ERGOSTEROL: KLÍČOVÝ STEROID HUB

Vlastimil Dohnal^{1,2,3}, Alena Ježková¹, Jiří Skládanka⁴

10: 247–482, 2008

ISSN 1212-4117

¹ Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav technologie potravin

² Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, katedra toxikologie

³ Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta, katedra chemie

⁴ Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav výživy zvířat a pícninářství

ÚVOD

V přírodě se vyskytují látky, jejichž produkce je vázána na jeden či více druhů organismů a které plní specifickou, pro daný organismus životně důležitou, funkci. Jedním z členů této skupiny látek je i sloučenina se steroidní strukturou – ergosterol (obr. 1).

Ergosterol se vyskytuje pouze v houbách, plísních a některých mikroorganismech, jako jsou kvasinky či trypanosomy, které vyvolávají spavou nemoc. V organismu je lokalizován v buněčných stěnách, kde zajišťuje správnou funkci lipidické membrány. Na jeho přítomnost je vázána permeabilita buněčné membrány a aktivita membránových enzymů. Vyskytuje se také v cytosolu, kde plní důležité funkce při

procesech látkové výměny. Fyziologická funkce ergosterolu u kvasinek tkví v účasti na regulaci proteinkinázy, která je potřebná pro iniciaci růstu. Dále slouží například k podpoře syntézy fosfatidylinositolu.

Ergosterol je v čisté formě bílou krystalickou látkou. Je velmi dobře rozpustný v tucích, naopak je prakticky nerozpustný ve vodě. Strukturně je velmi blízký cholesterolu, nejznámějšímu sterolu savců. Liší se pouze v přítomnosti methylové skupiny vázané na uhlík C-24 a dvou dvojných vazeb mezi uhlíky 7–8 a 22–23. Jeho hydrolýzou v alkalickém prostředí nevzniká ve vodě rozpustný produkt, čímž se liší od lipidů, podléhajícím zmýdlení.

Obr. 1 Strukturní vzorec ergosterolu

Objev ergosterolu

Přestože jsou kvasinky známy jako významný producent ergosterolu, byl tento sterol poprvé izolován ze sklerocií parazitické houby paličkovice nachové (námele, *Claviceps purpurea*), rostoucí na žitě. První izolaci provedl a pojmenování ergosterol pro tuto látku použil pařížský lékárník Charles Tanret roku 1889, který vycházel z pojmenování nemoci (ergotismu), kterou námel u lidí vyvolává (Vandamme et al., 1989). Teprve o několik let později Gérard (1895) popsal výskyt ergosterolu v kvasinkách a v plísňích.

Obsah ergosterolu v sušině plísni se pohybuje průměrně kolem 0,6 % (v některých případech až 2,2 %, *Penicillium westlingii*); u kvasinek se běžně vyskytuje v desetinách procenta (0,1–0,2 %), v některých případech může však dosáhnout i jednotek procent (2–9 % u *Saccharomyces cerevisiae*) (Vandamme, 1989). V současné době byly vytvořeny geneticky modifikované kvasinky *S. cerevisiae*, schopné rychle a ve velkém množství produkovat ergosterol (He, 2007).

Plísňím na stopě

Hlavním důvodem, proč je vhodné a často i nutné sledovat výskyt plísni, je jejich nepříznivé působení na potraviny či krmiva. Plísně mohou za určitých podmínek produkovat toxické metabolity – mykotoxiny, které jsou příčinou celé řady epidemických otrav (Morgavi, 2007; Richard, 2007). Mají také vliv na výživovou hodnotu, protože ke svému růstu spotřebovávají živiny, jako jsou tuky a sacharidy a také esenciální aminokyseliny (lysin, cystein). V neposlední řadě dochází k organoleptickým změnám potravin a krmiv – změna barvy, vůně, konzistence, chuti (Vieira, 2003). Také monitorování přítomnosti plísni v obytných prostorech, ulicích měst či ve skladištích potravinových surovin má velký význam.

Vzhledem k tomu, že produkce ergosterolu je vázána prakticky jen na houby a některé druhy kvasinek, se nabízí idea: kde je ergosterol, tam musí být jejich producenti, a to zejména plísně. Otcem myšlenky využití stanovení ergosterolu jako indikátoru přítomnosti plísni v cereáliích byl kolektiv vědců kolem Seitze. Ten také v roce 1977 popsal jednoduchou metodu extrakce a stanovení pomocí kapalinové chromatografie (Seitz, 1977).

