



**Gombatermesztésben előforduló kártékony penészek  
korai kimutatása illékony másodlagos  
anyagcseretermékeikkel**

**Doktori (PhD) értekezés**

**Geréné Radványi Dalma**

Budapest

2016.

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** Dr. Vatai Gyula  
egyetemi tanár  
SZIE, Élelmiszertudományi Kar,  
Biomérnöki és Folyamattervezési Intézet  
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

**Témavezető(k):** Dr. Fodor Péter  
professor emeritus  
SZIE, Élelmiszertudományi Kar,  
Élelmiszerminőségi, -biztonsági és Táplálkozástudományi Intézet  
Alkalmazott Kémia Tanszék

Jókainé Dr. Szatura Zsuzsanna  
egyetemi docens  
SZIE, Élelmiszertudományi Kar,  
Élelmiszerminőségi, -biztonsági és Táplálkozástudományi Intézet  
Alkalmazott Kémia Tanszék

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
1. BEVEZETÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1. Illóanyagok az élelmiszerekben	11
2.2. Aroma komponensek	11
2.2.1. Nem enzimátikus reakciók során keletkező illékony vegyületek	12
2.4.2. Enzimátikus reakciók során keletkező illékony vegyületek	12
2.3. Illékony szerves vegyületek (VOC)	14
2.3.1. VOC vegyületek	14
2.3.2. MVOC vegyületek	15
2.3.3. Penészek illékony anyagcseretermékei	16
2.4. Gombakomposzt gyártás, gombatermesztés és a jellemzően előforduló megbetegedések	19
2.4.1. Gombatermesztés az Európai Unióban	19
2.4.2. Csiperkegomba-termesztés Magyarországon	19
2.4.3. Gombatermesztés folyamata	20
2.4.4. Gombatermesztésben előforduló mikrobiális megbetegedések	21
2.5. Trichoderma nemzetség jellemző tulajdonságai	24
2.5.1. A zöldpenészes fertőzés megjelenése	24
2.5.2. Trichoderma nemzetség jellemzése	25
2.5.3. Trichoderma fajok biokontroll vonatkozásai	26
2.5.4. A zöldpenészes megbetegedésért felelős <i>Trichoderma aggressivum</i>	28
2.5.5. Trichoderma aggressivum és csiperke közötti kölcsönhatások	29
2.5.6. Trichoderma fajok anyagcseréje	30
2.6. Illékony szerves vegyületek vizsgálatának lehetőségei	32
2.6.1. Gőztér analízis	32
2.6.2. SPME mintavevő eszköz	34
2.6.3. Gázkromatográf-tömegspektrométer kapcsolt analitikai rendszer	39
2.6.4. Minőségi információ - tömegspektrum	42
2.6.3. VOC vegyületek vizsgálata a szakirodalomban	44
2.6.3. MVOC vegyületek vizsgálata a szakirodalomban	44
2.7. Kemometriai módszerek	45
3. CÉLKITŰZÉSEK	51
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	52
4.1. Az ötödik fejezetben felhasznált anyagok és módszerek	52
4.1.1. Mikroorganizmusok	52
4.1.2. Tápagar	52
4.1.3. SPME mintavétel	53
4.1.4. Retenciós idő standardok	54
4.1.5. Mérési paraméterek	54
4.2. A hatodik fejezetben felhasznált anyagok és módszerek	56
4.2.1. Mikroorganizmusok	56
4.2.2. Tápagarok	56
4.2.3. SPME mintavétel	57
4.2.4. Mérési paraméterek	58

4.3. A hetedik fejezetben felhasznált anyagok és módszerek	59
4.3.1. Minták	59
4.3.2. Tápagar	59
4.3.3. SPME mintavétel	59
4.3.4. Mérési paraméterek	60
5. EREDMÉNYEK. MÓDSZERFEJLESZTÉS A GOMBATERMESZTÉSben KÁRTÉKONY PENÉSZEK ILLÉKONY ANYAGCSEREMARKEREINEK DETEKTÁLÁSÁRA ÉS MONITOROZÁSÁRA	61
5.1. HS-SPME-GC-MS módszer fejlesztése gombatermesztésben kártékony penészek jelenlétének indikálására	62
5.1.1. A kromatográfias módszer kidolgozása	62
5.1.2. A SPME mintavétel optimalizálása	63
5.1.3. Retenció idő standardok használata	65
5.2. Gombatermesztésben előforduló kártékony penészek illékony anyagcseremarkereinek meghatározása	66
5.3. A gombatermesztésben előforduló kártékony penészek illékony anyagcseremarkereinek megfigyelése, monitorozása	70
5.3.1. Anyagcseremarkerek intenzitásértékeinek időbeli változása	70
5.3.2. Kemometriai módszerek alkalmazása penészek elkülönítésére	72
5.3.3. A leoltástól eltelt napok számának becslése PLS-R modellel	77
6. EREDMÉNYEK. <i>TRICHODERMA AGGRESSIVUM</i> F. <i>EUROPAEUM</i> KÜLÖNBÖZŐ SZÉNHYDRÁTFORRÁSÚ TÁPAGARON TÖRTÉNŐ VIZSGÁLATA	79
6.1. A <i>Trichoderma aggressivum</i> MVOC mintázata	80
6.2. A <i>Trichoderma aggressivum</i> növekedésének vizsgálata négy különböző tápagaron	81
6.3. <i>Trichoderma aggressivum</i> illékony anyagcseremarkereinek azonosítása	82
6.3.1. „Nagy intenzitású” komponensek egy lépéses azonosítása	83
6.3.2. Komponensek azonosítása egy lépéses háttérkorrekcióval	84
6.3.3. „Kis intenzitású” komponensek több lépéses azonosítása	85
6.4. <i>Trichoderma aggressivum</i> marker komponenseinek vizsgálata	88
6.4.1. Marker komponensek meghatározása, csoportosítása	88
6.4.2. Marker komponensek monitorozása	92
6.4.3. Marker komponensek vizsgálata módosított tápagaron	100
6.5. Gombatermesztésben előforduló kártékony penészek MVOC adatbázisa	101
7. EREDMÉNYEK. A GOMBATERMESZTÉSben KÁRTÉKONY PENÉSZEK ELKÜLÖNÍTÉSÉNEK LEHETŐSÉGE DETRENDELTE FLUKTUÁCIÓELEMZÉSSEL	103
7.1. A detrendelt fluktuációelemzés módszerének ismertetése	104
7.2. Teljes ionkromatogramok (TIC) vizuális összehasonlítása	106
7.3. Idősorelemzés detrendelt fluktuációelemzés segítségével	107
KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	112
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	114
ÖSSZEFOGLALÁS	116
SUMMARY	118
MELLÉKLET 1. IRODALOMJEGYZÉK	120
MELLÉKLET 2. ÁBRÁK GYŰJTEMÉNYE	131
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	134

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>Rövidítés:</b>	<b>Angol jelentés:</b>	<b>Magyar jelentés:</b>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>	varianciaanalízis
BCAs	<i>biocontrol agents</i>	biokontroll ágensek
CA	<i>cluster analysis</i>	klaszter analízis
CAR	<i>carboxen</i>	carboxen
CI	<i>chemical ionization</i>	kémiai ionizáció
CW	<i>carbowax</i>	carbowax
C7	<i>C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>, n-heptane</i>	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> , n-heptán
C9	<i>C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>, n-nonane</i>	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> , n-nonán
C14	<i>C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>, tetradecane</i>	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> , tetradekán
C15	<i>C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>, pentadecane</i>	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> , pentadekán
D	<i>distance</i>	távolság
DDT	<i>dichloro-diphenyl-trichloroethane</i>	diklór-difenil-triklóretán
DFA	<i>detrended fluctuation analysis</i>	detrendelt fluktuáció elemzés
DI-SPME	<i>direct immersion solid-phase microextraction</i>	közvetlen bemerítéses szilárd-fázisú mikroextrakció
DMAP	<i>dimethylallil diphosphate</i>	dimetil-allil-pirofoszfát
DVB	<i>divynil-benzene</i>	divinil-benzol
DS	<i>data system</i>	adattfeldolgozó rendszer
ENSZ	<i>United Nations (UN)</i>	Egyesült Nemzetek Szervezete
EI	<i>electron impact (elektron ionization)</i>	elektronütköztetési ionizáció
EU	<i>European Union</i>	Európai Unió
eV	<i>electron volt</i>	elektron volt
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>	Élelmiszerügyi és Mezőgazdasági Világszervezet
FPP	<i>farnesyl phyrophosphate</i>	farnezil-pirofoszfát
GC	<i>gas chromatograph</i>	gázkromatográf
GC-MS	<i>gas chromatograph - mass spectrometer</i>	gázkromatográf-tömegspektrométer kapcsolt rendszer
GC-MS-DS	<i>gas chromatograph - mass spectrometer - data system</i>	gázkromatográf-tömegspektrométer- adattfeldolgozó rendszer
GGPP	<i>geranyl geranyl phyrophosphate</i>	geranil-geranil-pirofoszfát
GHs	<i>glycoside hydrolases</i>	glikozid hidrolázok
GPP	<i>geranyl phyrophosphate</i>	geranil-pirofoszfát
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
HP-5MS	<i>(5%-phenyl)-methylpolysiloxane</i>	(5%-fenil)-metil-polisziloxán
HS	<i>headspace</i>	minta feleltti gőztér (gőztérextrakció)
HS-GC	<i>headspace- gas chromatography</i>	gőztérextrakciós-gázkromatográfia
HS-SPME	<i>headspace solid-phase microextraction</i>	gőztérextrakciós szilárd-fázisú mikroextrakció
HS-SPME-GC-MS	<i>headspace-solid-phase microextraction- gas chromatograph- mass spectrometer</i>	gőztérextrakció - szilárd fázisú mikroextrakciós mintavétellel kapcsolt gázkromatográfia tömegspektrométer
IPP	<i>isopentenyl phyrophosphate</i>	izopentenil-pirofoszfát
LDA	<i>linear discriminant analysis</i>	lineáris diszkriminancia analízis
LV	<i>latent variables</i>	látens változók
KA	-	komposzt agar (szárított gombakomposztból)
kb.	-	körülbelül
KMO	<i>Kaiser-Meyer-Olkin value</i>	Kaiser-Meyer-Olkin érték
KSH	-	Központi Statisztikai Hivatal
MEA	<i>malt-extract agar</i>	maláta kivonatos agar
MSE	<i>mean square error</i>	átlagos négyzetes hiba
MVOC	<i>microbial volatile organic compound</i>	mikrobiális eredetű illékony szerves vegyület
MS	<i>mass spectrometer</i>	tömegspektrométer

m/z	<i>relative masses of molecular ions</i>	töltésegységre eső tömeg
n	-	minták száma
n.a.	-	nincs adat
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>	Nemzeti Szabványügyi és Technológiai Intézet
PA	<i>polyacrylate</i>	poliakrilát
PCA	<i>principal component analysis</i>	főkomponens elemzés
PC	<i>principal component</i>	főkomponens
PDA	<i>potato-dextrose agar</i>	burgonya-dextróz agar
PDMS	<i>polydimethyl-siloxane</i>	polidimetil-sziloxán
PDMS/DVB	<i>polydimethylsiloxane/divinylbenzene</i>	polidimetil-sziloxán/divinilbenzol
PFTBA	<i>perfluorotributylamine</i>	perfluortributilamin
PLS-DA	<i>partial least squares discriminant analysis</i>	parciális legkisebb négyzetek elvén történő diszkriminancia elemzés
PLS-R	<i>partial least square regression model</i>	parciális legkisebb négyzetek elvén alapuló regressziós modell
P&T	<i>purge-and-trap</i>	„kihajtás” és „csapdázás”
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA</i>	véletlen primerekkel történő DNS-amplifikáció
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>	restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
RI	<i>retention index</i>	retenciós index
RMSE	<i>root mean square error</i>	átlagos négyzetes hiba gyöke
RMSEC	<i>root mean square error of calibration</i>	a kalibráció átlagos négyzetes hiba gyöke
RMSEP	<i>root mean square error of prediction</i>	a predikció átlagos négyzetes hiba gyöke
R <sup>2</sup>	<i>coefficient of determination</i>	determinációs együttható
SA	<i>similarity analysis</i>	azonosság elemzés
SMs	<i>secondary metabolites</i>	másodlagos anyagcseretermékek
SNA	<i>synthetischer Nährstoffarmer agar</i>	szintetikus tápanyagszegény agar
SPME	<i>solid-phase microextraction</i>	szilárd-fázisú mikroextrakció
stb.	-	és a többi
TIC	<i>total ion chromatogram</i>	teljes ionáram kromatogram
t <sub>R</sub>	<i>retention time</i>	retenciós idő
VA	-	víz agar
VOC	<i>volatile organic compound</i>	illékony szerves vegyület
6-PP	<i>6-phenyl-2H-pyran-2-one</i>	6-fenil-2H-prán-2-on

## 1. BEVEZETÉS

A csiperkegomba termesztés dinamikusan fejlődő ágazat nem csak Magyarországon, hanem szerte a világon. A kiváló minőség eléréséhez elengedhetetlen a jó alapanyag, vagyis a gombakomposzt előállítás. A komposzt búzaszalma, ló-, illetve baromfitrágya, gipsz és víz keveréke, amelyben összetett biológiai és mikrobiológiai folyamatok zajlanak le; ezen változások eredményeképpen jön létre a gombakomposzt. A hőkezelési szakaszt követően a komposztot gombacsírával oltják be, amelyen kis idő elteltével megjelennek a gombafejek és ezután elkezdődik a letermesztés fázisa. Könnyen belátható, ha a gombakomposzt minősége nem megfelelő, akkor termés-csökkenés, rosszabb esetben terméskiesés következhet be.

Minőségromlást idézhetnek elő bizonyos komposzton esetlegesen előforduló fertőzések, amelyek korai észlelésére szükség van. Az érlelőhelyiségekben ugyanis egyszerre több tonna komposzt is jelen van, így ha megtelepedik egy kisebb fertőzés, az hamar átterjedhet a komposzt teljes mennyiségére, amelynek igen jelentős gazdasági következményei lehetnek. A minőség megőrzése mellett fontos szempont a komposzton megjelenő fertőzések megelőzése, elkerülése, hiszen a csiperkegomba rendkívül érzékeny különféle megbetegedésekre (vírusos, bakteriális, penészes) és kártevőkre.

Az egyes penészes fertőzések időbeli detektálása döntő fontosságú a komposzt és a gomba minőségének megőrzése céljából. Magyarországon jelenleg főleg mikrobiológiai tesztekkel végzik a fertőzések detektálását. Jelenleg hazánkban még nem működik olyan online analitikai rendszer, amellyel a penészes fertőzés kimutatható lenne anélkül, hogy az adott szarzból mintát vennénk. Megoldást jelenthet a szilárd-fázisú mikroextrakciós szál (SPME), amellyel a minta feletti légtérből is detektálható a penész jelenléte, akár gombakomposzt tároló helyiségekben, akár gyümölcstárolókban is.

A SPME eszközzel végzett mintavételt általában valamilyen analitikai rendszer követi. Amennyiben a minta feletti illékony komponensek megkötése a cél, akkor GC-MS kapcsolt technikát érdemes társítani az eljáráshoz. A módszer előnye, hogy gyors, viszonylag egyszerű és megfelelő ismeretekkel pontos képet kaphatunk az egyes penészek által termelt mikrobiális eredetű illékony szerves vegyületekről (MVOC). A mikroorganizmusok online azonosításához egy olyan adatbázisra van szükség, amely tartalmazza mindazokat a marker vegyületeket, amelyekkel az adott penész jelenléte gyorsan kimutatható, esetleg a penészes fertőzés időpontja is előrejelezhető. Egy ilyen

adatbázis, a továbbiakban egyéb más kórokozók illékony vegyületeivel is bővíthető, ezáltal kiterjeszhetővé válik különböző érlelő tárolókban és szabályozott légterű tárolókban előforduló mikroorganizmusok kimutatására.

Doktori munkám során módszert fejlesztettem a gombatermesztésben kártékony penészek MVOC termékeinek feltérképezésére a minta feletti légtérből. A vizsgált penészek közül a *Trichoderma* nemzetséget már számos kutató vizsgálta, azonban a *T. aggressivum* f. *europaeum* illékony vegyületeinek átfogó vizsgálatára eddig még nem került sor. A másik két vizsgált penész (*Mycogone perniciosa*, *Lecanicillium fungicola*) MVOC vegyületeit még egyáltalán nem vizsgálták SPME mintavételi eljárással.

Munkám során összegyűjtöttem az egyes penészekre egyedileg jellemző úgynevezett marker vegyületeket. A *T. aggressivum* zöldpenész illékony vegyületeiről kevés irodalmi adat áll rendelkezésre, annak ellenére, hogy a gombatermesztés egyik legkártékonyabb penésze. Ebből adódóan elvégeztem annak részletes vizsgálatát több tápagaron, ami lehetőséget adott az MVOC vegyületek feltérképezésére és a különböző szénhidrátforrás hasznosítása során kibocsátott illékony vegyületek vizsgálatára. A vizsgált mikroorganizmusok és különböző tápagarra oltott penészek illékony anyagcserevegyületeinek meghatározása során nyert adathalmazból egy olyan adatbázist hoztam létre, amely tartalmazza a penészek azonosításához szükséges egyedi marker vegyületeket.

Doktori dolgozatomban továbbá egy új eljárást is bemutatok, amellyel kemometriai módszerek alkalmazásával hosszadalmas kiértékelési folyamat nélkül hatékonyan elkülöníthetők az egyes vizsgált penész minták.



## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Illóanyagok az élelmiszerekben

A zamat (*flavour*) a táplálék fogyasztásakor kialakuló többféle érzet összessége, ennek megfelelően az íz és az illat érzékelésének együttese határozza meg az ételek, italok zamatát. Az íz kialakításában szerepet játszó anyagok többnyire nem illékonyak szobahőmérsékleten, ugyanakkor egy termék illatát kialakító élelmiszeralkotók már illékony molekulák, amelyeket aromaanyagoknak nevezünk. Az íz- és az aromaanyag kategóriák nem átjárhatatlanok, egyes vegyületek mindkét fajta érzetet képesek kiváltani. (Belitz et al. 2009).

Az illékony anyagok koncentrációja az élelmiszereinkben alacsony (körülbelül 10-15 mg/kg), ezen vegyületek száma viszont nagy. Azok az élelmiszerek, amelyek például hőkezeléssel (kávé) vagy fermentációval (tea) készülnek, több mint 800 illékony komponenszt tartalmaznak. Ezeket az élelmiszerekre jellemző komponenseket már sokféleképpen csoportosították. Nijssen és munkatársai 1999-ben több mint 7100 illékony komponenszt írtak le körülbelül 450 élelmiszertermékből (Nijssen et al. 1999). Ezek a vegyületek korlátozott számban vesznek azonban csak részt az aroma kialakításában, az aroma-aktív anyagok közül is csak azok, amelyek az illatküszöb feletti mennyiségben vannak jelen. Arra is találhatunk példát, hogy több küszöbérték alatti koncentrációban jelenlévő illóanyag együttesen már képes kialakítani a termékre jellemző aromát. Számos adalékanyag hozzáadásával azonban elérhető, hogy a küszöbérték alatti koncentrációban lévő illóanyag aromát alakítson ki. Kulcsfontosságú illatanyagoknak (*key odorants*) nevezzük azokat a molekulákat, amelyek egy adott élelmiszerre vonatkozó jellegzetes illat kialakításában döntő szerepet játszanak; meghatározzák a termék illatát, aromajellegét. Ilyen kulcsfontosságú illatanyagok például a limonén, ami a narancslevek citrusos jellegét, az 1-oktén-3-ol, ami a gombák vagy a camembert sajt gomba illatát, illetve a benzaldehid, ami a mandula, cseresznye, szilva kesernyés, mandulás illatát adja (Belitz et al. 2009).

### 2.2. Aroma komponensek

Az élelmiszerekben azonosított több mint 7000 illékony vegyületnek csupán közel 5 %-a aroma, a többi vegyület aromaértéke (*aroma value*, definiált élelmiszerben az adott komponens koncentrációjának és a komponens illatküszöb-értékének (*odor threshold*) hányadosa) nem éri el azt az küszöb-érték (*threshold value*) szintet, ahonnan már éreznénk őket, tehát nem aromaaktív vegyületek. Magas aromaértékkel bíró vegyületek fogják az adott élelmiszer jellemző aromáját

meghatározni. Ezek az illékony vegyületek keletkezhetnek enzimatis vagy nem enzimatis úton is (Belitz et al. 2009).

### 2.2.1. Nem enzimatis reakciók során keletkező illékony vegyületek

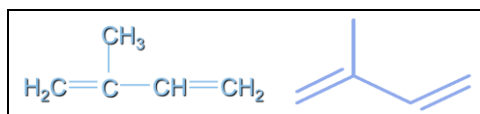
Egy illékony vegyület aromában történő kifejeződéséhez szükséges koncentrációja függ egyrészt a vegyület illatküszöb-értékétől, illetve más illatokkal történő interakciójától. Nem enzimatis reakciók szobahőmérsékleten is okozhatnak aromaváltozást, melyet hosszú tárolási idő után lehet észrevenni. Ebben részt vesz például a lipid peroxidáció, *Maillard* reakció és az ehhez kapcsolódó aminosavak *Strecker* degradációja, amelyek jelentős változást okozhatnak akár alacsony hőmérsékleten is, amennyiben a tárolási idő elegendően hosszú. A nem enzimatis barnulás (*Maillard* reakció) sok élelmiszer-technológiai folyamat (kávépörkölés, kenyérsütés) során előnyös, más esetben (szárított, piritott élelmiszerek tárolása) viszont hátrányos, köszönhetően a szín és az aromaváltozásnak, melyeket minden esetben fehérjevesztés is kísér (Fennema 1985; Milton 1985; Teranishi és Buttery 1985). Ezek a nem enzimatis folyamatok felgyorsulhatnak hőkezelés hatására. Hőkezelés során a termék felülete kiszárad, majd a szénhidrátok, fehérjék, zsírok és egyéb más összetevők (például fenolos savak) pirolízise játszódik le, aminek köszönhetően más egyéb komponensek mellett illatanyagok termelődnek. A nem enzimatis reakciók egyik jellegzetessége, hogy egy vagy több összetevő degradációjából nagyszámú illékony komponens keletkezhet. Mindazonáltal a létrejött aroma-aktív anyagok koncentrációja gyakran még erőteljes kezelések esetén sem éri el az illatküszöb-értéket, tehát hőkezelés hatására keletkező számos illékony komponens közül csupán néhány vegyület lesz aromaaktív (Belitz et al. 2009; Milton 1985; Teranishi és Buttery 1985). Nem enzimatis reakcióból keletkező vegyületek lehetnek karbonil komponensek, piranon vagy furanon vegyületek, tiolok, tiol-észterek, di- és tri-szulfidok, tiazolok, piridinek és pirrolok, pirazinok, aminok és fenolok. (Belitz et al. 2009).

### 2.2.2. Enzimatis reakciók során keletkező illékony vegyületek

Állatok, növények és mikroorganizmusok élettevékenységük során képesek illékony aromakomponensek termelésére normál metabolizmusuk által. Enzimatis reakciót vált ki továbbá a szövet szétesése is, például gyümölcsök, zöldségek darabolása esetén. Enzimek indirekt módon is hozzájárulhatnak az aromaképzéshez, például aminosavak kibocsátása során az elérhető fehérjéből vagy cukor felszabadításával poliszaharidokból. Ezek a vegyületek a továbbiakban nem enzimatis folyamatok során képesek átalakulni aromakomponensekké (Belitz et al. 2009). Ilyen enzimatis

reakciókból származó aromakomponensek lehetnek a karbonil komponensek és alkoholok. A gyümölcsök és zöldségek telítetlen szénhidrogéneket tartalmaznak, amelyek fontos szerepet játszanak az aroma kialakításában. Számos gyümölcs szignifikáns aromakomponensei lehetnek észterek is, amelyeket csak ép, sértetlen sejtek képesek előállítani (Belitz et al. 2009). Több aromaaktív lakton vegyület is fontos lehet ebből a szempontból, amelyek legtöbbször kellemes illatúak, ezért élelmiszerek aromizáló szereként is felkeltette a kutatók figyelmét. Egyes zöldségek illatösszetételéért illékony kénvegyületek felelősek, például a hagyma illetve fokhagyma szeletelésénél felszabaduló allicin vegyület, amely jellemző szúrós illattal rendelkezik (Belitz et al. 2009).

A terpének izoprénvázás vegyületek, melyeknek közös jellemzője, hogy molekuláikat, vagy azoknak vázát izoprén egységek (2-metil-1,3-butadién, 1. ábra) építik fel.



**1. ábra:** Izoprén egység (2-metil-1,3-butadién), terpének alapvázául szolgáló egység

A terpének szintén enzimatis és mikrobiális úton keletkezhetnek. Sokféle növényben, főként virágzatokban és gyümölcsökben, továbbá zöldségben, fűszerekben, gyógynövényekben, de még borokban is előfordulhatnak. A terpéneket a kapcsolódó izoprén egységek száma szerint szokás csoportosítani (1. táblázat).

**1. táblázat:** Terpének csoportosítása izoprén egységek száma alapján.

Név	Képlet	Izoprén egység
monoterpén	$C_{10}H_{16}$	2
szeszkviterpén	$C_{15}H_{24}$	3
diterpén	$C_{20}H_{32}$	4
triterpén	$C_{30}H_{48}$	6
tetraterpén	$C_{40}H_{64}$	8
politerpén	$(C_5H_8)_n$	$n > 8$

A terpének lehetnek aciklikus (nyílt forma), monociklikus (egy gyűrű), vagy biciklusos szerkezetűek. Monociklusos monoterpén például a mentol, limonén, és menton, aciklikus diterpén például az A-vitamin. Aciklikus triterpénként csupán egyetlen vegyületet tartanak számon, a szkvalént

[C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>], míg aciklikus tetraterpének közé tartozik többek között a likopin és a β-karotin, ami az A-vitamin előanyaga. A szeszkviterpének közé több mint 1000 féle vegyület tartozik, amelyek többsége még illékony vegyület, míg a több izoprén (>3) egységből álló terpének már nem illékonyak. A legtöbb terpén egy vagy több kiralitás centrummal rendelkezik. Különböző növények esetében előfordulhat a terpének optikailag inaktív formája és az L- vagy D-forma is. Ez azért fontos, mert az enantiomerek és diasztereoizomerek illatkarakterisztikája eltérő a legtöbb esetben. Erre példa a mentol, amelynek L-formája frissítő borsmenta aromájú, míg a D-formája kellemetlen, fenolos, gyógyszeres, dohos illatra emlékeztet (Belitz et al. 2009).

### **2.3. Illékony szerves vegyületek (VOC)**

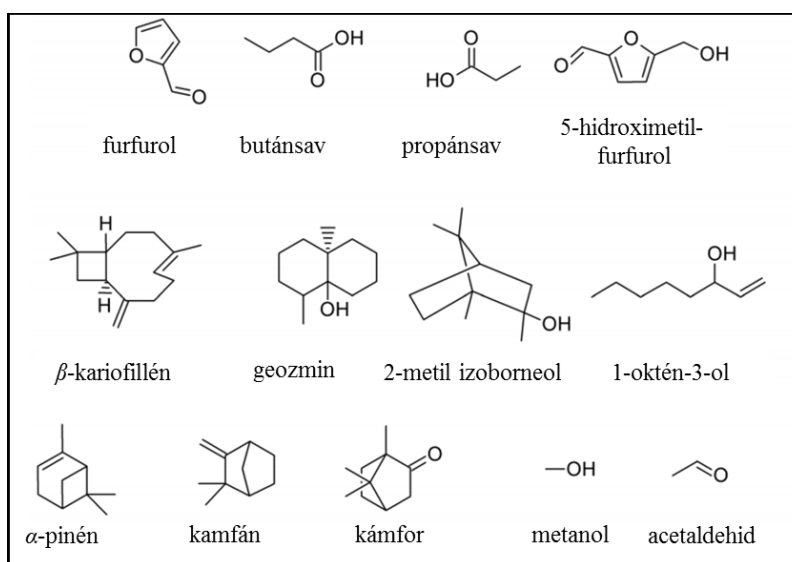
#### **2.3.1. VOC vegyületek**

A kibocsátott illékony szerves vegyületek (VOCs: *volatile organic compounds*) fontos gazdasági és fiziológiai szerepet játszanak számos szerves organizmus esetén. A VOC vegyületek általában különböző bioszintetikus útvonalokon keletkező kis molekulájú lipofil komponensek, amelyek illékonyak atmoszférikus nyomáson és szobahőmérsékleten. A VOC vegyületek általában közepesen oldódnak vízben és gyakran jellegzetes illattal rendelkeznek (Herrmann 2010). A természetben a VOC vegyületek felelősek az inter- és intra-organizmikus kommunikációért, a növények közötti számtalan kölcsönhatásért, antagonistá és mutualista szimbiózis kialakulásáért akár a föld feletti vagy alatti részekben (Maffei 2010; Maffei et al. 2011; Garbeva et al. 2014; Lemfack et al. 2014; Kanchiswamy et al. 2015a). A szerves illékony vegyületek képesek messze elkerülni termelődésük helyétől levegőben szél által, vízben vagy a talajban, lehetővé téve a rövid- és hosszútávú intercelluláris és szervezeti kölcsönhatások vizsgálatát (Maffei et al. 2011).

Az élelmiszeriparban rendkívül sok VOC vegyülettel találkozhatunk, amelyek almafajtákhoz (Song és Bangerth 1996; Altisent et al. 2009; Lopez et al. 2000; Karlshøj et al. 2007), eperhez (Watson et al. 2002), szilvafajtákhoz (González-Cebrino et al. 2016; Louw és Theron 2012; Pino és Quijano 2012; Nunes et al. 2008), esetleg különböző gombákhoz (Pennerman et al. 2015; Misharina et al. 2009; Ouzouni et al. 2009) köthetők. Amennyiben a VOC mintázat faj vagy ökológiai csoport specifikus, biomarkerekként vagy ökológiai mutatókként használhatók különböző gombacsoportok vagy fajok jellemzésére és azonosítására (Müller et al. 2013).

### 2.3.2. MVOC vegyületek

A mikrobiális eredetű illékony szerves vegyületek (MVOCs: *microbial volatile organic compounds*) a VOC vegyületek azon fajtája, amelyet mikroorganizmusok termelnek metabolikus folyamataik során. Ezek a vegyületek különböző metabolikus útvonalaknak köztes- és végtermékeiként keletkeznek. Az MVOC vegyületek egyfajta kémiai ablaknak is tekinthetők, amelyen keresztül alapvető információt nyerhetünk a mikrobiális aktivitás molekuláris alapjairól (Korpi et al. 2009; Thorn és Greenman 2012). Mindemelett számos MVOC vegyület faj-specifikus, tehát marker vegyületekként is szolgálhatnak különböző gomba vagy bakteriális eredetű környezeti változásoknál (Fiedler et al. 2001). Más formában ugyan, de a méregtelenítési folyamatok során is feltűnhetnek (Marmulla és Harder 2014). A kísérleti adatok összehasonlító elemzése szerint az illékony metabolitok sokkal jobban hozzájárulnak a mikrobiális interakciókhoz, mint a nem illékony metabolitok. Számos mikroorganizmus termel ugyanis illékony anyagokat az egymás közötti kölcsönhatások kialakításához, amely folyamatok gyakran előfordulnak a természetben (Tirranen és Gitelson 2006). A mikroorganizmusok anyagcserefolyamatainak megértésében segítségünkre lehetnek az MVOC vizsgálatok (Liang et al. 2008). A szakirodalom szerint a furfurool, a butánsav, a propánsav, a 5-hidroximetil-furfurool, a  $\beta$ -kariofillén, a geozmin, a 2-metil izoborneol, az 1-oktén-3-ol, az  $\alpha$ -pinén, a kamfán, a kámfor, a metanol és az acetaldehid (2. ábra) a leggyakrabban emittált vegyületek a mikrobiális anyagcsere-folyamatok során (Sundberg et al. 2013; Song és Bangerth 1996; Perl et al. 2011; Wenke et al. 2010).



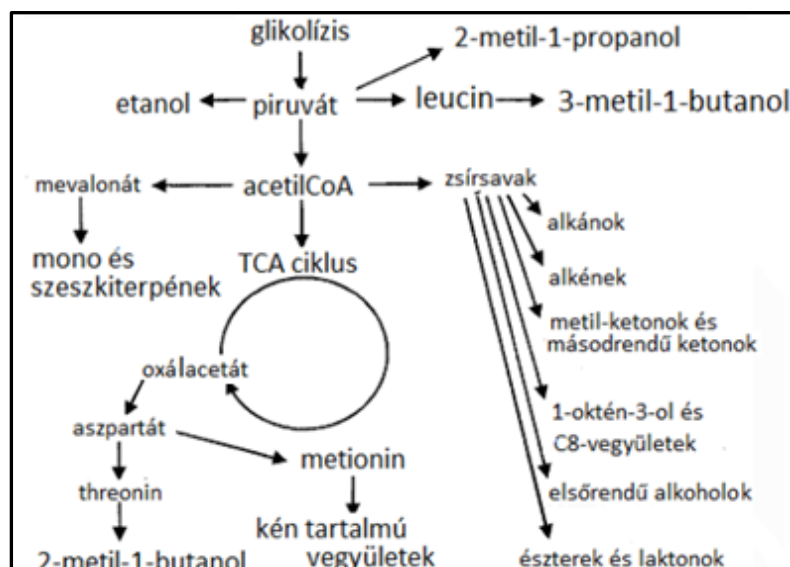
**2. ábra:** Mikrobiális tevékenység során felszabaduló leggyakoribb illékony szerves vegyületek

(**Forrás:** Kanchiswamy et al. 2015b)

A mikrobiális eredetű illékony szerves vegyületek közé tartoznak a penészek által kibocsátott vegyületek is, amelyek számos szerkezeti osztályba sorolhatók: mono- és szeszkviterpének, alkoholok, ketonok, laktonok, észterek, stb. 2013-ban Lemfack és munkatársai létrehoztak egy óriási MVOC adatbázist (Lemfack et al. 2014); hatalmas mennyiségű irodalmi adatot feldolgozva összegyűjtötték a legtöbb baktérium és penészgomba eredetű MVOC vegyületet. Az adatbázis körülbelül 10000 faj kibocsátott illékony vegyületeit tartalmazza, amely online hozzáférhető és bővíthető (internet 1).

### 2.3.3. Penészek illékony anyagcseretermékei

A különböző penészek által termelt illékony vegyületek témaköre még sok szempontból ismeretlen terület, megismerésében azonban jó támpontot adhatnak az ismert metabolikus folyamatok (3. ábra).



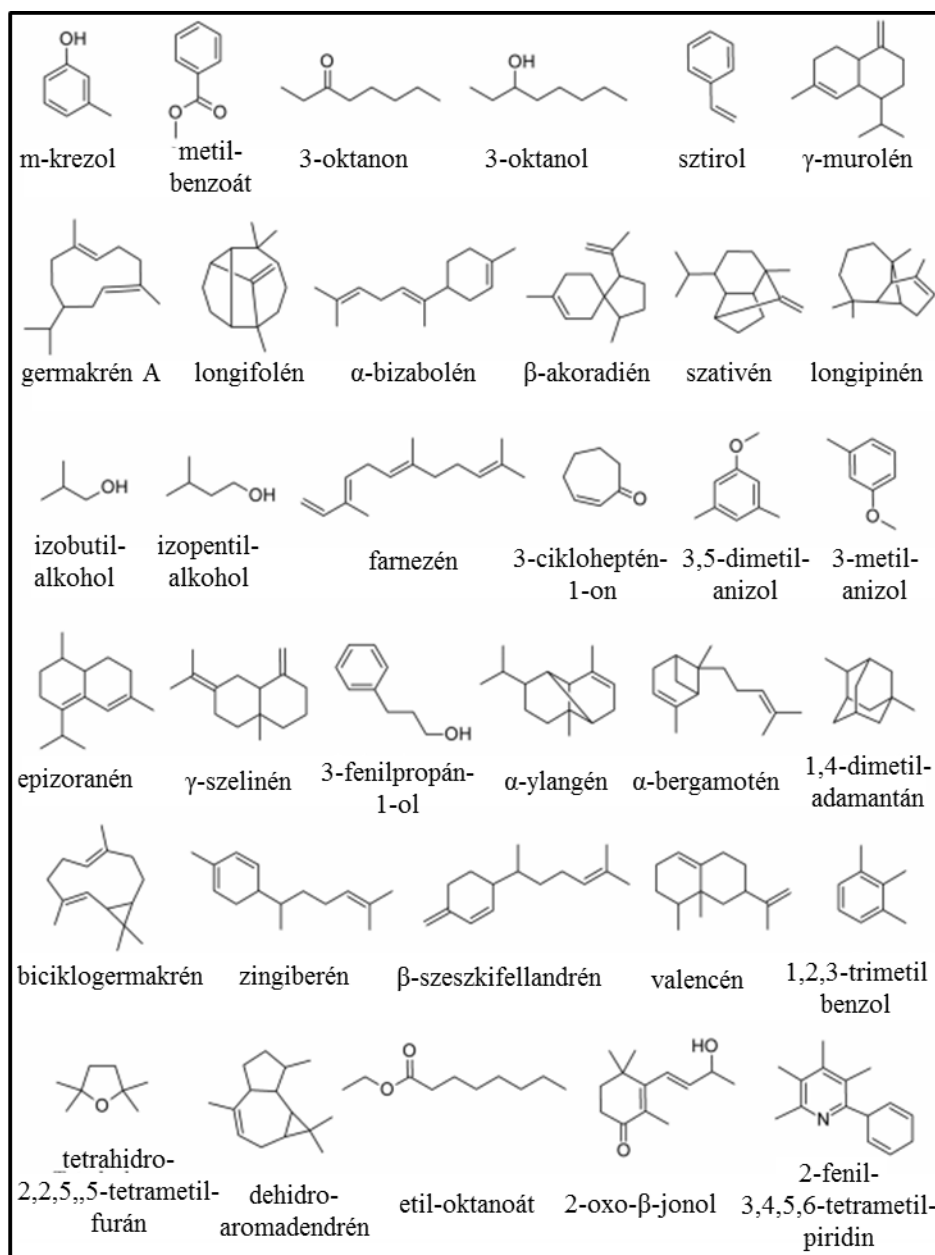
**3. ábra:** Penészgombák főbb metabolikus útvonalainak áttekintése

(**Forrás:** Sági-Kiss 2012)

Számos vegyületet tartunk számon, mint penészek által kibocsátott MVOC vegyületet: izobutil-metil-éter, izopentil-metil-éter, etanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, heptán, nonán, dekán, undekán, 3-metil-1-heptén, izoprén, 2,4-hexadién, 2-metil-1,3-pentadién (Fiedler et al. 2001), 2-metil-butánsav-metil-észter, 2,3-dimetil-butánsav-metil-észter, 4,4-dimetil-pentánsav-metil-észter, 6-metil-heptanon, 3-oktanon, 8-4-karén,  $\alpha$ -kurkumén (Fischer et al. 1999).

A penészek által kibocsátott anyagcseretermékek alapján az egyes penészfajok esetleges azonosítása is lehetővé válik (Zhang et al. 2014). Példaként említem az *Ampelomyces* spp. és

*Cladosporium* spp. penészeket, melyeknek fő aktív illékony komponensei az m-krezol és a metilbenzoát (4. ábra). Ezek a vegyületek segítik az *Arabidopsis* ISR penészt a patogén *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 penésszel szemben (Naznin et al. 2014).



**4. ábra:** Penészek által termelt legfőbb bioaktív illékony komponensek

(**Forrás:** Kanchiswam et al. 2015)

A *Fomes fomentarius* penész által kibocsátott illékony vegyületek között szerepel például az 1-oktén-3-ol (2. ábra), a 3-oktanon és a 3-oktanol (4. ábra), amelyek szokatlan viselkedést idéztek elő a penészgombákat fogyasztó *Bolitophagus reticulatus* bogárnál az olfaktometriás biológiai vizsgálatok során (Holighaus et al. 2014). A *Trichoderma* penészgombák MVOC vegyületei sok

esetben antibiotikus hatást fejtenek ki a növénypatogén penészek ellen, illetve növényi növekedést serkentő hatásuk is van. Rendszeres védelmet biztosítanak a növényeknek azáltal, hogy kevésbé sebezhetővé teszik azokat gombás kórokozókkal szemben (Stoppacher et al. 2010). *Trichoderma viride* Petri csészére oltott vizsgálata során izobutil-alkoholt, izopentil-alkoholt, farnezeint (4. ábra) és 3-metil-butanolt, valamint geranilacetont találtak. A kísérlet során a penész mellé lúdfüvet (*Arabidopsis*) helyeztek úgy, hogy fizikai kontaktus nem volt a penész és a növény között. A kísérlet végére a penész mellé helyezett növény magasabbra nőtt, korábban virágzott és gyökere sűrűbb oldalágat növesztett, mint a kontroll minta. Feltételezhetően a penész által kibocsátott MVOC vegyületek idézték elő a pozitív változásokat a növény növekedésében (Hung et al., 2015). Számos kutatás foglalkozott már a *Trichoderma* penészgombák illékony vegyületeinek feltérképezésével, főleg *T. atroviride* (2-heptanon, 1-oktén-3-ol, 3-oktanon, 2-pentil-furán, 3-oktanol, 6- $\alpha$ -fellandrén,  $\alpha$ -terpinén,  $\beta$ -fellandrén, 2-nonanon, feniletal-alkohol,  $\beta$ -farnezen,  $\alpha$ -kurkumén (Stoppacher et al. 2010) és *T. harzianum* (etil-butirát, 2-metil-etil-butirát, feniletanol, 2,6-dimetil-2,4,6-oktatrién (Fiedler et al. 2001) penészekkel foglalkoztak. Kifejezetten a *Trichoderma aggressivum* illékony anyagcseremarkereit azonban eddig még kevesen vizsgálták. Krupke és munkatársai a Th4-es biotípussal (*Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*) folytatott vizsgálatait során találtak egy, a csiperke növekedését gátló inhibitor vegyületet (3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-izokumarin). A vegyület egyetlen nem-aggresszív *T. harzianum* fajnál sem jelent meg (Krupke et al, 2003). Annak ellenére, hogy a *T. aggressivum* számos, például komposztból izolált baktériumra rezisztens, néhány izolátum mégis hatással van rá. A megfigyelések alapján egy, a *Bacillus subtilis*-t és lipopeptidjeit tartalmazó biofungicid, amit a szőlőültetvények *Botrytis* fenyegetettsége ellen sikeresen használnak, *T. aggressivum* esetében is sikeresnek bizonyult (Largeteau és Savoie, 2010).



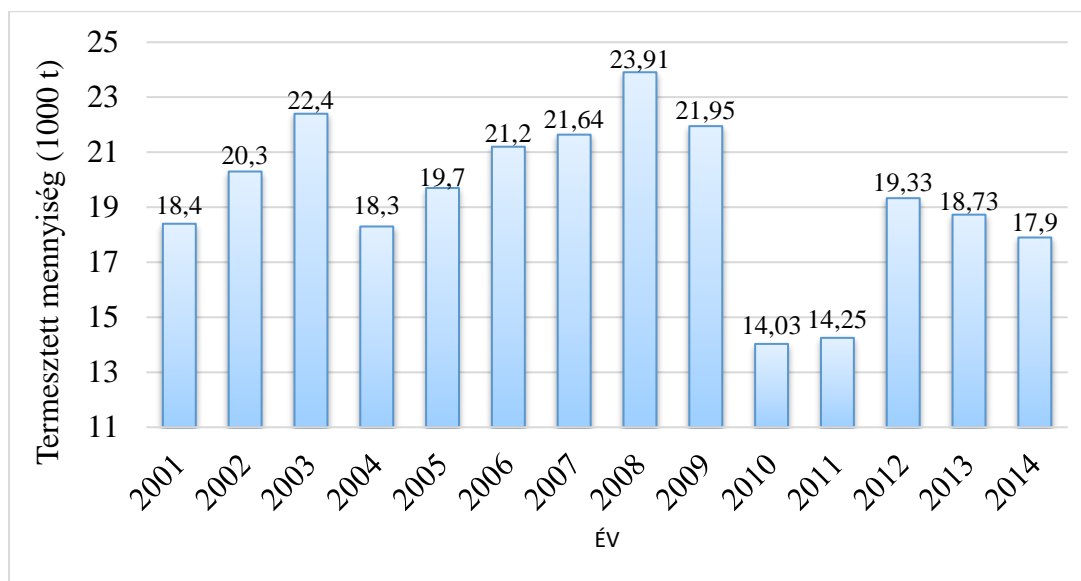
## **2.4. Gombakomposzt gyártás, gombatermesztés és a jellemzően előforduló megbetegedések**

### **2.4.1. Gombatermesztés az Európai Unióban**

A kétspórás csiperkegomba (*Agaricus bisporus*), a shiitake (*Lentinula edodes*), a laskagombafélék (*Pleurotus ostreatus*), illetve a Távols-Keleten népszerű júdásfülgomba-félék (*Auricularia* spp.) a legfontosabb termesztett gombafajok közé tartoznak világszerte (Chang 1999; Bratek et al. 2010; Largeteau és Savoie 2010). A gombatermesztés méretének növekedését tapasztalhatjuk az elmúlt 30 évben az egész világon; 1997-re a tervezett gomba mennyisége meghaladta közel a 2 millió tonnát. Bár a termesztett gombák között csökkent a csiperkegomba aránya, mégis még mindig a legnagyobb mennyiségben termesztett gombafajként tartják számon (Chang és Miles 2004). A csiperkegombát a világ több mint 100 országában termesztik és a leginkább kedvelt gombafajként tartják számon Nyugat-Európában és Észak-Amerikában is (Chang és Miles 2004). Az ENSZ (Egyesült Nemzetek Szervezete) Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezetének (*Food and Agriculture Organization - FAO*) adatai szerint a világ gombatermesztése jelenleg évente megközelíti a 8 millió tonnát, amelynek 75-80 százaléka csiperkegomba. A világban termesztett csiperkegomba körülbelül ötöde az Európai Unióból (EU) származik. A tagországokat tekintve Kelet-, illetve Közép-Európába helyeződött át a termesztés volumene. Az EU legnagyobb csiperkegomba-termelője Lengyelország (Stummer 2014), így nem meglepő, hogy a legnagyobb gomba-exportőrök közé sorolják Hollandiával együtt (Stummer 2015). Kiemelkedő gomba-importőrök az Egyesült Királyság, Németország valamint Franciaország (Stummer 2014).

### **2.4.2. Csiperkegomba-termesztés Magyarországon**

A KSH (Központi Statisztikai Hivatal) adatai szerint Magyarországon közel 20 ezer tonna a termesztett gomba mennyisége (5. ábra) (Stummer 2014).



**5. ábra:** Termesztett gombafélék mennyisége Magyarországon

(**Forrás:** Eurostat adatbázis, lekérdezés ideje: 2016. január 15.) (internet 2)

Magyarországon a gombatermesztésben főként a csiperkegomba (mintegy 90 %-os arányban) dominál, a fennmaradó hányad elsősorban laskagomba, de termelnek kisebb mennyiségben például shiitakét is (Stummer 2015). Az EU 2014 és 2020 közötti új pénzügyi időszakában célként tűzték ki a gombatermesztő kapacitás 50 ezer tonnára emelését. Előrevetítették továbbá 60 gombatermesztő farm létesítését, 100 gombakomposzt-előállító és hőkezelő egység felépítését, valamint 15 ezer tonna gombakonzerv készítésére alkalmas feldolgozó kapacitás létesítését (Stummer 2014). Hazánkban a gombát jelenleg is csak minden második háztartás vásárolja, így a fogyasztás elmarad az európai átlagtól, ami 1,5 kg/fő/év (Stummer 2014).

### 2.4.3. Gombatermesztés folyamata

A gombatermesztők jól ismerik azt a problémát, hogy a gombakomposzt minősége gyakran kiszámíthatatlan; változó, rossz minőségű alapanyaggal pedig szinte lehetetlen magas termésátlagot elérni. A gombakomposzt előállítása során ugyanis nehéz a komposzt minőségét az időjárás viszontagságaitól és a folytonosan változó alapanyagoktól függetleníteni. Az egyes nyersanyagok (búzaszalma, ló-, illetve baromfitrágya, gipsz és víz) összetett biológiai és mikrobiológiai folyamatainak váltakozása eredményeképpen jön létre a gombakomposzt, amelyet egy hőkezelési lépést követően gombacsírával oltanak be.

A csiperkegomba és más termőtesttel rendelkező gombák fejlődési ciklusát két részre lehet osztani: vegetatív életszakasz (micélium növekedése, fejlődése) és generatív életszakasz (termőtestek

képződése). A csiperkegomba termesztésnél a csíraszemből kifejlődő micélium először a komposztot szövi át, majd a takarást követően a micélium a takaróanyag rétegébe is belenő (vegetatív szakasz), végül a takarás, illetve a környezeti paraméterek jelentős változtatásának hatására lép át a folyamat a termőtestképződés (generatív szakasz) fázisába (Györfi 2013b).

A modern gombatermesztésben hét fő szakaszt különíthetünk el, melyek rendre a következők:

I. szakasz: A komposzt alapanyagainak homogén összekeverése és előkészítése.

II. szakasz: A nyers (I. fázisú) komposzt hőkezelő alagutakba kerül, amelyekben a komposztálódási folyamatok befejeződnek. A hőkezelésen átesett komposzt kórokozóktól és kártevőktől mentes, valamint megfelelő tápanyagforrást jelent a gomba számára. A hőkezelt komposzton (II. fázisú) a becsírázást követően megindulnak a gomba növekedéséhez szükséges biológiai és kémiai reakciók.

III. szakasz: A II. fázisú gombakomposztot visszatermelik egy újabb hőkezelő alagútba, ahol megtörténik az átszövetés. Az átszövetés fázisában a gombacsíra összefüggő „gyökérrendszereként” szereplő micéliumszálak átszövik a komposztot, és „feltárják” a benne lévő tápanyagokat.

IV. szakasz: Az átszövetett komposztot takaróanyaggal fedik be és amint megjelennek a takaróanyag felületén a borsószemnyi nagyságú termőtestek, elkezdődik az intenzív öntözési időszak.

V. szakasz: Lappangási időnek nevezzük a takarástól a termőtestek megjelenéséig tartó időszakot.

VI. szakasz: A takarás utáni 6-9. napon végezik a borzolást, ami a takaróanyagban levő micéliumkötegek széttördelését jelenti.

VII. szakasz: A „letermesztés” fázisában a komposzt és termőhelység hőmérsékletét csökkentik, majd a hűtés megkezdésétől számított 9-10. naptól kezdve lehet szedni a gombát. A letermett gombakomposzt talajdúsítóként újrahasznosítható a kertészetekben, kiküszöbölve a melléktermékek okozta környezeti problémát (Györfi 2013a; Györfi 2013b, internet 3).

#### **2.4.4. Gombatermesztésben előforduló mikrobiális megbetegedések**

A csiperkegomba (*Agaricus bisporus* - kétspórás csiperkegomba) termesztése során a termelőknek nehéz feladatuk van, hiszen gondosan kézben kell tartaniuk a termesztés körülményeit (páratartalom, hőmérséklet, ventilláció), illetve ügyelniük kell a gombakomposzt megfelelő minőségére. A csiperkegomba ezen kívül különösen érzékeny különféle vírusokra (*virus X disease*), gomba okozta megbetegedésekre (*Lecanicillium fungicola*, *Mycogone pernicioso*, *Trichoderma aggressivum*), baktériumokra (*Pseudomonas* spp.) és bizonyos egyéb kártevőkre (*Pygmephorus sellnicki*-paprika atka, *Heteropeza* spp.-cecid legyek) is (Fletcher 1990). Baktériumok

jelenléte negatívan befolyásolhatja a gombatermesztés minőségét, főként gombafoltosodást, enyhe rothadást okoznak a gomba termőtesten. Ilyen baktériumok lehetnek például a *Pseudomonas* spp., *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola*, *Janthinobacterium agaricidamnosum* sp. nov., (Lo Cantore és Iacobellis 2004; Geels et al. 1994).

