

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
BUDAI CAMPUS
ORSZÁGOS TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

**PATULIN TERMELŐ PENÉSZEK SZAPORODÁSÁNAK ÉS
TOXINTERMELÉSÉNEK GÁTLÁSA TEJSÁVBAKTÉRIUMOKKAL**

Inhibition of growth and toxin production of patulin-producer moulds by lactic acid bacteria

Készítette: **Schüller Anna**
F1YIJ0
Biomérnöki,
alapképzés
Nappali

Témavezetők:

Horváthné Dr Szanics Enikő, tudományos főmunkatárs, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék, Budai Campus

Dr. Zalán Zsolt, tudományos főmunkatárs, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Biomérnök és Erjedéssipari Technológiai Tanszék, Budai Campus

Lehetséges OTDK szekció: Agrár

**Budapest
2024.**

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	4
2.	Célkitűzés	5
3.	Szakirodalmi áttekintés.....	6
3.1.	Mikotoxinokról általánosan	6
3.2.	Patulin áttekintés	8
3.2.1.	Patulin fizikai és kémiai tulajdonságai	8
3.2.2.	Patulin történelmi áttekintése.....	9
3.2.3.	Patulin szabályozása.....	9
3.2.4.	Patulin jelentősége és toxicitása.....	10
3.2.5.	Patulin előfordulása.....	11
3.2.6.	Patulin bioszintézisének gátlása	12
3.3.	Patulin kimutatására szolgáló analitikai módszerek	13
3.3.1.	VRK	13
3.3.2.	GC/MS	13
3.3.3.	HPLC	14
3.3.4.	SPE technika	14
3.4.	Tejsavbaktériumok	15
3.4.1.	Általános jellemzés	15
3.4.2.	Tejsavbaktériumok antimikrobás anyagai.....	16
3.4.3.	Tejsavbaktériumok mint biokonzerválószerkes	17
3.4.4.	Tejsavbaktériumok probiotikus hatásai	18
4.	Anyagok és módszerek.....	19
4.1.	Felhasznált anyagok.....	19
4.2.	Felhasznált törzsek.....	19
4.3.	Mérési módszerek	19
4.3.1.	Mikrobiológia vizsgálatok.....	19
4.3.2.	Analitikai vizsgálatok	21
4.3.3.	Statisztikai elemzés	22
5.	Eredmények és értékelésük	23
5.1.	Táptalaj hatása a toxintermelésre	23
5.2.	Növekedés nyomon követése	24
5.3.	Analitikai mérések	27
5.4.	Toxintermelés kinetikája	28
5.5.	A tejsavbaktériumok patulin-termelést gátló aktivitásának vizsgálata	29

5.6.	Tejsavbaktériumok antagonista hatása a spóraszámra.....	31
5.7.	Tejsavbaktériumok antagonista hatása a toxin termelésre	32
5.8.	Statisztikai értékelés	32
5.9.	Alma agaron végzett kísérlet.....	34
5.10.	Alma gyümölcsön végzett kísérlet	35
6.	Összefoglalás	37
	Irodalom jegyzék:.....	39
	Köszönetnyilvánítás.....	43

1. Bevezetés

Az élelmiszerbiztonság kérdése az elmúlt évtizedekben kiemelt figyelmet kapott, mivel a fogyasztók tudatossága egyre növekszik a potenciális egészségügyi kockázatokkal szemben. Az élelmiszerek különösen érzékenyek a különböző szennyeződésekre, beleértve a mikrobiális fertőzéseket és a kémiai szennyezőanyagokat. A mikotoxinok, amelyek a penészgombák másodlagos anyagcseretermékei, különösen veszélyesek, mivel nemcsak toxikus hatásúak, de nehezen is kimutathatók. A mikotoxinok közé tartozik a patulin is, amelyet különösen a gyümölcsrothadást okozó penészgombák, mint az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek termelnek. A patulin előfordulása és toxicitása jelentős közegészségügyi problémát jelent, különösen az élelmiszer-feldolgozó ipar számára, mivel számos gyümölcsből készült termékben előfordulhat, például almalében és bériételekben.

A mezőgazdaság és élelmiszeripar számára egyre nagyobb kihívást jelent a patulin termelésének visszaszorítása természetes módszerekkel, amelyek nem igényelnek kémiai vegyületeket. Ebben a kontextusban a tejsavbaktériumok alkalmazása egy ígéretes megoldásként jelenik meg. A tejsavbaktériumok, amelyek széles körben használtak az élelmiszer-fermentációban, antimikrobiális tulajdonságaik révén hatékonyan gátolhatják a patulin termelő penészgombák növekedését és toxintermelését.

2. Célkitűzés

Patulin termelő *Aspergillus* gombák penész-növekedésének és patulin termelésének gátlása különböző tejsavbaktériumokkal. A kutatás célkitűzéseiben az alábbi kérdésekre keressük a választ:

- A vizsgálatba vont *Aspergillus* gombák rendelkeznek-e patulin termelőképesességgel?
- Hogyan és milyen mértékben gátolják a különböző tejsavbaktériumok a penészek növekedését és azok patulin termelését?
- Mikor érdemes a gátló mikroba törzset hozzáadni a penész tenyészethez, hogy maximálisan kifejtse antagonista hatását?
- A patulin termelés nyomon követése és a mikotoxin-termelés gátlásának vizsgálata tejsavbaktérium alkalmazásával.

3. Szakirodalmi áttekintés

Az elmúlt évtizedekben a fogyasztók tudatossága az élelmiszerek minőségével és biztonságával kapcsolatban folyamatosan nőtt, különösen az élelmiszerek kémiai összetétele helyett a toxikus szennyező anyagokból eredő lehetséges egészségügyi kockázatokkal kapcsolatban. Az élelmiszerek olyan mátrixok, amelyek könnyen szennyeződhetnek mikroorganizmusokkal, kártevőkkel és vegyi anyagokkal, amelyek károsak lehetnek az emberi egészségre. Meghatározásuk kulcsfontosságú az élelmiszerbiztonság garantálása érdekében, különösen a kémiai szennyeződések esetében, amelyek érzékszervileg sokszor nem észrevehetően lehetnek jelen a termékben. A számos szennyezőanyag közül a mikotoxinok veszélyesek és nehezen kimutathatók lehetnek. A mikotoxinok olyan másodlagos anyagcseretermékek, amelyeket a mikotikus gombák termelnek és a terményeket mind a szántóföldön, mind a tárolás során befertőzhetik (Notardonato és mtsai. 2021).

A baktériumokból és antimikrobiális komponenseiből származó biokonzerválószerek használata az élelmiszerek tartósítására nagy érdeklődésre tart számot, mivel a fogyasztók egyre nagyobb igényt tartanak a természetesebb élelmiszer-tartósítási módszerek alkalmazására a kémiai vegyületektől való függés helyett (Bangar és mtsai. 2021).

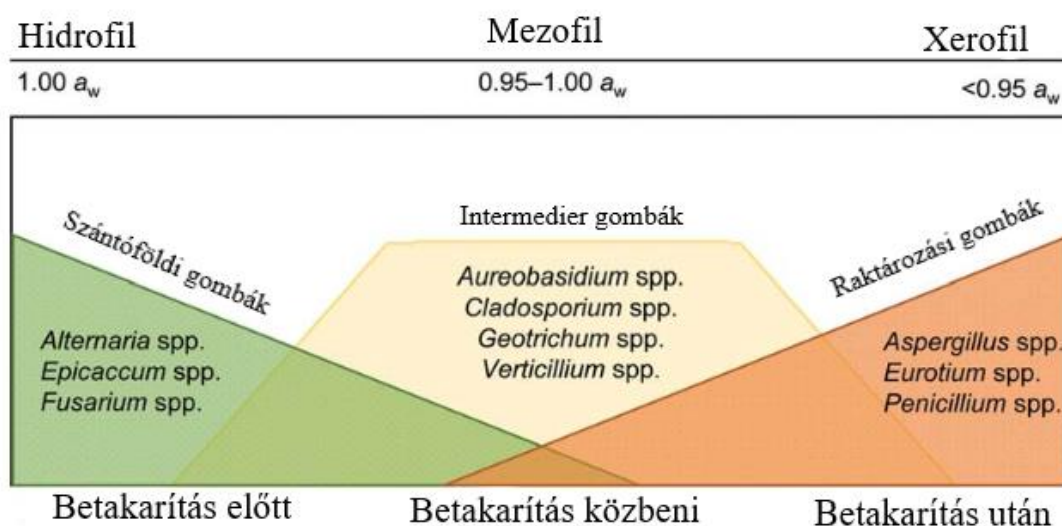
3.1. Mikotoxinokról általánosan

A mikotoxinok a fonalas gombák másodlagos anyagcseretermékei, ezek természetes környezet- és élelmiszerszennyező anyagok. Ezeknek a toxinoknak a száma több ezerre tehető, de ezekből csak kb. 20 felel humán- és állat megbetegedésekért, melyeket mikotoxózisnak hívjuk (Kovács 2018). Leggyakoribb egészségre gyakorolt hatásuk a nefrotoxicitás, hepatotoxicitás, immunszuppresszió, karcinogenitás és teratogenitás. Főbb mikotoxint termelő nemzetségek az *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps*. A mikotoxinok toxikus és alacsony molekulatömegű vegyületek szerkezetileg változatos csoportját alkotják, amelyek általában 1000 Da-nál kisebbek. A mikotoxinok nagyon rezisztensek, a környezet magas hőmérsékletén is stabilak és ellenállóak a gyomor savas pH-jának, ezért a mérgező hatásuk megmarad az állati szervezetekben. Így állatból emberbe is átjuthat a takarmányból bekerült toxin, ha akkumulálódik pl.: máj, zsír, hús vagy kiválasztódik a tejben és a tojásban. Ez a jelenség viszonylag ritka, csak néhány mikotoxin esetében fordul elő pl.: aflatoxin M1 tejben (Kovács 2018). Több, mint 100 gombafaj által termelt mintegy 400 potenciálisan toxikus mikotoxint azonosítottak, és úgy vélik, hogy a mezőgazdaság, az állattenyésztés és a közegészségügy szempontjából a trichotecének, az ochratoxinok, az aflatoxinok, a zearalenon, a fumonizinek, a patulin és a citrinin a legmérgezőbbek (Eszter és mtsai., é. n.; Janik és mtsai. 2020).

A szántóföldi növényeket szennyező gombákat két fő csoportra és egy harmadik köztes csoportra osztják aszerint, hogy a környezeti feltételek által befolyásolt termésnövekedés és betakarítás különböző szakaszaiban milyen mértékben dominálnak (1. ábra).

Az első csoportba a szántóföldi gombák tartoznak, amelyek a betakarítás előtt a szántóföldön álló növényeken az érő szemeket kolonizálhatják. Ebbe a csoportba az *Alternaria* és a *Fusarium* nemzetségek fajai tartoznak. A szántóföldi gombafajok többsége nem fertőzi meg a terményeket a betakarítás után, azonban a betakarítás előtt vagy közvetlenül azt követően mikotoxinokat termelhetnek.

A második csoportot a raktári gombák alkotják, amelyek kis számban jelen lehetnek a betakarítás előtt, vagy a betakarítás során fertőzhetik a gabonát, és a tárolás során megnövekedhet a számuk, mivel a környezeti feltételek kedveznek e gombák növekedésének a többi csoport növekedésével szemben. A raktári gombák közé elsősorban az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek tartoznak. A köztes gombák csoportjába azok a gombák tartoznak, amelyek a tárolás során tovább fejlődnek, ha a vízaktivitás (a_w) magas marad. Ebbe a csoportba tartoznak a *Cladosporium*, *Fusarium* és *Trichoderma* nemzetségek fajai. A betakarítás előtti szakaszban a gombás fertőzést elsősorban a gazdanövényekkel, a genotípussal, a talajtípussal és a biológiai tényezőkkel való kölcsönhatások határozzák meg. A betakarítás utáni szakaszban a gombák növekedését és fejlődését a szubsztrát állapota (a szemek károsodása és a táplálkozási összetevők), a környezeti tényezők (hőmérséklet és nedvesség) és a biotikus tényezők (rovarkártevők és mikroorganizmusok) irányítják.



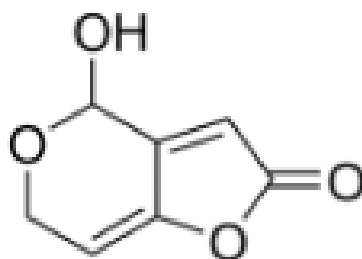
1. ábra A gombák csoportjainak osztályozása a szántóföldi növények betakarítás előtti és utáni szakaszai közötti előfordulási és dominanciafázisok alapján. A felső skála a gabonaféléken élő gombafajok váltakozó osztályozását mutatja be a gombák növekedéséhez szükséges vízaktivitásuk (azaz optimális vízaktivitásuk [a_w]) alapján (Mannaa és Kim 2017).

A toxin termelést befolyásoló tényezőkről elmondható, hogy mikrobánkként változik az optima minden egyes körülménynek. A következő tényezők azok, amik minden esetben meghatározóak a toxin termelése: a tárolási hőmérséklet, pH, a vízaktivitás (a_w), szárazanyag tartalom, a gyümölcs tápanyag tartalma, oxigén és CO_2 szint, gyümölcs felszíni hibái, földrajzi elhelyezkedés, betakarítása módja, éghajlat, betakarítás előtti kezelések, gyümölcs fajtája, gyümölcs fizikai és kémiai tulajdonságai, gyümölcs érési állapota. A felsorolt tényezők közül nem lehet tudni, hogy melyik a legmeghatározóbb, ezért fontos odafigyelni a betakarításkor, szállításkor, tároláskor és feldolgozáskor, hogy a termények penész-mentesek legyenek (Jackson és Al-Taher 2008).

