

Válasz Simonné Prof. Dr. Sarkadi Livia az MTA Doktora
Bartók Tibor: Új fumonizin mikotoxinok azonosítása HPLC/MS módszerekkel című
akadémiai doktori értekezéséről készített bírálata

Mindenekelőtt megköszönöm Opponensem igen részletes opponensi véleményét elismerő és bíráló szavait, amelyekből a további kutatómunkám során igyekszem minél többet felhasználni. Bírálataiban szereplő megjegyzéseire, kérdéseire az abban megjelent sorrendben válaszolok.

Válaszok az általános észrevételekre:

Köszönöm eddigi munkásságommal kapcsolatos pozitív véleményét és a nyilvános vita kitűzésére tett javaslatát. Ami a fumonizinek kutatásában elért eredményeket illeti, az alábbiakkal egészítem ki az értekezésben leírtakat.

- A fumonizinekkal a PhD fokozat megszerzését követően, 2004-ben kezdtem el foglalkozni. Az eddigi eredményeket jól mutatják a megjelent és megjelenés alatt lévő közleményeim és az egyre növekvő számú hivatkozások és szöveggörnyezetük. A fumonizines közleményeinkre kapott hivatkozások közül szeretném kiemelni Zöllner és Mayer-Helm 47 oldalas összefoglaló munkáját (Zöllner és Mayer-Helm 2006), amely a mikotoxinok HPLC/MS vizsgálatáról szól és megjelenése óta az egyik legidézettebb és legjelentősebb munka a mikotoxinok HPLC/MS meghatározása terén. Ebben a közleményben az első fumonizines közleményünkre (Bartók és mtsai 2006) 10 alkalommal hivatkoznak. Ez a közleményünk, megjelenése óta már több mint 50 hivatkozást kapott. Az először felfedezett változatos szerkezetű 40 új fumonizint nem 4-5 közleményben publikáltuk (az új FA, FB, FC és FBX analógokat külön-külön is lehetett volna közölni), hanem egyben. A nemzetközi szakirodalom reagálását jól érzékelteti az utóbbi években (2012-2013) megjelent szöveggörnyezeti hivatkozások mellékelt jegyzéke is. Úgy gondolom, az „általános észrevételek”-ben leírtak indokolják, hogy e helyen röviden összefoglaljam a disszertáció benyújtása óta nyert újabb vizsgálatokkal együtt a fumonizinek kutatásában elért eddigi eredményeinket.

- A kutatócsoportunk eddig 7 közleményben 102 új fumonizint közölt, illetve van közlés alatt. Közülük is igen fontos kiemelni az eddig ismeretlen FBX csoport fumonizinjeit amelyekkel először bizonyítottuk (Bartók és mtsai 2006) a trikarballil-csoport citrát-ciklus eredetét.
- Az általunk először leírt (Bartók és mtsai 2010a, 2013c), három acil-csoportot tartalmazó apoláris karakterű FB analógok valószínű, hogy a jelenleg ismert legtoxikusabb fumonizinek (Harrer és mtsai 2013), amelyeket olasz kutatók a mi közleményünk alapján már természetes fertőzőttségű kukoricában is megtaláltak (Falavigna és mtsai 2013).
- Nincs tudomásom egyetlen olyan közleményről sem, amely bármely alacsonyabb- vagy magasabb rendű élő szervezetben előforduló komponens és legalább 28 (Bartók és mtsai 2010b), illetve 22 (Bartók és mtsai 2013a) izomerje HPLC elválasztását bemutatta volna.
- Mi mutattuk ki először, hogy az *Aspergillus awamori* is képes fumonizineket szintetizálni (Varga és mtsai 2010).
- Vöröshagymában mi mutattunk ki és közöltünk először fumonizin szennyezést. (Varga és mtsai 2012)

Fontosnak tartom azt is megjegyezni, hogy már külföldi és hazai egyetemek, valamint az egyik legjelentősebb, mikotoxin referencia anyagokat forgalmazó cég is megkeresett már együttműködési javaslattal. Szeretném azt is megjegyezni, hogy eredményeink kapcsolódnak két OTKA (OTKA 46739, OTKA 77612), egy GAK (ALAP1-00073/2004) és egy EU (KBBE-2007-22269-2 MYCORED) pályázathoz is. Az első OTKA pályázatnak köszönhető a fumonizin kutatásunk elindulása, a *F. verticillioides* magyarországi elterjedésének a

feltérképezése és az első 46 új fumonizin leírása. A második OTKA pályázatunk kapcsolódik a 28 FB₁, a 22 FB₅ és a 6 acilezett FB₁ származék, továbbá az FP izomerek leírása. Azt gondolom, hogy az együttműködést javasoló kutatói megkeresések, és a témában elnyert pályázatok is a szakmai tevékenység elismerését és megmérettetését jelentik.

