

dc_253_11

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Új fumonizin mikotoxinok azonosítása
HPLC/MS módszerekkel

Bartók Tibor

Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar
Élelmiszermérnöki Intézet

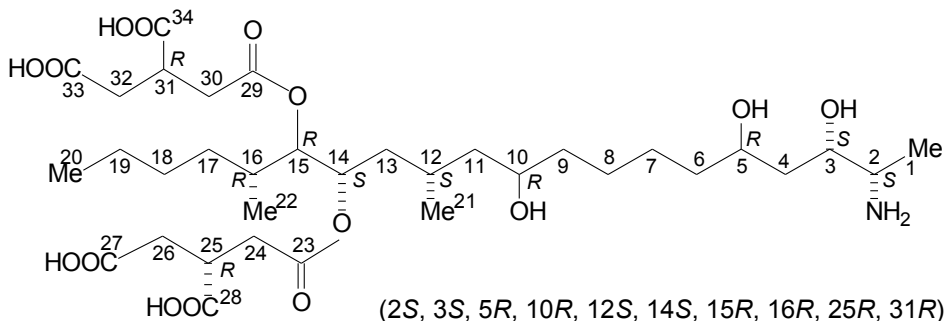
2011

A szántóföldi- és raktári penészgombafajok számos mikotoxint képesek szintetizálni, amelyek ezen fajok extracellulárisan kiválasztódó másodlagos anyagcseretermékei. A mikotoxinok biológiai szempontból igen sokfélék, hiszen egyazon mikotoxint számos egymással nem rokon gombafaj is képes termelni (pl. az ochratoxinokat egyes *Aspergillus* és *Penicillium* fajok, vagy a fumonizineket egyes *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* és *Tolypocladium* fajok), egy adott faj azonban termelhet többféle mikotoxint is (pl. *A. niger* ochratoxinokat és fumonizineket, *A. flavus* aflatoxinokat és kojisavat).

Ma már több száz mikotoxint ismerünk, közülük azonban viszonylag kevés okozhat jelentős humán- és állat-egészségügyi problémát. A legveszélyesebbnek számító mikotoxinok az aflatoxinok, az ochratoxin-A, a trichotecén-vázás mikotoxinok (pl. dezoxinivalenol, nivalenol, T-2, HT-2), a zearalenon és származékai és a jelen értekezés tárgyát képező fumonizinek. Az említett mikotoxinok kémiai szerkezetüktől függően már igen alacsony koncentrációban (ng/g-µg/g) is citosztatikus, citotoxikus, immunszuppresszív, mutagén, ösztrogén-mimetikus, rákkeltő és teratogén hatással rendelkeznek és mindezek mellett károsítják a fehérjebioszintézist, az idegrendszert és a parenchimas szerveket is. Nem szabad figyelmen kívül hagyni azt sem, hogy a szántóföldi növények (elsősorban a kalászos gabonafélék és a kukorica) gombafertőzése miatt bekövetkező minőségromlás jelentős terméseszköket is okoz, ami komoly mértékű bevételkiesést jelent a termelőknek és közvetve a nemzetgazdaságnak is.

Ami a fumonizineket illeti, a fumonizin kutatás jelentősége vitathatatlan, mivel a gombafertőzött kukoricából (a takarmány- és az étkezési kukorica fumonizinszenyezéséért főleg a *F. verticillioideus* és a *F. proliferatum* nevű gombafajok a felelősek) készült termékek fogyasztásában komoly élelmiszerbiztonsági kockázat rejlik. A világ számos országában a kukorica nemcsak a takarmányozásban meghatározó jelentőségű alapanyag, hanem humán célú felhasználása is jelentős és egyre növekszik. A fumonizinek felfedezésének gyakorlati fontossága mellett, elméleti jelentősége is igen nagy, mivel felfedezésünkkel több humán és állati betegség

kóroktanát ismertük meg. Bár még teljességgel nem bizonyított, feltételezik, hogy a fumonizinek emberben is rákkeltő hatásúak. A Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (IARC) a lehetséges karcinogének közé a 2B karcinogén csoportba sorolta (IARC 2002) a legnagyobb mennyiségben képződő fumonizint, az FB₁ toxint (1. ábra).



1. ábra. Az FB₁ toxin szerkezete és a királis szénatomok abszolút konfigurációja.

A fentiek indokolják a fumonizinek terén folyó kutatások sokféleségét: izolálás, azonosítás, kémiai szerkezet meghatározás, bioszintézis, toxicitás, élelmiszer- és takarmánybiztonság, stb. A fumonizin kutatás előtt álló feladatok közül az értekezés az alábbi célkitűzések megvalósításának eddigi eredményeiről számol be.

- 1) Módszert kívántunk kidolgozni a szilárd fermentációs eljárással termelt fumonizinek rutin RP-HPLC/ESI-ITMS meghatározásához;
- 2) Vizsgálni kívántuk a Magyarországon különböző termőhelyeken, különféle növényfajokról begyűjtött és egyéb forrásból származó számos *F. verticillioides* izolátum *in vitro* fumonizin (FB₁₋₄) termelőképességét;
- 3) Választ szeretnénk volna kapni arra a kérdésre, hogy a kiválasztott – jó FB₁₋₄-termelőképességgel rendelkező – *F. verticillioides* izolátum termel-e egyéb még nem publikált fumonizineket;
- 4) Miután az előzetes mérések alapján egy viszonylag meredek grádiens HPLC elválasztást alkalmazva számos új fumonizint azonosítottunk, módszert (RP-HPLC/ESI-ITMS és TOFMS) kívántunk kidolgozni a fumonizin izomerek minél hatékonyabb elválasztására, a gyártó által izomerek elválasztására javasolt RP-HPLC oszlop és egy kevésbé meredek grádiens elválasztás felhasználásával;

5) Az *Aspergillus niger* fumonizin-termelésével kapcsolatos közlemények alapján vizsgálni kívántuk a begyűjtött mazsola és a fekete rothadás tüneteit is mutató vöröshagymaminták mikrobiotáját és fumonizin-tartalmát.

Annak ellenére, hogy a Marasas professzor vezette dél-afrikai kutatócsoport által leírt fumonizinek (Bezuidenhout mtsai 1988) az egyik legújabban felfedezett mikotoxin csoport, mára – köszönhetően az elválasztástechnikai és tömegspektrometriás eljárások és egyéb szerkezetvizsgálati módszerek hatékonysága és érzékenysége növekedésének – a legtöbb komponenst tartalmazó mikotoxin csoporttá vált. Ezen műszeres eljárások felhasználása és kombinálása (HPLC/MS) tette lehetővé az értekezésben leírt számos új fumonizin azonosítását.

2. VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. A *F. verticillioides* izolátumok begyűjtése, azonosítása, felszaporítása, valamint a fumonizinek *in vitro* termeltetése és kinyerése a tenyészetekből

Az izolátumok begyűjtése, azonosítása, felszaporítása és a fumonizinek termeltetése Dr. Szécsi Árpád tudományos tanácsadó (MTA NKI, Budapest) irányításával történt. Az izolátumok jelentős részét hazánk fő gabonatermesztő területeiről, elsősorban kukoricáról (gyökér, szár, cső, szem) másodsorban egyéb növényfajokról (pl. búza, árpa, rozs, rizs, szeder, komócsin) gyűjtöttük be, de sikerült *F. verticillioides* izolátumokat begyűjteni kullancsról és emberi szemről is. Az egyéb forrásból származó izolátumokkal együtt összesen 60 *F. verticillioides* izolátum állt rendelkezésre a kísérletekhez. A fuzáriumokat a fertőzött mintákról laboratóriumi körülmények között Szécsi és Mesterházy (1998) módszerével izoláltuk. A fajsztínt taxonómiai azonosítást Booth (1971), Nelson és mtsai (1993) és Leslie és mtsai (2006) módszere ill. molekuláris módszerrel (PCR) végeztük (Szécsi és mtsai 2011).

