



Sterigmatocisztin tisztítása új, költséghatékony elválasztástechnikai módszerrel

OTDK dolgozat

Szerző: Sebők Noémi Regina

I. Évfolyam, Biológus MSc

Témavezető: Dr. Szekeres András

Egyetemi docens, SZTE TTIK Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

Lezárva: 2025. január 8.

Tartalmi összefoglaló

Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fonalas gombák széleskörben ismertek kozmopolita elterjedésük és az általuk termelt másodlagos metabolitok miatt. A nemzetség tagjai közé tartozó szekunder metabolitok közé tartoznak olyan vegyületek is, amelyet több iparág (élelmiszeripar, biotechnológia) felhasznál és olyanok is, amelyeknek egészségkárosító hatása van. A kutatásaink során vizsgált sterigmatocisztin (STC) egy poliketid mikotoxin, melyet az *A. creber* fajok képviselői szintetizálnak. A munkánk során egy olyan tisztítási módszeregyüttes kidolgozását végeztük el, amely a folyadék-folyadék kromatográfián alapszik. A módszerfejlesztési vizsgálatok megkezdéséhez szükség volt nagy mennyiségben STC-t tartalmazó *A. creber* fermentációs termékére. A mikotoxin és a szennyezők nyomon követéséhez HPLC-UV módszert fejlesztettünk, melyet eredményesen alkalmaztunk az extrakciók optimalizálásához, az oldószerrendszerek tesztelésére, valamint a folyadék-folyadék kromatográfiás frakcionálás nyomon követéséhez. A kidolgozott, többlépéses tisztítási eljárás két oldószeres extrakcióval kezdődik, amelyeket egy folyadék-folyadék kromatográfiás elválasztás követ. A kiindulási nyers extraktumban a vegyület területszázalékos aránya HPLC-UV mérések alapján kevesebb, mint 1% volt, míg a végső tisztított frakcióban 60% feletti tisztaságot értünk el. A vegyület igazolását, a szennyezők vizsgálatát és a főkomponens tisztaságának ellenőrzését a tisztítási folyamat után HPLC-ESI-HRMS mérésekkel is elvégeztük. A módszer előnye, hogy a célvegyület elválasztása gyorsabb és a folyadék állófázis használatának köszönhetően költséghatékonyabb, mint a hagyományos szilárd fázisú megközelítések.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. A termelő mikroorganizmus bemutatása	5
2.2. Mikotoxinok és a sterigmatocisztin	8
2.3. Az STC elválasztástechnikai jellemzői.....	9
2.4. A folyadék-folyadék kromatográfia.....	10
3. Célkitűzés	12
4. Anyagok és módszerek.....	13
4.1. Vegyszerek és oldószer.....	13
4.2. Tenyésztés.....	13
4.3. Extrakció.....	14
4.4. Oldószerrendszerek tesztelése.....	14
4.5. HPLC-UV mérések.....	15
4.6. Alkalmazott számítások	15
4.7. CPC mérések.....	16
4.8. HPLC-ESI-HRMS mérések	17
5. Eredmények és értékelésük	19
5.1. HPLC módszer optimalizálása.....	19
5.2. Az extrakciós lépések optimalizálása	20
5.3. Oldószerrendszerek.....	22
5.3.1. Arizona rendszer.....	22
5.3.2. A „legjobb oldószer” megközelítés	22
5.4. CPC-s elválasztás.....	25
5.5. HPLC-ESI-HRMS vizsgálatok	28
6. Összegzés	31
7. Irodalomjegyzék.....	33
8. Köszönetnyilvánítás	36
9. Mellékletek.....	37

1. Rövidítések jegyzéke

AFB1 – Aflatoxin B1

CPC – Centrifugális megoszlási kromatográfia (Centrifugal Partition Chromatography)

EFSA – Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (European Food Safety Authority)

ELISA – Enzyme Linked Immuno-Absorbent Assay

GC – Gáz kromatográfia (Gas Chromatography)

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points

HPLC – Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)

LLC – Folyadék-folyadék kromatográfia (Liquid-liquid Chromatography)

P – megoszlási hányados (partition coefficient)

PDA – Potato Dextrose Agar

R_s – felbontás (resolution)

STC – Sterigmatocisztin

Tol – toluol

t_R – retenció idő

UV – ultraibolya

α – szelektivitási tényező

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A termelő mikroorganizmus bemutatása

A gombák biológiai és gazdasági szempontból egyaránt nélkülözhetetlen szerepet töltenek be. A jelentőségük az általuk termelt extracelluláris enzimeknek köszönhető. Ökológiai szempontból kiemelkedően fontosak a szerves anyagok lebontásában. A gombák lebontása nélkül hihetetlen mennyiségben felhalmozódna a szerves hulladék mennyisége a Földön, ami komoly környezeti problémákhoz vezetne. Az ökológiai jelentőség mellett az ember is hasznosítja ezeket az enzimeket, amelyek több iparág alapját is jelenti ¹⁻³. Ilyen fonalas gombák az *Aspergillus* fajok is, melyek által termelt enzimek az ipar számára különösen értékesek. Az ipari jelentőségű fajok mellett azonban vannak olyan gombafajok a nemzetségben, amelyek komoly egészségügyi kockázatot jelentenek. Az általuk okozott megbetegedések közé tartoznak a szisztémás mikózisok, amelyek ritkábban fordulnak elő a szintén gombák okozta dermatomikózisoknál (bőrfertőzések), de annál súlyosabb, akár halálos kimenetelűek is lehetnek. E betegségeket többek között a nemzetségbe tartozó *A. fumigatus* és az *A. niger* fajok okozzák ⁴.

Az *Aspergillus* nemzetség rendszertanilag az Eukarióta (*Eukaryota*) doménbe, a Gombák (*Fungi*) országába, a *Dikarya* alországba, a *Tömlősgombák* (*Ascomycota*) törzsébe, a *Pezizomycotina* altörzsbe, az *Eurotiomycetes* osztályba, az *Eurotiomycetidae* alosztályba, az *Eurotiales* rendbe azon belül pedig az *Aspergillaceae* családba tartozik ⁵. A nemzetségről az első leírásokat Pier Antonio Micheli, olasz szerzetes és biológus tette közzé 1729-ben ⁶. Az *Aspergillus* nevet olyan penészgombák megnevezéséhez használta, amelyeknek a spóraláncai sugár irányba erednek egy központi struktúráról, ami egy kocsány csúcsán képződik ⁷.

Az *Aspergillus* kolóniák jellemzően gyors növekedésűek. Változatos színekben és árnyalatokban jelennek meg, a fehértől, a sárgán, a sárgás-barnán és a barnás-feketén át a zöldes árnyalatokig. A gombatelepeken a konídiofórok többnyire egy tömör réteget alkotnak.

Az *Aspergillus* nemzetség hat alnemzetséget (*Circumdati*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Aspergillus*, *Cremeri*, *Polypaecilum*) és összesen 27 fajcsoportot (section) tartalmaz. Az általunk a termeltetésre alkalmazott *A. creber* a *Nidulantes* szekcióba, azon belül a *Versicolores* sorozatba tartozik. Az *A. creber* lineage-be az *A. creber* fajon kívül még öt másik faj is tartozik (*A. cvjetkovicii*, *A. jensenii*, *A. puulaauensis*, *A. tennesseensis*, *A. venenatus*) ⁸. A „creber”, egy latin eredetű szó, melynek jelentése számos, gyakori. Az első fajleírását Jurjevic és munkatársai publikálták 2012-ben ⁹. Makrofológiai szempontból változatos kinézettel rendelkezik attól függően, hogy milyen táptalajon tenyésztjük (kukorica, YEB (Yeast Extract Broth), CZ20

(Czapek with 20 % Sucrose Broth)^{10,11}), és milyen hőmérsékleten (25-37°C^{10,12}) és mennyi ideig (1-3 hét^{10,11}) tartott az inkubáció. Mikromorfológiailag megfigyelhető, hogy az aszkokarp hiányzik. A Hülle-sejtek egyes törzseknél megtalálhatók, külsőleg átlátszó, nyújtott gömb alakú. A konídofór feji részén a biseriat konídofórok sugár irányba, sűrűn helyezkednek el. A nyél sima felszínű, átlátszó vagy halvány barna színű, a vezikulumok pedig szintén átlátszóak és a körte alaktól, a nyújtott gömbig változik az alakja. A metulák szintén átlátszóak és a henger-alaktól, a hordó formáig változik az alakja és beborítják a vezikulum háromnegyedét. A fialidok ugyanúgy átlátszóak és mellette palack alakúak, míg a konídiumok alakja gömbölyűtől nyújtott gömbig változik, szemölcsös felszínnel rendelkezik és szintén áttetsző⁸.

A mikotoxinok a fonalas gombák mérgező hatású másodlagos metabolitjai. A mikotoxinnal szennyezett táplálék fogyasztása által okozott betegségeket mikotoxikózisnak nevezik. Az eltérő mikotoxinok többféle hatással vannak az élő szervezetre, mint például emésztőszervrendszeri-problémák (pl. austdiol), májfibrosis (pl. sterigmatocisztin), hepatotoxicitás (pl. rubratoxin), vesetoxicitás (pl. ochratoxin) vagy akár rákkeltők is lehetnek (pl. aflatoxin). Egy 10 éven át tartó kutatásból az derült ki, hogy a 100 országból gyűjtött, közel 75 ezer kukoricából és állati takarmányból vett mintának 88%-a valamilyen mikotoxint tartalmazott és a mikotoxint tartalmazó mintáknak több, mint a felében (64%) kettő vagy annál több mikotoxin is kimutatható volt¹³.

Az Egyesült Nemzetek Szervezetének Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezet (Food and Agriculture Organization of the United Nation, FAO) mérései alapján a világ élelmezési célú terményének mintegy 25%-a szennyeződik mikotoxinnal a szántóföldön és a tárolás közben¹⁴. A fertőzött termények a feldolgozás során is hordozói a mikotoxinoknak, emiatt nem csak az alapvető élelmiszerek okoznak kockázatot, hanem azok feldolgozott formái is^{15,16}.

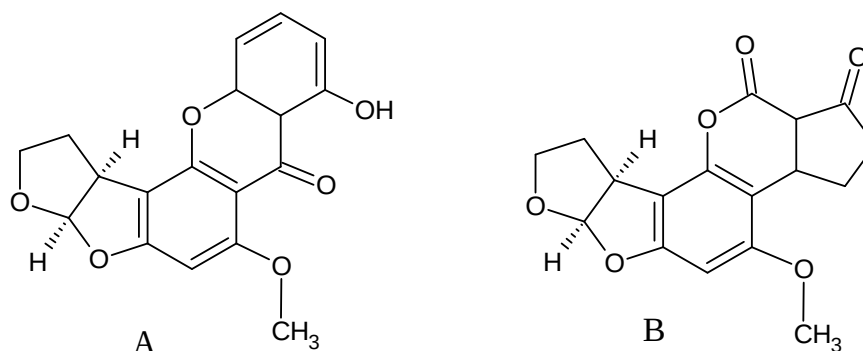
Az *Aspergillus* fajok által okozott megbetegedések jelentős részét a mikotoxinok okozzák. Ezek a kórállapotok a mikotoxinok következménye, amelyeket a gomba a késői stacioner fázisában termel. A stacioner fázis idejére a gomba már túl van a kezdeti növekedési szakaszon, melynek következtében megindult az olyan másodlagos metabolitok termelése, mint a mikotoxinok. A szekunder metabolitok termelése mellett a spórák képződése is utal a fejlődési szakasz elindulására¹⁷. Az *Aspergillus* nemzetség enzimtermelése és azok széleskörű felhasználása mellett nagy fokú diverzitást mutatnak a mikotoxinok termelésében is (**1. táblázat**).

1. táblázat *Aspergillus* fajok és a mikotoxinjaik

Fajnév	Toxin	Forrás
<i>A. creber</i>	STC	11
<i>A. flavus</i>	Aflatoxin B ₁ , B ₂ , ciklopiazonsav, aflatrem	18
<i>A. nidulans</i>	STC	19
<i>A. niger</i>	Ochratoxin A, fumonizin B ₂	20
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	18
<i>A. ochraceus</i>	Ochratoxin A, penicilsav	18
<i>A. versicolor</i>	STC, ciklopiazonsav	18

Az STC egy olyan másodlagos anyagcseretermék, amit több, mint 50 tömlősgombafaj képes termelni. Az elmúlt 50 évben számos tanulmány beszámolt arról, hogy filogenetikailag és fenotípusosan is eltérő nemzetségekben azonosítottak az előfordulását. Ezen nemzetségek közé tartozik az *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Botryotrichum*, *Chaetomium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Farrowia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Moelleriella*, *Monocillium* és *Podospora* (Chung és Wu, 2020; Rank és mtsai., 2011). A szakirodalomban fő termelőnek az *A. versicolor* faj képviselőit tartják ²². A különféle törzsek izolálási helyei jól alátámasztják a kozmopolita elterjedést. ²².

