

Review

BOVERICIN: KEMIZAM, BIOLOŠKI ASPEKTI I RAŠIRENOST

Maja ŠEGVIĆ KLARIĆ i Stjepan PEPELJNJAK

Zavod za mikrobiologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Primljeno u rujnu 2004.

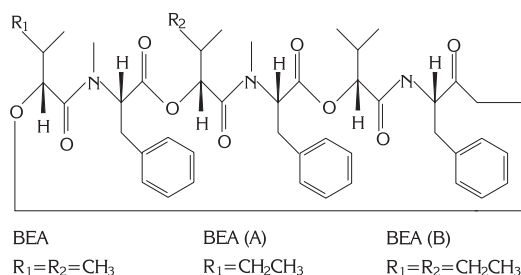
Bovericin (BEA) ciklički je heksadepsipeptid koji sintetiziraju *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces tenuipes* i *Polyporus sulphureus* te velik broj vrsta *Fusarium*. Ovaj mikotoksin ima antimikrobno, insekticidno, citotoksično i apoptotsko djelovanje, a specifični je inhibitor kolesterola aciltransferaze. Biološko djelovanje BEA povezano je s njegovom mogućnošću tvorbe kompleksa s esencijalnim kationima (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) čime povećava propusnost membrane za te ione i narušava ionsku homeostazu. Bovericin je nađen u uzorcima kukuruza iz različitih zemalja, uključujući i Hrvatsku te je utvrđena ko-kontaminacija s drugim fuzariotoksinima (fumonizini, moniliformin) i okratoksinom A. Biološka aktivnost BEA mogla bi povećati toksičnost drugih mikotoksina koji se istodobno pojavljuju u hrani. Uloga BEA u razvoju mikotoksikoza u ljudi i životinja još je uvijek nepoznata.

KLJUČNE RIJEČI: antimikrobno djelovanje, apoptoza, citotoksičnost, esencijalni kationi, *Fusarium*, kukuruz

KEMIZAM BOVERICINA

Bovericin je cikloheksadepsipeptid, tj. ciklički ester trimer amida N-metil-L-fenilalanina i D- α -hidroksiizovalerijanske kiseline, molekularne mase 783 Da (slika 1). Stabilna je, okrugla molekula lipofilnog karaktera i dominantna bioaktivna komponenta u gljivice *Beauveria bassiana* (1). Sinteza BEA nađena je u još nekih entomopatogenih gljivica uključujući *Paecilomyces fumosoroseus* (2), *Paecilomyces tenuipes* (3) i *Polyporus sulphureus* (4) te u većeg broja gljivica vrsta *Fusarium* (tablica 1). Gupta i sur. (5) opisali su dva kemijska analoga BEA: BEA (A) i BEA (B) (slika 1). BEA (A) je cikloheksadepsipeptid, molekularne mase 797 Da i nalazi se u manjoj količini kao produkt biosinteze *B. bassiana*. Veći lipofilni karakter BEA (A) potječe od dodatne metilne skupine na položaju R_1 . BEA (B) viši je kemijski analog BEA (A), molekularne mase 811 Da, sadržava dodatne metilne skupine na položaju R_1 i R_2 i još je više lipofilan. Sintetizira se u vrlo malim količinama. Smatra se da

u biosintezi BEA sudjeluje nespecifični multienzimski kompleks bovericin sintetaza, što može rezultirati tvorbom drugih metabolita (5). Spektrometrijom masa visoke razlučivosti (H-NMR) potvrđeno je da tijekom biosinteze dolazi do supstitucije jedinica α -hidroksiizovalerijanske kiseline (Hiv), koju nalazimo u BEA, sa 2-hidroksi-3-metilpentanonskom kiselinom (Hmp), koju sadržavaju BEA (A) i BEA (B). Hmp-ostaci potječu od izoleucin biosintetičkog intermedijara α -keto- β -metilvalerijanske kiseline.



