



DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Gyümölcsök penészes romlásának előrejelzése.**

Sági-Kiss Virág

Budapest

2012.

## A doktori iskola

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** Dr. Fodor Péter  
Egyetemi tanár, az MTA doktora  
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,  
Alkalmazott Kémia Tanszék

**Témavezetők:** Dr. Fodor Péter  
Egyetemi tanár, az MTA doktora  
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,  
Alkalmazott Kémia Tanszék

Héberger Károly  
Tudományos tanácsadó, címzetes egyetemi tanár  
Kémiai Kutatóközpont

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## BEVEZETÉS

A sejtek tenyésztésén alapuló klasszikus mikrobiológiai módszerek több napot vesznek igénybe, még a modern antitestek felismerését felhasználó módszerek is legalább több órába kerülnek. Nem véletlen, hogy a mikrobák gyors kimutatásának bármilyen lehetősége nagy figyelmet kelt, ilyen módszer a mikrobák elemi összetételének, vagy manapság a mikrobák által kibocsátott illékony szerves vegyületek detektálása.

Egy tipikus érdeklődési terület erre a technikára a szabályozott légterű tárolás. A zöldségek és gyümölcsök betakarítás utáni veszteségei igen jelentősek mind a tárolás, mind a szállítás, értékesítés során. Tekintettel arra hogy a veszteségek halmozottan elérhetik az ötven százalékot is, minden olyan technika iránt érdeklődés tapasztalható amely ezt az értéket bármely mértékben csökkentheti.

A dolgozat célul tűzte ki hogy, hogy az illékony vegyületek mérésével és az eredmények sokoldalú statisztikai feldolgozásával hozzájáruljon a gyümölcsök mikrobiológiai romlásának nyomonkövetéséhez marker vegyületeket alkalmazásával. Az ún. postharvest veszteségekért nagymértékben felelős mikrobiális – kertészeti termények esetén főként penészes – romlás nemcsak gazdasági veszteséget okoz, hanem élelmiszerbiztonsági szempontból is kockázatot jelent. A projekt végső célja egy olyan mérőrendszer kifejlesztése mely a légtérből való mintavétellel alkalmas a mikrobiális romlás jelzésére.

Ennek elméleti alapja, hogy a penészgombák szaporodás közben illékony vegyületeket termelnek (volatile organic compound, VOC). Ideális esetben a légtérből való SPME mintavétellel, majd a minta GC-MS vizsgálatával meg tudjuk mondani, hogy a tárolóban megindult-e valamilyen romlási folyamat vagy nem. A doktori munkám során ennek az elképzelésnek a detektálási és adatfeldolgozási lehetőségeit vizsgáltam.

## A MEGOLDANDÓ PROBLÉMÁK

Azokat az analitikai feladatokat amikor a bevett gyakorlattal szemben nem elválasztani akarjuk a mérendő alkotót a háttértől, hanem hogy minél hűbb képet kapjanak az aktuális minta tartalmáról nem-célzott (untargeted, non-targeted) elemzésnek hívjuk. Az analitikai cél minél több információ rögzítése a mintából. A mikrobiális illékony metabolitok mérése esetén nem ismerjük előre azokat a vegyületeket amelyeket mérni szeretnénk, de jó támpontot adnak az ismert anyagcsere útvonalak.

