

dc_253_11

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**Új fumonizin mikotoxinok azonosítása
HPLC/MS módszerekkel**

Bartók Tibor

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM MÉRNÖKI KAR
ÉLELMISZERMÉRNÖKI INTÉZET**

2011

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1. A fumonizinek felfedezése és kémiai szerkezetük azonosítása.....	9
2.2. A fumonizineket termelő gombafajok és a fumonizinek <i>in vivo/in vitro</i> termelődése/termeltetése.....	14
2.3. A fumonizinek bioszintézise és a bioszintézis genetikai szabályozása.....	18
2.4. A fumonizin-okozta toxikózisok és biokémiai változások laboratóriumi és tenyésztett állatokban.....	24
2.5. A hőkezelés hatása a fumonizinek szerkezetére és toxicitására az élelmiszer-feldolgozás során.....	29
2.6. A fumonizinek <i>in vivo</i> metabolizmusa.....	32
2.7. A fumonizinekre vonatkozó egészségügyi határ- és irányértékek.....	35
2.8. A fumonizinek minőségi- és mennyiségi meghatározása előtt alkalmazható mintaelőkészítési eljárások.....	37
2.9. A fumonizinek minőségi- és mennyiségi meghatározásának módszerei.....	39
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	48
3.1. A kísérletekhez felhasznált vegyszerek.....	48
3.2. A <i>F. verticillioides</i> izolátumok begyűjtése, azonosítása, felszaporítása és a fumonizinek <i>in vitro</i> termeltetése.....	48
3.3. A fumonizinek kinyerése az <i>in vitro</i> rizstenyészetekből.....	49
3.4. Mazsola- és vöröshagymaminták begyűjtése, <i>Aspergillus</i> fajok izolálása a mintákról és genetikai elemzésük.....	49
3.5. Fumonizinek kinyerése mazsolából, vöröshagyma pormintájából és mazsoláról izolált fekete <i>Aspergillus</i> fajokkal fertőzött táptalajmintákból.....	51
3.6. A fumonizinek minőségi és mennyiségi meghatározása.....	51
3.6.1. A fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel történő meghatározása meredekebb grádiens elválasztás felhasználásával.....	51
3.6.2. <i>F. verticillioides</i> izolátumok FB ₁₋₄ toxinprofiljának meghatározása RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel, meredekebb grádiens elválasztás felhasználásával.....	53

3.6.3. Új fumonizin izomerek RP-HPLC/ESI-ITMS és TOFMS módszerrel történő meghatározása kevésbé meredek grádiens elválasztás felhasználásával.....	54
3.6.4. Mazsola- és vöröshagymaminták fumonizin-tartalmának és mazsoláról izolált fekete <i>Aspergillus</i> fajok táptalajon történő fumonizin-termelésének RP-HPLC/ESI-ITMS vizsgálata kevésbé meredek grádiens HPLC elválasztás felhasználásával.....	56
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	57
4.1. Magyarországon begyűjtött <i>F. verticillioides</i> izolátumok fumonizin B ₁₋₄ termelése <i>in vitro</i>	57
4.2. Új fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel történő azonosítása meredekebb grádiens elválasztás felhasználásával.....	63
4.2.1. FB analógok.....	65
4.2.2. FA analógok.....	71
4.2.3. FC analógok és az FD.....	74
4.2.4. FBX analógok.....	78
4.3. Új fumonizin izomerek RP-HPLC/ESI-ITMS és TOFMS módszerrel történő azonosítása kevésbé meredek grádiens elválasztás felhasználásával.....	85
4.3.1. FB ₁ izomerek.....	85
4.3.2. FB ₅ izomerek.....	91
4.3.3. Három acil-csoportot tartalmazó fumonizinek azonosítása.....	96
4.3.4. FP izomerek.....	105
4.4. Fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS meghatározása mazsolából és mazsoláról izolált fekete <i>Aspergillus</i> fajokkal fertőzött táptalajmintákból.....	111
4.5. Fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS azonosítása vöröshagymában.....	119
5. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK.....	125
6. TOVÁBBI FELADATOK, LEHETŐSÉGEK A FUMONIZIN KUTATÁSBAN AZ ÉRTEKEZÉS EREDMÉNYEINEK TÜKRÉBEN.....	129
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	130
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	152

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA	„ <i>cis</i> -aconitic acid”, <i>cisz</i> -akonitsav
AAD	<i>cisz</i> -akonitsav anhidrid
AAK	<i>cisz</i> -akonitsav ketén formája
AFLP	„amplified fragment length polymorphism”, amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus
ALKP	alkalikus foszfatáz
ALT	alanin aminotranszferáz
AOAC	„Association of Official Analytical Chemists”, Hatósági Analitikai Kémikusok Szövetsége
AP ₁	aminopentol, hidrolizált FB ₁ toxin (HFB ₁)
API	„atmospheric pressure ionization”, atmoszférikus nyomású ionizáció
APCI	„atmospheric pressure chemical ionization”, atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció
APPI	„atmospheric pressure photoionization”, atmoszférikus nyomású fotoionizáció
a _w	vízaktivitás
AST	aszpartát aminotranszferáz
C18	18 szénatom hosszúságú láncokat tartalmazó állófázis
CE	„capillary electrophoresis”, kapilláris elektroforézis
CE/MS	kapilláris elektroforézis tömegspektrométerrel kapcsolva
CID	„collision-induced dissociation”, ütközések-indukálta disszociáció
CID-MS	ütközések-indukálta disszociáció révén kapott tömegspektrum
DAD	„diode-array detector”, diódasoros detektor
DRBC	“dichloran rose bengal chloramphenicol”, diklorán-bengálvörös-kloramfenikol
EFB ₁	észterezett FB ₁ toxin
EK	Európai Közösség
EKOL	az ELTE, a Kromat Kft., és a Dr. E. Wessling Kémiai Laboratórium Kft. Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratóriuma
ELEM	„equine leukoencephalomalacia”, lovak agyvelőlägyulása
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay”, enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat
ELSD	„evaporative light scattering detector”, egyetemes fényszórásos detektor
ESI	„electrospray ionization”, elektroporlasztásos ionizáció
EST	„expressed sequence tag”, kifejeződött szekvencia darab címkéje
FA	fumonizin „A” analóg
FAc	„fumaric acid”, fumársav
FAB	„fast atom bombardment”, gyors atom bombázás
FAK	keto fumonizin „A” analóg
FB	fumonizin „B” analóg
FBK	keto fumonizin „B” analóg
FC	fumonizin „C” analóg
FIA	„flow injection analysis”, áramlási injektációs analízis
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FMOC-Cl	9-fluorenilmetil-kloroformát

dc_253_11

FP	fumonizin „P” analóg
GC	„gas chromatography”, gázkromatográfia
GC/MS	gázkromatográf tömegspektrométerhez kapcsolva
GGT	gamma-glutamil transzferáz
HACCP	„hazard analysis critical control point”, veszélyelemzés a kritikus irányítási pontokon
HED	„high energy dynode”, nagyenergiájú dinóda
HFA	hidrolizált fumonizin „A” analógok
HFB	hidrolizált fumonizin „B” analógok
3-HP	3-hidroxipiridínium
HPLC	„high-performance liquid chromatography”, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HPLC/MS	nagyhatékonyságú folyadékkromatográf tömegspektrométerhez kapcsolva
HPLC/MSMS	nagyhatékonyságú folyadékkromatográf tandem tömegspektrométerhez kapcsolva
IAC	„immunoaffinity clean-up”, immunoaffinitás tisztítás
IARC	„International Agency for Research on Cancer”, Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség
ID	„internal diameter”, belső átmérő
ITMS	„ion trap mass spectrometer”, ioncsapdás tömegspektrométer illetve tömeganalizátor
ITS	„Internal Transcribed Spacer” szekvencia
2-KG	2-ketoglutársav, α -ketoglutársav
K	ketén (CH_2CO)
KPH	részlegesen hidrolizált keto fumonizin
LA	„linoleic acid”, linolsav
LAK	linolsav ketén formája
LDH	laktát dehidrogenáz
LOD	„limit of detection”, detektálási (kimutatási) határ
LOQ	„limit of quantitation”, meghatározási határ
MEA	„malt extract agar”, malátakivonat agar
MAP	mitogén-aktivált protein
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MI	metilénimin
MP	„mating population”, párosodási populáció
MRM	„multiple reaction monitoring”, többszörös reakció monitorozás
MS	„mass spectrometry”, tömegspektrometria
MSMS	tandem tömegspektrometria
m/z	tömeg/töltés
NBD-F	4-fluor-7-nitrobenzofurazán
NCM-FB ₁	N-(karboximetil)-FB ₁
NDF-FB ₁	N-(1-dezoxi-D-fruktóz-1-il) fumonizin B ₁
NMR	„nuclear magnetic resonance”, magmágneses rezonancia spektroszkópia
NRPS	nem riboszómális peptid szintetáz
OA	„oleic acid”, olajsav
OAK	olajsav ketén formája
OFA	„oxalfumaric acid”, oxálfumársav
OPA	o-ftáldialdehid
OPLC	„overpressured layer chromatography”, túlnyomásos rétegekromatográfia
ORD	„optical rotatory dispersion”, optikai rotációs diszperzió

dc_253_11

ORF	„open reading frame” nyitott leolvasási keret
OSA	„oxalsuccinic acid”, oxálborostyánkősav
OSAK	oxálborostyánkősav ketén formája
PA	„palmitic acid”, palmitinsav
PAK	palmitinsav ketén formája
PAP ₁	N-palmitoil-aminopentol, (a HFB ₁ toxin N-palmitoil származéka)
PB	„particle beam”, részecske nyaláb
PBS	„phosphate buffered saline”, foszfát-pufferes só
PC	„principal component”, főkomponens
PCA	„principal component analysis”, főkomponens analízis
PCNB	„pentachloronitrobenzene”, pentaklór-nitrobenzol
PCR–RFLP	„polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism”, polimeráz láncreakció–restrikciós fragmens hossz-polimorfizmus vizsgálat
PDA	„potato dextrose agar”, burgonya dextróz agar
PEEK	poli(éter-éter-ke-ton)
PH	„partially hydrolized”, részlegesen hidrolizált
PHFA	részlegesen hidrolizált fumonizin „A” analóg
PHFB	részlegesen hidrolizált fumonizin „B” analóg
PKS	poliketidszintáz
PP	polipropilén
PPE	„porcine pulmonary edema”, sertés tüdővizenyő
PTFE	poli(tetrafluoretilén), teflon
QTrap	kvadрупól/ioncsapda MSMS tömeg analizátor
RAPD	„random amplified polymorphic DNA”, véletlen amplifikált polimorf DNS
RP-HPLC	fordított fázisú folyadékkromatográfia
Sa/So	szfinganin/szfingozin arány
SAM	S-adenozil-metionin
SAX	„strong anion exchange”, erős anioncserélő
SFE	szuperkritikus folyadék extrakció
SIM	„selected ion monitoring”, kiválasztott ion figyelés
SPE	„solid-phase extraction”, szilárd-fázisú extrakció
SRM	„selected reaction monitoring”, kiválasztott reakció monitorozás
SS	„stainless steel”, saválló acél
TCA	„tricarballic acid”, trikarballilsav
TCAD	trikarballilsav anhidrid
TCAK	trikarballilsav ketén formája
TLC	„thin-layer chromatography”, vékonyréteg kromatográfia
TMS	trimetilszilil
TOF	„time-of-flight”, repülési idő
TOFMS	repülési idő tömegspektrométer illetve tömeganalizátor
TSP	„thermospray” ionforrás
UPLC	„ultraperformance liquid chromatography”, ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
UPLC/MS	ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográf tömegspektrométerrel kapcsolva
XRD	„X-ray diffraction”, röntgendiffrakció

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

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. ochratoxinokat egyes *Aspergillus* és *Penicillium* fajok, vagy fumonizineket egyes *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* és *Tolypocladium* fajok), ugyanakkor egy adott faj termelhet többféle mikotoxint is (pl. *A. niger* ochratoxinokat és fumonizineket, *A. flavus* aflatoxinokat és kojisavat). Egy-egy gombafajon belül is lehetnek különbségek, mivel nem minden egyed képes mérgeanyagot termelni, azaz a gomba jelenléte nem feltétlenül jelenti a mikotoxin jelenlétét a szubsztrátban, és a gomba hiánya sem jelent mindig toxinmentességet.

Ma már több száz mikotoxint ismerünk, közülük azonban viszonylag kevés okozhat jelentős állat- és humán-egészségügyi problémát. A legveszélyesebbnek számító mikotoxinok az aflatoxinok, az ochratoxin-A, a trichotecén-vázis mikotoxinok (pl. dezoxinivalenol, nivalenol, T-2, HT-2), a zearalenon és származékai és a jelen értekezés tárgyát képező fumonizinek. A mikotoxinok az állati- és humán táplálékláncba bejutva – a bevitt mikotoxin dózisától, a bevitel gyakoriságától és a szervezet ellenállóképességétől függően – komoly megbetegedéseket képesek okozni. Az említett mikotoxinok kémiai szerkezetüktől függően citosztatikus, citotoxikus, immunszuppresszív, mutagén, ösztrogén-mimetikus, rákkeltő és teratogén hatással rendelkeznek és mindezek mellett károsítják a fehérjeszintézist, az idegrendszert és a parenchimás szerveket is. A mikotoxinok azért is különösen veszélyesek, mert legtöbbjük már igen alacsony koncentrációban (ng/g-µg/g) is kifejtik káros – változatos kórképet okozó – hatásukat, jelentős részüknek a szervezetből történő kiürülése igen lassú, továbbá egyes szervekben (pl. máj, vese) felhalmozódásuk is bekövetkezhet. Nem szabad figyelmen kívül hagyni azt sem, hogy a szántóföldi- és raktári penészgombafajok az alapanyag illetve a termék penészesedése és a termelt mikotoxinok következtében jelentős minőségromlást okoznak. Továbbá, határérték feletti mikotoxint tartalmazó alapanyagot és készterméket nem lehet forgalomba hozni, illetve ha forgalomba kerül – hatósági ellenőrzés esetén – az előállító és/vagy a forgalomba hozó az élelmiszerláncból történő kivonás mellett jelentős bírságra is számíthat. A másik igen fontos tényező az, hogy a szántóföldi növények (elsősorban a kalászos gabonafélék és a kukorica) gombafertőzése miatt bekövetkező minőségromlás jelentős terméseszköket okoz, ami bevételkiesést jelent a termelőknek és közvetve a nemzetgazdaságnak is.

Az állattenyésztéssel foglalkozó gazdaságok esetében a takarmányok esetleges mikotoxin szennyeződése következtében fellépő minőségromlás jelentősen növelheti az egységnyi súlygyarapodásra eső takarmányfelhasználást, csökkentve ezzel az állattenyésztés gazdaságosságát.

Annak ellenére, hogy a fumonizinek a legújabban felfedezett (1988) mikotoxinok közé tartoznak, mára – köszönhetően az elválasztástechnikai és tömegspektrometriás eljárások és egyéb szerkezetvizsgálati módszerek (pl. NMR, XRD, ORD) hatékonysága és érzékenysége növekedésének – a legtöbb komponenst tartalmazó mikotoxin csoporttá vált. A műszeres eljárások hatékony felhasználása és kombinálása (HPLC/MS) eredményezte a számos új fumonizin leírását, amelyek az értekezés 4. fejezetében találhatók.

A téma jelentősége igen nagy, mivel a gombafertőzött kukoricából (a takarmány- és az étkezési kukorica fumonizin-szennyezéséért főleg a *F. verticillioides* 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 fumonizin kutatásra irányították a figyelmet az utóbbi évek *Aspergillus niger* fumonizin-termelésével kapcsolatos jelentős közlemények is, mivel *A. niger* számos mezőgazdasági terményből, élelmiszeripari alapanyagból illetve termékből izolálható. A fumonizinek felfedezésének nemcsak gyakorlati, hanem elméleti jelentősége is igen nagy, mivel felfedezésükkel több állati és humán betegség kóroktanát ismertük meg. Állatokban a fumonizinek által okozott két legjelentősebb megbetegedésen, a lovak agylágyulásán (ELEM), valamint a sertések mellvízkórján és tüdővízenyőjén (PPE) kívül, számos más állatfaj fumonizinek iránt mutatott érzékenységét is leírták. Kísérleti állatokban rákos megbetegedéseket tudtak fumonizin-tartalmú takarmány etetésével előidézni. Bár még teljességgel nem bizonyított, feltételezik, hogy a fumonizinek emberben is rákkeltő hatásúak. Főként a fumonizinekkel szennyezett kukorica gyakori fogyasztásával kapcsolatba hozott humán nyelőcsőrákos és primer májkarcinómás esetek következtében a Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (IARC) a lehetséges karcinogének közé – a 2B karcinogén csoportba – sorolta a legjelentősebb fumonizint, az FB₁ toxint.

A fentiekkel összhangban a fumonizin kutatás megkezdésekor és az előkísérletek eredményeinek értékelésekor az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- 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 B₁₋₄ termelőképességét;
- 3) Választ szerettünk volna kapni arra a kérdésre, hogy a kiválasztott – jó FB₁₋₄-termelőképesseggel rendelkező – *F. verticillioides* izolátum termel-e 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 egy speciális, a gyártó által izomerek elválasztására javasolt RP-HPLC oszlop és egy kevésbé meredek grádiens elválasztás felhasználásával.
- 5) A hatékonyabb elválasztási rendszerrel és az előkísérleteknél alkalmazottnál érzékenyebb tömegspektrométerekkel vizsgálni kívántuk, hogy a korábban már kiválasztott *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészetben detektálhatók-e újabb fumonizin izomerek.
- 6) A pontos tömeg mérésére alkalmas TOFMS készülékkel vizsgálni kívántuk a korábbi években a *F. verticillioides* izolátumok RP-HPLC/ESI-ITMS vizsgálatakor már látókörbe került magas molekulatömegű fumonizineket, mivel jó esélyt láttunk a két kapcsolt technika együttes alkalmazásával történő azonosításukra.
- 7) Az *Aspergillus niger* fumonizin-termelésével kapcsolatos közlemények alapján vizsgálni kívántuk a begyűjtött mazsola és a fekete rothadás tüneteit is mutató vöröshagymaminták mikrobiótáját és azt, hogy tartalmazznak-e fumonizineket. Vizsgálni kívántuk azt is, hogy a fekete *Aspergillus* izolátumaink termelnek-e *in vitro* körülmények között fumonizineket.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A Marasas professzor által vezetett dél-afrikai mikotoxin kutatócsoportnak az első fumonizinek izolálásáról és szerkezetazonosításáról szóló közleményének megjelenése óta (Bezuidenhout és mtsai 1988) a „Web of Science” szerint 2575 további fumonizinekkal kapcsolatos közlemény látott napvilágot (2011.07.29-ei adat) jelezve, hogy a nemzetközi mikotoxin kutatás középpontjába a fumonizinek kerültek. Ebből a jelentős közlemény mennyiségből a teljesség igénye nélkül több mint kétszázat említek ebben a fejezetben, ugyanakkor törekedtem arra, hogy a fumonizin kutatás fontosabb területeit (fumonizineket termelő gombafajok, *in vivo/in vitro* termelés/termeltetés, bioszintézis és genetikai szabályozása, a minőségi és mennyiségi meghatározásukra alkalmazott analitikai eljárások, szerkezetazonosítás, toxicitás vizsgálat, metabolizmus kutatás, élelmiszerbiztonsági szabályozás) ismertetve, az értekezést olvasó minél teljesebb képet kapjon a fumonizin kutatás jelenlegi állásáról, fő irányvonalairól.

2.1. A fumonizinek felfedezése és kémiai szerkezetük azonosítása

Már a múlt század elején megfigyelték a lovakban és rokon fajaiban (öszvér, szamár) idegrendszeri tünetekkel járó megbetegedéseket, amelyek az állatok elhullásához vezettek. A betegséget akkor a rá jellemző szöveti elváltozásról, az agy fehérállományának a lágyulásáról (equine leukoencephalomalacia, ELEM) nevezték el. Már a 1970-es években ezt a betegséget egyértelműen a kukorica *Fusarium moniliforme* (a *Fusarium verticillioides* korábbi elnevezése) fonalas gombával történő fertőzésével hozták kapcsolatba. Kiterjedt kísérletek kezdődtek, amelynek során izolálták az MRC 826-os elnevezésű *F. verticillioides* izolátumot. Ezzel az izolátummal fertőzött kukorica etetésével kísérletes úton a lovakban ELEM betegséget, míg sertésekben tüdővízenyőt és mellvízkórt idéztek elő (Marasas és mtsai 1988). A sertésekben ezt a tünetegyüttest Kriek és mtsai (1981a) a rá jellemző kórtani elváltozásokról nevezte el (porcine pulmonary oedema, PPE). Azt is kimutatták, hogy az MRC 826-os izolátummal fertőzött kukorica erősen hepatotoxikus és kardiotoxikus a rágcsálókra (Kriek és mtsai 1981b). Ezt követően először Dél-Afrikában (Marasas és mtsai 1984), majd az USA-ban is (Wilson és mtsai 1985) a *F. verticillioides* gombával természetes úton fertőződött kukorica etetésével kimutatták, hogy a rágcsálókban hepatokarcinómát okoz. Ezek a kísérleti eredmények vezettek arra a felismerésre, hogy az azonosítatlan karcinogén/ek nemcsak a *F. verticillioides* tenyészeiben fordulnak elő *in vitro*, hanem természetes körülmények között is

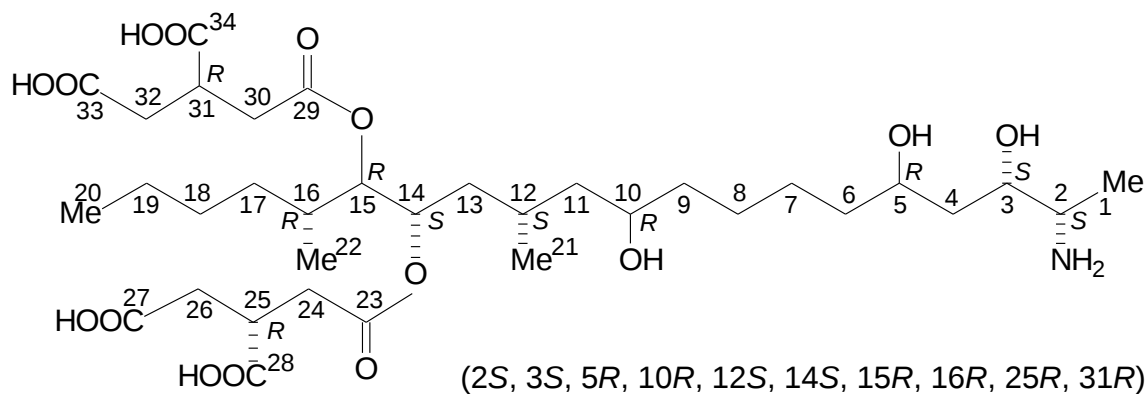
megtalálhatók. 1981-től kezdődően azt is megfigyelték, hogy Dél-Afrika Transkei tartományának déli részén szegényes körülmények között élő humán populációkban a nyelőcsőrák előfordulása a leggyakoribbak között van a világon, míg Transkei északi részén élőkénél sokkal ritkább (Jaskiewicz és mtsai 1987; Makaula és mtsai 1996). A Transkei déli területein élők gyakran fogyasztottak *F. verticillioides* által fertőzött kukoricát és abból készült termékeket.

A sokéves kutatómunka 1988-ban meghozta az eredményét: az előzetes extrakció és preparatív kromatográfiás tisztítás után spektroszkópiás módszerekkel sikerült meghatározni az FB₁ és FB₂ toxinok kémiai szerkezetét, a szénatomok relatív konfigurációját (Bezuidenhout és mtsai 1988; Gelderblom és mtsai 1988). A tisztított FB₁ toxinnal intravénás és orális bevitellel is elő tudták idézni a lovak ELEM betegségét, majd szintén intravénás bejuttatással a sertések PPE betegségét. Rágcsálókban az FB₁ toxin takarmányhoz történő hozzákeverésével (50 mg/kg) májrákot tudtak előidézni (Gelderblom és mtsai 1991). Az első fumonizinek (FB₁ és FB₂) leírását követően tovább folytatódtak az intenzív kutatások a témában, amelynek során – ezen értekezés alapját képező vizsgálatok elkezdéséig (2005) – további 26 fumonizint és fumonizin izomert (lásd összefoglalva Rheeder és mtsai 2002) azonosítottak. Az új fumonizin analógok felfedezésében igen fontos szerepet játszott az NMR spektroszkópiával történő szerkezetazonosítás mellett az is, hogy az 1980-as évek végétől a műszerpiacon megjelentek az első atmoszférikus nyomású elektroporlasztásos ionforrással (ESI) felszerelt tömegspektrométerek (MS), amelyek könnyen illeszthetők voltak a HPLC készülékekhez. Ezek az ún. kapcsolt HPLC/MS és HPLC/MSMS eljárások megkönnyítették a másodlagos anyagcsere termékek, így a mikotoxinok kutatását is. Az eljárás részletesebben az 2.9. és a 3.6. fejezetekben kerül ismertetésre.

A szakirodalom négy fő (A, B, C, P) fumonizin analóg csoportot különböztet meg (Rheeder és mtsai 2002). A C analógok kivételével (ahol 19 szénatomot tartalmaz a szénlánc) a fumonizinek egy lineáris, 20 szénatomos vázat tartalmaznak. Az alapvázon 3-5 hidroxil-csoport, 2 metil-csoport, 1 amino-, acetilamino- vagy 3-hidroxipiridínium-csoport található, valamint a trikarballilsav (TCA), amely a C-14, C-15 hidroxil-csoportokból észteresít kettőt, vagy ritkábban egyet. Ezek a vegyületek tehát leggyakrabban a 2-acetilamino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxieikozán (fumonizin A analógok), a 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxieikozán (fumonizin B analógok) és az 1-amino-11,15-dimetil-2,4,9,13,14-pentahidroxinonadekán (fumonizin C analógok) két molekula TCA-val képezett diészterei. Az FP analóg fumonizineket (FP₁₋₃) 1996-ban

közölték, amely komponenseknél – az FB analógoknál található primer amino-csoport helyett – 3-hidroxipiridínium-csoport kapcsolódik a fumonizin váz C-2 atomjához (Musser és Plattner 1996). Az egyes fumonizin analógokon belül a vegyületek egymástól a C-3, C-5, C-10 helyzetben lévő hidroxil-csoportok jelenlétében vagy hiányában különböznek.

A fumonizinek számos kiralitás centrumot tartalmaznak, pl. az FB₁ toxinnak 10 királis centruma van. Így elvileg az FB₁ toxin estében 1024 izomer képződésére van lehetőség (ApSimon és mtsai 1994a). Valószínű azonban, hogy egy adott gombafaj a rendelkezésére álló génkészlettel és enzimrendszerrel csak egy töredékét képes szintetizálni a sztereokémiaileg lehetséges izomereknek. A fumonizinek sztereokémiájára vonatkozó kutatások – beleértve a királis szénatomok abszolút konfigurációjának meghatározását is – az 1980-as évek végén, valamint az 1990-es évek elején indultak meg. 1994-1995-ben megjelent publikációk alapján (Boyle és mtsai 1994; Boyle és Kishi 1995b; Hoyer és mtsai 1994; ApSimon és mtsai 1994a,b, 1995; Poch és mtsai 1994; Shier és mtsai 1995) az FB₁ szerkezetét az 1. ábra mutatja. Megjegyzendő, hogy a C-14 és a C-15 atomok abszolút konfigurációjának meghatározása során felmerült vitát 1999-ben tisztázták (Edwards és mtsai 1999).

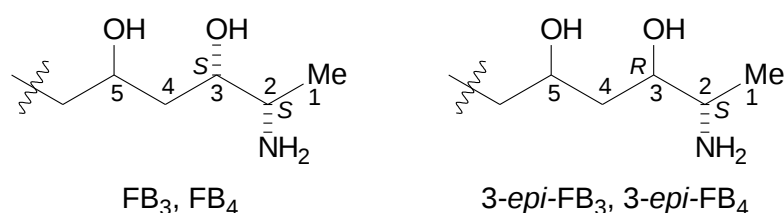


1. ábra. Az FB₁ toxin szerkezete és a királis szénatomok abszolút konfigurációja.

Az FB₂ sztereokémiájával kapcsolatos vizsgálatok az FB₁-hez hasonló szerkezethez jutottak, természetesen azzal a különbséggel, mely szerint az FB₂ a C-10-en nem tartalmaz OH-csoportot. Következtetésként tehát elmondható, hogy az FB₂ királis szénatomjainak abszolút konfigurációja megegyezik az FB₁-ével (Boyle és mtsai 1994; Harmange és mtsai 1994; Boyle és Kishi 1995a). Ezt a sztereokémiát egyébként elméleti számítások (Beier és

Stanker 1997), valamint az FB₂ előállítására végzett totál szintézis (Shi és mtsai 1997) is alátámasztották.

További sztereokémiai kutatások az FB₃ és az FB₄ toxinok királis szénatomjai abszolút konfigurációjának meghatározásával az FB₁₋₄ fumonizinek érintett királis centrumainak azonosságát igazolták (Bojja és mtsai 2004, Gelderblom és mtsai 2007) (2. ábra). Gelderblom és mtsai (2007) kutatásai egyúttal eddig ismeretlen FB₃ és FB₄ izomer teljes térszerkezetének felderítéséhez vezettek. Mivel ezen izomerek királis C-3 atomjának abszolút konfigurációja *R*-nek bizonyult – ami ellentétes az FB₃ és FB₄ C-3 atom *S* konfigurációjával – a két új izomert *3-epi*-FB₃ illetve *3-epi*-FB₄-ként nevezték el.

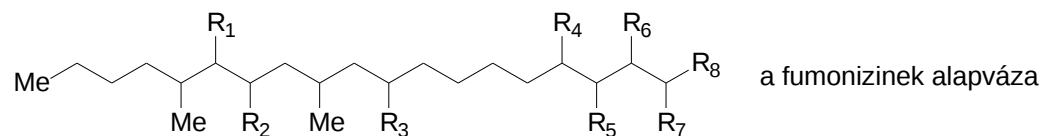


2. ábra. Az FB₃ és FB₄, valamint a *3-epi*-FB₃ és *3-epi*-FB₄ C-2 és C-3 királis atomjainak abszolút konfigurációja (a többi atom konfigurációja az FB₁-ével megegyezik, lásd 1. ábra).

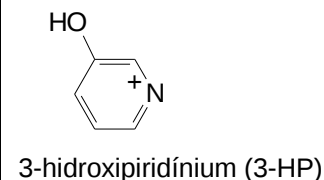
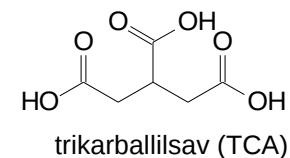
Egy 2010-ben megjelent tanulmány újabb FB₁ izomer izolálásáról számol be, amelyet FB₆-nak neveztek el (Mansson és mtsai 2010). Ennek az izomernek a szerkezete abban tér el az FB₁-től, hogy az FB₁ C-3 OH-ja helyett az FB₆-ban C-4 OH (R₅ a 3. ábrán) szerepel. A szénatomok abszolút konfigurációjáról nem nyilatkoztak a szerzők.

A fentiekén kívül különféle részlegesen hidrolizált (amikor csak egy TCA található a fumonizin vázon) fumonizineket (pl. PHFB₁), és teljesen hidrolizált (amikor nincs TCA a fumonizin vázon) fumonizineket (pl. HFB₁) is leírtak. A „PH” fumonizinek a fumonizintartalmú termékek feldolgozása (sütés, főzés) mellett természetes körülmények között is termelődhetnek (Shephard és mtsai 1996). A „H” fumonizineket olyan kukoricamintákban találták, amelyeket alkalikus hidrolízisnek (nixtamalizálás) vetettek alá, mint pl. a mexikói tortilla elkészítése során (Hopmans és Murphy 1993; Scott és Lawrence 1996; Stack 1998).

A fentieket összefoglalva megállapítható, hogy vizsgálataink megkezdésekor 28 fumonizin analóg volt ismert és azóta az irodalomban újabb három fumonizin analógot (*3-epi*-FB₃, *3-epi*-FB₄, FB₆) írtak le. A 31 vegyületből csupán hatnak (FB₁, FB₂, FB₃, FB₄, *3-epi*-FB₃ és *3-epi*-FB₄) ismert a teljes térszerkezete. A 2010-ig mások által leírt 31 fumonizin szerkezete összefoglalva a 3. ábrán látható.



Fumonizin csoport	Fumonizinek	Összegképlet	M _r	A fumonizin alapváz szubsztituensei							
				R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
FA	FA ₁	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₆	763	TCA	TCA	OH	OH	H	OH	NHCOMe	Me
	FA ₂	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₅	747	TCA	TCA	H	OH	H	OH	NHCOMe	Me
	FA ₃	C ₃₆ H ₆₁ NO ₁₅	747	TCA	TCA	OH	H	H	OH	NHCOMe	Me
	PHFA _{3a}	C ₃₀ H ₅₅ NO ₁₀	589	TCA	OH	OH	H	H	OH	NHCOMe	Me
	PHFA _{3b}	C ₃₀ H ₅₅ NO ₁₀	589	OH	TCA	OH	H	H	OH	NHCOMe	Me
	HFA ₃	C ₂₄ H ₄₉ NO ₅	431	OH	OH	OH	H	H	OH	NHCOMe	Me
	FAK ₁	C ₃₀ H ₅₃ NO ₁₁	603	=O	TCA	OH	OH	H	OH	NHCOMe	Me
FB	FBK ₁	C ₂₈ H ₅₁ NO ₁₀	561	=O	TCA	OH	OH	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₁	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721	TCA	TCA	OH	OH	H	OH	NH ₂	Me
	izo-FB ₁	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721	TCA	TCA	OH	H	OH	OH	NH ₂	Me
	PHFB _{1a}	C ₂₈ H ₅₃ NO ₁₀	563	TCA	OH	OH	OH	H	OH	NH ₂	Me
	PHFB _{1b}	C ₂₈ H ₅₃ NO ₁₀	563	OH	TCA	OH	OH	H	OH	NH ₂	Me
	HFB ₁	C ₂₂ H ₄₇ NO ₅	405	OH	OH	OH	OH	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₂	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705	TCA	TCA	H	OH	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₃	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705	TCA	TCA	OH	H	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₄	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₃	689	TCA	TCA	H	H	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₅	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₆	737	Hexahidroxialkil alapváz, pontos szerkezete még ismeretlen							
	3- <i>epi</i> -FB ₃	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705	TCA	TCA	OH	H	H	OH	NH ₂	Me
	3- <i>epi</i> -FB ₄	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₃	689	TCA	TCA	H	H	H	OH	NH ₂	Me
	FB ₆	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721	TCA	TCA	OH	OH	OH	H	NH ₂	Me
FC	FC ₁	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₅	707	TCA	TCA	OH	OH	H	OH	NH ₂	H
	N-acetil-FC ₁	C ₃₅ H ₅₉ NO ₁₆	749	TCA	TCA	OH	OH	H	OH	NHCOMe	H
	izo-FC ₁	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₅	707	TCA	TCA	OH	H	OH	OH	NH ₂	H
	N-acetil-izo-FC ₁	C ₃₅ H ₅₉ NO ₁₆	749	TCA	TCA	OH	H	OH	OH	NHCOMe	H
	OH-FC ₁	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₆	723	TCA	TCA	OH	OH	OH	OH	NH ₂	H
	N-acetil-OH-FC ₁	C ₃₅ H ₅₉ NO ₁₇	765	TCA	TCA	OH	OH	OH	OH	NHCOMe	H
	FC ₃	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₄	691	TCA	TCA	OH	H	H	OH	NH ₂	H
	FC ₄	C ₃₃ H ₅₇ NO ₁₃	675	TCA	TCA	H	H	H	OH	NH ₂	H
FP	FP ₁	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₆	800	TCA	TCA	OH	OH	H	OH	3-HP	Me
	FP ₂	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₅	784	TCA	TCA	H	OH	H	OH	3-HP	Me
	FP ₃	C ₃₉ H ₆₂ NO ₁₅	784	TCA	TCA	OH	H	H	OH	3-HP	Me



3. ábra. A fumonizinek szerkezete.

2.2. A fumonizineket termelő gombafajok és a fumonizinek *in vivo/in vitro* termelődése/termeltetése

A fumonizinek termelését több fonalas gombanemzetség esetében is megfigyelték, azonban a fő fumonizin-termelők a *F. verticillioides* és a *F. proliferatum*, amelyek világszerte elterjedt patogén fajok gazdaságilag fontos növényfajoknak, különösen a kukoricának, és emiatt számos országban jelentős élelmiszerbiztonsági problémát okoznak. A *Fusarium* fajokat a gomba taxonómiával foglalkozó kutatók a morfológiai bélyegek alapján több szekcióba sorolják. Egyre elterjedtebben alkalmazzák a DNS-alapú eljárásokat is a fajok azonosítására és a fajpopuláció genetikai változékonyságának a kimutatására. A szakirodalom négy szekció (*Liseola*, *Dlaminia*, *Elegans*, *Arthrosporiella*), összesen 15 faja (1. táblázat) esetén említi, hogy képesek fumonizineket szintetizálni, azonban nem egyforma mértékben (Rheeder és mtsai 2002). A legtöbb fumonizin-termelő *Fusarium* faj esetében az FB₁ toxin mennyisége a legjelentősebb, az összfumonizintartalom kb. 70-80%-a. Az FB₂ és az FB₃ toxinok mennyisége 15-25% illetve 3-8% között változik, míg az FB₄ mennyisége általában nem jelentős (Thiel és mtsai 1992; Marín és mtsai 1995; Musser és Plattner 1997). A *Fusarium* fajok – így a fumonizin-termelésre képesek is – a szántóföldi penészekhez tartoznak, azaz már a szántóföldön megfertőzik a gazdanövényt és kedvező körülmények esetén a raktározás alatt is folytatják a mikotoxinok bioszintézisét. A fumonizin-termelés szempontjából az abiotikus tényezők közül a nedvesség-tartalomnak és a hőmérsékletnek van a legnagyobb jelentősége. Le Bars és mtsai (1994) kimutatták, hogy 22% nedvesség-tartalom alatti szubsztráton nem történik fumonizin-termelés. Több közlemény szerint a szántóföldi körülmények között történő fumonizin bioszintézis 30-32% nedvesség-tartalom és 20-25 °C hőmérsékleten a legoptimálisabb (Le Bars és mtsai 1994; Nelson és mtsai 1994). Marín és mtsai (1996, 1999) szerint a *F. verticillioides* és a *F. proliferatum* fumonizin-termelése szempontjából a 0,97-es vízáktivitás (a_w) és a 15-30 °C hőmérséklet az optimális.

A fumonizinek bioszintézisét számos *Fusarium* faj mellett néhány egyéb gombanemzetség esetében is megfigyelték. A fumonizinek termelésére képes gombafajok és az általuk szintetizált fumonizinek – Rheeder és mtsai (2002) összefoglaló közleményét a legújabb eredményekkel kiegészítve – az 1. táblázatban láthatók. A paradicsom egyik kórokozója az *Alternaria alternata* esetében leírták, hogy *in vitro* képes termelni fumonizineket (Chen és mtsai 1992; Abbas és Riley 1996; Mirocha és mtsai 1996), azonban 1996 után ezen faj fumonizin-termelőképesége a paradicsom esetében nem nyert megerősítést.

1. táblázat. Fumonizineket termelő fonalas gombafajok (MP „mating population”, párosodási populáció).

Fumonizin-termelő <i>Fusarium</i> fajok	Termelt fumonizinek
<i>Liseola</i> szekció	
<i>Fusarium verticillioides</i> (MP-A)	FA ₁₋₃ , FB ₁₋₅ , izo-FB ₁ , FAK ₁ , FBK ₁ , FC _{1,4} , FP ₁₋₃ , PHFB _{1a-b} , 3- <i>epi</i> -FB _{3,4} ,
<i>Fusarium sacchari</i> (MP-B)	FB ₁
<i>Fusarium fujikuroi</i> (MP-C)	FB ₁
<i>Fusarium proliferatum</i> (MP-D)	FA ₁₋₃ , FB ₁₋₅ , FAK ₁ , FBK ₁ , FC ₁ , FP ₁₋₃ , PHFB _{1a-b}
<i>Fusarium subglutinans</i> (MP-E)	FB ₁
<i>Fusarium thapsinum</i> (MP-F)	FB ₁₋₃
<i>Fusarium anthophilum</i>	FB ₁₋₂
<i>Fusarium globosum</i>	FB ₁₋₃
<i>Dlaminia</i> szekció	
<i>Fusarium nygamai</i> (MP-G)	FA ₁₋₃ , FB ₁₋₅ , FAK ₁ , FBK ₁ , FC ₁ , FP ₁ , PHFB _{1a-b}
<i>Fusarium dlamini</i>	FB ₁
<i>Fusarium napiforme</i>	FB ₁
<i>Fusarium pseudonygamai</i>	FB ₁₋₂
<i>Fusarium andiyazi</i>	FB ₁
<i>Elegans</i> szekció	
<i>Fusarium oxysporum</i>	FC _{1,3-4} , N-acetil-FC ₁ , izo-FC ₁ , N-acetil-izo-FC ₁ , N-acetil-OH-FC ₁
<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>redolens</i>	FB ₁₋₃
<i>Arthrosporiella</i> szekció	
<i>Fusarium polyphialidicum</i>	FB ₁
Fumonizin-termelő egyéb fajok	
<i>Alternaria alternata</i>	FB ₁₋₃
<i>Aspergillus niger</i>	FB _{2,4,6}
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	FB _{2,4}
<i>Tolypocladium geodes</i>	FB _{2,4}
<i>Tolypocladium inflatum</i>	FB _{2,4}

Tudományos körökben nagy érdeklődést váltott ki az a megfigyelés, hogy az *Aspergillus niger* is képes lehet bizonyos fumonizinek termelésére, mivel a *F. verticillioides*-hez hasonlóan a fumonizinek bioszintéziséért felelős génklasztert sikerült ebben a fajban is azonosítani és táptalajon fumonizint (FB₂) termeltetni (Frisvad és mtsai 2007). Ezen megfigyelések után az *A. niger* fumonizin-termelésével kapcsolatos kutatások

felgyorsultak és sikerült kávébabban (Noonim és mtsai 2009), szőlőben (Logrieco és mtsai 2009; Mogensen és mtsai 2010a), mustban (Logrieco és mtsai 2009), borban (Mogensen és mtsai 2010b) és mazsolában (Mogensen és mtsai 2010a) is fumonizineket azonosítani. A *F. verticillioides* és az *A. niger* fumonizin bioszintézist szabályozó gén klasztereit a bioszintézissel foglalkozó fejezetben részletesebben ismertetem. Legújabban Mogensen és mtsai (2010c) *Tolypocladium* fajokkal kapcsolatban mutatták ki, hogy képesek fumonizineket (FB₂, FB₄) szintetizálni. A fumonizin bioszintézis szabályozásáért felelős génklaszter egymástól viszonylag távolálló nemzetségekben történő megjelenése is felveti a fajok és nemzetségek közötti horizontális géntranszfer lehetőségét.

A fumonizinek állatetelési kísérletekben történő alkalmazásához, a toxicitás és az *in vivo* metabolizmus vizsgálatához viszonylag nagy mennyiségű toxinra van szükség. A kereskedelmi forgalomban kapható fumonizinek igen drágák, ezért az állatkísérletekhez a fumonizineket lehetőleg *in vivo* vagy *in vitro* kell a toxinogén gombafajokkal megtermeltetni és lehetőség szerint a felhasználás előtt preparatív módszerekkel a biológiai mátrixból kinyerni azokat (ezekhez a kísérletekhez nem szükséges az analitikai tisztaságú komponens). Szántóföldi, természetes fertőződésből származó kukorica esetében 2-3 g/kg fumonizin produkció érhető el. Az *in vivo* fumonizin-termeltetés hátránya, hogy a biotikus és abiotikus tényezők változékonysága miatt homogén fumonizin eloszlást nem lehet elérni, és a termeltetés körülményeinek a standardizálása is nehézségekbe ütközik. Ezen okok következtében a fumonizinek termeltetésére az *in vitro* eljárások jobban elterjedtek.

A fumonizinek *in vitro* termeltetése szempontjából az abiotikus faktorok (vízaktivitás, hőmérséklet) mellett igen nagy jelentősége van a termeltetés szubsztrátjának és az alkalmazott izolátumnak, mint biotikus faktoroknak is. Mivel a toxintermelést jelentősen befolyásolja az alkalmazott gombafaj és izolátum (Musser és Plattner 1997), igen fontos, hogy a lehető legnagyobb toxin-kihozatalhoz a rendelkezésre álló fajok és izolátumok közül a legmegfelelőbbet válasszák ki. A termeltetéshez leggyakrabban *F. verticillioides* és *F. proliferatum* izolátumokat alkalmaznak. Ezeknek a fajoknak számos izolátuma termel fumonizint, azonban sok izolátum csak nyomnyi mennyiségű fumonizint szintetizál (Rheeder és mtsai 2002). Kétségtávol, a ma fumonizin-termeltetésre használt izolátumok közül a legismertebb a Dél-Afrikában izolált MRC 826-os elnevezésű *F. verticillioides* izolátum. A fumonizinek *in vitro* termeltetésére folyadék- és szilárd tenyészeteket is alkalmaznak. A folyadékkultúra előnye az, hogy a termeltetést követően kevesebb zavaró mátrix komponenst tartalmaz. A folyadékkultúrák termeltetés során gyakran valamilyen természetes-eredetű tápoldat kiegészítőt (pl. élesztőkivonat, kukoricaliszt, cirokliszt,

rizsliszt, keményítő kivonat) alkalmaznak az optimális fumonizin-termeléshez (Narashima Rao és mtsai 2010). Jiménez és mtsai (2003) kimutatták, hogy a csak ásványi sókat, vizet és egy-egy cukrot és aminosavat tartalmazó tápoldatban a *Gibberella fujikuroi* fajkomplex izolátumai szerves-eredetű tápoldat kiegészítő (élesztőkivonat, keményítő kivonat, mikológiai pepton) nélkül nem voltak képesek növekedni. A tápoldat kiegészítők alkalmazása mellett a cukorszint növelésével (5, 10 és 20 g/l) a termelt FB₁ és FB₂ toxinok mennyisége is növekedett. A tápoldat összetevőinek optimalizálásával az egyik izolátumnál az FB₁ és FB₂ esetében 6,609 és 1,472 µg/ml koncentrációt sikerült elérniük. Azt is megállapították, hogy a cukor-aminosav-izolátum kombináció alapvető jelentőségű a fumonizin bioszintézis szempontjából, azaz minden egyes izolátum esetében optimalizálni kell a tápoldathoz adagolt szén- és nitrogénforrás mennyiségét is. A tápoldathoz adott aminosavak (mint szerves nitrogénforrás) koncentrációjának 1 g/l értékről 10 g/l értékre növelése a fumonizinek bioszintézisét csökkentette, ami igazolta Shim és Woloshuk (1999) eredményeit, miszerint a *F. verticillioide*s esetében nitrogénbőség esetén a fumonizin bioszintézis út gátolt, nitrogénhiány viszont indukálja a toxintermelést. Hornok László akadémikus kutatócsoportja közölte, hogy a nitrogénhiányra fellépő fumonizin bioszintézist a *FUM* gének (*FUM1* és *FUM8*) transzkripció aktivációja váltja ki. Vad típusú, $\Delta Fphog1$ MAPK null-mutáns és a vad típusú alléllal komplementált MAPK mutáns törzsekkel végzett kísérleteikben igazolták, hogy a nitrogénhiány-okozta stressz érzékelésben az *Fphog1* MAP kináz igen fontos szerepet játszik (Ádám és mtsai 2008a,b; Kohut és mtsai 2009).

A fumonizinek termeltetéséhez a szilárd tenyésztési eljárásokat gyakrabban alkalmazzák mivel a viszonylag egyszerűbb eljárással jelentősebb mennyiségű fumonizin állítható elő. Szubsztrátként általában kukoricát vagy rizst használnak fel a termeltetéshez. Az MRC 826-os izolátummal Alberts és mtsai (1990) szemes kukoricán 17900 mg/kg FB₁ toxint tudtak termeltetni. Eredményeiket – ugyanazt az izolátumot alkalmazva – Fodor és mtsai (2006) nem tudták reprodukálni. Kísérleteikben az FB₁ toxin tekintetében jóval alacsonyabb ($244,4 \pm 102,5$ mg/kg) toxinhozamot értek el, feltehetőleg azért mert szemes kukorica helyett darált kukoricát alkalmaztak és a tenyészetek a nem megfelelő szellőzés miatt befülledtek és/vagy az izolátum fenntartása során az izolátum fumonizin-termelő képessége a többszöri átoltás miatt lecsökkent. Hinojo és mtsai (2006) *F. verticillioide*s izolátummal rizsen 3840 mg/kg FB₁ és 448,5 mg/kg FB₂ toxint tudtak termeltetni. A fumonizin-termelés 20 °C hőmérsékleten volt a legmagasabb, míg 37 °C-on

a legalacsonyabb. Az öt vizsgált vízaktivitás (a_w) értékből négynek (0,97; 0,98; 0,99 és 1,0) nem volt szignifikáns hatása a fumonizin-termelésre, viszont 0,96-os a_w érték alatt fumonizineket nem tudtak kimutatni a tenyészetekből. Bailly és mtsai (2005) egész szemű, durva szemcseméretűre, valamint liszt finomságúra őrölt kukoricát és rizst használtak szubsztrátként erősen toxinogén *F. verticillioides* izolátumok fumonizin-termelésének a tanulmányozásához. A kukorica szubsztráton a rizs szubsztráthoz képest magasabb FB₁ szintet értek el, ugyanakkor a két szubsztrát között a micélium növekedésben – az ergosterin-tartalom meghatározása alapján – szignifikáns eltérést nem tapasztaltak. A legmagasabb toxin hozamot (4000 mg FB₁/kg) az NRRL-3428-as számú izolátummal a durvára őrölt kukorica esetében kapták, amikor 50% víztartalom mellett, 5 hétig, 21 °C hőmérsékleten inkubálták a tenyészeteket. A durvára őrölt kukorica esetében a gomba micéliumok könnyebben hozzáfértek a makro- és mikroelemekhez, szerves tápanyagokhoz, mint a szemes kukorica esetében. A kukoricaliszt szubsztráton a gyenge oxigén ellátottság miatt a micéliumok nem tudtak megfelelő mértékben növekedni, ami minimális fumonizin-termelést eredményezett.

2.3. A fumonizinek bioszintézise és a bioszintézis genetikai szabályozása

A témakör kiemelkedő elméleti jelentőségét igazolják a számos közlemény mellett az utóbbi évtized összefoglaló munkái is (Desai és mtsai 2002; Merrill 2002; Du és mtsai 2008; Alexander és mtsai 2009; Huffman és mtsai 2010; Picot és mtsai 2010; Reverberi és mtsai 2010). A fumonizinek bioszintézisének tanulmányozásához főként izotópetetési kísérleteket alkalmaztak. ¹³C-jelzett prekursorokkal végzett kísérletekben igazolták, hogy a C-1, C-2, és a primer amino-csoport alaninból, a C-3 – C-20 szénatomok az acetyl-KoA-ból és malonil-KoA-ból, míg a C-12 és C-16 metil-csoportok a metioninból származnak (Alberts és mtsai 1993; Branham és Plattner 1993; Blackwell és mtsai 1994, 1996; Plattner és Shackelford 1992). A C-3 hidroxil-csoport forrása egy acetyl-KoA-ból képződött karbonil-csoport, azonban a C-5, C-10, C-14 és C-15 hidroxil-csoportok valószínűleg a molekuláris oxigénből származnak (Caldas és mtsai 1998). A TCA feltételezhetően a citrát-ciklusból származik (Blackwell és mtsai 1996).

A legtöbb mikotoxin bioszintézisének génjei klaszterekben helyezkednek el. A *F. verticillioides* esetében 15 gén (*FUM1-FUM3*, *FUM6-FUM8*, *FUM10*, *FUM11*, *FUM13-FUM19*) az 1-es kromoszómán egy lókuszbán helyezkedik el, közülük a fumonizin bioszintézis során 13 génnek tulajdonítanak fontosabb szerepet (Desjardins és mtsai 1996; Desjardins és Proctor 2007; Seo és mtsai 2001). A legelőször publikált és ugyanakkor az

egyik legfontosabb *FUM* gén a *FUM1*, amely hét funkcionális doménnel, β -ketoacil szintáz (KS), aciltranszferáz (AT), dehidratáz (DH), metiltranszferáz (MT), enoilreduktáz (ER), β -ketoacil reduktáz (KR) és acil-vivő fehérje (ACP) rendelkezik és a poliketid szintáz (PKS) fehérjét kódolja (Proctor és mtsai 1999). Feltételezik, hogy a gén által kódolt Fum1p PKS fehérje felelős a 18 szénatomból álló telített szénlánc (C-3-tól C-20-ig) és a C-12 és C-16 atomokon lévő egy-egy metil-csoport szintéziséért is, amely a fumonizin bioszintézis első lépése. Sok PKS rendelkezik – a lánchosszabbítás leállítása valamint a poliketid lánc PKS enzimről történő leválásának elősegítése céljából – tioészteráz (TE) vagy TE/ciklizáló doménnel (Proctor és mtsai 2003; Staunton és Weissman 2001), azonban a poliketid váz a PKS Fum1p fehérjéről a Fum8p fehérje közreműködésével válik le (Du és mtsai 2008; Gerber és mtsai 2009).

Homológia vizsgálatokkal igazolták, hogy a Fum8p hasonlóságot mutat az amino-aciltranszferázok egy családjával, amelyek az acil-KoA és az aminosavak kondenzációját katalizálják. A *FUM8* gén kiiktatásával a fumonizinek bioszintézise és az intermedierek felhalmozódása is leállt (Seo és mtsai 2001). Három deléciós mutáns (*ΔFUM1*, *ΔFUM6*, *ΔFUM8*) különböző kombinációinak együtt-tenyésztéses kísérleteivel igazolták, hogy a Fum6p a Fum1p és a Fum8p után lép működésbe (Bojja és mtsai 2004). A Fum6p homológiát mutat a citokróm P450 oxigenázzal és hasonló a *F. oxysporum*-ból izolált P450 foxy elnevezésű zsírsav hidroxiláz enzimhez (Seo és mtsai 2001). A Fum6p a C-14 és C-15 szénatomokat hidroxilezi, amely hidroxil-csoportok a fumonizin vázon a trikarballilsav molekulákkal történő észterezési reakciókban vesznek részt. Gerber és mtsai (2009) igazolták, hogy a (2S)-alanin és a enzimhez-kötött C-18 poliketid lánc közötti C-C kötés a *FUM8* gén által kódolt Fum8p fehérje, a piridoxál-foszfát függő amino-aciltranszferáz enzim közreműködésével jön létre.

A Fum13p egy olyan 3-ketoreduktáz, amely a C-3 keton redukcióját katalizálja a bioszintézis korai szakaszában. *FUM13* mutánsok 90%-kal kevesebb FB₁ toxint termeltek mint vad típusú társaik, és főleg a 3-keto-FB₃ és a 3-keto-FB₄ komponenseket szintetizálták. Ez vezetett arra a konklúzióra, hogy a Fum14p a szintézis egyik utolsó lépésében vesz részt, de még a Fum2p által történő C-10 hidroxilezés előtt, amely az elágazási pont az FB₃→FB₁ és FB₄→FB₂ toxinok szintézise felé. Úgy tűnik, hogy a C-3 helyzetben található keton jelenléte gátolja a Fum3p által történő C-5 hidroxilezést. Azonban, mivel a vad típushoz képest azért 10% mennyiségben FB₁₋₄ toxinok szintetizálódtak, kell lenni egy másodlagos és kevésbé hatékony 3-ketoreduktáznak is, amely valószínű, hogy a 3-ketoszfinganin reduktáz homológja (Butchko és mtsai 2003a).

A Fum2p enzim a citokróm P450 oxigenáz homológja. Kimutatták, hogy a *FUM2* gén deléciójával nyert mutánsok elvesztették képességüket az FB₁ és FB₃ toxinok szintézisére a (Desjardins és mtsai 1996; Butchko és mtsai 2006). Két természetben előforduló törzs (amelyek közül az egyik törzs nem termelt FB₁ és FB₃ toxint) fumonizin-termelőképességének összehasonlításával azonosítani tudták, hogy a *FUM2*-es gén felelős a C-10 hidroxilezéséért (Desjardins és mtsai 1996; Proctor és mtsai 2003).

A *FUM3* gént először *FUM9*-ként közölték, amíg a funkcióját kapcsolatba nem hozták a *FUM3* ismert lókuszával (Desjardins és mtsai 1996; Butchko és mtsai 2003b; Proctor és mtsai 2003). A kísérleti megfigyelések azt jelzik, hogy az FB₁/FB₂ bioszintézis utolsó lépését – az FB₃/FB₄ toxinok C-5 atomjának hidroxilezését – a Fum3p katalizálja (Ding és mtsai 2004). A TCA beépülésének a kiiktatása nem eredményezett FB₁/FB₂ toxint, csak hidrolizált FB₃/FB₄ komponenseket, jelezve, hogy a Fum3p a Fum14p után lép működésbe (Zaleta-Rivera és mtsai 2006). Azok a mutánsok amelyeknél a *FUM9*-es gént kiiktatták, képtelenek voltak FB₁/FB₂ toxint termelni.

Noha a *FUM11*-es gén nem nélkülözhetetlen a fumonizinek bioszintéziséhez, a gén kiiktatása alacsonyabb fumonizin koncentrációkat eredményezett. Mivel a Fum11p homológiát mutatott a mitokondriális, membránhoz kötött trikarbonsav transzporterekkel, úgy tűnik, hogy a *FUM11* prekursorokat szolgáltat a trikarballilsav előállításához (Proctor és mtsai 2003).

A TCA pontos összeállításáért és az oldalláncok fumonizin vázhoz történő kapcsolásáért 3 gén felelős (*FUM7*, *FUM10*, *FUM14*). A Fum7p és Fum10p működésének pontos sorrendje még nem tisztázott. Több tanulmány szerint a TCA és a fumonizin váz megfelelő hidroxil-csoportjai (C-14 és C-15) közötti észterezési reakcióért a Fum14p a felelős. A *FUM14* kiiktatása a hidrolizált fumonizinek mennyiségének jelentős növekedését eredményezte és a Fum14p enzimnek NRPS-kal mutatott homológiája alapján feltételezik, hogy a Fum14p az észter képződést (C-O) katalizálja az amid képződés (C-N) helyett, ami normálisan elvárható lenne az NRPS enzimtől (Zaleta-Rivera és mtsai 2006). Lehetségesnek tartják, hogy a *FUM7*, *FUM10* és *FUM14* együtt képez egy nem riboszómális peptid szintetáz (NRPS) komplexet (Zaleta-Rivera és mtsai 2006).

A Fum7p hasonlóságot mutat a dehidrogenázzal, amely a hidroxil-csoportokat ketonná alakítja (Proctor és mtsai 2003). A *FUM7*-es gén kiiktatása olyan fumonizineket eredményezett ahol a TCA oldalláncban egy kettős kötés volt megfigyelhető (Butchko és mtsai 2006). Emiatt azt gondolják, a Fum7p fehérje fumonizin bioszintézisben játszott

szerepe az, hogy a kettős kötést eltávolítva létrehozza a trikarballilsavat (Zaleta-Rivera és mtsai 2006).

A *FUM10* kiiktatása hidrolizált fumonizineket (HFB₃, HFB₄) eredményezett, jelezve, hogy a *FUM10* szükséges a TCA molekulák fumonizin vázhoz történő kapcsolásához. Mivel a Fum10p homológiát mutatott egy acil-KoA szintázzal, feltételezik, hogy a Fum10p felelős a TCA-KoA komplex képződéséért.

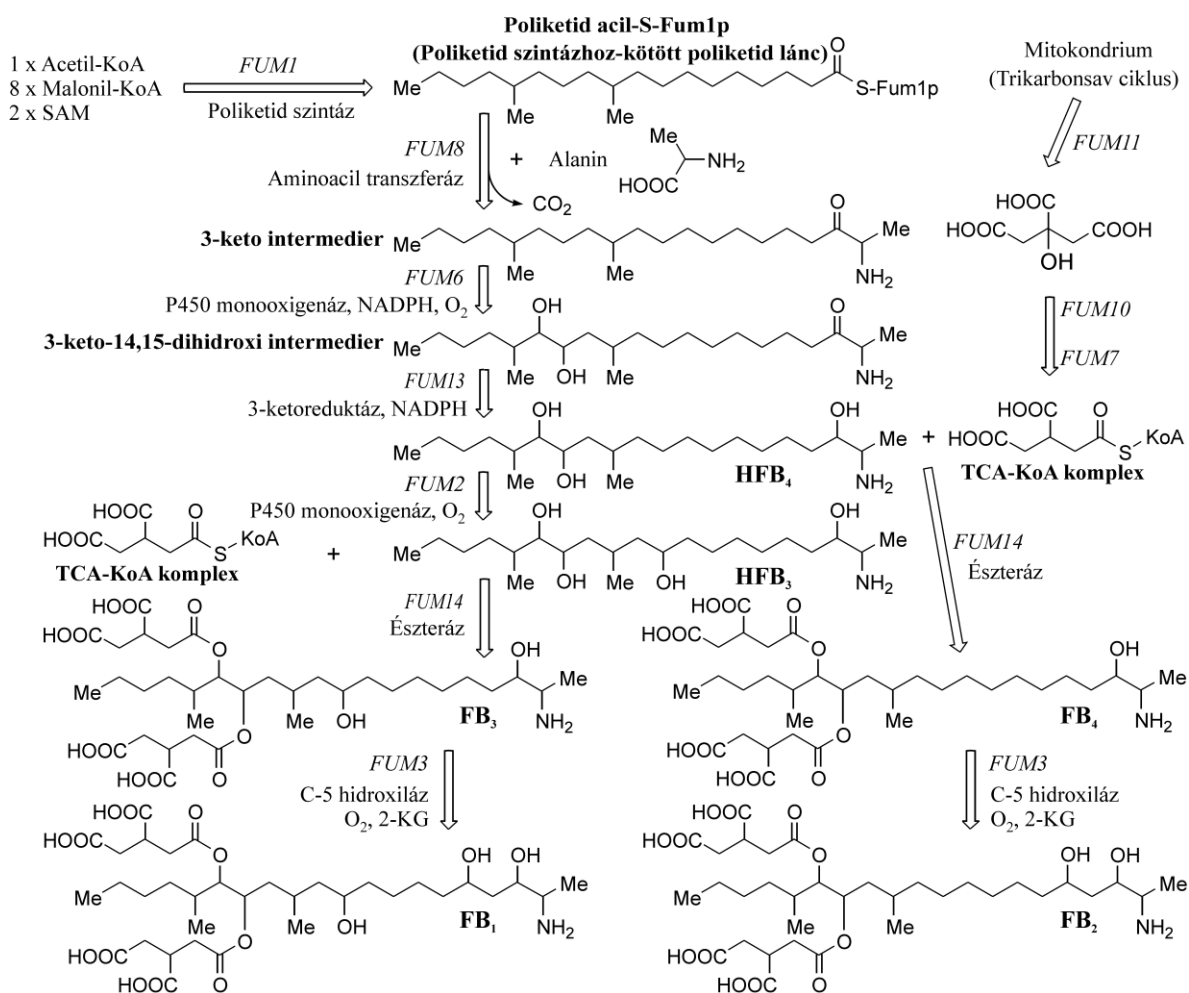
Brown és mtsai (2005, 2007) *F. verticillioides*-ben két további gént (*FUM20*, *FUM21*) azonosítottak a fumonizin bioszintéziséért felelős gén klaszterben a 87000 EST jellemzése során. A *FUM20* egy kis méretű gén, amely 40 aminosavat kódol, funkciója még nem tisztázott. A *FUM21* gén egy Zn(II)2Cys6 transzkripciósfaktort kódol: azoknál a törzseknél ahol ezt a gént kiiktatták, a fumonizin bioszintézis gátlását figyelték meg. Így valószínű, hogy a Fum21p egy irány-specifikus transzkripciósfaktor.

A *FUM15-FUM18* génekről feltételezik, hogy nem nélkülözhetetlenek a fumonizinek bioszintéziséhez. A *FUM15* génről azt gondolják, hogy egy citokróm P450 monooxigenázt kódol. A fumonizin váz hidroxil-csoportjai közül a *FUM15* kiiktatása egyik hidroxil-csoportot sem befolyásolta. Ez azt sugallja, hogy a *FUM15* a szénlánc egy már felismert pontjának a hidroxilezésében vehet részt. A *FUM16* génnel kapcsolatban feltételezik, hogy hasonlóan a *FUM10* génhez acil-KoA szintázt kódol, azonban, szemben a *FUM10* génnel, kiiktatása nem eredményezett változást a fumonizin-termelés mintázatában (Butchko és mtsai 2006). A *FUM17* és *FUM18* génekről feltételezik, hogy ceramid szintázokat kódolnak és a fumonizinekkal szembeni rezisztencia mechanizmus kialakításában lehet fontos szerepük.