Slika 1. Osnovna kemijska struktura BEA i njegovih analoga

Tablica 1. Tvorba bovericina u vrsta *Fusarium*

Lokalitet/uzorak	Producent (N pozitivnih sojeva/ΣN)	BEA / mg kg ⁻¹	Literatura
Peru / kukuruz	<i>F. subglutinans</i> (8/8)	50-250	41
SAD / krmivo	<i>F. verticillioides</i> (1/3)	300	9
Italija / kukuruz	<i>F. proliferatum</i> (1/1)	45	42
Poljska / kukuruz	<i>F. subglutinans</i> (22/26)	10-200	32
Italija / kukuruz	<i>F. verticillioides</i> (3/13)	5	37
	<i>F. proliferatum</i> (4/4)	40-175	
SAD Iowa/krmivo	<i>F. proliferatum</i> (9/11)	85-350	34
Europa, Sjeverna i Južna Amerika, Azija, Australija / kukuruz, pšenica krumpir, kupus, voće, tlo i dr.	<i>F. sambucinum</i> (12/14)	2-230	43
	<i>F. acuminatum</i> (2/7)	2-8	
	<i>F. equiseti</i> (2/3)	3-12	
	<i>F. longipes</i> (1/2)	200	
	<i>F. subglutinans</i> (3/3)	10-300	
	<i>F. anthophilum</i> (1/2)	1300	
	<i>F. oxysporum</i> (3/7)	13-3200	
	<i>F. poae</i> (3/4)	20-63	
	<i>F. avenaceum</i> (1/6)	7	
	<i>F. beomiforme</i> (1/1)	5	
SAD Teksas / riža	<i>F. proliferatum</i> (15/15)	109-1350	44
	<i>F. proliferatum</i> (4/5)	310-1130	35
	<i>F. subglutinans</i> (3/5)	140-700	
<i>F. globosum</i> (5/5)	10-110		
Slovačka / kukuruz	<i>F. subglutinans</i> (2/2)	65	45
	<i>F. proliferatum</i> (2/2)	70	
Finska / pšenica	<i>F. avenaceum</i> (10/13)	tragovi-70	38
	<i>F. poae</i> (1/1)	9.4	
	<i>F. tricinctum</i> (1/1)	33	

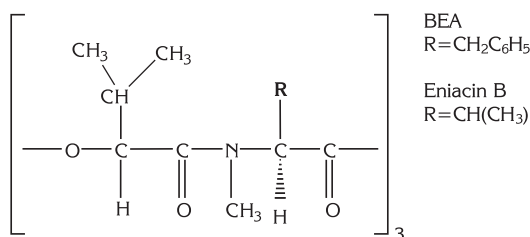
Nilanonta i sur. (6) su koristeći se sojem *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614, dodavanjem prekursora biosinteze BEA (L-izoleucin i D-alozoleucin), povećali proizvodnju BEA (A) i BEA (B) te sintezu BEA (C). Primjenom prekursora D-izoleucina i L-alozoleucina sintetizirani su diastereoizomeri BEA (A, B i C) koji su nazvani alobovericini A, B i C.

Nedavno su iz kulture *Beauveria* sp. FKI-1366 izolirana tri nova stereoisomera bovericina: BEA D, E i F (7).

Strukturno slični metaboliti

Vrste *Beauveria* tvore boveriolide I i III, BEA-i strukturno slične peptide, za koje se ne zna jesu li toksične (8).

BEA je strukturno sličan ciklopepspeptidu eniacinu (A-C), kojeg tvore vrste roda *Fusarium*. U eniacinu (slika 2) aromatska je aminokiselina fenilalanin zamijenjena kombinacijom N-metil derivata alifatskih aminokiselina, i to izoleucina, leucina i valina (9).



Slika 2. Kemijska struktura BEA i eniacina

BIOLOŠKI UČINCI BEA

Biološke osobine BEA i eniacina povezane su s njihovom mogućnošću stvaranja kompleksa s dvovalentnim (Ca²⁺) i alkalnim kationima (Na⁺ i K⁺), zbog čega se povećava propusnost membrane za ove ione u uvjetima *in vivo* i *in vitro* (10, 11). BEA pokazuje antimikrobno (12), insekticidno (1, 13, 14), citotoksično (15) i apoptotsko djelovanje (16, 17) te

ima negativan ionotropni i kronotropni učinak na srčani mišić i glatke mišiće sisavaca (18).

