



Szelénnel kezelt komposzton termesztett csiperkegomba szelénspeciációs vizsgálata

KAROSI ROLAND^{1,2} – MARCIN WOJCIECHOWSKI¹ –
EWA BULSKA¹ – TÓÁSÓ GYULA³ – POSTA JÓZSEF²

¹ Faculty of Chemistry, Warsaw University
Pasteura 1, 02-093 Warsaw, Poland

² Debreceni Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék
Debrecen

³ Nyugat-Magyarországi Egyetem
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar
Mosonmagyaróvár

ÖSSZEFOGLALÓ

Munkánk célja természetes és szelénnel kezelt komposzton termesztett csiperkegomba (*Agaricus bisporus*) minták teljes szeléntartalmának meghatározására és a minták minőségi szelénspeciációs vizsgálatára irányult. Különböző extrakciós közegeket biztosítva (vizes, savas közeg és enzimek jelenléte – tripszin, drizeláz és proteáz) megvizsgáltuk az extrakció hatásfokát, az extrakcióval kinyert szelénformákat és összehasonlítottuk a hús 6 órás mechanikus keverés és fél órás ultrahangos rázatás hatását az extrakció hatásfokára. A szeléntartalom meghatározása ICP-MS készülékkel történt a ⁸²Se izotóp monitorozásával. A gombaminták vizes és enzimatis extraktumainak szelénspeciációs vizsgálatát HPLC technikával, anioncserélő oszlopon történő elválasztással hajtottuk végre, amit online ICP-MS meghatározás követett. Néhány ismeretlen szelénspeciesszel egyetemben a mintáinkban szelenometionint, szelenocisztint, szeleno-metil-szelenociszteint és szervetlen szelénformákat sikerült azonosítanunk.

BEVEZETÉS

A szelén egyike azoknak az elemeknek, amelyek nagyon szűk toleranciatartománnyal jellemezhetők [1], azaz a szervezet számára szükséges és a toxikus szelénmennyiség nagyon közel esik egymáshoz. Az ajánlott napi beviteli szint alatti szelénfelvétel különböző szelénhiánnyal kapcsolatos betegségekhez vezethet [2–4], az ajánlott bevétel többszörösét

meghaladó mennyiségnél viszont a szelén toxikus hatása figyelhető meg. Mindemellett ezt az elemet az emberek nélkülözhetetlen tápanyagaként könyvelték el, melynek nagy biológiai aktivitása ismert. Fontos része néhány enzimnek, mint például a glutation-peroxidáz és tioredoxin redukáz [5, 6]. A különböző szelénvegyületek szervezetre gyakorolt eltérő hatása miatt az analitikai kémia fontos tárgyává vált a szelenspeciáció, azaz a szelénformák egymás melletti meghatározása. Fontos, hogy a felvett szelén milyen kémiai formában kerül be a szervezetbe, és ennek függvényében milyen átalakulás után raktározódik, illetve ürül ki a szervezetből.

1. táblázat Néhány, a környezetünkben megtalálható szervetlen és szerves szelénmódsulat

Table 1. Some inorganic and organic selenium species and their formula

Name	Formula
Szelenit	SeO_3^{2-}
Szelenát	SeO_4^{2-}
Szelenometionin	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Se-CH}_3$
Szelenocisztein	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-Se-H}$
Szelenetionin	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Se-CH}_2\text{CH}_3$
Szelenocisztin	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-Se-Se-CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Se-metil-szelenocisztein	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-Se-CH}_3$
Selenocianid	HSeCN
γ -glutamil-Se-metil-szelenocisztein	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{-CO-NHCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{-Se-CH}_3$
Szelenocisztationin	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Se-CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3)\text{COOH}$
Szelenohomocisztein	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Se-H}$
Trimetilszelenonium kation	$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$
Szelenocisztamin	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{-Se-Se-CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Se-adenozilszelenohomocisztein	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Se-CH}_2\text{C}_4\text{H}_5\text{C}_5\text{N}_4\text{NH}_2$
Dimetilszelenid	$(\text{H}_3\text{C})_2\text{Se}$ (illékony)
Dimetildiszelenid	$(\text{H}_3\text{C})_2\text{Se-Se}(\text{CH}_3)$ (illékony)

