

**MIKROSZKÓPIKUS GOMBÁK MIKOTOXIN-BONTÓ KÉPESSÉGÉNEK
VIZSGÁLATA**

Péteri Adrienn Zsanett



Témavezetők:

Dr. Varga János, Egyetemi docens
Dr. Vágvolgyi Csaba, Tanszékvezető egyetemi tanár

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2009

Bevezetés

A mikotoxinok a gombák másodlagos anyagcseretermékei, melyek az állatokra és az emberekre nézve egyaránt ártalmasak. Az élelmiszerek és az állati takarmányok mikotoxin-szennyezettsége ma is világméretű problémát jelent. Gazdasági és egészségügyi szempontból az egyik legjelentősebb mikotoxin az ochratoxin A (OTA), melyet több *Aspergillus* és *Penicillium* faj is termel. Számos mezőgazdasági termékben (pl. kakaó, kávé, fűszerek, gabonafélék) előfordulhatnak ochratoxinok. A mikotoxinok egészségügyi határértékeit az Európai Unión belül az Európai Bizottság (EC) határozta meg, ezen kívül számos ország rendelkezik saját egészségügyi határértékkel. Állati és emberi egészségügyi szempontból az ochratoxinok hepato- és nefrotoxikus, valamint karcinogén tulajdonságokkal rendelkeznek. Számos eljárást fejlesztettek ki a mikotoxinok eltávolítására, melyek lehetnek fizikai, fizikokémiai, kémiai és biológiai detoxifikáló eljárások. A biológiai eljárások esetében számos mikroorganizmust vizsgáltak már, hogy képes-e az OTA-t lebontani, vagy átalakítani nem toxikus ochratoxin α -vá, vagy más kevésbé toxikus vegyületekké.

Célkitűzések

Munkánk során egy kíméletesebb dekontaminációs eljárás (biológiai módszer) kifejlesztése volt a cél, mely lehetővé tenné a mezőgazdasági termények/termékek mikotoxin-szennyezettségének csökkentését. Célunk volt toxinbontásra pozitívnak bizonyult mikrobák (mint pl.: a *Rhizopus* fajok, a *Phaffia rhodozyma*) további vizsgálata, valamint a *Ph. rhodozyma* gombafaj OTA-adszorpciós és degradáló képességének vizsgálata, valamint annak tisztázása, hogy milyen enzim(ek) lehetnek felelősek a detoxifikációért. Munkánk során a következő célokat fogalmaztuk meg:

- Milyen a *Ph. rhodozyma* izolátum OTA- bontásának kinetikája.

- Milyen hatással van a hőmérséklet az OTA-degradációra és az adszorpcióra.
- Milyen hatással van az OTA-adszorpcióra a különböző sejtkoncentráció és az időtartam.
- Esetleg az ochratoxin α -án kívül más bomlástermékek is keletkezhetnek-e (HPLC analízis).
- Milyen hatással vannak a különböző karboxipeptidáz-inhibitorok az OTA-degradációra.

Terveink között szerepelt még a bontásért felelős enzim (karboxipeptidáz A) génjének azonosítása és klónozása a már korábban OTA- bontóként azonosított *A. niger* (CBS 120.49 / N400) gombaizolátumban, mivel korábbi vizsgálatok szerint egy karboxipeptidáz-szerű enzim lehet felelős az OTA bontásáért. Ezt a hipotézisünket az alábbi lehetőségekkel szeretnénk volna alátámasztani:

1. A karboxipeptidáz A-t kódoló gén expresszáltatása *Pichia pastoris* élesztőfajban, így további információk szerzése az enzimfehérjéről.
2. A karboxipeptidáz A-t kódoló gén expresszáltatása atoxinogén *Aspergillus* gombafajokban.

