

*Eszterházy Károly Főiskola, Élelmiszertudományi Intézet
Kémia, Borászati kémia és Borászat Tanszék*

Ózon hatásának vizsgálata mikotoxinok bomlására

Készítette
Szabó Sándor
Matematika-Kémia BSc
III.évfolyam

Konzulens
B. Tóth Szabolcs
adjunktus

Eger

2012

Tartalom

A vizsgálat elméleti alapjai	2
Általánosan a mikotoxinokról.....	3
Az vizsgálat során használt toxinok főbb jellemzői és tulajdonságai	7
Zearalenon.....	7
Deoxynivalenol	8
Nivalenol.....	9
Kísérleti leírás	10
Felhasznált anyagok:	10
Felhasznált eszközök:	10
Kimutatási módszerek érvényessége	11
Zearalenon kimutatásának paraméterei:	11
Deoxynivalenol kimutatásának paraméterei	11
Nivalenol kimutatásának paraméterei	12
Visszanyerési tesztek.....	14
Ózon előállítása:	15
Mikotoxinok ózonnal történő bontására végzett kísérletek.	18
Ózonnal történő bontási kísérletek Szűrőpapírcsíkon	18
Zearalenon esetében :.....	18
Deoxynivalenol esetében:	19
Nivalenol esetében:.....	20
Ózonnal történő bontási kísérletek gabonaszemen.....	22
Zearalenon esetében:.....	22
Deoxynivalenol esetében	23
Nivalenol esetében.....	24
Összegzés.....	25
Felhasznált irodalmak:.....	27
Melléklet.....	28

A vizsgálat elméleti alapjai

Az élelmiszer alapanyagok közé tartozó gabonafélék (búza, árpa, kukorica) mezőgazdasági termelésben történő termesztése során napjainkban egyre jobban előtérbe kerül a biogazdálkodás, amelyben a növényvédő szerek alkalmazása háttérbe szorul. Emiatt a növényeken megtelepedő gombák (penészgombák) száma jelentősen megnőtt a számukra egyre inkább kedvező életkörnyezet hatására. A penészgombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek (mikotoxinok) termelése, a penészgombák ilyen magas arányú elterjedése miatt szintén megnőtt, amely az élelmiszerek minőségében jelentős kockázatot jelent.

Az összes mikotoxin száma mintegy 300-500.000 db-ra becsült, ezek közül csupán 10-15 db a jelentős kárt okozó méreganyag. A mikotoxinok jelenlétének a megszüntetésére több beavatkozási helyen lenne lehetőség az élelmiszernövény fejlődése során, de sajnos sokszor már a learatott termény fertőzött a nem megfelelő és hiányos beavatkozások miatt. A learatott termények, így az élelmiszer alapanyagoknak felhasznált gabonák mikotoxin tartalma főleg a külső héj részén összpontosul. A külső héj részben lévő toxin elbontása illetve eltávolítása egy jó megoldás lehet a szennyezett gabona toxinmennyiségének csökkentésére.

A kidolgozott módszer alapja az ózon fertőtlenítő, oxidáló hatásában keresendő.

Az egyszerű technikával előállított ózon és a gabonaszem érintkezése során a szem külső héj részében feldúsult mikotoxin reagál az ózonnal, amely reakció végeredményeként a toxin elveszítheti mérgező hatását, más típusú vegyület keletkezik. Az ózon előállítása két különböző technikával történik, az első az ívfényes technika, a második technika az UVC (254nm) Germicid lámpás technika.

A kísérlet során zearalenon, deoxynivalenol és nivalenol mikotoxinok mennyiségének és minőségének a meghatározása történik ózonnal dúsított közegben HPLC-UV illetve HPCL-MS technika felhasználásával.

A vizsgálatok során először az ózon bomlásának mértékét, majd tiszta toxin bomlásának mértékét határozzuk meg modell rendszerben. Valós körülmények közötti meghatározás során a szennyezett gabonaszemek a toxin mennyiségének a változását vizsgáljuk a három toxinra. Vizsgáljuk az egyes mikotoxinok és ózon reakciója során keletkezett bomlástermékeket is, amelyek kémiai szerkezete és tulajdonsága lényegese a keletkező termékek esetleges toxicitása miatt.

Általánosan a mikotoxinokról

Az antibiotikumok megfigyelése az 1800-as évek végére tehető, amikor Pasteur mindenki számára jól ismert kísérletében észrevette, hogy egyes mikrobák hatással vannak a lépfene bacilusára és ugyanezt tapasztalták más baktériumok és gombák esetében is. Erre azonban az akkori időkben nem figyeltek fel az orvosok, és a mikrobiológusok is csak a primitív szervezetek létért való harcának tartották a folyamatot. Ezért az antibiotikumok felfedezése 1928-ig váratott magára, mikor Fleming a *Penicillium* penészgomba fajok baktériumölő aktivitását tanulmányozta, majd a későbbiekben a tenyészetükből izolált anyagot penicillinnek nevezte el. A penicillin felfedezésének nyilvánosságra hozása után számos antibiotikus hatású anyagot izoláltak különböző penészgombák tenyészetéből. Sokról kiderült, hogy mérgezőek lehetnek állatfajokra, így toxicitásuk miatt el sem jutottak a gyógyászati használatig. Ekkor egy új, általánosanak nevezhető felismerés látott napvilágot, mégpedig hogy a főleg a mikroszkopikus gombák egyes másodlagos anyagcsere termékei felelősek lehetnek állati és emberi betegségek kialakulásáért. Ez abban az időben merész, de egyben igen előrehaladott gondolat volt.

A mikotoxinok („mycos” (görög) gomba és „toxicum” (latin) mérge szavakból) penészgombák által termelt, emberekben és/vagy állatokban toxikus válaszokat indukáló anyagok, melyek széles körben elterjedtek. Előfordulásuk természetes, ezért potenciális, nem kiküszöbölhető veszélyt jelentenek. Elsősorban táplálkozás útján kerülnek be a szervezetünkbe, de bőrön keresztül, inhalálás útján is bejuthatnak: mikotoxikózist okoznak. Több, mint 400 mikotoxin ismert eddig, melyekből kiemelkedő humán- és állategészségügyi jelentőséggel kevesebb, mint 20 rendelkezik. Többségük kémiai struktúrájuk szerint 5 nagy csoportba sorolható:

1. ergotalkaloidok,
2. aflatoxinok,
3. trichotecének,
4. fumonizinek és
5. ochratoxinok.

A mikotoxinok léte közegészségügyi, mezőgazdasági és gazdasági szempontból fontos világméretű probléma. Ezt bizonyítja például a 2004 októberében hazánkban talált, aflatoxinnal jelentős mértékben szennyezett pirospaprika (az egészségügyi határérték 60-szorosát is elérte egyes mintákban a toxin koncentrációja). Elkerülhetetlen, hogy az

élelmiszerek, takarmányok ne fertőződjenek meg gombával a növény elültetésétől a szüretelés, szállítás és tárolás során, sőt még a bolti, éttermi, otthoni raktározás során is számolnunk kell a fertőzés megjelenésével. A toxintermelést számtalan tényező befolyásolhatja: maga a gomba faja, mechanikai sérülés, földrajzi hely, hőmérséklet és a páratartalom; ezért a penészgomba jelenléte nem jelenti a mikotoxin jelenlétét is egyben. Mivel a termelt toxinok gyakran nagyon stabilisak és az általános ételkészítési eljárásokkal szemben ellenállóak (amely esetekben főleg a hőhatással kell számolnunk), így az is lehetséges, hogy az élelmiszer tartalmaz toxint, bár a gomba már nincs jelen. Tény, hogy a mikotoxinok az egész világon elterjedtek, s az élelmiszerekből való teljes eltávolításuk esetleg megkötésük lényegében nem lehetséges, ezért nagy figyelmet fordítanak biológiai hatásaik vizsgálatára az egész világon. A mikotoxinok akut (heveny), szubakut (félheveny) és krónikus toxicitási tulajdonságot mutathatnak állatokban és az emberben, valamint néhány toxinnal ismert, hogy karcinogén, mutagén, teratogén hatású is lehet. . Epidemiológiai vizsgálati eredmények összefüggést mutatnak néhány, a természetben előforduló mikotoxin elterjedése, és a daganatos betegségekben szenvedő emberek nagyobb száma között. Az étkezés útján a szervezetünkbe kerülő karcinogének, úgy mint pl. a mikotoxinok, a mesterséges peszticidek, az adalékanyagok, és a főzés során keletkező pl. heterociklikus aminok közül kiemelkednek a természetes eredetű mikotoxinok, mivel a többihez képest sokkal nagyobb, százszor-ezerszer mérgezőbb a hatásuk és kémiaiilag igen ellenállóak.

A mikotoxinok okozta megbetegedések évszázadok óta ismertek. Már a XIII. században leírták a lovak tömeges megbetegedését és elhullását a Batu kán vezette hadjáratban. A leírások alapján ma már egyértelműen azonosítható, hogy a háttérben a stachybotriotoxikózis (*Stachybotrys alternans* és a *S. atra*) állt. Az első nagy néptömegeket érintő fertőzés, mikotoxin okozta betegség az anyarozs (*Claviceps purpurea*) mérgezés, az ergotizmus (ergot alkaloidok okozták) volt a középkorban, melyről csak az 1800-as években ismerték fel, hogy gomba eredetű.