Az STC egy poliketid mikotoxin (C₁₈H₁₂O₆; **1. ábra**), emellett pedig az egyetlen ismert dihidrofurán xanton származék ^{23,24}. Szilárd halmazállapotban fakó sárga színű, túszerű kristályokat ad ²⁵. Az STC oldódik dimetil-szulfoxidban, kloroformban, piridinben, acetonitrilben, benzolban, metanolban, etil-acetátban és acetonban, valamint a legtöbb szerves oldószerben. Azonban oldhatatlan vízben, petrol-éterben és erős vizes bázisokban ^{25–27}. Ultraibolya (UV) fény alatt vörösesnarancs színben fluoreszkál. A vegyület 324,3 g/mol molekulatömeggel rendelkezik és 246 °C-on bomlik el. Az STC egy optikailag aktív vegyület, forró etanolos kálium-hidroxiddal való kezelés hatására átalakul egy optikailag inaktív molekulává, izosterigmatocisztinné ²⁸. A szerkezeti vizsgálatok közben derült fény az STC és az aflatoxinok kapcsolatára is (**1. ábra**) ²⁹.



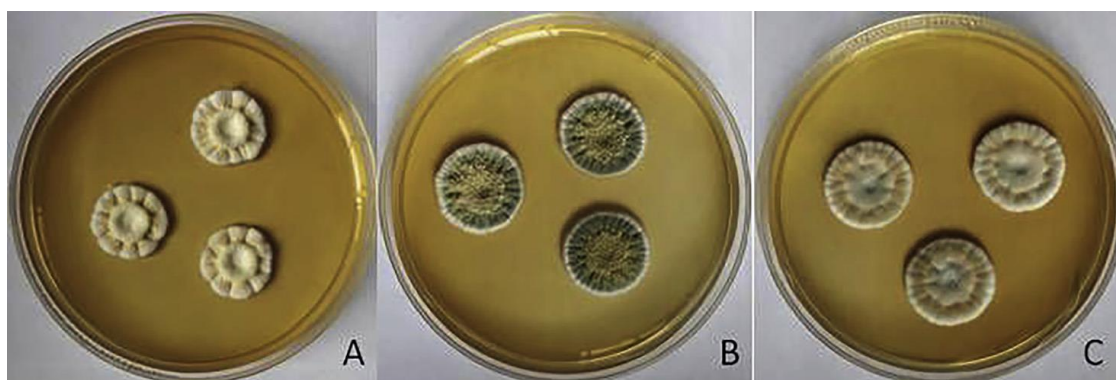
1. ábra A) Sterigmatocisztin; B) Aflatoxin B1

2.2. Mikotoxinok és a sterigmatocisztin

Az STC és az aflatoxin B1 szerkezete között hasonlóságot állapítottak meg, ami arra utalt, hogy az aflatoxin bioszintézisének közti terméke lehet a difuroxanton ³⁰. Az AFB1 és az STC bioszintézisét elsődlegesen az aflR gén szabályozza az *A. flavus*, *A. parasiticus* és *A. nidulans* fajokban. Az *A. nidulans* további 24 gén bevonásával szabályozza az STC termelést. Az *A. nidulans* aflR gén fehérjéje interakcióba lép több különböző AFB1 és STC klaszter gén promóter régiójával. Emellett, a laeA gén, amely gátolja az aflR gén expresszióját, univerzálisan szabályozza az AFB1, STC, penicillin és gliotoxin termelést a különféle gombafajokban ²⁷. E tanulmányok szerint, az STC, az AFB1 szintézis útvonalban egy késői közti termék, míg számos *Aspergillus* fajnál, pedig végső termékként van jelen ³¹⁻³³.

Az STC megjelenésében szerepet játszhat a közeg hőmérséklete, nitrogén- és szénforrása és a pH (5-5,5 tartomány ³⁴). A szintézist szabályzó mechanizmusok eltérnek az *A. nidulans* és *A. parasiticus* fajokban. Amíg a magasabb hőmérséklet és nitrátokban gazdagabb környezet elősegíti az STC termelést az *A. nidulans* fajokban, addig visszaszorítja az AF szintézist az *A. parasiticus* fajoknál. A közeg pH-ja szintén hatással van a bioszintézisre, savas közeg emelkedett STC és AF termelést indukál ³⁵.

Több gombatörzs esetében sikerült már meghatározni a termelt STC mennyiségét. Ilyen törzsek közé tartozik a fentebb jelenlévő *A. creber* Km26, *A. griseoaurantiacus* SZMC 22334 és *A. pepii* SZMC 22332 törzs is (2. ábra) ¹¹.



2. ábra Három Magyarországon izolált sterigmatocisztin (STC) termelő faj telepmorfológiája Maltóz kivonatos táptalajon (Merck). **A:** *A. creber* Km26; **B:** *A. griseoaurantiacus* SZMC 22334; **C:** *A. pepii* SZMC 22332 ¹¹

Az Európai Bizottság megbízására az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (European Food Safety Authority, EFSA) átfogó kutatást végzett 2013-ban az STC hatásaival kapcsolatban. Céljuk az volt, hogy felmérjék az STC egészségügyi kockázatát illetően. Vizsgálták az STC toxikokinetikáját, a toxicitását többféle kísérleti állatban és más ártalmas hatásait haszonállatokban, halakban és háziállatokban. A

hitelesített referencia anyagok hiányában és a limitált mennyiségű adatból humán és állati egészségre vonatkozóan nem sikerült pontos kockázatelemzést készíteni. Azonban, ha a pontos egészségügyi veszélyt nem is határozták meg, addig is sikerült különféle sejtekre és szervekre való hatását kimutatni ³⁶.

A difuroxanton szerkezet miatt az AFB1-hez hasonló genotoxikus és rákkeltő hatása van az STC-nek. Az akut toxicitási vizsgálatok alacsony orális toxicitást (120-160 mg / kg testtömeg) mutattak, de kiemelték a májat és vesét, mint célszerveket ³⁷. Hepatotoxikus hatást mutattak ki patkányokban, egerekben, majmokban és tengeri malacokban is. A dózis és a kitettség idejének növelésével nőtt a májsejtek nekrozisának és vérzésének kockázata. A vesékben hialin degradáció, tubuláris nekrozis és vérzés alakult ki STC-vel kezelt patkányokban és majmokban. Egyes kutatások szerint, immunmodulátor hatással is rendelkezik az STC, de ennek teljeskörű igazolása még várat magára ³⁶.

Az emlős sejtek mellett a bakteriális sejtekre is mutagén hatással van. Kromoszómális elváltozást és degradációt indukál mind in vitro sejttenyészetekben, mind in vivo körülmények között a kísérleti állatokban ^{38,39}.

Számos tüdő károsító hatás is megfigyelhető az STC-vel kitett kísérleti patkányoknál. Súlyos gyulladásos reakció és citotoxikus károsodást írtak le in vivo patkányok tüdőszövetében. A mérgezés következtében a légutak öntisztító mechanizmusa károsodott, amely légúti rendellenességet okozott ⁴⁰.

2.3. Az STC elválasztástechnikai jellemzői

Az STC széleskörben való elterjedésének okán a legkülönbözőbb környezetekben lehet detektálni. Legyen akár szó élelmiszeripari termékekből (kukorica, rizs, búza, árpa, kenyér, olajos magvak, szójabab, pisztácia, zöldségek, kakaóbab, sajt stb.), állati takarmányból ⁴¹ vagy akár építési területekről ⁴² vett mintákról.

A detektálás során a mintavételt követő lépés az STC kinyerése az adott mátrixból. A lépés célja, hogy a mátrixból, amely tartalmazza a termelő gombát és a tápközeget, kioldjuk és egy olyan szerves oldószerbe kerüljön, amelyben jól oldódik. Oldódás szempontjából jónak számító oldószerek a hexán, kloroform és aceton a gravimetriás mérések alapján **(2. táblázat)** ⁴³. A szakirodalom alapján, a legelterjedtebb extrakciós oldószer az acetonitril, melyet gyakran elegyítenek 4%-os kálium-klorid oldattal.

2. táblázat STC oldhatósága szerves oldószerekben 25 °C-on ⁴³

Oldószer	mg / 100 ml
Aceton	442,3
Acetonitril	176,0
Etanol	27,8
Etil-acetát	330,8
Hexán	327,0
Kloroform	7138,0
Metanol	34,5
Toluol	295,0

Az extrakciót követően érdemes az első extraktumot tovább tisztítani a szennyezők csökkentése érdekében. Az eltérő mátrixokból való kitisztításhoz többféle módszert is közölnek az irodalomban ^{25,37}.

A tisztított minták analitikai mennyiségi meghatározáshoz főként immunkémiai (ELISA), vagy kromatográfiás eljárást alkalmaznak. A 2000-es évek előtt jellemzően a vékonyréteg kromatográfiát alkalmazták a kimutatáshoz. Az idő előre haladtával és a technológia fejlődésével kezdtek elterjedni a HPLC eljárások ²⁵.

2.4. A folyadék-folyadék kromatográfia

A preparatív kromatográfiás elválasztások során a vegyületek minél nagyobb mennyiségben történő tisztítása a cél. Ennek egyik típusa a folyadék-folyadék kromatográfia, amely számos természetes eredetű anyag elválasztására és tisztítására ad lehetőséget ⁴⁴.

A folyadék-folyadék kromatográfiában (Liquid-Liquid Chromatography, LLC) mind a két fázis, a mozgó és álló fázis is folyadék. Ez az elválasztástechnika az extrakcióhoz hasonló, mivel kétfázisú folyadékrendszert alkalmaz és az elválasztás minősége a minta komponenseinek megoszlásának az eltérésén alapul a két fázis között. A folyadék-folyadék kromatográfiás tisztítás során jelentős szerepe van az alkalmazásához választott oldószereknek. Az elválasztás alapja a kétfázisú oldószerrendszer, amely lehet biner, terner, kvarterner vagy akár pentamer oldószerkeverék is. A módszerfejlesztés egyik fő célja, hogy egy olyan oldószerrendszert találjunk, amiben az adott komponensek stabilak és a lehető a legjobban oldódnak. A gyors és produktív elválás érdekében praktikus olyan rendszert választani, amiben a fázisok minél kisebb feltisztulási idővel (feltisztulási idő: a fázisok megfelelő szétválása, szemmel nem látható zavarosság és éles fázishatár jellemzi) rendelkeznek (< 30 mp) ⁴⁴.

A szakirodalom alapján a folyadék-folyadék kromatográfiát alkalmazták már különböző gombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek és mikotoxinok kitisztítására, ennek egy része kutatócsoportunk eredményeit mutatja be. Legkorábban egy 1988-as cikkben jelent meg a nivalenol és fusarenon-X tisztítása, egy *Fusarium graminearum* törzsből ⁴⁵. Később szintén *Fusarium* törzsek másodlagos anyagcseretermékeinek a tisztítását végezték (deoxinivalenol; fumonizin B1, B2, B3; trichotecének) különböző fermentumokból ^{46–51}. Egyes esetekben a fermentációt gabonákon végezték, ilyen például a rizs vagy kukorica, más esetekben burgonya kivonatot tartalmazó agart alkalmaztak. A tisztítások többségében 98% vagy afeletti eredménnyel zárultak. A visszanyerések a különböző módszereknél eltérnek, azonban nagyrészt 80% feletti. A *Fusarium* törzsek másodlagos metabolitjainak a tisztítása mellett alkalmazták ezt az eljárást a *Penicillium expansum* által termelt patulin tisztítására is ⁴⁶. A tisztítást almaborból és almaléből végezték el és több, mint 98%-os tisztaságot és 86%-os visszanyerést értek el. A technika alkalmas a napjainkban sokat kutatott aflatoxin tisztítására is. Az *Aspergillus parasiticus* törzsek tenyésztését folyadék tápoldatban végezték. A tisztításhoz a fermentlevet használták fel, melyből 95% feletti tisztasággal és legalább 80%-os visszanyeréssel lehetett a négy fő aflatoxin (Aflatoxin B1, B2, G1, G2) kitisztítani ⁵². A kutatócsoportunk egyik új eredménye az *Aspergillus albertensis* által termelt ochratoxin folyadék-folyadék kromatográfiás tisztítása ⁵³.

Fontos azonban kiemelni, hogy a tisztítások során alkalmazott oldószerkelet mindig az adott mikotoxin megoszlási hányadosára optimalizált, specifikus oldószerösszetétellel bír. A rendszerek kiválasztásánál figyelembe kell venni minden olyan tényezőt, amely a célmolekulák elválasztását meghatározza, valamint a célmolekulák kémiai tulajdonságai mellett a mátrix komponensek hatásaival is számolni kell.