Az ELTE EKOL laboratóriumában én kerestem meg Tölgyesi Lászlót a TOFMS vizsgálatokkal kapcsolatban, mivel ilyen típusú készülékkel nem rendelkezünk. Az új fumonizinek nagy részét HPLC/ESI-ITMS és MS/MS módszerrel már korábban azonosítottam, megerősítés végett szerettem volna elvégezni a TOFMS méréseket is. Mivel a vizsgálatok pozitív eredménnyel zárultak természetes, hogy ezek az eredmények is bekerültek újabb közleményeinkbe, amelyekben érthető módon Ő is társszerző lett.

Az értekezéssel kapcsolatos formai megjegyzéseit köszönöm, jelentős részével egyetértek és további publikációink elkészítése során figyelembe fogom venni azokat.

- A nagy táblázatoknál a betűméretet a szövegtörzsnél alkalmazottnál kisebbre választottam elsősorban azért, hogy a táblázat törés nélkül egy oldalra kerülhessen. Számos szakfolyóirat szerzői instrukcióiban szerepel az, hogy pl. 8-as méretnél nem lehetnek nagyobbak a betűk a táblázatban. Néhány ábránál valóban vehettem volna nagyobbra a betűméretet.
- Az, hogy pontot kell-e tenni az ábrák és táblázatok címe után azt a folyóiratok határozzák meg. Véletlenszerűen áttanulmányozva 5 fumonizines közleményt, 4 esetben volt pont az ábrák és táblázatok címe végén.
- A fekvő oldalaknál a „Word” programmal nem tudtam megoldani azt, hogy az oldalszámok a jobb alsó sarokba kerüljenek. Utólag végiggondolva, valószínű, hogy ezen oldalaknál az lett volna a célravezető megoldás, ha előre rányomtatam volna a fekvő lapokra az oldalszámokat és utána visszahelyezve a nyomtatóba a megfelelő ábrák, illetve táblázatok lettek volna nyomtatva újabb oldalszám nélkül.
- Azt gondolom, hogy az értekezés tanulmányozását nem zavarta, hogy nem tüntettem fel a két oldalas ábrák és táblázatok esetében mindkét oldalon a címeteket. Jól láthatóan jelölve van ezeken az ábrákon, illetve táblázatokon, hogy az ábra és a táblázat folytatódik, illetve folytatása az előző oldalon lévőnek. Ezt a megoldást szintén számos közleményben láttam (pl. az előbb említett Zöllner és Mayer-Helm-féle cikkben) és a mi közleményeinkben is így szerepel.

Véleményem szerint a többes szám használata szerényebb megoldás, még akkor is, ha a vizsgálatok jelentős részét én végeztem. Ezt a számos kutatási terület alkalmazását igénylő munkát egy személyben képtelenség lett volna egyedül elvégezni. Egy személyben nem lehet magasszintű jártasságot szerezni minden eljárásban, mint pl. a fonális gombák taxonómiája, az *in vitro* technikák, az elválasztástechnikai és tömegspektrometriás eljárások és molekuláris módszerek. Nekem sem sikerült, azonban a Gabonakutatóban abban a szerencsés helyzetben volt részem, hogy éveket dolgozhattam Dr. Sági Ferenc és Dr. Pauk János irányításával a biotechnológiai laboratóriumban, részt vehettem a Dr. Mesterházy Ákos akadémikus irányításával a fuzárium kutatásban, több mint két évtizedig vezethettem a nagyműszeres laboratóriumot és bekapcsolódhattam a Dr. Szécsi Árpád és Dr. Varga János vezetésével folyó *Fusarium verticillioides* törzsek illetve fekete *Aspergillus* fajok fumonizin termelésével kapcsolatos kutatásokba is. Megjelöltem a dolgozatban, hogy a kutatómunka mely fázisait végezték más kutatócsoportok, mely felvételeket készítettek mások és azt is, hogy a TOFMS méréseket az ELTE EKOL-ban végeztük. Itt a többes szám különösen helytálló, mert a TOFMS mérések során végig jelen voltam, segítettem a mérőrendszer összeállítását és a mérési paraméterek beállítását.

Válaszok a „Részletes értékelés”-hez:

A Rövidítések jegyzékével, a Célkítűzésekkel, és az Irodalmi áttekintéssel kapcsolatos megjegyzéseit köszönöm.

- A T-2 és HT-2 toxinoknak nincs más elnevezése (az igen hosszú kémiai elnevezés kivételével) nem úgy, mint pl. DON és dezoxinivalenol, FB₁ és fumonizin B₁, vagy F-2 toxin és zearalenon.
- A „H” (hidrolizált) elnevezés szerepel a rövidítés jegyzékben, mint HFA és HFB.
- Az MRC és NRRL az izolátumok elnevezését jelenti, amit az ezeket alkalmazó kutatók írtak le, nincs adat arról, hogy mit jelentenek, ezért nem szerepelnek a jegyzékben.
- A FUM triviális elnevezés egy fumonizinekkal foglalkozó értekezésben, ezért nem szerepeltettem a jegyzékben, illetve az első említése (*FUM* gének) meg is magyarázza jelentését.
- Az enzimeket jelölő rövidítések valóban nem szerepelnek (szándékosan) a jegyzékben, viszont a szövegben csak 1-1 helyen szerepelnek és ott megadtam az enzimek teljes nevét is.
- A PPE elnevezés rövidítése úgy gondolom nem hibás, mivel a tünetegyüttest az USA-ban nevezték el PPE-nek. Emiatt az angolszász szakirodalom is ezt a rövidítést alkalmazza. Ha angolszász kutatók írták volna le, akkor valószínűleg a PPO elnevezést kapta volna (porcine pulmonary oedema). Magyar nyelvű közleményekben is a PPE elnevezés szerepel (lásd pl. Dr. Fazekas Béla, vagy Dr. Kovács Melinda és kutatócsoportjaik közleményeit).
- Az értekezés célkitűzésében azért szerepel a tézisekhez képest kettővel több pont, mert a 3. pontból még kiemeltem az 5. és 6. pontokat.
- Az LOQ esetében természetesen elírás történt, a Rövidítések jegyzékében jól szerepel.