A *FUM19* gén az ABC transzporter génekhez hasonló és feltételezik, hogy ez is a rezisztencia mechanizmusban játszik szerepet. Proctor és mtsai (2003) öt *FUM19* mutáns vizsgálata során azt találták, hogy az FB₁ és FB₃ toxin arányában mindegyik mutáns esetében történt egy kis változás, míg azok a transzformánsok amelyek megőrizték a vad típust nem mutattak eltérést a két toxin arányában. Ezt a fenotípust két különböző kísérletben is megfigyelték, ami jelzi a *FUM19* finom szerepét a végleges fumonizin mintázat kialakításában. Mivel ezek a gének (*FUM17*, *FUM18*, *FUM19*) egy klaszterben helyezkednek el és együtt expresszálódnak más fumonizin génekkel, valószínű, hogy vagy a bioszintézisben játszanak szerepet, vagy a toxinokkal szembeni rezisztenciát nyújtják. A genomban azonban találhatók olyan gének is, amelyek képesek kompenzálni a mutánsokban kiesett funkciókat. Így pl. a *F. verticillioides* genomi szekvencia adatbázisa jelzi, hogy a gombának a *FUM17* és *FUM18* mellett három további ceramid szintáz génje

és a *FUM19* génen kívül 20 egyéb ABC transzporter génje is van. Továbbá úgy tűnik, hogy a *FUM11* (trikarbonsav transzportert kódol) és a *FUM20* sem nélkülözhetetlen a bioszintézishez (Brown és mtsai 2005; Butchko és mtsai 2006). A *FUM11* mutánsok a vad típusnak megfelelő FB_{1-4} toxin-mintázatot mutatták, ugyanakkor PH és KPH fumonizineket is termeltek jóval magasabb mennyiségben mint a vad típus. Ezek az eredmények is mutatják, hogy a *FUM11* és *FUM19* gének a fumonizin bioszintézisben játszott szerepüket tekintve fontosak, de nem nélkülözhetetlenek.

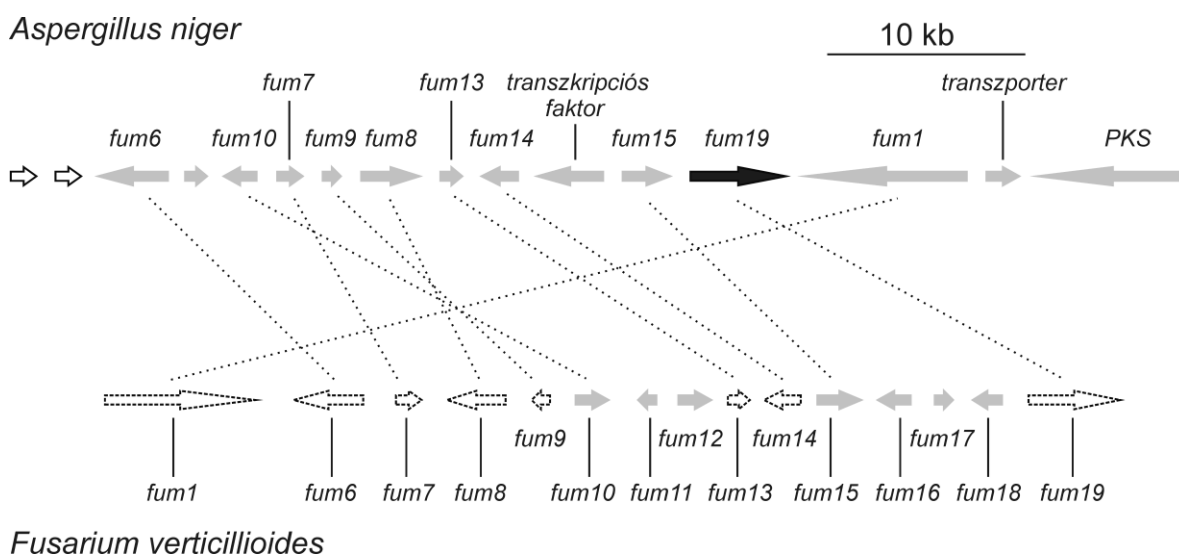
A bioszintézisben szerepet játszó gének genetikai és biokémiai eljárásokkal történő közvetlen tanulmányozása szolgáltatotta az alapot a fumonizinek (FB_{1-4}) bioszintézis útjainak a felvázolásához (4. ábra).



4. ábra. Az FB_{1-4} toxinok bioszintézisének főbb lépései *F. verticillioides*-ben (Butchko és mtsai 2006, módosítva). 2-KG = 2-ketoglutársav, SAM = S-adenozil-metionin.

Waalwijk és mtsai (2004) *F. proliferatum*-ban a teljes 15 gént tartalmazó *FUM* klasztert azonosították és azt találták, hogy a gének sorrendje és irányultsága ugyanaz mint a *F. verticillioides*-ben. A klaszteren kívüli szekvencia azonban a *FUM1* géntől felfelé található 2 kb régió kivételével jelentősen eltért, amely valószínű, hogy a később közölt *FUM21*-es regulátor gén (Brown és mtsai 2007).

Az 5. ábrán látható, hogy az *Aspergillus niger*-ben leírt *FUM* gén klaszter jelentősen eltér a *Fusarium* nemzetségben található *FUM* klaszterektől (Baker 2006). Az *A. niger* *FUM* gén klasztere nem tartalmazza a *FUM2*, 11, 16, 17 és 18 géneket. Elképzelhető, hogy néhány módosító enzim helyezkedik el az *A. niger* fumonizin gén klaszterében és talán nem az összes *F. verticillioides*-ben talált ORF szükséges a fumonizin-termeléshez és a sejtek védelméhez (Alexander és mtsai 2009). A *FUM2* hiánya okozza azt, hogy az *A. niger* termel FB_2 toxint, ugyanakkor nem termel FB_1 és FB_3 toxinokat, mivel a Fum2p fehérje a felelős a C-10 szénatom hidroxilezéséért és az FB_2 toxinnak nincs ilyen hidroxil-csoportja, míg az FB_1 és FB_3 toxinnak van (Frisvad és mtsai 2007). Mivel a *FUM11*, 16, 17 és 18 gének az *A. niger*-ben hiányoznak feltételezik, hogy ezek a gének nem szükségesek a fumonizinek termeléséhez. A *FUM11*-re, mint trikarbonsav transzporter génre azért nincs szüksége az *A. niger*-nek a fumonizin gén klaszterében, mert ez a faj közismerten jó citromsav-termelő, amely a citrát-ciklus egy igen fontos trikarbonsav alkotóeleme.



5. ábra. A *F. verticillioides* és az *A. niger* fumonizin klaszterei (Pel és mtsai 2007).

2.4. A fumonizin-okozta toxikózisok és biokémiai változások laboratóriumi és tenyésztett állatokban

A fumonizinek toxicitásának újabb eredményeire vonatkozó ismereteket az összefoglaló művek folyamatosan publikálták (Diaz és Boenmans 1994; Bondy és Pestka 2000; Gutleb és mtsai; Humpf és Voss 2004; Voss és mtsai 2007; El-Nekeety és mtsai 2007; Stockmann-Juvala és Savolainen 2008). Az egyes részleteket – kitérve a hazai kutatás eredményeire is – röviden az alábbiakban foglalom össze.

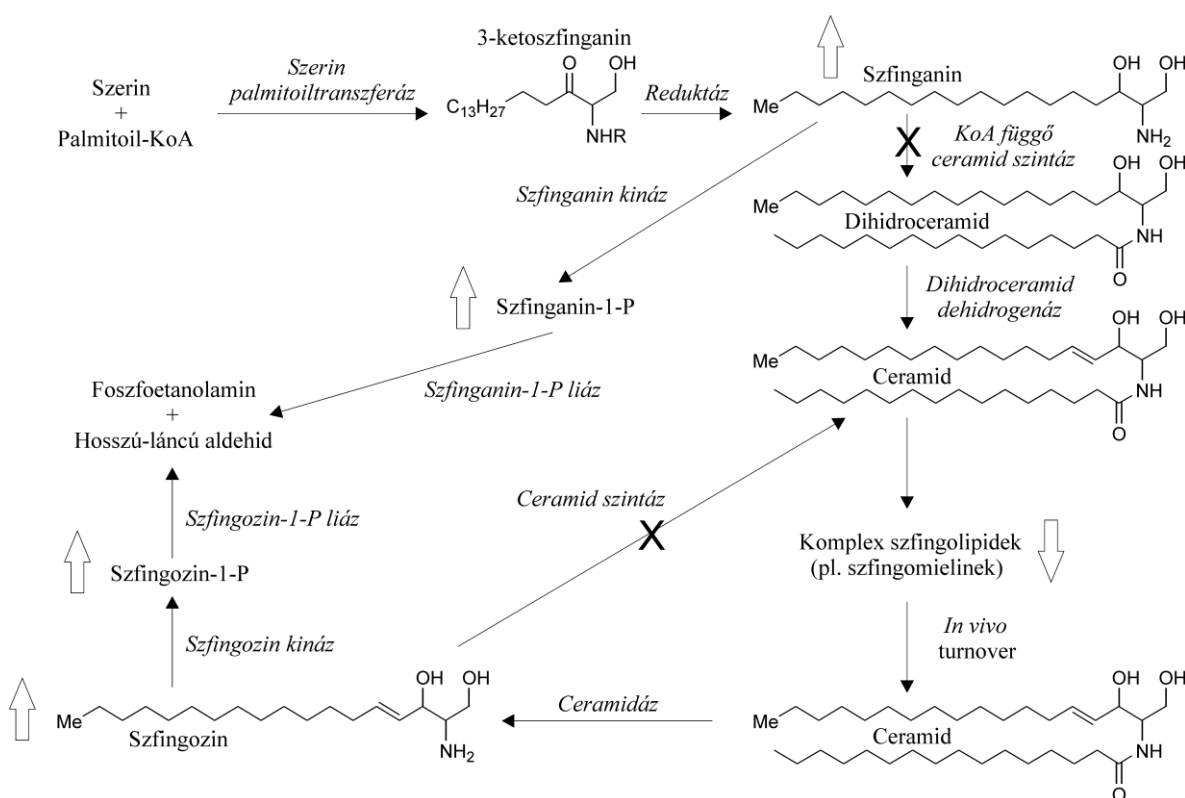
Mint az előzőekben említésre került, már a múlt század elején megfigyeltek lovakban és rokon fajaikban (öszvér, szamár) olyan – idegrendszeri tünetekkel járó – megbetegedéseket (ELEM), amelyek az állatok elhullásához vezettek. Csak jóval később találtak közvetlen összefüggést a penészes kukorica etetése és az ELEM között, amikor Wilson és Maronport (1971) *F. verticillioidea* gombatenyésztéssel kevert takarmánnyal etetett lovakban kísérletes úton előidézte az ELEM betegséget, amely az állatok elhullásával végződött. Magyarországon is már 1977-ben leírtak (Lacza és Lázár 1977) a lovak esetében olyan megbetegedést, amelyet akkor takarmány-toxikózisnak diagnosztizáltak és utólag a tüneteket és kórtani elváltozásokat kiértékelve arra a következtetésre jutottak, hogy a lovak elhullását akkor az agylágyulás okozta (Fazekas és Bajmócy 1996).

Magyarországon már az 1950-es évek elején észlelték sertésekben – kukorica takarmány fogyasztását követően – a tüdővízenyő járványszerű előfordulását (Domán 1952; Petrás 1952). A betegség hazánkban a sertések „hízalási tüdővízenyője” néven vált ismertté. Patológiai és biokémiai vizsgálatokat folytatva Kékesi (1961) arra a következtetésre jutott, hogy a sertések tüdővízenyőjét takarmányozás-eredetű szérum albuminszint csökkenés okozza, amely a kálium- és nátriumion arány megváltoztatása révén szívműködési zavarhoz vezet. Akkor még nem tudták, hogy a háttérben a fumonizin-szennyezés okozta toxikózis található. *F. moniliforme* gombával fertőzött kukoricával etetett sertésekben tüdővízenyőt és mellvízkórt tudtak előidézni, amelyet a tünetegyüttesről PPE-nek neveztek el. A hízalási tüdővízenyő és a Kriek és mtsai (1981a) által PPE-nek elnevezett tünetegyüttes közötti hasonlóság alapján hazai kutatók feltételezték, hogy a hízalási tüdővízenyőt is a takarmányok mikotoxin-szennyezése idézi elő (Kakuk 1995). Ezt a feltételezést Fazekas és mtsai (1997) kísérletes úton, két malacnak 330 mg FB₁/kg toxint tartalmazó kísérleti táppal történő etetésével igazolták. A malacok a takarmány részbeni visszautasítása után a kísérlet 5. napján súlyos légzőszervi tünetek között elhullottak. A patológiai vizsgálatok súlyos tüdővízenyőt, mellvízkórt, májelfajulást és

kezdődő agylágyulást állapítottak meg, azaz az elváltozások megegyeztek az USA-ban leírt PPE nevű kórképpel. Motelin és mtsai (1994) 101 és 175 mg FB₁/kg toxint tartalmazó takarmányt fogyasztó választott malacokkal végzett vizsgálatukban azt találták, hogy a vizsgálat 14. napján a vészérum bilirubin és koleszterin koncentrációja megemelkedett és néhány enzim aktivitása (GGT, ALT, AST) is jelentősen megnőtt. A sertések klinikai tünetekben meg nem nyilvánuló, de májkárosodást (Riley és mtsai 1996) valamint vese- és hasnyálmirigy nekrozist (Harrison és mtsai 1990) kiváltó megbetegedését alacsonyabb koncentrációjú (20 mg/kg alatt) FB₁ toxint tartalmazó takarmány szájon keresztül történő bevitelével is sikerült kiváltani. Rotter és mtsai (1996) 10 mg/kg FB₁ tartalmú takarmányt fogyasztó választott malacok mindegyikében az AST aktivitás emelkedését tapasztalták a kísérlet 2. hetében. Zomborszky-Kovács és mtsai (2002) igen alacsony toxin-tartalmú (< 1 mg FB₁/kg) takarmányt etettek nyolc héten keresztül a sertésekkel. Ez az alacsony FB₁-tartalom klinikai tüneteket még nem okozott, viszont a szérum biokémiai paramétereit vizsgálva megállapították, hogy a fumonizin terhelés hatására – a dózis nagyságától és idejétől függően – a bilirubin és az epesavak mennyisége, valamint több fontos enzim (ALP, AST, LDH, GGT) aktivitása is megnőtt. Vemhes kocákkal végzett kísérletükben megállapították, hogy az FB₁ toxint tartalmazó takarmány etetése már a méhen belül károsította a magzatokat. A tüdővízenyő és a máj kóros elváltozása már az ellés után leölt malacokban is kimutatható volt. A vészérum ALKP, AST és GGT enzimeinek aktivitása a fiziológiásnál magasabb volt. A szérum szfinganin és szfingozin aránya (Sa/So) a tünetek súlyosságának megfelelően változott. Az értékek az enyhe-, valamint a súlyos fokú elváltozás esetén 0,20-0,24 és 0,29-0,36 között voltak (Zomborszky-Kovács és mtsai 2000).

Az Sa/So arány megváltozásának igen nagy jelentősége van a fumonizin okozta toxikózisok diagnosztizálásában. Kimutatták, hogy a C-2 atomon primer amino-csoportot tartalmazó fumonizinek – mint a szfingoid bázisok (Sa, So) szerkezeti analógjai – kompetitív módon gátolják a ceramid szintáz, amely a szfingolipid metabolizmus kulcs enzimeként katalizálja a Sa, So és más szfingoid bázisok acilezését. Kimutatták, hogy a ceramid szintáz az FB₁ toxin primer amino-csoportjával és a trikarballil-csoportokkal is interakcióba léphet (Merrill és mtsai 1996; Humpf és mtsai 1998). A ceramid szintáz gátlása következtében az enzim szubsztátjának (szfinganin) a szintje a szövetekben, a szérumban és a vizeletben drámaian megemelkedik, míg a So szintje kisebb mértékben növekszik (Merrill és mtsai 2001; Riley és mtsai 2001; Riley és Voss 2006). Ily módon a fumonizinek gátolják a ceramid *de novo* bioszintézisét és a szfingolipidek (pl.

szfingomielin) képződését (6. ábra), ezáltal olyan celluláris eseményeket indítanak el, amelyekről azt gondolják, hogy felelősek ezen komponensek toxikusságáért és rákkeltő hatásáért. A szfingolipidek a biológiai membránok igen fontos alkotói, továbbá a sejtek közötti információátadásban is szerepet játszanak, ezért az anyagcseréjük kóros megváltozása az egész szervezetre káros hatással van. A szfingomielinek igen fontos szerepet töltenek be a biológiai membránok stabilitásában, így bioszintézisük gátlása a sejtek lízisét idézheti elő és ez lehet a felelős az ELEM és a PPE kórképekben megfigyelt késleltetett nekrozisért is. A ceramidokról, mint a szfingozin *N*-acil származékairól feltételezik, hogy a szfingozinhoz hasonlóan, másodlagos hírvivő szerepet töltenek be és tumor-szupresszor lipideként funkcionálnak (Hannun és mtsai 1993).



6. ábra. A szfingolipid metabolizmus sémája, jelezve (X) azon pontokat, amelyeket a fumonizinek blokkolnak. A felfelé mutató vastag nyilak a szövetekben és a szérumban a fumonizinek hatására emelkedő tendenciát mutató komponensek, míg a lefelé mutató vastag nyíl a komplex szfingolipidek koncentrációjának a csökkenését jelzik (Pruett és mtsai 2008, módosítva).

A szfingolipidek bioszintézisének első lépésében a szerin kapcsolódik a palmitinsavat vagy a sztearinsavat szállító KoA-val, majd a keletkező 3-ketoszfingánin redukálódik NADPH segítségével szfingáninná. Ezután a szfingánin a ceramid szintáz által, többféle

zsírsav-acil-KoA-t (sztearinsav>lignocerilsav>palmitinsav>olajsav) felhasználva dihidroceramiddá acilálódik, majd a dihidroceramid dehidrogenáz hozza létre a C-4 és C-5 atomok közötti kettős kötést, kialakítva ezzel a ceramidot, amelyből a komplex szfingolipidek képződnek. A szfingozin, amely a ceramid bomlásterméke, a ceramidáz enzim segítségével alakul ki. A szfinganinból és a szfingozinból is kináz enzimek közreműködésével képződik a foszfát származékuk (szfinganin-1-foszfát, szfingozin-1-foszfát), amelyekből liáz enzimek hatására képződik a foszfoetanolamin és a hosszú-láncú aldehidek (6. ábra).

A fumonizinek hatására bekövetkező szfingoid bázis felhalmozódásokat és az Sa/So arány megváltozását számos emlős-, szárnyas- és halfajban megfigyelték, amelyet Bolger és mtsai (2001), valamint Haschek és mtsai (2001) összefoglaló közleménye tárgyal. Merrill és mtsai (2001) valamint Riley és mtsai (2001) igazolták, hogy kísérleti körülmények között az Sa/So arány meghatározása a szövetekben, a szérumban és a vizeletben valóban hasznos biomarker a fumonizin kitettség igazolására, azonban figyelembe kell venni, hogy a fumonizinek által indukált szfingoid bázis profil megváltozás visszafordítható folyamat (Wang és mtsai 1992; Voss és mtsai 1998a; Enongene és mtsai 2002).

Az összetett gyomorral rendelkező kérődző állatok viszonylag ellenállóak a takarmányok fumonizin-szennyezettségével szemben (Smith és Thakur 1996). Osweiler és mtsai (1993) növendék szarvasmarhákon 148 mg/kg FB₁₋₃ toxin-tartalmú takarmánynak az etetésével idéztek elő súlygyarapodás csökkenést és májelfajulást. Mathur és mtsai (2001a) szarvasmarhákon végzett vizsgálataik során hét napon keresztül intravénásan adagolták az FB₁ toxint és az adagolás megkezdése után 2-4 nappal a szérum és a vizelet biokémiai analízise máj- és veseelfajulást mutatott ki az állatokban. A májban, a vesében, a tüdőben a szívben és a vázizmokban is az Sa és So szint növekedését figyelték meg, azonban a lovakkal és a sertésekkel szemben kardiovaszkuláris eltérést nem tapasztaltak (Mathur és mtsai 2001b). Az USA-ban, vadonélő szarvasokban jelentkező megbetegedést követően a szérumban magas AST szintet mértek és a takarmányukban jelentős FB₁-szennyezetést mutattak ki (Howerth és mtsai 1989). Juhokban fumonizin-tartalmú (45,5 mg FB₁₋₃/kg) gombatenyészet etetésével idéztek elő máj- és veseelfajulást (Edrington és mtsai 1995).

A baromfifélék is viszonylag ellenállóak a fumonizin toxicitással szemben, noha naposcsibék esetében a magas dózisú (100-400 mg/kg) FB₁ toxint tartalmazó gombatenyésztettel történő etetés a növekedésben való lemaradást, májkárosodást és angolkórt idézett elő (Ledoux és mtsai 1992). Pulykapipék etetési kísérletei hasonló

eredményeket adtak azzal a különbséggel, hogy a hosszantartó fumonizin kezelésre a naposcsibékkel szemben érzékenyebbek voltak (Weibking és mtsai 1993; Broomhead és mtsai 2002). Tőkés récéken végzett mesterséges táplálásos kísérletek során amikor 20 mg/kg FB₁-tartalmú kukoricát 12 napig etettek az állatokkal azt tapasztalták, hogy a kacsák 8%-a elhullt, a takarmány hasznosulása csökkent és az Sa szintje a májban és a szérumban megnövekedett igazolva, hogy a kacsák érzékenyebbek a fumonizinekre (Tardieu és mtsai 2004). Csirkéken és pulykákon végzett etetési kísérletek azt mutatták, hogy az FB₁ toxin ezekre az állatokra immunszuppresszív hatással is rendelkezik (Qureshi és Hagler 1992; Dombrink-Kurtzman és mtsai 1994). A vízi szárnyasok fumonizin érzékenységéről igen kevés adat áll rendelkezésre.

Nyérceket (*Mustela vison*) 118 mg/kg fumonizint tartalmazó táplálékkal etettek, de a letargián kívül semmilyen klinikai tünetet nem mutattak (Restum és mtsai 1995). A szérumban bekövetkező változások a máj, a vese és a hasnyálmirigy megbetegedését jelezték, ugyanakkor a szövettani vizsgálatok kóros elváltozást nem mutattak. A szabad Sa mennyisége és az Sa/So arány a májban és a vesében is megemelkedett. A nőstény nyércek szaporodására a 115 és 254 mg/kg fumonizint tartalmazó takarmány etetése nem volt hatással (Powell és mtsai 1996). A vizsgálatok alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a nyércek a fumonizin-okozta toxicitásra nem túlságosan fogékonyak.

A haltakarmányok legfontosabb összetevője a kukorica. Az USA-ban 1 kg haltakarmányban 300-350 g kukorica található. A potenciális fumonizin toxikózis miatt a fumonizinek hatását több halfajon (harcsa, ponty) is vizsgálták. A pettyes harcsa (*Ictalurus punctatus*) öt hétig tartó etetési kísérlet során 313 mg FB₁/kg gombatenyészettel fertőzött kukorica takarmányt is tolerált toxicitásra utaló szöveti elváltozás nélkül (Brown és mtsai 1994). Ugyanezen a halfajon végzett másik kísérlet során ≥ 20 mg FB₁/kg gombatenyészettel fertőzött kukoricával 10-14 hétig etették a felnőtt halakat és csökkent súlygyarapodást, valamint a hematológiai paraméterek és a máj morfológiai megváltozását tapasztalták. A 320 és 720 mg FB₁/kg takarmány esetében jelentős elhullás történt (Lumlertdacha és mtsai 1995; Lumlertdacha és Lovell 1995). Pepeljnjak és mtsai (2003) egy-nyaras pontyokat 42 napig etettek FB₁-tartalmú takarmányokkal és olyan – a dózistól függő – biokémiai változásokat észleltek a szérumban amelyek jelezték, hogy a halak esetében is a fumonizin toxikózis célszervei a máj és a vese. A májban az ALT és AST enzimek aktivitása és a bilirubin-, míg a vesében a kreatinin koncentrációja emelkedett meg.

A fumonizinek laboratóriumi állatokra gyakorolt toxikológiai és patológiai hatásait kiterjedten tanulmányozták, amely vizsgálatok eredményeit több összefoglaló közlemény is tárgyalja (Bucci és mtsai 1998; Bolger és mtsai 2001; Dragan és mtsai 2001; Hard és mtsai 2001; Voss és mtsai 2001b). A kísérleti adatok alapján megállapítható, hogy a fumonizin toxikózisnak laboratóriumi kísérleti állatok (egér, patkány, nyúl) esetében is a legfontosabb célszervei a máj és a vese. A laboratóriumi kísérleti állatokban a különböző fumonizin dózisokra a fajtól-, a fajtától- és a nemtől függő toxikológiai válaszokat kaptak. A Sprague-Dawley (Riley és mtsai 1994) és a Fischer 344 (Voss és mtsai 1995; Howard és mtsai 2001a,b) patkányok esetében pl. a fumonizin kezelés hatására a májhoz képest a vesében nem, vagy csak alig érzékelhető elváltozás történt, továbbá a hím egyedek a veseelfajulásra hajlamosabbak voltak, mint a nőstények. A nyulak nagyon érzékenyek az FB₁ kezelés hatására bekövetkező veseelfajulásra (Gumprecht és mtsai 1995; Bucci és mtsai 1998). Mint korábban már említettem, először Dél-Afrikában (Marasas és mtsai 1984), majd az USA-ban is (Wilson és mtsai 1985) a *F. verticillioides* gombával természetes úton fertőződött kukorica etetésével kimutatták, hogy a rágcsálókban hepatokarcinómát okoz. Az FB₁ toxin takarmányhoz történő hozzákeverésével máj- (Gelderblom és mtsai 1991, Howard és mtsai 2001a) és vesekarcinómát (Howard és mtsai 2001a) tudtak előidézni. A tumorok agresszivitását jelezte, hogy áttételeket is produkáltak.

A fumonizin-okozta toxikózisokat összefoglalva megállapítható, hogy a takarmány fumonizin-szennyezésére a legérzékenyebbek a lovak és rokon fajaik valamint a sertések. Valamennyi fumonizin toxikózis tüneteit mutató állatfajban kisebb-nagyobb fokú májkárosodást is megfigyeltek, ami összefüggésben lehet a máj magas ceramidáz-tartalmával. Ma még nem létezik hatásos terápia a fumonizin-okozta toxikózisok kezelésére, ezért kiemelkedő fontosságú annak megelőzése, ami csak úgy biztosítható, hogy az állattenyésztéssel foglalkozó gazdaságok a felhasználni kívánt takarmányt mikotoxin-tartalom szempontjából rendszeresen bevizsgálják/bevizsgáltatják és megbízható forrásból szerzik be a takarmányt. Ezzel jelentősen csökkenthető az esélye, hogy fumonizinekkal szennyezett takarmány kerüljön felhasználásra.

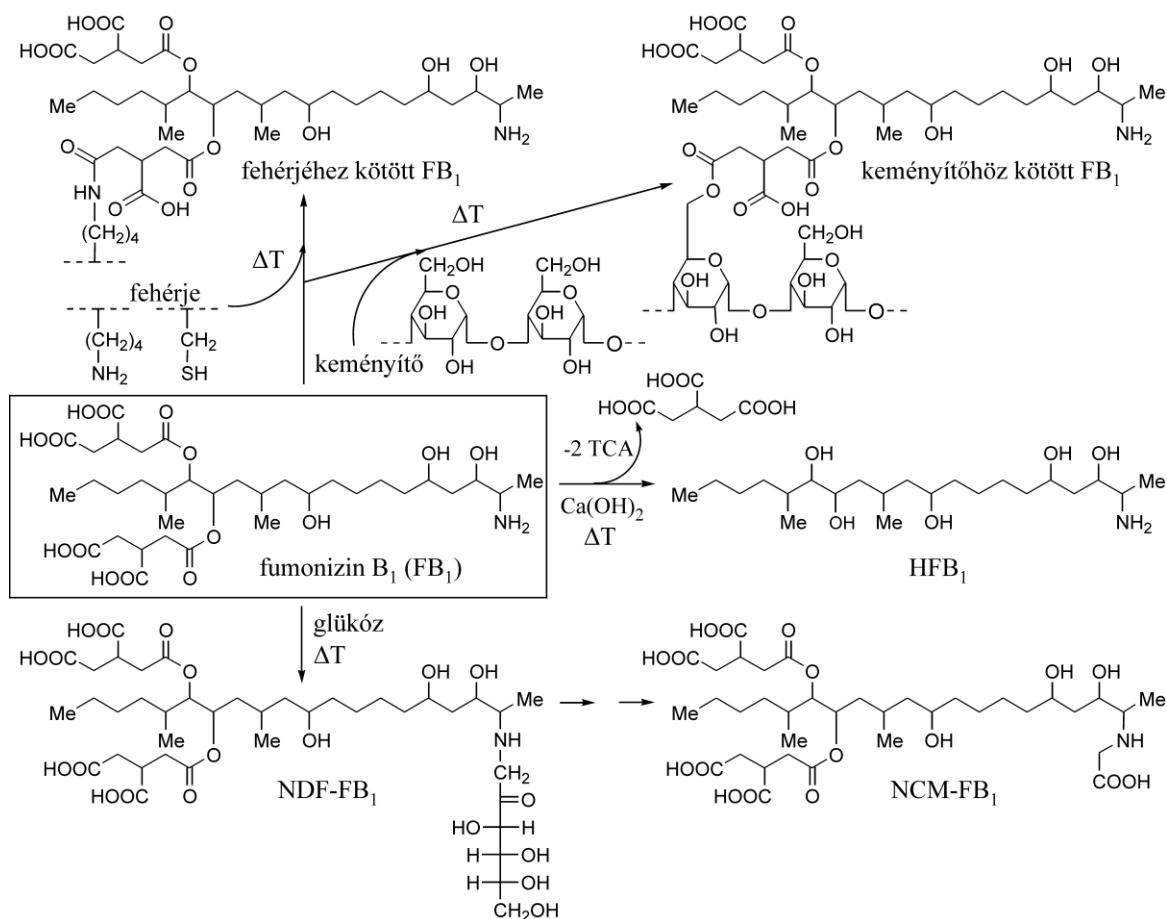
2.5. A hőkezelés hatása a fumonizinek szerkezetére és toxicitására az élelmiszer-feldolgozás során

A fumonizinek 100-120 °C hőmérsékletig viszonylag stabilak. A *F. verticillioides* tenyészet forralása (100 °C, 30 perc) nem csökkentette az FB₁ toxin koncentrációját (Alberts és mtsai 1990). A tej pasztörözése (62 °C, 30 perc) sem csökkentette

számottevően a tejhez hozzáadott FB₁ toxin (50 ng/ml) mennyiségét (Maragos és Richard 1994). A fumonizin-szint csökkenése magasabb hőmérsékleten kezdődik. A szárított kukorica hőkezelését (100 °C-on 175 perc, 125 °C-on 30-38 perc és 150 °C-on 10 perc) követően a kiindulási FB₁-tartalom felét tudták visszamérni (Dupuy és mtsai 1993). A száraz és nedves kukoricaliszt 190 °C hőmérsékleten 60 percig tartó hőkezelése során az FB₁- és FB₂-tartalom 60-80%-a, míg 220 °C-on 25 percig tartó sütés során majdnem az összes fumonizin elbomlott illetve átalakult (Scott és Lawrence 1994). A sütésen és főzésen kívül az extrudálást, pörkölést és nixtamalizálást (a kukorica kalcium-hidroxid tartalmú vízben történő főzése pl. a mexikói tortilla készítése során) követően is megfigyelték a fumonizinek mennyiségének csökkenését (Humpf és Voss 2004). A nixtamalizálás során a trikarballil-csoportok lehidrolizálódnak az FB₁-ről és HFB₁ képződik (7. ábra). A HFB₁ toxikológiai jelentősége még nem tisztázott. Az FB₁-hez képest kevésbé gátolja a ceramid szintáz jelezve, hogy *in vivo* kevésbé toxikus (Norred és mtsai 1997), ugyanakkor a rágcslókat nixtamalizált fuzáriummal fertőzött kukoricatenyésztéssel etetve, hasonló hepatotoxikus és nephrotoxikus hatást értek el, mint a kezeletlen tenyészet esetében (Hendrich és mtsai 1993; Voss és mtsai 1996, 1998b).

Még nem egyértelmű, hogy a hőkezeléssel járó élelmiszeripari feldolgozás során bekövetkező fumonizin-szint csökkenést milyen arányban okozza a fumonizinek lebomlása valamint az élelmiszer-mátrixban található fehérjékhez, szénhidrátokhoz és egyéb komponensekhez történő kötődése. Kimutatták ugyanis, hogy az élelmiszerfeldolgozás során amikor az FB₁ toxint redukáló cukrok (pl. glükóz) jelenlétében melegítik – stabil reakciótermék – az *N*-(karboximetil)-FB₁ (NCM-FB₁) képződik (Howard és mtsai 1998; Seefelder és mtsai 2001; Voss és mtsai 2001a; Lu és mtsai 2002; Poling és mtsai 2002). Az NCM-FB₁ szerkezetét Howard és mtsai (1998) azonosították (7. ábra). Lu és mtsai (2002) valamint Poling és mtsai (2002) ennek a reakcióútnak a főbb köztestermékeit is jellemezték. Véleményük szerint, az FB₁ toxin primer amino-csoportja a D-glükóz karbonil-csoportjával Schiff-bázist képezve reagál, majd az ún. Amadori-átrendeződésen keresztül *N*-(1-dezoxi-D-fruktóz-1-il) fumonizin B₁ (NDF-FB₁) képződik. Az általános Maillard-reakció sémáját követve feltételezik, hogy az NDF-FB₁ alakul át NCM-FB₁-é. Noha az *N*-szubsztituált fumonizinek toxicitásáról kevés információ áll rendelkezésre, egyértelmű, hogy az *N*-szubsztituátlan fumonizinekhez képest biológiai aktivitásuk alacsonyabb. Az FB₁ és FB₂ toxinok *N*-acetyl származékaival kapcsolatban kimutatták, hogy a primer amino-csoport blokkolása patkány máj sejtenyészetekben meggátolta ezen komponensek toxicitását (Gelderblom és mtsai 1993). A tisztított *N*-acetyl-FB₁ (FA₁) nem

gátolta a ceramid szintáz aktivitását (Norred és mtsai 1997), ugyanakkor bizonyos körülmények között spontán átrendeződhet *O*-acetyl-FB₁-é (Norred és mtsai 2001). Az *O*-acetyl-FB₁ ceramid szintáz aktivitást gátló hatását indirekt módon igazolták. Az FA₁ és *O*-acetyl-FB₁ elegye gátolta patkány májszeletek ceramid szintáz aktivitását *in vitro*, viszont amikor az elegyből eltávolították az *O*-acetyl-FB₁ komponenst, a megmaradó FA₁ már nem gátolta az enzim aktivitását (Norred és mtsai 2001). *N*-szubsztituált fumonizinek (FA₁, NCM-FB₁, FP₁) felhasználásával kiterjedt toxicitási vizsgálatokat folytattak egereken és megállapították, hogy ezen komponensek etetése ($\leq 140 \mu\text{M}$ fumonizin/kg takarmány) nem okozott toxikus reakciót a kísérleti állatokban és nem gátolták a ceramid szintáz aktivitását (Howard és mtsai 2002). Összefoglalva megállapítható, hogy a fumonizin váz *N*-szubsztitúciói csökkentik a fumonizinek biológiai aktivitását.



7. ábra. A FB₁ toxin átalakulása és mátrix komponensekhez történő kötődése a kukorica hőkezeléses élelmiszeripari feldolgozása során (Humpf és Voss 2004).

A fumonizinek primer amino-csoportján kívül a TCA oldalláncok karboxil-csoportjai is képesek az élelmiszerek mátrix komponenseivel (pl. aminosavak, fehérjék, szénhidrátok,

nukleotidok) reagálni (7. ábra). Seefelder és mtsai (2003) az izotópjelzett FB₁ toxin keményítővel és fehérjével képzett kovalens konjugátumait HPLC/ESI-MS eljárással azonosították. Véleményük szerint a keményítő OH-csoportjai és a fehérjét alkotó aminosavak szabad NH₂- és SH-csoportjai kétlépéses reakció során reagálnak a fumonizinek TCA-csoportjaival. A reakció első lépéseként a TCA oldalláncokból vízkilépés következtében anhidrid képződik, majd az anhidrid reagál a szabad OH-, NH₂- és SH-csoportokkal. Amikor a TCA oldalláncot nem tartalmazó HFB₁ toxinnal reagáltatták a keményítőt és a fehérjét, kovalens komplexek nem képződtek, igazolva, hogy ezek a makromolekulák valóban a TCA oldalláncokhoz kötődnek. Kim és mtsai (2003) fumonizin-tartalmú kukoricából készített kukoricafehely lúgos hidrolízise során azt találták, hogy a hidrolízist követően – a hidrolízis előtti mintához képest – a szabad fumonizin-tartalom 2,6x magasabb volt. Ez a kísérlet arra az élelmiszerbiztonsági problémára hívta fel a figyelmet, hogy a fumonizin-szennyezett kukoricából készített élelmiszerek esetén a mátrixhoz kötött fumonizinek mennyiségével is számolni kell. Pocsfalvi és mtsai (2000) az FB₁ toxin oligonukleotidokkal képzett nem kovalens komplexeit azonosította szintén HPLC/ESI-MS módszerrel. A FB₁ toxin átalakulását, mátrix komponensekhez történő kötődését a kukorica hőkezeléses élelmiszeripari feldolgozása során a 7. ábra mutatja.

2.6. A fumonizinek *in vivo* metabolizmusa

A fumonizinek tápcsatornából történő felszívódásáról, metabolizmusáról, a metabolitok biológiai hozzáférhetőségéről és toxicitásáról viszonylag kevés és ellentmondásos információval rendelkezünk. A fumonizinek *in vivo* metabolizmusa valamint az élelmiszer- és takarmány-feldolgozás során (lásd előző fejezetben) az egyik vagy mindkét észter kötés elhidrolizálhat létrehozva az FB₁ toxin PHFB₁ és HFB₁ metabolitjait (Thakur és Smith 1996). Shephard és mtsai (1994) vizsgálataik során azt találták, hogy az FB₁→HFB₁ átalakulásban köztes vegyületként a PHFB_{1a} és a PHFB_{1b} jelenik meg, amelyek aránya egyensúlyi állapotban: PHFB_{1a}:PHFB_{1b} 55:45.

Dantzer és mtsai (1999) ¹⁴C-FB₁ és ¹⁴C-HFB₁ kiürülését vizsgálták patkányokban és azt tapasztalták, hogy a ¹⁴C-HFB₁ vizelettel történő kiürülése jelentősebb mértékű, mint a ¹⁴C-FB₁ toxiné, ami véleményük szerint a HFB₁ nagyobb biológiai hozzáférhetőségére utal. Shephard és mtsai (1999) ¹⁴C-FB₂ toxin adagolásával vervet majmokon végzett kísérletükben a fumonizin metabolitok közül a bélsárban a fő komponens a PHFB₂ volt, míg a HFB₂-öt csak kis mennyiségben tudták kimutatni. Caloni és mtsai (2002) humán

Caco-2 sejteken végzett *in vitro* kísérletükben azt tapasztalták, hogy a 48 órás FB₁, PHFB₁ és HFB₁ kezelést követően a sejtek életképessége az intakt FB₁ hatására változott meg a leginkább. A PHFB₁ „a” és „b” formáját sem tudták kimutatni a sejtekben, míg a HFB₁ dózistól függően adszorbeálódott. A szerzők szerint is a HFB₁ biológiai hozzáférhetősége jóval nagyobb mint az FB₁ toxiné és ezért élelmiszerbiztonsági szempontból figyelmet kell rá fordítani.

Prelusky és mtsai (1994) is ¹⁴C-FB₁ toxin intravénás és orális adagolásával végeztek kísérleteket sertéseken, és azt tapasztalták, hogy 0,4 mg/kg jelzett FB₁ toxin intravénás adagolása után 72 órával a bélsárban, a vizeletben és a szövetekben a beadott toxinmennyiség 58%-a, 21%-a és 20%-a jelent meg. Egy epekanül behelyezése után vizsgálni tudták a szintén intravénásan beadott FB₁ toxin enterohepatikus forgalmát is. A beadott toxin 71%-a jelent meg az epében. A ¹⁴C-FB₁ orális adagolása (0,5 mg/kg) után a toxin biológiai hozzáférhetőségét 6%-nak találták, ugyanakkor az orális adagolást követően a szervekben kevésbé csökkent le a toxin koncentrációja (1/10-ére), mint az intravénás adagolás esetén. Ugyanez a kutatócsoport egy másik kísérletben 2-3 mg/kg ¹⁴C-FB₁ -et tartalmazó takarmány 24 napig tartó etetése után azt találták, hogy a sertés májában és veséjében fordult elő a legmagasabb toxin-szint (160 és 55 µg/kg), ugyanakkor az izom- és zsírszövetben toxin-szennyezést nem tudtak kimutatni. A toxin-tartalmú takarmány etetésének befejezése után 9 nappal a toxinkoncentráció a szövetekben gyorsan lecsökkent (Prelusky és mtsai 1996). Szarvasmarhákon végzett kísérletükben az FB₁ toxin gyomorszondán történő adagolását (1 és 5 mg/kg) követően a toxin a plazmában nem volt detektálható és a szérum Sa/So aránya sem változott, jelezvén, hogy az összetett gyomorral rendelkező állatok esetében az FB₁ toxin biológiai hozzáférhetősége alacsony.

A Kaposvári Egyetem Állattudományi Karán a vékonybél és a vakbél mikrobiotájának az FB₁-tartalomra gyakorolt hatását vizsgálták növendék sertéseken, 45 mg FB₁/kg takarmány szájon át történő bejuttatásával. Megállapították, hogy a bejuttatott FB₁ mennyiségének a 4%-a szívódott fel az ileum (csípőbél) végéig és a béltartalomból visszanyert FB₁ származékok 3,9%-a PHFB₁-ként, 1%-a pedig HFB₁-ként jelent meg. A vizsgált szervekből/szövetekből az akkumulálódott FB₁ toxin átlagosan 50%-át változatlan formában, míg 20%-át PHFB₁-ként, 30%-át pedig HFB₁-ként mutatták ki. A folyamatos toxinterhelés (10 nap) során az FB₁ toxin átlagosan 60%-a hidrolizálódott a bélcsatornában és a hidrolizált termékek közül a PHFB₁ jelent meg nagyobb arányban (az FB₁ származékok 47%-a) a bélsárban, míg a HFB₁ kis mennyiségű volt (12%). A vizeletben az FB₁ metabolitok aránya alacsonyabb (40%) volt. Mind toxikológiai, mind

élelmiszerbiztonsági szempontból igen fontos volt az a megfigyelés, miszerint a vizsgált szövetek többsége, valamint a bélsár és a vizelet 10 nappal a toxinterhelés megszüntetése után is tartalmazott FB₁₋₂ toxint és az FB₁ metabolitjait (Fodor és mtsai 2006, 2007a). A bélsárból és a vizeletből az összesen felvett FB₁ kb. 70%-át tudták visszanyerni és az FB₁ szervekben és a szövetekben történő megjelenése alacsony volt.

A hiányzó hányad sorsára a szerzők szerint többféle magyarázat lehetséges: (1) újabb, még ismeretlen metabolitok kialakulása; (2) a toxinnak és/vagy metabolitjainak eddig nem vizsgált szervekben/szövetekben történő akkumulációja; (3) hosszabb idő szükséges az FB₁ és metabolitjai szervezetből történő maradéktalan kiürüléséhez. Fodor és mtsai (2007a,b) a sertések vakbél tartalmát felhasználva mikrobiális fermentációs kísérleteket is végeztek anaerob körülmények között az FB₁ toxin biotranszformációjának a tanulmányozására. Megállapították, hogy az FB₁ toxin (5 µg/ml) az inkubálás előrehaladtával növekvő mértékben hidrolizálódott. 48 óra elteltével az FB₁→PHFB₁ konverzió megközelítette (46%) az eredeti FB₁ formában való megjelenés arányát, majd 72 órás inkubálás után a PHFB₁ moláris koncentrációja közel megegyezett az FB₁ koncentrációjával (49%). Az FB₁ kevesebb mint 1%-a alakult át a teljesen hidrolizált (HFB₁) formává. Élelmiszerbiztonsági szempontból ez jelentős megfigyelés, mivel korábban kimutatták ugyanis, hogy a HFB₁ és különösen a HFB₁ *N*-palmitoil származéka (*N*-palmitoil-aminopentol, PAP₁) – apolárisabb karaktere miatt – jóval toxikusabb, mint maga az FB₁ toxin (Humpf és mtsai 1998). Az FB₁ toxin a ceramid szintáz által nem tud acilálódni, de amikor a TCA oldalláncok lehidrolizálnak és kialakul a HFB₁ (AP₁), a HFB₁ elfoglalja a szfingoid bázisok helyét a ceramid szintázban és a KoA a szállított zsírsavat (palmitinsav) a HFB₁ molekula amino-csoportjához köti kialakítva a ma ismert legtoxikusabb FB₁ metabolitot, az *N*-palmitoil-AP₁-et (PAP₁).

Összefoglalva megállapítható, hogy az FB₁ toxin felszívódása viszonylag alacsony, ugyanakkor komoly állat- és humán-egészségügyi problémákat tud okozni. Gondoljunk csak az állatok esetében diagnosztizált és az előzőekben már tárgyalt ELEM és PPE kórképekre, vagy egyes országokban a humán nyelőcső- (Jaskiewicz és mtsai 1987; Makaula és mtsai 1996) és primer máj karcinómák (Ueno és mtsai 1997) kialakulásában játszott feltételezett szerepére. Ezen kórképek alapján sorolta az IARC az FB₁ toxint a lehetséges karcinogének („group 2B”) közé (IARC 2002). Ezt az ellentmondást Shier (2000) fumonizin paradoxonként fogalmazta meg. Véleménye szerint ezen ellentmondás hátterében állhatnak eddig ismeretlen, könnyebben felszívódó toxinok; dózis-függő felszívódás és metabolizmus; a toxikus komponensek bioakkumulációja; a metabolizmus

során olyan fumonizin származékok kialakulása, amelyek biológiai hozzáférhetősége jelentős.

2.7. A fumonizinekre vonatkozó egészségügyi határ- és irányértékek

A különböző élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok (köztük a mikotoxinok) felső határértékét az Európai Unió illetékes bizottságának 1881/2006/EK számú rendelete (2006. december 19.) szabályozza, amelybe a mindenkor módosítások beépülnek. Jelenleg ennek a rendeletnek 8 módosítása van. A rendelet szerint tilos a határérték feletti szennyezettségű tételt alacsony toxin-tartalmú tételbe keverni azzal a céllal, hogy a határérték alatti szintre állítsák be a határérték feletti tétel toxintartalmát. A rendelet jelenleg a fumonizinekkal kapcsolatban csak a két általában legjelentősebb mennyiségben előforduló fumonizinnek az együttes mennyiségét (FB₁ és FB₂ összege) szabályozza. A 2. táblázat a rendelet élelmiszerekre vonatkozó fumonizin határértékeit ismerteti. A táblázatban jól látható, hogy a többi mikotoxinhoz hasonlóan a fumonizinekkal kapcsolatban is a legalacsonyabb határértékeket a csecsemők és kisgyermekek számára készült élelmiszerekkel és bébiételekkel kapcsolatban állapítottak meg (200 µg/kg).

2. táblázat. A fumonizinekre vonatkozó egészségügyi határértékek.

3	FUMONIZINEK	FB ₁ és FB ₂ összege (µg/kg)
3.1	Feldolgozatlan kukorica, a nedves őrlésre szánt feldolgozatlan kukorica kivételével	4 000
3.2	Közvetlen emberi fogyasztásra szánt kukorica, közvetlen emberi fogyasztásra szánt kukoricaalapú élelmiszerek, a 3.3. és 3.4. pontban felsorolt élelmiszerek kivételével	1 000
3.3	Kukoricaalapú reggeli pelyhek és kukoricaalapú szeletek	800
3.4	Csecsemők és kisgyermekek számára készült kukoricaalapú élelmiszerek és bébiételek	200
3.5	A kukorica 1103 13 vagy 1103 20 40 KN-kód alá tartozó, 500 mikronnál nagyobb méretű őrlési frakciói és kukoricából származó egyéb, nem közvetlen emberi fogyasztásra szánt az 1904 10 10 KN-kód alá tartozó, 500 mikronnál nagyobb őrlési termékek	1 400
3.6	A kukorica 1102 20 KN-kód alá tartozó, legfeljebb 500 mikron méretű őrlési frakciói és kukoricából származó egyéb, nem közvetlen emberi fogyasztásra szánt az 1904 10 10 KN-kód alá tartozó, legfeljebb 500 mikron méretű őrlési termékek	2 000

A takarmányok mikotoxin-tartalmára vonatkozóan jelenleg nem határértékek, hanem csak ajánlás létezik, amely nem kötelező érvényű, de iránymutatásul szolgál az állattenyésztők számára. Valószínűleg – hasonlóan az élelmiszerekhez – előbb-utóbb a takarmányokra vonatkozóan is lesznek határértékek meghatározva. Általában, ha egy gabonátétel már nem megfelelő élelmiszeripari felhasználásra, még alkalmas lehet takarmányozásra, azonban túl magas mikotoxin-tartalom esetén számolni kell az előbb említett tünetekkel. A takarmányok esetén lehetőség van olyan adalékok (pl. antioxidánsok) takarmányhoz történő hozzákeverésére, amelyek egyes mikotoxinok toxikus hatását képesek csökkenteni. Adsorbenseket (pl. aktív szén, szén-alapú polimerek, szilícium-alapú polimerek) is hozzá lehet keverni a takarmányokhoz, amelynek következtében számos mikotoxin kevésbé szívódik fel az állatok gyomor-bélrendszerében (Mézes és mtsai 2010). A 3. táblázatban a takarmányok – az Európai Unió bizottsági ajánlás szerinti (2006/576/EK) – javasolt maximális fumonizin-tartalma (FB₁₋₂) látható.

Az MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága is megfogalmaz a takarmányok mikotoxin-tartalmával kapcsolatban depresszív és toxikus értékeket (Magyar Takarmánykódex II-III. kötet Bp. 2004), amelyek közül a fumonizin B₁ toxinra vonatkozó adatokat a 4. táblázat mutatja.

3. táblázat. A takarmányok EU ajánlás szerinti javasolt maximális fumonizin-tartalma.

Takarmányozásra szánt termék	FB ₁ és FB ₂ összege Irányérték (µg/kg), 12%-os nedvességtartalmú takarmányra vonatkozóan
<i>Takarmány-alapanyag</i>	
Kukoricafélék és kukoricakészítmények	60 000
<i>Az alábbiaknak szánt kiegészítő és teljes értékű takarmányok</i>	
Sertések, lovak (<i>lófélék</i>), nyulak, kedvtelésből tartott állatok	5 000
Halak	10 000
Baromfi, borjak (< 4 hónap), bárányok és gidák	20 000

4. táblázat. Az MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága által elfogadott FB₁ toxin értékek.

Az alábbiaknak szánt takarmányok	Depresszív érték µg/kg	Toxikus érték µg/kg
Ló	5000	
Szarvasmarha	50000	
Sertés	5000	10000
Baromfi	30000	
Egyéb takarmánykeverékek	30000	

2.8. A fumonizinek minőségi- és mennyiségi meghatározása előtt alkalmazható mintaelőkészítési eljárások

Mielőtt rátérnék a fumonizinek tényleges műszeres analitikai vizsgálati módszereire ismertetem a mintavételezés és a minták fizikai és kémiai módszerekkel történő feltárásának és a kivonatok tisztításának a fontosságát és az alkalmazott eljárásokat.

A mintavételezés döntő jelentőségű, legyen az hatósági vagy kutatási jellegű mintavétel, mivel sok esetben a helytelen mintavétellel (ami nem reprezentálja eléggé a minta egészét) nagyobb hibát lehet elkövetni mint magával a műszeres analitikai vizsgálattal. A mikotoxin-tartalom hatósági ellenőrzéséhez is használandó mintavételi eljárásokat a 401/2006/EK rendelet tartalmazza. A rendelet az 50 tonnánál nagyobb és kisebb tételek esetében szabályozza a mintavételezést. A mikotoxin vizsgálatra történő mintavételezés történhet szilárd (pl. szemes termények, szilárd *in vitro* tenyészet minták) vagy folyadékmintából (pl. gyümölcslevek, *in vitro* folyadékkultúra, fermentlé). Természetesen, mivel a folyékony halmazállapotú mintákban a fumonizinek oldott állapotban vannak, a homogenitás az esetükben nem szokott problémát jelenteni.

A különböző minták fumonizin-tartalmának meghatározása, azaz a tényleges analitikai vizsgálat előtt a minták fizikai és kémiai módszerekkel történő feltárása és a legtöbb esetben a kivonatok tisztítása szükséges. A szilárd élelmiszer- és takarmányminták valamint a vizsgálandó *in vitro* tenyészet minták fizikai előkészítése az aprítást, a homogén őrlemény előállítását jelenti. Az aprítás előtt – amennyiben a minta víztartalma magas – a minta kíméletes módon történő szárítása (általában szárítószekrényben) vagy fagyasztva szárítása (liofilizálás) szükséges. Az aprítás leggyakrabban laboratóriumi méretű kalapácsos-, tárcsás darálóval, vagy golyósmalmokban, esetleg cseppfolyós nitrogénnel kombinált golyósmalmokban, a krio malmokban történik. Sok esetben különösen, ha a vizsgálandó minta mennyisége korlátozott, a közönséges kávédarálókat is eredményesen alkalmazzák. A minták esetleges keresztaszennyeződése és az ún. fals pozitív eredmények elkerülése szempontjából igen fontos, hogy az egyes minták őrlése között az őrleberendezések megfelelően ki legyenek tisztítva. Különösen a nagyobb őrleberendezések használata során hasznos a berendezés gyors kitisztítása után a következő minta egyik felének a megőrlése, amelynek kiöntése után a minta másik felének az őrleményét használják az analitikai, így a mikotoxin vizsgálatokhoz is.

A legtöbb mikotoxin vizsgálati módszerhez a mikotoxint tartalmazó homogén őrleményekből a mikotoxinokat ki kell nyerni, azaz oldatba kell vinni. A fumonizineket leggyakrabban valamilyen oldószerrel (általában acetonitril/víz vagy metanol/víz)

vonják ki az örleményekből, így a szilárd tenyészet mintákból is. Az acetonitril/víz esetében az 1/1 (v/v), míg a metanol/víz esetében a 3/1 (v/v) arányú elegyeket találták a leghatékonyabbnak (Zöllner és Mayer-Helm 2006). Az acetonitril/víz extrakciós oldószerkelet alkalmazásakor az extrakciót követő szűrés és/vagy centrifugálás után megfigyelték, hogy két oldószer réteg képződhet, amiben nem egyenlő arányban lehetnek jelen a fumonizinek. Az extrakció hatékonyságát az extrakciós edény vízszintes (horizontális rázó gép) vagy függőleges (átfordulós rázó gép) rázásával, továbbá késes homogenizátor alkalmazásával lehet növelni. Az extrakció után sok esetben néhány perces ultrahangos kezelést is alkalmaznak az extrakció hatékonyságának fokozása és a kioldódott és esetlegesen az analitikai mérést zavaró fehérjék eltávolítása (ultrahangos kicsapás) céljából. Az extrakció után szűréssel (pl. Whatman 4-es szűrőpapíron) és/vagy centrifugálással állítják elő a fizikailag tiszta szűrletet vagy felülúszót a további tisztításhoz vagy a direkt analitikai vizsgálathoz. A direkt analitikai vizsgálat ez esetben azt jelenti, hogy a mikotoxin analitikában a ma legkorszerűbbnek számító és a későbbiekben részletezendő HPLC/MS és MSMS vizsgálathoz általában nem szükséges a szűrletek illetve a felülúszók további kémiai tisztítása. A HPLC elválasztás előtt, azonban (különösen, ha nem alkalmaznak előtétoszlopot) az analitikai oszlop élettartamának növelése céljából célszerű a szűrlet vagy felülúszó 0,2 vagy 0,45 µm-es pórusméretű membránszűrőn történő átszűrése is.

A szuperkritikus folyadék extrakciót (SFE) is alkalmazták már a fumonizinek meghatározása során. A kukoricamintákat a szuperkritikus folyadék halmazállapotú széndioxiddal extrahálták 5% vizes ecetsavnak, mint poláris módosítónak a felhasználásával (Selim és mtsai 1996). A módszer előnye, hogy a széndioxid elpárologtatása után gyakorlatilag betöményítve áll rendelkezésre a minta és visszaoldás után tovább tisztítható az alábbiakban részletezett módszerekkel vagy közvetlenül analizálható HPLC/MS és MSMS eljárásokkal. Az eljárás hátránya ugyanakkor a viszonylag költséges extrakciós berendezés, ezért a mai napig nem terjedt el széles körben.

A kromatográfiás berendezésre történő mintafelvétel előtt, különösen akkor, ha az elválasztás után nem tömegspektrometriás detektálást alkalmaznak, a detektálást zavaró mátrix komponenseket el kell távolítani. Ezt a feladatot szilárd-fázisú extrakciós (SPE) oszlopokon történő tisztítással oldják meg. Az SPE mintatisztító oszlopok közül az immunoaffinitás (IAC)- a fordított fázisú C18-, és az erős anioncserélő (SAX) oszlopokat alkalmazzák a leghatékonyabban a fumonizinek meghatározása előtt (Arranz és mtsai 2004), de vannak adatok az Amberlite XAD-4 (Wang és mtsai 2008a,b) és a Dowex-1

(Karuna és Sashidhar 1999) ioncserélő gyantán történő tisztításra is. Körvizsgálatok során azt találták, hogy a SAX SPE oszlopokon történő tisztítás a C18-as SPE oszlopoknál jobb eredményt ad (Visconti és mtsai 1996), ugyanakkor a SAX SPE oszlopok alkalmazásánál a megfelelő visszanyeréshez ügyelni kell egyrészt a minta pH értékének a beállítására (pH 5,8 felett) másrészt a mintafelvitel során az alacsony áramlási sebességre (max 1 ml/perc). SAX SPE oszlopok alkalmazásával kukoricaminták fumonizin-tartalmának a vizsgálata során 6 ismétlésben, 81% visszanyerést értek el (Scudamore és Patel 2000). Természetesen a SAX SPE oszlopok nem használhatók a hidrolizált fumonizinek aminopoliol vázának a meghatározása előtti mintatisztításhoz, mivel ekkor már nem tartalmaznak könnyen deprotonálható funkciós csoportokat. A C18-as SPE oszlopok hátránya, hogy a töltet aktív helyei kapcsolatba lépnek a fumonizinekkel, csökkentve a visszanyerési értéket. Az IAC oszlopok természetükből adódóan igen szelektíven képesek megkötni a fumonizineket, ugyanakkor a SAX és a C18-as SPE oszlopokhoz képest csökkent kapacitással rendelkeznek, azaz a mintafelvitel során figyelni kell arra, hogy kellően híg minta kerüljön az oszlopra. Mind a SAX, mind az IAC oszlopokkal kapcsolatban kimutatták, hogy a kukorica kivonatok megtisztítása után regenerálhatók, ami jelentős költségcsökkentő tényező. Abramovic és mtsai (2005) az 500 mg töltetet tartalmazó SAX SPE oszlopokat egymás után 5 alkalommal használták fel kukorica kivonatok tisztítására majd 5 ml 0,1 mol/l HCl oldat és 8 ml víz SPE oszlopon történő átszívásával sikeresen regenerálták azokat. A regenerálás után az oszlopokat metanolban állni hagyták 1 napig, majd újra használhatók voltak. Fazekas és mtsai (2000) kukorica kivonatok IAC oszlopon (FumoniTest) történő tisztításával kapcsolatban kimutatták, hogy legalább két alkalommal regenerálhatók, azaz 3x is használhatók, miközben a regenerált oszlopok fumonizin affinitása, kapacitása és specificitása változatlan marad. A regeneráláshoz – a fumonizinek IAC oszlopról történő metanolos elúciója után – a PBS puffert a következő minta átengedése előtt szobahőmérsékleten egy napig az oszlopon hagyták.

2.9. A fumonizinek minőségi- és mennyiségi meghatározásának módszerei

A fumonizinek analitikájában alkalmazott elválasztástechnikai módszerek ismertetése előtt, a teljesség kedvéért meg kell említeni az ún. gyors módszereket is, amelyek többsége immunoaffinitáson – antigén-antitest reakción – alapuló analitikai eljárás. A reakcióhoz poliklonális vagy monoklonális antitesteket alkalmaznak. A poliklonális antitestek állatok vérében történő termeléséhez a megfelelő antigént az állatokba oltják. A poliklonális antitestek a bejuttatott antigén különböző funkciós csoportjaival reagálni képes antitestek

keverékét tartalmazza. A monoklonális antitesteket az immunizált egér lépéből nyert B-nyiroksejtek és az egér csontvelő-daganatból származó sejtek fúziójával létrehozott hibrid sejtek termelik. Egy hibrid sejt csak egyfajta antitestet képes termelni, amely a mikotoxin molekulának csak egy adott csoportjához tud specifikusan kötődni. Legelterjedtebben az ún. kompetitív ELISA technikát alkalmazzák, amely esetében is az antigén-antitest reakció szilárd hordozó felületén játszódik le. A mintában lévő mérendő szabad antigén a jelzett antigénnel verseng az antitest korlátozott számú kötőhelyeiért. A kompetitív reakció után a nem kötődött reagenseket mosással eltávolítják, majd a kötött jelzett antigént fotometriásan meghatározzák (Barna-Vetró és Solti 2001). Az ELISA eljárással gyorsan, nagyszámú mintát lehet rutinszerűen analizálni, különösen akkor, ha automatizálják. További előnye, hogy alkalmazása nem igényel költséges laboratóriumi felszerelést és túlzottan képzett személyzetet, emiatt főként az élelmiszerlánc elején, a gabona átvevőhelyeken valamint a malmokban a belső minőségellenőrzési rendszer (HACCP) részeként Magyarországon is egyre gyakrabban alkalmazzák, ami élelmiszerlánc-biztonsági szempontból is igen öröndetes. Az ELISA technika ún. szemikvantitatív eljárás, azaz a határérték körüli pozitív mintákat célszerű valamilyen megerősítő eljárással is (pl. HPLC/MS és MSMS) megvizsgálni. Vannak olyan jól felműszerezett hatósági laboratóriumok is, ahol a beérkezett mintát az őrlés, az extrakció és a centrifugálás után ELISA módszerrel vizsgálják meg, és csak a pozitív, határérték közelébe eső mintákat vizsgálják tovább a megerősítő, nagyműszeres eljárással. Az ELISA eljárás alkalmazásánál előfordulhat, hogy a mintában ténylegesen található FB₁ és FB₂ érték fölé mér az ELISA leolvasó. Ez azzal magyarázható, hogy az ELISA eljárás alkalmazása során az FB₁ és FB₂ toxinokkal szemben termeltetett antitestekkel adott esetben nemcsak az FB₁ és FB₂ toxinok képesek antigén-antitest komplexet képezve reagálni, hanem az FB₁ és FB₂ izomerjei és egyéb fumonizinek is adhatnak ún. keresztreakciót (Azcona-Olivera és mtsai 1992; Usleber és mtsai 1994). A keresztreakciók felhasználása ugyanakkor hatékony lehet a jövőben olyan ELISA mérési módszer kifejlesztésében, amely képes lehet a kivonatok valós ún. összfumonizin-tartalmának a meghatározásában. Magyarországon is kifejlesztettek olyan – monoklonális antitestet alkalmazó – ELISA „kit”-et, amelynek a mérési tartománya cereáliákban az FB₁ toxin tekintetében 10-500 ng/g, a detektálási határ pedig 7,6 ng/g (Barna-Vetró és mtsai 1999, 2000; Barna-Vetró és Solti 2001).

