

## POTENCIAL PRODUCTION OF ROQUEFORTINE C BY STRAINS *PENICILLIUM ROQUEFORTI* ISOLATES

Dana Tančinová, Zuzana Barboráková, Zuzana Mašková

### ABSTRACT

The aim of the present work was to isolate *Penicillium roqueforti* isolates from roquefort type of cheese and test their *in vitro* ability to produce roquefortin C. Based on macromorphological and micromorphological characters, we found out that samples of roquefort type of cheese were not contaminated with any other type of microscopic filamentous fungi such as *Penicillium roqueforti*. Obtained strains were tested for the ability to produce roquefortin C *in vitro* conditions. Cultivation for screening roquefortin C was conducted on CYA (Czapek agar with yeast extract) because it is so intracellular toxin. Inoculated media were incubated at 15±1 °C, 25±1 °C for 7, 14 and 21 days. To determine the presence of roquefortin C, we used thin layer chromatography (TLC). With the time of cultivation the number of producing strains was growing and after 21 days of incubation all the strains irrespective of cultivation temperature were producing roquefortin C.

**Keywords:** *Penicillium roqueforti*, roquefortin C, TLC

### ÚVOD

*Penicillium roqueforti* je mikroskopická huba so špecifickými morfológickými vlastnosťami a morfológiou kolónie, ak je kultivovaná na špecifických rastových médiách (Pitt et Hocking, 2009). Schopnosť produkovať roquefortín C popisujú viacerí autori (Samson et Frisvad, 2004, Rundberget et al., 2004, Sengun et al., 2008, Rasmussen et al., 2010). Akútna toxicita roquefortínu C nie je veľmi vysoká (Cole et Cox, 1981), ale je popisovaný ako neurotoxín (Altug, 2003, Frisvad et al., 2006, Frisvad et al., 2007).

Cieľom štúdie bolo vyizolovať kmene *Penicillium roqueforti* zo syrov roquefortského typu a testovať ich v podmienkach *in vitro* na schopnosť produkovať roquefortín C.

### MATERIÁL A METODIKA

V práci sme testovali 14 kmeňov *Penicillium roqueforti*. Kmene sme získali zo syrov roquefortského typu, ktoré boli zakúpené v obchodnej sieti v Nitrianskom regióne. Pôvod vzoriek: Česká republika (2 vzorky), Francúzsko (3 vzorky), Litva (1 vzorka), Nemecko (3 vzorky), Poľsko (2 vzorky) a Slovensko (3 vzorky). Pôvod konkrétnych vzoriek syrov a zároveň testovaných kmeňov uvádzame v Tabuľke 1. Mikroskopické huby sme izolovali z miesta syra s viditeľným rastom. Ako očkovací médium sme použili MEA (agar so sladidlovým extraktom, Pitt et Hocking, 1997). Naočkované platne sme kultivovali 7 dní, pri teplote 25±1 °C, v tme. Vyrastené kolónie sme preočkovali na odporúčané identifikačné médiá pre rod *Penicillium*: CYA (Czapek agar s kvasničným extraktom; Pitt et Hocking, 1997), MEA, CREA (agar s kreatínom a sacharózou; Samson et al., 2002) a YES (agar s kvasničným extraktom a sacharózou; Samson et al., 2002). Izoláty sme na Petriho misky očkovali trojbodovo a kultivovali sme ich pri teplote 25±1 °C, 7 dní, v tme. Druhú identifikáciu sme robili podľa Pitt et Hocking (1997), Samson et al. (2002) a Samson et Frisvad (2004b).

**Stanovenie toxinogenity**

Kmene *Penicillium roqueforti* sme v *in vitro* podmienkach testovali na schopnosť produkovať roquefortín C metódou tenkovstrovej chromatografie (TLC) podľa Samson et al. (2002) upravenou Labudom a Tančinovou (2006). TLC je jednou z najuniverzálnejších metód chromatografickej analýzy. Kultivácia pre skrining roquefortínu C prebiehala na CYA, pretože sa jedná o tzv. intracelulárny toxín. Naočkované médiá boli kultivované pri teplotách 15±1 °C, 25±1 °C po dobu 7, 14 a 21 dní. Po uvedenej dobe kultivácie sme zisťovali schopnosť testovaných kmeňov produkovať roquefortín C. Z kolónií sme vyrezali spolu s kultivačným médiom 3 výseky, každý s plochou približne 5 x 5 mm. Výseky sme nechali extrahovať 5 min v 500 µl roztoku chloroform:metanol (2:1) a premiešali pomocou Vortexu. Tekuté fázy metabolických extraktov jednotlivých kmeňov sme naniesli v množstvách 30 - 50 µl na chromatografickú platňu a následne boli vyvíjané v chromatografickej sústave TEF (toluén, etylacetát, kyselina mravčia; 5:4:1). Vizualizácia roquefortínu C: po nanosení Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O sa roquefortín C vizualizoval ako oranžová škvrna na štarte chromatografickej platne.