Alkalmazott Módszerek

Ochratoxin A detektáláshoz alkalmazott technikák:

- Vékonyréteg kromatográfia (TLC)
- Magas nyomású folyadék kromatográfia (HPLC)

DNS alapú technikák:

- DNS tisztítása
- Polimeráz láncreakció (PCR, Inverz PCR)
- DNS fragmentumok klónozása
- DNS szekvenálás
- Plazmid konstrukciók létrehozása
- Baktériumok transzformációja
- Plazmid DNS tisztítása

Nukleotid és aminosav szekvencia adatok elemzése:

- DNS szekvenciák ellenőrzése
- Nukleotid szekvenciák analízise, összehasonlítása, a nukleotid szekvenciákból származtatott aminosav szekvenciák megállapítása
- Nukleotid és aminosav szekvenciák illesztése

Pichia pastoris expressziós rendszer alkalmazása:

Fehérje tisztítás, fehérje gélelektrofórezis.

Atoxinogén *Aspergillus* izolátumok genetikai transzformációja:

- Higromicin B rezisztencián alapuló szelekciós körülmények optimalizálása
- Protoplastok képzése
- Integratív transzformálás

Eredmények

***Rhizopus* izolátumok mikotoxin-detoxifikáló képességének vizsgálata.**

(VARGA és MTSAI. 2005)

Rhizopus és a *Phaffia/Xanthophyllomyces* izolátumokat vizsgáltuk, hogy rendelkeznek-e OTA-bontó képességgel. Elsőként 51 *Rhizopus* izolátumot teszteltünk, melyek közül 15 izolátum képes az OTA bontásra. A jól bontó izolátumok közül kettőt (*Rhizopus stolonifer* Rh 5, *Rh. microsporus* Rh 31) kiválasztottuk a toxinbontás kinetikájának részletes elemzése céljából. Ezen kísérletekhez összehasonlításként az *Aspergillus niger* CBS 120.49 törzset is felhasználtuk, mivel korábban már e törzs bontási kinetikáját részletesen megvizsgáltuk. Kísérleti eredményeink kimutatták, hogy a *Rhizopus* izolátumok az OTA 90%-át csak 12-14 nap elteltével voltak képesek elbontani, míg az *A. niger* az OTA 90%-át 6 napos inkubáció alatt volt képes degradálni. A vizsgált két *Rhizopus* izolátum (Rh 5, Rh 31) toxinbontása között nem tapasztaltunk jelentős eltéréseket. Ezen kívül kíváncsiak voltunk, hogy a két *Rhizopus* Rh 5, Rh 31 és az *A. niger* CBS 120.49 izolátumok képesek-e az OTA-bontásra természetes körülményeket modellező kísérleti rendszerben: a toxinbontást nem tápoldatban, hanem benedvesített búzaszemeken teszteltük. A modellkísérleti eredmények alapján elmondhatjuk, hogy mindhárom izolátum szemmel

láthatóan jól növekedett a szubsztrátumon, de a két *Rhizopus* izolátum közül csak az egyik (*Rh. stolonifer* Rh 5) volt képes lecsökkenteni a toxintartalmat természetes körülményeket modellező kísérlet során. Az *A. niger* CBS 120.49 izolátum, mely tápfolyadékos kísérletekben a legjobb toxinbontónak bizonyult, nem volt képes lebontani az OTA-t. A HPLC-kísérletek is alátámasztották, hogy 14 nap inkubálás után búzán a bevitt OTA 96,5%-át lebontotta a *Rh. stolonifer* (Rh 5) izolátum. A *Rh. stolonifer* Rh 5 izolátum megfelelőnek bizonyulhat ipari célokra történő felhasználásra, mely ígéretes biológiai detoxifikáló eljárás lenne a szennyezett mezőgazdasági termékekre nézve. A módszer optimalizálásához további kísérletek szükségesek.