3. Célkitűzés

A tudományos diákköri kutatásom során célul tűztem ki a sterigmatocisztin tisztítását fermentált rizsből, oldószeres extrakcióval és a folyadék-folyadék kromatográfia alkalmazásával. Ennek megvalósítása érdekében az alábbi célokat tűztem ki:

- HPLC módszer adaptálása STC vizsgálatához és a mátrix specifikus szennyezők azonosításához az extraktumokban
- STC extrakciójának optimalizálása rizsen nevelt *A. creber* fermentációs termékéből
- oldószerrendszerek keresése az STC CPC elválasztásához a megoszlási hányadosok és a szelektivitási tényezők meghatározásával
- CPC módszer fejlesztése a kiválasztott oldószerrendszer alkalmazásával

4. Anyagok és módszerek

4.1. Vegyszerek és oldószerek

Az extrakcióhoz és oldószerrendszer próbákhoz analitikai tisztaságú oldószereket, a HPLC-UV mérésekhez, a HPLC tisztaságú oldószereket, valamint az oldószerrendszer teszteléseknél alkalmazott 96%-os ecetsavat a Molar Chemicals Hungary Kft.-től (Magyarország) szereztük be. A HPLC-UV kalibrációhoz, valamint a tömegspektrometriás karakterizáláshoz az STC referencia vegyületet a Merk Kft. (Magyarország) biztosította számunkra (3. táblázat).

3. táblázat Oldószerek

Név	Tisztaság	Forgalmazó
acetón		
kloroform	Analitikai	Molar Chemicals Hungary Kft., Magyarország
etil-acetát		
etanol		
víz	HPLC	VWR International Kft., Magyarország
	MilliQ	
heptán		
hexán	Analitikai	Molar Chemicals Hungary Kft., Magyarország
acetonitril		
metanol	HPLC	VWR International Kft., Magyarország
	Analitikai	Molar Chemicals Hungary Kft., Magyarország
toluol	Analitikai	Molar Chemicals Hungary Kft., Magyarország

4.2. Tenyésztés

Az *Aspergillus creber* Km26 törzs rizsen történő tenyésztéséhez a megfelelő inokulum mennyiséget a törzs PDA (Potato Dextrose Agar, VWR International Kft., Magyarország) táptalajon történő 7 napos, 25 °C-on, sötétben történő inkubációjával állítottuk elő. A tenyészetből 10^7 konídiospóra/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk, majd homogenizáltuk. A tápközeg előállításához 10 kg rizshez 8 liter desztillált vizet adtunk, majd két egymást követő napon autoklávval sterilizáltuk. Az elkészült szuszpenzióból 200 ml-t adtunk a rizsfermentumhoz és 3 hétig, 25 °C-on inkubáltuk ¹¹.

4.3. Extrakció

Az autoklávval előkezelt 14 kg rizs fermentumot először egy 60 literes űrtartalmú polietilén hordóba mertük át, majd ezt követően 30 liter laboratóriumi felhasználású metanolt adtunk a rizs fermentumhoz. Elektromos kézi keverőgép (Black & Decker) használatával végeztük az extrakciót. A dekantálást és szűrőpapíron való átszűrést követően a szűrletet 2 l-es űrtartalmú gömblombikba töltöttük (első extraktum) és rotációs vákuumbepárló (IKA R10, VWR International Kft., Magyarország) segítségével bepároltuk az extrakcióhoz használt szerves oldószert. Az első extraktum ezután egy második, két lépéses extrakcióval további tisztításra került sor. A második extrakcióhoz az irodalomban elsősorban mintaelőkészítéshez ismert oldószereket és különböző összetételüket alkalmaztuk. Ezen mérések következtében pedig kísérletes úton is sor került más összetételek kipróbálására. Az extrakció tesztelésének eredményei a 5.2 fejezetben találhatóak, amelyből további munkánkat a metanol/kloroform/víz = 20/30/50 eleggyel végeztük. A fázisok szétválását követően a kloroformos fázist leválasztottuk és a megmaradt metanolos fázishoz az előző lépéssel azonos mennyiségű vízzel és kloroformmal megismételtük az extrakciót. Ezt követően ismét leválasztottuk a kloroformos fázist, majd az előzővel együtt összeöntve ezt alkalmaztuk a CPC futások kivitelezéséhez.

4.4. Oldószerrendszerek tesztelése

Az első extraktumból 1 ml-es mintákat vettünk és ND10-es fiolákba szedés után szárazra pároltuk centrifugális vákuumbepárlóval (IKA R10, VWR International Kft., Magyarország). A különböző összetételű oldószerrendszerek összeállítását félkémcsövekben végeztük, 5 ml végtérfogatban. Külön-külön 750 µl térfogatokat pipettáztunk az alsó és felső fázisból a bepárolt első extraktumot tartalmazó fiolákba. Ezt követően a mintákat 30 másodpercig vortex segítségével kevertettük, majd 10 percig ultrahangos kádban kezeltük, hogy a minta biztosan feloldódjon. Abban az esetben, ha a minta oldhatatlan részeket tartalmazott, a fázisokat külön-külön centrifugáltuk 5 percig maximális fordulatszámon (12 700 rpm). A centrifugálás után a felülúszókat tiszta ND10-es fiolákba mértük át a HPLC-s méréshez előkészítve. A vizsgált oldószerrendszerek felső fázisa többségében erősen illékony volt, ezért a pontosság érdekében ezekből a fázisokból 500 µl bepárlásra került enyhe nitrogén áram alatt 40 °C-on. A bepárlás után 500 µl HPLC tisztaságú metanolban oldottuk vissza a bepárolt felső fázisokat. Az alsó fázis esetében, csak 500 µl mintát mértünk át fiolába az eredeti összeállításból.

4.5. HPLC-UV mérések

A minták minőségi és mennyiségi elemzését egy Shimadzu Nexara XR (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japán) HPLC-UV rendszeren végeztük. A rendszerhez DGU-20A5R (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japán) gáztalanítót, LC-ADX (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japán) biner pumpát, SIL-20AXR (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japán) automata mintaadagolót, SPD-10AVP (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japán) detektort, CTO-10ASVP (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japán) oszloptermosztátot alkalmaztunk CBM-20Alite (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japán) rendszervezérlővel. Két különböző oszlopon történő elválasztást a **4. táblázat** mutatja be.

4. táblázat Az alkalmazott kromatográfiás elválasztások paraméterei

Oszlop	Phenomenex Kinetex C18	Phenomenex Prodigy C18
	150 x 4,6 mm; 2,6 μ m	250 x 4,6 mm; 5 μ m
Mozgó fázis	A: víz	A: víz
	B: metanol	B: metanol
Elúció (elválasztás)	Gradiens mód	Gradiens mód
	0 perc – 60% B	0 perc – 55% B
	11 perc – 95% B	9 perc – 80% B
	16 perc – 95% B	12 perc – 80% B
	17 perc – 60% B	15,5 perc – 95% B
	22 perc – 60% B	21 perc – 95% B
		21,5 perc – 55% B
		25 perc – 55% B
Futási idő	22 min	25 min
Áramlási sebesség	0,5 ml/min	1 ml/min
Oszloptermosztát hőmérséklete	40 °C	40 °C
Detektor	UV; λ =325 nm	UV; λ =325 nm
Injektálási térfogat	5 μ l	10 μ l

4.6. Alkalmazott számítások

A megoszlási hányados (P) értékeket és a szelektivitási tényező (α) értékeket a kromatográfiás mérések kiértékelése során számítottuk ki az egyes komponensekre vonatkozóan. A komponenseket a retenciós idő alapján definiáltuk a fázisokban. A megoszlási hányadoshoz a felső fázisokban ($c_{felső}$) mért terület értékét

osztottuk el az alsó fázisban ($c_{alsó}$) mért értékkel az adott komponensre nézve (**1. egyenlet**). A szelektivitási tényezőt minden esetben az STC-hez viszonyítva számoltuk ki. Először a megoszlási hányadosok alapján sorba rendeztük a komponenseket, a kisebb (P_2) értéktől a nagyobbig (P_1). Az STC megoszlási hányadosát a nálánál kisebb értékekkel osztottuk, a nagyobb értékeket pedig vele osztottuk el (**2. egyenlet**).

1. egyenlet

$$P = \frac{c_{felső}}{c_{alsó}}$$

2. egyenlet

$$\alpha = \frac{P_2}{P_1}$$

A minták tisztaságát ($A\%$) az egyes HPLC-UV kromatogramok alapján számítottuk ki. A számolás során az összes integrált csúcs területével (A_{total}) osztottuk el az adott integrált csúcs területét (A_i) és a százalékos eredmény érdekében a hányadost százzal megszoroztuk (**3. egyenlet**).

3. egyenlet

$$A\% = \frac{A_i}{A_{total}} \cdot 100$$

A tisztítási lépések során a visszanyerést (R) a bevitt anyagmennyiség ($\bar{c}_i$) és a kinyert anyagmennyiség (c_{ref}) százalékos viszonya adja meg (**4. egyenlet**).

4. egyenlet

$$R = \frac{\bar{c}_i}{c_{ref}} \cdot 100\%$$

Az eredményként kapott hozamot pedig mindig a koncentrációból számoltuk vissza a térfogatok ismeretében tömegmértékegységre.

4.7. CPC mérések

A preparatív elválasztást egy laboratóriumi léptékű CPC oszlop (Armen Instrument, Vannes, Franciaország) segítségével végeztük el, amelyhez egy 250 ml térfogatú rotort alkalmaztunk. A rotor maximális fordulatszáma 3000 rpm, a rendszer legfeljebb 100 bar nyomással használható. A CPC oszlophoz egy PLC 2250 Prep/Flash hybrid kromatográf (Gilson Inc., Saint-Ave, Franciaország) kapcsolódott, amely egy kvaterner gradiens pumpát, egy UV-VIS detektort és egy frakciószedőt tartalmazott. A készülékegyüttest a Gilson Glider Prep (Gilson In., Saint-Ave, Franciaország) szoftverrel vezéreltük.

A CPC-vel történő elválasztás előtt a megoszlási hányadosok alapján, becsült álló és mozgófázis térfogatokkal meghatároztuk az elúciós térfogatokat ascendens és descendes módban (**5. egyenlet**), ami segített kiválasztani a célszerűbb elválasztási irányt. Az áramlási sebesség és a fordulatszám beállításnál tekintettel kell lenni a nyomás 100 bar alatt tartására, illetve a rotorban a mozgófázis és állófázis arányára, melynek közelítőleg 20/80-nak kell lennie. Az oszlop állófázissal való feltöltését követően a mozgófázist a rendszerbe pumpáltuk. A kiáramló folyadékot egy mérőhengerben felfogva követtük a fázisok térfogatarányát. A hidrodinamikai egyensúly elérésekor, azaz mikor a nyomás állandósul és már csak mozgófázis távozik a rendszerből – megmérjük az állófázis térfogatát. Amennyiben ismerjük az álló- (V_s) és mozgófázis térfogatát (V_m) az **5. egyenlet** lehetővé tette a komponensek várható retenciós térfogatának (V_r) a kiszámítását, illetve adott áramlási sebesség mellett a retenciós időket (t_r) is.

5. egyenlet

$$V_r = V_m + P * V_s$$

4.8. HPLC-ESI-HRMS mérések

Az elválasztást Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) gyártmányú HPLC-vel végeztük, Phenomenex Gemini NX-C18 (150 x 2,1 mm; 3 μ m) oszlopon, 25 °C-on. Mozgó fázis "A" komponense víz + 0,1 % hangyasav, a „B” komponense pedig metanol/acetonitril 1:1 + 0,1 % hangyasav volt. Az elválasztás során gradiens elúciót alkalmaztunk az **Error! Reference source not found.** szerint. A mozgó fázis áramlási sebességét 0,2 ml/perc értékre állítottuk. A komponensek UV elnyelését 325 nm hullámhosszon követtük.

5. táblázat Az alkalmazott gradiens elúció paraméterei

Idő (min)	B koncentráció (%)
0	5
2	5
15	95
19	95
19,5	5
22	5

A tömegspektrometriás vizsgálatok a HPLC-hez kapcsolt QExactive plus (ThermoScientific) Hibrid Quadrupole Orbitrap ESI ionforrással felszerelt nagyfelbontású tömegspektrométerrel történtek a **6. táblázat**ban feltüntetett paraméterek alkalmazásával.