Antimikrobno djelovanje

Antimikrobno djelovanje BEA dokazano je na nekoliko vrsta gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija uključujući *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* i *Escherichia coli* (19). Metodom difuzije *Castelbury i sur.* (12) dokazali su da BEA u količini od 0,1 μg inhibira rast *Bacillus pumilus*, 1 μg inhibira rast *B. cereusa*, *B. mycoidea*, *B. sphaerica*, *Paenibacillus alvei* i *Paenibacillus sp.*, a 25 μg inhibira rast i *P. validusa*. Dokazano je inhibitorno djelovanje BEA na rast anaerobnih vrsta *Eubacterium bifforme*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *P. productus*, *Bifidobacterium adolescentis* i *Clostridium perfringens*. BEA i BEA (A) izolirani iz *Paecilomyces tenuipesa* imaju baktericidan učinak na *Mycobacterium tuberculosis* u koncentraciji 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a antiparazitarni učinak dokazan je na *Plasmodium falciparum* (K1, multi-drug resistant strain) s $\text{EC}_{50}=1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $\text{EC}_{50}=12 \mu\text{g mL}^{-1}$ (3). Ovi nalazi govore u prilog djelovanju BEA kao antibiotika i antiparazitika što ga svrstava u potencijalne tuberkulostatike i antimalarike. Osim toga, novootkriveni stereoizomeri BEA (D) i (E) znatno smanjuju IC_{50} mikonazola koji se rabi za suzbijanje flukonazol-rezistentne *Candida albicans* (7).

Insekticidno djelovanje

Insekticidno djelovanje BEA nađeno je ispitivanjem na ličinkama komaraca ($\text{LC}_{50}=26 \text{ mg kg}^{-1}$ BEA, $\text{LC}_{50}=31 \text{ mg kg}^{-1}$ BEA A), muhama (*Musca vomitoria*) i krumpirovoj zlatci (5, 13, 14). Toksično djelovanje BEA utvrđeno je na nekim vrstama morskih račića (Crustacea), i to *Artemia salina* ($\text{LD}_{50}=2,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) i *Mysidopsis bahia* ($\text{LD}_{50}=0,56 \text{ mg mL}^{-1}$) (20, 21). Na staničnoj kulturi *Spodoptera frugiperda* SF-9 (*Lepidoptera*) nađeno je inhibitorno ($\text{IC}_{50}=2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) i citotoksično ($\text{CC}_{50}=3 \mu\text{mol L}^{-1}$) djelovanje BEA, pri čemu se BEA pokazao toksičnijim od gliotoksina ($\text{CC}_{50}=4 \mu\text{mol L}^{-1}$), eniacina ($\text{CC}_{50}=6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$), nivalenola ($\text{CC}_{50}=9,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), zearalenona ($\text{CC}_{50}=18,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) i deoksinivalenola ($\text{CC}_{50}=45 \mu\text{mol L}^{-1}$) (22).

Citotoksično i apoptotsko djelovanje

Nilanonta i sur. (3) dokazali su da BEA i BEA (A) djeluju kao citostatici u kulturama stanica humanoga epidermoidnog karcinoma (KB) ($\text{IC}_{50}=4,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $\text{IC}_{50}=2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) i humanog karcinoma dojke (BC-1) ($\text{IC}_{50}=3,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $\text{IC}_{50}=2,9 \mu\text{g mL}^{-1}$). BEA je citotoksičan *in vitro* u kulturi humanih B-limfocita (15), u kulturi stanica limfoma U-937 ($\text{CC}_{50}=30 \mu\text{mol L}^{-1}$) i stanica promijelocitne leukemije HL-60 ($\text{CC}_{50}=15 \mu\text{mol L}^{-1}$) (23). BEA je umjereno toksičan za *Vibrio fischeri* ($\text{EC}_{50}=94 \mu\text{g mL}^{-1}$), što je dokazano testom bakterijske bioluminiscencije (24). Amesov test na pet standardnih sojeva *Salmonella typhimurium* nije pokazao mutageni učinak BEA u koncentraciji 2 μg po ploči (spot test) te u rasponu koncentracija od 0,2 do 500 μg po ploči (ugradnja u ploču) (24). BEA uzrokuje apoptozu preko Ca^{2+} -aktivirajućih endonukleaza (10), a adukti s BEA nastaju pri vrlo niskoj koncentraciji od 25 pmol mL^{-1} (25). *Harnois i sur.* (16) proučavali su apoptozu u kulturi stanica ljudskih kolangiokarcinoma. BEA je uzrokovao značajnu apoptozu (29 %) u kulturi kolangiocita pri koncentraciji od 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nakon 6 sati, dok je u kulturi malignih kolangiocita apoptoza bila slabije izražena (12 %). Maligne su stanice pokazale 15 puta veću ekspresiju proteina Bcl-2, što upućuje na ulogu tih proteina u rezistenciji malignih stanica na apoptozu. *Que i sur.* (17) dokazali su da BEA potiče apoptozu preko Ca^{2+} -ovisne CPP-32 proteaze, usprkos ekspresiji proteina Bcl-2 u kolangiocitima štakora. BEA uzrokuje apoptozu limfocita periferne krvi purana u koncentracijama 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ i 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, što se očituje fragmentacijom DNA, kondenzacijom kromatina u perifernim dijelovima stanice te vakuolizacijom citoplazme. Aplikacijom BEA i FB_1 u jednakim koncentracijama (8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) zapažen je značajan aditivni učinak koji se, osim apoptoze, očitovao smanjenjem broja makrofaga. Ovi rezultati upućuju na moguće sinergističko imunosupresivno djelovanje BEA i FB_1 smanjenjem proliferacije i poticanjem apoptoze (26).