Előállítottak már száloptikás immunoszenzorokat is, amelyeket sikeresen alkalmaztak az FB₁ toxin kukoricamintákban történő direkt kompetitív meghatározására. Az FB₁ toxinnal szemben termeltetett monoklonális antitesteket egy heterobifunkciós szilánon

keresztül kötötték kovalensen az optikai szálhoz. A fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt FB₁ toxinnal (FB₁-FITC) telítették az antitestek kötőhelyeit, majd a mintában lévő FB₁ és az FB₁-FITC között versengés alakult ki, amely a jelölt FB₁ kiszorítását eredményezte. Ezzel az eljárással a metanol/víz eleggyel extrahált kukoricaminták esetében 3,2 µg/g detektálási határt értek el. Amikor az eredeti kivonatot IAC oszlopon megtisztították, a detektálási határt 0,4 µg/g értékig tudták csökkenteni. A száloptikás immunoszenzor eljárás jó egyezést mutatott a HPLC meghatározással, kivéve amikor az antitestekkel keresztreakcióra képes egyéb fumonizinek (pl. FB₂) jelentősebb mennyiségben voltak jelen a mintában (Maragos 1997; Maragos és Thompson 1999).

A fumonizinek minőségi és mennyiségi meghatározása különféle elválasztástechnikai módszerekkel lehetséges. A sík elrendezésű elválasztástechnikai eljárások közül említést érdemel a vékonyréteg kromatográfia (TLC, Gelderblom és mtsai 1988; Nelson és mtsai 1993) és a túlnyomásos rétegekromatográfia (OPLC), amely magyar kutatók által kifejlesztett eljárás (Tyihák és mtsai 1979). A TLC-t először a fumonizinek felfedezésekor Gelderblom és mtsai (1988) alkalmazták fumonizinek meghatározására. Az elválasztáshoz fordított fázisú (C18) szilikagél lapot, és a mintafelvitelt követő kifejlesztéshez metanol/víz elegyet (3/1, v/v) alkalmaztak. Ugyanez a kutatócsoport normál fázisú TLC módszert is kidolgozott, amelynél a szilikagél lapra felvitt minták komponenseit kloroform/metanol/víz/ecetsav eleggyel választották el (Cawood és mtsai 1991). A kifejlesztések után a réteglapokat ninhidrin vagy *p*-ánizsaldehid oldattal fújták le a fumonizinek láthatóvá tétele céljából, mivel a fumonizinek – az FP analógok kivételével – nem tartalmaznak kromofór csoportot. Ezek a TLC módszerek alkalmazhatók voltak az oszlopról eluálódó komponensek és gombatenyészetek vizsgálatára is, azonban az eljárást viszonylag rossz érzékenysége (0,5 mg/g) miatt nem sikerült természetes fertőzöttségű kukoricaminták fumonizin-tartalmának a meghatározására felhasználni (Sydenham és mtsai 1990a). A fluoreszkamin reagens bevezetésével a fumonizinek esetében sikerült a detektálási határt a 100 ng/g értékre csökkenteni, azonban kukoricaalapú takarmányoknál 1000 ng/g alatt jelentős mátrix hatást figyeltek meg. Amikor a minta kivonatokat erős anioncserélő (SAX) szilárd-fázisú extrakciós oszlopon (SPE) engedték át, a mátrixhatás jelentősen csökkent (Stockenström és mtsai 1994). Amikor a rizskivonatokat SAX oszlopon történő mintatisztítását és a TLC lapnak *p*-ánizsaldehid 0,16%-os savas oldatába történő bemerítését alkalmazták, ún. pásztázó fluorodenzitóméter felhasználásával 250 ng/g detektálási határt sikerült elérni (Dawlatana és mtsai 1995). Mindkét sík elrendezésű

eljárás jelentős előnye, hogy párhuzamosan több minta is futtatható egyszerre a réteglapokon.

Az OPLC előnye a TLC-hez képest az, hogy mivel az OPLC elválasztás zárt térben, nyomás alatt történik, lényegesen kisebb a komponens sávok kiszélesedése, ami különösen alkalmassá teszi komplex minta elegyek gyors elválasztására. Hátrányuk ugyanakkor – különösen a TLC esetében – az, hogy a detektálás általában ún. „off-line” módszerrel, leggyakrabban denzitométerrel történik. Az OPLC esetében mivel zárt térben történik az egyes komponensek elválasztása már sikerült megoldani az „on-line” detektálást is pl. UV detektornak az OPLC kamrához történő kapcsolásával (Mincsovcics és mtsai 1986, 1988), amikor a réteglapról eluálódó vegyületek kapillárison keresztül jutnak a detektorba. Ma már lehetséges az atmoszférikus nyomású ionforrásokkal felszerelt tömegspektrométerek OPLC készülékekhez történő kapcsolása is (OPLC/MS, Chai és mtsai 2003). Mincsovcics és mtsai (2008) teljesen „on-line” OPLC/DAD/MS készüléket állítottak össze, azaz sikeresen megoldották az OPLC készülékkel elválasztott vegyületek multidimenzionális (UV és MS) detektálását, amikor a réteglapról eluálódó anyagok egy kapillárison keresztül a DAD cellába, majd a cellából kivezető kapillárison keresztül a tömegspektrométer ionforrásába jutnak. Az OPLC eljárást sikeresen alkalmazták *Fusarium* izolátumok rizstenyészetben történő fumonizin B₁₋₄ termelőképességének a vizsgálatára is (Kátay és mtsai 2001). A denzitometrázás előtt fluoreszksaminnal származékképezték a primer amino-csoportokat és a létrejött származékokat 365 nm-es hullámhosszon detektálták. Az egyes fumonizinek között (FB₁-FB₃, FB₃-FB₂, FB₂-FB₄) igen jó felbontást (R_s 2,6; 2,0; 2,67) sikerült elérniük. A legkisebb detektálható anyagmennyiség a négy fumonizinre (FB₁₋₄) nézve 7,3-11,9 ng/sáv volt.

A síkrendszerű elválasztástechnikai eljárások után a fumonizinek mennyiségi és minőségi meghatározására alkalmazott oszloprendszerű eljárásokat (gázkromatográfia, GC; kapilláris elektroforézis, CE; nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, HPLC; ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, UPLC) foglalom össze. Természetesen, mindegyik eljárás kapcsolható tömegspektrométerhez is (GC/MS, CE/MS, HPLC/MS, UPLC/MS), amely kapcsolt eljárások jelentik ma a rutinszerűen alkalmazható bioanalitikai, így a fumonizin meghatározási módszerek csúcsát.

A fumonizinek a viszonylag nagy molekulatömegük miatt a magas gázkromatográfiás injektálási hőmérsékleteken (100-300 °C) sem illékonyak, ezért közvetlenül nem analizálhatók. Először Sydenham és mtsai (1990a) alkalmazták a GC eljárást fumonizinek meghatározására. A két TCA oldalláncot hidrolízissel eltávolították az FB₁ molekuláról,

metilésztert képeztek a karboxil-csoportokon, majd a származékképzett TCA molekulákat analizálták a GC módszerrel. Természetesen a TCA oldalláncok lehasítása után visszamaradt aminopoliol vázat így nem tudták detektálni, ezért a módszer nem volt alkalmas az egyes fumonizinek megkülönböztetésére. Jackson és Bennett (1990) az FB₁ és FB₂ molekulákat közvetlenül származékképezték trimetilszililező (TMS) reagenssel, majd az így kapott TMS-FB₁ és TMS-FB₂ származékokat választották el sikeresen tágfuratú DB-5 típusú kapilláris GC oszlop (5 m x 0,53 mm) felhasználásával. A detektálást tömegspektrométerrel oldották meg (GC/MS) és elektronütközéses ionizációt (EI) alkalmazva a várt – molekulaiont nem tartalmazó – jelentős fragmentációt mutató EI tömegspektrumot kapták.

Noha a CE eljárást már a 90-es évek közepén több szerző is alkalmazta a fumonizinek mennyiségi és minőségi meghatározására, mégsem terjedt el széles körben. Hines és mtsai (1995) a CE elválasztást elektroporlasztásos ionforrással (ESI) felszerelt tömegspektrométerrel kombinálták. A CE elválasztás során 44000/m elméleti tányérszámot értek el. A kukoricaminták esetében 10/1 jel/zaj viszony mellett 156 ng/g volt a detektálási határ, amely 1,1 pg FB₁ toxinnak a CE oszlopra történő injektálását jelentette. Később ugyanez a kutatócsoport közölt egy új CE eljárást, mivel az első CE eljárásuk nem volt alkalmas az FB₁ és FB₂ toxinok elválasztására, azaz a kukoricaminták rutin FB₁ és FB₂ tartalmának a meghatározására. Az új eljárás során a CE elválasztás előtt oszlop előtti származékképzési reakciót alkalmaztak 9-fluorenilmetil-kloroformát (FMOC-Cl) reagens felhasználásával, amely reakció a kiindulási toxinok (FB₁ és FB₂) polaritását jelentősen csökkentve megfelelő elválasztást eredményezett. A megismételt CE elválasztások azonban a megfelelő HPLC elválasztáshoz képest 2-3x nagyobb szórást mutattak (Holcomb és Thompson 1995). Maragos (1995) fluoreszcein izotiocianátot (FITC) alkalmazott a fumonizinek primer amino-csoportjai származékképzéséhez, és ezzel az eljárással az FB₁ tekintetében 50 ng/g kimutatási határt tudtak elérni.

Ma a leggyakrabban a HPLC eljárást alkalmazzák (fordított fázisú C18-as oszlopokat felhasználva) a fumonizinek egymástól és a mátrix komponensektől történő elválasztására (Zöllner és Mayer-Helm 2006). Mint az előbbieken már említésre került, a legtöbb fumonizin nem tartalmaz kromofór csoportot, ezért a leggyakrabban alkalmazott HPLC detektorokkal (UV és fluoreszcens) előzetes származékképzési reakció nélkül nem detektálhatók. A fumonizinek HPLC elválasztását követő első származékképzési reakció, a maleinsav-anhidriddel történő reakció volt. A származékokat – 10 µg/g detektálási határ mellett – UV detektorral érzékelték, amely a kukoricamintákból történő fumonizin

kimutatáshoz nem volt elég érzékeny (Sydenham és mtsai 1990b). Egy évvel később vezették be a fumonizinek fluoreszcens detektálását a TLC technikában korábban már alkalmazott fluoreszkamin reagens felhasználásával (Ross és mtsai 1991), azonban ez a reagens két FB₁ csúcsot eredményezett, amely természetesen a detektálás során nem kívánatos. Később az aminosavak származékképzése során már bevált o-ftáldialdehid (OPA) reagenst alkalmazták a fumonizinek primer amino-csoportjai származékképzéséhez is. Az OPA reagens 2-merkaptotanol jelenlétében, borát puffer által biztosított lúgos pH érték mellett szobahőmérsékleten gyorsan és reprodukálhatóan reagált a fumonizinekkel ún. alkil-tio-szubsztituált izoindol származékokat hozva létre. A probléma ugyanakkor az OPA-származékokkal kapcsolatban az, hogy a származékok igen bomlékonyak. A származékképzési reakció után 4 perccel a fluoreszcens jel 5%-al csökkent, ami a származékképzési reakció komponenseinek (minta, 2-merkaptotanol tartalmazó OPA reagens, borát puffer) összemérésére alkalmas automata HPLC mintaadagoló felhasználásával kiküszöbölhető, mivel a reakcióelegy összemérése a HPLC oszlopra történő injektálás előtt reprodukálhatóan mindig ugyanakkor történik (Shephard 1998). Az AOAC által javasolt hivatalos szabvány módszer az OPA/2-merkaptotanol reagenst alkalmazza a fumonizinek mennyiségi és minőségi meghatározására. Az OPA/2-merkaptotanol reagens mellett egyéb ún. oszlop utáni származékképző reagenseket is alkalmaztak, mint pl. a 4-fluor-7-nitrobenzofurazán (NBD-F). Az NBD-F reagenssel 100 ng/g detektálási határt is elértek, azonban a származék ebben az esetben sem volt túl stabil (Scott és Lawrence 1992). Holcomb és mtsai (1993a) alkalmazták először a 9-fluorenil-metil-kloroformátot (FMOC-Cl) az FB₁ toxin primer amino-csoportja származékképzéséhez. Az FMOC-FB₁ származék szobahőmérsékleten kevesebb, mint 1 perc alatt létrejött, és a származék legalább 72 órán át stabil volt. Bennett és Richard (1994) a 2,3-diformil-naftalin/kálium cianid reagenssel erősen fluoreszkáló, több mint 24 óráig stabil származékot hozott létre. Ezzel a módszerrel tejben 5 ng/ml FB₁ és FB₂ toxint tudtak kimutatni (Maragos és Richard 1994). Ez a reagens – elsősorban az igen toxikus kálium cianid alkalmazása miatt – nem terjedt el. Velázquez és mtsai (2000) a fumonizinek tanulmányozása iránti egyre növekvő igény miatt javasolták a 6-aminokinolil-N-hidroxiszukcinimidil-karbamátot a származékképzéshez. Az OPA/2-merkaptotanol-származékokhoz képest jobb stabilitást tapasztaltak, ami kísérleteikben legalább 48 óra volt.

Az egyetemes fényszórási detektor (ELSD) kifejlesztése után Wilkes és mtsai (1995) alkalmazták először az eljárást a HPLC elválasztást követően a származékképzetlen

fumonizinek detektálására. Wang és mtsai (2008b) a HPLC-ELSD módszerrel injektálásonként 60 ng FB₁ toxint tudtak kimutatni, ami a minta oldatát tekintve 3 ng/μl értéknek felelt meg. Ezzel az eljárással különféle kukoricaalapú termékekben 0,25-3,13 μg/g fumonizin-szennyezést mutattak ki.

Az első fumonizinek felfedezését követően, a 90-es évek elején főleg a fent említett oszlop utáni származékképzési reakciókat alkalmazták a fumonizinek HPLC elválasztást követő fluoreszcens detektorral történő érzékeny mennyiségi meghatározásához, mivel az akkoriban korszerűnek számító és HPLC készülékhez csatlakoztatható tömegspektrométerek és HPLC/MS „interface”-eik/ionforrásaik kezelhetősége viszonylag bonyolult volt és az érzékenyséjük is sok esetben nem volt megfelelő a mintákban alacsony koncentrációban jelenlévő fumonizinek kimutatásához. Azokban az években főként a FAB-MS (Korfmacher és mtsai 1991; Chen és mtsai 1992; Holcomb és mtsai 1993b), a TSP-MS (Korfmacher és mtsai 1991; Thakur és Smith 1994, 1996) és a PB-MS (Young és Lafontaine 1993) eljárásokat használták a fumonizinek HPLC/MS vizsgálatához. Ezek a közlemények elsősorban a fumonizinek tömegspektrometriás viselkedésére fókuszáltak – mint pl. az ionizáció hatékonysága, az adduktionok képződése, az ionforrásban történő fragmentáció, a CID reakciók – és nem a mennyiségi meghatározásra. A jelentős áttörést a fumonizinek minőségi és mennyiségi meghatározásában, valamint az új fumonizin analógok (FA, FC, FP) azonosításában is egyértelműen az atmoszférikus nyomású elektroporlasztásos ionizációs technika (ESI) 1980-as évek végén történő bevezetése jelentette. Ez az eljárás mára – mind a nagy molekulatömegű biopolimerek mind a kis molekulatömegű szerves molekulák vizsgálata során – az uralkodó rutin HPLC/MS eljárássá vált az élelmiszeranalitikával foglalkozó hatósági- és kutató laboratóriumokban is, legyőzve a GC/MS tradicionális hátrányait (illékonyág, hőstabilitás). A fehérjék ESI-MS módszerrel történő meghatározásának kifejlesztéséért JB Fenn professzor 2002-ben kémiai Nobel-Díjat kapott. Az API technikák (ESI, APCI, APPI) közül – egy kivételtől eltekintve (APCI, Royer és mtsai 2004) – az ESI-MS és ESI-MSMS eljárást alkalmazták a fumonizinek meghatározásához (Zöllner és Mayer-Helm 2006). A tömegspektrométerek csak gázfázisban lévő, töltéssel rendelkező molekulákat és fragmensionokat tudnak vizsgálni. Az ESI technika alkalmazása oldószerben előre megformált ionokat igényel, azaz a HPLC oszlopról az ESI porlasztóba jutó komponenseknek már töltéssel kell rendelkezniük, hogy az ionok az ionforrásban át tudjanak lépni a folyadékfázisból a gázfázisba, amely a HPLC/MS vizsgálatok alapfeltétele. Ezt leggyakrabban úgy érik el, hogy a HPLC oldószerbe kis mennyiségben

(0,01-0,5%, v/v) illékony szerves savat, leggyakrabban ecetsavat vagy hangyasavat tesznek a fumonizinek protonálásához. A primer amino-csoportot tartalmazó fumonizinek így pozitív ion módban igen érzékenyen mérhetők. A szerves savak HPLC oldószerhez történő hozzáadása abból a szempontból is fontos, hogy a trikarballil oldalláncok karboxil-csoportjai protonálódása révén a fumonizinek fordított fázisú HPLC oszlopokon történő retenciója – a polaritásuk csökkenése miatt (ion szupresszió) – növekszik és a csúcs alak is javul, amelyek végeredményben a kromatográfiás elválasztás hatékonyságát növelik (Faberi és mtsai 2005). Pozitív ion módban a fumonizinek tömegspektrumában a molekulaionok ($[M+H]^+$) mellett igen gyakran megfigyelhetők a nátrium ($[M+Na]^+$) és kálium ($[M+K]^+$) adduktionok is (Zöllner és Mayer-Helm 2006). A fumonizinek negatív ion módban is mérhetők, azonban Doerge és mtsai (1994) azt találták, hogy a primer amino-csoportot tartalmazó fumonizinek 3x nagyobb jelet adnak pozitív ion módban, mint negatívban. Továbbá azt is megfigyelték, hogy negatív ion módban kétszeresen töltött molekulaionok is megjelennek a fumonizinek tömegspektrumában (Caldas és mtsai 1995). Azt is kimutatták, hogy az „A” fumonizin analógok (FA) pozitív ion módban az acetilált amino-csoportjuk csökkent protonaffinitása miatt kevésbé érzékenyen mérhetők mint negatív módban (Caldas és mtsai 1995; Plattner 1999).

A műszergyártó cégek különféle tömeganalizátorral (kvadрупól, ioncsapda, repülési idő, mágneses, Fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia) felszerelt és ezek kombinálásával kialakított ún. tandem tömegspektrométereket (MSMS) is forgalmaznak. A rutin fumonizin analitikában közülük is általában a kvadрупól (SIM módban) és a hármas kvadрупól MSMS (SRM vagy MRM módban) készülékeket alkalmazzák ár/érték arányuk, üzemeltetési költségeik és tömeganalizátoruk lineáris dinamikus tartománya miatt, amely a hármas kvadрупól tömegspektrométerek esetében az öt nagyságrendet is elérheti. Hármas kvadрупól tömegspektrométerrel Sorensen és Elbaek (2005) tejből 0,09 és 0,04 $\mu\text{g/l}$ FB_1 és FB_2 toxint is ki tudtak mutatni. A fumonizinek MSMS vizsgálatához is a leggyakrabban a hármas kvadрупól-, valamint az ioncsapdás készülékeket használják. Az ioncsapdás tömeganalizátor előnye, hogy pásztázó (SCAN) üzemmódban az egyik legérzékenyebb tömeganalizátor, amelynek igen nagy jelentősége van az új, sokszor nyomnyi mennyiségű szerves komponensek azonosításában, továbbá MSMS, sőt MS^n üzemmódban is (ahol „n” akár 9 is lehet) üzemeltethetők. Hátránya ugyanakkor az, hogy lineáris dinamikus tartománya viszonylag alacsony (leggyakrabban 2-2,5 nagyságrend). Voss és mtsai (2001a) az ioncsapdás tömegspektrométerükkel 2 $\mu\text{g/kg}$ -os kimutatási határt (LOQ) érték el kukoricából készült termékek vizsgálata során.

A fumonizinek molekulaionjai MSMS, illetve az ioncsapdás tömegspektrométereknél az MS^2 spektruma igen jellemző a fumonizinekre (Josephs 1996), azaz kis gyakorlattal viszonylag könnyen eldönthető, hogy az adott tömegspektrum fumonizintől származik-e vagy sem (lásd részletesen az 4.2. és 4.3. fejezetekben a 63. és 85. oldalon). Faberi és mtsai (2005) egy kvadрупól és egy lineáris ioncsapda analizátorral kombinált ún. QTrap tandem tömegspektrométert használtak a fumonizinek MSMS spektrumai vizsgálatához. Ez a készülék a lineáris ioncsapda analizátor miatt hármass kvadрупól analizátorként is üzemeltethető, azaz egy műszeren vizsgálható volt a fumonizinek hármass kvadрупól és ioncsapda analizátorral kapott MSMS spektruma is. Vizsgálataik során a két üzemmódban majdnem azonos MSMS spektrumot kaptak. A fumonizinek molekulaionjairól nemcsak MSMS készülékkel, hanem egy viszonylag olcsó kvadрупól tömegspektrométerrel is – az ionforrásban történő ütköztetést („in-source CID”) felhasználva – lehetőség van az analizált komponensek MSMS spektrumainak vizsgálatára (Caldas és mtsai 1995; Churchwell és mtsai 1997). Itt azonban előfeltétel, hogy a HPLC elválasztás körülményeit úgy állítsák be, hogy a HPLC oszlopról eluálódott vizsgálni kívánt komponens csúcsa „tisztá” legyen, különben a vizsgálat kevert, nehezen kiértékelhető MSMS spektrumot eredményez. Churchwell és mtsai (1997) közleményükben azt is bemutatták, hogy az ütközési feszültség gyors változtatásával (amire az újabb kvadрупól tömegspektrométerek esetében is már lehetőség van) egyidejűleg jelentős érzékenység (a molekulaion detektálásával alacsony ütközési feszültség mellett) és szelektivitás (szerkezeti információ a magasabb ütközési feszültség mellett kapott tömegspektrum segítségével) is elérhető. Vizsgálataik során a kvadрупól MS készülékkel az alacsony $\mu\text{g/kg}$ tartományban sikerült a rágcsáló csalétekben fumonizint (FB_{1-3}) kimutatniuk. Kísérleteikben a referencia oldatokkal meghatározott LOD és LOQ érték, 0,3 és 1,1 $\mu\text{g/kg}$ volt. Seefelder és mtsai (2001) közölték, hogy a kvadрупól MS készülékkel SIM módban hasonló érzékenységet (LOD, 10 $\mu\text{g/kg}$) sikerült elérni, mint az SRM módban használt MSMS berendezéssel, mivel a fumonizinek molekulaionjai viszonylag magas tömege távol esik a legtöbb alacsony moltömegnél jelentkező zajforrástól. A pontos tömeg mérésére alkalmas TOF analizátorral felszerelt tömegspektrométereket is egyre gyakrabban alkalmazzák a fumonizin kutatásban (Lemke és mtsai 2001; Frisvad és mtsai 2007; Senyuva és Gilbert 2008; Mogensen és mtsai 2010a). A TOFMS rutin mennyiségi analízisben történő alkalmazási lehetőségét korlátozza a hármass kvadрупól rendszerekhez képest alacsonyabb lineáris dinamikus tartománya (2-3 nagyságrend).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A kísérletekhez felhasznált vegyszerek

A burgonya dextróz agart (PDA), a HPLC minőségű MeOH-t, a fumonizin B₁, B₂ referencia anyagokat, a hangyasavat, a módosított pentaklórnitrobenzol (PCNB) és a diklorán-bengálvörös-kloramfenikol (DRBC) tápközeg komponenseit a Sigma-Aldrich Kft-től vásároltuk (Budapest, Magyarország). A HPLC minőségű MeCN-t (hypergrade) a Merck Kft-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A *F. verticillioides* izolátumok FB₁₋₄ termelésének a vizsgálatához az FB₃ és FB₄ standardokat Prof. WCA Gelderblom-tól (PROMEK Medical Research Council, Tygerberg, Dél-Afrika) és Prof. RD Plattner-től (National Center for Agricultural Utilization Research, USDA, Peoria, IL, USA) kaptuk. A 18 MΩ ellenállású, membránszűrt HPLC minőségű vizet a laboratóriumunkban állítottuk elő egy Nanopure II típusú (Barnstead/Thermolyne Co., Dubuque, IA, USA) töltetes víztisztító berendezéssel.

3.2. A *F. verticillioides* izolátumok begyűjtése, azonosítása, felszaporítása és a fumonizinek *in vitro* termeltetése

Az izolátumok begyűjtése, azonosítása, felszaporítása és a fumonizinek termeltetése Prof. Szécsi Árpád (MTA Növényvédelmi Kutatóintézet, Budapest) irányításával történt. Az izolátumok jelentős részét hazánk fő gabonatermesztő területeiről, elsősorban kukoricáról (gyökér, szár, csó, szem) másodsorban egyéb növényfajokról (búza, árpa, rozs, rizs, szeder, komócsin) gyűjtöttük be, de sikerült izolálni *F. verticillioides*-eket kullancsról és emberi szemről is. Az egyéb forrásból származó izolátumokkal együtt összesen 60 *F. verticillioides* izolátum állt rendelkezésre a szilárd fermentációs kísérletekhez. Az izolátumok begyűjtési helye és eredete az 5. táblázatban (59-60. oldal) látható. A fuzáriumokat a fertőzött mintákról laboratóriumi körülmények között Szécsi és Mesterházy (1998) módszerével izoláltuk. A fajszintű taxonómiai azonosítást a makro- és mikrokonídiumok mikroszkópos képe alapján Booth (1971), Nelson és mtsai (1983) és Leslie és mtsai (2006) módszere szerint végeztük. Több izolátumot fajspecifikus PCR eljárással is azonosítottunk Mulé és mtsai (2004) módszere szerint. Az izolátumok fajszintű azonosítását a kalmodulin gén egy szakaszának szekvencia analízisével, a VERT-1 és VERT-2 indítószekvencia-pár alkalmazásával végeztük (Szécsi és mtsai 2011). Az azonosított monospóra-eredetű izolátumokat kémcsövekben ¼ erősségű ún. ferde PDA táptalajon tároltuk 15 °C hőmérsékleten, sötétben. A fermentációs kísérletekhez az

izolátumokat tartalmazó ferde agarokat steril vízzel mostuk, majd négyrétegű steril gézen átszűrtük. A steril szűrletben körülbelül 10^4 konídium volt milliliterenként.

A fumonizineket az azonosított *F. verticillioides* izolátumokkal rizstenyészetben, ún. szilárd fermentációs eljárással termeltettük. A termeltetéshez hosszúszemű rizst használtunk (Uncle Ben's), amelyből 50 g-ot 50 ml ioncserélt víz mellett 500 mL űrtartalmú Erlenmeyer lombikba helyeztünk. A lombikokat egész éjjel szobahőmérsékleten tartottuk, majd a felesleges vízmennyiség leöntése után 121 °C hőmérsékleten 15 percig autoklávoztuk azokat. Az autoklávozást két nap múlva megismételtük. A sterilizálás után a lombikokban lévő rizs tápközeget külön-külön mesterségesen megfertőztük a fent említett *F. verticillioides* 5 ml-es konídium szuszpenzióival. A tenyészeteket termosztátban 28 °C hőmérsékleten sötétben négy hétig inkubáltuk. Az inkubálás első három napján az inokulumok egyenletes eloszlása és a rizsszemek összetapadásának a megelőzése céljából a tenyészeteket naponta egyszer felráztuk. Az inkubálás 4. hetének végén a tenyészeteket a lombikokból kivettük, majd azonnal lefagyasztottuk és liofilizáltuk azokat. A liofilizált tenyészeteket kávédarálással finom porrá őröltük, majd az analízisig jól lezárva, mélyfagyasztóban tároltuk az örleményeket -80 °C hőmérsékleten.

3.3. A fumonizinek kinyerése az *in vitro* rizstenyészetekből

A liofilizált rizstenyészet örleményeket (3 g) polipropilén (PP) centrifugacsőben (30 ml) MeCN/H₂O (3/1 v/v, 25 ml) elegyével, UltraTurrax T25 típusú (IKA, Staufen, Germany) nagysebességű homogenizátor felhasználásával 13500-as fordulatszámon, 1 percig homogenizáltuk, majd átfordulós rázógépen (60 fordulat/perc) szobahőmérsékleten 1 órán át extraháltuk azokat. Az extrakciót követően a mintákat centrifugáltuk (10000xg, 10 perc), majd PTFE membránszűrőn (0,45 µm) keresztül a HPLC mintaadagoló fiolába szűrtük a felülúszókat. A fumonizin műtermékek képződésének minimalizálásához a nyers kivonatok fumonizinjeit egyéb mintaelőkészítési és tisztítási lépések nélkül a később részletezett HPLC/ESI-MS módszerek felhasználásával közvetlenül analizáltuk.

3.4. Mazsola- és vöröshagymaminták begyűjtése, *Aspergillus* fajok izolálása a mintákról és genetikai elemzésük

A fumonizin vizsgálatokhoz a mazsola- és vöröshagymaminták begyűjtése, az *Aspergillus* fajok izolálása és genetikai analízise Dr. Varga János egyetemi docens irányításával az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékén történt. A mazsolaminták különböző országokból származtak (19. táblázat, 114. oldal), míg a kísérleteink során

vizsgált vöröshagymamintákat Magyarország különböző területeiről, főként Szegeden és környékén szereztük be, de Tápiógyörgyéről és Pusztavacsról származó mintákat is felhasználtunk. A fekete *Aspergillus* fajok izolálásához olyan vöröshagymákat válogattunk ki, amelyeken már látható volt némi fekete elszíneződés is. Egészséges hagymát csak kontrollként továbbá a fumonizin visszanyerési kísérletekhez alkalmaztunk. A vöröshagymáról történő mintavételhez a hagyma mind külső száraz, mind belső húsos leveleit felhasználtuk.

A 96%-os etanolban 5 percig felületi sterilizált mazsolákat valamint a hagyma külső buroklevél és belső húsos levél mintáit malátakivonatos DRBC 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 (Malt Extract Agar, MEA) tartottuk (Samson és mtsai, 2004) és klasszikus taxonómiai módszerekkel azonosítottuk az izolátumokat (Raper és Fennell 1965; Samson és mtsai 2007).

A fekete *Aspergillus* fajok meghatározásához a PCR–RFLP analízist alkalmaztuk. A DNS kivonást követően az izolátumok ITS régióját az ITS1 és ITS4 primerekkel amplifikáltuk (White és mtsai 1990) és *RsaI* restrikciós endonukleázzal emésztettük 37 °C hőmérsékleten 1 órán át (Accensi és mtsai 1999). Az emésztés eredménye alapján a fekete *Aspergillus* izolátumok 2 típusba sorolhatók: a T-típusba az *A. acidus*, az *A. costaricensis*, az *A. piperis*, az *A. tūbingensis* és az *A. vadensis* tartozik, míg az N-típusba a többi fekete *Aspergillus*, beleértve a potenciális fumonizin-termelő *A. niger* és *A. awamori* fajokat is (Accensi és mtsai 1999; Samson és mtsai 2007).

Az N-típusú *Aspergillus* izolátumok fajszerinti besorolását a kalmodulin gén egy szakaszának szekvencia analízisével, a 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 kivitelezttük. A szekvenálási reakció termékeit gélszűrővel Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) oszlopon tisztítottuk, és a nukleotid sorrendet az ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) készülékkel határoztuk meg. A DNS szekvenciák szerkesztéséhez a DNASTAR szoftver csomagot alkalmaztuk. Az illesztéseket és a filogenetikai analízist a MEGA 4.0 szoftverrel végeztük (Tamura és mtsai 2007). A törzsfa elkészítéséhez a parszimónia analízist alkalmaztuk, a fa topológiáját „bootstrap” analízissel ellenőriztük (Hillis és Bull 1993). Kulcsoportként egy *A. flavus* izolátumot alkalmaztunk.

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

A mazsolamintákat liofilizáltuk, megőröltük és az őrlményeket (1 g) PP centrifugacsőben (12 ml) MeOH/H₂O (3/1 v/v, 8 ml) elegyével, UltraTurrax T25 homogenizátor felhasználásával 20000 fordulat/perc sebességgel 4 percig homogenizáltuk, majd átfordulás rázógépen (60 fordulat/perc) szobahőmérsékleten 1 órán át extraháltuk azokat. Az extrakció után a mintákat centrifugáltuk (10000xg, 10 perc), majd PTFE membránszűrőn (0,45 µm) keresztül a HPLC mintaadagoló fiolába szűrtük a felülúszókat.

A hagymamintákat (lásd 48. ábra, 119. oldal) – beleértve a fumonizineket nem tartalmazó kontroll mintát (G) is – vékony szeletekre vágtuk, majd 24 órán át liofilizáltuk azokat. A liofilizált mintákat közönséges kávédarálóval 2 perc alatt finom porrá őröltük, majd 0,5 g-ot 4 ml MeOH/H₂O 3/1 (v/v) elegyével ultrahangos fürdőben kezeltünk (3 perc) és ezt követően átfordulás rázógépen 60 fordulat/perc sebességgel 90 percig extraháltuk azokat. Centrifugálást (13000xg, 10 perc) követően a felülúszókat a HPLC mintaadagoló PP mikrofiolába membránszűrtük (0,45 µm, PTFE).

A mazsoláról származó fekete *Aspergillus* izolátumokat CYA20S agar táptalajon 7 napig tenyésztettük (Samson és mtsai 2004). A telepek közepéből 5 db 0,6 cm átmérőjű agar dugót (összesen 1,2 g) metszettünk ki, amelyeket Frisvad és mtsai (2007) eljárása szerint – kis módosítással – extraháltunk. Az extrakciót MeOH/H₂O (3/1 v/v, 6 ml) elegyével 12 ml-es PP centrifugacsőben UltraTurrax T25 homogenizátor felhasználásával 20000 fordulat/perc sebességgel, 4 percig végeztük. A kivonatokat centrifugáltuk (10000xg, 10 perc), majd a felülúszókat a HPLC mintaadagoló fiolába (PP) membránszűrtük (0,45 µm, PTFE).

3.6. A fumonizinek minőségi és mennyiségi meghatározása

3.6.1. A fumonizinek RP-HPLC/ESI–ITMS módszerrel történő meghatározása meredekebb grádiens elválasztás felhasználásával

A fumonizin kutatásunk megkezdésekor és az azt követő 4 évben az RP-HPLC/ESI–ITMS és MS² vizsgálatokat – meredekebb grádiens HPLC elválasztás felhasználásával – az MTA Sztereokémiai Kutatócsoportjának, majd a Gabonakutató Non-profit Kft. (a továbbiakban GK Kft.) HPLC/ESI–ITMS készülékével végeztük, amely műszer együttesek a 8. ábrán láthatók.



8. ábra Az MTA Sztereokémiai Kutatócsoportja (baloldali kép) és a GK Kft. HPLC/ESI-ITMS műszeregyüttese.

A fumonizinek HPLC elválasztásához a meredekebb grádiens elválasztás során az MTA Sztereokémiai Kutatócsoportjában, Agilent (Palo Alto, CA, USA) 1100 Series moduláris HPLC rendszert alkalmaztunk a következő modulokkal: bináris pumpa, mikro vákuumos gáztalanító és „μWell-plate” mintaadagoló. A grádiens HPLC elválasztást Supelcosil ABZ Plus analitikai oszlopon (250 x 2,1 mm, 5 μm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) és előtétoszlopon (20 x 3 mm, 5 μm) végeztük, amelyet a holtterfogat csökkentése miatt kapilláris nélkül csatlakoztattunk az analitikai oszlophoz. Az oszlop kimenetét egy mindössze 40 mm hosszú, 127 μm belső átmérőjű PEEK kapillárisal kötöttük össze a tömegspektrométer ESI ionforrásának a porlasztójával. A HPLC oszlopot 40 °C hőmérsékletre termosztáltuk egy „7990 Space” típusú oszloptermosztát (Jones Chromatography Ltd., Hengoed, UK) felhasználásával. A grádiens HPLC elválasztáshoz a grádiens a bináris HPLC pumpa „A” (H₂O + 0,1% HCOOH) és „B” (MeCN + 0,1% HCOOH) oldószerből keverte. A minta (1 μl) injektálásakor a grádiens 25% „B” értékről indult és 22 perc alatt 40% „B” értéket ért el, majd további 5 perc alatt 100% „B”-re emelkedett, amelyet 3 percig tartott az apoláris mátrix komponensek oszlopról történő eltávolítása céljából. Az áramlási sebesség 0,3 ml/perc volt.

A fumonizinek detektálását Agilent 1100 MSD Trap SL típusú, ESI ionforrással és ioncsapda (IT) tömeganalizátorral felszerelt tömegspektrométerrel (ESI-ITMS) végeztük, pozitív ion módban. A tömegspektrométer mérési paraméterei a következőkben láthatók. ESI ionforrás: kapilláris feszültség, 3500 V; porlasztógáz (N₂) nyomás, 40 psi; szárítógáz (N₂) sebesség és hőmérséklet, 9 l/perc és 350 °C; kapilláris kilépő feszültség, 200 V; Detektor feszültségek: elektronsokszorozó, 1185 V; nagyenergiájú dinóda (HED), 7 kV; IT paraméterek: „trap drive”: 53,9; akkumulációs idő, 300 ms; pásztázási tartomány, *m/z* 50-1100; átlagolás, 3 spektrumonként; fragmentációs amplitúdó, 1,3 V. A tömegspektrométer

paramétereit 10 ng/ml koncentrációjú FB₁ referencia oldatnak (MeCN/H₂O 1/1 v/v, + 0,1% HCOOH) KDS 101 típusú fecskendőpumpával (KD Scientific, Holliston, MA, USA) a porlasztóba történő vezetésével optimalizáltuk. A porlasztógáz nyomásának és a szárítógáz sebességének, valamint hőmérsékletének optimalizálásához a fenti FB₁ oldatot automatizált áramlási injektációs módszerrel juttattuk be a porlasztón keresztül az ESI ionforrásba. A teljes HPLC/MS rendszer szabályozását és a tömegspektrometriás adatok kiértékelését az Agilent ChemStation szoftver (A09.03) és a Bruker ITMS szoftver (v.5.2) végezte. A mintában talált fumonizinek és fumonizin-szerű komponensek relatív mennyiségét a fő komponensnek, az FB₁ toxinnak a százalékában adtuk meg (Bartók és mtsai 2006).

3.6.2. *F. verticillioides* izolátumok FB₁₋₄ toxinprofiljának meghatározása RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel, meredekebb grádiens elválasztás felhasználásával

A különféle *F. verticillioides* izolátumok FB₁₋₄ toxinprofiljának meghatározásához a GK Kft. HPLC/ESI-ITMS készülékén is a meredekebb grádiens HPLC elválasztást alkalmaztuk. A készülékegyüttes egy Hewlett-Packard 1090 Series II típusú folyadékkromatográfot és egy Varian 500-ITMS (Varian, Inc., Walnut Creek, CA, USA) tömegspektrométert tartalmazott (8. ábra), amely ESI ionforrással volt felszerelve és amelyet szintén pozitív ion módban üzemeltettünk. A HPLC készülék beépített bináris pumpával, automata mintaadagolóval és kiegészítésként egy „Varian Prostar” típusú vákuumos oldószer gáztalanítóval volt felszerelve. A HPLC mérési paraméterek (oszlop típusa, oldószerek, grádiens meredekség, oszloptermosztát és hőmérséklete, áramlási sebesség, injektált minta térfogata) – a HPLC készülék típusát kivéve – mindenben megegyeztek a fent leírtakkal. A Varian 500-ITMS készülék mérési paraméterei az alábbiakban láthatók. ESI paraméterek: porlasztógáz (N₂) nyomása, 60 psi; szárítógáz (N₂) nyomása és hőmérséklete, 20 psi és 350 °C; porlasztócsúcs feszültsége, 4000 V; kapilláris feszültsége, 139 V; „spray” pajzs feszültsége, 600 V; Ionizációs kontroll paraméterek: „target” TIC, 100%; max ion idő, 500000 µs; Pásztázási paraméterek: tömegtartomány, *m/z* 500-850; RF terhelés, 82%. Általános paraméterek: pásztázási idő, 2,05 ms; spektrum átlagolás, 3 µScans; adatgyűjtési frekvencia, 0,49 Hz. A tömegspektrométer paramétereinek az optimalizálásához az FB₁ toxin oldatát (1 ng/µl, MeOH/H₂O 1/1, v/v + 0,1% HCOOH) a készülék beépített fecskendőpumpájának a segítségével juttattuk be az ionforrásba (5 µl/perc) áramlási injektációs (FIA) módszerrel. A mennyiségi kiértékelést külső standard módszerrel végeztük az FB₁₋₄ toxinok oldatainak (10 pg/µl – 500 ng/µl)

felhasználásával. A HPLC/ESI–ITMS rendszer szabályozását és a tömegspektrometriás adatok kiértékelését az Agilent ChemStation szoftver (A09.03) és a Varian Workstation 6.6 (SP1) szoftver végezte (Szécsi és mtsai 2010).

3.6.3. Új fumonizin izomerek RP-HPLC/ESI–ITMS és TOFMS módszerrel történő meghatározása 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, a GK Kft. laboratóriumába beszerzett, a gyártó által szerkezeti izomerek elválasztására javasolt HPLC oszloppal új, kevésbé meredek grádiens elválasztást dolgoztunk ki. Ezt a HPLC oszlopot és kevésbé meredek grádiens elválasztást alkalmaztuk később az ELTE EKOL laboratóriumában a fumonizin izomerek RP-HPLC/ESI–TOFMS meghatározása során is. Az ELTE EKOL laboratóriumának HPLC/ESI–TOFMS készüléke az 9. ábrán látható.



9. ábra. Az ELTE EKOL laboratóriumának HPLC/ESI–TOFMS készüléke.

A fumonizin izomerek kevésbé meredek grádienssel történő HPLC elválasztása és tömegspektrometriás meghatározása során alkalmazott mérési paraméterek az alábbiakban olvashatók. A Varian 500-ITMS ioncsapda tömeganalizátorral ellátott tömegspektrométerhez egy Hewlett-Packard 1090 Series II típusú HPLC készüléket – beépített bináris pumpával, és automata mintaadagolóval – csatlakoztattunk (8. ábra). A HPLC elválasztást YMC-Pack J'sphere ODS H80 (250 x 2,1 mm, 4 µm) RP-HPLC oszlopon (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Németország) végeztük, amely a holtterfogatok csökkentése miatt a fentiekben már említett Jones „7990 Space” típusú oszloptermosztátba volt helyezve, amelyet 40 °C hőmérsékletre állítottunk. A bináris

grádiens elválasztáshoz „A” ($\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{HCOOH}$) és „B” ($\text{MeCN} + 0,1\% \text{HCOOH}$) oldószerek grádiensét alkalmaztuk. A minta (1 μl) injektálásakor a grádiens 24% „B” értékről indult és 79 perc alatt lineárisan emelkedett 40% „B” értékig, majd további 15 perc alatt 100% „B”-re emelkedett, amely 10 percig tartott. Az áramlási sebesség 0,2 ml/perc volt.

Az elválasztott fumonizineket pozitív ion MS és MSMS módban, normál pásztázási sebességgel detektáltuk a Varian 500-ITMS készülékkel. A műszer fontosabb mérési paraméterei a következők voltak. ESI paraméterek: porlasztókamra hőmérséklete, 55 °C; porlasztógáz (N_2) nyomása, 60 psi; szárítógáz (N_2) nyomása és hőmérséklete, 20 psi és 350 °C; porlasztócsúcs feszültsége, 4000 V; „spray” pajzs feszültsége, 600 V. Általános paraméterek: maximum pásztázási idő, 2,71 ms; spektrum átlagolás, 3 spektrumonként; adatgyűjtési sebesség, 0,37 Hz; max ion idő, 500000 μs . MSMS paraméterek: kapilláris feszültség, 139 V; RF terhelés, 75%; ion izolálási ablak, 3 m/z ; hullámforma típusa, rezonáns; gerjesztési amplitúdó, 2,83 V; gerjesztési idő, 10 ms. A fenti ESI paramétereket FB_1 referencia oldat (1 ng/ μl , $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1, v/v + 0,1% HCOOH) ionforrásba juttatásával (5 μl /perc) optimalizáltuk a tömegspektrométerbe épített fecskendőpumpa felhasználásával. A *F. verticillioides* izolátumokkal fertőzött rizstenyészet minták mennyiségi kiértékelését az FB_1 toxin kalibrációs mintái (10 pg – 1000 ng az oszlopra injektálva) alapján külső standard módszerrel végeztük és az eredményeket a fő komponens, az FB_1 toxin százalékában adtuk meg. A teljes HPLC/ESI-ITMS rendszer szabályozását és a tömegspektrometriás adatok kiértékelését az Agilent ChemStation szoftver (A09.03) és a Varian Workstation 6.6 (SP1) szoftver végezte.

A fumonizin izomerek HPLC/ESI-TOFMS vizsgálatához Agilent 1200 típusú moduláris HPLC rendszert és Agilent 6210 típusú ESI-TOFMS készüléket használtunk, amely nagy pontosságú tömegmérésre alkalmas tömegspektrométer. A HPLC készülék mikro vákuumos oldószert gáztalanítót, bináris pumpát és automata mintaadási modulokat tartalmazott. Oszloptermosztátként a korábban már említett Jones gyártmányú készüléket alkalmaztuk (40 °C), amelyet az összekötő kapillárisok (0,127 mm ID) hosszának minimalizálása céljából térben az injektor szelep és az ESI ionforrás porlasztója közé helyeztünk. A bináris pumpából a pulzálást csökkentő egységet kivettük abból a célból, hogy csökkentsük az oldószerszállító rendszer holtterefogatát, mivel a fentiekben említett HPLC/ESI-ITMS méréseknél alkalmazott HP 1090 Series II típusú folyadékkromatográf oldószerszállító rendszerének a holtterefogata jóval kisebb volt. A pulzálást csökkentő egység eltávolításával sikerült hasonló retenciós időket kapnunk a

kétféle rendszerrel, bár még így is a HPLC/ESI–ITMS méréseknél valamivel alacsonyabbak voltak a retenciós idők. A többi HPLC mérési paraméter (HPLC oszlop, oldószer-összetétel, grádiens meredekség, áramlási sebesség, injektálási térfogat) az előbb említett HPLC/ESI–ITMS méréseknél alkalmazottakkal megegyezett. Az ESI–TOFMS készülék fontosabb mérési paraméterei a következők voltak: 2 porlasztót tartalmazó ESI ionforrás, amelynél az egyik porlasztón keresztül a HPLC oszlopról az oldószerárammal eluálódó komponenseket, míg a másik porlasztó segítségével a pontos tömeg méréséhez nélkülözhetetlen két referencia tömeget (m/z 121,050873 és 922,009798) tartalmazó oldatot juttattuk be az ionforrásba; porlasztógáz (N_2) nyomása, 20 psi; szárítógáz (N_2) sebessége és hőmérséklete, 10 l/perc és 350 °C; kapilláris feszültsége, 3500 V; fragmentor feszültsége, 170 V; „skimmer” lencse potenciálja, 70 V; „OCT 1 RF Vpp”, 250 V; pásztázási tömegtartomány, m/z 100–1700, adatgyűjtési sebesség, 250 ms/spektrum. A HPLC/ESI–TOFMS készüléket az Agilent ChemStation B03.02 szoftver vezérelte és az adatokat az Agilent MassHunter B.02.00 szoftverrel dolgoztuk fel.

3.6.4. 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–ITMS vizsgálata során az előző fejezetben leírt műszeregyüttest (Hewlett-Packard 1090 Series II típusú HPLC, Varian 500-ITMS) alkalmaztuk. A mérési paraméterek megegyeztek az ott tárgyaltakkal. A mintákban talált fumonizinek koncentrációját az FB₁ és FB₂ referencia anyagok 8 koncentráció értéket tartalmazó hígítási sorának (1 pg – 100 ng anyagmennyiség a mazsola- és a táptalajminták és 1 pg – 50 ng anyagmennyiség a vöröshagymaminták esetében, MeCN/H₂O 1/1 (v/v) arányú elegyében a HPLC oszlopra injektálva) HPLC/MS vizsgálata alapján készült külső standard kalibrációk alapján értékeltük ki. Az FB₁ és FB₂ toxinok tekintetében a mazsola, a vöröshagyma és a mazsoláról izolált fekete *Aspergillus* fajokkal fertőzött táptalajkorong mintákkal is végeztünk visszanyerési vizsgálatokat, amely mérések adatai az 4. fejezet megfelelő alfejezeteiben olvashatók.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. Magyarországon begyűjtött *F. verticillioides* izolátumok fumonizin B₁₋₄ termelése *in vitro*

A begyűjtött és azonosított *F. verticillioides* izolátumokkal fertőzött rizstenyészetek kivonatait RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel analizáltuk, a meredekebb grádiens HPLC elválasztás felhasználásával. Két tipikus HPLC/MS kromatogram a 10. ábrán látható. A 10A ábrán a legtöbb *F. verticillioides* izolátumra jellemző, míg a 10B ábrán csak két izolátumra jellemző fumonizin profil látható. A *F. verticillioides* izolátumokkal fertőzött rizstenyészeti kivonatok RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel kapott mérési adatait főkomponens analízissel (PCA) elemeztük. Az 5. táblázatban jól látható, hogy mind a 60 *F. verticillioides* izolátum termelt B típusú fumonizint, ami mások eredményével megegyezik (Desjardins és mtsai 1992; Plattner és mtsai 1996). A teljes FB₁₋₄ mennyiség 12-9692 mg/kg volt, azaz a leggyengébb és legerősebb FB₁₋₄-termelő izolátum között 8000x-es volt a különbség. Hasonló szélső értékeket több kutatócsoport is közölt (Nelson és mtsai 1991, 1994; Visconti és mtsai 1994; Mirete és mtsai 2003). Az izolátumok fele kevesebb, míg a másik fele több mint 2000 mg/kg FB₁₋₄ toxint termelt (11. ábra).

Az izolátumok FB₁₋₄ termelését eredet szerint is összehasonlítva megállapítható, hogy sem a fumonizin B termelés mennyiségét sem a négy FB analóg egymás közötti arányát az izolátum eredete nem befolyásolta (12. ábra). A legnagyobb eltérés (12-9692 mg/kg) a kukoricaszárról származó izolátumok esetében volt. A rizstenyészetekben mind a négy vizsgált FB toxin mennyisége széles koncentráció tartományban változott (FB₁, 9-3228 mg/kg; FB₂, 3,8-7503 mg/kg; FB₃, 1,2-681 mg/kg; FB₄ 0,1-1876 mg/kg), de a legtöbb esetben az FB₁ volt a legjelentősebb mennyiségű (13. ábra). Az izolátumok többségénél (85%) a termelt teljes fumonizin B mennyiségének átlagosan 75%-a FB₁, 18%-a FB₂, 5%-a FB₃, 2%-a FB₄ volt. Az izolátumok két kis csoportja kivételével az FB₁₋₄ toxinok mennyiségének sorrendje az izolátumokban a következő volt: FB₁ > FB₂ > FB₃ > FB₄. Ez a sorrend mások közleményeiben közöltekkel egyezést mutat (Desjardins és mtsai 1992; Plattner és mtsai 1996). Három izolátum (9, 53 és 54) több FB₃ toxint termelt, mint FB₂-t, míg két izolátum (19 és 27) dominánsan FB₂ toxint termelt és jelentős mennyiségben FB₄-et is. Proctor és mtsai (2006) szerint a *FUM* gén klaszterben történő egy-egy pontmutáció lehet a felelős az eltérő fumonizin B toxinprofilért. Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a trichotecén kemotípusokhoz hasonlóan léteznek fumonizin kemotípusok is. Az FB₁ toxin aránya a rizs tápközegben ellentétesen változott a fumonizinek össz mennyiségével

($t_{y,p} = -7,1 > t_{0,001} = 3,49$). A teljes variációk 95%-át 2 főkomponens (PC) tette ki. Az első PC-ben az FB_1 és az FB_3 volt a domináns, míg a másodikban az FB_2 és az FB_4 . A kétváltozós ábrán (14. ábra) jól láthatóan ezek a toxinpárok ellentétes szektorban helyezkednek el, jelenlétük a tenyésztő közegben egymáshoz kapcsolott volt. Ez a megfigyelés azzal magyarázható, hogy az FB_{1-4} toxinok bioszintézise során – mint a 4. ábrán (22. oldal) is látható – a HFB_4 képződése után a bioszintézisük kettéválik az $FB_3 \rightarrow FB_1$ illetve az $FB_4 \rightarrow FB_2$ irányra, ami a *FUM2*-es gén termékének (Fum2p) egy citokróm P450 oxigenáz enzimhomológjának köszönhető, amely a C-10 atomot hidroxilezi. A PC értékek ábrázolása jelzi az összefüggést az izolátumok, mint termelők között (15. ábra). Egy teljesen elkülönített szektorban jól látható, hogy két – eltérő kukoricatermesztő területen kukoricáról begyűjtött – izolátum termelt domináns mennyiségű FB_2 , jelentős mennyiségű FB_4 és kis mennyiségű FB_1 toxint és csak nyomokban FB_3 toxint. Ez a két izolátum hasonló lehet ahhoz az amerikai – természetben előforduló – FB_1 és FB_3 toxint nem termelő izolátumhoz, amelynek felhasználásával azonosítani tudták, hogy a *FUM2*-es gén felelős a C-10 hidroxilezéséért (Desjardins és mtsai 1996; Proctor és mtsai 2003).

Az izolátumok egy másik kis csoportjának a klasztere – amely több FB_3 toxint termelt, mint FB_2 -t – a főcsoportozáshoz kapcsolódik. Az is jól látható, hogy az izolátumok sem a földrajzi elhelyezkedés sem az izolátum forrása alapján nem különülnek el egymástól. Néhány jelentős mennyiségű FB_1 toxint termelő izolátum a főcsoporttól eltért. Vizsgálataink során mind a 60 izolátum termelt FB_1 toxint még ha volt is közöttük olyan, amely csak minimális mennyiségű FB_1 -et termelt. Feltételezhető tehát, hogy a *F. verticillioides* szinte mindig termel FB_1 toxint az *in vitro* tenyészetekben. Azok az eredmények, amelyek FB_1 -et nem termelő izolátumokról írnak, valószínű, hogy az alkalmazott analitikai módszer érzékenységevel lehetnek összefüggésben.

Közleményünk az első tanulmány, amely Magyarország különféle termőhelyeiről és szubsztrátjairól származó *F. verticillioides* izolátumok fumonizin-termelőképességét vizsgálta, és a mérési eredmények alapján javasolta a fumonizin kemotípus elnevezést (Szécsi és mtsai 2010).

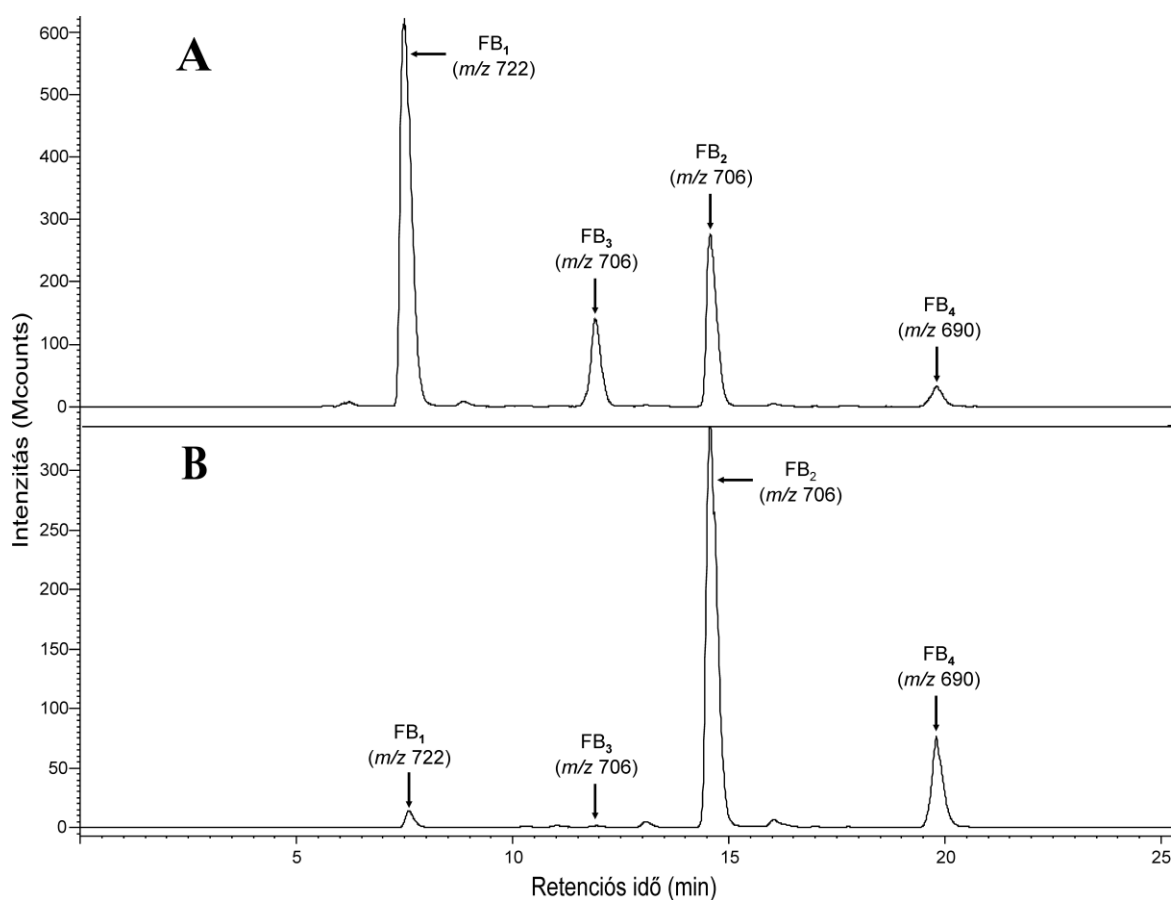
5. táblázat. *F. verticillioides* izolátumok eredete és FB₁₋₄ termelése rizstenyészetben.

Izolátum			Teljes FB ₁₋₄ -tartalom a fermentáció után (mg/kg)	Megoszlás FB ₁₋₄ (%)			
Szám	Begyűjtési hely	Eredet		FB ₁	FB ₂	FB ₃	FB ₄
		Kukorica					
1	Dág	gyökér	1061	82,4	11,3	4,5	1,8
2	Röjtökmuzsaj	gyökér	3153	75,9	17,2	5,4	1,5
3	Székkutas	gyökér	3633	73,0	19,1	6,1	1,8
4	Dág	szár	12	76,0	17,0	6,6	0,4
5	Debrecen-Kismacs	szár	34	83,1	11,2	5,6	0,1
6	Röjtökmuzsaj	szár	161	79,6	12,5	6,2	1,7
7	Decs	szár	242	90,7	5,4	3,1	0,8
8	Barcs	szár	1011	79,9	13,6	4,5	2,0
9	Székkutas	szár	1450	73,5	11,2	13,6	1,7
10	Decs	szár	1628	69,6	24,9	3,1	2,4
11	Dág	szár	2155	75,1	19,1	4,3	1,5
12	Dunapataj	szár	2301	70,0	24,4	3,4	2,2
13	Tordas	szár	2412	68,9	25,5	3,5	2,1
14	Eszterápuszta	szár	2654	71,0	18,8	8,0	2,3
15	Székkutas	szár	2942	70,8	18,3	7,8	3,1
16	Kesztölc	szár	3208	72,9	19,8	5,2	2,1
17	Kompolt	szár	3716	73,6	18,5	6,2	1,8
18	Kecskemét	szár	4444	70,8	18,2	9,2	1,8
19	Iregszemcse	szár	9692	2,8	77,4	0,4	19,4
20	Röjtökmuzsaj	cső	1061	78,2	13,5	5,9	2,3
21	Röjtökmuzsaj	cső	1134	83,4	9,8	5,4	1,4
22	Bóly	cső	1215	78,9	14,5	5,1	1,4
23	Kecskemét	cső	1580	81,0	12,5	4,5	2,1
24	Dánszentmiklós	cső	1623	72,5	22,4	3,2	2,0
25	Iregszemcse	cső	3935	71,9	17,4	8,9	1,8
26	Nagyvázsony	cső	4378	59,7	36,4	2,0	2,0
27	Debrecen	cső	8003	3,2	81,3	0,3	15,2
28	Bicske	szem	72	73,0	16,9	7,7	2,4
29	Nyiregyháza	szem	574	81,8	10,8	5,6	1,7
30	Piliszentiván	szem	2259	72,7	18,9	6,0	2,3
31	Biharkeresztes	szem	2404	78,1	14,4	6,3	1,3
32	Békéscsaba	szem	2943	72,4	19,6	6,2	1,7
33	Dombóvár	szem	3187	73,5	14,3	10,8	1,4
34	Baja	szem	3335	73,0	16,6	8,8	1,5
35	Sarkad	szem	3335	73,6	18,6	6,3	1,5
36	Mohács	szem	3492	70,5	21,1	6,1	2,3
37	Mátészalka	szem	4215	66,9	18,7	10,3	4,0
38	Szombathely	szem	4325	62,5	23,5	10,6	3,3
39	Tokaj	szem	5297	60,9	22,8	12,9	3,4
40	Piliscsaba	légtér	373	82,0	9,3	6,1	2,5
41	Piliscsaba	légtér	669	74,5	16,3	6,3	2,9
42	Piliscsaba	légtér	648	76,7	14,7	5,8	2,9
43	Piliscsaba	légtér	926	74,1	17,8	5,0	3,1

a táblázat folytatódik,

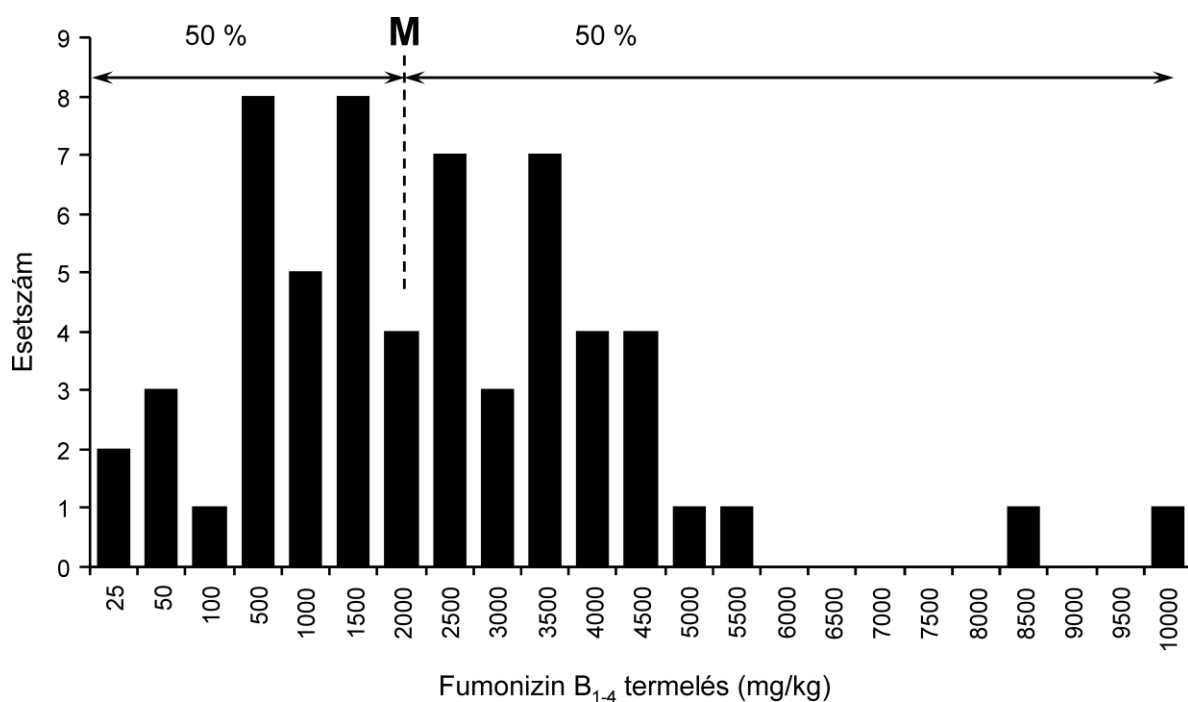
az 5. táblázat folytatása,

Izolátum			Teljes FB ₁₋₄ -tartalom a fermentáció után (mg/kg)	Megoszlás FB ₁₋₄ (%)			
Szám	Begyűjtési hely	Eredet		FB ₁	FB ₂	FB ₃	FB ₄
Egyéb							
44	Martonvásár	cirok szárszövet	1492	71,0	21,4	4,8	2,9
45	Kesztölc	cirok szárszövet	3602	70,8	20,7	6,6	1,9
46	Jászfalu	árpaszem	218	69,8	16,3	9,0	5,0
47	Jászfalu	árpaszem	960	83,7	9,8	5,1	1,4
48	Helesfa	búzaszem	32	80,7	15,2	3,9	0,2
49	Pusztagegres	búzaszem	4578	63,4	26,7	5,6	4,3
50	Szeged	rozsszem	2062	65,7	29,7	2,5	2,0
51	Karcag	rizsszem	39	72,8	20,5	4,7	2,0
52	Karcag	rizsszem	3466	64,8	30,8	2,5	1,8
53	Kerepes	komócsin	249	79,1	8,1	11,9	1,0
54	Kerepes	komócsin	1853	77,6	9,4	10,9	2,1
55	Budapest	fokhagyma	25	74,5	15,5	8,1	1,9
56	Budapest	szeder szárszövet	273	71,9	18,6	6,3	3,2
57	Budapest	szeder szárszövet	2102	74,5	21,0	2,8	1,6
58	Sükösd	kullancs	107	84,2	12,0	2,5	1,3
59	Vecsés	kullancs	355	77,9	13,7	6,2	2,1
60	Szeged	emberi szem	1377	81,5	10,7	5,6	2,2
Átlag			2161	72,0	19,4	6,0	2,6

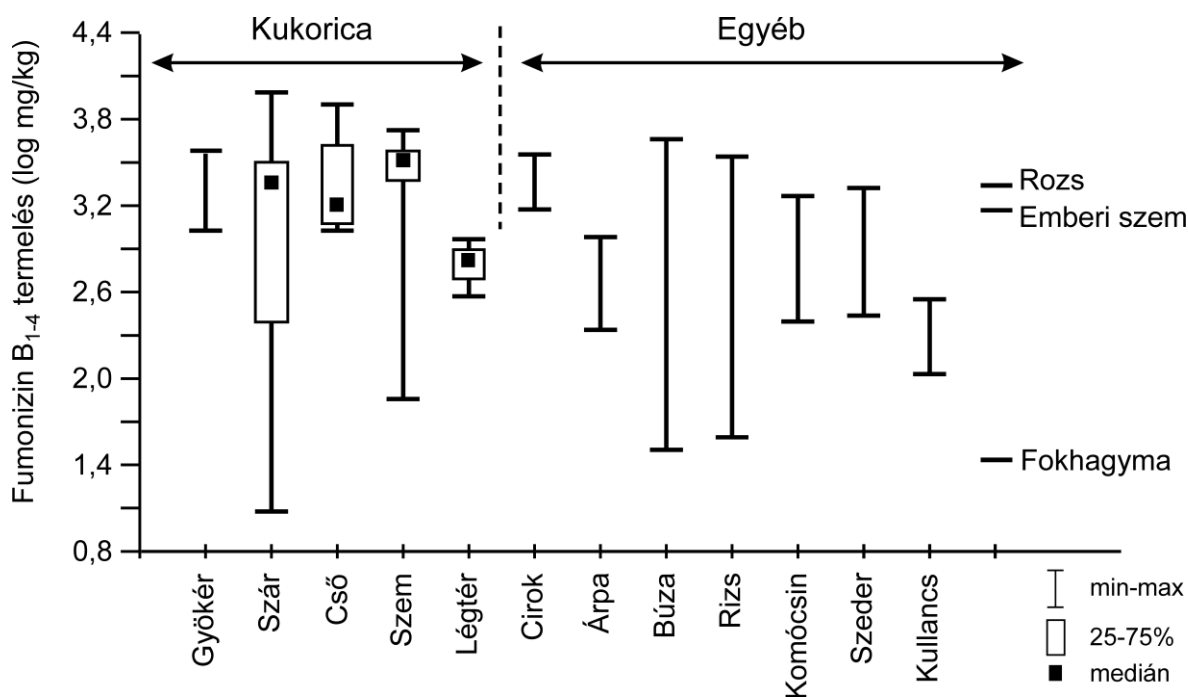


10. ábra. *F. verticillioides* izolátumok által fertőzött rizstenyészet kivonatok HPLC/ESI-ITMS extrahált ion (m/z 722+706+690) kromatogramjai. Az „A” kromatogram a 39-es, míg a „B” kromatogram a 19-es számú mintának felel meg az 5. táblázatban.

