



AZ EMÉSZTÉSSZIMULÁCIÓS VIZSGÁLATOK JELENTŐSÉGE A FUMONIZIN MIKOTOXIN BIOLÓGIAI HOZZÁFÉRHETŐSÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSÁBAN

Varga-Szatmári Viktória^{1,2}, Vargáné Visi Éva¹, Bóta Brigitta², Péterfi-Szabó Dóra¹, Gömbös Patrik¹, Kovács Melinda^{1,2}

¹Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élettani és Takarmányozástani Intézet, Élettani és Állategészségügyi Tanszék, Agrár Biotechnológia és Precíziós Nemesítés az Élelmiszerbiztonságért Nemzeti Laboratórium, Kaposvár, 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.

²HUN-REN-MATE Mikotoxinok az Élelmiszerláncban Kutatócsoport, Kaposvár, 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.

ÖSSZEFOGLALÁS

A fumonizin mikotoxinokat a *Fusarium verticillioides* mellett más penészgombák is termelik. Az intakt FB1-en kívül számos más FB1-formák is ismertek, melyek különböző kémiai, biokémiai, fizikai hatásokra jönnek létre. Az FB1 egy része mátrixhoz kötötten van jelen a táplálékban, amely emésztés során a mátrixból kiszabadulva, a vékonybélben képessé válik a felszívódásra. Az élelmiszer vagy takarmány FB1-tartalmán kívül ezért célszerű azt is meghatározni, hogy az FB1-nek mekkora a biológiai hozzáférhetősége, azaz milyen mennyiség áll belőle rendelkezésre potenciálisan a felszívódásra. Munkánk során Brodkorb és mtsai. (2019) által leírt INFOGEST statikus in vitro emésztési modellt alkalmaztuk annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az emésztés során a FB1-gyel szennyezett sertéstápból oldatba jutó FB1 mennyiségét, és ezt összehasonlítsuk az emésztés előtt mért mennyiséggel (HPLC-MS). Megállapítható volt, hogy az in vitro emésztési folyamat végén több volt az oldott formájú FB1 az emésztési modellben, mint amennyi FB1-et az emésztésre bemért táp a kémiai analízis alapján tartalmazott ($p < 0,01$). A szimulált emésztés hatására tehát a FB1 egy olyan hányada is felszabadult a mintából és mérhetővé vált, amely nem volt kimutatható az emésztés előtti mintából.

ABSTRACT

Fumonisin mycotoxins are also produced by other moulds besides *Fusarium verticillioides*. In addition to intact FB1, several other forms of FB1 are known, which are formed by various chemical, biochemical and physical effects within the plant and animal organisms, as well as by food and feed processing. Part of FB1 is present in the food or feed bound to a matrix, which may be released from the matrix during digestion. The FB1 released from the matrix becomes capable of being absorbed in the small intestine. Therefore, in addition to the FB1 content of the food or feed, it is also useful to determine the bioaccessibility of FB1, i.e. the amount of FB1 potentially available for absorption. In our work, we adapted the INFOGEST static in vitro digestion model described by Brodkorb et al. (2019) to investigate the amount of FB1 in solution during digestion in the digestion model and compare this with the amount before digestion (HPLC-MS). It was found that at the end of the in vitro digestion process, there was significantly more dissolved amount of FB1 in the digestion model than the amount of FB1 in the feed before, analysed by the routine LC-MS methodology ($p = 0.01$). The difference may be attributed to the partial release of hidden FB1 during simulated digestion.

BEVEZETÉS

A fumonizinek olyan másodlagos anyagcseretermékek, amelyeket penészgombák termelnek, elsősorban a *Fusarium* fajok, de más penészgombafajok is termelhetik ezeket a metabolitokat. Ezek közé tartozik az *Aspergillus niger* és a *Tolypocladium* nemzetség néhány faja (Frisvad és mtsai., 2007; Mogensen és mtsai., 2010). A fumonizinek több csoportja (A, B, C, P) közül a B csoport (B1, B2, B3, B4) a legjelentősebb, melyen belül a fumonizin B1 (FB1) a legtoxikusabb és a legnagyobb mértékben termelődő fumonizin B analóg. A fumonizinek elsősorban gabonát (kukorica, búza, árpa) szennyeznek.