A fumonizineket az azonosított *F. verticillioides* izolátumokkal rizstenyészetben szilárd fermentációs eljárással termeltettük. A termeltetéshez hosszúszemű rizst használtunk (Uncle Ben's), amelyet sterilizálás után mesterségesen fertőztünk a monospóra-eredetű *F. verticillioides* izolátumok konídium szuszpenzióival. A tenyészeteket termosztátban 28 °C hőmérsékleten sötétben 4 hétig inkubáltuk. Az

inkubálás végén a tenyészeteket befagyasztottuk, liofilizáltuk majd porrá őröltük és jól lezárva az analízisig mélyfagyasztoóban tároltuk azokat.

A liofilizált rizstenyészet őrleményeket (3 g) polipropilén (PP) centrifugacsőben (30 ml) MeCN/H₂O (75/25 v/v, 25 ml) elegyével, UltraTurrax T25 típusú homogenizátor felhasználásával homogenizáltuk, majd átfordulós rázógépen extraháltuk azokat. A kivonatok fumonizin B₁₋₄ összetételét centrifugálás és a felülúszó membránszűrése után HPLC/ESI-ITMS módszer felhasználásával közvetlenül analizáltuk.

2.2. Mazsola és vöröshagymaminták begyűjtése, *Aspergillus* fajok izolálása a mintákról és genetikai analízisük

A mikrobióta és a fumonizin vizsgálatokhoz a mazsola- és vöröshagymaminták kiskereskedelmi forgalomból történő begyűjtése, az *Aspergillus* fajok izolálása és genetikai analízise Dr. Varga János egyetemi docens irányításával az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékén történt. A fekete *Aspergillus* fajok izolálásához olyan vöröshagymákat válogattunk ki, amelyeken már látható volt némi fekete elszíneződés is. Egészséges hagymát csak kontrollként, valamint a fumonizinek visszanyerési kísérleteihez alkalmaztunk. A vöröshagymáról történő mintavételhez a hagyma mind külső száraz, mind belső húsos leveleit felhasználtuk.

A felületi sterilizált mazsolákat valamint a hagyma külső buroklevél és belső húsos levél mintáit malátakivonatos diklorán-bengálvörös-kloramfenikol táptalajra (King és mtsai 1979) helyeztük. A lemezeket termosztátban 25 °C hőmérsékleten 7 napig inkubáltuk, és ezt követően a lemezeken kinövő fekete *Aspergillus* telepeket kitisztítottuk, majd malátakivonatos ferdén öntött agaron tartottuk (Samson és mtsai, 2004) és klasszikus taxonómiai módszerekkel azonosítottuk az izolátumokat (Raper és Fennell 1965; Samson és mtsai 2007).

A fekete *Aspergillus* fajok PCR-RFLP azonosításához DNS-üket kivontuk, ITS régiójukat amplifikáltuk (White és mtsai 1990), majd RsaI restrikciós endonukleázzal emésztettük azokat (Accensi és mtsai 1999). Az emésztés eredménye alapján a fekete *Aspergillus* izolátumok két típusba (T és N) sorolhatók. A fumonizin-termelésre képes

fehér *Aspergillus* fajok (*A. niger* és *A. awamori*) az N típusba tartoznak (Accensi és mtsai 1999; Samson és mtsai 2007).

Az N típusú *Aspergillus* izolátumok fajszintű besorolását a kalmódulin gén egy szakaszának szekvencia analízisével, cmd5 és cmd6 primerek alkalmazásával (Hong és mtsai 2006), Samson és mtsai (2007) módszere alapján végeztük. A szekvencia analízist a „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” segítségével kiviteleztük. A szekvenálási reakció termékeit géliszűrővel Sephadex G-50 oszlopon tisztítottuk, és a nukleotid sorrendet az ABI PRISM 310 készülékkel határoztuk meg. A DNS szekvenciák szerkesztéséhez a DNASTAR szoftercsomagot alkalmaztuk. Az illesztéseket és a filogenetikai analízist a MEGA 4.0 szoftverrel végeztük.

2.3. Fumonizinek kinyerése mazsolából, vöröshagyma pormintájából és mazsoláról izolált fekete *Aspergillus* fajokkal fertőzött táptalajmintákból

A mazsola- és a vékony szeletekre vágott, majd liofilizált és porított hagymamintákat is MeOH/H₂O (3/1 v/v) elegyével, UltraTurrax T25 homogenizátor felhasználásával homogenizáltuk, majd átfordulós rázógépen extraháltuk. Az extrakció után a mintákat centrifugáltuk majd PTFE membránszűrőn keresztül a HPLC mintaadagoló fioláiba szűrtük a felülúszókat.

A mazsoláról származó fekete *Aspergillus* izolátumokat CYA20S agar táptalajon 7 napig tenyésztettük (Samson és mtsai 2004). A telepek közepéből agar dugókat metszettünk ki, amelyeket MeOH/H₂O (3/1 v/v) elegyével extraháltunk szintén UltraTurrax T25 homogenizátor felhasználásával, majd a kivonatokat centrifugáltuk és a felülúszókat membránszűrtük.

2.4. Új fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel történő azonosítása és *F. verticillioides* izolátumok FB₁₋₄ toxinprofiljának vizsgálata meredekebb grádiens HPLC elválasztás felhasználásával

A fumonizin kutatásunk megkezdésekor és az azt követő 4 évben a fumonizin vizsgálatokat meredekebb grádiens HPLC elválasztás felhasználásával az MTA Sztereokémiai Kutatócsoportjának, majd a Gabonakutató Non-profit Kft-nek (a

továbbiakban GK Kft.) a műszereivel végeztük. Az előbbi kutatóhelyen az első új fumonizinek azonosítása során Agilent 1100 típusú moduláris HPLC rendszert kapcsoltunk az Agilent 1100 MSD Trap SL típusú, atmoszférikus nyomású elektroporlasztásos (ESI) ionforrással és ioncsapda (IT) tömeganalizátorral felszerelt tömegspektrométerhez (MS), míg a GK Kft laboratóriumában a *F. verticillioides* izolátumok FB₁₋₄ toxinprofiljának vizsgálata során HP 1090 Series II típusú HPLC rendszert illesztettünk a Varian 500-ITMS típusú, szintén ESI ionforrással és IT tömeganalizátorral szerelt MS készülékhez. A méréseket mindkét készüléken pozitív ion módban végeztük. A fumonizinek elválasztásához Supelco ABZ Plus (250x2,1 mm, 5 µm) HPLC oszlopot, valamint „A” (H₂O + 0,1% HCOOH) és „B” (MeCN + 0,1% HCOOH) oldószerek grádiensét (25% B → 40% B 22 perc alatt), 0,3 ml/perc áramlási sebességgel alkalmaztuk.

2.5. Új fumonizin izomerek RP-HPLC/ESI–ITMS és TOFMS módszerrel történő azonosítása kevésbé meredek grádiens elválasztás felhasználásával

Miután a fumonizin vizsgálatok első 4 évében számos új fumonizint sikerült azonosítani a fent említett meredekebb grádiens HPLC elválasztás alkalmazásával, egy a GK Kft. laboratóriumába beszerzett, a gyártó által szerkezeti izomerek elválasztására javasolt HPLC oszlopot (YMC-Pack J'sphere ODS H80; 250x2,1 mm, 4 µm) alkalmazva új, kevésbé meredek grádiens elválasztást dolgoztunk ki az előbb már említett oldószerekkel (24% B → 40% B 79 perc alatt, majd 100% B 15 perc alatt) a HP 1090 Series II típusú folyadékkromatográf és a Varian 500-ITMS tömegspektrométer felhasználásával. Az áramlási sebesség 0,2 ml/perc volt. Ezt a HPLC oszlopot és kevésbé meredek grádiens alkalmaztuk később az ELTE EKOL laboratóriumában is a fumonizin izomerek RP-HPLC/ESI–TOFMS azonosítása során. A TOF (time-of-flight, repülési idő) tömeganalizátor a HPLC oszlopról eluálódó komponensekről pontos tömegértékeket ad, amely jelentős segítség az új vegyületek azonosítása során. A fumonizin izomerek RP-HPLC/ESI–TOFMS vizsgálatához Agilent 1200 típusú moduláris HPLC rendszert és Agilent 6210 típusú ESI–TOFMS készüléket használtunk.