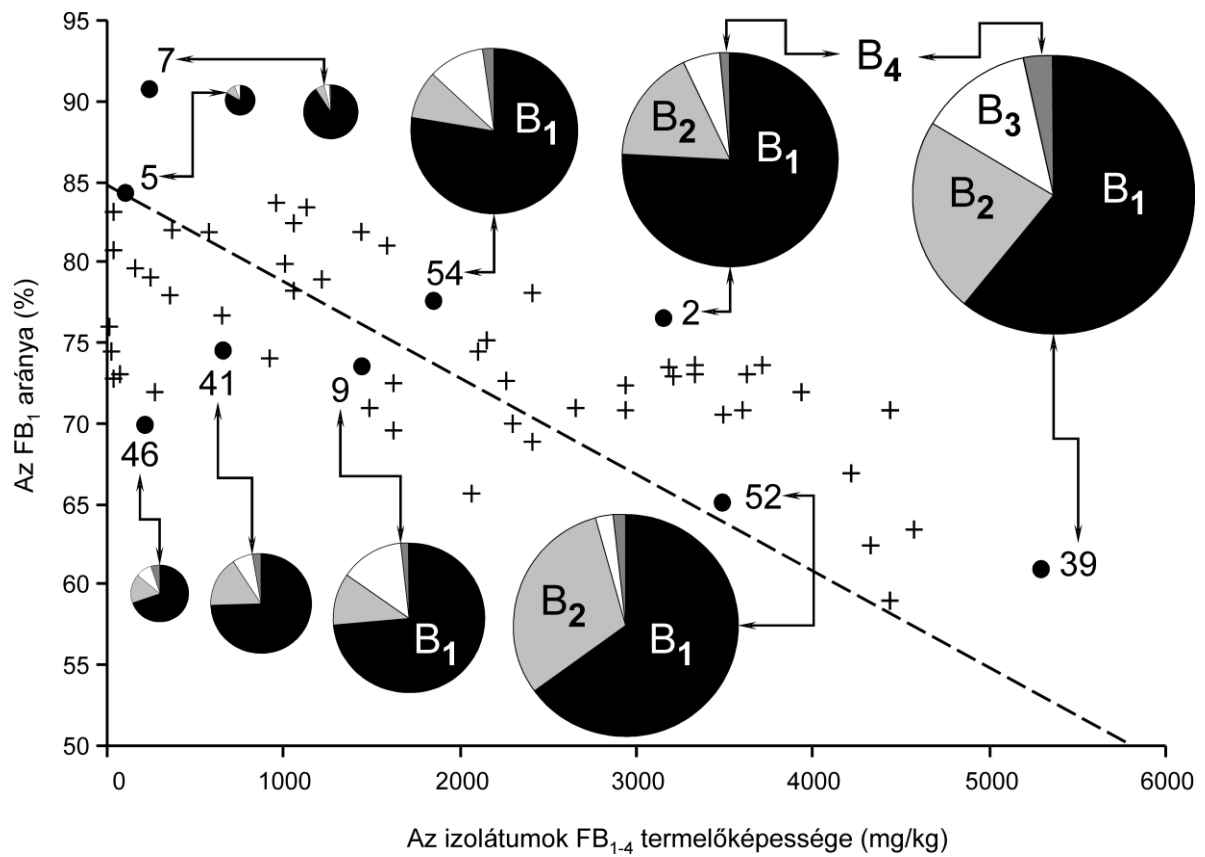
dc_253_11



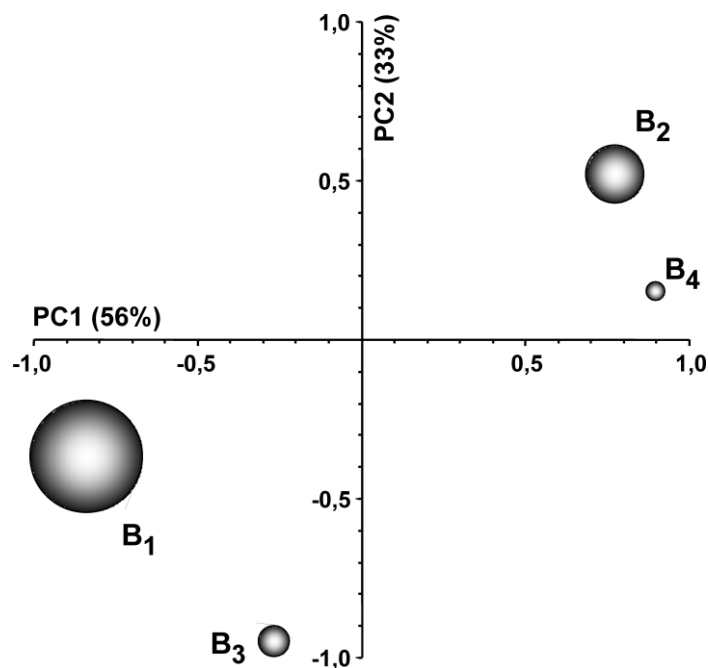
11. ábra. Magyarországon begyűjtött *F. verticillioides* izolátumok fumonizin B₁₋₄ termelőképesség szerinti megoszlása. Az átlagot (M) a függőleges szaggatott vonal mutatja.



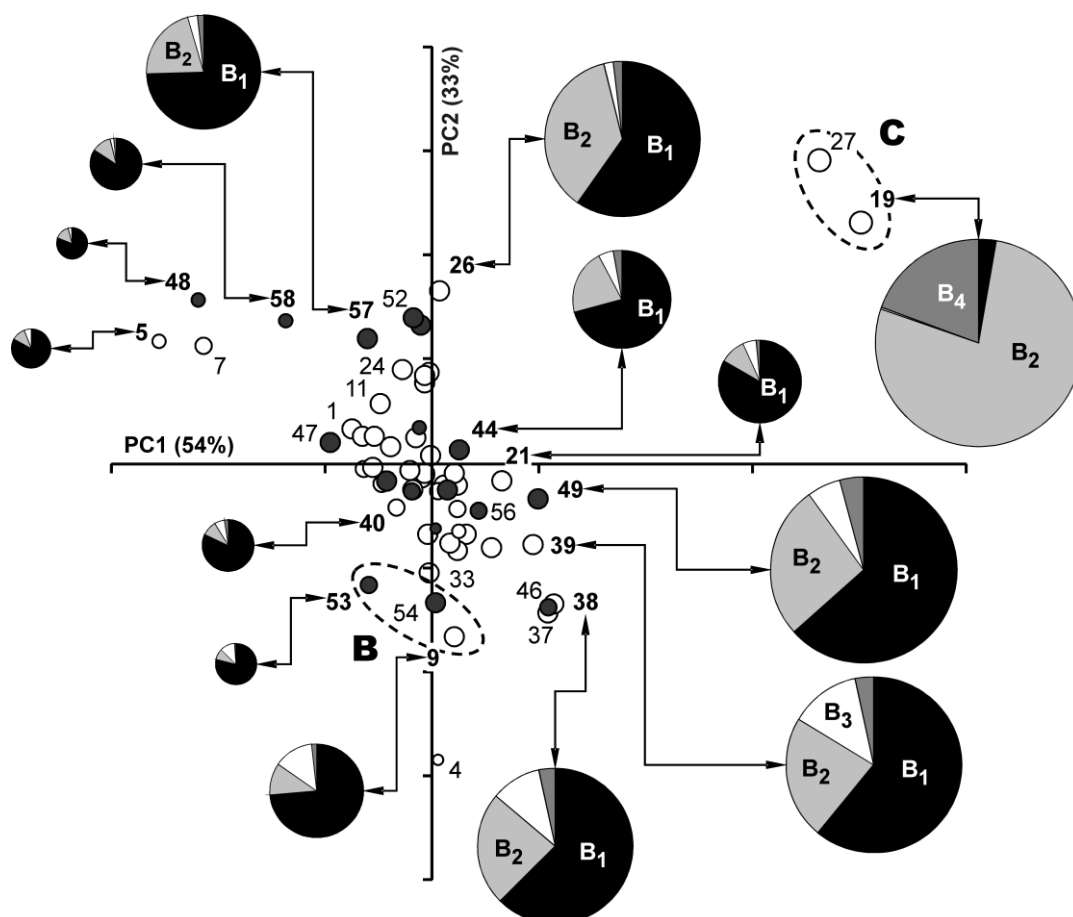
12. ábra. Különböző-eredetű *F. verticillioides* izolátumok fumonizin B₁₋₄ termelésének változékonysága.



13. ábra. A *F. verticillioides* izolátumok fumonizin B_{1-4} termelőképessége és a termelt FB_1 (%) közötti kapcsolat. Az izolátumok számai megegyeznek az 5. táblázatban található jelölésekkel. A körök és a szektorok mérete a rizstenyésztben mért mennyiségekkel arányos.



14. ábra. A fumonizin B analógok termelésének kapcsolódása. A jelek mérete arányos a komponensek átlagos mennyiségével a rizstenyésztben.



15. ábra. *F. verticillioides* izolátumok főkomponensek szerinti pontdiagramja („scatter plot”). A körök melletti számok megegyeznek az 5. táblázat első oszlopában található mintaszámokkal. 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 rizstenyésztésben.

4.2. Új fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel történő azonosítása meredekebb gradiens elválasztás felhasználásával

Az 5. táblázatban 38-as számmal szereplő izolátumot választottuk ki arra a célra, hogy megvizsgáljuk, a *F. verticillioides* termel-e a már publikáltakon kívül egyéb fumonizineket is. Korábban Josephs (1996) közölte, hogy az ioncsapdás tömegspektrométerek alkalmasak kis mennyiségben jelenlévő fumonizinek izolálás nélküli detektálására és azonosítására, természetesen a pontos konfiguráció meghatározása nélkül. A 2.9. számú fejezetben már említésre került és a 16. ábrán is jól látható, hogy a fumonizinek molekulaionjai ($[M+H]^+$) ütközéseket követő fragmentáció révén kapott CID-MS spektrumai igen jellemzőek a fumonizinekre. A 2 trikarballil-csoportot tartalmazó fumonizinek esetében 3, míg a részlegesen hidrolizált fumonizineknél (PH) csak 2 fragmension csoport található a CID-

MS tömegspektrumokban. Egy fragmension csoporton belül a szomszédos ionok m/z értékei néhány kivételtől eltekintve 18 Da értékkel különböznek egymástól, ami egy vízmolekula kilépését jelenti a fragmentáció során. A magasabb m/z értéknél látható fragmension csoport a molekulaion csoportja, míg a tőle balra elhelyezkedő ion csoportok a molekulaion -1 molekula TCA és a molekulaion -2 molekula TCA (ez a fragmension csoport természetesen a PH fumonizineknél hiányzik) fragmension csoportok.

Az alkalmazott tömegspektrométer külön előnye volt az auto MSMS pásztázó üzemmódban történő mérési lehetőség, amellyel azonosítani sikerült az addig közölt 28 fumonizinen (Rheeder és mtsai 2002) kívül számos további, többségében kis mennyiségben termelődő fumonizint (Bartók és mtsai 2006). Az auto MSMS üzemmódban a tömegspektrométer folyamatosan figyelte a megadott pásztázási tömeg/töltés (m/z) tartományban a HPLC oszlopról az ESI ionforráson keresztül a tömegspektrométer vákuumterébe jutó molekulaionokat, amelyek közül a legnagyobb intenzitással rendelkezőket automatikusan ütköztette és felvette a CID-MS (MS^2) spektrumukat. Az analízis végén ezeket az MS^2 spektrumokat (1125 db) ellenőriztük, hogy fumonizinektől származnak-e vagy sem. A tömegspektrumok áttekintése meglepő eredményt szolgáltatott, mely szerint az eddig leírt fumonizin-típusú mikotoxinokon kívül a vizsgált *F. verticillioides* izolátum számos egyéb fumonizin analógot és fumonizin-szerű vegyületet termelt *in vitro*. A komponensek közül akkor 37 új fumonizint sikerült azonosítani, amelyek a továbbiakban a fumonizin analóg csoportok (FB, FA, FC, és az új FD és FBX típus) szerint kerülnek ismertetésre. Elsőként a legtöbbet vizsgált, legnagyobb mennyiségben előforduló FB szériával kapcsolatos újabb eredmények kerülnek ismertetésre. Mivel az új vegyületek izolálása még nem történt meg, pontos szerkezetük meghatározása nem lehetséges. A kromatográfiás retenciós idő és az automatikusan felvett MS^2 spektrumok értelmezése, fragmentációs mintázatának meghatározása azonban lehetővé tette típusuk megállapítását, ezáltal szerkezetük valószínűsítését. Az új vegyületek szerkezetének megállapításánál – izolálás hiányában – kiindulási pontként szerepelt az az általánosan elfogadott szerkezeti elem, mely szerint a TCA minden esetben a fumonizin váz ugyanazon szénatomjaihoz (C-14, C-15) kötődik. Azonban bizonyos esetekben egy fumonizin típuson belüli izomerek (a HPLC oszlopról eluálódó komponensek) széles intervallumú retenciós idejük alapján (lásd pl. FB₁ izomereket: 4,7 min – 14,2 min a 7. táblázatban a 69. oldalon) felmerülhet a fenti általánosan elfogadott állítás korrekciója. Ez a korrekció a jelenlegi vizsgálatok alapján még nem realizálható.

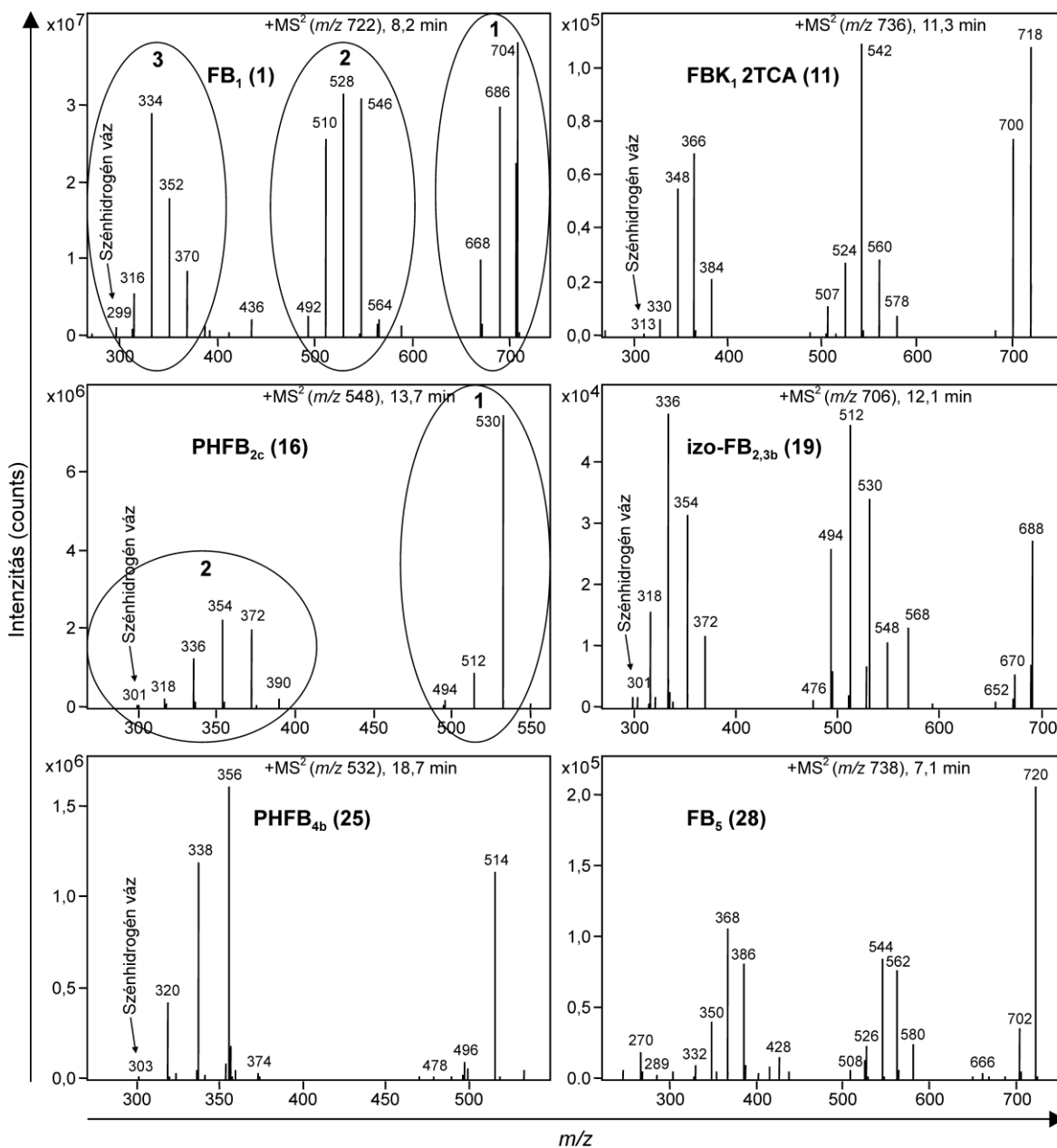
Az 1. ábrán (11. oldal) látható, hogy az FB₁ toxinban tíz királis centrum található. Jól ismert, hogy az MS technikák nem teszik lehetővé az egyes izomerek megkülönböztetését, a királis szénatomok abszolút konfigurációjának meghatározását. Az erre szolgáló módszerek (NMR technikák, XRD, ORD) azonban biztosították az eddig felismert és izolált fumonizinek közül több komponens térszerkezetének a meghatározását, beleértve a szénatomok abszolút konfigurációját is. Ezekről a jelentős eredményekről a szakirodalom már beszámolt, mint ahogy a 2.1. fejezetben (9. oldal) említésre került. Jelen értekezés a fumonizinek szénatomjainak konfigurációját (az FB₁ toxint kivéve) nem jelöli egyrészt az egyszerűsítés céljából, másrészt, mivel a leírt fumonizinek közül soknak nem ismert a teljes térszerkezete.

4.2.1. FB analógok

A fumonizinek MS-vizsgálatának modellvegyülete a FB₁, amelynek molekulaionja karakterisztikus CID-MS spektrumát az 16. ábra mutatja. Néhány új FB analóg CID-MS spektruma is ezen az ábrán látható. A detektált FB-típusú fumonizineket a 6. táblázat foglalja össze, míg a jellemző mérési adataikat a 7. táblázat összegzi. A fragmentációt jellemző fontosabb vegyületek rövidítései a rövidítések jegyzékében és a szerkezeti képletekkel együtt a 25. ábrán (79. oldal) láthatók. Szerencsés esetben a funkciós csoportok nélküli szénhidrogén váz is detektálható volt, ami diagnosztikus jelentőséggel bírt az ismeretlen fumonizinek azonosítása során. A szénhidrogén váz detektálása esetén az *m/z* értéke alapján kikalkulálható, hogy a fragmentációt megelőzően összesen mennyi funkciós csoport volt jelen a molekulán. A FB₁-re elkészített fragmentációs sémához (17. ábra) és elméleti fragmentációs mintázathoz (18. ábra) hasonlóan a többi fumonizin analógra is könnyen felvázolhatók hasonló fragmentációs sémák és elméleti fragmentációs mintázatok, amelyekkel valószínűsíthetők az újabb fumonizinek szerkezetei.

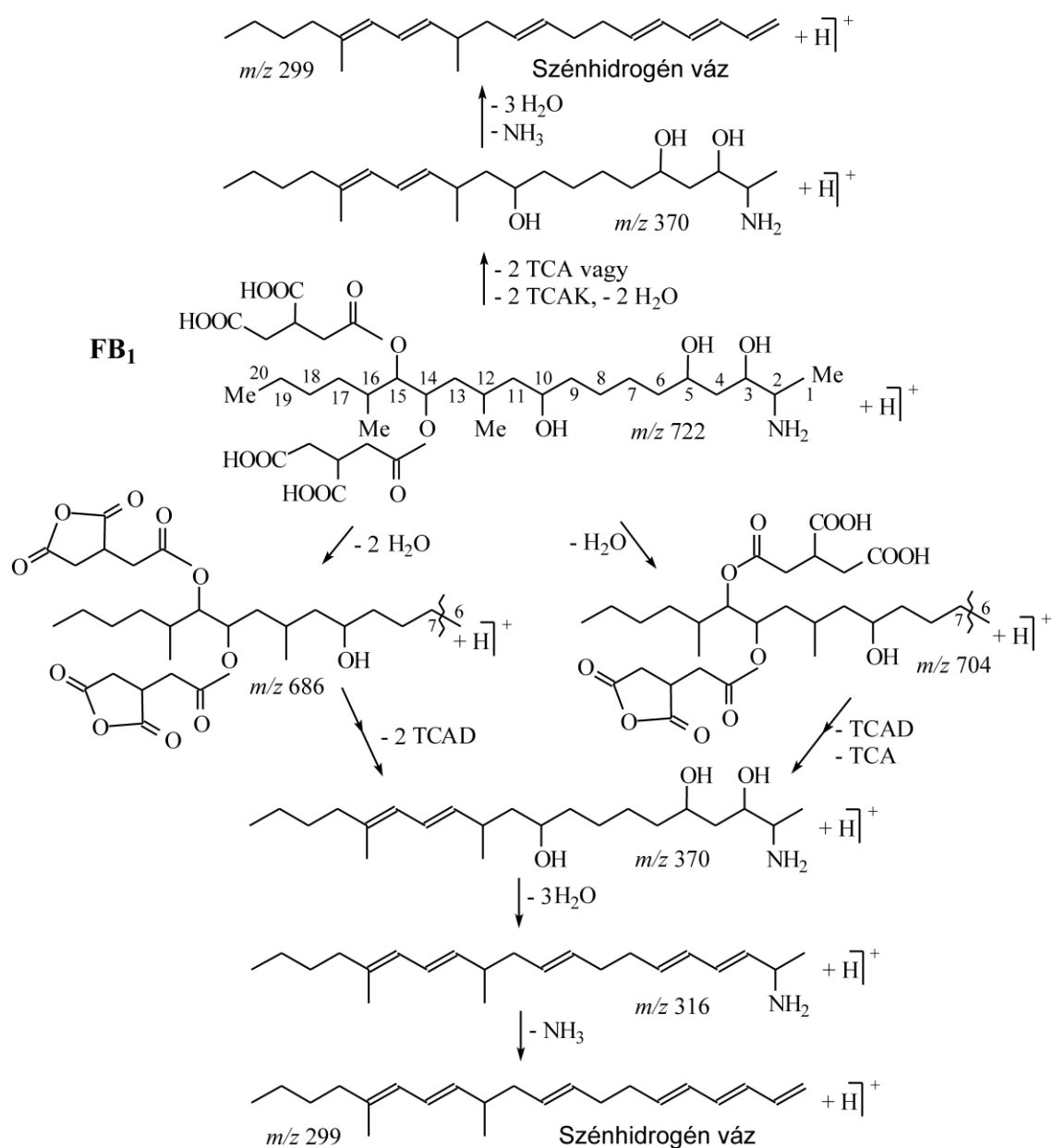
A fumonizinek szerkezetéből adódóan a fragmentáció során a fumonizin vázon lévő csoportok lehasadása történik, azaz C-O kötések hasadása következtében víz és trikarballilsav (TCA) kilépése, valamint a C-N kötés hasadása megy végbe (17. ábra). A fragmentáció eredményeként képződő kationok *m/z* értékéből megállapítható, hogy a TCA részletekben történő kihasadása is lejátszódik, azaz a megfelelő anhidrid (TCAD = 158 Da) képződése közben víz távozik, majd pedig a TCAD. Megfigyelhető volt a TCA ketén formában (TCAK) történő lehasadása, sőt fumársav (FAC = 116 Da) és AcOH (60 Da) formájában történő lehasadása is. Tekintettel arra, hogy az egyes szerkezeti izomerek (pl.

FB₁ és izo-FB₁) az eddigi vizsgálatok szerint a fragmentációs mintázat alapján nem különböztethetők meg egymástól, megkülönböztetésük a retenciós idejük alapján történt.

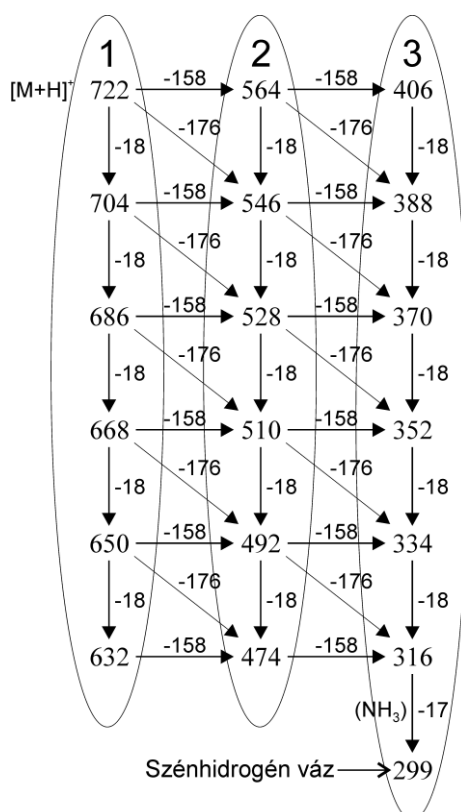


16. ábra. Néhány FB analóg CID-MS spektruma. Az oválisok a két acil-csoportot tartalmazó fumonizinekre (pl. FB₁) és az egy acil-csoportot tartalmazó részlegesen hidrolizált (PH) fumonizinekre (pl. PHFB_{2c}) jellemző három illetve kettő fragmentacion csoportot mutatják.

dc_253_11

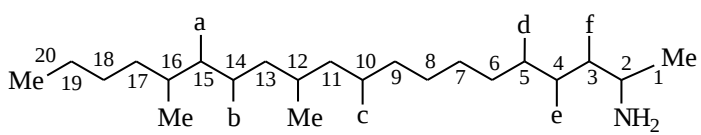


17. ábra. Az FB₁ toxin molekulaionja ([M+H]⁺) CID-MS fragmentációja során képződött néhány ion feltételezett szerkezete.



18. ábra. Az FB₁ toxin és izomerjei molekulaionjának ([M+H]⁺) jellemző CID-MS elméleti fragmentációs útvonalai. Az átlós nyilak a TCA (176 Da), a vízszintes nyilak a TCAD és TCAK (mindkettő 158 Da), míg a függőleges nyilak a H₂O (18 Da) és az NH₃ (17 Da) kihasadását jelzik az FB₁ molekulából és izomerjeiből (a rövidítésekhez lásd a 25. ábrát, 79. oldal). Az oválisok az MS² spektrumban is látható (16. ábra) három fragmentacion csoportot (1-3) jelzik.

6. táblázat. A rizstenyészetben azonosított FB analógok ismert és javasolt szerkezetei

							
Komponens		A fumonizín váz oldalláncai					
		a	b	c	d	e	f
1	FB ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	OH
2	izo-FB ₁	TCA	TCA	OH	H	OH	OH
3-6 ^a	izo-FB _{1a-d}	TCA	TCA	OH	H	H	OH
7,8	PHFB _{1a,b}	OH	TCA	OH	OH	H	OH
9,10	FBK _{1a,b}	=O ↔	TCA	OH	OH	H	OH
11 ^a	FBK ₁ 2TCA	TCA	TCA	OH	OH	H	=O
12	FBK ₄ 2TCA	TCA	TCA	H	OH	H	=O
13	FB ₂	TCA	TCA	H	OH	H	OH
14-16 ^a	PHFB _{2a-c}	TCA ↔	OH	H	H	H	OH
17	FB ₃	TCA	TCA	OH	H	H	OH
18-22 ^a	izo-FB _{2,3a-e}	TCA	TCA	H	H	H	OH
23	FB ₄	TCA	TCA	H	H	H	OH
24-27 ^a	PHFB _{4a-d}	TCA ↔	OH	H	H	H	H
28-32 ^b	FB ₅ /izo-FB _{5a-d}	TCA	TCA	OH	H	H	OH

^a Egy másik OH-csoport is van a fumonizín vázon; ^b Két másik OH-csoport is van a fumonizín vázon; Az újonnan leírt fumonizinek neve vastagított

7. táblázat. A FB analóg fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS eljárással kapott jellemző adatai. A rövidítésekhez lásd a 25. ábrát (79. oldal).

Komponens	Retencios idő (min)	Relatív mennyiség az FB ₁ %-ában (FB ₁ = 100%)	A molekulaionok ([M+H] ⁺ és az azokból képződött termékionok m/z értékei és relatív abundanciáik (%))																	[M+H - XTCA - YH ₂ O - NH ₃] ⁺ (Szénhidrogén váz)
			[M+H] ⁺	[M+H - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - 4H ₂ O] ⁺	[M+H - TCAC] ⁺	[M+H - TCA] ⁺	[M+H - TCA - H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - TCAC] ⁺	[M+H - 2TCA] ⁺	[M+H - 2TCA - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - XTCA - YH ₂ O] ⁺			
1 FB ₁ ^a	8,2	100	722	704 (100)	686 (78)	668 (26)	650 (0)	564 (5)	546 (81)	528 (83)	510 (67)	492 (6)	388 (3)	370 (22)	352 (47)	334 (76)	316 (14)	299 (3)		
2 izo-FB ₁	9,7	1,2	722	704 (71)	686 (37)	668 (3)	650 (0)	564 (20)	546 (100)	528 (73)	510 (23)	492 (17)	388 (3)	370 (67)	352 (45)	334 (58)	316 (23)	299 (3)		
3 izo-FB _{1a}	4,7	0,1	722	704 (100)	686 (41)	668 (15)	650 (1)	564 (2)	546 (39)	528 (75)	510 (94)	492 (30)	388 (3)	370 (8)	352 (55)	334 (55)	316 (0)	299 (1)		
4 izo-FB _{1b}	6,7	1,1	722	704 (86)	686 (43)	668 (9)	650 (0,3)	564 (8)	546 (44)	528 (100)	510 (49)	492 (18)	388 (0)	370 (27)	352 (41)	334 (16)	316 (18)	299 (2)		
5 izo-FB _{1c}	11,2	0,2	722	704 (77)	686 (61)	668 (14)	650 (0,4)	564 (5)	546 (50)	528 (100)	510 (14)	492 (17)	388 (4)	370 (42)	352 (85)	334 (49)	316 (42)	299 (3)		
6 izo-FB _{1d}	14,2	0,5	722	704 (15)	686 (3)	668 (0)	650 (0)	564 (20)	546 (100)	528 (24)	510 (0,2)	492 (2)	388 (6)	370 (45)	352 (25)	334 (8)	316 (0,3)	299 (0)		
7 PHFB _{1a}	4,1	0,03	564	546 (100)	528 (9)	510 (6)	492 (0)	406 (3)	388 (40)	370 (42)	352 (22)	334 (21)					316 (4)	299 (2)		
8 PHFB _{1b}	5,3	2,1	564	546 (100)	528 (15)	510 (3)	492 (0)	406 (0,1)	388 (4)	370 (11)	352 (12)	334 (5)					316 0,7)	299 (0,4)		
9 FBK _{1a} ^b	6,5	0,1	562	544 (100)	526 (27)	508 (14)	490 (1)	404 (3)	386 (11)	368 (10)	350 (11)							297 (3)		
10 FBK _{1b} ^c	7,8	4,1	562	544 (100)	526 (48)	508 (7)	490 (0)	404 (3)	386 (3)	368 (11)	350 (7)							297 (0,1)		
11 FBK ₁ 2TCA	11,3	0,2	736	718 (99)	700 (68)	682 (2)	664 (0)	578 (6)	560 (26)	542 (100)	524 (29)	506 (10)	402 (0)	384 (19)	366 (62)	348 (50)	330 (5)	313 (0,2)		
12 FBK ₄ 2TCA	14,2	0,8	704	686 (52)	668 (29)	650 (0,2)		546 (10)	528 (34)	510 (100)	492 (16)		370 (6)	352 (6)	334 (43)	316 (13)		299 (3)		
13 FB ₂	15,6	72,2	706	688 (96)	670 (28)	652 (2)		548 (10)	530 (32)	512 (100)	494 (23)	476 (2)	372 (0)	354 (46)	336 (68)	318 (32)		301 (0)		
14 PHFB _{2a}	9,8	0,8	548	530 (100)	512 (10)	494 (0,1)	476 (0)	390 (7)	372 (7)	354 (36)	336 (9)	318 (0,1)						301 (1)		
15 PHFB _{2b}	11,9	0,4	548	530 (100)	512 (15)	494 (2)	476 (0)	390 (0)	372 (35)	354 (36)	336 (21)	318 (11)						301 (0)		
16 PHFB _{2c}	13,7	5,7	548	530 (100)	512 (10)	494 (1)	476 (0)	390 (2)	372 (26)	354 (29)	336 (15)	318 (3)						301 (1)		

a táblázat folytatódik,

a 7. táblázat folytatása,

Komponens	Retenciósi idő (min)	Relatív mennyiség az FB ₁ %-ában (FB ₁ = 100%)	A molekulaionok ([M+H] ⁺ és az azokból képződött termékionok m/z értékei és relatív abundanciáik (%))																[M+H - XTCA - YH ₂ O - NH ₃] ⁺ (Szenhidrogén váz)
			[M+H] ⁺	[M+H - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - 4H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA] ⁺	[M+H - TCA] ⁺	[M+H - TCA - H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - TCA] ⁺	[M+H - 2TCA] ⁺	[M+H - 2TCA - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - 4H ₂ O] ⁺	
17 FB ₃	12,9	37,7	706	688 (100)	670 (31)	652 (8)	634 (0)	548 (25)	530 (84)	512 (53)	494 (37)	476 (10)	372 (2)	354 (53)	336 (56)	318 (58)			301 (3)
18 izo-FB _{2,3a}	10,8	0,1	706	688 (25)	670 (16)	652 (3)	634 (0)	548 (2)	530 (100)	512 (8)	494 (8)	476 (4)	372 (11)	354 (36)	336 (84)	318 (20)			301 (5)
19 izo-FB _{2,3b}	12,1	0,2	706	688 (57)	670 (11)	652 (2)	634 (0)	548 (22)	530 (71)	512 (96)	494 (53)	476 (2)	372 (24)	354 (65)	336 (100)	318 (32)			301 (3)
20 izo-FB _{2,3c}	16,5	0,2	706	688 (76)	670 (22)	652 (5)	634 (0)	548 (10)	530 (42)	512 (100)	494 (34)	476 (2)	372 (0)	354 (23)	336 (91)	318 (38)			301 (0)
21 izo-FB _{2,3d}	17,0	1,6	706	688 (26)	670 (12)	652 (4)	634 (0)	548 (14)	530 (100)	512 (14)	494 (8)	476 (3)	372 (24)	354 (79)	336 (19)	318 (19)			301 (0)
22 izo-FB _{2,3e}	18,8	0,9	706	688 (52)	670 (31)	652 (1)	634 (0)	548 (0)	530 (54)	512 (84)	494 (7)	476 (0,5)	372 (50)	354 (26)	336 (100)	318 (28)			301 (3)
23 FB ₄	20,8	15,3	690	672 (44)	654 (9)	636 (0)		532 (10)	514 (66)	496 (16)	478 (28)	460 (0)	356 (11)	338 (72)	320 (100)				303 (8)
24 PHFB _{4a}	16,4	0,2	532	514 (67)	496 (14)	478 (3)		374 (0,4)	356 (81)	338 (100)	320 (18)								303 (0,3)
25 PHFB _{4b}	18,7	1,3	532	514 (70)	496 (5)	478 (0,2)		374 (2)	356 (100)	338 (74)	320 (26)								303 (0,1)
26 PHFB _{4c}	22,5	0,7	532	514 (100)	496 (8)	478 (0,1)		374 (1)	356 (50)	338 (38)	320 (9)								303 (1)
27 PHFB _{4d}	25,3	0,2	532	514 (42)	496 (7)	478 (0)		374 (1)	356 (100)	338 (39)	320 (2)								303 (2)
28 FB ₅	7,1	0,4	738	720 (100)	702 (17)	684 (0,1)	666 (0,1)	580 (12)	562 (37)	544 (41)	526 (11)	508 (2)	404 (1)	386 (39)	368 (52)	350 (19)	332 (4)	314 (2)	297 (0)
29 izo-FB _{5a}	3,0	0,02	738	720 (100)	702 (45)	684 (0)	666 (0)	580 (0)	562 (11)	544 (100)	526 (54)	508 (16)	404 (0)	386 (2)	368 (3)	350 (23)	332 (14)	314 (44)	297 (2)
30 izo-FB _{5b}	3,9	0,02	738	720 (79)	702 (36)	684 (40)	666 (5)	580 (0)	562 (41)	544 (100)	526 (83)	508 (5)	404 (0)	386 (18)	368 (35)	350 (14)	332 (4)	314 (13)	297 (0)
31 izo-FB _{5c}	6,0	0,1	738	720 (100)	702 (40)	684 (11)	666 (0,5)	580 (5)	562 (9)	544 (56)	526 (21)	508 (6)	404 (3)	386 (20)	368 (30)	350 (14)	332 (3)	314 (6)	297 (0)
32 izo-FB _{5d}	11,5	0,06	738	720 (100)	702 (25)	684 (15)	666 (13)	580 (12)	562 (26)	544 (65)	526 (35)	508 (0)	404 (0)	386 (11)	368 (53)	350 (17)	332 (0,5)	314 (0)	297 (0)

X: 1 (7-10, 14-16, 24-27) vagy 2 (1-6, 11-13, 17-23, 28-32); Y: 1 (23), 2 (12, 13, 17-22, 24-27), 3 (1-6, 9-11, 14-16) vagy 4 (7, 8, 28-32)

^a + m/z 588 (2,9) = [M+H-FAc-H₂O]⁺; + m/z 412 (0,8) = [M+H-TCA-FAc-H₂O]⁺^b + m/z 333 (3) = [M+H-TCA-2H₂O-NH₃]⁺; + m/z 315 (0,5) = [M+H-TCA-3H₂O-NH₃]⁺^c + m/z 333 (5) = [M+H-TCA-2H₂O-NH₃]⁺; + m/z 315 (0,2) = [M+H-TCA-3H₂O-NH₃]⁺

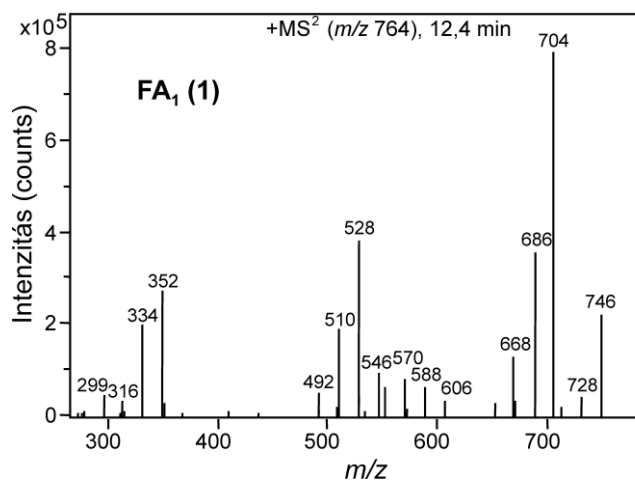
4.2.2. FA analógok

Az FB szériához hasonlóan a megfelelő kísérleti adatokat a 8. és 9. táblázatok, valamint a 20. és 21. ábrák foglalják össze. A 19. ábra az FA sorozatot jellemző spektrumként az FA₁ toxin CID-MS spektrumát ábrázolja. Az FB szériához képest jelentősen kevesebb számú FA analóg volt detektálható, ami összhangban van a témában publikált adatokkal. Az FA analógok közül a már publikált FA₁₋₃ toxinokat és két FA₁ izomert sikerült azonosítani. A fragmentációs mintázatuk – mint az várható volt – különbözik az FB szériáétól. Ennek fő oka abban van, hogy az FA analógok nem aminos-csoportot tartalmaznak, hanem az aminok acetilezett származékát, azaz az FA analógok nem aminok, hanem acetamidok. A 20. és 21. ábrák szerint kétféle fragmentációs mintázat bontakozhat ki, attól függően, hogy az acetyl-csoport mely fázisban hasad le a fumonizin alapvázról. Az egyes fragmentumok m/z értékei ezt jól illusztrálják.

8. táblázat. A rizstenyészetben azonosított FA analógok ismert és javasolt szerkezetei.

Komponens		A fumonizin váz oldalláncai					
		a	b	c	d	e	f
1	FA ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	OH
2,3 ^a	izo-FA _{1a,b}	TCA	TCA	H	H	H	OH
4	FA ₂	TCA	TCA	OH	H	H	OH
5	FA ₃	TCA	TCA	H	OH	H	OH

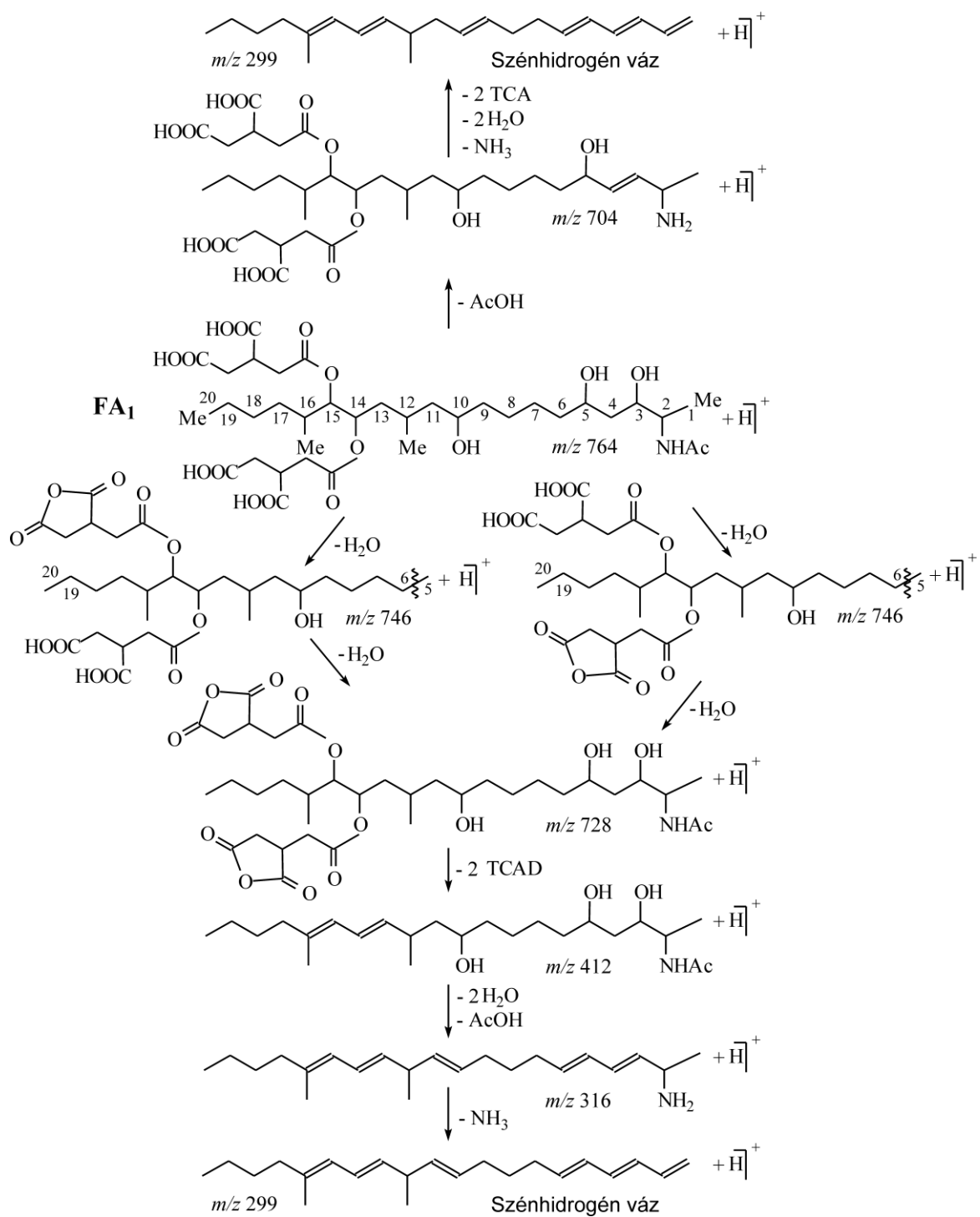
^a Két másik OH-csoport is van a fumonizin vázon; Az újonnan azonosított fumonizinek neve vastagított



19. ábra. Az FA₁ toxin CID-MS spektruma.

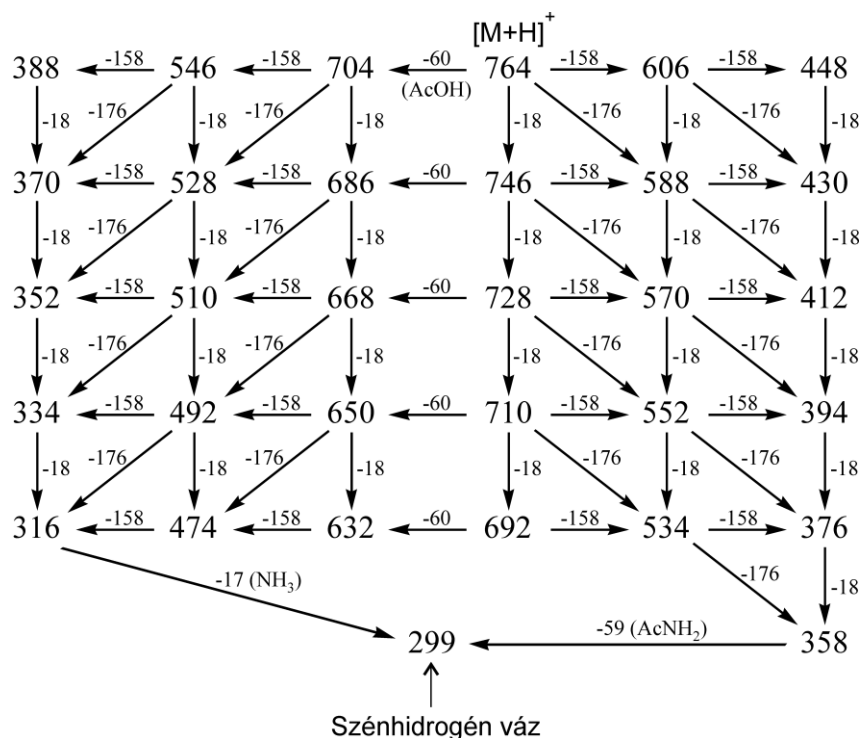
9. táblázat. Az FA analóg fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS eljárással kapott jellemző adatai. A rövidítésekhez lásd a 25. ábrát (79. oldal).

Komponens	Retenciósi idő (min)	Relatív mennyiség az FB ₁ %-ában (FB ₁ = 100%)	A molekulaionok ([M+H] ⁺ és az azokból képződött termékionok <i>m/z</i> értékei és relatív abundanciáik (%))																							
			[M+H] ⁺	[M+H - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - 4H ₂ O] ⁺	[M+H - AcOH] ⁺	[M+H - AcOH - H ₂ O] ⁺	[M+H - AcOH - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - AcOH - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - TCAC] ⁺	[M+H - TCA - H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - AcOH - H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - AcOH - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - AcOH] ⁺	[M+H - 2TCA - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - AcOH - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - AcOH - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - AcOH - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - AcOH - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - AcOH - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - AcOH - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - AcOH - H ₂ O] ⁺	
1	FA ₁	12,4	0,7	764	746 (27)	728 (5)	710 (2)	692 (0)	704 (100)	686 (44)	668 (16)	650 (3)	606 (4)	588 (8)	570 (10)	552 (7)	546 (11)	528 (48)	510 (24)	492 (6)	412 (1)	394 (0)	352 (34)	334 (24)	316 (4)	299 (5)
2	izo-FA _{1a}	21,7	3,3	764	746 (100)	728 (82)	710 (34)	692 (34)	704 (0)	686 (93)	668 (72)	650 (5)	606 (36)	588 (0)	570 (54)	552 (10)	546 (0)	528 (23)	510 (3)	492 (0)	412 (5)	394 (9)	352 (0)	334 (18)	316 (0)	299 (4)
3	izo-FA _{1b}	22,2	0,3	764	746 (55)	728 (60)	710 (0)	692 (0)	704 (0)	686 (30)	668 (0)	650 (0)	606 (0)	588 (100)	570 (53)	552 (51)	546 (0)	528 (0)	510 (0)	492 (0)	412 (0)	394 (38)	352 (0)	334 (0)	316 (0)	299 (0)
4	FA ₂	27,9	8,0	748	730 (100)	712 (0)	694 (0)		688 (0)	670 (58)	652 (0)		590 (10)	572 (0)	554 (17)		530 (0)	512 (11)	494 (0)	396 (0)	378 (5)	336 (12)	318 (29)		301 (0)	
5	FA ₃	19,6	1	748	730 (18)	712 (2)	694 (4)		688 (100)	670 (48)	652 (2)		590 (4)	572 (2)	554 (13)		530 (3)	512 (84)	494 (28)	396 (0,5)	378 (0,2)	336 (13)	318 (21)		301 (0)	



20. ábra. Az FA₁ toxin molekulaionja ($[M+H]^+$) CID-MS fragmentációja során képződött néhány ion feltételezett szerkezete.

dc_253_11



21. ábra. Az FA₁ toxin molekulaionja ([M+H]⁺) elméleti CID fragmentációs mintázata. Az átlós nyilak a TCA (176 Da) és az NH₃ (17 Da), a vízszintes nyilak a TCAD és a TCAK (mindkettő 158 Da) illetve az AcOH (60 Da) és az AcNH₂ (59 Da) míg a függőleges nyilak a H₂O (18 Da) kihasadását jelzik az FA₁ molekulából és izomerjeiből. A rövidítésekhez lásd a 25. ábrát (79. oldal).

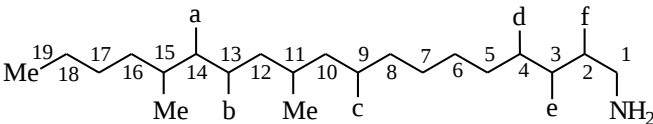
4.2.3. FC analógok és az FD

Az FB- és FA sorozatokhoz hasonló kísérleti adatokat a 10. és 11. táblázatok, valamint a 22-24. ábrák foglalják össze. Az FB analógokhoz képest ez esetben is jelentősen kevesebb számú vegyületet lehetett detektálni, az FA analógokhoz képest azonban némileg többet. Különösen figyelemreméltó a PHFC₄ és az FD-vel jelölt fumonizin-szerű analógok termelése. Részlegesen hidrolizált (PH) FC analógokat eddig még nem közöltek. Acetilezett FC analógokat (Rheeder és mtsai 2002) nem detektáltunk.

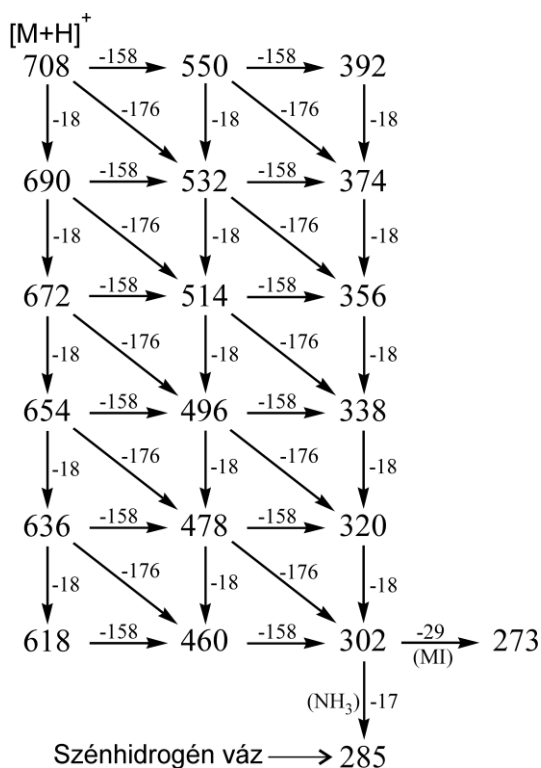
Az eddigiektől eltérően a CID fragmentáció záró lépéseként – az NH_3 kihasadása mellett – metilénimin (MI) képződésével járó fragmentáció is végbement (22. és 23. ábra).

A 24. ábra ugyancsak eddig ismeretlen típusú fumonizin analógra utal (jelölve FD). Az m/z 678-as kation vagy C18 szénláncot tartalmazó vegyület, vagy C17 szénláncú keton. Mint az a két sémából látható, az MS^2 spektrum alapján a két vegyület nem különböztethető meg egymástól. Remélhetőleg a későbbiekben a tervezett MS^n ($n>2$) mérések lehetővé teszik valamelyik szerkezet valószínűsítését.

10. táblázat. A rizstenyészetben azonosított FC analógok és az FD toxin ismert és javasolt szerkezetei.

							
Komponens		A fumonizin váz oldalláncai					
		a	b	c	d	e	f
1	FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	OH
2	izo-FC ₁	TCA	TCA	OH	H	OH	OH
3	FC ₂	TCA	TCA	H	OH	H	OH
4	FC ₃	TCA	TCA	OH	H	H	OH
5,6 ^a	izo-FC _{2,3}	TCA	TCA	H	H	H	OH
7	FC ₄	TCA	TCA	H	H	H	OH
8	PHFC ₄	TCA ↔	OH	H	H	H	OH
9 ^b	FD	TCA	TCA	H	H	H	H

^a Egy másik OH-csoport is van a fumonizin vázon; ^b C17-es keton vagy C18-as komponens (két másik OH-csoport is van a fumonizin vázon); Az újonnan azonosított fumonizinek neve vastagított

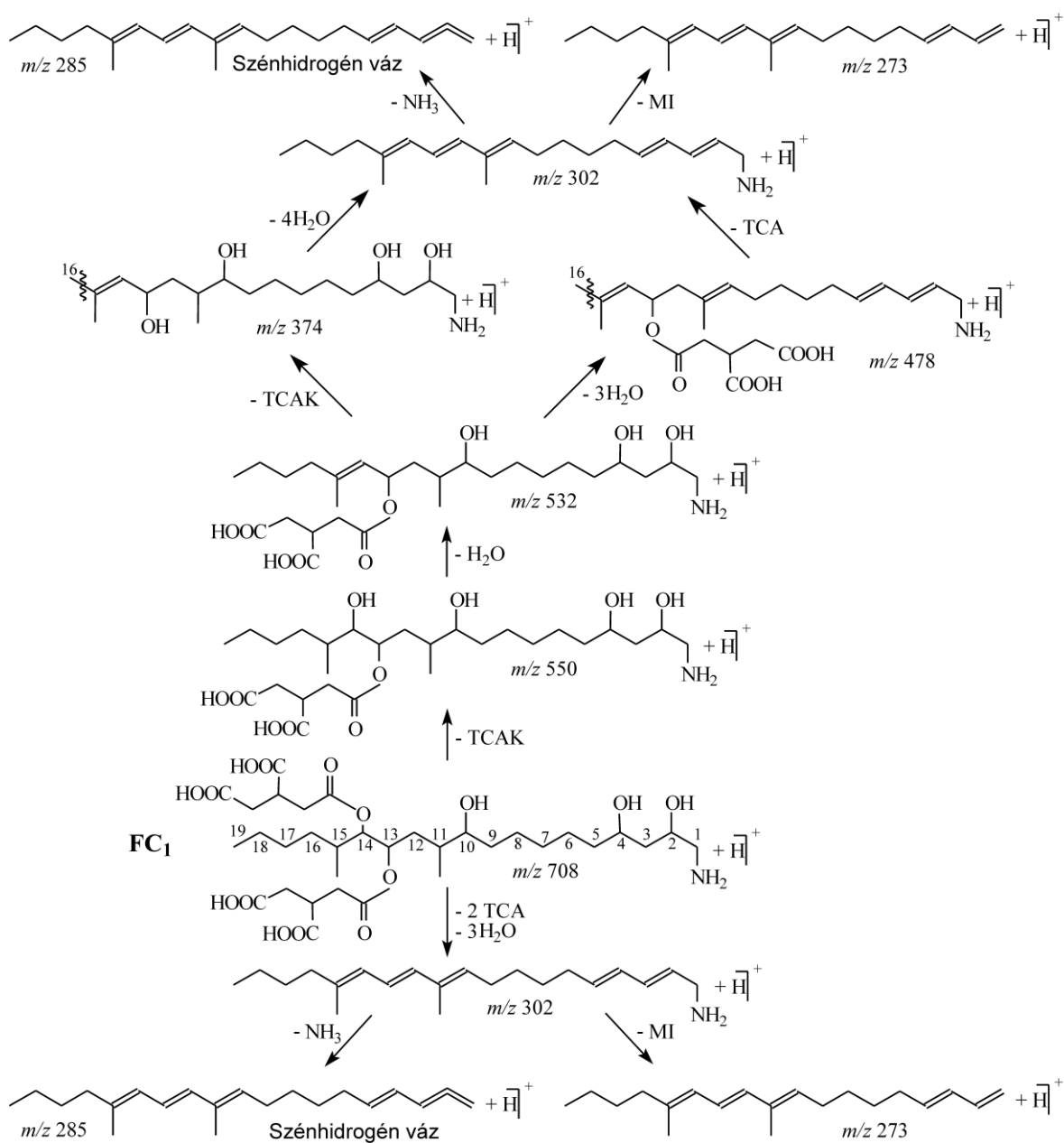


22. ábra. Az FC₁ toxin molekulaionja ([M+H]⁺) elméleti CID fragmentációs mintázata. Az átlós nyilak a TCA (176 Da), a vízszintes nyilak a TCAD és TCAK (mindkettő 158 Da) illetve az MI (29 Da), míg a függőleges nyilak a H₂O (18 Da) és az NH₃ (17 Da) kihasadását jelzik az FC₁ molekulából és izomerjeiből. A rövidítésekhez lásd a 25. ábrát (79. oldal).

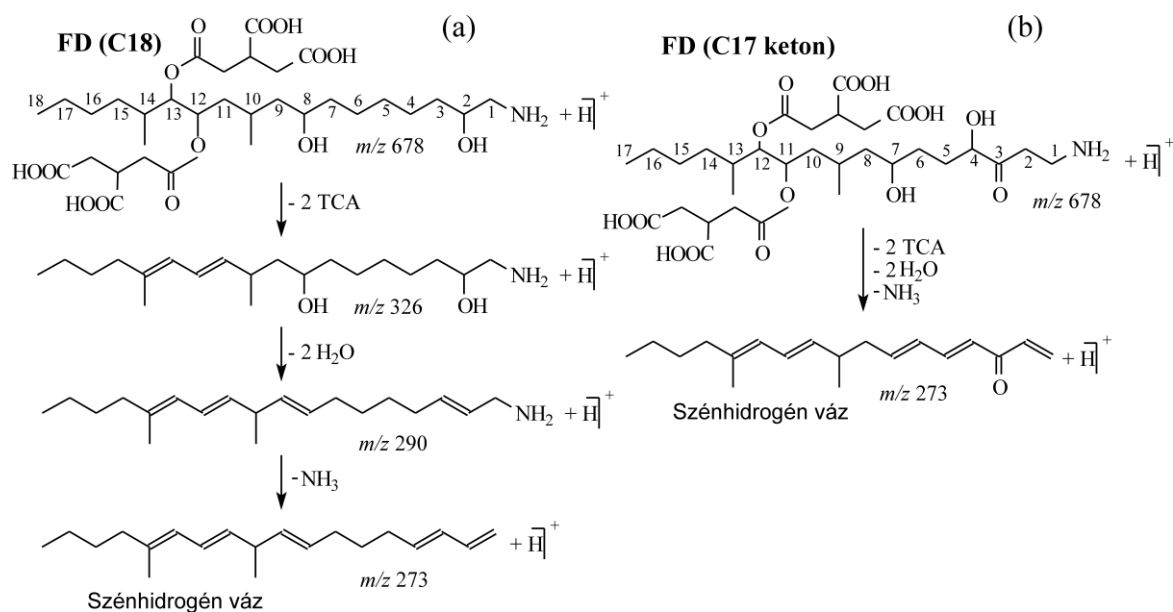
11. táblázat. Az FC analógok és az FD toxin RP-HPLC/ESI-ITMS eljárással kapott mérési adatai. A rövidítésekhez lásd a 25. ábrát (79. oldal).

