luschchak, 2011.).

2.2.1. Reaktivne vrste kisika

Reaktivne vrste kisika (ROS) superoksidni anion (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2), te za stanicu najštetniji hidroksilni ion (OH^-), nastaju kao rezultat stupnjevite jednovalentne redukcije molekularnog kisika (**Slika 1**). Rezultat su normalnog rada stanice, a glavnina ih nastaje kao rezultat curenja elektrona sa mitohondrijskog respiratornog niza. Osim u mitohondrijskom respiratornom nizu, ROS nastaju u peroksisomima tijekom ß-oksidacije dugolančanih masnih kiselina, na endoplazmatskom retikulumu kao rezultat djelovanja citokroma P450, a dio ROS nastaje uslijed djelovanja oksidaza: NADH oksidaze, lipooksigenaze, cikooksigenaze i ksantinoksidaze (Luschchak, 2011.; Strelec, 2007.).

Uz navedene u ROS se ubraja i singletni oblik kisika koji prije svega nastaje kao rezultat zračenja (Luschchak, 2011.; Strelec, 2007.).



Slika 1. Nastanak reaktivnih vrsta kisika (Strelec, 2007.)

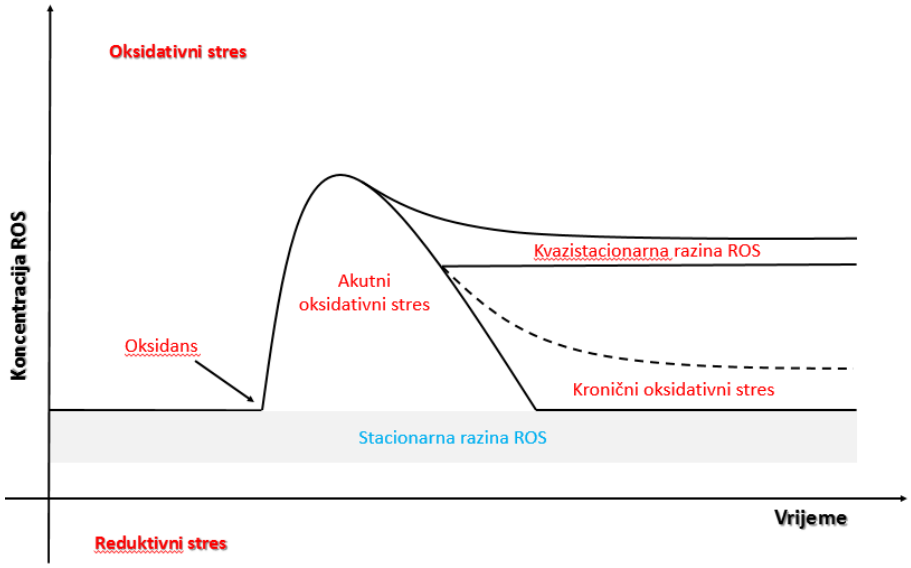
2.2.2. Utjecaj reaktivnih vrsta kisika na stanicu

Prekomjerno nakupljanje ROS u stanici dovodi do narušavanja ravnoteže između nastanka i njihova uklanjanja, uslijed čega dolazi do oksidacije staničnih komponenata što posljedično dovodi do oštećenja stanične membrane, te poremećaja fiziološkog stanja i metabolizma stanice. Interakcija ROS i komponenata stanice ovisi o mjestu nastanka i reaktivnosti ROS, te reaktivnosti molekule s kojom ROS stupa u interakciju. Sve stanične molekule se djelovanjem ROS mogu oksidativno oštetiti, a posebno osjetljivi na oksidativno oštećenje su enzimi akonitaza, 6-fosfoglukonat dehidrogenaza, te gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (Luschchak, 2011.).

Ključno je naglasiti da se ROS konstantno proizvode i eliminiraju pa je stoga njihova koncentracija u stanici izražena parametrom „ustaljeno stanje ili ustaljena razina“ (eng.„*steadystate*“) (Luschchak, 2011.).

U situaciji kada je koncentracija ROS privremeno ili stalno povećana na razinu višu od one koja karakterizira „*ustaljeno stanje*“ dolazi do oksidativnog stresa (**Slika 2**) (Luschchak, 2011.).

U nekim slučajevima koncentracija ROS se ne vraća na početnu razinu već se stabilizira na nekoj novoj višoj koncentraciji koja se naziva „*kvazistacionarna razina*“(**Slika 2**). To se događa kod dijabetesa, ateroskleroze, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, a pretpostavka je da se događa i tijekom biosinteze aflatoksina u stanicama plijesni (Luschchak, 2011.).



Slika 2. Dinamika reaktivnih vrsta kisika u biološkim sustavima (Luschchak, 2011.)