Inhibicija kolesterol-aciltransferaze

Bovericin je vrlo jak specifičan inhibitor kolesterol-aciltransferaze (ACAT) (27), enzima koji sudjeluje u esterifikaciji kolesterola s masnim kiselinama, pri čemu nastaje acil-kolesterol-ester. Vrlo niska koncentracija BEA (3 $\mu\text{mol L}^{-1}$) inhibira aktivnost ACAT za 50 % u jetri miševa. Kod ciroze jetre i toksičnog hepatitisa

smanjena je sintetska i esterifikacijska funkcija jetre te se mogu naći izrazito niske koncentracije kolesterola, osobito esterificiranoga.

Negativni ionotropni i kronotropni učinci

Fiziološko-kemijske studije pokazale da BEA ima selektivno ionoforno djelovanje prema esencijalnim kationima Ca^{2+} , K^{+} i Na^{+} (28, 29). Učinak BEA na jačinu mišićne kontrakcije ispitan je na glatkim mišićima ileuma i srčanom mišiću zamorčeta (18). Utvrđen je negativni ionotropni učinak BEA (redukcija jačine kontrakcije) u ileumu pri koncentracijama $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $3 \mu\text{mol L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($\text{IC}_{50}=0,86 \mu\text{mol L}^{-1}$) te u papilarnim mišićima pri koncentraciji od $3 \mu\text{mol L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($\text{IC}_{50}=18 \mu\text{mol L}^{-1}$), dok je pri koncentraciji od $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ kontrakcija papilarnih mišića sasvim izostala. Negativni ionotropni učinak dobiven nižim koncentracijama BEA ($3 \mu\text{mol L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $30 \mu\text{mol L}^{-1}$) mogao se ukloniti dodatkom CaCl_2 , dok se učinak od $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ BEA nije mogao spriječiti dodavanjem CaCl_2 . Značajni negativni kronotropni učinak (smanjenje vodljivosti) na aktivnost desnog atrija zapažen je kod $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ BEA čime je dokazano da je negativni ionotropni učinak BEA jači od negativnoga kronotropnog učinka. Mogući mehanizmi smanjenja kontrakcije glatkih mišića u ileumu su inhibicija protoka Ca^{2+} kroz L-tip kalcijevih kanala (30) ili aktivacija kalijevih kanala čime se povećava propusnost membrane za kalij (10). Smanjenje jačine kontrakcije u papilarnim mišićima može biti posljedica redukcije slobodnog kalcija u stanici zbog inhibicije protoka kalcija kroz L-kanale. Kod nižih koncentracija BEA, negativni se kronotropni učinak može spriječiti povećanjem izvanstanične koncentracije kalcija. BEA nekompetitivno inhibira protok kalcija, što znači da je njegov mehanizam djelovanja različit od mehanizma djelovanja Ca-antagonista. Nakon 55 min BEA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) značajno snizuje membranski potencijal u mirovanju te skraćuje trajanje akcijskog potencijala u staničnoj kulturi neurona NG 108-15 (hibridna linija neuroblastoma miša i glioma štakora) (31). BEA uzrokuje reverzibilnu inhibiciju L-tipa kalcijevih kanala u toj kulturi stanica pri rasponu koncentracija od $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ do $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($\text{IC}_{50} = 4 \mu\text{mol L}^{-1}$). U koncentraciji od $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ BEA povećava negativnost membranskog potencijala i skraćuje trajanje akcijskog potencijala. Potpuna inhibicija protoka kalcija pri koncentraciji od $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ nađena je već nakon 2 min. Ta koncentracija BEA ne djeluje na protok kalija,