A penészgombák által termelt mikotoxinok káros hatásaira a 60-as években egy pulykafarmon derült fény, ahol ugyanis a nagy mennyiségű állatpusztulás kapcsán derült ki, hogy penészgombák által termelt mérgeanyagok okozták.

Az élelmiszerbiztonság, azaz az egészségre nem káros, biztonságosan fogyasztható élelmiszerek, illetve a takarmányok biztonságának kérdése az utóbbi évtizedben különösen nagy hangsúlyt kapott. A táplálkozásban az élelmiszerek a szervezetre káros anyagokat tartalmazhatnak, amelyeknek számos hatásuk lehet az élőlényekre, ezen belül ránk emberekre

is. Ezen káros anyagok hatását számos tényező (kémiai, mikrobiológiai, élettani stb.) befolyásolhatja.

A mérgező anyagok körében potenciális veszélyforrást jelentenek a különböző gombafajok által termelt másodlagos anyagcseretermékek, a mikotoxinok, amelyek főként, de nem elsősorban gabonafélékben fordulnak elő. Emellett jelentős problémát jelent még a biotermékek egyre nagyobb fogyasztása, mert ezek esetében még nagyobb számban lehetnek jelen a mikotoxinok.

A nagy részben gabonát felhasználó állattenyésztés is veszélyeztetett; a gyengébb gyarapodástól, reprodukciós zavarokból, esetleg elhullásból eredő gazdasági problémák is nagy problémákat jelenthetnek. A mikotoxinok állati termékekben is jelentkezhetnek, az állati takarmányozásban felhasznált alapanyagokban és így az állati termékekben is kimutathatóak a toxinok vagy metabolitjaik, azaz az emberi fogyasztásra szánt élelmiszerekben is, ezáltal ezek minőségét is befolyásolhatják.

Külön probléma a biotermékek kérdése, ugyanis a problémák itt nagyságrendekkel nagyobbak, hiszen a hatékony növényvédő szerek túlnyomó többségének felhasználása ebben az ágazatban tiltott. A dolog azért ellentmondásos, mert a gyorsan lebomló, gyenge mérgeknek számító fungicideknél sokkal mérgezőbb nem bomló, és igen ellenálló gombatoxinok elkerülték a bioélelmiszereket előállító szervezetek és felhasználók figyelmét, és ezzel potenciálisan az a lakossági réteg vált kiemelten veszélyeztetetté, amely a természetes élelmiszerekben bíz.

A mikotoxinok különböző penészgombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, amelyek nagyon mérgezőek. Egészségkárosító hatásuk akár több százszorosan is nagyobb lehet az élelmiszerekben előforduló mérgező hatású anyagokhoz vagy növényvédő szerekhez viszonyítva.

Kémiai összetételük, szerkezetük és hatásmechanizmusuk nagyon sokféle. Antigén hatással nem rendelkeznek, általában kis molekulásúak, a környezeti hatásokkal szemben nagyon ellenállóak és nagy mértékben bírnak biológiai aktivitással. Általában kémiaiilag stabilak, a vegyi anyagok nagy részével szemben ellenállóak, és az élelmiszeriparban használatos hőhatásoknak is ellenáll. Az eddig azonosított mikotoxinok száma több ezres nagyságrendű ebből a ténylegesen mérgezőek száma nem sokkal több, mint 10 darab.

Az élelmiszerekben a penész jelenléte nem minden esetben jelenti a mikotoxinok jelenlétét, hiszen eddig nem megmagyarázott biokémiai inger hatására termelődnek ezek a mérgeanyagok. Képződésük történhet a gabonafélék betakarítása során, a tárolás és eközben a különböző műveletek során, de a leggyakoribb, hogy már a szántóföldeken kialakul. A

méreganyagot termelő gombák közül azokat, amelyek kialakulásához magasabb nedvességtartalom szükséges (20% fölött) szántóföldi penészeknek, azokat, amelyek kialakulásához ennél kisebb víztartalom is elegendő raktári penészeknek nevezzük. A csoportosítás ezen módja már nem állja meg a helyét, mivel igazolhatóan a raktári penészek is fertőznek szántóföldön és fordítva is.

Nézzük most meg a fontosabb toxintermelő fajokat az előbbi elv szerint csoportosítva:

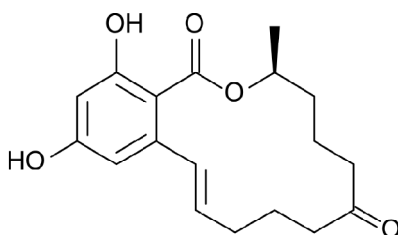
- raktári penészek: *Aspergillus* és *Penicillium* fajok
- szántóföldi penészek: *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Stachybotrys* fajok.

A méreganyagokat termelő gombafajoknak a vízhez való hozzáférés az alapvető életfeltétel, és a megfelelő hőmérséklet. Ha a gomba megfertőzi az adott növényt, akkor a páratartalom és a hőmérséklet jelentős befolyásoló tényezővel bír a növény növekedésével és egészségével kapcsolatosan. A tárolás során is felhalmozódhatnak a különböző mikotoxinok, olyan tényezők hatására mint, pl.: az állomány vízaktivitása, hőmérséklete, szellőzöttsége, rovarok és rágcsálók okozta károk, a mechanikai sérülések, és nem elhanyagolható a gombaszennyeződés koncentrációja sem.

Az vizsgálat során használt toxinok főbb jellemzői és tulajdonságai

A következőkben az általam használt mikotoxinok (zearalenon, deoxinivalenol, nivalenol) főbb jellemzőit és tulajdonságait írom le.

Zearalenon



1. kép: Zearalenon

A zearalenon (F-2 toxin) elsősorban búzában, árpában, rizsben, kukoricában és malátában képződik, leginkább a betakarítás előtt, de raktári penészként is ismeretes. Főleg felületi szennyeződésként jelenik meg a gabonaféléken és a malombéli feldolgozás során a korpába kerül. Popcorn és gabonapelyhek formájában jelenthet veszélyt a gyerekek számára, az újszülötteknél pedig az anyatejjel kiválasztott toxin.

Ez a mikotoxin heveny mérgezést nem okoz, rákkeltő hatása nem bizonyított. Ösztrogén hatású, ösztrogénkötő receptorokkal rendelkező szervekben károsodást okoz. Hímekben gátolja az ivarsejtképződést, amelynek súlyossága arányos a bevitt mennyiséggel és a méreg hatás időtartamával, nőstény állatok esetében a méh állandó állapota figyelhető meg. A méh és a petefészek működésének zavara figyelhető meg, a megtermékenyült pete beágyazódása akadályozottá válik, méh eredetű meddőség alakulhat ki.

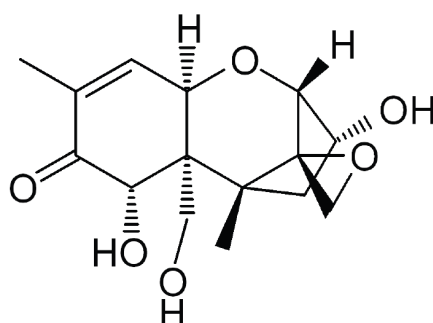
A toxinnal szembeni érzékenység fajonként jelentősen különbözik a toxin eltérő metabolizmusának és az eltérő ösztrogénkötő receptoroknak köszönhetően. Az emberek és a sertések kifejezetten érzékenyek erre a toxinra, ellenben a tyúkfélékkel és a szarvasmarhákkel. Az Európai Unió Élelmiszerügyi Tudományos Bizottság (ÉTB) a zearalenonra 0,2 µg/ttkg-os ideiglenes tolerálható napi beviteli szintet határozott meg, amely egy átlagos testsúlyú (70 kg) ember esetében napi maximum 14 µg ilyen toxint jelent.

A zearalenon hatásának klinikai tünetei a sertéseknél különböző koncentrációkra lebontva:

1. táblázat: Zearalenon hatásai különböző életkorú és nemű sertéseken [1]

állat	koncentráció (ppm vagy mg/kg)	hatás
Kocasüldő	3-5 ppm	megduzzadt péra, csecsbimbók és tögy duzzanata, petefészek és méhnyagbódás, méh ödéma, sárgatest visszamaradás és anösztrusz, hosszabbodik az ivari ciklus
Kocák	5-10 ppm	a fentieken kívül; álvemhesség (sárgatest visszamaradás miatt), kicsi alom nagyság, vetelés, malac születési testtömeg változása, növekszik a gyenge lábszétcsúszós malacok aránya, péra duzzanata, növekszik a választástól az újravemhesítésig
Kocák	30-60 ppm	embrió elhalás
Kanok	30-60 ppm	romló sperma minőség; több az abnormális sejt, csökkent libidó, szőrhullás
Minden állat		végbél és hüvely előesés, csökkent teljesítmény

Deoxynivalenol



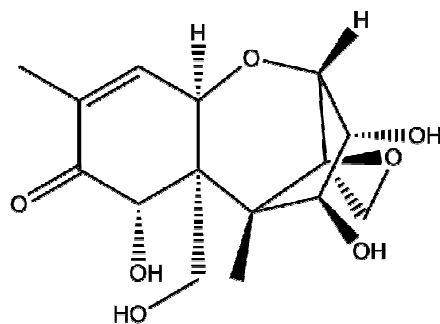
2. kép: Deoxynivalenol

A deoxynivalenolt vagy más néven DON, Vomitoxin, (12,13-Epoxy-3- α ,7- α ,15-trihydroxy-9-trichothecen-8-one) a *Fusarium* gombafajok termelik. A különféle gabonafélékben és a feldolgozott gabonatermékekben (sör, kenyér, maláta) fordulhat elő a leggyakrabban. Kémiai szerkezetét tekintve a DON a trichotecének csoportjába tartozik.