2.3. Plijesni roda *Aspergillus*

Rodu plijesni *Aspergillus* pripada oko 250 vrsta plijesni. Najpoznatiji predstavnik je plijesan *Aspergillus flavus*. Taksonomski gledano, *A. flavus* pripada carstvu gljiva (*Fungi*), odjeljku *Ascomycota*, razredu *Eurotiomycetes*, redu *Eurotiales*, porodici *Trichocomaceae*, rodu *Aspergillus*, vrsti *Flavus* (Free, 2013.; Klich, 2007.).

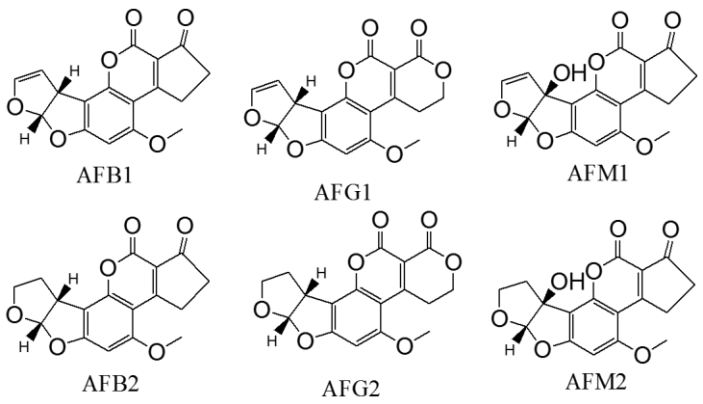
Aspergillus parasiticus i *Aspergillus flavus,* pripadnici jedne od tri aflatoksikogene sekcije, su plijesni roda *Aspergillus* koje kontaminiraju prehrambene proizvode aflatoksinom. Aflatoksini ulaze u prehrambeni lanac i kada se konzumiraju uzrokuju akutne zdravstvene probleme ili kroničnu toksičnost. Njihov najznačajniji učinak na ljudsko i životinjsko zdravlje su rak jetre i narušavanje imunološkog sustava (Varga i sur., 2011; Reverberi i sur., 2005.).

Postupci kontrole produkcije aflatoksina se temelje na kemijskim postupcima (pesticidi i fungicidi). Prekomjerna upotreba kemijskih sredstava ima negativne posljedice kao što je onečišćenje okoliša, ostatak kemijskih sredstava u prehrambenim proizvodima, te povećanje otpornosti patogenih organizama (Reverberi i sur., 2005.).

2.3.1. Aflatoksini

Aflatoksini (od ***A**spergillus **fla**vus***toksin**) su toksični sekundarni metaboliti plijesni *Aspergillus flavus* opasni za ljude i životinje u niskim koncentracijama. Navedeni sekundarni

metabolizam je najdetaljnije ispitan sekundarni metabolizam plijesni, a proučava se više od 40 godina. Aflatoksini su otkriveni nakon pomora peradi u Engleskoj 1960.-tih godina. Plijesan *A. flavus* je najznačajniji producent aflatoksina kojim, prije i nakon žetve kontaminira pšenicu, kukuruz, kikiriki, sjemenke pamuka, orašaste plodove te začinsko bilje. Kemijski gledano, aflatoksini su derivati difuranokumarina dobiveni poliketidnim putem, a postoji nekoliko vrsta aflatoksina od kojih je B1 najpoznatiji (**Slika 3.**). Aflatoksini se međusobno razlikuju po boji fluorescencije pod ultraljubičastim svijetlom, a razlikovati se mogu i primjenom tankoslojne kromatografije. Ako se u literaturi spominje aflatoksin u jednini misli se na aflatoksin B1. Poznate su dvije glavne posljedice izloženosti aflatoksinima, akutna aflatoksikoza (uzrokuje trenutnu smrt), te kronična aflatoksikoza (uzrokuje tumore-primarno tumor jetre, tumore respiratornog sustava). Aflatoksin B1 je karcinogen klasificiran u grupu 1 karcinogena (Mates, 2000.; Klich, 2007; Heydati i sur., 2007; Dutton, 1988).



Slika 3. Prikaz kemijskih formula aflatoksina koje producira plijesan *Aspergillus flavus* (Šarkanj, 2014.)

2.3.2. Biosinteza aflatoksina

Biosinteza aflatoksina je povezana sa različitim stupnjevima razvoja plijesni, pri kojima dolazi do prekomjernog nakupljanja ROS. Određeni sojevi *A. parasiticus* koji proizvode aflatoksine pokazali su da je za njihovu proizvodnju odgovoran oksidativni stres. Štoviše, pretpostavlja se da je oksidativni stres glavni „okidač“ biosinteze aflatoksina (Reverberi i sur., 2008.).

Naime, biosinteza aflatoksina u plijesni je ovisna o ekspresiji regulatornih gena aflR i aflS koji se pojačano eksprimiraju tijekom oksidativnog stresa (Degola i sur., 2007; Schmidt-Heydt i sur., 2010).