A FB1 számos formája ismert, melyek a szabad formán kívül különböző fizikai, kémiai és biológiai hatás révén jönnek létre a növényi és állati szervezeten belül, valamint a takarmány-, és az élelmiszergyártás során.

A nomenklatura a módosított formákat a szerkezetükben bekövetkező változások és a takarmány, illetve élelmiszer-komponensekhez való kapcsolódásuk szerint különböző elnevezéssel illeti (Rychlik és mtsai., 2014). A legjelentősebb módosított formák a hidrolizált fumonizin, vagy más néven aminopentol (HFB/AP) és a részben hidrolizált fumonizin (pHFB) (EFSA, 2018a). A módosított formák biokémiai vagy kémiai úton jönnek létre (Rychlik és mtsai., 2014). A szerkezeti változást többféle okra lehet visszavezetni. A növények és az állatok a toxin ellen különbözőképpen védekeznek. A védekezési mechanizmus egyféle biotranszformációban nyilvánul meg, amely oxidáció, hidrolízis, redukció vagy konjugáció révén megváltoztatja a fumonizin eredeti szerkezetét. A növényi szervezet a toxin ellen enzimatis módon védekezik, ami úgynevezett „maszkolt” fumonizint hoz létre. Ez jellemzően olyan konjugált FB1-formákat eredményez, melyek kovalens kötéssel szulfát-, glikozid-, vagy aminocsoportokhoz kapcsolódnak (Matos és mtsai., 2024, Lu és mtsai., 2020). Az állati szervezeten belül általában a FB1 hidrolízise valósulhat meg, mely jellemzően HFB-t vagy pHFB-t eredményez (Lu és mtsai., 2020). A másik, kémiai úton történő szerkezeti változást a takarmányok és élelmiszerek gyártása során a mechanikai hatások, az alkalmazott termikus kezelések, illetve a különböző savas és lúgos eljárások okozzák (EFSA, 2018b). Élelmiszer és takarmány előállításakor a FB1-ből *N*-(1-dezoxi-D-fruktóz-1-il)-fumonizin B1 (NDF-FB1), valamint *N*-(karboximetil)-fumonizin B1 származékok keletkeznek a Maillard-reakció révén; illetve a nixtamizálás a HFB kialakulását idézi elő. Az élelmiszerek, takarmányok lúgos kezelésével *N*-acil-származékok is létrejöhetnek (Lu és mtsai., 2020).

A takarmány- és élelmiszergyártás folyamata elősegítheti a fumonizinek mátrixhoz való kötődését is. A fumonizinek amid- vagy észterkötéssel kapcsolódhatnak különböző makromolekulákhoz (fehérje, keményítő). A tápanyagokhoz nem kovalensen kötődő FB1 a táplálékban fizikailag körbezárva is jelen lehet, viszont itt nem következik be szerkezeti módosulás, ezért ez a forma nem nevezhető módosítottnak. Ezt a formát „kötött” fumonizinnak nevezik.

Számos vizsgálat rávilágított arra, hogy a fumonizin mennyiségi meghatározását nagyban befolyásolják az analitikai körülmények (oldószer, extrakciós módszer, hőmérséklet, pH). Legáltalánosabban a FB1-et acetonitril-víz vagy metanol-víz elegyével vonják ki a mintából. A mért FB1-tartalom részben attól függ, hogy mintaelőkészítéskor, adott extrakciós eljárás alkalmazásakor, mennyi FB1 oldódik ki a mintából (Szabó-Fodor és mtsai.,

2015). Az analitikai eljárás szempontjából alkalmazott szakirodalmi terminológia eltér az előzőleg említett, a kölcsönhatások jellegén alapuló nomenklatúrától. A szokványos extrakciós eljárásokat alkalmazó analitikai módszerekkel kimutatható mennyiséget nevezik „szabad” mikotoxintartalomnak, míg a mintában lévő, de nem mérhető formák összessége adja a „rejtett” mikotoxintartalmat – utóbbiak a szokványos módszerekkel nem vonhatók ki, így nem mutathatók ki.

