

Mikotoxinogén penészgombák vizsgálata és az általuk termelt mikotoxinok analitikai kimutatása fűszerekből és takarmányokból

György Éva¹, Harai Éva¹, András Csaba Dezső², Tolokán Antal³, Hantz András¹

Sapientia EMTE, ¹Műszaki és Természettudományi Tanszék, ²Élelmiszertudományi Tanszék, Csíkszereda, ³WESSLING Hungary Kft., Budapest

Studiul micromicetelor micotoxinogene și determinarea analitică a micotoxinelor din condimente și furaje

Micotoxinele produse de numeroase micromicete sunt în general citotoxice, care afectează structura celulelor sau anumite funcții celulare. Dintre efectele cele mai nocive care afectează sănătatea umană, pot fi amintite: efectul cancerigen, teratogen, suprimarea funcțiilor reproductive și a sistemului imunitar, precum și efectele asupra sistemului nervos. Micromicetele, respectiv micotoxinele produse contaminatează plantele încă din stadiul de cultură sau în cursul depozitării. Micotoxinele ajung în organismul uman direct, prin intermediul alimentelor de origine vegetală, sau indirect, prin intermediul produselor de origine animală (de ex. carne, lapte, ouă). În cadrul prezentei cercetări s-a realizat identificarea micromicetelor din diferite furaje, determinarea condițiilor de proliferare și de producție a toxinelor, precum și determinarea analitică a micotoxinelor din furaje și boia de ardei.

Cuvinte cheie: micromicete micotoxinogene, aflatoxine, cromatografia lichidă de înaltă performanță, furaje, condimente.

Study of mycotoxigenic moulds and analytical determination of their mycotoxins from spices and forages

Mycotoxins produced by many micromycetes are generally cytotoxic, affecting the cellular structures or functions. Among the effects most frequently affecting human health the following can be mentioned: carcinogenicity, teratogenicity, decreasing of the reproductive potential, immunosuppression and neurotoxicity. Micromycetes, by their mycotoxin production, contaminate plants from the cultivation stage, or during the storage period. Mycotoxins infest the human body directly, by consumption of foods of plant origin, or indirectly, through products of animal origin (eg. meat, milk, eggs). The aim of this research was the identification of different micromycetes from forages and spices, the determination of the proliferation and toxin production conditions, and the qualitative and quantitative determination of the mycotoxins from forages and paprika powder.

Keywords: mycotoxigenic moulds, aflatoxins, HPLC, forages, spices.

Orvostudományi Értesítő, 2008, 81 (4): 275-278

www.orvtudert.ro

Az élelmiszer-, illetve a takarmánybiztonsági kérdések megoldásában fontos tevékenységnek minősül a mikotoxinok tanulmányozása és pontos mennyiségi meghatározása. A penészgombák, illetve az általuk termelt mikotoxinok már a termőterületen, vagy pedig a tárolás során fertőzhetik a növényeket. Kedvező körülmények között a penészgombák gyors növekedésnek indulnak, és ha stresszhatás éri őket, toxint termelnek. A másodlagos metabolitok termelése a gombaszaporodás exponenciális szakaszának a végére jellemző [8]. Az így keletkezett mikotoxinok a növényi eredetű élelmiszerekkel (gabonamagvak, fűszerek) közvetlenül, az állati eredetű termékek révén (pl. vese, máj, tej, tojás) pedig közvetve kerülhetnek az ember szervezetébe [2].