A szelénhiányos környezetben ezért biztosítani kell, hogy táplálék-kiegészítők formájában pótolhassuk a hiányt. Erre lehetnek alkalmasak a gombák, mert ezek bizonyos nyomelemeket a táptalajból nagy koncentrációban képesek felvenni, elraktározni. Ezért korábbi vizsgálataink első lépése az volt, hogy nátrium-szelenittel és nátrium-szelenáttal kezelt komposzton termesztett csiperkegombának (*Agaricus bisporus*) vizsgáltuk a terméshozamát a táptalaj szelénszintjének függvényében. Sikerült meghatározni az elemfelvételbeli különbséget a szelenit és szelenát forma között. Mindkét formára meghatároztuk a komposzt optimális szeléntartalmát, amely esetén a terméshozam javulása mellett kellő szeléndúsulás érhető el. Megállapítottuk továbbá, hogy milyen a komposzt maximális szeléntartalma, amely jelenlétében megszűnik a gomba fejlődése. A nagy szeléntartalmú termesztett csiperkegomba szárítás után jól porítható, szeléntartalma a kívánt értékre beállítható. Ez alapja lehet olyan tápláléknak, táplálék-kiegészítőnek, amely az emberi szervezet számára a szelénhiány pótlását biztosítja.

E projekt keretében arra kerestünk választ, hogy a felvett szelént a csiperkegomba milyen kémiai formában raktározza. Az emberi szervezet számára ugyanis ettől erősen függ, hogy a gombában dúsult szelént a szervezet mennyire tudja hasznosítani, és hogy e szelénkoncentráció ebben a formában nem toxikus-e. A korábbi és jelenlegi vizsgálatok a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének a Nyugat-Magyarországi Egyetem Élelmiszertudományi Intézetével és a Varsói Egyetem Kémiai Karával folyó együttműködése keretében folynak.

BERENDEZÉSEK ÉS MÓDSZEREK

Teljes szeléntartalom

A vizsgálatok első lépése a gombaminták összes szeléntartalmának meghatározása volt. Ehhez a gombákat mikrohullámmal elősegített nagynyomású roncsolásnak vetettük alá, melyet Multiwave (Anton Paar, Austria) készülékkel végeztünk. A roncsolás 4 ml 65% HNO₃-val folyt 1000 W energiával 40 percen keresztül. Ezt követően az elroncsolt mintákból készült oldatot kvantitatívan műanyag kémcsőbe átmostuk és ioncserélt vízzel 15 ml-re töltöttük. Az így kapott mintaoldatokat teljes szeléntartalmát induktív csatolású plazma tömegspektrométerrel (ICP-MS) határoztuk meg.

Extrakciós eljárások

A homogenizált gombamintát (0,1 g) műanyag kémcsővekbe helyeztük és hozzáadtunk 4 ml-t a megfelelő extrahálószerkekből. A szelénformák kivonását ioncserélt vízzel, 3%-os sósavval, valamint többféle enzimmel (tripszin, drizeláz, proteáz) végeztük el. Összehasonlításra került az ultrahangos rázással és 20 órás mechanikus keveréssel végzett extrakció is. Az extrakciós módszerek leírása a 2. táblázatban látható. Extrakció után a centrifugálással kapott felülúszókat elválasztottuk az üledéktől és 0,45 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrőn engedték át.

Szelénmódosulatok elválasztása

Az előbbieket szerint nyert extraktumokból a szelénformák elválasztását anioncserés nagynyomású folyadékkromatográfiával végeztük. Az eluens szállítását L-6210 (Merck, Germany) HPLC nagynyomású pumpával valósítottuk meg. A vivőfolyadék 4,7 pH-jú ammónium-acetát volt. Az elválasztó oszlop típusa: HAMILTON PRP-X 100 (200 mm x 4,6 mm x 10 mm), Hamilton, USA. Az elúciós program a 3. táblázatban látható. Az így elválasztott szelénformák detektálására a folyadékkromatográfot Elan 6100 DRC (Perkin Elmer SCIEX, USA) induktív csatolású plazma tömegspektrométerrel (AE-HPLC-ICP-MS) kombináltuk.

