



Élelmiszertudományi Kar

**ROMLÁST OKOZÓ, POTENCIÁLISAN TOXINKÉPZŐ
PENÉSZGOMBA FAJOK NÖVEKEDÉSÉNEK MODELLEZÉSE A
HŐMÉRSÉKLET ÉS A VÍZAKTIVITÁS FÜGGVÉNYÉBEN**

Doktori értekezés tézisei

Csernus Olívia

Témavezetők: Dr. Beczner Judit, CSc

Dr. Baranyi József, PhD

Konzulens: Dr. Farkas József, DSc

**Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ
Agrárkörnyezet-tudományi Kutatóintézet
Környezeti és Alkalmazott Mikrobiológiai Osztály**

**Budapest
2014**

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Felföldi József, PhD

Egyetemi tanár

BCE, Élelmiszertudományi Kar,

Fizika-Automatika Tanszék

Témavezetők: Dr. Beczner Judit, CSc

Tudományos tanácsadó

Agrárkörnyezet-tudományi Kutatóintézet

Dr. Baranyi József, PhD

Leader of the Computational Microbiology Research Group

Institute of Food Research, Norwich, Anglia

Konzulens: Dr. Farkas József, DSc

Emeritus professzor, az MTA rendes tagja

BCE, Élelmiszertudományi Kar

Hűtő és Állattermék Technológiai Tanszék

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 témavezetők jóváhagyása

1. BEVEZETÉS

A betakarítás/szüret utáni, az ún. postharvest veszteségekért nagymértékben felelős mikrobás, főként penészes romlás nemcsak gazdasági veszteségeket okoz, hanem élelmiszerbiztonsági szempontból is kockázatot jelent. Az élelmiszer alapanyag előállítás (növénytermesztés), feldolgozás, tárolás és forgalmazás minden fázisában számolni kell a penészgombák jelenlétével és növekedésével. Az élelmiszeripar számára alapvető a penészgombáktól és a gombák toxinjaitól lehetőleg mentes alapanyag.

Az élelmiszertermelés mennyiségi gondjai mellett világszerte előtérbe kerül az élelmiszerek minőségének problémája, és stratégiai kérdésként fogalmazódik meg a biztonságos élelem, a jó minőségű élelmiszer iránti igény.

A globális klímaváltozás egyre növekvő mértékben kihat az élelmiszerellátás biztonságossága („food security”) mellett az élelmiszer-egészségügyi biztonságra („food safety”) is. A hőmérséklet növekedése elősegíti a meleget kedvelő penészgombák, pl. az aszpergillusok elterjedését és az általuk termelt mikotoxinoknak az élelmiszerekben észlelt egyre gyakoribb megjelenését. A klímaváltozás és az élelmiszergazdasági jelentőségű penészgombák ökofiziológiai kapcsolata az előbbiekben említett mindkét szempont alapján nagy figyelmet érdemel, mert a penészgombák, különösen a toxikus anyagcseretermékeket (mikotoxinokat) képzők, a terményeink romlási és tárolási veszteségein túlmenően meghatározó élelmiszer-biztonsági jelentőségűek is.

Mindezek miatt és a megelőzésre/védekezésre való jobb felkészülés érdekében fontos a penészgombák növekedési törvényszerűségei ökofiziológiai összefüggéseinek elmélyült ismerete és lehetőség szerinti előrejelzése. Nagyszámú adat összegyűjtése szükséges ahhoz, hogy az azokra épülő matematikai modellek segítségével eredményes kockázat-megelőző munka legyen végezhető. Célszerű tehát első közelítésben laboratóriumi, reprodukálható körülmények között a penészgombák növekedési hőmérséklet- és vízáktivitás függésének tanulmányozása.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A doktori munkám célkitűzése a penészgomba növekedés modellezése volt különböző környezeti feltételek között.