A legtöbb mikotoxinhoz hasonlóan kémiailag nagyon stabilak, a különböző hőhatásoknak is ellenállnak, továbbá a tárolás/örlés és élelmiszer feldolgozás/főzés során sem bomlanak le. Ha a takarmány DON-nal szennyezett az állatok visszautasítják, de ha mégis megeszik, akkor magasabb koncentrációban hányást okoz. Biológiai hatásuk közé tartozik, hogy erősen immunszuppresszívek, vagyis csökkentik a szervezet védekezőképességét. Nem karcinogének, nincsenek hormonális hatásaik és nem okoznak késői krónikus megbetegedéseket.

UV abszorpció maximuma irodalmi adatok szerint 218 nm.

Nivalenol



3. kép: Nivalenol

A nivalenol vagy NIV, (3,4,7,15-Tetrahydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on, $C_{15}H_{20}O_7$) a *Fusarium*, a *Stachybotrys* gombafajok termelik. Ez a mikotoxin is szennyezheti az élelmiszereket és a takarmánynövényeket, gabonákban fordul elő a deoxynivalenollal együtt. Káros hatásai (nagyobb koncentrációban): károsítja a csontvelőt, gátolja a fehérje-és DNS szintézist, lábbetegségek kialakulása, csökkenti a szervezet immunaktivitását. Egészségügyi határérték: 0,7µg/ttkg/nap.

UV abszorpció maximuma irodalmi adatok szerint 218 nm.

Kísérleti leírás

Felhasznált anyagok:

A felhasznált anyagok közül a zearalenon, deoxynivalenol és nivalenol a Sigma-Aldrich cégtől kerültek beszerzésre, keményítő, kálium-jodid a VWR cégtől, míg a kromatográfiás elválasztáshoz használt acetonitril a VWR cégtől (BDH Prolabo), a használt víz pedig saját előállítású desztillált víz volt, 0,22 μm -es membrán szűrőn történő szűrés után. Vezetőképessége 5 μS .

Felhasznált eszközök:

A kromatográfiás méréshez felhasznált folyadékkromatográf Merck-Hitachi (LaChrom) L7000 típusú folyadék kromatográf volt, amely a következő alegységekből állt: UV Detektor:L-7400, Pumpa:L-7100, Autosampler:L-7200, Kolonnatér:L-7360.

A kromatográfiás elválasztáshoz Restek Pinnacle RP C18 (250mm*4,6mm*5 μm) oszlopot használtam.

A kísérletekben az ózont UVC (germicid) lámpával, az ívkisülésnél házilag készített készülékkel dolgoztam.

Kimutatási módszerek érvényessége

Zearalenon kimutatásának paramétereit:

eluens: acetonitril/víz (v/v): 25/75

áramlási sebesség: 0,7 ml/perc

kolonna: Restek Pinnacle RP C18 (250mm*4,6mm*5µm)

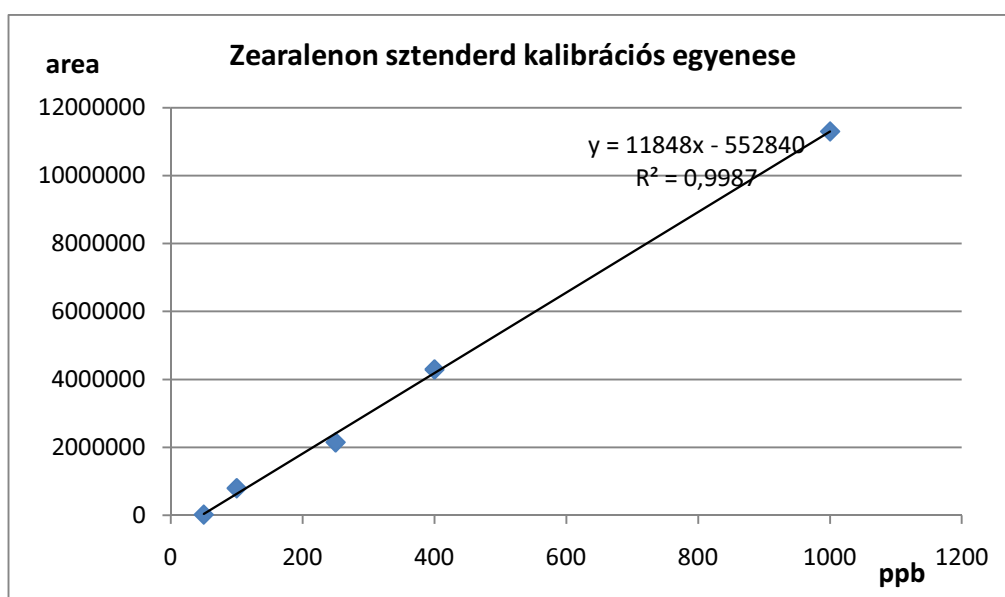
kolonna tér hőmérséklet: 40 °C

detektálási hullámhossz: 236 nm

injektált mennyiség: 10 µl

A diagramot 3 párhuzamos mérés adatai alapján készítettem el.

A sztenderd zearalenon oldatok koncentrációi 50, 100, 250, 400 és 1000 ppb (µg/kg) voltak.



1. diagram: zearalenon kalibrációs egyenese 236 nm-en

Deoxnivalenol kimutatásának paramétereit

eluens: acetonitril/víz (v/v): 25/75

áramlási sebesség: 0,7 ml/perc

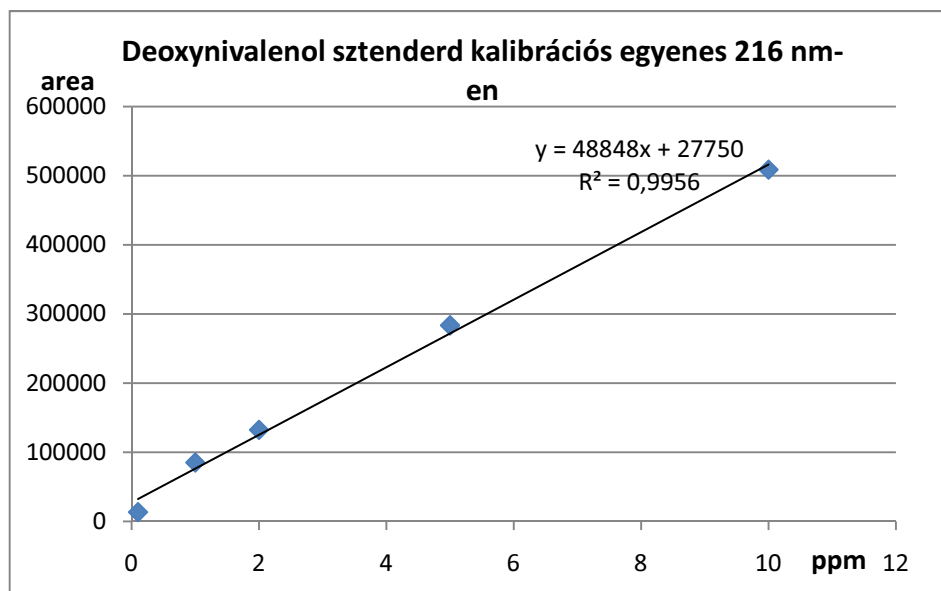
kolonna: Restek Pinnacle RP C18 (250mm*4,6mm*5µm)

kolonna tér hőmérséklet: 40 °C

detektálási hullámhossz: 216 nm

injektált mennyiség: 10 µl

A diagramot 3 párhuzamos mérés adatai alapján készítettem el. A sztenderd deoxynivalenol oldatok koncentrációi 0,1;1;2;5;10 ppm (mg/kg) voltak