6. táblázat A vizsgálatokhoz alkalmazott MS paramétere

Paraméter neve	Paraméter értéke
Kapilláris feszültség	3500 V
Szárító gáz hőmérséklete	300 °C
Szárító gáz áramlási sebessége	10
Porlasztó gáz áramlási sebessége	30
Kapilláris hőmérséklete	320 °C
S-lencse RF-értéke	50

A tisztasági vizsgálatokat pozitív és negatív ionizációs módban is végrehajtottuk. A mintákat pásztázó adatfüggő msms (fullscan-ddms2) módban vizsgáltuk. A pásztázó adatgyűjtést 130-1950 m/z tömegtartományban végeztük 70 000 felbontást, 1×10^6 automatikus erősítésvezérlést és 100 ms izolációs ablakot alkalmazva. Az adatfüggő msms méréseknél 17 500 felbontást 35 tetszőleges egységű normalizált ütközési energiát és 0,4 m/z kvadrupól izolációs ablakot használtunk.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. HPLC módszer optimalizálása

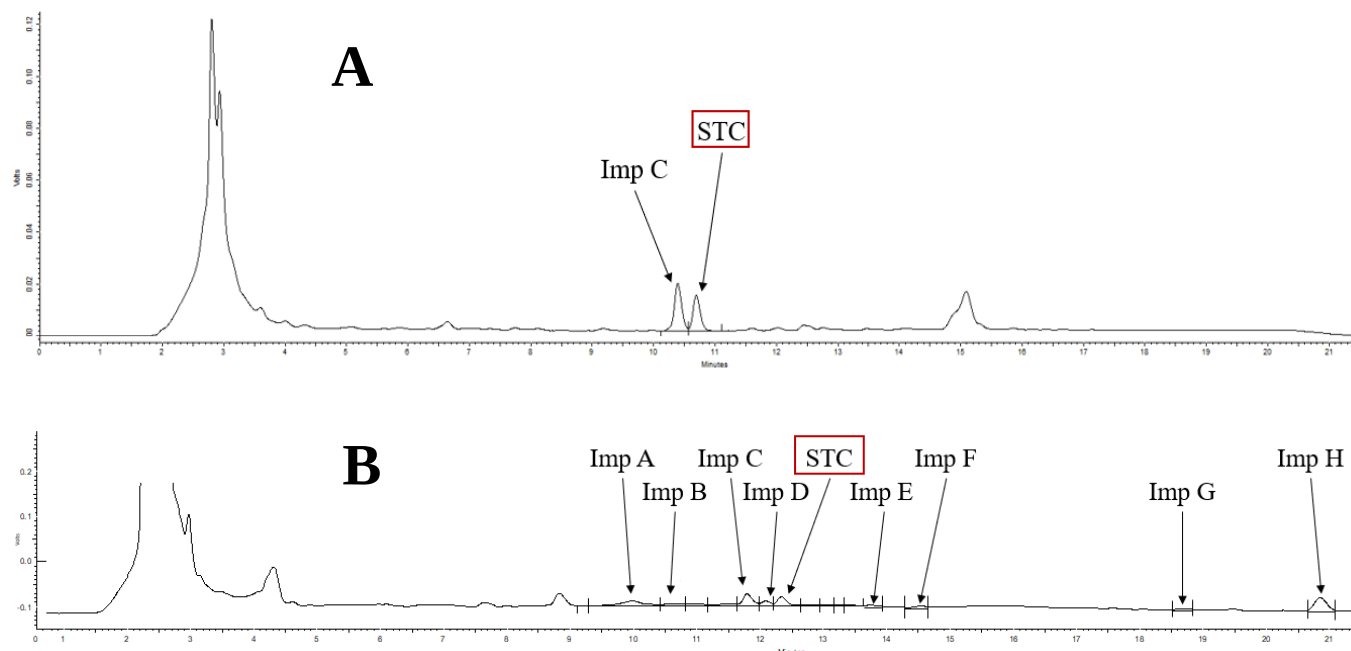
A HPLC módszer optimalizálásához az első metanolos extraktumot alkalmaztuk, hogy a mintában előforduló lehető legnagyobb számú komponens viselkedését tudjuk nyomon követni a mintaelőkészítés és a folyadék-folyadék kromatográfiás elválasztások során. Az egyes vizsgált komponensek megnevezését a **3. ábra** tartalmazza. A módszerfejlesztés közben célunk az volt, hogy minél rövidebb idő alatt, a legjobb elválasztást tudjuk elérni. A módszerfejlesztés két különböző paraméterekkel rendelkező HPLC oszlopon is elvégeztük. Az első oszlop egy Phenomenex Kinetex (C18, 150 x 4,6 mm, 2,6 μ m) oszlop, míg a második egy Phenomenex Prodigy (C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m).

Az első oszlopon alkalmazott, kutatócsoportunk korábbi STC kimutatásaihoz használt kiindulási módszer (A: víz, B: metanol, B%: 0 min, 54%; 9 min, 80%, 25 min; 80%, 26 min; 54 %; 37 min, 54%) már lehetővé tette az STC elválasztását az oszlopon, azonban ennek a módszernek viszonylag hosszú (38 perc) futási ideje volt. Annak érdekében, hogy az oldószer tesztelések a frakcionálás során előálló nagy számú mintát hatékonyan tudjuk analizálni a futási időt igyekeztünk csökkenteni. Ennek érdekében hoztuk létre a 2. módszert (A: víz, B: metanol, B%: 0 min, 60%; 8 min, 95%, 13 min; 95%, 14 min; 60 %; 20 min, 60%), ahol a futási időt 20 percre csökkentettük, a kiindulási B koncentrációt 54%-ról 60%-ra módosítottuk, majd azt tapasztaltuk, hogy az Impurity C (Imp C) ($t_R = 8,00$) és az STC ($t_R = 8,32$) nem váltak el jól egymástól az oszlopon. A két komponens közötti felbontás növelése érdekében a metanol gradiens kiindulási értékét csökkentettük 60%-ról 55%-ra (A: víz, B: metanol, B%: 0 min, 55%; 8 min, 95%, 13 min; 95%, 14 min; 55 %; 20 min, 55%). Ez a módosítás jobb elválasztást eredményezett, azonban az Imp C ($t_R = 10,13$) és az STC ($t_R = 10,40$) csúcsai továbbra is átfedtek. Ezt követően a gradiens felfutásának meredekségét csökkentettük, ahol a két csúcs közötti felbontás nőtt, a felfutás hosszát megnöveltük először 10, majd 12 percre, amely végül az Imp C ($t_R = 10,34$) és az STC ($t_R = 10,69$) elválását eredményezte.

A fejlesztett módszer ellenőrzésének érdekében ugyanazt az extraktumot egy szintén C18, de Phenomenex Prodigy típusú oszlopon is elválasztottuk (C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m), ahol az oszlop paramétereinek megválasztásában szerepet játszott az is, hogy a korábbi oszlop használata során közel jártunk a készülék alkalmazhatóságának nyomáshatárához. Az új oszlopon olyan jól sikerült elválasztani egymástól a korábbi két komponenst, hogy az Imp C és STC között megjelent egy újabb szennyező is (Imp D). Ezután a jobb elválás érdekében egy platóval törtük meg a gradiens felfutását, abban az időszámban, ahol az STC-t vártuk (A: víz, B: metanol, B%: 0 min, 55%; 9 min, 80%, 12 min; 80%, 15,5 min; 95 %; 21 min,

95%; 21,5 min, 55; 25 min, 55%). A további vizsgálatainkban ezt a módszert alkalmaztuk, a módszerben figyelembe vett komponensek adatait a **10. táblázat** tartalmazza.

A kísérletek kezdetén az STC azonosítását mindkét oszlopon standard referencia vegyület mérésével végeztük el. A két oszlopon a végső módszereket **3. ábra** szemlélteti.



3. ábra A Kinetex (A) és a Prodigy (B) oszlopon végső módszerekkel mért crude kromatogramja

5.2. Az extrakciós lépések optimalizálása

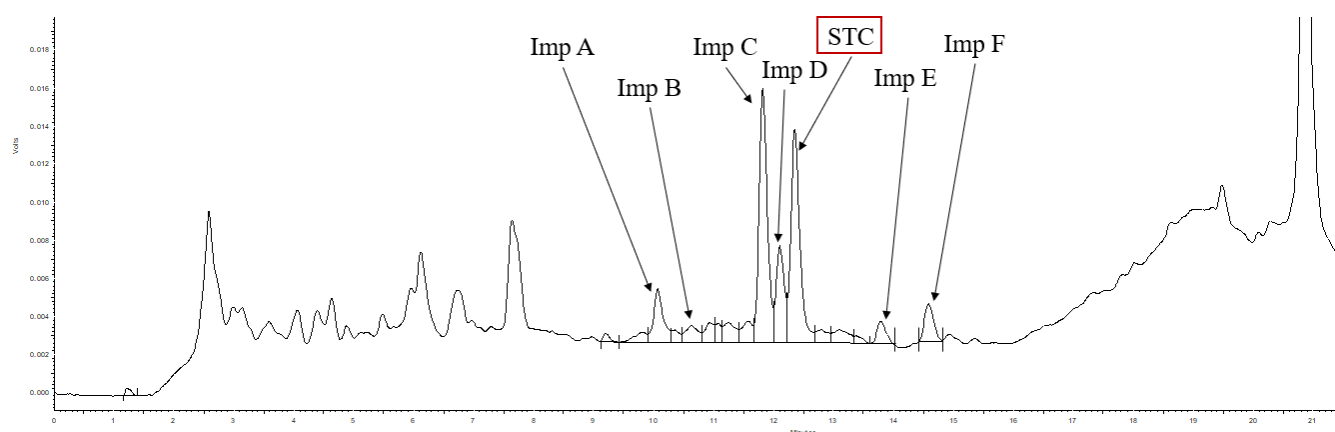
A csoportunk korábbi tapasztalatai alapján általában mindig érdemes a természetes forrásból származó mintákat előtisztítani a folyadék-folyadék kromatográfiás elválasztás előtt. Az STC nyers extraktuma esetében is jól látszott a kromatogramon a szennyező komponensek nagy száma és nagy mennyisége (csúcsterülete) az STC-hez viszonyítva (**3. ábra**). Először az irodalomban megtalálható, általában analitikai mérések mintaelőkészítéseihez alkalmazott oldószereket, oldószerösszetételeket alkalmaztunk a metanolos nyers kivonat partícionálásához, mint a hexánt²⁵, kloroformot²⁵ valamint ezek vizes és 4%-os kálium-klorid oldatos elegyeit²⁵. Az extraktumok HPLC mérési eredményei azt mutatták, hogy a kloroform/víz hozzáadása során létrehozott kétfázisú (kloroform/metanol/víz terner) rendszerrel kaptuk a legtisztább extraktumokat, ezért ezek eredményeit mutatjuk be (**7. táblázat**)

A kiválasztott terner rendszerben a víz mennyiségének a módosításával hangoltuk az extrakció hatékonyságát. A rendszer polaritását változtatva három összetételt teszteltünk, figyelve arra, hogy két fázist adjon a rendszer (**B. melléklet**). Ezzel a módszerrel sikerült megtalálni azt az összetételt

(kloroform/metanol/víz, 20/30/50) (**7. táblázat**), amelynek a használatával a kezdeti kevesebb, mint 1% tisztasággal rendelkező extraktumból egy több, mint 7% tisztasággal rendelkező extraktumot sikerült előállítani. A tisztaság növekedése mellett viszont azt tapasztaltuk, hogy csökkent a visszanyerés és ezáltal a hozam is. Azonban ennek a rendszernek a kétszer egymást követő alkalmazásával nem csak a tisztaságon tudtunk javítani, hanem a visszanyerésen is. Az extraktumok kromatogramját összehasonlítva (**3. ábra, 4. ábra**) jól látszik, hogy a korán eluálódó poláros szennyeződések nagy részét sikerült eltávolítanunk az extrakcióval.

7. táblázat Extrakciós próbák Klo/metanol/víz terner rendszerrel

Folyamat	Paraméter	STC (μg)
Első extraktum (fermentált rizs $\rightarrow$ metanol)	Hozam (μg)	15,44
	Tisztaság (%)	0,83
víz/metanol/kloroform 10/30/60	Hozam (μg)	$16,71 \pm 2,17$
	Tisztaság (%)	$2,54 \pm 0,13$
	Visszanyerés (%)	$90,20 \pm 11,70$
víz /metanol/kloroform 30/35/35	Hozam (μg)	$15,48 \pm 0,59$
	Tisztaság (%)	$5,71 \pm 1,01$
	Visszanyerés (%)	$71,61 \pm 2,73$
víz/metanol/kloroform 50/30/20	Hozam (μg)	$8,97 \pm 0,40$
	Tisztaság (%)	$7,39 \pm 1,16$
	Visszanyerés (%)	$72,60 \pm 3,27$
2. kör víz/metanol/kloroform 50/30/20	Hozam (μg)	$11,78 \pm 0,17$
	Tisztaság (%)	$9,40 \pm 1,02$
	Visszanyerés (%)	$74,92 \pm 1,89$



4. ábra A második extraktum kromatogramja

5.3. Oldószerrendszerek

Az oldószerrendszer kiválasztására két elfogadott módszer létezik, az egyik az ún. szisztematikus keresés- vagy a „legjobb oldószer” elvének módszere. Munkám során mindkettőt alkalmaztam, de a jobb eredményt a „legjobb oldószer” elve alapján választott rendszereknél tapasztaltam.

5.3.1. Arizona rendszer

A szisztematikus kereséshez az Arizona rendszert alkalmaztam és a **8. táblázat** tartalmazza azokat a próbált összetételeket, melyek esetében a HPLC mérés során a P értékek meghatározhatóak voltak az egyes komponensekre nézve.

8. táblázat Arizona rendszer

Oldószerrendszer száma	Térfogati összetétel (hexán/etil-acetát/metanol/víz)	P-értékek		
		Imp C	Imp F	STC
41	7/3/5/5	0,907	1,994	1,217
70	7/2,5/5,5/5	0,939	2,712	1,321
79	7/2/6/5	0,972	3,159	1,525

Az Arizona rendszerek tesztelése közben általánosságban azt tapasztaltam, hogy létrejött a két fázis, de az első extraktumokból készített mintákat csak részben oldotta, mivel az egyik fázis, általában az alsó (vizes) fázis opálos maradt. Ebből arra következtettünk, hogy az STC nem oldódik jól a vizes fázisban és ezt figyelembe is vettük a későbbi oldószerrendszerek választása során.