Az **Anyagok és módszerek** fejezettel kapcsolatos megjegyzéseire az alábbiakat válaszolom.

- A fumonizinek analitikájának, beleértve a kapcsolt eljárásokat is igen kiterjedt irodalma van (lásd Zöllner és Mayer-Helm 2006 összefoglaló közleményét). A releváns közlemények elolvasása (köztük több validált eljárás) és az azokban szereplő eredmények összegzése után kiválasztottunk egy megfelelő HPLC oszlopot és a legtöbb kutató által alkalmazott „biner” oldószer rendszert az FB₁₋₄ toxinok elválasztására. A későbbiekben, amikor az ún. kevésbé meredek gradiens elválasztást alkalmaztuk a számos izomer elválasztására, vizsgáltuk a kiindulási oldószererősség és gradiens meredekség hatását is az elválasztásra. Továbbá elvégeztük az ún. „intraday” és „interday” precizitás vizsgálatokat is, azonban ezeket sem az értekezésben sem a közleményeinkben eddig nem szerepeltettem. Szeretném megjegyezni, hogy vizsgálataink és közleményeink jelentős része alapkutatási tevékenységhez kapcsolódik, ami ebben a stádiumban még nem igényli a validált környezetet. Fontos megjegyezni, hogy az általunk alkalmazott ioncsapdás tömegspektrométerek elsősorban azonosításra illetve szerkezetkutatásra valók. A teljes módszer validálást a különböző mátrixokra (pl. rizstenyészet, mazsola, vöröshagyma) a jövőben, akkor lesz értelme elvégezni, amikor a fumonizinek teljes polaritás tartományában számos fumonizin (minimum az FB₁₋₅ és a 3 acil-csoportot tartalmazó fumonizinek közül is legalább egy komponens) fog rendelkezésre állni a vegyszerpiacon, vagy a saját laboratóriumunkban lesz előállítva (az FB₁ toxin izolálása 99%-os tisztaságban már megtörtént), ami sokkal költségkímélőbb megoldás. A referencia anyagok megléte esetén is a kvantitatív meghatározásra leginkább alkalmas hármas kvadrupól (QqQ) és/vagy ún. QTrap típusú MS/MS készülékekkel kell elvégezni a validálást.
- A későbbi vizsgálatok jelentős részénél már csak egy-egy injektálást végeztünk tekintettel az „intra- és interday” vizsgálatok során kapott eredményeinkre és az igen

hosszú 120 perces teljes analízisidőre, nem beszélve a HPLC/MS vizsgálatok jelentős költségéről.