A feladatok ennek megfelelően:

- szisztematikus adatgyűjtés a toxinogén penészgombák előfordulásáról, a növekedésüket befolyásoló fő ökofiziológiai (hőmérséklet és vízaktivitás) tényezők hatásáról;
- a hőmérséklet és a vízaktivitás együttes hatásának *in vitro* vizsgálata a kiválasztott penészgomba fajok (*Aspergillus niger* és *Penicillium expansum*) növekedésére;
- az *Aspergillus niger* penészgomba növekedését legjobban leíró matematikai modell kiválasztása/megalkotása;
- a ComBase továbbfejlesztésében való részvétel – egy ComBase-kompatibilis mikológiai adatbázis felépítése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A vizsgálatok során alkalmazott penészgomba törzsek

A vizsgált penészgomba törzsek: *Aspergillus niger* F.00770 és *Penicillium expansum* F.00811, a Budapesti Corvinus Egyetem, Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származnak.

3.2 A vizsgálatokhoz használt tápközegek

- Maláta táptalaj (Malt Extract Agar - Merck)
- Szőlőlé alapú táptalaj (különböző fajtájú szőlőből frissen préselt lé agarral szilárdítva)
- Almalé alapú táptalaj (kereskedelemből származó 100%-os almalé agarral szilárdítva)

Vizsgáltam, hogy a két penészgomba faj hőmérséklettől (20, 25, 30 és 35°C) és vízaktivitástól (a_w 0,90; 0,92; 0,94; 0,96; 0,98 és 0,99) függő növekedési „válaszai” hogyan alakulnak (párhuzamos mérések) és mennyire reprodukálhatók (kísérletek ismétlése). A telepátmérőt naponta háromszor mértem, amíg az el nem érte a Petri csésze szélét (90 mm), illetve 36 napig, amíg a kísérlet tartott.

3.3 Alkalmazott módszerek

A táptalajok vízaktivitását glicerinnel (*P. expansum*) és NaCl-dal (*A. niger*) állítottam be. A mérés NOVASINA LabMaster. a_w (VITALIS, Magyarország) készülékkel történt, minden esetben három párhuzamos méréssel. A műszer kalibrálását minden méréssorozat előtt hat ponton (a_w 0,75; 0,53; 0,32; 0,11; 0,90; 0,97) végeztem el. A kísérlet során esetleg bekövetkező változás megállapítására a táptalajok vízaktivitását a kísérletek végén (36 nap) ellenőriztem. A tápközegek vízaktivitása a vizsgált időszakon belül egyik inkubációs hőmérsékleten sem változott.

A statisztikai kiértékelés során regresszió számítást és varianciaanalízist alkalmaztam a Microsoft Excel[®] statisztikai makróinak használatával.

A szaporodási görbéket a DMFit – Excel makróval illesztettem, amely a Baranyi-modellt használja (IFR fejlesztésű szoftver, lásd

<http://www.combase.cc/index.php/en/downloads/file/53-dmfit-30>).

4. EREDMÉNYEK

A mérések alapján az *Aspergillus niger* F.00770 törzsének optimális növekedési hőmérséklete 30-35°C 0,98-as vízáktiváción. A *Penicillium expansum* F.00811 törzs esetében a maximális növekedési sebességet a kísérlet során alkalmazott inkubációs hőmérsékletek közül 25°C-on, 0,98-as vízáktivitás mellett figyeltem meg. Az eredményeim ebben a tekintetben alátámasztják a szakirodalomban található adatokat.

Hibaanalízis mutatta ki, hogy a penészgomba növekedés esetében a kísérleti variabilitás, tehát a párhuzamosok közötti különbség megközelítőleg 5%. Amennyiben a másodlagos modell a mért adatokra tökéletesen illeszkedik, megközelítőleg 17%-os pontossággal lehet a növekedési sebesség mérését megismételni adott hőmérséklet és vízáktivitás esetén. A hőmérséklet és a vízáktivitás együttes hatását leíró válaszfelület 0,19-es illeszkedéssel tudta megközelíteni a növekedési sebesség logaritmusát. Tehát a kísérlet egy újabb ismétlése során, a mérési tartományon belül, a növekedési ráta várhatóan kb. 20%-kal fog eltérni a megjósolttól (predikció).