Následne sme vybrali štyri kmene (po 21 dňoch kultivácie pri 25±1 °C), ktoré sme ďalej kultivovali pri teplote 4±1 °C. Prítomnosť roquefortínu C sme testovali vyššie popísanou TLC metódou.

**Tabuľka 1:** Pôvod vzoriek syrov a kmeňov *Penicillium roqueforti*

Číslo vzorky (kmeňa)	Krajina pôvodu
1	Francúzsko
2	Nemecko
3	Slovenská republika
4	Slovenská republika
5	Slovenská republika
6	Poľsko
7	Poľsko
8	Česká republika
9	Litva
10	Nemecko
11	Francúzsko
12	Česká republika
13	Nemecko
14	Francúzsko

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

*Penicillium roqueforti* je veľmi podobný druhom *P. carneum* a *P. paneum*. Tieto druhy však na CYA a YES netvorí tmavozelený reverz (Frisvad et Samson, 2004, O'Brien et al., 2008). Na základe mikromorfologických, makromorfologických a kultivačných znakov sme kmene identifikovali a zaradili do druhu *Penicillium roqueforti*. Produkcia mykotoxínov je závislá od mnohých faktorov ako sú vodná aktivita, teplota, substrát, kmeň huby, zloženie substrátu, prítomnosť chemických konzervantov a interakcie s inými mikroorganizmami (Varga et al.,

2005). V našej štúdii sme sledovali vplyv teploty a doby kultivácie na schopnosť kmeňov *Penicillium roqueforti* produkovať roquefortín C. Na stanovenie produkcie roquefortínu C sme v podmienkach *in vitro* využili TLC metódu. TLC metóda je kvalitatívna metóda, ktorou môžeme detegovať prítomnosť nami sledovaného roquefortínu C v živnom médiu. Výsledky uvádzame v Tabuľke 1. Po siedmych dňoch kultivácie sme detegovali nejasnú prítomnosť roquefortínu C len pri 3 kmeňoch, z toho u kmeňa č. 1 pri oboch kultivačných teplotách a u kmeňov 13 a 14 len pri teplote 15±1 °C.

**Tabuľka 2:** Testovanie kmeňov *Penicillium roqueforti* na schopnosť produkovať roquefortín C na CYA (Czapkov agar s kvasničným extraktom) v podmienkach *in vitro* v závislosti na teplote a dobe kultivácie

Číslo kmeňa	7 dní kultivácie		14 dní kultivácie		21 dní kultivácie	
	Roquefortín C		Roquefortín C		Roquefortín C	
	15±1 °C	25±1 °C	15±1 °C	25±1 °C	15±1 °C	25±1 °C
1	±	±	+	-	+	+
2	-	-	+	-	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
13	±	-	+	+	+	+
14	±	-	+	+	+	+

- produkcia nedetegovateľná  
± produkcia nejasná  
+ produkcia zistená

Po 14 dňoch kultivácie sme produkciu roquefortínu C nezistili len u kmeňov č. 1 a 2 a to pri kultivačnej teplote 25±1 °C. Ostatné kmene roquefortín C produkovali pri oboch kultivačných teplotách. Po 21 dňoch kultivácie sme zistili 100 % produkciu roquefortínu C a to pri oboch kultivačných teplotách. Podobne testovali Pose et al. (2007) kmene z argentínskych roquefortských syrov v podmienkach *in vitro* na produkciu roquefortínu C. Z 21 testovaných kmeňov (kultivácia 16 dní pri 25±1 °C, YES médium) toxín produkovalo 16 kmeňov. Tsuyuji et Masakatsu (2000) testovali 37 kmeňov *Penicillium roqueforti* (pôvod kmeňov: syry roquefortského typu). Všetky testované kmene produkovali roquefortín C. *Penicillium roqueforti* produkuje aj ďalšie mykotoxíny ako napr. PR-toxín a kyselinu mykofenolovú (Rundberget et al., 2004, Rasmussen et al., 2010 a ďalší). Po šiestich mesiacoch skladovania vykultivovaných kmeňov pri teplote 4±1 °C sme nezaznamenali prítomnosť roquefortínu C. Počas skladovania došlo k odbúraniu toxínu na nedetegovateľne množstvo nami použitou metódou. V literatúre nie sú dostupné informácie o takejto dlhej dobe skladovania živných médií s vytvoreným roquefortínom C.