- Azon véleményével teljes mértékben egyetértek, hogy legalább az igen hatékonnak bizonyult kevésbé meredek gradiens elválasztás alkalmazása esetében megemlíthettem volna a fontosabb teljesítmény jellemzőket. A meredekebb gradiens elválasztásnál az FB₁₋₄ toxinok tekintetében a N* és a k* (gradiens retenciók faktor) értéke a következő volt: FB₁ N*=4768, k*=5,173; FB₃ N*=10237, k*=5,229; FB₂ N*=14970, k*=5,229; FB₄ N*=25600, k*=5,289. A kevésbé meredek gradiens elválasztásnál az FB₁₋₄ toxinok tekintetében a N* és a k* értéke a következő volt: FB₁ N*=14834, k*=17,33; FB₃ N*=38344, k*=17,53; FB₂ N*=63581, k*=17,53; FB₄ N*=137741, k*=17,73.
- A szakirodalomban a fumonizinek szilárd-fázisú termeltetéséhez a rizst és a kukoricát használják szubsztrátként. A termeltetésnél elsősorban az alacsonyabb zsír- és pigment tartalma miatt választottuk a rizst, azonban már kukoricán is végeztünk termeltetést. A fumonizin profilt (kemotípust) egy adott *F. verticillioides* izolátum/törzs esetében a szubsztrát (rizs, kukorica) nem befolyásolta, csak az abszolút mennyiségeket. A kukoricán valamivel magasabb fumonizin szint érhető el. A fumonizin profilt az adott szubsztráton a termeltetés paramétereinek (vízaktivitás, hőmérséklet, tenyésztési idő, tenyészet levegőzése) változtatásával csak kismértékben, viszont a mennyiségi értékeket jelentősen lehet befolyásolni. Hat év mélyhűtőben történő tárolás után ugyanazzal a törzzsel beoltva a rizstenyészetet, azonos tenyésztési körülmények között azonos FB₁₋₄ profilt kaptunk. Ugyanakkor a szakirodalomban már több fonalas gomba faj, illetve törzs esetében is leírták, hogy megfigyeltek hosszabb tárolás során toxintermelés csökkenést, illetve a toxintermelés megszűnését is.
- Korábban végeztünk fumonizin termeltetést rizsen 5 párhuzamos lombikban. Az FB₁₋₄ toxinok tekintetében az RSD% értékek a következők voltak: 17,4; 20,7; 19,8 és 16,9.
- A Varian 500 ITMS műszer esetében (amellyel a mennyiségi vizsgálatok jelentős részét végeztük) az ESTD kalibrációknál általában 10-11 pontos kalibrációt alkalmaztunk. A lineáris dinamikus tartománya a műszernek az FB₁₋₂ toxinokra 100 pg-100 ng volt. A 100 ng feletti tartományban (500-1500 ng) már telítésbe mentek át a görbék.
- A korábbi években végeztünk vizsgálatokat a HPLC/ESI-MS mérések reprodukálhatóságával kapcsolatban. Az Fv16-os *Fusarium verticillioides* törzs szárított rizstenyészetéből kivonatot készítettünk, majd 4 napon keresztül ugyanazt a mintát napi 5 alkalommal megmértük a kevésbé meredek gradiens eljárással (2h/analízis). Az összesen 20 HPLC/MS analízis alapján kiszámoltuk az FB₁₋₄ toxinok tekintetében a csúcsterületek RSD% értékeit, amelyek a következők voltak: FB₁ 3,77%, FB₃ 3,82%, FB₂ 3,86% és FB₄ 5,27%. Ezek az értékek HPLC/MS mérésekről lévén szó, igen jónak mondhatók.
- a 3.6.1 és 3.6.2 fejezetekben megadott, MeCN/H₂O 1/1 + 0,1% HCOOH, illetve MeOH/H₂O 1/1 + 0,1% HCOOH oldószerkeverégekben oldott FB₁ toxint nem a kalibrációs mérésekhez, hanem a tömegspektrométer mérési paramétereinek optimalizálásához használtuk. A két ITMS műszer más kutatóhelyeken volt és érzékenységekben jelentős eltérés van, ami természetesen különböző koncentrációjú hangoló oldatokat igényel. Általában a MeCN/H₂O elegyet használjuk, de akkoriban a Gabonakutatóban végeztünk kísérleteket az FB₁ toxin MeOH-s oldatával is, és a megmaradt oldatot természetesen nem semmisítettük meg, mivel még felhasználható volt hangolási feladatokhoz.
- Az értekezés 3.4. fejezetében megtalálható az *Aspergillus*-fajok izolálásának leírása a mazsola- és vöröshagymamintákról a megfelelő referenciákkal együtt.
- A mazsolaminták mérésével kapcsolatos megjegyzésével egyetértek, az 50%-os visszanyerés valóban alacsony, további vizsgálatok szükségesek a mazsola mátrixszal

kapcsolatban. Ezeket a méréseket a saját referencia anyagok előállítása után tervezzük elvégezni.

- A MeOH és MeCN elnevezés a szakmában elfogadott, viszont Opponensemvel egyetértve a rövidítések jegyzékében feltüntethettem volna azokat.

Az **Eredményekkel** kapcsolatos megjegyzéseivel egyetértve a következőket válaszolom:

- Valóban, a HPLC elválasztás tekintetében az alkalmazott módszerek inkább adaptációnak tűnnek, mint valódi módszerfejlesztésnek. Ez, az irodalmazást követő meredekebb gradiens elválasztást alkalmazó módszerre igaz, amikor az volt a feladatunk, hogy információkat kapjunk 60 *F. verticillioides* törzs FB₁₋₄ termelőképességéről abból a célból, hogy a későbbi vizsgálatokhoz, újabb fumonizinek leírásához kiválasszuk a legjobb fumonizin termelő törzseket. A módszerfejlesztés akkor indult el, amikor az első mérések után a tömegspektrumok kiértékelésekor több új fumonizint, illetve fumonizin izomert ismertünk fel. Ekkor szereztük be a gyártó által szerkezeti izomerek elválasztására javasolt HPLC oszlopot és optimalizáltuk a kiindulási oldószererősséget és gradiens meredekséget úgy, hogy a lehető legtöbb fumonizin legalább vállban elváljon egymástól (persze így is maradt számos koelválódó komponens). Ez eredményezte az igen hosszú analízis időt és egyben a mai napig a szakirodalom legjobb felbontású fumonizin kromatogramjait (Bartók és mtsai 2010a-b, Bartók és mtsai 2013a, Varga és mtsai 2010). Ma már közel hasonló felbontást jóval rövidebb analízis idővel ún. „core-shell” típusú HPLC oszloppal is elértünk.
- A 12. ábrán vonalak jelzik a rozsról, az emberi szemről és a fokhagymáról izolált *F. verticillioides* törzsekkel termeltetett fumonizinek mennyiségét, mert csak 1-1 izolátum lett begyűjtve.
- Véleményem szerint jó helyen van a 66. oldalon a 16. ábra, mivel itt tárgyalom részletesen az FB analógokat, így ezeket az ábrákat egymás után volt célszerű elhelyezni. A 63. oldalon még csak általánosságban beszélek a fumonizinek MS2 spektrumai jellemző voltáról és utalok a három oldallal később látható ábrára.
- A 7., 9., 11., 13., 14., 15., 17., 18. táblázatok a megjelent és megjelenés alatt lévő közleményeinkből lettek egy az egyben átvéve és a szövegezés angolról magyarra átírva. A fejlécben szereplő szövegeket nem lehetett vízszintesen elhelyezni.