A P értékek és α értékek meghatározása szempontjából alkalmasak volt a 41-es, a 70-es és a 79-es rendszer (**9. táblázat**). Az STC megoszlási hányadosait (P érték) tekintve mind a három rendszer alkalmas lenne a CPC-n történő elválasztásra, azonban nem túl nagy tisztaságban, mivel az Imp C P értékei közel azonosak az STC értékeivel, ezáltal az Imp C α értéke a 1,5-es határ alatt vagy annak közelében van. Amíg az Imp C szelektivitási tényezője nem nagyobb, mint 1,5, addig az a rendszer nem tudja biztosítani az STC és Imp C elválását a CPC-ben.

5.3.2. A „legjobb oldószer” megközelítés

A további oldószerrendszereket a „legjobb oldószer” elve alapján választottam. Ez a módszer alkalmasabb arra, hogy olyan rendszert találjunk az elválasztáshoz, amelynek nagyobb a kapacitása, mint, amit egy Arizona rendszerrel el lehetne érni. A választott legjobb oldószer a metanol, az etanol, és az aceton volt. Az összetételüket a turner diagrammok alapján állítottam össze (**9. táblázat; A. melléklet; B. melléklet; C. melléklet**)

9. táblázat „Legjobb oldószer” elve alapján próbált oldószerrendszerek

Oldószerrendszer	Térfogati összetétel	P-értékek		
		Imp C	Imp F	STC
38	50/35/15	0,026	0,101	0,037
40	45/45/10	0,054	0,182	0,074
57	Metanol alapú rendszer (hexán/metanol/acetonitril)	0,065	0,210	0,084
71		0,031	0,113	0,039
72		0,026	0,148	0,026
73		0,030	0,097	0,030
48	40/30/30	0,375	1,064	0,744
66	Etanol alapú rendszer (hexán/etanol/víz)	0,401	1,037	0,720
68		1,282	2,753	2,162
89		0,255	1,136	0,456
49	50/30/20	0,683	1,627	0,986
60	55/25/20	0,760	1,742	1,067
61	70/20/10	0,744	2,126	1,019
64	40/30/30	1,092	3,208	1,648
65	35/35/30	0,914	2,027	1,304
78	50/25/25	1,542	4,756	2,124
93	45/30/25	1,213	2,733	1,588
94	60/25/15	0,950	1,481	1,355
95	Aceton alapú rendszer (hexán/aceton/víz)	1,128	2,798	1,661
96		1,080	1,823	1,523
97		1,198	2,299	1,747
101		0,875	1,528	1,439
102	70/20/5	1,090	1,496	1,683
103	70/25/10	0,944	1,503	1,449
104	70/15/10	1,066	2,496	1,819
105	65/20/10	1,045	1,547	1,649
106	75/20/10	1,533	3,438	2,450

Etanol és metanol, mint a „legjobb oldószer”

Az etanol hasonló kémiai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a metanol. Abból kiindulva, hogy az első extraktumot is metanollal készítettük el, teszteket végeztünk az etanollal, hogy hasonló rendszerben milyen elválást várhatunk. A tesztelés során azt tapasztaltuk, hogy az első extraktumból vett mintákat viszonylag jól oldotta, viszont az Arizona rendszerhez hasonlóan, az alsó fázis itt is opálos maradt. A feloldás során azt tapasztaltam, hogy az addigi vörösesbarna oldat felső fázisa citromsárga színű lett. A citromsárga színből következtetni lehetett arra, hogy valamennyi STC-t már tartalmazhat a felső fázis. Ez be is bizonyosodott a mérések során, azonban az alsó fázisban így is jóval több maradt. Valamint az Imp C és az STC megoszlási hányadosa közel esett egymáshoz, ami előrevetítette, hogy a rendszerben nem lehet a két vegyületet egymástól elválasztani (**9. táblázat**).

A korábbi oldószerrendszerekkel végzett tesztek során érdemesnek tartottunk egy olyan rendszert is kipróbálni, amelynél a rendszer nem tartalmaz vizet. Így esett a választásunk arra a rendszerre, amely hexán/metanol/acetonitril elegyből áll (**9. táblázat**).

Azonban már az oldószerrendszer tesztek során látszódott, hogy ezek a rendszerek nem oldják fel teljesen az első extraktumot és csapadék maradt. A HPLC-s mérések igazolták, hogy a csapadék sok STC-t zárt magába, ami veszteséget okozott. Így, az oldhatóság szempontjából a rendszernek vizet is kell tartalmaznia.

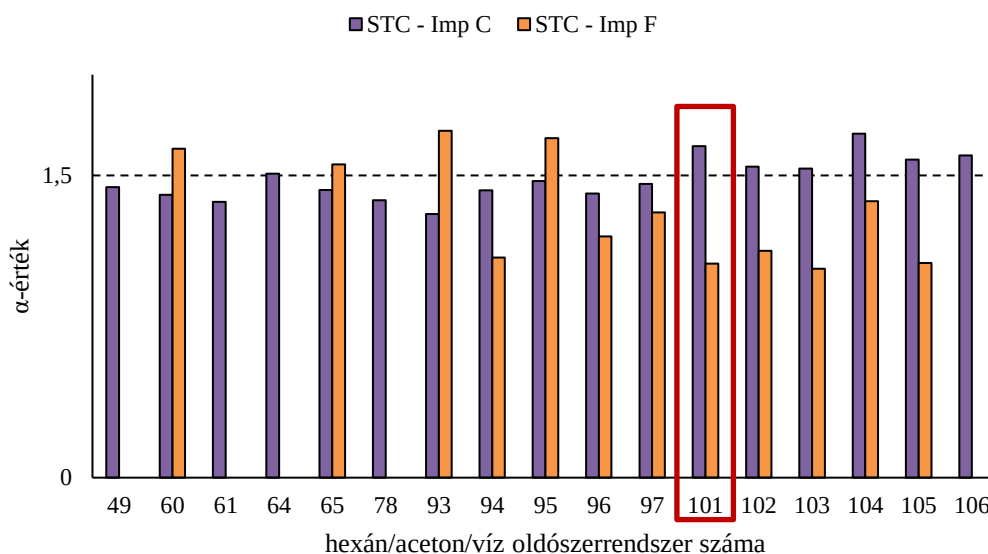
Aceton alapú rendszerek

A legtöbb tesztelést az aceton víz alapú rendszerekkel végeztük. Az acetont, mint „legjobb oldószer” az oldhatóság (**2. táblázat**) alapján választottuk. A vizsgálatok során két rendszert teszteltünk a hexán/aceton/víz és a kloroform/aceton/víz rendszert. Az utóbbit a CPC-n történő elválasztáshoz nem találtuk alkalmasnak, mert esetenként 30 mp-nél tovább tartott a két fázis szétválása vagy 3 fázist alkotott a kettő helyett. A legfőbb indok pedig az volt, hogy nem oldódtak jól az első extraktumból vett minták.

A legtöbbet a hexán/aceton/víz oldószerrendszer képviselőit teszteltem. A rendszer gyorsan két fázist alkotott és általában teljesen feloldotta az első extraktumból vett mintákat. Az első pár tesztelt oldószerrendszer HPLC-s mérése is ezt támasztotta alá. Mind az STC-nél, mind az Imp C-nél 1 körüliek voltak a megoszlási hányados értékei, ami az elválasztás szempontjából a legideálisabb. Emellett pedig az Imp C α értéke is 1,5 körül volt, ami sikeres elválasztást vetített előre a CPC készüléken (**5. ábra**).

Megvizsgáltuk, hogy a pH befolyásolja-e az STC megoszlását, ezért 0,1% ecetsavat adtunk a rendszerekhez. Mivel a megoszlási hányadosok értékét nem befolyásolta a sav hozzáadása a továbbiakban

nem is alkalmaztuk. A HPLC mérések alapján a CPC-n történő elválasztáshoz, a 101-es számú, 70:20:15 hexán/aceton/víz összetételű rendszert választottuk ki (5. ábra).



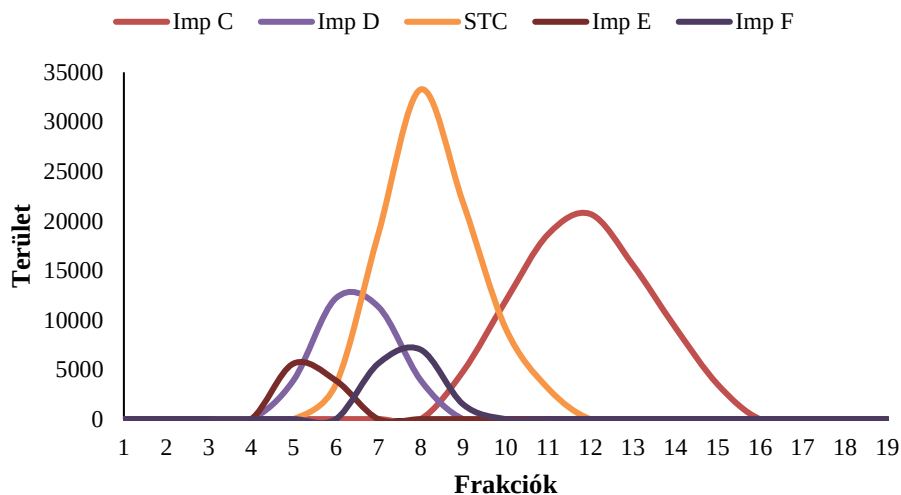
5. ábra Aceton alapú rendszerben a szelektivitási tényezők értéke

5.4. CPC-s elválasztás

Az elválasztás irányának kijelöléséhez (ascendens/descendens) szükséges volt a retenciós térfogat meghatározása (V_r). A 101-es oldószerszám tesztelésénél mért megoszlási hányadosokkal és az ideális álló-/mozgófázis arányával (20:80) és 10 ml/perc áramlási sebességgel számolva az STC, az Imp C és Imp F retenciós ideje ascendens módban 19, 28 és 18 perc, míg descendens módban 34, 22 és 36 perc (5. egyenlet). Mivel két módban viszonylag hasonló elválasztást kapunk, így a könnyebb bepárolás érdekében a felső fázis lett a mozgó fázis és az alsó fázis az álló fázis.

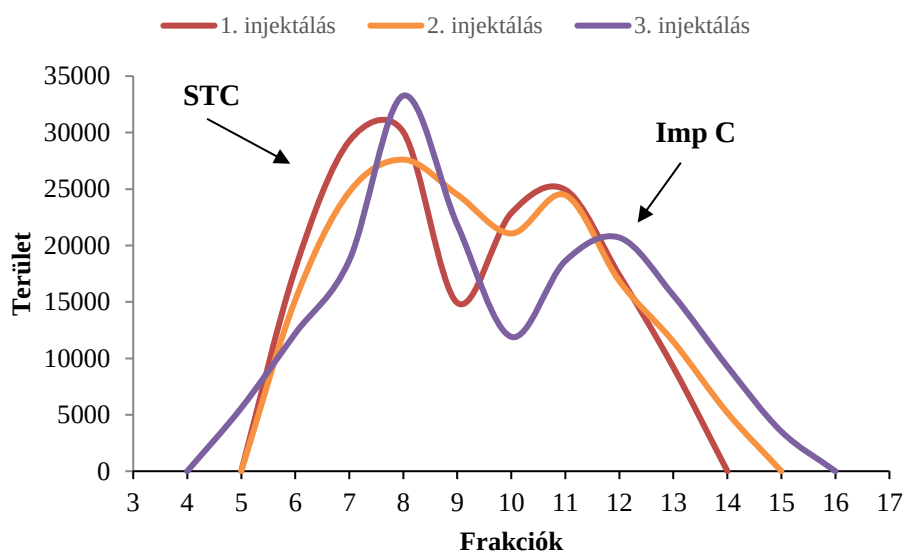
A CPC-s módszerbeállítás elején az oszlopot 500 rpm-es fordulatszám mellett feltöltjük az álló fázissal 50 ml/perc áramlási sebesség mellett descendens módban. Ezt követően a mozgófázist 10 ml/perc áramlási sebességgel pumpáltuk a rendszerbe 2000 rpm-es fordulatszámon, amelyet fokozatosan csökkentettünk annak érdekében, hogy a nyomás ne lépje át a rendszer maximális nyomáshatárát (100 bar), és közben megmaradjon az ideális álló-/mozgófázis arány a rendszerben. A rotor fordulatszámának 700 rpm-re való csökkentése stabil nyomást (7 bar) és hozzávetőlegesen 35 ml alsó fázis kiszorítást eredményezett. Ez a térfogat 14/86 mozgófázis/állófázis aránynak felel meg. Ez az arány nem optimális a folyadék-folyadék kromatográfiás gyakorlat alapján (alacsony a mozgófázis térfogata), de a kétfázisú rendszer tulajdonságai miatt nem lehetett ennél magasabb arányt elérni, így ezt a rendszert az elválasztásra alkalmasnak ítéltük. A CPC-vel történő elválasztáshoz a korábbiakban említett paramétereket alkalmaztuk. Az injektáláshoz 10

ml második (kloroformban oldott) extraktum mintát szárazra pároltunk enyhe nitrogén áram alatt, majd a kétfázisú rendszer felső és alsó fázisából 5-5 ml hozzáadva visszaoldottuk és így az injektált mennyiség 50 µg STC volt. Ezt a módszert alkalmazva elválasztható egymástól az STC és Imp C, amely a legmagasabb százalékban szennyezte a mintánkat (6. ábra).