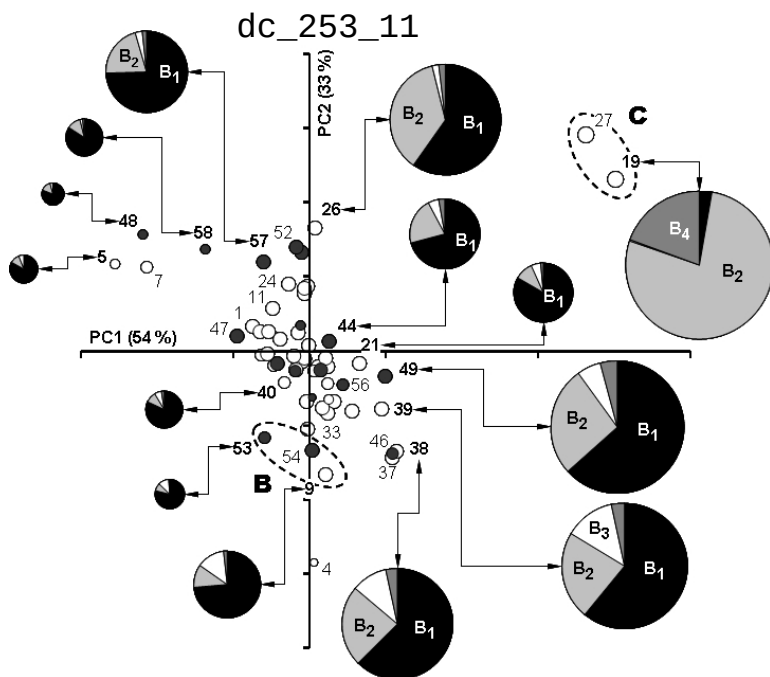
2.6. Mazsola- és vöröshagymaminták fumonizin-tartalmának és mazsoláról izolált fekete *Aspergillus* fajok táptalajon történő fumonizin-termelésének RP-HPLC/ESI-ITMS vizsgálata kevésbé meredek grádiens HPLC elválasztás felhasználásával

A mazsola- és a vöröshagymaminták, valamint a mazsoláról izolált *Aspergillus* fajokat tartalmazó táptalajminták fumonizin összetételének RP-HPLC/ESI-TMS vizsgálata során az előző fejezetben leírt műszeregyüttest (HP 1090 Series II típusú HPLC, Varian 500-ITMS) alkalmaztuk. A mérési paraméterek megegyeztek az ott tárgyaltakkal. Az FB₁ és FB₂ toxinok tekintetében a mazsolával, a vöröshagymával és a mazsoláról izolált fekete *Aspergillus* fajokkal fertőzött táptalajmintákkal is végeztünk visszanyerési vizsgálatokat.

3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az új tudományos eredményeinket ábrákkal is illusztrálva 9 pontban foglalom össze:

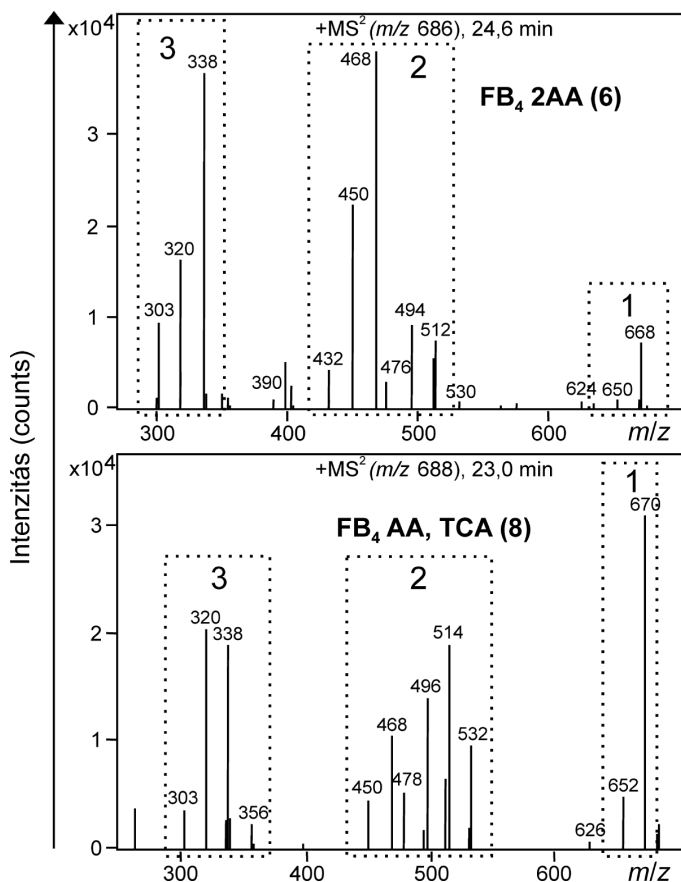
- 1) Együttműködésben folytatott kutatásaink térképezték fel először Magyarországon a *F. verticillioides* elterjedését különböző termőhelyek növényfajairól (főként kukorica) begyűjtött és egyéb-eredetű (légtér, kullancs, emberi szem), összesen 60 izolátum alapján. Az izolátumokkal fertőzött *in vitro* rizstenyészetek meredekebb grádiens alkalmazó RP-HPLC/ESI-ITMS vizsgálatai révén elmondható, hogy az izolátumok az FB₁₋₄ toxinprofil alapján három csoportba voltak besorolhatók. Az izolátumok többségénél (85%) az FB₁₋₄ toxinok mennyiségének a sorrendje az izolátumokban a következő volt: FB₁ > FB₂ > FB₃ > FB₄. Három izolátum több FB₃ toxint termelt, mint FB₂-t, míg két izolátum dominánsan FB₂ toxint termelt és jelentős mennyiségben FB₄-et is (2. ábra). Az eltérő FB₁₋₄ toxinprofilok alapján javasoltuk a fumonizin kemotípus elnevezést [1].



2. ábra. *F. verticillioides* izolátumok főkomponensek szerinti pontdiagramja („scatter plot”). A körök melletti számok a minták azonosító számai. Az üres körök a kukoricáról, míg a tele körök az egyéb-eredetű izolátumokat mutatják. A nagy körök és szektoraik mérete arányos a komponensek átlagos mennyiségével a rizstenyészetben.

2) A kiválasztott rizstenyészet minta – meredekebb grádiens alkalmazó – RP-HPLC/ESI-ITMS vizsgálatával a mások által eddig összesen publikált 31 fumonizinen felül, 2006-ban már **41 új fumonizint és fumonizin izomert sikerült azonosítanunk** (FA, FB, FC, FD és FBX analógok), közöttük olyan komponenseket is amelyeknél a fumonizin vázon lévő egy vagy két OH-csoportot nem a trikarballilsav (továbbiakban TCA), hanem egyéb szerves sav észteresít, úgymint *cisz*-akonitsav (továbbiakban AA), oxálfumársav és oxálborostyánkóssav. Ezt a fumonizin csoportot amelyben 16 új fumonizin található, az FB analógokhoz hasonló szerkezetük miatt FBX-nek neveztük el (lásd pl. a 3. ábrán az egy molekula AA-val és egy molekula TCA-val észterezett FB₄ AA,TCA toxin, valamint a két molekula AA-val észterezett FB₄ 2AA toxin molekulaionjai CID-MS spektrumát). **Az FBX típusú fumonizinek és fumonizin**

