

OBSAH ERGOSTEROLU U VYBRANÝCH DRUHŮ TRAV NA KONCI VEGETAČNÍHO OBDOBÍ

V. Dohnal, I. Kaderová, A. Ježková, J. Skládanka

Došlo: 20. února 2007

Abstract

DOHNAL, V., KADEROVÁ, I., JEŽKOVÁ, A., SKLÁDANKA, J.: *Ergosterol content in selected grasses on the end of vegetation period*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2007, LV, No. 4, pp. 9–14

Ergosterol is a natural compound with steroidal structure produced mainly by fungi. Due to this, it is considered as a marker of fungal spoilage. In this work, the content of ergosterol was monitored in samples of three forage crops (*Festuca arundinacea* x *Lolium multiflorum*, *Dactylis glomerata*, *Arrhenatherum elatius*) during period October–December 2005 and different term of summer harvesting (June or July). There were adapted and applied liquid chromatographic method with photometric detection in ultraviolet region for determination of this compound. It was found, that the content of ergosterol strongly increased in all december's samples with small variations between all three forage crops. Samples, where the summer harvest was performed in July had significantly lower content of ergosterol. Obtained results showed that level of monitored compounds was under limits in all samples.

ergosterol, *Festulolium*, *Dactylis glomerata*, *Arrhenatherum elatius*, liquid chromatography

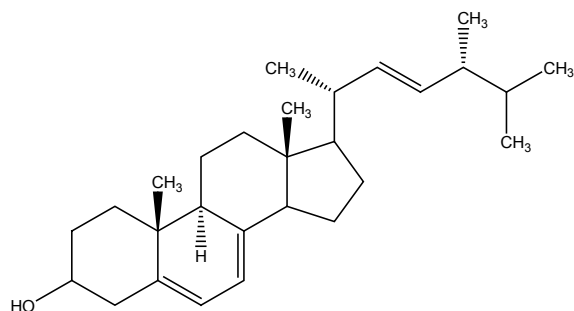
Ergosterol, též zvaný provitamin D₂ (Obr. 1), patří mezi hlavní steroly produkované nižšími i vyššími houbami. Je složkou buněčných membrán hub a má podobnou funkci jako cholesterol v živočišných buňkách. Jeho výskyt v jiných organismech je velmi omezený, pouze v některých bakteriích a kvasinkách byly nalezeny zanedbatelné koncentrace ergosterolu v sušině. Díky tomuto specifickému výskytu je prakticky možné spojit nález tohoto sterolu s přítomností plísní ve zkoumaném vzorku. Tato skutečnost byla ověřena například u napadení pečárkových výrobků plísněmi *Eurotium*, *Aspergillus* a *Penicillium*, kde se podařilo detekovat až 96 % plísněmi kontaminovaných výrobků (Marín, 2007). Bylo prokázáno, že přítomnost ergosterolu v jablečném džusu (Kadalkal, 2005) či výrobcích z rajčat (Hippelein, 2004) svědčí o kontaminaci těchto potravin houbami. Obsah ergosterolu ve vzduchu lze též využít ke sledování přítomnosti plísní v městských zástavbách (Görs, 2006) či v prachu (Parsi, 2006) a tak včas potenciálně zabránit kon-

taktu lidí s toxickým sekundárními metabolity některých plísní – s mykotoxiny.

Pro stanovení ergosterolu je používána celá řada zejména chromatografických metod, a to buď tenkovrstvá chromatografie (Larsen, 2004), plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (Nielsen, 2000) nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem (Varga, 2006) nebo s detekcí v UV oblasti (Gomis, 2000).

Ergosterol, obdobně jako mykotoxiny, se může vyskytovat na všech úrovních potravního řetězce, od krmiv až po hotová jídla. Detekován může být také v pastevní píce. K rozvoji hub dochází v travním porostu zvláště na podzim (Opitz von Boberfeld, 1996). Z fyziologického pohledu je podstatné, že působením ultrafialového záření přechází na vitamin D₂ (ergokalciferol) a ten se přeměnou v játrech mění na aktivní vitamin D. Vitamin D má vliv na metabolismus vápníku a ve velkých dávkách je toxický.

Cílem práce bylo využití obsahu ergosterolu jako charakteristického údaje pro hodnocení míry fungálního napadení píce v průběhu období podzim/zima v závislosti na intenzitě využití v létě. Sledovány byly ozimé druhy trav *Festulolium* a *Dactylis glomerata* schopné růst při nízkých teplotách a jarní druh *Arrhenatherum elatius*.



