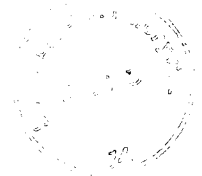


Ph.D. értekezés tézisei



**Hatékony módszerek *Fusarium* fajok trichotecén-vázás
toxinjainak (DON, NIV), szteroid- és zsírsavprofiljának
vizsgálatára és a gombafertőzöttség objektív
meghatározására**

LAMPER CSILLA

Témavezető:

Prof. Dr. Mesterházy Ákos
egyetemi magántanár

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi Kar

2001

1. BEVEZETÉS

A mikotoxinok mindmáig súlyos problémát okoznak az egész világon, annak ellenére, hogy az elmúlt húsz év alatt igen magas színvonalú kutatómunka folyt az egészséges élelmiszerek gyártása és biztonságos tárolása területén a helyzet felmérésére, valamint a távlati megoldások kidolgozása felé. A mikotoxikózisok a penészgombák mérgező másodlagos anyagcseretermékei által okozott, az egész világon a legkülönbözőbb megnyilvánulási formában előforduló, fertőzött táplálék vagy takarmány által közvetített megbetegedések. A mikotoxinokról szóló toxikológiai ismeretek elegendő súllyal tanúsítják, hogy erősen mérgező hatású anyagokról van szó. A penészgombák által termelt mikotoxinok lényegesen rontják a takarmányhasznosítást, erőteljesen és hátrányosan befolyásolják a szaporodási folyamatokat, a trichotecénvázis mikotoxinok pedig károsítják az immunrendszert és a parenchimas szerveket. Az elmúlt 15-20 év kutatómunkája eredményeként lényegesen többet tudunk a mikotoxinokról, hatásmechanizmusukról és veszélyességükről is. Az elmúlt évtized metodikai fejlődése a toxinok kimutatási határát lényegesen csökkentette, az eddig negatívnak minősített mintákból is kimutathatókká váltak, így a humán- és állategészségügyi kockázat pontosabb megítélésére szubakut dózisok esetében is lehetőség nyílik.

Hazánkban az egyéb gombakórokozók mellett a polifág *Fusarium* fajok a növények fejlődésének különböző szakaszaiban, azok legkülönbözőbb részeit fertőzve, endémiás járványokat előidézve okoznak különösen komoly veszteséget az agrárgazdaságnak. A *Fusarium* fajok által termelt mikotoxinok közül a trichotecén-vázás dezoxinivalenol (DON, vomitoxin) különös figyelmet érdemel, mivel a betegség (fuzariózis, scab) kialakulása során a legnagyobb mennyiségben detektálható.

A szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht-ban több éve folyó növénynemesítési és kórtani munka keretein belül a hazai környezeti feltételek mellett megfelelő *Fusarium* rezisztenciát mutató búza fajták nemesítése az egyik fő cél. A *fuzáriumok* okozta megbetegedés mértékének megállapítása céljából a vizuálisan meghatározható szemfertőzöttségi értékeket (bonitálás) objektív, jól reprodukálható és érzékeny műszeres analitikai vizsgálatokkal meghatározott DON értékekkel szükséges alátámasztani, ezért a mikotoxin meghatározási eljárások fejlesztése vitathatatlanul fontos. A műszeres analitikai módszerekkel detektált DON szint alapján, valamint a vizuálisan megállapított kalász- és szemfertőzöttségi értékek birtokában a rezisztencianemesítési munka kísérlettervezési irányvonala megalapozottabbá tehető, hatékonysága növelhető.

Az utóbbi néhány évben a HACCP rendszer és vele összefüggésben a prediktív mikrobiológia egyre nagyobb

jelentőségre tesz szert. Az EU jogszabályozási harmonizáció keretein belül, a 17/1999 (II. 10.) FVM - EüM együttes rendelete az élelmiszeriparban 2002. január 1.-vel a Veszélyek Elemzése Kritikus Irányítási Pontok (Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP) rendszer (illetve egyes elemeinek) kötelező alkalmazását írja elő. Mint ismeretes, a HACCP rendszer működtetése során a prevencióra helyezzük a hangsúlyt, tehát a feldolgozásra kerülő alapanyagok minősítése is elengedhetetlen tényező lesz. A malmok és takarmánykeverők felvásárlási rendszereiket úgy fogják módosítani, hogy a gabonafélék átvételekor az eddig fontosnak ítélt paraméterek mellett a toxintartalmat is deklarálni fogják.