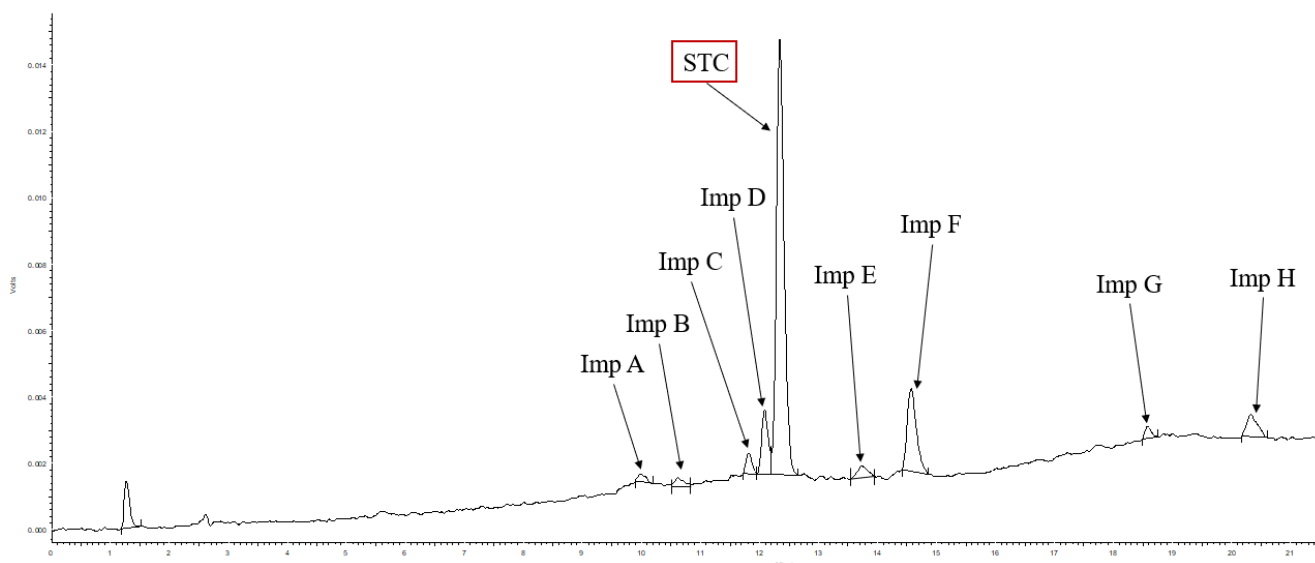
6. ábra Az alkalmazott CPC futás öt fontosabb komponensének fraktogramja

Az első elválasztást követően megvizsgáltuk a rendszer stabilitását és ismételhetőségét két ismételt CPC futással. Az elválasztást ugyanazzal a módszerrel végeztük, mint az első esetben, minden alkalommal friss mintát injektálva és frissen készített oldószerrendszert alkalmazva az újra és újra feltöltött oszlopon (7. ábra). A három párhuzamos futás fraktogramján jól látható, hogy a rendszer ismételhetősége megfelelő.



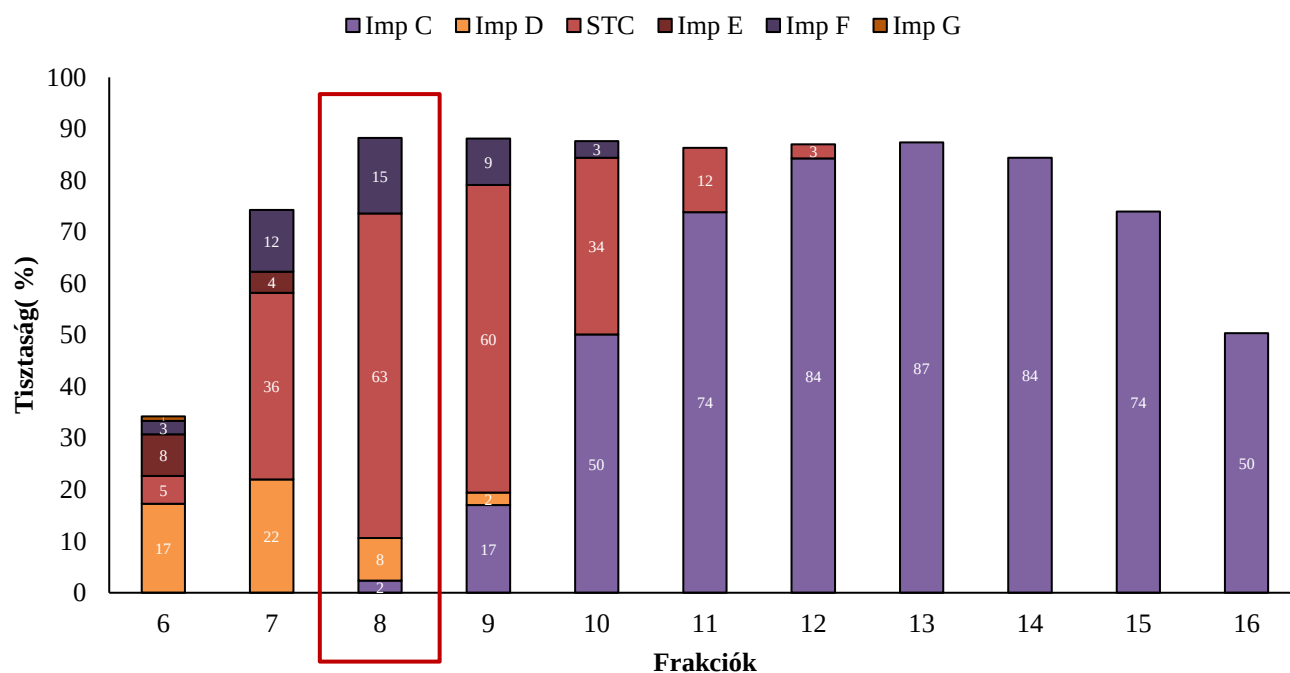
7. ábra Ismétlődő CPC futásokat ábrázoló fraktogram

Minden futás alkalmával 2 percenként, összesen 20 frakciót gyűjtöttünk, közvetlenül az injektálástól kezdve. Az egyes frakciók összetételét HPLC-UV mérésekkel határoztuk meg külső standarddal végzett kalibráció segítségével, az 8. frakció kromatogramját mutatja be a **8. ábra**.



8. ábra A 8. frakció HPLC-UV kromatogramja (tisztaság: 63%)

Az STC tisztításához alkalmazott 101-es számú oldószerrendszer használatával már 60 % körüli tisztaságot sikerült elérnünk a legkevesebb szennyezőt tartalmazó frakcióban (**9. ábra**). Amennyiben csak ezt a frakciót nézzük a visszanyerés (33%) is jóval alacsonyabb, mint ideális esetben elvárnánk. 101-es oldószerrendszer alkalmazásával sikeres elválasztást tudunk biztosítani az STC és Imp C között, azonban az addig csak kis mennyiségben jelenlévő szennyezők közül volt olyan, amely a tisztítás közben szintén feldúsult és problémát okozott (Imp F). Az így feldúsult szennyezőktől való elválasztást érdekében további CPC futásokra van szükség az STC tartalmú frakció egyesítése után, hogy mind a tisztaságon, mind a visszanyerésen javíthassunk.



9. ábra Optimalizált CPC futás frakcióinak összetétele és tisztasága (%)

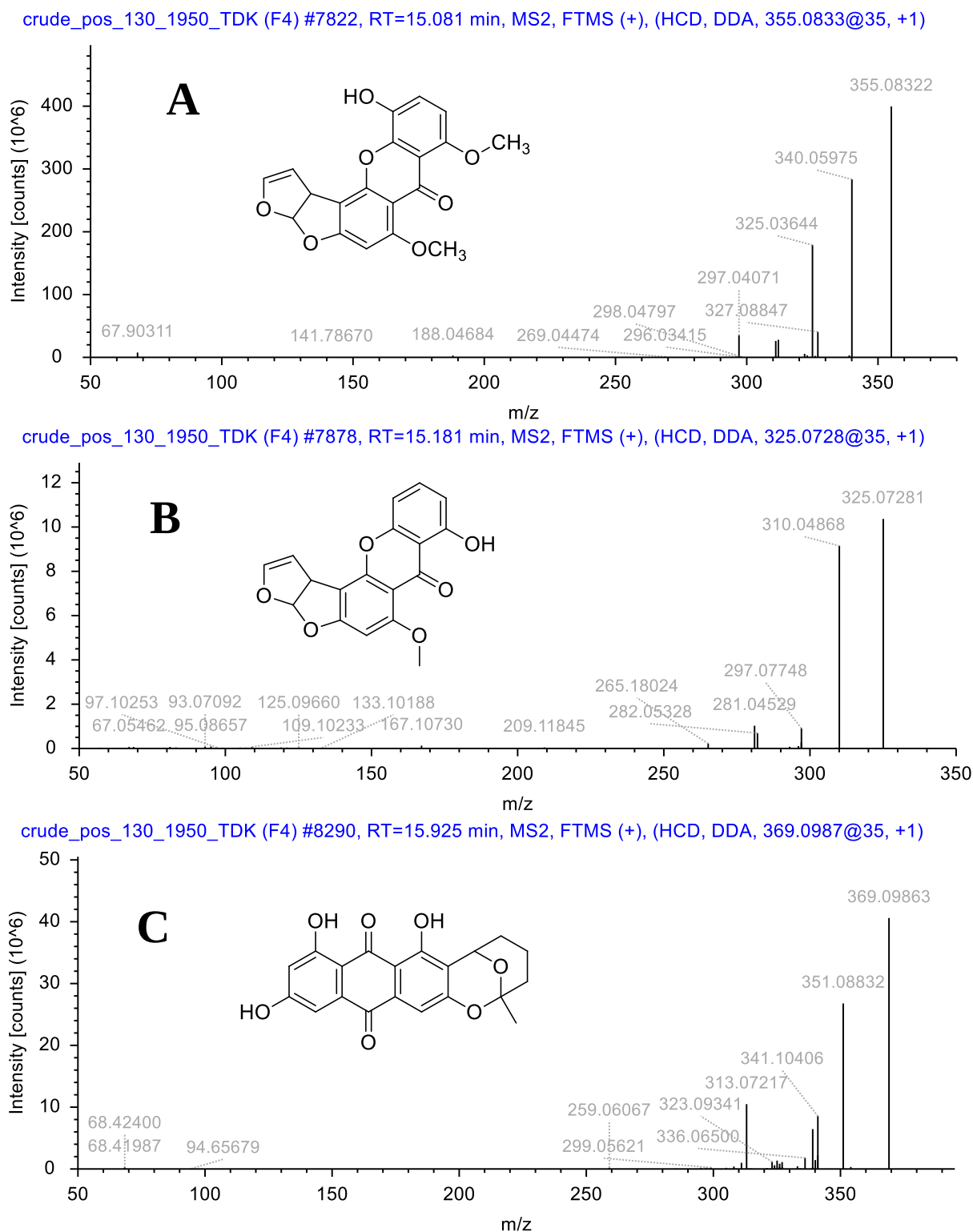
5.5. HPLC-ESI-HRMS vizsgálatok

Az STC és a szennyeződések azonosításához HPLC-ESI-HRMS vizsgálatokat végeztünk. A tömegspektrometriás vizsgálatokkal meg tudtuk erősíteni, hogy az UV elnyelés és a retenciós idő alapján tisztított vegyület ténylegesen az STC. A későbbi tisztítási eljárások tervezésében nagy segítséget nyújthat, ha a szennyező komponensekről is a lehető legtöbb információt gyűjtjük össze. Az **10. táblázat** tartalmazza a nyers extraktumban található szennyeződések tömegspektrometriás paramétereit.

10. táblázat Az STC és a szennyeződések retenciós ideje, pontos tömege és a detektált ionok m/z értéke a HPLC-ESI-HRMS vizsgálat során

Komponens	Retenciós idő (min)	Tömeg (g)	Detektált ion [M+H] ⁺ (m/z)
Imp A	9.6	370.3212	371.3285
Imp B	11.7	398.3561	399.3634
Imp C – 11-hidroxi-O-metil-sterigmatocisztin	13.0	317.2739	318.2812
Imp D	15.1	354.076	355.0833
STC	15.3	324.0655	325.0728
Imp E	15.6	400.2381	401.2453
Imp F - Averufin	15.9	368.0913	369.0986
Imp G	16.9	514.3514	537.3408
Imp H	21.4	735.5969	736.6041

A kromatogramon szereplő kilenc vegyület közül az STC-én kívül kettő vegyületet tudtunk egyértelműen azonosítani pontos tömegük és az adatbázisokban szereplő fragmentációs mintázatuk alapján (10. ábra), a 11-hidroxi-O-metil-sterigmatocisztint és az averufint.