1: Strukturální vzorec ergosterolu

MATERIÁL A METODY

Přístroje

Pro stanovení ergosterolu byl použit kapalinový chromatograf HP1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) sestávající z vakuové odplyňovací jednotky (model G1322A), kvartérního čerpadla mobilní fáze (G1311A), automatického dávkovače vzorku (G1313A), UV-VIS detektoru s proměnlivou vlnovou délkou (G1314A), fluorescenčního detektoru (G1321A) a hmotnostního detektoru (G1946VL). K separaci ergosterolu a jeho stanovení byla zvolena s malými úpravami metodika publikovaná v práci (Varga, 2006). Na rozdíl od původní práce, kde byla detekce hmotnostní, v naší práci jsme použili detekci v UV oblasti (282 nm).

Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly chromatografické čistoty. Methanol, hydroxid draselný a standard ergosterolu byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, s. r. o. (Praha, Česká republika). Toluén a n-hexan byly dodány firmou Labicom, s.r.o. (Olomouc, Česká republika).

Vzorky

Obsah ergosterolu byl sledován ve třech různých pícninách, a to festulolium (*Festuca arundinacea* x *Lolium multiflorum*) odrůda Felina, srha laločnatá (*Dactylis glomerata*) odrůda Vega, ovsík vyvýšený (*Arrhenatherum elatius*) odrůda Median. Maloparcelkový polní pokus byl založen metodou dělených dílců ve třech opakováních. V létě byl porost využíván jako

jednosečný (počátek června) nebo jako dvousečný (počátek června a konec července). Vzorky pro analýzy byly odebrány v říjnu, listopadu a prosinci. Odebrané vzorky o hmotnosti 1 kg byly usušeny při 60 °C a homogenizovány na velikost částic 1 mm.

Extrakce ergosterolu

Do 4ml skleněných vialek se šroubovým uzávěrem bylo na analytických vahách naváženo 250 mg vzorku homogenizované pícniny a přidány 2 ml 10% roztoku hydroxidu draselného v methanolu. Vialky byly poté uzavřeny víčkem s teflonovým septem. Obsah byl poté 30 sekund intenzivně promícháván na míchačce (MS2 Minishaker IKA, USA) a vialka ponechána v termostatu (Evaterm, Labicom, ČR) po dobu 90 minut při 80 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo ke vzorku přidáno 0,5 ml destilované vody, 1 ml hexanu a obsah vialky promícháván 30 sekund. Pro důkladné oddělení vodné a organické fáze byl obsah centrifugován (Universal 32R, Hettich, Německo) při 4000 ot./min po dobu 5 minut. Horní, organická, vrstva byla převedena do 1,8ml vialky a odpařena pod proudem dusíku. Ke zbylé vodné fázi byl opět přidán 1 ml hexanu a celý proces extrakce opakován ještě 2×, aby bylo dosaženo kvantitativního výtěžku ergosterolu. Spojené extrakty byly odpařeny do sucha. Odparek byl finálně rozpuštěn ve 400 µl směsi methanol/toluén (75:25, v/v) a analyzován pomocí kapalinové chromatografie.

HPLC stanovení obsahu ergosterolu

Vlastní stanovení ergosterolu proběhlo na výše popsaném kapalinovém chromatografu na reverzní fázi. Byla použita kolona Zorbax SB-C18 o rozměrech 4,6 × 30 mm a velikosti částic 1,8 µm (Agilent Technologies, USA). Separace byla prováděna při laboratorní teplotě isokratickou elucí mobilní fáze o složení methanol/voda (97,5:2,5, v/v) při objemové průtokové rychlosti 0,6 ml/min. Ergosterol byl detekován v ultrafialové oblasti při 282 nm. Dávkovaný objem extraktu činil 2 µl.

Kalibrace

Pro měření kalibrační křivky byla zvolena metoda standardního přidavku. Do sedmi vialek byla vpravena různá množství standardního roztoku ergosterolu odpovídajících po přepočtu rozmezí od 0,1 do 1000 µg/g pícniny. Poté byl obsah vialek odpařen proudem dusíku. Do každé vialky bylo naváženo 250 mg pícniny. Do osmé vialky byla vpravena pícnina bez přidavku standardu. Další postup proběhl již stejně jako u běžného vzorku. Každý bod kalibračního setu byl prováděn ve třech opakováních.