V predloženej štúdii sme zistili, že vzorky syrov typu roquefort neboli kontaminované iným druhom vláknitej mikroskopickkej huby ako *Penicillium roqueforti*. Získané kmene sme testovali na schopnosť produkovať roquefortín C pri dvoch kultivačných teplotách 15±1 °C a 25±1 °C a rôznej dobe kultivácie. S dobou kultivácie narastal počet produkujúcich kmeňov a po 21 dňoch kultivácie už všetky kmene bez ohľadu na kultivačnú teplotu produkovali roquefortín C.

## LITERATÚRA

- ALUG, T., 2003. *Introduction to toxicology and food*. New York Washington : CRC Press, 2003, 152 p., ISBN 0-8493-1456-9.
- COLE, R. J., COX, R. H., 1981. *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York : Academic Press, 1981, 937 p. ISBN 0-8493-9818-5.
- FRISVAD, J. C., THRANE, U., SAMSON, R. A., PITT, J., 2006. Important mycotoxins and the fungi which produce them, In *Advances in Food Mycology*, vol., 571, 2006, p. 3 – 31.
- FRISVAD, J. C., THRANE, U., SAMSON, R. A., Mycotoxin producers. In Dijksterhuis, J., Samson, R.A. (ed.): *Food Mycology A Multifaceted Approach to Fungi and Food*, chap. 8, Boca Raton : CRS Press, 2007, p 135 – 159.
- LABUDA, R., TANČINOVÁ, D., 2006. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. In

## ZÁVER

*Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2006, vol. 13, p. 193 - 200.

O'BRIEN, M., EGAN, D., O'KIELY, P., FORRISTAL, P. D., DOOHAN, F. M., FULLER, H. T., 2008. Morphological and molecular characterization of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. In *Mycological Research*, vol. 112, 2008, p. 921 – 932.

PITT, J. I., HOCKING, A.D., 1997. *Fungi and food spoilage*. 2 ed. London : CSIRO Division of Food Research, 1997, 593 p., ISBN 0-643-03949-X.

PITT, J. I., HOCKING, A.D., 2009. *Fungi and food spoilage*. 3 ed. London : CSIRO Division of Food Research, 2009, 519 p., ISBN 0-643-03949-X.

POSE, G., LUDEMANN, A., GÓMEZ, A., SEGURA, J., Comparison of growth characteristics and roquefortin C production of *Penicillium roqueforti* from blue-veined cheese. In *Mycotoxin Research*, vol. 23, 2007, no. 3, pp. 122 – 126.

RASMUSSEN, R. R., RASMUSSEN, P. H., LARSEN T. O., BLADST, T. T., BINDERUP, M. L., 2010. *In vitro* cytotoxicity of fungi spoiling maize silage. In *Food and Chemical Toxicology*, 2010 (in press) doi:10.1016/j.fct.2010.09.07

RUNDBERGET, T., SKAAR, I., FLÅØYEN, A., The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 90, 2004, p. 181-188.

SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 2002. *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. 6th revised ed. (with some corrections). Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, 389 p. ISBN 90-70351-42-0.

SAMSON, R. A., FRISVAD, J. C., 2004. *Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes, mycotoxins*

and other extrolites. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004, 260 p., ISBN 90-70351-53-6.

SENGUN, I. Y., YAMAN, D. B., GONUL, S.A., 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review, In *World Mycotoxin Journal*, vol. 1, 2008, no. 1, p. 291 – 298.

TSUYUJI, S., MASAKATSU, I., Production of toxic metabolites by *Penicillium* strains isolated from mold-ripened cheese. In *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, vol. 41, 2000, no. 2, p. 126 – 132.

VARGA, J., PETERI, Z., TABORI, K., TEREN, J., VAGVÖLGYI, C., 2005. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. In *International Journal of Food Protection*, vol. 99, 2005, p. 321 – 328.

#### Pod'akovanie:

Tento príspevok vznikol s finančnou podporou KEGA-014SPU-4/2010.

#### Contact address:

doc. Ing. Dana Tančinová, PhD., Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, Email: dana.tancinova@uniag.sk.

Ing. Zuzana Barboráková, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, Email: zuzana.barborakova@gmail.com.

Ing. Zuzana Mašková, PhD. Name Surname, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, Email: zuzana.maskova@uniag.sk.