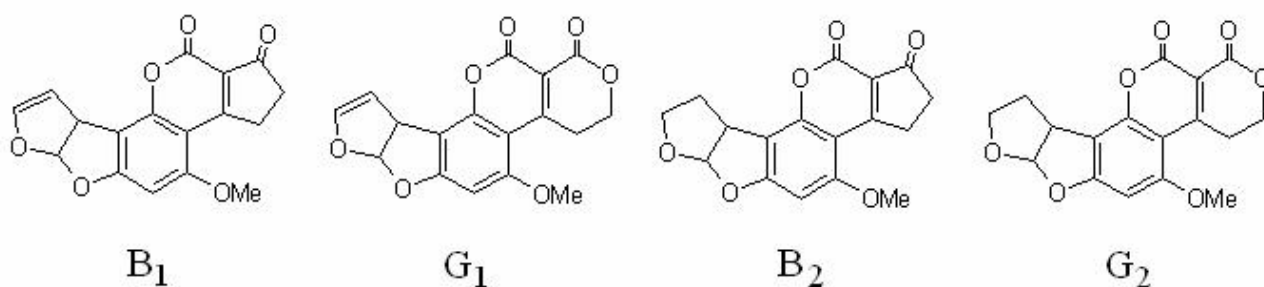
A legfontosabb mikotoxintermelő gombafajok az *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Penicillium verrucosum*, *Fusarium graminearum* és a *Fusarium verticillioides* [10]. Az *Aspergillus* fajok nagyon gyakoriak a környezetben, a talajban és a növényzeten, elsősorban mint szaprobionták és mint másodlagos növényi kórokozók. A legtöbb *Aspergillus* penészgomba élelmiszereinkben romlást okozóként van jelen. Számos faj xerofil. Általában tárolt termékeken fordulnak elő, így gabonaféléken, magvakon, fűszereken. Az *Aspergillus flavus* aflatoxin B₁, B₂, valamint ciklopiazonsav termelésére képes. Az *A. parasiticus* és az *A. nomius* aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂-t termel. A további fontosabb mikotoxin termelők az *A. ochraceus* (ochratoxint és penicillinsavat termel) és az *A. versicolor* (szterigmatocisztint termel) [1, 2, 3]. A *Penicillium* fajok általában kisebb hőmérsékleten növekednek, mint az *Aspergillus*ok. Ubikviterek a talajban, a gabonákon és az élelmiszereken. Hűtött raktárakban, valamint fagyasztott élelmiszereken is világszerte előfordulnak. A *Penicillium* penészgombák által termelt legfontosabb mikotoxinok a citrinin, a patulin, a citreoviridin és

a penitrem. A növények kórokozó gombáinak egyik legjelentősebb csoportja a *Fusarium*ok, leggyakrabban gabonaféléken és olajos magvakon fordulnak elő. A *Fusarium* fajok fontosabb toxinjai a trichotecének és a fumonizinek [13]. Az élelmiszerekben más toxikus gombák is elterjedtek, mint például a *Cladosporium*, a *Mucor* és a *Stachybotrys* [7].

A mikotoxinok rendkívül változatos kémiai szerkezetű vegyületek. Ennek megfelelően az általuk kiváltott tünetek és megbetegedések is sokfélék. Az ember egészségére ható leggyakoribb tényezők között a rákkeltő, a fejlődési rendellenességet okozó, a szaporodóképességet csökkentő, az immunosuppresszív és az idegrendszeret károsító hatások említhetők. Ezek a megbetegedések általában krónikus jellegűek, amelyek a mikotoxin huzamosabb fogyasztásának következményei, bár bizonyos esetekben akut tünetek, hányás, hasmenés, remegés, bőrkiütések is jelentkeznek [9, 14].

Az ember a mikotoxinokkal többnyire nem közvetlenül, hanem a növényi vagy állati eredetű táplálék szennyezettsége révén találkozik. A mikotoxinok különös veszélyessége annak tulajdonítható, hogy rendkívül hatékony mérgek, igen kis koncentrációban hatnak, és a kis dózisok hatása kumulálódik. A mikotoxikózis nem járványos, viszont antibiotikumokkal, gyógyszerekkel alig kezelhető, a védekezés legjobb módja a megelőzés. Ehhez a mikotoxinok kimutatására alkalmas, érzékeny, műszeres analitikai módszerek kidolgozására van szükség, mivel a mikotoxinok általában kis mennyiségben fordulnak elő az élelmiszerekben (takarmányokban). A mikotoxin-szennyezettség vizsgálatára legalkalmasabbak a nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiás (HPLC) módszerek [1]. Az egyre szigorodó élelmiszerekre vonatkozó előírások megkövetelik a kimutatási határértékek csökkentését, ezáltal érzékenyebb detekciós





1. ábra. A vizsgált aflatoxinok kémiai szerkezete

módszerek alkalmazását. A legfontosabb mikotoxinok az aflatoxinok, ezen belül a legveszélyesebb (AFB₁) élelmiszerekben megengedhető koncentrációja 10-20 µg/kg, takarmányokban 100 µg/kg [17].