što znači da je BEA relativno specifični inhibitor L-tipa kalcijevih kanala u NG108-15 stanicama (31).

Ionoforno djelovanje BEA moglo bi se objasniti na dva načina: djelovanjem BEA kao nosača i/ili mehanizmom stvaranja kanala u biološkim membranama. Kouri i sur. (32) dokazali su da BEA stvara kation-selektivne kanale u miocitima i liposomima te povećava propusnost membrane za monovalentne katione što dovodi do kolapsa kationskog gradijenta. Narušavanje homeostaze monovalentnih i divalentnih kationa može djelomično objasniti nespecifično toksično djelovanje BEA na stanice sisavaca, kukaca i mikroorganizama.

UČESTALOST BOVERICINA U HRANI

Na tablici 1. prikazana je sposobnost tvorbe BEA u različitim vrsta fuzarija (*in vitro*) koje su izolirane kao kontaminanti kukuruza i drugih supstrata u različitim područjima svijeta.

Kao prirodni kontaminant kukuruza BEA je prvi put nađen u Poljskoj (33), nakon čega je detektiran u uzorcima kukuruza iz Italije (34), SAD-a (35), Afrike (36) i Hrvatske (37). Koncentracija tog mikotoksina u kukuruзу najčešće se podudara s kontaminacijom kukuruza vrstama *Fusarium*. Tako je 52 % uzoraka iz Poljske i Italije sadržavalo BEA u koncentracijama od 5 mg kg^{-1} do 520 mg kg^{-1} te je zabilježena dominacija *F. subglutinans* (Poljska), odnosno *F. verticillioides* i *F. proliferatum* (Italija) (33, 34). Botalico i sur. (38) također su utvrdili kontaminaciju kukuruza s *F. verticillioides* i *F. proliferatum* pri čemu je BEA nađen u svim uzorcima u rasponu od 5 mg kg^{-1} do 10 mg kg^{-1} . Niže koncentracije BEA ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ do 3 mg kg^{-1}) nađene su u kukuruзу iz SAD-a (Iowa) koji je bio kontaminiran navedenim trima vrstama fuzarija (35). U afričkoj pokrajini Transkeji BEA je nađen u 100 % uzoraka kukuruza inficiranih s *F. proliferatum*, *F. subglutinans* i *F. globosum*, u koncentracijama od $0,008 \text{ mg kg}^{-1}$ do $1,7 \text{ mg kg}^{-1}$ (36). *Fusarium avenaceum* izoliran je iz 91 % uzoraka iz pšenice u Finskoj, a BEA je detektiran u 100 % uzoraka u koncentracijama od $0,64 \text{ mg kg}^{-1}$ do $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (39). Kako su *F. proliferatum*, *F. subglutinans* i *F. verticillioides* značajni producenti drugih mikotoksina (fumonizini, moniliformin, fuzaproliferin), valja očekivati njihovo istodobno pojavljivanje u takvoj hrani. O tome svjedoče nedavna istraživanja provedena u Italiji i Hrvatskoj. U kukuruзу sa Sardinije i drugih lokaliteta

u Italiji dokazano je istodobno pojavljivanje BEA, FB₁ i/ili moniliformina (40). Posebice su zanimljivi rezultati dobiveni analizom 209 uzoraka kukuruza skupljenih na 14 lokaliteta u Hrvatskoj, uključujući i područje endemske nefropatije (okolica Slavenskog Broda). U 9 % svih uzoraka kukuruza BEA je nađen u rasponu koncentracija od 0,013 mg kg⁻¹ do 1,9 mg kg⁻¹ (srednja koncentracija=0,393 mg kg⁻¹). Od toga je 53 % BEA-pozitivnih uzoraka skupljeno u području s endemskom nefropatijom (srednja koncentracija=0,09 mg kg⁻¹). Šest posto od ukupnog broja uzoraka sadržavalo je BEA i FB₁+FB₂, a 2 % uzorka BEA, FB₁+FB₂ i okratoksin A (OTA), što je ujedno i prvo izvješće o istodobnom pojavljivanju tih mikotoksina u kukuruзу (37, 41). Ko-kontaminacija hrane tim mikotoksinima upućuje na mogući rizik od mikotoksikoza u ljudi i životinja.