3.2. Patulin áttekintés

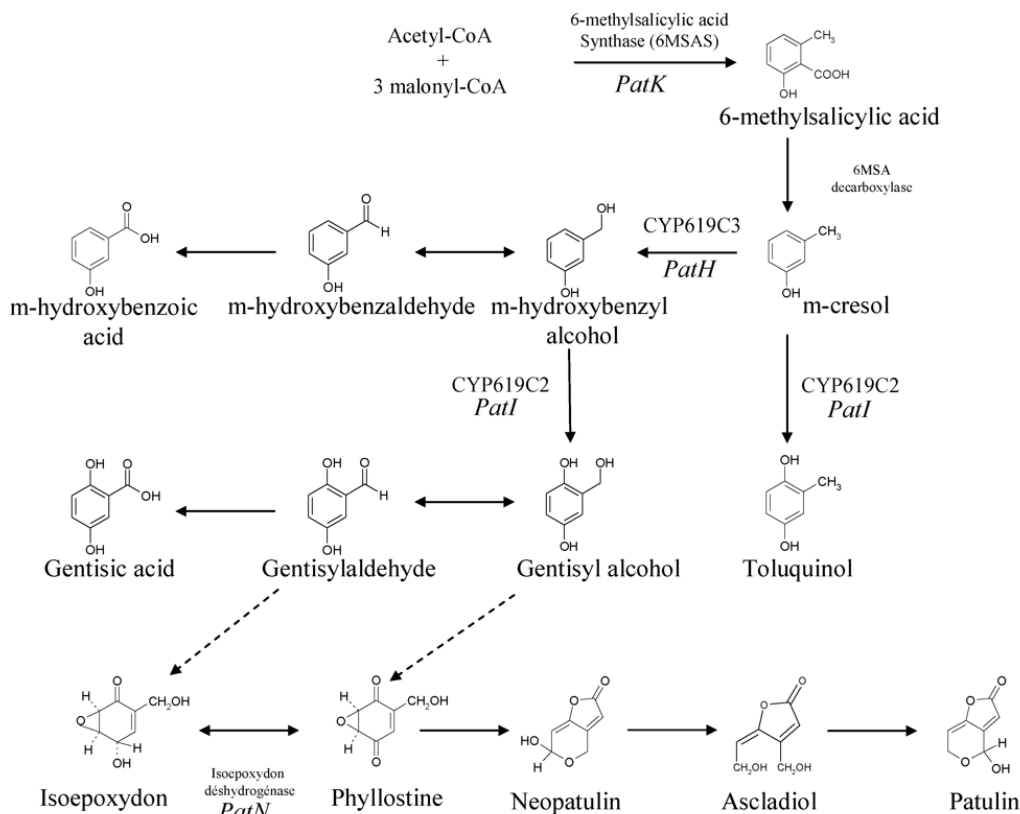
3.2.1. Patulin fizikai és kémiai tulajdonságai

Patulin (IUPAC név 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]pirán-2(6H)-on) 2-es ábra, egy heterociklusos lakton (molekulatömeg (M_w), 154,12 g/mol; alacsony az illékonysága ezért olvadáspontja 110°C -on), antibiotikus tulajdonságokkal rendelkező, (Shephard és Leggott 2000) hőálló toxin, vizes közegben 105 és 125°C között, $3,5$ és $5,5$ közötti pH-tartományban stabil, míg lúgosabb pH-n spontán lebomlik (Notardonato és mtsai. 2021).



2. ábra A patulin kémiai szerkezete (Notardonato és mtsai. 2021).

A patulin szintézise egy kb 10 lépéses folyamat, amiben a 3. ábrán látható enzimek és vegyületek vesznek részt, ezt számos biokémiai vizsgálat és több, a patulin bioszintézisét célzó kísérlet bizonyítja (Sekiguchi és Gaucher 1977). A bioszintézisének tanulmányozása két okból történelmileg jelentős. Először is, Birch acetát-elmélete a radioaktívan jelölt acetát 6-metilszalicilsavba (6MSA) való beépítésén alapult, és hozzájárult egy jelentős természetes vegyületcsoport, a poliketidek felismeréséhez, amit korábban Collie javasolt. A második ok az, hogy a patulin bioszintézisének első lépésében szereplő enzim volt az első poliketid-szintáz, amelyet *in vitro* tanulmányoztak és jellemeztek (Puel, Galtier, és Oswald 2010).



3. ábra A patulin bioszintetikus útjának sémája (Puel, Galtier, és Oswald 2010)

3.2.2. Patulin történelmi áttekintése

Az 1940-es években antibiotikumként izolálták először. Felfedezése több kutatócsoporthoz is köthető, ezért az alábbi nevek mindegyike a patulint írja le: klavacin, expansin, klaviformin, klavatin, gigantikus sav és myocin C. Kezdetben széles spektrumú gombaellenes antibiotikumként izolálták, később kiderült, hogy több mint 75 különböző baktériumfajt gátol, beleértve mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumokat. Nem sokkal később különböző vizsgálatok azt mutatták, hogy a patulin nemcsak gombákra és baktériumokra, hanem állatokra és magasabb rendű növényekre, többek között uborkára, búzára, borsóra, kukoricára és lenre is mérgező. Ahogy egyre több bizonyíték került elő a patulin egészségre gyakorolt negatív hatásaira, számos szabályozó hatóság elkezdte korlátozni az élelmiszerek patulin tartalmát (Moake, Padilla-Zakour, és Worobo 2005).

3.2.3. Patulin szabályozása

Az európai országok az elsők között foglalkoztak ezzel a problémával, és ma már a világ számos országa, különösen az EU-n belül, 50 µg/kg-ban korlátozza az élelmiszerek megengedett patulin tartalmát. Az 1. táblázatban látható, hogy eltérő szabályozás vonatkozik a különböző élelmiszerekben megengedett határértékekre. Míg a gyümölcslevekben és szeszes

italokban a megengedett határérték 50 µg/kg addig a bébiételekben és csecsemőknek szánt almalevekben és szilárd élelmiszerekben ez az érték 10 µg/kg-ra csökken (EU 2023/915 rendelet 2023).

1. táblázat Az EU bizottság érvényben lévő 2023/915 rendelete patulinra vonatkozó határértékekről (EU 2023/915 rendelet 2023).

1.3.	Patulin	Felső határérték (µg/kg)	Megjegyzések
1.3.1.	Gyümölcslevek, sűrítvényből készült gyümölcslevek, sűrített gyümölcslevek és gyümölcsnektárok ⁽¹⁾	50	A sűrített gyümölcslé esetében a felső határérték az elkészített gyümölcslére vonatkozik.
1.3.2.	Szeszes italok ⁽²⁾ , almabor és almából készült vagy almalevet tartalmazó más erjesztett italok	50	
1.3.3.	A végső fogyasztók számára forgalomba hozott szilárd almatermékek, az 1.3.4. és 1.3.5. pontban felsorolt termékek kivételével	25	Beleértve az almakompótot és az almapürét is.
1.3.4.	Csecsemőknek és kisgyermeknek szánt almálé és szilárd almából készült termékek ⁽³⁾ , amelyeket ilyenként jelölnek és hoznak forgalomba	10,0	Beleértve az almakompótot és az almapürét is. A felső határérték a fogyasztásra kész (fogyasztásra kész állapotban forgalmazott, vagy a gyártó utasításai szerint fogyasztásra elkészített) termékekre vonatkozik.
1.3.5.	Bébiételek ⁽⁴⁾	10,0	A felső határérték a fogyasztásra kész (fogyasztásra kész állapotban forgalmazott, vagy a gyártó utasításai szerint fogyasztásra elkészített) termékekre vonatkozik.

3.2.4. Patulin jelentősége és toxicitása

A patulint főleg alma romlását okozó penészek termelik, mivel azonban a legtöbb nem 100%-os gyümölcs készítmény (ivólé, bébiétel stb.) nagy hányadát alma adja, ezért nagyon sok élelmiszerben jelen lehet, amit nap mint nap fogyasztunk. A patulinnal való közvetlen expozíció gyomor-bélrendszeri tüneteket okozhat, beleértve a hányingert, hányást, fekélyeket, bélvérzéseket és elváltozásokat a patkóbélben. A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC) szerint a patulin a 3. csoportba tartozó rákkeltő anyag, ami azt jelenti, hogy nincs elegendő állatkísérleten alapuló vizsgálat vagy epidemiológiai tanulmány a rákkeltő hatás alátámasztására. A patulin nagy affinitást mutat a szulfhidril (SH) csoportok iránt. A ciszteinnel képződött patulin melléktermékek akut toxicitási, teratogenitási és mutagenitási vizsgálatokban kevésbé toxikusak, mint a változatlan vegyület. Az SH-csoportokhoz való affinitása magyarázza számos enzimre (ATPáz, lizoszomális enzimek, RNS-polimeráz stb.) gyakorolt gátló hatását (Puel, Galtier, és Oswald 2010). Napjainkban ismert, hogy a patulin neurológiai, gasztrointesztinális és immunológiai káros hatásokkal hozható összefüggésbe. Emellett a WHO a patulint lehetséges genotoxikus vegyületnek tekinti. A patulin toxicitási vizsgálatai a létfontosságú szervekben és rendszerekben, többek között a májban, a vesében és más szervekben mutattak ki károsodásokat (Saleh és Goktepe 2019).

3.2.5. Patulin előfordulása

A patulint leggyakrabban termelő törzsek a *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssoschlamys* (Saleh és Goktepe 2019). A *Penicillium expansum*ot tekintik a patulin szennyezéséért felelős elsődleges gombafajnak, ezért ebben a témában található a legtöbb kutatás. A *P. expansum* kékpenészt okoz, egy lágy, barna gyümölcsrothadást, amely idővel zöldes-kékes konidiofórákat és konídiumokat fejleszt ahogy az a 4. ábrán látható (Wright 2015).



4. ábra Kékpenésszel fertőzött alma (Wright 2015)

A 2. táblázat olyan élelmiszer mátrixok listáját tartalmazza, amelyekben a patulin előfordulása kimutatható volt. Látható, hogy noha a patulin elsősorban almákban, almalevelekben fordul elő, ennek ellenére megtalálható számos más gyümölcsben, zöldségben is.

2. táblázat Patulin előfordulása élelmiszerekben

Élelmiszer mátrix	Ország	Tartomány (µg/kg)	Kimutatási technika	Forrás
Alma	Brazília	150–267	HPLC-DAD	(Sylos 1999)
	Pakisztán	396	HPLC-UV	(Hussain és mtsai. 2020)
	Kanada	565	LC	(Abramson és mtsai. 2009)
	Argentína	19,622	HPLC	(Oteiza és mtsai. 2017)

Almalé	Belgium	2.5–38.8	HPLC	(Tangni és mtsai. 2003)
	Dél Korea	2.8–8.9	HPLC	(Cho és mtsai. 2010)
	Spanyolország	2.5–6	LC	(Marín és mtsai. 2011)
Sárgabarack	Argentína	16	HPLC	(Oteiza és mtsai. 2017)
Cseresznye	Törökország	5.6–113.3	HPLC	(Demirci, Arici, és Gumus 2003)
Szőlő	Argentína	13,808	HPLC	(Oteiza és mtsai. 2017)
Szőlő must	Németország	3.5–80	HPLC-UV	(Majerus, Hain, és Kölb 2008)
Körte	Argentína	1749	HPLC	(Oteiza és mtsai. 2017)
	Olaszország	0.79	LC	(Sarubbi és mtsai. 2016)
	Argentína	25	HPLC	(Funes és Resnik 2009)
Ananász	Pakisztán	460.3	HPLC-UV	(Iqbal és mtsai. 2018)
Eper	Törökország	3.2–572	HPLC	(Demirci, Arici, és Gumus 2003)
Paradicsom	Portugália	21.29	GC-MS	(Cunha és mtsai. 2014)
	Pakisztán	520.5	HPLC-UV	(Iqbal és mtsai. 2018)

3.2.6. Patulin bioszintézisének gátlása

Élesztők és baktériumok patulin lebontó és inaktiváló képességét is vizsgálták már. Ezek közül néhányan hatásosak a kékpenész-fertőzés visszaszorításában, mint biológiai védekező szerek (biocontrol agents-(BCA-k)). Néhány ismert faj pl.: *Pichia caribbica* (Cao és mtsai. 2013) és

Metschnikowia, (Settier-Ramírez és mtsai. 2021) képesek megvédeni az almát a kékpenész ellen, és megakadályozzák a patulin felhalmozódását. A biológiai lebontás termékei azonban ismeretlenek. Ezzel szemben van példa olyan mikroorganizmusokra, amelyek a patulint ismert termékekké bontják le: A *Lactobacillus plantarum* a patulint hidroaszkladiollá bontja, a *Kodameae ohmeri* pedig Easzkladiollá és Z-aszkladiollá. Általában az aszkladiol különböző formáit írják le a patulin mikrobiális biodegradációs termékeként. A másik fő mikrobiális biodegradációs termék a dezoxipatulinsav. Továbbá egy másik érdekes módszer az olyan baktériumok alkalmazása, amelyek képesek a patulin felvételére a sejtfaluk összetevőibe, például az *Alicyclobacillus* néhány faja (Yuan és mtsai. 2014, Wright 2015).

3.3. Patulin kimutatására szolgáló analitikai módszerek

A patulin mérésére és mennyiségének meghatározására számos kromatográfiás módszert használnak: vékony-réteg kromatográfiát (VRK), gázkromatográfiát tömegspektrometriás detektálással (GC-MS), nagy hatékonyságú folyadék kromatográfiát (HPLC).

3.3.1. VRK

A vékonyréteg kromatográfia volt az első erre alkalmazott módszer, amely egy etil-acetátos extrakciót követő szilikagélén végzett elválasztás. A szilikagél lemezeken a kimutatás 3-metil-2-benzotiazolinon-hidrazon (MBTH) permetezésével történt, a kimutatási határérték 20 µg/l volt.

3.3.2. GC/MS

A HPLC ugyan a leggyakrabban használt módszer a patulin kimutatásra, az irodalomban számos GC-MS módszert is találhatunk, amelynek a kimutatási határa 10 µg/l (Shephard és Leggott 2000). Ahhoz, hogy az almalében lévő patulin mennyiségét vizsgálhassák, azt előbb tisztítani és koncentrálni kell, ami kétfázisú dialízissel oldható meg. A kétfázisú dialízist általában alacsony molekulatömegű, alacsony polaritású anyagok vizes mintákból történő extrakciójára alkalmazták. A klasszikus kétfázisú dialízis készülékben egy féligáteresztő membrán választ el két nem keveredő fázist, például vizet és szerves oldószert. Így a dialízis során a kívánt vegyületek áthaladnak a membránon, a szerves oldószer fázis felé haladnak és koncentrálnak, míg a nagyobb molekulatömegű vagy polárisabb anyagokat a membrán a vízfázisban tartja vissza. Ma már a gázkromatográfiás módszerekben származékot képeznek, így a patulin-acetátot vizsgálják, ami egy sokkal stabilabb vegyület (Sheu és Shyu 1999).

3.3.3. HPLC

A legelterjedtebb és leggyakrabban használt módszer a HPLC. Az UV-detektálással kombinált HPLC különösen alkalmas a patulin meghatározására, mivel a toxin viszonylag poláris és erős abszorpciós spektrumot mutat. Bár az eredeti HPLC-munkák egy része normálfázisú kromatográfiát alkalmazott, a legújabb publikációk mindegyike fordított fázisú oszlopok használatát írja le. A Tanner és Zanier által közzétett, az almalé patulin tartalmának meghatározására szolgáló módszer etil-acetáttal való extrakciót és ezt követő tisztítást tartalmazott oldószeres elválasztással, nátrium-karbonát oldattal, néhány potenciálisan zavaró fenolos vegyület eltávolítása céljából (Pohland, Sanders, és Thorpe 1970). Ez a módszer kisebb módosításokon ment keresztül (Prieta és mtsai. 1993), de a jelenleg ajánlott HPLC-módszerek alapját képezi. Eredeti formájában a módszer egy körvizsgálat részét képezte, amelyben tíz ország tizenkét laboratóriumában értékelték a patulin almalében történő meghatározására szolgáló két fordított fázisú HPLC-módszer hatékonyságát. A Stray által közzétett második módszer abban különbözött az előzőtől, hogy a patulin etil-acetát kivonatból történő tisztítását szilikagél oszlopkromatográfiával végezték. Mindkét módszer kimutatási határa 5 µg/L volt, a Stray-módszer átlagos visszanyerése 78,4%, a Tanner és Zanier-módszeré pedig 81,4%. A megfelelő RSD 7,3% és 15% volt (Shephard és Leggott 2000).