A csiperketermesztés bármely szakaszában kifejlődhetnek nemkívánatos penészek a gombán vagy a gombakomposzton, amelyek kedvezőtlenül befolyásolhatják a termesztést. Két fő csoportot különböztethetünk meg: a kompetitív (versengő) és a parazita penészeket. A versengő penészek a komposztban, a takaróanyagban vagy mindkettőben, a csiperkegomba micéliumával a tápanyagokért, a vízéért, valamint az élettérért versenyeznek. Ilyen mikroorganizmusok a *Chaetomin olivaceum* – olajzöld penész, *Sepedonium chrysospermum* – „sepedonium sárga penész”. A parazita penészek bizonyos mértékig szintén versenyeznek a táplálékért, de emellett a termesztett gombát közvetlenül is károsíthatják (Bratek et al. 2010). Amennyiben ezek a káros mikroorganizmusok megtelepednek a komposzton, úgy a micéliumnövekedést gátolhatják, így a későbbiekben a termés hozamot csökkentik. A komposzt összetételének és minőségének megőrzéséhez ezen mikroorganizmusok előfordulását időben észlelni, a komposzt minőségét pedig folyamatosan ellenőrizni kell. A pasztörizálás során különböző paraméterek pontos beállításával a versengő patogén mikroorganizmusok elpusztíthatók (Seaby 1996a; Rinker és Alm 2000; Boiko et al. 2009).

#### 2.4.4.1. A termőtesten élősködő parazita penészek

Számos egyéb fertőzés okozhat károkat a gombatermesztés során, főleg az átszövetés időtartama alatt, ilyenek a különböző parazita penészek; *Cladobotryum dendroides* – pókhálós penész, *Mycogone perniciososa* – nedves mólé, *Lecanicillium fungicola* – száraz mólé (Lincoln et al. 1991; Lincoln et al. 1999; Gill és Tsuneda 1997).

A nedves mólé betegség kórokozója a *Mycogone perniciososa*, jelentős termés-csökkenést okoz (Gea et al. 2010). Főként a micéliumot fertőzi, így a tünetekre elsősorban a „puffancsképződés” jellemző, amelyek később nedvesen megrohadnak (Szili 2008). A mikoparazita hatására az *Agaricus bisporus* termőtestje nem differenciálódik tönkre és kalapra, csak egy alakatlan, karfiol-szerű gombatömeg képződik (Gea et al. 2010). A „puffancs” felülete először sűrű, bársonyos, fehér színű penészgyeppel fedett, amely néhány napon belül barnára színeződik. A „puffancs” kialakulásával együtt a penészgyep felületén kezdetben kicsi, borostyánsárga, majd egyre nagyobb, sötétebb barnára színeződő folyadékcspepek jelennek meg, amelyek a nedves mólébetegség jellemzői. A beteg termőtest lágy tapintású és kellemetlenül bűzös szagú (Bratek et al. 2010).

A száraz mólé betegség kórokozója a *Verticillium fungicola* var. *fungicola* (újabb nevén: *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola*), amely minden országban, ahol csiperkegombát termesztenek súlyos, rendszeresen előforduló betegséget okoz. A *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* a csiperkegombán a *Mycogone pernicioso* penésztől eltérően változatos tüneteket okoz („puffancsok”, részleges deformáció, stb.). A fertőzött termőtestek felületét finom, szürkés-fehér színű micéliumgyep borítja, míg a penészgyep alatti szövetek elszíneződnek (Bratek et al. 2010; Bailey et al. 2013).

A száraz és a nedves mólé betegség esetén elsődleges fertőzési források lehetnek az üzembe érkező műanyag ládák, amikor azokat fertőtlenítés nélkül rögtön a szedés alatt álló termesztő helyiségekbe viszik. Takaróanyag összetevők is lehetnek forrásai egy később kialakuló fertőzésnek, ugyanis takaráskor különösen megnő a veszélye a levegőben szálló porszemek okozta fertőzésnek. A fertőzöttnek vélt takaróanyagot célszerű hőkezelné. A kórokozók terjesztésének az öntözővíz az egyik legfontosabb forrása, ezért csak akkor szabad öntözni, amikor a beteg termőtesteket már összeszedték (Bratek et al. 2010).

#### 2.4.4.2. *Trichoderma*-fajok a csiperketermesztésben

A *Trichoderma* fajok imperfekt, talajlakó fonalagombák. Egyes fajukat a zöldpenész betegség kórokozójaként tartják számon, amely jelentős termés kiesést okozhat például a csiperke termesztésében. A csiperkegomba termesztésekor számtalan *Trichoderma*-fajt lehet a komposztból, a takaróanyagból, a termőtestekről kitenyészteni. (Kredics et al. 2011). A *Trichoderma*-fajok közös jellemzője, hogy nagyszámú spórát képeznek (Bratek et al. 2010). A zöldpenész betegség kórokozója, *Trichoderma aggressivum*, nem csak a gombatesten, hanem már a komposzton is képes károkat okozni, hiszen már akár a micélium átszövetés fázisában megtámadja a csiperkegombát, jelentős károkat okozva ezzel (Sindin és Hauser 1954). *T. aggressivum* emellett eredményesen verseng a tápanyagokért és a területért; továbbá extracelluláris enzimeket, toxikus szekunder metabolitokat és illékony szerves vegyületeket termel, amivel nemcsak magát a gombát, hanem a gombakomposztot is jelentősen károsítja (Kredics et al. 2011). Felismerését nehezíti, hogy vegetatív növekedési fázisa sokáig tart, a penészgyep kezdetben fehér, majd csak 2-4 nap múlva, a spórák képződése miatt válik zöld színűvé (Bratek et al. 2010; Kredics et al. 2011; Largeteau és Savoie 2010), így a kezdeti fázisban szinte lehetetlen szemmel észrevenni a betegséget. Krupke és munkatársai azonosítottak egy metabolitot *T. aggressivum* penészből in vitro körülmények között, ami gátolja egyes gombák növekedését. Ez a gombaellenes vegyület a 3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-izokumarin, amely nem termelődik a nem agresszív *Trichoderma* izolátumok esetében (Krupke et al. 2003). A

komposztkolonizáló *Trichoderma* biotípusoknak növekedésükhöz szükségük van a csiperke micéliumának jelenlétére is (Kredics et al. 2011; Largeteau és Savoie 2010). A *Trichoderma* fajok elleni védekezés nehéz, főleg akkor, amikor már elterjedt az üzemben. A termesztés során a levegő mozgása, az emberek tevékenysége, illetve egyéb állati kártevők, gépek hozzájárulhatnak a kórokozók terjedéséhez (Bratek et al. 2010), így a legfontosabb feladat a fertőzés megelőzése, nem pedig kezelése (Kredics et al. 2011).

## **2.5. *Trichoderma* nemzetség jellemző tulajdonságai**

### **2.5.1. A zöldpenészes fertőzés megjelenése**

A zöldpenészes fertőzés már több mint fél évszázada ismert betegség a gombatermesztésben. A fertőzött komposzton a *Trichoderma* nemzetség képviselői terméskiesést okoztak, azonban ezt csak olyan jelentéktelen problémaként tartották számon, amellyel kifejezetten nem foglalkoztak, csupán a nem megfelelő higiéniai körülmények és a gyengébb minőségű komposztok esetenkénti velejárájának tartották. A betegséggel 1985-86-ban kitörő észak-írországi zöldpenész járvány következtében kezdtek el igazán foglalkozni, amely járvány az 1990-91-es években a Brit-szigeteken is kitört. Az eset 3-4 millió angol font veszteséget okozott a gombatermesztésben (Fletcher 1990; Doyle 1991; Seaby 1996a; Seaby 1996b). Közel három év elteltével a fertőzés megjelent Hollandiában is (Geels 1997).

Észak-Amerikában az 1990-es évek elején ütötte fel a fejét a zöldpenész betegség, ahol a veszteség a 30 millió dollárt is meghaladta. A megbetegedést Alberta, Brit Kolumbia, Ontario tartományokból, továbbá Pennsylvania államból jelentették (Rinker 1993; Castle et al. 1998; Ospina-Giraldo et al. 1998; Spillman 2002). A későbbi években, Hollandiát követően Európa két másik országában is felütötte fejét a betegség. 1996-ban Spanyolországban, egy évvel később pedig Franciaországban jelent meg a zöldpenészes fertőzés a csiperketermesztésben (Hermosa et al. 1999; Mamoun et al. 2000a).

Az elmúlt évtizedekben a zöldpenészes megbetegedés tovább terjedt és Közép-Európában is megjelent. Hazánkban Kredics és munkatársai illetve Hatvani és munkatársai számoltak be a csiperkét károsító megbetegedés megjelenéséről (Hatvani et al. 2007; Kredics et al. 2011), míg a lengyelországi eseteket Szech és munkatársai, valamint Błaszczyk és munkatársai írták le (Szech et al. 2008; Błaszczyk et al. 2011). A betegség később a délebbi területeken, Horvátország farmjain is felütötte a fejét (Hatvani et al. 2010). Európán kívül megjelent még a fertőzés Mexikóban, Iránban és Ausztráliában is (Vahabi 2005; Clift és Shamshad 2009; Romero-Arenas et al. 2009).

## 2.5.2. *Trichoderma* nemzetség jellemzése

A nemzetség képviselőinek megjelenése az élővilágban igen változatos. Egyes fajai, mint a *T. reesei* jelentősek ipari szempontból, a második generációs bioüzemanyag előállításában játszanak szerepet (Gusakov 2011).

Más fajai képesek növénypatogén gombákat antagonizálni, amely hatást különböző sejtfalbontó enzimek működésével érik el mikoparazita tulajdonságokat kifejezve (Benitez et al. 2004). Antibiotikumok termelésével képesek más szervezet életfolyamainak gátlására is. Ezen kívül az antagonista fajok jó versengők a különböző tápanyagokért és élhetőbb területekért. Antagonista tulajdonságaikat a növény növekedésére gyakorolt pozitív hatással is kifejthetik. Közreműködésükkel a különböző ásványi anyagok és nyomelemek felvétele könnyebben megy végbe a növény számára, valamint a védekezési reakciókat is erősíthetik (Benitez et al. 2004).

Druzhinina és munkatársai vizsgálatokat folytattak egyes *Trichoderma* fajok emberi egészségre gyakorolt hatására is. Megállapították, hogy a nemzetségnek vannak olyan képviselői, amelyek feltételes kórokozók lehetnek az emberek számára (Druzhinina et al. 2008). Továbbá egyes fajai a gombatermesztésben jelennek meg különböző természetű gombák kórokozóiként, amelyek a zöldpenészes megbetegedésért felelősek (Kredics et al. 2011).

Világszerte számos tudományos intézményben folytatnak kutatásokat, amelyek a *Trichoderma* nemzetség potenciálisan veszélyes fajainak a csiperke és laskafarmokról történő kiszorítását célozzák meg. Különböző tanulmányok láttak napvilágot a *Trichoderma* fajok gombatermesztésben előforduló tagjainak fejlődésével, identifikálásával, osztályozásával kapcsolatban. Vizsgálták a nemzetség egyes képviselőit biológiai, filopatológiai és molekuláris szinteken a legfrissebb analitikai és számítógépes technikákat alkalmazva (Górski et al. 2014). Korábban a fertőzést jelentéktelen problémaként tartották számon, amely csak időszakosan jelent meg a rossz minőségű komposztban. Bizonyítékot nyert azonban, hogy a patogén *Trichoderma* fajok mind a gombán, mind a jó minőségű komposztban is fejlődnek, így a gombatest-képződés teljes megszűnését is okozhatják (Chen et al. 2003).

Górski és társai kísérleteket végeztek különböző *Trichoderma* fajok hatását vizsgálva különböző *Agaricus bisporus* törzsekre. Bizonyították, hogy a *T. viridie*, a *T. aureoviride*, a *T. pseudokoningii* és a *T. hamatum* fajok relatív alacsony kórokozó képességgel rendelkeznek. Ezzel szemben a *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* nagyon agresszív. A *T. aggressivum* f. *europaeum* izolátum erősen korlátozza a csiperkegomba törzsek hozamát és a

növekedésben is akadályozza a gombát (Górski et al. 2014). Górski és társainak eredményei megegyeznek Seaby és Williams által leírtakkal (Seaby 1996a; Williams et al. 2003).

### 2.5.3. *Trichoderma* fajok biokontroll vonatkozásai

A biológiai kontroll folyamatok hasznos organizmusoknak vagy az azok által termelt anyagoknak a növényre gyakorolt pozitív hatását jelentik. Az organizmusok élettevékenységük során negatív hatást fejtenek ki a növényt károsító kórokozókra vagy magára a növényre gyakorolnak jótékony hatást. A *Trichoderma* nemzetség több törzse is jelentős figyelmet kapott, mint biokontroll ágens (Siddiquee 2014).

A BCAs (*biocontrol agents*-biokontroll ágensek) és a patogén gombák közötti kölcsönhatásokban fő szerepet játszanak az antagonisztikus folyamatok, antibiotikus hatású VOC vegyületek termelése által. Emellett a biokontroll ágensek hatásukat a mikoparazitizmus vagy hiperparazitizmus és a tápanyagokért, valamint az élettérért való sikeres versengés során fejtik ki (Siddiquee 2014). A *Trichoderma* fajok másodlagos anyagcseretermékei (*secondary metabolites* – SMs) antimikrobás aktivitást mutatnak baktériumok, élesztők és penészek egy jelentős hányadára (Vizcaino et al. 2005). Jelentős biofungicid hatásuknak köszönhetően széles körben használják penészgombák elleni védekezésben (Verma et al. 2007).

A *Trichodermák* által termelt másodlagos metabolitokat már korábban is vizsgálták és az egyes vegyületeket különböző csoportokba rendezték (peptaibolok, gliotoxinok, gliovirinek, poliketidek, pironok és terpének) (Xiao-Yan et al. 2006; Vinale et al. 2008; Vinale et al. 2009). Az első *Trichoderma* metabolitot, a gliotoxint 1944-ben írták le először (Brian 1944), majd később kiderült, hogy ez a metabolit képes megakadályozni a *Rhizoctonia solani* szaporodását (Howell és Stipanovic 1983).

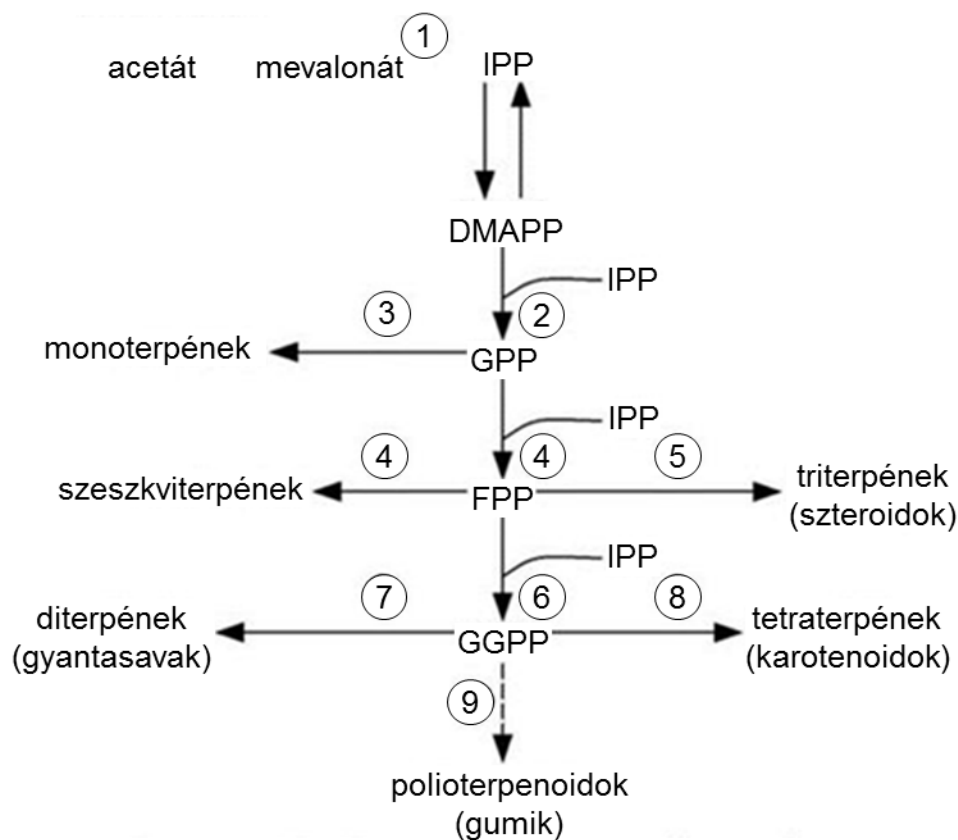
*Trichoderma* fajok által termelt különböző peptaibolok képesek gátolni különböző patogén penészgombák (Schirmbock et al. 1994) például a kakaót fertőző *Moniliophthora perniciosa* penész növekedését. Ez utóbbiért a *Trichoderma stromaticum* faj által termelt trichostromaticin A-E vegyület felelős (Samuels et al. 2000; Aime és Phillips-Mora 2005). *Furarium oxysporum* növekedését is képes gátolni például a *T. pseudokoningii* által termelt trichokonin VI (Shi et al. 2012). Egyes baktériumok szaporodására, növekedésére szintén káros hatással vannak a peptaibolok, például *Bacillus cinerea* baktériumot gátolja a trichorzianin TA és TB (Lorito et al. 1996).

A különböző pironok (leginkább ismert képviselője a 6-fenil-2H-pirán-2-on, 6-PP) antagonista hatást fejtenek ki például fitopatogén gombákra, *R. solani* (Claydon et al. 1987),



*F. oxysporum* (Scarselletti és Faull 1994) és *Botrytis* fajokra (Poole és Whitmore 1997). Néhány éve fedeztek fel egy új metabolitot, a cerinolaktont, amelyet a *Trichoderma cerinum* penészből izoláltak és képes aktivitást mutatni *B. cinerea*, *R. solani* és *Pythium ultimum* fajok ellen (Vinale et al. 2012).

A *Trichoderma* fajok legnagyobb mennyiségben terpéneket termelnek (Reino et al. 2008; Cardoza et al. 2011). A kialakuló kondenzált szénláncok és gyűrűk építőkövei az IPP (izopentenil-pirofoszfát) és izomerje, a DMAP (dimetil-allil-pirofoszfát). A prekursor vegyületekből (geranil-pirofoszfát-GPP, farnezil-pirofoszfát-FPP, geranil-geranil-pirofoszfát-GGPP) nagyszámú vegyület szintetizálódik, a lépéseket specifikus enzimek katalizálják, amelyeknek csak egy része ismert. A terpének bioszintézisét mutatja be a 6. ábra. Egyes szeszkviterpének (például 3,4-dihidroxi-karotán és lignorén) antimikrobás aktivitást fejtenek ki a *Bacillus subtilis*, a *Mycobacterium smegmatis* és a *Pseudomonas aureginosa* ellen, míg antiélesztős aktivitást mutatnak *Sporobolomyces salmonicolor* és *Rhodotorula rubra* ellen (Berg et al. 2004).



**6. ábra:** Terpének bioszintézise az úgynevezett mevalonát útvonalon.

Prekursorok: IPP = izopentenil-pirofoszfát, DMAP = dimetil-allil-pirofoszfát, GPP = geranil-pirofoszfát, FPP = farnezil-pirofoszfát, GGPP = geranil-geranil-pirofoszfát. Enzimek: 1 = IPP-izomeráz, 2,4,6 = prenil-transzferáz különböző változatai, 3,4,7 = cikláz-enzimek, 5,8,9 = egyéb, részben ismeretlen enzimek.

(**Forrás:** Baradat et al. 1991; Hermosa et al. 2014)

#### 2.5.4. A zöldpenészes megbetegedésért felelős *Trichoderma aggressivum*

A gombatermesztésben növekedési szubsztrátnak alkalmazott gombakomposzton a *Trichoderma aggressivum* jól képes növekedni és szaporodni, a kolonizáció késői fázisában pedig zöld színű konídiumokat (ivartalan spórákat) képez mind a komposztban, mind a fertőzött területeken. Ennek köszönhetően kapta nevét: zöldpenész fertőződés vagy *Trichoderma* komposzt penész. A *T. aggressivum* által benépesített területeken a gomba termőtestek képződése retardált, és a kifejlődő gombatestek is rossz minőségűek lehetnek (O'Brien et al. 2014).

Talajlakó gomba révén, számos *Trichoderma* faj izolálható gombakomposztból, úgy mint *T. crassum*, *T. hamatum*, *T. koningii*. A zöldpenészes megbetegedést okozó járványokkal azonban csak a *T. harzianum* fajt hozták eddig kapcsolatba (Doyle 1991). A Brit-szigeteken történő járványkitörést követően a *T. harzianum* izolátumokat három különböző biotípusba sorolták. A Th1, Th2 és Th3 biotípusok növekedésük sebességében, konídiumképzési mintázatukban és a kolonizációs képességeikben térnek el egymástól, emellett telepmorfológiájukban és mikromorfológiájukban is különbözőek. A Th2-es biotípus mezofil, tehát jól növekszik 24-27 °C-os hőmérsékleten, gyapotszerű légmicélium-réteget képez, a konídiumképzés pedig jellemzően a növekedés 3-4. napján indul meg, zöld koncentrikus telepek kialakulásával (Seaby 1996a).

Különböző molekuláris biológiai technikákkal (például RFLP (*restriction fragment length polymorphism* – restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus) és RAPD (*random amplified polymorphic DNA* – véletlen primerekkel történő DNS-amplifikáció) csoportosították és vizsgálták a brit-szigeteki járványok során összegyűjtött, valamint később az észak-amerikai területekről begyűjtött izolátumokat (Castle et al. 1998).

A mitokondriális DNS felépítésének tanulmányozása során megállapították, hogy az ír és a brit törzsek között különböző eltérések mutatkoznak. Ez alapján megkülönböztették a brit-szigeteki agresszív Th2-es típust az észak-írországi Th4-es kórokozótól (Muthumeenakshi et al. 1994; Muthumeenakshi et al. 1998). A Th4-es törzsek genetikailag egységesnek tűntek, ami arra utal, hogy a Th4 biotípus is egyetlen forrásból eredeztethető. Az ITS1 régió szekvenciaelemzése alapján 5 bázispárnyi különbség mutatkozott a Th2 és Th4 biotípusok között, valamint mindkét biotípus közeli filogenetikai rokonságot mutatott a *T. harzianum* Th1 biotípusával (Muthumeenakshi et al. 1998). A Th4 biotípus szintén képes a légmicélium képzésre, sávokban jönnek létre konídiumai, hullámos szélű telepeket alkotva (Seaby 1996a). Az eredmények bizonyították, hogy a brit-szigeteki és az észak-amerikai zöldpenészes járványkitörésért különböző törzsek voltak felelősek, amelyek kialakulásához a korábbi formák mutációi/adaptációi vezettek (Kredics et al. 2011).

A Th2-es és a Th4-es biotípus fertőző tulajdonságainak felismerését követően felmerült a kérdés, hogy a növénypatogén gombák ellen nagy sikerrel alkalmazott biokontroll fajok, mint a *T. harzianum* képviselői okozhatnak-e zöldpenészes megbetegedéseket. Rinker és munkatársainak illetve Romaine és kutatótársainak vizsgálatai alapján kiderült, hogy a *T. harzianum* törzsei valamint a Th1-es biotípus nem képesek a csiperkét megtámadni, szemben a Th4-es biotípussal (Rinker és Alm 2000; Ospina-Giraldo et al. 1998). Összességében elmondható, hogy a zöldpenészes betegség kialakulásáért mind a Th2-es (Fletcher 1990; Doyle 1991; Seaby 1996a), mind pedig a Th4-es (Rinker et al. 1997; Ospina-Giraldo et al. 1998) biotípus felelős. További molekuláris mikrobiológiai vizsgálatok alapján valamint a kismértékben eltérő morfológiai jellegeik alapján Samuels és társai a Th2-es biotípust *T. aggressivum* f. *europaeum*-ként, a Th4-es biotípust pedig *T. aggressivum* f. *aggressivum*-ként írták le, mint két agresszív biotípust (Samuels et al. 2002).

*T. aggressivum* f. *europaeum* (Th2-es biotípus) főként Európában okoz zöldpenészes megbetegedéseket, míg a kanadai, amerikai és mexikói fertőzésekért a *T. aggressivum* f. *aggressivum* (Th4-es biotípus) a felelős. Lane és munkatársai 2007 telén angliai farmokon kezdtek vizsgálatokat, amelynek során ők nem azonosították a Th4-es biotípust (Lane 2008). A *T. aggressivum* f. *aggressivum* Európába kerülése újabb mutációs lehetőségeket hordoz magában, melynek káros következményeit a szakemberek egyelőre nem tudják megjósolni. Az Ausztráliában súlyos termés kieséssel járó zöldpenészes megbetegedésért a Th4-es biotípust tették felelőssé, így nem zárható ki annak az esélye sem, hogy Európában is felüti fejét az észak-amerikai biotípusnak tulajdonítható zöldpenészes fertőzés (Kredics et al. 2011).

A vizsgálatok során a *T. aggressivum* f. *europaeum* és a *T. aggressivum* f. *aggressivum* növekedése és telepképződése között minimális különbségeket fedeztek fel, morfológiai jegyek alapján a két biotípus nem igazán különböztethető meg egymástól (Kredics et al. 2011). Az európai Th2 agresszív biotípus azonban a Th1 biotípussal ellentétben illékony antifungális metabolitokat képes termelni (Krupke et al. 2003).

### **2.5.5. *Trichoderma aggressivum* és csiperke közötti kölcsönhatások**

A kétspórás csiperke és a *Trichoderma aggressivum* fajok közötti versengésben különböző kémiai kölcsönhatások játszanak szerepet. A két kultúra együttes vizsgálata azt mutatta, hogy a gombamicélium jelenléte elengedhetetlen ahhoz, hogy a Th2-es biotípus intenzív spóráképződése megkezdődjön a komposztban. Mindkét organizmus esetében megfigyelhető volt a szimultán növekedés, de amint a sporuláció megkezdődött a *Trichoderma aggressivum* penésznél, a csiperke

növekedésének mértéke nagymértékben lecsökkent és a zöldpenész fejlődése hirtelen megindult elnyomva ezzel a csiperkegomba kifejlődött micéliumait (Mamoun et al. 2000a; Mamoun et al. 2000b). A csiperke micéliumai olyan metabolitokat bocsátanak ki, amelyek folyékony közegben a Th2-es biotípus növekedését stimulálják, azonban a kevésbé agresszív *T. atroviride* és *T. harzianum* Th1-es biotípus fajok növekedését gátolják (Mumpuni et al. 1998).

A fertőzés könnyen terjed más termelési területre ventilláció során, rovarok vagy humán közvetítés által; mechanikai vektorokkal és egyéb, a termesztés során használt eszközökkel (Krupke et al. 2003). A zöldpenésszel fertőzött területen megjelenő gombák felületén világos barna foltok keletkeznek (7. ábra).



**7. ábra:** Zöldpenészes fertőzés a csiperkegomba termőtestén (**Forrás:** saját fotó)

A fertőzés előidézti a gombában az összes tirozináz enzim degradációját, amely a barnulási folyamatokban játszik szerepet. Ennek következtében a fertőződés hatására a gombán barna foltosodás jelenik meg, amely a sejtfal roncsolódásához vezet (Soler-Rivas et al. 2000; Anderson et al. 2001).

### 2.5.6. *Trichoderma* fajok anyagcseréje

A *Trichoderma* fajok kiemelkedő túlélési képessége metabolikus kapacitásuk különbözőségének és természetes versenyképes agresszivitásuknak tulajdonítható. A *Trichoderma* olyan metabolikus szabályozást fejlesztett ki, amellyel képes a különböző környezeti változásokra és a tápanyaghiányra reagálni. Egyes fajoknak még oxigénszegény környezetben is van esélyük a túlélésre, másodlagos anyagcseretermékeiket ugyanis az oxigén jelenlétének függvényében tudják változtatni (Silva et al. 2014). Emellett a *Trichoderma* fajok számos olyan károsító enzimet termelnek, amelyek szükségesek a túlélési folyamataikhoz. Néhány fajuk antibiotikum- és toxin-termelő, más fajuk képes a szerves klórtartalmú vegyületek lebontására (pl.: DDT). Emellett képesek túlélni

különböző fémek nagy koncentrációjú jelenlétét is (réz, cink és kadmium). Ennek következtében az egyes fajok evolúciója az élehetetlennek tűnő helyeken is kimutatható (Silva et al. 2014). A *Trichoderma* fajok sokfélesége jól reflektálható a fajok metabolikus profiljában, például a *T. harzianum* penészgombáiban. A *T. harzianum* számos táptalaj forráson jól fejlődik, például fenilalanin, N-acetil-mannózamin, arabitol, arbutin, vagy szorbit alapú táptalajon. A *T. atroviride* jól növekszik laktulóz és maltotrióz alapú táptalajokon, míg a *T. asperellum* szacharóz, raffinóz, maltitol, melezitóz, dextrin, melibióz, D-glükóz és eritritol alapú táptalajon is képes életben maradni (Gupta et al. 2014).

Érdekességként megemlíteném, hogy a *Trichoderma* fajok által termelt bizonyos vegyületek (heptadekánsav-16-dimetil-észter, 9,12-oktadekánsav és cisz-9-oktadekánsav) hatásosnak bizonyultak egy, a bőrrákot okozó fehérje ellen (Kandasamy et al. 2012). Emellett a *Trichoderma* fajok a Gram-pozitív baktériumok ellen hatásos peptaibol (például hidroxil-L-leucin, vagy  $\beta$ -alanin) molekulák termelésére is képesek (Silva et al. 2014).

A *Trichoderma* fajok számos olyan homopoliszacharid és heteropoliszacharid enzimet termelnek, melyek szükségesek a túlélési folyamataikhoz. Ezek az enzimek főleg glikozid hidrolázok (*glycoside hydrolases* - GHs). A glikozid hidrolázok katalizálják az összetett szénhidrátok hidrolízisét kisebb cukrokra. Ezeknek az enzimeknek rendkívüli szerepük van például a biomassza felhasználásánál (cellulóz és hemicellulóz bontás), antibakteriális védelmi stratégiákban (pl. lizozim) patogének elleni mechanizmusokban (mikoparaziták enzimeit) és a normál celluláris folyamatokban. A GHs-ek a glikoziltranszferázokkal együtt a glikozidos kötések szintézisének és bontásának fő katalitikus közreműködői (Silva et al. 2014).

A komposzt nagy mennyiségű lignint és cellulózt tartalmaz. A gomba extracelluláris enzimein keresztül szénforrásként tudja hasznosítani ezen szubsztrátokat (Krupke et al. 2003). Komon-Zelazowska és társai vizsgálatokat végeztek az egyes *Trichoderma* fajok szénforrás hasznosításával kapcsolatban. A *Trichoderma* fajok leginkább D-manniton, L-eritriten, glicerinen, fruktózon, fukózon, L-arabinózon, D-galaktózon és xilit tápközegen nőttek, míg például az L-prolin, a putreszcin, a turanóz vagy az  $\alpha$ -ketoglutarát nem biztosította a növekedésüket. Megállapításuk szerint a *Trichoderma aggressivum* más *Trichoderma* fajokhoz képest lényegesen jobban hasznosította a N-acetil-D-glükózamint, kinasavat (*quinic acid*) és az  $\alpha$ -D-glükóz forrásokat (Kubicek et al. 2003; Komon-Zelazowska et al. 2007).

Sobieralski és munkatársai kutatásokat végeztek 22 *T. aggressivum* f. *europaeum* izolátum felhasználásával. A micéliumok növekedését kísérték figyelemmel különböző hőmérsékleteken, hagyományos tápközegekben és szerves komposzton. Kutatásaik során megállapították, hogy a

micéliumok 25 és 30 °C- on nőttek legnagyobb mértékben. Ennek következtében nyilvánvalóvá vált, hogy a zöldpenész előfordulásának észlelése és kézbe tartása a gombatermesztés során igen nehézkes, hiszen a termesztett gombák micélium növekedésének is éppen 25 °C az optimális hőmérséklete. Sobieralski és társai arról is beszámoltak, hogy a komposztagaron gyorsabban fejlődtek a zöldpenész gomba micéliumai (Sobieralski et al. 2009).

Samuels és társai hasonló vizsgálatokat végeztek PDA (*potato dextrose agar* - burgonya dextróz agar) tápagon, amelynek során hasonló eredményekre jutottak, mint Sobieralski és munkatársai. Esetükben azonban az alacsony tápanyagtartalmú agaron végzett micélium növekedés kisebb mértékű volt, mint Samuel és társai csökkentett szénhidrát tartalmú táptalajon történő tenyésztési esetén (Samuels et al. 2002; Sobieralski et al. 2009). Az agresszív Th2-es biotípus továbbá jobban nőtt PDA táptalajon, mint tápanyagszegény SNA (*Synthetischer Nährstoffarmer Agar*- szintetikus tápanyagszegény agar) táptalajon. Eredményeik szerint az agresszív fajok növekedése 30 °C-os hőmérsékleten volt a legintenzívebb (Samuels et al. 2002).

A fent leírtakból következik, hogy a gombatermesztőknek szükségük van olyan minőség ellenőrzési technikára, amellyel képesek a gombatermesztésben előforduló mikroorganizmusokat detektálni, jelenlétüket esetleg előre jelezni, hogy a szükséges lépéseket megtehessek a termesztett gomba egészségének megőrzése érdekében.

## **2.6. Illékony szerves vegyületek vizsgálatának lehetőségei**

### **2.6.1. Gőztér analízis**

Élelmiszerminták előkészítése illékony komponenseinek gázkromatográfiás méréséhez általában igen munkaigényes folyamat. A minta előkészítés első lépései általában a mintahomogenizálás, többszörös folyadék-folyadék extrakció, centrifugálás, szárítás vagy párologtatás, esetleg származékképzés (derivatizálás) (Wilkes et al. 2000; Baker et al. 1987; Souza Tette et al. 2016; Caballero-Casero et al. 2016), amelyek szükségesek a mintakomponensek illékonyságának növelése, az anyagok termikus stabilitásának növelése, a csúcsátfedések csökkentése, illetve a detektálhatóság növelése érdekében. Ezek a folyamatok mind idő- és költségigényesek, terhelik a környezetet és esetenként egészségre ártalmasak lehetnek. Alternatívaként ma már egyre jobban elterjedtek a különböző oldószermentes vizsgálatok, amelyek mentesek a fent leírt káros hatásoktól. Ilyen technika lehet a gőztéranalízis (*headspace*, HS) (Hovánszki et al. 2006).

### 2.6.1.1. Statikus HS analízis

A minta feletti gőztér elemzése lecsökkenti ugyan a mérhető komponensek körét, de ez a szelektivitás előnyt is jelenthet a vizsgálatok során (Sági-Kiss 2012). Bonyolult minták esetén a *headspace* mintavétel a leggyorsabb és legtisztább módja az illékony szerves vegyületek elemzésére. A HS-gázkromatográfia (*headspace-gaschromatography*, HS-GC) viszonylag egyszerű technika, népszerűsége az elmúlt évek során egyre növekedett és mostanra világszerte elfogadottá vált. A statikus gőztérből történő elemzéssel idő és költség takarítható meg azáltal, hogy direkt mintavétellel a gőztérből az illékony komponensek mérhetőek, továbbá nincs szükség oldószerre és megfelelő körülményekkel végezve az eljárást hasonlóan megbízható eredményt nyújt, mint a hagyományos előkészítésen alapuló vizsgálatok (Restek Corporation 2000). Az élelmiszermintát első lépésben légmentesen záródó tárolóedénybe helyezük, majd a megfelelő hőmérsékletre felfűtve megvárjuk, amíg beáll az egyensúly a mátrixban kötött és a légtérben lévő illékony komponensek között. Ezt követően gázfecskenővel mintát veszünk a légtérből, majd injektáljuk a gázkromatográfba. A módszer hátránya, hogy csupán a fő illékony komponenseket lehet detektálni, ám ha az érkező főbb illékony vegyületeket olfaktometriásan azonosítani is tudjuk, a módszer kiválóan alkalmazható a főbb vegyületek illatának azonosítására (Belitz et al. 2009).

### 2.6.1.2. Dinamikus HS analízis – SPME

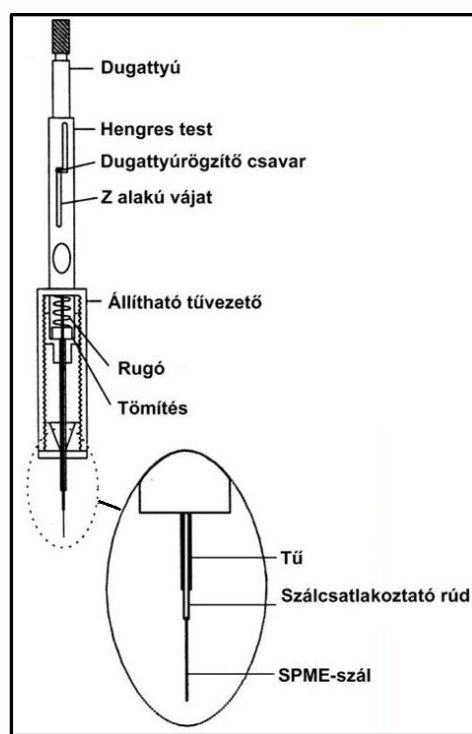
A gőztéranalízis egy másik gyakran használt fajtája a „kihajtás” és „csapdázás” (*purge and trap*, P&T), ezeket más néven dinamikus gőztér extrakciónak is nevezik. A statikus gőztér analízis nem feltétlenül kompatibilis a modern gázkromatográfia tömegspektrométer (*gas chromatograph-mass spectrometer*, GC-MS) technikával, mivel nagy mennyiségű vizet, illetve magas forráspontú szerves gőzöket visznek magukkal, amelyek beszenyeznek a mintát, illetve az ionforrást is korrodálhatják. Szükségessé vált tehát, egy olyan mintaelőkészítési módszer kidolgozása, amely kompatibilis a GC-MS technikával is. Ilyen mintaelőkészítési módszernek/mintaelőkészítést nem igénylő mintavevő eszköznek ígérkezett az oldószermentes, szilárd-fázisú mikroextrakciós mintavételi technika (SPME: *solid-phase microextraction*) (Costin 2004), amelynek kifejlesztése Arthur és Pawliszyn nevéhez fűződik (Arthur és Pawliszyn 1990).

A klasszikus analitikai mérés a mintavételezés, a mintaelőkészítés, az elválasztás, a meghatározás és az adatelemzés folyamataiból áll. Az analízisidő több mint 80 %-át a mintavétel és a mintaelőkészítés teszi ki. A SPME mintavételi technika lényegében gyors, oldószermentes alternatívája a hagyományos extrakciós technikáknak (de Koning et al. 2009; Vas és Vékey 2004),

amely jól kombinálható GC-MS rendszerrel is. A vizsgálandó anyagok szorbeálódnak a SPME szál felületén, majd onnan deszorbeálódnak a gázkromatográf injektorában. Ebben a mintaelőkészítési technikában egy kvarcüveg szál külsejét vonták be a megfelelő állófázissal (szorbens réteggel). A vizsgálandó komponenst a mintából közvetlenül extraháljuk és koncentrálnak erre a szálbevonatra. Az extrakciót követően a GC injektorában megtörténik a deszorpció, amely során a vizsgált minta az oszlopra kerül. Mivel oldószer injektálás nem történik és az illékony komponensek gyorsan deszorbeálódnak a GC injektorban, rövid és kis belső átmérőjű kapilláris oszlopokat is lehet használni. Ez a technika nem csak a vizsgálati időt csökkenti, de javítja a kimutatási határt is, a felbontás megőrzése mellett (de Koning et al. 2009; Bak 2011).

### 2.6.2. SPME mintavevő eszköz

Maga az SPME eszköz egy száltartóból és egy szál szerelvényből áll. A védelem érdekében egy tűben található a beépített szál. A száltartó egy rugós dugattyúból, egy rozsdamentes acéltartóból és egy állítható mélységű műszerből áll (8. ábra). Az eszközt úgy tervezték, hogy a szál újra és újra, többször felhasználható, majd végül cserélhető legyen. A kvarcüveg szál egy vékony filmréteggel van bevonva, amelyre a mintamátrixból a szerves vizsgálandó anyagok szorpciós folyamatok által képesek koncentrálnak (Kataoka et al. 2000).



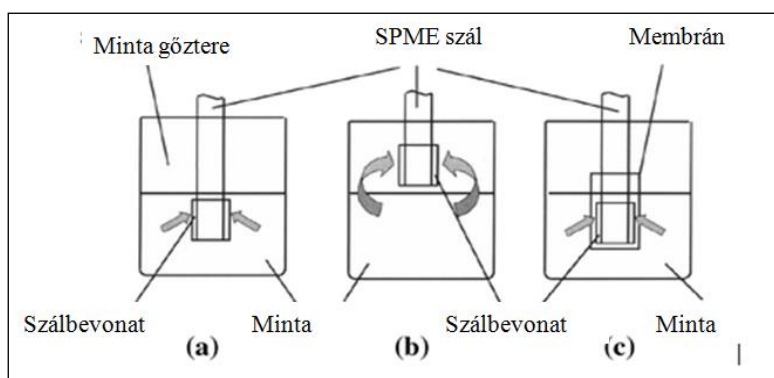
**8. ábra:** Kereskedelmi forgalomban kapható SPME eszköz felépítése (Forrás: Shirey 2012)



Az SPME mára rutinszerűen kapcsolható GC-MS technikához, széles körűen alkalmazzák a legkülönbözőbb vegyületek, különösen az illékony és fél-illékony szerves vegyületek kinyerésére környezeti, biológiai és élelmiszer mintákból, akár komplex mátrixok esetén is (Arthur és Pawliszyn 1990; Kataoka et al. 2000).

### 2.6.2.1. SPME mintavételi típusok

Az SPME mintavétel gyakran alkalmazott módszerei a közvetlen bemerítéses extrakció (DI-SPME, DI: *direct immersion*), a gőztérextrakció (HS-SPME, HS: *headspace*) és a ritkábban használt membrán védett SPME (9. ábra).



**9. ábra:** SPME működési módok: (a) DI-SPME, (b) HS-SPME, (c) membrán-védett SPME

(**Forrás:** de Koning et al. 2009)

A HS-SPME mintavétel esetén a folyékony vagy szilárd minta feletti gőztérből történik a mintavétel, míg a DI-SPME mintavétel esetén a szál közvetlenül a folyadék mintába merül. A DI-SPME egy nagyon egyszerű technika, ám a szál törékenysége és kitettsége miatt egyre népszerűbbé vált a HS-SPME mód, amely elsősorban arra szolgál, hogy az illékony komponenseket vizsgálja a gőztérből, megvédve ezzel a szálbevonatot a nagy molekulatömegű anyagoknak tulajdonítható károsodásoktól, így annak élettartama jelentősen hosszabb (Hovánszki et al. 2006; de Koning et al. 2009). A minta adagolásának automatizálásával az injektálás reprodukálhatósága is jelentősen javult a korábbi manuális injektáláshoz képest (Spietelun et al. 2013).

### 2.6.2.2. Az extrakció hatékonyságát befolyásoló paraméterek

A SPME hatékonyságát leginkább a szálbevonatok típusa határozza meg. A SPME szálakat a szábevonat polaritása és filmvastagsága szerint csoportosítjuk. Folyékony fázisok közül a

leggyakrabban alkalmazott szálbevonat a nem-poláros polidimetil-sziloxán (*polydimethyl-siloxane*, PDMS). A 2. táblázat mutatja a kereskedelmi forgalomban kapható különböző SPME száltípusokat, köztük az eltérő vastagságú (7  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$  és 100  $\mu\text{m}$ ) PDMS szálakat.

**2. táblázat:** Kereskedelmi forgalomban kapható SPME szálbevonatok típusai.

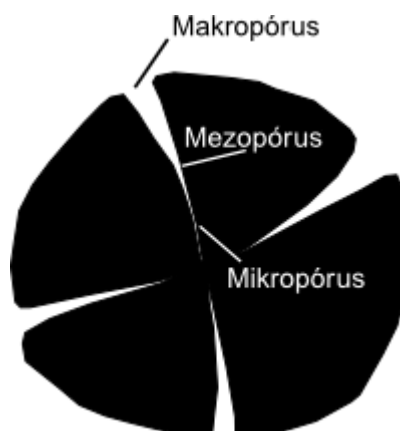
PDMS: polidimetil-sziloxán, PA: poliakrilát, CW: carbowax, DVB: divinil-benzol (**Forrás:** Shirey 2012)

Szálbevonat típusa	Extrakció mechanizmusa	polaritás
7 $\mu\text{m}$ PDMS	abszorpció	nem-poláros
30 $\mu\text{m}$ PDMS	abszorpció	nem-poláros
100 $\mu\text{m}$ PDMS	abszorpció	nem-poláros
85 $\mu\text{m}$ PA	abszorpció	poláros
60 $\mu\text{m}$ CW	abszorpció	poláros
15 $\mu\text{m}$ Carbopack Z-PDMS	adszorpció	bipoláros
65 $\mu\text{m}$ PDMS/DVB,	adszorpció	bipoláros
55 $\mu\text{m}$ /30 $\mu\text{m}$ DVB/CAR/PDMS	adszorpció	bipoláros
85 $\mu\text{m}$ CAR/PDMS	adszorpció	bipoláros

Minél vastagabb a szálbevonat, annál több analitot képes megkötni, azonban az extrakció ideje is hosszabb, míg a vékonyabb szálbevonatok használatával az extrakciós idő csökkenthető, azonban az extrahált komponensek mennyisége is kisebb lesz. A poliakrilát (*polyacrylate*, PA) és a carbowax (CW) szálbevonatok poláros tulajdonsággal bírnak. A poliakrilát egy merev, rideg anyag, aminek köszönhetően az adott komponens be/ki történő migrációja jelentősen lassabb, így az alkalmazandó extrakciós idő ennél a szálbevonatnál a leghosszabb. Ehhez hozzájárul az is, hogy magasabb hőmérsékleten kell a megkötött komponenseket deszorbeálni a GC injektorába. A carbowax szálbevonat típust mérsékelt polaritás jellemzi. Fontos megjegyezni, hogy ez a szálbevonat vízben először felduzzad, majd feloldódik, így vizes mátrixok esetén ennek a száltípusnak a használata nem javasolt. Ezen problémák kiküszöbölésére erősen keresztkött (*highly crosslinked*) carbowax szálbevonatot szintetizáltak, amely már nem oldódik vízben és kevésbé képes felduzzadni, kismértékben azonban a polaritása is csökkent (Shirey 1999).

Pórusos részecske keverékekből is készítenek szálbevonatokat, ilyen például a divinilbenzol (*divinylbenzene*, DVB). A pórusos tulajdonsága miatt ez a szálbevonat típus képes fizikailag visszatartani a vizsgált komponenst, ami szorosabb, stabilabb retenciót eredményez azoknál a komponenseknél, amelyek beleférnek a pórusos szerkezet lyukaiba. A DVB szálbevonat éppen ezért alkalmasabb kis méretű és mennyiségű komponens (*trace level*) megkötésére (ppm, ppb vagy ppt mértékben). A DVB szálbevonat fajlagos felülete megközelítőleg 750  $\text{m}^2/\text{g}$ , amely tartalmaz makropórusokat ( $\geq 500 \text{ \AA}$ ), mezopórusokat (20-500  $\text{ \AA}$ ) és mikropórusokat (2-20  $\text{ \AA}$ ) is. A mezoporózus

részek ideálisak 6-15 szénatomszámú (C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>) vegyületek szorpciójára, habár a DVB képes nagyobb molekulák hatékony megkötésére is. A divinilbenzol szilárd pórusos szemcsékből álló anyag, ezért a szálra való felvitelhez szükség van egy folyadék halmazállapotú szálbevonatra is, lehetőleg oly módon, hogy a keverékben mindkét száltípus előnyeit kihasználhassuk. A carbowax és DVB keveréke (CW/DVB) növeli a szál polaritását és növeli a megköthető molekula mérettartományát is. A DVB réteg felvihető PDMS szálbevonatra is (PDMS/DVB). Ez a kombináció kissé jobb visszatartást biztosít a kis komponensek számára, mint a PDMS és mutat némi affinitást egyes poláris vegyületek iránt. Ezen keverék szálbevonatok hátránya, hogy törékenyebbek és nem megfelelő körülmények között képesek leválni a szálról, tehát nagyobb körültekintést igényel a használatuk. A carboxen (CAR) száltípus számos kedvező tulajdonsággal bír, amelyet ha PDMS szálbevonattal kombinálunk olyan bipoláros fázist kapunk, amely képes kisebb molekulák megkötésére. Ezek közé a kedvező tulajdonságok közé sorolhatjuk a pórusos lyukak méretét, azok eloszlását, térfogatát és alakját. A carboxen elsősorban egy szintetikus szénsorból álló szálbevonat, amelynek jellegzetes pórusos szerkezete van makro-, mezo- és mikropórus részekkel (10. ábra). Ennek a pórusos szerkezetének köszönhetően kiválóan alkalmazható kis molekulatömegű vegyületek megkötésére. A carboxen szálbevonat fajlagos felülete megközelítőleg 720 m<sup>2</sup>/g, amelyet szintetikus úton állítanak elő, így a pórus térfogatok és méretek pontosan kézben tarthatók és ellenőrizhetők. A pórus alakja jelentősen befolyásolhatja a szorpció folyamatokat (Shirey 1999).



**10. ábra:** Carboxen szálbevonat egyedi pórusos szerkezetének sematikus ábrája.

(**Forrás:** Shirey 1999)

A kereskedelmi forgalomban kapható szálbevonatok típusai azonban meglehetősen korlátozottak, és ezek nem mindig felelnek meg a gyakorlatban fontos elvárásoknak. Az extrakciós szálaknak további hiányosságuk, hogy hőre bomlékonyak és mechanikailag meglehetősen gyengék és sérülékenyek (Kataoka et al. 2000; Spietelun et al. 2013). A kereskedelmi forgalomban kapható

extrakciós szálak alkalmazhatósága is korlátozott, így előtérbe kerültek a teljesen új szorpciós anyagok szintetizálásán alapuló szálbevonatok, úgymint: vezető polimerek: polipirrol és annak származékai, molekuláris lenyomatú polimerek, szol-gél szorbensek, ionos folyadékok (polimer ionos folyadékok), nanocsövek, valamint egyéb típusú szálbevonatok (polikristályos grafit, poliszilikon fullerének, mezoporózusos szilikátok) (Spietelun et al. 2013).

Az extrakció módja is jelentősen befolyásolja az illékony komponensek kinyerésének hatékonyságát. Az extrakciós mód kiválasztása a célkomponensek illékonyága és azok affinitása alapján történik. Általánosságban elmondható, hogy a direkt immerzió (DI-SPME) érzékenyebb mintavételi technika, mint a gőztéranalízis (HS-SPME), ugyanakkor a HS-SPME alacsonyabb háttérzajjal rendelkezik és alkalmas a legtöbb illékony vegyület extrakciójára gáz, folyékony és szilárd mintákból is. A HS mintavétel csökkenti a szennyeződések kockázatát és az extrakciós szál károsodását, továbbá szelektivitása felülmúlja a közvetlen mintavételét (de Koning et al. 2009).