A hibaanalízisnél használt kvadrátikus modell lokális környezetben (az elvégzett kísérlet intervallumon belül) használható. Az újonnan alkotott másodlagos modell (ún. kombinált modell) jobban alkalmazható predikcióra a növekedés határaihoz közel eső pontok esetében. Az új modellt független adatokkal ellenőriztük, s 24 adatból kettő nem esett bele a predikció konfidencia sávjába, ami reprezentálja a 95%-os konfidencia intervallum pontosságát.

Gyümölcs alapú táptalajokat is használtam; *Penicillium expansum* esetében almalé alapú tápközeget (kereskedelmi forgalomból származó 100%-os almalé), *Aspergillus niger* esetében pedig szőlőlé alapú táptalajt (Furmint, Hárslevelű, Kékfrankos és Olaszrizling fajtájú szőlőből frissen préselve), a penészgombák növekedésének további jellemzésére. Elmondható, hogy a szőlőlé alapú táptalajon mért adatokból számolt növekedési ráták azonos tendenciát írnak le, mint a kombinált modell, bár enyhe szisztematikus torzítással. A *P. expansum* az esetek nagy részében maláta táptalajon jobban nőtt mint almalé alapú tápközegen. Ennek oka valószínűleg az, hogy az almalé tápanyagban szegényebb, mint a maláta.

A ComBase mikológiai adatbázisának létrehozásával célunk, hogy a kutatómunkát hatékonyabbá tegyük az adatbázisban elérhető adatok segítségével, és az a gyakorlat számára is jól hasznosítható legyen. A bevitt adatok saját mérési eredményeinkből, publikált cikkekből, illetve kooperáló egyetemek és kutatóintézetek mérési eredményeiből származnak. Az egyetemek, kutatóintézetek és az élelmiszeripar számára egy ilyen jellegű adatbázis értékes információ forrást jelent. Segítségével a közzétett adatok gyorsan és költségmentesen elérhetők, illetve precíz (kvantitatív, és a további számításokhoz matematikai) alapokat szolgáltatnak a mikrobiológiai kutatásokhoz.

Vizsgálati eredményeim megerősítették azt a feltételezést, hogy a nyári hőhullámok gyakoriságának és intenzitásának feltételezett várható növekedése az élelmiszerek fokozott mikológiai kockázatát idézheti elő a régiókban, nemcsak a most is elterjedt *Penicillium* fajok szaporodását stimulálva, hanem lehetőséget teremtve a melegkedvelő *Aspergillus* fajok fokozott megtelepedésének, illetve mezőgazdasági és kertészeti terményeink és tárolt élelmiszereink velük való erőteljes szennyeződésének is.

Az eredmények hozzájárulnak a toxinogén penészgombák szaporodása kvantitatív előrejelzésének lehetőségéhez a hőmérséklet és a vízaktivitás függvényében. Segítséget jelentenek a gyakorlatnak, továbbá a kockázatbecslés számára is hasznos információt nyújtanak.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Az *Aspergillus niger* növekedés prediktív modelljének hibaanalízise a kísérletek között jelentkező eltérések okait azonosította. Új fogalmak kerültek bevezetésre: (1) a *kísérleti variabilitás* (a párhuzamosok között jelentkező eltérés), amely megfelel az ANOVA-ban használatos csoportokon belüli variabilitás (within groups) fogalmának; (2) a *környezeti variabilitás* (az ismétlések között jelentkező eltérés), amely analóg az ANOVA-ban használatos csoportok közötti (between groups) variabilitás fogalommal.

A kétféle variabilitás kvantifikálása szerint 5%, illetve 17% volt a kísérleti és a környezeti hozzájárulás a teljes variabilitáshoz. Ez azt jelenti, hogy egy újabb kísérlet során a növekedési ráta várhatóan kb. 20%-kal fog eltérni a megjósolttól (predikció).