Mivel a teljes fumonizinmennyiség (szabad + rejtett FB1) a kontaminálódott táplálékban mindig több, mint a szabad forma (Scarpino és mtsai., 2024, Matos és mtsai., 2024), ezért ahhoz, hogy a táplálékból a legpontosabban meg tudjuk határozni a teljes FB1-mennyiségét, az oldószer és a mátrix közötti kölcsönhatást maximalizálni kell, illetve olyan eljárásokat is alkalmaznak, mellyel ezek a rejtett formák felszabadíthatók. Matos és mtsai. (2024) kálium-hidroxiddal hidrolizálták a kukoricaalapú termékeket, hogy a teljes (szabad + rejtett) FB1-tartalmat kinyerjék a mintákból. Bertuzzi és mtsai. (2016) vizsgálatai is kimutatták, hogy az FB1 komplex analitikai módszerekkel való kimutatása jobb eredményeket produkál, mint a hagyományos analitikai meghatározás. Vizsgálatuk során különböző extrakciós lépéseket hasonlítottak össze egymással a teljes FB1-tartalom meghatározása érdekében. Arra jutottak, hogy hőkezeletlen kukoricamintáknál nem feltétlenül szükséges a KOH-hidrolízis, hanem elegendő egy foszfát pufferes (PB) extrakció, azonban hőkezelt mintáknál szükség van a KOH-hidrolízisre (Bertuzzi és mtsai., 2016). Ezekkel a kémiai módszerekkel a táplálékban potenciálisan rendelkezésre álló FB1-mennyiségét ismerjük meg, azonban arról nem szerzünk tudomást, hogy ennek milyen hányada képes az emésztés során felszívódásra alkalmas állapotba kerülni.

Az emésztés során a FB1 kötött formáinak egy része a mátrixból felszabadulhat endogén vagy mikrobiális enzimek révén. Ezenkívül a módosított formák egy része visszaalakulhat szabad formává, ami szintén az enzimes folyamatoknak köszönhető. Az FB1 biológiai hozzáférhetőségét a teljes FB1-tartalom azon hányada határozza meg, amely a vékonybélben felszívódásra alkalmassá válik. A biológiai hozzáférhetőséget befolyásolja az FB1 és a komponensek közötti kötési típus és a táplálék maga, mivel a különböző takarmány- és élelmiszer-alapanyagokat eltérő mátrix jellemzi. Az FB1 eredeti alakja rendkívül káros egészségügyi hatásokkal rendelkezik. Annak ellenére, hogy az FB1 csak nagyon kis mértékben képes a felszívódásra a vékonybélben – a takarmánnyal felvett FB1-mikotoxin 3–6%-os hányada alkalmas a felszívódásra sertésben (Prelusky és mtsai., 1994) – mégis hatalmas egészségügyi károkat okoz, ezt számos kutatás alátámasztja. Az FB1 potenciálisan karcinogén besorolást (2B) kapott (IARC, 2002). Ezenfelül hepato-, és nefrotoxikus, lovakban az agyvelő szivacsos elváltozását okozza, sertésben tüdőödémát idéz elő. Egyelőre nem teljesen tisztázott, hogy a módosított formák toxikusabbak-e vagy sem az eredeti molekulához viszonyítva. Az FB1+FB2 sertések takarmányában javasolt maximális koncentrációja 5 mg/takarmány kg (2006/576/EC). A szimulált emésztési vizsgálatok lehetőséget nyújtanak arra, hogy megbecsüljük a toxinok biológiai hozzáférhetőségét.

ANYAG ÉS MÓDSZER

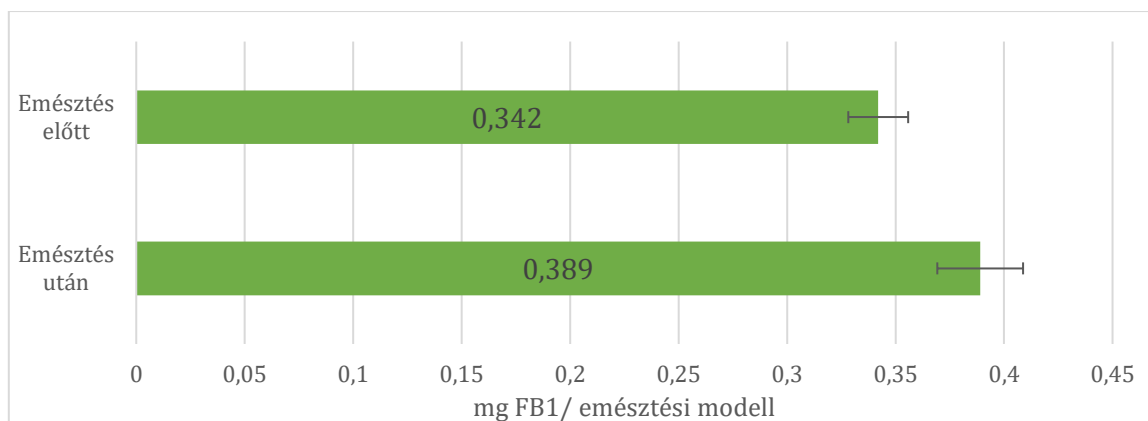
Annak érdekében, hogy meg tudjuk határozni a felszívódásra rendelkezésre álló fumonizin mennyiségét, *in vitro* emésztésszimulációt végeztünk. Az emésztés három fázisában (szájüreg-, gyomor- és vékonybél-fázis) az emésztési folyamat a Brodkorb és mtsai. (2019) által leírtaknak megfelelően, szabályozott körülmények között zajlott. A mintavétel a vékonybél-fázist követően történt, mivel az FB1 túlnyomó hányada felszívódik a vékonybél-fázis végéig (Massarolo és mtsai., 2020).