Az extrakciós idő az az időtartam, amíg az egyensúly beáll a minta feletti fázis és a mátrixban lévő komponens koncentrációja között, valamint a légtérben lévő és a SPME szál bevonatán megkötődött komponens koncentrációja között. Az extrakciós időt számos tényező befolyásolja, mint például az extrakció típusa, a minta hőmérséklete, a minta koncentrációja, a szálbevonat típusa és vastagsága stb. (Lorito et al. 1996; Spietelun et al. 2013). Mindazonáltal a gyakorlatban az egyensúly elérését ritkán várják meg, elsősorban annak nagy időigénye miatt, így az extrakciót gyakran végzik nem egyensúlyi állapotban, de optimalizált extrakciós körülmények között (Spietelun et al. 2013).

A mintatérfogat szintén befolyásolja a SPME mintavétel hatékonyságát. Gőztér analízis esetén az extrakció hatékonysága függ a gőztér mennyiségétől is. A HS mintavétel érzékenysége akkor a legjobb, ha kicsi a gőztér térfogata, így nagyobb a minta koncentrációja a légtérben, ezáltal gyorsabban és nagyobb hatékonysággal történik az extrakció (Spietelun et al. 2013).

A minta keverése növeli az anyagátmenetet a két fázis között, lerövidítve ezáltal az extrakciós időt, javítva esetleg a reprodukálhatóságot is. Egyes vizsgálatok szerint azonban a HS mintavételezésnél a minta kevertetése nem javítja szignifikánsan az extrakció hatékonyságát (Sági-Kiss 2012).

Kis mennyiségű só hozzáadása (kisózás) javíthatja az extrakció hatékonyságát, azáltal, hogy az ionerősséget növelve megváltoztatja – csökkenti – a vizsgált komponens oldhatóságát a mintamátrixban (Shirey 2012).

Abban az esetben, amikor a vizsgálandó anyag kismértékű affinitással rendelkezik az extraháló fázisra nézve, a hatékonyság javításának jó módja lehet a származékképzés. A származékok eltérő kémiai szerkezettel és tulajdonsággal rendelkeznek, így nagyobb affinitással kötődnek az

extrakciós fázishoz, tehát kedvezőbb a megoszlási együtthatójuk. A származékképzés akkor lehet leginkább mellékreakcióktól mentes, ha a SPME szálon történik, ugyanis, az eredeti mintában végezve a folyamatot mellékreakciók bekövetkeztével kell számolnunk (Spietelun et al. 2013).

### 2.6.2.3. A deszorpció hatékonyságát befolyásoló paraméterek

A GC injektorában a termikus deszorpció folyamata függ a vizsgálandó minta illékonyságától, a szálbevonat vastagságától, az injektálás mélységétől, az injektor hőmérsékletétől és az expozíció időtartamától. A szál expozíció mélységét úgy kell beállítani, hogy az a forró injektor közepén helyezkedjen el és lehetőleg éppen a GC oszlopra fókuszáljon. A legtöbb injektor (modern GC esetben) alkalmas a szál közvetlen befogadására, ahol a *liner* térfogata befolyásolja a kromatográfiás csúcsok alakját. *Split/Splitless* injektorokat *splitless* üzemmódban célszerű működtetni. Az injektor hőmérsékletét úgy kell beállítani, hogy az optimális deszorpciós hőmérséklet megközelítőleg azonos legyen a legkevésbé illékony komponens forráspontjával. A maximális deszorpciós hőmérsékletet a SPME mintavevő szál típusától függően kell megválasztani, amelyet a gyártó a terméken feltüntet. A csúcshéledés megakadályozása érdekében a kezdeti oszlop hőmérsékletet alacsony értéken érdemes tartani (Kataoka et al. 2000; Shirey 2012).

## 2.6.3. Gázkromatográf-tömegspektrométer kapcsolt analitikai rendszer

A GC-MS-DS műszerrendszer főbb egységei a gázkromatográf (*gas chromatograph*, GC), a tömegspektrométer vákuumrendszerrel (*mass spectrometer*, MS), valamint számítógép (*data system*, DS). A GC fő feladata a minta alkotóinak elválasztása, az MS végzi az elválasztott alkotók jellemző tömegspektrumának felvételét, végül a DS vezérli a teljes műszerrendszer működését, összegyűjti az adatokat, majd segíti az adatok feldolgozását, értelmezését és archiválását (Balla 2006).

### 2.6.3.1. Gázkromatográfia

A gázkromatográfia bomlás nélkül elpárologtatható, illékony, vagy illékonyra tehető, hőstabil anyagok elválasztására alkalmas analitikai módszer. Közvetlenül 200-300 moláris tömegű vegyületekig alkalmazható, de származékképzéssel ez a tartomány akár 600 moláris tömegű vegyületekig is növelhető (Lakatos et al. 2009). A gázkromatográfiás módszereket ma már az élelmiszeranalízis sok területén alkalmazzák, többek között gázkromatográfiával határozzák meg az antioxidánsokat, a tartósítószerket, a szermaradványokat, az íz- és aromaanyagokat, valamint az illó

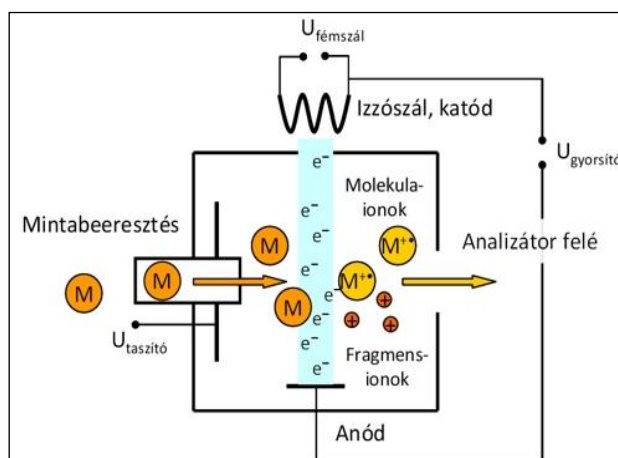
vagy illóvá tehető komponenseket (alkoholok, aldehidek, zsírsavak, észterek), valamint használható aminosav-meghatározásra is az aminosavak analízise során (Kovács és Csapó 2015).

A gázkromatográfiás technikánál az elválasztás a gázkromatográfiás kolonnán történik. Az elúciós technika során, az állófázison nagy tisztaságú vivőgázt (He, Ar, N<sub>2</sub> és H<sub>2</sub>) áramoltatunk folyamatosan (Pokol et al. 2011), állandó áramlási sebességgel, majd ebbe az áramba juttatjuk be pillanatszerűen a mintát, amely dugószerűen halad tovább az állófázison, ahol az eltérő fajlagos szorpciók következtében a minta alkotói időben elválnak egymástól. A mintaadagolás pillanatszerűen történik és a folyadék minta a gyors felfűtésnek köszönhetően azonnal gáz halmazállapotba kerül. Az elválasztandó minta az állófázissal különböző típusú és mértékű fizikai kölcsönhatásokat alakít ki, így az állófázisban eltérő ideig tartózkodnak a komponensek (retenciós idő,  $t_R$ ) (Balla 2006; Bak 2011).

A detektorok túlnyomó többsége a detektorba jutó anyag pillanatnyi mennyiségével arányos jelet szolgáltatják. A kromatogram magában hordozza a két legfontosabb analitikai információt, a mennyiségi (görbék csúcs alatti területe) és minőségi (retenciós idő) információkat (Balla 2006). A leghasználhatóbb csoportosítás a működési elv szerint történhet, mely szerint megkülönböztetünk ionizációs detektorokat, fotometriás detektorokat, hővezetőképesség-mérő detektorokat, molekulaszелеktív, vagy tömegspektrometriás detektorokat (Balla, 2006; Pokol et al. 2011).

### 2.6.3.2. Tömegspektrometria

A tömegspektrometria olyan vizsgálati módszer, amelynél ionos részecskéket választunk el fajlagos tömegük ( $m/z$ ) szerint, csökkentett nyomáson. Az elválasztott ionok intenzitását folyamatosan mérjük, így egy tömegspektrumot (ionáram intenzitás - fajlagos tömeg függvénykapcsolat) kapunk. A tömegspektrométerben az ionforrás feladata, hogy a vizsgálandó molekulából energia segítségével ionokat hozzon létre és ezeket lehetőleg egy nyalábben juttassa az analizátorba. Az alkalmazott gerjesztési energiától függően többféle ionforrás létezik. A leggyakoribb az elektronütközéses ionizáció (*electron impact/electron ionization*, EI) (11. ábra), amelyet széles körben alkalmaznak GC-MS technika során; emellett a kémiai ionizáció (*chemical ionization*, CI) használata is egyre terjed (Bak 2011).



**11. ábra:** Az elektron ütközéses ionforrás sematikus ábrája (Forrás: Boros et al. 2010)

Az EI ionforrásban egy izzószálon (*filament*) áramot vezetünk keresztül, amelynek hatására az felizzik és elektronok lépnek ki belőle. A minta molekulái a gyors elektronokkal találkozáva összeütköznek, majd ionizálódhatnak és a képződő ionok egy repellernek nevezett taszító potenciál hatására elhagyják az ionforrást, ahogy a 11. ábra is mutatja. A gyakorlatban 70 V-os gyorsítófeszültséget alkalmaznak, ennek következményeként az elektronnaláb energiája közelítőleg 70 eV. Szerves molekulákat feltételezve az ionizációra mintegy 10–12 eV, míg gerjesztésre néhány eV fordítódik. A maradék többlet energiának köszönhetően fragmentálódik a molekula, amely szerkezeti információt szolgáltat. Ionizációhoz szerves analitikában főként 70 eV energiát szokás használni, mivel ez esetben karakterisztikus tömegspektrumot kapunk, ami minden molekulára egyedi és a fragmenskép csupán minimális eltérést mutat (Tholl et al. 2006; de Hoffmann és Stroobant 2007). Az adatbankokban összegyűjtött tömegspektrumok 95%-a 70 eV-os EI ionforrással készült. Kíméletesebb ionizációs megoldások lehetnek a kémiai-, a foto-, a lézer deszorpció, az elektromos stb. ionizációk (Balla 2006).

A tömegspektrométeren fragmentáció nélkül végighaladó ionokat molekulaionnak (gyökkation ( $M^+$ )), míg az „elreagálódott” ionokat fragmensionnak nevezzük. Az EI-ionforrásban első lépésben képződő ionok mindig gyökkionok, hiszen egy elektron elvesztésével képződnek. Az ionizációs energia csökkentésével a tömegspektrumon kirajzolódó fragmensek intenzitás értékei is jelentősen csökkennek, gyakorlatilag ez az oka, hogy nem használják ezt a fajta megoldást a molekulaion megtalálására.

Az analizátor elválasztja az ionforrásból nagy sebességgel érkező ionokat fajlagos tömegük szerint. Az elválasztás alapján megkülönböztetünk: repülési idő elvén alapuló, elektromos (például kvadrupól), radiofrekvenciás, ionsapdás, mágneses, elektrosztatikus, kettős fókuszálású

tömegspektrométereket, illetve tandem analizátorokat (Balla 2006; de Hoffmann és Stroobant 2007). A GC-MS kombinációkban azonban főként a kvadrupól és az ioncsapda analizátorok terjedtek el. A kvadrupól négy rúdból álló (kettő-kettő ellentétes egyenfeszültségre kapcsolt) tömegspektrométer. Páronkénti frekvenciaváltoztatással vándoroltatjuk az ionokat a rudak között, így azok meghatározott pályán futnak végig és az adott tömegű, kiválasztott ion bekerül a detektorba. A detektor fő feladata az egyes ionok számával arányos intenzitású jel szolgáltatása. Az ionsokszorozó vagy fotosokszorozó detektorok terjedtek el leginkább. A detektor által előállított és továbbított jel lehetővé teszi az elválasztott komponensek azonosítását (kvalitatív analízis) és mennyiségük meghatározását (kvantitatív analízis) (Balla 2006). A tömegspektrométerek működésének lényeges eleme a legalább kétfokozatú vákuumrendszer. Az első fokozatnál többnyire olajrotációs szivattyút használnak, amely biztosítja az olajdiffúziós szivattyúzás elővákuumát, végül kialakul a végvákuum  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  kPa (Balla 2006).

#### 2.6.4. Minőségi információ - tömegspektrum

Amennyiben elektronütközéses ionforrással ionizáltuk a molekulákat (50-80 eV energiájú ionizáló elektronokkal), akkor az úgynevezett karakterisztikus spektrumot kapunk. Ezek a tömegspektrumok hordozzák azt a minőségi, szerkezeti információt, amely egy adott molekulát jellemez.

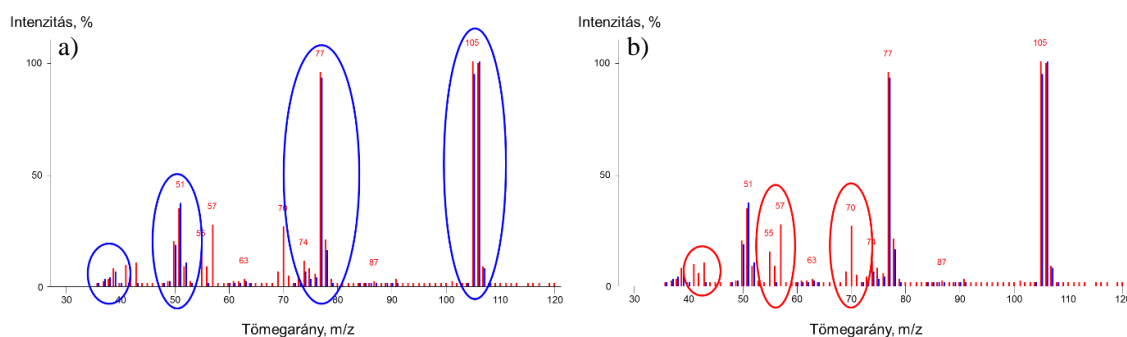
Tömegspektrum könyvtár alkalmazásával történő azonosítás során sem jelent mindig azonosságot a nagymértékű hasonlóság, ezért a GC-MS technikával foglalkozóknak is meg kell ismerkedniük a tömegspektrumok megfejtésének, értelmezésének elvi alapjaival. Ez annál inkább elkerülhetetlen, minél inkább olyan mintacsoportok analízisére vállalkozik valaki, amelyek esetében nem állnak rendelkezésre adatbázisok. Azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy 50-60 ezer, akár 120-130 ezer spektrumot is tartalmaz egy-egy tömegspektrum könyvtár, és még egy nagyságrenddel nagyobb azon szerves vegyületek száma, amelyek vizsgálata potenciális kihívást jelenthet. A spektrumfejtés alapszabályainak a megismerése ezért a legtöbb gyakorlati feladat megoldásához nélkülözhetetlen lehet. A mikrobiális eredetű illékony szerves vegyületek (MVOC) analízise is ilyen feladat, ahol komponensek százainak elemzése történik standardok nélkül (*unknown screening*).

A tömegspektrumban megjelenő és az adott molekulára jellemző ionok döntő többsége az ionforrásban keletkezik. Amennyiben az ionok keletkezésének útját ismerjük, a spektrumban talált ionokból az adott szerkezetű molekula felépíthető. Ha a molekulaion bomlása, fragmentációja nagyon gyors, monomolekuláris, szimultán lejátszódó reakciók sorozata következik be. Ennek két fő



lehetséges útja van, a molekulaion hasadása és átrendeződése. Ezen szimultán reakciók mindegyike lejátszódik, de nem azonos valószínűséggel. A legnagyobb mérvű energiacsökkenés irányába lejátszódó reakció termeli a legintenzívebb fragmens iont. A tömegspektrumok megfejtéséhez ezeken kívül még nagyon sok hasadási és átrendeződési folyamat ismeretére van szükség. Ez sajátos szakmai ismereteket kíván. Az azonosításnak másik lehetséges útja spektrumkönyvtárak igénybevételéhez kötődik, azaz a mért spektrum és az adatbázisban lévő tömegspektrum összehasonlítása. Ma már a számítógépes adatbázisok internetes hálózaton is hozzáférhetők. A legnagyobb ilyen adatbázis a NIST (National Institute of Standards of USA), amely több mint 200 ezer tömegspektrumot tartalmaz, melyek az egyes komponensek 70 eV-os EI ionizációjának hatására keletkeztek (Balla 2006).

Az elválasztott vegyületek azonosítása NIST tömegspektrum könyvtárral úgy történik, hogy az általunk mért ismeretlen komponens tömegspektrumát hasonlítjuk össze az adatbázisban lévő összes tömegspektrummal és a hasonlóságok/különbségek függvényében meghatározzuk a molekula minőségét (12. ábra).



**12. ábra:** NIST könyvtárral történő azonosítás tömegspektrumok összevetése által. Kékkel az azonosítani kívánt, míg pirossal a spektrumkönyvtárban lévő tömegspektrum látható.

A kék elipszisek (a) a megegyező, piros elipszisek (b) pedig az eltérő fragmenseket jelölik.

Az ismeretlen spektrum NIST tömegspektrum könyvtár segítségével történő azonosítása során minden egyes spektrumhoz társul egy találati százalék érték. Tökéletes egyezőség esetén ez az érték 99,9 %. Tökéletes illeszkedést azonban csak akkor kapnánk, ha a minta tömegspektrumában fellelhető minden egyes tömegcsúcs jelen lenne a könyvtár tömegspektrumában is, és azok intenzitás aránya is pontosan megegyezne. Általános útmutatóként, a 90,0 % vagy ennél nagyobb találati érték kiváló egyezést jelent, a 80,0-90,0 % jó egyezést, a 70,0-80,0 % méltányos egyezést, míg a kevesebb, mint 60,0 % szegényes egyezést mutat.

### 2.6.3. VOC vegyületek vizsgálata a szakirodalomban

Kezdetben a SPME mintavételi módszert illékony vegyületek meghatározására használták környezeti mintákból. Ma már a technikát a biogyógyászat területén, az élelmiszeranalízisben, továbbá kevésbé illékony vegyületek meghatározására is alkalmazzák (de Koning et al. 2009). Az élelmiszeranalitikában számos komponens és szennyezőanyag vizsgálatára alkalmazzák SPME módszert, ezek közül a 100 µm PDMS és 65 µm PDMS/DVB szálak alkalmazása terjedt el leginkább GC-MS vizsgálatok esetén (Martos és Pawliszyn 1997).

GC-MS kapcsolt technikával vizsgálták már szarvasgombák (Pelusio et al. 1995), vargánya gombák (Aprea et al. 2015) illékony komponenseinek összetételét. A szakirodalomban PDMS/DVB szállal kerestek összefüggést ehető gombák átfogó aroma és illóanyag tartalma között (De Pinho et al. 2008), valamint elvégezték különböző gombák illékony komponenseinek mennyiségi meghatározását is (Costa et al. 2013). Gombákon kívül különböző hagymafélék (Järvenpää et al. 1998), és mentol minták (Coleman és Lawson 1998) illékony szerves vegyületeinek összetételét is vizsgálták. Különböző gyümölcsök, úgy mint almák (Song et al. 1997), citrusfélék (Nardini et al. 2013), és barackok (Guillot et al. 2006) illékony komponenseit, aroma összetételét vizsgálták HS-SPME mintavételi technikával. Mindezeket túl különböző keverék citrus gyümölcslevek illékony komponenseit is meghatározták már öt különböző SPME száltípussal (Barboni et al. 2009). Ezeken kívül különböző alkoholos italokat is vizsgáltak már HS-SPME-GC-MS technikával, úgy mint söröket (Jelen et al. 1998; Pinho et al. 2006), és gyümölcs ízesítésű maláta italokat (Constant és Collier 1997). Morales és munkatársai kísérlettervet dolgoztak ki klórozott fenol és anizol illékony vegyületek pontos meghatározására (Morales et al. 2012). Különböző gyártótól származó kereskedelmi forgalomban is kapható komposztot vizsgáltak HS-SPME-GC-MS technikával (Kim et al. 2005). Az élelmiszeripari termékek közül a HS-SPME technikával vizsgált minták legnagyobb csoportját 2005 és 2011 között a borok tették ki. A fent leírtakon túl zöldségeket, gyümölcsöket, tejtermékeket és különböző italokat, húsokat, fűszereket, gyógynövényeket és egyéb élelmiszeripari termékeket vizsgáltak ezzel a mintavételi technikával (Jelen et al. 2012).

### 2.6.3. MVOC vegyületek vizsgálata a szakirodalomban

Számos kutatás irányult már különböző MVOC vegyületek vizsgálatára 65 µm PDMS/DVB szál használatával, például *Beauveria bassiana* enteropatogén gomba (Crespo et al. 2008) és vadon termő gombafajok (Malheiro et al. 2013) esetében. Norbert Stoppacher és munkatársai kutatásuk során azt tapasztalták, hogy a legnagyobb számú illékony vegyületet a 65 µm PDMS/DVB

szálbevonattal lehetett detektálni (Stoppacher et al. 2010), ugyanígy Sági-Kiss Virág és munkatársai gyümölcsök penészes romlásának előrejelzésekor szintén 65  $\mu\text{m}$  vastagságú PDMS/DVB bevonatú szálát használták (Sági-Kiss és Fodor 2011; Sági-Kiss 2012). Wilkins és munkatársai építési felületeken (mint például gipszkarton) vizsgáltak különböző penészeket és azok mikrobiológiai illékony szerves anyagcseretermékeit (Wilkins et al. 2000).

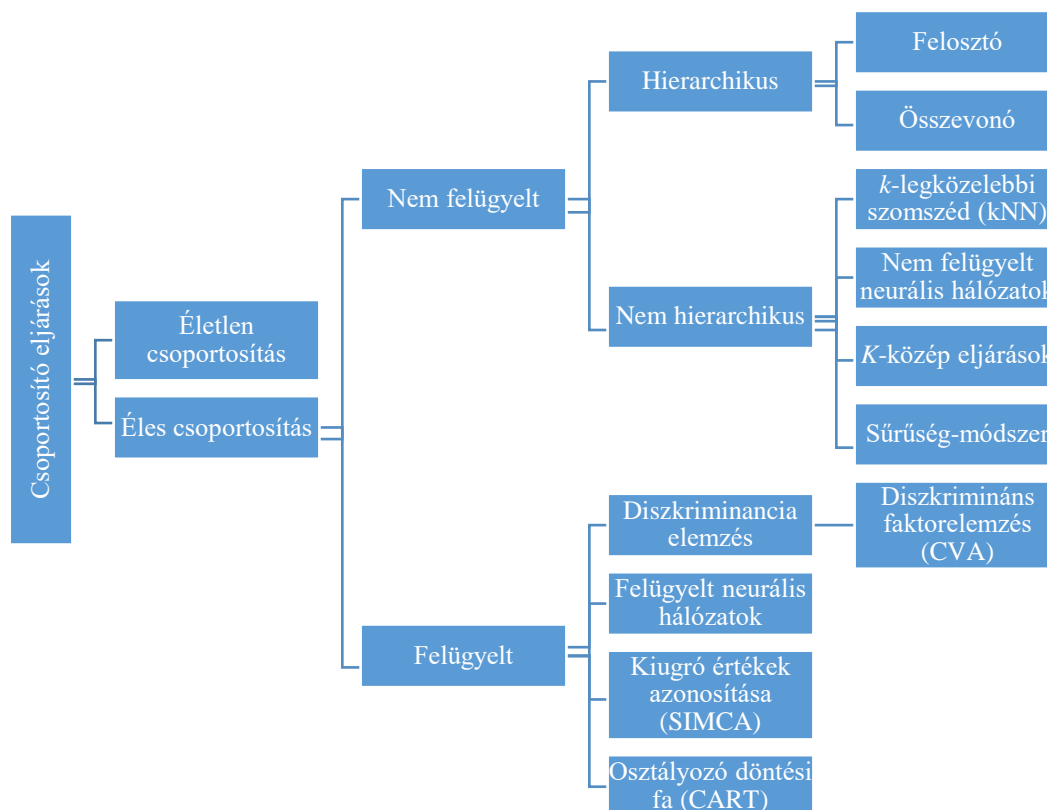
A szakirodalom szerint a SPME-GC-MS módszert gyakran használják különböző mikroorganizmusok illékony vegyületeinek vizsgálatára, például *Fusarium poae* vizsgálatára malátában (Dong et al. 2015), *Fusarium* és *Trichoderma* fajok MVOC termékeinek meghatározására (Kluger et al. 2013), illetve különböző penészek MVOC vegyületeinek vizsgálatára különböző táptalajokon (Matysik et al. 2008; Müller et al. 2013). SPME-GC-MS módszert használtak beltéri penészek (Van Lancker et al. 2008) vizsgálatára is, *Aspergillus* fajok marker vegyületeinek meghatározására beltéri környezetben (Polizzi et al. 2012b), illetve penészek MVOC termékeinek vizsgálatára nedves épületanyagokon és szintetikus tápagon (Claeson et al. 2002; Wady et al. 2003).

## **2.7. Kemometriai módszerek**

A már ismertetett mérések során kapott eredményeket sokszor célszerű valamilyen megbízható statisztikai módszerrel is alátámasztani. Az analitikai kémiai mérések során nyert adatok statisztikai elemzésével foglalkozó tudományág, a kemometria, amely magában foglalja a kémiai tudományokon kívül az alkalmazott matematikát, többváltozós statisztikát illetve a számítástudományokat is. Multidiszciplináris jellege miatt számtalan problémára nyújtanak megoldást a kemometriai módszerek. A kemometriai problémák jellemzője, hogy egy nagyobb adathalmazból (akár több száz változó és eset) kell kinyerni azt az információt, amit felhasználva és kritikusán értelmezve juthatunk el a megfelelő következtetéseikig (Hastie et al. 2011). A kemometria fiatal tudományterület, a számítógépek elterjedésével együtt került a figyelem középpontjába, mivel az addigiaknál nagyobb adathalmazokat töredék idő alatt lehetett értékelni az új eszközökkel, módszerekkel (Brereton 2007). A kemometria elnevezés Svante Wold nevéhez köthető, aki 1974-ben használta először (Wold 1995).

A legelterjedtebb alkalmazási területek a csoportosítás, a dimenziócsökkentés és regressziós problémák megoldására terjednek ki. Az osztályozó eljárások során a meglévő információk alapján az egyes esetek csoportokba sorolása történik különböző szempontrendszerek szerint. Felügyeletlen algoritmusok segítségével ismeretlen csoportosulások deríthetők fel, míg felügyelt módszerek alkalmazásával ellenőrizhetők az előzetesen megfogalmazott csoportba tartozások, illetve ismeretlen

minták csoportosítása is elvégezhető. Az osztályozási eljárásokat elsősorban átfedő (életlen), illetve éles csoportosítási eljárások közé sorolhatjuk. Az átfedő modellek lehetőséget adnak arra, hogy egy-egy mintaelem egy bizonyos valószínűségi értékek mellett több csoport tagja is lehessen. Ezzel szemben az éles csoportosítás során egy mintaelem kizárólag egy csoportba tartozhat. Az éles csoportosítások tovább oszthatók a tanulási mód alapján felügyelt és felügyeletlen módszerekre (13. ábra).



**13. ábra:** A csoportosító eljárások felosztása Borosy nyomán (**Forrás:** Borosy 2001)

A felügyelt és felügyeletlen módszerek közötti különbség azon alapul, hogy a futtatott modellek a tanulási fázis során „ismerik”-e az egyes esetek hovatartozását, vagyis vannak-e előre definiált csoportok. Ilyen módszereket azokban az esetekben érdemes alkalmazni, amikor egy ismeretlen mintát kell előre behatárolt csoportokba sorolni. Kóktélparadicsom fajták lineáris diszkriminancia elemzéssel (*linear discriminant analysis-LDA*) történő csoportosítását mutatták be Csambalik és munkatársai tanulmányukban, amelynek során ~98 %-os pontossággal tudták csoportosítani az egyes fajtákat műszeres és érzékszervi minősítési eredményeik alapján (Csambalik et al. 2014). Mézek esetében Zhao és munkatársai nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (*high performance liquid chromatography*, HPLC) mérésekből származó adatahalmazt elemezték LDA

módszerrel, majd a 36 minta alapján elkészített modellt 41 ismeretlen mintával tesztelték. Eredményeikben a 41 ismeretlen minta típusát (azaz, hogy milyen virágból készült a méz) sikeresen beazonosították (Zhao et al. 2016). Li és munkatársai növényolajok vizsgálata során több más módszerrel összehasonlítva szintén LDA elemzéssel vizsgálták a GC-MS mérésekből származó eredményeket, és arra keresték a választ, hogy a minták illékony vegyületei alapján lehetséges-e csoportosítani az olajokat fajtájuk szerint (Li et al. 2016). Ezek a kemometriai eljárások a felügyeletlen módszerek közé tartoznak, amelyek esetében nincsenek előre definiált csoportok, jól használhatók a minták jellemzésére fontos változók szűrésére, a minták közötti hasonlóságok és különbségek leírására (13. ábra).

Logikai osztályozás végezhető döntési fa algoritmusok felhasználásával, ahol különböző logikai szabályok megfogalmazásával, úgynevezett szabályok létrehozásával sorolhatók csoportokba a minták (Caetano et al. 2007). A biológiai neuronok mintájára megalkotott neurális hálózatok alkalmasak az úgynevezett „*deep learning*” vizsgálatok végzésére, amelyekkel komplex, többszintű osztályozási problémák is megoldhatók. Szárazon pácolt sonkák érési idejének vizsgálatára alkalmaztak mesterséges neurális hálózat alapú modellt Prevolnik és munkatársai. Közeli infravörös spektroszkópiai adatokat felhasználva 79,7 % pontossággal tudták meghatározni az ismeretlen minták érlelési idejét (Prevolnik et al. 2014). Az egyes osztályozási eljárások főbb előnyeit és hátrányait Gere és munkatársai foglalták össze táblázatos formában (Gere et al. 2016).

Dimenziócsökkentő eljárások alkalmazása akkor javasolt, amikor nagyszámú, egymással erősen korreláló változó szerepel az adathalmazban. A korrelált változók közül előállított, nagy információtartalmú, korrelálatlan fő változók előállításával pontosabb modellek, jobb vizualizáció és hatékonyabb csoportosítás érhető el. A dimenziócsökkentő eljárások egyik legismertebb módszere a főkomponens elemzés, amelynek segítségével az erősen korreláló változók lineáris transzformációjával olyan mesterséges (hipotetikus), egymástól független változók (főkomponensek) állíthatók elő, amelyek lényeges információvesztés nélkül biztosítják a változók függetlenségét. A magyarázóváltozók sorrendjétől függetlenül, a főkomponensek szórása, azaz információtartalma rendre csökken. Az egyes főkomponensek információtartalmát megkaphatjuk a magyarázóváltozók korrelációs mátrixából kiszámítható sajátértékként. Mivel általában néhány főkomponens már jól jellemzi a mintában rejlő információt, a többi elhanyagolható, számuk csökkenthető. Ekkor hasznos lehet a faktorsúlyok ortogonális transzformációja, amely a koordináta-rendszer rotációját jelenti. Ez megkönnyíti a faktorok felismerését. A transzformáció sokféleképpen elvégezhető, különböző kritériumoknak eleget tevő módszerek léteznek. Legáltalánosabban alkalmazott a varimax, amely a kvadratikus faktorsúlyok szórásnégyzetét maximalizálja. A faktoranalízis alkalmazásának akkor van

értelme, ha a változók redundáns módon tartalmazzák információt, és mögöttük egy látens struktúra húzódik meg. A Bartlett-féle teszt és a Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) mutató segítségével vizsgálhatjuk a főkomponens elemzés feltételeit. A Bartlett-féle próba azt vizsgálja, hogy a változók korrelációs mátrixa mennyire hasonlít egy egységmátrixhoz, vagyis a változók páronként korrelálatlanok-e. A teszt egy  $\chi^2$ -próba, aminek nullhipotézise a korrelációs mátrix és az egységmátrix egyezősége. A Kaiser-Meyer-Olkin mutatószám (0 és 1 közé eső érték) az adatok összefüggő voltának, a korreláltság vizsgálatának módszere. Ha ez a mutatószám 0,8-nál nagyobb, akkor ajánlott, ha ez a mutatószám viszont 0,5-nél kisebb, akkor nem ajánlott a főkomponens elemzés végrehajtása (Ketskeméty et al. 2011). A főkomponens elemzés széles körben alkalmazott technika, jártassági vizsgálatokban (Škrbić et al. 2013), elektronikus nyelv mérések értékelésénél (Sipos et al. 2013), preferencia-térképezésben (Gere et al. 2014), vagy fűszernövények vizsgálatánál (Bernhardt et al. 2015). Egy frissebb kutatásban koreai kimcsi metabolomikai változásait vizsgálták. Főkomponens elemzés segítségével GC-MS vizsgálatok eredményeit értékelve mutatták be a különböző starterkultúrák közötti hasonlóságokat és különbségeket (Park et al. 2016). *Agaricus bisporus* gombák különböző szárítási eljárásainak vizsgálatára alkalmazták a főkomponens elemzést Pei és munkatársai. Elemzésük során a GC-MS és elektronikus orr műszerek adatait értékelték ki a módszer segítségével. Az elektronikus orr adatain futtatott főkomponens elemzés segítségével derítették fel a szárítási módszerek közötti hasonlóságokat és különbségeket (Pei et al. 2016).

A regresszióelemzés során egy vagy több „független” (magyarázó) és egy függő változó közötti független kapcsolat keresése a cél. Regressziószámítás során két vagy több véletlen változó között fennálló kapcsolatot lehet modellezni, valamint több jellemző által az eredményváltozóra gyakorolt hatását lehet vizsgálni. A regressziós egyenletben a magyarázandó vagy más néven célváltozót (Y)-t a magyarázó változók vagy regresszorok (X) mint független változók magyarázzák. A regressziós modellek szerkesztésekor a legelső feladat azoknak a változóknak a megkeresése, amelyek az eredményváltozóval szignifikáns kapcsolatban állnak. Az eljárás arra ad választ, hogy a független változók egységnyi változása, a függő változó milyen mérvű megváltozását vonhatja maga után. A regressziós egyenlet fontos része a maradék vagy más néven reziduum (modell által nem magyarázott rész). A regressziós módszerek feltételeinek ellenőrzése során a kérdés az, hogy a regresszióra futtatott varianciaanalízis és az egyes regressziós paraméterek ( $\beta$ ) szignifikánsak-e, illetve hogy a determinációs együttható ( $R^2$ ) értéke kellően magas-e. A reziduumok normalitásának vizsgálatával ellenőrizhető, hogy az előrejelzések során a modell torzít-e (Sajtos és Mitev 2007). A többváltozós lineáris regresszió kemometriai alkalmazása során a túlillesztés problémája jelentkezhet olyan esetekben, amikor több változóval, mint esettel kell modelleket építeni. Ilyen esetekben a

modellek nagyon jól illeszkednek a tanuló adatokra, azonban a validálás során új adatokon történő futtatáskor gyenge eredményt adnak. A probléma megoldására fejlesztették ki a parciális legkisebb négyzetek elvén alapuló regresszió módszerét (*partial least square regression model*, PLS-R), amely a többváltozós lineáris regresszió kiterjesztésének is tekinthető. A PLS-R módszerrel a regressziós egyenlet együtthatóit úgy becsüljük, hogy a megfigyelésekből származó és a regressziófüggvény alapján becsült függő változó értékek különbségének eltérés-négyzetösszege a legkisebb. Ezáltal a kapott együtthatók nem valódi mért adatok együtthatói, azok ugyanis nem ismertek. Az együtthatókból a regressziós egyenlet segítségével kiszámíthatók az eredeti adatok, vagyis megadható, hogy az ismert független változóhoz milyen függő változó értékek tartoznak (Adams 1995). Az eredmények értelmezése során a kérdés szintén az, hogy az egyes regressziós paraméterek ( $\beta$ ) szignifikánsak-e, illetve hogy a determinációs együttható ( $R^2$ ) értéke kellően magas-e. Az átlagos négyzetes hiba gyöke számítható a kalibrációs és a predikációs adathalmazra is, melyeket RMSEC (*root mean square error of calibration*) és RMSEP (*root mean square error of prediction*) rövidítésekkel jelölnék. Ezek az értékek valójában azt adják meg, hogy mekkora hibával terhelt az elkészült modell. A regressziós módszerek alkalmazási területe igen széleskörű az érzékszervi termékfejlesztéstől (Gere et al. 2015), az elektronikus nyelv adatok feldolgozásáig (Várvölgyi et al. 2014; Szöllősi et al. 2012)

A nagyműszeres analitikai kémiai mérések eredményei alapján történő minta-összehasonlítás és minta-elkülönítés a legtöbb esetben időigényes folyamat. A legelterjedtebb módszer a dekonvolúciós algoritmusokkal történő elemzés és a tömegspektrumok elemzése különböző spektrumtisztító módszerek alkalmazásával. A minták összehasonlítása csak azután tehető meg, hogy az egyes komponensek különböző referencia standardokkal történő azonosítása megvalósult (Radványi et al. 2015). Az elemzési idő úgy redukálható egy kiértékelési folyamat során, ha csupán a nyers kromatogramokkal dolgozunk, mindenféle feldolgozási műveletet kihagyva (dekonvolúció, csúcs alatti területek integrációja, azonosítás, stb.). Varmuza és munkatársai mutatták be az azonosság elemzést (*similarity analysis*, SA), amelyben különböző infravörös spektrumokat hasonlítottak össze hasonlósági mértékeket felhasználva (Varmuza et al. 2003). Egy szintén egyszerű, de hatékony módszer egy referencia minta és egy mért minta kromatogramjai közötti korrelációs koefficiens és/vagy szögkoszinusz értékeinek számítása (Tang et al. 2010; Wei et al. 2010; Jin et al. 2008).

Az SA mellett a klaszter elemzés módszerét (*cluster analysis*, CA) is széles körben alkalmazzák kromatogramok összehasonlítására. A CA a minták közötti kapcsolatot távolságokban (*distance*, D) adja meg, amely valójában az SA során használt azonossági mértékek (korrelációs koefficiens  $(r)$ ) inverze, ám ezek tartománya eltérő:  $-1 < r < +1$ , míg  $0 < D < +\infty$ . A CA

algoritmusával mintázatok kereshetők, csoportok és kiugró értékek azonosíthatók. Az eredmények dendrogramokban ábrázolhatók, amelyek megkönnyítik az eredmények értelmezését (Yudthavorasit et al. 2014). További többváltozós statisztikai módszerek (pl.: főkomponens elemzés, lineáris diszkriminancia elemzés, stb.) alkalmazására is található példa a kapcsolt analitikai rendszerekkel foglalkozó nemzetközi szakirodalomban, ahol a mért adatok alapján el tudták különíteni a mintákat (Berrueta et al. 2007).

Egy másik megközelítés alapján azonban a kromatogramok felfoghatók idősorokként is, mivel az adatpontok rögzítése adott, egyenlő hosszúságú időpillanatokban történik. A kromatogramok ezen tulajdonságát Felinger 2011-ben alkalmazta úgy, hogy a kromatogramokon Fourier transzformációt hajtott végre (Finger 2011). A detrendelt fluktuáció elemzés (*detrended fluctuation analysis*, DFA) módszere széles körben alkalmazott idősorelemzési módszer. Az elmúlt néhány évben sikeresen alkalmazták szívritmus elemzésre (Yeh et al. 2009), *Austrocedrus Chilensis* évgyűrűinek elemzésére (Telesca és Lovallo 2010) és szarvasgomba ízesítésű olaj minták elektronikus orr eredményeinek értékelésére. A DFA nem minden esetben adott kielégítő eredményeket, így a szarvasgombás ízesítésű olajok esetében Pacioni és munkatársai további többváltozós statisztikai módszerekkel kombinálták az eljárást (Pacioni et al. 2014).



### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori dolgozatomban **1)** a gombakomposztot károsító penészek illékony anyagcseremarkereinek feltárását, **2)** a gombatermesztésben leginkább kártékony zöldpenész (*Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*) különböző szénhidrátforrású tápagon történő vizsgálatát és **3)** gyors statisztikai elkülönítési technika kidolgozását tűztem ki célul.

#### **1. A gombatermesztésben kártékony penészek illékony anyagcseremarkereinek detektálására és monitorozására alkalmas módszer fejlesztése során főbb célkitűzéseim a következők voltak:**

- Gyors analitikai módszer kidolgozása *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* illékony komponenseinek detektálására; megfelelően alkalmazható retenciós idő standardok kiválasztása és alkalmazhatóságának kidolgozása.
- A kidolgozott módszer alkalmazásával a gombatermesztésben előforduló kártékony penészek illékony anyagcseremarkereinek (MVOC) meghatározása és monitorozása, valamint a mikroorganizmusok „életkorának” becslése a kibocsátott MVOC vegyületek alapján.
- Az egyes kártékony penészek többváltozós statisztikai módszerekkel történő megerősítő elkülönítése.

#### **2. *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* különböző szénhidrátforrású tápagon történő vizsgálata során főbb célkitűzéseim voltak:**

- A *T. aggressivum* MVOC mintázatának feltérképezése, valamint növekedésének vizsgálata különböző tápagonokon.
- A *T. aggressivum* illékony anyagcseremarkereinek meghatározása és azonosítása különféle tápagonokon, valamint megfelelő kiértékelő eljárás kidolgozása a különböző intenzitás értékkel rendelkező komponensek minél pontosabb azonosítására.
- A komposztos tápagar összetételének módosítása további marker vegyületek fellelése érdekében.

#### **3. A gombatermesztésben kártékony penészek elkülönítési lehetőségeinek vizsgálata során főbb célkitűzéseim voltak:**

- Kemometriai eljárások alkalmazása (DFA, PCA, CA) a vizsgált kártékony penészek egymástól való elkülönítésére, amelyek használatával kiválthatók a hagyományos, sokszor időigényes kiértékelési eljárások.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

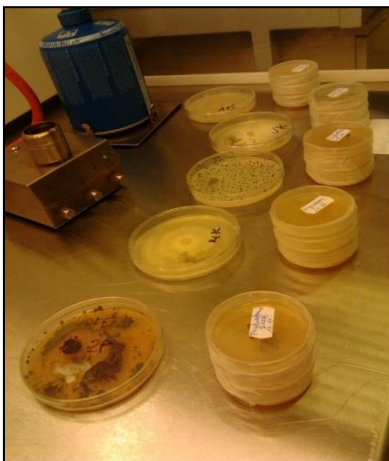
### 4.1. Az ötödik fejezetben felhasznált anyagok és módszerek

#### 4.1.1. Mikroorganizmusok

A gombatermesztésben kártékony penészgombák közül a *Mycogone perniciososa* (nedves mólé betegség), a *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, másnéven *Lecanicillium fungicola* (száraz mólé betegség), valamint a *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (zöld penész betegség) és *Trichoderma* DOFE (zöld penész betegség, pontos faja nem ismert, természetnél izolált) mikroorganizmusokat vizsgáltam. Kísérleteim során a kétspórás csiperkegombát (*Agaricus bisporus* A15) szintén megvizsgáltam annak érdekében, hogy összehasonlítsam a csiperkegomba és a csiperkét fertőző penészek illékony szerves vegyületeit. A mikroorganizmusokat a Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Karának, Zöldség- és Gombatermesztési Tanszéke bocsátotta rendelkezésemre.

#### 4.1.2. Tápagar

A csiperkegomba és a penész minták minden kísérletben öt napos szilárd tenyészetek voltak, amelyeket egy gyári (Scharlau S.L.) PDA (*potato-dextrose agar*, burgonya-dextróz agar, 39 g/L koncentrációban) tápagar felületére oltottam át kisméretű steril Petri csészékbe steril fülke alatt, steril oltókacs használatával. A tápagar burgonya-peptont (4 g/L), glükózt (20 g/L) és agart (15 g/L) tartalmazott. A szilárd tenyészetekből kb. 8 mm átmérőjű lyukakat vágtam ki, amelyeket áthelyeztem egy újabb, addig még nem használt PDA tápagar közepére, majd a PDA tápagart tartalmazó Petri csészéket lezártam, ahogy a 14. ábra is mutatja. Mindegyik tenyészetből három-három párhuzamos leoltást készítettem.



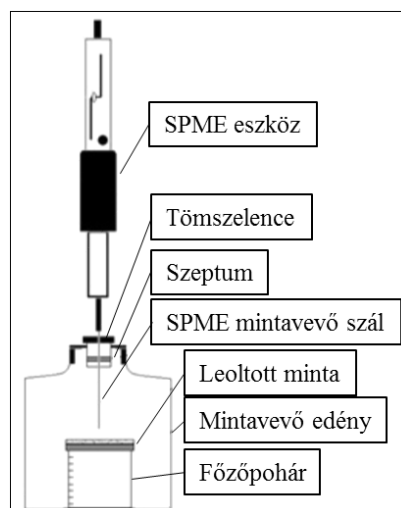
**14.ábra:** Az öt különböző tenyészet és a három párhuzamos leoltás (**Forrás:** saját fotó)

Az elkészített leoltásokat ezután steril fülke alatt felnyitottam majd fedél nélkül egy 0,5 L térfogatú mintavevő edénybe helyeztem, amelyet azonnal lezártam. A leoltás napját tekintettem a kísérleti sorozat nulladik napjának, majd Börjesson és munkatársai kutatását véve alapul 15 napon keresztül (1. nap, 2. nap, 3. nap, 4. nap, 7. nap, 8. nap, 10. nap, 11. nap, 14. nap és 15. nap) vizsgáltam a penészek és a csiperkegomba által kibocsátott illékony anyagcseremarkereket (Börjesson et al. 1989).

#### 4.1.3. SPME mintavétel

A mintavétel során SPME mintavételi technikát alkalmaztam, amely képes a légtérben lévő illékony és fél-illékony komponensek megkötésére. Az illékony vegyületek kinyerésére három különböző SPME szálát használtam, 100  $\mu\text{m}$  PDMS (*polydimethylsiloxane*), 65  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB (*polydimethylsiloxane/divinylbenzene*) és 85  $\mu\text{m}$  PA (*polyacrylate*) (Supelco, Bellafonte) szálakat. Méréseim megkezdése előtt mindegyik szálát a gyártó által előírt módon kondicionáltam.

A PDA táptalajra leoltott mintákat egy 0,5 L térfogatú mintavevő edénybe helyeztem egy kisebb méretű főzőpohár tetejére, majd légmentesen lezártam a mintavevő edény tetejét. A kísérleti elrendezés a 15. ábrán látható.



**15. ábra:** A mintavétel sematikus ábrája

A mintatartó üvegek kupakjait átfürtam és tömszelence segítségével rögzítettem rá a szeptumot, amelyen keresztül a SPME mintavételt végrehajtottam. A mintákat minden esetben 23 °C-on tároltam. Az SPME mintavétel ideje 15 perc volt, a gázkromatográf injektorában a deszorpció 250 °C-on 4 percig zajlott.

#### 4.1.4. Retenciós idő standardok

A retenciós idők kézbentartásához különböző alkán standardokat, n-heptánt (C7: C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>), n-nonánt (C9: C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>), tetradekánt (C14: C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>), pentadekánt (C15: C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>) és heptadekánt (C17: C<sub>17</sub>H<sub>36</sub>) (Sigma-Aldrich) alkalmaztam a kísérleteim során.

#### 4.1.5. Mérési paraméterek

A méréseket Agilent 6890 típusú gázkromatográf és 5975 C MSD típusú tömegspektrométer kapcsolt technikával végeztem el. Vivőgázként 6.0 (99,9999% tisztaságú) hidrogént használtam. A hidrogén áramlási sebessége 1,2 ml/perc volt. Az elválasztást HP-5MS kapilláris oszloppal (30,0 m x 250 μm x 0,25 μm, Agilent Technologies) végeztem, amelynek összetétele 5% fenil és 95% metilpolisziloxán. A fűtési program paramétereit optimalizáltam, az optimált fűtési program a következők szerint alakult:

Az oszlop kezdeti hőmérséklete 50 °C volt. A fűtési program során 20 °C/perc sebességgel emeltem a kolonnatér hőmérsékletét 150 °C-ra, majd 40 °C/perc sebességgel 170 °C-ra. Ezt követően 25 °C/perc sebességgel nőtt a hőmérséklet 190 °C-ra, ahonnan 40 °C/perc sebességgel fűtöttem az

oszlopot 280 °C-ra, végül 50 °C/perc sebességgel 300°C-ra. Ezen a hőmérsékleten 2 percig tartottam a rendszert annak érdekében, hogy az oszlopról minden komponenst lefűtsek a következő mérés előtt.

Az injektálás splitless üzemmódban történt, az inlet hőmérséklete 250 °C volt.

A tömegspektrométerben minden mérés esetén 230 °C volt az ionforrás hőmérséklete, míg a kvadrupól hőmérséklete 150 °C volt. EI ionforrást használtam pozitív üzemmódban, ahol a molekulákat 70 eV-os kinetikus energiával rendelkező elektronokkal ütköztettem. A tömegspektrométert naponta finomhangoltam (*tune-oltam*) perfluortributil-aminnal (PFTBA). A gázkromatográfot és tömegspektrométert összekötő úgynevezett *transfer line* hőmérsékletét 300 °C-ra állítottam be (ez megegyezik az oszlop véghőmérsékletével). A vizsgált m/z (töltésegységre eső tömeg) tartomány 33-500 m/z közé esett.

Agilent Enhanced MSD ChemStation szoftvert használtam a GC-MS kapcsolt rendszer paramétereinek vezérlésére. Agilent Enhanced Data Analysis és Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.06.00 szoftvereket használtam a komponensek kereséséhez, a tömegspektrumok elemzéséhez és az adatok további kiértékeléséhez, valamint a kromatogramok teljes körű összehasonlításához. A kromatográfias csúcsok, azaz a kapott komponensek azonosítását a NIST Mass Spectral Search (NIST/EPA/NIH/ Mass Spectral Library, Version 2.0.) tömegspektrum könyvtárral hajtottam végre. Az ismeretlen spektrum azonosítása során minden egyes spektrumhoz hozzárendelhető egy találati érték, amely az ismeretlen és az ismert spektrum hasonlóságát jellemzi százalékban kifejezve. Általános útmutatásként a 90,0 %, vagy ennél nagyobb érték kiváló egyezést, a 80,0-90,0 % jó egyezést, míg a 70,0-80,0 % egy méltányos egyezést jelent. A kevesebb, mint 60,0 % szegényes egyezést mutat. Az azonosítás során kapott komponensek neveit a NIST könyvtár alapján angolul tüntettem fel a teljes dolgozatban, az ismeretlen komponenseket pedig egységesen „*unknown*”-nak neveztem el.

Főkomponens elemzést, lineáris diszkriminancia elemzést és parciális legkisebb négyzetek elvén alapuló regressziót használtam a mikrobák leoltástól eltelt napjai szerinti elkülönítéshez és a közös komponensek statisztikai vizsgálatához XL-Stat statisztikai programcsomag MX modulja segítségével (Wehrens 2011).

## 4.2. A hatodik fejezetben felhasznált anyagok és módszerek

### 4.2.1. Mikroorganizmusok

A hatodik fejezet mérései során *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* zöldpenészfaj spóraszuszpenzióját ( $2,4 \cdot 10^8$  spóra/500  $\mu$ L) használtam. A spóraszuszpenzió előállítását, a spórák leszámolását, valamint a penész leoltását a Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Karának Zöldség- és Gombatermesztési Tanszékén végeztem el. Az előzetesen leoltott penész megfelelő inkubációja után a kifejlődött telepekből leszűreteltem a spórákat, amelyeket steril desztillált vízbe kevertem. A kapott szuszpenzió spóratartalmát Bürker-kamrával ellenőriztem mikroszkóp alatt.