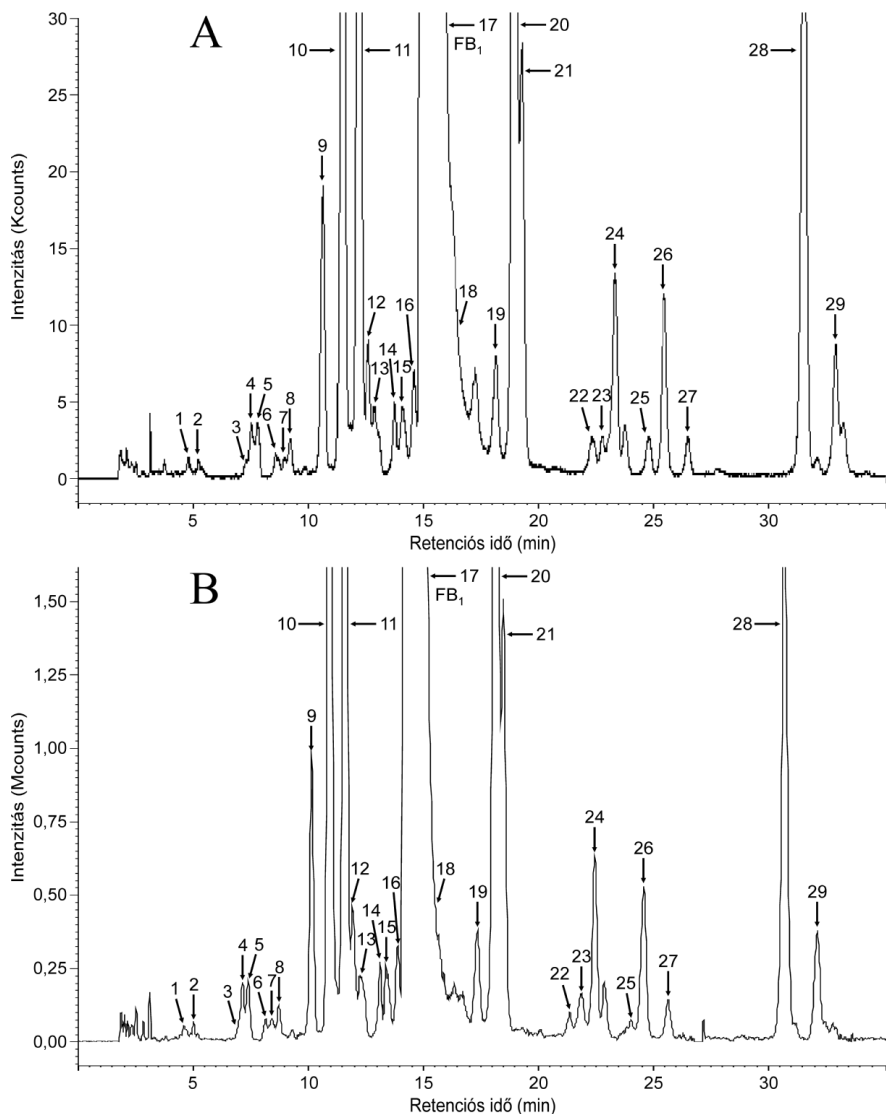
dc 253_11
 prekurzorok azonosításával először igazoltuk a trikarballil-csoportok citrát-ciklus eredetét [2-7].



3. ábra. Az FB₄ 2AA és az FB₄ AA, TCA toxinok molekulaionjai ($[M+H]^+$) CID-MS spektrumai. A két acil-csoportot tartalmazó fumonizinek CID-MS spektrumára jellemző három fragmension csoportot (1-3) a pontozott téglalapok jelzik.

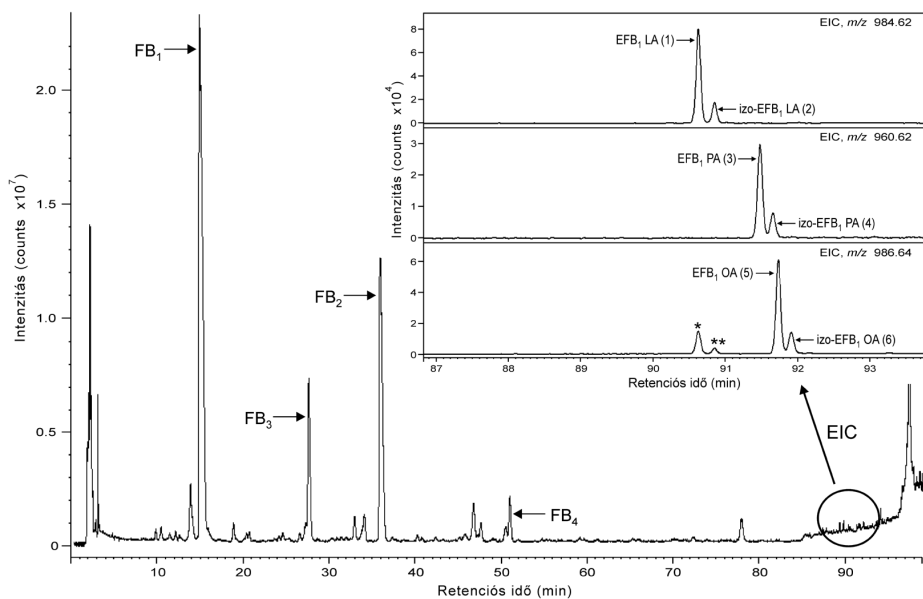
3) A fumonizin izomerek HPLC elválasztására a korábban közltekénél hatékonyabb módszert dolgoztunk ki, a szerkezeti izomerek elválasztására javasolt RP-HPLC oszlop és a korábban alkalmazotthoz képest kevésbé meredek grádiens elúció felhasználásával. Ezzel az oszloppal az **FB₁** (4. ábra) és **FB₅** toxinok 28 [8] ill. 22 [9] izomerjét sikerült elválasztani és ESI-ITMS valamint ESI-TOFMS eljárásokkal azonosítani *F. verticillioide*s izolátummal fertőzött

rizstenyészet kivonatából. A pontos tömegmérésre szolgáló TOFMS módszer először nyert alkalmazást fumonizin izomerek azonosítására.

