

**Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego**  
**im. prof. Wacława Dąbrowskiego**  
**Zakład Analizy Żywności**

**dr inż. Marcin Bryła**

Załącznik 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego  
w dziedzinie Nauk Rolniczych w dyscyplinie Technologia Żywności i Żywienia

**Autoreferat**

Występowanie wtórnych metabolitów grzybów strzępkowych w roślinach  
zbożowych w aspekcie bezpieczeństwa żywności

Warszawa, 2018



## Spis treści

1. Dane personalne .....	5
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej .....	5
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	6
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki .	7
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	7
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia.....	7
4.3. Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia .....	9
4.3.1. Wprowadzenie .....	9
4.3.2. Cel naukowy Osiągnięcia oraz omówienie wyników badań.....	14
4.3.3. Podsumowanie.....	31
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych).....	40
5.1. Zestawienie dorobku przed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.....	40
5.2. Sumaryczny impact factor (IF) według listy Journal Citation Reports (JCR).	42
5.3. Sumaryczna liczba punktów według MNiSW .....	42
5.4. Liczba cytowań publikacji .....	42
5.5. Indeks Hirscha.....	42
5.6. Udział i rola w projektach badawczych .....	42
5.7. Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową.....	45
5.8. Staże naukowe i uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych .....	45
5.9. Recenzje publikacji w czasopiśmie międzynarodowych i krajowych .....	45
5.10. Opis działalności naukowej .....	46



## 1. Dane personalne

Imię i nazwisko: Marcin Bryła

Miejsce pracy: Zakład Analizy Żywności

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno – Spożywczego im.  
prof. Waclawa Dąbrowskiego w Warszawie  
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

## 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

**12.06.2014** Doktor inżynier nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia człowieka, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, praca doktorska pt. „Występowanie fumonizyn w kukurydzy i produktach kukurydzianych oraz ich przemiany w wybranych operacjach technologicznych” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Mieczysława W. Obiedzińskiego. Praca została wyróżniona uchwałą Rady Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie.

**23.07.2009** Magister inżynier, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, praca magisterska pt. „Autentyczność geograficznego pochodzenia kawy *Coffea arabica* i *Coffea canephora var. robusta*” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Mieczysława W. Obiedzińskiego.

**13.03.2008** Inżynier, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, praca inżynierska pt. „Nowe trendy w analizie autentyczności i identyfikowalności żywności” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Mieczysława W. Obiedzińskiego.

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

#### **12.09.2014 – obecnie**

Stanowisko: ADIUNKT

Miejsce zatrudnienia: Zakład Analizy Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno – Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie.

#### **08.02.2012 – 11.09.2014**

Stanowisko: ASYSTENT

Miejsce zatrudnienia: Zakład Analizy Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno – Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie.

#### **01.07.2010 – 07.02.2012**

Stanowisko: TECHNOLOG

Miejsce zatrudnienia: Zakład Analizy Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno – Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie.

#### **02.03.2010 – 30.06.2010**

Stanowisko: STAŻYSTA

Miejsce zatrudnienia: Zakład Analizy Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno – Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie.

#### **4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki**

Osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.) jest monotematyczny cykl sześciu publikacji naukowych.

##### **4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

Występowanie wtórnych metabolitów grzybów strzępkowych w roślinach zbożowych w aspekcie bezpieczeństwa żywności.

##### **4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia**

H1. **Bryła M.**, Waśkiewicz A., Ksieniewicz-Woźniak E., Szymczyk K., Jędrzejczak R. (2018): Modified *Fusarium* mycotoxins in cereals and their products - metabolism, occurrence, and toxicity: an updated review. *Molecules*, 23(4), 963 [MNiSW = 30; IF = 2,861; IF<sub>5-letni</sub> = 2,988].

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaproponowaniu koncepcji pracy, analizie dostępnej literatury, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem (autor korespondujący). Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

H2. **Bryła M.**, Waśkiewicz A., Podolska G., Szymczyk K., Jędrzejczak R., Damaziak K., Sułek A. (2016): Occurrence of 26 mycotoxins in the grain of cereals cultivated in Poland. *Toxins*, 8(6), 160 [MNiSW = 35; IF = 3,030; IF<sub>5-letni</sub> = 3,450].