10. ábra Az 11-hidroxi-O-metil-sterigmatocisztin (A), az STC (B) és az averufin (C) fragmentációja és szerkezeti képlete

Az aflatoxin és a sterigmatocisztin ugyanazon bioszintetikus útvonal termékei. A szintézis hexanoátból indul és a végterméke az aflatoxin B1. Az általunk tisztított vegyület és a két másik azonosított szennyező is ezen útvonal közti termékei. A mintánkban azonosított averufin, a hexanoát molekulákból poliketid szintézissel keletkező norsolorin sav származéka. Az averufinból további, ezimakkal szabályozott reakciókban versicolorin-származékok (versicolorin A, versicolorin B) keletkeznek. Az általunk tisztított STC a versicolorin A-ból keletkezik. Az általunk a tisztítás elején Imp C-nek nevezett szennyező, a 11-hidroxi-O-metil-sterigmatocisztin pedig az STC-ből keletkező közti termék az aflatoxin B1 szintézise közben ⁵⁴. Ezek alapján az mondható el a termelő mikroorganizmusról (*A. creber* Km26), hogy nem csak az STC szintéziséhez alkalmas génekkel és enzimekkel rendelkezik, hanem az STC az aflatoxin B1 irányába történő tovább alakítására is képes, azonban aflatoxint már nem termel.

6. Összegzés

A tudományos diákköri munkám során sikeresen fejlesztettünk két különböző paraméterekkel rendelkező HPLC oszlopra olyan módszereket, amelyek alkalmasak arra, hogy a fermentációs mintában előforduló nagy számú komponenst detektálni tudjuk.

Az extrakció optimalizálása érdekében az analitikai mérések mintaelőkészítéseihez alkalmazott oldószereket, oldószerösszetételeket alkalmaztunk. Az irodalomban említett oldószeres extrakciós összetételek közül azonban csak a víz/metanol/kloroform 50:20:30 összetételű terner rendszer hozta meg az általunk elérni kívánt hatást. E rendszer kezdeti alacsony visszanyerését két egymást követő extrakcióval javítottuk. Ezt a terner rendszert alkalmazva a kezdeti kevesebb, mint 1%-os tisztasággal rendelkező STC mintánkból már több, mint 7% tisztaságú második extraktumot sikerült előállítanunk.

Az oldószerrendszerek tesztelése során közel 120 különböző összetételű rendszerben vizsgáltuk az STC és a szennyezők megoszlási hányadosait és a szelektivitási tényezőket. A tesztelést követően azokat a megállapításokat tudtuk tenni, hogy az STC főként az apoláros fázisban fordul elő, azonban a minta feloldásához és a többi komponenstől való elválasztásához szükség van a vízre. A „legjobb oldószer” elve alapján választott rendszerek közül a hexán/aceton/víz oldószereket tartalmazók közül találtunk olyat, amely lehetővé tette az STC és Imp C elválasztását.

A CPC-n történő elválasztás előtt az elválasztás irányát jelöltük ki. Az ascendens módot választottuk, figyelembe véve a számolt retenciós időket és az oldószer könnyebb bepárolhatóságát. Az elválasztáshoz a hexán/aceton/víz 70:20:15 összetételű rendszert alkalmaztuk. A tisztaság mértékének a változását HPLC-UV mérésekkel határoztuk meg. A 101-es rendszert alkalmazva a legnagyobb tisztasággal rendelkező frakció is csak 63%-ban tartalmazza az STC-t, azonban az eddig legnagyobb mennyiségben (területszázalék) jelenlevő szennyezőtől (Imp C) sikerült az elválasztás. E rendszerrel történő elválasztás hatására azonban egy addig csak kis mennyiségben (területszázalék) jelenlevő szennyező, az Imp F feldúsult az STC-t tartalmazó frakciókban, így a jövőbeni feladat az ettől a szennyezőtől való elválasztás lesz.

Az STC a szennyeződések azonosításához HPLC-ESI-HRMS vizsgálatokat végeztünk. A tömegspektrometriás vizsgálatokkal meg tudtuk erősíteni, hogy az UV elnyelés és a retenciós idő alapján tisztított vegyület ténylegesen az STC. Az általunk követett nyolc szennyező közül kettőt tudtunk azonosítani pontos tömegük és az adatbázisokban szereplő fragmentációs mintázatuk alapján. A mintánkban azonosított 11-hidroxi-O-metil-sterigmatocisztint (Imp C) és averufin (Imp F) szintén az aflatoxin bioszintézisének a közti termékei.

Jövőbeli terveink közé tartozik olyan oldószerrendszerek felkutatása, mely lehetővé teszi az STC és Imp F elválasztását is. Az egyszerű tisztítás mellett célunk az optimális rendszer terhelhetőségének a vizsgálata is. További terveink közé tartozik a többi szennyezőnek a lehetséges szerkezetének a meghatározása, emellett pedig a tenyésztési körülmények optimalizálása, annak érdekében, hogy minél több STC-t tudjunk tisztítani.

7. Irodalomjegyzék

- (1) Abdel-Azeem, A.; Abdel Azeem, M.; Abdul-Hadi, S.; Darwish, A. *Aspergillus: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications: 3rd ISNPS*, Avignon, France, June 2016; 2019; pp 121–179. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_4.
- (2) Jakucs E. *A mikológia alapjai*; 2009.
- (3) Navale, V.; Vamkudoth, K. R.; Ajmera, S.; Dhuri, V. *Aspergillus Derived Mycotoxins in Food and the Environment: Prevalence, Detection, and Toxicity. Toxicol. Rep.* **2021**, *8*, 1008–1030. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.04.013>.
- (4) Kucsra J.; Kevei F. *Mikrobiológia I.*; 2010.
- (5) Schoch, C. L.; Ciufu, S.; Domrachev, M.; Hottot, C. L.; Kannan, S.; Khovanskaya, R.; Leipe, D.; Mcveigh, R.; O'Neill, K.; Robbertse, B.; Sharma, S.; Soussov, V.; Sullivan, J. P.; Sun, L.; Turner, S.; Karsch-Mizrachi, I. NCBI Taxonomy: A Comprehensive Update on Curation, Resources and Tools. *Database J. Biol. Databases Curation* **2020**, *2020*, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>.
- (6) Micheli, P. A. *Nova plantarum genera*; 1729.
- (7) Kwon-Chung, K. J. *Aspergillus: Diagnosis and Description of the Genus*. In *Aspergillus and Aspergillosis*; Vanden Bossche, H., Mackenzie, D. W. R., Cauwenbergh, G., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1988; pp 11–21. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3505-2_2.
- (8) Sklenář, F.; Glässnerová, K.; Jurjević, Ž.; Houbraken, J.; Samson, R. A.; Visagie, C. M.; Yilmaz, N.; Gené, J.; Cano, J.; Chen, A. J.; Nováková, A.; Yaguchi, T.; Kolařík, M.; Hubka, V. Taxonomy of *Aspergillus* Series Versicolores: Species Reduction and Lessons Learned about Intraspecific Variability. *Stud. Mycol.* **2022**, *102* (1), 53–93. <https://doi.org/10.3114/sim.2022.102.02>.
- (9) Jurjevic, Z.; Peterson, S. W.; Horn, B. W. *Aspergillus* Section Versicolores: Nine New Species and Multilocus DNA Sequence Based Phylogeny. *IMA Fungus* **2012**, *3* (1), 59–79. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2012.03.01.07>.
- (10) Jurjević, Z.; Peterson, S. W.; Solfrizzo, M.; Peraica, M. Sterigmatocystin Production by Nine Newly Described *Aspergillus* Species in Section Versicolores Grown on Two Different Media. *Mycotoxin Res.* **2013**, *29* (3), 141–145. <https://doi.org/10.1007/s12550-013-0160-4>.
- (11) Dobolyi, C.; Inotai, K.; Bata-Vidács, I.; Sárkány, D.; Csernus, O.; Kocsubé, S.; Tóth, B.; Szekeres, A.; Kukolya, J. Isolation and Detailed Characterisation of the First Sterigmatocystin Hyperproducer Mould Strain in Hungary. *Acta Aliment.* **2021**, *50* (2), 247–258. <https://doi.org/10.1556/066.2020.00326>.
- (12) Hajjar, J. D.; Bennett, J. W.; Bhatnagar, D.; Bahu, R. Sterigmatocystin Production by Laboratory Strains of *Aspergillus nidulans*. *Mycol. Res.* **1989**, *93* (4), 548–551. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80052-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80052-8).
- (13) Gruber-Dorninger, C.; Jenkins, T.; Schatzmayr, G. Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. *Toxins* **2019**, *11* (7), 375. <https://doi.org/10.3390/toxins11070375>.
- (14) Luo, S.; Du, H.; Kebede, H.; Liu, Y.; Xing, F. Contamination Status of Major Mycotoxins in Agricultural Product and Food Stuff in Europe. *Food Control* **2021**, *127*, 108120. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108120>.
- (15) Milićević, D. R.; Skrinjar, M.; Baltić, T. Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. *Toxins* **2010**, *2* (4), 572–592. <https://doi.org/10.3390/toxins2040572>.
- (16) Tolosa, J.; Rodríguez-Carrasco, Y.; Ruiz, M. J.; Vila-Donat, P. Multi-Mycotoxin Occurrence in Feed, Metabolism and Carry-over to Animal-Derived Food Products: A Review. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *158*, 112661. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112661>.
- (17) Calvo, A. M.; Wilson, R. A.; Bok, J. W.; Keller, N. P. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66* (3), 447–459. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002>.
- (18) Smith, J. E. 11 - Mycotoxins. In *Food Chemical Safety*; Watson, D. H., Ed.; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing, 2001; pp 238–259. <https://doi.org/10.1533/9781855736320.2.238>.
- (19) Keller, N. P.; Kantz, N. J.; Adams, T. H. *Aspergillus nidulans* verA Is Required for Production of the Mycotoxin Sterigmatocystin. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60* (5), 1444–1450. <https://doi.org/10.1128/aem.60.5.1444-1450.1994>.