Az **Összefoglalással** és az **Új eredményekkel** kapcsolatos véleményére az alábbiakban válaszolok.

- Az értekezés összeállításakor azt a talán szokatlan megoldást választottam, hogy az ismétlések elkerülése végett az összefoglalásban vastagítva emelem ki az új eredményeket. A tézisekben természetesen a szokásos módon szerepelnek a tézispontok.
- Opponensem 5 pontban említi az értekezés új eredményeit, ugyanakkor nem említi az egyik legfontosabb új fumonizin csoportnak, a három acil-csoportot tartalmazó fumonizineknek a felismerését. Közben igazolást nyert (Harrer és mtsai 2013), hogy ezek a fumonizinek a legnagyobb toxicitással rendelkeznek, emiatt gondolom, hogy az Európai Unió élelmiszerbiztonsággal foglalkozó szervezete (EFSA) is hamarosan felfigyel eredményeinkre.
- A Nelson és mtsai (1993) hivatkozás az értekezés 41. oldalán megtalálható.
- Úgy gondolom a beküldött kéziratokra történő hivatkozás és a referencia listában történő szerepeltetés szakmai körökben elfogadott. Egyébként az értekezés benyújtása óta az értekezésben és a tézisekben „közlésre beküldve”-ként jelölt kézirateink már megjelentek illetve megjelenés alatt vannak (Bartók és mtsai 2013 a-b, Kocsubé és mtsai 2013, Varga és mtsai 2011). Egy, az értekezésben még nem szereplő további

közleményünk is (amely az új *N*-acil-FB₁ származékok azonosítását tárgyalja) megjelenés alatt van (Bartók és mtsai 2013c).

- Megköszönöm, hogy a *F. verticillioides* magyarországi elterjedésének felmérését és a TOFMS technika fumonizin izomerek vizsgálatában elsőként történő alkalmazását kiemelkedő eredményként említi. Ami pedig az új fumonizin izomereknek és különösen az FBX analógoknak, valamint a 3 acil-csoportot tartalmazó FB₁ analógoknak az elsőként történő leírását jelenti, azok jelentőségére mások közleményei hívják fel a figyelmet, amelyek közül néhány 2012-2013-ban megjelent közlemény szövegkörnyezeti hivatkozásait mellékeltem.

Az **Egyéb kérdésekre** a következőket válaszolom:

- Opponensem kérdezi, hogy milyen kilátások vannak a mikotoxinokra (fumonizinekre) rezisztens gabona hibridek előállítására. Elsősorban nem a mikotoxinokkal, hanem a gombabetegségekkel szemben ellenálló kalászos gabonaféléket és kukorica hibrideket lenne szükséges főként nemesítési módszerekkel előállítani. A legjelentősebb fumonizin termelő *Fusarium* fajok (*F. verticillioides* és *F. proliferatum*) a kalászos gabonaféléket nem fertőzik, így ebből a szempontból a kukoricának van elsődleges szerepe a nemesítésben. A hagyományos nemesítési eljárások alkalmazásával a világ több vezető és úgy tudom, hogy hazai növénynemesítő cégek is foglalkoznak, azonban átütő siker még nem született. A GMO fajták és hibridek elterjedését pedig több országban (így hazánkban is) törvények tiltják, illetve korlátozzák. Ezek miatt ma még a megelőzés, azaz a megfelelő agrotechnika, illetve növényvédőszeres kezelés alkalmazásán van a hangsúly.
- Opponensem kérdezi, hogy „mikor várható az ún. eltűrhető napi beviteli érték (TDI) meghatározása fumonizinekre?”. Ilyen érték az EU-ban már jelenleg is megtalálható (a Bizottság 856/2005/EK rendelete). Az FB₁₋₃ toxinok mennyisége együttesen és külön-külön sem haladhatják meg a 2 µg/kg testtömeg/nap értéket. Az újonnan leírt fumonizinek közül véleményem szerint a legveszélyesebbnek tűnő, az általunk először leírt 3 acil-csoportot tartalmazó FB₁ analógokra várható leghamarabb határ- és TDI érték megállapítása. Hosszabb távon az is várható, hogy határ- és TDI érték lesz előírva a tényleges összes fumonizin tartalomra, amely magában foglalja nemcsak a „major”, hanem a számos „minor” fumonizint is. Ehhez viszont olyan szelektív és gyors módszert kellene kidolgozni, amely pl. a fumonizinek különböző szénhidrogén alapvázának vizsgálatán alapul. Opponensem kérdése irányította a figyelmemet arra, hogy az értekezés idevonatkozó részében szerepeltethettem volna a fumonizinekre jelenleg vonatkozó TDI értéket is.