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu analiz i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem (autor korespondujący). Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

H3. **Bryła M.**, Ksieniewicz-Woźniak E., Waśkiewicz A., Szymczyk K., Jędrzejczak R. (2018): Natural occurrence of nivalenol, deoxynivalenol, and deoxynivalenol-3-glucoside in Polish winter wheat. *Toxins*, 10(2), 81 [MNiSW = 35; IF = 3,030; IF<sub>5-letni</sub> = 3,450].

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaproponowaniu koncepcji pracy, wykonaniu analiz i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem (autor korespondujący). Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

H4. **Bryła M.**, Ksieniewicz-Woźniak E., Waśkiewicz A., Szymczyk K., Jędrzejczak R. (2018): Co-occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in beer samples. *Food Control*, 92, 319-324 [MNiSW = 40; IF = 3,496; IF<sub>5-letni</sub> = 3,584].

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaproponowaniu koncepcji pracy, wykonaniu analiz i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem (autor korespondujący). Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

H5. **Bryła M.**, Waśkiewicz A., Szymczyk K., Jędrzejczak R. (2017): Effects of pH and temperature on the stability of fumonisins in maize products. *Toxins*, 9(3), 88 [MNiSW = 35; IF = 3,030; IF<sub>5-letni</sub> = 3,450].

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaproponowaniu koncepcji pracy, wykonaniu analiz i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem (autor korespondujący). Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

H6. **Bryła M.**, Ksieniewicz-Woźniak E., Podolska G., Waśkiewicz A., Szymczyk K., Jędrzejczak R. (2018): Occurrence of ergot and its alkaloids in winter rye harvested in Poland. *World Mycotoxin Journal*, DOI 10.3920/WMJ2018.2322 [MNiSW = 25; IF = 2,189; IF<sub>5-letni</sub> = 2,279].



*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaproponowaniu koncepcji pracy, wykonaniu analiz i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redaktorem (autor korespondujący). Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

Łączny Impact Factor (IF) dla sześciu publikacji naukowych wchodzących w skład Osiągnięcia wynosi 17,636 (IF<sub>5-letni</sub> = 19,201). Suma punktów według polskiej oceny czasopism MNiSW (z roku opublikowania) 200.

### **4.3. Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia**

#### **4.3.1. Wprowadzenie**

W omówieniu publikacji wchodzących w skład Osiągnięcia wykorzystano następujące skróty:

15-AcDON	15-acetyl-deoksyniwalenol
3-AcDON	3-acetyl-deoksyniwalenol
ARfD	ostra dawka referencyjna
DON	deoksyniwalenol
DON-3G	deoksyniwalenol-3-glukozyd
EFSA	Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności
HFB <sub>1</sub>	zhydrolizowana fumonizyna B <sub>1</sub>
PHFB <sub>1a</sub> i PHFB <sub>1b</sub>	częściowo zhydrolizowana fumonizyna B <sub>1</sub> (izomer a i b)
NIV	niwalenol
TDI	tymczasowe dzienne tolerowane pobranie
UPLC-TOF-HRMS	ultra-wysokosprawny chromatograf ciekłowy z wysokorozdzielczym spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu
ZEN	zearalenon
α-ZEL	α-zearalenol
β-ZEL	β-zearalenol.

Polska jest znaczącym producentem zbóż. W gospodarce narodowej rolnictwo odgrywa istotną rolę, w którym z kolei produkcja roślinna stanowi ok. 43% produkcji rolniczej, a produkcja zbóż stanowi ok. 37% produkcji roślinnej ogółem. W roku 2016

produkcja pszenicy wynosiła ok. 10,8 mln ton, żyta - 2,2 mln ton, jęczmienia - 3,4 mln ton, owsa - 1,4 mln ton i pszenżyta - 5,1 mln ton, co powoduje, że pod względem uprawy Polska zajmuje drugie miejsce w Unii Europejskiej (po Francji), a w zbiorach – trzecie (po Francji i Niemczech). Pomimo faktu, iż w Polsce zbiory zbóż i plony w poszczególnych latach ulegają znacznym wahaniom, wynikającym ze zmienności warunków pogodowych, to w plonowaniu zbóż odnotowuje się tendencję wzrostową (CSO, 2017).