A patulin egy kis molekulatömegű, poláros vegyület, amely csak magas víztartalmú mobilfázisok alkalmazásával tartható vissza a fordított fázisú HPLC-oszlopokon. Az analitikai vizsgálatok során leggyakrabban használt mobilfázisok: víz és acetonitril (maximum 10%) vagy víz és tetrahidrofurán (maximum 5%) keverékei. A megfelelő elválasztás és retenciós idő érdekében a pontos összetételt rendszerint finomítják. A HPLC-t jellemzően izokratikus módban használják, bár egyes almatermékek esetében gondok adódhatnak a későn eluálódó szennyeződések miatt. E probléma megoldására egyes kutatók gradiens elúciós módszereket alkalmaznak (Shephard és Leggott 2000).

3.3.4. SPE technika

Meg kell említenünk még a szilárd fázisú extrakciós (SPE) technikát, amit a patulin almaléből történő kivonására és/vagy tisztítására alkalmaznak. Ezt a módszert először Rovira és munkatársai (Rovira és mtsai. 1993) dolgozták ki, akik a hagyományos félkvantitatív VRK technikát fejlesztették tovább úgy, hogy a kivonatot egy szilícium-dioxid SPE patronnal tisztították meg, amit fordított fázisú HPLC-vel és UV detektorral való meghatározás követett. Egy másik technika hagyományos- fordított fázisú SPE patronrt használt a patulin visszatartására. A hígítatlan almalevet közvetlenül egy előkészített patronra vitték fel, amely

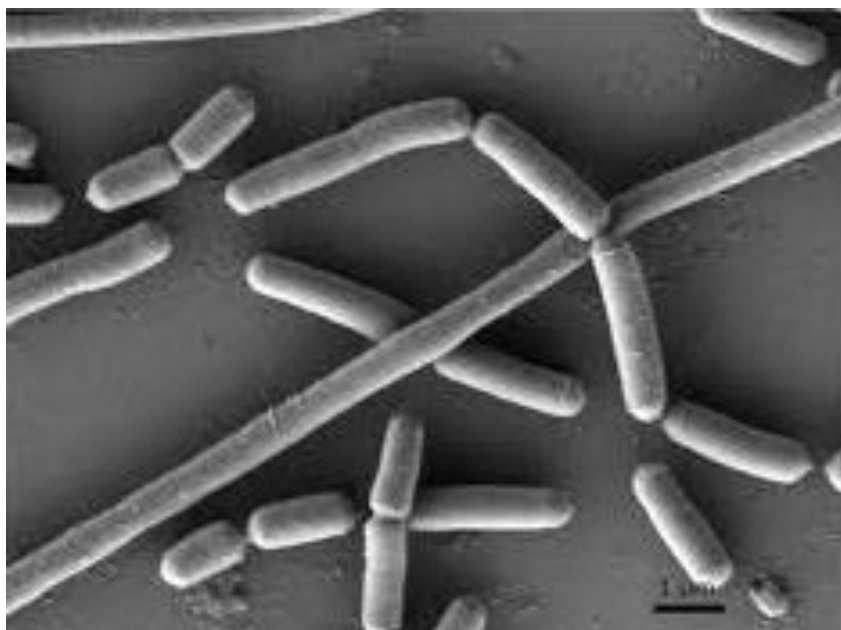
divinilbenzén és N-vinilpirrolidon kopolimerjét tartalmazta. Az oszlop mosása után a patulint eluálták, majd HPLC-vel határozták meg, és az analitikai visszanyerés 93–104%-os volt (Trucksess és Tang, é. n.). Egy újabb módszert dolgoztak ki a patulin kivonására és tisztítására francia almaborok elemzéséhez, hogy kiküszöböljék a zavaró csersavakat és fenolos vegyületeket. A patulint az Extrelut extrakciós oszlopon történő kivonás után egy Sep-Pak (Waters) Florisil SPE patronon tisztították, majd fordított fázisú HPLC-vel és UV detektorral mérték. Az analitikai visszanyerés 90,4%-tól 91,7%-ig terjedt, és a kimutatási határ 10 µg/l volt (Herry és Lemétayer 1996).

3.4. Tejsavbaktériumok

3.4.1. Általános jellemzés

A laktobacillusok nem spóráképző, Gram-pozitív pálcikák, amelyek a normál emberi baktériumflóra fontos részét képezik, és általában a szájban, a gyomor-bélrendszerben, húgyúti traktusban telepednek meg. Mikroszkóposan ezek a baktériumok nem mozgékony, vékony, a hosszútól a rövidig változó hosszúságú pálcikák formájában jelennek meg. Megjelenhetnek hajlított morfológiájú fonalakként, vagy hajlamosak láncokban növekedni. A laktobacillusok legtöbb faja fakultatív anaerob, amelyek anaerob környezet jelenlétében vagy hiányában is növekednek, vagyis aerotoleránsak. A laktobacillusok általában jól szaporodnak a vér-agaron. Néhány, de nem minden faj a *Lactobacillus* szelektív táptalajon is megnő. A tejsav a laktobacillusok fő metabolikus végterméke a glükózfermentáció során.

Ecetsav és borostyánkősav is keletkezik, de csak változatos arányban és kisebb mennyiségben. A tejsavbaktériumokat a béltraktusban védő szervezeteknek tekintik, és úgy gondolják, hogy tejsav és más metabolitok termelésén keresztül gátolják a patogén mikroorganizmusok növekedését (Slover és Danziger 2008).



5. ábra *A Lactobacillus paraplantarum* pásztázó elektronmikroszkópos felvétele (SEM)
(Nishida és mtsai. 2017)

3.4.2. Tejsavbaktériumok antimikrobás anyagai

A tejsavbaktériumok ideális jelöltek az élelmiszerekben a romlást okozó gombák ellenszereiként. A tejsavbaktériumokat (LAB) ősidők óta széles körben használják a hagyományos élelmiszer-fermentációkban, és az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatal (FDA), illetve az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) általánosan biztonságosnak (GRAS-nak), illetve minősített feltételezéssel biztonságosnak (QPS) tekinti őket. Számos LAB-ot „zöld tartósítószerként” tartanak számon, mivel képesek az élelmiszerekben a gombák által okozott romlást késleltetni. Számos antimikrobiális komponenst termelnek, többek között szerves savakat, zsírsavakat, karbonsavakat, diacetilt, bioaktív antimikotikus peptideket, bakteriocineket, hidrogén-peroxidot (H_2O_2), laktonokat, alkoholokat (Bangar és mtsai. 2021).

A pH és a szerves savak:

A fermentáció során a tejsavbaktériumok az alapanyagban található szénhidrátokat (elsősorban a glükózt és a laktózt) anaerob körülmények között tejsavra bontják, ezzel a termék pH-ját savas tartományba csökkentik ($pH < 4,5$). Ezt a savas környezetet a tejsavbaktériumok általában jól tolerálják, azonban számos más baktérium, köztük a romlást okozó és kórokozó baktériumok, nem képesek elviselni. A savas pH mellett a képződő gyenge savak (tejsav, ecetsav stb.) disszociálatlan molekuláinak is jelentős károsító hatása van. Ezek a lipofil molekulák könnyen áthatolnak a plazmamembránon, és a citoplazmában disszociálnak. A sejtbe bejutó, valamint a

disszociáció során felszabaduló protonok felhalmozódnak a citoplazmában, és tönkre teszik a transzmembrán protongradienst (más néven proton-mozgató erőt), amely elengedhetetlen a különböző transzportfolyamatokhoz, a mozgásképesességhez és az ATP-bioszintézishez.

Hidrogén-peroxid:

Oxigén jelenlétében a tejsavbaktériumok elektronokat juttatnak a molekulára, aminek következtében szuperoxid anion (O_2^-), hidrogén-peroxid (H_2O_2) vagy víz képződik. A hidrogén-peroxid erős oxidálószerként képes gátolni, illetve elpusztítani a romlást okozó és patogén baktériumokat (Szekér, 2007.).

Bakteriocinek:

A bakteriocinek olyan peptidek, amik antimikrobás hatással rendelkeznek. A bakteriocinek 4 csoportba sorolják a molekulatömegük és hatásmechanizmusuk szerint:

- Lantibiotikumok, kisméretű, membrán-aktív peptidek (<5 kDa)
- Kisméretű, hőstabil, nem-lanthionint tartalmazó, membrán-aktív peptidek (<10 kDa),
- Nagyméretű, hőlabilis fehérjék (>30 kDa.).
- Komplex bakteriocinek, amelyek fehérjéből és egy vagy több kémiai komponensből (lipid, szénhidrát) állnak, amelyek szükségesek az aktivitásukhoz (Klaenhammer 1993).

Legismertebb képviselőjük a nizin, amelyet a *Lactococcus lactis* termel. Ennek az egyetlen bakteriocinek a használatát engedélyezte élelmiszer tartósítószerként a WHO (Szekér, 2007.). A nizin, számos más bakteriocinnel ellentétben, a legtöbb vegetatív Gram-pozitív baktériumot, köztük számos patogént is gátol bizonyos mértékig, és hatással van az endospórákra is (gátolja a spórák csírázását). A Gram-pozitív patogének közül különösen a *Listeria monocytogenes* érzékeny rá (Kiss 2019).

3.4.3. Tejsavbaktériumok mint biokonzerválószer

Laktobacillusokat évtizedek óta használják az élelmiszer-tartósításban természetes tartósítószerként, tejtermékek, fermentált zöldségek, halak és kolbászok fermentációjában. A laktobacillusok a savanyításnak köszönhető tartósító hatásuk és/vagy az íz, a textúra és a táplálkozási érték fokozása miatt kapcsolódnak az élelmiszer-előállításához. A laktobacillusok számos sajt-fajta, erjesztett növényi élelmiszer, erjesztett hús, bor- és sörgyártás, kovászos kenyér és szilázs előállítása során starterként vagy kiegészítő kultúráként használatosak. A nyersanyagban gyors pH-csökkenést okoznak a tejsav, mint fő katabolikus termék termelésével (Giraffa, Chanishvili, és Widyastuti 2010).

A savas élelmiszer-fermentáció előnyei a következők:

1. ellenállóvá teszi az élelmiszereket a mikrobiális romlással és atoxinok kialakulásával szemben,
2. csökkenti a hajlamot az élelmiszerekben a patogén mikroorganizmusok szaporodására,
3. tartósítja az élelmiszereket a betakarítás és a fogyasztás között,
4. módosítja az eredeti összetevők ízét, és gyakran javítja a tápértéket (Rhee, Lee, és Lee 2011)

A LAB anyagcseréje számos vegyületet eredményez, például a citrát hasznosításából származó diacetilt, acetoint és 2,3-butándiolt, valamint az aminosav-katabolizmusból származó illékony vegyületek és bioaktív peptidek széles skáláját; ezekről ismert, hogy befolyásolják a sajt aromáját és ízét (Coelho, Malcata, és Silva 2022).

3.4.4. Tejsavbaktériumok probiotikus hatásai

A probiotikum egy jól ismert kifejezés, amelyet az "élő mikroorganizmusokra" használnak, élelmiszerekben történő alkalmazásukkal, azok hozzáadott értéke növelhető. Az élelmiszeriparban alkalmazott tejsavbaktériumok GRAS besorolással rendelkeznek, ezért fogyasztásuk biztonságosnak tekinthető (Hassan és mtsai. 2020).

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

- Maláta kivonat (Sigma Aldrich)
- PDA agar (Potato Dextrose Agar-Liofilchem)
- Acetonitril (Chemlab)
- Etil-acetát
- MRS agar
- Desztillált víz
- Tween80
- R-Sutdio

4.2. Felhasznált törzsek

A törzseket a tanszék dolgozói izolálták exotikus állatok székletéből, olyan céllal, hogy megvizsgálják penészekre, illetve mikotoxinokra kifejtett hatásuk. Ezen törzsek MRS tápvelesben jó aflatoxin-kötő képességgel rendelkeztek, így fontosnak/érdekesnek tartottam a törzsek patulin termelésre kifejtett tulajdonságainak megismerését is. Az azonos fajon belül vizsgált három törzs pedig lehetőséget adott ezen tulajdonság törzs-specifikusságának feltérképezésére.

- *Aspergillus clavatus* (jelölésük: Br1; B9/6)
- *Lactobacillus paraplantarum* 3db törzs, egy tarvarjú székletéből izolált (jelölése: Tv1) és két aldobrai teknős székletéből izolált (jelölése: AT3; AT26)

4.3. Mérési módszerek

A szakdolgozatomhoz szükséges kísérletek két fő részre oszthatók: mikrobiológiai és analitikai szakaszokra, így a módszereket is ennek megfelelően mutatom be a dolgozatomban. Ahhoz, hogy a penészt laboratóriumi körülmények között vizsgálni tudjam, először táptalajt kellett készítenem. A kísérleteim első fázisában burgonyadextóz agar (PDA) és maláta kivonat táptalajt (MEA) használtam, hogy kiderítsem, melyik táptalajon szaporodik jobban a penészgomba, és melyik táptalajon eredményesebb a toxin termelése.

4.3.1. Mikrobiológia vizsgálatok

A burgonyadextóz agar táptalajt a dobozon található javaslat alapján készítettem el: 4,2 g/100 ml víz. Az elegyet folyamatos keverés mellett felforraltam, majd hőálló üvegbe öntöttem, és autoklávoztam 121°C-on 15 percig. Miután kb. 50°C-ra hűlt, a steril munkafülkében adagoltam

ki a petricsészékbe, körülbelül 20 ml-t petricsészénként. A maláta extrakt táptalajhoz (3 g/100 ml) maláta kivonatot, peptont (0,5 g/100 ml) és agart (1,5 g/100 ml) adtam, majd ugyanúgy jártam el, mint az előző esetben. Mindkét táptalajra 10 µl spóra szuszpenziót cseppentettem a penészgombák mindkét törzséből külön-külön, és a mintákat egy hétig 25°C-on inkubáltam.

4.3.1.1. A tejsavbaktériumok mikotoxin-termelést gátló aktivitásának vizsgálata

- **a.** A 10 µl penész spóra szuszpenzió száradása után azonnal cseppentettem a tejsavbaktérium 10 µl-es szuszpenzióját.
- **b.** A penészek inkubációjának, telepeinek kialakulása és a spórák megjelenése után cseppentettem a tejsavbaktérium szuszpenzióját, majd a spórázás után egy nappal végeztem az extrakciót.

Itt arra kerestem a választ, hogy mikor érdemes a tejsavbaktériumokat alkalmazni, hogy csökkentsék a toxin termelést.

4.3.1.2. Toxintermelési kinetika vizsgálata

A vizsgálat célja az volt, hogy megállapítsam, mikor, a telep növekedésének hányadik napján kezd el toxint termelni a penészgomba. Ennek érdekében a toxin termelési kinetikáját vizsgáltam. Mindkét penész törzsből (Br1, B9/6) hat petricsészére cseppentettem 10 µl spóra szuszpenziót, 25 °C-on inkubáltam, majd minden nap, a hétvége kivételével, extraháltam egy-egy mintát, hogy kövessem a toxin-termelési folyamatot.