Végezetül megköszönöm fáradozását az igen részletes bírálat elkészítésében és remélem, hogy megjegyzéseire, kérdéseire megfelelő válaszokat tudtam adni.

Szeged, 2013. 06. 21.

Tisztelettel:

Dr. Bartók Tibor

Hivatkozások:

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 Spec* 20:2447-2462

Bartók T, Tölgyesi L, Mesterházy Á, Bartók M, Szécsi Á (2010a) 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, Szekeres A, Varga M, Bartha R, Szécsi Á, Bartók M, Mesterházy Á (2010b) 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 Spec* 24:35-42

Bartók T, Tölgyesi L, Szécsi Á, Varga J, Bartók M, Mesterházy Á, Gyimes E, Véha A (2013a) Identification of unknown isomers of fumonisin B₅ mycotoxin in a *Fusarium verticillioides* culture by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. *J Liquid Chrom Rel Technol* 36:1549-1561

Bartók T, Tölgyesi L, Szécsi Á, Mesterházy Á, Bartók M, Gyimes E, Véha A (2013b) Detection of previously unknown fumonisin P analogue mycotoxins in a *Fusarium verticillioides* culture by high performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. *J Chrom Sci* (JCS-12-511, in press)

Bartók T, Szécsi Á, Juhász K, Bartók M, Mesterházy Á (2013c) ESI-MS and MS/MS identification of the first ceramide analogues of fumonisin B₁ mycotoxin from a *Fusarium verticillioides* culture following RP-HPLC separation. *Food Addit Contam* DOI: 10.1080/19440049.2013.809626

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

Harrer H, Laviad EL, Humpf H-U, Futerman AH (2013) Identification of N-acyl-fumonisin B₁ as new cytotoxic metabolites of fumonisin mycotoxins. *Mol Nutr Food Res* 57:516-522

Kocsubé S, Varga J, Szigeti Gy, Baranyi N, Suri K, Tóth B, Toldi É, Bartók T, Mesterházy Á (2013) *Aspergillus* species as mycotoxin producers in agricultural products in Central Europe. *Proc Nat Sci Matica Srpska* 124:13-25

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, Vágvolgyi Cs, Bartók T (2011) Black Aspergilli and fumonisin contamination in onions purchased in Hungary. *Acta Alimentaria* 41:414-423

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

Fontosabb idézetek szövegkörnyezettel 2012-2013-ban (az idézett közleményeim vastagított számokkal szerepelnek a szövegkörnyezetben).

Scott PM: Recent research on fumonisins: a review.

Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 29, 242-248 (2012)

There are many recently discovered fumonisins. These include the FBX series – 12 compounds with the tricarballic acid moiety replaced by other carboxylic acids (such as cis-aconitic acid, oxalysuccinic acid and oxalylfumaric acid), the FD series, which has fewer carbon atoms in the backbone, and numerous other fumonisin related metabolites (Bartók et al. 2006) [1], as well as 28 isomers of FB1 (Bartók et al. 2010) [2], detected by LC-MS/MS in *F. verticillioides* cultures.

Falavigna C; Cirlini M; Galaverna G; Sforza S; Dossena A; Dall'Asta C: LC/ESI-MS/MS analysis outlines the different fumonisin patterns produced by *F. verticillioides* in culture media and in maize kernels.

J. Mass Spectrom. 47, 1170-1176 (2012)

In a recent work, the detection and univocal characterization of new fumonisin mycotoxins and fumonisins-like compounds by using a multistage mass spectrometry technique have been reported by Bartók et al.[4], [1]. The same research group employed LC-MSn techniques in structural studies for the identification of six new, higher molecular weight FB analogues, having the hydroxyl groups of the tricarballic acid units esterified with long-chain fatty acids, also distinguishing among various isomers. [21], [3]. However, these methods have been applied only to fungal mycelia and not to liquid growing media, using an ion trap feature for structure identification.

So as to univocally characterise each analyte, MS/MS experiments were performed in order to obtain product ions spectra due to the fragmentation of the selected molecular ions. The fragmentation patterns achieved were compared with those proposed by Bartók et al., [4], [1] thus confirming the identity of each compound. The neutral losses obtained upon the fragmentation of the molecular ions are very similar for all the target toxins. Bartók et al. proposed the theoretical collision-induced dissociation fragmentation patterns of [FB1+ H]⁺, [FA1+H]⁺ and [FC1 +H]⁺ [4], [1]. The three fragmentation patterns suggested by the authors

are very similar: in the course of fragmentation, TCA units are gradually eliminated along with H₂O, through the concomitant formation of the corresponding anhydride or via their conversion in the form of ketene.

Lazzaro I; Falavigna C; Dall'Asta C; Proctor RH; Galaverna G; Battilani PB: Fumonisin B, A and C profile and masking in *Fusarium verticillioides* strains on fumonisin-inducing and maize-based media.