A búza szántóföldi eredetű gombafertőzöttségének előrejelzésére számos hagyományos módszer áll rendelkezésre, de ezek általában idő - és vegyszerigényesek, ezért sorozatvizsgálatok céljára nem alkalmasak. A szakirodalom szerint az ergoszterin tartalom alapján történő gombabiomassa meghatározás alkalmas lehet a *fuzariumok* által szintetizált DON mennyiségének előrejelzésére is, így lehetővé válik a legkisebb mikrobiológiai kockázat vállalása. A vizsgálati mintákban detektálható ergoszterin szint alapján négy minőségi osztályt alakítottak ki, melyek magukban foglalják az élelmiszeripari és takarmányozási felhasználásra alkalmas szinteket, valamint deklarálják a továbbfeldolgozásból történő kizárás határértékét és adott esetben a multitoxin analízis

kötelező végrehajtását is. Az EU-ban a Francia Szabványügyi Hivatal kezdeményezte először az állati eledel mikológiai minősítésének a bevezetését az ergoszterin tartalom meghatározása alapján. Az 1993-1997 között publikált tudományos közlemények a DON és az ergoszterin közötti kapcsolatot eltérően jellemzik, ezért a minősítő rendszerek helytállóságának vizsgálata, valamint hazai adaptálási lehetőségének felmérése rendkívül időszerű, mert hazánkban cereáliákból meglehetősen sokat fogyasztunk.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A *Fusarium* fertőzött búza dezoxinivalenol (DON) tartalmának meghatározására irányuló, gyors, jól reprodukálható, érzékeny nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszer kidolgozása, különös tekintettel a mintatisztítás lépéseire.

2.2. Új, érzékeny analitikai módszer kidolgozása a hatósági ellenőrzések és a növénynevelési kutatómunka során (F1 nemzedék) kis mennyiségben rendelkezésre álló minták DON és NIV (nivalenol) tartalmának kapilláris elektroforézissel (CE) történő meghatározására.

2.3. A *Fusarium* fertőzött búza ergoszterin tartalmának meghatározására irányuló GC/MS módszer kidolgozása.

2.4. A vizuálisan meghatározható szemfertőzöttség valamint a műszeres analitikai vizsgálatokkal meghatározható DON és ergoszterin tartalom közötti kapcsolat vizsgálata, majd ennek ismeretében a minőségi kategóriák alkalmazhatóságának vizsgálata.

2.5. A természetes körülmények között kialakuló, fertőzéseket okozó *Fusarium* fajok identifikálási lehetőségének vizsgálata az egyes *Fusarium* fajok szteroid- és zsírsavprofiljának együttes felvételére kidolgozott GC/MS technikával.

3. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

3.1. A dezoxinivalenol (DON) örölt búzaszem mintamátrixtól történő elválasztását acetonitril (ACN) /víz (86/14 v/v) extraháló elegyével végeztük. Az extraktumban található, kimutatást zavaró komponenseket (pl. pigmentek) szilárd fázisú extrakcióval (SPE) távolítottuk el. A laboratóriumi körülmények között készített SPE oszlopok töltete aktív szén/alumínium oxid 1/20 m/m arányú keverékből állt. Az átlagos visszanyerési érték 91,77 % volt. Az RP-

HPLC elválasztás során, Hypersil ODS C18 oszlopon az általunk kidolgozott grádiens elúciót alkalmazva (ACN, víz), diódasoros UV (220 nm) detektálás mellett a DON retenciós ideje 5,55 percre volt csökkenthető.

3.2. A DON és NIV kapilláris elektroforézises (CE) elválasztási módszerének kidolgozása során a búzaszem mintamátrixból extrahált mikotoxinok ún. nyers és szilárd fázisú extrakcióval (SPE) koncentrált mintáinak analízisét végeztük el, az általunk bizonyítottan jó hatásfokkal működő SPE oszlop (aktív szén/alumínium oxid 1/20 m/m) felhasználásával. A mikotoxinok extrahálása a minta visszaoldásától eltekintve az RP-HPLC elválasztásnál már ismertetett elv szerint történt. Az extrakciót követő bepárlás után az extraktumot acetonitrillel (ACN) visszaoldottuk, majd 85 mM (pH= 9,2) borát pufferrel történő hígítás után, membránszűrést követően végeztük el a CE elválasztást.