4.3.1.3. Alma agaron végzett kísérlet

Az almaléből készült agaron végzett kísérlethez a táptalajt úgy készítettem el, hogy az almaléhoz adtam 30g/l mennyiségű agart. A későbbiekben ugyanúgy jártam el, ahogy a többi táptalaj készítésnél. A kész táptalajra 10 µl spóra és baktérium szuszpenziót cseppentettem, majd 1 hétig 25 °C-on inkubáltam, végül ezt követte az extrakció.

4.3.1.4. Almán végzett kísérlet

Az alma gyümölcsön végzett kísérletet az almahéjának megtisztításával kezdtem, ehhez egy 1,5%-os hypo oldatot készítettem, amiben az előzőleg megmosott almát 3 percig áztattam, majd kivettem és újra leöblítettem. Ezzel a héj közel csíramentessé vált. Az almát lapokra vágtam úgy, hogy széles héj felülete legyen, ahova a későbbiekben rácseppenttem a 10 µl spóra és baktérium szuszpenziót. Az almából megmaradt részeket felkockáztam és 50 ml-es falcon csövekbe tettem, hogy a későbbiekben táptalaj legyen a kinövő penésznek, erre helyeztem rá a

leoltott darabokat úgy, hogy a héjon levő cseppek ne folyjanak le. A falcon csöveket alufóliával zártam le, hogy az aerob környezetet biztosítsam. 1 hétig 25 °C-on inkubáltam.

4.3.1.5. Toxin extrakció a mikrobiológiai mintákból

A Petri-csésze közepéből, ahol a penésztelep kinőtt, steril, 50 ml-es centrifugacsővel egyforma átmérőjű agar-penész korongokat vágtam ki, amelyeket aztán a centrifugacsőbe helyeztem. 20 ml extrahálószer (90:10 víz:acetonitril) öntöttem rájuk, majd fél órán át vortexeltem és ráztam őket. Harminc perc elteltével 6000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltam 10 percig. Mivel a centrifugálás után az agar darabok lebegtek a felülúszóban, redős szűrőn átszűrtem őket. A mintákat ezután lefagyasztottam az analitikai mérésekig.

4.3.2. Analitikai vizsgálatok

4.3.2.1. Patulin extrakció

Öt ml extraktumot pipettáztam egy 100 ml-es választótölcsérbe, majd 10 ml etil-acetátot adtam hozzá és 1 percig ráztam. Miután a rétegek szétváltak, a vizes és az etil-acetátos réteget két külön Erlenmeyer-lombikba engedtem le. A vizes fázist visszahelyeztem a választótölcsérbe, és ismét 10 ml etil-acetáttal extraháltam. A rétegek szétválása után ismét leengedtem a vizes réteget egy üres lombikba, az etil-acetátos réteget pedig az előző extrakcióból származó etil-acetátos fázishoz adtam. Az eljárást harmadszorra is megismételtem. Az egyesített etil-acetátos fázisokat választótölcsérbe öntöttem, az Erlenmeyer-lombikot további 5 ml etil-acetáttal átöblítettem, majd ezt is a választótölcsérhez adtam. Ezután 2 ml nátrium-karbonát oldatot (1,5%) adtam hozzá, és fél percig ráztam. Miután a rétegek szétváltak, az alsó vizes fázist Erlenmeyer-lombikba engedtem, a felső etil-acetátos réteget pedig gömblombikba csepegtettem, amelybe 15 g vízmentes nátrium-szulfátot tettem, szűrőpapíron keresztül. A vizes réteget ismét visszahelyeztem a választótölcsérbe, az Erlenmeyer-lombikot 5 ml etil-acetáttal öblítettem át, és fél percig ráztam. Miután a rétegek ismét szétváltak, az alsó réteget a regdőba engedtem, a felső réteget pedig a gömblombikba, szűrőpapíron keresztül, majd kétszer 5 ml etil-acetáttal átmostam a választótölcsért, és ezeket is a gömblombikba csepegtettem. A patulin lúgos oldatban nem stabil, ezért az extrakciót a lehető leggyorsabban végeztem el a veszteségek elkerülése érdekében.

Az extrakció után az etil-acetátos kivonatot tartalmazó gömblombikot bepároltam rotációs vákuum bepárlóban, majd a bepárlás után a visszamaradt anyagot 1 ml eluensben (90:10 víz:acetonitril) oldottam fel. A méréseket HPLC-vel végeztem, a mintákat fecskendőszűrővel szűrtem le a mérés előtt.

4.3.2.2. Mérés HPLC-vel

- Eluens: 90:10 víz:acetonitril
- Áramlási sebesség: 0,3 ml/perc
- Kolonna: Phenomenex kinetex 2,6 μm B-C18, 100 Å LC oszlop, 100x3 mm
- Hőmérséklet: szobahőmérséklet
- Injektált térfogat: 50 μl
- Izokratikus elválasztás

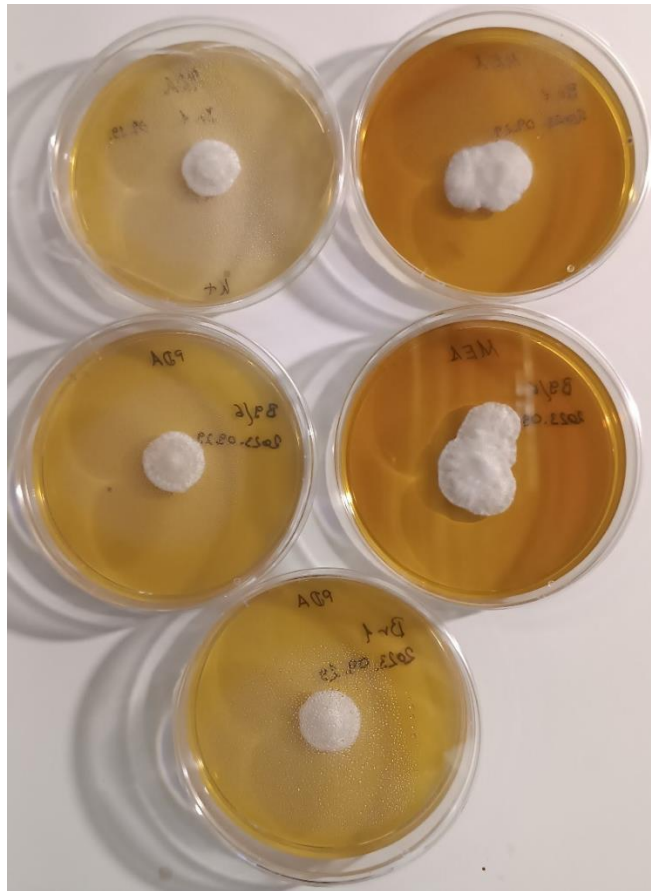
4.3.3. Statisztikai elemzés

Statisztikailag elemeztem R-Studio segítségével, hogy a toxin termelés és a spóra szám között van-e összefüggés, erre ANOVA-t és Pearson-féle korreláció analízist használtam.

5. Eredmények és értékelésük

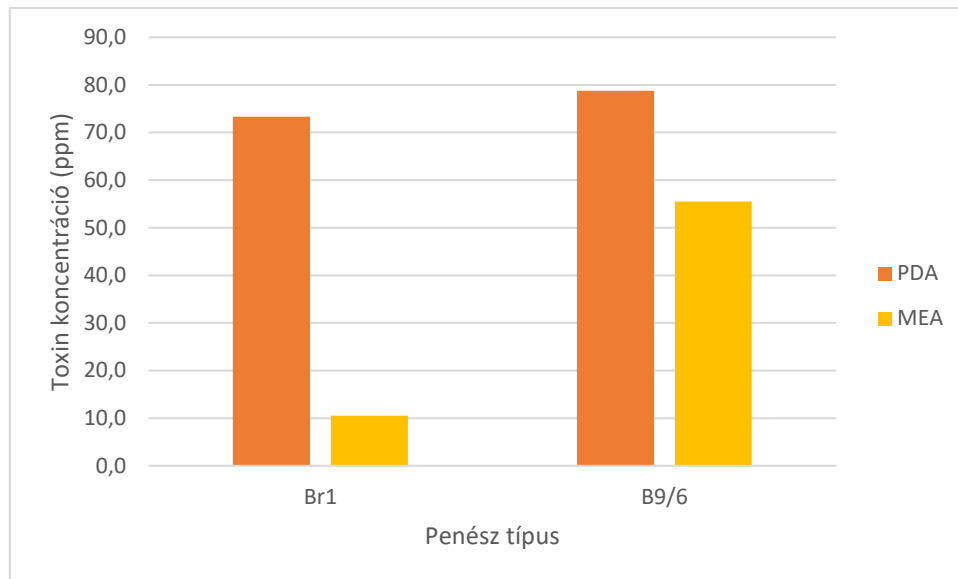
5.1. Táptalaj hatása a toxintermelésre

Az elsőként az almákról izolált *Aspergillus clavatus* Br1-es törzs, és *Aspergillus clavatus* B9/6-os penészgomba törzsek szaporodását és toxintermelő képességét vizsgáltam. A vizsgálatban szaporodásukat két különböző táptalajon (PDA és Maláta agar) követtem nyomon (6. ábra).



6. ábra Táptalaj kísérlet PDA agar (balra) Maláta kivonat agar (jobbra)

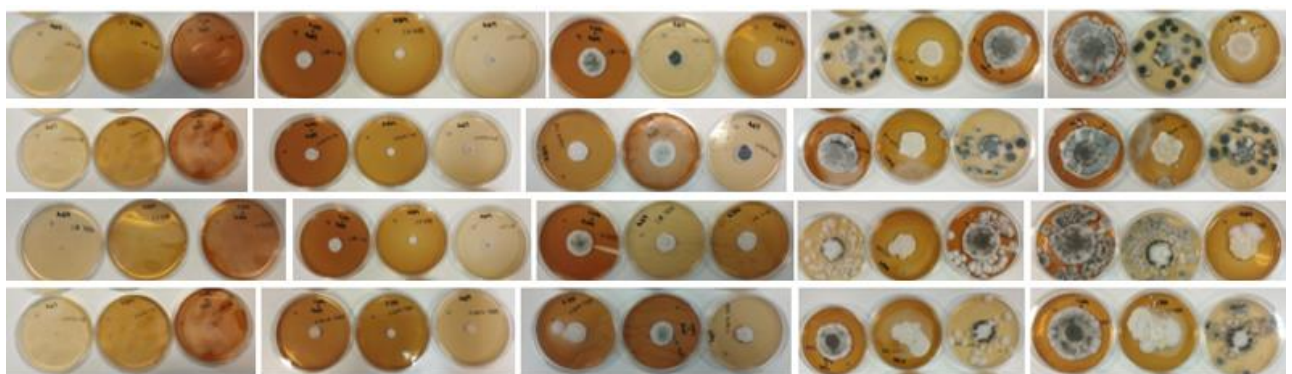
Azt tapasztaltam, hogy a penészgombák Maláta agaron nagyobb telepeket képeztek, jobban elszaporodtak, ugyanakkor PDA agar esetében magasabb volt a penészgombák által termelt patulin mennyisége, ahogy az a 7. ábrán látható, így a további kísérletekben ezt a táptalajt használtam.



7. ábra A táptalaj típus befolyása a toxin termelésre

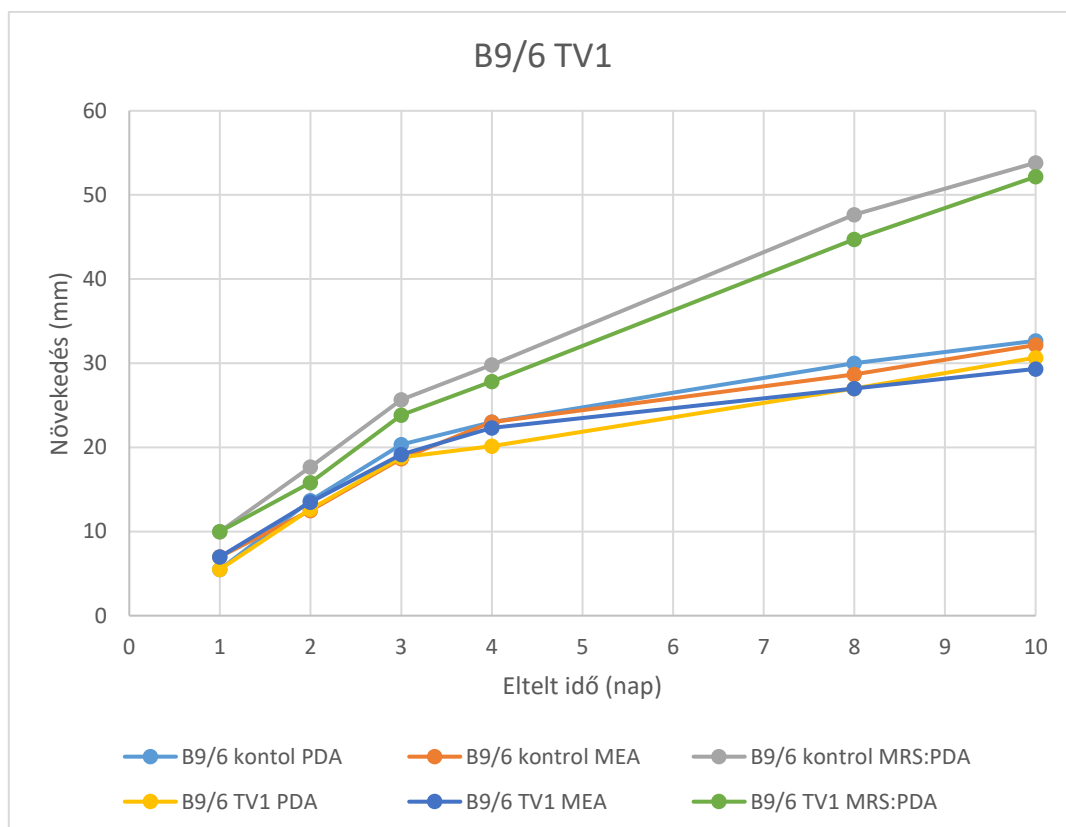
5.2. Növekedés nyomon követése

A növekedés nyomon követésére három táptalajt használtam: MEA; PDA és MRS:PDA 50:50%. Minden táptalajon 10 napig követtem a telepek növekedését, a telepek átmérőjének mérésével, a második, harmadik, negyedik, nyolcadik és tizedik napon mértem a telepek méretét. A 8. ábrán jól látható a telepek növekedése az idő elteltével. Míg a MEA táptalajon alig, szinte egyáltalán nem spóráztak a telepek addig a PDA agaron és az MRS:PDA agaron jól látható a spóráképződés. Szemrevételezés után látható, hogy ahol a penész mellett jelen volt a tejsavbaktérium, ott kevésbé spórázott szét a petricsészében a telep a kontrollhoz képest, mind a Br1-es és a B9/6-o törzs esetében.