A szimulált emésztést rizsszubsztráton termesztett *Fusarium verticillioides* gombatenyészetet tartalmazó sertéstáppal végeztük el, az FB1 koncentrációját a keverékben 50 mg/kg körüli értékre állítottuk be. Az emésztés végén az emésztőenzimek inaktiválása céljából a mintákat 4 °C-ra hűtöttük le, majd a mintákat lecentrifugáltuk (4000 rpm, 10 p, 4 °C). A centrifugálás utáni felülúszóból vettünk mintát, amelyet az analitikai feldolgozásig -20 °C-on tároltunk. Mind az emésztés előtti, mind az emésztés utáni mintákat négy párhuzamosban vizsgáltuk.

Az *in vitro* emésztés előtt (mg/kg minta) és után mért FB1-koncentráció (mg/dm³ felülúszó) alapján kiszámoltuk, hogy mennyi FB1 volt az emésztési modellben lévő mintamennyiségben emésztés előtt, illetve mennyi oldott állapotú FB1 volt a minta felülúszójában az emésztést követően. A statisztikai elemzések során az emésztési modellben mért FB1 mennyiségét hasonlítottuk össze az emésztés előtt, illetve után. Az eredmények statisztikai kiértékelését R-programmal végeztük, ahol független mintás t-próbával elemeztük a csoportok átlagát $p < 0,05$ szignifikanciaszinten.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Az 1. ábrán látható, hogy az emésztési modellben az emésztés után az oldatban lévő FB1 mennyisége mintegy 13%-kal több volt, mint az emésztés előtt mért érték. Az FB1 emésztési modellben meghatározott biológiailag hozzáférhető mennyisége több volt ($p < 0,05$), mint amennyit az emésztésre szánt minta a kémiai analízis alapján tartalmazott. Ez összhangban van Szabó-Fodor és mtsai. (2015) eredményeivel, akik azt tapasztalták, hogy mind a kukorica-, mind a búzaalapú gombatenyészetek az *in vitro* emésztés után több oldott állapotú FB1-t tartalmaztak (kukoricában kb. 38%, búzában 28%-kal többet), mint az emésztetlen minták. Dall'Astra és mtsai., (2009) FB1-gyel természetesen szennyezett kukoricamintákból emésztés után szintén 30-50%-kal magasabb FB1-koncentrációt mértek, mint emésztés előtt.



1. ábra. Az *in vitro* emésztés előtti és az emésztés utáni FB1 mennyisége a sertéstápban

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Vizsgálatunk során azt tapasztaltuk, hogy egy szokványos, kémiai extrakciós módszerrel kisebb FB1-tartalmat mértünk, mint amikor ugyanazt a módszert szimulált emésztést követően alkalmaztuk. A mintából az oldatba jutott és ezért a felszívódásra potenciálisan rendelkezésre álló FB1 mennyisége több volt, mint az emésztés előtti mintából mért FB1 mennyisége. Ennek oka feltehetőleg az volt, hogy az emésztési folyamatok a minta feltárásával lehetővé tették az FB1 nagyobb hányadának meghatározását. Ez a más szerzők által tapasztaltakkal (Dall'Asta és mtsai., 2009; Szabó-Fodor és mtsai., 2015) összhangban lévő eredmény felhívja a figyelmet arra, hogy fennáll annak a veszélye, hogy a szokványos analitikai módszerek alkalmazása során nem nyerjük ki a mintából az FB1 jelentős hányadát, amely viszont felszabadul az emésztés során, ezért biológiai hatás szempontjából jelentőséggel bírhat.

