

Szakmai zárójelentés
OTKA-PD 76859 sz. pályázat
Készítette: Szekeres András

A 76859 számú OTKA-PD pályázat során felmértük 60 magyarországi *Fusarium verticillioides* izolátum fumonizin B1, B2, B3 és B4 toxinjainak termelési profilját. A toxinok fermentációját megfelelően előkészített rizsen végeztük, melyeket a törzsek táptalajon előtenyésztett inokulumaival oltottunk be. A termelt fumonizineket fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadék kromatográfiával (RP-HPLC) választottuk el és a komponenseket elektropray ionizációs ioncsapdás tömegspektrométerrel (ESI-IT-MS) detektáltuk és azonosítottuk. A minta-előkészítéshöz csak egy egyszerű oldószeres extrakciót alkalmaztunk. A kísérletsorozatban jól látszott, hogy az izolátumok nagy része az irodalmi adatokkal összhangban az FB1 toxint termelte legnagyobb mennyiségben, de sikerült olyan fumonizin termelési sajátosságú törzset is izolálni, melyeknél az FB2 toxin termelése jóval meghaladta az FB1-ét. Az egyes izolátumok a morfológiai karakterükben nem különböztek egymástól, a fumonizin B analógok termelési profilja alapján azonban három jól elkülönülő kemotípust lehetett elkülöníteni. Az első kemotípus a fumonizineket az FB1>FB2>FB3>FB4 szerinti csökkenő mennyiségekben termelte, a második kemotípus nagyobb mennyiségű FB3-at termelt mint FB2-öt, míg a harmadik típusba tartozó törzsek az FB2 és FB4 toxinokat termelték nagyobb mennyiségben (Szécsi Á; Szekeres A; Bartók T; Oros G; Bartók M; Mesterházy Á: *Fumonisin B1-4-producing capacity of Hungarian Fusarium verticillioides isolates.*, *World Mycotoxin J* 3: 67-76, 2010).

A fermentációs optimalizálási kísérletekhez a legnagyobb mennyiségű fumonizin mikotoxint termelő törzset választottuk ki, és meghatároztuk a maximális toxintermeléshez szükséges tenyészedény típust, rizsmennyiséget, vízaktivitást, hőmérsékletet valamint optimalizáltuk az inokulációt is. A tenyésztés idejét a kezdeti 1 hónapról sikerült két hétre csökkenteni jelentős toxin-mennyiség vesztés nélkül (András Szekeres, Anita Kecskeméti, Mónika Gruic-Tölgyesi, Eszter Andó, Brigitta Harmath, Árpád Szécsi, Ákos Mesterházy, *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Nagygyűlése. Keszthely, Magyarország, 2010*).

A korábbi kutatásaink során kifejlesztett HPLC-ESI-Ion Trap módszerünket használva az eddig általunk leírt 37 új fumonizin mellett további 4 új az FBX típusba tartozó részlegesen hidrolizált, oxál-borostyánkősavat (PHFB-OSA) tartalmazó fumonizin izomert azonosítottunk. A vegyületek előfordulását először full scan üzemmódban vizsgáltuk, majd a karakterisztikus $M+H^+$ értékek azonosítása után a szerkezetek jellemző alegységeit MS-MS fragmentálást követően határoztuk meg. A fragmens ionok segítségével leírtuk a lehetséges fragmentációs utakat, amit, kihasználva az ioncsapda analizátor nyújtotta lehetőségeket le is ellenőriztünk (*Bartók T; Szekeres A; Tölgyesi L; Varga M; Bartha R; Szécsi Á; Németh L; Mesterházy Á: 115-116 in 8th Balaton symposium on high performance separation methods and 15th International symposium on separation sciences*).