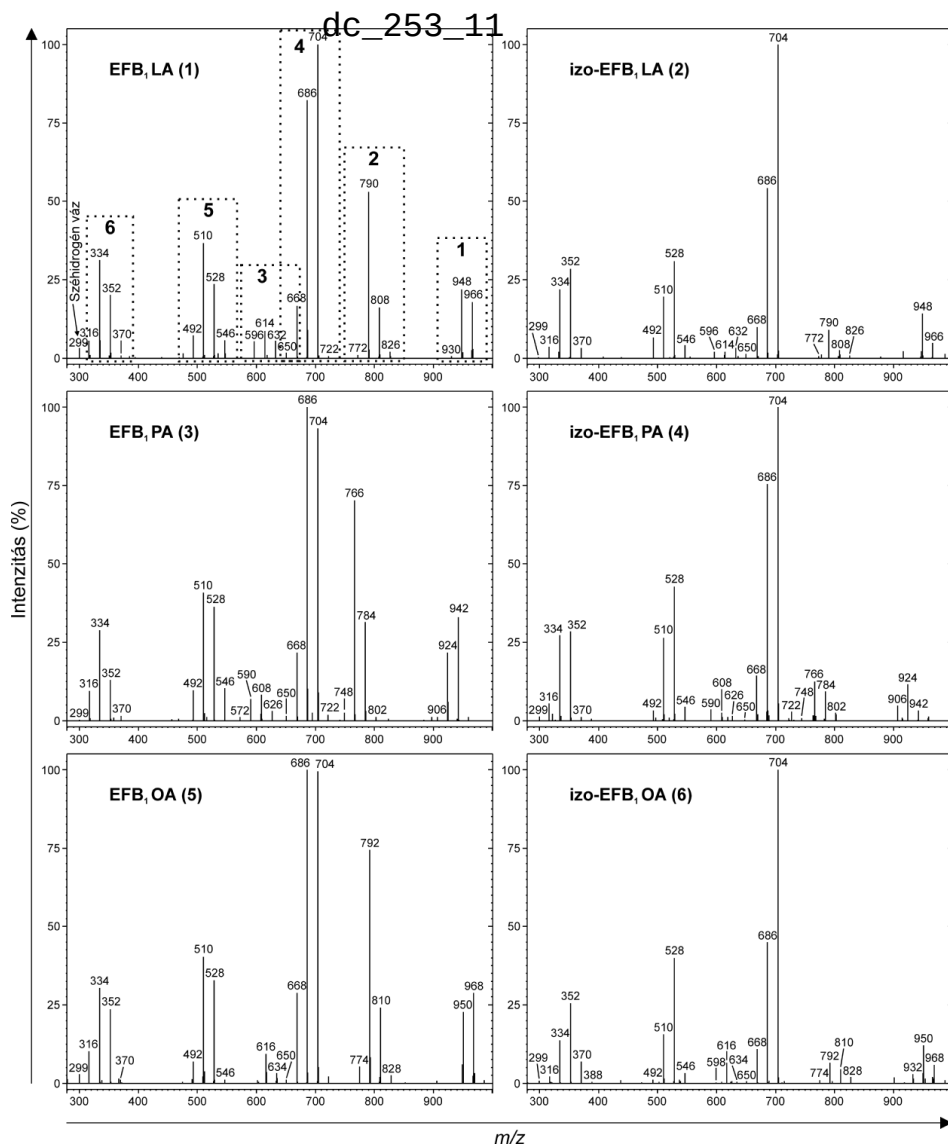


4. ábra. *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészet kivonatának RP-HPLC/ESI-TOFMS (A; m/z 722,3957) és RP-HPLC/ESI-ITMS (B; m/z 722) módszerekkel kapott nagyított extrahált ion kromatogramjai, amelyek az FB_1 toxint és 28 izomerjét mutatják.

- 4) A kevésbé meredek gradiens elválasztással **6 új, apoláris tulajdonságú fumonizint azonosítottunk** RP-HPLC/ESI-TOFMS (5. és 6. ábra) és RP-HPLC/ESI-ITMS eljárásokkal [10]. Az ionsapdás tömegspektrométer által felvett CID-MS spektrumok (6. ábra) alapján **megállapítottuk, hogy szerkezetük az FB₁ toxinéhoz hasonló, azzal az eltéréssel, hogy a szénláncukon a két trikarballil-csoporton kívül harmadik acil-csoport (palmitil, linolil vagy oleil) is található**, ezáltal ezek a vegyületek a többi, poláris karakterű fumonizinhoz képest eltérő, erősebb biológiai hatással (toxicitással) rendelkezhetnek. Mivel a három acil-csoportot tartalmazó új fumonizinek feltételezhetően az FB₁ toxin észterezett származékai, észterezett FB₁ (EFB₁) toxinoknak neveztük el azokat. A név végén található betűk (LA=linolsav, PA=palmitinsav, OA=olajsav) jelzik, hogy melyik a molekulán található harmadik acil-csoport (EFB₁ LA, izo-EFB₁ LA, EFB₁ PA, izo-EFB₁ PA, EFB₁ OA, izo-EFB₁ OA).

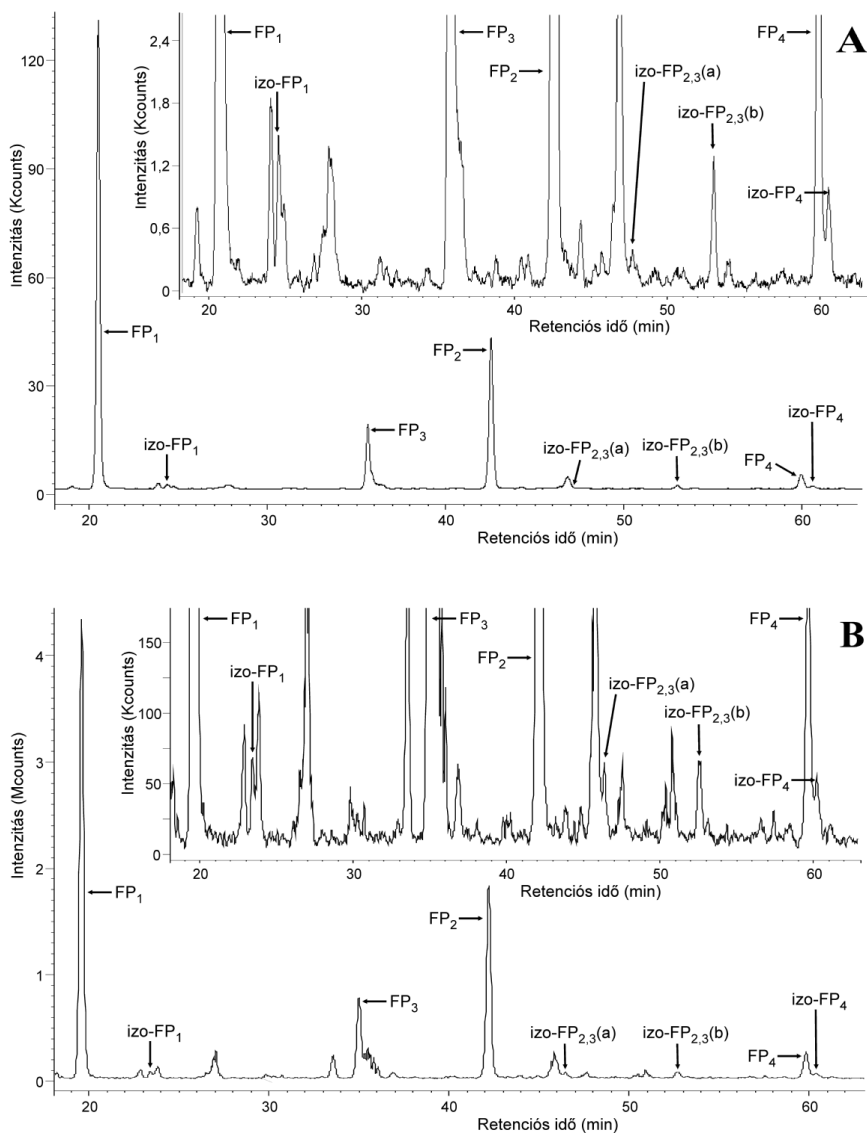


5. ábra. *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészet kivonatának RP-HPLC/ESI-TOFMS totál ion kromatogramja és nagyított extrahált ion kromatogramjai (EIC, m/z 984,62; 960,62 és 986,64). A nagyított kromatogramok az új észterezett FB₁ (EFB₁) izomereket mutatják. Megjegyzés: a *,** jelek az EFB₁ LA (1) és izo-EFB₁ LA (2) X+2-es izotópjainak a csúcsait jelzik.



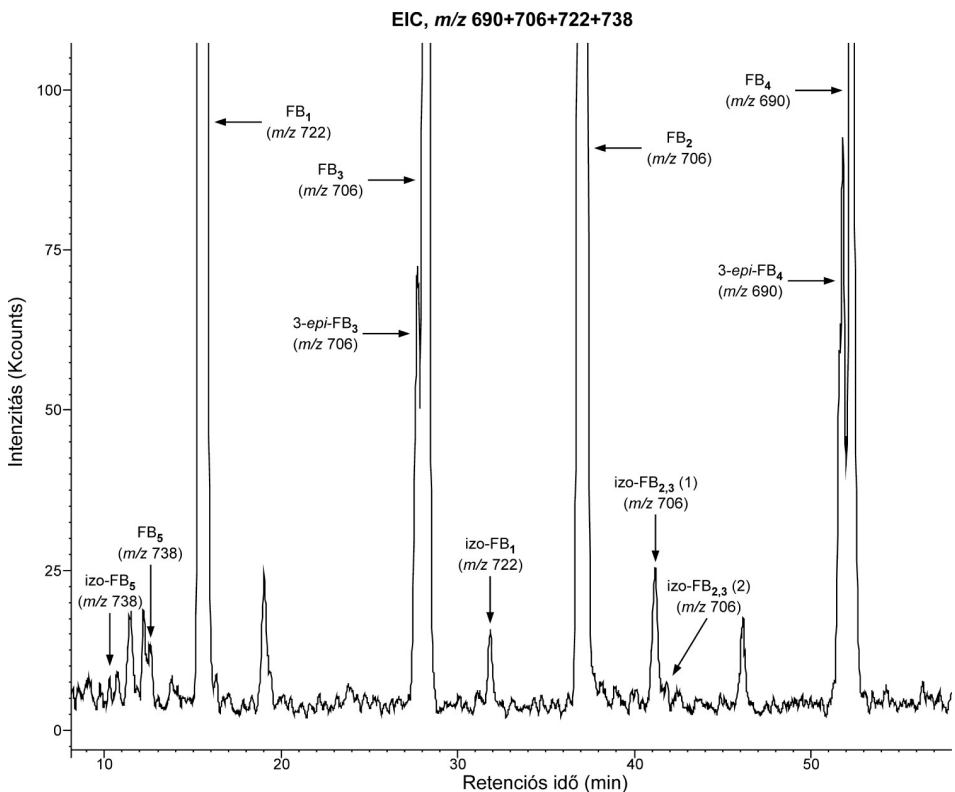
6. ábra. Az észterezett FB₁ (EFB₁) izomerek molekulaionjainak ([M+H]⁺) RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel felvett CID-MS spektrumai: EFB₁ LA (1), izo-*EFB₁* LA (2), EFB₁ PA (3), izo-*EFB₁* PA (4), EFB₁ OA (5), izo-*EFB₁* OA (6). Az EFB₁ izomerekre jellemző hat termékion-csoport (1–6) az EFB₁ LA (1) CID-MS spektrumában van jelezve. Az EFB₁ izomerekkel szemben a két acil-csoportot tartalmazó fumonizinek (a legtöbb fumonizin ilyen) CID-MS spektrumában csak három fragmentacion-csoport található, mint ahogy a 3. ábrán is látható.