Statistické vyhodnocení

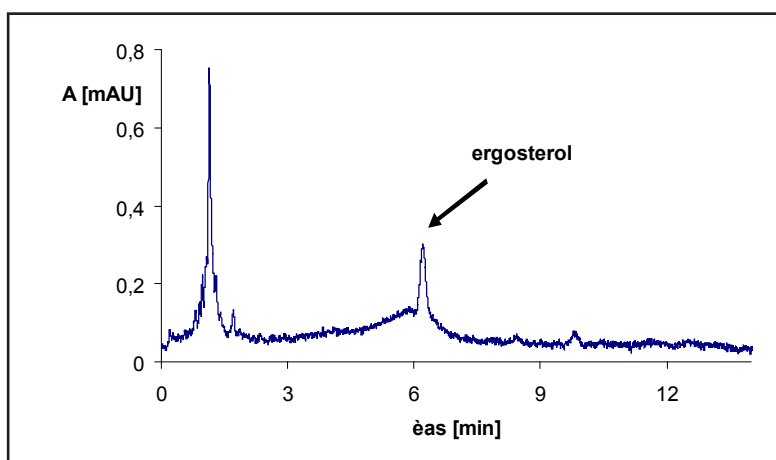
Získané výsledky byly vyhodnoceny vícefaktorem analýzou variance (ANOVA) a následným testováním Tukeyovým testem za pomoci statistického programu Statistica 6.0 CZ.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Ukázka typického chromatogramu při stanovení ergosterolu je na obrázku 2. Kalibrace založená na metodě standardního přídávku řeší prakticky veškeré problémy, které stanovení analytu ve složité matici přírodního původu skýtá. Byla zjištěna linearita kalibrace

v požadovaném rozsahu koncentrací ergosterolu. Z toho lze odvodit, že výtěžnost extrakce je v celém rozsahu koncentrací stejná. Kalibrační křivka, proložená všemi naměřenými body, prochází po odečtení slepého pokusu prakticky počátkem (obrázek 3). Nebyla tedy nalezena žádná systematická chyba, která by způsobila posun přímky v ose y.

Koncentrace ergosterolu ve vzorcích se pohybovala od 0,44 po 473 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny píce. Získané výsledky uspořádané dle druhu pícniny a doby sklizně jsou uvedeny v Tab. I. Vliv intenzity využití v létě na následný obsah ergosterolu v říjnu, listopadu a prosinci je v Tab. II.



2: Chromatogram reálného vzorku

I: Obsah ergosterolu ve vzorcích píce [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$] *Festulolium*, *Dactylis glomerata* a *Arrhenatherum elatius* na konci vegetačního období

	říjen	listopad	prosinec
<i>Festulolium</i>	40,94 ± 10,68	30,29 ± 4,46	212,04 ± 15,92
<i>Dactylis glomerata</i>	52,02 ± 13,01	59,29 ± 7,32	339,63 ± 33,94
<i>Arrhenatherum elatius</i>	39,70 ± 9,04	49,43 ± 4,71	314,05 ± 48,19

II: Obsah ergosterolu ve vzorcích píce [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$] *Festulolium*, *Dactylis glomerata* a *Arrhenatherum elatius* na konci vegetačního období v závislosti na intenzitě využití v létě

pícnina	měsíc	Využití v létě	
		červen	červen a červenec
<i>Festulolium</i>	říjen	59,90 ± 12,14	21,98 ± 7,97
	listopad	38,76 ± 0,75	21,82 ± 5,21
	prosinec	210,71 ± 10,22	213,36 ± 34,07
<i>Dactylis glomerata</i>	říjen	72,92 ± 19,93	31,11 ± 3,46
	listopad	69,75 ± 4,42	48,82 ± 11,78
	prosinec	342,36 ± 56,23	336,90 ± 50,89
<i>Arrhenatherum elatius</i>	říjen	52,53 ± 10,07	26,86 ± 11,93
	listopad	4,53 ± 4,65	54,33 ± 8,08
	prosinec	216,35 ± 27,08	411,75 ± 36,52

III: Výsledky analýzy variance pro obsah ergosterolu na konci vegetačního období

	Suma čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F	p
Druh	29846,6	2	14923,3	8,7603	0,000794
Léto	582,5	1	582,5	0,3419	0,562365
Podzim	710357,1	2	355178,5	208,4975	0,000000
Druh*Léto	19220,3	2	9610,1	5,6414	0,007393
Druh*Podzim	27996,1	4	6999,0	4,1086	0,007632
Léto*Podzim	23908,8	2	11954,4	7,0175	0,002670
Druh*Léto*Podzim	20613,8	4	5153,4	3,0252	0,030013
Chyba	61326,5	36	1703,5		