Ziarno zbóż jest podstawowym surowcem do produkcji żywności. Jest również głównym komponentem pasz stosowanych w żywieniu zwierząt. Do najważniejszych gatunków zbóż o największym światowym znaczeniu gospodarczym zaliczyć należy kukurydzę, pszenicę oraz ryż (Syp, 2015). Roczna wielkość produkcji poszczególnych gatunków ziarna zbóż i jej jakość jest w Polsce uwarunkowana licznymi czynnikami. Wpływ na skalę produkcji wywiera także sytuacja na światowych rynkach zbóż i wielkość gospodarstw rolnych. Jakość zbóż natomiast zależy m.in. od genotypu zbóż, jakości ziarna do siewu, czynników agrotechnicznych, postępowania pozbiorniczego, a także od czynników pogodowych (Stuper-Szablewska i Perkowski, 2014). Te ostatnie, okazują się być bardzo zmienne pomiędzy poszczególnymi latami zbiorów (Kapusta, 2016).

W ostatnich latach, wraz z obserwowanymi zmianami klimatu, zwraca się uwagę na ich wpływ na produkcję rolniczą, a tym samym na bezpieczeństwo żywności (Magan i wsp. 2011). Pomimo ogromnego postępu w rolnictwie na przestrzeni ostatnich lat, wciąż dużym problemem w uprawie zbóż są choroby wywoływane przez wiele rodzajów grzybów. Grzyby strzępkowe w określonych warunkach mogą biosyntetyzować toksyczne dla ludzi i zwierząt wtórne metabolity zwane powszechnie mikotoksynami (Nesic i wsp. 2014). Mikotoksyny istotnie wyróżniają się spośród większości zanieczyszczeń żywności (np. pozostałości leków weterynaryjnych, pestycydów i zanieczyszczeń środowiskowych). Ich obecność w ziarnie zbóż jest praktycznie nieunikniona i silnie uzależniona od czynników klimatycznych, których kontrola w uprawie zbóż jest praktycznie niemożliwa. Z tego powodu, zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt wynikające z obecności mikotoksyn w żywności może być większe niż wynikające z obecności pozostałości i dodatków substancji chemicznych stosowanych w ochronie i produkcji żywności (Dohlman, 2003).

Wzrost i rozwój grzybów patogennych dla roślin zbożowych jest silnie zależny od czynników pogodowych. Zachodzące globalne zmiany klimatyczne wpływają na

wysoką zmienność przebiegu warunków pogodowych w trakcie sezonu wegetacyjnego. Może to wpływać na stworzenie dogodnych warunków dla rozwoju dotychczas niespotykanych na danym obszarze geograficznym gatunków grzybów (odpowiednia aktywność wody i temperatura) oraz biosyntezy przez te grzyby różnych mikotoksyn (Chakraborty i Newton, 2011).

Do grzybów biosyntetyzujących mikotoksyny należą m.in. grzyby z rodzaju *Aspergillus* (biosyntetyzuje np. aflatoksyny, ochratoksyny), *Penicillium* (np. ochratoksyny), *Fusarium* (np. trichoteceny, zearalenon, fumonizyny), a także *Claviceps* (alkaloidy sporyszu) (Abrunhosa i wsp. 2016). Ostatnie dwa rodzaje grzybów bardzo często w warunkach klimatycznych Polski infekują uprawiane rośliny zbóż (Miedaner i Geiger 2015; Ferrigo i wsp. 2016).

Na podstawie wyników oceny ryzyka w stosunku do wybranych mikotoksyn np. trichotecenów (deoksyniwalenol (DON) i toksyny HT-2 i T-2) oraz zearalenonu (ZEN), fumonizyn, ochratoksyny A (OTA) i aflatoksyn, wprowadzono regulacje dotyczące ich maksymalnych dopuszczalnych zawartości w żywności (Smith i wsp. 2016).