Komponens	Retenció idő (min)	Relatív mennyiség az FB ₁ %-ában (FB ₁ = 100%)																	
		[M+H] ⁺	[M+H - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - TCAC] ⁺	[M+H - TCA] ⁺	[M+H - TCA - H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - TCA - TCAC] ⁺	[M+H - 2TCA] ⁺	[M+H - 2TCA - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - 2TCA - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - XTCA - YH ₂ O - NH ₃] ⁺ (Szenhidrogén váz)	[M+H - XTCA - YH ₂ O - MI] ⁺		
		A molekulaionok ([M+H] ⁺ és az azokból képződött termékionok m/z értékei és relatív abundanciáik (%))																	
1	FC ₁	7,6	2,3	708	690 (100)	672 (41)	654 (16)	550 (6)	532(8)	514 (62)	496(37)	478 (9)	374 (1)	356 (5)	338 (34)	320 (25)	302 (3)	285 (1,5)	273 (2)
2	izo-FC ₁	8,9	0,2	708	690 (54)	672 (21)	654 (0)	550 (0)	532 (69)	514 (46)	496 (5)	478 (9)	374 (3)	356 (100)	338 (159)	320 (25)	302 (0)	285 (0)	273 (49)
3	FC ₂	15,0	4,2	692	674 (54)	656 (17)	638 (5)	534 (7)	516 (37)	498 (83)	480 (12)	462 (0)	358 (9)	340 (45)	322 (100)	304 (26)		287 (5)	275 (0,4)
4	FC ₃	11,8	2,1	692	674 (100)	656 (39)	638 (13)	534 (11)	516 (45)	498 (37)	480 (36)	462 (28)	358 (9)	340 (34)	322 (57)	304 (20)		287 (5)	275 (5)
5	izo-FC _{2,3}	13,9	0,9	692	674 (47)	656 (31)	638 (3)	534 (7)	516 (68)	498 (92)	480 (10)	462 (0)	358 (0)	340 (21)	322 (100)	304 (30)		287 (8)	275 (4)
6	izo-FC _{2,3}	16,1	0,9	692	674 (9)	656 (11)	638 (0)	534 (30)	516 (100)	498 (14)	480 (3)	462 (0)	358 (60)	340 (55)	322 (17)	304 (33)		287 (3)	275 (3)
7	FC ₄	19,5	5,6	676	658 (37)	640 (6)	622 (0,3)	518 (22)	500 (75)	482 (13)	464 (10)		342 (10)	324 (100)	306 (469)			289 (8)	277 (0,7)
8	PHFC ₄	20,5	0,1	518	500 (100)	482 (27)	464 (0)	360 (0,2)	342 (32)	324 (62)	306 (10)							289 (0,5)	277 (0)
9	FD	10,1	0,2	678	660 (64)	642 (39)	624 (5)	520 (7)	502 (19)	484 (100)	466 (15)		344 (1)	326 (9)	308 (48)	290 (23)		273 (3)	

X: 1 (**7**) vagy 2 (**1-6, 8**), Y: 1 (**6**), 2 (**3-5, 7, 8**) vagy 3 (**1, 2**)



23. ábra. Az FC₁ toxin molekulaionja ([M+H]⁺) CID-MS fragmentációja során képződött néhány ion feltételezett szerkezete.



24. ábra. Az [FD (C18)+H]⁺ (a) és az [FD (C17 keton)+H]⁺ (b) toxin molekulaionja és a fragmentáció során képződött néhány ion feltételezett szerkezete.

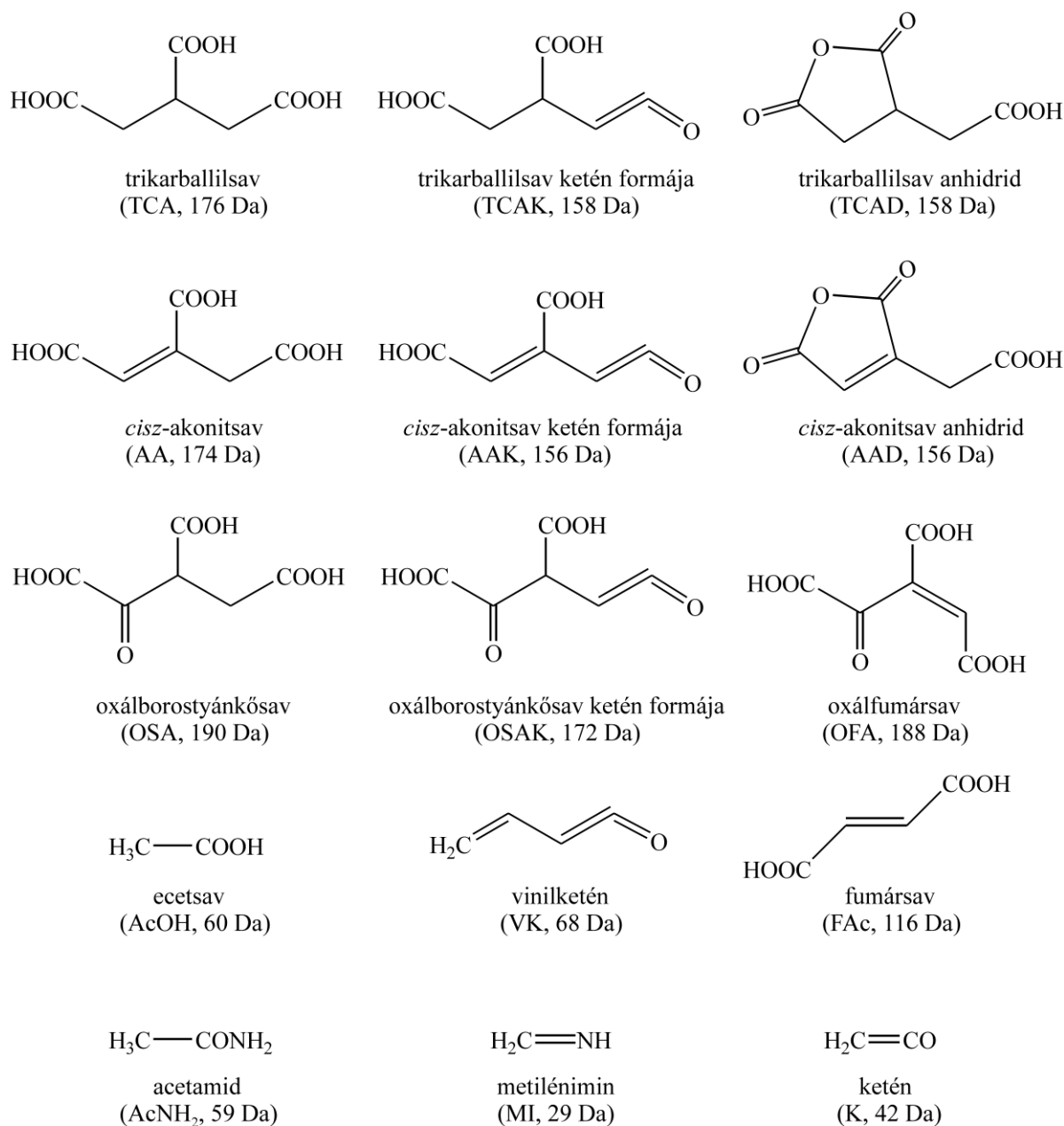
4.2.4. FBX analógok

Kétségtől, az ebben a vizsgálat sorozatban a *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészetből detektált új fumonizinek közül a legjelentősebbek az általunk FBX-nek elnevezett csoportba tartozó komponensek. Az FBX elnevezés arra utal, hogy az ebbe a csoportba tartozó komponensek szerkezete az FB analógokhoz hasonló, azzal a különbséggel, hogy esetükben a fumonizin alapvázon lévő OH-csoportok nem, vagy nemcsak a TCA-val képeznek észtereket, hanem a citrát-körben szereplő egyes karbonsavakkal (*cisz*-akonitsav (AA) és oxálborostyánkősav (OSA), 12. táblázat és 25. ábra), valamint az oxálfumársavval (OFA). Úgy gondoljuk, talán a későbbiekben olyan fumonizineket is sikerülhet azonosítani, amelyek a citrát-kör egyéb karbonsavait is tartalmazhatják (pl. citromsav, izo-citromsav). Eddig összesen 16 ilyen komponens sikerült azonosítani, köztük 4 izomert is (PHFB₄ OSA_{a-d}, Bartók és mtsai 2008). Az FBX analógok nevének végén lévő betűk (TCA, AA, OFA, OSA) jelzik, hogy a fumonizin vázon lévő OH-csoportok közül egyet vagy kettőt mely szerves savak észteresítik.

Jelentőségük miatt a 12. és 13. táblázatban szereplő összes FBX analóg CID-MS spektrumát bemutatom a 27. ábrán. A 26. és 28. ábrán az FB₄ 2AA toxin elméleti fragmentációs mintázata és feltételezett fragmentációs sémája látható. Mivel az FBX analógokban a TCA mellett más észterképző savak is vannak, a 13. táblázatban a CID fragmentáció során a molekulából kilépő savak SAV¹-el és SAV²-vel vannak jelölve. A SAV¹ és SAV² kihasadása általában egymás mellett és nem egymás után következett be.

Az FA, FB és FC típusú fumonizin analógoktól eltérően, pl. az FB₄ 2AA CID fragmentációját nemcsak a fentieknel bemutatott fragmentációs mintázat jellemzi, hanem az azonosított *m/z* értékű fragmentumok alapján CO₂ kihasadásával járó fragmentációs mintázat is felvázolható (26. és 28. ábra jobb oldala).

Az új FBX analógokkal sikerült igazolni Blackwell és mtsai (1996) feltételezését, miszerint a fumonizin vázon található trikarballil-csoportok a citrát-körből származnak. Egy-két enzimatis lépéssel a TCA az AA-ból, az OFA-ból és az OSA-ból is előállítható.

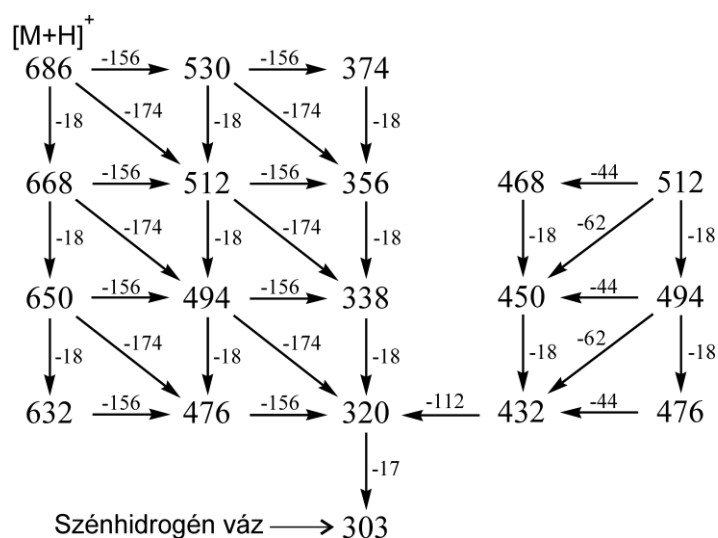


25. ábra. Az azonosított fumonizinek CID fragmentációja során képződő komponensek feltételezett szerkezete.

12. táblázat. A rizstenyészetben azonosított FBX analógok javasolt szerkezetei. A rövidítésekhez lásd a 25. ábrát (79. oldal).

Komponens		A fumonizin váz oldalláncai						
		a		b	c	d	e	f
1	PHFB ₄ AA	OH	↔	AA	H	H	H	OH
2	izo-PHFB ₄ AA	OH	↔	AA	H	H	H	OH
3	PHFB ₀ OSA	OH	↔	OSA	H	H	H	H
4	PHFB ₄ OFA	OH	↔	OFA	H	H	H	OH
5 ^a	PHFB _{2,3} OSA	OH	↔	OSA	H	H	H	OH
6	FB ₄ 2AA	AA		AA	H	H	H	OH
7 ^a	izo-FB ₄ 2AA	AA		AA	H	H	H	H
8	FB ₄ AA, TCA	AA	↔	TCA	H	H	H	OH
9 ^a	izo-FB ₄ AA, TCA	AA	↔	TCA	H	H	H	H
10 ^a	FB _{2,3} 2AA	AA		AA	H	H	H	OH
11,12 ^a	FB _{2,3} AA, TCA _{a,b}	AA	↔	TCA	H	H	H	OH
13,14,15,16	PHFB ₄ OSA _{a-d}	OH	↔	OSA	H	H	H	OH

^a Egy másik OH-csoport is van a fumonizin vázon; Az újonnan leírt fumonizinek neve vastagított



26. ábra. Az FB₄ 2AA toxin molekulaionja ([M+H]⁺) elméleti CID fragmentációs mintázata. Az átlós nyilak az AA (174 Da), a vízszintes nyilak az AAD és AAK (mindkettő 156 Da) valamint a CO₂ (44 Da) és a C₂H₂ + CO₂ (70 Da), míg a függőleges nyilak a H₂O (18 Da) illetve a CH₂CO (K, 42 Da) és az NH₃ (17 Da) kihasadását jelzik az FB₄ 2AA molekulából és izomerjeiből. A rövidítésekhez lásd a 25. ábrát.

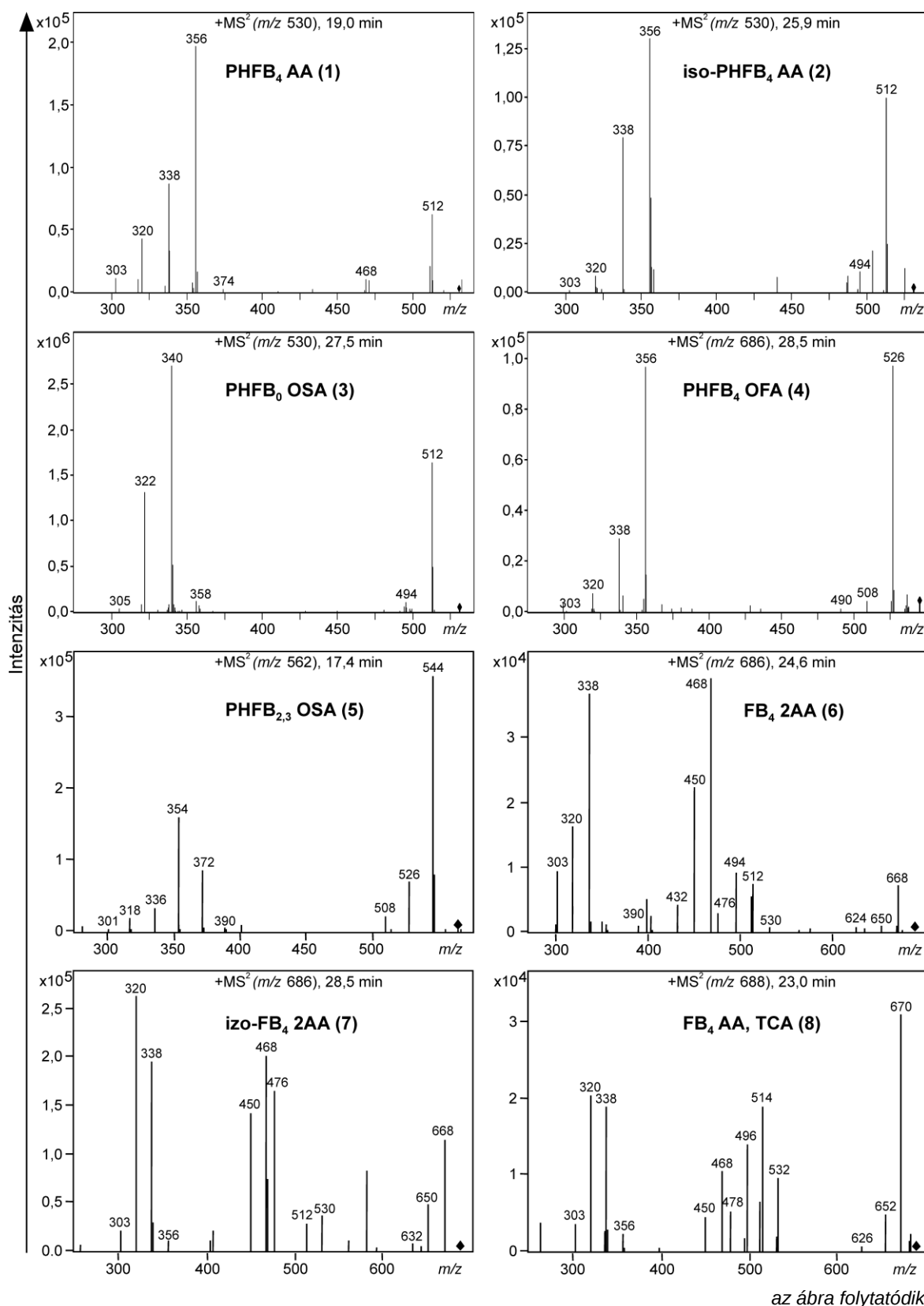
13. táblázat. Az FBX sorozatba tartozó fumonizinek RP-HPLC/ESI–ITMS eljárással kapott jellemző adatai. A rövidítéseket lásd a táblázat alatt.

Komponens	Retenció idő (min)	Relatív mennyiség az FB ₁ %-ában (FB ₁ = 100%)	A molekulaionok ([M+H] ⁺ és az azokból képződött termékionok m/z értékei és relatív abundanciáik (%))															
			[M+H] ⁺	[M+H - H ₂ O] ⁺	[M+H - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - H ₂ O - CO ₂] ⁺	[M+H - ACK ¹] ⁺	[M+H - SAV ¹] ⁺	[M+H - SAV ¹ - H ₂ O] ⁺	[M+H - SAV ¹ - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - SAV ¹ - 3H ₂ O] ⁺	[M+H - SAV ¹ - ACK ²] ⁺	[M+H - SAV ¹ - SAV ²] ⁺	[M+H - SAV ¹ - SAV ² - H ₂ O] ⁺	[M+H - SAV ¹ - SAV ² - 2H ₂ O] ⁺	[M+H - SAV ¹ - SAV ² - 2H ₂ O - NH ₃] ⁺ (Szénhidrogén váz)	
1 PHFB ₄ AA	19,0	0,3	530	512 (31)	494 (0)	476 (0)	468 (5)	374 (1)	356 (100)	338 (44)	320 (22)						303 (6)	
2 izo-PHFB ₄ AA	25,9	0,2	530	512 (18)	494 (36)	476 (0)	468 (0)	374 (0)	356 (100)	338 (61)	320 (6)						303 (1)	
3 PHFB ₀ OSA	27,5	4,1	530	512 (71)	494 (3)		468 (0)	358 (2)	340 (100)	322 (64)							305 (4)	
4 PHFB ₄ OFA	23,4	0,1	544	526 (100)	508 (36)	490 (0,5)	482 (0)		356 (100)	338 (30)	320 (7)						303 (0,3)	
5 PHFB _{2,3} OSA	17,4	0,3	562	544 (100)	526 (19)	508 (5)	500 (0)	390 (0,2)	372 (24)	354 (45)	336 (9)	318 (5)					301 (0,1)	
6 FB ₄ 2AA ^a	24,6	0,1	686	668 (18)	650 (2)	632 (1)	624 (1)	530 (1)	512 (18)	494 (23)	476 (8)		356 (2)	338 (94)	320 (41)		303 (24)	
7 izo-FB ₄ 2AA	28,5	1,2	686	668 (43)	650 (18)	632 (3)	624 (0)	530 (13)	512 (10)	494 (0)	476 (60)		356 (4)	338 (74)	320 (100)		303 (7)	
8 FB ₄ AA, TCA ^c	23,0	0,1	688	670 (100)	652 (15)	634 (0)	626 (2)	532 ^b (30)	514 (61)	496 (45)	478 (16)		356 (7)	338 (61)	320 (65)		303 (11)	
9 izo-FB ₄ AA, TCA	27,4	0,8	688	670 (64)	652 (20)	634 (0)	626 (0)	532 ^b (3)	514 (74)	496 (46)	478 (11)		356 (2)	338 (66)	320 (100)		303 (8)	
10 FB _{2,3} 2AA ^d	24,8	0,2	702	684 (100)	666 (42)	648 (10)	640 (1)	546 (7)	528 (7)	510 (15)	492 (25)	474 (16)	372 (3)	354 (43)	336 (76)	318 (32)	301 (12)	
11 FB _{2,3} AA, TCA ^a _a	22,8	0,2	704	686 (100)	668 (69)	650 (9)	642 (0)	548 (14)	530 (21)	512 (61)	494 (16)	476 (0)	372 (0)	354 (29)	336 (64)	318 (6)	301 (0,6)	
12 FB _{2,3} AA, TCA ^b _b	25,1	0,2	704	686 (62)	668 (42)	650 (14)	642 (0)	548 (7)	530 (70)	512 (100)	494 (18)	476 (22)	372 (5)	354 (29)	336 (61)	318 (77)	301 (2)	
13 PHFB ₄ OSA _a	23,8	0,1	546	528 (35)	510 (10)	492 (0,6)		374 (0,5)	356 (45)	338 (100)	320 (52)						303 (0,7)	
14 PHFB ₄ OSA _b	24,5	0,6	546	528 (56)	510 (21)	492 (0,5)		374 (0,4)	356 (45)	338 (100)	320 (58)						303 (0,4)	
15 PHFB ₄ OSA _c	25,6	0,1	546	528 (20)	510 (10)	492 (0,3)		374 (0,4)	356 (100)	338 (35)	320 (30)						303 (0,1)	
16 PHFB ₄ OSA _d	25,9	0,2	546	528 (24)	510 (5)	492 (0,6)		374 (0,5)	356 (77)	338 (100)	320 (19)						303 (0,8)	

SAV¹: AA (*cisz*-akonitsav **1, 2, 6-12**), OSA (oxálorostyánkősav **3, 5, 13-16**), OFA (oxálfumársav **4**); SAV²: TCA (trikarballilsav **8, 9, 11, 12**), AA (**6, 7, 10**);

ACK¹ (sav ketén formája): AAK (*cisz*-akonitsav ketén formája **1, 2, 6-12**), OSAK (oxálorostyánkősav ketén formája **3, 5, 13-16**); ACK²: AAK (**6, 7, 10**), TCAK (trikarballilsav ketén formája **8, 9, 11, 12**);

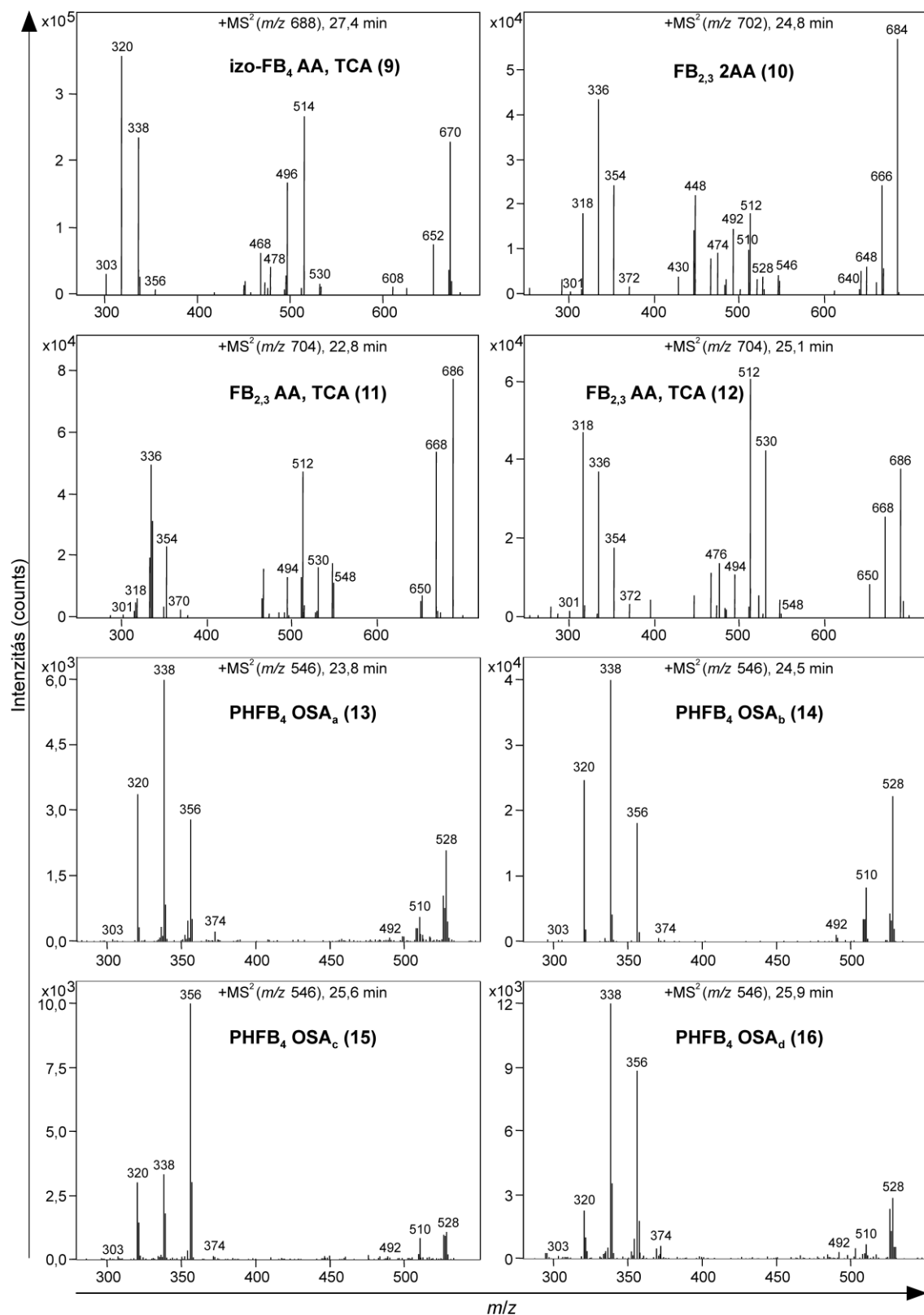
^a + m/z 468 (100), 450, 432, 424, 390 (lásd **(6)** a 26-28. ábrán); ^b + m/z 530; ^c + m/z 468, 450; ^d + m/z 512, 448, 430; ^e + m/z 546, 510, 370, 338, 334, 320

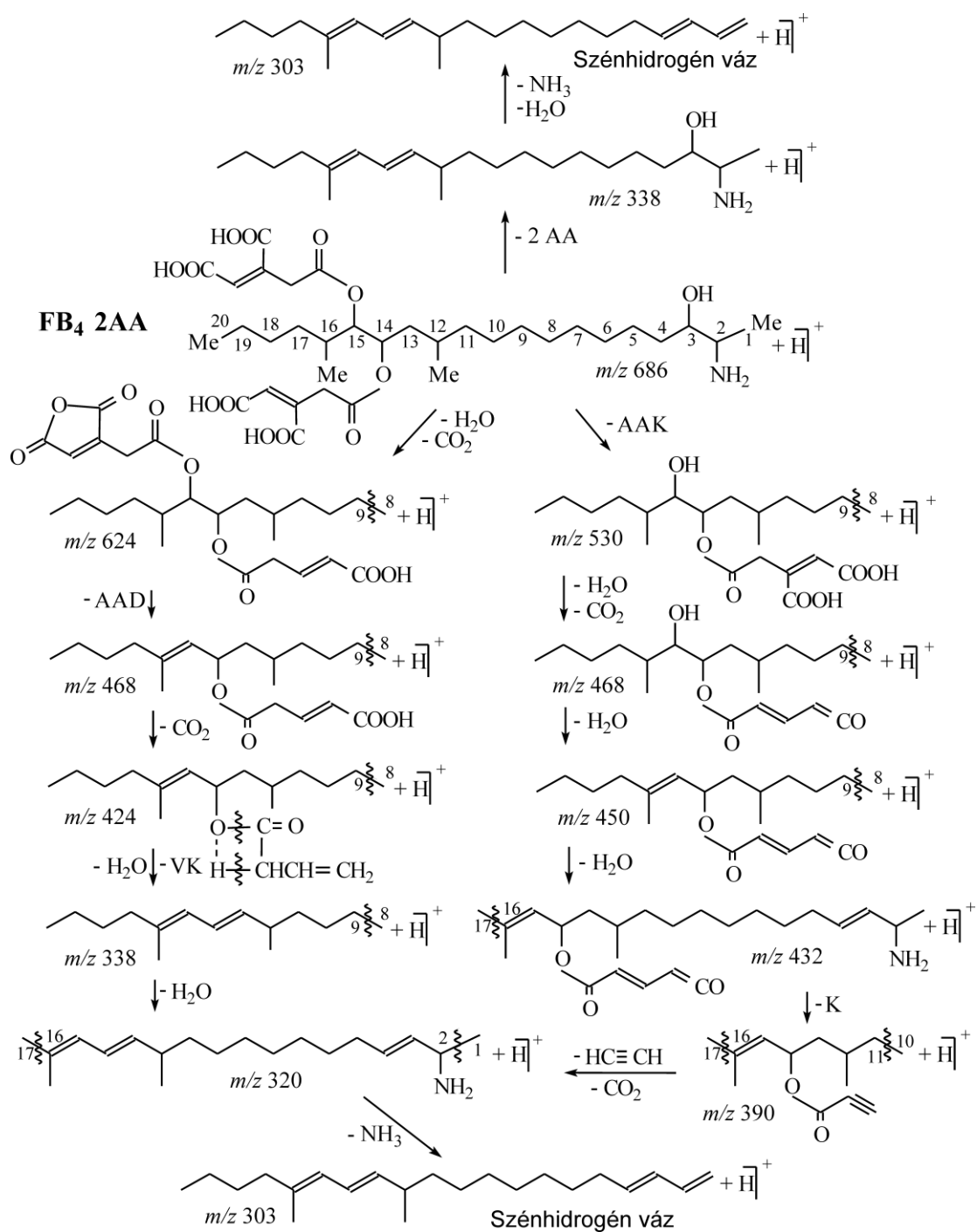


27. ábra. Az azonosított FBX analógok molekulaionjai ($[M+H]^+$) CID-MS spektrumai. A rövidítésekhez lásd a 25. ábrát (79. oldal).

dc_253_11

a 27. ábra folytatása,





28. ábra. Az FB₄ 2AA toxin molekulaionja és a CID fragmentáció során képződött néhány ion feltételezett szerkezete. A rövidítésekhez lásd a 25. ábrát (79. oldal).

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

4.3.1. FB₁ izomerek

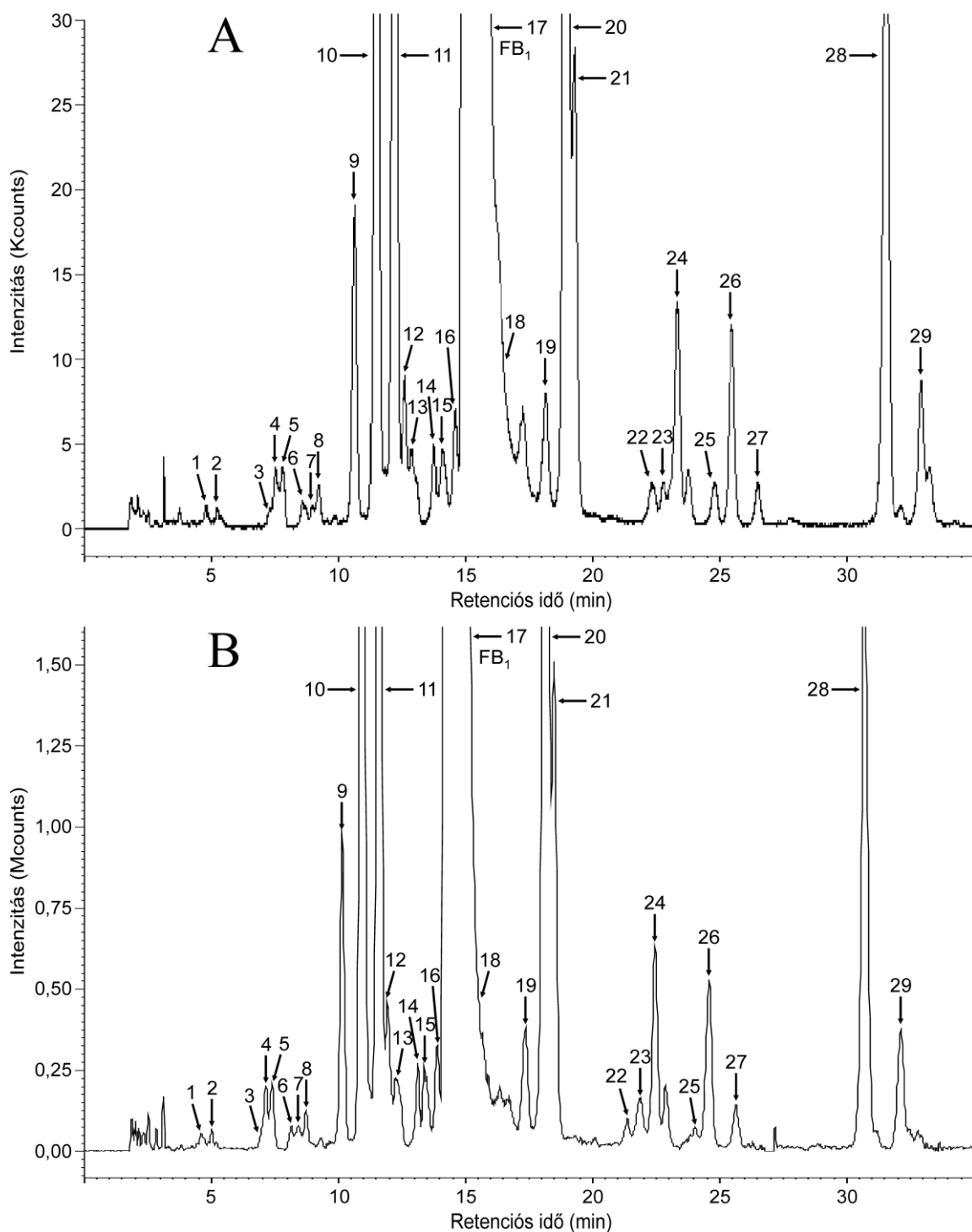
Megvásároltunk egy olyan HPLC oszlopot (YMC-Pack J'Sphere ODS H80, 250 x 2,1 mm, 4 µm), amely magas széntartalommal (22%) és alacsony H-kötő képességgel rendelkezik és amelyet a gyártó speciálisan szerkezeti izomerek elválasztására ajánlott. Ezzel a HPLC oszloppal és az igen érzékeny IT- és TOF analizátorral felszerelt tömegspektrométerekkel kívántuk megvizsgálni, hogy a *F. verticillioides* az eddig közöltekén kívül termel-e egyéb fumonizin izomereket is. YMC ODS oszlopon történő fumonizin elválasztást közöltek már korábban, de azon oszlopok töltetei alacsonyabb széntartalommal (14%) és magasabb H-kötő képességgel rendelkeztek, amelyek a mienknél meredekebb grádiens elválasztással együtt rosszabb csúcsfelbontást eredményeztek (Josephs 1996; Musser és Plattner 1997).

Az előzetesen nem tisztított biológiai minták HPLC elválasztása során igen fontos a HPLC oszlop élettartamának növelése céljából az előtétoszlop alkalmazása, amely egyrészt az esetlegesen a mintában található fizikai szennyeződések és az irreverzibilisen a HPLC oszlop töltetéhez kötődő komponenseket is megköti. Azonban leggyakrabban az előtétoszlopot valamilyen kapilláris (PEEK vagy SS) felhasználásával kötik az analitikai oszlophoz, ami extra holtterefogatot ad a rendszerhez csökkentve az egymáshoz közel eluálódó komponensek közötti csúcsfelbontást. Sokkomponensű biológiai minták (mint pl. a gombatenyészetből kivont fumonizin izomerek) analízisének különösen fontos, hogy a teljes kapilláris rendszer hosszát/terefogatát a lehető legminimálisabb értéken tartsuk, mivel a csúcsfelbontásra nemcsak az előtétoszlop és az analitikai oszlop közötti kapillárisnak, hanem az injektortól az előtétoszlopig és az analitikai oszlop végétől a detektorig (jelen esetben a tömegspektrométer ESI ionforrásának porlasztójáig) tartó kapillárisok holtterefogatának is dramatikus hatása van. Emiatt egybeépített előtétoszlop/analitikai oszlop rendszert és egy külön oszloptermosztátot alkalmaztunk. Az oszloptermosztátot pontosan a HPLC mintaadagoló injektor szelepe és a tömegspektrométerek ESI ionforrásának porlasztója közé helyeztük. A fumonizin izomerek HPLC elválasztásának kidolgozása során a grádiens paramétereit (kiindulási oldószer erősség, grádiens meredekség) is optimalizáltuk. Az előbb említett HPLC oszlop esetén az FB₁ izomerek elválasztása során a 24% MeCN/76% víz (+ 0,1% HCOOH) → 40% MeCN/60% víz (+ 0,1% HCOOH) grádiens, 79 perc alatt találtuk megfelelőnek. Fontos megjegyezni, hogy

ezzel az elválasztási rendszerrel, mások által még nem publikált felbontást sikerült elérnünk a fumonizin izomerek elválasztása során (Bartók és mtsai 2010a). Annak ellenére, hogy a pulzálást csökkentő egységet eltávolítottuk a TOFMS mérések során az Agilent 1200 típusú bináris HPLC pumpából, ennek a pumparendszernek a térfogata magasabb volt, mint az ITMS mérésekhez használt HP 1090 Series II típusú HPLC készülék DR5-ös oldószerszállító rendszeréé. Azonban, mint a 14. táblázatban is látható a HPLC/ESI–TOFMS és ITMS mérések során az FB₁ izomerekre kapott – az FB₁ toxin retenciós idejére vonatkoztatott – relatív retenciók nagyon hasonlóak voltak. A t₀ értéke és az FB₁ toxin retenciós ideje a TOFMS és ITMS mérések esetében 1,903 és 1,845 perc, valamint 14,932 és 14,529 perc volt. A minták injektálása előtt a HPLC készülékekben a 0,2 ml/perc áramlási sebesség és 40 °C oszloptermosztát hőmérséklet mellett a nyomásérték 110-115 bar volt.

A műtermékek képződésének minimalizálása céljából a rizstenyésztéskészült kivonatot minden további tisztítási lépés nélkül, közvetlenül analizáltuk a HPLC/ESI–TOFMS és ITMS készülékekkel. Közleményeinken kívül három kutatócsoport négy közleménye (Lemke és mtsai 2001; Frisvad és mtsai 2007; Senyuva és Gilbert 2008; Mogensen és mtsai 2010a) említi a pontos tömeg mérésére alkalmas TOFMS technikát a fumonizinek meghatározása során, azonban egyik csoport sem vizsgált ezzel az eljárással fumonizin izomereket. Vizsgálataink során a TOFMS készülékkel történő pontos tömegmérés után kapott extrahált ion kromatogram (EIC) egyértelműen jelezte a fő komponens (FB₁) mellett 28 FB₁ izomer jelenlétét a mintában (29A ábra). A készülék kiértékelő szoftvere (Mass Hunter) a pontos tömegadatok alapján mind a 29 (FB₁ + 28 izomerje) komponens esetén egyértelműen jelezte a C₃₄H₅₉NO₁₅ tapasztalati képletet. A molekulaionok ([M+H]⁺) tapasztalati képlete alapján számított pontos tömeg 722,3957 volt. A könnyebb összehasonlítás végett a TOFMS és ITMS adatokat egy táblázatban foglaltuk össze (14. táblázat). A HPLC/ESI–TOFMS mérés során elválasztott és azonosított FB₁ izomerek retenciós ideje, az FB₁ toxinra vonatkoztatott relatív retenciók, a mért pontos tömegértékek, valamint a számított és mért pontos tömegértékek közötti eltérés a 14. táblázat első felében található. Az FB₁ izomerek retenciós ideje 4,826 és 32,808 perc között, míg az FB₁-re vonatkoztatott relatív retenciójuk 0,224 és 2,372 között volt. A szerkezetazonosítási módszerekkel eddig vizsgált fumonizinek, köztük az FB₁ toxin és mindkét FB₁ izomer (MacKenzie és mtsai 1998; Mansson és mtsai 2010) esetében is a trikarballil-csoportok a C-14 és C-15 atomokon található. Mansson és mtsai (2010) közleményével kapcsolatban – amely a közleményünk (Bartók és mtsai 2010a) után jelent

meg – meg kell jegyezni, hogy az általuk *A. niger* tenyészetből izolált, NMR eljárással szerkezetazonosított, és FB₆-nak elnevezett komponens megegyezik a közleményünkben és a 29 A,B ábrán szereplő 28-as számú FB₁ izomerrel, amit igazolnak az *A. niger*-rel kapcsolatos vizsgálataink is (lásd 4.4. fejezetben, 111. oldal).



29. 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) nagyított extrahált ion kromatogramjai (EIC), amelyek az FB₁ toxint és izomerjeit mutatják.

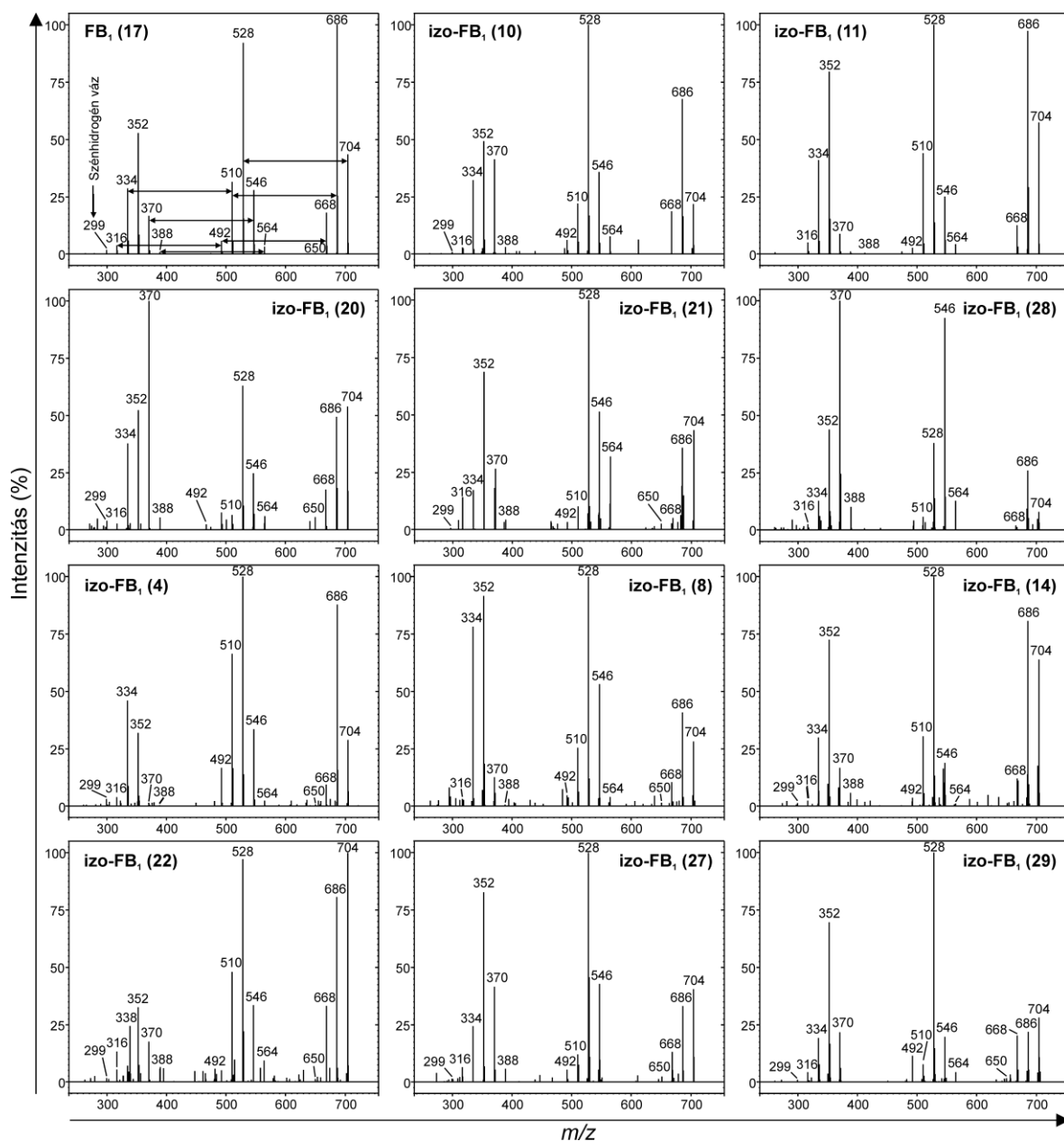
14. táblázat. Az FB₁ toxin és izomerjei RP-HPLC/ESI-TOFMS és RP-HPLC/ESI-ITMS eljárásokkal kapott jellemző adatai. A rövidítésekhez lásd a rövidítések jegyzékét és a 25. ábrát (79. oldal).

Komponens	Retenció idő (min, TOFMS)	Az FB ₁ -re vonatkoztatott relatív retenció (TOFMS)	Mért pontos tömeg ([M+H] ⁺ , TOFMS)	Tömegpontosság (ppm, TOFMS)	Retenció idő (min, ITMS)	Az FB ₁ -re vonatkoztatott relatív retenció (ITMS)	Relatív mennyiség az FB ₁ %-ában (ITMS)	A molekulaionból ([M+H] ⁺ , m/z 722) képződött termékionok relatív abundanciái (%)														
								[M+H – H ₂ O] ⁺ m/z 704	[M+H – 2H ₂ O] ⁺ m/z 686	[M+H – 3H ₂ O] ⁺ m/z 668	[M+H – 4H ₂ O] ⁺ m/z 650	[M+H – TCaK] ⁺ m/z 564	[M+H – TCa] ⁺ m/z 546	[M+H – TCa – H ₂ O] ⁺ m/z 528	[M+H – TCa – 2H ₂ O] ⁺ m/z 510	[M+H – TCa – 3H ₂ O] ⁺ m/z 492	[M+H – TCa – TCaK] ⁺ m/z 388	[M+H – 2TCa] ⁺ m/z 370	[M+H – 2TCa – H ₂ O] ⁺ m/z 352	[M+H – 2TCa – 2H ₂ O] ⁺ m/z 334	[M+H – 2TCa – 3H ₂ O] ⁺ m/z 316	[M+H – 2TCa – 3H ₂ O –NH ₃] ⁺ (Szénhidrogén váz) m/z 299
1	izo-FB ₁	4,826	0,224	722,3967	1,4	4,596	0,217	29,3	37,8	2,5	6,3	14,2	21,3	62,6	31,4	10,2	0,7	32,4	100	56,5	7,3	5,8
2	izo-FB ₁	5,268	0,258	722,3950	-1,0	5,019	0,250	41,2	67,5	8,6	2,4	6,3	47,0	100	34,7	7,5	2,1	18,7	86,1	24,1	1,3	3,9
3	izo-FB ₁	7,320	0,416	722,3949	-1,1	6,928	0,401	18,1	100	12,6	3,9	0,9	14,5	50,9	56,6	5,8	0	5,2	29,0	22,6	1,0	0,5
4	izo-FB ₁	7,542	0,433	722,3953	-0,6	7,149	0,418	28,8	87,9	9,4	0,8	6,1	25,9	100	90,6	10,7	3,7	3,2	60,1	61,3	2,7	2,4
5	izo-FB ₁	7,821	0,454	722,3953	-0,6	7,398	0,438	28,4	70,0	2,6	0,7	4,4	49,7	100	69,6	9,3	6,0	20,6	63,1	42,5	9,0	2,3
6	izo-FB ₁	8,609	0,515	722,3959	0,3	8,143	0,497	38,8	43,2	2,4	0,2	0,7	33,8	100	25,0	2,5	1,4	17,7	49,8	24,5	0,9	1,0
7	izo-FB ₁	8,980	0,543	722,3988	4,3	8,425	0,519	17,9	45,3	1,1	1,7	1,9	48,2	95,3	43,0	3,6	7,6	32,7	79,1	41,5	2,2	0
8	izo-FB ₁	9,189	0,559	722,3969	1,7	8,727	0,543	28,2	40,8	10,5	1,6	4,1	53,2	100	25,6	4,7	0,6	12,5	91,5	78,2	3,2	0
9	izo-FB ₁	10,645	0,671	722,3954	-0,4	10,157	0,655	29,3	65,9	8,6	0,1	5,9	23,4	100	27,0	1,6	1,1	8,7	49,8	37,8	1,4	1,1
10	izo-FB ₁	11,479	0,735	722,3947	-1,4	10,950	0,718	22,0	67,7	18,7	0,4	7,7	35,9	100	22,1	6,2	3,1	41,5	49,2	32,3	3,0	1,1
11	izo-FB ₁	12,184	0,789	722,3955	-0,3	11,615	0,770	57,5	97,3	12,6	0,6	4,4	25,2	100	44,1	2,7	1,1	8,9	79,7	41,0	5,1	0,1
12	izo-FB ₁	12,609	0,822	722,3956	-0,1	11,947	0,796	29,8	38,7	9,1	0,7	6,6	38,5	100	25,4	4,1	0,7	15,4	45,5	21,6	3,1	3,3
13	izo-FB ₁	12,868	0,841	722,3937	-2,8	12,278	0,822	22,4	31,2	7,3	1,2	1,7	82,6	100	18,9	1,3	0,1	19,0	87,4	43,7	1,9	1,5
14	izo-FB ₁	13,743	0,909	722,3948	-1,2	13,134	0,890	63,9	80,8	12,1	1,0	1,2	18,9	100	30,4	3,7	5,8	16,7	72,4	30,0	2,4	1,4
15	izo-FB ₁	14,090	0,935	722,3948	-1,2	13,401	0,911	53,5	100	18,3	1,1	12,3	39,5	63,6	51,1	3,2	2,7	24,4	77,0	33,0	4,8	1,6
16	izo-FB ₁	14,561	0,972	722,3947	-1,4	13,893	0,950	44,0	100	29,5	48,1	2,9	39,5	88,4	28,8	2,1	1,8	20,6	70,5	35,2	8,7	0,7
17	FB ₁	14,932	1,000	722,3958	0,1	14,529	1,000	43,6	100	18,1	0,4	3,3	28,0	92,2	31,5	5,7	0,9	16,7	52,9	28,7	3,9	1,9
18	izo-FB ₁	16,233	1,099	722,3948	-1,2	15,661	1,089	53,8	12,4	29,9	15,6	50,4	59,3	62,7	100	12,5	9,1	3,7	92,9	21,6	0	0,8
19	izo-FB ₁	18,102	1,243	722,3943	-1,9	17,348	1,222	27,8	45,5	29,2	4,9	7,3	57,6	100	26,9	3,5	13,7	36,5	37,6	30,7	14,6	0,8
20	izo-FB ₁	18,886	1,303	722,3950	-1,0	18,133	1,284	53,9	49,3	12,3	3,7	3,0	24,8	63	6,3	7,6	5,4	100	52,2	38,2	2,8	4,0
21	izo-FB ₁	19,261	1,332	722,3951	-0,8	18,496	1,313	43,3	5,4	3,7	2,4	31,9	51,5	100	13,0	3,2	4,3	18,2	68,6	17,2	16,9	2,9
22	izo-FB ₁	22,231	1,560	722,3947	-1,4	21,379	1,540	100	80,7	33,2	1,2	9,4	33,4	97,2	48,1	5,1	5,8	17,7	32,7	7,0	5,5	1,6
23	izo-FB ₁	22,731	1,599	722,3947	-1,4	21,847	1,577	39,8	99,7	33,5	3,9	1,2	50,4	100	42,3	12,5	3,2	24,0	56,7	36,9	6,5	0,5
24	izo-FB ₁	23,282	1,641	722,3961	0,6	22,446	1,624	47,1	53,7	22,3	1,4	7,7	29,5	100	15,4	12,2	8,8	49,4	94,3	29,0	32,0	1,7
25	izo-FB ₁	24,737	1,753	722,3957	0,0	24,071	1,752	31,0	100	35,0	1,1	8,9	40,4	38,2	17,2	5,8	9,2	3,0	4,2	6,5	2,0	4,1
26	izo-FB ₁	25,384	1,802	722,3956	-0,1	24,591	1,793	51,0	20,7	0,8	1,7	1,3	40,7	100	15,2	2,9	0,8	21,9	61,2	11,7	1,9	4,1
27	izo-FB ₁	26,410	1,881	722,3954	-0,4	25,632	1,875	40,5	33,2	13,2	0	8,1	42,8	100	12,1	5,5	5,8	41,5	82,7	24,4	6,5	1,4
28	izo-FB ₁	31,398	2,264	722,3960	0,4	30,703	2,275	8,0	1,3	26,1	0	12,7	92,5	38,0	5,8	0,1	10,2	100	43,9	12,7	2,7	0
29	izo-FB ₁	32,808	2,372	722,3965	1,1	32,148	2,389	28,1	21,9	20,3	1,6	5,0	19,8	100	7,7	11,4	0,3	21,7	69,6	19,2	4,3	0,9

A *F. verticillioides* által fertőzött rizstenyészeti kivonatból általunk azonosított 28-as jelzésű FB₁ izomer – FB₁ toxinra vonatkoztatott – relatív retenciója megegyezik a kísérleteink során az *A. niger* kivonatokból azonosított FB₁ izomer relatív retenciójával. Munkánk során detektált számos FB₁ izomer széles retenciós idő tartománya miatt Josephs-hez (1996) hasonlóan – aki két FB₁ izomert azonosított – feltételezhető, hogy az acil-csoportok nemcsak a C-14 és C-15 atomokon találhatók. Ennek igazolásához a legnagyobb mennyiségben a mintákban található FB₁ izomereket izolálni és NMR módszerrel szerkezetüket meghatározni szükséges. Két izomer (7 és 12) kivételével a tömegpontosság 0,1 és 1,7 ppm között változott.

A következőkben az FB₁ izomerek HPLC/ESI-ITMS mérésekor kapott eredményeket ismertetem. Mint a 29B ábrán jól látható a 28 FB₁ izomert az ITMS eljárással is sikerült detektálni, sőt az izomerekre jellemző CID-MS spektrumot is felvenni, amely spektrumok közül 12 látható a 30. ábrán. Hasonlóan a TOFMS adatokhoz, a komponensekre jellemző számszerű adatok – beleértve a retenciós időt, az FB₁-re vonatkoztatott relatív retenciót és relatív mennyiséget és a diagnosztikus jelentőséggel bíró CID-MS fragmentumokat – a 14. táblázat második felében láthatók. A HPLC/ESI-ITMS mérések során kapott retenciós idők az oldószerszállító rendszer kisebb térfogata miatt alacsonyabbak voltak, mint a TOFMS mérések esetében. Az izomerek retenciós ideje és FB₁ toxinra vonatkoztatott relatív retenciója 4,596 és 32,148 perc, valamint 0,217 és 2,389 között volt. Az előzőekben már bemutatott 16. ábrán (66. oldal) és a 30. ábrán is jól látható, hogy a molekulaionok CID-MS spektruma alapján a fumonizinek viszonylag könnyen azonosíthatók. Az FB₁ toxin és izomerjei esetében a molekulaionból ([M+H]⁺) történő vízvesztések vezetnek az 704, 686 és 668-as *m/z* értékekhez. A 650-es *m/z* értéknek különös jelentősége van, mivel ez az érték egy további vízmolekula kilépését jelenti a megfelelő fragmentumokból és ugyanakkor csak három OH-csoport található az FB₁ molekulában és izomerjeiben. Sőt, néhány izomer esetében a CID-MS spektrumban az 532-es *m/z* érték is megfigyelhető volt, ami egy ötödik vízmolekula kilépésére utal. A negyedik és ötödik vízmolekula – anhidrid képződése közben – csak a trikarballil-csoportokból léphet ki. Ezek az adatok igazolják, hogy a TCA (176 Da) nemcsak egyben, hanem részletekben is kiléphet a molekulából, víz (18 Da) és TCAD (158 Da) formájában. A TCA kihasadása a molekulából ketén formájukban (TCAK = 158 Da) az *m/z* 564-es értéknél és a TCAK + víz kilépése révén az *m/z* 546-os értéknél is megfigyelhető volt. Ugyanezt az *m/z* értéket kapjuk, amikor a TCA fumsav (116 Da) + ecetsav (60 Da) formájában lép ki a molekulából. Az *m/z* 546-os kationból további vízmolekula kilépések vezetnek az *m/z* 528, 510 és 492-es kationokhoz.

Egy molekula TCA és TCAK kihasadása vezet az m/z 388-as kationhoz, majd az ebből történő további vízmolekula kilépések révén jutunk el az 370, 352 és 334-es m/z értékű kationokhoz. Legvégül a primer amino-csoport kilépése révén jutunk el az m/z 299-es értékű kationhoz, a szénhidrogén vázhoz.



30. ábra. Az FB₁ toxinnak (17), továbbá a kiválasztott öt jelentősebb mennyiségű (10, 11, 20, 21 és 28-as számú izomerek) és hat kisebb mennyiségben megtalálható (4, 8, 14, 22, 27 és 29-es számú izomerek) vegyület molekulaionjainak ($[M+H]^+$, m/z 722) RP-HPLC/ESI-ITMS eljárással felvett termékion tömegspektrumai (CID-MS). A kettős nyilak a 176 Da tömegkülönbséget (egy TCA molekula kihasadása) jelzik a szomszédos termékion csoportok megfelelő ionjai között.

Mint az előzőekben már említettem, a szénhidrogén váz m/z értéke diagnosztikus jelentőségű a fumonizinek azonosítása során, mivel minden egyes oldallánc (TCA, OH, NH_2) molekulából történő kilépése egy kettős kötést hagy vissza a szénláncon, azaz a szénhidrogén váz m/z értéke megmondja, hogy eredetileg mennyi TCA, OH-csoport és egyéb funkciós csoport (pl. NH_2) volt jelen eredetileg a molekulán.

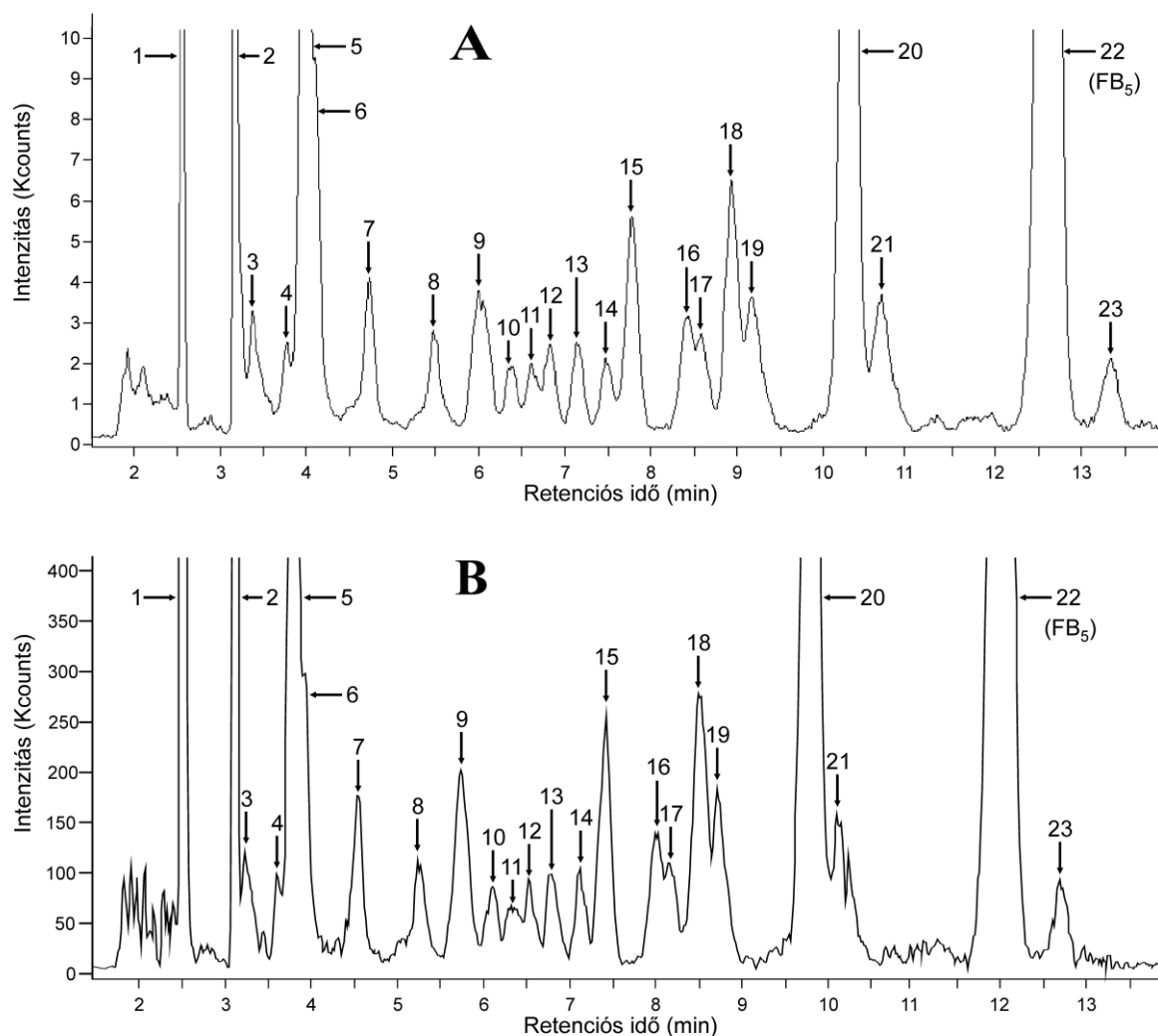
A vizsgált *F. verticillioides* izolátum által fertőzött rizstenyészetben – a tenyésztési körülmények optimalizálása után – 18,27 mg/g FB_1 toxint sikerült kimutatni, ami egyezést mutat az irodalomban megtalálható legjobb fumonizin-termelőképeséssel rendelkező izolátumokkal (Alberts és mtsai 1990). Az FB_1 izomerek FB_1 -tartalomra vonatkoztatott relatív mennyisége 0,001 és 0,579% között volt. Az izomerek összmennyisége az FB_1 -tartalom 2,803%-a volt. Az izomerek közül három fordult elő viszonylag nagyobb mennyiségben (0,579%, 0,495% és 0,460%), amely adatok is a 14. táblázatban láthatók.

4.3.2. FB_5 izomerek

Korábbi munkánkban egy kevésbé érzékeny ITMS készülékkel, egy másik HPLC oszloppal és egy meredekebb gradiens HPLC elválasztással négy új FB_5 izomert azonosítottunk (lásd a 4.2.1. fejezetben a 65. oldalon) a *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészetből (Bartók és mtsai 2006). Az előző fejezetben már leírt – a szerkezeti izomerek elválasztására javasolt – előtétoszloppal egybeépített HPLC oszloppal és igen érzékeny tömegspektrométerekkel további 18, összesen 22 FB_5 izomert sikerült azonosítanunk (Bartók és mtsai 2011a). Az FB_5 toxinról és izomerjeiről HPLC/ESI–TOFMS és ITMS eljárásokkal kapott mérési adatait részletezem az alábbiakban.

Az FB_5 toxin tapasztalati képletéből ($\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{16}$) következően molekulaionja ($[\text{M}+\text{H}]^+$) számított pontos tömege 738,3907. A TOFMS mérés segítségével ennél az m/z értéknél az FB_5 toxint és 22 izomerjét detektáltuk (31A ábra). A könnyebb megértés és összehasonlítás miatt az FB_5 toxin és izomerjei RP-HPLC/ESI–TOFMS és ITMS mérése során kapott részletes adatok egy táblázatban láthatók (15. táblázat). Az FB_1 toxinhoz és izomerjeihez hasonlóan (4.3.1. fejezet, 85. oldal) az FB_5 toxin retenciós idejénél (12,605 min) alacsonyabb és magasabb retenciós idővel rendelkező izomereket is detektáltunk (2,530–15,933 min). Az FB_5 izomerek FB_1 toxinra vonatkoztatott relatív retenciója 0,048 és 1,077 között változott. Az izomerek viszonylag nagy számát és tág retenciós idő tartományukat figyelembe véve az FB_5 izomerek esetében is feltételezhető, hogy szerkezetük igen eltérő lehet, azaz a TCA molekulák nemcsak a C-14 és C-15 atomokon elhelyezkedő OH-csoportokat észtereshíthetik, mint ahogy az eddig szerkezetileg

azonosított fumonizineknél leírásra került (3. ábra, 13. oldal). Az FB₅ toxin és izomerjei tömegpontossága 0,1 és 2,0 ppm között volt, kivéve néhány komponenst (5, 8, 9, 11 és 15), amelyeknél a tömegpontosság -3,0; 3,8; 4,1; -4,9 és 2,6 ppm értéket ért el. Az FB₁ izomerekhez hasonlóan az új FB₅ izomerek leírása is igazolta a pontos tömeg mérésére alkalmas ESI–TOFMS eljárás hasznosságát az új fumonizin izomerek azonosítása során.



31. ábra. *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészet kivonatának RP-HPLC/ESI–TOFMS (A; m/z 738,3907) és RP-HPLC/ESI–ITMS (B; m/z 738) nagyított extrahált ion kromatogramjai (EIC), amelyek az FB₅ toxint és izomerjeit mutatják.

Az FB₅ toxin és 22 izomerje jelenlétét az RP-HPLC elválasztást követően ESI–ITMS és MS² eljárásokkal is sikerült igazolnunk (31B ábra). Az ITMS és MS² eljárásokkal kapott jellemző adatok (retenciós idő, FB₁ toxinra vonatkoztatott relatív retenció, FB₁ toxinra vonatkoztatott relatív mennyiség, a molekulaionok MS² spektrumának jellemző fragmensionjai és azok relatív abundancia értékei a 15. táblázat második felében láthatók.