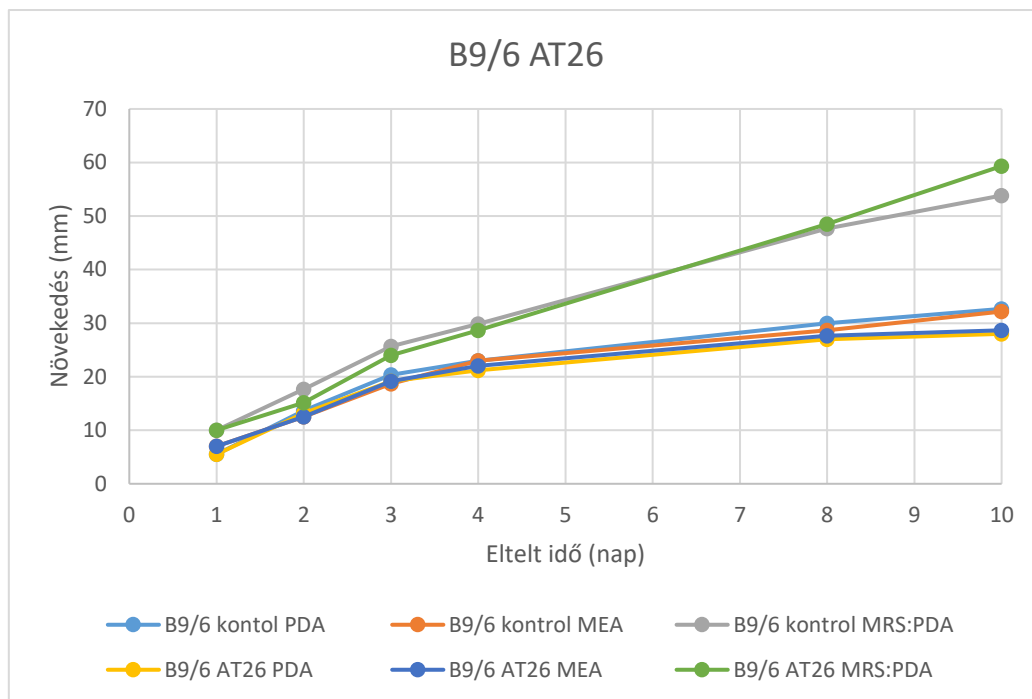
8. ábra Növekedés nyomon követése penész-tejsavbaktérium együttes leoltása esetén (fentről lefelé: Br1 kontroll; Br1 AT26; B9/6 kontroll; B9/6 AT26)

A következő ábrákon (9,10,11,12) láthatóak a növekedés nyomon követésének eredményei. Jól látható, hogy a telepek mérete nagyon függött a táptalaj összetételétől. A telepek jellemzően kisebbek voltak PDA táptalajon és legnagyobbra az MRS:PDA kevert táptalajon nőttek. A táptalaj összetétel nem csak a telep méretét befolyásolta, hanem a spórázásra is hatással volt, ahogy ez látható a 8. ábrán. A 9. ábra azt mutatja, hogy a TV1-es tejsavbaktérium törzs antagonista hatást fejt ki a B9/6-os penész törzssre, ami leginkább a PDA táptalajon látható, ám bár minden táptalajról elmondható.



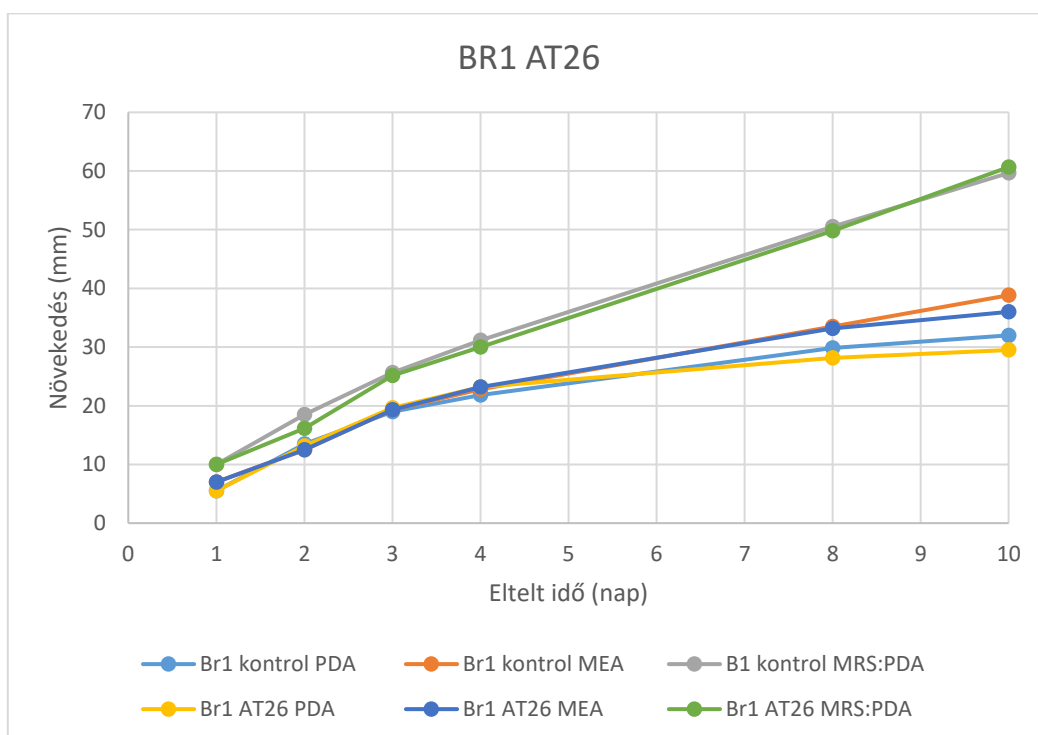
9. ábra A B9/6-os penész törzs gátlása az TV1-es tejsavbaktériummal

A 10. ábrán az MRS:PDA beállításnál az AT26-os tejsavbaktérium törzzsel egyidőben leoltott B9/6-os penész törzs mérete meghaladta a kontroll mintáét. Ez azzal magyarázható, hogy a növekedés nyomon követésére a telepek átmérőjét mértem meg két irányból és ezt átlagoltam. Sok helyen nehéz volt pontosan mérni az átmérőt a spórázás miatt, amik új telepet képeztek és bele lógtak az eredeti vizsgált telep méretébe. A PDA és MEA táptalajokon a tejsavbaktériumot is tartalmazó petricsészékben a penész görbe lefutása hasonló a kontroll mintákához képest.



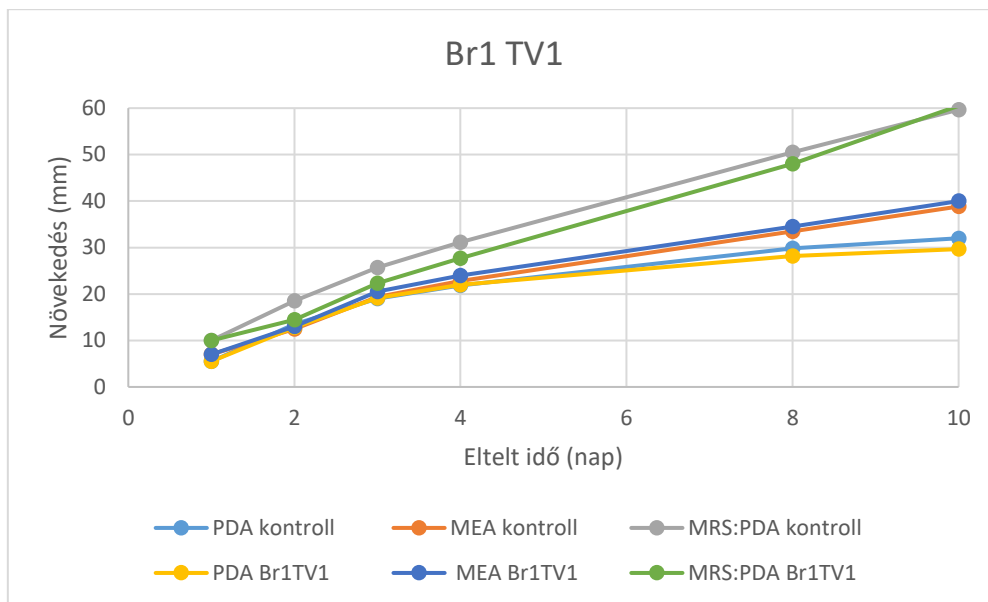
10. ábra A B9/6-os penész törzs gátlása az AT26-os tejsavbaktériummal

A 11-es ábra a Br1-es penész törzs szaporodását ábrázolja az AT26-os tejsavbaktérium mellett a növekedési kísérlet során. Ebben az esetben nem volt jelentős különbség kimutatható a baktériummal leoltott penészek esetében egyik táptalajon sem.



11. ábra A Br1-es penész törzs gátlása az AT26-os tejsavbaktériummal

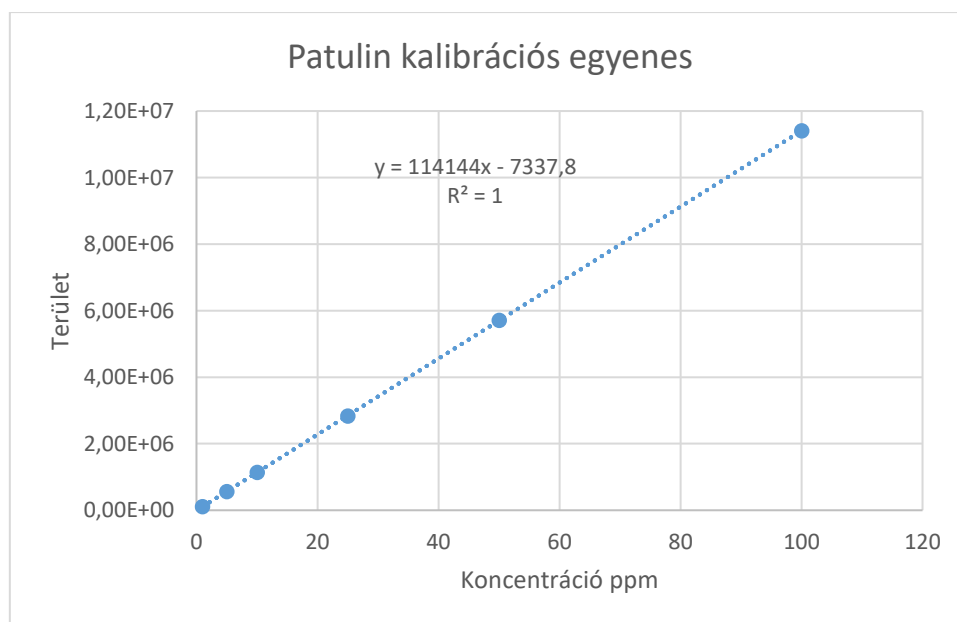
A 12-es ábra a Br1-es penésztörzs növekedését ábrázolja a TV1-es tejsavbaktérium mellett. Az MRS:PDA agaron egészen a 8. napig kimutatható gátlás, azt követően a 10. napra a görbe megegyezik a kontrol minta görbéjével. A PDA és MEA agar esetében nincs számottevő különbség.



12. ábra A Br1-es penész törzs gátlása az TV1-es tejsavbaktériummal

5.3. Analitikai mérések

A patulin mennyiségi meghatározásához első lépésben kalibrációs görbét vettem fel, ami a 13. ábrán látható.



13. ábra Patulin kalibrációs egyenes

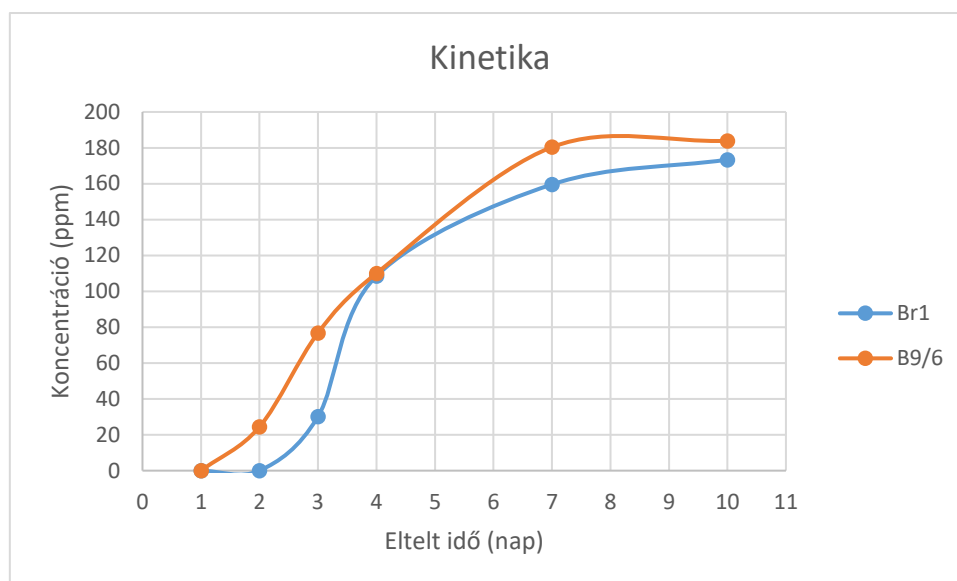
A méréshez 90:10 víz:acetonitril eluenszt használtam, 0,3 ml/perc volt az áramlási sebesség és izokratikus eluens összetételt használtam. A patulin kimutatásához izokratikus elúciót használtam, az eluens összetétele: víz:acetonitril (90:10), az áramlási sebesség pedig 0,3 ml/perc volt, ezen paraméterek alkalmazásával a patulin retenció ideje a kromatogramon: 3,48 perc. A visszanyerés mérésével megvizsgáltam, hogy a módszer képes-e meghatározni a mérendő komponenst, a patulint. A mintaelőkészítésnél ismert mennyiségű patulint adtam a mintához majd az előbbiekben leírtak szerint végeztem az extrakciót. Ezután meghatároztam a kalibráció segítségével a koncentrációt. Így össze tudtam hasonlítani a hozzáadott/valódi és a mért koncentrációját az anyagnak. A visszanyerés 68% volt.

A módszer legkisebb kimutatási határát (LOD Limit of detection) is meghatároztam, ami 1 ppb volt. Ez a legkisebb mért koncentráció, ami megkülönböztethető a vak mintától.

Meghatározási határ (Limit of quantification, LOQ) 2 ppb volt. Ez az a legkisebb mért koncentráció, amely elfogadható pontossággal és precizitással határozható meg és különíthető el a vak mintától. Ez az érték a vak minta analitikai jelének hat-tízszeres tapasztalati szórásával egyezik meg.