2. táblázat Extrakciós módszerek leírása
Table 2. Description of extraction methods

Extrakciós közeg	Ultrahang	Extrakciós idő	Extrakciós térfogat (ml)	Extrakció hatásfoka (%)
Ioncserélt víz	Igen	30 perc	4,0	20,7
	Nem	20 óra	4,0	25,7
3%-os HCl	Igen	30 perc	4,0	24,6
	Nem	20 óra	4,0	27,2
20 mg tripszin 50 mmol/L Tris-HCl-ben	Igen	30 perc	4,0	35,2
	Nem	20 óra	4,0	42,8
20 mg drizeláz 50 mmol/L Tris-HCl-ben	Igen	30 perc	4,0	32,3
	Nem	20 óra	4,0	33,1
20 mg proteáz 50 mmol/L Tris-HCl-ben	Igen	30 perc	4,0	47,6
	Nem	20 óra	4,0	45,3
20 mg proteáz 50 mmol/L Tris-HCl-ben (drizelázal való extrakció után)	Igen	30 perc	4,0	54,7
	Nem	20 óra	4,0	56,2

3. táblázat A gombaminák szelénmódosulatainak elválasztása során használt elúciós program
Table 3. Elution program used for the separation of selenium species of mushroom samples

Lépések	Elúciós program – gradiens elúció (Eluens összetétele)
I.	0–4 percig 2 mmol/L CH ₃ COONH ₄ – 95% metanol – 5%
II.	4–4,1 percig 2 mmol/L CH ₃ COONH ₄ – 95% – 0% 200 mmol/L CH ₃ COONH ₄ – 0% – 92% metanol – 5% – 8%
III.	4,1–25 percig 200 mmol/L CH ₃ COONH ₄ – 92% metanol – 8%

EREDMÉNYEK

Teljes szeléntartalom meghatározása

A munka során felhasznált gombaminták és a teljes szeléntartalom meghatározás eredményei a 4. táblázatban látható. Magasabb szelénfelvétel volt megfigyelhető, ha a gomba szelennel adalékolt kompozton volt termesztve. A szelennel kezelt kompozton termesztett csiperke gomba szeléntartalma csaknem harmada volt a szelennel kezeltnek.

4. táblázat A gombaminták termesztésénél használt komposzt típusa és a minták teljes szeléntartalma

Table 4. Composts used for cultivation of mushroom samples and total selenium concentration in mushrooms

Minta-szám	A gomba termesztésénél használt komposzt kezelése	Teljes szeléntartalom ($\mu\text{g Se/g}$)
1.	Komposzt adalék nélkül	4,2
2.	1 kg komposzt + 10 mg Se(IV) Na_2SeO_3 formában	182,0
3.	1 kg komposzt + 10 mg Se(VI) Na_2SeO_4 formában	88,0

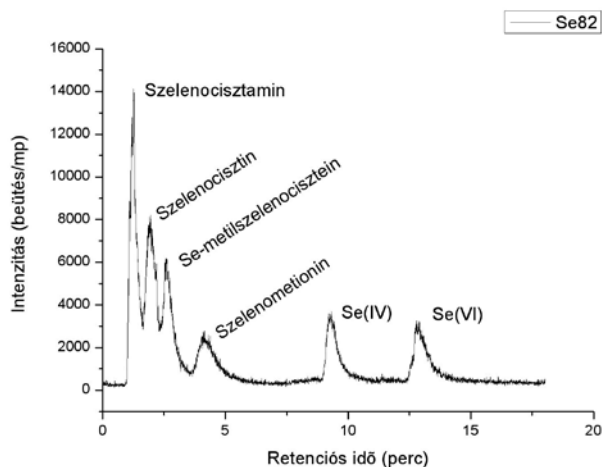
Elválasztás és azonosítás

A szelénmódosulatok extrahálására ioncserélt vizet, 3%-os sósavat, két különböző proteolitikus enzimet (tripszin, proteáz) és egy sejtfalbontó enzimkeveréket (drizeláz) teszteltünk. A különböző extraháló eljárások közül a kétlépéses enzimatis (drizeláz és proteáz) extrakció bizonyult a leghatásosabbnak. Az extrakciók hatásfokait a 2. táblázatban láthatjuk.