Az általunk analitikailag vizsgált mikotoxinok az *Aspergillus flavus* és az *Aspergillus parasiticus* által termelt aflatoxin B₁, G₁ illetve B₂, G₂ voltak, mivel a legveszélyesebb mikotoxinok, valamint a fenti penészgombák viszonylag gyakori fajok. Általuk főként importált termékek (földimogyoró, paprika, szója, kukorica, zab, kókuszdió) fertőztek. Kémiaileg dihidrofurano-furán (B₁, G₁ – rendkívül toxikusak) és tetrahidrofurano-furán (B₂, G₂ – kevésbé toxikusak) származékok, szerkezetük az 1. ábrán látható.

Az aflatoxin B₁ az egyik leghatásosabb májrák-keltő anyag, patkánykísérletekben 1 µg is okozott daganatot [18]. Az aflatoxin-molekulának feltehetően két reaktív (toxikus/karcinogén) helye van, a dihidrofurán rész telítetlen vége és a lakton gyűrű a kumarin részből. Hasonló szerkezetű karcinogén vegyületekkel (pl. benz[a]pirén) egyetemben az AFB₁ a DNS szálhoz kötődve mutációt vált ki, vagyis a tumorképződés a genotoxicitás következménye [11]. Majdnem kizárólag máj és vesedaganatokat okoz, így valószínűsíthető volt, hogy a toxin valamely reaktív metabolitja felelős a mutagén hatásért. Továbbá, mivel a toxin-molekula nem rendelkezik kötőhellyel, mellyel kovalensen beépülhetne a DNS láncba ez további bizonyíték volt az aktív köztitermék létezésére. Az AFB₁ a májban a CYP3A4 citokróm-oxidáz enzim (EC 1.14.13.97) hatására oxirán-származékot képez, egy oxigénatom kapcsolódik a 8. és 9. számú szénatomra, a 8,9-*exo*-epoxi-AFB₁ köztitermékét hozva létre, ami igen aktív és vízkilépéssel kötődik a DNS-szálra [12, 18]. A 2. ábrán ez a két konsekutív reakció látható. Magas kötődési affinitása a guaninhoz nagy jelentőségű, mivel a p53 celluláris tumor antigén 249-es számú kodonjában pontmutációt okoz [15] és az erről átíródó mutáns fehérje nem képes tumorszupresszor szerepét ellátni. Az AFB₁ másik metabolitja, az AFB₁-dialdehid lizinhez kapcsolódva enzimblokkoló hatású, részben ennek következménye az akut toxicitás [5, 15].

A reakciók analóg módon az AFG₁ toxinnal is végbe-mennek. Az AFB₂ és AFG₂ mutagenitása sokkal kisebb, a 8. és 9. szénatom közötti kettős kötés hiánya miatt, viszont a laktongyűrű bomlása esetén aktív kötőhelyek keletkezhetnek és magas a két toxin in vivo szabadgyök-képző aktivitása is.

A 8. és 9. szénatomok közötti kettős kötés aktivitását kihasználva, brómaddíciós reakcióval dibrómszármazék képezhető, a 3. ábrán bemutatott reakció szerint. Ezek a vegyületek intenzívebben fluoreszkálnak, mint az eredeti toxinok, ezt használja ki az általunk alkalmazott analitikai módszer a G₁ és B₁ aflatoxinok kimutatási határának csökkentésére. A G₂ és B₂ aflatoxinok kimutatási határa változatlan marad, mivel ezek nem képeznek brómszármazékot, viszont a veszélyesebb toxinok kimutathatósága lényegesen javul.