### 4.2.2. Tápagarok

A zöldpenészt négy különböző tápagarra oltottam le, amely tápagarokat szintén a Zöldség- és Gombatermesztési Tanszéken állítottam elő. A zöldpenész vizsgálata során a mikrobát MEA (*malt extract agar*, malátakivonatos agar), PDA (*potato-dextrose agar*, burgonya dextróz agar), KA (komposzt agar), valamint tápanyagban szegény VA (víz agar) felületére oltottam le. Kísérleteim második részéhez a szárított gombakomposzt alapú tápagart (KA) módosítottam, nevezetesen különböző szénhidrátokkal (dextróz, maltóz, mannit) dúsítottam. A tápagarokat a 3. táblázatban található recept alapján készítettem el.

**3. táblázat:** Tápagarok összetétele 500 mL agar elkészítéséhez. MEA (malt-extract agar, malátakivonatos agar), PDA (potato-dextrose agar, burgonya dextróz agar)

Név	Alapanyag		Bakterológiai agar (Biolab)	Desztillált víz
<b>MEA</b>	7,502 g maláta extrakt (Biolab)		8,008 g	500 mL
<b>PDA</b>	19,504 g PDA agar (Biolab)			500 mL
<b>Komposzt agar</b>	5,003 g szárított gombakomposzt		8,007 g	500 mL
<b>Víz agar</b>	-		8,007 g	500 mL
<b>Komposzt agar dextrózzal</b>	5,010 g szárított komposzt	1,015 g dextróz	8,010 g	500 mL
<b>Komposzt agar maltózzal</b>	5,030 g szárított komposzt	1,020 g maltóz	8,000 g	500 mL
<b>Komposzt agar mannittal</b>	5,020 g szárított komposzt	1,015 g mannit	8,040 g	500 mL

A por alapú alapanyagokat desztillált vízzel kevertem össze, majd autoklávoztam a megfelelő sterilitás elérése érdekében. A komposzt agar előállításához a Biofungi Kft. által biztosított II. fázisú

gombakomposztot szárítószekrényben szárítottam tömegállandóságig 80 °C-on, majd finom porrá daráltam.

Az elkészült csíráltatott, de még folyékony tápagarokból steril fülke alatt 5 mL mennyiséget 20 mL-es előzetesen szintén autoklávozott, sterilizált HS (*headspace*) üvegcsékbe mértem, majd hagytam ferde agarrá szilárdulni őket, ahogy a 16. ábra mutatja. Ezt követően 500 µl mennyiségű spóraszuszpenziót ( $2,4 \cdot 10^8$  spóra/500 µL) pipettáztam a tápagarok felületére, majd szeptummal légmentesen lezártam az üvegcséket. A méréseket táptalajonként három párhuzamosban, valamint kontroll (tápagar penész leoltás nélkül) minta vizsgálatával végeztem. Tápagaronként egy negyedik párhuzamos leoltást is készítettem, amelyeket mindössze egyszer, az utolsó napon mértem le.



**16. ábra:** Táptalajok a kiöntést követően, steril fülke alatt (**Forrás:** saját fotó)

#### 4.2.3. SPME mintavétel

A leoltást követően hét napon keresztül monitoroztam a zöldpenész által kibocsátott illékony anyagcseremarkereket. A leoltás napját a kísérlet nulladik napjának tekintettem, amelyen szintén elvégeztem a méréseket, majd minden nap megmértem az emittált illékony vegyületeket.

Korábbi méréseim, valamint Stoppacher és munkatársainak mérései alapján a minta feletti gőztér extrakciójához 65 µm Stable Flex™ PDMS/DVB szálát (Supelco, Bellafonte) választottam (Stoppacher et al. 2010), mivel ezzel a mintavevő szállal tudtam a legtöbb illékony vegyületet megkötni. A mintavételt 24 °C-on 15 percig végeztem (17. ábra) a tápagaronkénti három párhuzamos leoltás esetében.



**17. ábra:** HS-SPME mintavétel víz agarra oltott zöldpenész esetén (leoltástól eltelt 7. napon)

(**Forrás:** saját fotó)

A méréseket táptalajonként három párhuzamosban, valamint kontroll (tápagar penész leoltás nélkül) minta vizsgálatával végeztem. A teljes vizsgálati időszak alatt az üvegcséket enyhén dőlt helyzetben tároltam annak érdekében, hogy az üveg alján összegyűlt szuszpenzióból kiindulva a zöldpenész egyenletes micélium gyepet tudjon képezni (melléklet 2.1. ábra).

A mintavételt követően a megkötött illékony komponensek a SPME szálról közvetlenül a GC injektorába kerültek a 4 perces 250 °C-on történő deszorpció során. A tápagaronkénti negyedik párhuzamos leoltást egyszer, az utolsó napon mértem, hosszabb (60 perc) mintavételi idővel.

#### 4.2.4. Mérési paraméterek

A mérésekhez Agilent 6890 gázkromatográfot és 5975 C MSD tömegspektrométert használtam. A beállított GC-MS paraméterek megegyeznek a 4.1.5. fejezetben leírt mérési paraméterekkel. A kromatogramok teljeskörű kiértékeléséhez (dekonvolúció, háttérkorrekció, integrálás) Agilent Enhanced Data Analysis és Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.06.00 szoftvereket használtam, az egyes komponensek azonosításában NIST (NIST 2011, Wiley 10<sup>th</sup> edition) tömegspektrum könyvtár volt segítségemre.



### **4.3. A hetedik fejezetben felhasznált anyagok és módszerek**

#### **4.3.1. Minták**

Vizsgálataimhoz *Agaricus bisporus* A15 kétspórás csiperkegombát és annak két fő fertőző penészét (*M. perniciosus* és *T. aggressivum*) választottam ki. Az alkalmazott statisztikai módszer tesztelése érdekében olyan mintákat is bevontam a vizsgálatokba, amelyek nagymértékben eltérnek a vizsgálni kívánt mintáktól (*outlier*, kiugró minták): kereskedelmi forgalomban kapható vörösbor (Sauska Siller, Villány/2011), illetve gombakomposzt (Biofungi Kft.).

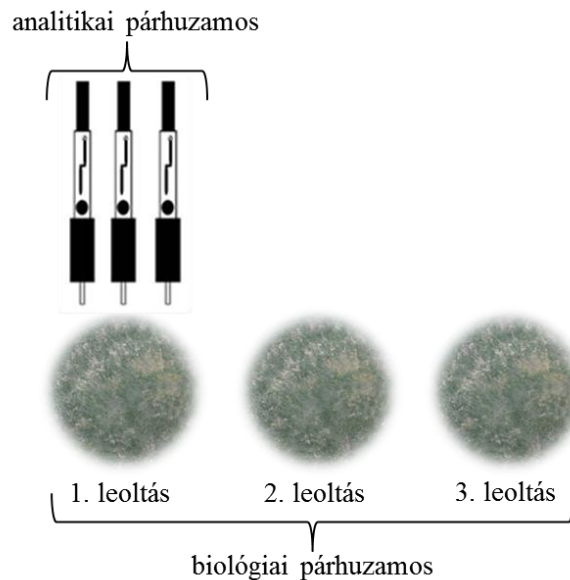
#### **4.3.2. Tápagar**

A penészgomba is és a csiperkegomba is minden kísérletben öt napos szilárd tenyészetek voltak, amelyeket egy gyári PDA tápagar felületére oltottam át kisméretű Petri csészékbe steril fülke alatt, steril oltókacs használatával. A szilárd tenyészetekből kb. 8 mm átmérőjű lyukakat vágtam, melyeket áthelyeztem egy új, steril PDA tápagar közepére. A Petri csészékre oltott mintákat ezután külön-külön egy 0,5 L űrtartalmú mintavevő edényekbe helyeztem, majd lezártam azokat. Korábbi méréseim során igazoltam, hogy ezen minták esetén már a harmadik napon megjelennek a vizsgálni kívánt marker vegyületek (Radványi et al. 2015), így a harmadik napon történt a mintavételezés három párhuzamos mérésben.

#### **4.3.3. SPME mintavétel**

A mikroorganizmus és a kiugró minták feletti légtér mintázásához 65  $\mu\text{m}$  Stable Flex™ PDMS/DVB SPME (Supelco, Bellafonte) szálát használtam, amelyet a mérések megkezdése előtt a gyártó javaslata alapján kondicionáltam (250 °C-on 0,5 óráig). Első lépésben a SPME szálát 0,5 L zárt légtérű üres mintavevő edénybe helyeztem, háttér kromatogram felvétele céljából. A Petri csészékre oltott mikroorganizmust ugyanilyen 0,5 L-es mintavevő edénybe helyeztem külön-külön. Lezártam a felettük lévő légtérrel, majd három nap elteltével megvizsgáltam a kibocsátott szerves illékony vegyületeket. A kiugró minták vizsgálata során 0,3 L vörösbort és 0,1 kg gombakomposztot tettem a mintavevő edényekbe, majd az edények lezárása után egy nap elteltével végeztem el a mintavételt. A mintavétel során az extrakciós idő 15 perc volt szobahőmérsékleten.

A vizsgálat során nem csak analitikai, hanem biológiai párhuzamosokat is mértem az egyes organizmusokból, azaz amellett hogy egy leoltást több párhuzamosban is megmértem, ugyanazon penész több párhuzamos leoltását is megvizsgáltam, ahogy azt a 18. ábra is mutatja.



**18. ábra:** Az analitikai és biológiai párhuzamos mérések szemléltetése

#### 4.3.4. Mérési paraméterek

A 4.1.5. fejezetben ismertetett mérési paramétereket használtam az idősoelemzés során a vizsgált minták méréséhez is. A kiértékeléshez a 4.1.5. fejezetben említett szoftvereken felül a „csúsztatott ablakos” DFA (*deternded fluctuation analysis*, detrendelt fluktuáció elemzés) futtatásához a Physionet statisztikai szoftvert használtam, a további számításokat az R-project 3.0.2 verzióján a stats és a cluster csomagokkal végeztem el.

**5. EREDMÉNYEK. MÓDSZERFEJLESZTÉS A GOMBATERMESZTÉSBEN  
KÁRTÉKONY PENÉSZEK ILLÉKONY ANYAGCSEREMARKEREINEK  
DETEKTÁLÁSÁRA ÉS MONITOROZÁSÁRA**

Közlés:

Radványi D., Gere A., Jókai Zs., Fodor P. 2015. Rapid evaluation technique to differentiate mushroom disease-related moulds by detecting microbial volatile organic compounds using HS-SPME-GC-MS. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY*, 407(2), pp.537–545.

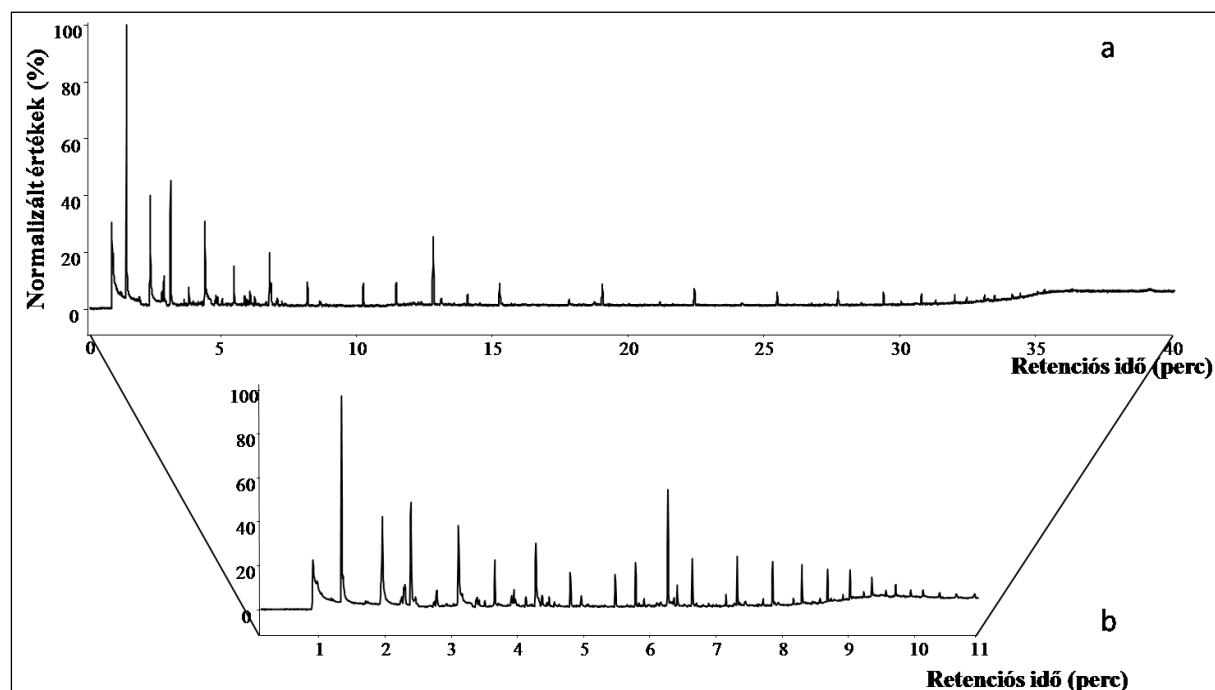
DOI 10.1007/s00216-014-8302-x (IF: 3,436)

## 5.1. HS-SPME-GC-MS módszer fejlesztése gombatermesztésben kártékony penészek jelenlétének indikálására

### 5.1.1. A kromatográfiás módszer kidolgozása

A kromatográfiás elválasztás optimalizálása során *Trichoderma aggressivum f. europaeum* penésszel végeztem a kísérleteket, mivel ez a fajta zöldsépenész okozza a legnagyobb problémát a gombakomposzt gyártásánál, illetve képes megfertőzni a már kinőtt kalapos csiperkét is.

Kezdetben egy 40 perces kromatogramot vettem fel (19. ábra a), amelyen megvizsgáltam mely vegyületek, milyen retenciós időnél érkeznek; valamint melyek azok a szakaszok, ahol ritkább az elúció, ezáltal lehet gyorsítani az elválasztáson. A kiindulási kromatogram felvétele során a hidrogén áramlási sebességét állandó 1 mL/perc értékre állítottam be. Fokozatosan gyorsítva a fűtési programot, lerövidítettem azokat a szakaszokat, ahol nem eluálódott vegyület, ezzel szemben megnyújtottam azokat a szakaszokat, ahol koelúció volt tapasztalható (19. ábra b).



**19. ábra:** a) *T. aggressivum* 40 perces TIC kromatogramja, b) *T. aggressivum* 11 perces TIC kromatogramja (TIC: total ion chromatogram, teljes ionáram kromatogram)

A 19. ábra a) részén látható, hogy a kromatogram elején sűrűn, rövid időközökkel jönnek a komponensek. A 10. perctől jóval ritkábban érkeznek vegyületek, míg a 35. perc után szinte alig detektálható komponens. A felfűtési sebesség lassításával a sűrűn egymást követő csúcsok jobban

elválaszthatók a kromatogramon, míg a felfűtési sebesség gyorsításával „sűrűbben” eluálódnak a vegyületek. Fontos azonban, hogy a felfűtés sebessége addig növelhető, amíg az adott méréshez szükséges minimális felbontóképesség megmarad. A fűtési program optimalizálása során a 4. táblázatban látható felfűtési programhoz, azaz hőmérsékletgrádienshez jutottam.

**4. táblázat:** Kromatográfias elválasztás fejlesztése során kapott 10,95 (~11) perces hőmérsékletgrádiens program

Felfűtési sebesség (°C/ perc)	Hőmérséklet (°C)	Hőntartás (perc)	Futtatási idő (perc)
-	50	0	0
20	150	0	5
40	170	0	5,5
25	190	0	6,3
40	280	0	8,55
50	300	2	<b>10,95</b>

A vivőgáz áramlási sebességét ezután 1,2 mL/percre módosítottam, mivel az áramlási sebesség növelése is gyorsabb elválasztást eredményez. Az így kapott 10,95 (~11) perces program a kezdeti elvárásoknak megfelelően alkalmassá tette a módszert a vizsgálandó minták illékony vegyületeinek, anyagcseretermékeinek megfelelő felbontású, gyors elválasztására.

#### 5.1.2. A SPME mintavétel optimalizálása

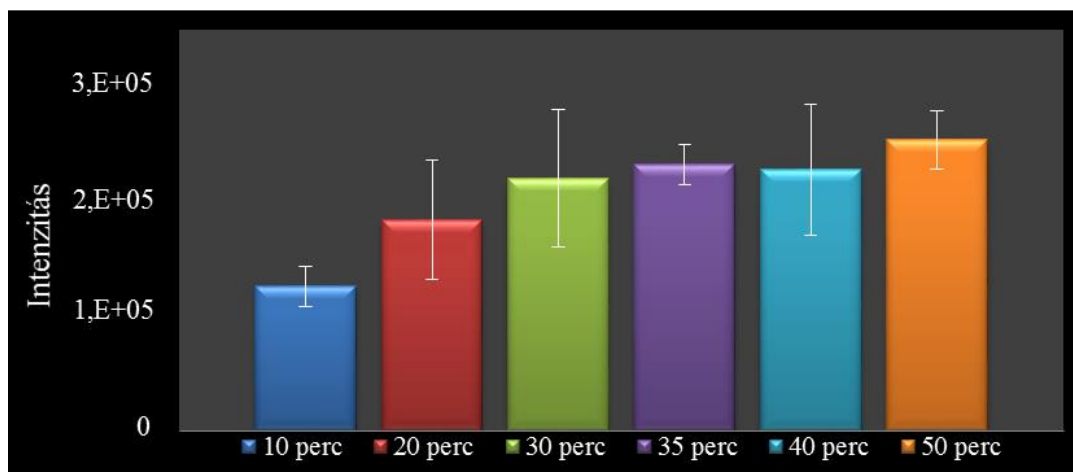
##### *SPME szál kiválasztása*

A mikroorganizmusok mintavételezése során három különböző SPME szálát vizsgáltam: 100 µm PDMS (*polydimethylsiloxane*), 65 µm PDMS/DVB (*polydimethylsiloxane/divinylbenzene*) és 85 µm PA (*polyacrylate*) SPME szálakat. A szál kiválasztása során a legfontosabb szempont a mintából származó illékony komponensek száma és azok intenzitása volt. A három SPME szál közül a Stable Flex™ 65 µm PDMS/DVB szál bizonyult a legalkalmasabbnak erre a feladatra, ennek alkalmazásával sikerült a legtöbb kiértékelésre alkalmas intenzitású vegyületet detektálnom. Az általam kapott eredményeket irodalmi adatok is alátámasztják (Kluger et al. 2013; Stoppacher et al. 2010). Érdemes azonban megjegyezni, hogy az ettől eltérő minták esetében ismét el kell végezni a szál kiválasztás optimalizálását, mivel nem biztos, hogy ez a SPME szál bizonyul a legjobbnak. A mérési sorozat előtt minden esetben kondicionáltam a szálakat a gyártó által megadott paraméterek szerint (100 µm PDMS: 250 °C-on 0,5 óra; 65 µm PDMS/DVB: 250 °C-on 0,5 óra; 85 µm PA: 280 °C-on 1 óra).

### SPME kinetika

A gőztéranalízis során két egyensúlyi rendszerrel kell számolnunk. Egyrészt egyensúly van a mátrixban kötött és a légtérben lévő illékony komponensek között, másrészt a légtérben lévő illékony komponensek és a SPME szálon kötött komponensek között. Az egyensúlyi állapot eléréséhez azonban sokszor hosszú időre van szükség, ami függ a komponens minőségétől, a légtér térfogatától, hőmérséklettől, stb. A következő lépésben ezért a SPME kinetika optimalizálását végeztem el, amely során meghatároztam az optimális extrakciós időt és hőmérsékletet.

Az optimális mintavételi idő meghatározásához *T. aggressivum* zöldpenészt használtam. A vizsgálat során a mintavétel idejét 10 és 50 perc között vizsgáltam a tíz legintenzívebb vegyület esetén, több párhuzamos mérésben. Méréseim eredményei alapján megállapítottam, hogy 30-40 perces mintavételi idő már elegendő valamennyi komponens esetén az egyensúlyi állapot eléréséhez a szál és a mintából érkező komponensek között. Munkám célja azonban egy gyors analízis kidolgozása volt, így rövidebb, 15 perces mintavételi időt alkalmaztam minden mérés során, hiszen a legtöbb illékony vegyület minőségi vizsgálata már 15 perc után is lehetővé válik (20. ábra).



**20. ábra:** SPME kinetika. Mintavételi idő optimalizálása 10 – 50 perc mintavételi idő között  
(6-pentyl-2H-pyran-2-one vegyület esetén, hátom párhuzamos mérés szórását feltüntetve)

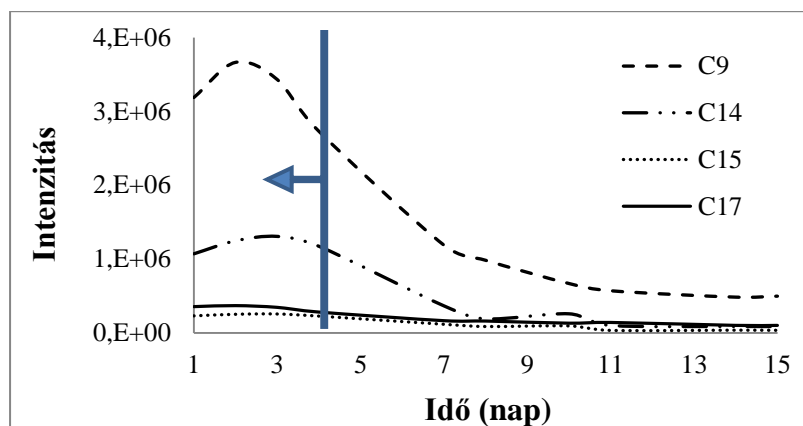
### 5.1.3. Retenciósi idő standardok használata

A minőségbiztosítási szempontokat szem előtt tartva, kezdetben a méréseim során retenciósi idő standardot is használtam a kromatogramok rögzítése érdekében. A Kovats-féle retenciósi index számítása során használatos alkán homológ sor tagjainak vizsgálatával (C7-C15 és C17) határoztam meg a megfelelő retenciósi idő standardokat. Miután megállapítottam az egyes standardok retenciósi idejét, kiválasztottam négyet közülük:

- n-nonán (C9:  $t_R=2,46$  perc,  $C_9H_{20}$ , Sigma-Aldrich),
- tetradekán (C14:  $t_R=5,91$  perc,  $C_{14}H_{30}$ , Sigma-Aldrich),
- pentadekán (C15:  $t_R=6,42$  perc,  $C_{15}H_{32}$ , Sigma-Aldrich),
- heptadekán (C17:  $t_R=7,25$  perc,  $C_{17}H_{36}$ , Sigma-Aldrich),

amelyek a kromatogram egy komponensekben „szegényebb” szakaszán eluálódtak. A mérések során standard mixet használtam (2  $\mu$ l C9, 50  $\mu$ l C14, C15 és 100  $\mu$ l C17) egy új, eddigi ismereteim szerint kevésbé használt módon. A mintavető rendszer memóriahatását kihasználva biztosítottam ugyanis a retenciósi idő standard jelet, így nem kellett a mintához hozzáadagolni külön a standardokat. Ezáltal elkerülhetővé vált a standard és a mikroorganizmusok között kialakuló esetleges interakció, amely során a mikrobák által termelt MVOC mintázat is változhat.

Első lépésben a standardokat kis fiolákba helyeztem, majd ezeket nagyobb, 0,5 L légterű mintatartóba tettem. Második lépésben a mintavételhez szükséges szeptumokat (Thermogreen® LB-2 Septa, 11 mm, Sigma-Aldrich) a kis fiolák mellé helyeztem a mintatartóba, végül a mintatartó edényt lezártam. 24 óra elteltével ezeket a szeptumokat használtam a mintavételhez, amelyek már biztosították számomra a kívánt retenciósi idő standardokat, azok memóriahatásának köszönhetően. Ez a technika a fent leírt módon retenciósi idő standard jelet biztosított a kromatogramon megközelítőleg 4 napig (21. ábra). Ezzel a módszerrel a manuális injektálás következtében esetlegesen előforduló retenciósi idő csúszások (amelyek inkább a kromatogram első pár percére jellemzők) ellenőrizhetők, korrigálhatók a megbízható eredmények elérése érdekében.



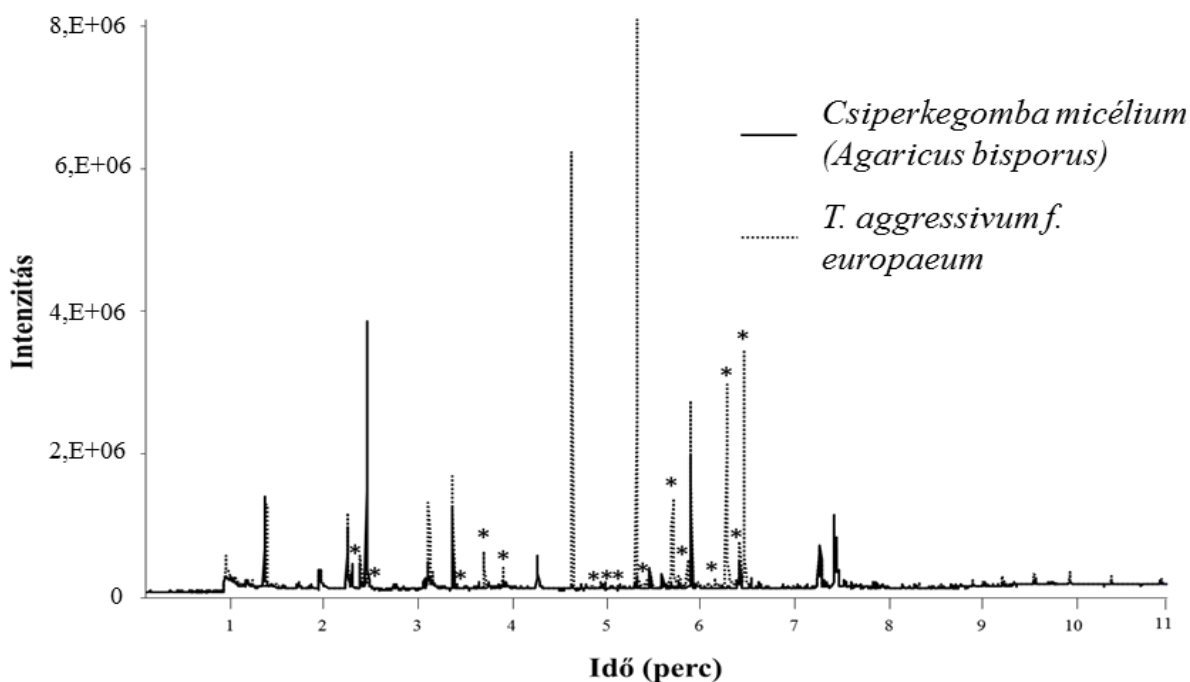
**21. ábra:** A mintavevő rendszer összegzett memóriahatása az eltelt idő függvényében.

C9: n-nonán ( $t_R=2,46$  min,  $C_9H_{20}$ ), C14: tetradekán ( $t_R=5,91$  min,  $C_{14}H_{30}$ ), C15: pentadekán ( $t_R=6,42$  min,  $C_{15}H_{32}$ ),  
C17: heptadekán ( $t_R=7,25$  min,  $C_{17}H_{36}$ )

## 5.2. Gombatermesztésben előforduló kártékony penészek illékony anyagcseremarkereinek meghatározása

A kidolgozott módszer alkalmazásával lehetővé vált a gombakomposzt előállításánál során előforduló kártékony mikroorganizmusok (*Trichoderma aggressivum*, *Mycogone perniciosus*, *Lecanicillium fungicola*) által kibocsátott illékony vegyületek feltérképezése, azonosítása. A továbbiakban fontos feladat volt meghatározni az egyes mikroorganizmusokra egyénileg jellemző, úgynevezett marker vegyületeket, amelyek egyértelműen azonosítják az adott mikrobát, ezáltal lehetőség nyílik arra, hogy viszonylag egyszerűen és gyorsan elkülöníthetők legyenek az egyes penészek egymástól, valamint a csiperkegomba micéliumától. A marker vegyületek meghatározása során az egyes penészek kromatogramjait összehasonlítottam egymással, majd a különbségeket kiértékeltem, összevettem minden kromatogram esetében. Erre mutat példát az 22. ábra, amelyen a csiperkegombának és azt leginkább fertőző zöldpenésznének összehasonlító kromatogramja látható.

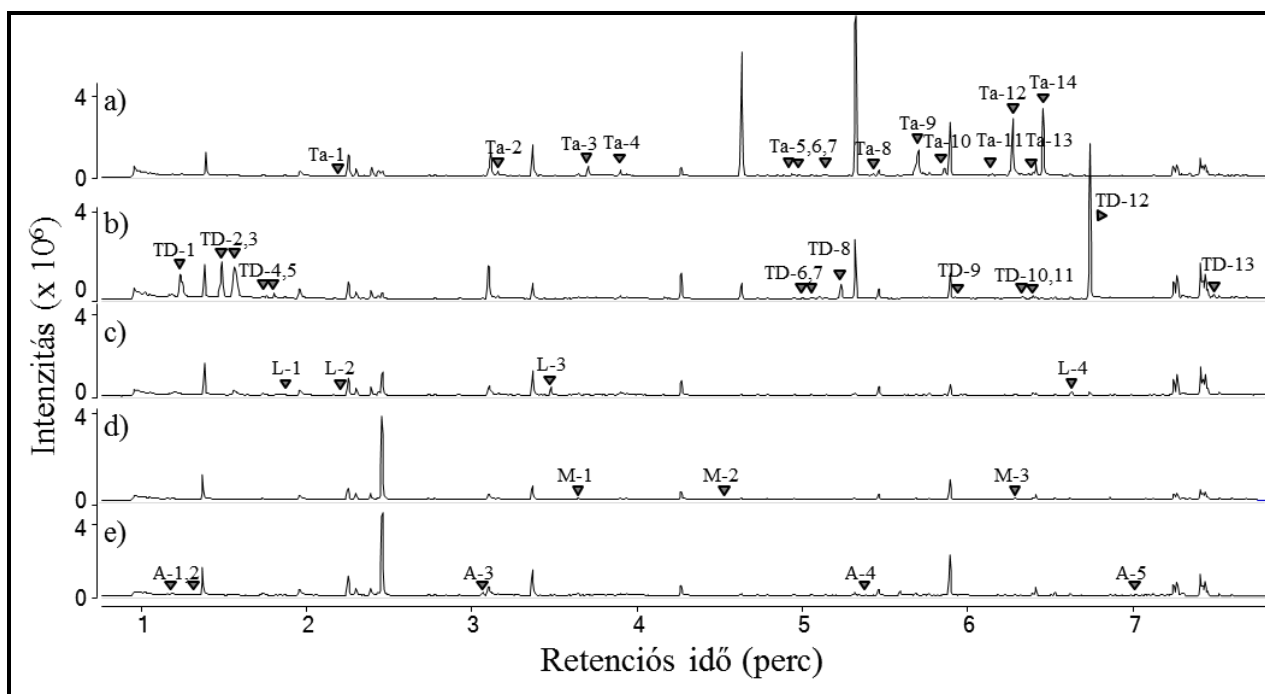




**22. ábra:** *T. aggressivum f. europaeum* és *A. bisporus* micélium illékony vegyületeinek összehasonlítása a teljes ion kromatogramok (TIC) egymásra fektetésével.

\* jelöli a *T. aggressivum f. europaeum* markervegyületeit

A marker vegyületek egyértelműen jellemzik az adott mikroorganizmust, így csak akkor jelennek meg a kromatogramon, ha az adott penészt vizsgáljuk. A 23. ábrán láthatók az egyes vizsgált mikroorganizmusok és az *Agaricus bisporus* TIC kromatogramjai, melyek egy ujjlenyomatszerű, adott penészsre jellemző marker vegyület mintázatot mutatnak. Mivel a 11 perces kromatogram nyolcadik percét követően lényegi információt tartalmazó komponens már nem érkezik (csupán az oszlop „vézrését” jelző sziloxán vegyületek), ezért az 23. ábrán az összes kromatogram ábrázolása 8 percig tart (*Trichoderma aggressivum* eredeti TIC kromatogramját a melléklet 2.2. ábrája mutatja). Az egyes penészekre jellemző marker vegyületek listáját az 5. táblázat mutatja a „csúcs ID” oszlopban.



**23. ábra:** A leoltást követő harmadik napon kapott TIC kromatogramok összehasonlítása, amely megadja az egyes penészekre jellemző MVOC mintázatot.

(a) *T. aggressivum*, (b) *T. DOFE*\*\*, (c) *L. fungicola*, (d) *M. pernicioso*, (e) *A. bisporus*.

Az egyes jelölt komponensek az 5. táblázat „csúcs ID” oszlopában találhatóak.

\*\* Termelőnél izolált zöld penész, melynek pontos faja nem ismert

A *T. aggressivum* élettevékenysége során 16 marker vegyületet termelt változó intenzitással (23. ábra), ahogy a másik *Trichoderma* zöldpenész (*T. DOFE*) is. A többi mikroorganizmus jóval kevesebb marker vegyületet bocsátott ki (23. ábra és 5. táblázat). Az 5. táblázat tartalmazza a gombakomposztot károsító mikroorganizmusok által termelt marker vegyületek listáját és azok NIST spektrumkönyvtárral történő azonosítása során kapott találati százalék értékét. Ezen marker vegyületek ujjlenyomatszerűen jellemzik az adott penészt, ezáltal lehetővé vált a mikrobák egyértelmű azonosítása, egymástól való elkülönítése.

**5. táblázat:** Gombakomposztot károsító mikroorganizmusok által termelt marker vegyületek listája.

ID%: találati százalék; NIST tömegspektrum-könyvtár alapján; Csúcs ID: az egyes minták rövidítését, kódját tartalmazza (Ta: *T. aggressivum* f. *europaeum*, TD: *T. DOFE*, L: *L. fungicola*, M: *M. perniciosus*, A: *A. bisporus*) illetve a talált komponensek sorszáma; \*jelöli azokat a komponenseket, amelyek tömegspektruma a melléklet 2.3.-2.5. ábráján láthatók.

Minta	Csúcs ID	tR (min)	Komponens neve	NIST ID %
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	Ta-1	2,21	* unknown	-
	Ta-2	3,41	D-limonene	78%
	Ta-3	3,70	* 4-nonanone	87%
	Ta-4	3,84	2-nonanone	90%
	Ta-5	4,93	(3E)-3-ethylidene-3a-methyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-1H-indene	79%
	Ta-6	4,98	1,1,4,4-tetramethyl-2,5-dimethylene-cyclohexane	73%
	Ta-7	5,12	2-ethylidene-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane	75%
	Ta-8	5,43	1,6,6-trimethyl-7-(3-oxobut-1-enyl)-3,8-dioxatricyclo[5.1.0.0(2,4)]octan-5-one	71%
	Ta-9	5,70	n-decanoic acid	92%
	Ta-10	5,86	furfuryl alcohol	73%
	Ta-11	6,15	(E)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid; (icosapent)	86%
	Ta-12	6,27	6-pentyl-2H-pyran-2-one	91%
	Ta-13	6,37	5,6-dihydro-6-pentyl-2H-pyran-2-one	69%
	Ta-14	6,46	tetrahydro-6-pentyl-2H-pyran-2-one	96%
	Ta-15	8,31	unidentified diterpenoid	-
	Ta-16	9,01	* unknown	-
<i>Trichoderma DOFE</i> **	TD-1	1,23	2-methyl-1-propanol	91%
	TD-2	1,48	3-hydroxy-2-butanone (acetoin)	95%
	TD-3	1,56	3-methyl-1-butanol	91%
	TD-4	1,75	unidentified alcohol (butanediol)	-
	TD-5	1,80	2,3-butanediol	81%
	TD-6	5,00	unidentified pyran compound	-
	TD-7	5,10	cycloocta-2,4-dien-1-ol	79%
	TD-8	5,23	(10R)-10-methyl-2-oxecanone	91%
	TD-9	5,92	(R)-1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis-(1-methylethenyl)cyclohexane	78%
	TD-10	6,24	(E)-12-methyloxacyclododec-9-en-2-one	70%
	TD-11	6,33	(Z)-8-methyl-9-tetradecenoic acid	81%
	TD-12	6,74	3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1H-2-benzopyran-1-one; (3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarin)	92%
	TD-13	7,49	[3R-(3a,3aβ,7β,8aα)]-2,3,4,7,8,8a-hexahydro-3,6,8,8-tetramethyl-1H-3a,7-methanoazulene (cedr-8-ene)	84%
<i>Lecanicillium fungicola</i>	L-1	1,84	cyclopentanone	56%
	L-2	2,22	2-dodecanone	56%
	L-3	3,47	methyl 2-ethylhexanoate	94%
	L-4	6,63	unknown	-
<i>Mycogone perniciosus</i>	M-1	3,59	unidentified alkane compound	-
	M-2	4,49	unknown	-
	M-3	6,23	unknown	-
<i>Agaricus bisporus</i>	A-1	1,15	acetic acid	55%
	A-2	1,32	1-chlorobutane	56%
	A-3	3,06	3-octenone	82%
	A-4	5,59	1,2,3-triacetoxypropane (triacetin)	88%
	A-5	7,02	3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid)	70%

\*\* Zöldpenész, pontos faja nem ismert, a penészt egy gombatermelőnél izoláltuk

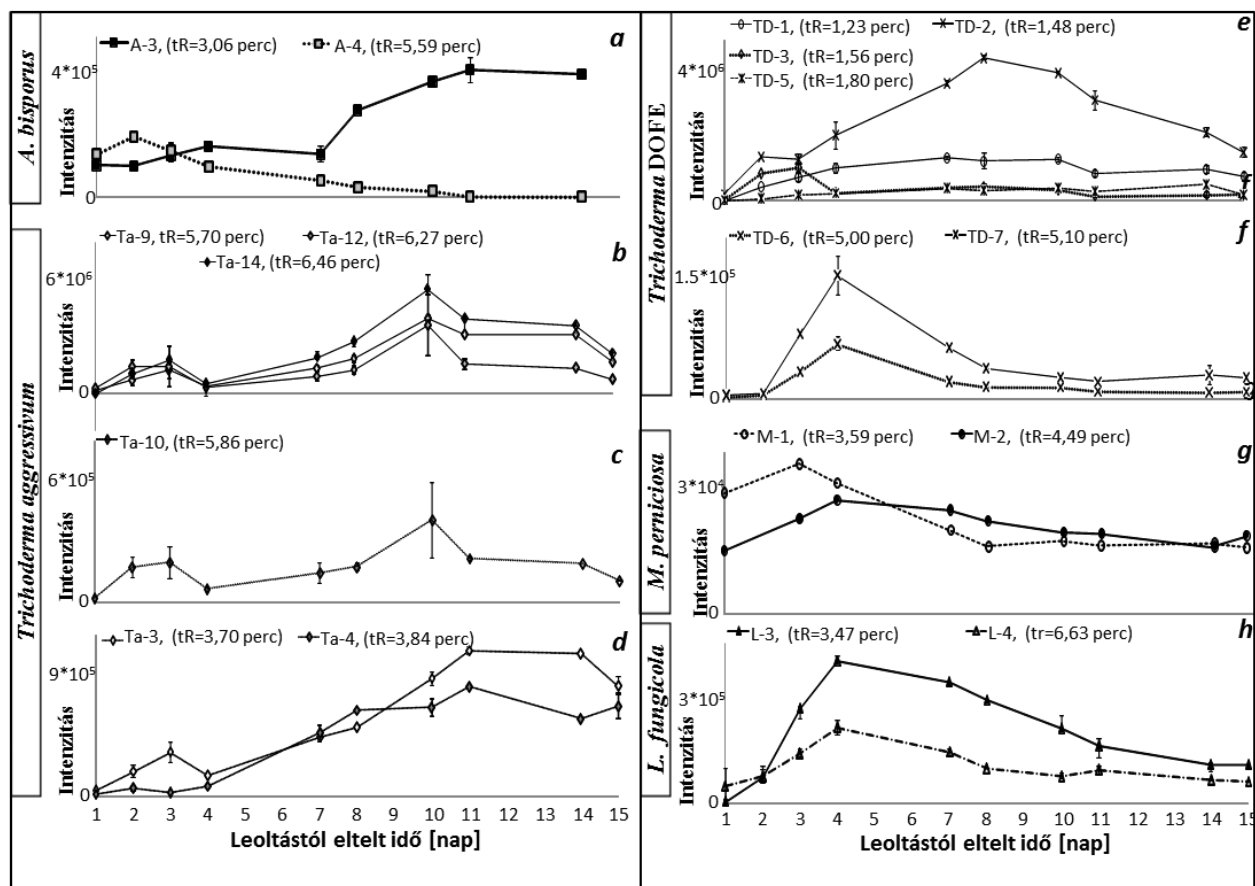
### **5.3. A gombatermesztésben előforduló kártékony penészek illékony anyagcseremarkereinek megfigyelése, monitorozása**

#### **5.3.1. Anyagcseremarkerek intenzitásértékeinek időbeli változása**

A mikroorganizmusok élettevékenysége során a leoltást követően a spórából hifa fonalak nőttek ki radiális irányban, ezáltal a micéliumnövekedés terjedése a táptalajon kör alakú volt. Amint a mikroorganizmus elérte a táptalaj szélét, a táptalajban szegény környezet hatására spórákat termelt a megváltozott környezeti feltételek miatt. A növekedés során termelt marker komponensek segítségével megállapítható, hogy a vizsgált penész melyik stádiumban van az előbb említett növekedési szakaszok közül.

Az 5. táblázatban bemutatott marker vegyületeket monitoroztam a leoltástól számított 1-15 nap között. Megállapítható volt, hogy a legtöbb csiperkegomba marker vegyület intenzitása növekvő tendenciát mutatott a vizsgálat során. Kivételt képezett a *triacetin* és *sinapinic acid*, amelyek intenzitásértékei csökkentek a leoltástól eltelt napok előrehaladtával (24. ábra a). A *3-octenone* vegyület egy hét elteltével jelent meg a légtérben, amikor is a csiperkegomba micéliuma elérte a PDA táptalaj szélét. Ezt a vegyületet már korábban is azonosították vad gombafajok vizsgálata során, szintén HS-SPME-GC-MS technika alkalmazásával (Malheiro et al. 2013b).

A *M. perniciosus* és *L. fungicola* penészek legtöbb marker vegyületüket a harmadik és negyedik vizsgálati napon emittálták. A leoltástól számított hetedik napon a legtöbb marker termelődése lecsökkent vagy megállt, vagyis ezek a fajok főként a micéliumnövekedés szakaszában bocsátottak ki marker vegyületet (24. ábra g) h).



**24. ábra:** Anyagseremarkerek intenzitásváltozása a leoltástól számított 1-15. napon.

Az egyes komponensek jelölését (penész nevének rövidítése - sorszám) az 5. táblázat „Csúcs ID” oszlopa tartalmazza

A *Trichoderma* fajok ebből a szempontból eltérő tendenciát mutattak a többi vizsgált penészhez képest. A *T. aggressivum* penész legtöbb marker vegyülete (*n-decanoic acid*; *furfuryl alcohol*; *6-pentyl-2H-pyran-2-one*; *tetrahydro-6-pentyl-2H-pyran-2-one*) a hetedik nap után jelentős intenzitás növekedést mutatott (24. ábra b c). A markerek megjelenése és intenzitásuk növekedése éppen akkorra tehető, amikor a zöld spóra megjelent a leoltott penészmintákon. Ezen vegyületek intenzitás értéke a tizedik napon érte el a maximumot, ezután csökkenésnek indult. Néhány vegyület a leoltástól eltelt idő függvényében csökkenő intenzitás értéket mutatott: *D-limonene*; *(3E)-3-ethylidene-3a-methyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-1H-indene*; *2-ethylidene-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane*. Ezzel szemben a *4-nonanone* és *2-nonanone* vegyületek épp ellenkezőleg, határozottan növekvő intenzitás értékekkel voltak jellemezhetőek a vizsgált időszakban (24. ábra d). A *2-nonanone* vegyületet már korábban is leírták *T. atroviride* vizsgálata során (Bruce et al. 2000), ugyanígy a *6-pentyl-2H-pyran-2-one* (6PP) vegyületet is (Polizzi

et al. 2011), amelyeket a légtérből vizsgáltak szintén HS-SPME-GC-MS technika használatával (Stoppacher et al. 2010).

A természetnél izolált zöld penész (*Trichoderma DOFE*) esetében az alábbi vegyületeket soroltam a micélium növekedés fázisába:

*3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1H-2-benzopyran-1-one*; *(10R)-10-methyl-2-oxecanone*; *cycloocta-2,4-dien-1-ol*; *unidentified pyran*. A zöld spórák termelődését az alábbi vegyületek intenzitás értékének növekedése jelezte: *2-methyl-1-propanol*; *acetoin*; *3-methyl-1-butanol*; és *2,3-butanediol*.

### 5.3.2. Kemometriai módszerek alkalmazása penészek elkülönítésére

A penészek marker vegyületeinek meghatározásával elvileg egyértelműen el tudjuk különíteni az egyes penész fajokat, azonban sok esetben kevés, mindössze három-négy marker vegyületet találtam a vizsgálat során. Azokban az esetekben, amikor nincs vagy nagyon kevés marker vegyület áll rendelkezésünkre, kemometriai módszerek segítségével választhatók ki azok a vegyületek, amelyek a minták (esetemben penész fajok) közötti különbségeket a legjobban magyarázzák. Dimenziócsökkentő eljárás alkalmazásával olyan kémiai vegyületeket kerestem, amelyek minden mintában jelen vannak, azonban intenzitás értékük különböző. A dimenziócsökkentő eljárások családjából a főkomponens elemzés (*principal component analysis*, PCA) segítségével értékeltem az eredményeimet. Olyan vegyületeket használtam a PCA futtatásakor, amelyek minden vizsgált penész mintában jelen voltak, ezért közös vegyületeknek tekintettem őket. A főkomponens elemzés terminológiája miatt a következőkben a kémiai komponensekre vegyületként, míg a kémiai vegyületekből képzett változók korrelálatlan, lineáris kombinációjából előállított statisztikai értékekre főkomponensként fogok hivatkozni.

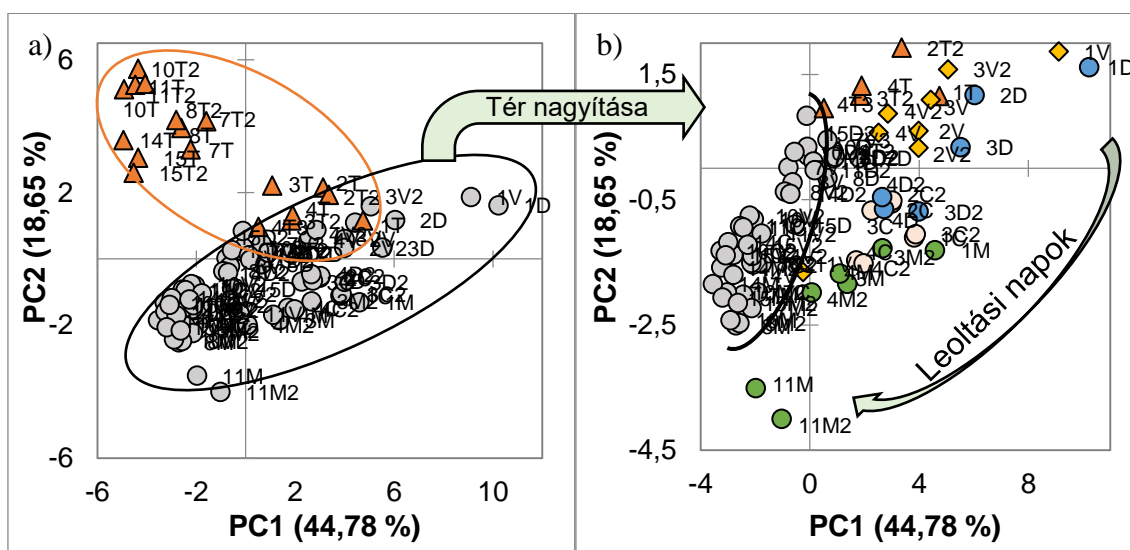
#### 5.3.2.1. Penészek elkülönítése főkomponens elemzéssel

Első lépésben megkerestem a vizsgált 4 penész és a csiperkegomba összes olyan vegyületét, amelyek minden TIC kromatogramon megjelentek (57 vegyület), ezeket közös vegyületeknek neveztem el. Ezután főkomponens elemzést hajtottam végre az így meghatározott közös vegyületek integrált csúcs alatti területértékeire.

A statisztikai elemzés előtt ellenőriztem a PCA feltételeit. Az adatokra futtatott Pearson-féle korrelációs táblázat számos változópár esetén magas (> 0,4) és szignifikáns korrelációs koefficienseket ( $r$ ) tartalmazott. A korrelációs mátrixot ezt követően Bartlett-féle szfericitás

vizsgálatnak is alávettem, amely a korrelációs mátrixot egy korrelálatlan változókból előállított korrelációs mátrixhoz hasonlítja. A teszt eredménye szignifikánsnak adódott ( $\alpha = 0,05$ ), így a PCA azon feltétele, hogy szignifikánsan korreláló változókon futtatható, teljesült. A PCA összesített KMO (Kaiser-Meyer-Olkin) értéke 0,816-nak adódott, ami „nagyon jó”-nak nevezhető a KMO értékelési táblázat alapján. A KMO és a korrelációs koefficiensek alapján kiválasztott 22 kémiai vegyület alapján futtatott PCA első három főkomponense 76,51 % (PC1 = 44,78 %, PC2 = 18,65 %, PC3 = 13,07 %) varianciát magyaráz (PC: főkomponens, *principal component*).

A PCA első és második főkomponenséből (PC1 és PC2) generált szkór ábrán (25. ábra) mutatom be a vizsgált penész és a csiperkegomba mintákat. A PC1 a napok szerinti eltéréseket, míg a PC2 a minták közötti különbségeket magyarázza. A harmadik főkomponens szintén a minták közötti különbségeket írja le, ezáltal pontosítva a PC2 által magyarázott eltéréseket.



**25. ábra:** Az egyes penészek PCA szkór ábrája, az a) ábra a teljes teret, míg a b) ábra az a) ábra alsó felét emeli ki.

A minták jelölése a következők szerint történt: napok száma (1-15), faj neve (T: *Trichoderma aggressivum*, M: *Micogone perniciosa*, V: *Lecanicillium fungicola*, D: *Trichoderma DOFE*, C: *Agaricus bisporus*), imétlések száma (1-3). Például: méréstől eltelt negyedik napon a *T. aggressivum* második párhuzamos mérése: 4T2.

A *Trichoderma* minták jóval távolabb helyezkednek el az ábrán a többi mért penésztől, főleg a harmadik-negyedik nap után (25. ábra a). Emiatt a határozott különbség miatt azonban a skála összenyomódik és az ábrákon nehezebben kivehető a többi minta egymáshoz viszonyított helyzete. A 25. ábra b) részén az összesített területet nagyítottam ki, hogy jobban láthatóvá váljanak a különbségek.

A főkomponensekben szerepet játszó változók vizsgálata során megállapítottam, hogy a 7. perc körül érkező vegyületek felelősek a minták közötti eltérésekért (6. táblázat). A mintavétel első napjai magas pozitív PC1 értékekkel rendelkeztek és 0 körüli PC2 értékekkel. A mintavételi idő növekedésével a PC1 értéke csökkent. Ezek alapján megállapítható, hogy a PC1 főkomponensben szerepet játszó változók felelősek az időbeli különbségekért, a minták időbeli változásáért. Ezt az időbeli tendenciát szemlélteti a 25. ábra b) része is. A PC1-ben nagy súllyal szerepet játszó változók (azaz vegyületek) a következők voltak: c4, c7-c9, c13-c22. A változók kódolását a 6. táblázat tartalmazza.