5.4. Toxintermelés kinetikája

A penészgombák toxintermelésének kinetikáját is vizsgáltam. A toxintermelés szempontjából kedvező PDA agaron egy egyhetes kísérleti beállítással. A kísérlet indítását a 3.3.1.1 pontban leírt módszerek szerint végeztem. Az egy hét elteltével mindkét törzsből meghagytunk egyet és a 10. napon extraháltuk. A B9/6 törzs esetében a második, míg a Br1 törzs esetében a harmadik naptól mutatható ki toxintermelés. Látható a 14. ábra alapján, hogy a B9/6-os törzs nagyobb mennyiségű, 6%-kal több toxint termelt. A grafikonról leolvasható, hogy a patulin termelés exponenciális szakasza a 7. napon véget ért, a 10. napig csak kis mértékű növekedés volt megfigyelhető, így a 10. napra elérhette a toxintermelés maximumát.



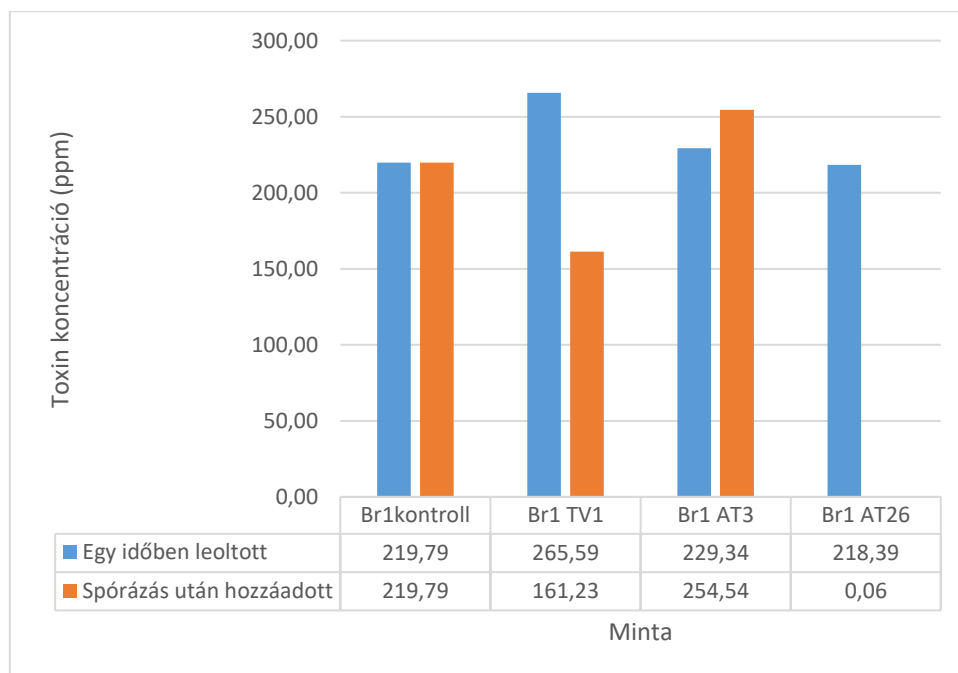
14. ábra A Br1-es és B9/6-os penész törzsek toxin termelési kinetikája

5.5. A tejsavbaktériumok patulin-termelést gátló aktivitásának vizsgálata

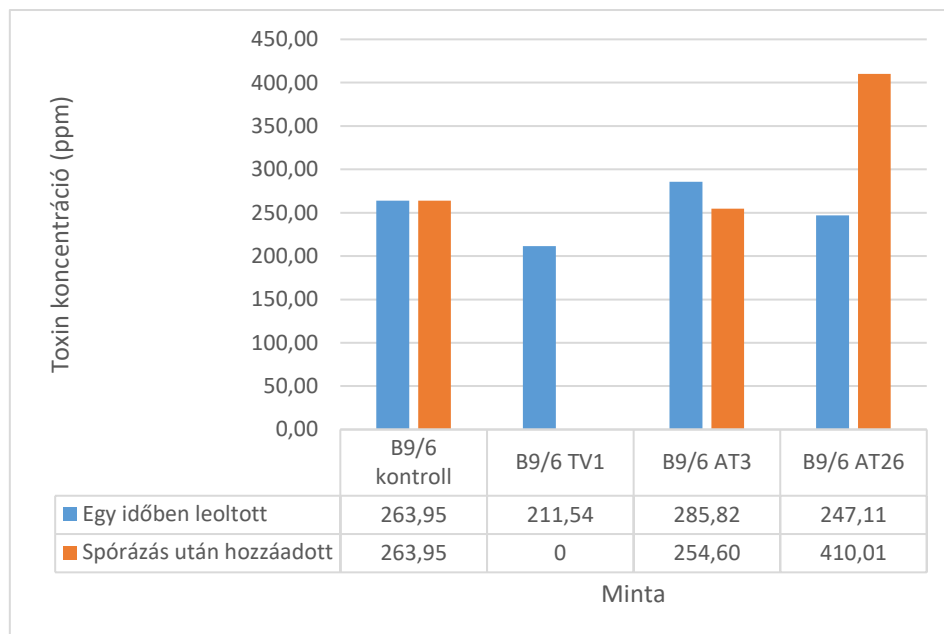
A kísérlet során azt vizsgáltam, hogy mikor érdemes a tejsavbaktériumot alkalmazni a mikotoxin csökkentése érdekében, ezért a baktériumot különböző időpontokban adtam hozzá a penészt tartalmazó petricsészékhez. Első esetben egyidőben oltottam le penészt és a tejsavbaktériumokat, majd az inkubáció után megmértem a toxin termelést. Második esetben a penészek spórázása után kezeltem a telepeket a tejsavbaktérium szuszpenzióval és egy nappal később – de az együtt leoltott mintákkal egy időben - extraháltam. Ezt a két módszert több szempont figyelembevételével választottuk ki. Az egy időben történő leoltás esetén kialakulhat egy penész-növekedés gátlás, ami alapján véve a mikotoxin-termelésre is hatással van, illetve a növekedés során közvetlenül magára a mikotoxin-termelésre. A másik lehetőségnél a spórázásnak indult penészgombák esetében a tejsavbaktériumok gátló hatása befolyásolhatja a már megkezdődött toxintermelés vagy közvetlenül a toxintermelés előtti állapotot, emellett képesek lehetnek megkötni vagy lebontani a már termelt mikotoxint. A 15-ös és 16-os ábrán látható eredményekből megállapítható, hogy a három *Lactobacillus* törzs és két *Aspergillus* törzs kombinációja nem mutat egy egyetemesen levonható következtetést. Bizonyos esetekben (B9/6 TV1; B9/6 AT25; Br1 AT26) az egy időben leoltott minták esetén mértem kisebb patulin termelést, míg a spórázás után kezeltek esetén 2 párosításnál (Br1 TV1; B9/6 AT3). Az eredmények sokfélesége abból is fakadhat, hogy a mikroorganizmusok különböző helyzetekben (például tejsavbaktérium-penész párosítások, együtt szaporodás vagy spórázás utáni érintkezés) eltérő reakciókat mutatnak. Mivelhogy egyik kezelés sem eredményezett jelentős patulin-

csökkenést a kontrollhoz képest, az együtt leoltást választottam, mivel ez a gyakorlati alkalmazás szempontjából is relevánsabb megoldás lehet.

A Br1 AT26-os beállításnál a spórázás után hozzáadott tejsavbaktériumok esetén a termelt patulin koncentrációja 0,06 ppm. Ez ígéretes lehet ebben a vizsgálati összeállításban, de ehhez további megerősítő vizsgálatokra van szükség a másik penész esetében ez a tejsavbaktérium ennél a kísérleti beállításnál adta ugyanis a legnagyobb toxin koncentrációt.



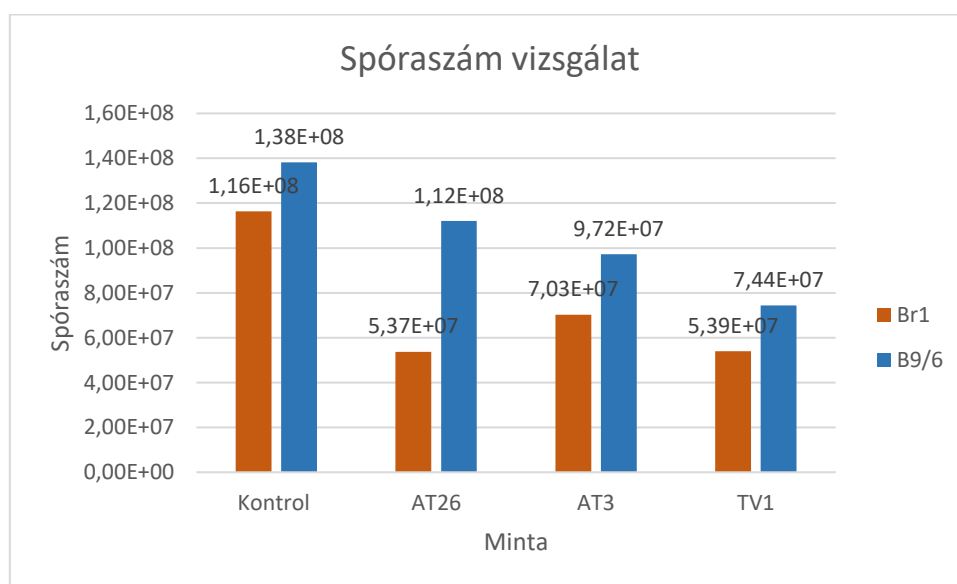
15. ábra A tejsavbaktériumok mikotoxin termelést gátló aktivitásának vizsgálata a Br1-es penész törzsre nézve



16. ábra *A tejsavbaktériumok mikotoxin termelést gátló aktivitásának vizsgálata a Br1-es penész törzsre nézve*

5.6. Tejsavbaktériumok antagonista hatása a spóraszámra

A spórákat a telepekről gyűjtöttem be, azonos méretű felületről (a Petri-csésze közepéből a centrifugacsővel kivájt agarról, 5,72cm²) és Tween80 (0,1%) oldatba vettem fel, hogy az aggregálódást megakadályozzam. A számolást Bürker-kamrában végeztem. A 17. ábra alapján elmondható, hogy mindkét penész törzs esetében a kontroll mintához képest az antagonista tejsavbaktériumokkal leoltott minták esetében, csökkenést tapasztaltam a spóra képződésben.

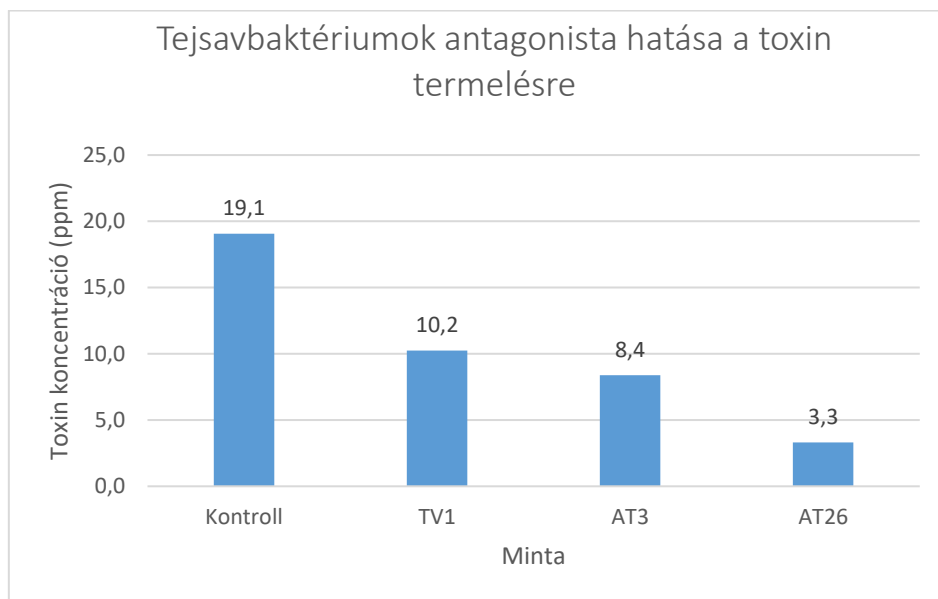


17. ábra *Antagonista tejsavbaktérium jelenlétének hatása a spóraszámra*

5.7. Tejsavbaktériumok antagonista hatása a toxin termelésre

A mérések során a Br1-es törzs elvesztette a toxintermelő képességét laboratóriumi körülmények között, ezért ezzel a törzzsel a továbbiakban nem tudtam dolgozni a toxintermeléses kísérletekben.

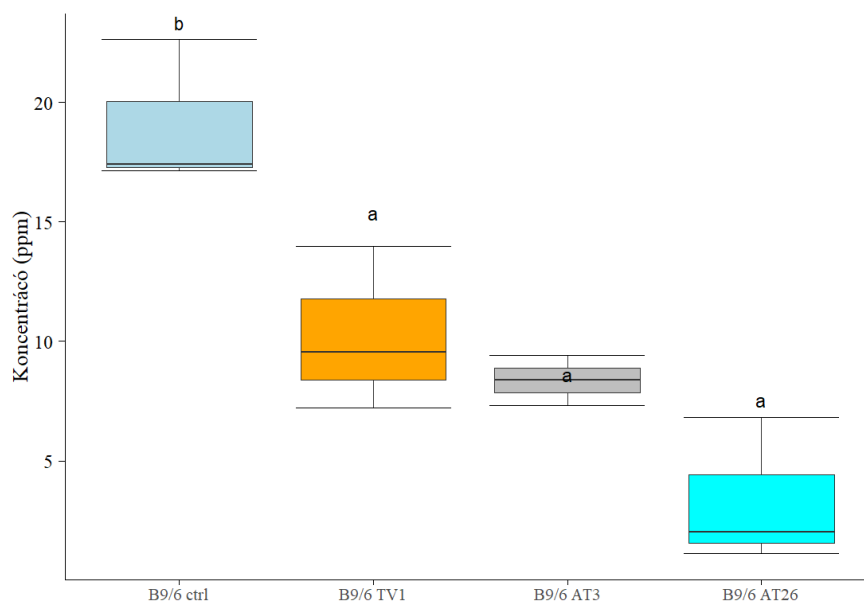
Az eredményeim azt mutatják (18. ábra), hogy a kontroll mintához képest, mindhárom kísérletbe vont tejsavbaktérium esetében csökken a patulin termelés, az AT26-os tejsavbaktérium fejt ki a legnagyobb antagonista hatást a B9/6 penész toxintermelésére.



