

Válasz Dr. Fazekas Bélának

Bartók Tibor: Új fumonizin mikotoxinok azonosítása HPLC/MS módszerekkel című akadémiai doktori értekezéséről készített bírálata

Mindenekelőtt megköszönöm az értekezéséről alkotott pozitív véleményét, amely számomra különösen jelentős, mert Fazekas dr. és munkatársai voltak az elsők akik Magyarországon fumonizin szennyezést mutattak ki kukoricában (Fazekas és Tóthné 1995; Fazekas és mtsai 1996), és igazolták először, hogy a lovak agylágyulását és elhullását, fumonizin szennyezett takarmány etetése okozta (Fazekas és Bajmócy 1996), továbbá kísérletes úton fumonizin-tartalmú takarmány etetésével elsőként idézték elő sertések PPE betegségét és elhullását (Fazekas és mtsai 1997).

A bírálóban megfogalmazott 6 kérdésre sorrendben válaszolok.

1. A bíráló kérdezi, mi indokolta a rizs szubsztrát alkalmazását a fumonizinek termeltetése során, amikor a természetes szennyezettség a kukoricában a leggyakoribb és ez befolyásolhatta-e az új fumonizinek termelődését a kukorica szubsztráttal összehasonlítva?

A fumonizin kutatásban történő részvételem Szécsi Árpád professzor Úr megkeresésére indult, aki az MTA NKI-ban hosszú évek óta foglalkozott és jelenleg is foglalkozik különböző *Fusarium*-fajok azonosításával és az azonosított törzsek mikotoxin termelőképességének és mikotoxin-profiljának vizsgálatával. Laboratóriumában a rizs szubsztráton történő mikotoxin-termeltetés terjedt el, elsősorban azért mert azonos minőségű szubsztrátot (Uncle Ben's rizs) a kereskedelmi forgalomban be lehetett és be lehet szerezni. Az Uncle Ben's rizs nemcsak az egyik legdrágább és étkezési célra történő felhasználásban is az egyik legkedveltebb rizs, hanem csak igen kismértékben tapadnak össze a hosszú rizs szemek, amely segíti a tenyészet gombafonalakkal történő mielőbbi átszövését és egyben a tenyészet levegőzését is, azaz a *Fusarium*-fajok számára optimális szubsztrátot jelent. Továbbá, alacsonyabb zsír és pigment-tartalma miatt az extrakció, az LC/MS analízis és a mikotoxin-izolálás szempontjából is megfelelőbb szubsztrátnak tűnt, mint a kukorica. A fumonizinek szilárdfázisú fermentációjáról az irodalomban kb. azonos számú közlemény jelent meg a rizs és a kukorica szubsztrát alkalmazásáról. Az utóbbi években már termeltettünk fumonizineket kukorica szubsztráton is, így saját vizsgálatok alapján elmondhatom, hogy ugyanazon *F. verticillioides* törzs és tenyésztési körülmények (tenyészedeny, szubsztrát mennyiség, vízaktivitás, a fermentáció hőmérséklete és időtartama) esetében hasonló fumonizinprofilt kaptunk. A kukorica szubsztrát esetében valamivel magasabb fumonizin értékeket kaptunk. Párhuzamos termeltetést is végeztünk rizs szubsztráton 5 ismételtsben. Az FB₁₋₄ tartalom tekintetében az RSD% értékek a következők voltak: 17,4; 20,7; 19,8 és 16,9.

2. Bírálóm az FB₁ toxin 7. és 14. táblázatban közölt eltérő intenzitású fragmensionokat tartalmazó CID-MS spektruma alapján kérdezi, hogy mennyire reprodukálhatók az ITMS-sel nyert CID-MS spektrumok, illetve mivel magyarázhatók az intenzitás arányok jelentős eltérései?

A 7. és 14. táblázatban közölt intenzitás értékek két különböző típusú ITMS készüléken történő mérés alapján lettek megadva. A különböző gyártóktól származó HPLC-MS rendszerek esetében a tömegspektrumok fragmentációs mintázatában a legtöbb esetben jóval nagyobb eltérés tapasztalható, mint pl. a 70 eV ütközési energia mellett felvett GC-MS spektrumok esetében. Azonos HPLC-MS készüléken és azonos beállításokkal (beleértve a hangolást is) a CID-MS spektrumok igen jól

reprodukálhatóak és különösen akkor, ha átlagspektrumokat vizsgálunk. A közleményeinkben közölt CID-MS spektrumok minden esetben 3-5 tömegspektrum átlagát mutatják.

3. Opponensem kérdezi, hogy mivel magyarázható a vöröshagymához viszonyítva a mazsola esetében kapott viszonylag alacsony visszanyerési érték?