3.3. Az ergoszterin kimutatásának első lépése a búzaszem őrlemény KOH-os elszappanosítása (80 °C, 90 perc), majd n-hexánnal történő extrakciója volt. Az apoláris fázisokat bepároltuk, majd a GC mintaadagoló fioláiban származékot képeztünk. A GC/MS meghatározáshoz a szililezést N,O-bis (trimetilszilil) trifluoracetamid (BSTFA) / 2 % (v/v) trimetilklórszilán (TMCS) elegyével

blokktermosztátban végeztük. A GC/MS meghatározás során hélium vivőgázt alkalmaztunk, nyomás és oszloptermosztát fűtési programot kidolgozva, szelektív ion figyelési módot (SIM) alkalmazva. Természetesen a rendelkezésre álló ergoszterin sztenderd előzetes, GC/MS (EI, SCAN) vizsgálatát is elvégeztük, így a jellegzetes molekula (m/z 468) és fragmens ionok (m/z 337, 363) kiválaszthatók voltak.

3.4. A *Discolor*, *Sporotrichiella* és *Liseola* szekcióba sorolható, 15 *Fusarium* faj szteroid és zsírsav profiljának együttes meghatározásához az ergoszterin elválasztására kidolgozott GC/MS (EI, SIM) módszert alkalmaztuk. A laboratóriumi körülmények között Czapek-Dox tápközegben előállított *Fusarium* tenyészetekből származó micéliumok elszappanosítását (KOH) n-hexánnal végzett extrakció követte. Az apoláris fázisok bepárlása után a minták szililezése következett N,O-bis(trimetilszilil) trifluoracetamid (BSTFA) / 2 % (v/v) trimetilklórszilán (TMCS) elegyével, blokktermosztátban. A rendelkezésünkre álló, származékképzett sztenderd komponensek GC/MS (EI, SCAN) tömegspektrumai alapján kiválasztottuk a GC/MS (EI, SIM) mérésekhez a tömegspektrométer által figyelendő, jellemző molekula és/vagy fragmens ionokat (tetradekánsav: m/z 300, 285, hexadekánsav: m/z 328, 313, olajsav: m/z 354, 339, oktadekánsav: m/z 356, 341,

ejkozánsav: m/z 384, 369, dokozaánsav: m/z 412, 397, tetrakozánsav: m/z 440, 425, ergoszterin: m/z 363, 337).

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

4.1. A laboratóriumi sorozatvizsgálatok elvárásait kielégítő, gyors, jól reprodukálható RP-HPLC módszert dolgoztunk ki a DON gabonafélékből történő kimutatására. Az új módszerrel a rendkívül költséges mintatisztítás lépését egyszerűsítve, laboratóriumi körülmények között tölthető SPE oszlopot teszteltem, mely biztosította a nagyműszeres elválasztáshoz szükséges mintatisztaságot is. A módszer megbízhatóságát a 1999-2000 között elvégzett mintegy 2000 búzaminta analízise során kapott eredmény is igazolta.

4.2. Új, rendkívül érzékeny kapilláris elektroforézis módszert dolgoztunk ki a gabonafélék DON és NIV tartalmának meghatározására. A módszer érzékenységének és elválasztási hatékonyságának köszönhetően (nl mintamennyiség) alkalmas nemcsak szilárd-fázisú extrakcióval tisztított hanem ún. nyers kivonatok direkt analízisére is. Az ún. nyers extraktumok esetében a DON és NIV kvantitatív meghatározásakor a kimutathatósági határ

350 ill. 875 $\mu\text{g}/\text{kg}$ volt, míg az általam tesztelt SPE oszlop közbeiktatásával 70 ill. 175 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -ra volt csökkenthető.

4.3. Négy eltérő *Fusarium* rezisztenciával rendelkező búzafajta, különböző patogenitású *F. graminearum* és *F. culmorum* izolátumokkal történt mesterséges fertőzését követően, a vizuálisan meghatározott szemfertőzöttség (bonitálás, %), valamint az RP-HPLC technikával meghatározott DON (mg/kg) és a GC/MS (EI, SIM) eljárással mért ergoszterin (mg/kg) tartalom között igen szoros, pozitív korrelációt tudunk kimutatni ($r= 0,8737; 0,8945, 0,8981$).