2. diagram: deoxynivalenol kalibrációs egyenese 216 nm-en felvéve

Nivalenol kimutatásának paraméterei

eluens: acetonitril/víz (v/v): 25/75

áramlási sebesség: 0,7 ml/perc

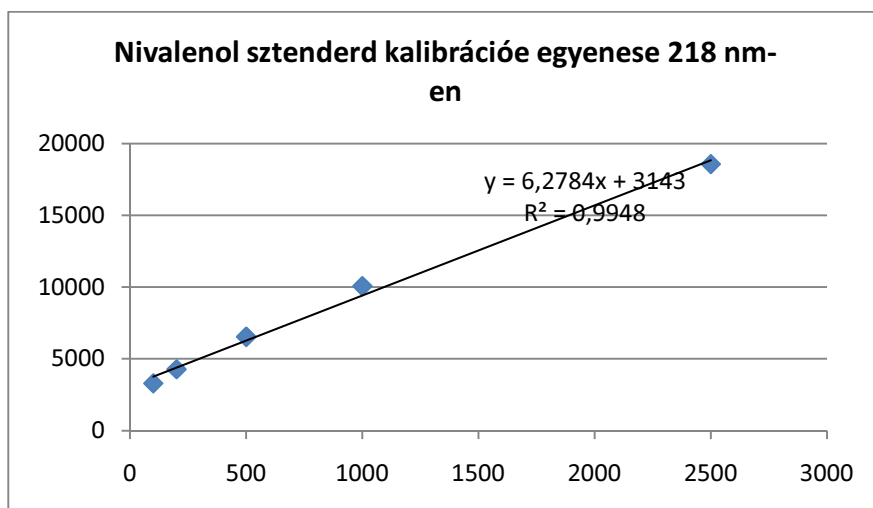
kolonna: Restek Pinnacle RP C18 (250mm*4,6mm*5 μ m)

kolonna tér hőmérséklet: 40 °C

detektálási hullámhossz: 218 nm

injektált mennyiség: 10 μ l

A diagramot 3 párhuzamos mérés adatai alapján készítettem el. A sztenderd nivalenol oldat koncentrációi 100, 200, 500, 1000, 2500 ppb (μ g/kg) voltak



3. diagram: Nivalenol kalibrációs egyenese 218 nm-en mérve

Visszanyerési tesztek

A mérés során felhasznált mikotoxinokkal visszanyerési tesztek végeztem bból a célból, hogy megállapítsam, a felvitt mennyiség hányad részét kapom vissza az extrakció során.

Az extraháláshoz acetonitrilt használtam.

Az extrahálás a szűrőpapír csíkkal végzett kísérletek során úgy történt, hogy 2 cm*1 cm-es szűrőpapír csíkokat vágtam, majd erre a csíkra tettem rá adott mennyiségű, 100 µl toxin oldatot 2 részletben. A toxin felvitele során ügyeltem arra, hogy a felvitt acetonitril elpárologjon a csíkról, és az összes toxin a csíkra jusson. Ezek után a csíkot összehajtottam, majd 1,5 ml-es mintatartó fiolába téve arra 1,00 ml acetonitrilt mértem, majd ultrahangos fürdőben 10 másodpercig extraháltam és mértem. Az extrakció papír csík esetében ebből a lépésből állt, ezzel kizáróltam ki az oldat többszöri kimérés és párolgásból származó hibát.

Szűrőpapírra csepegtetett mikotoxin (5 párhuzamos mérés) visszanyerése:

Deoxynivalenol: 92 ^{+/-} 3 %

Nivalenol: 89 ^{+/-} 5 %

Zearalenon: 91 ^{+/-} 4 %

A gabonaszemmel elvégzett visszanyerési tesztek során a gabonaszemre adott mennyiségű, 50 µl mikotoxin sztenderd oldatot vittem fel fél cseppenként, ügyelve arra, hogy a toxin oldat a szemre jusson és ne a petricsészébe, amelyben a toxin volt. Ezzel modelleztem a gabona külső héjában lévő mikotoxin mennyiségét.

A toxin oldat felvitele és a szem megszáritása után gabonaszemet 1,5 ml-es mintatartó fiolába tettem, majd 1,00 ml acetonitrilt méretem ki rá, ebben extraháltam ultrahangos fürdő segítségével 30 másodpercig, majd további 5 percig ultrahangos fürdő nélkül. Ezen idő alatt a zavarosodást okozó részek leülepedtek a mintatartó edény aljára. A továbbiakban az oldat tisztájából pontosan mért mennyiséget újabb mintatartó edénybe tettem és elemeztem a mikotoxin mennyiségét.

Gabonaszemre csepegtetett mikotoxin (5 párhuzamos mérés) visszanyerése:

Deoxynivalenol: 93 ^{+/-} 4 %

Nivalenol: 92 ^{+/-} 3 %

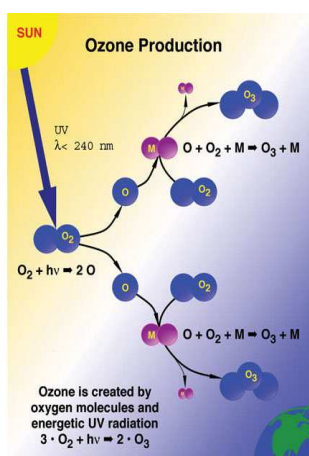
Zearalenon: 94 ^{+/-} 6 %

Ózon előállítása:

A kísérletben használt ózont a kísérlet helyszínén állítottam elő. Kettő különböző technikát próbáltam ki, amelyeket ismertetek.

Az első ózon előállítási technika az UVC ($\lambda=254\text{ nm}$) sugárzást használó technika volt. A kísérletben kettő különböző germicid lámpát használtam az egyik 8 W-os a másik 12 W-os teljesítményű lámpa volt. A kísérleti körülmények kidolgozása során egy 15 liter térfogatú Dewar palackba tettem bele a lámpákat, majd különböző ideig hagytam bekapcsolva a lámpát, úgy mint 5, 10, 20, 30 percig. A bekapcsolási idő alatt illetve a végén is vizsgáltam az edény légterét ózonra oly módon, hogy kálium-jodid és keményítő enyhén savas oldatával átitatott szűrőpapír csíkot tettem a légterbe, és figyeltem a színreakciót. A kísérlet során megállapítható volt, hogy a szűrőpapír csíkon a kálium-jodid/jód átalakulás sokkal intenzívebb és gyorsabb volt, amíg a germicid lámpa égett. 30 perc bekapcsolási idő után a lámpa kikapcsolása mellett a szűrőpapíron a reakció viszonylagosan gyorsult.

Ekkor meghatároztam az ózon tartalmát v/v%-ban az edénynek oly módon, hogy töményebb KI-os keményítő oldaton buborékolttam át a lombik egész tartalmát ügyelve arra, hogy inert gázzal – argonnal szorítottam ki a benne levő ózont. A KI-os keményítő oldatot ezután nátrium-tioszulfát oldattal titráltam, amely oldat fogyásából számoltam vissza az ózon mennyiségére. A következő eredményeket kaptam az ózon koncentrációjára és eltarthatóságára. Az eltarthatósági kísérletet úgy végeztem el, hogy a besugárzási időt fixen tartva, (a mérések között levegővel köblítve a palackot) lámpa kikapcsolása után a megadott időt vártam, és az idő elteltével buborékolttam át a gázt a KI- keményítő oldaton, majd titráltam.



4. kép: Ózon előállítás sematikus ábrája UVC sugárzás hatására



5. kép: a kísérlethez használt germicid lámpák

Ózon koncentráció a tárolóedényben 30 perc UVC sugárzás után 12 W-os lámpával:

2 % (30 perc UVC besugárzás után)

Ózon koncentrációcsökkenés:

1 óra után: 1,5 v/v%

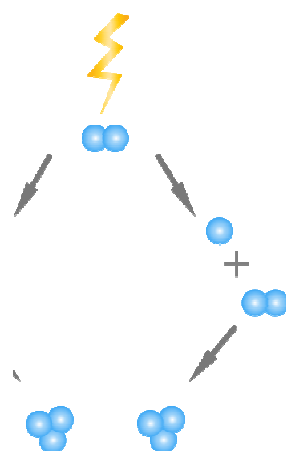
2 óra után: 1 v/v%

3 óra után: 0,2 v/v%

Az ózon előállításának másik módjaként az ívfényes technikát választottam, ezt a technikát hasonlítottam össze a germicid lámpás technikával.

Az ívfényes ózon előállítás lényege, hogy nagyfeszültséggel elektromos ívet húzunk kettő vezető között. Az elektromos ív hatására a levegőben lévő oxigén molekulák egy része felbomlik, reaktív oxigén atomok keletkeznek, amelyek reakcióba lépnek a még nem bomlott oxigén atomokkal. A rekombináció eredményeként ózon (O_3) keletkezik. Persze a hatásfok nem 100 %-os, mivel a keletkezett oxigén atomok nagy része visszaalakulhat oxigén molekulákká, illetve elreagálhat más anyagokkal.