Transkripcijski faktor AFLR nastao kao rezultat ekspresije gena aflR veže se na nukleotidni slijed u blizini gena koji kodiraju enzime za biosintezu aflatoksina, te potiče njihovu ekspresiju, a time i slijednu sintezu aflatoksina. Uz aflR i aflS, gen za transkripcijski faktor antioksidativnog odgovora (yapA) ima značajnu ulogu u regulaciji biosinteze aflatoksina. Naime, yapA kodira za transkripcijski faktor YAP1, koji u uvjetima oksidativnog stresa prelazi iz citoplazme u jezgru i uzrokuje transkripciju gena za antioksidativne enzime (Reverberi i sur., 2008.).

2.4. Antioksidativna obrana stanica plijesni

Osim što izaziva oksidativni stres u stanicama plijesni izaziva pojačanu produkciju aflatoksina, isto tako utječe i na povećanje antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze, glutationperoksidaze i katalaze. Osnovna svrha ovih enzima je smanjiti razinu prisutnih ROS, te vratiti stanicu na razinu ustaljenog stanja ili na određenu kvazistacionarnu razinu. Stoga će se u daljnjem tekstu opisati uloga pojedinih antioksidativnih enzima (Mates, 2000.).

2.4.1. Superoksid dizmutaza (SOD)

Superoksid dismutaza (SOD) je enzim koji katalizira pretvorbu nastalog superoksid aniona u vodikov peroksid koji se onda djelovanjem katalaze ili glutation peroksidaze prevodi u vodu (Mates, 2000.).

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Postoji nekoliko vrsta SOD. Mangan SOD (Mn-SOD) je homotetramer koji na svakoj podjedinici sadrži po jedan atom mangana u aktivnom središtu. Bakar,cink SOD (Cu,Zn-SOD) je homodimer koji na svakoj podjedinici sadrži atome bakra i cinka u aktivnom središtu. Nikal SOD (Ni-SOD) je homotetramer, sa atomom nikla u aktivnom središtu svake podjedinice (Mates, 2000.).

2.4.2. Katalaza (CAT)

Katalaza je tetramerni enzim sastavljen od četiri jednake podjedinice te sadrži četiri feriprotoporfirinske grupe. Jedna je od najučinkovitijih enzima pa ne može biti zasićen vodikovim peroksidom pri bilo kojoj koncentraciji. Reagira sa vodikovim peroksidom tvoreći vodu i molekularni kisik, ali i sa donorima vodika (metanol, etanol, mravlja kiselina, fenol) koristeći 1 mol peroksida u nekoj vrsti aktivnosti peroksidaze (Mates, 2000.).

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O+O_2$$

$$ROOH+AH_2 \rightarrow H_2O+ROH+A$$

2.4.3. Glutationperoksidaza(GPX)

Glutationperoksidaza katalizira redukciju hidroperoksidauz glutation(GSH) kao kofaktor i na taj način štiti stanicu od oksidativnog stresa (Mates, 2000.).

$$ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$$

Pronađeno je najmanje pet izoenzima GPX, a razina pojedinog ovisi o vrsti tkiva (Mates, 2000.).

3. ZAKLJUČAK

Prekomjerno nakupljanje reaktivnih vrsta kisika u stanicama plijesni dovodi do oksidativnog stresa, od kojih se stanice štite pojačanom produkcijom antioksidativnih enzima. Ukoliko antioksidativna obrana nije u stanju u potpunosti ukloniti prekomjerno nastale ROS, nastaje kvazistacionarno stanje koje može pogodovati pojačanoj produkciji aflatoksina.

4. LITERATURA

Degola F, Berni E, Dall'Asta C, Spotti E, Marchelli R, Ferrero I, Restivo FM: A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* 103:409-417, 2007.

Dutton MF: Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiological Reviews* 274-295, 1988.

Free S J: Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in genetics* 81:34-82, 2013.

Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW: *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153:1677-1692, 2007.

Klich M A: *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology* 8(6): 713 – 722, 2007.

Luschchak VI: Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 153: 175–190, 2011.

Mates JM: Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153: 83–104, 2000.

Reverberi M, Fabbri AA, Zjalic S, Ricelli A, Punelli F, Fanelli C: Atioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. *Applied Microbial And Cell Physiology*69:207-215, 2005.

Reverberi M, Zjalic S, Ricelli A, Punelli F, Camera E, Fabbri C, Picardo M, Fanelli C, Fabbri AA*:* Modulation of atioxidantdefense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. *Eukaryotic Cell* 7(6): 988-1000, 2008.

Šarkanj B: Utjecaj inhibitora glutation S – transferaze na produkciju aflatoksina plijesni Aspergillus flavus. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

Schmidt-Heydt M, Rüfer CE, Abdel-Hadi A, Magan N, Geisen R: The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Research* 26:241-246, 2010.

Strelec I: Kemijske i biokemijske promjene starenja zrna pšenice. Doktorska dizertacija. Prehrambeno.biotehnološki fakultet, Zagreb 2007.

Varga J, Frisvad JC, Samson RA: Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi. Studies in Mycology* 69:57-80, 2011.