15. táblázat. Az FB₅ toxin és izomerjei RP-HPLC/ESI-TOFMS és RP-HPLC/ESI-ITMS eljárásokkal kapott jellemző adatai. A rövidítésekhez lásd a rövidítések jegyzékét és a 25. ábrát (79. oldal).

Komponens	Retenció idő (min, TOFMS)	Az FB ₁ -re vonatkoztatott relatív retenció (TOFMS)	Mért pontos tömeg ([M+H] ⁺ , TOFMS)	Tömegpontosság (ppm, TOFMS)	Retenció idő (min, ITMS)	Az FB ₁ -re vonatkoztatott relatív retenció (ITMS)	Relatív mennyiség az FB ₁ %-ában (ITMS)	A molekulaionból ([M+H] ⁺ , m/z 738) képződött termékionok relatív abundanciái (%)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
								[M+H – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – 6H ₂ O] ⁺	[M+H – 7H ₂ O] ⁺	[M+H – 8H ₂ O] ⁺	[M+H – 9H ₂ O] ⁺	[M+H – 10H ₂ O] ⁺	[M+H – 11H ₂ O] ⁺	[M+H – 12H ₂ O] ⁺	[M+H – 13H ₂ O] ⁺	[M+H – 14H ₂ O] ⁺	[M+H – 15H ₂ O] ⁺	[M+H – 16H ₂ O] ⁺	[M+H – 17H ₂ O] ⁺	[M+H – 18H ₂ O] ⁺	[M+H – 19H ₂ O] ⁺	[M+H – 20H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – 2TCA] ⁺	[M+H – TCA – TCAC] ⁺	[M+H – TCA – 5H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 4H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 3H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA – H ₂ O] ⁺	[M+H – TCA] ⁺	[M+H – TCAC] ⁺	[M+H – 2TCA – 4H

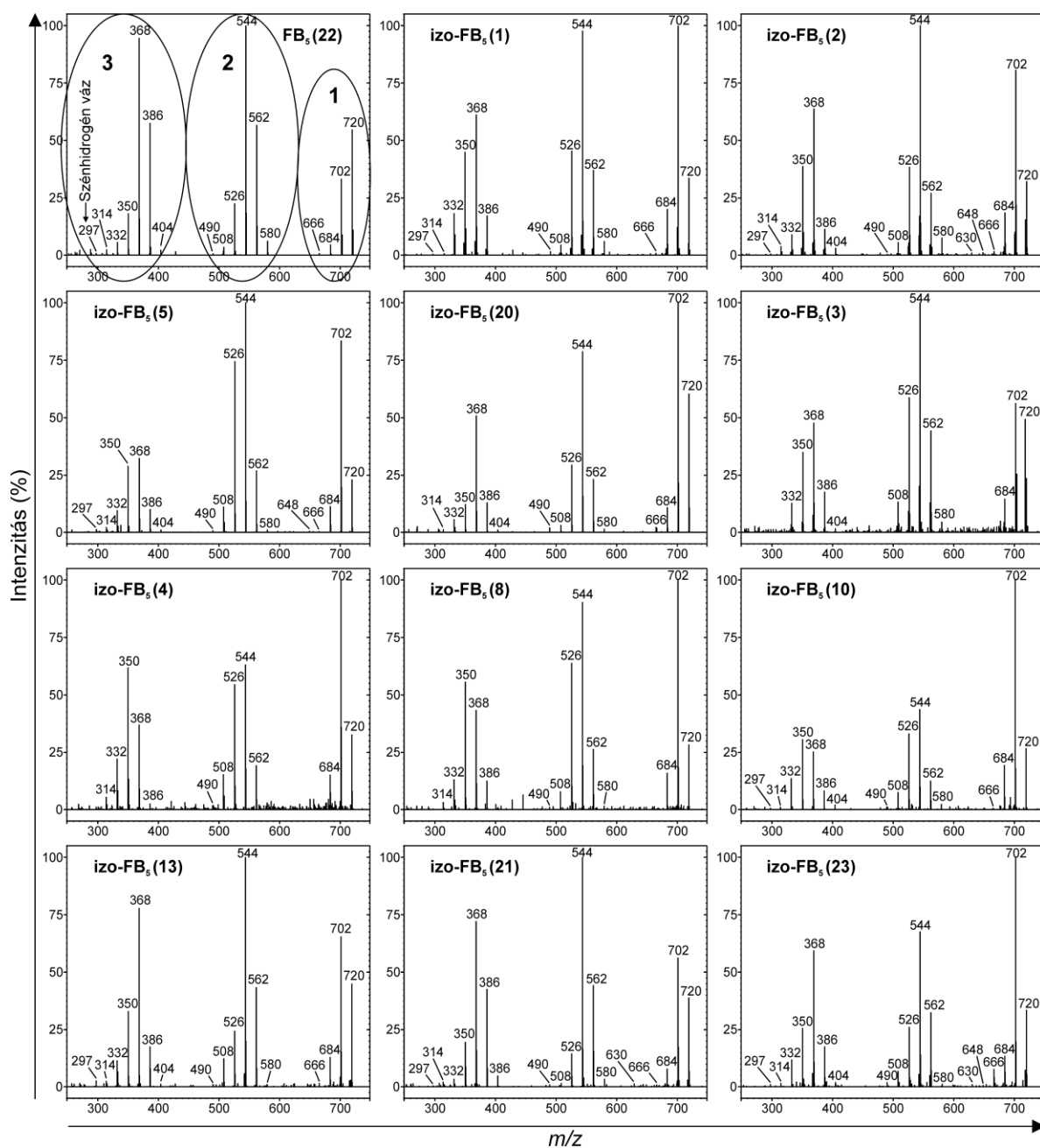
Az izomerek retenciós ideje és az FB₁ toxinra vonatkoztatott relatív retenciója 2,481 és 15,281 perc, valamint 0,050 és 1,059 között változott.

Az FB₅ izomerek az eddig leírtakhoz hasonlóan könnyen azonosíthatók a karakterisztikus CID-MS spektrumuk alapján, mint a 32. ábrán is látható. A többi FB analóghoz hasonló elméleti fragmentációs mintázat rajzolható fel az FB₅ toxinra és izomerjeire is (33. ábra). A fumonizinek kémiai szerkezetéből következik, hogy az összes lehetséges fragmentációs útvonal aktiválási energiája hasonló (Josephs 1996) és a CID fragmentáció során különböző szerkezetek egyforma m/z értéket is eredményezhetnek. Mint a 15. táblázatban is jól látható, összesen 20 fragmentum volt megfigyelhető az FB₅ toxin és izomerjei CID-MS spektrumában. Az előzőekben az FB₁ izomereknél már leírt fragmentációs mechanizmus vázolható fel azzal a különbséggel, hogy az FB₅ toxin és izomerjei esetében a molekulákon eggyel több OH-csoport található, ami a fragmentációjuk során – jól láthatóan – egy plusz vízmolekula kilépésével jár együtt.

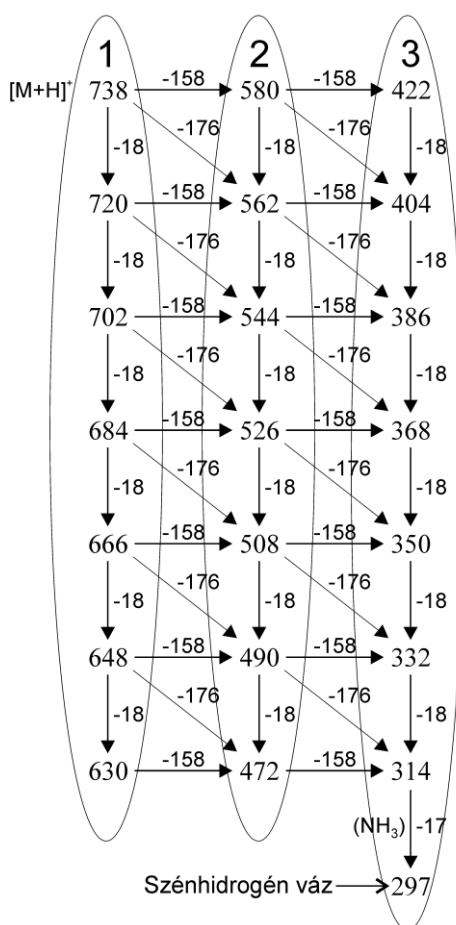
A molekulaiionból ($[M+H]^+$, m/z 738) hat molekula víz vesztese (négy molekula víz az OH-csoportok kihasadása, míg két molekula víz a TCA-csoportokból TCAD képződése közben) vezet az m/z 720, 702, 684, 666, 648 és 630-as kationokhoz. A TCA kilépése ketén formájában (TCAK=158 Da, TCAK + H₂O=176 Da) is megfigyelhető volt, amely kihasadások eredményezték az m/z 580 és m/z 562-es kationokat. Az m/z 404-es kation egy molekula TCA és TCAK molekulaiionból történő kilépésének eredménye, amelyből vízkilépések révén jutunk el az m/z 386, 368, 350, 332 és 314-es kationokhoz. Természetesen az m/z 386-os kation úgy is kialakulhat, hogy a molekulaiionból a két TCA molekula egyszerre hasad ki.

A CID folyamat végén az ammónia (17 Da) kihasadása után, m/z 297-es értékkel a diagnosztikus jelentőségű szénhidrogén váz marad vissza. Itt szeretnék utalni arra, hogy az FB₁ toxin és izomerjei MS² spektrumában a szénhidrogén váz m/z értéke 299 volt, ami jelzi, hogy a molekulájukban eredetileg eggyel kevesebb OH-csoport volt jelen, azaz a CID fragmentáció végén eggyel kevesebb kettős kötés maradt vissza a szénhidrogén vázon, ami a kettővel magasabb m/z értéket eredményezte. A legtöbb FB₅ izomer esetében a termékion spektrumban a szénhidrogén váz m/z értéke is megfigyelhető volt, amelyek abundancia aránya 0,2 és 3,5% között változott. A rizstenyészet kivonatban az FB₅ toxin és izomerjei FB₁ toxinhoz viszonyított relatív mennyisége 0,001-0,304% között változott. Teljes mennyiségük az FB₁ toxin 0,928%-a volt, amely akár jelentősnek is tűnhet, ha figyelembe vesszük, hogy toxicitásuk jelenleg ismeretlen. Az FB₅ toxin és izomerjei közül öt komponens (1, 2, 5, 20 és 22) fordult elő viszonylag nagyobb mennyiségben (0,050%,

0,171%, 0,076%, 0,162% és 0,304%) a kivonatban (15. táblázat). Ezen öt vegyület esetén nyílik a legjobb lehetőség a szerkezetvizsgálathoz szükséges mennyiségű és minőségű anyag előállítására.



32. ábra. Az FB₅ toxin (22), továbbá a kiválasztott négy jelentősebb (1, 2, 5 és 20-as jelzésű komponensek) és hét kisebb mennyiségben megtalálható (3, 4, 8, 10, 13, 21 és 23-as jelzésű komponensek) izomerje molekulaionjainak ($[M+H]^+$, m/z 738) RP-HPLC/ESI-ITMS eljárással felvett termékion tömegspektrumai. Az oválisok az FB₅ toxin molekulaionja CID-MS spektrumában a két acil-csoportot (itt TCA) tartalmazó fumonizinekre jellemző három fragmension csoportot jelzik.



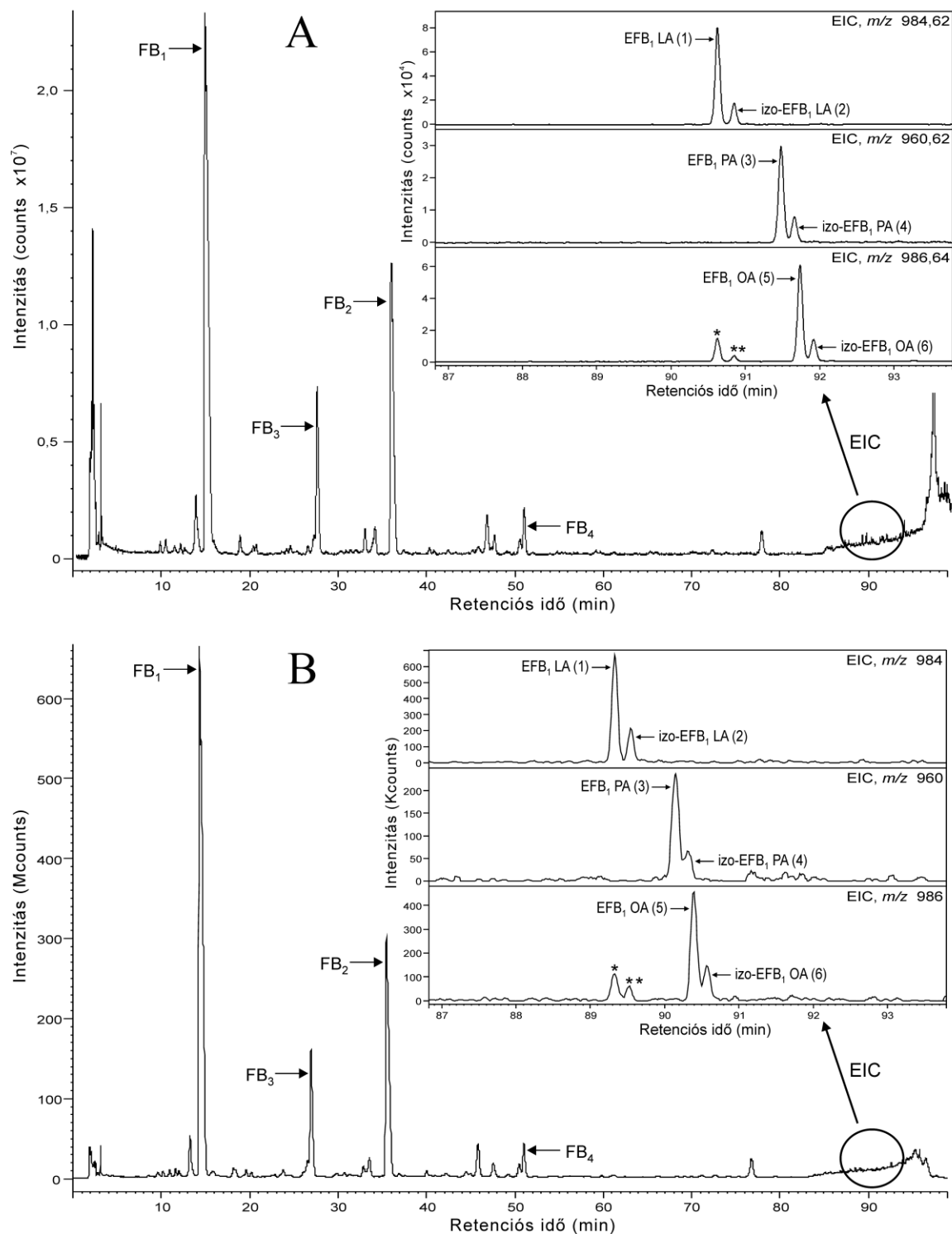
33. ábra. Az FB₅ toxinra és izomerjeire jellemző elméleti fragmentációs utak. Az átlós nyilak a TCA (176 Da), a vízszintes nyilak a TCAK (158 Da), míg a függőleges nyilak a H₂O (18 Da) és az NH₃ (17 Da) kihasadását jelzik az FB₅ toxin molekulaionjából és fragmensionjaiból (a rövidítésekhez lásd a 25. ábrát a 79. oldalon). Az oválisok az FB₅ toxin CID-MS spektrumában (32. ábra) is jelzett fragmension csoportokat mutatják.

4.3.3. Három acil-csoportot tartalmazó fumonizinek azonosítása

Mivel a fumonizinek molekulaionjai CID-MS spektruma igen jellemző a fumonizinekre, már a meredekebb grádiens elválasztást alkalmazó RP-HPLC/ESI-ITMS vizsgálataink során felfigyeltünk arra, hogy a rizstenyészet kivonatok tartalmaznak azonosítatlan, magasabb molekulatömegű fumonizineket is. Az alkalmazott meredekebb grádiens HPLC elválasztás során ezek az ismeretlen fumonizinek közel 100% MeCN-nel (0,1% HCOOH-val kiegészítve) eluálódtak a C18-as állófázist tartalmazó HPLC oszlopról, jelezve, hogy ezek a komponensek az addig közölt fumonizineknél jóval apolárisabbak. Az MS² spektrumban található fragmensionok *m/z* értéke (beleértve a szénhidrogén váz 299-es *m/z* értékét is) egyértelműen jelezte, hogy a magas molekulatömegű fumonizinek szerkezete az FB₁ toxinéhoz hasonló, kivéve azt, hogy további funkciós csoport is található

a molekulájukban. Feltételeztük, hogy az új szubsztituensek a fumonizin váz szabad OH-csoportjait észterestítő olyan szerves savak lehetnek, amelyeket még fumonizinek esetében nem közöltek. Akkor még az ITMS műszerünkkel – amely a többi ITMS készülékhez hasonlóan pontos tömeg meghatározására nem volt alkalmas – nem tudtuk azonosítani az új fumonizineket. Az előzetes ITMS vizsgálatok viszont amellett, hogy az új fumonizinek FB₁-szerű szerkezete azonosítható volt, egyértelműen megadták a molekulaionok $[M+H]^+$ m/z értékét (960, 984, 986) a 2-2-2 izomer esetében.

Az FB₁ izomerek azonosítása során már sikeresen alkalmaztuk (Bartók és mtsai 2010a) a pontos tömeg mérésére képes ESI–TOFMS készüléket, így jó esélyt láttunk arra, hogy ez a műszer képes lesz azonosítani az eddig közöltekénél magasabb molekulatömegű fumonizineket is. A rizstenyészet kivonat kevésbé meredek grádiens alkalmazó RP-HPLC/ESI–TOFMS és ITMS módszerrel – a tömegspektrométerek pásztázó üzemmódjában – történő analízise után a műszerek adatfeldolgozó szoftverei ábrázolták a totálion kromatogramokat, amelyeken a fő komponenseken (FB₁₋₄) kívül a kis mennyiségben jelenlévő fumonizinek nem látszottak (34A és B ábra). A TOFMS EIC kromatogramok (34A ábra nagyított része) és az ITMS EIC kromatogramok (34B ábra nagyított része) azonban, egyértelműen mutatták a 6 (2-2-2 izomer) új magas molekulatömegű fumonizin izomert a 90,623-91,928 és 89,324-90,569 retenciós idő tartományban három különböző m/z érték mellett. Az egységnyi felbontással rendelkező ioncsapdás tömegspektrométer „csak” azt jelezte, hogy az új fumonizinek molekulaionjai m/z értéke 960,4, 984,4 és 986,4. A TOFMS készülék szoftvere azonban a molekulaionok öttizedes pontossággal mért m/z értékei (16. táblázat) alapján javaslatot tett a kérdéses fumonizinek tapasztalati képletére (protonálatlan): C₅₀H₈₉NO₁₆; C₅₂H₈₉NO₁₆ és C₅₂H₉₁NO₁₆. A javasolt tapasztalati képletek alapján a szoftver a molekulaionokra $[M+H]^+$ a következő pontos tömegértékeket számolta ki: 960,6254; 984,6254 és 986,6411. A javasolt tapasztalati képletekből kivonva az FB₁ toxin tapasztalati képletét (C₃₄H₅₉NO₁₅) és ehhez hozzáadva a H₂O-t, amely feltehetően a fumonizin vázon lévő egyik OH-csoport és a harmadik szerves sav molekula között lejátszódó észterezési reakció során lépett ki, megkaptuk az új fumonizinek esetében a fumonizin váz adott OH-csoportjait észterestítő harmadik szerves savak tapasztalati képletét: C₁₆H₃₂O₂ (palmitinsav, PA), C₁₈H₃₂O₂ (linolsav, LA) és C₁₈H₃₄O₂ (olajsav, OA). A fumonizin irodalomban jelenleg alkalmazott elnevezéseket (pl. FB₁; PHFB₁ = részlegesen hidrolizált FB₁; HFB₁ = hidrolizált FB₁) figyelembe véve az új fumonizineket észterezett FB₁ toxinoknak (EFB₁) neveztük el (Bartók és mtsai 2010b).



34. ábra. *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészet kivonatának RP-HPLC/ESI-TOFMS (A; EIC, m/z 984,62; 960,62 és 986,64) és RP-HPLC/ESI-ITMS (B; EIC, m/z 984; 960 és 986) totálion és extrahált ion (EIC) kromatogramjai. A nagyított EIC ábrák az új észterezett FB_1 (EFB_1) izomereket mutatják. Megjegyzések: mindkét EIC ábrán a $\star, \star\star$ jelek az EFB_1 LA (1) és $izo-EPB_1$ LA (2) $X+2$ -es izotópjainak a csúcsait jelzik. Az ábrán nem látható, de az $X+2$ -es izotópok a másik négy komponens esetében is megfigyelhetők voltak (m/z 962 és 988 értékeknél).

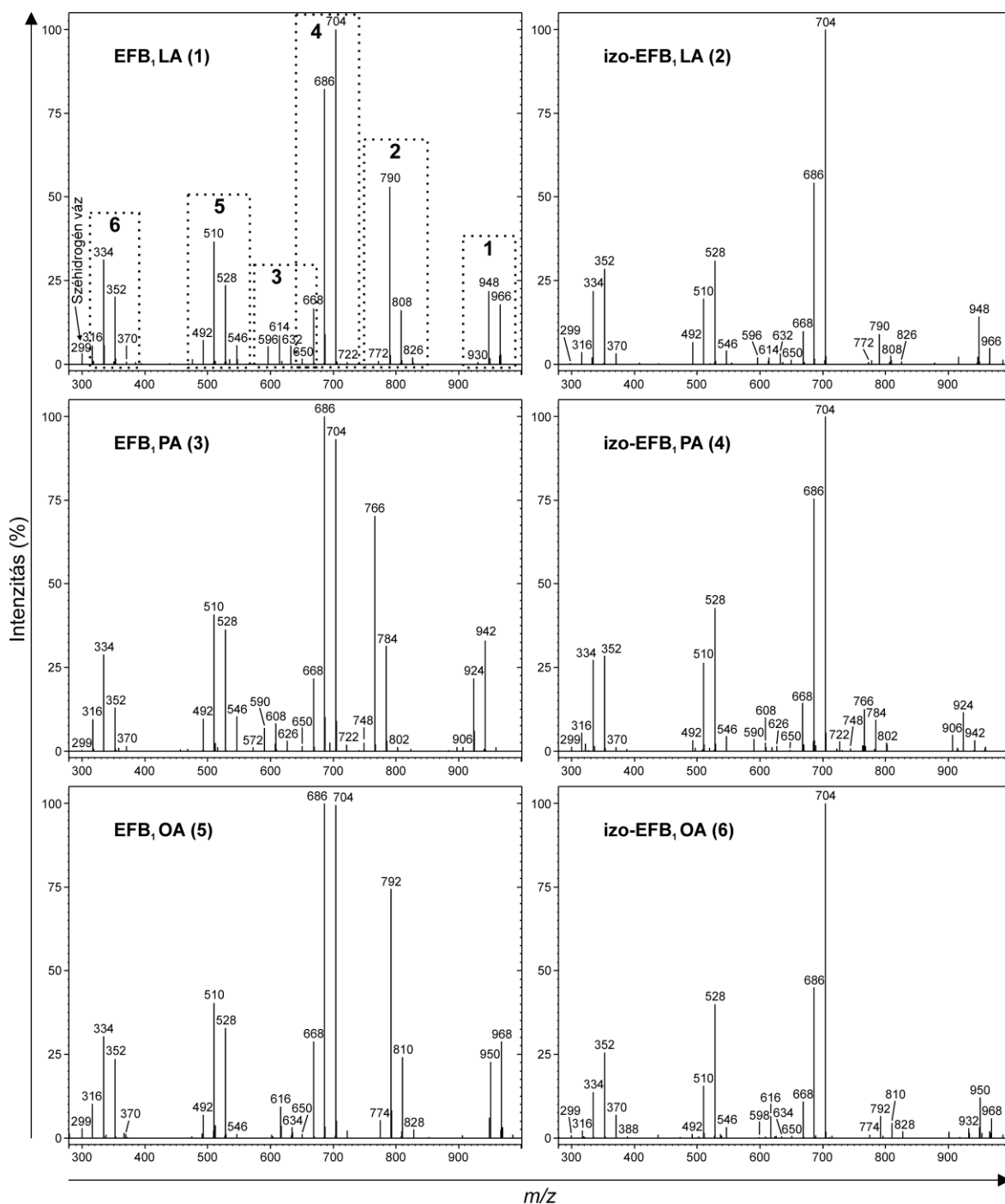
16. táblázat. Az EFB₁ izomerek RP-HPLC/ESI–TOFMS eljárással kapott jellemző adatai.

Komponens neve	Retenció idő (min)	Az FB ₁ -re vonatkoztatott relatív retenció	Összegképlet (protonátlan)	Számított pontos tömeg [M+H] ⁺	Mért pontos tömeg [M+H] ⁺	Tömeg pontosság (ppm)
1 EFB ₁ LA	90,623	6,809	C ₅₂ H ₈₉ NO ₁₆	984,6254	984,6243	-1,1
2 izo-EFB ₁ LA	90,852	6,827	C ₅₂ H ₈₉ NO ₁₆	984,6254	984,6248	-0,6
3 EFB ₁ PA	91,482	6,875	C ₅₀ H ₈₉ NO ₁₆	960,6254	960,6259	0,5
4 izo-EFB ₁ PA	91,670	6,890	C ₅₀ H ₈₉ NO ₁₆	960,6254	960,6255	0,1
5 EFB ₁ OA	91,732	6,895	C ₅₂ H ₉₁ NO ₁₆	986,6411	986,6412	0,1
6 izo-EFB ₁ OA	91,928	6,909	C ₅₂ H ₉₁ NO ₁₆	986,6411	986,6412	0,1

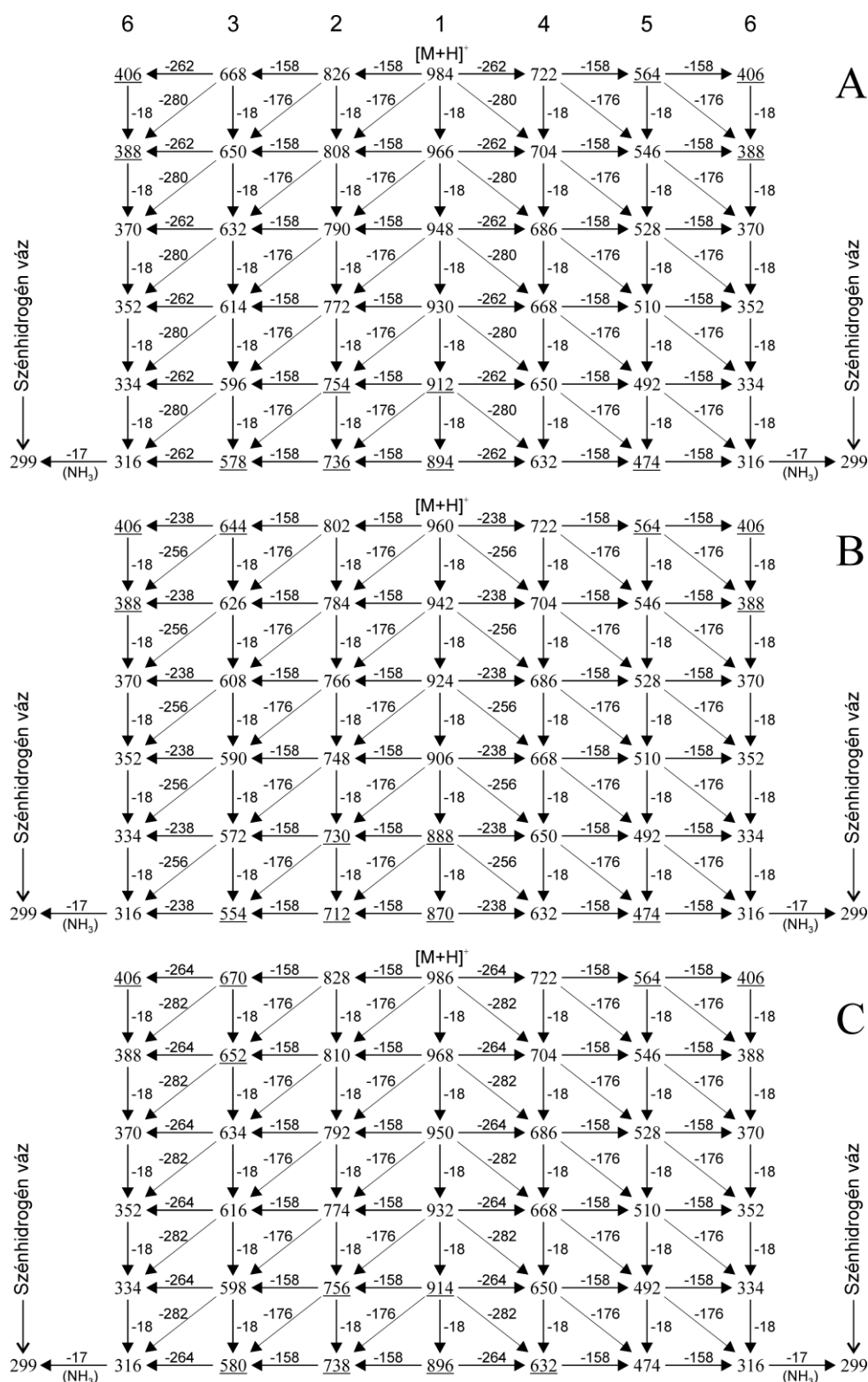
A név végén található két betű jelzi a fumonizin vázon lévő egyik OH-csoportot észteresítő harmadik szerves savat. Így a hat nagy moltömegű fumonizin általunk javasolt elnevezése a következő: EFB₁ PA, izo-EFB₁ PA, EFB₁ LA, izo-EFB₁ LA, EFB₁ OA és izo-EFB₁ OA. Az új fumonizinek esetében a mért és a számított pontos tömegértékekből kalkulált tömegpontosság (0,1– -1,1 ppm) szintén a 16. táblázatban látható. Fontos megjegyezni, hogy a harmadik szerves sav nemcsak a fumonizin váz OH-csoportjaival reagálhat, hanem – mint ahogy a ceramidoknál a 6. ábrán (26. oldal) is látható – a primer amino-csoporttal is reagálhatnak savamidot képezve. Ennek a problémakörnek az igazolása folyamatban van.

A két acil-csoportot tartalmazó fumonizinek MS² spektrumával szemben a nagy moltömegű új fumonizinek RP-HPLC/ESI–ITMS mérése során kapott MS² spektrumokban nem három, hanem hat fragmension csoport található (35. ábra). A TOFMS mérések következtében egyértelművé vált, hogy az EFB₁ izomerek MS² spektrumában található hat fragmension csoportból a 4., 5. és 6. a fumonizin vázon található harmadik acil-csoport következménye. A hat új komponens molekulaionjai CID-MS elméleti fragmentációs mintázatai a 36. ábrán láthatók. Amikor az FB₁ toxin molekulaionjai CID-MS elméleti fragmentációs mintázatát (18. ábra, 68. oldal) az EFB₁ izomerek molekulaionjai fragmentációs mintázatával (36. ábra) összehasonlítjuk, azonnal szembetűnik, hogy az EFB₁ izomerek fragmentációs mintázatában található 4., 5. és 6. fragmension csoportok *m/z* értékei találhatóak az FB₁ toxin fragmentációs mintázatának fragmension csoportjaiban (1-3) is. A magyarázat igen kézenfekvő: az EFB₁-típusú fumonizinek CID-MS fragmentációjakor a fumonizin vázon lévő harmadik acil-csoport zsírsavként vagy a zsírsav ketén formájában – bármelyik TCA kihasadása előtt – is kiléphet a molekulából

létrehozva az m/z 722-es és 704-es kationokat. Ettől kezdve a fragmentációs mintázat teljes egészében megegyezik az FB_1 toxin CID-MS elméleti fragmentációs mintázatával (18. ábra, 68. oldal), beleértve a diagnosztikus jelentőségű, a fragmentációs folyamat végén visszamaradó szénhidrogén váz m/z értékét (299) is.

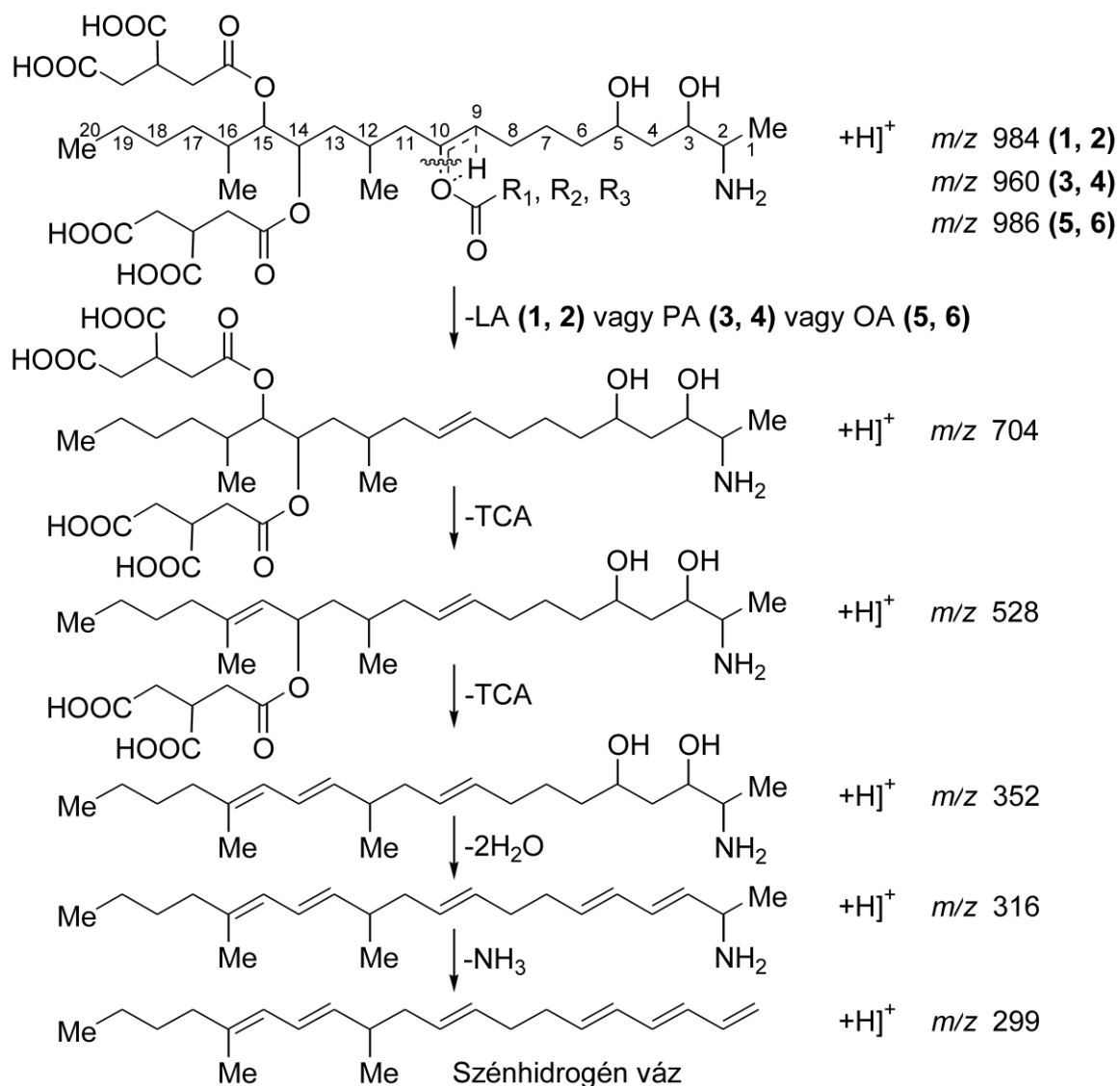


35. ábra. Az észterezett FB_1 (EFB_1) izomerek molekulaionjainak ($[\text{M}+\text{H}]^+$) RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel felvett CID-MS spektrumai: EFB_1 LA (1), iso- EFB_1 LA (2), EFB_1 PA (3), iso- EFB_1 PA (4), EFB_1 OA (5), iso- EFB_1 OA (6). Az EFB_1 izomerekre jellemző hat termékion csoport (1-6) az EFB_1 LA (1) CID-MS spektrumában és a 36. ábrán van jelezve.



36. ábra. Csak az észterezett FB₁ (EFB₁) izomerek molekulaionjaira jellemző elméletileg lehetséges CID-MS fragmentációs mintázat: (A) EFB₁ LA (1), iso-EFB₁ LA (2); (B) EFB₁ PA (3), iso-EFB₁ PA (4); (C) EFB₁ OA (5), iso-EFB₁ OA (6). A függőleges, vízszintes és átlós nyilak a H₂O (18 Da); a TCAD és/vagy a TCAK (158 Da), a PAK (238 Da), az LAK (262 Da), az OAK (264 Da) és az NH₃ (17 Da); és a TCA (176 Da), a PA (256 Da), az LA (280 Da), az OA (282 Da) kihasadását jelzik a megfelelő molekula- és termékionokból. Az aláhúzott *m/z* értékek nem voltak megfigyelhetők a CID-MS spektrumokban. A rövidítéseket lásd a rövidítések jegyzékében és a 38. ábrán (103. oldal).

dc_253_11



R₁=CH₃(CH₂)₄CH=CHCH₂CH=CH(CH₂)₇- *cisz*-8,*cisz*-11-heptadekadienil csoport (1, 2)

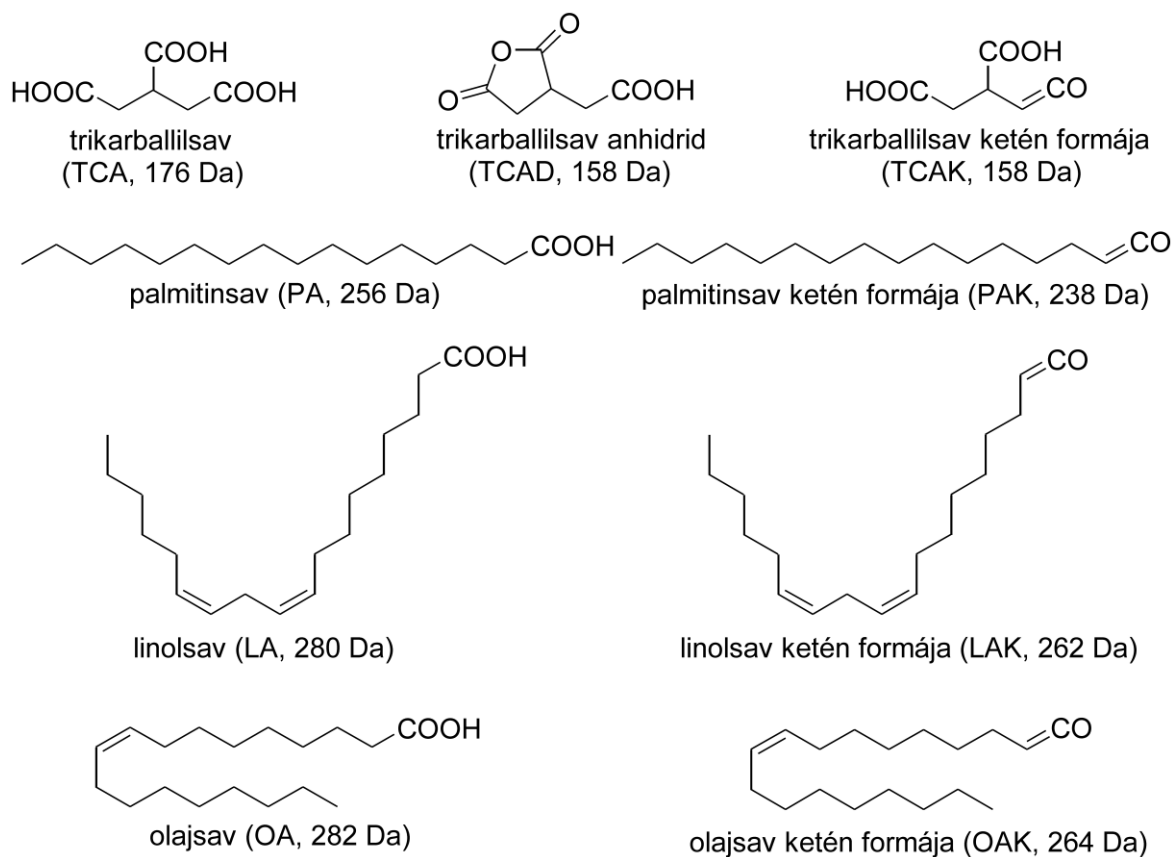
R₂=CH₃(CH₂)₁₄- pentadekanil csoport (3, 4)

R₃=CH₃(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇- *cisz*-8-heptadecenil csoport (5, 6)

37. ábra. Az EFB₁ izomerek molekulaionjai CID fragmentációja során képződött néhány jellemző ion feltételezett szerkezete. A zsírsavak feltételezett észterezési helye a C-10. A rövidítéseket lásd a 38. ábrán.

Az EFB₁ izomerek molekulaionjai CID fragmentációja során képződött néhány jellemző ion feltételezett szerkezete a 37. ábrán látható, amely ábrán a zsírsavak valószínűsített észterezési helye a C-10. Az EFB₁-típusú fumonizinek CID fragmentációja során is a C-O és C-N kötések hasadása vezet a fumonizin vázat módosító funkciós csoportok (H₂O, TCA, LA, OA, PA, NH₃) molekulából történő kilépéséhez, a fumonizin vázon egy-egy kettős kötést hagyva vissza. Az EFB₁-típusú fumonizinek esetében is a TCA egyben (176 Da) és részletekben – H₂O (18 Da) és anhidrid (TCAD, 158 Da) – is kiléphet a

molekulából. Az MS² spektrumokban megfigyelhető volt a TCA és a zsírsavak (LA, OA és PA) ketén formában (TCAK 158 Da, LAK 262 Da, OAK 264 Da és PAK 238 Da) történő kilépése is, mint ahogy a 36. ábra elméleti fragmentációs mintázatai is mutatják. Az EFB₁ izomerek esetében a fumonizin vázhoz kapcsolódott szerves savakat és a CID-MS fragmentáció során feltehetően képződött komponenseket a 38. ábra mutatja.



38. ábra. A fumonizin vázhoz kapcsolódott savak, és a CID fragmentáció során feltételezhetően képződött komponensek szerkezete az EFB₁ izomerek esetében.

Az ITMS készülékkel felvett MS² spektrumok vizsgálata során a következőket figyeltük meg: (1) a zsírsavak (LA, OA, PA) kihasadásával képződtek a legnagyobb intenzitású fragmensionok; (2) a legkisebb intenzitású fragmensionok a 2 TCA molekula kihasadásával létrejöttek voltak; (3) a fragmension csoportok intenzitás szerinti sorrendje az EFB₁ LA, OA és PA komponenseknél $4 > 2 > 5 > 6 \geq 1 > 3$, míg az izo-EFB₁ LA, OA és PA vegyületeknél $4 > 5 > 6 > 1 \geq 2 > 3$ volt. Az RP-HPLC/ESI-ITMS mérés során kapott jellemző adatok a 17. táblázatban láthatók. Az EFB₁-típusú fumonizinek FB₁ toxinhoz viszonyított relatív mennyisége 0,003-0,036% között változott. Teljes mennyiségük az FB₁ toxin 0,1%-a volt, amely akár jelentős is lehet, ha figyelembe vesszük, hogy ezek a vegyületek az eddig ismert fumonizineknél jóval apolárisabbak.

17. táblázat. Az EFB₁ izomerek RP-HPLC/ESI-ITMS eljárással kapott jellemző adatai. A rövidítésekhez lásd a 38. ábrát az előző oldalon.

Komponens neve és a molekulaiionok ([M+H] ⁺) m/z értékei (dőlt)	Retenció idő (min)	Az FB ₁ -re vonatkoztatott relatív retenció	Relatív mennyiség az FB ₁ %-ában	A molekulaiionokból [M+H] ⁺ képződött termékionok m/z értékei (dőlt) és relatív abundanciái (%)																								
1	EFB ₁ LA 984	89,324	6,897	0,036	966	948	930	826	808	790	772	722	704	686	668	650	632	614	596	546	528	510	492	370	352	334	316	299
					17,9	21,8	0,7	2,0	16,1	52,9	0,9	0,7	100	82,3	16,6	1,6	5,4	8,6	5,4	5,7	23,5	36,7	7,2	0,8	20,1	31,2	5,4	3,2
2	izo-EFB ₁ LA 984	89,542	6,914	0,010	966	948	930	826	808	790	772	722	704	686	668	650	632	614	596	546	528	510	492	370	352	334	316	299
					4,7	14,1	0	0,8	2,6	9,0	0,6	0	100	54,3	9,8	1,3	3,2	2,0	2,0	4,1	30,9	19,5	6,6	3,2	28,4	21,8	3,6	0
3	EFB ₁ PA ^a 960	90,150	6,962	0,015	942	924	906	802	784	766	748	722	704	686	668	650	608	590	572	546	528	510	492	370	352	334	316	299
					33,0	21,6	1,1	1,1	31,4	70,3	2,5	1,8	93,1	100	21,7	1,6	8,3	7,0	1,2	10,4	36,2	40,8	9,6	1,4	13,0	28,8	9,4	0,2
4	izo-EFB ₁ PA ^b 960	90,323	6,976	0,003	942	924	906	802	784	766	748	722	704	686	668	650	608	590	572	546	528	510	492	370	352	334	316	299
					3,2	11,6	4,8	2,0	9,3	12,4	0	0,8	100	75,4	14,4	0	2,8	3,6	0	4,5	42,8	26,3	3,1	1,1	28,4	27,2	5,4	1,3
5	EFB ₁ OA ^c 986	90,395	6,981	0,027	968	950	932	828	810	792	774	722	704	686	668	650	634	616	598	546	528	510	492	370	352	334	316	299
					28,8	22,8	0	2,6	24,1	74,4	5,3	2,2	99,5	100	28,8	1,1	3,3	9,3	0,2	1,1	32,8	40,4	6,9	1,2	23,5	30,4	10,1	2,8
6	izo-EFB ₁ OA ^d 986	90,569	6,995	0,008	968	950	932	828	810	792	774	722	704	686	668	650	634	616	598	546	528	510	492	370	352	334	316	299
					5,8	12,2	2,8	2,0	4,5	6,6	0,9	0	100	45,1	10,9	0,7	0,4	6,5	0,2	3,2	39,9	15,6	1,2	7,0	25,6	13,7	2,1	0,7

^a + m/z 626 $[M+H-TCA-TCAC]^+$ 3,1%; ^b + m/z 626 $[M+H-TCA-TCAC]^+$ 1,5%; ^c + m/z 474 $[M+H-TCA-OA-3H_2O]^+$ 0,9%; + m/z 388 $[M+H-2TCAC-OA]^+$ vagy $[M+H-TCAC-TCA-OAC]^+$ 1,4%; ^d + m/z 474 $[M+H-TCA-OA-3H_2O]^+$ 0,2%; + m/z 388 $[M+H-2TCAC-OA]^+$ vagy $[M+H-TCAC-TCA-OAC]^+$ 0,4%;

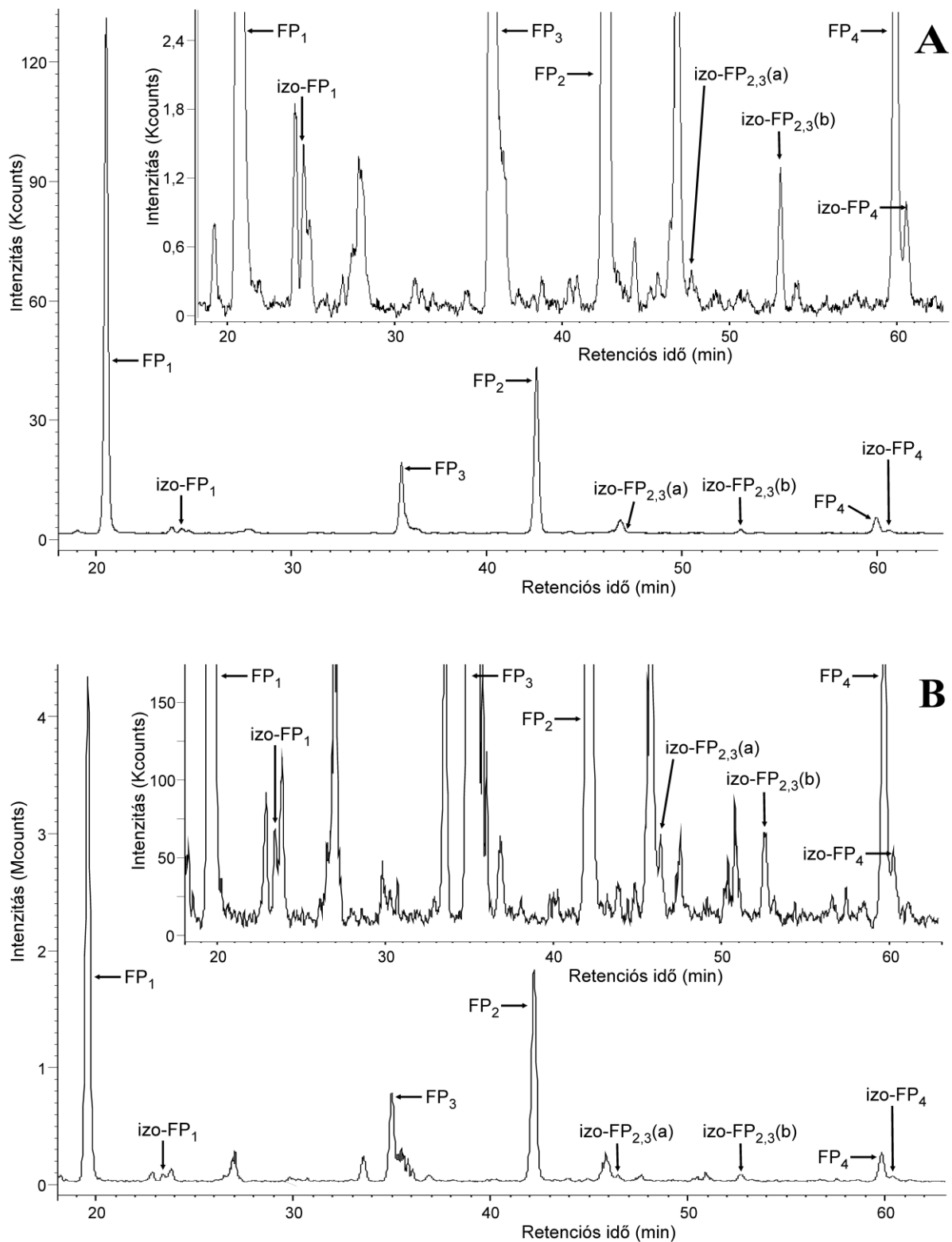
Emiatt a lipid kettős membránokon és a véragygáton könnyebben átjutva fejthetik ki toxikus hatásukat a különféle szervezetekben, szövetekben.

Az itt említett eredmények jól mutatják, hogy két különböző kapcsolt technika (HPLC/ESI–ITMS és HPLC/ESI–TOFMS) ugyanazon mintán történő alkalmazásával sikerült megoldani eddig ismeretlen nagy moltömegű fumonizinek azonosítását. Az ITMS készülékkel nyert MS² spektrumok alapján tudtuk azonosítani az FB₁-szerű szerkezetet, míg a TOFMS készülékkel történő pontos tömeg mérés alapján sikerült a fumonizin vázon található harmadik acil-csoportokat azonosítani.

4.3.4. FP izomerek

A fumonizin P analógokat (FP) eddig mindössze négy közlemény említi (Musser és mtsai 1996; Musser és Plattner 1997; Abbas és mtsai 1998; Rheeder és mtsai 2002). A témában megjelenő első közlemény számolt be az FP₁₋₃ toxinok gombatenyészetből történő izolálásáról és szerkezetük azonosításáról (Musser és mtsai 1996). Az FP₁₋₃ toxinokat a *F. moniliforme* M-2285-ös izolátumával fertőzött kukoricatenyészetből izolálták. Az új fumonizinek szerkezetét ¹H NMR és ¹³C NMR módszerrel határozták meg. Igazolták, hogy az eikozán lánc C-2-es atomján – a legtöbb fumonizinre jellemző primer amino-csoport helyett – 3-HP funkciós csoport található. Az elválasztott komponenseket a karakterisztikus MSMS spektrumuk alapján is azonosították (Musser és Plattner 1997). Vizsgálataik során azt is megállapították, hogy az FP₁₋₃ toxinok szerkezete a C-2-n lévő csoport kivételével megegyezik az FB analógok hasonló vegyületeivel (FB₁₋₃). Az FB analógok ismert sztereokémiájával szemben (lásd a 2.1. fejezetet a 9. oldalon), az FP₁₋₃ fumonizinek királis atomjainak abszolút konfigurációja azonban máig ismeretlen. Az eddigi kutatások szerint az FP analógok toxicitása jelentősen elmarad az FB analógok toxicitásától (Abbas és mtsai 1998). Talán ezzel magyarázható, hogy az FP analógok további vizsgálata az elmúlt 10 évben elkerülte a kutatók figyelmét.

Az FP₁, FP₂, FP₃ izolálására és ezáltal szerkezetük igazolására vonatkozó jelentős eredmények keltették fel érdeklődésünket a 3-HP-csoportot tartalmazó szokatlan szerkezetű fumonizin-típusú mikotoxinok további vizsgálatára. Méréseink során egy új FP analógot és négy új FP izomert azonosítottunk (Bartók és mtsai 2011b). A *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészet kivonatának RP-HPLC/ESI–TOFMS és ITMS mérése után felvett extrahált ion kromatogramok a már korábban azonosított (FP₁₋₃) és az új FP analógokkal (izo-FP₁₋₃, FP₄ és izo-FP₄) a 39. ábrán láthatók. A mérési adatokat az 18. táblázat foglalja össze.



39. ábra. *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészeti 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) nagyított extrahált ion kromatogramjai (EIC), amelyek az FP analógokat mutatják.

18. táblázat. Az FP analógok RP-HPLC/ESI-TOFMS és ITMS eljárással kapott jellemző adatai. A rövidítéseket lásd a rövidítések jegyzékében és a táblázat alatt.

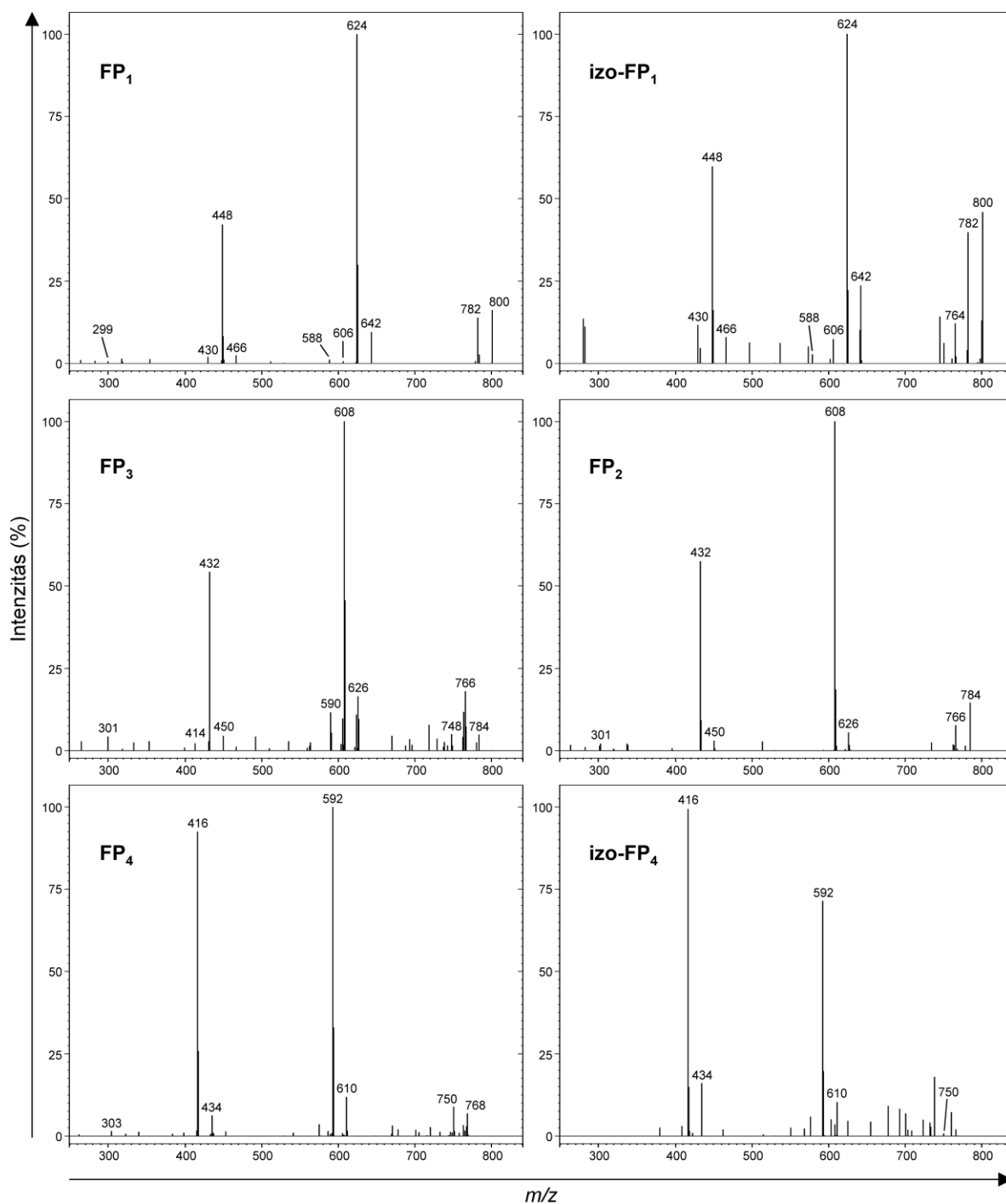
Komponens	Retenció idő (min, TOFMS)	Az FB ₁ -re vonatkoztatott relatív retenció (TOFMS)	Számított pontos tömeg ([M+H] ⁺ , TOFMS)	Mért pontos tömeg ([M+H] ⁺ , TOFMS)	Tömegpontosság (ppm, TOFMS)	Retenció idő (min, ITMS)	Az FB ₁ -re vonatkoztatott relatív retenció (ITMS)	Relatív mennyiség az FB ₁ %-ában	A molekulaionok [M] ⁺ és a belőlük képződött termékeionok m/z értékei (dőlt) és relatív abundanciái (%)												[M – 2TCA – xH ₂ O – 3-HP] ⁺ (Szénhidrogén váz)
									[M] ⁺	[M – H ₂ O] ⁺	[M – 2H ₂ O] ⁺	[M – 3-HP] ⁺	[M – TCAK] ⁺	[M – TCA] ⁺	[M – TCA – H ₂ O] ⁺	[M – TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M – 2TCA] ⁺	[M – 2TCA – H ₂ O] ⁺	[M – 2TCA – 2H ₂ O] ⁺	[M – 2TCA – 3H ₂ O] ⁺	
1 FP ₁	20,408	1,566	800,4069	800,4055	-1,7	19,596	1,399	0,680	800	782	764	705	642	624	606	588	448	430	412	394	299
									16	14	0	0	10	100	0,7	1	42	2	0	0	0,6
2 izo-FP ₁	24,241	1,714	800,4069	800,4057	-1,5	23,394	1,698	0,008	800	782	764	705	642	624	606	588	448	430	412	394	299
									46	40	12	0	24	100	7	0	60	0	0	0	0
3 FP ₃	35,569	2,583	784,4119	784,4134	1,9	34,991	2,613	0,138	784	766	748	689	626	608	590	572	432	414	396	-	301
									5	18	5	1	16	100	12	0	54	2	0		4
4 FP ₂	42,467	3,113	784,4119	784,4111	-1,0	42,214	3,182	0,313	784	766	748	689	626	608	590	572	432	414	396	-	301
									15	8	0	0	5	100	0	0	60	0	0,5		1
5 izo-FP _{2,3a}	46,721	3,439	784,4119	784,4106	-1,7	46,466	3,517	0,007	784	766	748	689	626	608	590	572	432	414	396	-	301
									44	6	16	0	22	100	0	0	66	0	0		0
6 izo-FP _{2,3b}	52,961	3,918	784,4119	784,4104	-1,9	52,703	4,009	0,010	784	766	748	689	626	608	590	572	432	414	396	-	301
									21	18	0	0	6	100	5	5	64	0	0		1,5
7 FP ₄	59,880	4,449	768,4170	768,4167	-0,4	59,816	4,570	0,048	768	750	732	673	610	592	574	556	416	398	-	-	303
									7	9	1	0	12	100	3	0	92	1			1,5
8 izo-FP ₄	60,577	4,503	768,4170	768,4155	-2,0	60,386	4,615	0,008	768	750	732	673	610	592	574	556	416	398	-	-	303
									0,1	0,7	4	0	10	72	0	0	100	0			0

TCA = trikarballilsav; TCAK = trikarballilsav kétén formája; 3-HP = 3-hidroxipiridínium; (szerkezeti képletüket lásd a 3. és 38. ábrán, 13. és 103. oldal); X: 1 (7, 8), 2 (3-6) vagy 3 (1, 2)

A kísérleti adatokból az alábbi fontos következtetések vonhatók le. Az újabb nagyhatékonyságú/felbontóképességű/érzékenységi műszeres technikák alkalmazása lehetővé tette a Musser és mtsai (1996, 1997) által felfedezett FP₁₋₃ típusú mikotoxinok eddig nem ismert izomerjeinek azonosítását. Nevezetesen az új kísérleti adatok igazolják az eddig ismeretlen FP₄, valamint FP₁₋₄ izomerek (izo-FP₁, izo-FP_{2,3a}, izo-FP_{2,3b}, izo-FP₄) jelenlétét a vizsgált izolátumban. Az új FP analógok létezését az alábbi kísérleti adatok támasztják alá: 1) azonos kromatografálási körülmények között nyert retenciós idők, összehasonlítva azokat a már ismert FB₁₋₄ és FP₁₋₃ vegyületek retenciós idejével és FB₁ toxinra vonatkoztatott relatív retenciós adatokkal (39A, B ábra, 18. táblázat); 2) ESI-TOFMS eljárással nyert pontos tömegértékek (18. táblázat); 3) ESI-ITMS²-el nyert CID-MS spektrumok (40. ábra, 18. táblázat), amelyek fragmentációs képe megegyezik az FP₁-ről közölt MS² spektrummal (Musser és Plattner 1997).

Ami a retenciós időket illeti, már 1991-ben megállapították RP-HPLC oszlopon az FB₁ < FB₃ < FB₂ < FB₄ retenciós idők szerinti elúciós sorrendet (Cawood és mtsai 1991), amely sorrend 1997-ben nemcsak megerősítést nyert a YMC J'sphere ODS-L80 HPLC oszlopon, hanem a sorrend megegyezett az FP₁₋₃ vegyületeknél is, azaz FP₁ < FP₃ < FP₂ (Musser és Plattner 1997). Ezen elúciós sorrendet mutatták az általunk használt YMC J'sphere ODS-H80 oszloppal nyert kísérleti adatok is, azzal a kiegészítéssel, hogy az újonnan azonosított FP₄ toxin az FP₂ után eluálódott FP₁ < FP₃ < FP₂ < FP₄. A fentiekben felsorolt elúciós sorrendek segítették az FP₄ vegyület azonosítását a TOFMS-sel és az ITMS-sel is, mivel az FP₄ toxin jelenlétét az FP₂ után kellett keresnünk kb. olyan retenciós idő eltérésben, mint ahogy az FB₄ toxin eluálódott az FB₂ toxin után.

Mivel az új fumonizineket még nem izoláltuk a szerkezetük pontos meghatározása jelenleg nem lehetséges. Az FP analógok molekulaionjainak ([M+H]⁺) azonban a többi fumonizinhoz hasonlóan igen jellegzetes CID-MS spektruma van, ami alapján a komponensek típusa (FP) és a szénláncukon lévő funkciós csoportok (TCA, OH, 3-HP) azonosíthatók (természetesen a szénláncukon elfoglalt helyük és konfigurációjuk nem). Az azonosított FP analógok közül hat komponensnek a Varian 500-ITMS típusú ioncsapdás tömegspektrométerrel felvett MS² spektrumait a 40. ábra mutatja. Az FP₁₋₄ komponensek szerkezetéből következik, hogy CID-MS fragmentációjuk során a C-O és C-N kötések felhasadása révén a szénláncot módosító funkciós csoportok H₂O, TCA és 3-HP formájában lépnek ki a molekulából.