5) A kevésbé meredek grádiens elválasztással öt új P típusú fumonizint sikerült kimutatnunk (7. ábra): az FP₄ toxint és négy FP izomert (izo-FP₁₋₄) [11].



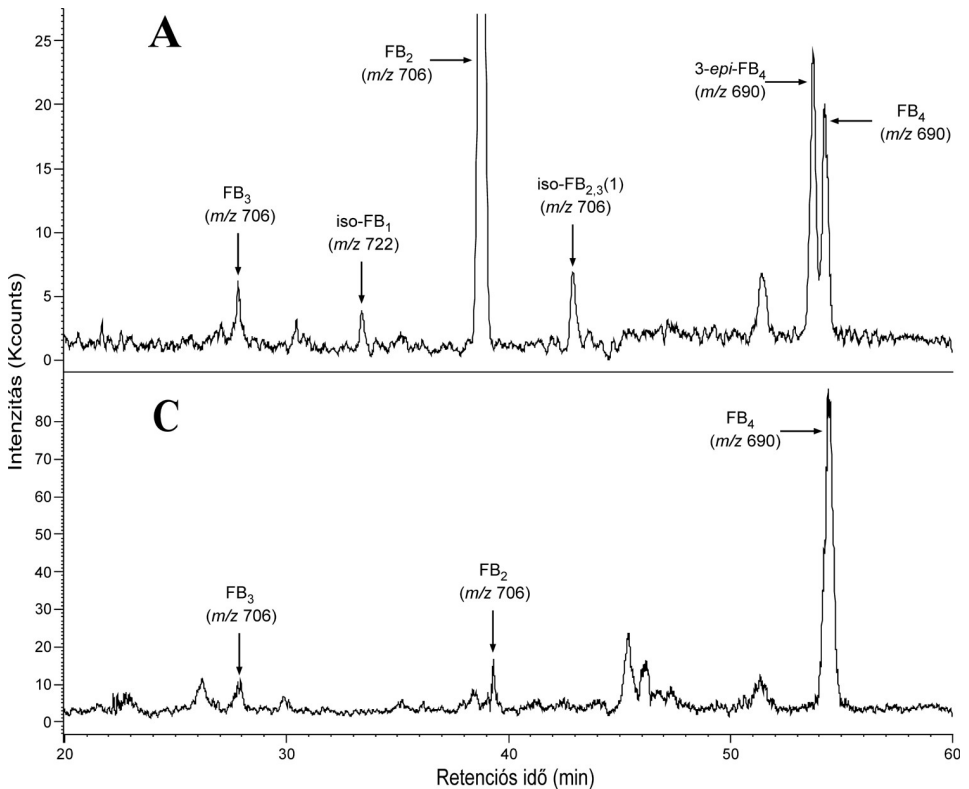
7. ábra. *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészet kivonatának RP-HPLC/ESI-TOFMS (A; m/z 800,41+784,41+768,41) és RP-HPLC/ESI-ITMS (B; m/z 800+784+768) extrahált ion kromatogramjai (EIC), jelezve az FP analógokat.

6) *Aspergillus* fajok által fertőzött mazsola- és vöröshagymamintákban is mutattunk ki fumonizin-szennyezést, amely egy újabb élelmiszerbiztonsági problémára hívja fel a figyelmet. Az egyik (kaliforniai-eredetű) mazsolamintában a fumonizin-tartalom a kukoricára érvényes határérték kilencszerese (~36 mg/kg) volt (8. ábra). Vizsgálataink során kimutattuk, hogy az *Aspergillus niger* a korábban már publikált FB₂, FB₄ és izo-FB₁ (FB₆) toxinokon kívül táptalajon *in vitro* is termelt többnyire csak nyomnyi mennyiségben kimutatható néhány egyéb fumonizint [12].



8. ábra. Kaliforniai-eredetű mazsolaminta kivonatának RP-HPLC/ESI-ITMS egyesített extrahált ion kromatogramja (EIC, m/z 690+706+722+738, nagyított).

7) Együttműködésben végzett kutatásaink mutattak ki először vöröshagymában fumonizin-szennyezést (9. ábra) [13].



9. ábra. Vöröshagymaminták (A és C) RP-HPLC/ESI-ITMS extrahált ion kromatogramja (EIC, m/z 690+706+722).

8) Kutatásaink eredményeként *in vivo* és *in vitro* mintákból is mi mutattuk be először a 3-*epi*- FB_4 és FB_4 toxinok HPLC elválasztását (8-9. ábra). Felhívtuk a figyelmet arra, hogy az FB_4 toxint tartalmazó kivonatok nagy részében a 3-*epi*- FB_4 izomer is megtalálható, amely csak megfelelő hatékonyságú HPLC oszlop és kis meredekségű grádiens- vagy izokratikus elúció alkalmazásával választható el az FB_4 toxintól [12].

9) Vizsgálataink során igazoltuk, hogy az *Aspergillus awamori* is képes *in vivo* és *in vitro* fumonizineket szintetizálni [12,13].

Növényi- és állati-eredetű élelmiszeripari alapanyagok, termékek és takarmányok fumonizin izomer összetételének meghatározására a gyakorlatban is hasznosítható eljárást sikerült kidolgozni. Az új fumonizinek felismerése, valamint különböző *in vivo* és *in vitro* körülmények közötti képződésük tanulmányozása megfelelő izolálási eljárások kifejlesztését teszi lehetővé. Az élelmiszer- és takarmánybiztonság szempontjából fontos teendő a fumonizinekre vonatkozó határértékek felülvizsgálata. A kockázat- és veszélyelemzés nyomán új határ- és irányértékek kerülhetnek megállapításra olyan alapanyagok és termékek esetében is – különös tekintettel azokra az élelmiszeripari alapanyagokra és termékekre amelyekben fumonizin-termelésre képes fekete *Aspergillus* fajok azonosíthatók – amelyeknél jelenleg nincsenek ilyen értékek megállapítva.

A kutatások további konkrét feladata a viszonylag könnyebben izolálható fumonizin analógok szükséges tisztaságú előállítás, valamint a kereskedelemből be nem szerezhető fumonizineknek az együttműködő partnerek részére bocsátása különböző toxikológiai vizsgálatok céljaira. A számos új fumonizin típusú mikotoxin felismerése és szerkezetük igazolása az elméleti kutatások számára fontos tudományos előzményeket jelenthet eddig még ismeretlen biokémiai mechanizmusok értelmezéséhez.

Az értekezés eredményeinek tükrében szükséges azt is megvizsgálni, hogy a rizstenyészetben legjobb fumonizin-termelőképeséggel rendelkező *F. verticillioides* izolátumok az általunk leírt új fumonizineket ill. egy részüket képesek-e *in vivo* körülmények között is szintetizálni. Ehhez tenyészkerti körülmények között a kiválasztott izolátumokkal a kukoricánövények (csövek) mesterséges fertőzését tervezzük.