4.4. A DON RP-HPLC elválasztására kidolgozott módszerrel, valamint az általunk kidolgozott ergoszterin GC/MS (EI, SIM) meghatározásra irányuló módszerrel és a 3. pontban igazolt, rendkívül szoros korreláció ismeretében bebizonyítottuk, hogy az ergoszterin tartalom alapján felállított minőségi kategóriák megbízhatósága megfelelő, ezért a rendszer segítségével predikciót tudunk tenni a jelenlévő DON mennyiségére is.

4.5. A zsírsavak és szteránvázis vegyületek együttes GC/MS analízisének kidolgozásával felvázoltuk az egyes *Fusarium* fajok és izolátumok teljes zsírsav- és szteroidprofilját. Megállapítottuk, hogy a különböző *Fusarium* szekciókba besorolt fajok kemotaxonomiai differenciálása a szteroidprofil alapján nem lehetséges, nemzetségek

között azonban igen. Az ochratoxint termelő *Aspergillusok* szteroidprofilja azt mutatja, hogy az ergoszterin mellett a minor szteroidok hiányoznak, tehát ezek jelenléte természetes szubsztrátumon *Fusarium* szennyezettséget valószínűsít. A zsírsavak tekintetében a *Discolor* szekcióban a *F. graminearum* és *F. culmorum* egységes képet mutat. Az egyéb *Fusariumok* esetében egyértelmű azonosságot nem tudtunk kimutatni.

A GYAKORLATI HASZNOSÍTÁS LEHETŐSÉGEI

Korunk korszerű minőségellenőrzési rendszereinek a gyors, jól reprodukálható és rendkívül érzékeny műszeres analitikai módszerekre kell épülniök, mert csak így valósítható meg a HACCP rendszerek alapkövetelménye, a prevenció. A hatósági minőségellenőrző műszercentrumok adta lehetőségek kihasználása érdekében új, szabványos és az EU elvárásoknak is megfelelő műszeres analitikai módszereket kell alkalmazni.

Mindezek figyelembevételével olyan analitikai módszereket (RP-HPLC, CZE, GC/MS) dolgoztunk ki, melyek nagy segítséget nyújthatnak a korszerű minőségellenőrzésben, gyorsaságuk és rendkívüli érzékenyséjük miatt. A bemutatott műszeres analitikai eljárások kidolgozásakor tekintettel voltunk arra, hogy a lehető

legegyszerűbb mintaelőkészítést alkalmazva, rövid analízis idő alatt hatékony elválasztást érjünk el.

Mérési eredményeink több aspektusból is alátámasztották azt a feltevésünket, hogy a szántóföldi eredetű penészgomba megbetegedések előrejelzésére az ergoszterin tartalom meghatározása jól alkalmazható, aminek tükrében a gomba által szintetizált mikotoxin (DON) mennyiségére is következtethetünk. A módszer az EU normákhoz igazodó, megbízható, jól reprodukálható eredményt ad, így szabványosítására is van lehetőség.

A *Fusarium* fajok esetében vizsgált szteroid és zsírsav profil alapján egyértelmű kemotaxonómiai azonosítás nem lehetséges, de a szántóföldi (preharvest) és raktári (postharvest) fonalagomba nemzetségekre kiterjedő, szteroidprofil meghatározására irányuló későbbi vizsgálatainktól - a más génuszokra is vonatkozó előzetes méréseinket figyelembe véve - várható, hogy a teljes szteroid- és zsírsavprofil alapján az egyes nemzetségek egyértelműen megkülönböztethetők, tehát azonosíthatók lesznek. A szteroidprofil vizsgálatának jelentőségét növeli az a tény, hogy a növénytermesztésben elterjedten alkalmazott azo típusú fungicidek (propikonazol, tebukonazol) a patogén gombák szteroid szintézisét befolyásolják, tehát a profil változása a gombaölőszer hatékonyságát is jelzi.

Az értekezés témakörében megjelent publikációk

Komoróczy, R., Lamper, Cs., Bartók, T., Mesterházy, Á., Sági, F.: Determination of amatoxins and phallotoxins by CZE., ACE, 1: 95-104 (1998).

Lamper, Cs., Téren, J., Bartók, T., Komoróczy, R., Mesterházy, Á., Sági, F.: Predicting DON contamination in Fusarium-infected wheat grains via determination of the ergosterol content. Cereal Res. Commun. 28: 337-344 (2000).

Mesterházy Á., Bartók T., Lamper Cs.: Influence of cultivar resistance, epidemic severity, aggressiveness of Fusarium isolates and weather on the efficacy of fungicides against Fusarium head blight and DON contamination in wheat. Plant Disease (megjelenés alatt, 2001).