Mivel nem minden penészgombafaj termel mikotoxinokat, célszerű a mikotoxinogén törzseket azonosítani, így csökkenthető a vizsgálandó minták száma, és ezzel arányosan a fellépő költségek is. Ennek egyik módja, hogy az aflatoxinokat termelő törzseket speciális anyagokat tartalmazó táptalajon tenyésztik, majd a telepeket UV-fénnyel megvilágítva tapasztalható, hogy az aflatoxinogén gombatelepek fluoreszkálnak, valamint a gerjesztést követően sötétben pár másodpercig szabad szemmel foszforeszkáló gyűrű figyelhető meg a telep körül [16].

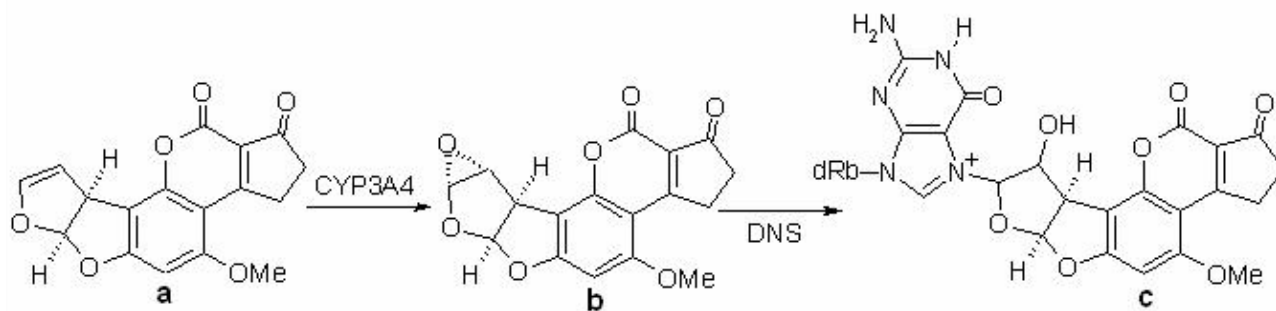
Kutatásunk célja a növényi anyagon előforduló penészgombák azonosítása, a szaporodási és toxinképzési feltételeik megismerése, valamint az aflatoxinok minőségi és mennyiségi kimutatására szolgáló, érzékeny analitikai módszer alkalmazása.

Anyag és módszer

Mikotoxinokat termelő penészgombák az *Aspergillus parasiticus*, az *A. ochraceus* és a *Penicillium verrucosum* szaporodását vizsgáltuk kereskedelembe kapható gabona-örleményeken és takarmányozási célra használt ép gabona-szemeken (búza, kukorica, zab, árpa) különböző nedvességi viszonyok mellett. Ugyanakkor meghatároztuk a penészgombák szaporodását befolyásoló hőmérsékleti értékeket, Sabouraud táptalajon tenyésztve 5, 20, 25, 30, 35, 45 és 50°C inkubálási hőmérsékleten.

Tenyésztési eljárással kimutattuk a gabonák és a különféle őrlemények (takarmányliszt, korpá) mikotoxinogén penészgombákkal való szennyezettségét. A vizsgált mintákból készített alapszuspenziókat szélesztéssel Czapek-Dox táptalajra oltottuk és 6 napig 30°C hőmérsékleten inkubáltuk. A penészgombákat mikroszkópi preparátumok és telepmorfológiai tulajdonságok alapján azonosítottuk.

Analitikailag csak aflatoxin-tartalmat vizsgáltunk, miko-



2. ábra. Az AFB₁ enzimátikus oxidációja és adduktum képződése a DNS-sel (a - AFB₁; b - 8,9-*exo*-epoxi-AFB₁; c - 7-N-AFB₁-dG)

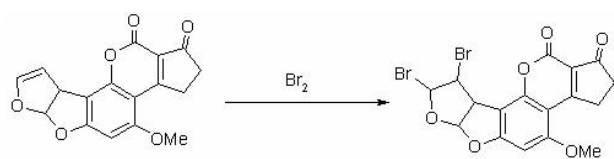
toxinogén penészgombával beoltott minták és fűszerpaprika-őrlemények esetén. A minta-előkészítés során a metanolos extrakciót aflatoxin-specifikus immunoszlopon (AflaTest WB) történő dúsítás követte. Az analízist nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiával (belső kalibrációval) végeztük. Az érzékelés fluoreszcenciás detektorral történt elektrokémiai Coring-cellával végzett származék-képzést (*in situ* oszlop utáni brómadddíciót) követően [5]. A cella működésének leírása és a kromatográfiai módszer részletes ismertetése egy korábbi közleményünkben található [6].