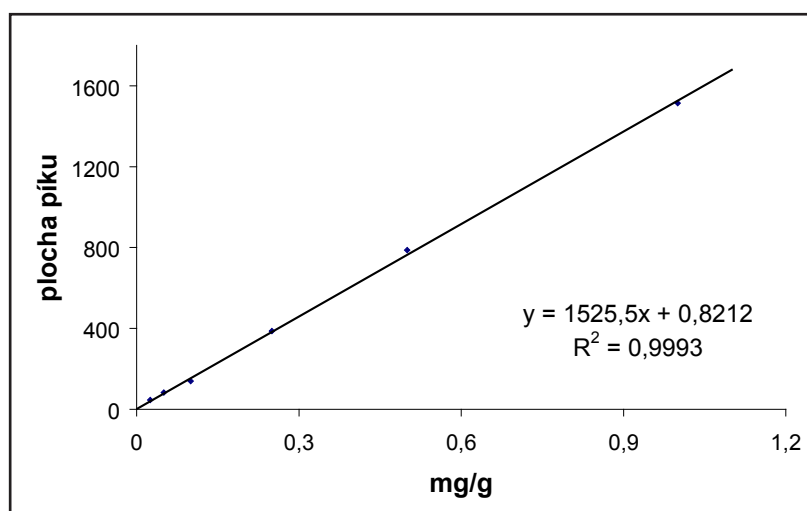
Druh – vyšetř. druh; Léto – termín využití v létě; Podzim – termín využití na konci vegetačního období

IV: Statisticky průkazné rozdíly ($P < 0,05$) mezi obsahem ergosterolu v říjnu, listopadu a prosinci

Využití na podzim	Ergosterol
Říjen	44,22 ^a
Listopad	46,34 ^a
Prosinec	288,57 ^b

V: Statisticky průkazné rozdíly ($P < 0,05$) mezi obsahem ergosterolu u *Festulolium*, *Dactylis glomerata* a *Arrhenatherum elatius*

Využití na podzim	Ergosterol
<i>Festulolium</i>	94,42 ^a
<i>Dactylis glomerata</i>	134,39 ^b
<i>Arrhenatherum elatius</i>	150,31 ^b



3: Kalibrační křivka a regresní rovnice pro stanovení ergosterolu v pícech

Ze získaných výsledků vyplývá, že obsah ergosterolu se od října do prosince zvyšoval. Statisticky průkazný vliv ($P < 0,05$) na obsah ergosterolu měl nejenom termín využití na konci vegetačního období, ale také vyšetř. druh (Tab. III). Vliv intenzity využití

v létě neměl průkazný vliv na obsah ergosterolu na následném podzimním, resp. zimním využití. Z následného testování Tukeyovým testem (Tab. IV) je zřejmé, že v prosinci byl u sledovaných druhů trav statisticky průkazně vyšší obsah ergosterolu (288,57 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) než

v říjnu a listopadu ($44,22 \mu\text{g.g}^{-1}$, resp. $46,34 \mu\text{g.g}^{-1}$). Zvyšování obsahu ergosterolu s pokračující zimou v důsledku náchylnosti travního porostu k onemocnění potvrzují také Opitz von Boberfeld (1996) nebo Opitz von Boberfeld a Wolf (2002). Rozdílná je ovšem náchylnost jednotlivých druhů k onemocnění. Mezi méně náchylné druhy patří *Festuca arundinacea* (Bartholomew et al., 1997; Achilles, 2002). Odolnost rodu *Festuca* a kvalitu rodu *Lolium* kombinují kříženci těchto dvou rodů (Speer et al., 1983). Jak vyplývá z výsledků následného testování (Tab. V), obsahovalo *Festulolium* průkazně méně ergosterolu ($94,42 \mu\text{g.g}^{-1}$) než *Dactylis glomerata* ($134,39 \mu\text{g.g}^{-1}$) nebo *Arrhenatherum elatius* ($150,31 \mu\text{g.g}^{-1}$). Nižší

obsah ergosterolu indikuje zvýšenou odolnost vůči houbovým chorobám. Přestože *Dactylis glomerata* je považována za druh vhodný pro prodloužení pas-tevního období na podzim (Klapp, 1971), byl obsah ergosterolu u tohoto druhu srovnatelný s obsahem ergosterolu u *Arrhenatherum elatius*. Přestože termín (intenzita) využití v létě neměla statisticky průkazný vliv na obsah ergosterolu na konci vegetačního období, je z výsledků patrné (Tab. II), že u dvousečných porostů (červen a červenec) byl obsah ergosterolu nižší než u porostu jednosečného. Vliv intenzity využití v létě je patrný zvláště na následném využití v říjnu a listopadu.