***Phaffia/Xanthophyllomyces* izolátumok OTA-bontó képességének elemzése.** (PÉTERI és MTSAL 2007)

A *Rhizopus* izolátumokon kívül megvizsgáltuk még néhány *Phaffia/Xanthophyllomyces* élesztő-izolátum OTA-bontó képességét is. Kezdeti kísérletek során három *Phaffia/Xanthophyllomyces* élesztő-izolátumot (CBS 5905, CBS 5908, CBS 6938) alkalmaztunk az OTA-bontó képesség vizsgálatára. A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy az élesztő-izolátumok kevesebb, mint 10 nap alatt lebontják vagy adszorbeálják az OTA-t PM tápoldatból. A vizsgált izolátumok közül is a *Ph. rhodozyma* CBS 5905 izolátum bizonyult a legjobbnak, ezért a későbbiekben már csak ezzel az izolátummal dolgoztunk tovább. E törzssel elvégeztük az OTA bontási kinetikájának vizsgálatát, melynek eredményei alapján a *Ph. rhodozyma* CBS 5905 izolátum a 7. napon az OTA-mennyiség 50%-át lebontotta a PM tápoldatból, és további 7 nap után a teljes toxinmennyiség 90%-át bontotta le. A sejtextraktumból kiderül, hogy az első két napban a *Phaffia* élesztősejtek a lebontás mellett adszorbeálják az OTA-mennyiség egy részét, majd az adszorpció is folyamatosan csökken. Tehát a *Ph. rhodozyma* izolátum az OTA-

bontó képessége mellett OTA-adszorbeáló képességgel is rendelkezik, mely élesztők esetében a szakirodalom szerint általános jelenség. Az OTA-bontási kinetikájának vizsgálatán kívül még számos kísérletet végeztünk el annak tisztázására, hogy milyen hatással van a különböző hőmérséklet, az inkubációs idő hosszúsága és a növekvő sejtkoncentráció az OTA-degradációra és adszorpcióra. Megvizsgáltuk, hogy az OTA-bontásért felelős enzim extracellulárisan vagy intracellulárisan választódik-e ki. A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a *Ph. rhodozyma* izolátum OTA bontása 25 és 35°C között a legnagyobb és a bontásért felelős enzim(ek) aktivitása egészen 60°C-ig megmaradt, annak ellenére, hogy a *Ph. rhodozyma* izolátum optimális növekedéséhez szükséges hőmérséklet 20°C. Érdekes, hogy az OTA degradáció 20°C-on jóval elmaradt a 25 és 35°C-on tapasztalható képest. A 60°C feletti hőmérsékleteken az OTA-degradáció helyett inkább az OTA-adszorpció vette át a szerepet. A *Ph. rhodozyma* izolátum OTA-adszorpciójára irányuló kísérletek során összehasonlítottuk az élő és a hőkezelt élesztősejtek OTA-adszorbeáló képességét négyféle sejtkoncentráció (10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} sejt/ml) esetében. Azt tapasztaltuk, hogy a hőkezelt élesztősejtek esetében jelentősebb volt az OTA-adszorpció, mint az élő sejteknél. Emellett pozitív összefüggést tapasztaltunk a hőkezelt élesztősejtek toxinmegkötő képessége és a növekvő sejtkoncentráció között. Az élő sejtek esetében nem tapasztaltunk összefüggést az OTA-adszorpció és a növekvő sejtkoncentráció között. Azon kísérletekből, melyek az OTA-bontásért felelős enzim extracellulárisan vagy intracellulárisan történő kiválasztódásának vizsgálatára irányultak, azt az eredményt kaptuk, hogy feltételezhetően az enzim(ek) nem választódnak ki a fermentlébe, hanem ez az enzim(ek) sejthez kötöttek lehetnek. Irodalmi adatok és a *Ph. rhodozyma* izolátum OTA-bontásának HPLC-analízise alapján azt feltételeztük, hogy az OTA-bontásért egy karboxipeptidáz enzim lehet a felelős. Ebből kiindulva megvizsgáltuk, hogy milyen hatással vannak a különböző karboxipeptidáz

inhibitorok az OTA bontására nézve *Ph. rhodozyma* izolátum esetében. A különböző karboxipeptidáz inhibitorok (karboxipeptidáz inhibitor burgonyából, teljes mini proteáz inhibitoroktól-tabletta, EDTA, EGTA és 1,10-fenantrolin) közül csak kettő bizonyult hatásosnak, ez a kettő kelátoló ágens (EDTA, 1,10-fenantrolin) melyek jelentősen gátolták az OTA bontását az élesztősejtek esetében. Ebből arra következtettünk, hogy a degradációt végző enzim feltehetően egy metalloproteáz, melynek működéséhez nem Ca^{2+} ion szükséges, mivel a EGTA nem volt hatással a OTA-bontásra *Ph. rhodozyma* izolátum esetében. További kísérleteket tervezünk az OTA-bontásért felelős folyamatok hátterének felderítése céljából a *Ph. rhodozyma* izolátum esetében, mivel jó OTA-bontó és adszorbeáló képességgel rendelkezik.