Int. J. Food Microbiology 159, 93-100 (2012)

All strains were isolated from diseased maize plants in Italian fields, and chosen for their ability to produce B fumonisins; they belong to different chemotypes, with FB1>FB2>FB3 in ITEM 10026 and FB3 higher than FB2 in ITEM 10027 and ITEM 1744. Formerly, FB chemotypes of *F. verticillioides* were published by Szécsi et al. (2010) [4].

Lazzaro I; Busman M; Battilani P; Butchko RAE: FUM and BIK gene expression contribute to describe fumonisin and bikaverin synthesis in *Fusarium verticillioides*

Int. J. Food Microbiology 160, 94-98 (2012)

F. verticillioides strains used in this study were recovered from maize and were confirmed to be fumonisin-producers (Etcheverry et al., 2009; Moretti et al., 1995). They showed different patterns of fumonisin production: ITEM 1744 had a classical pattern of FBs produced (FB1>FB2>FB3; de Oliveira Rocha et al., 2011; López- Errasquín et al., 2007) while ITEM 10027 presented one of the minor chemotypes: FB1>FB3>FB2 (Szécsi et al., 2010) [4], in accord with our previous data (ITEM1744: 2800 FB1>521 FB2>480 FB3 µg/kg; ITEM 10027: 7720 FB1>2180 FB3>2070 FB2 µg/kg) (Lazzaro et al., 2012).

Krska R; Becalski A; Braekevelt E; Koerner T; Cao XL; Dabeka R; Godefroy S; Lau B; Moisey J ; Rawn DFK; Scott PM; Wang ZW; Forsyth D: Challenges and trends in the determination of selected chemical contaminants and allergens in food; Review

Anal. Bioanal. Chem. 402, 139-162 (2012)

Newly discovered fumonisins that have recently been detected by LC–MS–MS in *F. verticillioides* cultures are the FBX series comprising 12 compounds with the tricarballic acid moiety replaced by other carboxylic acids (for example cis-aconitic acid, oxalylsuccinic acid, and oxalylfumaric acid), the FD series with fewer carbon atoms in the backbone and several others, including FB5 and FBK1 [186], [2].

Lazzaro I; Susca A; Mulè G; Ritieni A; Ferracane R; Marocco A; Battilani P: Effects of temperature and water activity on FUM2 and FUM21 gene expression and fumonisin B production in *Fusarium verticillioides*

Eur. J. Plant Pathology 134, 685-695 (2012)

The FB pattern that we found, FB1>FB3>FB2, is one of the two minor chemotypes previously described for *F. verticillioides* (Szecsi et al 2010) [4].

Dall'Asta C; Falavigna C; Galaverna G; Battilani P: Role of maize hybrids and their chemical composition in *Fusarium* infection and fumonisin production

J. Agr. Food Chem. 60, 3800-3808 (2012)

Nevertheless, because the same statistical trend was found for free and total fumonisins, this result suggests that fatty acids may be implicated also in the masking phenomenon. Very recently, Bartok et al.² [3] found several fatty acid esters of fumonisins in fungal mycelia. Although their occurrence has never been proven in food and/or in plants, these derivatives should be actually considered as masked fumonisins. Moreover, these compounds may be cleaved under alkaline conditions similar to those applied in this study, thus releasing the hydrolyzed forms. Although the formation of fumonisin derivatives esterified with fatty acids could offer a possible explanation of the masking phenomenon, according to Bartok et al.,² [3] these derivatives are produced by fungi in very small amounts and are with difficulty excreted in the media, due to their low polarity.

Capriotti AL; Caruso G; Cavaliere C; Foglia P; Samperi R; Laganà A: Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry

Mass Spectrometry Reviews 31, 466-503 (2012)

Nielsen and Smedsgaard (2003) reported a database of 474 mycotoxins and fungal metabolites, and previously unknown metabolites have been recently discovered (Bartók et al., 2010), [3]. In this scenario, two kinds of strategy can be followed to develop and validate MS-based methods for mycotoxin determination: (i) to devise a wide range method to detect and roughly quantify as many metabolites as possible in generic samples, reducing the selectivity of extraction and cleanup steps to a minimum; (ii) to develop a high-performance method to determine rationally selected metabolites in selected samples.

Bulder A S; Arcella D; Bolger M; Carrington C; Kpodo K; Resnik S; Riley RT; Wolterink G; Wu F;

WHO Food Additives Series 65 (Safety evaluation of certain food additives and contaminants), 325-794 (2012)

Fumonisin (addendum). Idézetek a 420-421 oldaláról:

Bartók et al. (2006) [1] detected 37 new fumonisins and grouped them according to fumonisin types: fumonisin B, fumonisin A, fumonisin C and a new series type, FBX. The FBX series is esterified by other carboxylic acids, such as *cis*-aconitic acid, oxalylsuccinic acid and oxalylfumaric acid.

Four new compounds (belonging to the FBX series described above) were detected by Bartók et al. (2008) [5]. In these compounds, one of the hydroxyl groups attached to the fumonisin

backbone was esterified by a carboxylic acid (oxalylsuccinic acid) other than tricarballic acid.