Az 1. ábrán bemutatott standard szelénformák kromatogramját a 2. ábrán bemutatott extraktum kromatográfiás csúcaival összehasonlítva jól látható, hogy a kísérő anyagok jelentősen befolyásolják az egyes szelénformák retenciós idejét. Az extraktum egyes komponenseinek azonosítása ezért standard addíciós módszerrel történt, melynek során a következő szelénmódosulatokat azonosítottuk a csiperkegomba mintákban: szelenometionin, szelenocisztin, szeleno-metil-szelenocisztein, illetve szelénsók.

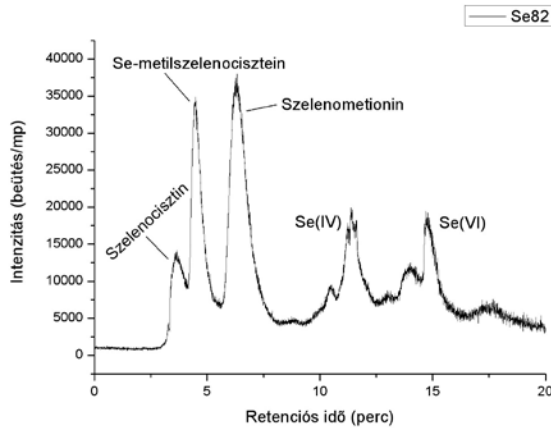
1. ábra Szelénformákra 10-10 μg szelén/L szelén-standardok anion-cserés kromatogramja HPLC-ICP-MS detektálási rendszerrel

Figure 1. Chromatogram of a mixture of standard selenium forms



2. ábra Se(VI)-al kezelt gombaminta enzimatikus extrakciójának (20 órán át drizelázssal) kinyert extraktum anioncserés kromatogramja

Figure 2. Chromatogram of an extract obtained by extraction of mushroom with driselase enzyme

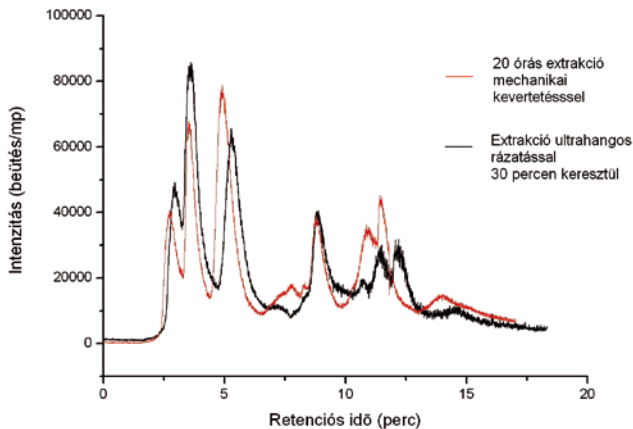


Ultrahangos rázással és mechanikus kevertetéssel végzett extrakció összehasonlítása

Összehasonlításra került az ultrahangos rázással és 20 órás mechanikus kevertetéssel végzett extrakció is. Az eredményeink alapján az ultrahang segítségével végzett extrakciónál (30 percen belül) elért hatások hasonló a 20 órás mechanikus kevertetéssel végzett extrakcióéval. Az egyetlen eltérés a különböző szelénmódsulatok extrakciós hatásokában található (3. ábra).