Dalšími výzkumy bylo zjištěno, že obsah

ergosterolu v plísňích napadajících potravinové suroviny ve skladištích není významně ovlivněn podmínkami, ve kterých rostou. Tento poznatek otevřel cestu k možnosti využití obsahu ergosterolu jako „indexu“ množství fugální biomasy. Později se však ukázalo, že situace nemusí být tak jednoduchá a při nižším obsahu vody v substrátu může být korelace mezi ergosterolem a počtem kolonií plísni mnohem menší. Za definovaných environmentálních podmínek je však možné velmi přesně stanovit množství plísni v daném materiálu.

Trendem do budoucnosti je snaha vytvoření modelu produkce ergosterolu plísňemi za různých environmentálních podmínek. Pokud se navíc podaří vyvinout model, který kromě produkce ergosterolu zahrne i produkci toxických sekundárních metabolitů plísni, bude možné předpovídat potenciální environmentální faktory, za nichž dochází k napadení plísňemi a k produkci mykotoxinů. Největší význam modelů tkví v minimalizaci rizika růstu plísni v potravinách (Tothill, 2003). U pšenice je například obsah ergosterolu také funkcí hmotnosti zrna, kde menší zrna obsahují relativně více ergosterolu než zrna větší. I nečistoty a úlomky zrn se vyznačují vyšším obsahem ergosterolu (Regner, 1994). Množství ergosterolu bylo navrženo jako jeden z nových parametrů kvality rajčat a rajčatových výrobků (Kadalkal, 2004).

Ergosterol je možné využít také jako indikátor napadené píce plísňemi. Jeho výskyt ukazuje na horší kvalitu píce. V lučních a pastevních porostech je výskyt plísni závislý na stanovištních a povětrnostních podmínkách. Stoupá zejména na konci vegetačního období, kdy jsou porosty náchylnější k onemocnění a saprofytům. Otázka plísni a s nimi spojených zdravotních problémů tak nabývá na významu při prodlužování pastevního období, resp. při celoročním pobytu zvířat na pastvinách. Výzkum, který proběhl na různých stanovištích v České republice, Německu, Polsku a Maďarsku v letech 2000–2003, ukázal, že obsah ergosterolu v píce z travních porostů se na konci vegetačního období může pohybovat od 20 do 500 mg.kg⁻¹ sušiny. V průběhu podzimu dochází ke zvýšení obsahu ergosterolu. Náchylnost travního porostu k houbovým chorobám se tedy postupně zvyšuje. Fyziologicky starší porosty jsou k houbovým chorobám náchylnější. Porosty využívané pouze počátkem června vykazují kon-

cem vegetačního období (listopad) vyšší produkci biomasy, ale také vyšší obsah ergosterolu v píci (70–220 mg.kg⁻¹ sušiny). Naproti tomu porosty intenzivněji využívané mají koncem vegetačního období nižší produkci, ale kvalita píce je vyšší nejenom s ohledem na obsah živin, ale také s ohledem na výskyt plísni. Obsah ergosterolu se zde pohybuje od 10 do 160 mg.kg⁻¹ sušiny (Opitz von Boberfeld et al., 2006).

Rozdílná je také náchylnost jednotlivých druhů k houbovým chorobám (plísním). Náchylnější jsou jemnolisté druhy, jako je jilek vytrvalý (*Lolium perenne* L.) nebo lípnice luční (*Poa pratensis* L.). Naopak druhy s tuhými vzpřímenými listy jsou vůči houbovým chorobám odolnější. Ergosterol zde může opět sloužit jako indikátor fungálního napadení. V klimatických podmínkách Hesenska (Německo) byl v průběhu tří let u porostu jílku vytrvalého (*Lolium perenne* L.) zjištěn počátkem prosince obsah ergosterolu od 157 až po 314 mg.kg⁻¹ sušiny. Naproti tomu u kostřavy rákosovité (*Festuca arundinacea* Schreb.) se ve stejném období obsah ergosterolu pohyboval pouze od 48 do 129 mg.kg⁻¹ sušiny. S obsahem ergosterolu zde souvisela také přítomnost mykotoxinu zearalenonu. Tento mykotoxin byl detekován pouze u porostu jílku vytrvalého (*Lolium perenne* L.) v množství max. 0,02 mg.kg⁻¹ sušiny (Wolf, 2002). V našich pokusech na Českomoravské vrchovině byl v letech 2005 a 2006 u porostu ovsíku vyvýšeného (*Arrhenatherum elatius* L. P. Beauv.) zjištěn koncem vegetačního období od října do prosince průměrný obsah ergosterolu 140 mg.kg⁻¹ sušiny a u srhly laločnaté (*Dactylis glomerata* L.) 137 mg.kg⁻¹ sušiny. Festucoidní hybrid, kříženec kostřavy rákosovité (*Festuca arundinacea* Schreb.) a jílku mnohokvětého (*Lolium multiflorum* Lam.), vykázal nižší úroveň napadení houbovými chorobami, průměrný obsah ergosterolu byl 95 mg.kg⁻¹ sušiny (Dohnal, 2007).