Eredmények

A kiválasztott mikotoxinogén penészgombák (*Aspergillus parasiticus*, *A. ochraceus*, *Penicillium verrucosum*) a takarmányszer és a korpa felületén egyaránt elszaporodtak, a takarmányszer felületén 6 nap inkubálást követően nagyobb mértékű volt a szaporodás. A különböző gabonafélék (búza, kukorica, zab, árpa) felületére oltott penészgombák nem szaporodtak el.

A 20-35°C-os hőmérsékleti intervallumban inkubált mindhárom penészgomba esetében megfigyelhető volt bizonyos mértékű szaporodás. Az optimális szaporodási hőmérsékleti értékek: *Penicillium verrucosum* 20°C, *Aspergillus ochraceus* 30°C, *A. parasiticus* 35°C. Az 50°C-on, illetve 45°C-on inkubált minták egyikében sem szaporodtak el a penészgombák. Az 5°C-on történő inkubálás esetén csak a *Penicillium verrucosum*-mal beoltott táptalajon fejlődtek ki gombatelepek.

Az általunk vizsgált mintákból négyféle penészgombafajt sikerült azonosítanunk: *Aspergillus flavus*-t, *A. ochraceus*-t, *A. niger*-t és *A. fumigatus*-t. A búzából készített alapszuspenzióval beoltott Czapek-Dox táptalajon *A. ochraceus* telepek fejlődtek ki, a Sabouraud táptalajról *A. flavus*, *A. ochraceus* és *A. fumigatus* telepeket azonosítottunk.



3. ábra. A származék-képzési reakció AFB₁ esetén

tunk. A zab alapszuspenziójával beoltott táptalaj felületén *A. niger* és *A. ochraceus* telepek jelentek meg. A korpa esetében a mikotoxint termelő gombák közül csak *A. ochraceus* telepek voltak kimutathatók. A takarmányszer-szuspenzióval beoltott Czapek-Dox táptalajon *A. fumigatus* fejlődött ki, a Sabouraud táptalajon élesztőgombák szaporodtak el.

A vizsgált, ötféle importált fűszerpaprika HPLC elemzése során kettőből aflatoxinokat mutattunk ki, az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze. Megállapítható tehát, hogy a vizsgált minták még a megengedett határérték alatt tartalmaznak aflatoxinokat.

1. táblázat. A paprika-őrlemények aflatoxin-tartalma

Mikotoxin	A minta	B minta	Megengedett határérték
	C _A [μg/kg]	C _B [μg/kg]	C _{max} [μg/kg]
AFB ₁	1,502	1,996	5
AFG ₁	1,329	2,088	Nincs szabályozva
AFB ₂	0,082	0,112	Nincs szabályozva
AFG ₂	-	-	Nincs szabályozva
Össz AF	2,913	4,196	10

A mikotoxinogén penészgombával (*Aspergillus parasiticus*) beoltott búzakorpa és kukoricaliszt esetében, az adott körülmények között, a beoltást követően 15 nappal, a penészgombák még nem képeztek kimutatható mennyiségben aflatoxinokat. A beoltott korpát és kukoricalisztet tartalmazó Petri-csészéket ezután szobahőmérsékleten, majd hűtőszekrényben is tároltuk, nem ellenőrzött körülmények között. Egy hónap elteltével UV-lámpával megvilágítva a Petri-csészékben levő minták fluoreszkáltak, amely arra utal, hogy a telepek aflatoxint termeltek. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az eltelt idő alatt a nedvesség-tartalom, a tápanyagok mennyisége nagymértékben csökkent, a hőmérséklet is megváltozott, és mindezek együttléve stresszhatást jelentettek a penészgombáknak.