A kísérlethez a nagyfeszültséget trafó segítségével állítottam elő, az ívkisülést pedig kettő réz elektród között hoztam létre. Az ívkisülés összes idejét itt is változtattam, 5, 10, 15, 20 perces időkből. Az ózon bejuttatására több kísérletet tettem a technika kidolgozása során (ventilátor, sűrűségkülönbség kihasználása), de a legalkalmasabb és legbiztosabb az volt, hogy a réz drótokat az edényzet belsejébe helyeztem, majd az ívet az edény belsejében hoztam létre a két elektród között. A vizsgálatok alapján 10 perc idő elégnek bizonyult az ózon elég magas koncentrációjának előállítására. Az ózon mennyiségét a fent leírtak alapján határoztam meg itt is. A következő eredményeket kaptam.



tására keletkező ózon sematikája



rkészített ívfényes ózon előállító

Ózon koncentráció a tárolóedényben:

10 % (10 perc elteltével)

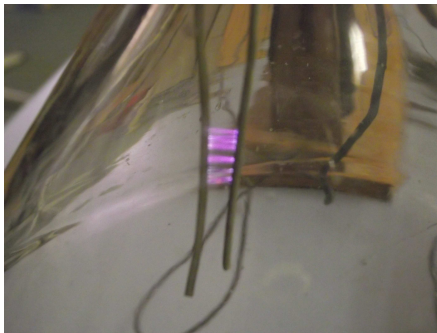
1 óra után: 10%

2 óra után: 8 %

3 óra után: 7 %

5 óra után: 6%

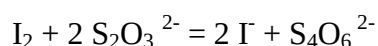
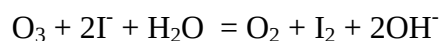
24 óra után: 0,5 %



8. kép: ívfény az ózonizátorban

Az ózon mennyiségének a kimutatása jodometriás módszeren alapul:

Egy szűrőpapírra kálium-jodidot és keményítőt csepegtünk és enyhén savanyítjuk. Ez a szűrőpapír ózondús környezetbe helyezve azonnal kék színű lett, azaz jódkiválás történik, amelyet a jód-keményítő színe jelez.



Az ózon viszonylag állandónak mondható, hiszen különböző időközönként megvizsgálva, 2, 5, 10, 15, 20, 30 perc után is jelen volt a légmentesen lezárt tárolóedényben. Sőt még 24 óra elteltével is!

Az ózon előállítási kísérletek eredményeként megállapítottam, hogy a hatásosabb ózon előállítás az ívfényes technika segítségével értem el, amely során nagyobb mennyiségű ózon keletkezett, mint a germicid lámpa használata során.

A keletkezett ózon tárolhatósága szempontjából nem vért eredményeket kaptam. Az előállított ózont még 24 óra múlva is ki lehetett mutatni. ennek a jelentősége abban rejlik, hogy a kísérlet során az egymás utáni párhuzamos toxin bontási kísérletekben biztosra vehetem, hogy az edényem tartalmaz ózont, és nem bomlik el gyorsan, még a vizsgálat előtt.

Mikotoxinok ózonnal történő bontására végzett kísérletek.

Ózonnal történő bontási kísérletek Szűrőpapírcsíkon

A kísérletben zearalenon, deoxynivalenol és nivalenol toxinokat használtam.

A kísérlet során a fentebb leírt módon ívfényes technikával ózont állítottam elő a Deward edényben. A kísérlet első lépéseként a természetes mátrix hatás elkerülése végett a toxin bontási kísérletete szűrőpapíron végeztem el oly módon, hogy 1 cm széles és 4 cm hosszú szűrőpapír csíkokat vágtam, amelynek a végére (körülbelül 1 cm² részre) vittem fel adott mennyiségű toxin (100 µl) oldatot.

A felvitt toxin oldatok koncentrációi a következők voltak:

zearalenon: 25 ppm (mg/l) acetonitrilben oldva

deoxynivalenol 10 ppm (mg/l) acetonitrilben oldva

nivalenol 5 ppm (mg/l) acetonitrilben oldva.

A felvitel során ügyeltem arra, hogy az acetonitril elpárologjon a szűrőpapírról, ezért több részletben vittem fel a toxin oldatot.

A toxin oldat beszárítása után csipesz segítségével az ózont tartalmazó edénybe helyeztem különböző időközökre a papír csíkokat. A toxin ózonos közegben tartózkodásának idői a következők voltak: 5, 10, 20, 30, 60 másodperc. A kontakt idő letelte után az állandó ózonkoncentráció biztosítása miatt a készülékben 1 percig újra fejlesztettem ózont az ívfény segítségével.

A vizsgálatokat 3 párhuzamos mérés alapján végeztem el mindegyik eltérő kontaktidő szerint. A kontakt idő leteltével a szűrőpapír csíkokat összehajtottam, majd 1,5 ml-es fiolába téve 1,00 ml acetonitril tettem rá. Az extrakciót 10 mp ultrahangozással segítetttem elő, amely után a minták toxin tartalmát elemeztem HPLC-UV technika segítségével.

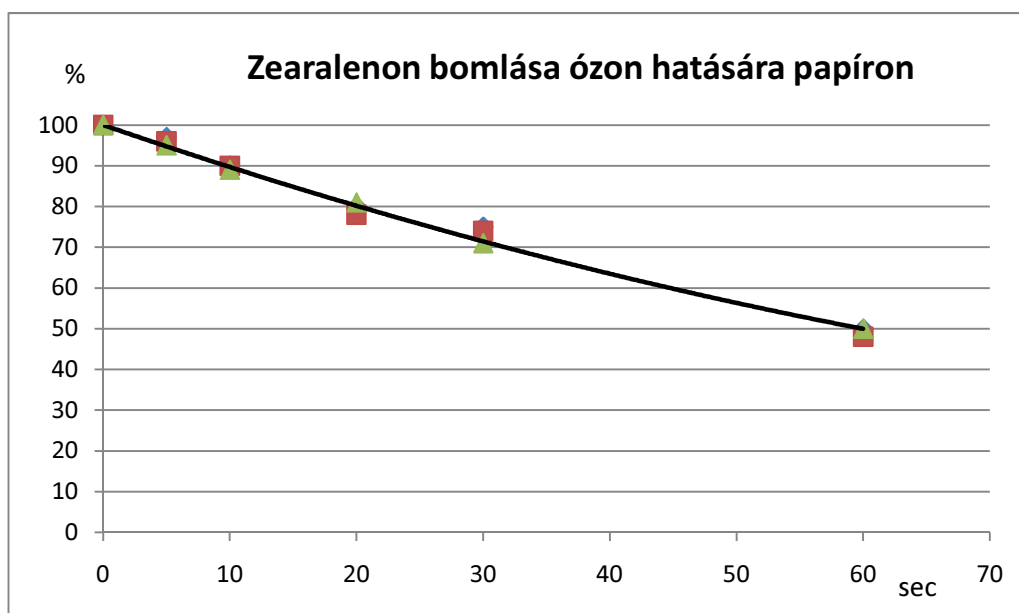
A következő eredményeket kaptam:

Zearalenon esetében :

2. táblázat: zearalenon bomlásának mértéke szűrőpapíros kísérletben ózon hatására

kontakt idő (sec)	0	5	10	20	30	60
el nem bomlott toxin (%)	100	97	90	80	75	50
	100	96	90	78	74	48
	100	95	89	81	71	50
rsd (%)	-	1,0000	0,5774	1,5275	2,0817	1,1547

Az eredményekből a következő diagramot kaptam:

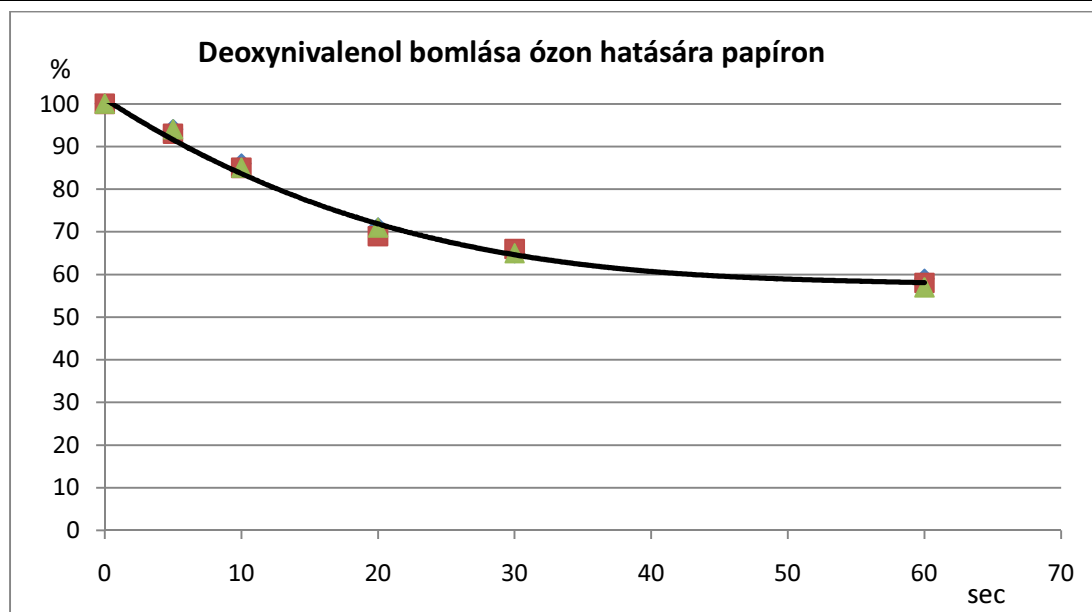


4. diagram: Zearalenon bomlásának diagramja szűrőpapíron ózon hatására

Deoxinivalenol esetében:

3. táblázat: Deoxynivalenol bomlásának mértéke ózon hatására

kontakt idő (sec)	0	5	10	20	30	60
el nem bomlott toxin (%)	100	94	86	71	65	59
rsd (%)	0,0000	0,5774	0,5774	1,1547	0,5774	1,0000

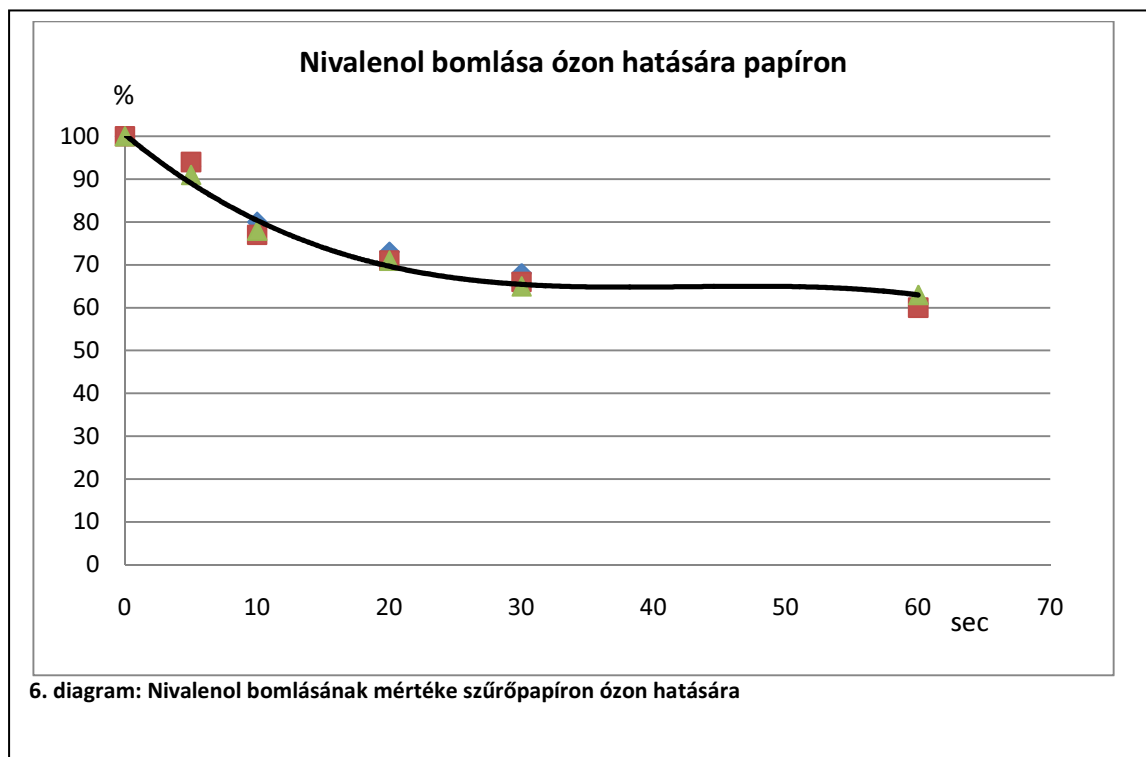


5. diagram: Deoxynivalenol bomlása ózon hatására szűrőpapíron

Nivalenol esetében:

4. táblázat: Nivalenol bomlásának adatai ózon hatására szűrőpapíron

kontakt idő (sec)	0	5	10	20	30	60
el nem bomlott toxin	100	93	80	73	68	61
(%)	100	94	77	71	66	60
rsd (%)	0,0000	1,5275	1,5275	1,1547	1,5275	1,5275



Az adatokból látszik, hogy az ózonnak volt hatása a toxinra, mégpedig csökkentette az a toxin mennyiségét minden esetben. Az 5 másodperces kontakt idejű mintáknál legjobban a Nivalenol esetében csökkent a mennyisége, majd a deoxynivalenol illetve a zearalenon. Az eltérés a három toxin bomlása között csekély. 10 másodperces kontakt időnél szintén a nivalenolnak, majd a deoxynivalenolnak és a zearalenonnak csökkent a mennyisége a legjobban. A 20 másodperces kontakt időnél a deoxynivalenol bomlásának mértéke megelőzte a nivalenol és a zearalenon bomlásának mértékét, ami a 30 másodperces mintánál is hasonló eredményt mutat. Érdekes a 60 másodperces kontakt idejű mintáknál a zearalenon bomlott a legnagyobb mértékben, majd a deoxynivalenol és a nivalenol. Ezen eredmények alapján kimondható, hogy a zearalenonnak kell a legnagyobb kontakt idő ózonban a bomláshoz, majd a deoxynivalenolnak, illetve a nivalenolnak szűrőpapíros minta esetében. Lényeges

megjegyezni, hogy a szűrőpapíron elméletileg a toxinok a felviteli részen azonos mértékben, egyenletesen vannak eloszlalva. Az egymásra rétegződő toxinok rétegei nem valószínűsíthetők, ezért a lehető legnagyobb felületen érintkezhet a toxin az ózonnal. A görbék lefutási alakjából megállapítható, hogy a nivalenolnak a bomlása valószínűleg megáll, vagy kevésbé bomlik tovább, míg a deoxynivalenolnak a bomlása nem lassul le annyira, mint a nivalenolnak. A zearalenont nézve a toxin bomlása majdnem egyenes mentén történik, ami érdekes abból a szempontból nézve, hogy több kontakt idő valószínűleg nagyobb százaléku zearalenont bont, mint nivalenolt és deoxynivalenolt, illetve a toxin mennyiségének a csökkenése nem áll meg a görbe alapján, vagyis elméletileg teljesen el lehetne bontani ezen adatok alapján.

A görbéket elemezve feltételezhető egy olyan intermedier termék a nivalenolnál illetve a deoxynivalenolnál, amely reakcióba lép az ózonnal, vagy „védő” hatást fejthet ki a toxinra, amely a zearalenonnál nem mondható el. A bomlás mértékeinek arányában nagy szerepet játszhat a molekula szerkezete is.

Ózonnal történő bontási kísérletek gabonaszemen.

A gabonaszemen történő bontási kísérletekben toxinmentes gabonaszemeket használtam. A toxin mentességről a saját vizsgálati módszerrel győződtem meg. Az extrakcióra a gabonaszemekből 10 db-ot tettem 4 ml-es fiolába, amelyre 2 ml acetonitrilt tettem. Ultrahangos fürdő segítségével extraháltam 10 mp-ig, majd további 5 percet a gabonaszemekben tartottam az acetonitrilt. A minta leülepedése után a tisztáját leszedtem, majd ha további tisztítást igényelt, centrifuga segítségével a lebegő anyagoktól 10.000 fordulat/percen megtisztítottam. Ezek után mértem a toxin tartalmát a 3 toxinra.

A toxin szennyezés során a gabonaszemre részletekben 50 µl toxin oldatot juttattam, ügyelve arra, hogy az acetonitril elpárologjon a szemről, és a toxin oldat a szemre menjen. Minden esetben 3 gabonaszemmel végeztem el a párhuzamos kísérletet.

A felhasznált toxin oldatok koncentrációi a következők voltak:

zearalenon: 25 ppm (mg/l) acetonitrilben oldva

deoxynivalenol 10 ppm (mg/l) acetonitrilben oldva

nivalenol 5 ppm (mg/l) acetonitrilben oldva.

A toxinnal szennyezett gabonaszemet csipesz segítségével az ózonos közegbe helyeztem adott ideig, amelyek a következők voltak:

kontakt idő: 5, 10, 20, 30, 60 másodperc.

A kontakt idők letelte után az állandó ózonkoncentráció biztosítása miatt a készülékben 1 percre újra fejlesztettem ózont az ívfény segítségével.

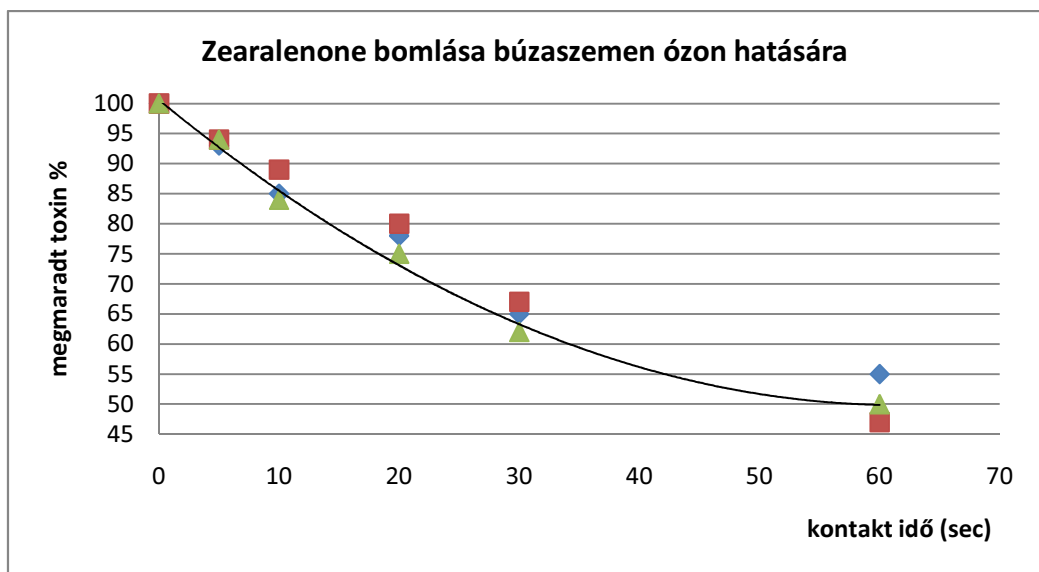
A kontakt idő letelte után a szemeket 1,5 ml-es fiolába tettem, amelyekben 500 µl acetonitrilt mértem rájuk, és 10 másodpercig ultrahangos fürdő segítségével extraháltam, majd 5 percet hagytam az acetonitrilen. Az oldat letisztulása után a tisztáját elválasztottam, ha nem volt megfelelően tiszta, centrifugálás segítségével tisztítottam, majd elemeztem.