18. ábra Tejsavbaktériumok antagonista hatása a toxintermelésre PDA agaron a B9/6-os penész törzsre

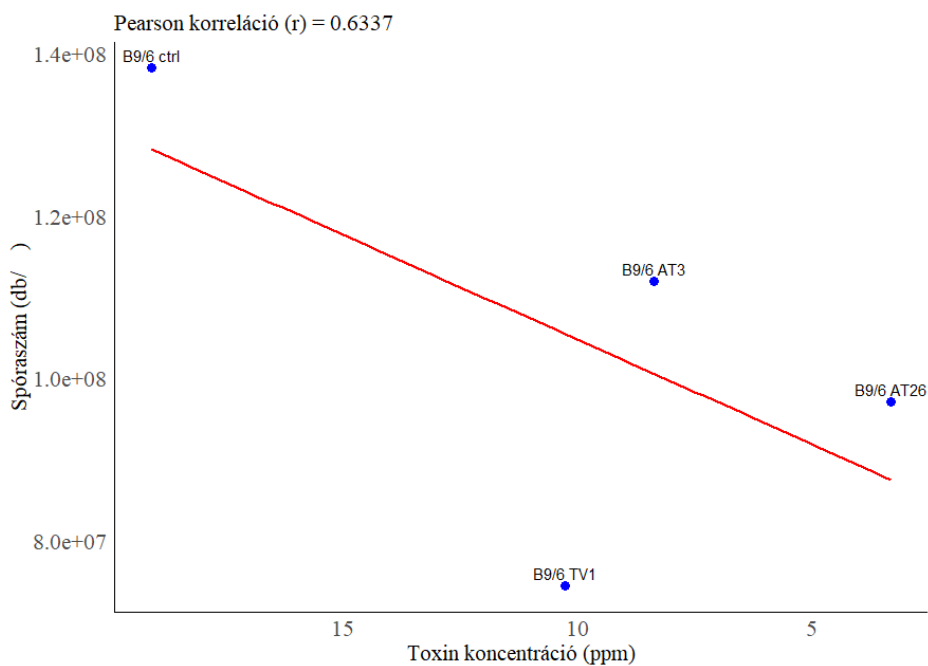
5.8. Statisztikai értékelés

A 19. ábrán látható a statisztikai elemzéssel készített box plot, amelyből megállapítható, hogy a kontroll mintához képest (B9/6 ctrl az ábrán) szignifikáns eltérés van toxin termelés tekintetében a tejsavbaktériummal gátolt minták esetében. Noha mindegyik, tejsavbaktériummal kezelt minta jelentősen kisebb patulin-koncentrációt mutatott a kontrollhoz képest, azok között szignifikáns különbség nem volt.



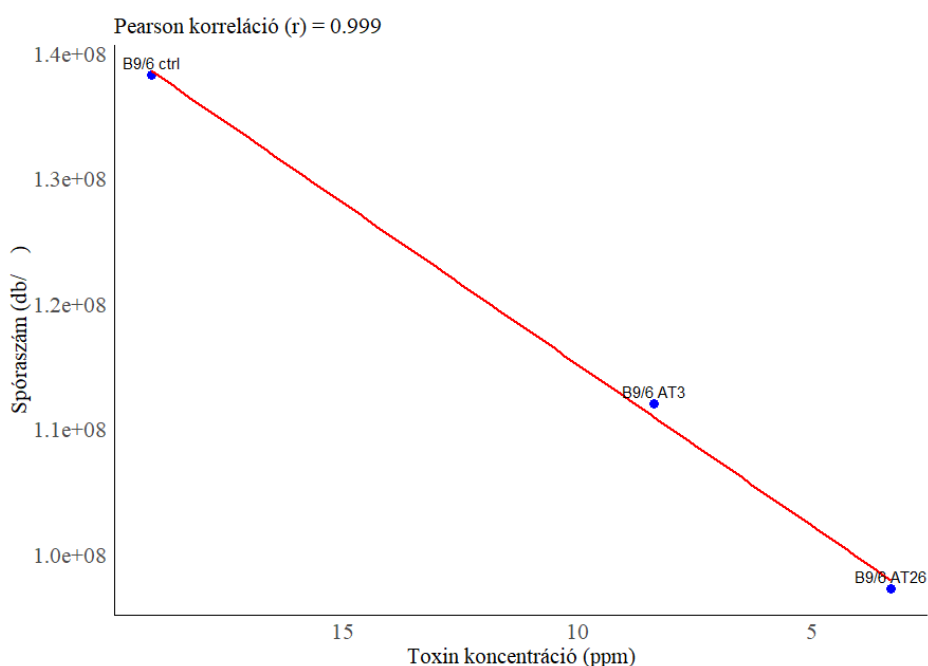
19. ábra *Tejsavbaktériumok mikotoxin termelést gátló hatásának statisztikai elemzése (PDA agar, B9/6-os penész törzs)*

A 20-as ábrán mind a három antagonista hatással rendelkező tejsavbaktérium spóratermelésének változását vizsgáltam a toxintermelés változásának a függvényében. A korrelációs együttható $R=0,6337$ lett, ami nem elég magas érték, így nincs korreláció a toxin és a spóra termelés között, ha mind a három tejsavbaktérium hatását vizsgáljuk.



20. ábra *Pearson-féle korreláció analízis a B9/6-os törzs toxin- és spóra termelésére az AT3-a, a TV1-es és az AT26-os tejsavbaktérium törzsekkel*

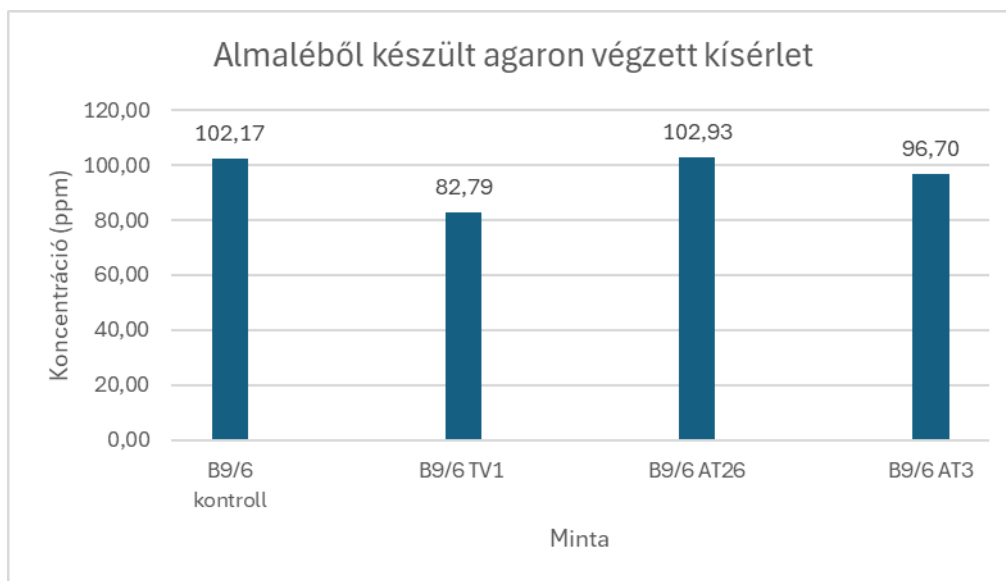
Megvizsgáltam, hogy csak az AT3-as és az AT26-os tejsavbaktériumok esetén van-e összefüggés a toxin és a spóra termelés között (21. ábra). A Pearson-féle korrelációs együttható $R=0,999$ volt, ami azt mutatja, hogy ezen tejsavbaktériumok alkalmazása mellett van kimutatható összefüggés a spóra- és a toxin termelés, illetve azok gátlása között. Ez egybevág több tanulmány megállapításával is, miszerint a penészgombák másodlagos anyagcseréje, toxintermelése és a sporuláció mind időben, mind funkcionálisan összefügg (Calvo és mtsai. 2002; Brodhagen és Keller 2006). Így elmondható, hogy ez a két tejsavbaktérium antagonista hatással rendelkezik mind a spóra mind a toxin termelésre.



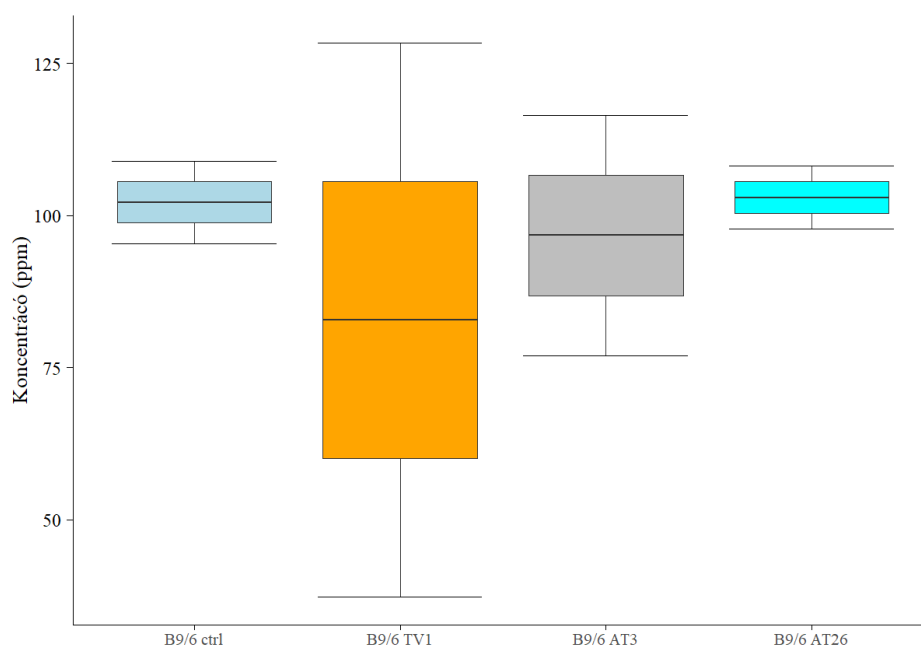
21. ábra Pearson-féle korreláció analízis a B9/6-os törzs toxin- és spóra termelési analízisére az AT3-as és az AT26-os tejsavbaktérium törzsekkel

5.9. Alma agaron végzett kísérlet

Az előző részfeladatok eredményeit szintetizálva a következő kísérletben almaléből készített táptalajon követtem nyomon a vizsgált tejsavbaktériumok penészgombák patulin termelésének gátlására kifejtett hatását. A 22. ábra alapján elmondható lenne, hogy a TV1-es tejsavbaktérium törzs gátolja a patulin termelést, de az adathalmazra lefuttatott statisztikai elemzés alapján, ami a 23. ábrán látható, ez nem egyértelmű, mivel nagyon nagy az eredmények szórása. Ahogyan a többi tejsavbaktériumnál sem kimutatható az antagonista hatás.



22. ábra Almaléből készült agaron végzett kísérlet



23. ábra Almaléből készült agaron végzett kísérlet statisztikai elemzése

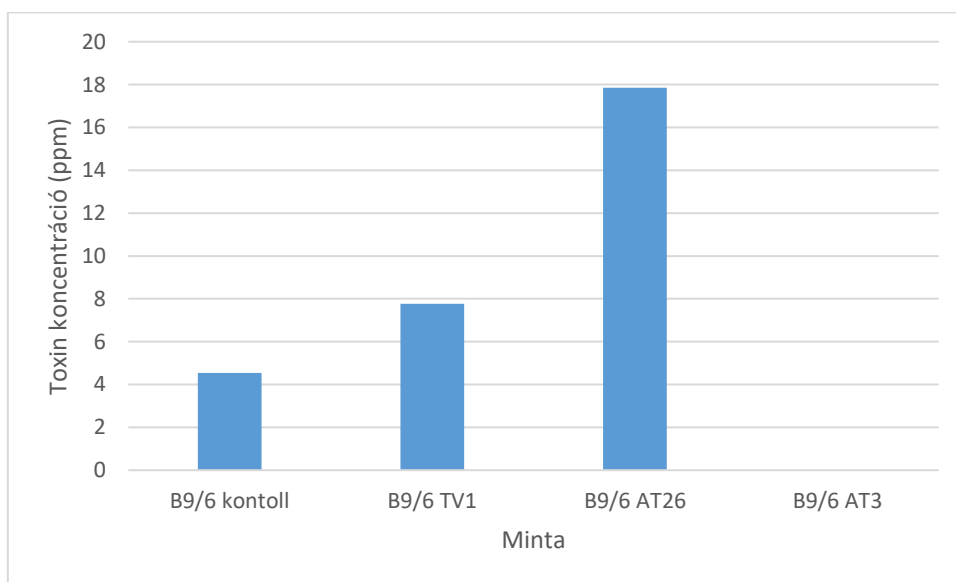
5.10. Alma gyümölcsön végzett kísérlet

A kísérlet sorozat utolsó lépéseként alma gyümölcsre oltottuk le a penész és tejsavbaktérium törzseket a korábbiakban leírt módon. A kísérletben a penész lassabban nőtt a vártnál, a 24. ábrán látható állapotba csak a 10. napon jutott.



24. ábra Alma gyümölcsön végzett kísérlet

A 25-ös ábrán az alma gyümölcsön végzett kísérlet toxint termelési eredményeit ábrázoltam. Almán lassabban nőtt ki a penész a vártnál és a kontroll kevesebb patulint termelt, mint azok a minták, ahol tejsavbaktériumot adtunk hozzá. Az AT3-as tejsavbaktérium törzs nem szaporodott tovább laboratórium körülmények között, így ebben a kísérleti összeállításban már nem tudtam vizsgálni.



25. ábra Alma gyümölcsön végzett kísérlet toxin termelése

6. Összefoglalás

Kutatásom célja két *Aspergillus clavatus* penészgomba törzs növekedésének és patulin termelésének gátlása három *Lactobacillus paraplantarum* tejsavbaktérium törzs segítségével. A fő kérdések közé tartozik annak meghatározása, hogy az *Aspergillus* penészgombák milyen táptalajon mekkora mennyiségű patulint termelnek, hogy a *Lactobacillus* baktériumokkal való gátlás hatással van-e a penészek növekedésére, toxin termelésére és a sporulációra, valamint mikor érdemes a gátló mikroba törzset hozzáadni, hogy a legnagyobb antagonista hatást érje el. A vizsgálathoz két *Aspergillus clavatus* (Br1; B9/6) törzset és három *Lactobacillus paraplantarum* (TV1; AT3; AT26) törzset használtam, és ezeknek a kombinációját. A kísérletekhez alkalmazott táptalajok közé tartozott a burgonyadextóz agar (PDA), a maláta kivonat táptalaj (MEA), valamint egy MRS és PDA keverék táptalaj (50:50%). Ezen kívül almaléből készült táptalajon és alma gyümölcsön is végeztem kísérleteket.

A mérési módszereim elkülöníthetők analitikai és mikrobiológiai vizsgálatokra. A mikrobiológiai mérések során a különböző táptalajok hatását néztem a toxintermelésre és a növekedésre, a tejsavbaktériumok antagonista hatását vizsgáltam a spóra számra és a gátló hatású tejsavbaktériumok hozzáadásának időpontját vizsgáltam. Az analitikai mérések során a penészek patulin termelés kinetikáját követtem nyomon és a tejsavbaktériumok antagonista hatását a toxintermelésre.

A dolgozatom eredményei alapján elsődlegesen arra a megállapításra jutottam, hogy a táptalaj összetételnek meghatározó szerepe van a vizsgált penészgombák patulin termelésére, a penésztelepek növekedésére és a spórázásra is. A toxin termelés időbeli lefolyását vizsgálva a kinetika megmutatta melyik penész törzs mikor kezd el patulint termelni és mikor éri el annak maximumát.

A három *Lactobacillus* törzs és két *Aspergillus* törzs kombinációja nem mutat egy egyetemesen levonható következtetést a tejsavbaktériumok hozzáadásának idejét vizsgálva. Merthogy egyik kezelés sem eredményezett jelentős patulin-csökkenést a kontrollhoz képest, az együtt leoltást választottam, mivel ez a gyakorlati alkalmazás szempontjából is relevánsabb megoldás lehet.