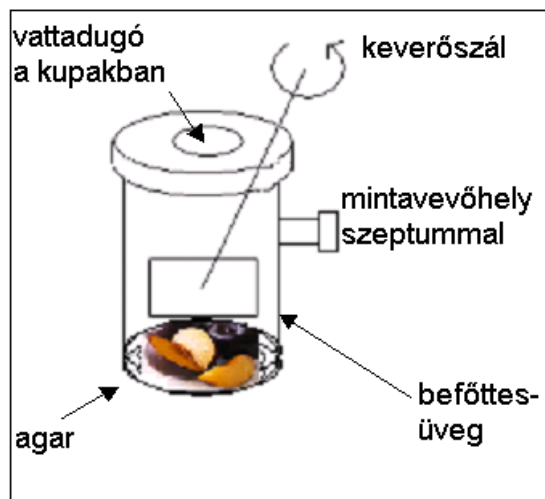
A probléma, hogy mind a mikrobiális VOC-k, mind a gyümölcsök aromakomponensei nagymértékben függenek a környezeti tényezőktől. Ráadásul gyümölcsök VOC-i hasonló karakterűek, mint a penészek metabolitjai. Az anyagcsereútvonalak alapján tudjuk, hogy a lehetséges metabolitban csak annyi közös van, hogy szobahőmérsékleten illékonyak. Sokszámú hasonló vegyületet kell elválasztani, detektálni, majd kiválasztani közülük a romlásban fontos szerepet játszókat. Ez mind a kísérletek tervezését, mind a különböző kutatások eredményeinek összevetését megnehezíti, a kivitelezés elképzelhetetlen valamilyen automatizált kiértékelés nélkül. Ezért minden olyan kutatás időszerű amely ezen kísérletek adatfeldolgozását lerövidíti vagy egyáltalán lehetővé teszi.

Az én kísérleti megközelítésem abban tér el a szakirodalomban talált tanulmányoktól, hogy egyszerre több gyümölcsmintát és több törzset alkalmazok a romlás modellezésére. A bevett gyakorlattal ellentétben nem csak a romlott és nem romlott minták által kibocsátott VOC-eket vizsgáltam, hanem ezek változásai során keresem a marker vegyületeket.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

A VOC méréseket SPME-GC-MS (szilárd fázisú mikroextarkciós mintavétellel kapcsolt gázkromatográfiás tömegspektrometria) kapcsolt technikával végeztük. Mintavételre minden esetben 65 µm vastagságú PDMS-DVB bevonatú szálát használtam, az extrakciós idő 30 perc. A kromatográfiás csúcsok hozzávetőleges azonosítása NIST 2.0 referenciaspektrumokat tartalmazó könyvtárral történt. A dolgozatban nem törekszem a pontos mennyiségi meghatározásra, a kromatográfiás csúcs alatti integrált használom fél-mennyiségi adatként, melyet az egyszerűség miatt itt koncentrációnak hívok.

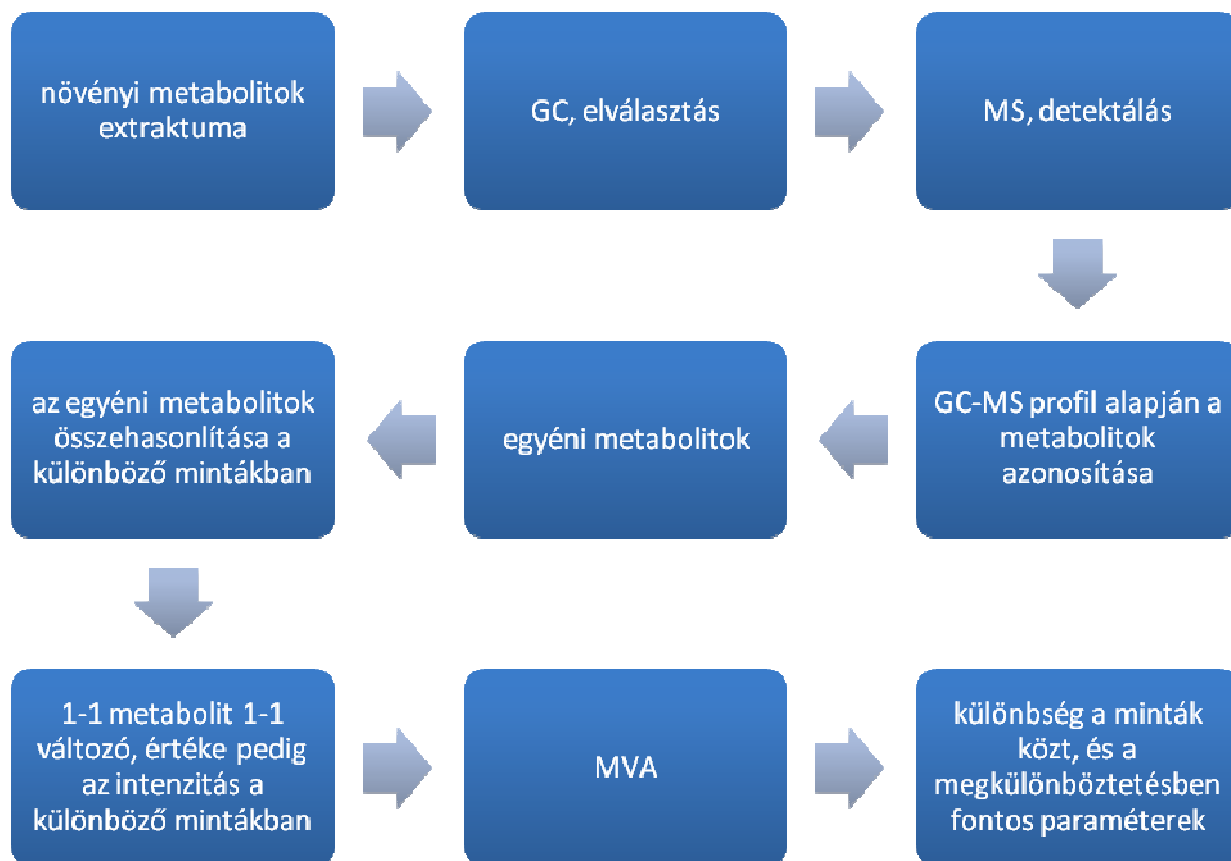
A felhasznált mikroorganizmus a *P. expansum* (P1) és *B. cinerea* (P2) (származás: Japán szilva, BCE, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék Törzsgyűjtemény). Ezeket a törzseket a korábbi kísérletekben szelektív táptalajok segítségével izolálták japán szilváról. Az egész dolgozat során ezekkel a törzsekkel dolgoztunk. A modellgyümölcs japán szilva és alma, amelyeket a piacról szereztünk be. A szilva minták előkészítése a BCE, Mikrobiológia Tanszékén történt, a kész mintákat a mintavevő edényben (1. ábra) elhelyezve átszállítottuk az Alkalmazott Kémia Tanszékre ahol a mérések történtek..