A 25. ábrán bemutatott PCA szkór ábra alapján a PC2 felelős a minták közötti különbségekért. A felügyeletlen PCA nem volt képes teljes mértékben elkülöníteni a penészeket, azonban egyfajta tendencia mégis kirajzolódott. A *Lecanicillium fungicola* minták jellemzően magasabb, míg a *T. DOFE* minták alacsonyabb PC2 értékekkel rendelkeztek. A legmagasabb PC2 értékeket a *T. aggressivum* penészminta, míg a legalacsonyabb értékeket a csiperkegomba minta kapta. A PC2-ben nagy súllyal szerepet játszó komponensek a következők voltak: c2,c3,c5,c6,c11. A változók kódolását szintén a 6. táblázat tartalmazza.

Látható, hogy a kísérleti időszak kezdetén a minták jobban, majd a negyedik-ötödik nap után már kevésbé különültek el egymástól. A PCA nem tudta maradéktalanul elkülöníteni a mintákat, meg kell azonban jegyezni, hogy nem is ez volt a módszer elsődleges célja, hanem az idő és a minták elkülönülésében szerepet játszó változók meghatározása (6. táblázat). A táblázatban félkövérrel szedett értékek az adott változó magasabb négyzetes koszinusz értékeit jelölik, tehát azt mutatják meg, mekkora szerepet töltenek be az adott főkomponensben.



**6. táblázat:** A PCA főkomponenseit (PC1, PC2, PC3) meghatározó változók, azaz komponensek.  $t_R$ : retenciós idő (perc). A félkövérrel szedett értékek az adott változó magasabb négyzetes koszinusz értékeit jelölik.

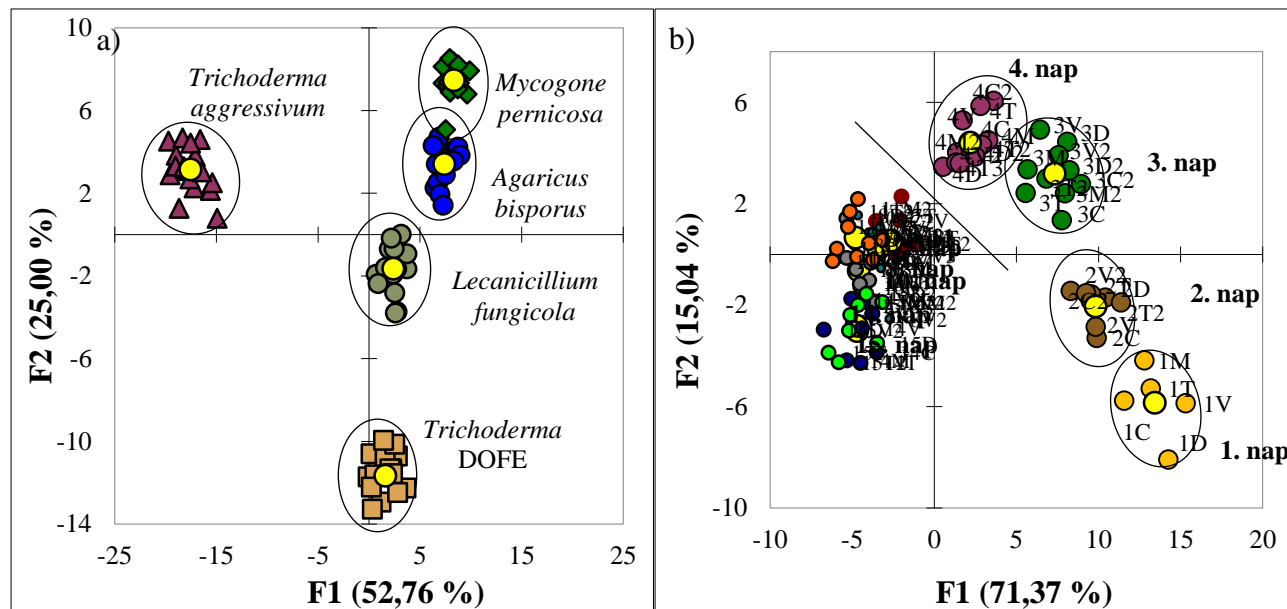
Változó kódolása	$t_R$ (perc)	PC1	PC2	PC3	Vegyület név
c1	2,29	0,178	0,059	0,163	<i>p-xylene</i>
c2	2,39	0,183	<b>0,634</b>	0,012	<i>oxime-, methoxy-phenyl-</i>
c3	2,42	0,121	<b>0,366</b>	0,236	<i>unknown</i>
c4	3,36	<b>0,286</b>	0,124	0,116	<i>1-hexanol, 2-ethyl-</i>
c5	3,69	0,154	<b>0,676</b>	0,004	<i>unknown</i>
c6	3,89	0,153	<b>0,234</b>	0,174	<i>unknown</i>
c7	3,93	<b>0,339</b>	0,037	0,146	<i>unknown</i>
c8	4,73	<b>0,677</b>	0,031	0,209	<i>unknown</i>
c9	5,05	<b>0,301</b>	0,132	0,091	<i>unknown</i>
c10	5,14	0,181	0,245	<b>0,393</b>	<i>unknown</i>
c11	5,69	0,156	<b>0,637</b>	0,063	<i>unknown</i>
c12	6,41	0,039	0,024	<b>0,833</b>	<i>unknown</i>
c13	6,86	<b>0,429</b>	0,148	0,129	<i>7-methyl-Z-tetradecen-1-ol acetate</i>
c14	7,25	<b>0,895</b>	0,069	0,003	<i>unknown</i>
c15	7,27	<b>0,853</b>	0,075	0,024	<i>unknown</i>
c16	7,41	<b>0,815</b>	0,098	0,059	<i>unknown</i>
c17	7,42	<b>0,819</b>	0,080	0,033	<i>unknown</i>
c18	7,44	<b>0,846</b>	0,067	0,033	<i>unknown</i>
c19	7,45	<b>0,619</b>	0,076	0,103	<i>unknown</i>
c20	7,52	<b>0,702</b>	0,119	0,000	<i>1,1'-biphenyl, 3,4-diethyl-</i>
c21	7,60	<b>0,600</b>	0,083	0,000	<i>unknown</i>
c22	7,86	<b>0,506</b>	0,090	0,052	<i>unknown</i>

### 5.3.2.2. Csoportosítás lineáris diszkriminanciaelemzéssel

Lineáris diszkriminancia elemzést (*linear discriminant analysis*, LDA) alkalmaztam az összes (57) közös változón a minták egymás közötti és időbeli különbségeinek feltárására. Az LDA futtatása előtt a változók normalitását is megvizsgáltam, és megtettem a szükséges transzformációs lépéseket, továbbá az alkalmazott egyszeres beléptetési (*stepwise forward*) változókiválasztással futtatott LDA-t véletlenszámokkal validáltam.

Első lépésben a fajok csoportosítását végeztem el (26. ábra a). Az ábrán az egyes mintacsoportok csoportközéppontjait (centroidjait) sárga körrel jelöltem. A centroid köré egy 95 %-os konfidencia ellipszist rajzolva látható, hogy a minták 95 %-a mekkora területre esik. A minták elkülönítése az LDA alkalmazásával sikeresnek bizonyult a legtöbb esetben, azonban volt egy minta (*M. pernicios*, első napon), amely a csoportjától eltérően a csiprke mintához került nagyon közel, így kiugró adatként

kezeltém. Az egyszeres beléptetéses LDA során az alábbi változókat választotta ki a módszer a modell felállításához:  $t_R$  = 2,25 perc; 2,42 perc; 2,73 perc; 3,06 perc; 3,36 perc; 3,70 perc; 3,74 perc; 4,63 perc; 4,73 perc; 5,05 perc; 5,14 perc; 5,32 perc; 5,69 perc; 5,73 perc; 5,77 perc; 6,41 perc; 6,53 perc; 6,86 perc; 7,27 perc; 7,41 perc; 7,44 perc; 7,45 perc; 7,60 perc; és 7,83 perc.



**26. ábra:** A vizsgált penészfajok LDA elkülönítése a) minták szerint, b) leoltástól eltelt idő (nap) szerint. A minták jelölése a következők szerint történt: napok száma, faj neve, imétlés száma. F1, F2: első, második diszkrimináló függvény

Második lépésben a leoltástól eltelt idő (napok) alapján történő elkülönítésre alkalmaztam az LDA modellt. Az eredmények alapján a negyedik napig a leoltástól eltelt napok száma jól elkülöníthető (26. ábra b), majd ezt követően a modell nem tudott különbséget tenni a leoltástól eltelt napok között. A modell validálásához alkalmazott keresztellenőrzés során az első négy napról származó minták leoltástól eltelt napjainak számát jól prediktálta a modell, azonban a leoltástól eltelt 7-15. napon mért mintákat rendre eltévesztette. Ezek alapján a modellel jól csoportosíthatók a minták a leoltástól eltelt idő alapján az első négy napig. Az egyszeres beléptetéses LDA során az alábbi változókat választotta ki a módszer a modell felállításához:  $t_R$  = 1,18 perc; 1,86 perc; 2,25 perc; 2,29 perc; 2,42 perc; 3,36 perc; 3,74 perc; 3,89 perc; 4,63 perc; 4,73 perc; 5,32 perc; 5,77 perc; 5,89 perc; 6,53 perc; 7,25 perc; 7,44 perc; 7,45 perc; 7,52 perc; 7,6 perc; 7,83 perc; és 7,86 perc.

### 5.3.3. A leoltástól eltelt napok számának becslése PLS-R modellel

Az 5. táblázatban felsorolt marker vegyületek jelzik a penészek jelenlétét, azonban kevés információt szolgáltatnak az adott penész „életkorát” illetően, azaz a leoltástól eltelt napok/órák számáról. Éppen ezért a parciális legkisebb négyzetek elvén alapuló regressziós modellt (*partial least squares regression*, PLS-R) használtam a leoltástól, vagyis a fertőzéstől eltelt napok számának előrejelzésére. A PLS-R modellt minden mintára külön-külön futtatam, mivel a prediktorok/magyarázó változók (kémiai vegyületek) száma az egyes mintáknál különbözött. Összesen 34 közös, nagy intenzitású komponenszt választottam ki az 57 közös komponenszt tartalmazó MVOC profilból. Első lépésben meghatároztam a tanuló adatsort, aminek segítségével a PLS-R modellt felépítettem. Ez esetben a modell előrejelzi adott mintára a leoltástól eltelt napok számát (például *T. aggressivum* penészmintánál a leoltástól számítva 2,4 nap telt el). Mivel azonban az adott minta leoltástól eltelt ideje ismert (például ugyanennél a *T. aggressivum* penészmintánál a leoltástól pontosan 2,0 nap telt el), így az előrejelzés és az ismert adatokból a különbség számítható (például  $2,4 - 2,0 \text{ nap} = 0,4 \text{ nap}$ ). Ez a különbség megadja a modell hibáját (a hibák négyzetre emelésével és átlagolásával megkapjuk az MSE értéket), amiből a modell hibájának gyöke (RMSE) számítható, amit szórásként értelmezhetünk (például *T. aggressivum* esetében a modell által becsült „kor”:  $2,4 \pm 0,2 \text{ nap}$ ). Ugyanezt elvégezzük a modell számára addig még ismeretlen predikciós adathalmazon. Így az előrejelzés és az ismert adatok különbségéből megkapjuk a predikciós adathalmazra felállított modell hibáját (MSEP), aminek gyöke szintén a modell szórását adja meg (RMSEP). A vizsgálat során használt paramétereket és a regressziós modell eredményét az egyes penész fajokra, illetve az *A. bisporus* csiperkegombára a 7. táblázat foglalja össze.

**7. táblázat:** Paraméterek és a PLS-R modell átlagos négyzetes hiba gyökének (RMSE: *root mean square error*) értéke az egyes penészfajokra és csiperkegomba micéliumára.  $R^2$ : determinációs együttható, MSE: átlagos négyzetes hiba (*mean square error*), RMSE: átlagos négyzetes hiba gyöke, RMSEP: a predikció átlagos négyzetes hiba gyöke (*root mean square error of prediction*),  $n_{\text{(tanuló)}}$ : minták száma a tréning adathalmazban,  $n_{\text{(predikciós)}}$ : minták száma a predikciós adathalmazban, LV: látens változók száma

Minták	$R^2$	MSE	RMSE (nap)	RMSEP (nap)	$n_{\text{(tanuló)}}$	$n_{\text{(predikciós)}}$	LV
<i>Agaricus bisporus</i>	0,992	0,117	0,306	0,342	16	7	3
<i>Lecanicillium fungicola</i>	0,991	0,187	0,432	0,654	20	9	5
<i>Mycogone perniciososa</i>	0,901	1,897	1,377	1,381	17	8	2
<i>Trichoderma aggressivum</i>	0,979	0,417	0,646	0,651	18	10	2
<i>Trichoderma DOFE</i>	0,983	0,334	0,578	0,771	18	8	3

A modell magas  $R^2$  és alacsony átlagos négyzetes hiba (*mean square error*, MSE) értékeket mutatott. Soronkénti egyszeres kihagyásos keresztellenőrzést használtam a PLS modell látens változóinak (LV) meghatározásához. A PLS modell építéséhez szükséges látens változók száma három az *Agaricus bisporus* és a természetnél izolált zöld penész (*Trichoderma DOFE*), míg öt a *Lecanicillium fungicola* és kettő a *Mycogone perniciosa* és *Trichoderma aggressivum* penészek esetében. A legmagasabb RMSE érték 1,377 nap a *M. perniciosa* penésznél, míg a legalacsonyabb értéket – 0,306 nap – az *A. bisporus* csiperke esetén kaptam. Ezek az értékek azt jelzik, hogy milyen hibával tudja a PLS-R modell előrejelezni egy adott minta leoltástól eltelt napjainak számát. A tanuló adathalmaz vizsgálata során hasonló eredményeket kaptam (RMSE), mint a predikciós adathalmaz vizsgálata során (RMSEP), emellett az értékek egymással szoros pozitív korrelációban álltak, ezért a modell alkalmas ismeretlen minták „korának” azaz a leoltástól eltelt időnek a becslésére. A kapott RMSE és RMSEP értékek megfelelő korrelációban álltak a mikroorganizmusok tényleges korával, azaz a fertőzéstől eltelt napok számával. A kapott értékek alapján az alkalmazott kapcsolt technika PLS regressziós modellel alkalmas az egyes penészek „életkorának” megfelelő előrejelzésére.

Az eddigiekben ismertetett mérések és vizsgálatok általános képet adnak az egyes kártékony penészekről, azok detektálhatóságáról és elkülöníthetőségéről, azonban a penészek pontos feltérképezéséhez fajspecifikus elemzésekre van szükség. Éppen ezért indokolt a gombatermesztésben leginkább kártékony zöldpenész további vizsgálatára külön hangsúlyt helyezni.

**6. EREDMÉNYEK. *TRICHODERMA AGGRESSIVUM* F. *EUROPAEUM*  
KÜLÖNBÖZŐ SZÉNHIDRÁTFORRÁSÚ TÁPAGARON TÖRTÉNŐ  
VIZSGÁLATA**

Közlemény szerkesztés alatt:

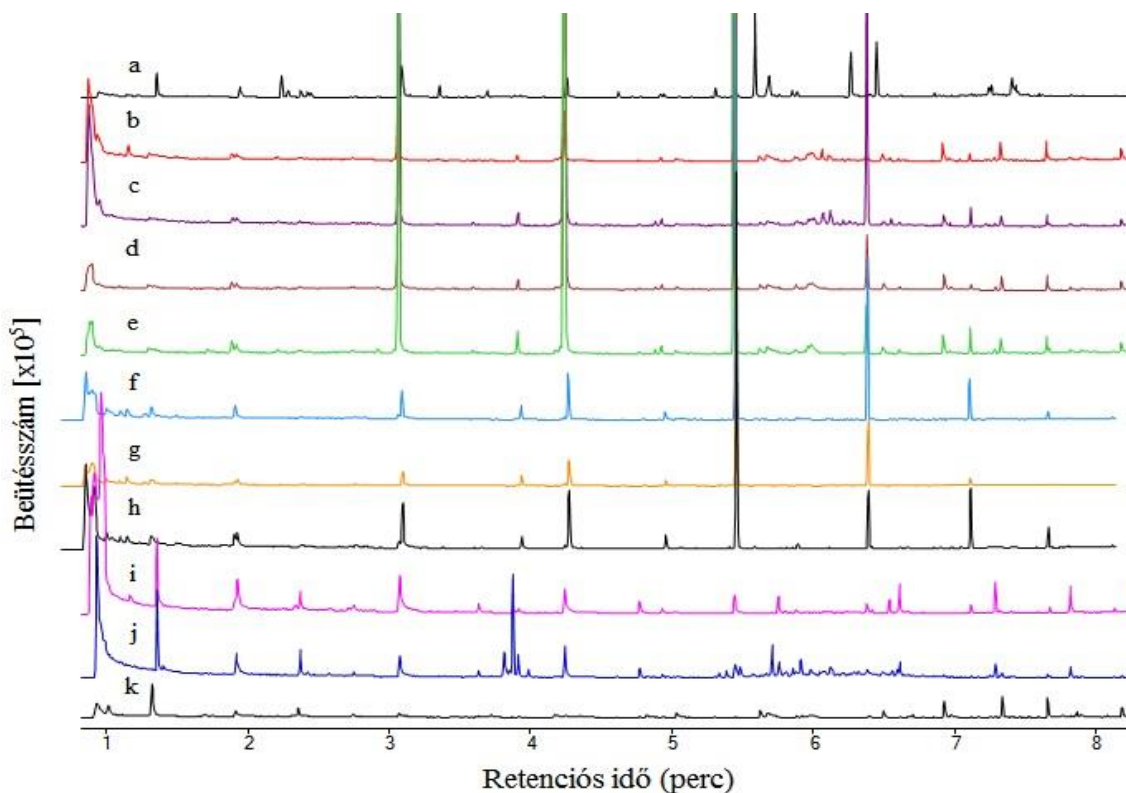
Radányi D., Juhász L., Jókai Zs., Fodor P. Examination of *Trichoderma aggressivum*'s  
metabolomic pathways on four different substrata

Célfolyóirat: *Talanta* (IF: 3,545)

## 6.1. A *Trichoderma aggressivum* MVOC mintázata

Az előző fejezetben ismertetett kísérletek során azonosítottam és nyomonkövettem a különféle penészek által kibocsátott MVOC vegyületeket. Ebben a fejezetben azokat az eredményeimet mutatom be, amelynek a gombatermesztésben leginkább káros penész, a zöldpenész volt a kísérleti alanya. Megvizsgáltam, hogy élettevékenysége során milyen eltérő vegyületeket képes kibocsátani a penész különböző tápagarokon.

Munkám során nyomonkövettem a *T. aggressivum* által kibocsátott illékony anyagcseretermékeket különböző tápagarokon, gombakomposzton és a csiperkegombán is. A 27. ábrán látható a 2013-2016 között végzett mérések reprodukálhatósága. A SPME szálból érkező sziloxán vegyületek ( $t_R=1,3$  perc; 3,0 perc; 4,2 perc; 5,5 perc; és 6,4 perc) retenciós idejének nyomonkövetésével megállapítottam, hogy a TIC kromatogramok jól kézben tarthatók, nem „csúszkálnak”, hiszen ezek a vegyületek mintától függetlenül mindig jelen vannak. Végeredményképpen öt ponton rögzített, stabil kromatogramokat kaptam.



**27. ábra:** *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* penész kilenc különböző tápagarra történő leoltása során kapott MVOC mintázat. A vizsgált tápagarok: a) PDA (első mérési kör, 2013) b) PDA (második mérési kör, 2016) c) MEA d) víz agar e) komposztos agar f) módosított komposztos agar (hozzáadott mannit) g) módosított komposztos agar (hozzáadott maltóz) h) módosított komposztos agar (hozzáadott dextróz) i) gombakomposzt j) csiperkegomba k) vak SPME szál

## 6.2. A *Trichoderma aggressivum* növekedésének vizsgálata négy különböző tápagon

A kísérletek során ugyanabból a törzsből származó *T. aggressivum* penészmintát vizsgáltam, frissen leoltott tenyészetekből. A friss tenyészetek spóraszuszpenzióját használtam fel a kísérletek elvégzéséhez. Ezután hét napig monitoroztam a mikroorganizmus által kibocsátott illékony komponenseket, és vizsgáltam a penész fejlődése során történő változásokat (micéliumképzés, spórázás, stb.).

Első lépésben, a kezdeti feltételezésnek megfelelően megbizonyosodtam arról, hogy a tápanyagban gazdag táptalajon tudtak gyorsabban nőni a penészek. A kezdeti micéliumképzést követően zöld spórák jelentek meg a micéliumgyep szélén, majd a vizsgált időszak végére ellepték a fehér micéliumot is (28. ábra).

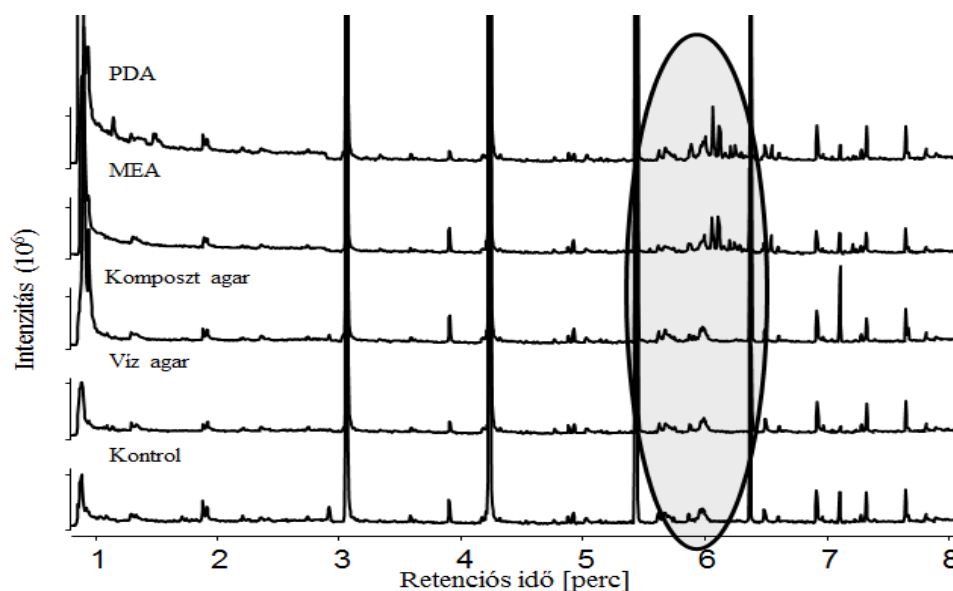


**28. ábra:** *Trichoderma aggressivum* a leoltástól eltelt hatodik napon.

Táptalajok balról jobbra: PDA (burgonya-dextróz agar), KA (komposzt agar), MEA (maláta-extrakt agar), VA (víz agar)

(**Forrás:** saját fotó)

Várakozásaimnak megfelelően a megfelelő hőmérséklet és tápagar összetétel kedvezett a penész növekedésének (Samuels et al. 2002; Sobieralski et al. 2009; Stoppacher et al. 2010), a tápanyagban gazdag agaron a második napon már megindult a micéliumképzés. A tápanyagban szegény tápagaron a micéliumnövekedés jelentéktelen volt, csupán foltokban jelent meg, amely megjelenő foltokon a spóráképzés sokkal gyorsabbnak bizonyult. A zöldpenész a PDA és MEA tápagaron nőtt a legjobban, így nem meglepő, hogy a műszeres vizsgálat során is ezen a két tápagon növesztett penész bocsátotta ki a legtöbb illékony anyagcsereterméket. A penészgombákra leginkább jellemző vegyületek, a terpének (Reino et al. 2008; Cardoza et al. 2011; Hermosa et al. 2014) a kromatogramon főleg 6 perc körül eluálódtak (29. ábra).



**29. ábra:** *T. aggressivum* MVOC mintázata a különböző tápagarokon. Szürke ellipszis jelzi az anyagcseremarkerek érkezésének idejét (~ 6 perc) a kromatogramon. Az eredeti TIC kromatogramok a melléklet 2.6. ábráján láthatók.

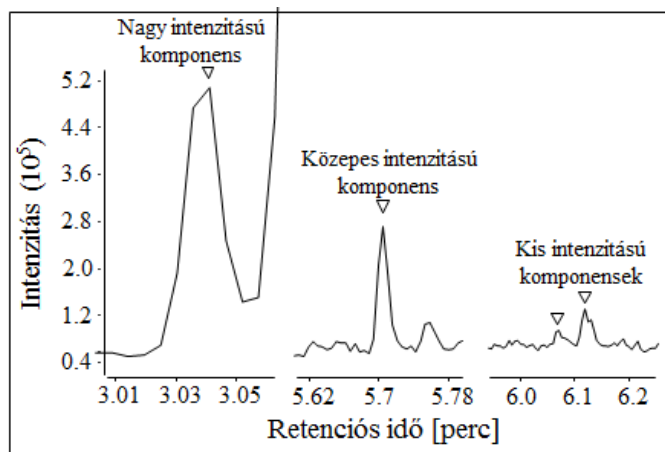
### 6.3. *Trichoderma aggressivum* illékony anyagcseremarkereinek azonosítása

Mikroorganizmus illékony vegyületeinek vizsgálatánál az alapvető gondot az egyes vegyületek „kis ( $\leq 10^5$ ) intenzitás” értéke jelentette. A gyors kromatográfias elemzés érdekében gyors mintavételi technikát alkalmaztam. Noha a mintavétel hatékonysága a hőmérséklet emelésével növelhető lenne, azonban a magas hőmérséklet jelentős hatással van a penészek élettevékenységére, szaporodására, tehát bizonyos hőmérséklet felett már nem volt értelme a mintavételt végrehajtani. Emiatt a vizsgálatok során az SPME-GC-MS méréseknél megszokott  $10^7$ - $10^8$  nagyságrendtől eltérő, kisebb intenzitás értékeket kaptam. Megfelelően „nagy ( $\sim 4 \cdot 10^5$ ) intenzitással” bíró komponensek azonosítását és a csúcsok integrálását automatikus kiértékelő szoftverekkel el lehet végezni (például Mass Hunter Unknown Analysis), esetemben azonban a „kis intenzitás” értékek miatt a szoftver még dekonvolúciós algoritmussal sem találta meg megfelelően a komponenseket, amelyeket viszont megtalált, azokat több esetben helytelenül azonosította vagy integrálta.

Méréseim során a vizsgálandó komponensek intenzitás értékei alig érték el a  $10^5$ -en nagyságrendet, így automatikus kiértékelést nem tudtam alkalmazni. A manuális kiértékeléssel kapott komponenseket csoportokba rendeztem intenzitás értékeik alapján, majd különböző eljárásokat dolgoztam ki a vizsgált komponensek megfelelő kiértékelésére. „Nagy intenzitású” komponensek közé soroltam a  $\geq 4 \cdot 10^5$  intenzitás értékkel rendelkező vegyületeket. A komponensek többsége azonban a „közepes intenzitású” komponensek ( $1,2$ - $3 \cdot 10^5$  intenzitás érték), illetve a „kis intenzitású”



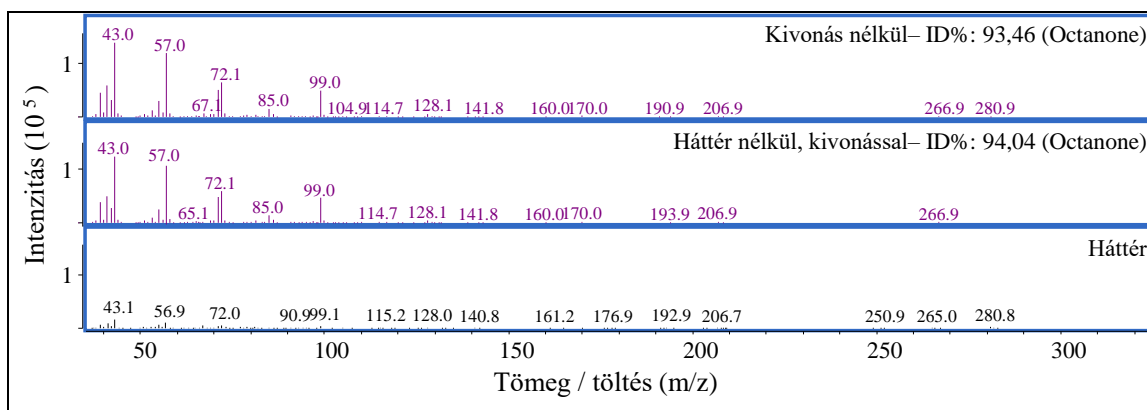
komponensek (közel alapvonalban lévő komponensek,  $\leq 10^5$ ) csoportjába tartozott (30. ábra). Összehasonlításként említeném, hogy a SPME-GC-MS intenzitás értékek sokszor megközelítik vagy meghaladják a  $10^7$ - $10^8$  nagyságrendes értéket is.



**30. ábra:** Nagy- ( $\geq 4 \cdot 10^5$ ), közepes- ( $1,2-3 \cdot 10^5$ ) és kis ( $\leq 10^5$ ) intenzitású komponensek

### 6.3.1. „Nagy intenzitású” komponensek egy lépéses azonosítása

A manuális azonosítás során a kellően „nagy intenzitással” bíró komponensek ( $4 \cdot 10^5$  vagy annál nagyobb intenzitás érték) tömegspektruma háttérspektrummal kevésbé zavart, így tömegspektrum könyvtárak alkalmazásával azonosításuk egyszerűen megoldható volt. Az azonosítás során megbízható eredményeket kaptam, ugyanis az összes párhuzamos mérésnél hasonlóan magas találati aránnyal ugyanazon vegyületekként azonosítottam NIST spektrumkönyvtár segítségével az azonos retenciós időnél érkező komponenseket. Ezek a „nagy intenzitással” bíró vegyületek automatikus kiértékelő szoftverek segítségével is könnyedén azonosíthatók voltak (például: MassHunter Unknown Analysis, MassHunter Quantitative Analysis, Metabolite Detector), köszönhetően a komponens nagy intenzitású fragmenseinek (31. ábra).

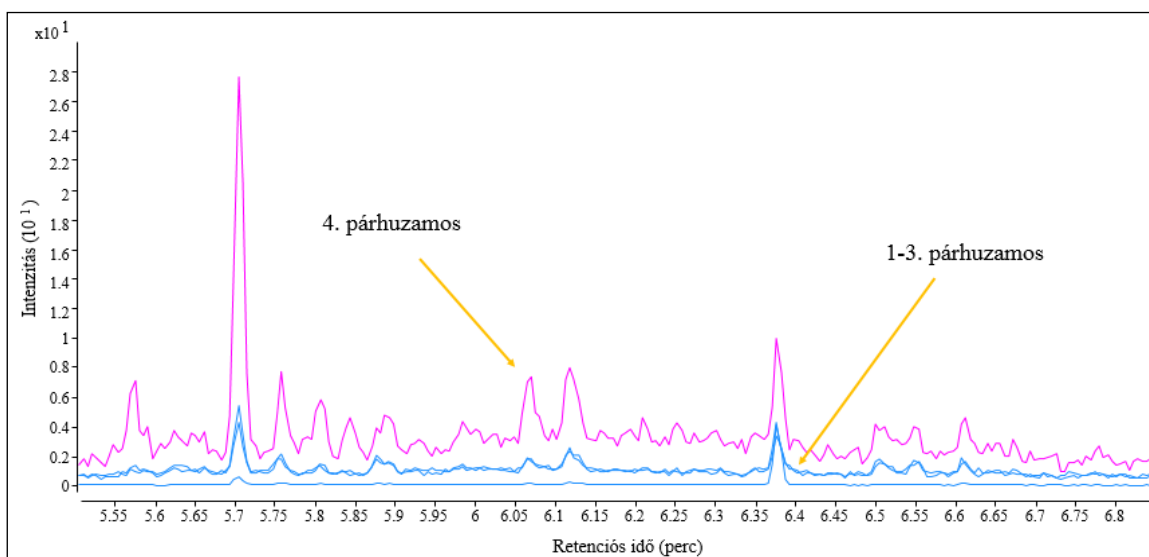


**31. ábra:** *Octanone* azonosítása háttérkorrekció (kivonás) nélkül, illetve háttérkorrekcióval (kivonással). ID%: NIST könyvtárban kapott találati százalék.

### 6.3.2. Komponensek azonosítása egy lépéses háttérkorrekcióval

A „közepes intenzitású” komponensek esetén háttérkorrekciót kellett alkalmazni, melynek eredményeként elértem, hogy a komponens tömegspektrumát a háttérben lévő egyéb komponensek fragmensei ne zavarják. Az így kapott háttérzajtól mentes tömegspektrum már megfelelően azonosítható volt tömegspektrum könyvtár segítségével. Az azonosítás során csak azokat a találatokat fogadtam el, amelyek találati százaléka meghaladta a 60 %-ot (ID % > 60 %). Ezen érték alatti találatoknál a komponens nevét feltételekkel fogadtam el, azok pontos azonosításához további kiegészítő eljárások voltak szükségesek (például a komponens retenciós indexének vizsgálata).

Az utolsó mérési napon, eredményeimet megerősítendő, a három párhuzamos mérés mellett az addig még nem mintavételezett negyedik párhuzamos leoltást is megvizsgáltam (32. ábra). Az addig még nem vizsgált negyedik párhuzamos vizsgálata során a hosszabb mintavételnek köszönhetően a kromatogramon megjelenő komponensek jóval nagyobb intenzitással bírtak, így azok felhasználhatók voltak az azonosítás megerősítése érdekében, hiszen a nagyobb intenzitás értéknek köszönhetően biztosabb találatot (nagyobb találati értéket) kaptam.



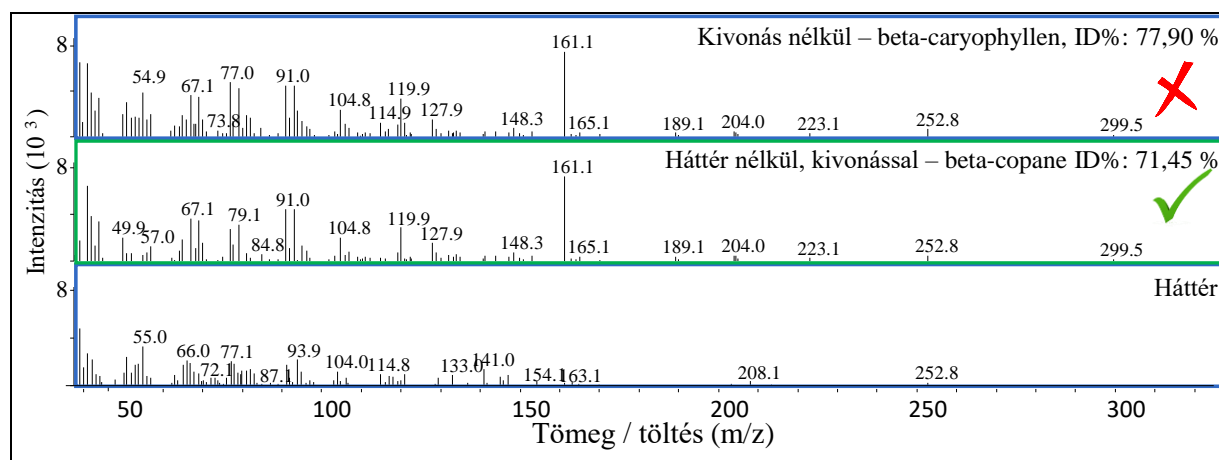
**32. ábra:** A leoltástól eltelt hetedik napon vett párhuzamos mérések szemléltetése

### 6.3.3. „Kis intenzitású” komponensek több lépéses azonosítása

Az azonosítás során a legnagyobb kihívást a „kis intenzitású” komponensek jelentették (30. ábra), különösképpen azok, amelyek a kimutatási határérték körüli intenzitással rendelkeztek. Automatikus kiértékelő szoftverek ilyen „kis intenzitással” bíró komponensek esetén nem voltak használhatók megfelelően jó biztonsággal. A „kis intenzitású” komponensek csúcs alatti területeinek meghatározása során az integrálási algoritmus helytelenül akár több komponenst is egybe integrált, vagy az alapzajtól nem tudta elkülöníteni a jelet, tehát nem talált értékelhető csúcst. Ezekben az esetekben manuális dekonvolúciót alkalmaztam a komponensek megtalálásához. Eredményeimet megerősítendő, szintén az utolsó mérési napon megvizsgált negyedik párhuzamos leoltást használtam, amelynek kiértékelését az előzőekben leírtak szerint végeztem el. Ez esetben is rendelkezésemre állt az első három párhuzamos mérésből származó azonosítás találati százaléka, illetve a negyedik párhuzamos biztosabb, azaz magasabb találati százalékkal rendelkező azonosítása, így a komponenseket a négy párhuzamos mérés eredményei alapján határoztam meg.

A „kis intenzitású” komponensek kiértékelését több oldalról közelítettem meg. Először megvizsgáltam a komponens tömegspektrumát (háttérzaj lehetséges), majd a több pontról vett háttérzajokat kivontam a komponens tömegspektrumából, hogy minél kevésbé zavart tömegspektrumot kapjak, ami már jó megközelítéssel a komponensre jellemző fragmensekből állt. A 33. ábrán egy háttérkorrekciós eljárás látható, amelynek eredményeként a *beta-copane* vegyületet sikerült azonosítanom. Jóllehet a kivonás nélküli azonosítás során magasabb találati százalékkal (ID

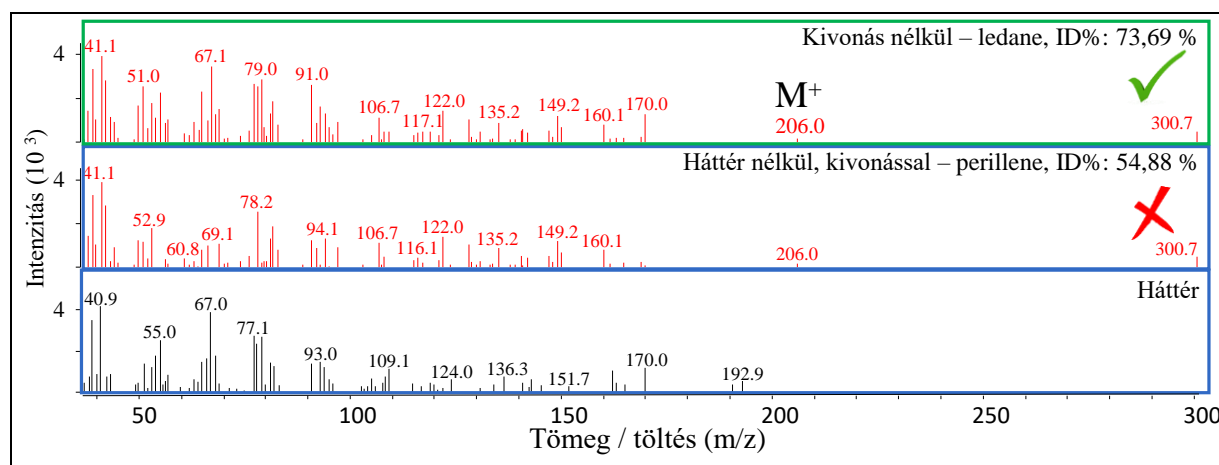
%) azonosítottam a *beta-caryophyllen* vegyületet, azonban a negyedik párhuzamos mérés (illetve a hosszabb mintavételi idő) alkalmazásával kapott eredményekkel igazoltam, hogy a 3,12 percnél érkező vegyület nem a korábban azonosított *beta-caryophyllen*, hanem a *beta-copane* (ID% = 86,2%).



**33. ábra:** 3,12 percnél eluálódó komponens azonosítása háttérkorrekció (kivonás) nélkül, illetve háttérkorrekcióval (kivonással). ID%: NIST könyvtárban kapott találati százalék.

✓ : helyes azonosítás, ✗ : helytelen azonosítás

Problémát jelentett azonban, hogy a „kis intenzitású” komponensek azonosítása során sokszor hibát követhetünk el ha háttérkorrekciót alkalmazunk, mint ahogy azt a 34. ábra mutatja.



**34. ábra:** 6,25 percnél eluálódó komponens azonosítása háttérkorrekció (kivonás) nélkül, illetve háttérkorrekcióval (kivonással). ID%: ID%: NIST könyvtárban kapott találati százalék.

✓ : helyes azonosítás, ✗ : helytelen azonosítás

„Kis intenzitású” komponensek azonosítása során gondot okozhat, hogy a vizsgálandó komponens fragmenseinek intenzitása nem sokkal nagyobb, mint a háttérben lévő zavaró fragmensek intenzitása, így a háttér tömegspektrum kivonásával elveszíthetjük a komponensből származó,

azonosításhoz nélkülözhetetlen fragmensionokat is a tömegspektrumról. Ebben az esetben előfordulhat, hogy azonosításként nem a megfelelő komponenst kapjuk, mint ahogyan a 34. ábrán is látható, a *perillene* (54,88 %) azonosítása esetén. Jelen esetben a helyes azonosításhoz (*ledane*) nem volt szükség háttérkorrekciós eljárásra. A komponens pontos meghatározásához ebben az esetben is a negyedik párhuzamos mérés során, hosszabb mintavételi idő után kapott mérési eredményeket vettem alapul.

Egyes esetekben a kismértékben koeluálódó komponensek azonosítása során is hasonló többlépéses háttérkorrekciót végeztem, azaz a több pontról vett háttérzajt kivontam a komponens tömegspektrumából a megfelelő azonosítás érdekében.

Ismeretlen vegyületek azonosításánál (*unknown screening*), a tömegspektrum elemzésekor jó kiinduló pontot jelenthet a molekulaion jelenléte (34. ábra), amelynek  $m/z$  értéke segíthet az azonosítási folyamatban. Tudván, hogy a szerves molekulák ionizációjára az ionforrásban 10-12 eV, míg gerjesztésre csupán néhány eV fordítódik a 70 eV-ből, addig a maradék többlet energia ( $\sim 50$  eV) a molekula fragmentációját eredményezi, amelyből a molekula szerkezetére lehet következtetni. Emiatt a legtöbb szerves molekula teljesen elfragmentálódik az ionforrásban, ám előfordulnak olyan molekulák is, amelyeknek gyökkationja, tehát egy elektronvesztéssel keletkező molekulaionja,  $[M^+]$  mégis látható a tömegspektrumban. A molekulaion jelenléte mellett további támpontként szolgálhat a vizsgált vegyület retenciós indexe (RI) is.

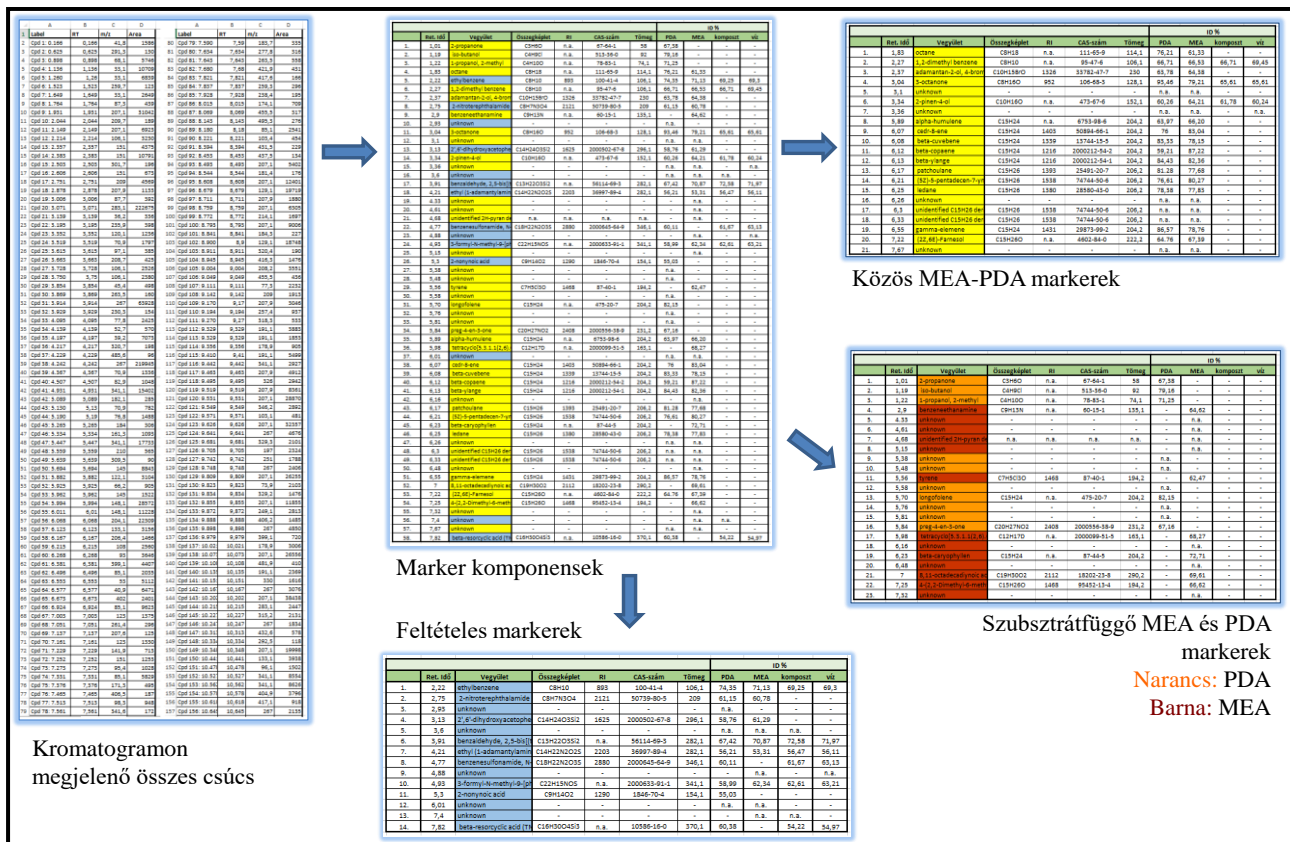
Az azonosításkor a NIST könyvtár bizonyos százalékkal (ID %) megadja, hogy a vizsgált molekula tömegspektruma milyen más vegyület tömegspektrumára hasonlít a legjobban a könyvtárban. A legtöbb vegyületnél található egy (vagy több) könyvtári retenciós index is, amely érték(ek) gázkromatográfiás oszlophoz és fűtési programhoz van(nak) rendelve (internet 4). A könyvtárban lévő RI értékeket összevettem az általam mért komponensek számolt RI értékével is az azonosítás megerősítése érdekében. A lineáris fűtési program szerint számolt retenciós index értékek számítása során kapott értékek helyenként eltérhetnek a NIST könyvtárban lévő retenciós index értékektől (főként annak számítási módja miatt), így a retenciós idők összevetése tájékoztató jellegű.

*Unknown screening* vizsgálatoknál további támpontként szolgálhat a nemzetközi szakirodalom ismerete is, ugyanis a tömegspektrumok vizsgálata során azokat az azonosítási találatokat könnyen kizárhatjuk, amely vegyületek egyáltalán nem jellemzők a vizsgált mintára, jelen esetben a penészgombákra.

## 6.4. *Trichoderma aggressivum* marker komponenseinek vizsgálata

### 6.4.1. Marker komponensek meghatározása, csoportosítása

A *Trichoderma aggressivum* zöldpenész vizsgálata során kezdetben az MVOC mintázatot vizsgáltam minden különböző tápagra történő leoltások esetében. Ezen kísérletet eredményeként összesen mintegy 150 komponenst találtam. Ezek közül a vegyületek közül kivettem azokat, amelyek a SPME szálról vagy az oszlopról érkeztek, tehát nem köthetők a mintához, és megkerestem azokat, amelyek kifejezetten a *Trichoderma aggressivum* jelenlétére utalnak (56 vegyület). Az 56 komponens között még mindig akadtak olyanok (12 vegyület), amelyeket nem tudtam egyértelműen a penész jelenlétéhez kötni (például egyes kontroll mérések is tartalmazták az adott vegyületet). Összességében végül 44 vegyületet soroltam a *T. aggressivum* marker komponensei közé, vagyis ezek azok a vegyületek, amelyek egyértelműen jelzik a *T. aggressivum* jelenlétét MEA, PDA, KA vagy VA táptalajokon. A 35. ábra a fent említett vegyületek meghatározásának sématicus folyamatábráját mutatja.



A kiválasztott 44 marker vegyületből 3 olyan vegyületet (*1,2-dimethyl benzene*; *3-octanone*; *2-pinen-4-ol*) találtam, amelyek táptalajtól függetlenül minden tenyésztett penész esetében megjelentek. A tápanyagban gazdag tápagarokon (PDA, MEA) történt leoltásnál már sokkal több közös marker vegyületet találtam; 18 olyan vegyületet sikerült azonosítanom, amelyek tápanyagban gazdag tápagarra leoltva jellemzik a vizsgált mikroorganizmust (7. táblázat, MEA-PDA markerek). A továbbiakban a fent említett 21 (3+18) vegyületre közös marker komponensként hivatkozom az egyértelmű terminológia érdekében.

A 21 közös markerkomponensen felül 10 olyan vegyületet találtam, amelyek csak a PDA tápagarra leoltott *T. aggressivum* fejlődése során termelődtek, illetve 13 olyan vegyületet, amelyek csak a MEA tápagaron tenyésztett penész esetében keletkeztek (7. táblázat, Szubsztrát függő markerek). Ezeket a vegyületeket táptalaj-/szubsztrát függő markerekként említem a továbbiakban.

Az azonosítás során az egyértelműség kedvéért minden vegyületet a NIST spektrumkönyvtár azonosítása alapján angol nevéen neveztem meg. Az azonosított vegyületek közül a 60 % feletti találati százalékkal (3 párhuzamos mérésből származó komponensek azonosítása során kapott találati százalékok átlaga) rendelkező vegyületeket fogadtam el.

A fent említett egyértelmű marker vegyületeken felül meghatároztam 12 olyan vegyületet, amelyek akár a penész jelenlétére is utalhatnak. Bizonyos párhuzamos mérések esetén megtaláltam ezeket a komponenseket, máskor viszont nem, néhol kis intenzitással a vak mintában is fellelhetők voltak vagy az azonosítás során 60% alatti találati százalékkal azonosítottam őket. Ezen „feltételes” marker vegyületek esetében a sikeres azonosításhoz további megerősítő vizsgálatok szükségesek.