SOUHRN

V této práci byl sledován obsah ergosterolu ve vzorcích pícnin sklizených v období říjen–prosinec ve vztahu k jejich druhu a využití v létě. Z výsledků vyplývá, že největší obsah ergosterolu byl nalezen v prosincových vzorcích, a to sestupně v pořadí *Dactylis glomerata*, *Arrhenatherum elatius* a *Festulolium*. *Festulolium* mělo průkazně nejnižší ($P < 0,05$) obsah ergosterolu. Na kvalitu prosincové sklizně nemělo letní využití prakticky žádný dopad. Naproti tomu v říjnu a listopadu vykazoval porost fyziologicky mladší (využívaný v červnu a červenci) nižší obsah ergosterolu než porost fyziologicky starší (využívaný pouze v červnu), ale uváděné rozdíly nejsou statisticky průkazné.

ergosterol, *Festulolium*, *Dactylis glomerata*, *Arrhenatherum elatius*, kapalinová chromatografie

Práce vznikla s podporou grantu GAČR č. GP521/06/P253.

LITERATURA

- ACHILLES, W., et al: *Ganzjährige Freilandhaltung von Fleischrindern*. Darmstadt: KTBL, 2002. 103 s.
- BARTHOLOMEW, H. M., BOYLES, S. L., CARTER, B., VOLLBORN, E., MILLER, D. and SULC, R. M.: Experiences of eight Ohio beef and sheep producers with year-round grazing. In *Proc. 18th Intern. Grassl. Congr.* Saskatoon, 1997, vol. 29, 127–128.
- GOMIS, D. B., FERNÁNDEZ M. P. and GUTIÉRREZ ALVAREZ, M. D.: Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2000, 891, 1: 109–114.
- GÖRS, S., SCHUMANN, R., HÄUBNER, N. and KARSTEN, U.: Fungal and algal biomass in biofilms on artificial surfaces quantified by ergosterol and chlorophyll *a* as biomarkers. *Int. Biodeterior. & Biodegrad.*, (v tisku)
- HIPPELEIN, M. and RÜGAMER, M.: Ergosterol as an indicator of mould growth on building materials. *Int. J. Hyg. Env. Health*, 2004, 207: 379–385.
- KADAKAL, C., NAS, S. and EKUNC, R.: Ergosterol as a new quality parameter together with patulin in raw apple juice produced from decayed apples. *Food Chem.*, 2005, 90: 95–100.
- LARSEN, T., AXELSEN, J. and WEBER RAVN, H.: Simplified and rapid method for extraction of ergosterol from natural samples and detection with quantitative and semi-quantitative methods using thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1026, 1–2: 301–304
- MARÍN, S., VINAIXA, M., BREZMES, J., LLOBET, E., VILANOVA, X., CORREIG, X., RAMOS and A.J., SAN, V.: Use of a MS-electronic nose for prediction of early fungal spoilage of bakery. *Int. J. Food Microbiol.*, (v tisku)
- KLAPP, E.: *Wiesen und Weiden*. 4. Aufl. Berlin; Hamburg: Verl. Paul Parey, 1971.
- NIELSEN, K. F. and MADSEN, J. Ø.: Determination of ergosterol on mouldy building materials using isotope dilution and gas chromatography–tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 2000, 898, 2: 227–234.
- OPITZ VON BOBERFELD, W.: Qualitätsveränderun-

- gen einschließlich Mykotoxinproblematik von Primäraufwüchsen einer Glatthaferwiese (*Arrhenatherion elatioris*). *Agribiol. Res.*, 1996, 49: 52–62.
- OPITZ VON BOBERFELD, W. and WOLF, D.: Zum Effekt pflanzenbaulicher Maßnahme auf Qualität und Ertrag von Winterweidefutter. *German J. Agron.*, 2002, 6: 9–16.
- PARSI, Z. and GÓRECKI, T.: Determination of ergosterol as an indicator of fungal biomass in various samples using non-discriminating flash pyrolysis. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1130: 145–150.
- SPEER, G. S., ALLINSON, D. W. and WASHKO, W. W.: An evaluation of yield and quality components of Lolium x Festuca hybrids. In *Research Rep. Storrs*. Connecticut: Agric. Experim. Station, 1983, no. 77, p. 1–19.
- VARGA, M., BARTÓK, T. and MESTERHÁZY, Á.: Determination of ergosterol in *Fusarium*-infected wheat by liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1103: 278–283.

Adresa

Mgr. Vlastimil Dohnal, Ph.D., Bc. Ilona Kaderová, Ing. Alena Ježková, Ústav technologie potravin, Ing. Jiří Skládanka, Ph.D., Ústav výživy zvířat a pícninářství, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, e-mail: dohnal@mendelu.cz, sklady@mendelu.cz