1. ábra: A mintavételi elrendezés

A kritikus kérdés a GC-MS-el detektált VOC-k összehasonlításának lehetősége. Az illékony vegyületek rendkívül csúcs gazdag kromatogramokat eredményeznek. Ezeknek kézi összehasonlítása nem csak hosszadalmas, de sok hibával járó feladat. Az automatikus csúcsfelismerés, metabolit azonosítás az egyetlen járható út nem-célzott mérések esetén. Az azonosítás itt nem azt jelenti, hogy megmondható az egyes

tömegspektrumok mely vegyülethez társíthatók, hanem az algoritmus valamilyen kritériumok alapján kiválasztja azokat a jellemző információcsomagokat a GC-MS rendszerben rögzített összes adatból amelyek valószínűleg egy vegyülethez tartoznak. Ezek után az összepárosított, címkével ellátott, vagy táblázatba rendezett metabolitok közül különböző többváltozós módszert alkalmazhatunk a mintákban lévő különbségek felderítésére és megkülönböztetésben fontos vegyületek kiválasztására. A 2. ábrán szerepel az ilyen módszerek egyszerűsített vázlata.



2. ábra: A feladat menete (MVA: multivariate analysis, többváltozós elemzés)

## CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetésben említett mérőrendszer, mellyel ipari méretű szabályozott légterű tárolókban előre lehetne jelezni az esetleges mikrobiális romlást nem fér bele egy doktori munka kereteibe. Ahhoz, hogy egy iparilag alkalmazható mérőrendszer feltételeit megteremtsük, valamilyen automatizált módszert kell alkalmazni. Én a marker vegyületek alkalmazását választottam, ez esetben a cél, olyan vegyületek felkutatása, amelyek általánosak minden vagy több olyan romlásra amely az adott terménnyel kapcsolatban előfordulhat, vagy általánosak egy adott mikrobára különböző termények esetén. Az út egy modellrendszeren keresztül vezet, melyben lehetőség van kidolgozni a VOC-k mérésének és feldolgozásának lehetőségét, és közös marker vegyületeket keresni. Célul tűztem ki a VOC-k mérési rendszerének tulajdonságait és befolyásoló tényezőit megvizsgálni és különböző adatelemzési módszereket vizsgálni a későbbi felhasználás tekintetében.