ZAKLJUČCI

Dosadašnja istraživanja upućuju na to da je BEA antibiotik širokog spektra i citostatik. BEA u relativno niskim koncentracijama djeluje citotoksično i apoptotski, inhibira kolesterol-aciltransferazu i smanjuje jačinu kontrakcije i vodljivost u srčanome mišiću pokusnih životinja. Dosadašnja istraživanja provedena u nekim zemljama Europe, SAD-a i Afrike govore o relativno visokoj učestalosti nalaza BEA i plijesni koje ga proizvode na kukuruзу. U Hrvatskoj je provedeno samo jedno istraživanje o pojavljivanju BEA u kukuruзу te se ne može zaključiti kolika je kod nas izloženost ljudi i životinja tom mikotoksinu. Međutim, istodobno pojavljivanje BEA i drugih mikotoksina, primjerice FB₁, FB₂ i OTA upućuje na povećan rizik za zdravlje ljudi i životinja zbog njihova mogućeg sinergističkog djelovanja. Mehanizam toksičnosti BEA *in vivo* i *in vitro* nije dovoljno istražen i zato su potrebna daljnja istraživanja kako bi se razjasnila moguća uloga ovog mikotoksina u razvoju mikotoksikoza u ljudi i životinja.

LITERATURA

1. Hamill RK, Higgins CE, Boaz HE, Gorman M. The structure of beauvericin: a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett* 1969;49:4255-8.
2. Bernardini M, Carilli A, Pacioni G, Santurbano B. Isolation of beauvericin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry* 1975;14:1865.
3. Nilanonta C, Isaka M, Kittakoop P, Palittapongarnpim P, Kamchonwongpaisan S, Pittayakhajonwut D, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. Antimicrobial and antiplasmodial cyclodepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. *Planta Med* 2000;66:756-8.
4. Doel BS, Ridley DD, Singh P. Isolation of cyclodepsipeptides from plant pathogenic fungi. *Australian J Chem* 1978;31:1397-9.
5. Gupta S, Montllor C, Hwang YS. Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. *J Nat Prod* 1995;58:733-8.
6. Nilanonta C, Isaka M, Kittakoop P, Trakulnaleamsai S, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. Precursor-directed biosynthesis of beauvericin analogs by the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. *Tetrahedron* 2002;58:3355-60.
7. Fukuda T, Arai M, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Omura S. New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Beauveria sp.* FKI-1366. Taxonomy, fermentation isolation and biological properties. *J Antibiot* 2004;57:110-6.
8. Namatame I, Tomoda H, Si SY, Yamaguchi Y, Masuma R, Omura S. Beauveriolides, specific inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages, produced by *Beauveria sp.* FO-6979. *J Antibiot* 1999;52:1-6.
9. Platner RD, Nelson PE. Production of beauvericin by a strain of *Fusarium proliferatum* isolated from corn fodder for swine. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:3894-6.
10. Ojcius DM, Zychlinsky A, Zheng LM, Young JD. Ionophore-induced apoptosis: a role of DNA fragmentation and calcium fluxes. *Exp Cell Res* 1991;197:43-9.
11. Benz R. Alkali ion transport through lipid bilayer membranes mediated by enniatin A and B and beauvericin. *J Membr Biol* 1978;43:367-94.
12. Castelbury LA, Sutherland JB, Tanner LA, Henderson AL, Cerniglia CE. Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 1999;15:119-21.
13. Gupta S, Krasnoff SB, Underwood NL, Renwick JAA, Roberts DW. Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme var. subglutinans*. *Mycopathologia* 1991;115:185-9.
14. Grove JF, Pople M. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia* 1980;70:103-5.
15. Di Paola R, Nenna S, Fornelli F, Moretti A, Logrieco A, Caiuffa MF, Bottalico A, Tursi A, and Macchia L.