- (20) Soares, C.; Calado, T.; Venâncio, A. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Rev. Iberoam. Micol.* **2013**, *30* (1), 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.05.002>.
- (21) Chung, S. W. C.; Wu, A. H. T. Development and Validation of an Analytical Method for the Analysis of Sterigmatocystin in Roasted Coffee Beans and Black Pepper Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **2020**, *37* (2), 355–362. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1693635>.
- (22) Rank, C.; Nielsen, K. F.; Larsen, T. O.; Varga, J.; Samson, R. A.; Frisvad, J. C. Distribution of Sterigmatocystin in Filamentous Fungi. *Fungal Biol.* **2011**, *115* (4), 406–420. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.013>.
- (23) Burkhardt, H. J.; Forgacs, J. O-Methylsterigmatocystin, a New Metabolite from *Aspergillus Flavus*, Link Ex Fries. *Tetrahedron* **1968**, *24* (2), 717–720. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(68\)88020-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(68)88020-2).
- (24) PubChem. Aflatoxin B1. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/186907> (accessed 2024-05-17).
- (25) Veršilovskis, A.; De Saeger, S. Sterigmatocystin: Occurrence in Foodstuffs and Analytical Methods – An Overview. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54* (1), 136–147. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900345>.
- (26) IARC. *Some Naturally Occurring Substances*; 1976.
- (27) Mahata, P. K.; Dass, R. S.; Gunti, L.; Thorat, P. A. First Report on the Metabolic Characterization of Sterigmatocystin Production by Select *Aspergillus* Species from the Nidulantes Section in *Foeniculum Vulgare*. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.958424>.
- (28) Bullock, E.; Roberts, J. C.; Underwood, J. G. 808. Studies in Mycological Chemistry. Part XI. The Structure of Isosterigmatocystin and an Amended Structure for Sterigmatocystin. *J. Chem. Soc. Resumed* **1962**, No. 0, 4179–4183. <https://doi.org/10.1039/JR9620004179>.
- (29) Rodricks, J. V.; Henery-Logan, K. R.; Campbell, A. D.; Stoloff, L.; Verrett, M. J. Isolation of a New Toxin from Cultures of *Aspergillus Flavus*. *Nature* **1968**, *217* (5129), 668. <https://doi.org/10.1038/217668a0>.
- (30) Biollaz, M.; Büchi, G.; Milne, G. The Biosynthesis of the Aflatoxins. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (4), 1035–1043. <https://doi.org/10.1021/ja00707a050>.
- (31) Barnes, S. E.; Dola, T. P.; Bennett, J. W.; Bhatnagar, D. Synthesis of Sterigmatocystin on a Chemically Defined Medium by Species of *Aspergillus* and *Chaetomium*. *Mycopathologia* **1994**, *125* (3), 173–178. <https://doi.org/10.1007/BF01146523>.
- (32) Hamasaki, T.; Matsui, K.; Isono, K.; Hatsuda, Y. A New Metabolite from *Aspergillus Versicolor*. *Agric. Biol. Chem.* **1973**, *37* (7), 1769–1770. <https://doi.org/10.1080/00021369.1973.10860908>.
- (33) Hicks, J. K.; Shimizu, K.; Keller, N. P. Genetics and Biosynthesis of Aflatoxins and Sterigmatocystin. In *Agricultural Applications*; Kempken, F., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2002; pp 55–69. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03059-2_4.
- (34) Hitokoto, H.; Morozumi, S.; Wauke, T.; Sakai, S.; Yoshikawa, S. Chemically Defined Medium for High Yields of Sterigmatocystin. *Mycopathologia* **1982**, *78* (2), 99–105. <https://doi.org/10.1007/BF00442633>.
- (35) Cary, J. W.; Chang, P.-K.; Bhatnagar, D. Clustered Metabolic Pathway Genes in Filamentous Fungi. In *Applied Mycology and Biotechnology*; Khachatourians, G. G., Arora, D. K., Eds.; Agriculture and Food Production; Elsevier, 2001; Vol. 1, pp 165–198. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(01\)80009-5](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(01)80009-5).
- (36) EFSA Panel on Contaminants in the Food, C. (CONTAM). Scientific Opinion on the Risk for Public and Animal Health Related to the Presence of Sterigmatocystin in Food and Feed. *EFSA J.* **2013**, *11* (6), 3254. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3254>.
- (37) Viegas, C.; Nurme, J.; Piecková, E.; Viegas, S. Sterigmatocystin in Foodstuffs and Feed: Aspects to Consider. *Mycology* **2018**, *11* (2), 91–104. <https://doi.org/10.1080/21501203.2018.1492980>.
- (38) Abdel-Wahhab, M. A.; Hasan, A. M.; Aly, S. E.; Mahrous, K. F. Adsorption of Sterigmatocystin by Montmorillonite and Inhibition of Its Genotoxicity in the Nile Tilapia Fish (*Oreochromis Niloticus*). *Mutat. Res.* **2005**, *582* (1–2), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.12.009>.
- (39) Curry, P. T.; Reed, R. N.; Martino, R. M.; Kitchin, R. M. Induction of Sister-Chromatid Exchanges in Vivo in Mice by the Mycotoxins Sterigmatocystin and Griseofulvin. *Mutat. Res.* **1984**, *137* (2–3), 111–115. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(84\)90099-5](https://doi.org/10.1016/0165-1218(84)90099-5).
- (40) Piecková, E.; Hurbánková, M.; Cerna, S.; Majorošová, M.; Kováčiková, Z. Respiratory Toxicity of *Aspergillus Versicolor* : The Most Common Indoor Mould in Slovakia; 2011; Vol. 15, pp 135–145. <https://doi.org/10.2495/EHR110131>.

- (41) Veršilovskis, A.; Van Peteghem, C.; De Saeger, S. Determination of Sterigmatocystin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A* **2009**, *26* (1), 127–133. <https://doi.org/10.1080/02652030802342497>.
- (42) Nielsen, K. F.; Gravesen, S.; Nielsen, P. A.; Andersen, B.; Thrane, U.; Frisvad, J. C. Production of Mycotoxins on Artificially and Naturally Infested Building Materials. *Mycopathologia* **1999**, *145* (1), 43–56. <https://doi.org/10.1023/A:1007038211176>.
- (43) Steyn, M. Solubility of Sterigmatocystin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1974**, *57* (1), 225–227. <https://doi.org/10.1093/jaoac/57.1.225>.
- (44) Ito, Y. Golden Rules and Pitfalls in Selecting Optimum Conditions for High-Speed Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1065* (2), 145–168. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.044>.
- (45) Onji, Y.; Aoki, Y.; Yamazoe, Y.; Dohi, Y.; Moriyama, T. Isolation of Nivalenol and Fusarenon-X from Pressed Barley Culture by Centrifugal Partition Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **1988**, *11* (12), 2537–2546. <https://doi.org/10.1080/01483918808076745>.
- (46) He, J.; Yang, R.; Zhou, T.; Tsao, R.; Young, J. C.; Zhu, H.; Li, X.-Z.; Boland, G. J. Purification of Deoxynivalenol from *Fusarium Graminearum* Rice Culture and Mouldy Corn by High-Speed Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1151* (1), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.112>.
- (47) Hu, J.; Lv, H.; Hou, M.; Wang, G.; Lee, Y.-W.; Shi, J.; Gu, Z.; Xu, J. Preparative Isolation and Purification of B-Type Fumonisin by Using Macroporous Resin Column and High-Speed Countercurrent Chromatography. *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **2020**, *37* (1), 143–152. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1678768>.
- (48) Hübner, F.; Harrer, H.; Frasse, A.; Kneifel, S.; Humpf, H.-U. Large Scale Purification of B-Type Fumonisin Using Centrifugal Partition Chromatography (CPC). *Mycotoxin Res.* **2012**, *28* (1), 37–43. <https://doi.org/10.1007/s12550-011-0114-7>.
- (49) Liu, Y.; Zhou, X.; Naman, C. B.; Lu, Y.; Ding, L.; He, S. Preparative Separation and Purification of Trichothecene Mycotoxins from the Marine Fungus *Fusarium* Sp. LS68 by High-Speed Countercurrent Chromatography in Stepwise Elution Mode. *Mar. Drugs* **2018**, *16* (2), 73. <https://doi.org/10.3390/md16020073>.
- (50) Szekeres, A.; Lorántfy, L.; Bencsik, O.; Kecskeméti, A.; Szécsi, Á.; Mesterházy, Á.; Vágvolgyi, Cs. Rapid Purification Method for Fumonisin B1 Using Centrifugal Partition Chromatography. *Food Addit. Contam. Part A* **2013**, *30* (1), 147–155. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.729161>.
- (51) Wang, G.; Chen, W.; Hu, J.; Fan, B.; Shi, J.; Xu, J. Preparative Isolation and Purification of Zearalenone from Rice Culture by Combined Use of Macroporous Resin Column and High-Speed Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2019**, *1110–1111*, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.02.009>.
- (52) Endre, G.; Hegedüs, Z.; Turbat, A.; Škrbić, B.; Vágvolgyi, C.; Szekeres, A. Separation and Purification of Aflatoxins by Centrifugal Partition Chromatography. *Toxins* **2019**, *11* (6), 309. <https://doi.org/10.3390/toxins11060309>.
- (53) Hegedüs, Z.; Gömöri, C.; Varga, M.; Vágvolgyi, C.; Szekeres, A. Separation of Ochratoxins by Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2024**, *1724*, 464898. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464898>.
- (54) Caceres, I.; Al Khoury, A.; El Khoury, R.; Lorber, S.; P. Oswald, I.; El Khoury, A.; Atoui, A.; Puel, O.; Bailly, J.-D. Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review. *Toxins* **2020**, *12* (3), 150. <https://doi.org/10.3390/toxins12030150>.
- (55) Foucault, A. P. *Centrifugal Partition Chromatography*; Chromatographic Science Series; 1994; Vol. 68.
- (56) Jolliffe, H.; Gerogiorgis, D. I. Process Modelling and Simulation for Continuous Pharmaceutical Manufacturing of Ibuprofen. *Chem. Eng. Res. Des.* **2014**, *97*. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.12.005>.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Papp Tamásnak, amiért a tudományos diákköri kutatásomat a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén készíthettem el.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Szekeres Andrásnak, hogy lehetőséget adott arra, hogy bekapcsolódjak az Elválasztástudomány Kutatócsoport munkájába és hogy a biológia mellett a kémia tudományával is jobban megismerkedhessek.

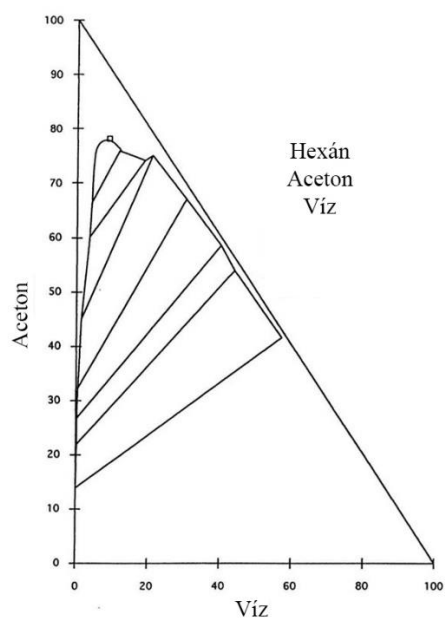
Köszönöm a kutatócsoport többi tagjának a munkám során nyújtott segítségüket és jó kedvüket, amellyel még jobbra tették a kutatással töltött időt.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Puskás Rebekának mindenért, amit tett, hogy ez az OTDK dolgozat létrejöhessen.

A kutatás a „Mikrobiális génbankhoz kapcsolódó integrált élettudományi és hatóanyag kutatás-fejlesztési centrum” (GINOP-2.3.3-15-2016-00006) és a NKFI K128659 és K139312 projektek támogatásával készült.

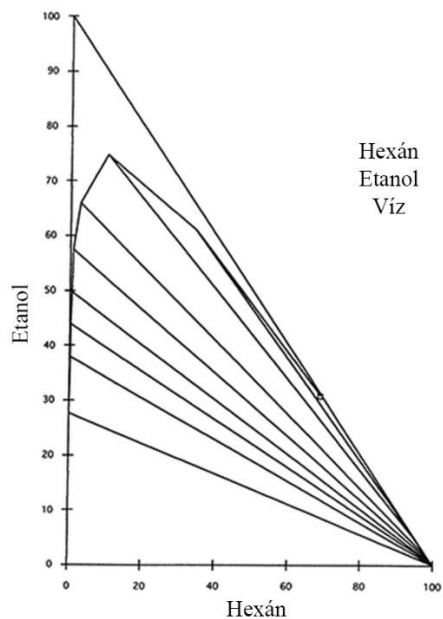
9. Mellékletek

A. melléklet Hexán/acetón/víz és Hexán/etanol/víz terner diagramja



Legjobb oldószer: Aceton.

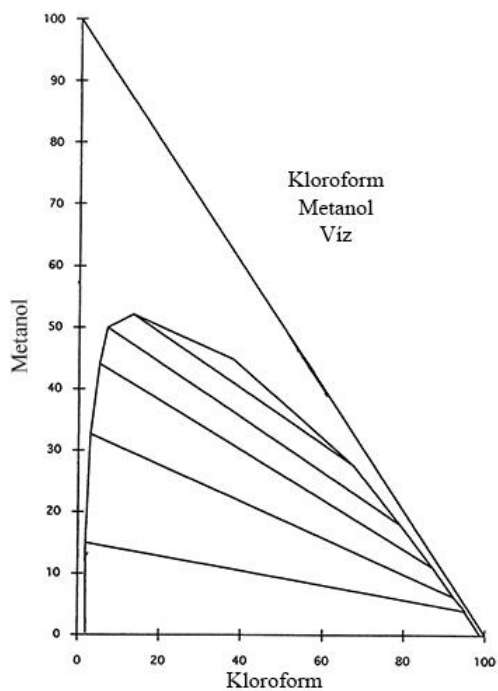
Megjegyzés: Magas acetón tartalmat tesz lehetővé.



Legjobb oldószer: Etanol

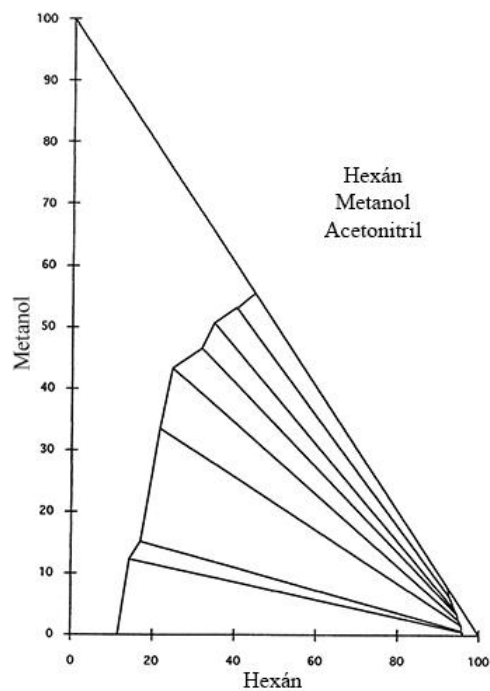
Megjegyzés: Hasonló a víz/metanol/hexán rendszerhez;
gradiens fordított fázisban van

B. melléklet Kloroform/metanol/víz és Hexán/metanol/acetonitril rendszer ⁵⁵



Legjobb oldószer: Metanol

Megjegyzések: Hasonló az 1,2-diklóretán/metanol
/víz rendszerhez.



Legjobb oldószer: Metanol

Megjegyzések: Vízmentes rendszer

C. melléklet Hexán/metanol/víz rendszer ternér diagramja 25 és 65 °C-on ⁵⁶