Ehhez a feladathoz a dolgozatban a következő kérdéseken keresztül kerestem választ:

- Milyen aromakomponenseit tudjuk lemérni az egészséges gyümölcsöknek? Mennyire állandóak az aromakomponensek egy kísérleten ill. több kísérletsorozaton keresztül?
- Van-e szignifikáns és állandó különbség a teljesen romlott és egészséges minták közt? Mely vegyületek fontosak a megkülönböztetésben? Mely statisztikai módszerrel lehet ezeket hatékonyan meghatározni?
- *Penicillium expansum* oltott almák és szilvák esetén van-e olyan marker vegyület, amely azonos mindkét gyümölcs esetében?
- *Penicillium expansum* és *Botrytis cinerea*val oltott gyümölcsök esetén van-e olyan marker vegyület, amely közösen megtalálható?
- A megkülönböztetésben jelentős vegyületek felhasználhatók-e a romlás előrejelzésére?

## EREDMÉNYEK

A munka során egy modellrendszert, egy adatfeldolgozási és kísérleti módszert fejlesztettem az ismeretlen VOC-k mérésére. A VOC-k nyomonkövetésére reprodukálhatóan alkalmas a rendszer, találtam a romlásra jellemző VOC-eket. Az észterek és a terpének voltak a legfontosabb kémiai csoportok a VOC-k közül mind egészséges mind romlott gyümölcsök esetében. Míg az észterek koncentrációjának csökkenése vagy növekedése jól jellemzi a romlást, addig a terpének nagy száma és változékonysága (izomerek) ebben a GC-MS rendszerben nem alkalmas a romlás előrejelzésre. Mindkét gyümölcs esetében marker vegyületnek bizonyult a sztirol, 1-metoxi-metil-benzol és az etil-benzoát. A markerek már kimutathatók a légtérből a romlás szemmel látható jeleinek megjelenésével egyidőben. Nem találtunk olyan vegyületet amely *P. expansum* és *B. cinerea* esetében is alkalmas lenne romlás előrejelző modell építésére. A penészgombás romlás kimutatásának lehetőségét bizonyítottuk. A VOC-k alapján a különböző romlási fázisban lévő gyümölcsöket csoportba lehet sorolni.

Többváltozós módszerrel a romlás különböző szakaszai különböző kísérletsorozatok esetén is elkülönülnek. Megfelelő adatfeldolgozó szoftverek segítséget nyújtanának a GC-MS mérőműszerek mezőgazdasági minőségellenőrzési rendszerekben történő szélesebb körű és költséghatékony felhasználásában. Az adataim és feldolgozásuk megmutatják, hogy a manuális kiértékelés mennyire időigényes a többváltozós statisztikai módszerekhez képest.

A következő oldalon látható a munka folyamatábrája.

3. ábra: Penészgombával fertőzött gyümölcsök légterének mintavétele.

4. ábra: SPME-GC-MS-el mért VOC-k.

5. ábra: A VOC-k koncentrációinak többváltozós elemzése a minták közti különbségek felderítésére.

6. ábra: Marker vegyület kiválasztása.



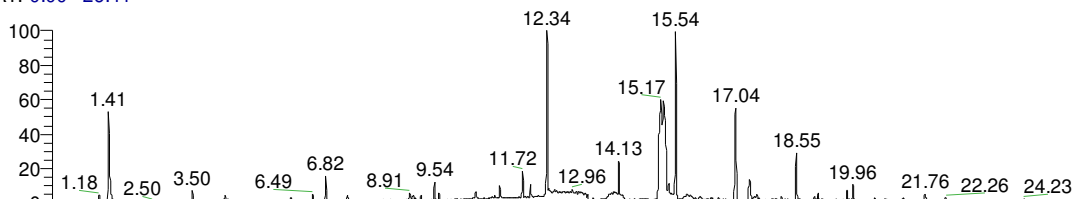
# Illékony vegyületeinek változása *B. cinerea* és *P. expansum* hatására