A következő eredményeket kaptam:

Zearalenon esetében:

5. táblázat: Zearalenon bomlásának adatai gabonaszemen ózon hatására

kontakt idő (sec)	0	5	10	20	30	60
el nem bomlott toxin (%)	100	93	85	78	65	55
	100	94	89	80	67	47
	100	94	84	75	62	50
rsd (%)	0,0000	0,5774	2,6458	2,5166	2,5166	4,0415

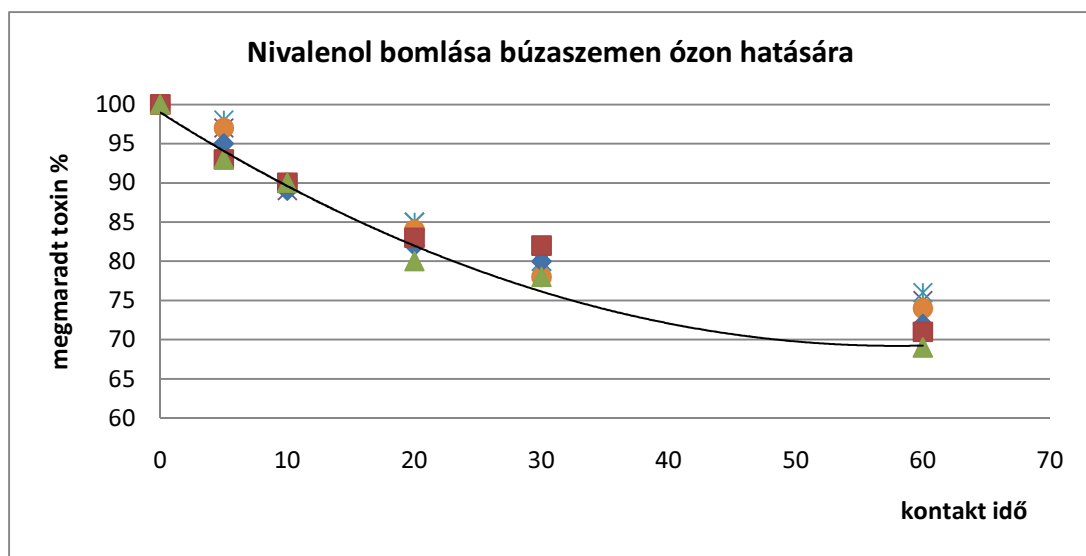


7. diagram: Zearalenon bomlásának mértéke ózon hatására gabonaszemen

Deoxynivalenol esetében

6. táblázat: Deoxynivalenol bomlásának adatai gabonaszemen ózon hatására

kontakt idő (sec)	0	5	10	20	30	60
el nem bomlott toxin (%)	100	97	89	85	80	75
rsd (%)	0,0000	0,5774	0,5774	0,5774	1,1547	1,0000

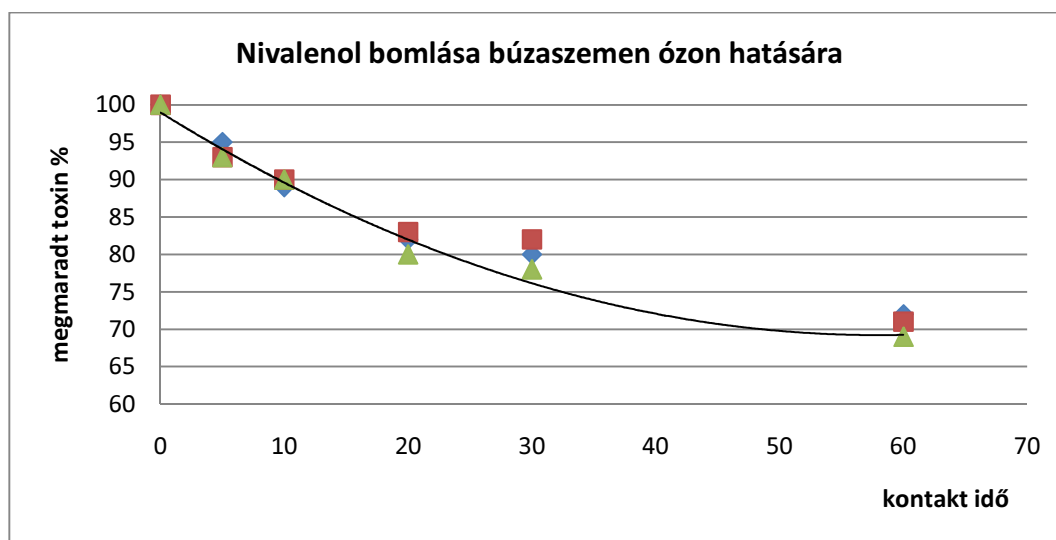


8. diagram: Nivalenol bomlásának mértéke gabonaszemen ózon hatására

Nivalenol esetében

7. táblázat: Nivalenol bomlásának adatai gabonaszemen ózon hatására

kontakt idő (sec)	0	5	10	20	30	60
el nem	100	95	89	82	80	72
bomlott	100	93	90	83	82	71
toxin (%)	100	93	90	80	78	69
rsd (%)	0,0000	1,1547	0,5774	1,5275	2,0000	1,5275



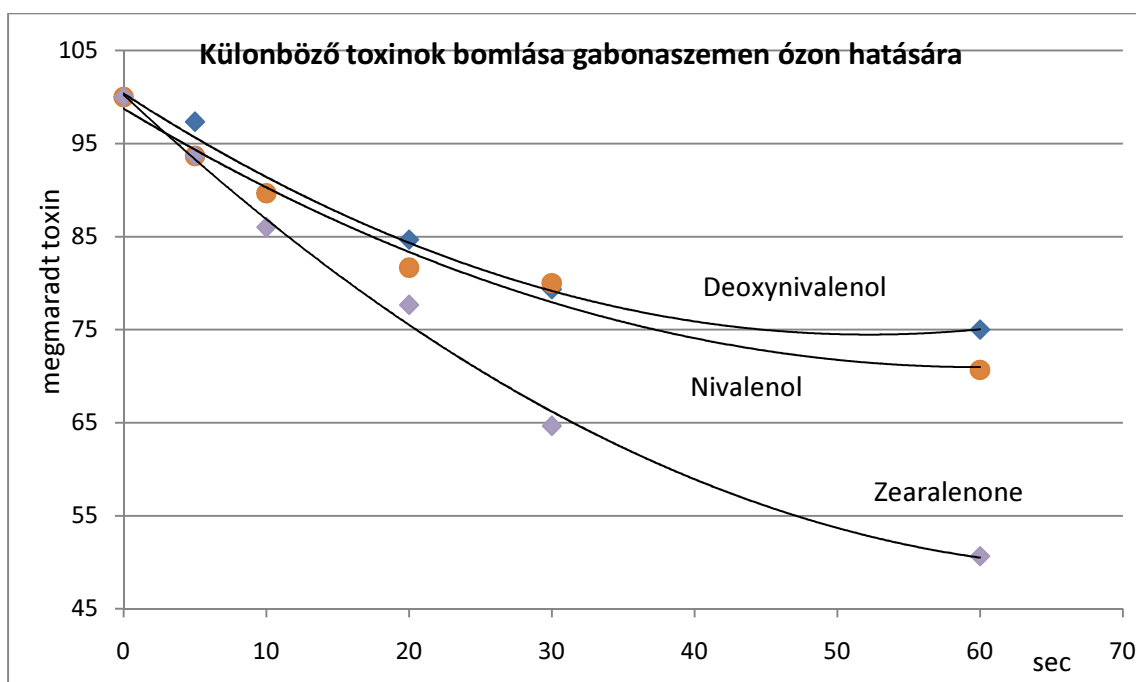
9. diagram: Nivalenol bomlásának mértéke ózon hatására gabonaszemen

Összegzés

Összességében megállapítható, hogy a búzaszemeket történő toxin bontás ózon hatására az 5 másodperces kontakt időnél a zearalenon és a nivalenol esetében közel azonos eredményt hozott, míg a deoxynivalenol kevésbé bomlott. A 10 másodperces kontakt idő esetében a zearalenon jobban bomlott 1-2 %-al, mint a másik két toxin, amely pár százalékkal nagyobb mértékű bomlás a 20 másodperces kontakt időnél is megmaradt a zearalenon javára. A 30 másodperces mintáknál a zearalenon mennyiségének bomlása több mint 10 %-al nagyobb, mint a közel azonos mértékben bomló deoxynivalenol és nivalenol bomlási aránya. A 60 másodperces mintánál ismét a zearalenon toxinból bomlott el több, mint a másik két toxinból, bár a nivalenolból több bomlott el mint a deoxynivalenolból.