Következtetések

A mikotoxinokat termelő penészgombák csak a különböző gabonaőrleményeken szaporodtak el, míg az ép gabona-

szemekén nem. Alacsony inkubálási hőmérsékleten csak a *Penicillium verrucosum* képes szaporodni. A magas hőmérséklet gátolja a vizsgált penészgombák szaporodását. Az általunk vizsgált gabonamintákról az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó penészgombákat azonosítottunk. A paprikaminták még a megengedett határérték (5 µg/kg AFB₁, 10 µg/kg összes aflatoxin) alatt tartalmaztak aflatoxinokat. Az alkalmazott immunoszlopos dúsítás esetén jobban érzékelhető kromatogram-csúcsokat kapunk, ami a koncentrációnövekedés következménye. Coring-cellával történő származékképzéssel a B₁ és G₁ aflatoxinok kimutatási határa csökken, a fluoreszcencia intenzitásának növekedése következtében. Elmondható, hogy az alkalmazott analitikai módszer jelentősen javítja az aflatoxinok mérési pontosságát alacsony koncentrációk esetén is. A penészgombák mikotoxin-termelése csak stresszhatás (nedvesség- és táplálékhiány) következtében mutatható ki, a +4°C-on történő tárolás még nem vált ki aflatoxin-termelést.

Irodalom

1. Abbas H.K. – *Aflatoxin and food safety*, CRC Press, Boca Raton, 2005, 95-96, 244-261.
2. Deák T. (szerk.) – *Élelmiszer-mikrobiológia*, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 2006, 125-132.
3. Doyle M. P., Beuchat L.R., Montville T.J. – *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd edition, ASM Press, Washington, 2001, 451-465.
4. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Council of Europe (COE) – *Determination of aflatoxin B1 in herbal drugs*. In: European Pharmacopoeia, 6th ed., Electronic version, 2007, 256.
5. Guengerich F.P. – *Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity*, The AAPS Journal, 2006; 8 (1): Article 12.
6. Harai É., András Cs. D., György É. et al. – *Aflatoxinok folyadék-kromatográfiás meghatározása fűszerpaprikából oszlop utáni elektrokémiai származékképzéssel*, XIV. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, 2008 november 13-15., 62-67.
7. Harrigan W.F., Park R.W.A. – *Biztonságos élelmiszerek előállítása*, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 1994, 32-33.
8. James M. J. – *Modern food microbiology*, 6th edition, Aspen Publishers, Gaithersburg, 2000, 595-609.
9. Kertai P. – *Közegészségtan*, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1982, 592-597.
10. Leslie J.F., Bandyopadhyay R., Visconti A. – *Mycotoxins*, Cromwell Press, Trowbridge, 2008, 29-30.
11. Loeb L., Harris C.C. – *Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective*, Cancer Research, 2008, 68 (17): 6863-6872.
12. Luch A. – *Nature and nurture-lessons from chemical carcinogenesis*, Nature Reviews Cancer, 2005, 5 (2): 113-125.
13. Magan N., Olsen M. – *Mycotoxins in food: Detection and control*, Woodhead Publishing, Cambridge, 2004, 128-132.
14. Mănescu S. – *Microbiologie sanitară*, Editura Medicală, Bucureşti, 1989, 190-192.
15. Moss M.O. – *Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs*, International Biodeterioration & Biodegradation, 2002, 50 (3-4): 137-142.
16. Rojas-Durán T.R., Fente C.A., Vázquez B.I. et al. – *Study of a room temperature phosphorescence phenomenon to allow the detection of aflatoxigenic strains in culture media*, International Journal of Food Microbiology, 2007, 115 (2): 149-158.
17. Santos L., Marin S., Sanchis V. et al. – *Capsicum and mycotoxin contamination: State of the art in a global context*, Food Science and Technology International, 2008, 14 (1): 5-20.
18. Warshawsky D., Landolph Jr J.R. (eds.) – *Molecular carcinogenesis and the molecular biology of human cancer*, Taylor & Francis Group, New York, 2006, 45-79.