Přítomnost ergosterolu v prachu z domácností je známkou přítomnosti plísni a jeho množství koreluje s množstvím fugální biomasy. To přináší problém nejen s toxicitou spojenou s jejich metabolity. Negativní působení plísní tkví nejenom v toxicitě některých jejich metabolitů, ale spory mohou u některých jedinců působit jako alergen. Ergosterol se do prachu dostává právě se spóry, kde se jeho koncentrace pohybuje kolem 1,0 µg/mg spór. Rozdíly mezi jednotlivými plísněmi jsou přibližně 25 %.

V celkovém množství prachu se pak jedná řádově o 0,7–45,0 µg/g prachu, respektive 0,01–194,0 ng/m³ vzduchu. Množství ergosterolu nevypovídá o druhu plísni či zdravotním riziku, kterému jsou obyvatelé domu vystaveni (Sullivan, 2001).

Velmi zajímavým příkladem využití stanovení ergosterolu je i sledování kvality odpadních vod v čistírně. Vycištěná voda prochází nádobkou, ve které jsou pěstovány plísně, a průběžně je sledována produkce ergosterolu. Snížila-li se hladina ergosterolu, je zřejmé, že voda obsahuje toxické látky a není tedy dostatečně čistá (Padgett, 2000).

Ergosterol jako cíl antimykotik

Skutečnost, že ergosterol plní velmi důležité role v buňce, a díky tomu, že se nevyskytuje v živočišných buňkách, jsou látky, které vážou ergosterol (například polyeny jako natamycin, Amphotericin B, nystatin apod.) nebo blokující jeho syntézu (azoly, alylaminy, morfoliny), používány jako antimykotika.

Polyeny, skupina přibližně 200 látek, jsou produkovány *Streptomyces* spp. a mají schopnost tvořit komplexy s ergosterolem. Snížení koncentrace volného ergosterolu vede ke snížení fluidity membrán, které se stávají více krystalickými a vytvářejí se v nich polární póry. V důsledku této změny je narušena integrita membrány buňky, které se stávají více permeabilní, a dochází k vytečení jejich obsahu, zejména iontů draslíku a sodíku i polárních látek. Tak masivní úbytek jednonásobně nabitých kationtů vede nevyhnutně ke smrti buňky.

Problémem aplikace polyenů je jejich interakce s cholesterolem a jinými steroly živočišných buněčných membrán, podobných ergosterolu. Způsobují tak kromě žádaného fungicidního účinku i poškození léčeného organismu, zejména ledvin, s následnou elektrolytovou disbalancí. Toxicita Amphotericinu B se může snížit jeho podáním například ve formě lipidického komplexu, což umožní podávání vyšších terapeutických dávek.

Zatímco polyeny poškozují funkci membrány přímou interakcí s ergosterolem, jiné skupiny antimykotik jsou založeny na inhibici jeho biosyntézy. Do této skupiny léků patří například azoly (imidazoly, triazoly), alylaminy a morfoliny. Na tomto principu je založena nejen celá řada antifungálních látek, jako jsou léčiva či fungicidy.

Narozdíl od polyenů působí azoly (Flukonazol, Itrakonazol), imidazoly (například Clotrimazol, Mikonazol apod.), respektive morfoliny spíše jako fungistatika. Jejich nespornou výhodou je, že jsou prakticky netoxické. Azoly blokují enzym P450-Erg11P, který provádí demethylaci na C-14. Výsledkem je hromadění C-14 methylovaného ergosterolu v buňkách a snížení množství ergosterolu. Methylovaný sterol je objemnější, nezapadá tak dobře do membránové struktury jako ergosterol. To má negativní vliv na enzymy vázané na membránu. Dochází k ovlivnění produkce chitinu, příjmu nutrietů a tím k zastavení růstu buňky, zastavení replikace a eventuálně k její smrti.