Komplex analitikai módszerekkel lehetőség van a minta jobb feltárására (Bertuzzi és mtsai., 2016; Matos és mtsai., 2024), ebben az esetben arra törekszünk, hogy a kémiai feltárás tökéletesítésével megközelítsük a teljes FB1-mennyiséget. Ennek viszont csak egy adott hányada fog az emésztés során felszabadulni. A biológiai hozzáférhetőség százalékos arányát abban az esetben tudnánk egzaktul meghatározni, amennyiben rendelkezésre állnának olyan komplex analitikai módszerek, melyekkel lehetőség lenne a teljes FB1-szint meghatározására, és ehhez tudnánk viszonyítani az emésztés során felszabadult FB1 mennyiségét.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kísérlet és a publikáció a RRF-2.3.1-21-2022-00007 számú és „Agrár biotechnológia és precíziós nemesítés az élelmiszerbiztonságért” elnevezésű projekt keretében készült.

IRODALOM

- Bertuzzi T., Mulazzi A., Rastelli S., & Pietri A. (2016): Hidden Fumonisin: Simple and Innovative Extractions for Their Determination in Maize and Derived Products, Food Anal. M., 9.1970–1979. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0377-2>
- Brodkorb A., Egger L., Alminger M., Alvito P., Assuncao R., & Ballance S. (2019): INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. Nature prot., 14, 991–1014. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

- Dall'Asta, C., Mangia, M., Berthiller, F., Molinelli, A., Sulyok, M., Schuhmacher, R., Krska, R., Galaverna, G., Dossena, A. & Marchelli R. (2009): Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins, *Anal. and Bioanal. Chem.*, 395, 1335–1345. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2933-3>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2018a): Appropriateness to set a group health-based guidance value for fumonisins and their modified forms. *EFSA J.*, 16(2), e05172. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5172>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2018): Risks for animal health related to the presence of fumonisins, their modified forms and hidden forms in feed. *EFSA J.*, 16(5), e05242. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5242>
- Frisvad J.C., Smedsgaard J., Samson R.A., Larsen T.O., & Thrane U. (2007): Fumonisin B2 Production by *Aspergillus niger*, *J. of Agricult. and Food Chem.*, 55(23), 9727–9732. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0718906>
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans (2002)
- Lu Q., Qin J-A., Fu Y-W., Luo J-Y., Lu J-H., Logrieco A. F., & Yang M-H. (2020): Modified mycotoxins in foodstuffs, animal feed, and herbal medicine: A systematic review on global occurrence, transformation mechanism and analysis methods, *Trends in Analytical Chem.* 133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116088>
- Massarolo, K. C., Ferreira, C. F. J., Collazzo, C. C., Bianchini, A., Kupski, L., & Badiale-Furlong, E. (2020): Resistant starch and hydrothermal treatment of cornmeal: Factors in aflatoxins and fumonisin B1 reduction and bioaccessibility, *Food Cont.*, 114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107274>
- Matos M. A. V., Sartori A. V., Soilo E. R. P., Moraes M. H. P., & Jacob S. C. (2024): A survey on free and hidden fumonisins in Brazilian corn and corn-based products, *Food Cont.*, 156. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110135>
- Mogensen, J. M., Moller, K. A., Freiesleben, P., Labuda, R., Varga, E., Sulyok, M., Kubatova, A., Thrane, U., Andersen, B., & Nielsen, K. F. (2010): Production of fumonisins in B2 and B4 in *Tolypocladium* species, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 1329–1335. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0916-1>
- Scarpino V., Bresciani A., & Blandino M. (2024): The effects of the extrusion process used for the production of maize snacks and pasta on the free, bound, and total B fumonisin contents, *LWT*, 198, 115977. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115977>
- Szabó-Fodor, J., Dall'Asta, C., Falavigna, C., Kachlek, M., Szécsi, Á., Szabó, A., & Kovács, M. (2015): Determination of the amount of bioaccessible fumonisin B1 in different matrices after in vitro digestion. *World Mycotoxin J.*, 8(3), 261–267. DOI: <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1771>