- Accensi F, Cano J, Figuera L, Abarca ML, Cabañes FJ (1999) New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiol Lett* 180:191-196
- Bezuidenhout GC, Gelderblom WCA, Gorst-Allam CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G, Vleggaar R (1988) Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J Chem Soc Chem Commun* 743-745
- Booth C (1971) The Genus *Fusarium*. CMI, Eastern Press, UK. 237 pp.
- Hong SB, Cho HS, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA (2006) Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:477-486
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2002) Fumonisin B₁. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some traditional medicines, some mycotoxins, naphtalene and styrene. No. 82. Lyon (France): IARC; p. 301–366
- King Jr AD, Hocking AD, Pitt JI, (1979) Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl Environ Microbiol* 37:959–964
- Leslie JF, Summerell BA, Bullock S (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, UK. 388 pp.
- Nelson PE, Desjardins AE, Plattner RD (1993) Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annu Rev Phytopathol* 31:233-252
- Raper KB, Fennell DI, (1965) The Genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC (2004) Introduction to Food- and Airborne Fungi, 7th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad JC, Varga J (2007) Diagnostic tools to identify black Aspergilli. *Studies Mycol* 59:129–145
- Szécsi Á, Mesterházy Á. (1998) A medium for selective isolation and identification of *Fusarium* spp. from cereal grains and maize kernels. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 33:79-87

Szécsi Á, Koncz Zs, Magyar D (2011) Morphological and molecular identification of airborne *Fusarium* propagules trapped in a maize field in Hungary. *Acta Phytopathol Entomol Hung* (megjelenés alatt)

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.), PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, New York, pp. 315-322

6. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

6.1. Az értekezés eredményeit tartalmazó publikációk, kéziratok és konferencia kiadványok

- [1] Szécsi Á, Szekeres A, **Bartók T**, Oros G, Bartók M, Mesterházy Á (2010) Fumonisin B_{1,4}-producing capacity of Hungarian *Fusarium verticillioides* isolates. *World Mycotoxin J* 3: 67-76
- [2] **Bartók T**, Szécsi A, Szekeres A, Mesterházy A, Bartók M (2006) Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:2447-2462
- [3] **Bartók T**, Szécsi Á, Szekeres A, Mesterházy Á, Bartók M (2006) Discovery of the novel fumonisin mycotoxins by ion trap mass spectrometry. *Acta Microbiol Immunol Hung* 53, 246
- [4] **Bartók T**, Szécsi Á, Szekeres A, Mesterházy Á, Bartók M, Új fumonizin mikotoxinok felfedezése ion-csapdás tömegspektrometriával. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006 évi Nagygyűlése. Keszthely, Magyarország, 2006.10.18-2006.10.20. Paper ÉM-6.
- [5] **Bartók T**, Szekeres A, Szécsi Á, Bartók M, Mesterházy Á (2008) A new type of fumonisin series appeared on the scene of food and feed safety. *Cereal Res Commun* 36 (Suppl B):315-319
- [6] **Bartók T**, Ion-csapdás tömegspektrométer alkalmazása új mikotoxinok vizsgálatához. In: A Kárpátok-Eurorégió élelmiszerlánc felügyeleti körképe; Az

Európai Élelmiszerlánc Parlament megalakítása és bemutatása. Visegrád, Magyarország, 2008.11.25-2008.11.27. p. 133;

- [7] **Bartók T**, Szekeres A, Szécsi Á, Bartók M, Mesterházy Á, Új fumonizin mikotoxinok az élelmiszerbiztonság színpadán. In: Klebovich I, Gazdag M, Babják M (szerk.) Elv拉斯ztástudományi Vándorgyűlés 2008. Sárvár, Magyarország, 2008.11.05-2008.11.07. p. 50. Paper E-11.
- [8] **Bartók T**, Tölgyesi L, Szekeres A, Varga M, Bartha R, Szécsi Á, Bartók M, Mesterházy Á (2010) Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B₁ (FB₁) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24:35-42
- [9] **Bartók T**, Tölgyesi L, Varga J, Szécsi Á, Varga M, Bartók M, Mesterházy Á, Gyimes E, Véha A (2011) Identification of unknown isomers of fumonisin B₅ mycotoxin in a *Fusarium verticillioides* culture by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry (közlésre beküldve).
- [10] **Bartók T**, Tölgyesi L, Mesterházy Á, Bartók M, Szécsi Á (2010) Identification of the first fumonisin mycotoxins with three acyl groups by ESI-ITMS and ESI-TOFMS following RP-HPLC separation: palmitoyl, linoleoyl and oleoyl EFB₁ fumonisin isomers from a solid culture of *Fusarium verticillioides*. *Food Addit Contam* 27:1714-1723
- [11] **Bartók T**, Tölgyesi L, Szécsi Á, Mesterházy Á, Bartók M, Gyimes E, Véha A (2011) Detection of unknown fumonisin P mycotoxins in a *Fusarium verticillioides* culture by electrospray ionization time-of-flight- and ion trap mass spectrometries following reversed-phase high-performance liquid chromatography separation (közlésre beküldve).
- [12] Varga J, Kocsubé S, Suri K, Szigeti Gy, Szekeres A, Varga M, Tóth B, **Bartók T** (2010) Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. *Int J Food Microbiol* 143:143-149

- [13] Varga J, Kocsubé S, Szigeti Gy, Mán V, Tóth B, Vágvolgyi Cs, **Bartók T** (2011) Black Aspergilli and fumonisin contamination in onions purchased in Hungary. *Acta Aliment* (megjelenés alatt)
- [14] Kocsubé S, Varga J, Szigeti Gy, Baranyi N, Suri K, Tóth B, Toldi É, **Bartók T**, Mesterházy Á (2011): *Aspergillus* species as mycotoxin producers in agricultural products in Central Europe. *Proc Nat Sci Matica Srpska* (megjelenés alatt)

6.2. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó, a PhD fokozat megszerzése után megjelent további közlemények és konferencia kiadványok

- [15] Mesterházy A, Kászonyi G, Tóth B, Purnhauser L, **Bartók T**, Varga M, Breeding Strategies and their Results against FHB in Wheat. In: Czembor J (szerk.) Workshop "Resistance of cereals to biotic stresses". Radzikow, Lengyelország, 2004.10.28-2004.12.01. Radzikow: IHAR, pp. 34-38.
- [16] Mesterházy Á, Matuz J, Kertész Z, Tóth B, Csősz M, Papp M, Bóna L, Cseuz L, **Bartók T**, Kászonyi G, Pauk J, Purnhauser, Züchtungsforschung und Pflanzenzüchtungsleistungen am GKI Szeged. In: Ruckenbauer P (szerk.) Bericht über die Arbeitstagung 2004 der Vereinigung der Pflzüchter und Saat. Gumpenstein, Ausztria, 2004 Wien: Bundesanstalt für Agrarwirtschaft, pp. 19-25.
- [17] Mesterházy A, Kászonyi G, Tóth B, Purnhauser L, **Bartók T**, Varga M, Breeding Strategies and their Results against FHB in Wheat. In: Canty S M, Boring T, Wardwell J, Ward R W (szerk.) 2nd International Symposium on Fusarium Head Blight, incorporating the 8th European Fusarium Seminar. Orlando, Amerikai Egyesült Államok, 2004.12.11-2004.12.15. East Lansing: Michigan State University, pp. 115-120.
- [18] Kászonyi G, Mesterházy A, **Bartók T**, Varga M, Tóth B, The Longevity of Fungicides Controlling FHB in Wheat. In: Canty S M, Boring T, Wardwell J, Ward R W (szerk.) 2nd International Symposium on Fusarium Head Blight, incorporating the 8th European Fusarium Seminar. Orlando, Amerikai Egyesült

Államok, 2004.12.11-2004.12.15. East Lansing: Michigan State University, pp. 333-336.