A *cpa* gén klónozása *Aspergillus niger* (CBS 120.49 / N400) törzsből.

Ezen munkákkal párhuzamosan elvégeztük a bontásért felelős enzim (karboxipeptidáz A) génjének azonosítását és klónozását a már korábban OTA-bontóként azonosított *A. niger* CBS 120.49 törzsből. Korábbi irodalmi adatok alapján azt feltételeztük, hogy az OTA bontásért egy karboxipeptidáz lehet a felelős az *A. niger* CBS 120.49 izolátum esetében is. Meghatároztuk, hogy az *A. niger cpa* gént kódoló régió 3287 bp hosszúságú, a kódoló szakasz hossza 1939 bp, amely egy 72 bp intront tartalmaz és egy 621 aminosavból álló fehérjét határoz meg. A gén kódoló szekvenciája mellett egy 648 bp hosszúságú promotert és egy 700 bp hosszúságú terminális régiót is meghatároztunk.

A *cpa* gén expresszáltatása *Pichia* és atoxinogén *Aspergillus* izolátumokban.

Az alaphipotézisünket, melynek értelmében egy karboxipeptidáz enzim lehet felelős az OTA bontásért az *A. niger* CBS 120.49 izolátum esetében, további két kísérletsorozat elvégzésével próbáltuk meg alátámasztani.

1. Bejuttattuk a *cpa* gént kódoló szekvenciát a *Pichia pastoris* élesztőfaj transzformálásához szükséges pPICZ α -A vektorba. Ellenőriztük, hogy a *Pichia pastoris* KM71H törzs rendelkezik-e OTA-bontó vagy adszorbeáló képességgel. Azt tapasztaltuk, hogy a *Pichia* élesztősejtek nem rendelkeznek OTA-bontó képességgel, viszont képesek az OTA kismértékű adszorpciójára. Elvégeztük a *Pichia pastoris* KM71H törzs transzformálását a *cpa* gént tartalmazó pPICZ α -A vektorral. Ezután elvégeztük a *cpa* gén expresszáltatását transzformáns *Pichia pastoris* KM71H törzsekben. A *cpa* gén expresszáltatását követően megvizsgáltuk, hogy esetlegesen a natúr fermentlébe kijutott karboxipeptidáz enzimfehérje képes-e az OTA bontására. Az ellenőrző vizsgálatok során megállapítottuk, hogy sikeres volt a *Pichia pastoris* KM71H törzs transzformálása a *cpa* gént tartalmazó pPICZ α -A vektorral. Viszont nem sikerült kimutatni a natúr fermentléből a karboxipeptidáz enzimfehérjét, feltehetően nem jutott ki az élesztősejtből.

2. Kidolgoztunk egy transzformációs kísérletet a nem toxinbontó *Aspergillus* törzsek pANCPA vektorral történő transzformálására. Megterveztük és elkészítettük a pANCPA vektort, mely tartalmazta a *cpa* gént *trpC* promotérral és terminális régióval, és a *hyg^B* gént tartalmazó kazettát (szelekciós marker). A transzformációs kísérleteket megelőzően meghatároztuk a nem toxinbontó *Aspergillus* törzsek minimális gátló koncentrációját (MIC) hygromicin B antibiotikumra. Az *A. niger* JHC 607 izolátum esetében a MIC-érték 150 $\mu\text{g/ml}$, az *A. nidulans* SZMC 0552 esetében pedig 300 $\mu\text{g/ml}$ volt. Ezt követően elvégeztük a nem toxinbontó *Aspergillus* törzsek pANCPA vektorral történő transzformációját. A transzformáns *Aspergillus* izolátumokkal (T55L,

T55C) elvégeztünk egy teszt kísérletet, hogy a transzformációt követően rendelkeznek-e az OTA-bontó képességével. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a transzformáns *Aspergillus* izolátumok (T55L, T55C) rendelkeznek a *hygB^R* génnel, de a *cpa* gén nem jutott át a transzformáció során, esetleg nem fejeződött ki a későbbiekben, mivel nem történt OTA-bontás.