3. ábra A mechanikus és ultrahang segítségével végzett extrakció összehasonlítása

Figure 3. Comparison of extractions performed by 20-min shaking with ultrasound and 20-hour mechanic shaking



ÉRTÉKELÉS

Az eddigi vizsgálatokból az alábbiak voltak megállapíthatók. A gomba által felvett szelén koncentrációja függ mind a komposzt szelénkoncentrációjától, mind pedig annak szelénformájától. A korábbi tapasztalatokkal egyezően az azonos (10 mg/kg) koncentrációjú szelennel és szelenáttal kezelt komposztról szedett csiperkegombákban a szelénkoncentráció jelentősen eltért. Többszörös szelénfelvétel volt megfigyelhető, ha a gomba szelennel adalékolt komposzton volt termesztve. Enzimatisz extrakció esetén az ultrahanggal 20 percig végzett rázatás hasonló eredménnyel alkalmazható, mint a 20 órás mechanikai rázatás. Az egyetlen eltérés a különböző szelénmódosulatok extrakciós hatásfokában található. A szerves szelénformákkal kezelt táptalajból felvett szelén jelentős része átalakul szerves szelénvegyületekké. A HPLC-ICP-MS rendszer lehetővé tette számunkra az *Agaricus bisporus* gombamintáinkban eddig a szelenometionin, szelenocisztin, Se-metil-szelenocisztein, szelenit és szelenát szelénmódosulatok azonosítását.

Ezzel a munkával egy megbízható analitikai módszert szeretnénk javasolni gombaminták szelénspeciációjára és egyben megerősítenénk, hogy a szelénsók jelenlétében termesztett gombák képesek a szerves szelénformákat szelenoaminosavakká átalakítani.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az elvégzett kísérletek az OTKA T043366 pályázat és a HEF_06_1-SPECANAL jelű Öveges József Program támogatásával készültek. Karosi Roland köszönetét szeretné nyilvánítani az International Visegrad Fund-nak az 5 hónapos lengyelországi tanulmányútjának támogatásáért.

SUMMARY

In this study, total determination and speciation analysis of selenium in selenized and non-selenized mushroom samples (*Agaricus bisporus*) have been performed. Different extraction methods (water, acidic and enzymatic – trypsin, protease, driselase), their extraction efficiency and the obtained selenium species were investigated. The use of ultrasounds and 20-hours mechanical extraction were also compared. The selenium speciation of aqueous and enzymatic extracts of mushroom samples were carried out by using anion-exchange high performance liquid chromatography (AE-HPLC) coupled on-line to inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) by monitoring of Se⁸² isotope. Next to a few unknown species the use of HPLC-ICP-MS method allowed us to identify the following selenium species: selenomethionine, selenocystine, seleno-methyl-selenocysteine and inorganic selenium.

IRODALOM

1. *Suzuki, K. T.* (2005): Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. *J. Health Sci.* 51, 107–114.
2. *Cheng, Y. Y. – Qian, P. C.* (1990): The effect of selenium-fortified table salt in the prevention of Keshan disease on a population of 1.05 million. *Biomed. Environ. Sci.* 3, 422–428.
3. *Gu, G. W.* (1989): Selenium and cancerous epidemiology. *Int. Med.* 5, 176–177.
4. *Tan, J. A. – Zhu, W. Y. – Wang, W. Y. – Li, R. B. – Hou, S. F. – Wang, D. C. – Yang, L. S.* (2002): Selenium in soil and endemic diseases in China. *Sci. Total Environ.* 284, 227–235.
5. *Arthur, J. R. – Nicol, F. – Beckett, G. J.* (1990): Hepatic iodothyronine 5' deiodinase: the role of selenium. *Biochem. J.* 272, 537–540.
6. *Ganther, H. E.* (1999): Selenium metabolism, selenoproteins, and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 20, 1657–1666.

A szerzők levélcíme – Address of the authors:

WOJCIECHOWSKI Marcin – BULSKA Ewa
Faculty of Chemistry, Warsaw University
Pasteura 1, 02-093 Warsaw, Poland

KAROSI Roland – POSTA József
Debreceni Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék
H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

TÓÁSÓ Gyula
Nyugat-Magyarországi Egyetem
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar
Kémia Tanszék
H-9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony u. 15–17.