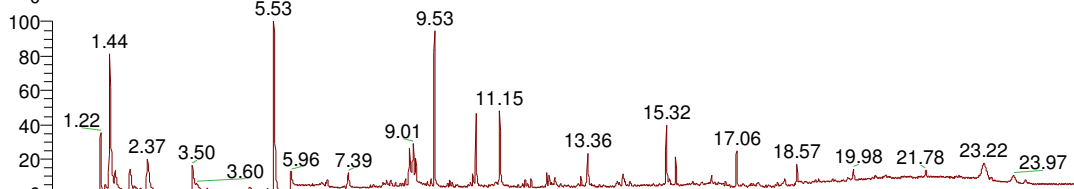
3. ábra: Romlott és ép alma fényképe 1 hét után.

mérés

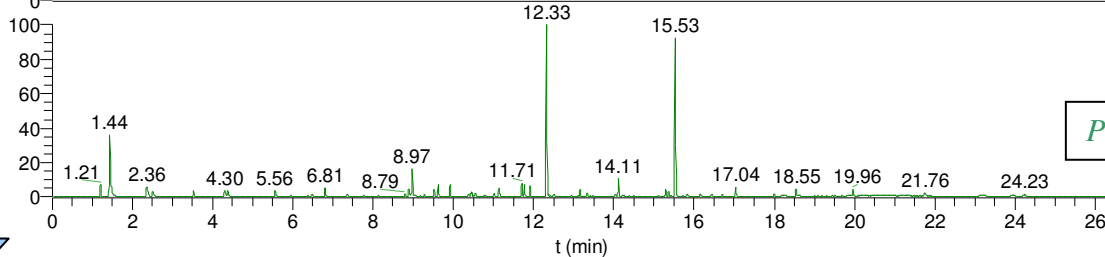
RT: 0.00 - 26.41



*B. cinerea*



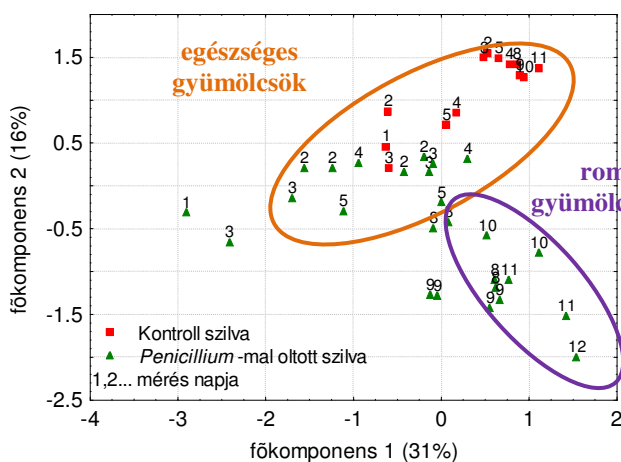
kontroll



*P. expansum*

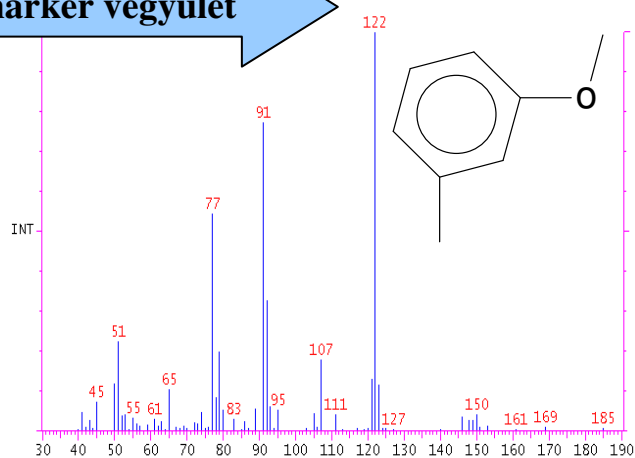
4. ábra: Egészséges és oltott, már megromlott gyümölcsök kromatogramjai

adatelemzés



5. ábra: főkomponens-elemzés a minták légtérének VOC-inek koncentrációi alapján

marker vegyület



6. ábra: metoxi-3-metil-benzol molekulája és tömegspektrum

# ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

## 1. A szilvaminták mintaelőkészítési/mintavételi rendszerének kritikai vizsgálata során elért új tudományos eredmények.