- Cytotoxicity of beauvericin on human B-lymphocyte cell lines. *Allergy Clin Immunol News* 1994;2:256.
16. Harnois DM, Que FG, Celli A, Larusso NF, Gores GJ. Bcl-2 is overexpressed and alters the threshold for apoptosis in a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology* 1997;26:884-90.
 17. Que FG, Gores GJ, Larusso NF. Development and initial application of an *in vitro* model of apoptosis in rodent cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997;35:G106-15.
 18. Lemmens-Gruber R, Rachoy B, Steininger E, Kouri K, Salch P, Krška R, Josephs R, Lemmens M. The effect of the *Fusarium* metabolite beauvericin on the electromechanical and physiological properties in isolated smooth and heart muscle preparations of guinea pigs. *Mycopathologia* 2000;149:5-12.
 19. Ovchinnikov YA, Ivanov VT, Mikhaleva II. The synthesis and some properties of beauvericin. *Tetrahedron Lett* 1971;2:159-62.
 20. Moretti A, Logrieco A, Botalico A, Ritieni A.A, Randazzo G, Corda P. Beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from different geographical areas. *Mycological Res* 1995;99:282-6.
 21. Genthner FJ, Cripe GM, Crosby DJ. Effect of *Beauveria bassiana* and its toxins on *Mysidopsis bahia* (Mysidacea). *Arch Environ Contam Toxicol* 1994;26:90-4.
 22. Fornelli F, Minervini F, Logrieco A. Cytotoxicity of fungal metabolite to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *J Invertebr Pathol* 2004;85:74-9.
 23. Calo L, Fornelli F, Ramires R, Nenna S, Tursi A, Caiaffa MF, Macchia L. Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin. *Pharmacol Res* 2004;49:73-7.
 24. Fotso J, Smith JS. Evaluation of beauvericin toxicity with the bacterial bioluminescence assay and the Ames mutagenicity bioassay. *J Food Chem* 2003;68:1938-41.
 25. Pocsfalvi G, Dilanda G, Ferranti P, Ritieni A, Randazzo G, Malorni A. Observation of non-covalent interactions between beauvericin and oligonucleotides using electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Comm Mass Spectrom* 1997;11:265-72.
 26. Dombrink-Kurtzman MA. Fumonisin and beauvericin induce apoptosis in turkey peripheral blood lymphocytes. *Mycopathologia* 2003;156:357-64.
 27. Tomoda H, Huang XH, Cao J, Nishida H, Nagao R, Okuda S, Tanaka H, Omura S, Arai H, Inoue K. Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity by cyclodepsipeptide antibiotics. *J Antibiot* 1992;45:1626-32.
 28. Prince RC, Crofts AR, Steinrauf LK. A comparison of beauvericin, enniatin and valinomycin as calcium transporting agents in liposomes and chromatophores. *Biochem Biophys Res Comm* 1974;59:697-703.
 29. Roeske RW, Isaac S, King TE, Steinrauf LK. The binding of barium and calcium ions by the antibiotic beauvericin. *Biochem Biophys Res Comm* 1974;57:554-61.
 30. Nakajyo S, Matsouka K, Kitayama T, Yamamura Y, Shimizu K, Kimura M, Urakawa N. Inhibitory effect of beauvericin on a high K⁺-induced tonic contraction in guinea-pig taenia coli. *Jpn J Pharmacol* 1987;45:317-25.
 31. Wu SN, Chen H, Liu YC, Chiang HT. Block of L-type Ca²⁺ current by beauvericin, a toxic cyclopeptide, in the NG 108-15 neuronal cell line. *Chem Res Toxicol* 2002;15:854-60.
 32. Kouri K, Lemmens M, Lemmens-Gruber R. Beauvericin-induced channels in ventricular myocytes and liposomes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2003;1609:203-10.
 33. Logrieco A, Moretti A, Ritieni A, Chelkowski J, Altomare C, Botalico A, Randazzo G. Natural occurrence of beauvericin in preharvested *Fusarium subglutinans* infected corn ears in Poland. *J Agric Food Chem* 1993;41:2149-52.
 34. Ritieni A, Moretti A, Logrieco A, Botalico A, Giacomo R, Monti SM, Ferracane R, and Fogliano V. Occurrence of fusaproliferin, fumonisin B₁ and beauvericin in maize from Italy. *J Agric Food Chem* 1997;45:4011-4016.
 35. Munkvold G, Stahr HM, Logrieco A, Moretti A, Ritieni A. Occurrence of fusaproliferin and beauvericin in *Fusarium*-contaminated livestock feed in Iowa. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3923-6.
 36. Shepard GS, Sewram V, Nieuwoudt TW, Marasas WFO, Ritieni A. Production of the mycotoxins fusaproliferin and beauvericin by South African isolates in the *Fusarium* section Liseola. *J Agric Food Chem* 1999;47:5111-5.
 37. Jurjević Ž, Solfrizzo M, Cvjetković B, De Girolamo A, Visconti A. Occurrence of beauvericin in corn from Croatia. *Food Technol Biotechnol* 2002;40:91-4.
 38. Botalico A, Logrieco A, Ritieni A, Moretti A, Randazzo G, Corda P. Beauvericin and fumonisin B₁ in preharvest *Fusarium moniliforme* maize ear rot in Sardinia. *Food Addit Contam* 1995;12:599-607.
 39. Logrieco A, Rizzo A, Ferracane R, Ritieni A. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:82-5.
 40. Logrieco A, Botalico A, Mule G, Moretti A, Perrone G. Epidemiology of toxigenic fungi associated mycotoxins from some Mediterranean crops. *Eur J Plant Pathol* 2003;109:645-67.