2. Az *Aspergillus niger* növekedésének leírásához elsőként alkalmaztam egy olyan ún. kombinált másodlagos modellt, amely a környezeti változók minimum, optimum és maximum értékein alapuló ún. kardinális modell és egy kvadratikus válaszfelület kombinációjából származtatható. A kombinált modell jobban alkalmazható predikcióra a növekedés határaihoz közel eső pontok esetében, mint a hibaanalízisre használt kvadratikus válaszfelület, amely csak interpolációra alkalmas. A parabola nyújtását biztosító főgyűthető variálásával ($const_1$, $const_2$) lehetővé vált, hogy a válaszfelület aszimmetrikus legyen, ami jobban tükrözi az adatok trendjét.
3. Bemutattam, hogy a szőlőlé alapú táptalajon mért adatokból számolt növekedési ráták azonos tendenciát írnak le, mint a kombinált modell. Kedvezőtlen környezeti feltételek (elsősorban a növekedésre nézve minimum feltételek) között a szőlőlé alapú tápközeg jobban támogatja az *A. niger* növekedését, mint a maláta táptalaj. Az almaléből készült táptalaj viszont kevésbé támogatja a *P. expansum* növekedését, még optimális környezeti feltételek között is. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a modellek ellenőrzése/validálása természetes eredetű tápközegen is feltétlenül szükséges.
4. A ComBase prediktív mikrobiológiai adatbázis továbbfejlesztése során létrehozott adatbázis a penészgombák növekedésére fókuszál, különböző környezeti feltételek között. A ComBase mikológiai adatbázisának felépítése, Dr. Baranyi József témavezetőmmel végzett együttműködésben, ezen kísérlet adataival kezdődött el.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ TARTOZÓ PUBLIKÁCIÓK

IF-es folyóiratok:

Csernus, O., Andrásy, É., Bata-Vidács, I., Beczner, J., Farkas, J. (2011): *Penicillium expansum* és *Aspergillus niger* növekedési hőmérséklet- és vízaktivitás-függésének vizsgálata, különös tekintettel a klímaváltozásra. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*, 57 (4) 209-218 (IF: 0,040)

Csernus, O., Bata-Vidács, I., Farkas, J., Beczner, J. (2013): Effects of environmental temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria*, 42 (4) 640-648 (IF: 0,43)

Baranyi, J., **Csernus, O.**, Beczner, J. (2014): Error analysis in predictive modelling demonstrated on mould data. *International Journal of Food Microbiology*, 170 78-82 (IF: 3,425)

NEM IF-es folyóiratcikk, magyarul:

Csernus, O. (2012): Penészgomba szaporodás előrejelzése – Mikológiai adatbázis. *Konzervújság*, LVIV. Évf. (3-4.) 52-53

Nemzetközi konferencia (összefoglaló):

Csernus, O., Baranyi, J. (2011): Data mining for training in food microbiology. NetSci-2011 Network Science Applications to Food Security and Safety. Book of abstracts. p. 8.

Csernus, O., Baranyi, J., Beczner, J., Farkas, J. (2011): Knowledge mining from microbiological data – application of network science in food microbiology. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* Vol. 58, Supplement. p. 133.

Csernus, O., Baranyi, J. (2012): Mycology database on prediction of mould's growth. 5th Hungarian Mycological Conference. Book of abstracts Vol. 51. No.1. pp. 54-56.

Csernus, O., Dalmadi, I., Bata-Vidács, I., Andrásy, É., Beczner, J., Farkas, J. (2013): The use of electronic nose for rapid estimation of mould contamination of fruit products. 4th MoniQA International Conference, 26 February – 1 March 2013, Budapest. Book of abstracts p. 105.

Csernus, O., Bata-Vidács, I., Andrásy, É., Beczner, J., Farkas, J. (2013): Effect of environmental temperature on growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger*, with special reference to the climate change. 4th MoniQA International Conference, 26 February – 1 March 2013, Budapest. Book of abstracts p. 106.

Csernus, O., Baranyi, J. (2013): Predictive Mycology. 4th MoniQA International Conference 26 February – 1 March 2013, Budapest. Young Scientist Forum. Book of abstracts pp. 164-165.