**7. táblázat:** Marker vegyületek csoportosítása különböző tápagra (MEA, PDA, KA, és VA) történt leoltások szerint. \* jelöli azt az azonosítatlan vegyületet, amely a MEA és PDA táptalajon kívül a víz agaron is megjelent

Marker vegyületek			
	Szubsztrát függő markerek	MEA-PDA markerek (micéliumnövekedés)	Szubsztrát független markerek
PDA	<i>2-propanone; isobutyl chloride; 1-propanol, 2-methyl; longifolene; ismeretlen vegyületek (<math>t_R=5,38; 5,48; 5,58; 5,76; 5,81</math> és <math>5,84</math> perc)</i>	<i>octane; adamantan-2-ol, 4-bromo-, cis; alpha-humulene; cedr-8-ene; beta-cubebene; beta-copaene; beta-ylange; patchoulane;</i>	<i>1,2-dimethyl benzene; 3-octanone; 2-pinen-4-ol</i>
MEA	<i>tetracyclo[5.3.1.1(2,6).0(4,9)]dodecane; beta-caryophyllen; 8,11-octadecadiynoic acid, methyl ester; 4-(2,2-dimethyl-6-methylenecyclohexyl)butanal; azonosítatlan 2H-pirán származék (<math>t_R=4,68</math> perc); ismeretlen vegyületek (<math>t_R=4,33; 4,61; 5,15; 6,16; 6,48</math> és <math>7,32</math> perc)</i>	<i>(5Z)-5-pentadecen-7-yne; ledane; gamma-elemene; (2Z,6E)-farnesol; azonosítatlan <math>C_{15}H_{26}</math> származékok (<math>t_R=6,30</math> és <math>6,33</math> perc); ismeretlen vegyületek (<math>t_R=3,10; 3,36^*; 6,26</math> és <math>7,67</math> perc)</i>	
KA			
VA			
<b>„Feltételes” markerek:</b>			
<i>ethylbenzene; 2-nitroterephthalamide; ethyl (1-adamantylamino)carbothioylcarbamate; benzenesulfonamide, N-(bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-ylmethyl)-4-(5-oxo-3-pyrrolidinyl)-; 3-formyl-N-methyl-9-[phenylethynyl]dibenzo[2,3-a : 5,6-a'] (1,4)-thiazine; 2-nonynoic acid; beta-resorcylic acid; unknown (<math>t_R= 2,93; 3,60; 4,88, 6,01</math> és <math>7,40</math> perc)</i>			

Az azonosított anyagcseremarkereket összevettem a szakirodalmi adatokkal, olyan vegyületeket kerestem, amelyek már bizonyítottan *Trichoderma* spp. jelenlétére utalhatnak. Összesen hét olyan vegyületet találtam (*2-methyl-1-propanol; octane; ethylbenzene; 1,2-diethyl-benzene; 3-octanone; beta-elemene; beta-caryophyllene*), amelyek irodalmi adatok szerint is *Trichoderma* spp. jelenlétéhez köthetők. *Trichoderma* spp. nemzetségre jellemző további komponenseket Siddiquee és munkatársai publikálták le, akik 479 jellemző komponenst gyűjtöttek össze (Siddiquee 2014).

A további általam azonosított vegyületeket is összevettem a szakirodalmi adatokkal, amelynek eredményét a 8. táblázat mutatja. Megállapítottam, hogy a mérések során kapott illékony vegyületek egy részét korábban már azonosították más penészek esetén is, így ezek a vegyületek feltehetően nemzetségtől függetlenül penészes jelenlétre utalhatnak.

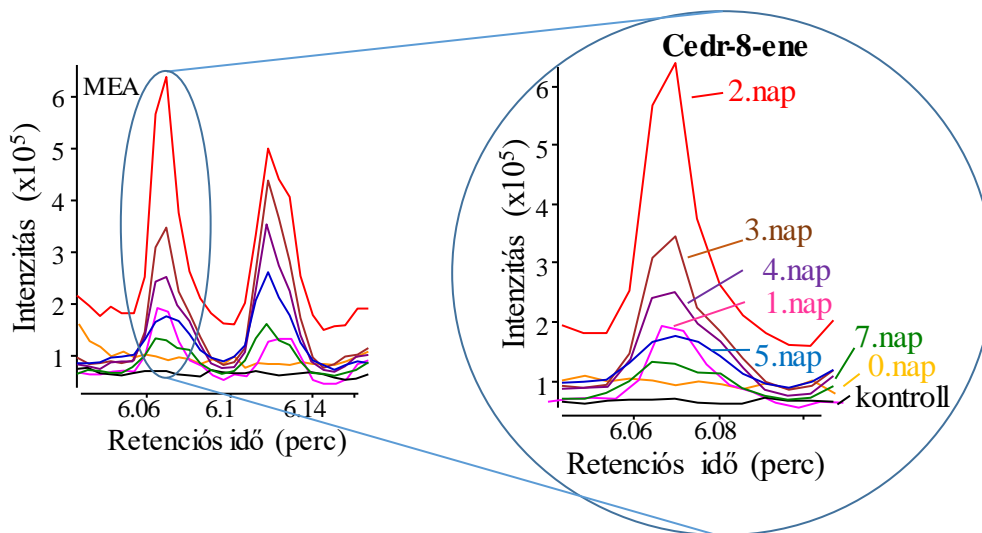


**8. táblázat:** Közös, penész jelenlétére utaló anyagcseremarkerek az irodalomban. A *Trichoderma* spp. anyagcseremarkerei vastagon szedve láthatók.

Vegyület	Mikroorganizmus	Forrás
<b>2-methyl-1-propanol</b>	<i>Penicillium chrysogenum</i> IBT 15996, <i>Stachybotris chartarum</i> IBT 14915, <b><i>T.viride</i> IBT 8866</b> , <i>Penicillium palitans</i> IBT 15899	(Wilkins et al. 2000)
	<i>Penicillium chrysogenum</i> IBT 15921	(Wilkins et al. 2003)
	<b><i>T. atroviride</i> CCM F536</b>	(Nemcovic et al. 2008)
	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Ulocladium chartarum</i>	(Van Lancker et al. 2008)
	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. brevicompactum</i>	(Matysik et al. 2009)
	common volatile compounds produced by fungi	(Morath et al. 2012)
<b>octane</b>	<i>Aspergillus versicolor</i> IBT16000	(Wilkins et al. 2000)
	<b><i>T. harzianum</i> FA1132</b>	(Siddiquee et al. 2012)
<b>ethylbenzene</b>	<b><i>T. harzianum</i> FA1132</b>	(Siddiquee et al. 2012)
<b>1,2-diethylbenzene</b>	<b><i>T. harzianum</i> FA1132</b>	(Siddiquee et al. 2012)
<b>3-octanone</b>	<i>Penicillium palitans</i> IBT 15899	(Wilkins et al. 2000)
	<i>Penicillium palitans</i> IBT 15899, <i>P. chrysogenum</i> IBT 15921	(Wilkins et al. 2003)
	<i>Penicillium expansum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Cladosporium cladosporoides</i>	(Matysik et al. 2008)
	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Penicillium variable</i>	(Van Lancker et al. 2008)
	<b><i>T. atroviride</i> CCM F536</b>	(Nemcovic et al. 2008)
	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Cladosporium cladosporoides</i>	(Matysik et al. 2009)
	<b><i>T. atroviride</i> ATCC 74058</b>	(Stoppacher et al. 2010)
<b><i>T. atroviride</i></b>		
	<i>Penicillium polonicum</i> , <i>Aspergillus ustus</i> , <i>Periconia britannica</i>	(Polizzi et al. 2012a)
<b>alfa/beta-copaene</b>	<i>Aspergillus ustus</i> , <i>Penicillium decumbens</i>	(Polizzi et al. 2012a)
<b>alfa-cububene</b>	<i>Aspergillus ustus</i>	(Polizzi et al. 2012a)
<b>alfa-ylangene</b>	<i>Aspergillus ustus</i>	(Polizzi et al. 2012a)
<b>beta-elemene</b>	<b><i>T. virens</i></b>	(Polizzi et al. 2012a)
	<i>Aspergillus ustus</i> , <i>Periconia britannica</i> , <i>Penicillium decumbens</i>	(Polizzi et al. 2012a)
<b>beta-caryophyllene</b>	<b><i>T. virens</i></b>	(Zhang et al. 2008)
	<i>Fusarium oxysporum</i> MSA 35	(Minerdi et al. 2011)
	általános penészek által termelt vegyület	(Morath et al. 2012)
	<i>Periconia britannica</i>	(Polizzi et al. 2012b)
<b>beta-cedrene</b>	<i>Periconia britannica</i>	(Polizzi et al. 2012b)
<b>beta-patchoulene</b>	<i>Penicillium roqueforti</i>	(Van Lancker et al. 2008)
	<i>Trametes versicolor</i>	(Drilling és Dettner 2009)
<b>beta-elemene</b>	<i>Penicillium roqueforti</i>	(Van Lancker et al. 2008)

### 6.4.2. Marker komponensek monitorozása

A sikeres azonosítást követően megvizsgáltam a talált marker vegyületek intenzitásának időbeli változását a hét napos vizsgálati időtartam alatt. Egy, a MEA és PDA tápagaron is termelődött marker vegyületen, a *cedr-8-ene* vegyületen mutatom be a komponens intenzitásának időbeli változását (36. ábra).



**36. ábra:** MEA (malátakivonatos agar) tápagar felületére oltott zöldpenész által kibocsátott *cedr-8-ene* vegyület intenzitásának változása a vizsgált napok függvényében

A leoltástól számított első napon már megjelent a TIC kromatogramon a *cedr-8-ene* vegyület, intenzitása nőtt a második napig, ahogy a penész is növekedett a tápagaron. Ezt követően intenzitás értéke folyamatosan csökkent, a hetedik napon már alig volt detektálható. Hasonló tendenciát lehetett megfigyelni a legtöbb marker vegyület esetében is. Voltak azonban ettől eltérő tendenciát mutató illékony marker komponensek is a monitorozás során. Az intenzitás értékek változásában bekövetkező tendenciák alapján az egyes marker vegyületeket különböző csoportokba soroltam (monoton növekvő, maximumot mutató, monoton csökkenő vagy fluktuáló tendenciát mutató).

#### 6.4.2.1. MEA-PDA és közös markervegyületek intenzitásváltozása

A 9. táblázat mutatja a PDA és MEA tápagarra oltott *T. aggressivum* által kibocsátott illékony anyagcseremarkereket, valamint a közös markereket, amelyek minden tápagarra oltott penésznél megjelentek. Ezen marker vegyületek nevét, retenciós idejét és retenciós indexét valamint az egyes vegyületekhez tartozó összegképletet, CAS-számot és molekulatömeget foglalja össze a következő táblázat.

**9. táblázat:** PDA és MEA táptalajra oltott *T. aggressivum* által kibocsátott (18 vegyület) illetve az összes tápagarra leoltott zöldpenész közös (3) marker vegyületei, ID%: azonosítás során kapott találati érték, RI 1.: retenciós index adatbázisból, RI 2.: számolt retenciós index, KA: komposzt agar, VA: vízagar. \* jelöli azt a két azonosítatlan C<sub>15</sub>H<sub>26</sub> származékot, amelyek tömegspektruma a melléklet 2.7. és 2.8. ábráján láthatók.

#	t <sub>R</sub> (perc)	név	összeg- képlet	RI 1	RI 2	CAS-szám	molekula tömeg	PDA ID%	MEA ID %	ID%	
										KA	VA
1	1,83	<i>octane</i>	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	n.a.	767	111-65-9	114,1	76	61	-	-
2	2,27	<i>1,2-dimethyl benzene</i>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	n.a.	848	95-47-6	106,1	67	67	67	69
3	2,37	<i>adamantan-2-ol, 4-bromo-, cis</i>	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> BrO	1326	864	33782-47-7	230	64	64	-	-
4	3,04	<i>3-octanone</i>	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	n.a.	962	106-68-3	128,1	94	79	66	66
5	3,10	<i>unknown</i>	-	-	970	-	-	-	-	-	-
6	3,34	<i>2-pinen-4-ol</i>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	n.a.	1003	473-67-6	152,1	60	64	62	60
7	3,36	<i>unknown</i>	-	-	1006	-	-	-	-	-	-
8	5,89	<i>alpha-humulene</i>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	n.a.	1358	6753-98-6	204,2	64	66	-	-
9	6,07	<i>cedr-8-ene</i>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1403	1390	50894-66-1	204,2	76	83	-	-
10	6,08	<i>beta-cubebene</i>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1339	1392	13744-15-5	204,2	83	78	-	-
11	6,12	<i>beta-copaene</i>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1216	1399	2000212-54-2	204,2	59	87	-	-
12	6,13	<i>beta-ylange</i>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1216	1401	2000212-54-1	204,2	84	82	-	-
13	6,17	<i>patchoulane</i>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub>	1393	1409	25491-20-7	206,2	81	78	-	-
14	6,21	<i>(5Z)-5-pentadecen-7-yne</i>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub>	1538	1418	74744-50-6	206,2	77	80	-	-
15	6,25	<i>ledane</i>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub>	1380	1426	28580-43-0	206,2	78	78	-	-
16	6,26	<i>unknown</i>	-	-	1428	-	-	-	-	-	-
17	6,30	* <i>unidentified C<sub>15</sub>H<sub>26</sub> derivatives</i>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub>	-	1437	-	206,2	-	-	-	-
18	6,33	* <i>unidentified C<sub>15</sub>H<sub>26</sub> derivatives</i>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub>	-	1443	-	206,2	-	-	-	-
19	6,55	<i>gamma-elemene</i>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1431	1489	29873-99-2	204,2	87	79	-	-
20	7,22	<i>(2Z,6E)-farnesol</i>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	n.a.	1652	4602-84-0	222,2	65	67	-	-
21	7,67	<i>unknown</i>	-	-	1779	-	-	-	-	-	-

A párhuzamos leoltások vizsgálata során kapott komponensek integrált csúcs alatti területeinek átlag értékeivel dolgoztam a továbbiakban. Ezen átlag értékeket vizsgáltam és ábrázoltam a leoltástól eltelt napok függvényében, ahol az eredmények alapján az egyes markereket ismét külön csoportokba rendeztem intenzitásváltozásuk alapján. A következő csoportosításban szereplő vastagon szedett vegyületek tápagartól függetlenül mindenhol megjelenő közös markerek.

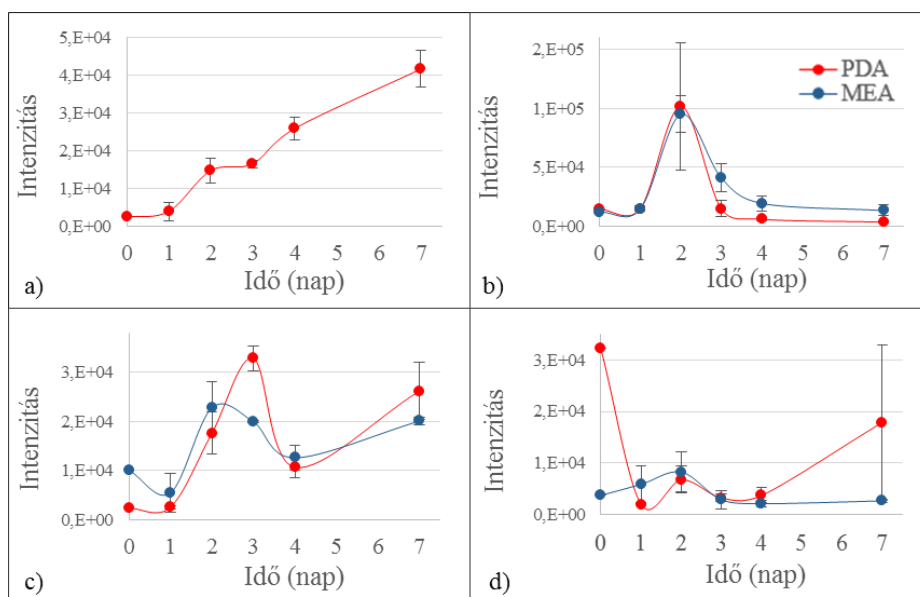
- Monoton növekvő intenzitásértéket mutató komponensek PDA tápagaron az *octane* (t<sub>R</sub>=1,83 perc) (37. ábra a) és a *3-octanone* (t<sub>R</sub>=3,04 perc).

- Második napi intenzitásmaximummal rendelkező vegyületek az *adamantan-2-ol, 4-bromo-, cis* (t<sub>R</sub>=2,37 perc); a *2-pinen-4-ol* (t<sub>R</sub>=3,34 perc); két ismeretlen (*unknown*) vegyület 3,36 percnél és 6,26 percnél, az *alpha-humulene* (t<sub>R</sub>=5,89 perc), a *cedr-8-ene* (t<sub>R</sub>=6,07 perc), a *beta-cubebene* (t<sub>R</sub>=6,08 perc), a *patchulene* (t<sub>R</sub>=6,17 perc) és a *ledane* (37. ábra b) (t<sub>R</sub>=6,25 perc), amelyek MEA és PDA tápagarok esetében is megjelentek. Ezen vegyületek termelődése az első napon elkezdődött, de

a második napon érte el a legnagyobb intenzitásértéket, ezt követően pedig folyamatosan csökkent a vegyületek intenzitása.

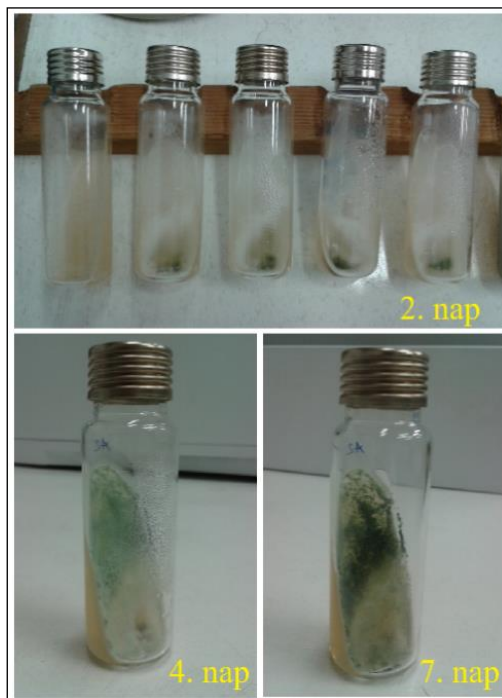
- Második-harmadik napi intenzitásmaximummal volt jellemezhető az *1,2-dimethyl-benzene* (37. ábra c) ( $t_R=2,27$  perc); a *beta-copaene* ( $t_R=6,12$  perc); a *beta-ylangene* ( $t_R=6,13$  perc); egy azonosítatlan  $C_{15}H_{26}$  származék (*unidentified  $C_{15}H_{26}$  derivatives*) ( $t_R=6,3$  perc); az (*5Z*)-5-pentadecen-7-yne ( $t_R=6,21$  perc); a (*2Z,6E*)-farnesol ( $t_R=7,22$  perc) és a *gamma-elemene* ( $t_R=6,55$  perc). Ebbe a csoportba olyan vegyületeket soroltam, amelyek intenzitásmaximuma a második vagy a harmadik napon volt, illetve azokat, amelyek intenzitásmaximum értéke nagy eltéréseket mutatott attól függően, milyen tápagarra (MEA/PDA) volt leoltva a penész. Egyes vegyületek gyorsabban és/vagy nagyobb mennyiségben szintetizálódtak különböző tápagarak esetén. Ebből arra következtettem, hogy ha egy adott vegyület korábban jelenik meg az egyik tápagarra oltott penész esetében, mint másik tápagarra oltott esetében, akkor az előbbi tápagaron feltételezhetően gyorsabb anyagcserét folytat a mikroba, a tápanyagok könnyebben hozzáférhetőek és hasznosíthatók a penész számára, így a szaporodása, telepfejlődése is felgyorsul.

- Változó, fluktuáló intenzitásváltozást mutatott két ismeretlen (*unknown*) vegyület ( $t_R=3,10$  (37. ábra d) és  $t_R=7,67$  perc), és egy azonosítatlan  $C_{15}H_{26}$  származék (*unidentified  $C_{15}H_{26}$  derivatives*) ( $t_R=6,33$  perc). Ezen vegyületek mérési eredményeihez általánosságban nagy szórás értékek is társultak.



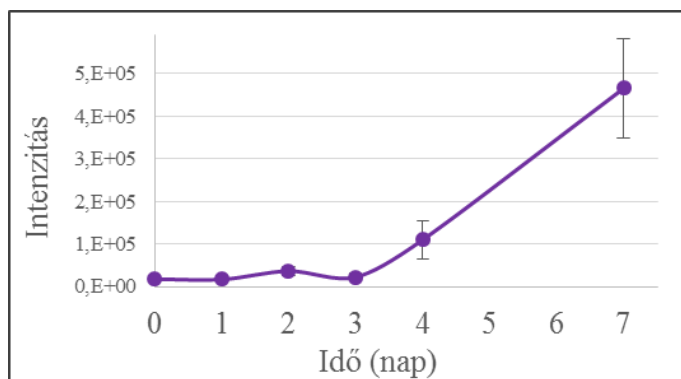
**37. ábra:** Marker vegyületek monitorozása közben tapasztalt intenzitásváltozások három párhuzamos átagérték alapján. a) monoton növekvő intenzitásérték, *octane* b) második napi intenzitásmaximum, *ledane*, c) második-harmadik napi intenzitásmaximum, *1,2-dimethyl-benzene* d) fluktuáló intenzitásváltozás, ismeretlen vegyület ( $t_R=3,10$  perc)

A monitorozás során figyelemmel kísértem a különböző tápagra oltott penészek növekedését is (38. ábra).



**38. ábra:** A zöldpenész növekedése MEA tápagon. Micéliumnövekedés a 2. napon, illetve spóráképződés a 4. naptól. Az utolsó fotó a monitorozás utolsó napján (7. nap) tapasztalt fejlődési állapotot mutatja be. (**Forrás:** saját fotó)

A kapott eredményekből és a megvizsgált zöldpenész növekedéséből arra a következtetésre jutottam, hogy a második és harmadik napon megjelenő marker vegyületek feltehetően a micélium növekedés szakaszában termelődtek, hiszen a második-harmadik napon volt leginkább tapasztalható a micéliumnövekedés is (38. ábra). A monoton növekvő intenzitású vegyületek közül azok, amelyek intenzitása a leoltástól eltelt 3. naptól kezdve ugrásszerűen nő (például *3-octanone*, 39. ábra), feltehetően a spóráképzéshez köthetők.



**39. ábra:** *3-octanone* markervegyület megjelenése a leoltástól számított harmadik naptól

## 6.4.2.2. Táptalajfüggő markerek és azok monitorozása

PDA táptalajfüggő anyagcseremarkerek

A PDA tápagarra oltott *T. aggressivum* tíz jellemző illékony anyagcseremarkert bocsátott ki (10. táblázat), amelyek csak erre a tápagarra oltott penész MVOC összetételében jelentek meg. A megjelenő marker vegyületek közül négyet sikeresen azonosítottam, ezek rendre a *2-propanone*; az *isobutyl chloride*; az *1-propanol, 2-methyl*; valamint a *longifolene*.

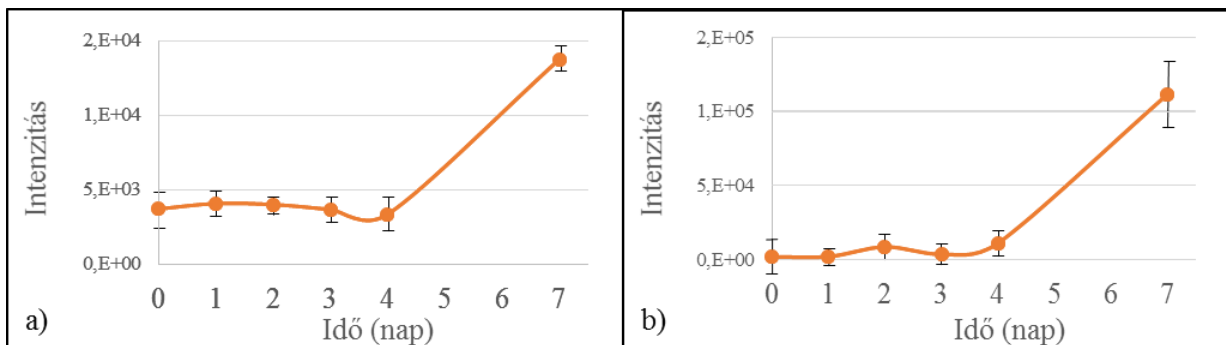
**10. táblázat:** PDA táptalajra oltott *T. aggressivum* által kibocsátott illékony anyagcseremarkerek.

ID%: azonosítás során kapott találati érték, RI: retenció index, n.a.: nincs adat

#	PDA							
	t <sub>R</sub> (perc)	név	összeg- képlet	RI adatbázis	RI számolt	CAS szám	molekula tömeg	ID%
1	1,01	<i>2-propanone</i>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	n.a.	-	67-64-1	58	67
2	1,19	<i>isobutyl chloride</i>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> Cl	n.a.	-	513-36-0	92	79
3	1,22	<i>1-propanol, 2-methyl</i>	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	n.a.	-	78-83-1	74,1	71
4	5,38	<i>unknown</i>	-	-	1276	-	-	-
5	5,48	<i>unknown</i>	-	-	1289	-	-	-
6	5,58	<i>unknown</i>	-	-	1303	-	-	-
7	5,70	<i>longifolene</i>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	n.a.	1324	475-20-7	204,2	82
8	5,76	<i>unknown</i>	-	-	1335	-	-	-
9	5,81	<i>unknown</i>	-	-	1344	-	-	-
10	5,84	<i>unknown</i>	-	-	1349	-	-	-

A PDA tápagarfüggő markereket is csoportosítottam a vizsgált időszakban bekövetkezett intenzitásértékeik alapján.

- Monoton növekvő intenzitásértéket mutattak az alábbi vegyületek: *2-propanone* (t<sub>R</sub>=1,01 perc); *longifolene* (5,70 perc); ismeretlen (*unknown*) (t<sub>R</sub>=5,48 perc) vegyület. A monoton növekvő komponensek ez esetben is jelezhetik a spóráképződés kezdetét, hiszen az 5,48 percnél eluálódó ismeretlen vegyületet (40. ábra a) és a *longifolene* (40. ábra b) marker vegyület is a leoltástól számított negyedik naptól mutatott jelentős intenzitásérték növeledést, éppen mikor a zöld spórák is megjelentek a leoltott penészen.



**40. ábra:** Monoton növekvő intenzitásértékeket mutató marker vegyületek.

a) ismeretlen vegyület ( $t_R=5,48$  perc), b) *longifolene*

- Második napi intenzitásmaximum volt jellemző az *isobutyl chloride* ( $t_R=1,19$  perc); és az *1-porpanol*, *2-methyl* ( $t_R=1,22$  perc) vegyületekre.
- Váltakozó, fluktuáló intenzitásváltozást mutatott a többi PDA markerként definiált vegyület, amelyek főleg ismeretlen vegyületek ( $t_R=5,38$ ;  $5,58$ ;  $5,76$ ;  $5,81$  és  $5,84$  perc) voltak.

#### MEA táptalajfüggő anyagcseremarkerek

A malátakivonatos tápagarra oltott *T. aggressivum* 13 különböző anyagcseremarkert bocsátott ki a vizsált időszakban. Az azonosítást nehezítette, hogy ezek a komponensek igen kis intenzitással ( $< 10^5$ ) rendelkeztek, még hosszabb mintavételi idő esetén sem tudtam sikeresen azonosítani minden anyagcseremarkert. Végül hat marker vegyületet sikerült azonosítanom, amelyeket a 11. táblázat foglal össze.

**11. táblázat:** MEA táptalajra oltott *T. aggressivum* által kibocsátott illékony anyagcseremarkerek.

ID%: azonosítás során kapott találati érték, RI: retenciós index

#	MEA							
	t <sub>R</sub> (perc)	név	összeg- képlet	RI adatbázis	RI számolt	CAS szám	molekula tömeg	ID%
1	2,90	<i>benzeneethanamine</i>	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N	n.a.	950	60-15-1	135,1	65
2	4,33	<i>unknown</i>	-	-	1133	-	-	-
3	4,61	<i>unknown</i>	-	-	1168	-	-	-
4	4,68	<i>unidentified 2H-pyran derivatives</i>	-	-	1176	-	-	-
5	5,15	<i>unknown</i>	-	-	1241	-	-	-
6	5,56	<i>tyrene</i>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>3</sub> O	1468	1300	87-40-1	194,2	62
7	5,98	<i>tetracyclo[5.3.1.1(2,6).0(4,9)]dodecane</i>	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> D	n.a.	1374	2000099-51-5	163,1	68
8	6,16	<i>unknown</i>	-	-	1407	-	-	-
9	6,23	<i>beta-caryophyllen</i>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	n.a.	1422	87-44-5	204,2	73
10	6,48	<i>unknown</i>	-	-	1474	-	-	-
11	7,00	<i>8,11-octadecadiynoic acid, methyl ester</i>	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	2112	1599	18202-23-8	290,2	70
12	7,25	<i>4-(2,2-dimethyl-6-methylenecyclohexyl)butanal</i>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	1468	1662	95452-13-4	194,2	67
13	7,32	<i>unknown</i>	-	-	1680	-	-	-

A MEA tápagarfüggő markereket is csoportosítottam a vizsgált időszakban mutatott intenzitásváltozásuk alapján.

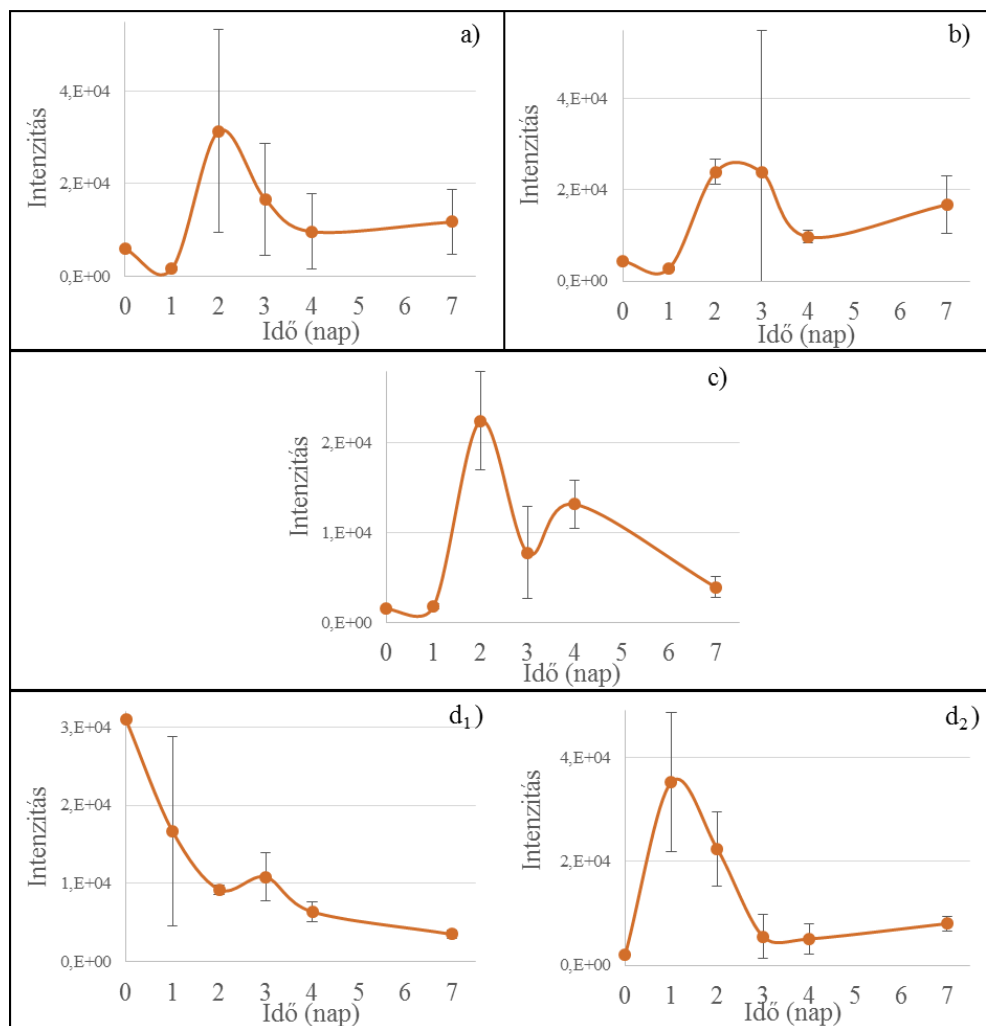
- Második napi intenzitásmaximum volt rendelhető a *benzeneethanamine*; három ismeretlen (*unknown*) vegyület (t<sub>R</sub>=4,33 perc, t<sub>R</sub>=5,15 perc és t<sub>R</sub>=6,16 perc) (41. ábra a); és egy azonosítatlan 2-H-pirán származék (*unidentified 2H-pyran derivatives*) (t<sub>R</sub>=4,68 perc) vegyületekhez. Szintén ide sorolható a *beta-caryophyllen* és a *tyrene* vegyületek, azonban esetükben némi fluktuáció is megfigyelhető a második napot követően.

- Második-harmadik napi intenzitásmaximum volt jellemző két ismeretlen vegyületre (*unknown*) (t<sub>R</sub>=6,48 (41. ábra b) és t<sub>R</sub>=7,32 perc), valamint a *4-(2,2-dimethyl-6-methylenecyclohexyl)butanal* vegyületre.

- Változó, fluktuálódó intenzitásváltozást mutatott a *8,11-octadecadiynoic acid, methyl ester* (41. ábra c). Ezen kívül, ahogy már említettem a *beta-caryophyllen* és a *tyrene* vegyületek esetén is megfigyelhető volt némi fluktuáció a második naptól kezdve.

- Egyéb intenzitásváltozás, nevezetesen monoton csökkenő intenzitás volt megfigyelhető egy ismeretlen (*unknown*) vegyület (t<sub>R</sub>=4,61 perc) (41. ábra d<sub>1</sub>) esetében, illetve első napi intenzitásmaximumot mutatott a *tetracyclo[5.3.1.1(2,6).0(4,9)]dodecane* (41. ábra d<sub>2</sub>) vegyület.





**41. ábra:** MEA tápagarra oltott *T. aggressivum* anyagcseremarkerinek intenzitásváltozása.

- Csoportosítás: a) második napi intenzitásmaximum (ismeretlen,  $t_R=4,33$  perc),  
 b) második-harmadik napi intenzitásmaximum (ismeretlen,  $t_R=6,48$  perc),  
 c) fluktuáló intenzitásváltozás (*8,11-octadecadiynoic acid, methyl ester*,  $t_R=7,00$  perc),  
 d<sub>1</sub>) monoton csökkenő intenzitásváltozás (ismeretlen,  $t_R=4,61$  perc),  
 d<sub>2</sub>) első napi intenzitásmaximum (*tetracyclo[5.3.1.1(2,6).0(4,9)]dodecane*,  $t_R=5,98$  perc)

A különböző csoportokba sorolt marker vegyületek a mikroorganizmus különböző növekedési fázisában jelentek meg. Ezek alapján arra következtettem, hogy az első napokban termelődött illékony anyagcseremarkererek főleg a zöldpenész micéliumnövekedése során termelődtek. A zöldpenész spóráképződéséhez köthetők azok a vegyületek, amelyek intenzitásmaximumukat a 3.-4. nap után értékék el.

### 6.4.2.3. „Feltételes” marker vegyületek

A 6.4.1. fejezetben leírtak alapján a biztosan marker vegyületeknek vélt komponenseken felül találtam 12 olyan vegyületet, amelyek akár a penész jelenlétére is utalhatnak: *ethylbenzene*; *2-nitroterephthalamide*; *ethyl (1-adamantylamino) carbothioylcarbamate*; *benzenesulfonamide*, *N-(bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-ylmethyl)-4-(5-oxo-3-pyrrolidinyl)-*; *3-formyl-N-methyl-9-[phenylethynyl]dibenzo[2,3-a: 5,6-a'] (1,4)-thiazine*; *2-nonynoic acid*; *beta-resorcylic acid*; *unknown (tR= 2,93; 3,60; 4,88, 6,01 és 7,40 perc)*

Bizonyos párhuzamos mérések esetén megtaláltam ezeket a vegyületeket, más esetekben viszont nem. Néhol kis intenzitással a vak mintában is fellelhetők voltak vagy az azonosítás során 60 % alatti találati százalékkal azonosítottam őket. Ezen „feltételes” marker vegyületek esetében a sikeres azonosításhoz további megerősítő vizsgálatok lehetnek szükségesek, akár statisztikai (főkomponens elemzés), akár analitikai (ismételt mérések, spektrumfejtés, dekonvolúció) oldalról is.

### 6.4.3. Marker komponensek vizsgálata módosított tápagon

A PDA és MEA tápagra leoltott *T. aggressivum* intenzív növekedéséből arra a következtetésre jutottam, hogy a penész nyilvánvalóan a tápanyagokban gazdag agaron fejlődött az elvártaknak megfelelően. A vízagaron nem számítottam különösebb telepképzésre, azonban a komposztos agaron elmaradt a várt mikroba szaporodás. Ez érdekes tapasztalat volt, tekintve, hogy a gombatermesztésben főként a gombakomposzton jelenik meg a zöldpenész betegség, tehát arra számítottam, hogy a komposztos agaron is jelentős növekedést fogok tapasztalni.

A PDA és MEA tápagra oltott penészek esetében néhány marker vegyület időben egymástól kisebb eltolódással érkezett (2. napi helyett 3. napi intenzitásmaximum), így arra a következtetésre jutottam, hogy a szénhidrátforrásbeli különbség és annak hozzáférhetősége okozhatta ezt az eltolódást. Ebből kiindulva a komposztos táptalajt különböző cukrok (mannit, maltóz, dextróz) hozzáadásával dúsítottam, és ezekre a módosított tápagarakra újra leoltottam a *T. aggressivumot*, majd ismét megvizsgáltam a megjelenő illékony anyagcseretermékeket. Irodalmi adatok alapján a mérésekhez olyan cukrokat használtam fel, amelyeket a penészgomba jól tud hasznosítani (Kubicek et al. 2003; Komon-Zelazowska et al. 2007). Végül szárított komposztból és dextrózból (PDA tápagra hasonló), valamint szárított komposztból és maltózból (MEA tápagra hasonló) készítettem táptalajokat, amelyeket kiegészítettem egy harmadik, szárított komposztból és mannitból

álló tápagarral (42. ábra). Ez utóbbit azért állítottam össze, hogy megvizsgáljam, milyen mértékben tudja hasznosítani a mikroba a cukoralkoholokat a mono- és diszacharidokhoz képest.



**42. ábra:** *Trichoderma aggressivum* fejlődése (balról) dextrózzal, maltózzal és mannittal dúsított komposztos tápagaron (**Forrás:** saját fotó)

A leoltást követően szintén hét napig vizsgáltam a zöldpenész növekedését. A várt gyors növekedés helyett azonban ismét zöld spóratelepek képződését tapasztaltam foltokban a tápagar különböző oldalain. Az eredeti, cukor nélküli komposztos tápagarhoz képest ugyan több vegyületet emittált a mikroba, de még mindig alulmúlta a várt mennyiséget.

Mindhárom módosított táptalajon megjelentek a *3-octanone*; a *3-octanol* és a *tyrene* vegyületek ( $t_R = 3,04$  perc;  $3,10$  perc és  $5,56$  perc), valamint a maltózzal dúsított táptalajon az *1,2-dimethyl benzene* ( $t_R = 2,27$  perc) és a *2-pinen-4-ol* ( $t_R = 3,34$  perc) is. Ezen komponensek közül a *tyrene* eddig csak a MEA tápagra oltott penész esetében volt tapasztalható, míg a  $3,10$  percnél érkező ismeretlen (*unknown*) marker vegyület mind a MEA, mind pedig a PDA tápagarakra oltott zöldpenész esetén megtalálható volt, amelyeket ebben a mérési sorozatban sikerült azonosítani *3-octanol* néven. Megállapítottam, hogy a módosított tápagra oltott penész további két olyan vegyületet emittált (*tyrene* és *3-octanol*), amelyek egyértelműen a *T. aggressivum* jelenlétéhez köthetők, tehát annak marker vegyületei.

### **6.5. Gombatermesztésben előforduló kártékony penészek MVOC adatbázisa**

HS-SPME-GC-MS kapcsolt technika segítségével létrehoztam egy olyan adatbázist (12. táblázat), amely az adott mikroorganizmusra jellemző anyagcseremarkereket tartalmazza. A táblázatban feltüntetett vegyületek neve mögött szerepel még azok retenció indeje/indexe, találati százaléka, jellemző fragmensionjainak tömege, esetleg a molekulaion tömege. Így az általam felépített

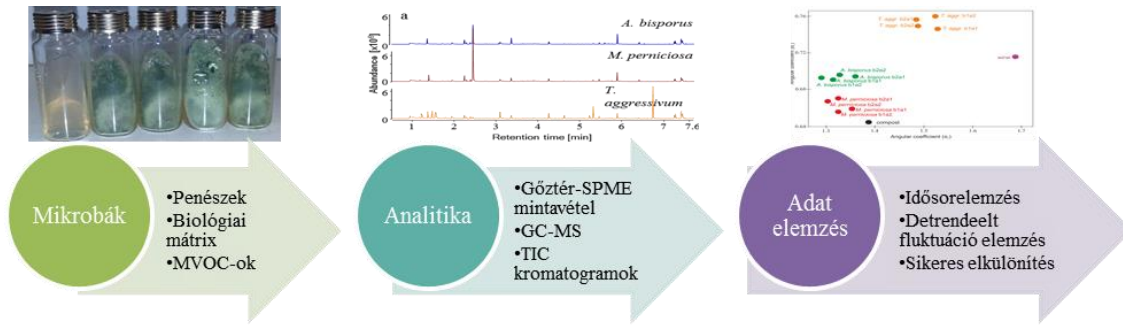
adatbázis jelen körülmények között teljesnek tekinthető. A táblázat segítségével a későbbi mérések során egy-egy fertőzés megjelenése gyorsan indikálhatóvá, esetleg (penészfaj szinten) azonosíthatóvá válik.

12. táblázat: Anyagcsere markerek adatbázisa a mikroorganizmusok és a leoltási táptalaj típusa szerint. PDA\_1 az első mérési kört, PDA\_2 a második mérési kört jelenti. PDA: burgonya-dextróz agar, MEA: maláta kivonat agar, KA: komposzt agar, VA: víz agar. A **szürkével kiemelt** vegyületek fellelhetők voltak az első és második PDA mérési körben is.

	PDA_1	PDA_2	MEA	KA	VA	
<i>Trichoderma aggressivum</i>	D-limonene; 4-nonanone; 2-nonanone; (3E)-3-ethylidene-3a-methyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-1H-indene; 1,1,4,4-tetramethyl-2,5-dimethylencyclohexane; 2-ethylidene-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane; 1,6,6-trimethyl-7-(3-oxobut-1-enyl)-3,8-dioxatricyclo[5.1.0.0(2,4)]octan-5-one; n-decanoic acid; furfuryl alcohol; icosapent; 6-pentyl-2H-pyran-2-one; 5,6-dihydro-6-pentyl-2H-pyran-2-one; tetrahydro-6-pentyl-2H-pyran-2-one; unidentified diterpenoid; unknown ( $t_R=2,21$ and $9,01$ min) <b>T. DOFE:</b> 2-methyl-1-propanol; 3-hydroxy-2-butanone; 3-methyl-1-butanol; unidentified alcohol (butanediol); 2,3-butanediol; unidentified pyran compound; cycloocta-2,4-dien-1-ol; (10R)-10-methyl-2-oxecanone; (R)-1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis-(1-methylethenyl)cyclohexane; (E)-12-methylloxacyclododec-9-en-2-one; (Z)-8-methyl-9-tetradecenoic acid; 3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarin; cedr-8-ene	2-propanone; isobutyl chloride; 1-propanol, 2-methyl; longifolene; unknown ( $t_R=5,38$ ; $5,48$ ; $5,58$ ; $5,76$ ; $5,81$ and $5,84$ min)	benzeneethanamine; tetracyclo[5.3.1.1(2,6).0(4,9)]dodecane; beta-caryophyllen; 8,11-octadecadiynoic acid, methyl ester; 4-(2,2-dimethyl-6-methylenecyclohexyl)butanal; unidentified 2H-pyran derivatives ( $t_R=4,68$ min), unknown ( $t_R=4,33$ , $4,61$ ; $5,15$ ; $6,16$ ; $6,48$ and $7,32$ min)	-	-	
		<b>PDA-MEA közös markerek:</b> octane; adamantan-2-ol, 4-bromo-, cis; alpha-humulene; cedr-8-ene; beta-cubebene; beta-copaene; beta-yllange; patchoulane; (5Z)-5-pentadecen-7-yne; ledane; gamma-elemene; (2Z,6E)-farnesol; unidentified $C_{15}H_{26}$ derivatives ( $t_R=6,30$ and $6,33$ min), unknown ( $t_R=3,36$ ; $6,26$ and $7,67$ min)				
		<b>Szubsztrát független markerek:</b> 1,2-dimethyl benzene; 3-octanone; 2-pinen-4-ol; tyrene; 3-octanol				
<i>Mycogone perniciosa</i>	unidentified alkane compound; unknown ( $t_R=4,49$ and $6,23$ min)	-	-	-	-	
<i>Lecanicillium fungicola</i>	cyclopentanone; 2-dodecanone; methyl 2-ethylhexanoate; unknown ( $t_R=6,63$ min)	-	-	-	-	
<i>Agaricus bisporus</i>	acetic acid; 1-chlorobutane; 3-octenone; triacetin; sinapinic acid	-	-	-	-	

Az adatbázis bővítéséhez további mérésekre lehet szükség esetlegesen még több felület (tápagar) vizsgálatával. A bővítés során egy-egy új vegyület felvétele hosszadalmas kiértékelési folyamatot igényel. Ebből adódóan a továbbiakban megoldást kerestem arra, hogyan tudnám kiváltani ezt a bonyolult, időigényes folyamatot.

## 7. EREDMÉNYEK. A GOMBATERMESZTÉSBN KÁRTÉKONY PENÉSZEK ELKÜLÖNÍTÉSÉNEK LEHETŐSÉGE DETRENDELT FLUKTUÁCIÓELEMZÉSSEL



Közlés:

Radványi D., Gere A., Sipos L., Kovács S., Jókai Zs., Fodor P. 2016. Discrimination of mushroom disease-related mould species based solely on unprocessed chromatograms. *JOURNAL OF CHEMOMETRICS*, 30(4), pp.197–202.

DOI: 10.1002/cem.2777 (IF: 1,50)

## 7.1. A detrendelt fluktuációelemzés módszerének ismertetése

Az előző fejezetekben bemutatott mérések kiértékelése bonyolult és sokszor időigényes. Abban az esetben, ha a mintákat csupán elkülöníteni szeretnénk, számos statisztikai módszer közül válogathatunk. Az alábbi fejezetben egy, az idősorelemzésen alapuló elkülönítési eljárást mutatok be. Első lépésben az eljárás alapjait ismertetem, hiszen a korábbi PCA és LDA módszerekhez képest a detrendelt fluktuáció elemzés (*detrended fluctuation analysis*, DFA) kevésbé ismert és nem igazán rutinszerűen alkalmazott eljárás sem az élelmiszeranalitika sem pedig a kemometria területén.

A detrendelt fluktuáció elemzés alapjait 1992-ben Peng és munkatársai fektették le (Peng et al. 1992) és fluktuációelemzés néven közölték. A DFA módszere azonban (ahogy neve is mutatja) kissé eltér a fluktuációelemzéstől mivel az idősorból eltávolítja a lokális trendeket. Az eredeti DFA négy lépésből áll. Tegyük fel, hogy adott egy  $N$  elemből álló, adott intervallumokban rögzített  $(x_i)$  idősor.

Az első lépésben meghatározzuk az idősor kumulatív összegeit (profiljait):

$$y_j = \sum_{i=1}^j x_i, (j=1, \dots, N) \quad \text{1. egyenlet}$$

Ebből fakadóan egy  $N$  értékből álló új sorozatot kapunk az 1. egyenletből, mivel az eredeti idősor első  $j$  elemének összege  $y_j/y_1 = x_1; y_2 = x_1 + x_2; y_3 = x_1 + x_2 + x_3$  és így tovább/.

A második lépésben a profilt adott,  $l$ -hosszúságú részekre osztjuk, így az  $s$  szegmensek maximális száma  $s = \left\lceil \frac{N}{l} \right\rceil$ , ahol  $f(x) = [x]$  adja az alsó egészrész függvényt (megadja az  $x$ -nél nem nagyobb legnagyobb integer értékét). Mivel  $N$  nem szükséges, hogy  $l$  egész számú többszöröse legyen, a legtöbb esetben a profil végén egy rövidebb szakasz marad. A problémát úgy lehet megoldani, hogy a folyamatot megismételjük a profil másik végéről is (együttesen  $2s$  szegmenst alkalmazunk).

A harmadik lépésben a profil lokális trendjeit számítjuk ( $y_r^{(FIT)}$ ) minden szegmensre külön-külön a legkisebb négyzetek illesztése alapján, ahol az  $r$  a  $k$ -adik szegmensben ( $k = 1, \dots, 2s$ ) található adott időpillanatot jelöli, ahogy az 1. egyenletben bemutattam. Legyen  $p$  az illesztett polinom foka. Ez alapján megadható az  $l$  szegmens hosszára az idősor detrendelt profilja:

$$z_r^{(p)} = y_r - y_r^{(FIT)} \quad \text{2. egyenlet}$$

Az illesztett polinomiális fok alapján a módszert DFA-1-nek (elsőfokú polinom) vagy DFA-2-nek (másodfokú polinom), illetve általánosan DFA- $p$ -nek nevezhetjük.

A negyedik lépésben minden  $l$ -hosszúságú  $k$  szegmens fluktuációja számítható az  $y_j$  profil varianciája alapján, a  $p$  polinom szerint (Peng et al. 1993; Peng et al. 1994; Kantelhardt et al. 2001):

$$\delta_k^{(p)} = \frac{1}{l} \sum_{i=1}^l \left[ z_{(k-1)l+i}^{(p)} \right]^2 \quad 3. \text{ egyenlet}$$

Végül az  $l$ -hosszon átlagoljuk az összes szegmenst, majd négyzetgyököt vonva megkapjuk az úgynevezett  $l$  és  $p$  szerinti DFA fluktuációt:

$$F_l^{(p)} = \sqrt{\frac{1}{2s} \sum_{k=1}^{2s} \delta_k^{(p)}} \quad 4. \text{ egyenlet}$$

A szögkoefficiensek megadásához definiáljuk az  $f(x)$  görbét, ahol  $x = \log_{10}(l)$ , tehát  $f(x) = \log_{10}(F_l^{(p)})$ . Ennélfogva egy elsőrendű, legkisebb négyzetek alapján illesztett polinomot számítunk  $f(x)$  értékeire az  $4 \leq l \leq 16$  alapján. Ennek az elsőrendű polinomnak a szögkoefficiense az  $\alpha_1$ . Ezt a lépést  $x$  értékeire ismételjük úgy, hogy  $16 \leq l \leq N$  (ahol  $N$  változó tartalmazza a beütésszámokat, hossza pedig 2012 esetünkben). Ennek a polinomnak a szögkoefficiensét pedig  $\alpha_2$ -nek nevezzük (Almeida et al. 2013). Amennyiben a hosszú és rövid távú exponensek ( $\alpha_1$  és  $\alpha_2$ ) értékei magasabbak mint 0,5, úgy hosszú távú memória található az idősorban.

2001-ben Kantelhardt és munkatársai (Kantelhardt et al. 2001) bemutatták azt a módosított DFA algoritmust, amely eltávolítja a skálázásból eredő eltéréseket, melyek erősebbek lehetnek magasabb rendű DFA rövid idősorokon történő alkalmazásakor. A DFA alkalmazásakor felléphetnek nemkívánatos hatások is. Amennyiben a jel hossza nem az ablak hosszának többszöröse, akkor legalább egy ablakban kevesebb minta lesz, mint a többiben és megszakítások keletkeznek a detrendelt jelen minden ablak szélén. Mindkét probléma kiküszöbölhető a „csúsztatott ablak” megközelítés alkalmazásával, amelyet Almeida és munkatársai mutattak be 2013-ban (Almeida et al. 2013).