Gyümölcsminták tárolása során bekövetkező romlás nyomonkövetésére létrehoztam egy olyan kísérleti modellrendszert, mely alkalmas az illékony alkotók mintavételezésére és az adatok statisztikai feldolgozásával jelezni a romlást. A romlott szilva minták esetében meghatározó vegyületek: butánsav-metil-észter, sztirol, 3-karén ( $C_{10}H_{16}$ ), metoxi-3-metilbenzol, 1-decin és 1 azonosítatlan vegyület. A sztirol és az 1-metoxi-metilbenzol alapján, még a mennyiségi információk nélkül, annak alapján, hogy ezek a vegyületek megtalálhatók-e egy rendszerben vagy nem, meg lehet különböztetni, hogy kontroll vagy oltott szilvához tartoznak-e az egyes légtérből vett minták. Ez igaz, két különböző sebességgel romló szilva kísérletsorozat eredményei esetén is, hiába használtunk kissé más mérési körülményeket a párhuzamos oltások során.

## 2. Az almaminták illékony komponenseinek elemzése során elért új tudományos eredmények.

A egészséges alma aromakomponenseinek koncentrációja nem állandó ebben a kísérleti rendszerben, változik az idővel. A változás egységes a különböző vegyületekre, így összevetve a fertőzött almák illékony vegyületeivel, használható az összehasonlításra. Fertőzött almák illékony alkotóinak vizsgálatakor megállapítható, hogy főként az észterek és terpénvegyületek koncentrációi változnak a romlás folyamán. A kísérleti adataink alátámasztják azt a feltételezésünket, miszerint a mikroorganizmusok élettevékenységük során egyes észter vegyületeket elhasználnak, ezért ezek koncentrációjának csökkenése szemben az ép almákon tapasztalt koncentrációnövekedéssel a romlás előrejelzésére használható fel. Parciális legkisebb négyzetek (PLS) elve alapján történő regressziós módszerrel az észtervegyületek alapján az oltástól eltelt idő becsülhető.

## 3. *Penicillium expansum* fertőzött 'Granny Smith' minták illékony szerves vegyületeinek vizsgálata során elért új tudományos eredmények.

Az egészséges és a romlott alma megkülönböztetésben fontos vegyületek közül a pentánsav-etil-észter és a hexil-propanoát koncentrációja csökken a *P. expansum* fertőzött mintákban a romlás előrehaladtával, míg metil-3,3-dimetil-butanoát, etil-hexanoát és 1-metoxi-3-metilbenzol koncentrációja nő. A támogató vektor módszer regressziós változatával (SVR) modellt építettünk, melyek alapján becsülni lehet a sztirol koncentrációját az oltástól eltelt napok számából.

## 4. Új tudományos eredmények a *Penicillium expansum* fertőzött *Prunus Salinica* minták esetén.

Főkomponens-elemzés segítségével kiválasztottam azokat a szerves illékony alkotókat, amelyek az egészséges és a romlott szilva megkülönböztetésben fontosak, majd az almák esetében talált lehetséges

marker vegyületekkel hasonlítottam ezeket össze. Megállapítottam, hogy mind a szilván, mind az almán csak a *Penicillium expansum* oltott gyümölcsök esetében keletkeznek a következő marker vegyületek: sztirol, etil-benzoát, 1-metoxi-3-metil-benzol. Mivel ezek általánosan megjelennek az almán és a szilván is, feltételezhetjük, hogy a *Penicillium Expansum* más gyümölcsmintákon növekedve is termelheti őket.

#### 5. Új tudományos eredmények a *Botrytis cinerea*val fertőzött *Prunus Salinica* minták esetén

Megállapítottam, a *Botrytis cinerea* esetében a romlott és az egészséges szilvák megkülönböztetésében fontos illékony szerves vegyületeket, ezek a butánsav-2-2-metil-hexil-észter, hexánsav-butil-észter, ecetsav-hexil-észter, izopropil-alkohol, 2-metil-4-penténal. Ezek közül csak az izopropil-alkohol közös a *Penicillium expansum* oltott gyümölcsök esetében detektált vegyületekkel, azonban az izopropil-alkohol rövid retenciós ideje miatt ebben a modellrendszerben nem használható a romlás előrejelzésére.