Další možností inhibice syntézy ergosterolu je inhibice dalšího enzymu, podílejícího se na jeho biosyntéze, skvalenepoxydázy, například alylaminy (Terbinafine, naftifin). Mechanismus

účinku je obdobný jako u azolů – v buňce dojde k hromadění meziproductu, v tomto případě skvalenu, a k deficitu ergosterolu. Výsledkem je opět narušení integrity buněčných stěn.

Morfoliny inhibují C-14 reduktázu a $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ izomerázu. Výsledný efekt na buňku je obdobný jako u ostatních inhibitorů syntézy ergosterolu.

Místa působení jednotlivých druhů antimykotik jsou shrnuty v přehledném obrázku 2.

Blokace syntézy ergosterolu je též používána u antibiotických látek, které působí proti dalším organismům využívajících tento sterol. Jedná se především o kandidy, kryptokoky, ale i protozoa, které jsou původci leishmaniózy a malárie (*Trypanosoma gambiense* a *T. rhodesiense*, *Plasmodium falciparum*). Kromě toho, je i celá řada fungicidů založena na principu blokády tvorby ergosterolu v různých fázích jeho biosyntézy.

Obr. 2 Místa působení jednotlivých typů antimykotik

Provitamin D₂

Vitamin D je potřebný zejména pro správný metabolismus minerálních látek a tvorbu kostí u savců a ptáků. Ovlivňuje hladinu vápníku, fosforečnanů a parathyroidního hormonu v krevním séru.

V roce 1924 Steenbock a Black prokázali, že ozáření potravy vede ke vzniku vitaminu D. O tři roky později, byla vyslovena hypotéza, že ergosterol je prekurzorem vitaminu D. V následujícím roce Windaus izoloval tři formy vitaminu D, z toho dva rostlinné steroly, které

pojmenoval vitamin D₁ a D₂ a jeden z ozáření kůže vitamin D₃. Roku 1928 byla práce tohoto vědce, zabývající se výzkumem struktury sterolů a jejich vztahu k vitaminům, oceněna Nobelovou cenou. V roce 1932 byla definována chemická struktura vitaminu D₂ a zaveden pojem ergokalciferol. Dnes jsou známy dva typy vitaminu – D₂ a D₃. Vitamin D₁ jako chemická látka neexistuje, neboť v původním objevu šlo o směs sloučenin (Bjorn, 2001).

Mechanismus vzniku vitaminu D₂ je tedy následující: Ozářením ergosterolu dochází

k otevření kruhu mezi atomy uhlíku 9 a 10, za vzniku viosterolu, který teplem izomeruje na ergokalciferol. Ten se později v játrech a pak v ledvinách mění na 10,25-dihydroxyergokalciferol, aktivní formu vitamínu D (obr. 3).

Vitaminy D₂ (ergokalciferol) a vitamin D₃ (cholecalciferol) jsou u savců přibližně stejně účinné. U drůbeže je naopak účinnější vitamin D₃ (Jelínek et al., 2003). Vitamin D má tři hlavní funkce. Ve střevní sliznici indukuje biosyntézu bílkovin nezbytných pro resorpci iontů Ca²⁺, podporuje mineralizaci kostí a pomáhá koordinovat také metabolismus fosfátů. Vitaminy D₂ a D₃ jsou pro živočišný organismus metabolicky neaktivní. Aktivním se vitamin D stává postupnou přeměnou v játrech a ledvinách až na kalcitriol, který je neúčinnějším metabolitem vitamínu D. Nedostatek vitamínu D způsobuje u mladých jedinců křivici (rachitis). Při nedostatku

vitamínu D je snížena úroveň ukládání minerálních látek, což u rychle rostoucích kostí vede k deformaci a zvýšené lámavosti. U dospělých jedinců dochází k demineralizaci kostí, což způsobuje měknutí kostí (osteomalacií) a řidnutí kostí (osteoporózu). Při prudkém nástupu produkce mléka počátkem laktace může nastat u vysokoprodukčních dojnic tzv. poporodní paréza. Ve velkých dávkách je vitamin D toxický. Příliš vysoký přísun vitamínu D vede k hypervitaminóze a následnému zvýšenému ukládání vápenatých solí v ledvinách, plicích, srdci a cévách.