Some of these analogues may occur in naturally contaminated maize at relatively low levels (<5% of the sum of FB1, FB2 and FB3 levels), and they are not detected with most traditional analytical methods due to the derivatization process, but can be detected with the use of LC-MS (Rheeder, Marasas & Vismer, 2002; [Bartók et al., 2006](#)) [1].

New components described by [Bartók et al. \(2010a\)](#) [3] are significantly more apolar than earlier-described fumonisins, and their uptake into and toxicity elicited in the various tissues of living organisms may therefore be different from those of other mentioned fumonisins. The new compounds were denoted as esterified FB1 (EFB1) toxins, with the suggested names EFB1 PA, *iso*-EFB1 PA, EFB1 LA, *iso*-EFB1 LA, EFB1 OA and *iso*-EFB1 OA, where the fumonisin backbone is esterified by the fatty acids C16H32O2 (palmitic acid, PA), C18H32O2 (linoleic acid, LA) and C18H34O2 (oleic acid, OA). The total amount of these new compounds is estimated to comprise 0.1% of the FB1 concentration. The FB1 toxin has 10 chiral centres; theoretically, therefore, 1024 stereoisomers can be produced. The 28 FB1 stereoisomers found by [Bartók et al. \(2010b\)](#) [2] represented 2.8% of the quantity of FB1.

Berthiller F; Crews C; Dall'Asta C; Saeger SD; Haesaert G; Karlovsky P; Oswald IP; Seefelder W; Speijers G; Stroka J: Masked mycotoxins: A review

Molecular Nutrition and Food Research 57, 165-186 (2013)

Fumonisin fatty acid esters were identified in rice cultures inoculated with *F. verticillioides* – these substances are, however, most likely to have been fungal metabolites [80], [3].

Falavigna C; Lazzaro I; Galaverna G; Battilani P; Dall'Asta C: Fatty acid esters of fumonisins: first evidence of their presence in maize

Food Additives and Contaminants Part A (2013) DOI:10.1080/19440049.2013.802839

Concerning minor fumonisin analogues, because they are commonly produced at relatively low levels (about 35 <5% of the total fumonisins produced), they have been less extensively studied than B-series analogues so far (Gelderblom et al. 1988; [Bartók et al. 2006](#)) [1].

The latter hypothesis is also supported by the study performed by [Bartók et al. \(2010\)](#) in which three fumonisin derivatives obtained by the esterification of FB1 with palmitic, oleic and linoleic fatty acids (the proposed structures are reported in Figure 1) were detected and characterised in solid cultures of *F. verticillioides* grown on cracked rice. Such derivatives, called palmitoyl-, oleoyl- and linoleoyl-EFB1 (EFB1PA, EFB1OA and EFB1LA, respectively), can be considered as masked fumonisins and, more specifically, as bound fumonisins [3].

Sample preparation for the analysis of FB1 metabolites was performed according to the procedure proposed by [Bartók et al. \(2010\)](#) with slight modification [3].

Each analyte was univocally characterised by performing the MS/MS experiment to obtain product ion spectra due to the fragmentation of the selected molecular ions, and the identity of

each compound was confirmed by the comparison of the fragmentation pattern achieved with those proposed by Bartók et al. (2010) (see Figure 2) [3].

Besides FB1, two peaks can be observed for both FB1 derivatives, according to Bartók et al. (2010), probably due to the presence of isomeric esters, depending on the esterification site on the fumonisin backbone [3].

In agreement with previous experiments (Bartók et al. 2010), FB1 fatty acid esters are formed by fungal strains only on a complex substrate rich in lipids, such as rice or maize [3].

Similarly, the percentage of fatty acid ester derivatives found in maize samples as well as in corn meal medium are generally higher than those reported for rice-based media (Bartók et al. 2010). As reported by the authors, fatty acid esters of FB1 found in rice medium are about 0.1% of the FB1 concentration, while in maizebased medium, this percentage reaches 6.7% [3].

Idézett közlemények:

- [1] 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
- [2] Bartók T, Tölgyesi L, Szekeres A, Varga M, Bartha R, Szécsi Á, Bartók M, Mesterházy Á (2010) Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B₁ (FB₁) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24:35-42
- [3] Bartók T, Tölgyesi L, Mesterházy Á, Bartók M, Szécsi Á (2010) Identification of the first fumonisin mycotoxins with three acyl groups by ESI-ITMS and ESI-TOFMS following RP-HPLC separation: palmitoyl, linoleoyl and oleoyl EFB1 fumonisin isomers from a solid culture of *Fusarium verticillioides*. *Food Addit Contam* 27:1714-1723
- [4] Szécsi Á, Szekeres A, Bartók T, Oros Gy, Bartók M, Mesterházy Á (2010) Fumonisin B1-4-producing capacity of Hungarian *Fusarium verticillioides* isolates. *World Mycotoxin J* 3:67-76
- [5] Bartók T, Szekeres A, Szécsi A, Bartók M, Mesterházy Á (2008) A new type of fumonisin series appeared on the scene of food and feed safety. *Cereal Res Commun* 36:315–319