A „csúsztatott ablakos” (*sliding window*) megközelítés alapján az eredeti DFA második lépésében a profilt szegmenseken átfedő  $l$ -hosszúságúra osztjuk, ahol  $s = N - l + 1$ . A negyedik lépésben a profil varianciája az alábbiak szerint számítható:

$$\delta_k^{(p)} = \frac{1}{l} \sum_{i=1}^l \left[ z_{(k-1)l+i}^{(p)} \right]^2 \quad 5. \text{ egyenlet}$$

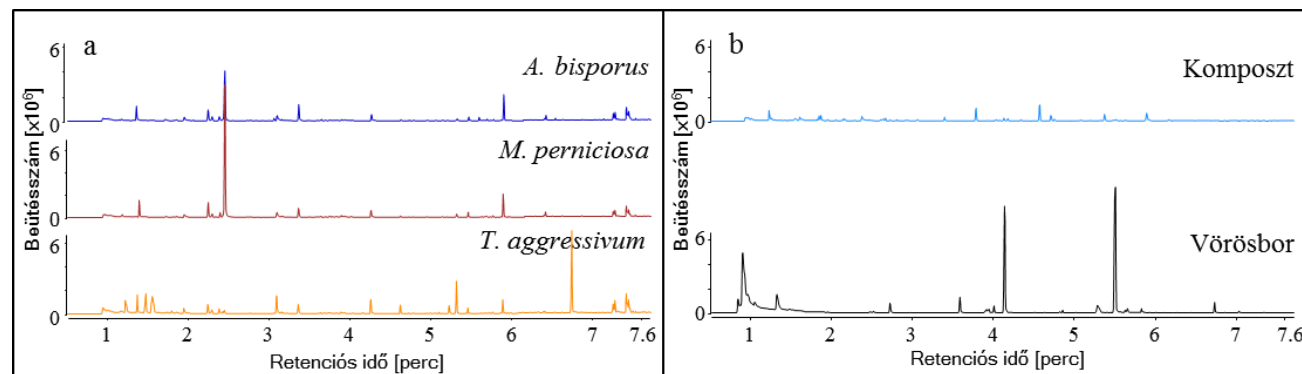
Nyilvánvalóan a DFA fluktuáció utolsó lépése csak a szegmensre lesz kiszámítva. Ennélfogva egy finomított trend jelet kapunk és a detrendelt jelből a megszakítások eltüntethetők. Kutatásomban a másodfokú polinom „csúsztatott ablakos” DFA módszert alkalmaztam. Jellegeből adódóan a DFA a

kromatogramokat idősorként kezeli; nem megfigyelésekből és változókból álló mátrixként, ahogy a főkomponens elemzés. Ennélfogva a DFA nem csak a két adathalmaz hasonlóságait és különbözőségeit vizsgálja, hanem információt szolgáltat a fluktuációkról, illetve arról is, hogy az adatok miként követik a hatványtörvényt. Euklideszi távolságot és Ward módszerét alkalmaztam a mintázatok, csoportok, hasonló elemek, kiugró adatok vizsgálatára. A csúsztatott ablakos DFA futtatása a Physionet statisztikai szoftverrel történt (Goldberger et al. 2000), a további számításokat az R-projekt 3.0.2 stats és cluster csomagjaival végeztem el.

## 7.2. Teljes ionkromatogramok (TIC) vizuális összehasonlítása

A különböző minták elkülönítése során első lépésben vizuálisan értékeljük a TIC kromatogramokat és megpróbáljuk kiszűrni azokat a komponenseket, amelyek az elkülönítésben szerepet játszhatnak. Ezt követően megtörténik a kiértékelés, ahol az elvárásainknak megfelelően megkeressük a két minta közötti különbségeket.

A 43. ábra a) része mutatja a vizsgált mikroorganizmusok mikrobiális eredetű illékony szerves vegyületeinek (*microbial volatile organic compound*, MVOC) mintázatát *A. bisporus*, *M. perniciosus* és *T. aggressivum* esetében.



**43. ábra:** a) TIC kromatogramok a vizsgált három mikroorganizmus (*A. bisporus*, *M. perniciosus* és *T. aggressivum*) esetében, b) A vizsgált kiugró minták (vörösbor, gombakomposzt) TIC kromatogramjai

A 43. ábra a) része alapján elmondható, hogy a három minta MVOC mintázata hasonló egymáshoz. Érdekes megjegyezni, hogy a három minta TIC kromatogramjának intenzitás tartománya megegyezik, így a kisebb intenzitású, ám mégis különbséget okozó (akár biomarkereket) komponenseket nehéz észrevenni, vagyis vizuális úton nehéz különbséget tenni a minták között, így



nem lehet nagy bizonyossággal meghatározni a marker vegyületeket. Ezáltal a minták azonosítása, elkülönítése nem valósítható meg. A minták kielégítő elkülönítéséhez sokszor időigényes feldolgozásra, adatok kinyerésére van szükség. Az MVOC vegyületeket el kell választani egymástól, majd megfelelő standardok segítségével azonosítani kell őket. Ha nem állnak rendelkezésre a megfelelő standard vegyületek, akkor tiszta komponens tömegspektrumok és tömegspektrum könyvtár segítségével is elvégezhető az azonosítás. Annak érdekében, hogy egy komponens esetén tiszta tömegspektrum álljon rendelkezésre dekonvolúciós algoritmust kell használni, illetve további tömegspektrum tisztítási eljárás is alkalmazható. A fent említett technikák mindegyike sokszor optimális beállításokat igényel, amelyek megvalósítása szintén igen időigényes. Egy általánosan használható kiértékelő folyamatot ír le Sági-Kiss Virág doktori disszertációjában (Sági-Kiss 2012), Stoppacher és munkatársai (Stoppacher et al. 2010), valamint Weingart és munkatársai (Weingart et al. 2012) publikációjukban. Abból a célból, hogy elkerüljem ezt a hosszadalmas és bonyolult kiértékelési eljárást, különböző statisztikai módszereket teszteltem a minták elkülönítésére. A 43. ábra b) része mutatja a kiugró minták VOC mintázatát, ahol jól látható a köztük lévő különbség. A vörösbor rendelkezik néhány igen jól elkülöníthető intenzív csúccsal, így a kiugró minták elkülönítése könnyebb feladat, akár vizuális módon is. Érdeemes megjegyezni azonban, hogy a másik kiugró minta (komposzt) TIC kromatogramján található, de szabad szemmel alig látható, kis intenzitású csúcsok jelentősen megnehezítik a kiértékelési feladatot.

A fent leírtakból adódóan az egyes minták összehasonlító/elkülönítő elemzése során érdemes a különböző statisztikai módszerek kínálta lehetőségek közül kiválasztani azt, amelyik a legjobban megfelel a céljainknak.

### ***7.3. Idősorelemzés detrendelt fluktuációelemzés segítségével***

Az elemzési idő rövidítése érdekében különböző statisztikai módszereket használtam a még nyers, ki nem értékelt TIC kromatogramokon. Első lépésben detrendelt fluktuáció elemzést alkalmaztam az adatokra. Mivel a DFA nem egy hagyományos kiértékelési eljárás, ezért az eredményeket egy sokkal ismertebb és megszokottabb statisztikai módszerrel, a főkomponens elemzéssel (PCA) validáltam.

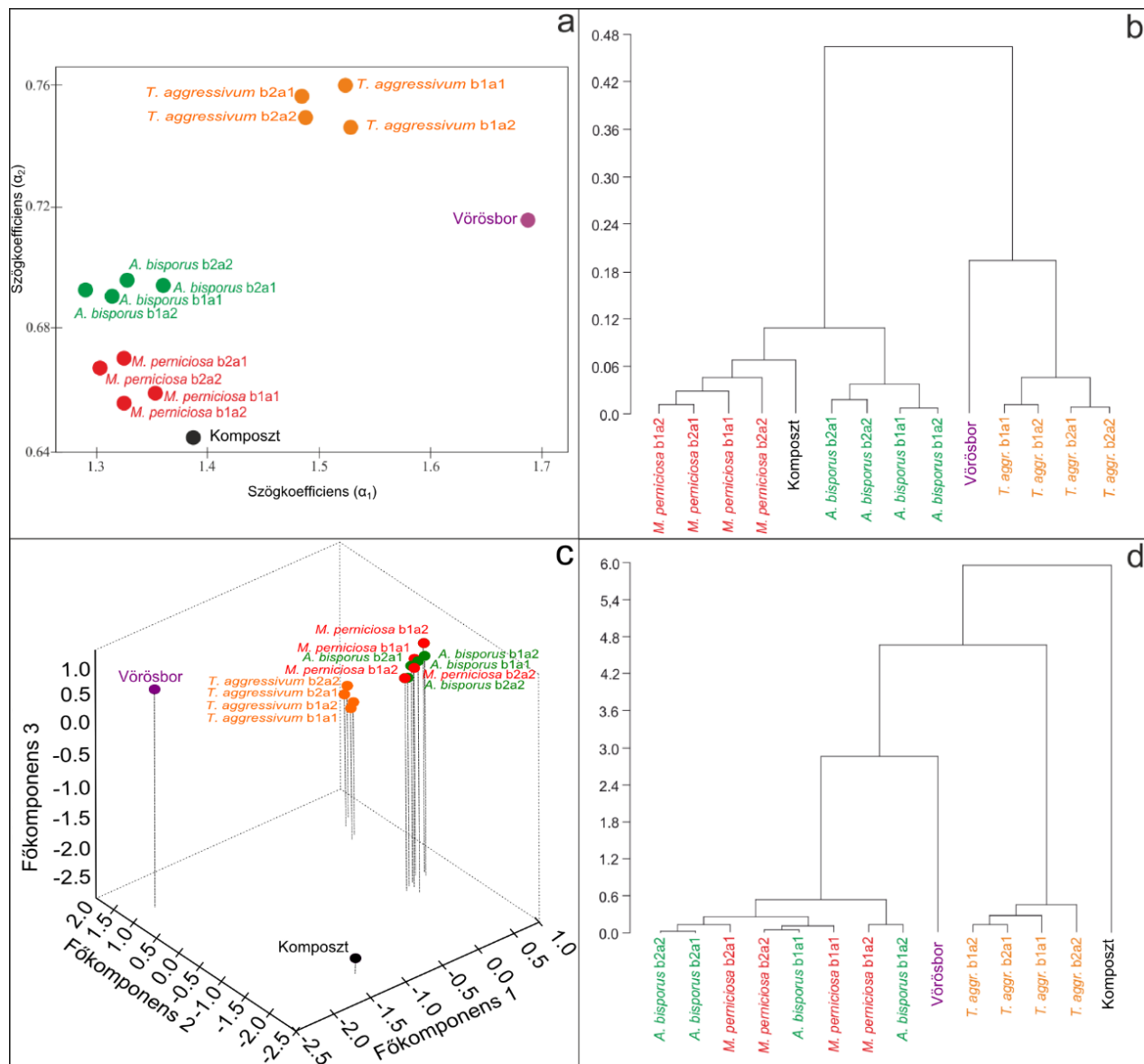
A PCA futtatása előtt a változók standardizálása érdekében autószkálázást és centrálást alkalmaztam. Az autószkálázás (vagy z-transzformáció) során a változó minden mintaeleméből kivonjuk a mintaelemek átlagát, majd osztjuk a változó szórásával az alábbi képlet alapján:

$$z = \frac{X_i - \bar{X}}{SD} \quad \text{6. egyenlet}$$

, ahol  $X_i$  a vizsgált mintaelem. Centrálás során pedig a változó minden mintaeleméből kivonjuk a mintaelemek átlagát.

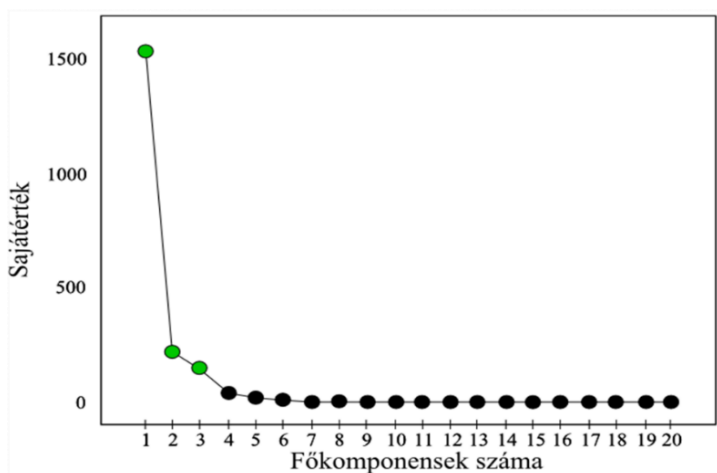
Mindkét alkalmazott módszerrel (DFA, PCA) kétdimenziós ábrákat lehetett létrehozni, amelyeket csupán vizuális úton nem lehetett megfelelően nagy biztonsággal összehasonlítani. Ebből adódóan klaszter elemzést (*cluster analysis*, CA) futtattam mind a PCA szkórokra (*scores*), mind pedig a DFA koefficiensekre (*coefficients*). Az ilyen módon kapott dendrogramok már elegendő információt szolgáltatottak a két módszer megbízható összehasonlításához, tehát a DFA validálásához.

DFA módszert használtam a hosszú ( $\alpha_1$ ) és a rövid ( $\alpha_2$ ) távú exponensek előállításához, „csúsztatott ablak megközelítést” használva, ahogy azt a 7.1. fejezetben részletesen leírtam. Az  $\alpha_1$  és  $\alpha_2$  exponensek ábrázolásával egy kétdimenziós teret kaptam, amelyet a 46. ábra a) része mutat. Ezen vizsgáltam a hasonlóságokat és az eltéréseket az egyes vizsgált minták között. A kiugró minták közül a komposzt a bal alsó negyedben, míg a vörösbors a jobb oldalon található az ábrán. A penészek közül a *T. aggressivum* az ábra felső felében, míg a *M. perniciosus* és a csiperkegomba (*A. bisporus* micéliuma) együtt a bal alsó negyedben található, ahol az utóbbi két minta szintén elkülönül egymástól. A módszerrel tehát a minták jól elkülöníthetők (szemrevételezéssel), továbbá mind az analitikai, mind a biológiai párhuzamosok közel vannak egy-egy mintán belül, ahogy arra számítottam.



**44. ábra:** Az egyes minták elhelyezkedése a) kétdimenziós térben, melyeket  $\alpha_1$  és  $\alpha_2$  exponensekkel állítottam elő DFA esetében és c) három dimenziós térben, melyeket PCA szkórok segítségével állítottam elő. b)  $\alpha_1$  és  $\alpha_2$  exponensekre, míg d) PCA szkórokra futtatott klaszter elemzés dendrogramja. A minták neve mögött található “b” jelzi a biológiai, míg “a” az analitikai ismétléseket.

A DFA által adott csoportosítást ezután összevettem a PCA eredményeivel. A főkomponenseket (PC) az összes magyarázott variancia alapján választottam (PC1 = 75,98 %, PC2 = 11,13 %, PC3 = 7,55 %, tehát az összes magyarázott variancia: 94,66 %). A PCA hegyomlás diagramját a 45. ábra mutatja, ami magyarázza a főkomponensek számának választását.



**45. ábra:** PCA hegyomlás diagramja, ami segít a főkomponensek számának kiválasztásában.

A PCA eredmények azt mutatják, hogy a kiugró minták (vörösbor minta, komposzt minta) jól elkülönültek (44. ábra c). Az *A. bisporus* és *M. perniciosus* minták azonban közel kerültek egymáshoz az ábrán, a minta csoportok átlapolnak nem csak az első kettő, de az első három főkomponens mentén is (melléklet 2.9. ábra). A *T. aggressivum* penészminták a 44. ábra c) részén a diagram közepén helyezkedtek el, jól elkülönülve a többi mikroorganizmustól. Összességében ez annyit jelent, hogy a PCA jó elkülönítést adott a kiugró mintákra és a *T. aggressivum* mintára, köszönhetően azok jelentősen eltérő TIC kromatogramjainak. Ugyanakkor, mint ahogy említettem nem tudta elkülöníteni a csiperkegombát (*A. bisporus*) a másik gombafertőző penésztől (*M. perniciosus*). A 44. ábra a) és c) részét összehasonlítva megállapítható, hogy összességében a DFA jobb csoportosítást biztosított a minták elkülönítésére, alkalmazásával az összes minta jól elkülönült. Ezzel szemben a PCA nem tudott két mintát megfelelő biztonsággal elkülöníteni, viszont jobban kiemeli a különbségeket a komposzt és más minták között, mint a DFA.

Klaszter elemzést használtam a kapott eredmények egyszerűsítésére, értelmezésére, amelynek eredményeit a 44. ábra b) és d) része mutatja. A DFA koefficiensekre futtatott CA azt mutatja, hogy a kiugró adatok máshogy csoportosultak mint a többi minta, de ezen felül az ugyanabba a csoportba tartozó mintákat egy klaszterbe sorolta. Ebben az esetben tehát az *A. bisporus* jól elkülönült a két, gombát leginkább fertőző penésztől, továbbá a kiugró adatok eredményei biztosítanak róla, hogy a módszer megbízható.

Az 44. ábra d) része mutatja a kiválasztott három főkomponens szkórjaira futtatott CA eredményeit. Mind a kiugró adatok, mind pedig a *T. aggressivum* minták külön klaszterbe kerültek

(köszönhetően jelentősen különböző TIC kromatogramjuknak), azonban az *A. bisporus* és *M. perniciosus* minták elkülönítése ebben az esetben sem volt sikeres.

Mivel a vizsgált minták száma alacsony volt, ezért felügyelt módszereket, úgy mint lineáris diszkriminancia elemzést (*linear discriminant analysis*, LDA) vagy parciális legkisebb négyzetek alapján történő diszkriminancia elemzést (*partial least squares discriminant analysis*, PLS-DA) nem tudtam alkalmazni.

Megállapítottam, hogy a DFA jól elkülönítette a mintákat, míg a PCA nem tudott megfelelően különbséget tenni az *A. bisporus* és a *M. perniciosus* penész minták között. A DFA módszere tehát alkalmasabbnak bizonyult kiértékeletlen, feldolgozatlan teljes ion kromatogramok alapján történő gyors elkülönítésre, mint a PCA. Kísérleteim során bizonyítékot nyert tehát, hogy a fentiekben ismertetett statisztikai módszerek segítségével lehetőség nyílik a minták gyors elkülönítésére, akár online módon is, kiváltva ezáltal az időigényes, bonyolult kiértékelési lépéseket.

## KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Doktori munkám során egy olyan analitikai módszer kidolgozására törekedtem, amely a gombatermesztésben kártékony penészek indikálására képes a minta feletti légtérből. A kidolgozott módszer alkalmazásával lehetővé vált a gombakomposzt előállításánál előforduló kártékony mikroorganizmusok által kibocsátott illékony vegyületek feltérképezése, azonosítása.

Az egyes, penészekre egyedileg jellemző marker vegyület mintázatok ismeretében lehetőségünk nyílik a mikrobák azonosítására, egymástól való elkülönítésére. Az alkalmazott kapcsolt technika különböző kemometriai módszerekkel az egyes penészek elkülönítésére, csoportosítására, azok „életkorának” megfelelő előrejelzésére alkalmas.

Pontos tömegmérésen alapuló analitikai eljárásokkal a módszer fejleszhető, nagy felbontású készülékek bevonásával az azonosítás pontossága javítható, míg ugyanezen készülékek rutin analízisbe töretető bevonása szintén jelentős előrelépés lehet a jövőben.

Munkám során létrehoztam egy olyan adatbázist, amelyet online rendszerekbe integrálva a komposzt feletti légtér monitorozása során a penészes jelenlét kimutatására alkalmazható. Az adatbázis bővítésével - például további mikroorganizmusok illékony marker vegyületeinek hozzáadásával - a penészes romlás széles körben kimutathatóvá válik az élelmiszeripar bármely területén.

A kidolgozott HS-SPME-GC-MS módszer alkalmas lehet továbbá különböző élelmiszer hamisítások kimutatására. Példaként említeném az aszú borokkal kapcsolatos problémakört. Az aszú borok előállításánál nélkülözhetetlen ugyanis a *Botrytis cinerea* penész a szőlőszemekben, amely a szőlőszem aszúsodását idézi elő. Amennyiben a környezeti paraméterek nem megfelelőek a penész számára, elmarad az aszúsodás folyamata, vagyis az adott évből származó aszú boroknak feltüntetett termék minősége kérdéses. A szesziparban további alkalmazási terület lehet a penészes gyümölcsökből készült párlatok azonosítása is.

Mindezekon felül a technika nem csak az élelmiszeriparban megjelenő penészek detektálására alkalmas. Számos nemzetközi kutatócsoport foglalkozik az úgynevezett beteg épület szindrómát (*Sick Building Syndrome*, SBS) okozó beltéri penészek vizsgálatával. Nem megfelelő minőségű beltéri levegő, légkondicionáló penészesedése, falon meglepedett penészek, stb. mind kimutathatók ezzel

az eljárással. A módszer tehát kiterjeszhető az élelmiszer vizsgálatokról a környezet monitorozására is, ezáltal megelőzhető lehet számos egészségre káros betegség (például allergia és asztma) kialakulása.

A HS-SPME-GC-MS technika felkeltette egy új terület, az orvostudomány, érdeklődését is. A legfrissebb kutatásokban a különböző emberi testen/testben elszaporodott mikroorganizmusok kimutatását vizsgálják leheletből, vizeletből. A lehelet vizsgálatával a torokban, garatban illetve gyomorban vagy az ezeket összekötő emésztőrendszerben megtapadt és elszaporodott mikrobákat lehet kimutatni (például fogszuvasodás vagy cukorbetegség detektálása). Különböző bőrgombásodást okozó mikroorganizmusok (például *Trichophyton rubrum* vagy *Candida intertrigo*) kimutatására is alkalmassá válhat a technika megfelelő adatbázis kiépítése után. Az egészségügyben ezáltal gyorsabban ki lehet mutatni a fertőzéseket, mint a több napos mikrobiológiai tenyésztéses eljárások alkalmazásával.

Doktori munkám célja általánosságban az volt, hogy különböző eljárásokat, illetve azok kombinációit dolgozzam ki penészes fertőzések megjelenésének detektálására. A kidolgozott eljárások mindegyike adaptálható akár az élelmiszeripar, akár a környezetkémia vagy az orvostudomány bizonyos területeire, kiváltva a jelenleg rendelkezésre álló, sokszor több napig is tartó mikrobiológiai tenyésztéses vizsgálatokat.

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1) Kidolgoztam egy gyors, szilárd-fázisú mikroextrakciós mintavételi technikával kombinált gázkromatográfiás tömegspektrometriai (HS-SPME-GC-MS) eljárást, amellyel kimutatható bizonyos penészek jelenléte gombakomposzt előállító és gombatermelő üzemekben. A módszerfejlesztés során egy új eljárást, nevezetesen a memóriaeffektuson alapuló retenciós idő standard használatát vezettem be.

2) Meghatároztam a gombatermesztésben előforduló három kártékony penész (*Trichoderma aggressivum*, *Mycogone perniciososa* és *Lecanicillium fungicola*) mikrobiális eredetű illékony szerves anyagcseretermékeit (MVOC), továbbá az egyes vizsgált penészekhez köthető MVOC mintázatot *in vitro* körülmények között. PLS-R statisztikai eljárás alapján előjelzést dolgoztam ki, amely az MVOC vegyületek alapján alkalmas a penészes fertőzés „korának”, azaz a leoltástól eltelt napok számának meghatározására.

1)-2) Közlés:

Radányi D., Gere A., Jókai Zs., Fodor P. 2015. Rapid evaluation technique to differentiate mushroom disease-related moulds by detecting microbial volatile organic compounds using HS-SPME-GC-MS. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY*, 407(2), pp.537–545. (IF: 3,436)

3) Meghatároztam a gombatermesztésben legfőbb kártevő penész (*Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*) növekedése során termelt táptalajfüggő, ujjlennyomatszerű MVOC mintázatát, valamint feltérképeztem a vizsgált penész különböző szénhidrátforrású tápagon történő illékony anyagcseremarker kibocsátását.

Közlés:

Radányi D., Juhász L., Jókai Zs., Geösel A., Fodor P. (2015) Analysis of microbial volatile organic compounds emitted by *Trichoderma aggressivum* growing on different substrata, 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis pp. 204., Prague: University of Chemistry and Technology (UCT), 2015. (ISBN:978-80-7080-934-1)

Juhász L., Radányi D., Jókai Zs., Fodor P. (2015) Determination of volatile metabolite markers using HS-SPME-GC-MS technique. *Proceedings of the 21st International Symposium on Analytical and Environmental Problems* pp. 296., Szeged: Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék (ISBN:978-963-306-411-5)



4) Meghatároztam a gombatermesztésben kártékony három vizsgált penész (*Trichoderma aggressivum*, *Mycogone pernicioso* és *Lecanicillium fungicola*) marker vegyületeit – összesen közel 80 vegyületet –, amelyek minden esetben egyértelműen jelzik az adott mikroba jelenlétét. Ezt követően létrehoztam egy olyan szerves illékony anyagcseremarkerekből álló adatbázist, amely segítségével a hasonló körülmények között vizsgált penészek jelenléte könnyen előrejelezhető a minta feletti légtérből.

*Közlemény szerkesztés alatt:*

*Radványi D., Juhász L., Jókai Zs., Fodor P. Examination of *Trichoderma aggressivum*'s metabolomic pathways on four different substrata*

*Célfolyóirat: Talanta (IF: 3,545)*

5) Kidolgoztam egy új eljárást, amely segítségével a feldolgozatlan (kiértékeletlen) teljes ion kromatogramok összehasonlítása alapján különíthetők el az egyes vizsgált penész minták. Megállapítottam, hogy bonyolult és időigényes kiértékelési folyamat nélkül időszerelemzést alkalmazva az egyes minták megkülönböztethetők, ezáltal a kidolgozott módszer integrálhatóvá válik a légtér folyamatos monitorozását végző online rendszerekbe.

*Közlés:*

*Radványi D., Gere A., Sipos L., Kovács S., Jókai Zs., Fodor P. 2016. Discrimination of mushroom disease-related mould species based solely on unprocessed chromatograms. JOURNAL OF CHEMOMETRICS, 30(4), pp.197–202. DOI: 10.1002/cem.2777 (IF: 1,50)*

*Radványi D., Gere A., Sipos L., Kovács S., Jókai Zs., Fodor P. (2015) Application of HS-SPME-GC-MS combined with detrended fluctuation analysis to distinguish mould species, pp. 18. Conferentia Chemometrica, 2015. Budapest, MTA Természettudományi Kutatóközpont, (ISBN:978-963-7067-31-0)*

## ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során a gombatermesztésben kártékony penészek illékony anyagcseremarkereinek detektálására és monitorozására alkalmas HS-SPME-GC-MS módszert dolgoztam ki. A mérések során standard mix oldat alkalmazásával memóriaeffektuson alapuló retenciós idő standard módszer használatát dolgoztam ki, ahol a mintavevő rendszer négy napig volt képes emlékezni a különböző alkán standardokra.

A fejlesztett eljárás alkalmazásával meghatároztam és azonosítottam a gombatermesztésben előforduló kártékony penészek (*Trichoderma aggressivum*, *Mycogone perniciosus*, *Lecanicillium fungicola*) és a csiperkegomba illékony szerves vegyületeit (MVOC); meghatároztam a penészekre egyedileg jellemző úgynevezett marker komponenseket. Ezen vegyületek monitorozása során nyomonkövettem azok intenzitásérték változását, majd meghatároztam ennek a penészek növekedésével való kapcsolatát. Megállapítottam, hogy a *Trichoderma* fajok főként a zöldspóra képződésével, míg a nedves és száraz mólé penészek a micélum növekedésével összefüggésben bocsátották ki a legtöbb marker vegyületet.

Elvégeztem a különböző penészek közös MVOC vegyületeinek elemzését főkomponens elemzéssel; az első főkomponens a napok szerinti eltéréseket, míg a második főkomponens a minták közötti különbségeket magyarázza. A főkomponensekben szerepet játszó változók vizsgálata során meghatároztam, hogy mely MVOC vegyületek felelősek a minták közötti különbségekért. A minták és a leoltástól eltelt napok számának elkülönítését lineáris diszriminancia elemzéssel végeztem el. A leoltástól eltelt idő becsléséhez parciális legkisebb négyzetek elvén alapuló regressziós modellt használtam, melynek eredményeként az egyes penészek „életkora” előrejelezhető.

A *T. aggressivum* f. *europaeum* metabolomikájának vizsgálata során meghatároztam a zöldpenészre jellemző MVOC mintázatot, majd definiáltam az egyes marker vegyületeket. Ezen vegyületek nagyságrendileg különböző intenzitásértékei miatt különböző – intenzitásértéktől függő – eljárásokat dolgoztam ki a megfelelő kiértékelés céljából.

A kiválasztott marker vegyületek közül meghatároztam a táptalaj független (3 marker), a tápanyagban gazdag tápagarokra jellemző (18 marker), illetve a táptalaj-függő/szubsztrát-függő (10 marker PDA tápagaron, 13 marker MEA tápagaron) marker vegyületeket. A sikeres azonosítást és csoportosítást követően megvizsgáltam a marker vegyületek intenzitásának időbeli változását és

annak négy különböző tápagra oltott zölpenész növekedési fázisaival (micéliumképzés, zöld spóra termelés) való kapcsolatát.

A vizsgálatok eredményei alapján létrehoztam egy olyan adatbázist, amely az adott mikroorganizmusokra jellemző anyagcseremarkereket tartalmazza.

A vizsgált penészek azonosítása és egymástól való elkülönítése céljából kemometriai eljárást (csúsztatott ablakos detrendelt fluktuáció elemzés, DFA) alkalmaztam a „nyers”, kiértékeletlen teljes ion kromatogramokon (TIC). Mivel a DFA nem egy hagyományos kiértékelési eljárás, ezért az eredményeket főkomponens elemzéssel (PCA) validáltam. A főkomponens szkórok és DFA szögkoefficiensek értelmezésére klaszter analízist használtam. Megállapítottam, hogy a DFA a PCA-nál hatékonyabb módszer a penészek elkülönítésére, ráadásul ez az eljárás kiváltja a mérési adatok hagyományos, sokszor igen időigényes kiértékelési folyamatát.

## SUMMARY

In my PhD work, HS-SPME-GC-MS method was developed which is able to detect and monitor the volatile metabolomic marker compounds produced by different mushroom disease-related moulds. A unique internal standard method was devised based on the memory effect of the standard mix. This standard mix solution was used during the experiments, where the memory effect of the alkane standards lasted for approximately four days.

Microbial volatile organic compounds (MVOCs) from mushroom disease-related moulds (*Trichoderma aggressivum*, *Mycogone pernicioso*, *Lecanicillium fungicola*) and the button mushroom were determined and identified using the previously developed method. Moreover, those marker compounds were determined, which clearly characterised the examined moulds. During the MVOC monitoring, the intensity change of these biomarkers were followed, than the relationship between biomarkers and mould growth was determined. *Trichoderma* species emitted the most volatile metabolites during the green spores production phase, while the wet and dry bubble disease moulds emitted their volatiles during the mycelium growth phase.

The common MVOCs produced by different moulds were analysed with principal component analysis (PCA). The first principal component (PC) explained the differences between the days, while the second PC explained the differences between the samples. By examining the variable structure of the PCs, those MVOCs were clearly identified, which were responsible for the differences between the samples. Linear discriminant analysis was used to discriminate the samples and the number of the days passed from the inoculation. Partial least square regression model was applied to predict the “age” of the samples by estimating the number of the days passed from the inoculation.

The MVOC pattern of green mould (*T. aggressivum* f. *europaeum*) were determined in the metabolomic experiments. After MVOC determination, the biomarkers were also defined. I established different evaluation processes, since these biomarker compounds had highly different intensity values, which requires different – intensity-dependent – evaluation processes, in order to get proper results.

Media-independent (3 markers), and media-dependent (10 markers on PDA, 13 markers on MEA) biomarkers were determined from the selected markers, moreover from the nutrient-rich media derived (18 markers) marker compounds were also determined. After successful identification and classification of the biomarkers, I examined the changes of their intensity during the experiment.

Furthermore, the changes of the markers were linked to the inoculated microorganisms' growth phase (mycelium growth, green spores production) on four different media.

After all experiments a comprehensive database was built, which contains all of the characteristic marker compounds of all the microorganisms on all media.

In order to identify and distinguish different examined microorganisms, chemometric method (sliding window detrended fluctuation analysis, DFA) was applied on the unprocessed ("raw") total ion chromatogram (TIC). DFA is not a well-known method, therefore PCA was used to validate its results. Cluster analysis interpreted the PCA scores and DFA angle coefficients. According to my results, DFA was more effective compared to PCA in separating different mould samples. Moreover, DFA was also able to substitute the conventional, generally time consuming evaluation processes.

## MELLÉKLET 1. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adams, M.J., 1995. *Chemometrics in Analytical Spectroscopy* 1st ed. N. Barnett, ed., Cambridge: The Royal Society of Chemistry. ISBN: 0854045554
2. Aime, M.C. és Phillips-Mora, W., 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97(5), pp.1012–1022. DOI: 10.3852/mycologia.97.5.1012
3. Almeida, D.L.F., Soares, F.A. és Carvalho, J.L.A., 2013. A sliding window approach to detrended fluctuation analysis of heart rate variability. *Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, 2013, pp.3278–3281. DOI: 10.1109/EMBC.2013.6610241
4. Altisent, R. et al., 2009. Shelf-life of 'Golden Reinders' Apples after Ultra Low Oxygen Storage: Effect on Aroma Volatile Compounds, Standard Quality Parameters, Sensory Attributes and Acceptability. *Food Science and Technology International*, 15(5), pp.481–493. DOI: 10.1177/1082013209350351
5. Anderson, M.G., Beyer, D.M. és Wuest, P.J., 2001. Yield comparison of hybrid *Agaricus* mushroom strains as a measure of resistance to *Trichoderma* green mold. *Plant Disease*, 85(7), pp.731–734. DOI: 10.1094/PDIS.2001.85.7.731
6. Aprea, E., Romano, A., Betta, E., Biasioli, F., Cappellin, L., Fanti, M., Gasperi, F., 2015. Volatile compound changes during shelf life of dried *Boletus edulis*: comparison between SPME-GC-MS and PTR-ToF-MS analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 50(1), pp.56–64. DOI: 10.1002/jms.3469
7. Arthur, C.L. és Pawliszyn, J., 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), pp.2145–2148. DOI: 10.1021/ac00218a019
8. Bailey, A.M., Collopy, P.D., Thomas, D.J., Sergeant, M.R., Costa, A.M.S.B., Barker, G.L.A., Mills, P.R., Challen, M.P., Foster, G.D., 2013. Transcriptomic analysis of the interactions between *Agaricus bisporus* and *Lecanicillium fungicola*. *Fungal Genetics and Biology*, 55, pp.67–76. DOI: 10.1016/j.fgb.2013.04.010
9. Bak, I., 2011. *Műszeres analitikai technikák a gyógyszerészi és bioanalitikai vizsgálatokban* 1st ed., Budapest: Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerhatástani Tanszék Gyógyszerészi műszeres- és bioanalitikai részleg. Available at: <https://books.google.hu/books?id=SGzjsgEACAAJ>.
10. Baker, G.B., Wong, J.T.F., Coutts, R.T., Pasutto, F.M., 1987. Simultaneous extraction and quantitation of several bioactive amines in cheese and chocolate. *Journal of Chromatography*, 392(19), pp.317–331. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)94276-1
11. Balla, J., 2006. *A gázkromatográfia analitikai alkalmazásai* 1st ed., Budapest: Edison House Kft. ISBN: 963-06-1470-7
12. Baradat, P., Marpeau, A. és Walter, J., 1991. Terpene markers. In G. Muller-Starck és M. Ziehe, eds. *Genetic variation in european populations of forest trees*. Frankfurt am Main: Sauerlander's Verlag, pp. 40–66. Available at: <http://prodinra.inra.fr/record/106315>.
13. Barboni, T., Luro, F., Chiaramonti, N., Desjobert, J.M., Muselli, A., Costa, J., 2009. Volatile composition of hybrids Citrus juices by headspace solid-phase micro extraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry*, 116(1), pp.382–390. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.031
14. Belitz, H.D., Grosch, W. és Schieberle, P., 2009. *Food Chemistry* 4th revise., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-540-69933-0, DOI: 10.1007/978-3-540-69993-7
15. Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C., Codon, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), pp.249–260. ISSN: 1139-6709
16. Berg, A., Kemami W., Hilaire V., Nkengfack, A.E., Schlegel, B., 2004. Lignoren, a new sesquiterpenoid metabolite from *Trichoderma lignorum* HKI 0257. *Journal of Basic Microbiology*, 44(4), pp.317–319. DOI: 10.1002/jobm.200410383
17. Bernhardt, B., Sipos, L., Kókai, Z., Gere, A., Szabó, K., Bernáth, J., Sárosi, Sz., 2015. Comparison of different *Ocimum basilicum* L. gene bank accessions analyzed by GC–MS and sensory profile. *Industrial Crops and Products*, 67, pp.498–508. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.01.013
18. Berrueta, L.A., Alonso-Salces, R.M. és Héberger, K., 2007. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of chromatography. A*, 1158(1-2), pp.196–214. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.05.024
19. Blaszczyk, L., Popiel, D., Chełkowski, J., Koczyk, G., Samuels, G.J., Sobieralski, K., Siwulski, M., 2011. Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *Journal of Applied Genetics*, 52(2), pp.233–243. DOI: 10.1007/s13353-011-0039-z
20. Boiko, O. a., Mel' nichuk, M.D. és Ivanova, T. V., 2009. Spread, diagnosis, and prevention of diseases of the button mushroom. *Russian Agricultural Sciences*, 35(2), pp.94–95. DOI: 10.3103/S1068367409020086
21. Boros, B., Bufa, A., Csóka, B., Dörnyei, Á., Farkas, N., Felinger, A., Kiss, I., Kilár, A., Kilár, F., Lambert, N.,

- Makszin, L., Páger, Cs., Petz, A., 2010. *Műszeres analitika gyakorlatok* 1st ed., Pécs: Pécsi Tudományegyetem. Available at: <http://ttk.pte.hu/analitika/letoltesek/jegyzet/ch09s02.html#d0e7336>.
22. Borosy, A.P., 2001. Csoportosítás (alakfelismerés). In G. Horvai, ed. *Sokváltozós adatelemzés (kemometria)*. Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó, p. 32. ISBN: 963192114X
  23. Börjesson, T., Stollman, U., Adamek, P., Kaspersson, A., 1989. Analysis of volatile compounds for detection of molds in stored cereals. *Cereal Chemistry*, 66(4), pp.300–304. ISSN: 0009-0352
  24. Bratek, Z., Geösel, A., Györfi, J., Kovácsné, Gy.M., Szarvas, J., Vetter, J., 2010. *Gombabiológia, gombatermesztés* 1st ed. J. Györfi, ed., Budapest: Mezőgazda Kiadó Kft. ISBN: 9789632866079
  25. Brereton, R.G., 2007. *Applied Chemometrics for Scientist*, Chichester, West Sussex, United Kingdom: John Wiley és Sons, Ltd. ISBN: 9780470016862
  26. Brian, W.P., 1944. Production of Gliotoxin by *Trichoderma viride*. *Nature*, 154, pp.667–668. DOI: 10.1038/153746a0
  27. Bruce, A., Wheatley, R.E., Humphris, S.N., Hackett, C.A., Florence, M.E.J., 2000. Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. *Holzforschung*, 54(5), pp.481–486. DOI: 10.1515/HF.2000.081
  28. Caballero-Casero, N., Lunar, L. és Rubio, S., 2016. Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. *Analytica Chimica Acta*, 908, pp.22–53. DOI: 10.1016/j.aca.2015.12.034
  29. Caetano, S., Üstün, B., Hennessy, S., Smeyers-Verbeke, J., Melssen, W., Downey, G., Buydens, Lu., Vander Heyden, Y., 2007. Geographical classification of olive oils by the application of CART and SVM to their FT-IR. *Journal of Chemometrics*, 21(September), pp.324–334. DOI: 10.1002/cem.1077
  30. Lo Cantore, P. és Iacobellis, N.S., 2004. First report of brown discoloration of *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas agarici* in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(1), pp.35–38. ISSN: 0031-9465
  31. Cardoza, R.E., Malmierca, M.G., Hermosa, M.R., Alexander, N. J., McCormick, S. P., Proctor, R.H., Tijerino, A.M., Rumbero, A., Monte, E., Gutiérrez, S., 2011. Identification of loci and functional characterization of trichothecene biosynthesis genes in filamentous fungi of the genus *Trichoderma*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), pp.4867–4877. DOI: 10.1128/AEM.00595-11
  32. Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Bissett, John., 1998. Morphological and Molecular Identification of *Trichoderma* Isolates on North American Mushroom Farms These include: Morphological and Molecular Identification of *Trichoderma* Isolates on North American Mushroom Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), pp.133–137.
  33. Chang, S.T., 1999. World Production of Cultivated Edible and Medicinal Mushrooms in 1997 with Emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, in China. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(4), pp.291–300. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v1.i4.10
  34. Chang, S.T. és Miles, P.G., 2004. *Mushrooms. Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact* second edi., Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press LLC. ISBN: 0-8493-1043-1
  35. Chen, X., Ospina-Giraldo, M.D., Wilkinson, V., Royse, D.J., Romaine, C.P., 2003. Resistance of Pre- and Post-epidemic Strains of *Agaricus bisporus* to *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. *Plant disease*, 87(12), pp.1457–1461. DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.12.1457
  36. Claeson, A.S., Levin, J.O., Blomquist, G., Sunesson, A.L., 2002. Volatile metabolites from microorganisms grown on humid building materials and synthetic media. *Journal of Environmental Monitoring*, 4(5), pp.667–672. DOI: 10.1039/b202571j
  37. Claydon, N., Allan, M., Hanson, J.R., Avent, A.G., 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 88(4), pp.503–513. DOI: 10.1016/S0007-1536(87)80034-7
  38. Clift, A.D. és Shamshad, A., 2009. Modelling mites, moulds and mushroom yields in the Australian Mushroom Industry. *18th World IMACS / MODSIM Congress, Cairns, Australia*, (July), pp.491–497. ISBN: 9780975840078
  39. Coleman, W.M. és Lawson, S.N., 1998. Solid-Phase Microextraction—Gas Chromatographic—Mass Selective Detection Analysis of Selected Sources of Menthol. *Journal of Chromatographic Science*, 36(8), pp.401–405. DOI: 10.1093/chromsci/36.8.401
  40. Constant, M. és Collier, J., 1997. Headspace gas chromatography profiles of fruit-flavored malt beverages using solid-phase microextraction. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 55(3), pp.112–118. ISSN: 0361-0470
  41. Costa, R., Tedone, L., De Grazia, S., Dugo, P., Mondello, L., 2013. Multiple headspace-solid-phase microextraction: An application to quantification of mushroom volatiles. *Analytica Chimica Acta*, 770, pp.1–6. DOI: 10.1016/j.aca.2013.01.041
  42. Costin, C., 2004. *Oldószermaradványok meghatározása gyógyszerekben Statikus Gőztér-Analízissal és Szilárd-Fázisú Mikroextrakció (SPME) alkalmazásával*. Budapesti Műszaki és Gazdálkodástudományi Egyetem. Ph.D. értekezés
  43. Crespo, R., Pedrini, N., Juárez, M.P., Dal Bello, G.M., 2008. Volatile organic compounds released by the

- entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiological Research*, 163(2), pp.148–151. DOI: 10.1016/j.micres.2006.03.013
44. Csambalik, L., Divéky-Ertsey, A., Pap, Z., Orbán, Cs., Stégerné Máté, M., Gere, A., Stefanovits-Bányai, É., Sipos, L., 2014. Coherences of instrumental and sensory characteristics: case study on cherry tomatoes. *Journal of Food Science*, 79(11), pp.C2192–202. DOI: 10.1111/1750-3841.12685
  45. Dong, L., Liu, R., Dong, H., Piao, Y., Hu, X., Li, C., Cong, L., Zhao, C., 2015. Volatile metabolite profiling of malt contaminated by *Fusarium poae* during malting. *Journal of Cereal Science*, 66, pp.37–45. DOI: 10.1016/j.jcs.2015.09.006
  46. Doyle, O., 1991. *Trichoderma* green mould update. *Irish Mushroom Review*, 3, pp.13–17.
  47. Drilling, K. és Dettner, K., 2009. Electrophysiological responses of four fungivorous coleoptera to volatiles of *Trametes versicolor*: implications for host selection. *Chemoecology*, 19(2), pp.109–115. ISSN: 0937-7409
  48. Druzhinina, I.S., Komon-Zelazowska, M., Kredics, L., Hatvani, L., Antal, Zs., Belayneh, T., Kubicek, C.P., 2008. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology*, 154(11), pp.3447–3459. DOI: 10.1099/mic.0.2008/021196-0
  49. Felinger, A., 2011. Estimation of chromatographic peak shape parameters in Fourier domain. *Talanta*, 83(4), pp.1074–8. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.10.001
  50. Fennema, O., 1985. *Chemical Changes in Food during Processing—an overview* 1st ed. T. Richardson és J. W. Finley, eds., New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc. ISBN: 13:978-1-4612-9389-7
  51. Fiedler, K., Schütz, E., Geh, S., 2001. Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials. *International journal of hygiene and environmental health*, 204(2-3), pp.111–121. DOI: 10.1078/1438-4639-00094
  52. Fischer, G., Schwalbe, R., Möller, M., Ostrowski, R., Dott, W., 1999. Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere*, 39(5), pp.795–810. DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00015-6
  53. Fletcher, J.T., 1990. *Trichoderma and Penicillium diseases of Agaricus bisporus*, London, UK: Adas.
  54. Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., de Boer, W., 2014. Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(3), pp.639–649. DOI: 10.1111/1574-6941.12252
  55. Gea, F.J., Tello, J.C. és Navarro, M.J., 2010. Efficacy and effects on yield of different fungicides for control of wet bubble disease of mushroom caused by the mycoparasite *Mycogone perniciosa*. *Crop Protection*, 29(9), pp.1021–1025. ISSN: 02612194
  56. Geels, F.P., 1997. Rondetafel - bijeenkomst over *Trichoderma*. *De champignoncultuur*, 41(1), pp.13–17.
  57. Geels, F.P., Hesen, L.P.W. és Vangriensven, L.J.L.D., 1994. Brown discoloration of mushrooms caused by *Pseudomonas agarici*. *Journal of Phytopathology- Phytopathologische Zeitschrift*, 140(3), pp.249–259. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1994.tb04814.x
  58. Gere, A., Losó, V., Györey, A., Kovács, S., Huzsvai, L., Nábrádi, A., Kókai, Z., Sipos, L., 2014. Applying parallel factor analysis and Tucker-3 methods on sensory and instrumental data to establish preference maps: case study on sweet corn varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), pp.3213–3225. DOI: 10.1002/jsfa.6673
  59. Gere, A., Danner, L., Nino, de A., Kovács, S., Dürschmid, K., Sipos, L., 2016. Visual attention accompanying food decision process: an alternative approach to choose the best models. *Food Quality and Preference*, 51, pp.1–7. DOI: 10.1016/j.foodqual.2016.01.009
  60. Gere, A., Sipos, L., Héberger, K., 2015. Generalized Pairwise Correlation and method comparison: Impact assessment for JAR attributes on overall liking. *Food Quality and Preference*, 43, pp.88–96. DOI: 10.1016/j.foodqual.2015.02.017
  61. Gill, W.M. és Tsuneda, A., 1997. The interaction of the soft rot bacterium *Pseudomonas gladioli* pv. *agaricicola* with Japanese cultivated mushrooms. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(7), pp.639–648. ISSN: 0008-4166
  62. Goldberger, A.L., Amaral, L.A.N., Glass, L., Hausdorff, J.M., Ivanov, P.Ch., Mark, R.G., Mietus, J.E., Moody, G.B., Peng, C.K., Stanley, H.E., 2000. PhysioBank, PhysioToolkit, and PhysioNet: Components of a New Research Resource for Complex Physiologic Signals. *Circulation*, 101, pp.215–220. DOI: 10.1161/01.CIR.101.23.e215
  63. González-Cebrino, F., García-Parra, J., Ramírez, R., 2016. Aroma profile of a red plum purée processed by high hydrostatic pressure and analysed by SPME-GC/MS. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, pp.108–114. DOI: 10.1016/j.ifset.2015.11.008
  64. Górski, R., Sobierski, K., Siwulski, M., Fraszczyk, B., Sas-Golak, I., 2014. The effect of *Trichoderma* isolates, from family mushroom growing farms, on the yield of four *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach strains. , 54(1), pp.24–27. DOI: 10.2478/jppr-2014-0016
  65. Guillot, S., Peytavi, L., Bureau, S., Boulanger, R., Lepoutre, J.P., Crouzet, J., Schorr-Galindo, S., 2006. Aroma characterization of various apricot varieties using headspace-solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, 96(1), pp.147–155. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.016



66. Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera, E.A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I., Tuohy, M.G., 2014. Biotechnology and Biology of Trichoderma. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Sara Burgerhartstraat 25, Amsterdam: Elsevier Science BV, pp. 1–549. ISBN: 978-0-444-59594-2; 978-0-444-59576-8
67. Gusakov, A. V., 2011. Alternatives to Trichoderma reesei in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 29(9), pp.419–425. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.04.004
68. Györfi, J., 2013a. *A csiperkegomba (Agaricus bisporus LANGE/IMBACH) termesztése* H. L. Zámoriné Németh Éva, ed., Budapest: Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar. ISBN: 978-963-503-537-3
69. Györfi, J., 2013b. *A csiperkegomba komposztkészítés technológiája. A letermelt komposzt hasznosítása* H. L. Zámoriné Németh Éva, ed., Budapest: Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar. ISBN: 978-963-503-537-3
70. Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J., 2011. *Springer Series in Statistics The Elements of* 2nd ed., New York, NY: Springer. ISBN: 0387848576
71. Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Nagy, A., Nagy, E., Vágvölgyi, C., Kredics, L., 2007. Green Mold Diseases of Agaricus and Pleurotus spp. Are Caused by Related but Phylogenetically Different Trichoderma Species. *Phytopathology*, 97(4), pp.532–537. DOI: 10.1094/PHYTO-97-4-0532
72. Hatvani, L., Czifra, D., Manczinger, L., Vágvölgyi, Cs., Ivić, D., Milicevic, T., Dermic, E., Kredics, L., 2010. Examination of the Trichoderma-caused green mold disease of cultivated Agaricus bisporus in Croatia. In *Book of abstracts-Power of Microbes in Industry and Environment*. Zágráb: Croatian Microbiological Society, p. 44. ISBN: 978-953-7778-00-2
73. Hermosa, M.R., Grondona, I., Monte, E., 1999. Isolation of Trichoderma harzianum Th2 from Commercial Mushroom Compost in Spain. *Plant disease*, 83(6), p.591. DOI: 10.1094/PDIS.1999.83.6.591B
74. Hermosa, R., Cardoza, R.E., Rubio, M.B., Gutiérrez, S., Monte, E., 2014. *Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of Trichoderma*, Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00010-2
75. Herrmann, A., 2010. Volatiles – An Interdisciplinary Approach. In A. Herrmann, ed. *The Chemistry and Biology of Volatiles*. pp. 1–10. ISBN: 978-0-470-77778-7
76. de Hoffmann, E. és Stroobant, V., 2007. *Mass Spectrometry - Principles and Applications* 3rd ed., Chichester: Wiley. ISBN: 978-0-470-03310-4 és 978-0-470-03311-4
77. Holighaus, G., Weißbecker, B., von Fragstein, M., Schütz, S., 2014. Ubiquitous eight-carbon volatiles of fungi are infochemicals for a specialist fungivore. *Chemoecology*, 24(2), pp.57–66. DOI: 10.1007/s00049-014-0151-8
78. Hovánszki, D., Prokisch, J., Györi, Z., 2006. A Headspace mintavevési módszer tanulmányozása illékony vegyületek GC-MS-sel történő azonosításához. *Agrártudományi közlemények*, 23(különszám), pp.35–38.
79. Howell, C.R. és Stipanovic, R.D., 1983. Glioviridin, a new antibiotic from Gliocladium virens and its role in the biological control of Pythium ultimum. *Canadian Journal of Microbiology*, 29, pp.321–324.
80. Hung, R., Lee, S., Bennett, Joan W., 2015. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), pp. 3395-3405. DOI: 10.1007/s00253-015-6494-4
81. Järvenpää, E., Zhang, Z., Huopalahti, R., King, J.W., 1998. Determination of fresh onion (Allium cepa L.) volatiles by solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 207(1), pp.39–43. DOI: 10.1007/s002170050292
82. Jeleń, H.H., Wlazły, K., Wasowicz, E., Kaminski, E., 1998. Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Some Alcohols and Esters in Beer: Comparison with Static Headspace Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(97), pp.1469–1473. DOI: 10.1021/jf9707290
83. Jeleń, H.H., Majcher, M., Dziadas, M., 2012. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. *Analytica Chimica Acta*, 738, pp.13–26. DOI: 10.1016/j.aca.2012.06.006
84. Jin, X.F., Lu, Yan H., Wei, Dong Z., Wang, Z.T., 2008. Chemical fingerprint and quantitative analysis of Salvia plebeia R.Br. by high-performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 48(1), pp.100–4. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.05.027
85. Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., Maffei, M.E., 2015a. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends in plant science*, 20(4), pp.206–211. ISSN: 1878-4372
86. Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., Maffei, M.E., 2015b. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in plant science*, 6, p.151. DOI: 10.3389/fpls.2015.00151
87. Kandasamy, S., Sahu, S.K., Kandasamy, K., 2012. In Silico Studies on Fungal Metabolite against Skin Cancer Protein (4,5-Diarylisoxazole HSP90 Chaperone). *ISRN dermatology*, p.5 pages. DOI: 10.5402/2012/626214
88. Kantelhardt, J.W., Koscielny-Bunde, E., Rego, Henio H.A., Havlin, S., Bunde, A., 2001. Detecting long-range correlations with detrended fluctuation analysis. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 295(3-4), pp.441–454. DOI: 10.1016/S0378-4371(01)00144-3
89. Karlshøj, K., Nielsen, P. V., Larsen, T.O., 2007. Prediction of Penicillium expansum spoilage and patulin concentration in apples used for apple juice production by electronic nose analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), pp.4289–4298. DOI: 10.1021/jf070134x

90. Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J., 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2), pp.35–62. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00309-5
91. Ketskeméty, L., Izsó, L., Könyves Tóth, E., 2011. *Bevezetés az IBM SPSS Statistics programrendszerébe* 1st ed., Budapest: Artéria Stúdió KFT. ISBN: 9789630811002
92. Kim, H., McConnell, L.L., Millner, P., 2005. Comparison of odorous volatile compounds from fourteen different commercial composts using solid-phase microextraction. *Transactions of the Asae*, 48(1), pp.315–320. ISSN: 0001-2351
93. Kluger, B., Zeilinger, S., Wiesenberger, G., Schöfbeck, De., Schuhmacher, R., 2013. Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology. In K. V. Gupta et al., eds. New York, NY: Springer New York, pp. 455–465. DOI: 10.1007/978-1-4614-2356-0\_42
94. Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S., 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), pp.7415–7426. DOI: 10.1128/AEM.01059-07
95. de Koning, S., Janssen, H.G., Brinkman, U.A.T., 2009. Modern Methods of Sample Preparation for GC Analysis. *Chromatographia*, 69(1), pp.33–78. DOI: 10.1365/s10337-008-0937-3
96. Korpi, A., Jarnberg, J., Pasanen, A.L., 2009. Microbial Volatile Organic Compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(2), pp.139–193. DOI: 10.1080/10408440802291497
97. Kovács, B. és Csapó, J., 2015. *Az élelmiszervizsgálatok műszeres analitikai módszerei* 1st ed. P. József, ed., Debrecen: Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar. ISBN: 978-963-473-831-2
98. Kredics, L., Czifra, D., Urbán, P., Manczinger, L., Várvolgyi, Cs., Hatvani, L., 2011. A termesztett csiperke zöldpenészes fertőzése. *Mikológiai Közlemények, Clusina*, 50(2), pp.199–218.
99. Krupke, O.A., Castle, A.J., Rinker, D.L., 2003. The North American mushroom competitor, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, produces antifungal compounds in mushroom compost that inhibit mycelial growth of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 107(12), pp.1467–1475. DOI: 10.1017/S0953756203008621
100. Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G., 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: A case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 38(3), pp.310–319. DOI: 10.1016/S1087-1845(02)00583-2
101. Lakatos, J., Bánhidí, O., Lengyel, A., Lovrity, Z., Muránszky, G., 2009. *Analitikai kémia Anyagmérnököknek*, Miskolc: Miskolci Egyetem.
102. Van Lancker, F., Adams, A., Delmulle, B., De Saeger, S., Moretti, A., Van Peteghem, C., De Kimpe, N., 2008. Use of headspace SPME-GC-MS for the analysis of the volatiles produced by indoor molds grown on different substrates. *Journal of Environmental Monitoring*, 10(10), pp.1127–1133. DOI: 10.1039/b808608g
103. Lane, C., 2008. *Trichoderma green mould – determining diversity and highlighting risks*, Central Science Laboratory, M46 Final report, York.
104. Largeteau, M.L. és Savoie, J.M., 2010. Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1), pp.63–73. DOI: 10.1007/s00253-010-2445-2
105. Lemfack, M.C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R., Piechulla, B., 2014. MVOC: A database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), pp.744–748. DOI: 10.1093/nar/gkt1250
106. Li, X., Kong, W., Shi, W., Shen, Q., 2016. A combination of chemometrics methods and GC–MS for the classification of edible vegetable oils. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 155, pp.145–150. DOI: 10.1016/j.chemolab.2016.03.028
107. Liang, H., Zhang, X., Rao, J., Chen, H., 2008. Microbial volatile organic compounds: generation pathways and mass spectrometric detection. *Journal of Chinese Biotechnology*, 28(1), pp.124-133. Available at: <http://www.oalib.com/paper/1534981#.V3y6yvmLTcs>
108. Lincoln, S.P., Fermor, T.R., Stea, D.E., Sellwood, J.E., 1991. Bacterial soft rot of *Agaricus bitorquis*. *Plant Pathology*, 40(1), pp.136–144. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1991.tb02302.x
109. Lincoln, S.P., Fermor, T.R., Tindall, B.J., 1999. *Janthinobacterium agaricidamnosum* sp. nov., a soft rot pathogen of *Agaricus bisporus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(4), pp.1577–1589. DOI: 10.1099/00207713-49-4-1577
110. Lopez, M.L., Lavilla, M.T., Recasens, I., Graell, J., Vendrell, M., 2000. Changes in aroma quality of ‘Golden Delicious’ apples after storage at different oxygen and carbon dioxide concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(3), pp.311–324. DOI: 10.1002/1097-0010(200002)80:3<311::AID-JSFA519>3.0.CO;2-F
111. Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., Kubicek, C.P., 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma* Cell Wall Synthesis Is a Major Target of Mycoparasitic Antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*, 178(21), pp.6382–6385. Available at:

- <http://jb.asm.org/content/178/21/6382.full.pdf>
112. Louw, E.D. és Theron, K.I., 2012. Volatile dynamics during maturation, ripening and cold storage of three Japanese plum cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). *Postharvest Biology and Technology*, 70, pp.13–24. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2012.03.007
  113. Maffei, M.E., 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, 76(4), pp.612–631. DOI: 10.1016/j.sajb.2010.03.003
  114. Maffei, M.E., Gertsch, J., Appendino, G., 2011. Plant volatiles: Production{,} function and pharmacology. *Natural Product Reports*, 28(8), pp.1359–1380. DOI: 10.1039/C1NP00021G
  115. Malheiro, R., Guedes de Pinho, P., Soares, S., César da Silva Ferreira, A., Baptista, P., 2013. Volatile biomarkers for wild mushrooms species discrimination. *Food Research International*, 54(1), pp.186–194. ISSN: 09639969
  116. Mamoun, M.L., Lapicco, R., Savoie, J.M., Olivier, J.M., 2000a. Green mould disease in France: *Trichoderma harzianum* Th2 and other species causing damages on mushroom farms. *Mushroom Science*, 15(2), pp.625–632. DOI: ISSN:0077-2364
  117. Mamoun, M.L., Savoie, J.M., Olivier, J. M., 2000b. Interactions between the pathogen *Trichoderma harzianum* Th2 and *Agaricus bisporus* in mushroom compost. *Mycologia*, 92(2), pp.233–240. DOI: 10.2307/3761556
  118. Marmulla, R. és Harder, J., 2014. Microbial monoterpene transformations-a review. *Frontiers in Microbiology*, 5(JULY), pp.1–14. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00346
  119. Martos, P.A. és Pawliszyn, J., 1997. Calibration of solid phase microextraction for air analyses based on physical chemical properties of the coating. *Analytical Chemistry*, 69(2), pp.206–215. DOI: 10.1021/ac960415w
  120. Matysik, S., Herbarth, O., Mueller, A., 2008. Determination of volatile metabolites originating from mould growth on wall paper and synthetic media. *Journal of microbiological methods*, 75(2), pp.182–187. ISSN: 0167-7012
  121. Matysik, S., Herbarth, O., Mueller, A., 2009. Determination of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by passive sampling onto charcoal sorbents. *Chemosphere*, 76(1), pp.114–9. ISSN: 1879-1298
  122. Milton, S.F., 1985. *Some aspects of the chemistry of nonenzymatic browning (The Maillard reaction)* 1st ed. T. Richardson és J. W. Finley, eds., New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc. DOI: 10.1007/978-1-4613-2265-8
  123. Minerdi, D., Bossi, S., Maffei, M.E., Gullino, M.L., Garibaldi, A., 2011. *Fusarium oxysporum* and its bacterial consortium promote lettuce growth and expansin A5 gene expression through microbial volatile organic compound (MVOC) emission. *FEMS microbiology ecology*, 76(2), pp.342–51. ISSN: 1574-6941
  124. Misharina, T.A., Muhutdinova, S.M., Zharikova, G.G., Terenina, M.B., Krikunova, N.I., 2009. The composition of volatile components of cepe (*Boletus edulis*) and oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). *Appl.Biochem.Microbiol.*, 45(2), pp.207–213. DOI: 10.1134/S0003683809020124
  125. Morales, R., Ortiz, M.C., Sarabia, L.A., 2012. Usefulness of a PARAFAC decomposition in the fiber selection procedure to determine chlorophenols by means SPME-GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(4), pp.1095–1107. DOI: 10.1007/s00216-011-5545-7
  126. Morath, S.U., Hung, R., Bennett, J.W., 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2-3), pp.73–83. ISSN: 17494613
  127. Mumpuni, A., Sharma, H.S.S., Brown, A.E., 1998. Effect of metabolites produced by *Trichoderma harzianum* biotypes and *Agaricus bisporus* on their respective growth radii in culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), pp.5053–5056. ISSN: 00992240
  128. Muthumeenakshi, S., Mills, P.R., Brown, A. E., Seaby, D. A., 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology*, 140(4), pp.769–777. DOI: 10.1099/00221287-140-4-769
  129. Muthumeenakshi, S., Brown, A., Mills, P., 1998. Genetic comparison of the aggressive weed mould strains of *Trichoderma harzianum* from mushroom compost in North America and the British Isles. *Mycological Research*, 102(4), pp.385–390. DOI: 10.1017/S0953756297004759
  130. Müller, A., Faubert, P., Hagen, M., zu Castell, W., Polle, A., Schnitzler, J.P., Rosenkranz, M., 2013. Volatile profiles of fungi - Chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genetics and Biology*, 54, pp.25–33. DOI: 10.1016/j.fgb.2013.02.005
  131. Nardini, G.S., Merib, J.O., Dias, A.N., Dutra, J.N.B., Silveira, C.D.S., Budziak, D., Martendal, E., Carasek, E., 2013. Determination of volatile profile of citrus fruit by HS-SPME/GC-MS with oxidized NiTi fibers using two temperatures in the same extraction procedure. *Microchemical Journal*, 109, pp.128–133. DOI: 10.1016/j.microc.2012.03.024
  132. Naznin, H.A., Kiyohara, D., Kimura, M., Miyazawa, M., Shimizu, M., Hyakumachi, M., 2014. Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 9(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0086882
  133. Nemicovic, M., Jakubikova, L., Viden, I., Farkas, V., 2008. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 284(2), pp.231–236. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01202.x

134. Nijssen, L.M., Visscher, C.A., Maarse, H., Willemsens, L.C., Boelens, M.H., 1999. *Volatile compounds in food*. 7th Editio., Zeist: The Netherlands. Available at: <http://www.leffingwell.com/bacis1.htm>.
135. Nunes, C., Coimbra, Manuel A., Saraiva, J., Rocha, S.M., 2008. Study of the volatile components of a candied plum and estimation of their contribution to the aroma. *Food Chemistry*, 111(4), pp.897–905. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.05.003
136. O'Brien, M., Grogan, H., Kavanagh, K., 2014. Proteomic response of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* to *Agaricus bisporus* tissue and mushroom compost. *Fungal Biology*, 118(9), pp.785–791. DOI: 10.1016/j.funbio.2014.06.004
137. Ospina-Giraldo, M.D., Royle, D.J., Thon, M.R., Chen, X., Romanie, C.P., 1998. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* causing mushroom green mold in Europe and North America to other species of *Trichoderma* sources from world-wide. *Mycologia*, 90(1), pp.76–81. DOI: 10.2307/3761014
138. Ouzouni, P.K., Koller, W.D., Badeka, A.V., Riganakos, K.A., 2009. Volatile compounds from the fruiting bodies of three *Hygrophorus* mushroom species from Northern Greece. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(4), pp.854–859. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2009.01919.x
139. Pacioni, G., Cerretani, L., Procida, G., Cichelli, A., 2014. Composition of commercial truffle flavored oils with GC-MS analysis and discrimination with an electronic nose. *Food chemistry*, 146, pp.30–5. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.016
140. Park, S.E., Yoo, S.A., Seo, S.H., Lee, K.In., Na, C.S., Son, H.S., 2016. GC-MS based metabolomics approach of Kimchi for the understanding of *Lactobacillus plantarum* fermentation characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 68, pp.313–321. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.12.046
141. Pei, F., Yang, W., Ma, N., Fang, Y., Zhao, L., An, X., Xin, Z., Hu, Q., 2016. Effect of the two drying approaches on the volatile profiles of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by headspace GC-MS and electronic nose. *LWT - Food Science and Technology*, 72, pp.343-350. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.05.004
142. Pelusio, F., Nilsson, T., Montanarella, L., Tilio, R., Larsen, B., Facchetti, S., Madsen, J.O., 1995. Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile organic sulfur compounds in black and white truffle aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), pp.2138–2143. DOI: 10.1021/jf00056a034
143. Peng, C.K., Buldyrev, S.V., Goldberger, A.L., Havlin, S., Sciortino, F., Simons, M., Stanley, H.E., 1992. Long-range correlations in nucleotide-sequences. *Nature*, 356(6365), pp.168–170. DOI: 10.1038/356168a0
144. Peng, C.K., Buldyrev, S.V., Goldberger, A.L., Havlin, S., Simons, M., Stanley, H.E., 1993. Finite-size effects on long-range correlations: Implications for analyzing DNA sequences. *Physical Review E*, 47(5), pp.3730–3733. DOI: 10.1103/PhysRevE.47.3730
145. Peng, C.K., Buldyrev, S.V., Havlin, S., Simons, M., Stanley, H.E., Goldberger, A.L., 1994. Mosaic organization of DNA nucleotides. *Physical Review E*, 49(2), pp.1685–1689. DOI: 10.1103/PhysRevE.49.1685
146. Pennerman, K.K., Yin, G., Bennett, J.W., 2015. Mycobiology Health Effects of Small Volatile Compounds from East Asian Medicinal Mushrooms. *Mycobiology*, 43(1), pp.9–13. DOI: 10.5941/MYCO.2015.43.1.9
147. Perl, T., Jünger, M., Vautz, W., Nolte, J., Kuhns, M., Borg-von Zepelin, M., Quintel, M., 2011. Detection of characteristic metabolites of *Aspergillus fumigatus* and *Candida* species using ion mobility spectrometry - metabolic profiling by volatile organic compounds. *Mycoses*, 54(6), pp.828–837. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2011.02037.x
148. Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Santos, L.H.M.L.M., 2006. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *Journal of Chromatography A*, 1121(2), pp.145–153. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.04.013
149. De Pinho, P.G., Ribeiro, B., Goncalves, R.F., Baptista, P., Valentao, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2008. Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5), pp.1704–1712. DOI: 10.1021/jf073181y
150. Pino, J.A. és Quijano, C.E., 2012. Study of the volatile compounds from plum (*Prunus domestica* L. cv. Horvin) and estimation of their contribution to the fruit aroma. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 32(1), pp.76–83. DOI: 10.1590/S0101-20612012005000006
151. Pokol, Gy., Simon, A., Bezúr, L., Horvai, Gy., Horváth, V., Dudás, K.M., Gyurcsányi, E.R., 2011. *Analitikai kémia* 1st ed., Budapest: Typotex Kiadó. ISBN: 978-963-279-466-2
152. Polizzi, V., Adams, A., Picco, A.M., Adriaens, E., Lenoir, J., Van Peteghem, C., De Saeger, S., De Kimpe, N., 2011. Influence of environmental conditions on production of volatiles by *Trichoderma atroviride* in relation with the sick building syndrome. *Building and Environment*, 46(4), pp.945–954. DOI: 10.1016/j.buildenv.2010.10.024
153. Polizzi, V., Adams, A., De Saeger, S., Van Peteghem, C., Moretti, A., De Kimpe, N., 2012a. Influence of various growth parameters on fungal growth and volatile metabolite production by indoor molds. *The Science of the total environment*, 414, pp.277–86. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.10.035
154. Polizzi, V., Adams, A., Malysheva, S.V., De Saeger, S., Van Peteghem, C., Moretti, A., Picco, A.M., De Krimpe, N., 2012b. Identification of volatile markers for indoor fungal growth and chemotaxonomic classification of *Aspergillus* species. *Fungal Biology*, 116(9), pp.941–953. DOI: 10.1016/j.funbio.2012.06.001
155. Poole, P.R. és Whitmore, K.J., 1997. Effects of topical postharvest applications of 6-pentyl-2-pyrone on properties

- of stored kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology*, 12(3), pp.229–237. DOI: 10.1016/S0925-5214(97)00052-5
156. Prevolnik, M., Andronikov, D., Žlender, B., Font-i-Furnols, M., Novič, M., Škorjanc, D., Čandek-Potokar, M., 2014. Classification of dry-cured hams according to the maturation time using near infrared spectra and artificial neural networks. *Meat Science*, 96(1), pp.14–20. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.06.013
157. Radványi, D., Gere, A., Jókai, Zs., Fodor, P., 2015. Rapid evaluation technique to differentiate mushroom disease-related moulds by detecting microbial volatile organic compounds using HS-SPME-GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(2), pp.537–545. DOI: 10.1007/s00216-014-8302-x
158. Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernández-Galán, R., Collado, I.G., 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), pp.89–123. DOI: 10.1007/s11101-006-9032-2
159. Restek Corporation, 2000. A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC. *Technical guide*, pp.1–6. Available at: <http://www.restek.com/pdfs/59895B.pdf>. Catalogue number: 59895B.
160. Rinker, D.L., 1993. Disease management strategies for *Trichoderma* mould. *Mushroom World*, 4, pp.3–5.
161. Rinker, D.L., Alm, G., Castle, A.J., Rghei, N., 1997. Not all green is *Trichoderma* green mould. *Mushroom World*, 8(1), pp.47–50.
162. Rinker, D.L. és Alm, G., 2000. Management of green mould disease in Canada. In V. Griensven, ed. *Science and Cultivation of edible fungi*. Rotterdam: Balkerna, pp. 617–622. ISBN: 90 5809 143 0
163. Romero-Arenas, O., Huerta, L.M., Huato, D.A.M., Hernández, F.D., Victoria, A.D.A., 2009. The characteristics of *Trichoderma harzianum* as a limiting agent in edible mushrooms. *Revista colombiana de Biotecnología*, 11(2), pp.143–151. ISSN: 0123-3475
164. Sági-Kiss, V., 2012. *Gyümölcsök penészes romlásának előrejelzése*. Corvinus University of Budapest. Ph.D. értekezés
165. Sági-Kiss, V. és Fodor, P., 2011. Development of a SPME-GC-MS method for spoilage detection in case of plums inoculated with *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria*, 40(Suppl.), pp.188–197. DOI: 10.1556/AAlim.40.2011.Suppl.18
166. Sajtos, L. és Mitev, A., 2007. *SPSS kutatási és adatelemzési kézikönyv* 1st ed., Budapest: Alinea Kiadó. ISBN: 9639659087
167. Samuels, G.J., Pardo-Schultheiss, R., Hebbbar, K.P., Lumsden, R.D., Bastos, C.N., Costa, J.C., Bezerra, J.L., 2000. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research*, 104(6), pp.760–764. DOI: 10.1017/S0953756299001938
168. Samuels, G.J., Dodd, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A., Petrini, O.J., 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94(1), pp.146–170. DOI: 10.2307/3761854
169. Scarselletti, R. és Faull, J.L., 1994. In vitro activity of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycological Research*, 98(10), pp.1207–1209. DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80206-2
170. Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E., Kubicek, C.P., 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied Environmental Microbiology*, 60(12), pp.4364–4370. ISSN: 0099-2240
171. Seaby, D.A., 1996a. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathology*, 45(5), pp.905–912. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1996.tb02901.x
172. Seaby, D.A., 1996b. Investigation of the epidemiology of green mould of mushroom (*Agaricus bisporus*) compost caused by *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathology*, 45, pp.913–923. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1996.tb02902.x
173. Shi, M., Chen, L., Wang, X.W., Zhang, T., Zhao, P.B., Song, X.Y., Sun, C.Y., Chen, X.L., Zhou, B.C., Zhang, Y.Z., 2012. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. *Microbiology*, 158(1), pp.166–175. DOI: 10.1099/mic.0.052670-0
174. Shirey, R.E., 2012. 4 – SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*. pp. 99–133. DOI: 10.1016/B978-0-12-416017-0.00004-8
175. Shirey, R.E., 1999. SPME Fibers and Selection for Specific Applications. In S. A. S. WERCINSKI, ed. *Solid Phase Microextraction - A Practical Guide*. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300: CRC Press Taylor & Francis Group, pp. 59–111. ISBN: 10:0-8247-7058-7
176. Siddiquee, S. et al., 2012. Separation and Identification of Volatile Compounds from Liquid Cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using Three Different Capillary Columns. *Journal of Chromatographic Science*, 50(4), pp.358–367. DOI: 10.1093/chromsci/bms012
177. Siddiquee, S., 2014. *Chapter 11 – Recent Advancements on the Role and Analysis of Volatile Compounds (VOCs) from Trichoderma*, Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00011-4
178. Silva, R.N., Steindorff, A.S., Monteiro, V.N., 2014. *Metabolic Diversity of Trichoderma*, Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00027-8

179. Sindin, J.W. és Hauser, E., 1954. Nature and Control of Three Mildew Disease of Mushrooms in America. *The International Society for Mushroom Science*, 2(1), pp.177–180. Available at : <http://www.isms.biz/gembloux/volume-2-part-1-article-33/>
180. Sipos, L., Gere, A., Szöllösi, D., Kovács, Z., Kókai, Z., Fekete, A., 2013. Sensory evaluation and electronic tongue for sensing flavored mineral water taste attributes. *Journal of Food Science*, 78(10), pp.S1602–8. DOI: 10.1111/1750-3841.12178
181. Škrbić, B., Héberger, K., Durišić-Mladenović, N., 2013. Comparison of multianalyte proficiency test results by sum of ranking differences, principal component analysis, and hierarchical cluster analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(25), pp.8363–75. DOI: 10.1007/s00216-013-7206-5
182. Sobieralski, K., Siwulski, M., Frużyńska-Jóźwiak, D., 2009. Growth of Aggressive Isolates of *Trichoderma Aggressivum* F. Europaeum in Dependence on Temperature and Medium. *Phytopathologia*, 53(1), pp.11–18. ISSN: 2081-1756
183. Soler-Rivas, C., Arpin, N., Olivier, J.M., Wichers, H.J., 2000. Discoloration and tyrosinase activity in *Agaricus bisporus* fruit bodies infected with various pathogens. *Mycological Research*, 104(3), pp.351–356. DOI: 10.1017/S0953756299001343
184. Song, J. és Bangerth, F., 1996. The effect of harvest date on aroma compound production from ‘Golden Delicious’ apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology*, 8(4), pp.259–269. DOI: 10.1016/0925-5214(96)00020-8
185. Song, J., Gardner, B.D., Holland, J.F., Beaudry, R.M., 1997. Rapid Analysis of Volatile Flavor Compounds in Apple Fruit Using SPME and GC/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), pp.1801–1807. DOI: 10.1021/jf9608229
186. Souza Tette, P.A., Guidi, L.R., De Abreu, G.M.B., Fernandes, C., 2016. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*, 149, pp.124–141. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.11.045
187. Spietelun, A., Kloskowski, A., Chrzanowski, W., Namiesnik, J., 2013. Understanding solid-phase microextraction: Key factors influencing the extraction process and trends in improving the technique. *Chemical Reviews*, 113(3), pp.1667–1685. DOI: 10.1021/cr300148j
188. Spillman, A., 2002. What’s killing the mushrooms of Pennsylvania? (A Mushroom Mystery). *Agricultural Research*, pp.14–15. Available at: <https://www.highbeam.com/doc/1G1-95678728.html>
189. Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., Schuhmacher, R., 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), pp.187–193. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.03.011
190. Stummer, I., 2014. Emelkedett a csiperkegomba termelői ára I. Stummer, ed. *Agrárpiaci Jelentések. Zöldség, Gyümölcs és Bor*, XVIII.(21), pp.6–8. ISSN: 1418 2130
191. Stummer, I., 2015. A termesztett gomba piaca I. Stummer, ed. *Agrárpiaci Jelentések. Zöldség, Gyümölcs és Bor*, XIX.(21), pp.6–7. ISSN: 1418 2130
192. Sundberg, C., Yu, D., Franke-Whittle, I., Kauppi, S., Smårs, S., Insam, H., Romantschuk, M., Jönsson, H., 2013. Effects of pH and microbial composition on odour in food waste composting. *Waste Management*, 33(1), pp.204–211. DOI: 10.1016/j.wasman.2012.09.017
193. Szczech, M., Staniaszek, M., Habdas, H., Ulinski, Z., Szymanski, J., 2008. *Trichoderma* spp., the cause of green mould on Polish mushroom farms. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 69, pp.105–114. DOI: 10.2478/v10032-008-0025-0
194. Szili, I., 2008. *Gombatermesztők könyve* 1st ed., Budapest: Mezőgazda Kiadó. ISBN: 9789632864211
195. Szöllösi, D., Kovács, Z., Gere, A., Sipos, L., Kókai, Z., Fekete, A., 2012. Sweetener Recognition and Taste Prediction of Coke Drinks by Electronic Tongue. *Sensors Journal, IEEE*, 12(11), pp.3119–3123. DOI: 10.1109/JSEN.2012.2187050
196. Tang, D., Yang, D., Tang, A., Gao, Y., Jiang, X., Mou, J., Yin, X., 2010. Simultaneous chemical fingerprint and quantitative analysis of Ginkgo biloba extract by HPLC-DAD. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(8), pp.3087–95. DOI: 10.1007/s00216-010-3536-8
197. Telesca, L. és Lovallo, M., 2010. Long-range dependence in tree-ring width time series of *Austrocedrus Chilensis* revealed by means of the detrended fluctuation analysis. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 389(19), pp.4096–4104. DOI: 10.1016/j.physa.2010.05.031
198. Teranishi, R. és Buttery R.G., 1985. *Chemical changes in flavor components during processing* 1st ed. T. Richardson és J. W. Finley, eds., New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc. DOI: 10.1007/978-1-4613-2265-8
199. Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U.S.R., Schnitzler, J.P., 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant Journal*, 45(4), pp.540–560. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02612.x
200. Thorn, R.M.S. és Greenman, J., 2012. Microbial volatile compounds in health and disease conditions. *Journal of Breath Research*, 6(2), p.24001. DOI: 10.1088/1752-7155/6/2/024001
201. Tirranen, L.S. és Gitelson, I.I., 2006. The role of volatile metabolites in microbial communities of the LSS higher plant link. *Advances in Space Research*, 38(6), pp.1227–1232. DOI: 10.1016/j.asr.2006.02.038

202. Vahabi, K., 2005. Genetic diversity of *Trichoderma* spp. related to button mushroom (*Agaricus bisporus*) using molecular and morphological approaches. Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. MSc. diplomamunka
203. Varmuza, K., Karlovits, M., Demuth, W., 2003. Spectral similarity versus structural similarity: infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 490(1-2), pp.313–324. DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00668-8
204. Várvolgyi, E., Gere, A., Szöllösi, D., Sipos, L., Kovács, Z., Kókai, Z., Csóka, M., Mednyánszky, Zs., Fekete, A., Korány, K., 2014. Application of Sensory Assessment, Electronic Tongue and GC–MS to Characterize Coffee Samples. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(1), pp.125–133. DOI: 10.1007/s13369-014-1489-5
205. Vas, G. és Vékey, K., 2004. Solid-phase microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(3), pp.233–254. DOI: 10.1002/jms.606
206. Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valéro, J.R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), pp.1–20. DOI: 10.1016/j.bej.2007.05.012
207. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L., Lorito, M., 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1-3), pp.80–86. DOI: 10.1016/j.pmpp.2008.05.005
208. Vinale, F., Flematti, G., Sivasithamparam, K., Lorito, M., Marra, R., Skelton, B.W., Ghisalberti, E.L., 2009. Harzianic Acid, an Antifungal and Plant Growth Promoting Metabolite from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 72(11), pp.2032–2035. DOI: 10.1021/np900548p
209. Vinale, F., Girona, I.A., Nigro, M., Mazzei, P., Piccolo, A., Ruocco, M., Woo, S., Rosa, D.R., Herrera, Ca.L., Lorito, M., 2012. Cerinolactone, a hydroxy-lactone derivative from *Trichoderma cerinum*. *Journal of Natural Products*, 75(1), pp.103–106. DOI: 10.1021/np200577t
210. Vizcaino, J.A., Sanz, L., Basilio, A., Vicente, F., Gutierrez, S., Hermosa, M.R., Monte, E., 2005. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycological Research*, 109(2005), pp.1397–1406. DOI: 10.1017/S0953756205003898
211. Wady, L., Bunte, A., Pehrson, C., Larsson, L., 2003. Use of gas chromatography-mass spectrometry/solid phase microextraction for the identification of MVOCs from moldy building materials. *Journal of Microbiological Methods*, 52(3), pp.325–332. DOI: 10.1016/S0167-7012(02)00190-2
212. Watson, R., Wright, C.J., McBurney, T., Taylor, A.J., Linforth, R.S.T., 2002. Influence of harvest date and light integral on the development of strawberry flavour compounds. *Journal of experimental botany*, 53(377), pp.2121–2129. DOI: 10.1093/jxb/erf088
213. Wehrens, R., 2011a. *Chemometrics with R: Multivariate Data Analysis in the Natural Sciences and Life Sciences* 1st ed., Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. ISBN: 9783642178405
214. Wei, H., Sun, L., Tai, Z., Gao, S., Xu, W., Chen, W., 2010. A simple and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of eight bioactive components and fingerprint analysis of *Schisandra sphenanthera*. *Analytica chimica acta*, 662(1), pp.97–104. DOI: 10.1016/j.aca.2009.12.
215. Weingart, G., Kluger, B., Forneck, A., Krska, R., Schuhmacher, R., 2012. Establishment and application of a metabolomics workflow for identification and profiling of volatiles from leaves of *Vitis vinifera* by HS-SPME-GC-MS. *Phytochemical Analysis*, 23(4), pp.345-358. DOI: 10.1002/pca.1364
216. Wenke, K., Kai, M., Piechulla, B., 2010. Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta*, 231(3), pp.499–506. DOI: 10.1007/s00425-009-1076-2
217. Wilkes, J.G., Conte, E.D., Kim, Y., Holcomb, M., Sutherland, J.B., Miller, D.W., 2000. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2), pp.3–33. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00318-6
218. Wilkins, K., Larsen, K., Simkus, M., 2000. Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media. *Chemosphere*, 41(3), pp.437–446. DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00273-8
219. Wilkins, K., Larsen, K., Simkus, M., 2003. Volatile metabolites from indoor molds grown on media containing wood constituents. *Environmental Science and Pollution Research*, 10(4), pp.206–208. DOI: 10.1065/espr2002.05.119
220. Williams, J., Clarkson, J.M., Mills, P.R., Cooper, R.M., 2003. Saprotrophic and Mycoparasitic Components of Aggressiveness of *Trichoderma harzianum* Groups toward t.pdf. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), pp.4192–4199. DOI: 10.1128/AEM.69.7.4192
221. Wold, S., 1995. Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it? *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 30(1), pp.109–115. DOI: 10.1016/0169-7439(95)00042-9
222. Xiao-Yan, S., Qing-Tao, S., Shu-Tao, X., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z., 2006. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 260(1), pp.119–125. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00316.x
223. Yeh, R. G. Shieh, J.S., Chen, G.Y., Kuo, C.D., 2009. Detrended fluctuation analysis of short-term heart rate variability in late pregnant women. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, 150(1-2), pp.122–6. DOI: 10.1016/j.autneu.2009.05.241
224. Yudthavorasit, S., Wongravee, K., Leepipatpiboon, N., 2014. Characteristic fingerprint based on gingerol derivative analysis for discrimination of ginger (*Zingiber officinale*) according to geographical origin using HPLC-DAD

- combined with chemometrics. *Food chemistry*, 158, pp.101–11. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.086
- 225.Zhang, H., Xie, X., Kim, M.S., Kornyejev, D.A., Holaday, S., Paré, P.W., 2008. Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 56(2), pp.264–73. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03593.x
- 226.Zhang, Y., Askim, J.R., Zhong, W., Orlean, P., Suslick, K.S., 2014. Identification of pathogenic fungi with an optoelectronic nose. *The Analyst*, 139(8), pp.1922–8. DOI: 10.1039/c3an02112b
- 227.Zhao, J., Du, X., Cheng, N., Chen, L., Xue, X., Zhao, J., Wu, L., Cao, W., 2016. Identification of monofloral honeys using HPLC-ECD and chemometrics. *Food Chemistry*, 194, pp.167–174. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.010

Internetes hivatkozások:

Internet 1: <http://bioinformatics.charite.de/mvoc>.

Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: bioinformatics mVOC. Lekérdezés időpontja: 2016. március 23.

Internet 2: <http://ec.europa.eu/eurostat/data/database>.

Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: eurostat database. Lekérdezés időpontja: 2016. január 15.

Internet 3: <http://www.biofungi.hu/>.

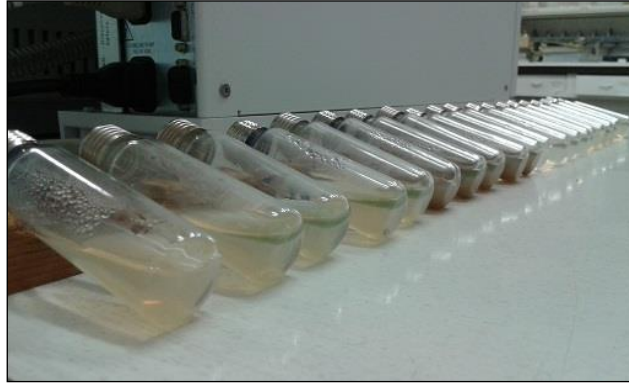
Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: biofungi. Lekérdezés időpontja: 2016. június 15.

Internet 4: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>.

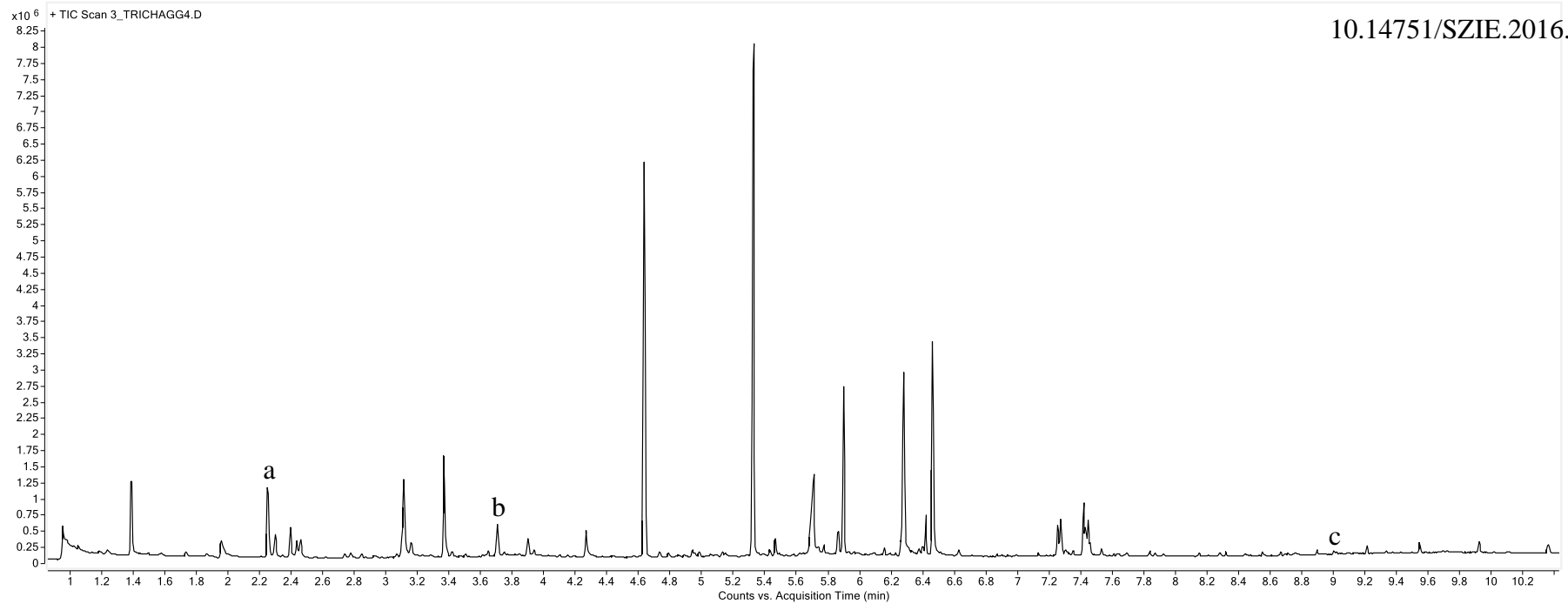
Keresőprogram: Google. Kulcsszavak NIST webbook. Utolsó lekérdezés időpontja: 2016. június 1.



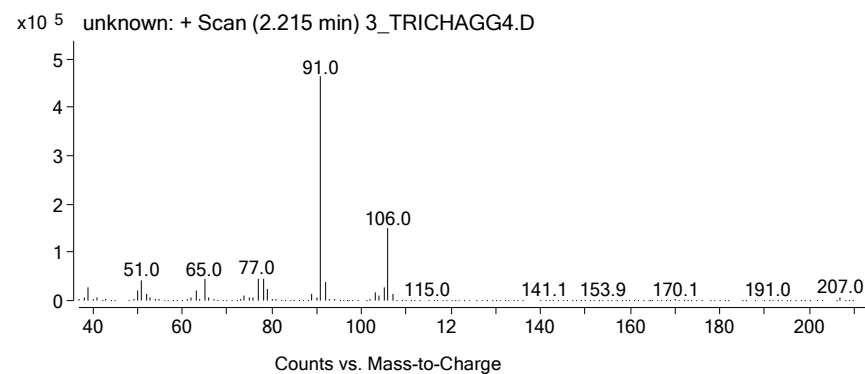
## MELLÉKLET 2. ÁBRÁK GYŰJTEMÉNYE



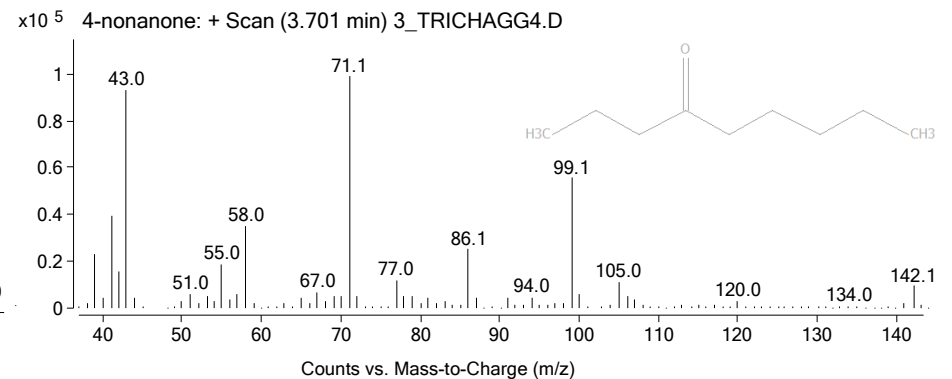
**Melléklet 2.1. ábra:** Különböző beoltott táptalajok 20 mL-es HS- üvegsékben a vizsgálat során



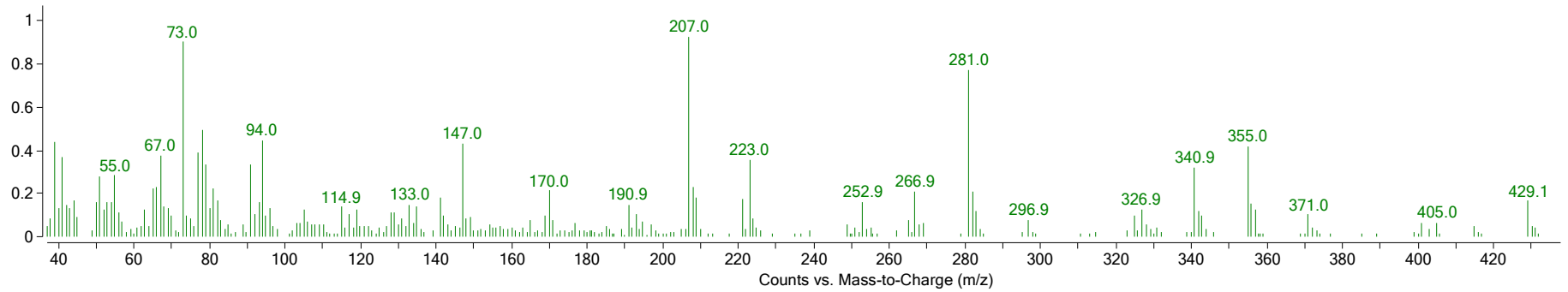
**Melléklet 2.2. ábra:** *Trichoderma aggressivum* harmadik napon mért eredeti TIC kromatogramja (MassHunter szoftverből)



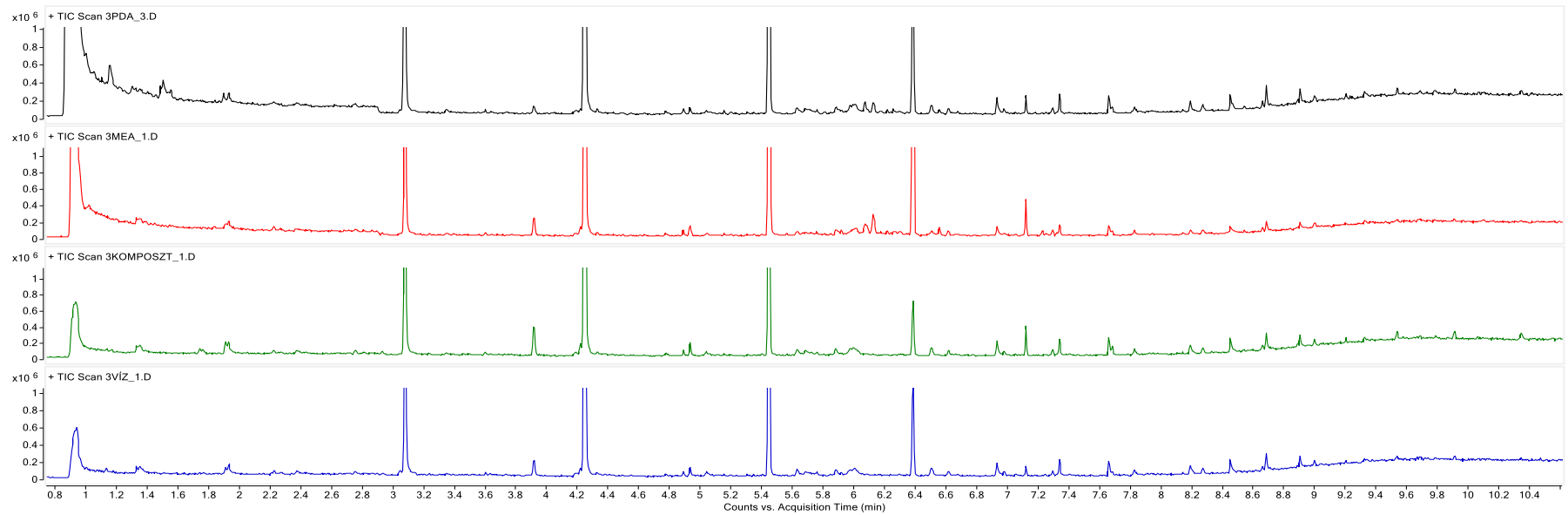
**Melléklet 2.3. ábra:** A Melléklet 2.2. ábráján a-vel jelzett azonosítatlan komponens tömegspektruma



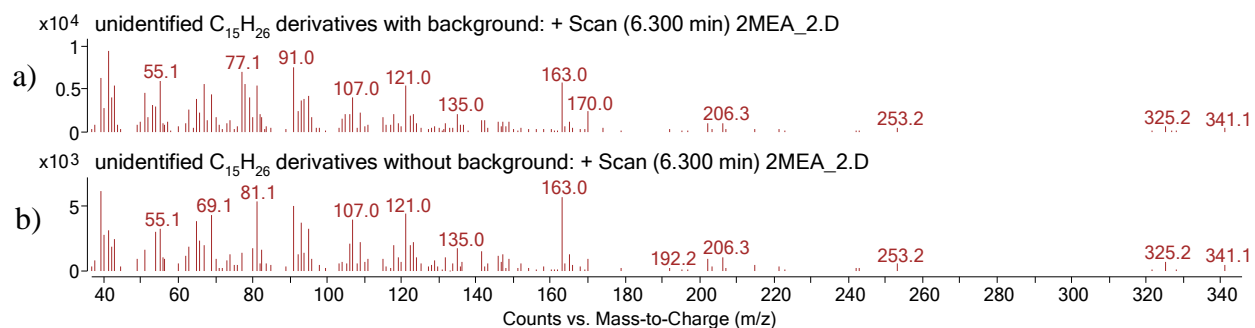
**Melléklet 2.4. ábra:** A Melléklet 2.2. ábráján b-vel jelzett komponens (4-nonanone) tömegspektruma

x10<sup>4</sup> unknown: + Scan (9.010 min) 3\_TRICHAGG4.D

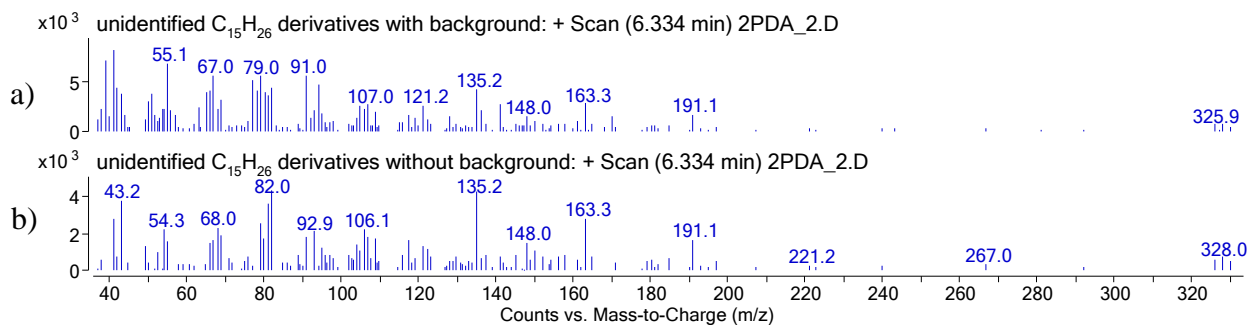
**Melléklet 2.5. ábra:** A Melléklet 2.2. ábráján c-vel jelzett azonosítatlan komponens tömegspektruma



**Melléklet 2.6. ábra:** *Trichoderma aggressivum* MVOC mintázata négy különböző tápagon (eredeti TIC kromatogram MassHunter szoftverből)



**Melléklet 2.7. ábra:** A Melléklet 2.6. ábráján 6,30-nál érkező azonosítatlan  $C_{15}H_{26}$  származék tömegspektruma a) háttérrel b) háttér nélkül



**Melléklet 2.8. ábra:** A Melléklet 2.6. ábráján 6,33-nál érkező azonosítatlan  $C_{15}H_{26}$  származék tömegspektruma a) háttérrel b) háttér nélkül



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban konzulenseimnek, Dr. Fodor Péternek és Jókainé Dr. Szatura Zsuzsannának, akik odaadó munkájukkal segítettek doktori éveim során és disszertációm megírásában. Szakmai és emberi támogatásukat, kitartásukat valamint türelmüket köszönöm az együtt töltött közel négy év alatt.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá:

- Dr. Hajdú Csabának a doktori munkám során nyújtott szakmai segítségért és támogatásért.
- Biofungi Kft.-nek a folyamatosan rendelkezésre álló gombakomposzt mintákért, illetve a komposztellőállítás megismerése során nyújtott szakmai segítségért és gyárlátogatás biztosításáért.
- KMR-12-1-2012-0189 számú projektnek, aminek anyagi támogatásával egy projektmunka keretein belül valósulhattak meg a doktori munkámhoz szükséges mérések.
- Dr. Geösel Andrásnak, aki fáradságot nem ismerve mindig segítségemre volt a mikroorganizmusok és gombák előkészítésében.
- diplomázó hallgatóimnak, akik a mintavételben és mintaelőkészítésben nyújtottak segítséget.
- Dr. Stefan Hann-nak és a BOKU egyetem kutatócsoportjának az ismeretlen komponensek azonosítása és kutatása során nyújtott szakmai segítségért,
- valamint az ERASMUS ösztöndíjprogramnak, hogy lehetővé tette számomra a külföldi szakmai gyakorlati részvételt.
- Dr. Héberger Károlynak, aki a statisztikai elemzések ellenőrzésében nyújtott segítséget, szakmai észrevételeivel és kritikáival emelte az elemzések színvonalát.
- Tanszékelem összes munkatársának a hétköznapiak során nyújtott derűs hangulatért és biztatástért,
- valamint Dr. Dernovics Mihálynak, a doktori éveim során nyújtott szakmai tanácsokért, észrevételekért és ötletekért.

Szeretném megköszönni a segítséget és támogatást kedves szüleimnek és testvéreimnek is, akik tanulmányaim kezdete óta nyomonkövették munkásságomat, támogattak és biztattak doktori éveim során.

Végül szeretném megköszönni férjemnek, Dr. Gere Attilának azt a rengeteg odaadást és segítséget, amit az eddigi évek során tanúsított. Köszönöm, hogy mindent félre téve mindig jutott pár kedves, nyugtató szava számomra. Bátorítása és biztatása nélkül sohasem kélszületett volna el ez a munka.

Köszönöm!