Poznámka: Při stanovení ergosterolu se využívá absorpce záření právě při vlnových délkách odpovídající UV oblasti (282 nm) (Dohnal, 2006), takže paradoxně po detekci nemusí být v roztoku přítomen ergosterol, ale již produkt fotolýzy ergokalciferol.

Obr. 3 Vznik aktivní formy vitamínu D z ergosterolu

ZÁVĚR

Ergosterol jako hlavní steroid hub a některých mikroorganismů může sloužit nejen pro jejich detekci, ale částečně i kvantifikaci. Vyšší množství ergosterolu v potravinách může být znakem kontaminace plísněmi a tím i varováním před jejich další konzumací. Detekci ergosterolu je také možné využít v krmivářské praxi. Obdobně jako v lidské výživě ukazuje jeho zvýšený obsah

na zoohygienickou závadnost krmiv. Kromě jiného má ergosterol pozitivní vliv na lidské zdraví, kdy po ozáření přechází na vitamin D₂. Inhibice syntézy ergosterolu je základní funkcí celé řady antimykotik a antibiotik, které jsou účinné nejen proti mykózám, ale též proti původcům nemocí jako jsou leishmanióza a malárie. V zemědělství jsou inhibitory syntézy ergosterolu používány jako fungicidy.

LITERATURA

- BJORN, L. O., WANG, T.: Is provitamin D a UV-B receptor in plants? *Plant Ecology*, 2001. Vol. 154, no 1, s. 3–8.
- DOHNAL, V., KADEROVÁ, I., JEŽKOVÁ, A., SKLÁDANKA, J.: Obsah ergosterolu u vybraných druhů trav na konci vegetačního období. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brunensis*, 2007. Vol. 4, s. 9–14.
- HE, X., GUO, X., LIU, N., ZHANG, B.: Ergosterol production from molasses by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007. Vol. 75, no. 1, s. 55–60.
- JELÍNEK, P., KOUDELA, K. et al.: Fyziologie hospodářských zvířat. 1. vyd., Brno: MZLU v Brně, 2003. 414 s.
- KADAKAL, C., ARTIK, N.: A New Quality Parameter in Tomato and Tomato Products: Ergosterol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004. Vol. 44, no 5, s. 349–351.
- MORGAVI, D. P., RILEY, R. T.: An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 2007. Vol. 137, s. 201–212.
- OPITZ VON BOBERFELD, W. et al.: Effect of different agronomical measures on yield of autumn saved herbage during winter grazing — 2nd communication: Crude protein, energy and ergosterol concentration. *Czech J. Anim. Sci.*, 2006. Vol. 51, no 6, s. 271–277.
- PADGETT, D. E., MALLIN, M. A., CAHOON, L. B.: Evaluating the use of ergosterol as a bioindicator for assessing fungal response to water quality. *Environ. Mon. Assess.*, 2000. Vol. 65, s. 547–558.
- REGNER, S., SCHNURER, J., JONSSON, A.: Ergosterol content in relation to grain kernel weight. *Cereal Chem.*, 1994. Vol. 71, no 1, s. 55–58.
- RICHARD, J. L.: Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007. Vol. 119, no 12, s. 3–10.
- SEITZ, L. M., MOHR, H. E., BURROUGHS, R., SAUER, D. B.: Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chem.*, 1977. Vol. 54, no. 6, s. 1207–1217.
- SULLIVAN, J. B., KRIEGER, G. R.: Clinical Environmental Health and Toxic Exposures, Lippincott: Williams & Wilkins, 2001, s. 1029–1030.
- TOTHILL, I.: Rapid and On-Line Instrumentation for Food Quality Assurance, Woodhead Publishing limited, Cambridge, Anglie, 2003, s. 150–157.
- VANDAMME, E. J.: Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors, Springer, 1989. s. 81–94.
- VIEIRA, S. L.: Nutritional implications of mould development in feedstuffs and alternatives to reduce the mycotoxin problem in poultry feeds. *World's Poultry Sci. J.*, 2003., Vol. 59, s. 111–122.
- WOLF, D.: Zum Effekt von Pflanzenbestand, Vornutzung und Nutzungsstermin auf Qualität und Masse von Winterweidefutter. Dissertation. Giessen: Justus-Liebig Universität, 2002. 127 s.

Vlastimil Dohnal et al.
dohnal@mendelu.cz