A bomlás mértékének eltérésében - a szűrőpapíros mintákhoz képest – szerepet játszhat a szerves minta mátrixa. Az általunk prognosztizált eredmény az volt, hogy a gabonaszemen kisebb lesz a toxinok bomlása, mint szűrőpapíron, mivel a gabonaszemek sok más szerves és szervetlen, bioszervetlen anyagot tartalmaznak, amelyek védhetik a toxint, illetve a toxin a gabonaszem mélyebb rétegeibe is behatolhat (acetonnitril „felpuhítja” a héj részt, ami miatt a toxin mélyebbre juthat), ami miatt az ózon nem éri el, nem lép reakcióba vele. Így kevésbé fognak a toxinok bomlani, mint szűrőpapíron. Ezen feltételezés ellentettjét kaptuk, az ellenkező esetet bizonyítják a mérések.

A következő ábrán összefoglaltam a különböző toxinok gabonaszemen történő bontásának eredményeit.



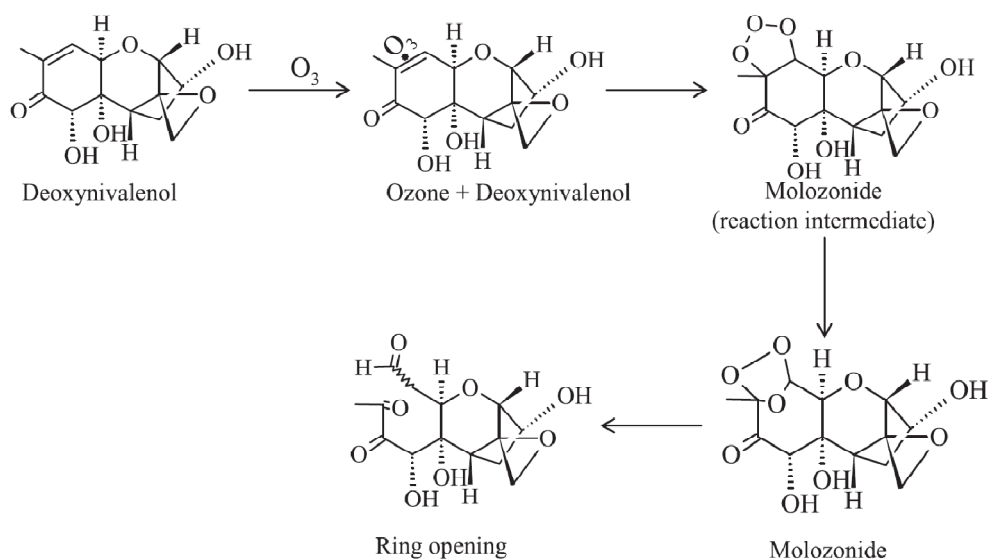
10. diagram: deoxynivalenol, nivalenol és zearalenon bomlásának mértéke gabonaszemen ózon hatására

Összességében el lehet mondani, hogy a vizsgált mikotoxinok mennyiségét csökkenti az ózon, vagyis az eredeti toxin mennyisége csökken. A valós körülményeket modellező gabonaszemen történő toxin bontás mértékével kapcsolatban is elmondható, hogy mindegyik vizsgált toxin bomlott az ózon hatására a gabonaszemen, igaz eltérő mértékben. A vizsgált toxinok bomlásának mértéke a kontakt idő növelésével nőtt.

A toxinok bomlásából származó termékek mérgező jellege lehet a következő felmerülő kérdés, úgy mint a zearalenonnál is feltételezhetően keletkezhet peroxid kötést tartalmazó vegyület, amely az élő szervezet számára ismét mérgező vegyületként szerepelhet.

A deoxynivalenol esetében B.K. Tiwari és munkatársai [1] vizsgálatai alapján a deoxynivalenol esetében gyűrű felhasadás keletkezik és ez által új, nem mérgező termék keletkezik.

A jelenleg folyó vizsgálatok során a toxinokból keletkezett bomlástermékeket próbálom azonosítani HPLC-ESI/APCI-MS technika segítségével.



9. kép: deoxynivalenol bomlása ózon hatására [2]

Felhasznált irodalmak:

- [1] www.kfki.hu=chemonet=osztaly=eloadas=mesterhazya.html
- [2] B.K. Tiwari , C.S. Brennan, T. Curran, E. Gallagher, P.J. Cullen, C.P. O' Donnell:
Application of ozone in grain processing, *Journal of Cereal Science* 51 (2010) 248–255
- [3] *FILIP KOTAL and ZUZANA RADOVÁ*: A Simple Method for Determination of
Deoxynivalenol in Cereals and Flours, *Czech J. Food Sci. Vol. 20, No. 2*: 63–68
- [4] www.knowmycotoxins.com=hu=npig8.htm

Melléklet

D-7000 HSM: Samples

Series: 0384

Report: original

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 03/09/11 06:13 PM

Reported: 12.06.14 20:57

Processed: 03/09/11 06:30 PM

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0384\

Processing Method: zearalenon

System(acquisition): Sys 1

Series:0384

Application: Samples

Vial Number: 36

Sample Name: ZEA std

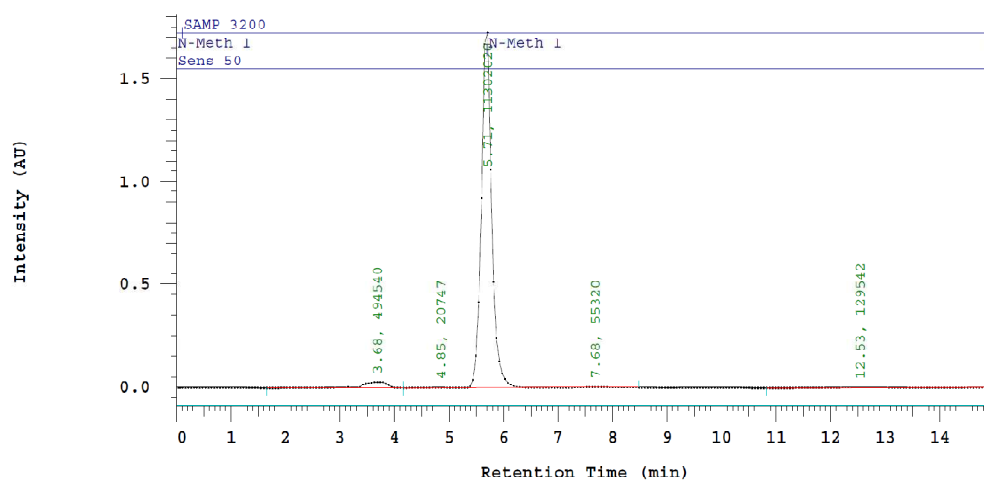
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: zearalenon

10. kép: Zearalenon sztenderd (1000 ppb) kromatogramja 236 nm-en.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12.02.17 18:15

Reported: 12.06.14 21:51

Processed: 12.02.17 18:27

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0167\

Processing Method: nivalenol_120216

System(acquisition): Sys 1

Series: 0167

Application: Samples

Vial Number: 22

Sample Name: NIV_45ppb

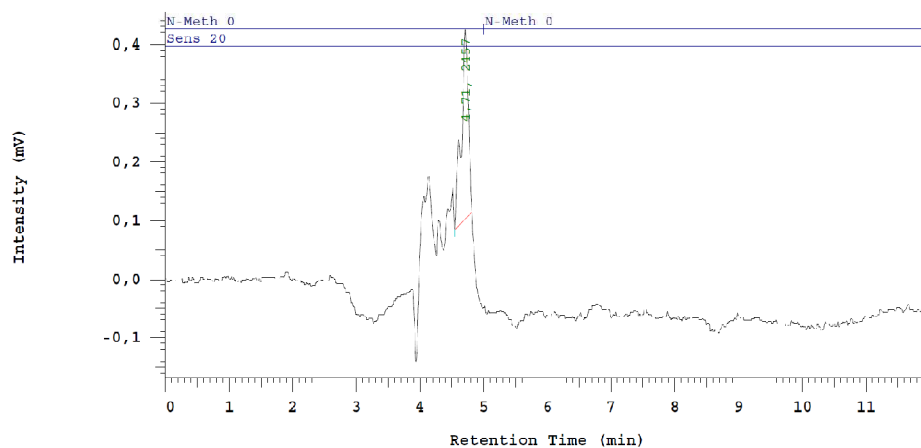
Vial Type: STD4

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10,0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

**11. kép: nivalenol sztenderd 45 ppb kromatogramja 216 nm-en.**