Varga, J., Rigó, K., Téren, J., Lamper, Cs., Szabó, G.: Examination of ochratoxin A production in different Aspergillus species. Mycopathologia (előkészítés alatt 2001).

Egyéb publikációk, előadások

Berek, I., Lamper, Cs.: Kergemarhakór – prionok – molekuláris biológiai alapjai. Magyar Biológiai Társaság Szegedi csoportjának 334. Ülése, Szeged, 1996. június 13.

Berek, I., Lamper, Cs.: Prionok – állati és emberi betegségek – élelmiszeripari vonatkozások. MTA ÉKB Élelmiszer-mikrobiológiai Munkabizottság, Budapest, 1996. szeptember 18.

Lamper, Cs., Berek, I.: Különleges gombák szerepe a paramedicinális termékek előállítására területén. Vas Károly Tudományos Ülésszak, KÉE Budapest, 1996. November 22.

Lamper, Cs., Berek, I.: Role of special mushrooms in obtaining paramedicinal food products. *Acta Alimentaria* 26: 305 (1997).

Bartók, T., Komoróczy, R., Lamper, Cs.: Mikotoxinok HPLC elválasztása. Magyar Kémikusok Egyesülete Csongrád Megyei Csoportja, XXIX. Kromatográfiai Továbbképző Tanfolyam, Szeged, 1998. január 28-30.

Bartók, T., Komoróczy, R., Lamper, Cs., Kalász, H., Sági, F.: Amfetamin és származékai HPLC/ES-MS meghatározása. Magyar Elválasztástudományi Társaság Elválasztástudományi Vándorgyűlés '98, Lillafüred, 1998. szeptember 30.-október 2.

Lamper, Cs., Komoróczy, R., Bartók, T., Mesterházy, Á., Téren, J., Sági, F.: Tetraciklikus trichotecén mikotoxinok (NIV, DON) CZE meghatározása búzában. Magyar Elválasztástudományi Társaság Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Lillafüred, 1998 szeptember 30. - október. 2.

Bartók, T., Komoróczy, R., Lamper, Cs., Sági, F.: HPLC/ES-MS. Magyar Kémikusok Egyesülete Kromatográfiai Anket '98, Budapest, 1998. december 1.

Lamper, Cs., Bartók, T., Téren, J., Mesterházy, Á., Sági, F.: Ergosterol - an indicator of unwanted fungal growth in *Fusarium* - infected wheat grain. Possibilities for prediction of mycotoxin contamination. *Proceedings of Euro Food Chem X*, 22-24 September, Budapest, Volume 2: 521 (1999).

Lamper, Cs., Téren, J., Bartók, T.: Ergoszterin meghatározás jelentősége a prediktív mikológiában. XIII. Élelmiszer Minőségellenőrzési Tudományos Konferencia, Székesfehérvár, 2000. október 25.-26.

Varga, J., Rigó, K., Bartók, T., Lamper, Cs., Téren, J.: Examination of ochratoxin production in *Aspergillus albertensis*. Bioactive Fungal Metabolites - Impact and Exploitation, University of Wales Swansea, 22-27th April (2001).

Lamper Cs.: *Fusarium* fertőzöttség - gombatoxin - ergoszterin. SZAB Biokémiai és Élelmiszerkémiai Munkabizottsága, Magyar Kémikusok Egyesülete Csongrád Megyei Csoportja , Szeged, 2001. május 2.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

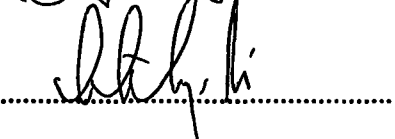
Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.

Dátum 2001. május.....

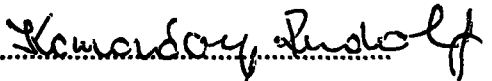
Bastók Tibor.....



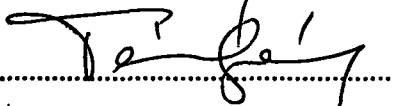
Dr. Mastervházy Tamas.....



Komoróczy Rudolf.....



Dr. Teren József.....



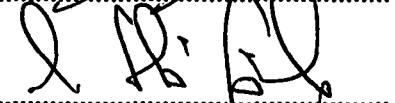
Dr. Sági Ferenc.....



Dr. Varga János.....



Dr. habil Szabó Gábor.....



Rigó Krisztina