Az elválasztás hatékonyságát növelve a felhasznált kromatográfiás oszlop szemcseméretének csökkentésével és magának az állófázis minőségének megváltoztatásával (YMC-Pack J'sphere ODS H80), valamint az elválasztáshoz használt grádiens meredekségének csökkentésével és az elválasztás idejének növelésével a módszert továbbfejlesztettük, ami lehetőséget biztosított további 28 FB1 izomer kromatográfiás szeparációjára. Az esetleges mesterséges származékok megjelenésének minimalizálása érdekében az analízist megelőzően itt is csak egy egyszerű oldószeres extrakciót alkalmaztunk mintaelőkészítésként. A protonált molekulák egzakt tömegét repülési-idő tömegspektrométerrel (TOF-MS) határoztuk meg és az FB1 izomereket a totál-ion kromatogram összegképletnek megfelelő tömeg szerinti extrakciójával tettük láthatóvá. Ilyen módon 29 kromatográfiás csúcsot különítettünk el. A korábban említett IT-MS alkalmazásával ezekből 28 csúcsot azonosítottunk mint FB1 izomer a komponensek MS2 spektruma alapján, ahol jól felismerhetőek voltak a karakterisztikus fragmens ionok, mint például az alapvázra jellemző m/z 299. Ezen FB1 izomerek teljes mennyisége a főtermék FB1-hez képest 2,8 %-nak adódott, amely kis mennyiségnek tekinthető ugyan, de érdemes megjegyezni, hogy a komponensek toxicitásáról és élelmiszerbiztonsági jelentőségéről még nincsenek ismereteink (*Bartók T; Tölgyesi L; Szekeres A; Varga M; Bartha R; Szécsi Á; Bartók M; Mesterházy Á: Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B1 (FB1) mycotoxin in a solid rice culture infected with Fusarium verticillioides by reversed-phase hi, Rapid Commun. Mass Spectrom. 24: 35 - 42, 2009*).

A pályázat időtartama alatt a nemzetközi tudományos folyóiratokban megjelent új eredmények hatására, olyan kutatásokat is végeztünk, melyek az eredeti munkatervben nem jelentek meg, de szervesen kapcsolódtak a témához, és szükségesnek éreztük ebben az irányban kibővíteni a vizsgálatokat, hogy lépést tartsunk a terület nemzetközi eredményeivel. Ez a téma a rendelkezésre álló analitikai háttér alkalmazása a környezetünkben fellelhető potenciálisan mikotoxin szennyezettségnek kitett élelmiszerek fumonizin tartalmának felmérésére, melyet párhuzamosan végeztünk a termékek mikrobiológiai analízisével a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékének segítségével. A vizsgálataink során azt találtuk, hogy viszonylag sok élelmiszeripari termék vizsgálata során tapasztalható fumonizin szennyezettség, de a *Fusarium* izolátumok nem voltak kimutathatóak a mikrobiológiai tenyésztések során. Ezzel szemben sok esetben a magas fumonizin szint az *Aspergillus niger* törzsek megjelenésével volt összefüggésben. Ezt a jelenséget először kávé esetében vizsgáltuk részletesebben, de az eredmények publikálásában a külföldi versenytársak néhány héttel megelőztek bennünket. Ezek után mazsolában is kimutattunk fumonizin toxinok jelenlétét, és sikerült is igazolni, hogy ténylegesen az *Aspergillus* törzsek felelősek ezek termeléséért. Így ki tudtuk jelenteni, hogy a fumonizin toxinokat nem csak a *Fusarium* nemzetség tagjai termelhetik, amint azt korábban még a kutatási terv bevezetőjében is szerepelt, hanem az élelmiszereinkben jóval nagyobb elterjedésű *Aspergillus* fajok is, és a toxinok mennyisége esetenként akár elérheti az élelmiszerbiztonsági határértékek kilencszeresét is (Varga J; Kocsubé S; Suria K; Szigeti Gy; Szekeres A; Varga M; Tóth B; Bartók T: *Fumonisin contamination and fumonisin producing black Aspergilli in dried vine fruits of different origin.*, *Int. J. Food Microbiol.* 143(3): 143-149, 2010)!