Alaphipotézisünket, mely szerint egy karboxipeptidáz enzim lehet felelős az OTA bontásáért az *A. niger* CBS 120.49 izolátum esetében, egyik kísérletsorozattal sem tudtuk alátámasztani vagy megcáfolni. További kísérleteket tervezünk, hogy megbizonyosodjunk arról valóban ez a karboxipeptidáz enzim felelős-e az OTA-bontásért az *A. niger* CBS 120.49 izolátum esetében.

A dolgozat alapját képező közlemények:

Varga, J., Péteri, Zs., Tábori, K., Téren, J., Vágvölgyi, Cs. (2005) Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology* 99,321-328.

Péteri Zs., Téren J., Vágvölgyi Cs. and Varga J. (2007) Ochratoxin adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology* 24: 205-210.

A dolgozat témájához kapcsolódó összefoglalók, poszterek:

Varga, J., Rigó, K., Péteri, Zs., Tábori, K., and Vágvölgyi, Cs. (2002) Degradation of mycotoxins by filamentous fungi. Croatian, Hungarian and Slovenian Symp. Ind. Microbiol. Microbiol. Ecol., Opatija, Abstracts 55.

Varga, J., Rigó, K., Péteri, Zs., Tábori, K., Téren, J., and Vágvölgyi, Cs. (2002) Degradation of mycotoxins by *Rhizopus* and *Aspergillus* isolates. MMT 2002. Balatonfüred, Abstracts.

Varga, J., Rigó, K., Péteri, Zs., Tábori, K., Téren, J., and Vágvölgyi, Cs. (2004) Ochratoxin degradation caused by *Rhizopus* and *Aspergillus* isolates. 2nd CEFOOD, Budapest, Abstracts.

Péteri, Zs., Varga, J., Vágvölgyi, Cs., Tábori, K., Téren J. (2005) Zygomycetes as microbial detoxifiers of ochratoxin A. Third Hungarian Mycological Conference 2005 Mátraháza, Abstracts.

Péteri, Zs., Téren, J., Vágvölgyi, Cs., Varga, J. (2006) Degradation and adsorption of ochratoxin A by astaxanthin-producing yeasts. MMT 2006 Keszthely, Abstracts.

Egyéb közlemények:

Varga, J., Rigó, K., Péteri, Zs., Tábori, K., Téren, J., Vágvölgyi, Cs. (2004) Ochratoxin degradation caused by *Rhizopus* and *Aspergillus* isolates. *Proceedings of the 2nd Central European Food Congress*, CD-ROM, P-S-07, pp. 1-6.

Csermetsics Á., Péteri Zs., Linka B., Takó M. (2005) Physiological and genetic variability of Zygomycetes causing post-harvest decay. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 40: 267-277.

Varga J, Kocsube S, Péteri Z, Samson RA (2009) An Overview of ochratoxin research. In *Applied mycology* (Rai M, Bridge P, eds) CABI Publishers, 38-55.

Egyéb konferenciaszereplések:

Varga, J., Rigó, K., Péteri, Zs., Tábori, K., Téren, J., and Vágvölgyi, C. (2003): Ochratoxin producing fungi in green coffee and other retail products in Hungary. Workshop on Mycotoxins and Food Safety: An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe. Martina Franca, 24-25 October 2003.

Péteri, Zs., Barta, K., Csernetics, Á., Vágvölgyi, Cs. and Papp, T. (2007) Cloning and partial sequence analysis of the *Gilbertella persicaria* farnezyl pyrophosphate synthase gene. MMT 2007 Budapest, Abstracts.

Társszerzői nyilatkozat

Kijelentjük, hogy Péteri Zsanett szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Varga, J., Péteri, Zs., Tábori, K., Téren, J., Vágvölgyi, Cs. (2005) Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology* 99: 321-328.

Péteri Zs., Téren J., Vágvölgyi Cs. and Varga J. (2007) Ochratoxin adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology* 24: 205-210.

címmel megjelent közleményekben, így az értekezésben és a publikációkban közölt eredményeket tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére nem használtuk fel és ezt a jövőben sem fogjuk tenni.

Szeged, 2009. szeptember 28.

Dr. Varga János

Dr. Vágvölgyi Csaba

Dr. Téren József

Tábori Katalin