A spóraszám változásának tekintetében arra a következtetésre jutottam, hogy mind a három tejsavbaktérium törzs jelenléte gátló hatással van a sporulációra.

A patulin termelés gátlásának vizsgálati eredményeiből megállapítottam, hogy a kontroll mintához képest mind a 3 tejsavbaktériummal kezelt minta alacsonyabb toxin koncentrációt tartalmazott. A tejsavbaktériumok antagonista hatásának erőssége azonban nem különbözik egymástól a statisztikai elemzés szerint.

A spóratermelés és a toxintermelés közötti összefüggést vizsgálva, arra jutottam, hogy csak két tejsavbaktérium esetében (AT3; AT26) van szoros korreláció a sporuláció és a patulin képzés közt.

Az almalé agaron végzett kísérletben nem volt kimutatható a tejsavbaktériumok antagonista hatása, feltételezhető, hogy ez a táptalajösszetétel nem volt kedvező a tejsavbaktériumok számára, ezért nem tudtak megfelelően növekedni és gátló hatást kifejteni.

Az alma gyümölcs esetében a penészek a vártnál sokkal lassabban fejlődtek és kevesebb toxint is termeltek. A tejsavbaktérium hozzáadásával készült minták patulin mennyisége jóval meghaladja a kontroll mintáét. Ebből arra következtettek, hogy az almán hozzáadott tejsavbaktérium nagyobb stresszt jelentett a penészek számára, mint laboratóriumi körülmények között. Ennek a stressz faktornak a hatására a másodlagos anyagcsereterméként képződő patulin mennyisége jóval magasabb lett.

A laboratóriumi táptalajon, almalé agaron és almaszeleteken végzett kísérletek eredményeiből az a következtetés vonható le, hogy a tápközeg természete, összetétele hatással van mind a toxintermelő penész szaporodására, patulin termelésére, mind befolyásolja a tejsavbaktériumok antifungális, toxintermelés-gátló hatását. Ezen hatások kombinációja változatos eredményt hozott.

Javaslatok a jövőre nézve:

Egy központi elrendezésű kísérletterv elkészítése, amiben különböző arányú spóra és tejsavbaktérium koncentráció beállításokat vizsgálunk.

Releváns lehet az a kísérlet miszerint az alma gyümölcsön hosszabb időre vesszük az inkubációs időt.

Célszerű lehet a magasabb mintaszámmal való munka, ami kiküszöbölné a biológiai minták nagy változatosságából adódó problémákat.

Irodalom jegyzék:

- Abramson, D., G. Lombaert, R. M. Clear, P. Sholberg, R. Trelka, és E. Rosin. 2009. „Production of Patulin and Citrinin by *Penicillium Expansum* from British Columbia (Canada) Apples”. *Mycotoxin Research* 25 (2): 85–88. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0012-4>.
- Bangar, Sneha Punia, Nitya Sharma, Manoj Kumar, Fatih Ozogul, Sukhvinder Singh Purewal, és Monica Trif. 2021. „Recent developments in applications of lactic acid bacteria against mycotoxin production and fungal contamination”. *Food Bioscience* 44 (december):101444. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101444>.
- Brodhagen, Marion, és Nancy P. Keller. 2006. „Signalling Pathways Connecting Mycotoxin Production and Sporulation”. *Molecular Plant Pathology* 7 (4): 285–301. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00338.x>.
- Calvo, Ana M., Richard A. Wilson, Jin Woo Bok, és Nancy P. Keller. 2002. „Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3): 447. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002>.
- Cao, Jing, Hongyin Zhang, Qiya Yang, és Rong Ren. 2013. „Efficacy of *Pichia Caribbica* in Controlling Blue Mold Rot and Patulin Degradation in Apples”. *International Journal of Food Microbiology* 162 (2): 167–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.007>.
- Cho, Mi Sook, Kyeongyeol Kim, Eunyoung Seo, Neema Kassim, Adelard Barthalomew Mtenga, Won-Bo Shim, Soo-Hyung Lee, és Duck-Hwa Chung. 2010. „Occurrence of Patulin in Various Fruit Juices from South Korea: An Exposure Assessment”. *Food Science and Biotechnology* 19 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0001-6>.
- Coelho, Márcia C., Francisco Xavier Malcata, és Célia C. G. Silva. 2022. „Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions”. *Foods* 11 (15): 2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>.
- Cunha, S. C., M. A. Faria, V. L. Pereira, T. M. Oliveira, A. C. Lima, és E. Pinto. 2014. „Patulin assessment and fungi identification in organic and conventional fruits and derived products”. *Food Control* 44 (október):185–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.043>.
- Demirci, M., Muhammet Arici, és Tuncay Gumus. 2003. „Presence of patulin in fruit and fruit juices produced in Turkey”. *ERNAHRUNGS-UMSCHAU* 50 (7). <https://avesis.yildiz.edu.tr/yayin/d48cda6d-ab28-458c-b6b1-fa8866754837/presence-of-patulin-in-fruit-and-fruit-juices-produced-in-turkey>.
- Eszter Tóth, Sándor Kocsubé, István Barcs, Sarolta Németh, és Erzsébet Burgettiné Böszörményi. é. n. „Aflatoxin termelő *Aspergillus* fajok érzékenysége különböző illóolaj kezelésekre in vitro The sensitivity of aflatoxin-producing *Aspergillus* species of various essential oil treatments in vitro”.
- Funes, G. J., és S. L. Resnik. 2009. „Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina”. *Food Control* 20 (3): 277–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.05.010>.

Giraffa, Giorgio, Nina Chanishvili, és Yantyati Widyastuti. 2010. „Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology”. *Research in Microbiology*, Microbial research commons: From strain isolation to practical use, 161 (6): 480–87. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.001>.

Hassan, Mahreen Ul, Hina Nayab, Farheen Shafique, Mike P. Williamson, Taghreed Saud Almansouri, Noreen Asim, Nuzhat Shafi, és mtsai. 2020. „Probiotic Properties of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* Isolated from Traditional Pakistani Yoghurt”. *BioMed Research International* 2020 (december):8889198. <https://doi.org/10.1155/2020/8889198>.

Herry, Marie P, és Nicole Lemétayer. 1996. „Liquid Chromatographic Determination of Patulin in French Apple Ciders”. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 79 (5): 1107–10. <https://doi.org/10.1093/jaoac/79.5.1107>.

Hussain, Shabbir, Muhammad Rafique Asi, Mazhar Iqbal, Muhammad Akhtar, Muhammad Imran, és Agustín Ariño. 2020. „Surveillance of Patulin in Apple, Grapes, Juices and Value-Added Products for Sale in Pakistan”. *Foods* 9 (12): 1744. <https://doi.org/10.3390/foods9121744>.

Iqbal, Shahzad Zafar, Shabana Malik, Muhammad Rafique Asi, Jinap Selamat, és Noeen Malik. 2018. „Natural occurrence of patulin in different fruits, juices and smoothies and evaluation of dietary intake in Punjab, Pakistan”. *Food Control* 84 (február):370–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.024>.

Jackson, Lauren S., és Fadwa Al-Taher. 2008. „Factors Affecting Mycotoxin Production in Fruits”. In *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, 75–104. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374126-4.00004-8>.

Janik, Edyta, Marcin Niemcewicz, Michal Ceremuga, Maksymilian Stela, Joanna Saluk-Bijak, Adrian Siadkowski, és Michal Bijak. 2020. „Molecular Aspects of Mycotoxins—A Serious Problem for Human Health”. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): 8187. <https://doi.org/10.3390/ijms21218187>.

Kiss Tamás. 2019. „Magyar Kémikusok Lapja”. *Magyar Kémikusok Lapja. ISSN 0025-0163 (print)*, 15881199 (online). 74. évf. 1. sz. (2019). <https://doi.org/10.24364/MKL.2019.01>.

Klaenhammer, T. 1993. „Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria”. *FEMS Microbiology Reviews* 12 (1–3): 39–85. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90057-G](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90057-G).

Kovács Melinda. 2018. „Mikotoxinok hatása az életminőségünkre”. *Acta Agraria Kaposváriensis* 22 (2): 33–45. <https://doi.org/10.31914/aak.2273>.

Krisztina Székér. é. n. „TEJSAVBAKTÉRIUMOK ÉS ÉLELMISZER-EREDETŐ ROMLÁS- ÉS KÓROKOZÓ BAKTÉRIUMOK VERSENGI KÖLCSÖNHATÁSÁNAK VIZSGÁLATA”.

Majerus, P., J. Hain, és C. Kölb. 2008. „Patulin in Grape Must and New, Still Fermenting Wine (Federweißer)”. *Mycotoxin Research* 24 (3): 135–39. <https://doi.org/10.1007/BF03032340>.

Mannaa, Mohamed, és Ki Deok Kim. 2017. „Influence of Temperature and Water Activity on Deleterious Fungi and Mycotoxin Production during Grain Storage”. *Mycobiology* 45 (4): 240–54. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.240>.

- Marín, Sonia, Eva M. Mateo, Vicente Sanchis, Francisco M. Valle-Algarra, Antonio J. Ramos, és Misericordia Jiménez. 2011. „Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market”. *Food Chemistry* 124 (2): 563–68. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.072>.
- Moake, Matthew M., Olga I. Padilla-Zakour, és Randy W. Worobo. 2005. „Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods”. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 4 (1): 8–21. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2005.tb00068.x>.
- Nishida, Satoshi, Masaki Ishii, Yayoi Nishiyama, Shigeru Abe, Yasuo Ono, és Kazuhisa Sekimizu. 2017. „Lactobacillus paraplantarum 11-1 Isolated from Rice Bran Pickles Activated Innate Immunity and Improved Survival in a Silkworm Bacterial Infection Model”. *Frontiers in Microbiology* 8 (március). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00436>.
- Notardonato, Ivan, Silvia Gianfagna, Raffaello Castoria, Giuseppe Ianiri, Filippo De Curtis, Mario Vincenzo Russo, és Pasquale Avino. 2021. „Critical Review of the Analytical Methods for Determining the Mycotoxin Patulin in Food Matrices”. *Reviews in Analytical Chemistry* 40 (1): 144–60. <https://doi.org/10.1515/revac-2021-0131>.
- Oteiza, Juan M., Amin M. Khaneghah, Fernanda B. Campagnollo, Daniel Granato, Mohammad R. Mahmoudi, Anderson S. Sant’Ana, és Leda Gianuzzi. 2017. „Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina”. *LWT* 80 (július):200–207. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.025>.
- Pohland, A E, K Sanders, és C W Thorpe. 1970. „Determination of Patulin in Apple Juice”. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 53 (4): 692–95. <https://doi.org/10.1093/jaoac/53.4.692>.
- Prieta, Javier, Miguel A. Moreno, Javier Bayo, Susana Díaz, Guillermo Suárez, Lucas Domínguez, Ramón Canela, és Vicente Sanchis. 1993. „Determination of Patulin by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Extraction by Diphasic Dialysis”. *The Analyst* 118 (2): 171–73. <https://doi.org/10.1039/AN9931800171>.
- Puel, Olivier, Pierre Galtier, és Isabelle P. Oswald. 2010. „Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin”. *Toxins* 2 (4): 613–31. <https://doi.org/10.3390/toxins2040613>.
- Rhee, Sook Jong, Jang-Eun Lee, és Cherl-Ho Lee. 2011. „Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods”. *Microbial Cell Factories* 10 (Suppl 1): S5. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S5>.
- Rovira, Ramon., Francesc. Ribera, Vicente. Sanchis, és Ramon. Canela. 1993. „Improvements in the Quantitation of Patulin in Apple Juice by High-Performance Liquid Chromatography”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (2): 214–16. <https://doi.org/10.1021/jf00026a013>.
- Saleh, Iman, és Ipek Goktepe. 2019. „The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin”. *Food and Chemical Toxicology* 129 (július):301–11. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.036>.

- Sarubbi, Fiorella, Giorgio Formisano, Giuseppe Auriemma, Assunta Arrichiello, és Raffaele Palomba. 2016. „Patulin in homogenized fruit's and tomato products”. *Food Control* 59 (január):420–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.022>.
- Sekiguchi, J, és G M Gaucher. 1977. „Conidiogenesis and Secondary Metabolism in *Penicillium Urticae*”. *Applied and Environmental Microbiology* 33 (1): 147–58. <https://doi.org/10.1128/aem.33.1.147-158.1977>.
- Settier-Ramírez, Laura, Gracia López-Carballo, Pilar Hernández-Muñoz, Angélique Fontana, Caroline Strub, és Sabine Schorr-Galindo. 2021. „New Isolated *Metschnikowia pulcherrima* Strains from Apples for Postharvest Biocontrol of *Penicillium expansum* and Patulin Accumulation”. *Toxins* 13 (6): 397. <https://doi.org/10.3390/toxins13060397>.
- Shephard, Gordon S, és Norma L Leggott. 2000. „Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices”. *Journal of Chromatography A* 882 (1): 17–22. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01341-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01341-2).
- Sheu, Fuu, és Yuan T. Shyu. 1999. „Analysis of Patulin in Apple Juice by Diphasic Dialysis Extraction with in Situ Acylation and Mass Spectrometric Determination”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (7): 2711–14. <https://doi.org/10.1021/jf9812329>.
- Slover, Christine M., és Larry Danziger. 2008. „*Lactobacillus*: a Review”. *Clinical Microbiology Newsletter* 30 (4): 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006>.
- Sylos, Celia Maria de. 1999. „Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil”. *Food Additives & Contaminants* 16 (2): 71–74. <https://doi.org/10.1080/026520399284226>.
- Tangni, E. K., R. Theys, E. Mignolet, M. Maudoux, J. Y. Michelet, és Y. Larondelle. 2003. „Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment”. *Food Additives & Contaminants* 20 (5): 482–89. <https://doi.org/10.1080/0265203031000093204>.
- Trucksess, Mary W, és Yifeng Tang. é. n. „Solid-Phase Extraction Method for Patulin in Apple Juice and Unfiltered Apple Juice”.
- Wright, Sandra AI. 2015. „Patulin in Food”. *Current Opinion in Food Science, Food Engineering and Processing • Food Mycology*, 5 (október):105–9. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.10.003>.
- Yuan, Y., X. Wang, S. Hatab, Z. Wang, Y. Wang, Y. Luo, és T. Yue. 2014. „Patulin Reduction in Apple Juice by Inactivated *Alicyclobacillus* Spp.” *Letters in Applied Microbiology* 59 (6): 604–9. <https://doi.org/10.1111/lam.12315>.
- A BIZOTTSÁG (EU) 2023/915 RENDELETE (2023. április 25.) az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeiről és az 1881/2006/EK rendelet hatályon kívül helyezéséről. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915>

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom

Horváthné Dr Szanics Enikő és Dr. Zalán Zsolt

konzulensi tevékenységeikért, hasznos szakmai javaslataikért és iránymutatásaikért,

valamint,

az

Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék dolgozóinak

a mérések kivitelezésében nyújtott segítségükért

és a

Biomérnök és Erjedésipari Technológiai Tanszék dolgozóinak

a mérések kivitelezésében nyújtott segítségükért