## **AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK**

### **Impakt faktoros folyóiratcikkek:**

- S.F.Sim and V.Sági-Kiss, Multiple Self Organising Maps (mSOMs) for simultaneous classification and prediction: Illustrated by spoilage in apples using volatile organic profiles, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 109 (2011) 57–64
- V. Sági-Kiss and P. Fodor, Development of a SPME-GC-MS method for spoilage detection in case of plums inoculated with *Penicillium Expansum*, *Acta Alimentaria*, Vol. 40 (Suppl.), pp. 188–197 (2011)
- Sim S. Fong, Virág Sági-Kiss and Richard G. Brereton, 2010, Self-Organizing Maps and Support Vector Regression as aids to coupled chromatography: Illustrated by predicting spoilage in apples using volatile organic compounds, *Talanta*, 83, 1269-78 (2011)

### **Az értekezésben szereplő eredményeket az alábbi hazai és nemzetközi konferenciákon ismerttettem:**

- Virág Sági-Kiss, Sim Fong, Andrea Pomázi, Péter Fodor, Richard G Brereton, Anna Maráz, 2009. Prediction of fungal fruit spoilage via detection of volatile organic compounds, 2nd Central European Forum for Microbiology (CEFARM), Keszthely, Hungary, 7-9 October 2009 (English), abstract: *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 56, page 167-168 (előadás összefoglaló)
- Sági-Kiss Virág, Fodor Péter, Pomázi Andrea, Maráz Anna, 2009. Predicting spoilage in storehouses based on microbial metabolic profiling, Conference of Chemical Engineering '09, Veszprém, Hungary, 21-23 April 2009 (Hungarian), abstract: *Conference Proceeding*, page 103. (előadás összefoglaló)

- Virág Sági-Kiss, Sim S. Fong, Andrea Pomázi, Péter Fodor, Richard G. Brereton, Anna Maráz, 2010, SPME, GC-MS integrated with chemometrics for prediction of fungal fruit spoilage, 7th Aegean Analytical Chemistry Days, 29 Sept – 03 Okt, Lesvos, Greece (poszter összefoglaló)
- Sági-Kiss Virág, Fodor Péter, Pomázi Andrea, Maráz Anna, 2009. Predicting mouldy spoilage in storehouses based on microbial metabolic profiling, Conference of Chemical Engineering '10, Veszprém, Hungary, 27-29 April 2010 (Hungarian), abstract: Conference Proceeding, page 103 (poszter összefoglaló)
- Virág Sági-Kiss, Sim Fong, Andrea Pomázi, Péter Fodor, Károly Héberger, Richard G Brereton, 2009 Pattern recognition and GCMS peak detection as an aid to predicting spoilage in fruit from production of volatile organic compounds (VOC). Conferentia Chemometrica 2009, Siófok, (English) , **legjobb poszter díj** (poszter összefoglaló)

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A téma multidiszciplinaritása miatt két másik kutatócsoporttal együttműködve születtek az eredmények. A mikrobiológia rendszer kidolgozását és minták előkészítését a Budapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológia Tanszékének munkatársai végezték Dr. Maráz Anna vezetésével. Különösen köszönöm Dr. Pomázi Andreának a közreműködését. A többváltozós statisztikai módszerekhez az adattáblát és a módszerek egy részét a Bristol Egyetem, Centre for Chemometrics munkatársai segítségével készítettük Prof. Richard Brereton vezetésével. Különösen köszönöm Dr. Sim Sion Fongnak a közreműködését.

Szeretnék köszönetet mondani családomnak, akik lehetővé tették, hogy idáig eljuthassak; és barátaimnak a folyamatos támogatásért. Témavezetőimnek, dr. Fodor Péternek, aki tanszékére befogadott és biztosította azt az anyagi és szakismereti háttérrel, melyre munkám épülhetett, dr. Héberger Károlynak az adatok értékelése során nyújtott kiemelkedő tanácsaiért és hogy a mentorom volt a kemometriai tanulmányaim során. Ezenkívül az Alkalmazott Kémia Tanszék dolgozóinak, a diplomázó hallgatóimnak és mindenkinek aki a munkában segítségemre volt.