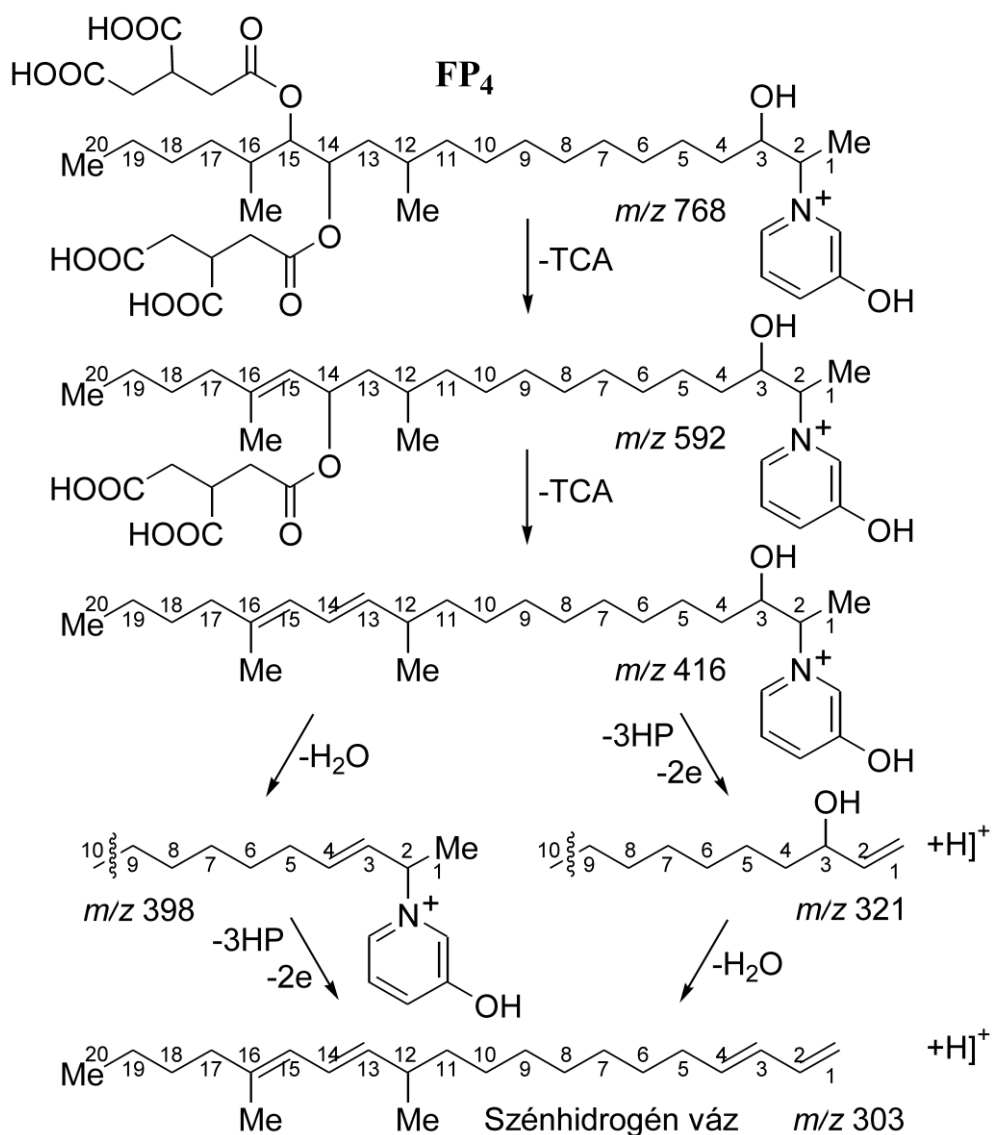


40. ábra. Az „FP” analóg fumonizinek (FP₁₋₄, iso-FP₁ és iso-FP₄) molekulaionjainak (M⁺) RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel felvett CID-MS spektrumai.

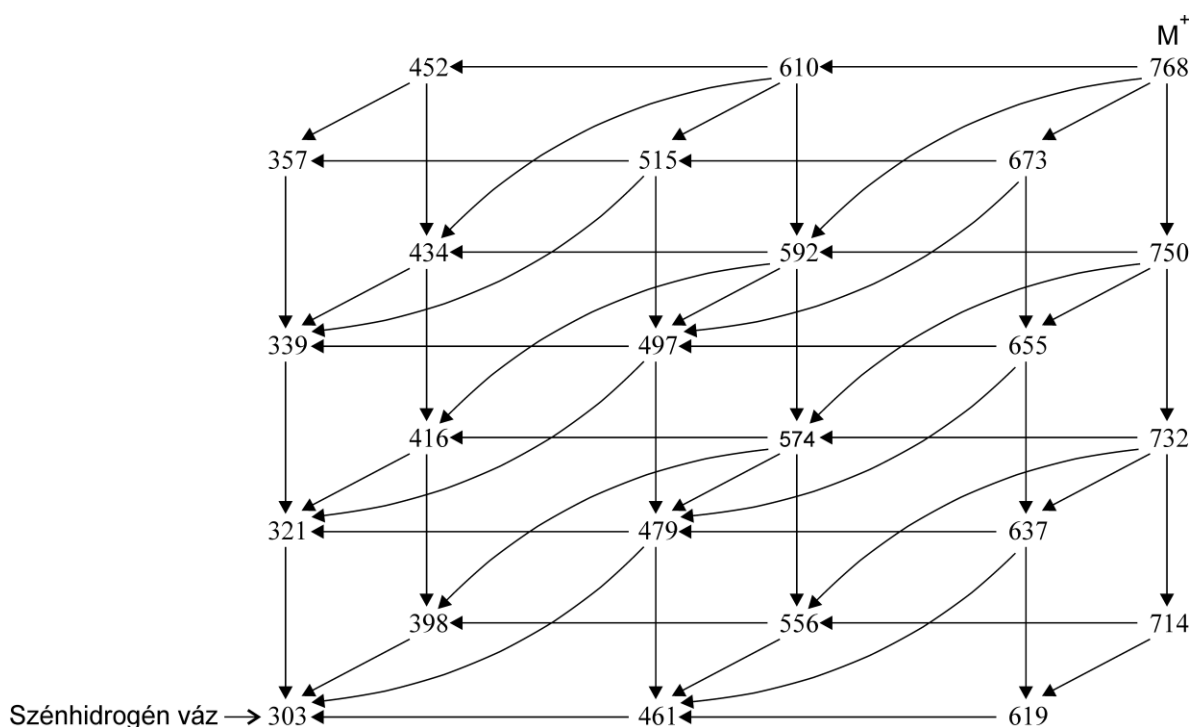
Az FP₄ toxin CID-MS fragmentációja során képződő néhány kation feltételezett szerkezetét és a fragmentáció elméleti sémáját a 41. és a 42. ábra mutatja. Az új FP analógokkal kapcsolatban a következőket kell még megjegyezni: 1) az iso-FP₁ alapváza feltételezhetően az iso-FB₁ ismert alapvázával egyezik meg; 2) az iso-FP_{2,3a} és az iso-FP_{2,3b} vegyületek feltételezhetően nem az FP₂ illetve az FP₃ epimerjei, mivel viszonylag

nagy a retenciós idő eltérés az izomerek illetve az FP₂/FP₃ toxinok között. Valószínűsíthető, hogy ezen izomerek esetében a TCA/OH más C-atomokon található; 3) az FP₄ alapváza feltételezhetően az FB₄ ismert alapvázával egyezik meg; 4) az izo-FP₄ vagy az FP₄ epimerje, vagy az alapvázon lévő OH-csoport nem a C-3-on található.

Úgy gondoljuk, hogy a kevésbé mérgező újabb fumonizinek felismerése további információkat szolgáltathat képződési mechanizmusuk kutatásában, ezáltal bonyolult biokémiai folyamatok értelmezésében.



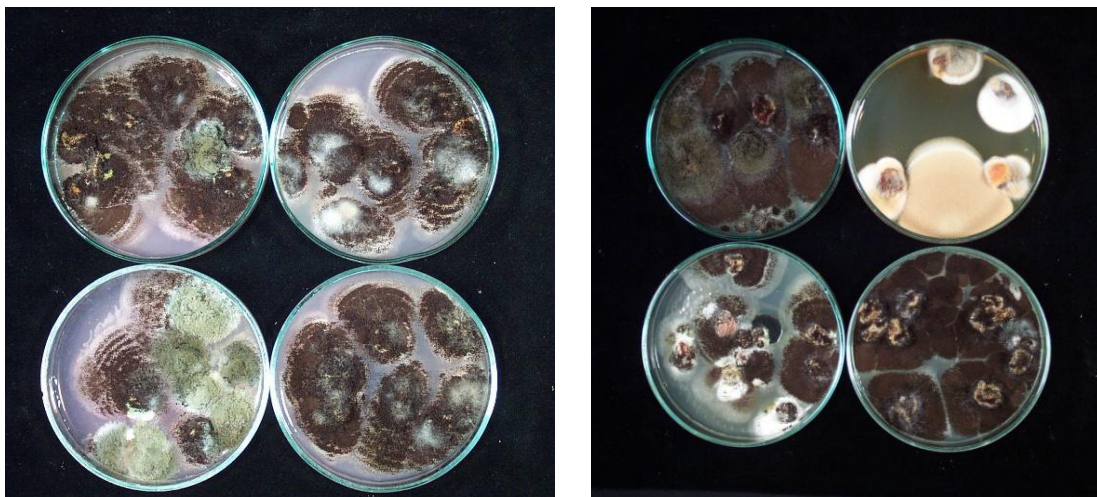
41. ábra. Az FP₄ toxin molekulaionja (M⁺) és a fragmentáció során képződött néhány ion feltételezett szerkezete. A rövidítéseket lásd a 3. ábrán (13. oldal).



42. ábra. Az FP₄ toxin és izomerje molekulaionjaira jellemző elméletileg lehetséges CID-MS fragmentációs mintázat. A többi FP analógra hasonló mintázat rajzolható fel. A függőleges, a vízszintes, a görbült átlós és a hátulról előre mutató nyilak a H₂O (18 Da); a TCAD vagy a TCAK (158 Da); a TCA (176 Da) és a 3-HP (95 Da) kihasadását jelzik a megfelelő molekula- és termékionokból. A rövidítéseket lásd a 3. és 25. ábrán (13. és 79. oldal).

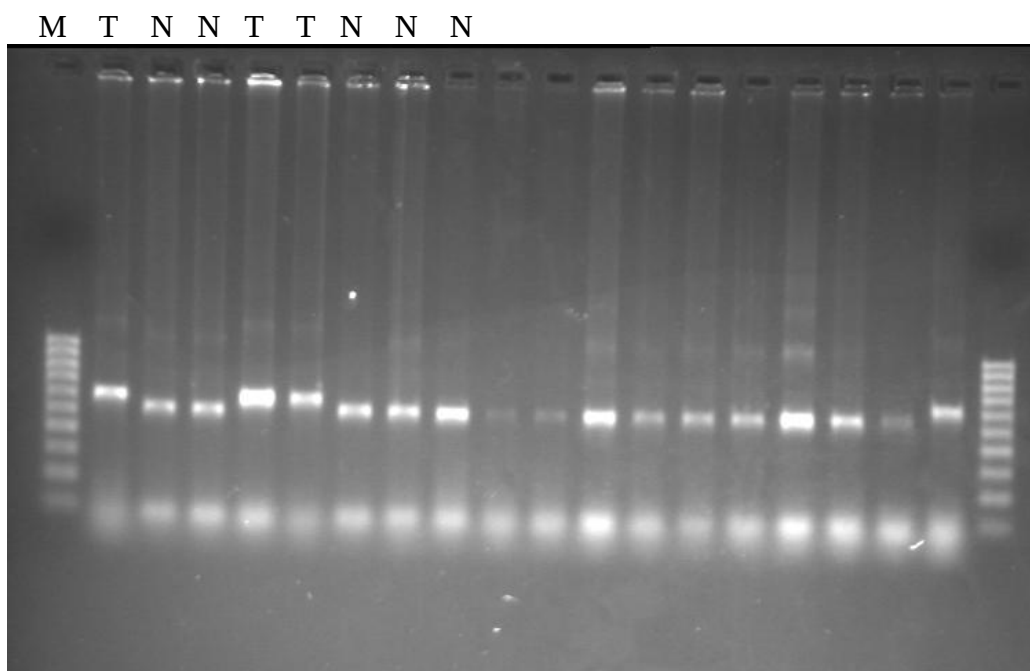
4.4. Fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS meghatározása mazsolából és mazsoláról izolált fekete *Aspergillus* fajokkal fertőzött táptalajmintákból

Kereskedelmi forgalomból begyűjtött, különféle országokból származó 13 mazsolaminta mikrobiotáját analizáltuk. A 43. ábra táptalajra helyezett mazsolák mikrobiotáját mutatja.

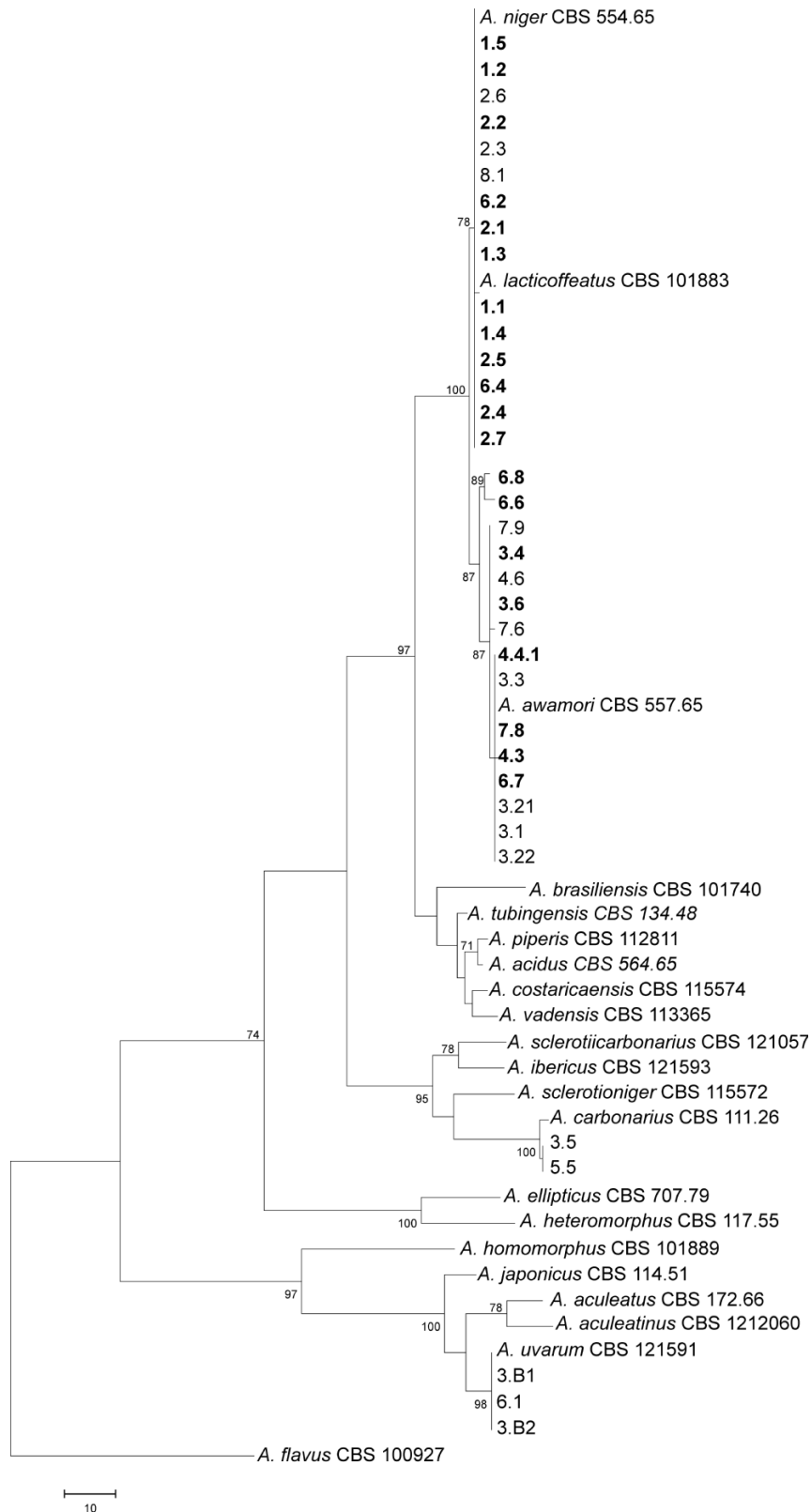


43. ábra. Néhány mazsolaminta mikrobiotája DRBC táptalajon (Kocsubé Sándor felvétele).

A gombatenyészetek morfológiai analízise azt mutatta, hogy két minta kivételével az összes mazsola fekete *Aspergillus* fajokkal volt szennyezve (19. táblázat). A fajok azonosításához PCR–RFLP eljárást és szekvencia analízist alkalmaztunk. A 72 izolátumból a PCR–RFLP módszer kétféle fekete *Aspergillus* típus azonosítását tette lehetővé (44. ábra): az egyik típus az, amelyikre a PCR–RFLP N-mintázat a jellemző (idetartozik számos más faj mellett az *A. niger* is), a másik típus a PCR–RFLP T-mintázat, amely mintázatot az *A. tubingensis*, *A. vadensis*, *A. costaricensis*, *A. acidus* és *A. piperis* mutatja (Samson és mtsai 2007). Mivel az utóbbi típus nem képes fumonizineket szintetizálni (JC Frisvad, személyes közlés), ezeket a mintákat kizártuk a fumonizin vizsgálatokból. Az izolátumaink közül 35 mutatott N-típusú PCR–RFLP profilt. Ezen izolátumoknak amplifikáltuk a kalmodulin gén egy szakaszát is, melyet megszekvenáltunk. A szekvencia adatokat illesztés után parszimónia analízisnek vetettük alá. A kapott 197 egyforma hosszúságú fa egyike a 45. ábrán látható. A kalmodulin illesztés 440 nukleotidot tartalmazott, melyek közül 197 volt parszimónia szempontjából informatív (fahossz: 620, konzisztencia index (CI): 0,607527, retenciós index (RI): 0,880393). A szekvencia analízis alapján az N-típust mutató izolátumok közül 30 tartozott az *A. niger* és az *A. awamori* fajhoz. Az *A. awamori* fajt a közelmúltban revalidálták mint az *A. niger*-től több gén szekvencia analízise és AFLP analízis alapján jól elkülöníthető fajt (Perrone és mtsi 2010).



44. ábra. A PCR–RFLP analízis eredménye (N: *A. niger* típus; T: *A. tubingensis* típus; M: marker; Kocsubé Sándor felvétele)



45. ábra. Fekete *Aspergillus* típusú törzsek és a mazsolamintákról származó fekete *Aspergillus* izolátumok kalmodulin szekvencia alapján készült filogenetikai törzsfája. Az elágazásoknál lévő számok a „bootstrap” értékeket jelzik. Csak a 70% feletti értékek vannak jelezve. A fumonizin-termelő mazsola-eredetű izolátumok vastagítva vannak.

19. táblázat. Mazsolaminták származása és a róluk izolált fekete *Aspergillus* fajok

Minta azonosító	Minta eredete (vásárlás helye)	Minta típusa	fe fekete <i>Aspergillus</i> izolátumok száma	N-típusú PCR-RFLP profil mutató izolátumok száma	Azonosított fajok
1	Kalifornia (USA)	mazsola	5	5	<i>A. niger</i>
2	Kalifornia (USA)	magnélküli mazsola	8	7	<i>A. niger</i>
3	Ismeretlen (Hollandia)	mazsola	11	9	<i>A. awamori</i> , <i>A. uvarum</i> , <i>A. carbonarius</i>
4	Törökország (Hollandia)	mazsola	7	3	<i>A. awamori</i>
5	Kína (Magyarország)	mazsola	9	1	<i>A. carbonarius</i>
6	Törökország (India)	Sulthana	8	6	<i>A. awamori</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. uvarum</i>
7	Törökország (Törökország)	mazsola	10	3	<i>A. awamori</i>
8	India (India)	mazsola	1	1	<i>A. niger</i>
9	Kína (Magyarország)	mazsola	3	-	-
10	Iran (Magyarország)	mazsola	6	-	-
11	India (India)	fe fekete mazsola	4	-	-
12	Dél-Afrika (Hollandia)	Sulthana	-	-	-
13	Törökország (Hollandia)	mazsola	-	-	-

A fumonizin-tartalmat RP-HPLC/ESI-ITMS eljárással összesen hét mazsolaminta esetében vizsgáltuk. Ennél a hét mintánál találtunk olyan *Aspergillus* fajok (*A. niger* és/vagy *A. awamori*) által történő szennyeződést, amelyek képesek fumonizineket szintetizálni (45. ábra). A kalibrációs mintákat (FB₁ és FB₂) 1 pg-100 ng tartományban analizáltuk és azt találtuk, hogy a kalibrációs görbék a 10 pg-10 ng tartományban voltak lineárisak ($r^2 = 0,9990$ és $0,9994$). A mazsolamintákban több fumonizint detektáltunk, beleértve az FB₁₋₄ toxinokat, az FB₃ és FB₄ toxinok 3-*epi* izomerjeit (3-*epi*-FB₃ és 3-*epi*-FB₄), izo-FB_{2,3} toxint, egy mazsolamintában az FB₅ toxint és egy izomerjét (izo-FB₅) és a *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészet mintából általunk (Bartók és mtsai 2010a) azonosított 28-as számú FB₁ izomert (izo-FB₁), ami megegyezik Mansson és mtsai (2010) által *A. niger* tenyészetből izolált és NMR eljárással azonosított izo-FB₁ toxinnal, amelyet FB₆-nak nevezték el. Talán jobb lett volna, ha a toxin elnevezése izo-FB₁ marad egy megfelelő alsó index jelöléssel megkülönböztetve a MacKenzie és mtsai (1998) által először izolált és szerkezetileg azonosított másik izo-FB₁ toxintól. A referencia anyagok oldatának mazsolamintákhoz történő hozzáadásával (2 mg/kg) – az oldószer elpárologtatása után – a visszanyerési értékeket is vizsgáltuk, amely az FB₁ és FB₂ esetében 59,4% és 54,3% volt. A mennyiségi kiértékelés során az FB₁ toxin kalibrációs egyenesét és visszanyerési értékét az FB₁, izo-FB₁ és FB₅, izo-FB₅, míg az FB₂ kalibrációs egyenesét és visszanyerési értékét az FB₂₋₄, 3-*epi*-FB₃, 3-*epi*-FB₄ és izo-FB_{2,3} toxinok

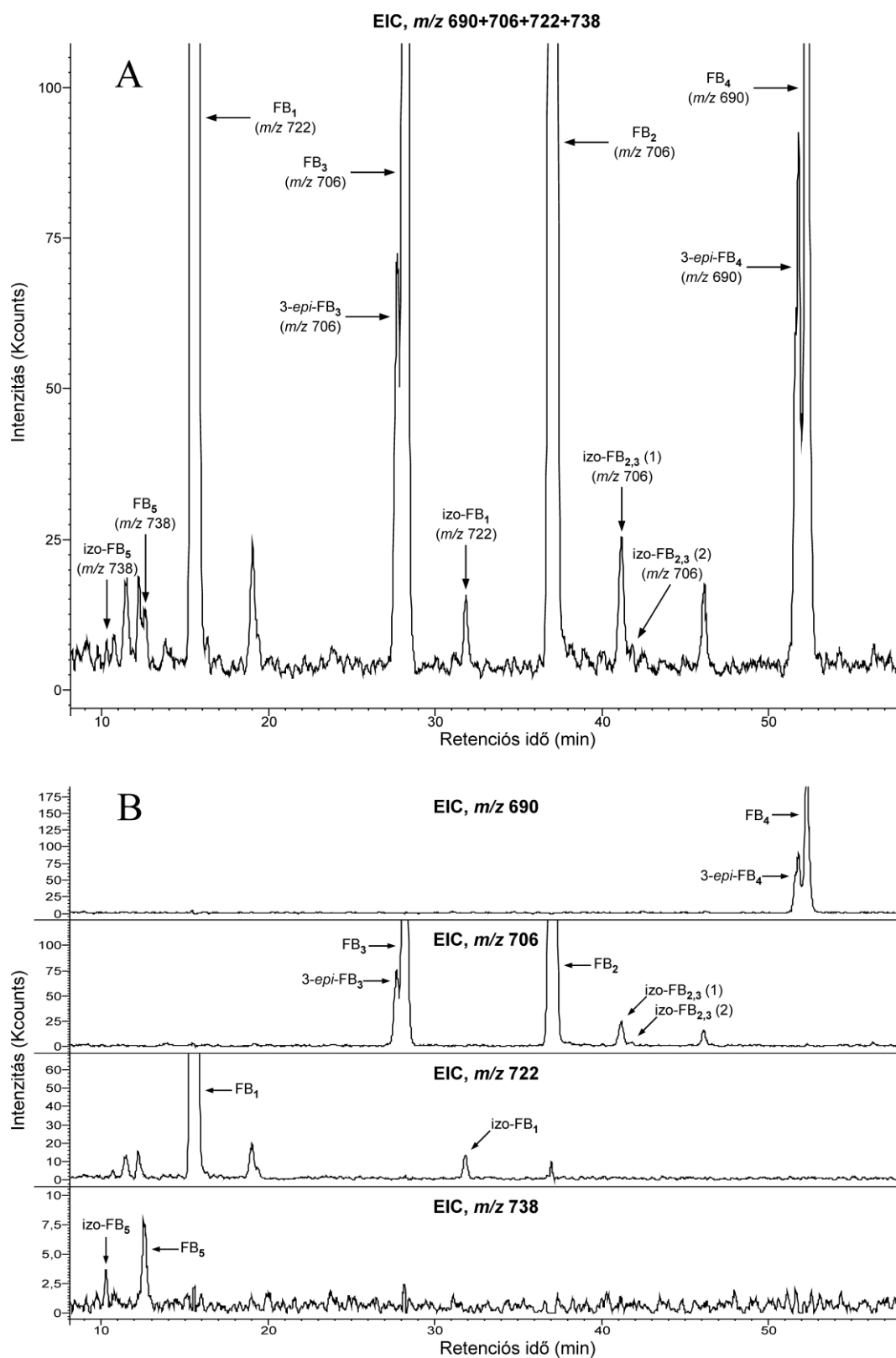
meghatározásához alkalmaztuk. A mazsolaminták átlagos fumonizin-tartalma 7,22 mg/kg (4,55-35,49 mg/kg) volt (20. táblázat). A legjelentősebb fumonizin-szennyezést a kaliforniai-eredetű mazsolamintában találtuk, amelynek az extrahált ion kromatogramjai

20. táblázat. Néhány mazsolaminta fumonizin-tartalma

Minta száma	A detektált fumonizin izomerek és mennyiségük (µg/kg) ^a										Teljes FB-tartalom
	FB ₁	FB ₃	3- <i>epi</i> -FB ₄	FB ₄	FB ₂	izo-FB ₅	FB ₅	3- <i>epi</i> -FB ₃	izo-FB ₁	izo-FB _{2,3(1)}	
1	17321,51	3716,03	673,10	1483,92	11515,78	11,99	43,80	489,93	68,08	163,40	35487,54
2	243,42	55,05	-	59,58	325,63	-	-	-	-	-	683,68
3	247,38	50,27	-	-	157,14	-	-	-	-	-	454,79
4	358,18	106,84	48,46	84,50	424,60	-	-	-	-	-	1022,58
6	502,85	236,11	98,09	236,20	1055,95	-	-	-	-	-	2129,20
7	299,33	122,50	30,19	94,19	379,15	-	-	-	-	-	925,36
8	1494,18	498,95	179,22	425,61	2095,40	-	-	62,38	-	-	4755,74

^a Az FB₁ toxin kalibrációs görbét és visszanyerési értékét az FB₁, izo-FB₁, FB₅ és izo-FB₅, míg az FB₂ toxin kalibrációs görbét és visszanyerési értékét az FB₂, 3-*epi*-FB₃, FB₃, 3-*epi*-FB₄, FB₄ és izo-FB_{2,3(1)} toxinok mennyiségi kiértékeléséhez alkalmaztuk; -, nem detektálható.

(EIC) a 46. ábrán láthatók. Mivel jelenleg mazsolára nincsenek mikotoxin határértékek megállapítva, csak összehasonlításként jegyzem meg, hogy a kaliforniai minta fumonizin-szennyezése kilencszerese volt a feldolgozatlan kukoricára érvényes Európai Unió egészségügyi határértéknek (1881/2006/EK, 4 mg/kg, 2. táblázat, 35. oldal) és harminchatszorosa az emberi fogyasztásra szánt kukoricára vonatkozó határértéknek (1 mg/kg, 2. táblázat, 35. oldal). A közleményünkben (Varga és mtsai 2010) található kromatogramok először mutatták be együtt a 3-*epi*-FB₃/FB₃ és a 3-*epi*-FB₄/FB₄ toxinok elválasztását, amellyel felhívtuk a figyelmet arra, hogy csak megfelelő hatékonyságú HPLC oszloppal és kevésbé meredek grádiens (esetleg izokratikus) analízis alkalmazásával választhatók el egymástól ezek a komponensek. Azaz, minden valószínűség szerint eddig azok a közlemények – beleértve egyik korábbi közleményünket is (Szécsi és mtsai 2010) – amelyek az FB₃ és/vagy FB₄ toxinok méréséről számoltak be (természetes vagy mesterséges fertőzésből származó mintákból), a 3-*epi*-FB₃/FB₃ és a 3-*epi*-FB₄/FB₄ toxinokat 1-1 csúcsban eluálódva együtt mérték. Mivel a mintákban találtunk FB₁- és FB₃-szennyezést is, feltételezhető, hogy ezek a mazsolák nemcsak fekete *Aspergillus* fajokkal voltak megfertőzve, vagy a bioszintézis során bekövetkező hibák eredményezhették kis mennyiségben az FB₁ és FB₃ toxinok szintézisét.



46. ábra. Kaliforniai-eredetű mazsolaminta (1-es számú minta a 19. és 20. táblázatban) RP-HPLC/ESI-ITMS egyesített extrahált ion kromatogramja (EIC, m/z 690+706+722+738, nagyított) (A). A mazsolaminta B típusú fumonizinjeire jellemző m/z értékeknél külön felvett nagyított extrahált ion kromatogramok (B).

Összesen 30 *A. niger* és *A. awamori* izolátum táptalajon történő fumonizin-termelését is vizsgáltuk. A visszanyerési értékek kiszámításához Hamilton fecskendővel a táptalajkorongokra csepegtettük az FB₁ és FB₂ referencia anyagok oldatát (1 µg/g táptalajkorong). Az oldószer elpárolgása utáni extrakciót követő RP-HPLC/ESI-ITMS mérések révén számított visszanyerési érték a két toxinra 87,2% és 74,8% volt. A 30 fekete *Aspergillus* izolátum közül 20 (66,7%) termelt detektálható mennyiségben fumonizin izomereket (21. táblázat). Ezen belül az *A. niger* izolátumok 80%-a, míg az *A. awamori* izolátumok 53,3%-a termelt fumonizineket. Ez jó egyezést mutat az irodalmi adatokkal, miszerint kávészemekről izolált *A. niger* izolátumok 76%-a (Noonim és mtsai 2009), valamint szőlőről és mazsoláról begyűjtött *A. niger* izolátumok 77%-a (Mogensen és mtsai 2010a) volt képes fumonizinek termelésére.

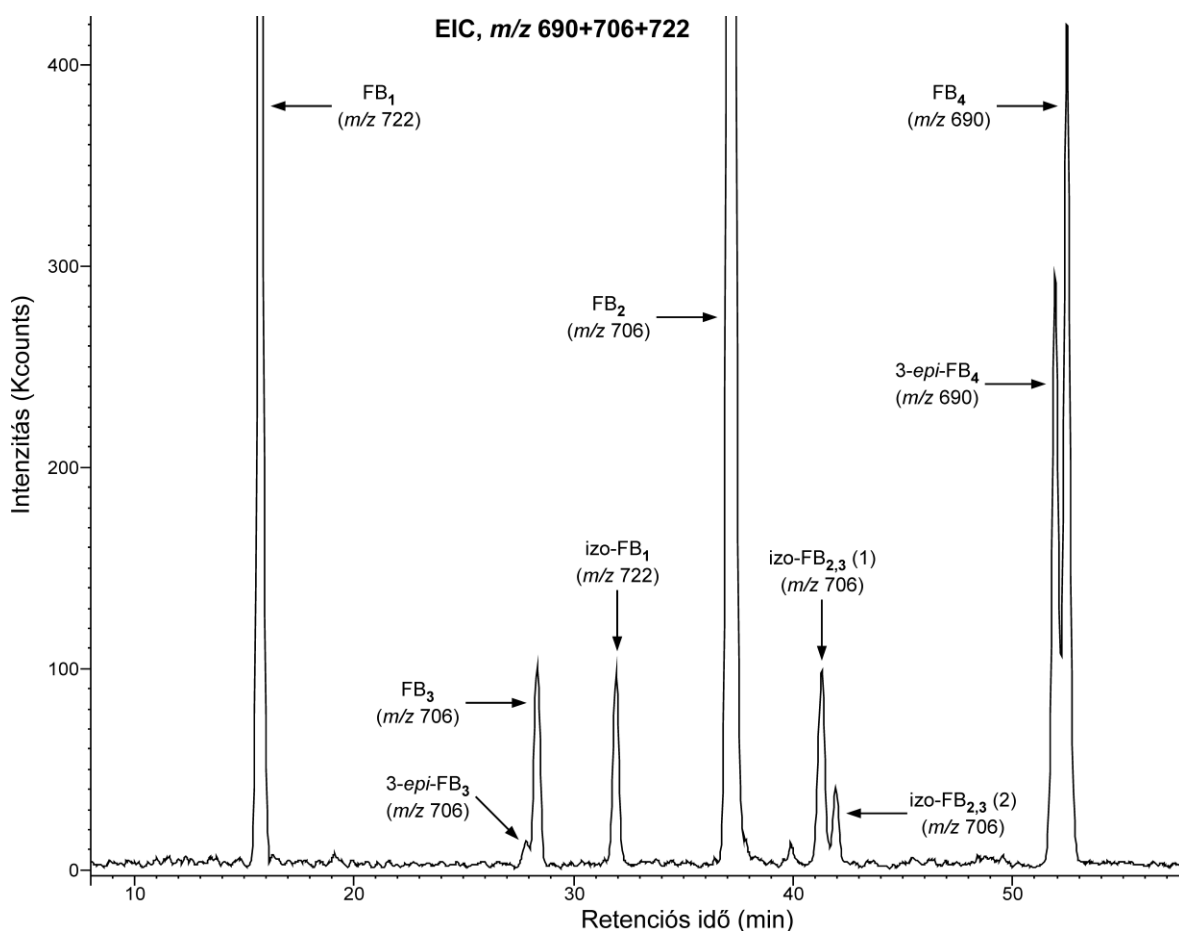
Az *Aspergillus* izolátumok több fumonizint termeltek, köztük olyanokat is, amelyeket még nem mutattak ki fekete *Aspergillus* tenyészetekből (21. táblázat). Igaz, az *Aspergillus* tenyészetekből detektált fumonizinek közül több is (FB₁, izo-FB_{2,3}(1), izo-FB_{2,3}(2)) csak nyomnyi mennyiségben volt kimutatható. A fumonizin-termelő izolátumok 0,017-19,6 mg/kg tartományban termeltek fumonizineket. Az átlagos toxin-termelés 5,16 mg/kg volt.

21. táblázat. Mazsoláról begyűjtött *A. niger* és *A. awamori* izolátumok fumonizin-termelőképessége. Az izolátum számokhoz lásd a 45. ábrát.

Izolátum száma	A detektált fumonizin izomerek mennyisége (µg/kg) ^a									Teljes FB-tartalom
	FB ₁	FB ₂	izo-FB _{2,3} (1)	izo-FB _{2,3} (2)	3- <i>epi</i> -FB ₄	FB ₄	3- <i>epi</i> -FB ₃	FB ₃	izo-FB ₁	
1.1	-	4908,33	196,34	70,07	91,52	366,47	-	-	260,75	5893,48
1.2	-	3109,12	98,52	37,38	161,77	335,63	-	-	181,48	3923,90
1.3	23,03	3310,45	113,90	34,16	168,05	291,03	-	-	189,57	4130,19
1.4	28,39	246,57	-	-	-	-	-	-	19,81	294,77
1.5	17,63	7153,52	226,08	69,68	143,22	418,71	-	-	458,22	8487,06
2.1	22,30	6572,47	226,45	82,87	71,79	461,02	-	-	333,82	7770,72
2.2	13,10	6689,70	417,95	105,96	63,69	594,05	-	-	296,64	8181,09
2.4	14,11	1562,46	63,46	21,11	26,81	153,16	-	-	89,33	1930,44
2.5	12,57	2971,50	92,76	32,73	35,23	140,20	-	-	221,17	3506,16
2.7	17,90	4816,58	154,19	81,34	38,48	382,27	-	-	389,28	5880,04
3.4	17,41	-	-	-	-	-	-	-	-	17,41
3.6	56,43	26,89	-	-	-	-	-	-	-	83,32
4.3	19,44	24,66	-	-	-	-	-	-	-	44,10
4.4.1	29,21	2239,33	118,50	50,15	102,87	474,78	-	-	85,65	3100,49
6.2	27,87	7102,55	269,88	86,16	505,10	698,28	-	-	318,38	9008,22
6.4	15,72	14350,36	458,21	133,04	832,33	1237,79	-	-	643,51	17670,96
6.6	21,55	18,52	-	-	-	-	-	-	-	40,07
6.7	2481,39	11649,00	593,79	183,08	1541,56	2155,48	73,36	538,49	379,49	19595,64
6.8	25,62	17,47	-	-	-	-	-	-	-	43,09
7.8	12,44	3239,09	21,80	12,44	4,32	27,17	-	-	267,49	3584,75

^a Az FB₁ toxin kalibrációs görbét és visszanyerési értékét az FB₁, izo-FB₁, FB₅ és izo-FB₅, míg az FB₂ toxin kalibrációs görbét és visszanyerési értékét az FB₂, 3-*epi*-FB₃, FB₃, 3-*epi*-FB₄, FB₄, izo-FB_{2,3}(1) és izo-FB_{2,3}(2) toxinok mennyiségi kiértékeléséhez alkalmaztuk; -, nem detektálható.

Ez az érték azonban közel három nagyságrenddel elmarad a *F. verticillioides* izolátumok fumonizin-termelésétől (Szécsi és mtsai 2010). A 6.7-es számú izolátum viszonylag jelentős mennyiségű FB₁ toxint is termelt (47. ábra, 21. táblázat). Ez igen érdekes adat – ami megerősítést, újabb kísérletek elvégzését igényli – mivel több közlemény (Desjardins és mtsai 1996; Butchko és mtsai 2006) szerint az *A. niger* nem képes sem az FB₁ sem az FB₃ toxinok szintézisére. Ezzel kapcsolatban ugyanakkor szeretném megjegyezni, mint ahogy a 4.3.1. fejezetben (85. oldal) és közleményünkben (Bartók és mtsai 2010a) is olvasható, hogy az általunk vizsgált *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészet mintából 28 FB₁ izomert tudtunk kimutatni, és a legtöbb izomert csak nyomnyi mennyiségben. Véleményünk szerint a fumonizinek bioszintézisét szabályozó génekben bekövetkező mutációk vagy transzkripció és transzláció hibák eredményezhetik a *F. verticillioides*-ben azt, hogy egy-egy funkció csoport a fumonizin váz másik szénatomjára illetve más térállásba kerül. Hasonló folyamatok vezethetnek egyes fekete *Aspergillus*



47. ábra. A 6.7-es számú *A. awamori* izolátum (43. ábra, 21. táblázat) kivonatának RP-HPLC/ESI-ITMS extrahált ion (EIC, m/z 690+706+722) kromatogramja (nagyított).

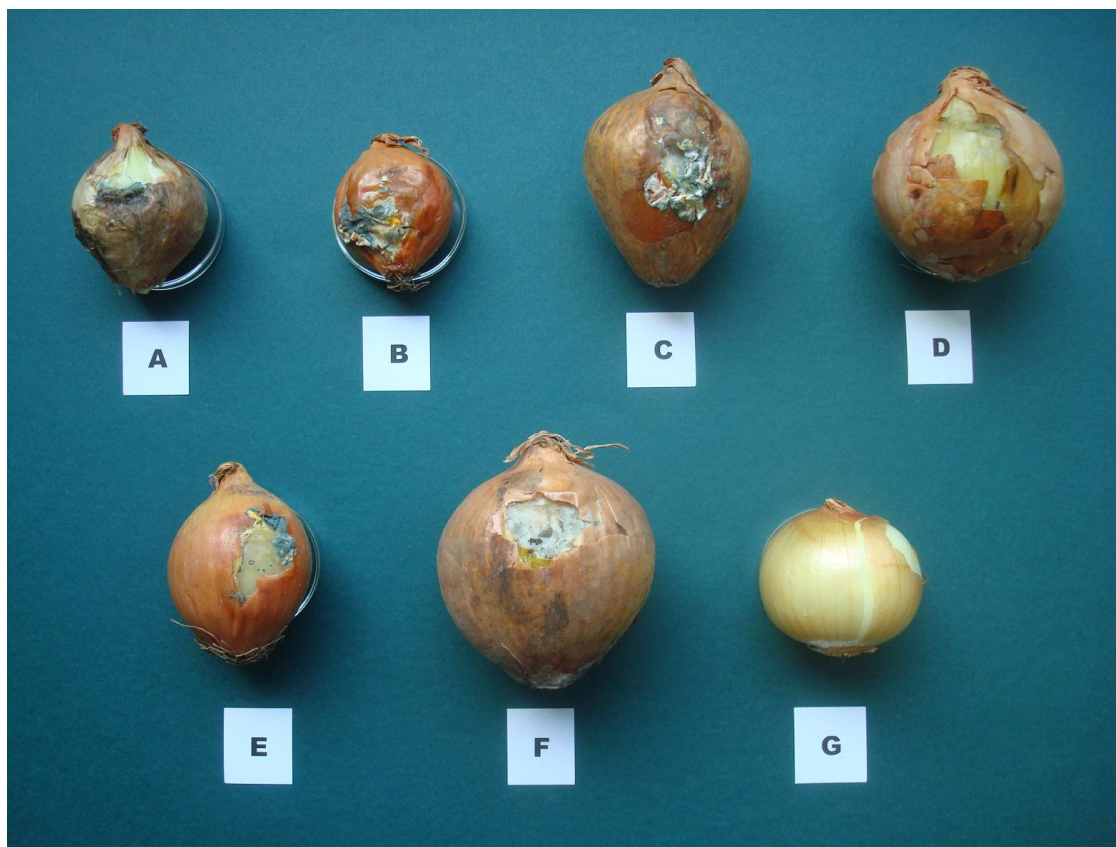
izolátumok FB₁ termeléséhez is, ugyanis mint Mansson és mtsai (2010) közölték és mi is kimutattuk (Varga és mtsai 2010), az *A. niger* az FB₁ toxin egy adott izomerjét képes szintetizálni.

Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a fumonizinek jelentős része már a szőlőszemen megtalálható és a szárítási folyamat vezet a fumonizin-tartalom növekedéséhez, mivel az *A. niger* a szőlőnek is kórokozója (Michailides és mtsai 2002, 2007; Varga és Kozakiewicz 2006).

Előkísérleteink során egyéb magas cukortartalmú gyümölcsökben is (füge, datolya) kimutattunk fekete *Aspergillus* fajokat és fumonizin-szennyezést (Kocsubé és mtsai 2011).

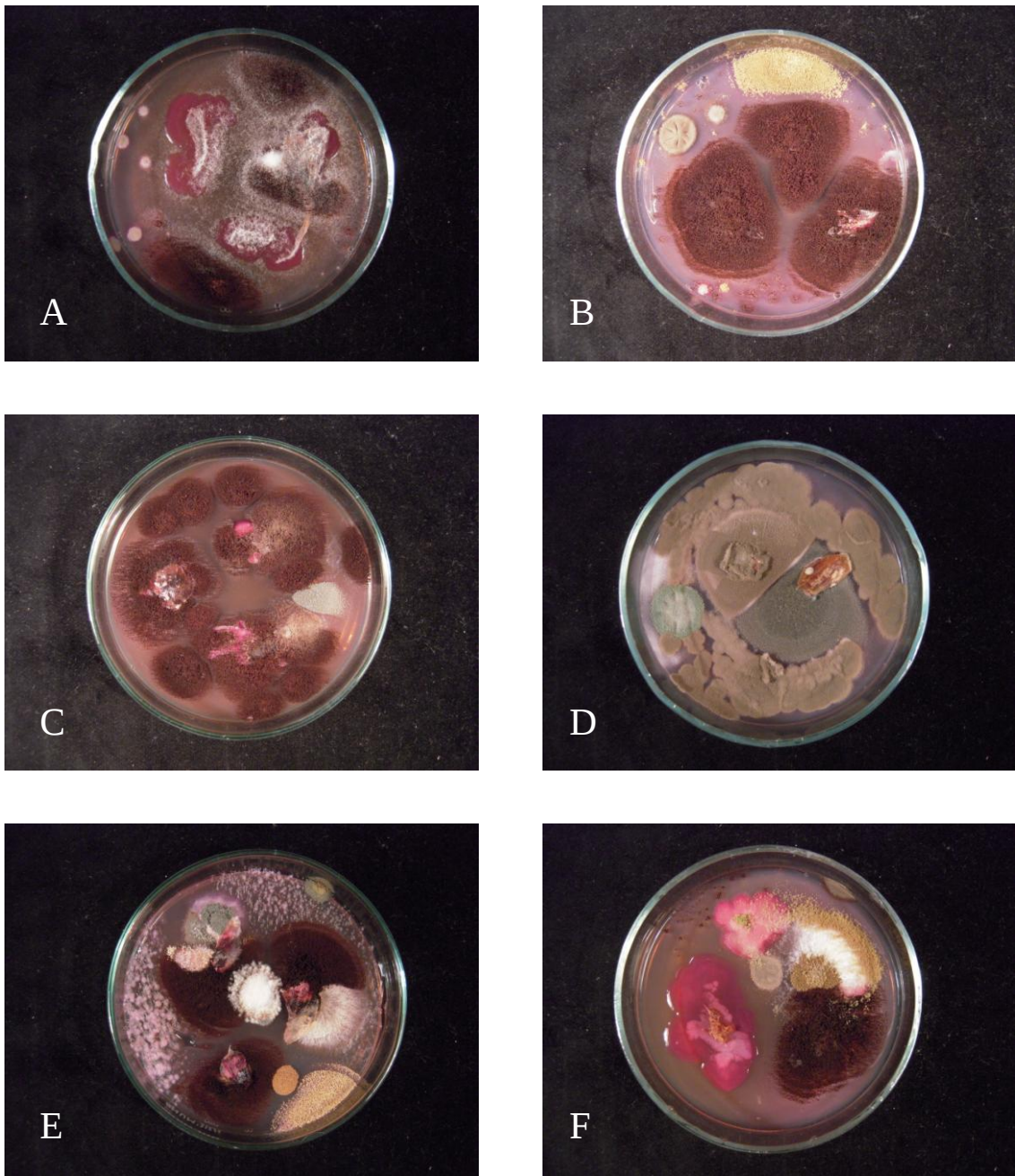
4.5. Fumonizinek RP-HPLC/ESI–ITMS azonosítása vöröshagymában

Összesen hat fertőzött (A-F) – a feketepenészes rothadás tüneteit is mutató – és egy kontroll (nem fertőzött, G) vöröshagymamintát (48. ábra) vizsgáltunk meg. A „D” minta kivételével – amelyből *A. fumigatus*-t, *A. versicolor*-t és *Penicillium* fajokat izoláltunk – a vöröshagymák külső és belső rétegeiből is sikeresen izoláltunk fekete *Aspergillus* fajokat (49. ábra).



48. ábra. A vizsgált fertőzött (A-F) és kontroll (G) vöröshagymaminták (Bartók Tibor felvétele).

A fekete *Aspergillus* fajok mellett egyéb *Aspergillus* fajokat is izoláltunk, úgymint: *A. ochraceus* (A és C minták), *A. fumigatus* (B minta) és *A. flavus* (E és F minta).



49. ábra. Vöröshagymaminták mikrobiótája DRBC táptalajon. (Kocsubé Sándor felvétele).

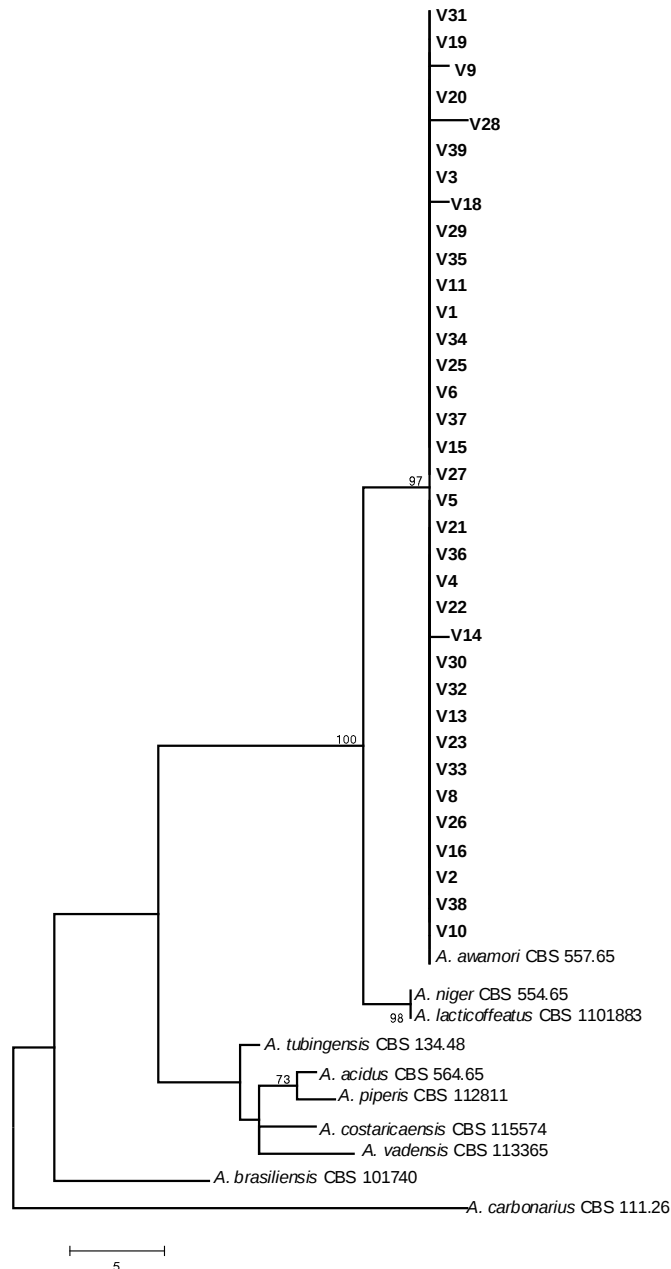
Az 5 mintáról (A, B, C, E, F) összesen 38 fekete *Aspergillus* izolátumot nyertünk. Ezeknek a mintáknak amplifikáltuk az ITS régióját, majd *RsaI* restrikciós enzimmel emésztettük a kapott fragmenteket. Az emésztést követően – a mazsolánál már leírtakhoz hasonlóan – az eltérő RFLP-mintázatok alapján a fekete *Aspergillus* törzsek két csoportját

különböztettük meg: N-mintázatot az *A. niger*, T-mintázatot pedig az *A. tubingensis* izolátumok esetében lehetett megfigyelni. Az *A. niger* ITS régiója tartalmazza az *RsaI* (5'-GT/AC-3') felismerési helyét a 75-ös pozíciónál, míg az *A. tubingensis* nem. Vizsgálataink alapján az izolátumaink közül 35 mutatott „N”-típusú PCR–RFLP-mintázatot.

Az izolátumok fajszerű besorolásához a fekete *Aspergillus* izolátumok kalmodulin génje egy szakaszának szekvencia analízisét alkalmaztuk (Samson és mtsai 2007). Az evolúciós kapcsolatokat a „Maximum Parsimony” módszer segítségével ábrázoltuk. A kalmodulin génszakaszok illesztése 26 parszimónia szempontjából informatív karaktert tartalmazott. Az analízis eredményeként kapott 653 egyforma hosszúságú fa közül egyet a 50. ábra mutat be (fahossz: 81, konzisztencia index: 0,74419, retenciós index: 0,9052). A vöröshagymamintákból nyert mind a 35 fekete *Aspergillus* izolátum az *A. awamori* fajhoz tartozott. Perrone és mtsai (2010) multilókusz szekvencia vizsgálat és AFLP analízis alapján megállapították, hogy az *A. awamori*, az *A. niger*-hez hasonló filogenetikai faj. Ez a faj az *A. niger*-től a molekuláris adatok, pl. számos fehérjét (β -tubulin, kalmodulin, α transzlációs elongációs faktor) kódoló gén szekvenciája alapján (Perrone és mtsai 2010) valamint AFLP és RAPD analízissel is (nem közölt adatok) könnyen megkülönböztethető. Az *A. niger*-hez hasonlóan az *A. awamori* izolátumok jelentős százaléka is képes ochratoxinok és fumonizinek bioszintézisére (Varga és mtsai 2010; Frisvad JC, személyes közlés).

A fumonizinek liofilizált vöröshagymaminták kivonataiból történő meghatározásához szintén többpontos (1 pg – 50 ng FB₁ és FB₂ injektálva az oszlopra) külső standard kalibrációt alkalmaztunk. Az FB₁ és FB₂ toxin kalibrációs görbéje a 10 pg – 10 ng tartományban lineáris volt ($r^2=0,9989$ és $0,9971$). Az FB₁ és FB₂ toxinok oldataival végzett visszanyerési vizsgálatok során 0,1 és 1 mg/kg koncentrációban adagoltuk a referencia anyagokat a kontroll vöröshagyma (G minta) liofilizált pormintáihoz. A visszanyerési értékek az FB₁ és FB₂ toxinra 93,7 és 96,7% illetve 90,4 és 99,4% volt.

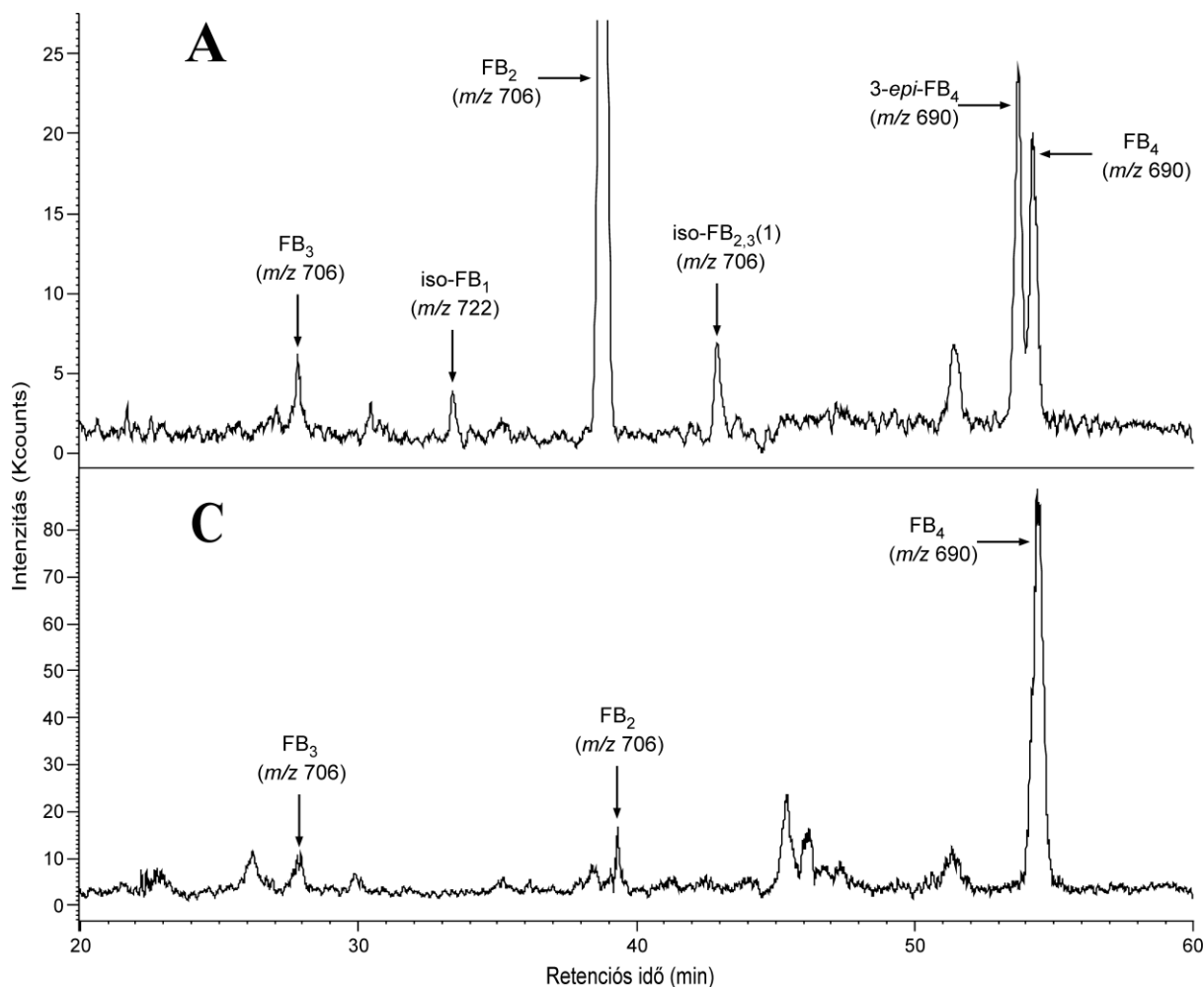
Két mintában (A és C) detektáltunk fumonizineket (51. ábra), teljes mennyiségük 0,32 és 0,33 mg/kg volt (22. táblázat). FB₂₋₄, 3-*epi*-FB₄ és izo-FB₁ (Mansson és mtsai 2010 szerint FB₆ toxin) toxinokat mutattuk ki, amelyeket az *A. awamori* fumonizin-termelésével is kapcsolatos korábbi közleményünkben már leírtunk (Varga és mtsai 2010). Korábban egy másik fumonizin-termelésre képes gombafajról, a *F. proliferatum*-ról is kimutatták, hogy a vöröshagymát is képes megfertőzni (Dissanayake és mtsai 2009a,b; Du Toit és mtsai 2003; Galvan és mtsai 2008; Stankovic és mtsai 2007). Vizsgálataink során azonban ezt a gombafajt a vöröshagymákról nem tudtuk izolálni.



50. ábra. A vöröshagymáról származó fekete *Aspergillus* izolátumok filogenetikai fája és fajszerű besorolásuk a kalmodulin szekvencia adatok alapján. Az ágak fölötti számok a „bootstrap” értékeket jelzik.

Továbbá, a *F. proliferatum* legnagyobb mennyiségben termelt fumonizinje az FB₁ toxin, amely a fertőzött vöröshagymamintákban nem volt kimutatható. Helyette az FB₂ és FB₄ toxinokat mutattuk ki a legnagyobb mennyiségben, amelyek az *A. niger* és az *A. awamori* fő fumonizinjei (Frisvad és mtsai 2007; Mogensen és mtsai 2010a; Varga és mtsai 2010). Ezek az adatok jelzik, hogy feltehetően az *A. awamori* felelős a vöröshagymák fumonizinszennyezéséért. Korábbi vizsgálatok jelezték, hogy az *A. niger*/*A. awamori* izolátumok

kétharmada képes fumonizineket termelni (Noonim és mtsai 2009; Logrieco és mtsai 2009; Mogensen és mtsai 2010; Varga és mtsai 2010). Érdekes eredmény, hogy az „A” mintában a 3-*epi*-FB₄ mennyisége meghaladta az FB₄ mennyiségét, ugyanakkor korábbi munkánk során a mazsolamintákban az FB₄ mennyisége minden esetben meghaladta a 3-*epi*-FB₄ mennyiségét (Varga és mtsai 2010). Csak nyomnyi mennyiségben (a jel/zaj viszony 3-4x-ese) sikerült kimutatni az FB₃ toxint (A és C minta), az izo-FB₁ (FB₆) toxint (A minta) és az FB_{2,3}(1) toxint (A és C minta, Varga és mtsai 2011).



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

A hagymában található alliin és egyéb antimikrobiális hatású komponensek miatt viszonylag kevés gombafaj képes rajta növekedni (Filtenborg és mtsai 1996), aminek következményeként elég ritkán lehet mikotoxinokat találni benne. Ochratoxint sem tudtak még kimutatni vöröshagymában, sőt amikor patulin-termelő *Penicillium expansum*, *P. urticae* vagy *Byssosclamyis nivea* törzsekkel fertőzték a hagymát, akkor sem tudtak patulint kimutatni (Frank 1977), mivel a műszerek akkori érzékenysége nagyságrendekkel elmaradt

a mikotoxin mérésre alkalmas mai berendezések érzékenységétől. A malformint amely az *A. niger* másodlagos anyagcseréjének terméke, a vöröshagyma külső burokleveleiben tudták kimutatni (Curtis és mtsai 1974). Noha az FB₁ toxint már azonosították *F. proliferatum* által fertőzött fokhagymában (Seefelder és mtsai 2002), ismereteink szerint vöröshagymában fumonizineket még nem mutattak ki. A két vöröshagymamintában viszonylag alacsony koncentrációban (~0,3 mg/kg) mutattunk ki fumonizineket (22. táblázat), vizsgálataink jelentőségének megítéléséhez több, különféle helyről (több országból) származó vöröshagymamintát célszerű a jövőben megvizsgálni.

22. táblázat. Vöröshagymaminták fumonizin-tartalma.

Minta	A detektált fumonizinek mennyisége (µg/kg) ^a						Teljes fumonizin-tartalom
	FB ₂	FB ₃	FB ₄	3- <i>epi</i> -FB ₄	izo-FB ₁ (FB ₆)	izo-FB _{2,3} (1)	
A	203,75	9,50	48,46	58,58	6,21	16,14	324,64
B	-	-	-	-	-	-	-
C	16,73	25,06	288,22	-	-	-	330,01
D	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-

^a Az FB₁ kalibrációs görbét és visszanyerési értékét az izo-FB₁, míg az FB₂ kalibrációs görbét és visszanyerési értékét az FB₂, FB₃, FB₄, 3-*epi*-FB₄ and izo-FB_{2,3}(1) toxinok mennyiségi kiértékeléséhez alkalmaztuk; -, nem detektálható.

Korábban, az *A. niger* és az *A. awamori* gombafajokkal kapcsolatban igazolták, hogy a fuzáriumokkal szemben alacsony vízaktivitás mellett is képesek fumonizineket termelni (Frisvad és mtsai 2007; Varga és mtsai 2010). A magas cukortartalmú mezőgazdasági termékeken kívül (pl. mazsola, füge) úgy tűnik, hogy a vöröshagyma viszonylag száraz külső buroklevelei elősegítik ezeknek a gombafajoknak a fumonizin-termelését. További vizsgálatok szükségesek annak az igazolására is, hogy vajon a fekete *Aspergillus* fajok a tárolás során szennyezik a vöröshagymát, vagy még a szántóföldön, mivel több szerzőnek is az a véleménye, hogy az *A. niger*-nek endofita életmódja van a hagymában (Lorbeer és mtsai 2002; Tuffley és Lorbeer 2002; Palencia és mtsai 2010).

5. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK

Különféle termőhelyeken, különféle növényfajokról (főként kukorica) és egyéb forrásokból begyűjtött és azonosított összesen 60 *F. verticillioides* izolátummal termeltettünk fumonizineket szilárd fermentációval, rizstenyészetben. Viszonylag meredek grádiens RP-HPLC elválasztás után ESI-ITMS eljárással detektáltuk az FB₁₋₄ toxinokat. A vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy mindegyik izolátum termelt fumonizineket és az izolátumok közel 50%-a jelentős mennyiségű FB₁₋₄ toxint termelt. Sem az FB₁₋₄-termelés mennyiségét, sem a négy FB analóg egymás közötti arányát az izolátum eredete nem befolyásolta. Az izolátumok többségénél (85%) a termelt teljes FB₁₋₄ mennyiségének átlagosan 75 %-a FB₁, 18 %-a FB₂, 5 %-a FB₃, 2 %-a FB₄ volt. **Az izolátumok kisebb része (12%) jelentősebb mennyiségben termelte az FB₃ toxint, míg két izolátum a többtől lényegesen eltérő arányban termelte az FB₂ és FB₄ toxinokat, így feltételezhetjük, hogy Magyarországon a *F. verticillioides* legalább két különböző kemotípusa kíséri a kukoricánövényt (Szécsi és mtsai 2010). Együttműködésben végzett kutatásunk először térképezte fel Magyarországon a *F. verticillioides* elterjedését.**

Az előkísérletek alapján kiválasztott rizstenyészet kivonatának – meredekebb grádiens alkalmazó – RP-HPLC/ESI-ITMS és ITMS² vizsgálata során, korábban már publikált fumonizinek mellett, **41 új fumonizint és fumonizin izomert azonosítottunk (Bartók és mtsai 2006, Bartók és mtsai 2008).** A fő komponens (FB₁) 0,02%-ában a mintában jelenlévő fumonizinekről még jellemző – az azonosításukat segítő – MS² spektrumokat sikerült nyerni. **A molekulaionok MS² spektruma alapján a különböző fumonizin analógokra részletes fragmentációs útvonalakat vázoltunk fel (köztük újakat is).** A számos új fumonizin közül ki kell emelni az FD-t és az FBX analógokat. Az FD toxin esetében a szénlánc – az eddig publikált fumonizinekhez képest – kevesebb atomot tartalmaz, ami valószínűsíti, hogy a hosszabb szénláncú komponensek prekursora lehet. **A 16 új FBX analógnál a fumonizin vázon lévő OH-csoportok közül egyet vagy kettőt nem a trikarballilsav, hanem egyéb szerves sav (cisz-akonitsav, oxálfumársav, oxálborostyánkősav) észteresít.** Ezt a fumonizin csoportot az FB analógokhoz hasonló szerkezetük miatt neveztük el FBX-nek. Az FBX-típusú fumonizinek illetve fumonizin prekursorok azonosításával igazoltuk a fumonizinek trikarballil-csoportjai citrát-ciklus eredetét, mivel a TCA az előbb említett szerves savakból egy-két enzimatis lépéssel kialakulhat.

A fumonizin izomerek HPLC elválasztására a korábban közlteknl hatékonyabb módszert dolgoztunk ki, egy – a gyártó által szerkezeti izomerek elválasztására javasolt – RP-HPLC oszlop és a korábban alkalmazotthoz képest kevésbé meredek grádiens elúció felhasználásával. Ezzel az oszloppal **az FB₁ és FB₅ toxinok 28 (Bartók és mtsai 2010a) valamint 22 izomerjét (Bartók és mtsai 2011a) sikerült elválasztani és ESI–ITMS valamint ESI–TOFMS eljárásokkal azonosítani *F. verticillioides* izolátummal fertőzött rizstenyészet kivonatából.** Az FB₁ és az FB₅ izomerek molekulaionjai ITMS² spektrumaiban 15 és 20 jellemző fragmension volt megfigyelhető, köztük az azonosításukat megkönnyítő, a CID fragmentáció végén visszamaradó szénhidrogén váz is (m/z 299 és m/z 297). Az FB₁- és FB₅ izomerek FB₁ toxin-tartalomra vonatkoztatott relatív mennyisége 0,001 és 0,579% valamint 0,001 és 0,304% között volt. Három FB₁ és öt FB₅ toxin izomer fordult elő viszonylag nagyobb mennyiségben. Esetükben nyílik lehetőség a szerkezetvizsgálathoz szükséges mennyiségű és minőségű anyag előállítására. **A pontos tömeg meghatározására alkalmas TOFMS eljárást kutatócsoportunk alkalmazta először fumonizin izomerek azonosítására.** A pontos tömegmérés alapján a TOFMS készülék „Mass Hunter” szoftvere mindegyik FB₁ és FB₅ izomer esetén az első helyen javasolta a C₃₄H₅₉NO₁₅ és C₃₄H₅₉NO₁₆ tapasztalati képleteket.

Az ESI–ITMS és ESI–TOFMS készülékekkel – a kevésbé meredek grádiens HPLC elválasztást alkalmazva – **hat (2-2-2 izomer) új, a korábban közlteknl magasabb molekulatömegű fumonizint is azonosítottunk (Bartók és mtsai 2010b).** A HPLC elválasztás során ezek a fumonizinek közel 100% MeCN-nel (0,1% HCOOH-val kiegészítve) eluálódtak a C18-as állófázist tartalmazó HPLC oszlopról, jelezve, hogy az addig közölt fumonizineknél jóval apolárisabbak. Az ITMS spektrumok egyértelműen mutatták az apoláris fumonizinek molekulaionjai m/z értékét (960, 984, 986). A molekulaionok CID-MS spektrumaiban található fragmensionok m/z értéke (beleértve a szénhidrogén váz 299-es m/z értékét is) jelezte, hogy a magas molekulatömegű fumonizinek szerkezete az FB₁ toxinéhoz hasonló, kivéve azt, hogy további funkciós csoport is található a molekulájukban. A TOFMS műszerrel mért pontos tömegértékek alapján a kiértékelő szoftver az új komponensek esetében egyértelműen jelezte a C₅₀H₈₉NO₁₆, C₅₂H₈₉NO₁₆ és C₅₂H₉₁NO₁₆ tapasztalati képleteket a hozzájuk tartozó számított pontos tömegértékekkel együtt (960,6254; 984,6254 és 986,6411). Ezekből a tapasztalati képletekből – az FB₁ toxin tapasztalati képlete segítségével – **sikerült azonosítani a fumonizin vázon lévő harmadik acil-csoportokat (palmitil, linolil vagy**

oleil), azaz esetükben feltehetően a fumonizin váz egyik OH-csoportját palmitinsav, linolsav és olajsav észteresíti, vagy ezek a szerves savak – hasonlóan a ceramidokhoz – a primer amino-csoporttal képeznek savamidot. A fumonizin irodalomban jelenleg alkalmazott elnevezéseket (pl. FB_1 , $PHFB_1$ = részlegesen hidrolizált FB_1 ; HFB_1 = hidrolizált FB_1) figyelembe véve az új fumonizineket észterezett FB_1 toxinoknak (EFB_1) neveztük el. A nevük végén található két betű utal a harmadik szerves savra (EFB_1 PA, izo- EFB_1 PA, EFB_1 LA, izo- EFB_1 LA, EFB_1 OA és izo- EFB_1 OA). A harmadik acil-csoport miatt ezek a vegyületek a többi, poláris karakterű fumonizinhez képest eltérő, erősebb biológiai hatással (toxicitással) rendelkezhetnek.

Szintén a kevésbé meredek grádiens elválasztást alkalmazva a mások által közölt FP_{1-3} toxinokon kívül öt új **FP analógot, az FP_4 toxint és négy FP izomert (izo- FP_{1-4}) sikerült kimutatnunk a vizsgált rizstenyészet kivonatban (Bartók és mtsai 2011b).** Az új FP analógok létezését az alábbi kísérleti adatok támasztották alá: 1) azonos kromatografálási körülmények között nyert retenciós idők, összehasonlítva azokat a már ismert FB_{1-4} és FP_{1-3} vegyületek retenciós idejével és az FB_1 toxinra vonatkoztatott relatív retenciókkal; 2) ESI-TOFMS mérés során kapott pontos tömeg adatok; 3) ESI-ITMS²-el nyert CID-MS spektrumok és fragmentációs mintázat. Az FP_{1-4} toxinok retenciós idő szerinti sorrendje ($FP_1 < FP_3 < FP_2 < FP_4$) megegyezett az FB_{1-4} toxinok sorrendjével ($FB_1 < FB_3 < FB_2 < FB_4$). Ezek az elúciós sorrendek segítették az FP_4 vegyület azonosítását a TOFMS és az ITMS eljárással is.

Különböző országokból származó mazsolaminták fumonizin-tartalmát és a mazsolákról izolált fekete *Aspergillus* fajok táptalajon történő fumonizin-termelését vizsgáltuk. Összesen 72, mazsoláról származó fekete *Aspergillus* izolátum ITS régiójának PCR-RFLP analízise, valamint a kalmodulin gén egy szakaszának szekvencia analízise alapján 30 izolátum tartozott az *A. niger* és *A. awamori* fajhoz, közülük az RP-HPLC/ESI-ITMS analízis alapján 20 termelt táptalajon átlagosan 5,16 mg/kg fumonizint. **A korábban *A. niger*-ben azonosított FB_2 , FB_4 és izo- FB_1 (FB_6) toxinok mellett kimutattunk néhány olyan fumonizin izomert is – legtöbbjüket nyomnyi mennyiségben – melyeket korábban *Aspergillus* fajokban nem detektáltak (pl. FB_1 , FB_3 , 3-*epi*- FB_3 , 3-*epi*- FB_4).** A mazsolaminták átlagos fumonizin-tartalma 7,22 mg/kg volt, ami közel kétszerese az EU-ban feldolgozatlan kukoricára érvényes egészségügyi határértéknek (4 mg/kg). Egy Kaliforniából származó mintában közel 36 mg/kg összfumonizin-tartalmat mutattunk ki, ami kilencszerese az előbb említett határértéknek. A mazsolából és a fekete *Aspergillus* fajokkal fertőzött táptalajmintákból készített kivonatok RP-HPLC/ESI-ITMS analízise

során a speciális HPLC oszloppal és kevésbé meredek grádiens elválasztással **először mutattuk be biológiai mintából a 3-*epi*-FB₄ és FB₄ toxinok elválasztását.** Ezzel az elválasztással felhívtuk a figyelmet arra, hogy biológiai mintákból a 3-*epi*-FB₃ és FB₃ valamint a 3-*epi*-FB₄ és FB₄ toxinok csak megfelelő hatékonyságú HPLC oszloppal, kevésbé meredek grádiens, esetleg izokratikus analízissel választhatók el egymástól (Varga és mtsai 2010). Fentiek alapján valószínűsíthető, hogy szükség lehet – amennyiben a további vizsgálatok hasonló eredményeket hoznak – azon magas cukortartalmú élelmiszerek (pl. mazsola, füge, datolya, aszalt gyümölcsök) esetében is határérték megállapítására, amelyeket a fekete *Aspergillus* fajok képesek megfertőzni és a szubsztrátban fumonizineket szintetizálni.

A Magyarországon kiskereskedelmi forgalomban vásárolt penészes vöröshagymaminták (6 db) külső száraz és belső húsos burokleveleinek mikrobióta vizsgálata azt mutatta, hogy egy kivételével az összes minta fekete *Aspergillus* fajokkal volt fertőződve. Fajszintű besorolásukat a kalmodulin gén egy szakaszának szekvencia analízisével végeztük el. **Az izolátumok szekvencia-alapú vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy mind a 35 izolátum az *A. awamori* fajhoz tartozott. Két minta 0,3 mg/kg koncentrációban volt szennyezve fumonizinekkel.** Az izomerek közül izo-FB₁-et (FB₆), FB₂₋₄-et, 3-*epi*-FB₄-et, és egy izo-FB_{2,3} formát azonosítottunk. Érdekes megfigyelés, hogy **az egyik mintában a 3-*epi*-FB₄ mennyisége valamivel meghaladta az FB₄ toxin mennyiségét, míg a másik fumonizin-tartalmú mintában a 3-*epi*-FB₄-et nem tudtuk kimutatni.** A szekvencia és a fumonizin összetétel vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy a Magyarországról származó vöröshagymák feketepenészes rothadásáért és fumonizin-szennyezéséért az *A. awamori* a felelős (Varga és mtsai 2011).

6. TOVÁBBI FELADATOK, LEHETŐSÉGEK A FUMONIZIN KUTATÁSBAN AZ ÉRTEKEZÉS EREDMÉNYEINEK TÜKRÉBEN

- 1) Annak a vizsgálata, hogy a rizstenyészetben legjobb fumonizin-termelőképeséssel rendelkező *F. verticillioides* izolátumok az értekezésben közölt új fumonizineket vagy egy részüket képesek-e *in vivo* körülmények között is szintetizálni. Ehhez tenyészkerti körülmények között a kiválasztott izolátumokkal a kukoricanövények (csövek) mesterséges fertőzését tervezzük.
- 2) Az értekezésben közölt új fumonizineken kívül a részletesen vizsgált *F. verticillioides* izolátum egyéb még azonosítatlan fumonizineket is termelt. Ezek közül célszerű lenne minél többet azonosítani.
- 3) Az azonosított új fumonizinek izolálása – különös tekintettel az FBX- és a három acil-csoportot tartalmazó EFB₁ analógokra – és szerkezetük spektroszkópiás módszerekkel történő meghatározása. Erre a fő komponenshez (FB₁ toxin) képest legalább 0,1% mennyiségben a rizstenyészetben jelenlévő fumonizinek esetén nyílik reális lehetőség.
- 4) A szerkezetazonosított új fumonizinek toxicitásának vizsgálata sejtenyészetben, kontrollként az FB₁ toxint alkalmazva.
- 5) Az értekezés 1. táblázatában szereplő fumonizin-termelésre képes mikroszkopikus gombafajok vizsgálata a mai érzékeny HPLC/MS és MSMS eljárásokkal, annak az eldöntésére, hogy képesek-e termelni egyéb fumonizineket is.
- 6) Fekete *Aspergillus* fajok által fertőzött élelmiszeripari alapanyagok és termékek fumonizin-tartalmának rutin vizsgálata annak eldöntésére, hogy fogyasztásukban rejlik-e és milyen fokú élelmiszerbiztonsági kockázat. A mérési eredményekről az Élelmiszerbiztonsági Hivatal (MÉBIH) és az EU illetékes bizottságának a tájékoztatása.
- 7) Fekete *Aspergillus* fajok fumonizin génklasztereinek vizsgálata, különös tekintettel azon izolátumokra, amelyek tenyészeiben az FB₂ és FB₄ toxinok mellett egyéb fumonizinek is detektálhatók.

7. IRODALOMJEGYZÉK

Abbas HK, Riley RT (1996) The presence and phytotoxicity of fumonisins and AAL-toxin in *Alternaria alternata*. *Toxicon* 34:133-136

Abbas HK, Shier WT, Seo JA, Lee YW, Musser SM (1998) Phytotoxicity and cytotoxicity of the fumonisin C and P series from *Fusarium* spp. fungi. *Toxicon* 36:2033-2037

Abramovic BF, Jaksic SM, Masic ZS (2005) Efficiency of crude corn extract clean-up on different columns in fumonisin determination. *Proc Nat Sci Matica Srpska* 108:95-102

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

Ádám AL, Kohut G, Hornok L (2008a) Cloning and characterization of a HOG-type MAP kinase encoding gene from *Fusarium proliferatum*. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 43:1-13

Ádám AL, Kohut G, Hornok L (2008b) *Fphog1*, a HOG-type MAP kinase gene, is involved in multistress response in *Fusarium proliferatum*. *J Basic Microbiol* 48:151-159

Alberts JF, Gelderblom WCA, Thiel PG, Marasas WFO, van Schalkwyk DJ, Behrend Y (1990) Effects of temperature and incubation period on the production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 56:1729-1733

Alberts JF, Gelderblom WCA, Vleggaar R, Marasas WFO, Rheeder JP (1993) Production of [14C] fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* MRC 826 in corn cultures. *Appl Environ Microbiol* 59:2673-2677

Alexander NJ, Proctor RH, McCormick SP (2009) Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews* 28:198-215

ApSimon JW, Blackwell BA, Edwards OE, Fruchier A, Miller JD, Savard ME, Young JC (1994a) The chemistry of fumonisins and related compounds – Fumonisins from *Fusarium moniliforme* – Chemistry, structure and biosynthesis. *Pure Appl Chem* 66:2315-2318

ApSimon JW, Blackwell BA, Edwards OE, Fruchier A (1994b) Relative configuration of the C-1 to C-5 fragment of fumonisin B₁. *Tetrahedron Lett* 35:7703-7706

ApSimon JW, Blackwell BA, Edwards OE, Fruchier A (1995) Relative configuration of the C-10 to C-16 fragment of fumonisin B₁. *Tetrahedron Lett* 36:1973-1977

Arranz I, Baeyens WRG, van der Weken G, de Saeger S, van Peteghem C (2004) HPLC determination of fumonisin mycotoxins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:195-203

Azcona-Olivera JJ, Abouzied MM, Plattner RD, Pestka JJ (1992) Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisin B₁, fumonisin B₂ and fumonisin B₃. *J Agric Food Chem* 40:531-534

Bailly JD, Querin A, Tardieu D, Guerre P (2005) Production and purification of fumonisins from a highly toxigenic *Fusarium verticillioides* strain. *Revue Méd Vét* 156:547-554

Baker SE (2006) *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Med Mycol* 44: Suppl i, S17-21

Barna-Vetró I, Szabó E, Fazekas B, Solti L (1999) ELISA teszt fumonizin B₁ mérésére. *Növényvédelem* 35:609-617

Barna-Vetró I, Szabó E, Fazekas B, Solti L (2000) Development of a sensitive ELISA for the determination of fumonisin B₁ in cereals. *J Agric Food Chem* 48:2821-2825

Barna-Vetró I, Solti L (2001) Enzim-immunanalitikai módszerek mikotoxinok mérésére. in: *Penészgombák és mikotoxinok a táplálékláncban*, szerk. Kovács F, MTA Agrártudományok Osztálya kiadványa, pp 29-41

Bartók T, Szécsi Á, Szekeres A, Mesterházy Á, 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

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 Suppl B*. 36:315–319

Bartók T, Tölgyesi L, Szekeres A, Varga M, Bartha R, Szécsi Á, Bartók M, Mesterházy Á (2010a) 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

Bartók T, Tölgyesi L, Mesterházy Á, Bartók M, Szécsi Á (2010b) 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

Bartók T, Tölgyesi L, Varga J, Szécsi Á, Varga M, Bartók M, Mesterházy Á, Gyimes E, Véha A (2011a) 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).

Bartók T, Tölgyesi L, Szécsi Á, Bartók M, Mesterházy Á, Gyimes E, Véha A (2011b) Detection of unknown fumonisin P mycotoxins in a *Fusarium verticillioides* culture by time-of-flight- and ion trap electrospray mass spectrometries following reversed-phase high-performance liquid chromatography separation (közlésre beküldve).

Beier RC, Stanker LH (1997) Molecular models for the stereochemical structures of fumonisin B₁ and B₂. *Arch Environ Contam Toxicol* 33:1–8

- Bennett GA, Richard JL (1994) Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. *J AOAC Int* 77:501-506
- 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
- Blackwell BA, Miller JD, Savard ME (1994) Production of carbon-14 labelled fumonisin in liquid culture. *J AOAC Int* 77:506-511
- Blackwell BA, Edwards OE, Fruchier A, ApSimon JW, Miller JD (1996) NMR structural studies of fumonisin B₁ and related compounds from *Fusarium moniliforme*. *Adv Exp Med Biol* 392:75-91
- Bojja RS, Cerny RL, Proctor RH, Du L (2004) Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *J Agric Food Chem* 52:2855-2860
- Bolger M, Coker RD, DiNovi M, Gaylor D, Gelderblom WCA, Olsen M, Paster N, Riley RT, Shephard G, Speijers GJA (2001) Fumonisins. Safety evaluation of certain mycotoxins in foods. FAO Food and Nutrition Paper 74. World Health Organization, Geneva, pp. 103-279
- Bondy GS, Pestka JJ (2000) Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol Environ Health* 3:109-143
- Booth C (1971) The Genus *Fusarium*. CMI, Eastern Press, UK. 237 pp.
- Boyle CD, Harmange JC, Kishi Y (1994) Novel structure elucidation of AAL toxin T_A backbone. *J Am Chem Soc* 116:4995-4996
- Boyle CD, Kishi Y (1995a) Absolute configuration at the tricarballic acid moieties of fumonisin B₂. *Tetrahedron Lett* 36:4579-4582
- Boyle CD, Kishi Y (1995b) Absolute configuration at the tricarballic acid moieties of fumonisin B₁ and AAL toxin T-A. *Tetrahedron Lett* 36:5695-5698
- Branham BE, Plattner RD (1993) Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 124:99-104
- Broomhead JN, Ledoux DR, Bermudez AJ, Rottinghaus GE (2002) Chronic effects of fumonisin B₁ in broilers and turkeys fed dietary treatments to market age. *Poultry Sci* 81:56-61
- Brown DW, McCoy CP, Rottinghaus GE (1994) Experimental feeding of *Fusarium moniliforme* culture material containing fumonisin B₁ in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Vet Diagn Invest* 6:123-124
- Brown DW, Cheung F, Proctor RH, Butchko RAE, Zheng L, Lee Y, Utterback T, Smith S, Feldblyum T, Glenn A, Plattner RD, Kendra DF, Town CD, Whitelaw CA (2005)

Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol* 42:848-861

Brown DW, Butchko RAE, Busman M, Proctor RH (2007) The *Fusarium verticillioides* *FUM* gene cluster encodes a Zn(II)2Cys6 protein that affects *FUM* gene expression and fumonisin production. *Eukaryot Cell* 6:1210-1218

Bucci TJ, Howard PC, Tolleson WH, LaBorde JB, Hansen DK (1998) Renal effect of fumonisin mycotoxins in animals. *Toxicol Pathol* 26:160-164

Butchko RAE, Plattner RD, Proctor RH (2003a) *FUM13* encodes a short chain dehydrogenase/reductase required for C-3 carbonyl reduction during fumonisin biosynthesis in *Gibberella moniliformis*. *J Agric Food Chem* 51:3000-3006

Butchko RAE, Plattner RD, Proctor RH (2003b) *FUM9* is required for C-5 hydroxylation of fumonisins and complements the meiotically defined *Fum3* locus in *Gibberella moniliformis*. *Appl Environ Microbiol* 69:6935-6937

Butchko RAE, Plattner RD, Proctor RH (2006) Deletion analysis of *FUM* genes involved in tricarballic ester formation during fumonisin biosynthesis. *J Agric Food Chem* 54:9398-9404

Caldas ED, Jones AD, Winter CK, Ward B, Gilchrist DG (1995) Electrospray-ionization mass spectrometry of sphinganine analog mycotoxins. *Anal Chem* 67:196-207

Caldas ED, Sadilkova K, Ward BL, Jones AD, Winter CK, Gilchrist DG (1998) Biosynthetic studies of fumonisin B₁ and AAL toxins. *J Agric Food Chem* 46:4734-4743

Caloni F, Spotti M, Pompa G, Zucco F, Stamatii A, De Angelis I (2002) Evaluation of fumonisin B₁ and its metabolites absorption and toxicity on intestinal cells line Caco-2. *Toxicon* 40:1181-1188

Cawood ME, Gelderblom WCA, Vleggaar R, Behrend Y, Thiel PG, Marasas WFO (1991) Isolation of the fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. *J Agric Food Chem* 39:1958-1962

Chai W, Leteux C, Lawson AM, Stoll MS (2003) On-line overpressure thin-layer chromatographic separation and electrospray mass spectrometric detection of glycolipids. *Anal Chem* 75:118-125

Chen JP, Mirocha CJ, Xie W, Hogge L, Olson D (1992) Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Appl Environ Microbiol* 58:3928-3931

Churchwell MI, Cooper WM, Howard PC, Doerge DR (1997) Determination of fumonisins in rodent feed using HPLC with electrospray mass spectrometric detection. *J Agric Food Chem* 45:2573-2578

Curtis RW, Stevenson WR, Tuite J (1974) Malformin in *Aspergillus niger*-infected onion bulbs (*Allium cepa*). *Appl Microbiol* 28:362-365

- Dantzer WR, Hopper J, Mullin K, Hendrich S, Murphy PA (1999) Excretion of (14)C-fumonisin B₁, (14)C-hydrolyzed fumonisin B₁ and (14)C-fumonisin B₁-fructose in rats. *J Agric Food Chem* 47:4291-4296
- Dawlatana M, Coker RD, Nagler MJ, Blunden G (1995) A normal-phase HPTLC method for the quantitative determination of fumonisin B₁ in rice. *Chromatographia* 41:187-190
- Desai K, Sullards MC, Allegood J, Wang E, Schmelz EM, Hartl M, Humpf H-U, Liotta DC, Peng Q, Merrill AH (2002) Fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585:188-192
- Desjardins AE, Plattner RD, Shackelford DD, Leslie JF, Nelson PE (1992) Heritability of fumonisin B₁ production in *Gibberella fujikuroi* mating population. *Appl Environ Microbiol* 58:2799-2805
- Desjardins AE, Plattner RD, Proctor RH (1996) Linkage among genes responsible for fumonisin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* mating population. *Appl Environ Microbiol* 62:2571-2576
- Desjardins AE, Proctor RH (2007) Molecular biology of Fusarium mycotoxins. *Int J Food Microbiol* 119:47-50
- Diaz GJ, Boermans HJ (1994) Fumonisin toxicosis in domestic-animals – A review. *Vet Hum Toxicol* 36:48-555
- Ding Y, Bojja RS, Du L (2004) Fum3p, a 2-ketoglutarate-dependent dioxygenase required for C-5 hydroxylation of fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *Appl Environ Microbiol* 70:1931-1934
- Dissanayake ML, Tanaka S, Ito S (2009a) Fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* strains isolated from *Allium fistulosum* plants and seeds in Japan. *Lett Appl Microbiol* 48:598-604
- Dissanayake ML, Kashima R, Tanaka S, Ito S (2009b) Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. *J Gen Plant Pathol* 75:37-45
- Doerge DR, Howard PC, Bajic S, Preece S, Games DE (1994) Determination of fumonisins using on-line liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 8:603-606
- Domán I (1952) Tömeges megbetegedések hízó sertések között. *Magy Állatorv Lapja* 7:202-208
- Dombrink-Kurtzman MA, Javed T, Bennet GA, Richard JL, Cote LM, Buck WB (1994) Lymphocyte cytotoxicity and erythrocyte abnormalities induced in broiler chicks by fumonisin B₁ and B₂ and moniliformin from *Fusarium proliferatum*. *Mycopathol* 124:47-54

Dragan YP, Bidlack WR, Cohen SM, Goldsworthy TL, Hard GC, Howard PC, Riley RT, Voss KA (2001) Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity and risk assessment: fumonisin B₁ as an example. *Toxicol Sci* 61:6-17

Du L, Zhu X, Gerber R, Huffman J, Lou L, Jorgenson J, Yu F, Zaleta-Rivera K, Wang Q (2008) Biosynthesis of sphinganine-analog mycotoxins. *J Indust Microbiol Biotech* 35:455-464

Dupuy J, Le Bars P, Boudra H, Le Bars J (1993) Thermostability of fumonisin B₁, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. *Appl Environ Microbiol* 59:2864-2867

Du Toit LJ, Inglis DA, Pelter GQ (2003) *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease* 87:750-750

Edrington TS, Kamps-Holzapple CA, Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH, Rottinghaus GE (1995) Acute hepatic and renal toxicity in lambs dosed with fumonisin-containing culture material. *J Anim Sci* 73:508-515

Edwards OE, Blackwell BA, Driega AB, Bensimon C, ApSimon JW (1999) The absolute stereochemistry of the ester functions of fumonisin B₁. *Tetrahedron Lett* 40:4515-4518

El-Nekeety AA, El-Kholy W, Abbas NF, Ebaid A, Amra HA, Abdel-Wahhab MA (2007) Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicon* 50:256-269

Enongene EN, Sharma RP, Bhandari N, Miller JD, Meredith FI, Voss KA, Riley RT (2002) Persistence and reversibility of the elevation in free sphingoid bases induced by fumonisin inhibition of ceramide synthase. *Toxicol Sci* 67:173-181

Faberi A, Foglia P, Pastorini E, Samperi R, Lagana A (2005) Determination of type B fumonisin mycotoxins in maize and maize-based products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a QqQ (linear ion trap) mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19:275-282

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

Fazekas B, Bajmócy E, Glávits R, Fenyvesi A (1997) Fumonizin-mikotoxikózisok Magyarországon: Lovak agylágyulása, sertések hízlalási tüdővízenyője. *Magy Állatorv Lapja* 119:137-139

Fazekas B, Koncz-Tar A, Tóth-Hajdú E, Zomborszky-Kovács M (2000) Reusability of immunoaffinity columns for determination of fumonisins in maize. *Nat Toxins* 7:259-263

Filtenborg O, Frisvad JC, Thrane U (1996) Moulds in food spoilage. *Int J Food Microbiol* 33:85-102

Fodor J, Meyer K, Riedlberger M, Bauer J, Horn P, Kovács F, Kovács M (2006) Distribution and elimination of fumonisin analogues in weaned piglets after oral administration of *Fusarium verticillioides* fungal culture. *Food Addit Contam* 23:492-501

Fodor J, Balogh K, Weber M, Mézes M, Kametler I, Pósa R, Rajli V, Bauer J, Horn P, Kovács F, Kovács M (2007a) A fumonizin B₁ metabolizmusának *in vivo* és *in vitro* vizsgálata. *Magy Állatorv Lapja* 129:735-745

Fodor J, Meyer K, Gottschalk C, Mamet R, Kametler I, Bauer J, Horn P, Kovács F, Kovács M (2007b) *In vitro* microbial metabolism of fumonisin B₁. *Food Addit Contam* 24:416-420

Frank HK (1977) Occurrence of patulin in fruit and vegetables. *Ann Nutr Aliment* 31:459-465

Frisvad JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U (2007) Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem* 55:9727-9733

Galvan GA, Koning-Boucoiran CFS, Koopman WJM, Burger-Meijer K, González PH, Waalwijk C, Kik C, Scholten OE (2008) Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. *Eur J Plant Pathol* 121:499-512

Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R, Kriek NPJ (1988) Fumonisin – Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 54:1806-1811

Gelderblom WCA, Kriek NPJ, Marasas WFO, Thiel PG (1991) Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. *Carcinogenesis* 12:1247-1251

Gelderblom WCA, Cawood ME, Snyman SD, Vleggaar R, Marasas WFO (1993) Structure-activity relationship of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. *Food Chem Toxicol* 31:407-414

Gelderblom WCA, Sewram V, Shephard GS, Snijman PW, Tenza K, van der Westhuizen L, Vleggaar R (2007) Structure and natural occurrence of stereoisomers of the fumonisin B series mycotoxins. *J Agric Food Chem* 55:4388-4394

Gerber R, Lou L, Du L (2009) A PLP-dependent polyketide chain releasing mechanism in the biosynthesis of mycotoxin fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *J Am Chem Soc* 131:3148-3149

Gumprecht LA, Marucci A, Weigel RM, Vesonder RF, Riley RT, Showker JL, Beasley VR, Haschek WM (1995) Effects of intravenous fumonisin B₁ in rabbits: nephrotoxicity and sphingolipid alterations. *Nat Toxins* 3:395-403

Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ (2002) Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 11:309-320

Hannun YA, Bell RM (1993) The sphingomyelin cycle: A prototypic sphingolipid signalling pathway. *Adv lipid Res* 25:27-41

Hard GC, Howard PC, Kovatch RM, Bucci TJ (2001) Rat kidney pathology induced by chronic exposure to fumonisin B₁ includes rare variants of renal tubule tumor. *Toxicol Pathol* 29:379-386

Harmange JC, Boyle CD, Kishi Y (1994) Relative and absolute stereochemistry of the fumonisin B₂ backbone. *Tetrahedron Lett* 35:6819-6822

Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, Cole JR (1990) Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin-B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J Vet Diagn Invest* 2:217-221

Haschek WM, Gumprecht LA, Smith G, Tumbleson ME, Constable PD (2001) Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ Health Persp* 109:251-257

Hendrich S, Miller KA, Wilson TM, Murphy PA (1993) Toxicity of *Fusarium proliferatum*-fermented nixtamalized corn-based diets fed to rats: Effect of nutritional status. *J Agric Food Chem* 41:1649-1654

Hillis DM, Bull JJ (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol* 42:182-192

Hines HB, Brueggemann EE, Holcomb M, Holder CL (1995) Fumonisin B₁ analysis with capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 9:519-524

Hinojo MJ, Medina A, Valle-Algarra FM, Gimeno-Adelantado JV, Jiménez M, Mateo R (2006) Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. *Food Microbiol* 23:119-127

Holcomb M, Thompson HC, Hankins LJ (1993a) Analysis of fumonisin B₁ in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection. *J Agric Food Chem* 41:764-767

Holcomb M, Sutherland JB, Chiarelli MP, Korfmacher WA, Thompson HC, Lay JO, Hankins LJ, Cerniglia CE (1993b) HPLC and FAB mass spectrometry analysis of fumonisin B₁ and B₂ produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. *J Agric Food Chem* 41:357-360

Holcomb M, Thompson HC (1995) Analysis of fumonisin B₁ in corn by capillary electrophoresis fluorescence detection of the FMOC derivative. *J Microcol Sep* 7:451-454

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

Hopmans EC, Murphy PA (1993) Detection of fumonisin B₁, fumonisin B₂ and fumonisin B₃ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn-containing foods. *J Agric Food Chem* 41:1655-1658

Howard PC, Churchwell MI, Couch LH, Marques MM, Doerge DR (1998) Formation of N-(carboxymethyl) fumonisin B₁, following the reaction of fumonisin B₁ with reducing sugars. *J Agric Food Chem* 46:3546-3557

Howard PC, Eppley RM, Stack ME, Warbritton A, Voss KA, Lorentzen RJ, Kovatch RM, Bucci TJ (2001a) Fumonisin B₁ carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F₁ mice. *Environ Health Persp* 109 (Suppl 2):277-282

Howard PC, Warbritton A, Voss KA, Lorentzen RJ, Thurman JD, Kovatch RM, Bucci TJ (2001b) Compensatory regeneration as a mechanism for renal tubule carcinogenesis of fumonisin B₁ in the F344/N/NctrBR rat. *Environ Health Persp* 109 (Suppl 2):309-314

Howard PC, Couch LH, Patton RE, Eppley RM, Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM, Okerberg CV (2002) Comparison of the toxicity of several fumonisin derivatives in a 28-day feeding study with female B6C3F₁ mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 185:153-165

Howerth EW, Wyatt RD, Hayes DA (1989) Equine leukoencephalomalacia in white tailed deer from North Carolina. *J Wild Disease* 25:384-387

Hoye TR, Jimenez JI, Shier WT (1994) Relative and absolute configuration of the fumonisin B₁ backbone. *J Am Chem Soc* 116:9409-9410

Huffman J, Gerber R, Du L (2010) Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers* 93:764-776

Humpf H-U, Schmelz E-M, Meredith FI, Vesper H, Vales TR, Menaldino DS, Liotta DC, Merrill Jr AH (1998) Acylation of naturally occurring and synthetic 1-deoxysphinganine by ceramide synthase: formation of N-palmitoyl-aminopenthol (PAP₁) produces a toxic metabolite of hydrolyzed fumonisin (AP₁), and a new category of ceramide synthase inhibitor. *J Biol Chem* 273:19060-19064

Humpf H-U, Voss KA (2004) Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol Nutr Food Res* 48:255-269

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, naphthalene and styrene. No. 82. Lyon (France): IARC; p. 301–366

Jackson MA, Bennett GA (1990) Production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* NRRL-13616 in submerged culture. *Appl Environ Microbiol* 56:2296-2298

Jaskiewicz K, Marasas WFO, van der Walt FE (1987) Oesophageal and other main cancer patterns in four districts of Transkei, 1981-1984. *S Afr Med J* 72:27-30

Jiménez M, Mateo JJ, Hinojo MJ, Mateo R (2003) Sugars and amino acids as factors affecting the synthesis of fumonisins in liquid cultures by isolates of the *Gibberella fujikuroi* complex. *Int J Food Microbiol* 89:185-193

Josephs JL (1996) Detection and characterization of fumonisin mycotoxins by liquid chromatography electrospray ionization using ion trap and triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 10:1333-1344

Kakuk T (1995) A sertések sajátos hízlalási tüdővizenyőjének kóroktana napjaink mikotoxinkutatásának tükrében. Egy régi kórkép új értelmezése? *Magy Állatorv Lapja* 50:404-406

Karuna R, Sashidhar RB (1999) Use of ion-exchange chromatography coupled with TLC-laser scanning densitometry for the quantitation of fumonisin B₁. *Talanta* 50:381-389

Kátay Gy, Szécsi Á, Tyihák E (2001) Separation of fumonisins by OPLC. *J Planar Chromatogr* 14:53-56

Kékesi B (1961) Klinikai és patológiai megfigyelések ún. tüdővizenyős sertéseken. *Magy Állatorv Lapja* 16:47-52

Kim EK, Scott PM, Lau BPY (2003) Hidden fumonisins in corn flakes. *Food Addit Contam* 20:161-169

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

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)

Kohut G, Ádám AL, Fazekas B, Hornok L (2009) N-starvation stress induced *FUM* gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *Int J Food Microbiol* 130:65-69

Korfmacher WA, Chiarelli MP, Lay JO, Bloom J, Holcomb M, McManus KT (1991) Characterization of the mycotoxin fumonisin B₁ – Comparison of thermospray, fast-atom-bombardment and electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 5:463-468

Kriek NPJ, Kellerman TS, Marasas WFO (1981a) A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort J Vet Res* 48:129-131

Kriek NPJ, Marasas WFO, Thiel PG (1981b) Hepato- and cardiotoxicity of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) isolates from southern African maize. *Food Cosmet Toxicol* 19:447-456

Lacza B, Lázár I (1977) Mikotoxikózis (T₂-toxin) mint a lovak súlyos megbetegedésének valószínűsített oka. *Magy Állatorv Lapja* 32:247-248

Le Bars J, Le Bars P, Dupuy J, Boudra H, Cassini R (1994) Biotic and abiotic factors in fumonisin B₁ production and stability. *J AOAC Int* 77:517-521

Ledoux DR, Brown TP, Weibking TS, Rottinghaus GE (1992) Fumonisin toxicity in broiler chicks. *J Vet Diagn Invest* 4:330-333

Lemke SL, Ottinger SE, Ake CL, Mayura K, Phillips TD (2001) Deamination of fumonisin B₁ and biological assessment of reaction product toxicity. *Chem Res Toxicol* 14:11-15

Leslie JF, Summerell BA, Bullock S (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, UK. 388 pp.

Logrieco A, Ferracane R, Haidukowsky M, Cozzi G, Visconti A, Ritieni A (2009) Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. *Food Addit Contam* 26:1495–1500

Lorbeer JW, Tuffley JW, Ransom VE, Snover KL (2002) The nature of *Aspergillus niger* as an endophytic fungus in onion plants and subsequent development of black mold. 2002 National Allium Research Conference, Pasco, WA, USA, Dec. 11-14 2002, Conference Abstracts Page 20.

Lu Y, Clifford L, Hauck CC, Hendrich S, Osweiler G, Murphy PA (2002) Characterization of fumonisin B₁-glucose reaction kinetics and products. *J Agric Food Chem* 50:4726-4733

Lumlertdacha S, Lovell RT, Shelby RA, Lenz SD, Kemppainen BW (1995) Growth, hematology and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. *Aquacult* 130:201-218

Lumlertdacha S, Lovell RT (1995) Fumonisin-contaminated dietary corn reduced survival and antibody production by channel catfish challenged with *Edwardsiella ictaluri*. *J Aquat Anim Health* 7:1-8

MacKenzie SE, Savard ME, Blackwell BA, Miller JD, ApSimon JW (1998) Isolation of a new fumonisin from *Fusarium moniliforme* grown in liquid culture. *J Nat Prod* 61:367-369

Makaula NA, Marasas WFO, Venter FS, Badenhorst CJ, Bradshaw D, Swanevelder F (1996) Oesophageal and other cancer patterns in four selected districts of Transkei, southern Africa: 1985-1990. *Afr J Health Sci* 3:11-15

Mansson M, Klejnstrup ML, Phipps RK, Nielsen KF, Frisvad JC, Gotfredsen CH, Larsen TO (2010) Isolation and NMR characterization of fumonisin B₂ and a new fumonisin B₆ from *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem* 58:949-953

Maragos CM, Richard JL (1994) Quantitation and stability of fumonisins B₁ and B₂ in milk. *J AOAC Int* 77:1162-1167

Maragos CM (1995) Capillary zone electrophoresis and HPLC for the analysis of fluorescein isothiocyanate-labeled fumonisin B₁. *J Agric Food Chem* 43:390-394

Maragos CM (1997) Measurement of mycotoxins in food with fiber-optic immunosensor. *J Clin Ligand Assay* 20:136-140

Maragos CM, Thompson VS (1999) Fiber-optic immunosensor for mycotoxins. *Nat Toxins* 7:371-376

Marasas WFO, Kriek NPJ, Fincham JE, van Rensburg SJ (1984) Primary liver-cancer and esophageal basal-cell hyperplasia in rats caused by *Fusarium moniliforme*. *Int J Cancer* 34:383-387

Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Coetzer JAW, Thiel PG, van der Lugt JJ (1988) Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium verticillioides*. *Onderstepoort J Vet Res* 55:197-203

Marín S, Sanchis V, Vinas I, Canela R, Magan N (1995) Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* in grain. *Lett Appl Microbiol* 21:298-301

Marín S, Sanchis V, Teixido A, Saenz R, Ramos AJ, Vinas I, Magan N (1996) Water and temperature relations and microconidial germination of *F. moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Can J Microbiol* 42:1045-1050

Marín S, Magan N, Belli N, Ramos AJ, Canela R, Sanchis V (1999) Two dimensional profiles of fumonisin B₁ production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. *Int J Food Microbiol* 51:159-167

Mathur S, Constable PD, Eppley RM, Waggoner AL, Tumbleson ME, Haschek WM (2001a) Fumonisin B₁ is hepatotoxic and nephrotoxic in milk-fed calves. *Toxicol Sci* 60:385-396

Mathur S, Constable PD, Eppley RM, Waggoner AL, Tumbleson ME, Smith GW, Tranquilli WJ, Morin DE, Haschek WM (2001b) Fumonisin B₁ increases serum sphinganine concentration but does not alter serum sphingosine concentration or induce cardiovascular changes in milk-fed calves. *Toxicol Sci* 60:379-384

Merrill Jr AH, Sweeley CC (1996) Sphingolipids: metabolism and cell signaling. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Vance DE, Vance JE (eds). New York: Elsevier 3-73

Merrill Jr AH, Sullards MC, Wang E, Voss KA, Riley RT (2001) Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ Health Persp* 109 (Suppl 2):283-289

Merrill Jr AH (2002) De novo sphingolipid biosynthesis: A necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem* 277:25843-25846

Mézes M, Balogh K, Tóth K (2010) Preventive and therapeutic methods against the toxic effects of mycotoxins – A review. *Acta Vet Hung* 58:1-17

Michailides TJ, Peacock W, Christensen P, Morgan DP, Felts D (2002) First report of *Aspergillus* vine canker of table grapes caused by *Aspergillus niger*. *Plant Disease* 86:75

Michailides TJ, Peacock W, Christensen P, Morgan DP (2007) *Aspergillus* vine canker of table grapes caused by *Aspergillus* sect Nigri in California. *Phytopathol Mediter* 46:103-104

Mincsovcics E, Tyihák E, Siouffi AM (1986) Characteristics of the one-dimensional on-line separation and detection in a modified CHROMPRES chamber. In *Proceedings of International Symposium on TLC with Special Emphasis on Overpressured Layer Chromatography (OPLC)*. Tyihák E (Ed). Labor MIM, Budapest, 251-264

Mincsovcics E, Tyihák E, Siouffi AM (1988) Comparison of off-line and on-line overpressured layer chromatography (OPLC). *J Planar Chromatogr – Modern TLC* 1:141-145

Mincsovcics E, Pápai K, Ludányi K, Dávid ÁZ, Budai M, Antal I, Klebovich I (2008) Fully on-line hyphenation of an experimental OPLC separation unit with diode-array detection and mass-spectrometry (OPLC–DAD–MS) for analysis of xanthine compounds. *J Planar Chromatogr – Modern TLC* 21:361-366

Mirete S, Patino B, Vázquez C, Jiménez M, Hinojo MJ, Soldevilla C, González-Jaén MT (2003) Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. *Int J Food Microbiol* 89:213-221

Mirocha CJ, Chen T, Xie W, Xu Y, Abbas HK, Hogge LR (1996) Biosynthesis of fumonisin and AAL derivatives by *Alternaria alternata* and *Fusarium* in laboratory culture. *Adv Exp Med Biol* 392:213-224

Mogensen JM, Frisvad JC, Thrane U, Nielsen KF (2010a) Production of fumonisin B₂ and B₄ by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. *J Agric Food Chem* 58:954-958

Mogensen JM, Larsen TO, Nielsen KF (2010b) Widespread occurrence of the mycotoxin fumonisin B₂ in wine. *J Agric Food Chem* 58:4853-4857

Mogensen JM, Moller KA, von Freiesleben P, Labuda R, Varga E, Sulyok M, Kubatova A, Thrane U, Andersen B, Nielsen KF (2010c) Production of fumonisins B₂ and B₄ in *Tolypocladium* species. *J Ind Microbiol Biotech* (in press), DOI 10.1007/s10295-010-0916-1.

Motelin GK, Haschek WM, Ness DK, Hall WF, Harlin KS, Schaeffer DJ, Beasley VR (1994) Temporal and dose response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. *Mycopathol* 126:27-40

Mulé G, Susca A, Stea G, Moretti A (2004) A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*. *Eur J Plant Pathol* 110:495-502

Musser SM, Gay ML, Mazzola EP, Plattner RD (1996) Identification of a new series of fumonisins containing 3-hydroxypyridine. *J Nat Prod* 59:970-972

Musser SM, Plattner RD (1997) Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygami*. *J Agric Food Chem* 45:1169-1173

Narashima Rao K, Vijaypal Reddy B, Girisham S, Reddy SM (2010) Factors influencing fumonisins B₁ production by *Fusarium moniliforme*. *Ind J Sci Tech* 3:213-215

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) *Fusarium* species. *An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State University, PA, USA, 193 pp.

Nelson PE, Plattner RD, Shackelford DD, Desjardins AE (1991) Fumonisin B₁ production by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Appl Environ Microbiol* 57:2410-2412

Nelson PE, Desjardins AE, Plattner RD (1993) Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annu Rev Phytopathol* 31:233-252

Nelson PE, Juba JH, Ross PF, Rice LG (1994) Fumonisin production by *Fusarium* species on solid substrates. *J AOAC Int* 77:522-525

Noonim P, Mahakarnchanakul W, Nielsen KF, Frisvad JC, Samson RA (2009) Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* from Thai coffee beans. *Food Addit Contam* 26:94-100

Norred WP, Plattner RD, Dombrink-Kurtzman MA, Meredith FI, Riley RT (1997) Mycotoxin-induced elevation of free sphingoid bases in precision-cut rat liver slices: Specificity of the response and structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol* 147:63-70

Norred WP, Riley RT, Meredith FI, Poling SM, Plattner RD (2001) Instability of *N*-acetylated fumonisin B₁ (FA₁) and the impact on inhibition of ceramide synthase in rat liver slices. *Food Chem Toxicol* 39:1071-1078

Osweiler GD, Kehrli ME, Stabel JR, Thurston JR, Ross PF, Wilson TM (1993) Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. *J Anim Sci* 71:459-466

Palencia ER, Hinton DM, Bacon CW (2010) The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. *Toxins* 2:99-416

Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR, Bendtsen JD, Benen JAE, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EGJ, Debets AJM, Dekker P, van Dijck PWM, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJM, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GSP, de Groot PWJ, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JPTW, van den Hondel CAMJJ, van der Heijden RTJM, van der Kaaij RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk PA, Lauber J, Lu X, van der Maarel MJE, Meulenberg R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NNME, Ram AFJ, Rinas U, Roubos JA, Sadt CMJ, Schmoll M, Sun JB, Ussery D, Varga J, Vervecken W, de Vondervoort PJJV, Wedler H, Wosten HAB, Zeng

AP, van Ooyen AJJ, Visser J, Stam H (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotech* 25:221-231

Pepeljnjak S, Petrinc Z, Kovacic S, Segvic M (2003) Screening toxicity study in young carp (*Cyprinus carpio* L.) on feed amended with fumonisin B₁. *Mycopathol* 156:139-145

Perrone G, Stea G, Epifani F, Varga J, Frisvad JC, Samson RA (2010) *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. IMC9 (9th International Mycological Congress), Edinburgh, 1-6 August, 2010, Poster No. P1.101.

Petrás Gy (1952) Sertések fertőző tüdőviznyője. *Magy Állatorv Lapja* 7:374-378

Picot A, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Lannou C, Richard-Forget F (2010) Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Crit Rev Microbiol* 36:221-231

Plattner RD, Shackelford DD (1992) Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycologia* 117:17-22

Plattner RD, Desjardins AE, Leslie JF, Nelson PE (1996) Identification and characterization of strains of *Gibberella fujikuroi* mating population A with rare fumonisin production phenotypes. *Mycologia* 88:416-424

Plattner RD (1999) HPLC/MS analysis of *Fusarium* mycotoxins, fumonisins and deoxynivalenol. *Nat Toxins* 7:365-370

Poch GK, Powell RG, Plattner RD, Weisleder D (1994) Relative stereochemistry of fumonisin B₁ at C-2 and C-3. *Tetrahedron Lett* 35:7707-7710

Pocsfalvi G, Ritieni A, Randazzo G, Dobo A, Maloni A (2000) Interaction of *Fusarium* mycotoxins, fusaproliferin and fumonisin B₁, with DNA studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 48:5795-5801

Poling SM, Plattner RD, Weisleder DW (2002) N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl) fumonisin B₁, the initial reaction product of fumonisin B₁ and D-glucose. *J Agric Food Chem* 50:1318-1324

Powell DC, Bursian SJ, Bush CR, Render JA, Rottinghaus GE, Aulerich RJ (1996) Effects of dietary exposure to fumonisins from *Fusarium moniliforme* culture material (M-1325) on the reproductive performance of female mink. *Arch Environ Contam Toxicol* 31:286-292

Prelusky DB, Trenholm HL, Savard ME (1994) Pharmacokinetic fate of 14C-labelled fumonisin B₁ in swine. *Nat Toxins* 2:73-80

Prelusky DB, Miller JD, Trenholm HL (1996) Disposition of 14C-derived residues in tissues of pigs fed radiolabelled fumonisin B₁. *Food Addit Contam* 13:155-162

Proctor RH, Desjardins AE, Plattner RD, Hohn TM (1999) A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet Biol* 27:100-112

Proctor RH, Brown DW, Plattner RD, Desjardins AE (2003) Co-expression of 15 contiguous gene delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet Biol* 38:237-249

Proctor RH, Plattner RD, Desjardins AE, Busman M, Butcko AE (2006) Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J Agric Food Chem* 54:2424-2430

Pruett ST, Bushnev A, Hagedorn K, Adiga M, Haynes CA, Sullards MC, Liotta DC, Merrill Jr AH (2008) Biodiversity of sphingoid bases (sphingosines) and related amino alcohols. *J Lipid Res* 49:1621-1639

Qureshi MA, Hagler Jr WM (1992) Effects of fumonisin B₁ exposure on chicken macrophage function *in vitro*. *Poultry Sci* 71:104-112

Raper KB, Fennell DI (1965) The Genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore

Restum JC, Bursian SJ, Millerick M, Render JA, Merrill Jr AH, Wang E, Rottinghaus GE, Aulerich RJ (1995) Chronic toxicity of fumonisins from *Fusarium moniliforme* culture material (M-1325) to mink. *Arch Environ Contam Toxicol* 29:545-550

Reverberi M, Ricelli A, Zjalic S, Fabbri AA, Fanelli C (2010) Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl Microbiol Biotech* 87:899-911

Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF (2002) Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 68:2101-2105

Riley RT, Hinton DM, Chamberlain WJ, Bacon CW, Wang E, Merrill Jr AH, Voss KA (1994) Dietary fumonisin B₁ induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. *J Nutr* 124:594-603

Riley RT, Wang E, Schroeder JJ, Smith ER, Plattner RD, Abbas H, Yoo HS, Merrill AH (1996) Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. *Nat Toxins* 4:3-15

Riley RT, Enongene E, Voss KA, Norred WP, Meredith FI, Sharma RP, Spitsbergen J, Williams DE, Carlson DB, Merrill Jr AH (2001) Sphingolipid perturbations as mechanism for fumonisin carcinogenesis. *Environ Health Persp* 109 (Suppl 2):301-308

Riley RT, Voss KA (2006) Differential sensitivity of rat kidney and liver to fumonisin toxicity: organ-specific differences in toxin accumulation and sphingoid base metabolism. *Toxicol Sci* 92:335-345

Ross PF, Rice LG, Plattner RD, Osweiler GD, Wilson TM, Owens DL, Nelson HA, Richard JL (1991) Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. *Mycopathol* 114:129-135

Rotter BA, Thompson BK, Prelusky DB, Trenholm HL, Steward B, Miller JD, Savard MF (1996) Response of growing swine to dietary exposure: to pure fumonisin B₁ during an eight-week period: growth and clinical parameters. *Nat Toxins* 4:42-50

Royer D, Humpf H-U, Guy PA (2004) Quantitative analysis of *Fusarium* mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam* 21:678-692

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, Houbroken J, Frisvad JC, Varga J (2007) Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Studies Mycol* 59:129-145

Scott PM, Lawrence GA (1992) Liquid chromatography determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazane. *J AOAC Int* 75:829-834

Scott PM, Lawrence GA (1994) Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *J AOAC Int* 77:541-545

Scott PM, Lawrence GA (1996) Determination of hydrolysed fumonisin B₁ in alkali-processed corn foods. *Food Addit Contam* 13:823-832

Scudamore KA, Patel S (2000) Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Addit Contam* 17:407-416

Seefelder W, Hartl M, Humpf H-U (2001) Determination of *N*-(carboxymethyl) fumonisin B₁ in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 49:2146-2151

Seefelder W, Gossmann M, Humpf H-U (2002) Analysis of fumonisin B₁ in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 50:2778-2781

Seefelder W, Knecht A, Humpf H-U (2003) Bound fumonisin B₁: Analysis of fumonisin-B₁ glyco and amino acid conjugates by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 51:5567-5573

Selim MI, El-Sharkawy SH, Popendorf WJ (1996) Supercritical fluid extraction of fumonisin B₁ from grain dust. *J Agric Food Chem* 44:3224-3229

Senyuva HZ, Gilbert J (2008) Identification of fumonisin B₂, HT-2 toxin, patulin, and zearalenone in dried figs by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Food Protect* 71:1500-1504

Seo JA, Proctor RH, Plattner RD (2001) Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol* 34:155-165

Shephard GS, Thiel PG, Stockenström S, Sydenham EW (1996) Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J AOAC Int* 79:671-687

Shephard GS, Thiel PG, Sydenham EW, Vleggaar R, Alberts JF (1994) Determination of the mycotoxin fumonisin B₁ and identification of its partially hydrolyzed metabolites in the faeces of non-human primates. *Food Chem Toxicol* 32:23-29

Shephard GS (1998) Chromatographic determination of fumonisin mycotoxins. *J Chromatogr A* 815:31-39

Shephard GS, Snijman PW (1999) Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B₂ in a non-human primate. *Food Chem Toxicol* 37:111-116

Shi Y, Peng LF, Kishi Y (1997) Enantioselective total synthesis of fumonisin B₂. *J Org Chem* 62:5666-5667

Shier WT, Abbas HK, Badria FA (1995) Complete structures of the sphingosine analog mycotoxins fumonisin B₁ and AAL toxin TA: absolute configuration of the side chains. *Tetrahedron Lett* 36:1571-1574

Shier WT (2000) The fumonisin paradox: A review of research on oral bioavailability of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. *J Toxicol Rev* 19:161-187

Shim WB, Woloshuk CP (1999) Nitrogen repression of fumonisin B₁ biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiol Lett* 177:109-116

Smith JS, Thakur RA (1996) Occurrence and fate of fumonisins in beef. *Adv Exp Med Biol* 392:39-55

Sorensen LK, Elbaek TH (2005) Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 820:183-196

Stack ME (1998) Analysis of fumonisin B₁ and its hydrolysis product in tortillas. *J AOAC Int* 81:737-740

Stankovic S, Levic J, Petrovic T, Logrieco A, Moretti A (2007) Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *Eur J Plant Pathol* 118:165-172

Staunton J, Weissman KJ (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* 18:380-416

Stockenström S, Sydenham EW, Thiel PG (1994) Determination of fumonisins in corn: Evaluation of two purification procedures. *Mycotoxin Res* 10:9-14

Stockmann-Juvala H, Savolainen K (2008) A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B₁. *Hum Exp Toxicol* 27:799-809

Sydenham EW, Gelderblom WCA, Thiel PG, Marasas WFO (1990a) Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. *J Agric Food Chem* 38:285-290

Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WFO, Shephard GS, Gelderblom WCA, van Schalkwyk DJ, Koch KR (1990b) Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. *J Agric Food Chem* 38:1900-1903

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, Szekeres A, Bartók T, Oros G, Bartók M, Mesterházy Á (2010) Fumonisin B₁₋₄-producing capacity of Hungarian *Fusarium verticillioides* isolates. *World Mycotoxin J* 3:67-76

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)

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599

Tardieu D, Bailly JD, Benard G, Tran TS, Guerre P (2004) Toxicity of maize containing known levels of fumonisin B₁ during force-feeding of ducks. *Poultry Sci* 83:1287-1293

Thakur RA, Smith JS (1994) Analysis of fumonisin B₁ by negative ion thermospray mass-spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 8:82-88

Thakur RA, Smith JS (1996) Determination of fumonisins B₁ and B₂ in their major hydrolysis products in corn, feed, and meat, using HPLC. *J Agric Food Chem* 44:1047-1052

Thiel PG, Marasas WFO, Sydenham EW, Shephard GS, Gelderblom WCA (1992) The implications of naturally-occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathol* 117:3-9

Tuffley JW, Lorbeer JW (2002) Endophytic activity of *Aspergillus niger* in onion. American Phytopathological Society Annual Meeting, 2002, Milwaukee, Wisconsin, USA, Abstract No. 115.

Tyihák E, Mincsovics E, Kalász H (1979) New planar liquid chromatographic technique: overpressured thin-layer chromatography. *J Chromatogr* 174:75-81

Ueno Y, Lijima K, Wang SD, Sugiura Y, Sekijima M, Tanaka T, Chen C, Yu SZ (1997) Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer. A 3-year study of corn harvested in Haimen China, by HPLC and ELISA. *Food Chem Toxicol* 35:1143-1150

- Usleber E, Straka M, Terplan G (1994) Enzyme-immunoassay for fumonisin B₁ applied to corn-based food. *J Agric Food Chem* 42:1392-1396
- Varga J, Kozakiewicz Z (2006) Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends Food Sci Tech* 17:72-81
- 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
- Varga J, Kocsubé S, Szigeti Gy, Man V, Tóth B, Vágvölgyi Cs, Bartók T (2011) Black *Aspergilli* and fumonisin contamination in onions purchased in Hungary. *Acta Alimentaria* (megjelenés alatt)
- Vélazquez C, Llovera M, Plana J, Canela R (2000) Effects of solvents on the fumonisins analysis by high-performance liquid chromatography with AccQ.Fluor as the derivatizing reagent. *J Chromatogr A* 870:469-472
- Visconti A, Doko MB (1994) Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *J AOAC Int* 2:546-549
- Visconti A, Boenke A, Solfrizzo M, Pascale M, Doko MB (1996) European intercomparison study for the determination of the fumonisin content in two maize materials. *Food Addit Contam* 13:909-927
- Voss KA, Chamberlain WJ, Bacon CW, Herbert RA, Walters DB, Norred WP (1995) Subchronic feeding study of the mycotoxin fumonisin B₁ in B6C3F₁ mice and Fischer 344 rats. *Fund Appl Toxicol* 24:102-110
- Voss KA, Bacon CW, Meredith FI, Norred WP (1996) Comparative subchronic toxicity studies of nixtamalized and water extracted *Fusarium moniliforme* culture extract. *Food Chem Toxicol* 34:623-632
- Voss KA, Plattner RD, Riley RT, Meredith FI, Norred WP (1998a) *In vivo* effects of fumonisin B₁-producing and fumonisin B₁-nonproducing *Fusarium moniliforme* isolates are similar: fumonisin B₂ and B₃ cause hepato- and nephrotoxicity in rats. *Mycopathol* 141:41-58
- Voss KA, Riley RT, Bacon CW, Meredith FI, Norred WP (1998b) Toxicity and sphinganine levels are correlated in rats fed diets providing fumonisin B₁ (FB₁) or hydrolyzed FB₁ (HFB₁). *Environ Toxicol Pharmacol* 5:101-104
- Voss KA, Poling SM, Meredith FI, Bacon CW, Saunders DS (2001a) Fate of fumonisins during the production of fried tortilla chips. *J Agric Food Chem* 49:3120-3126
- Voss KA, Smith GW, Haschek WM (2007) Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Anim Feed Sci Tech* 137:299-325

Voss KA, Riley RT, Norred WP, Bacon CW, Meredith FI, Howard PC, Plattner RD, Collins TFX, Hansen D, Porter JK (2001b) An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of *Fusarium moniliforme* and fumonisins. *Environ Health Persp* 109 (Suppl 2):259-266

Waalwijk C, van der Lee T, de Vries I, Hesselink T, Arts J, Kema GH (2004) Synteny in toxigenic *Fusarium* species: The fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. *Eur J Plant Pathol* 110:533-544

Wang E, Ross PF, Wilson TM, Riley RT, Merrill Jr AH (1992) Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J Nutr* 122:1706-1716

Wang J, Zhou Y, Liu W, Zhu X, Du L, Wang Q (2008a) Fumonisin level in corn-based food and feed from Linxian County, a high-risk area for esophageal cancer in China. *Food Chem* 106:241-246

Wang J, Zhou Y, Wang Q (2008b) Analysis of mycotoxin fumonisins in corn products by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Food Chem* 107:970-976

Weibking TS, Ledoux DR, Brown TP, Rottinghaus GE (1993) Fumonisin toxicity in turkey poult. *J Vet Diagn Invest* 5:75-83

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

Wilkes JG, Sutherland JB, Churchwell MI, Williams AJ (1995) Determination of fumonisin B₁, B₂, B₃ and B₄ by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J Chromatogr A* 695:319-323

Wilson BJ, Maronport RR (1971) Causative fungal agent of leucoencephalomalacia in equine animals. *Vet Rec* 88:484-486

Wilson TM, Nelson PE, Knepp CR (1985) Hepatic neoplastic nodules, adenofibrosis and cholangiocarcinomas in male fisher 344 rats fed corn naturally contaminated with *Fusarium moniliforme*. *Carcinogenesis* 6:1155-1160

Young JC, Lafontaine P (1993) Detection and characterization of fumonisin mycotoxins as their methyl-esters by liquid chromatography particle-beam mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 7:352-359

Zaleta-Rivera K, Xu C, Yu F, Butchko RAE, Proctor RH, Hidalgo-Lara ME, Raza A, Dussault PH, Du L (2006) A bidomain nonribosomal peptide synthetase encoded by *FUM14* catalyzes the formation of tricarballic esters in the biosynthesis of fumonisins. *Biochemistry* 45:2561-2569

Zomborszky-Kovács M, Vetési F, Kovács F, Bata Á, Repa I, Horn P (2000) A *Fusarium moniliforme* fumonizin-B₁ toxinjának tolerálható határértékére és perinatalis toxikózist előidéző hatására vonatkozó vizsgálatok sertésben. *Magy Állatorv Lapja* 122:168-175

Zomborszky-Kovács M, Vetési F, Horn P, Repa I, Kovács F (2002) Effects of prolonged exposure to low-dose fumonisin B₁ in pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49:197-201

Zöllner P, Mayer-Helm B (2006) Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1136:123-169

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. Köszönöm **Dr. Szécsi Árpádnak** az MTA doktorának, az MTA NKI tudományos tanácsadójának, hogy korábbi együttműködésünk eredményeként 2005-ben egy, a *Fusarium verticillioides* izolátumok fumonizin-termelésével kapcsolatos OTKA pályázatba közreműködőként bevonta laboratóriumunkat, amely közös munka eredményei képezték jelen értekezés alapját. Hálával tartozom **Dr. Barabás Zoltán** akadémikusnak és első közvetlen főnökömnek, **Dr. Sági Ferenc** tudományos főmunkatársnak - akik sajnos már nincsenek közöttünk - 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. Köszönetemet fejezem ki **Dr. Varga Jánosnak** az MTA doktorának, az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék egyetemi docensének, hogy bevont az *A. niger* és *A. awamori* izolátumok fumonizin-termelésével kapcsolatos kutatásokba. 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. Köszönöm édesapámnak, **Dr. Bartók Mihály** akadémikusnak, az SZTE TTIK Szerves Kémiai Tanszék emeritus professzorának a szakmai együttműködést és azt, hogy mérhettem az MTA Sztereokémiai Kutatócsoportja által beszerzett ioncsapdás tömegspektrométerrel. Megköszönöm **családomnak**, hogy a kutatómunkámhoz a nyugodt családi háttérrel biztosította. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni az **OTKA**, az **NKTH**, az **FVM** és az **EU** pályázati támogatását, amelyek nélkül vizsgálataink jelentős részét nem tudtuk volna elvégezni.