A fumonizinek analitikai meghatározására a legelterjedtebb módszer a tömegspektrometriás meghatározás, azonban ennek hátránya a detektálásra használt műszerek magas beszerzési és fenntartási költsége. Ezért kísérleteink során kidolgoztunk egy a tömegspektrometriás detektálás alternatívjaként használható költségghatékony és gyors módszert a fumonizin B1, B2, és B3 mikotoxinok meghatározására. A meghatározás célja azért ez három fumonizin volt, mert az EU-ban az első kettő vegyületre az USA-ban pedig mindháromra hatósági határértékek vannak megállapítva. A módszerfejlesztés során a származékképzést elkerülve igyekeztünk megfelelő, megbízható módszert találni ezen fumonizinek elválasztására

Korona kisüléssel aeroszol detektor (Corona-CAD) alkalmazásával. A detektor univerzalitása miatt és a kapott detektálási limitek alapján mindenképpen szükséges volt a minták előzetes tisztítása és koncentrálása a korábban használt extrakción túl. Ehhez szilárd fázisú extrakciót alkalmaztunk XAD-4 és SAX tölteteket használva, majd ezen töltetek alacsony visszanyerési értékei miatt a Trilogy cég szilárd fázisú extrakciós (SPE) oszlopai mellett döntöttünk. A kísérletsorozat során meghatároztuk az új módszerhez tartozó detektálási-, és kvantitálási limiteket, megvizsgáltuk a linearitást a határértékeknek megfelelően kiválasztott két nagyságrendnyi koncentráció tartományban és a minta-előkészítés visszanyeréseit, valamint a módszer reprodukálhatóságát. Az általunk használt szilárd fázisú extrakciós eljárás során a kukoricaminták fumonizin mikotoxin tartalmát sikerült megfelelően kimutatni, és egy rutin elemzésben jól használható mérési eljárást kidolgozni (Szekeres A; Budai A; Nemeth Laszlo; Bartók T; Szécsi Á; Mesterházy Á: *Measurement of fumonisin mycotoxins by high-performance liquid chromatography coupled with Corona Charged Aerosol Detector (HPLC-CAD)*, *J. Chrom A (közlésre elküldve)*).

Az eredeti kis léptékű tenyésztés léptéknövelését (scale up) sikerült megoldani, amely nagy tömegű fermentációs termék előállítását tette lehetővé és a tartalmazott mikotoxinok mennyisége a lehető legnagyobb volt mind össztömegében, mind pedig az egyes komponensek tekintetében. A preparatív tisztítási kísérleteket a legnagyobb mennyiségben előforduló FB1 izomer preparatív tisztításával kezdtük el, melyhez nagy mennyiségű fermentációs terméket állítottunk elő a mikrobiológiai munka során. Az optimalizált oldószeres és szilárd fázisú extrakció a toxin tisztítás során is hasznosnak bizonyult, amit egy előzetes etil-acetátos extrakció beiktatásával egészítettünk ki, amely segített megszabadulni a fermentációs termékben lévő apoláris szennyeződésektől. A tisztítás lépéseit a fumonizinek detektálásával, HPLC-CAD módszerrel ellenőriztük. A nyers extraktum végső tisztításához egy folyadék-folyadék kromatográfiás módszert alkalmaztunk, amit a pályázat kezdetén Közép-Európában csak a nálunk megtalálható Centrifugal Partition Chromatograph (CPC) készülékkel tudtunk kivitelezni. A módszerfejlesztés során 34 oldószerrendszerben vizsgáltuk meg az FB1 és a jelentősebb szennyezők megoszlását, és meghatároztuk az egyes rendszerekhez tartozó partíciós koefficienseket. Végül ezekből a rendszerekből választottuk ki a legmegfelelőbb bifázisú terner elegyet, ahol az FB1 partíciós koefficiense 1,17 volt, míg a környező szennyezőkkel mért szeparációs faktor 1,5-től 2,21-ig változott, ami elegendő a preparatív futás megkezdéséhez. Az