41. Jurjević Ž, Solfrizzo M, Cvjetković B, Avantaggiato G, Visconti A. Ochratoxin A and fumonisins (B₁ and B₂) in maize from Balcan nephropathy endemic and non endemic areas of Croatia. *Mycot Res* 1999;15:67-80.
42. Logrieco A, Moretti A, Altomare C, Bottalico A, Torres EC. Occurrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from Peruvian maize. *Mycopathologia* 1993;122:185-90.
43. Moretti A, Logrieco A, Bottalico A, Ritieni A, Randazzo G. Production of beauvericin by *Fusarium proliferatum* from maize in Italy. *Mycot Res* 1994;10:73-8.
44. Logrieco A, Moretti A, Castella G, Kostecki M, Golinski P, Ritieni A, and Chelowski J. Beauvericin production by *Fusarium species*. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3084-8.
45. Abbas HK, Cartwright RD, Xie W, Mirocha CJ, Richard JL, Dvorak TJ, Sciumbato GL, Shier WT. Mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolates from rice with *Fusarium* sheat rot disease. *Mycopathologia* 1999;147:97-104.
46. Srobarova A, Moretti A, Ferracane R, Ritieni A, Logrieco A. Toxigenic *Fusarium* species of *Liseola* section in preharvest maize ear rot and associated mycotoxins in Slovakia. *Eur J Plant Pathol* 2002;108:299-306.

Summary

BEAVERICIN: CHEMICAL AND BIOLOGICAL ASPECTS AND OCCURRENCE

Beauvericin (BEA) is a cyclic hexadepsipeptide produced by *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces tenuipes*, *Polyporus sulphurous*, and a variety of *Fusarium* species. This mycotoxin shows antimicrobial, insecticidal, cytotoxic, and apoptotic activity. It is the most potent specific inhibitor of cholesterol acyltransferase and possesses ionophoric properties. BEA increases ion permeability in biological membranes by forming a complex with essential cations (Ca^{2+} , Na^+ , K^+), which may affect the ionic homeostasis. BEA has been frequently found in maize samples in Europe, USA and Africa and co-contamination with other *Fusarium* toxins such as fumonisins, and moniliformin was also found. There is only one report of BEA occurrence and co-occurrence with fumonisin B₁, fumonisin B₂ and ochratoxin A in Croatia. Biological activity of BEA may increase the toxicity of other mycotoxins that co-occur with BEA in food. The role of BEA in the development of human and animal mycotoxicosis is still unknown.

KEY WORDS: antimicrobial activity, apoptosis, cytotoxicity, essential cations, *Fusarium*, maize

REQUESTS FOR REPRINTS:

Maja Šegvić Klarić
Zavod za mikrobiologiju
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Schrottova 39, HR-10000 Zagreb, Hrvatska
E-mail: msegvic@net.hr