- [19] Mesterházy A, Kászonyi G, Tóth B, **Bartók T**, Varga M, Prothioconazole Fungicides against FHB in Wheat, 2003/2004 Results. In: Canty S M, Boring T, Wardwell J, Ward R W (szerk.) 2nd International Symposium on Fusarium Head Blight, incorporating the 8th European Fusarium Seminar. Orlando, Amerikai Egyesült Államok, 2004.12.11-2004.12.15. East Lansing: Michigan State University, pp. 355-358.
- [20] Mesterházy Á, **Bartók T**, Kászonyi G, Varga M, Tóth B, Varga J (2005) Common resistance to different Fusarium sp. causing Fusarium head blight in wheat. *Eur J Plant Pathol* 112:267-281
- [21] Szécsi Á, **Bartók T**, Varga M, Magyar D, Mesterházy Á (2005) A 8-ketotrichotecén típusú mikotoxinok kemotípusainak azonosítása a hazai *Fusarium graminearum* populációban. *Növényvédelem* 41:45-51
- [22] Szécsi Á, **Bartók T**, Varga M, Magyar D, Mesterházy Á (2005) Determination of thrichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* strains isolated in Hungary. *J Phytopathol* 153:445-448
- [23] Tóth B, Mesterházy Á, Horváth Z, **Bartók T**, Varga M, Varga J (2005) Genetic variability of Central European *Fusarium graminearum* species complex. *Eur J Plant Pathol* 113:34-45
- [24] **Bartók T**, Téren J, Aflatoxinok meghatározása élelmiszerekben LC-MS technikával. In: Molnár P, Boross F (szerk.) XV. Élelmiszer Minőségellenőrzés Tudományos Konferenciai. Debrecen, Magyarország, 2006.03.29-2006.03.31. Budapest: European Organization for Quality Magyar Nemzeti Bizottsága, p. 131.
- [25] Varga M, **Bartók T**, Mesterházy Á (2006) Determination of ergosterol in Fusarium infected wheat by liquid chromatography- atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1103:278-283
- [26] Mesterházy Á, Kászonyi G, Tóth B, Purnhauser L, **Bartók T**, Szekeres A (2007) Breeding strategies against Fusarium head blight in wheat. *Hung Agricult Res* 16:10-13

- [27] Kászonyi G, Kótai Cs, Martonosi I, **Bartók T**, Lehoczky-Krsjak Sz, Szabó-Hevér A, Tóth B, Véha A, Mesterházy Á (2008) Development of a spraying method and its comparison to traditional techniques against FHB. *Növényvédelem* 44:39-45
- [28] Mesterházy Á, Tóth B, **Bartók T**, Varga M (2008) Breeding strategies against FHB in winter wheat and their relation to type I resistance. *Cereal Res Commun* 36 (Suppl. B):37-43
- [29] Toldi É, **Bartók T**, Varga M, Szekeres A, Mesterházy Á (2008) The role of breeding in reducing mycotoxin contamination in maize. *Cereal Res Commun* 36 (Suppl. B):175-177
- [30] Tóth B, Kászonyi G, **Bartók T**, Varga J, Mesterházy Á (2008) Common resistance of wheat to members of the *Fusarium graminearum* species complex and *F. culmorum*. *Plant Breeding* 127:1-8
- [31] Lehoczki-Krsjak S, Szabó-Hevér Á, Tóth B, Kótai C, **Bartók T**, Varga M, Farády L, Mesterházy Á (2010) Prevention of Fusarium mycotoxin contamination by breeding and fungicide application to wheat. *Food Addit Contam* 27:616-628

6.3. Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó, a PhD fokozat megszerzése után megjelent további közlemények

- [32] Bartók M, Sutyinszki M, Bucsí I, Felföldi K, Szöllösi Gy, Bartha F, **Bartók T** (2005) Enantio selective hydrogenation of ethyl pyruvate catalyzed by alpha- and beta-isocinchonine-modified Pt/Al₂O₃. *J Catal* 231:33-40
- [33] Bucsí I, Szöllösi G, **Bartók T**, Bartók M (2005) Identification of novel chiral aluminium containing oxonium cations in the enantioselective hydrogenation of ethyl pyruvate catalyzed using cinchonidine modified Pt-alumina in acetic acid. *React Kin Catal Lett* 85:361-366
- [34] Papp T, Velayos A, **Bartók T**, Eslava A, Vágvolgyi C (2006) Iturriaga E, Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:526-531

- [35] Jager K, **Bartók T**, Ördög V, Barnabás B (2010) Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. *South Afr J Bot* 76:511-516
- [36] Szöllösi Gy, Cserényi Sz, Bucsí I, **Bartók T**, Fülöp F, Bartók M (2010) Origin of the rate enhancement and enantiodifferentiation in the heterogeneous enantioselective hydrogenation of 2,2,2-trifluoroacetophenone over Pt/alumina studied in continuous-flow fixed-bed reactor system. *Appl Catal A-Gen* 382:263-271
- [37] Kádár Z, Kovács D, Frank É, Schneider Gy, Huber J, Zupkó I, **Bartók T**, Wölfling J (2011) Synthesis and antiproliferative activity *in vitro* of novel androst-5-ene triazolyl and tetrazolyl derivatives. *Molecules* 16:4786-4806
- [38] Kádár Z, Baji Á, Zupkó I, **Bartók T**, Wölfling J, Frank É (2011) Efficient approach to novel 1α -triazolyl- 5α -androstane derivatives as potent antiproliferative agents. *Org Biomol Chem* DOI: 10.1039/C1OB06086D (megjelenés alatt)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a Gabonakutató Non-profit Kft. és jogelődjei főigazgatóinak (**Dr. Szániel Imre, Dr. Erdei Péter, Dr. Frank József, Dr. Matuz János**) és **Dr. Mesterházy Ákos** akadémikusnak, hogy az általuk vezetett kutatóhelyen és kutatócsoportban dolgozhattam és biztosították számomra a kutatási feltételeket.

Külön köszönöm **Dr. Szécsi Árpádnak** az MTA doktorának, az MTA NKI tudományos tanácsadójának és **Dr. Varga Jánosnak** az MTA doktorának, az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék egyetemi docensének a *F. verticillioides* illetve az *A. niger* és *A. awamori* izolátumok fumonizin-termelésével kapcsolatos eredményes kutatási együttműködést.

Hálával tartozom **Dr. Barabás Zoltán** akadémikusnak és első közvetlen főnökömnek, **Dr. Sági Ferencnek** - akik sajnos már nincsenek közöttünk - azért, hogy kezdettől fogva egyengették tudományos pályámat a Gabonakutatóban.

Köszönöm a Gabonakutató tudományos főmunkatársának **Dr. Varga Mónikának** és laboratóriumi asszisztenseinek **Vargáné Bogdán Évának** és **Zentai Beátának** áldozatos segítségüket.

Megköszönöm **Tölgyesi László** precíz, igényes munkáját, amelyet az ELTE EKOL laboratóriumában a TOFMS vizsgálatok elvégzése során nyújtott.

Megköszönöm **Dr. Véha Antal** egyetemi tanárnak az SZTE Mérnöki Kar dékánjának és **Dr. Gyimes Ernő** egyetemi docensnek az SZTE Mérnöki Kar stratégiai és innovációs dékánhelyettesének, hogy biztosították számomra a mikotoxin kutatás folytatásához és az értekezés elkészítéséhez nélkülözhetetlen nyugodt körülményeket.

Köszönettel tartozom édesapámnak, **Dr. Bartók Mihály** akadémikusnak, az SZTE TTIK Szerves Kémiai Tanszék emeritus professzorának a szakmai együttműködést és azt, hogy biztosította számomra a mérési lehetőséget az MTA Sztereokémiai Kutatócsoportja által beszerzett ioncsapdás tömegspektrométerrel.

Köszönöm **családomnak**, hogy a kutatómunkámhoz és az értekezés elkészítéséhez a nyugodt családi hátteret biztosították.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni az **OTKA**, az **NKTH**, az **FVM**, valamint az **EU** pályázati támogatását, amelyek nélkül vizsgálataink jelentős részét nem tudtuk volna elvégezni.