oldószerrendszer kifejlesztése után optimalizáltuk a készülék paramétereit, a rotor sebességét és az áramlási sebességet descendens módban, azaz az alsó fázist alkalmaztuk mozgó fázisként. A gyűjtött frakciókat tömegspektrométerrel vizsgáltuk az FB1 tartalomra. A tisztítás során az FB1 mikotoxint 98,9%-os tisztaságban sikerült kinyernünk (Szekeres A; Lórántfy L; Kecskeméti A; Szécsi Á.; Mesterházy Á; Vágvölgyi Cs: *Purification of Fumonisin B1 by Centrifugal Partition Chromatography, J. Chrom A (közlésre elküldve)*).

A pályázat időtartama alatt a preparálásra használt CPC készülék meghibásodott és vissza kellett küldeni a gyártóhoz, ami jelentős kiesést okozott a tisztításokban, de a francia gyártónak köszönhetően négy hónap múlva újra üzemképesen került vissza laboratóriumunkba.

A preparatív módszerfejlesztés lépéseit kibővítve - köszönhetően az új folyadék-folyadék kromatográfiás (CPC) preparatív elválasztási technika mélyebb megismerésének - további célzottabb oldószerrendszereket alkalmaztunk a fumonizin B1 várható szeparációjának érdekében. A CPC rendszer és a korábban az analitikai detektálásra használt Corona CAD detektor összekapcsolásával lehetőség nyílt a nem UV aktív FB1 toxin elúciójának korrekt követésére, a korábban alkalmazott idő alapján történő frakciószedés és offline tömegspektrometriás detektálás helyett. Az FB1 tisztítás során az ioncserélő előtisztítási lépést felcseréltük egy szintén általunk kifejlesztett CPC technikán alapuló elválasztásra a pH zone refining (PZR) módszer alkalmazásával, ahol a tisztítandó savas karakterű komponensek a kétfázisú oldószerrendszerben egy kialakított pH grádiens mentén a jellemző pKa értéküknek megfelelően eluálhatók. Ebben az esetben a kétfázisú rendszer metil-terc-butil-éter, butanol, acetontiril, víz 2:2:1:5 arányú elegye volt, a felső fázisban visszatartó savként (retainer acid) trifluór ecetsavat alkalmazva. Az injektálást a feltöltött állófázisra történt a mozgó fázis egyidejű elindításával, még a hidrodinamikus equilibrium beállása előtt. A PZR módszer alkalmazásával már az első szeparációs lépés után 95% feletti tisztaságot értünk el az FB1 tekintetében! A következő lépés a már korábban kidolgozott szintén folyadék-folyadék kromatográfiás CPC elválasztás volt, mellyel a preparátum tisztaságát ismételten 98% fölé emeltük Így a tisztítás teljes egészében szilárd fázis használata nélkül sikerült megoldani (közlés folyamatban)!

A PZR módszerrel előtisztított frakciókból az alap oldószerrendszer segítségével a CPC futás során duál módban, ascendens-descendens váltás

közbeiktatásával 98 % feletti tisztaságban FB2, FB3 és FB4 komponensek tisztítása is folyamatban van. A további tisztítási eredmények közzéte a jövőben várható.

A pályázathoz kapcsolódó publikációs listát a kutatás előrehaladtával megváltozott tudományos közzéte formák miatt, a Technikai Útmutató alapján főként csak az elfogadott és a közzéte elküldött folyóiratcikkekkel töltöttem fel, a konferencia absztraktokat csak abban az esetben szerepeltettem, ha még nem készült belőle rangosabb publikáció. A projekt eredményeinek egy része később, várhatóan 2 éven belül kerül közzéte, és a feltüntetett közlemények között is szerepel közzéte elküldött folyóiratcikk, ezért szeretném kérni, hogy a jelentésben foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a később megjelent közleményeket is.