A mazsola magasabb zsír és különösen cukortartalma miatt sokkal bonyolultabb mátrix mint a vöröshagyma, így a fumonizinek jobban kötődhetnek a mátrix komponensekhez, amely nehezíti visszanyerésüket. A jövőben kiterjedt vizsgálatokat tervezünk a mazsola fumonizin-tartalmának vizsgálata során, beleértve többféle oldószert illetve oldószer elegyet és különféle extrakciós eljárásokat (ultrahang, mikrohullám, ASE, SFE). Ennek azonban előfeltétele, hogy megfelelő mennyiségben rendelkezésre álljon laboratóriumunkban előállított (tisztított) fumonizin standard, mivel a standardok beszerzése jelentős költséget jelentene.

4. A bíráló kérdezi, hogy az EFB₁ izomerek esetében a 4., 5. és 6. fragmension csoport a harmadik acil-csoport következménye, vagy az FB₁ fragmension csoportjaival azonos?

Mint az értekezésben látható, az FB₁ toxin molekulaionja CID-MS spektrumában a két acil-csoport (trikarballilsav, TCA) következtében 3 fragmension csoport (1. [M+H]⁺; 2. [M+H-TCA]⁺; 3. [M+H-2TCA]⁺), míg az EFB₁ izomerek esetében 6 fragmension csoport (1. [M+H]⁺; 2. [M+H-TCA]⁺; 3. [M+H-2TCA]⁺; 4. [M+H-zsírsav]⁺; 5. [M+H-TCA-zsírsav]⁺; 6. [M+H-2TCA-zsírsav]⁺) található, azaz hárommal több, ami a harmadik acil-csoport következménye. Más szavakkal, a 4. az 5. és a 6. fragmension csoport kapcsolatos a zsírsavmolekula kihasadásával az FB₁ toxin vázából. Ami kérdésének a második részét illeti: mivel a 4. az 5. és a 6. fragmension csoport esetében a zsírsav már kihasadt a molekulából, természetesen ugyanazok a fragmensionok találhatók meg ezen csoportokban, mint az FB₁ toxin molekulaionja CID-MS spektrumának 3 db fragmension csoportjában, azaz az EFB₁ izomerek 4., 5., és 6. fragmension csoportjai és a csoportok ionjai *m/z* értékei megfelelnek az FB₁ toxin 1., 2., és 3. fragmension csoportjaival és a csoportok ionjai *m/z* értékeivel. Kérdése természetesen ráirányította a figyelmemet arra, hogy az értekezésben még bővebben tárgyalhattam volna a fragmentáció témakörét.

5. Opponensem kérdezi, hogy a tenyészetekben kimutatott viszonylag kis mennyiségű EFB₁ izomerek kimutathatóak lennének-e átlagos fumonizin-szennyezettségű kukoricában, amennyiben természetes körülmények között is hasonló arányban termelődnének.

Válaszom írásakor éppen megjelenés alatt van olasz kutatók azon közleménye, amelyben leírják, hogy a mi közleményünk (Bartók és mtsai 2010) alapján megtalálták természetes fertőzöttségű kukorica mintákban is az EFB₁LA és EFB₁OA izomereket (Falavigna és mtsai 2013). Azonban csak magas FB₁ tartalmú (16000-26000 µg/kg) 4 mintában tudták ezeket a komponenseket 424-810 µg/kg koncentrációban kimutatni.

6. A bíráló utolsó kérdése, amelyben a nagyszámú, de kis mennyiségű fumonizin illetve fumonizin izomer keletkezésének okát kérdezi, a jövő egyik igen fontos kutatási területét érinti. Feltételezések szerint a nagyszámú izomer keletkezéséhez a bioszintézis során transzkripció és transzláció hibák vezethetnek. Emellett azonban azt gondolom, hogy a fumonizinek bioszintézisééről ma már sokat tudunk, de még mindig nem eleget.

Végezetül megköszönöm Opponensemnek értekezésem bírálatát, kérdéseit és azt, hogy alkalmasnak találta értekezésem nyilvános vitára történő kitűzését.

Szeged, 2013. 06. 20.

Tisztelettel:

Dr. Bartók Tibor

Hivatkozások:

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 Additives and Contaminants* 27:1714-1723

Falavigna C, Lazzaro I, Galaverna G, Battilani P, Dall'Asta C (2013) Fatty acid esters of fumonisins: first evidence of their presence in maize. *Food Additives and Contaminants* DOI: 10.1080/19440049.2013.802839

Fazekas B, Tóthné HE (1995) Incidence of fumonisin B1 mycotoxin in maize cultivated in Hungary. *Magyar Állatorvosok Lapja* 50:515-518

Fazekas B, Bajmócy E (1996) A lovak fumonizin-B1 mikotoxin okozta agylágyulásának előfordulása Magyarországon. *Magyar Állatorvosok Lapja* 51:484-487

Fazekas B, Kis M, Hajdu ET (1996) Data on the contamination of maize with fumonisin B-1 and other fusariotoxins in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* 44:25-37

Fazekas B, Bajmócy E, Glavits R, Fenyvesi A (1997) Sertések fumonizin okozta kísérletes mikotoxikózisa. *Magyar Állatorvosok Lapja* 119:10-14