Problem występowania mikotoksyn w ziarnie zbóż wydaje się być bardziej skomplikowany jeśli uwzględnimy w żywności obecność tzw. zmodyfikowanych mikotoksyn. Termin zmodyfikowane mikotoksyny został wprowadzony w celu zdefiniowania wszystkich rodzajów mikotoksyn, których struktura chemiczna została zmieniona wskutek różnych reakcji chemicznych (zachodzących np. podczas przetwarzania ziarna i produkcji żywności) i biochemicznych (zachodzących na skutek aktywności enzymów, bądź drobnoustrojów bytujących w organizmach żywych). Pojęcie zmodyfikowane mikotoksyny określa wszystkie możliwe kierunki ich powstawania. Spośród ogromnej możliwości modyfikacji mikotoksyn, biologicznie modyfikowane mikotoksyny, stanowią szczególną grupę związków, których biosynteza może zachodzić przy udziale enzymów roślinnych, zwierzęcych, czy bakteryjnych. Wiele z tych substancji jest obecnie analizowana pod względem szlaku ich powstawania, właściwości toksykologicznych oraz występowania w żywności (Rychlik i wsp. 2014). W odniesieniu do bezpieczeństwa żywności, głównym problemem jest to, że zmodyfikowane mikotoksyny zwykle nie są wykrywane za pomocą metod analitycznych powszechnie wykorzystywanych do oznaczania mikotoksyn (Berthiller i wsp. 2013). Wciąż brakuje badań z zakresu właściwości toksykologicznych tych substancji. Ograniczenia związane z prowadzeniem tego typu badań wynikają często z braku dostępu do czystych związków, które mogłyby być wykorzystane w badaniach

toksykologicznych. Należy wspomnieć jednak o działaniach podejmowanych przez środowisko naukowe nad możliwymi drogami pozyskiwania tych substancji. Należy tu wymienić syntezę chemiczną i biochemiczną z wykorzystaniem mikroorganizmów i roślin (Fruhmann i wsp. 2012; McCormick i wsp. 2015; Habler i wsp. 2016). Z powyższych przyczyn, nie ma ustanowionych przepisów prawnych w odniesieniu do dopuszczalnych zawartości zmodyfikowanych mikotoksyn w żywności.

Jedną z pierwszych publikacji naukowych wprowadzającą określenie „nowe” mikotoksyny, została opublikowana w 2008 roku i jej tematyka odnosiła się do metabolitów grzybów *Fusarium* takich jak: fuzaroproliferyna, bewerycyna, enniatyny i moniliformina. Od tamtego czasu termin ten był tylko stosowany w odniesieniu do tych związków (Jestoi, 2008). Później „nowe” mikotoksyny zostały zdefiniowane jako mikotoksyny, które nie są ani rutynowo analizowane ani poziom zawartości w środkach spożywczych nie jest regulowany prawnie, jednakże liczba dowodów naukowych wskazujących na ich występowanie ciągle wzrasta. Dlatego też, zgodnie z tą definicją wiele innych metabolitów o znanej lub potencjalnej toksyczności można byłoby sklasyfikować jako „nowe” mikotoksyny (Vaclavikova i wsp. 2013). W myśl tej definicji do tej grupy zaliczyć można alkaloidy sporyszu wytwarzane przez *Claviceps purpurea* - infekujące najczęściej obcopolne gatunki traw. Profil toksykologiczny „nowych” mikotoksyn bardzo często jest słabo poznany albo brak jest doniesień naukowych na ten temat (Kovalsky i wsp. 2016). Podobne stwierdzenie może być zastosowane w kontekście ich występowania w ziarnie zbóż i żywności na bazie zbóż, zwłaszcza pochodzących z polskich upraw.

Dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności bardzo ważny jest rozwój metod analitycznych, umożliwiających wykrywanie mikotoksyn, które w próbkach żywności mogą występować w bardzo zróżnicowanych stężeniach. Wśród tych metod najczęściej wykorzystywane są techniki chromatografii cieczowej z różnymi detektorami, w tym także łączona technika chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (LC-MS). Chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas jest metodą coraz bardziej popularną, ponieważ umożliwia równoczesne oznaczenie w matrycy żywnościowej wielu metabolitów (Rahmani i wsp. 2009). Metody oparte na wykorzystaniu spektrometrii mas z jednej strony umożliwiają ilościowe oznaczanie mikotoksyn w nietypowych matrycach i wykrycie nietypowych dla danych regionów geograficznych mikotoksyn (np. spowodowanych przez globalne ocieplenie), z drugiej zaś, z powodzeniem mogą

być wykorzystywane do wykrywania zmodyfikowanych jak również „nowych” mikotoksyn (Gruber-Dorninger i wsp. 2017).

Zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności i pasz związane z obecnością mikotoksyn i ich zmodyfikowanych form, podkreślane było w dokumentach publikowanych przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). W dalszym ciągu istnieje potrzeba zbierania informacji na temat identyfikacji zmodyfikowanych mikotoksyn i charakterystyki ich struktur chemicznych, które nie zostały jeszcze opisane. Istnieje również potrzeba prowadzenia badań w zakresie opracowania nowych (do rutynowego stosowania) i czułych metod analitycznych. Luka w obszarze badań naukowych nad zmodyfikowanymi mikotoksynami, obejmuje także kierunki ich przemian podczas przetwarzania żywności i pasz (EFSA, 2014a). W kontekście „nowych” mikotoksyn, obejmujących enniatyny, uwzględniając aktualną wiedzę, zaleca się realizację badań skupionych na przemianach zachodzących podczas produkcji żywności, ocenie toksyczności w warunkach *in vivo*, a także badań dotyczących współwystępowania enniatyn w żywności i paszach z innymi toksynami *Fusarium*. Bardzo ważne są także potencjalne efekty synergistyczne zachodzące w organizmie ludzi i zwierząt pod wpływem współwystępowania toksyn *Fusarium* (EFSA, 2014b).

Od dawna zagrożenie związane z występowaniem alkaloidów sporyszu w żywności wiązano z obecnością w ziarnie ich przetrwalników (Naudè i wsp. 2005). W Unii Europejskiej obowiązuje limit maksymalnej dopuszczalnej zawartości przetrwalników sporyszu w ziarnie zbóż na poziomie 0,5 g/kg. Według aktualnego stanu wiedzy, eliminacja przetrwalników sporyszu z ziarna nie prowadzi do całkowitego usunięcia alkaloidów sporyszu. W ziarnie, nawet bez fragmentów przetrwalników, stwierdza się obecność mierzalnych zawartości alkaloidów sporyszu. Dlatego też, w Unii Europejskiej dyskutowana jest zasadność wprowadzenia dopuszczalnej zawartości alkaloidów sporyszu w ziarnie zbóż i jego produktach przemiału, a także gotowych produktach zbożowych do bezpośredniego spożycia (UE, 2015/1940). W niedalekiej przyszłości jest wysoce prawdopodobne, że te przepisy będą obejmowały przynajmniej produkty na bazie zbóż.

Biorąc powyższe pod uwagę podjęto badania nad występowaniem „nowych” i zmodyfikowanych mikotoksyn w ziarnie zbóż i jego produktach. Opracowano rozwiązania analityczne pozwalające na ich identyfikację, a także w przypadku

wybranych substancji (fumonizyny), dokonano identyfikacji zmodyfikowanych form i prześledzono ich stabilność podczas procesu ogrzewania.

#### **4.3.2. Cel naukowy Osiągnięcia oraz omówienie wyników badań**

W zrealizowanych pracach wyróżnić należy dwa główne zagadnienia:

##### **1. Wybrane zmodyfikowane mikotoksyny – aspekty analityczne, występowanie w żywności i przemiany wybranych związków.**

W ramach tej części:

- 1.1. Przeprowadzono charakterystykę aktualnego stanu wiedzy z zakresu powstawania biologicznie zmodyfikowanych mikotoksyn grzybów *Fusarium* w roślinach zbożowych, ich efektów toksykologicznych u ludzi i zwierząt, a także przeanalizowano współwystępowanie tych substancji w ziarnie zbóż i jego produktach (publikacja H1).
- 1.2. Opracowano metody badawcze oznaczania wybranych mikotoksyn w ziarnie zbóż i piwie, a także ich zmodyfikowanych form (publikacje H2-H4).
- 1.3. Za pomocą opracowanych metod badawczych przeprowadzono ocenę występowania mikotoksyn w ziarnie zbóż z krajowych upraw (publikacje H2, H3). Omówiono także wpływ warunków pogodowych oraz genotypu pszenicy na stopień zanieczyszczenia mikotoksynami ziarna określonych genotypów zbóż (publikacja H2). Podkreślono także znaczenie zmodyfikowanych form mikotoksyn.
- 1.4. Przeprowadzono ocenę występowania NIV oraz DON i jego glukozydowej pochodnej (DON-3G) w próbkach piw dostępnych na rynku krajowym (publikacja H4).
- 1.5. Przeprowadzono ocenę wpływu procesu pieczenia ciasta na bazie mąki kukurydzianej naturalnie zanieczyszczonej fumonizynami na stabilność zarówno wolnych, jak i zmodyfikowanych form fumonizyn w zależności od pH środowiska i temperatury pieczenia. Dokonano identyfikacji naturalnie występujących zmodyfikowanych form fumonizyn w kukurydzy (publikacja H5).

##### **2. Wybrane „nowe” mikotoksyny i ich wpływ na bezpieczeństwo żywności.**

W ramach tej części:

- 2.1. Dokonano charakterystyki występowania „nowych” mikotoksyn (enniatyn) w ziarnie zbóż pochodzącym z polskich upraw doświadczalnych (publikacja H2).

2.2. Przeprowadzono ocenę zanieczyszczenia ziarna żyta pochodzącego z polskich upraw doświadczalnych sporyzmem i jego alkaloidami. W badaniach tych uwzględniono ocenę zawartości alkaloidów sporyszu w ziarnie, które spełniało wymagania dotyczące maksymalnych dopuszczalnych zawartości przetrwalników sporyszu, a także przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy zawartościami przetrwalników w ziarnie żyta a sumaryczną zawartością sześciu podstawowych alkaloidów i ich epimerów (publikacja H6).

#### **AD. 1. Wybrane zmodyfikowane mikotoksyny – aspekty analityczne, występowanie w żywności i przemiany wybranych związków.**

Tematyka zmodyfikowanych mikotoksyn należy do obszaru badawczego, który na całym świecie jest obecnie intensywnie eksplorowany. Przełomem w tego typu badaniach była identyfikacja pochodnych mikotoksyn powstałych w reakcjach katalizowanych przez glukozylotransferazy, które uczestniczą między innymi w procesach detoksykacji zachodzących w komórkach roślin (Kluger i wsp. 2013; Warth i wsp. 2015; Uhlig i wsp. 2016).

Celem pracy przeglądowej było przedstawienie tematyki zmodyfikowanych mikotoksyn ze szczególnym uwzględnieniem biologicznie zmodyfikowanych pochodnych DON, toksyn HT-2 i T-2, a także ZEN (publikacja H1). Dokonano charakterystyki ich powstawania, zebrano dane naukowe charakteryzujące ich właściwości toksykologiczne, przeprowadzono ocenę występowania tych związków, a także wskazano na kierunki rozwoju badań nad zmodyfikowanymi mikotoksynami.

W publikacji H1 podkreślono ogromną potrzebę prowadzenia badań nad występowaniem zmodyfikowanych form mikotoksyn w ziarnie zbóż i jego produktach. Działanie to nie jest możliwe bez dostępności standardów analitycznych zmodyfikowanych mikotoksyn, zarówno umożliwiających upowszechnienie tego typu badań, jak i uzyskiwanie wiarygodnych wyników. Problem dostępności czystych substancji zmodyfikowanych mikotoksyn jest równie ważny w badaniach nad potencjalną ich toksycznością. Zrozumienie mechanizmu występowania tych związków w żywności i ich właściwości toksykologicznych, pozwoli w przyszłości na rozważenie wprowadzania limitów dopuszczalnej zawartości omawianych substancji. W 2017 r. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności wydał opinię naukową dotyczącą zagrożenia dla ludzi i zwierząt spowodowanego obecnością deoksyniwalenolu, jego

acetylowanych i zmodyfikowanych pochodnych w żywności i paszach. W raporcie tym podkreślono, że głównym źródłem narażenia na te związki są zboża i jego produkty. Podobnie jak w przypadku acetylowanych pochodnych DON, toksyczność DON-3G zrównano z toksycznością DON, ponieważ wzięto pod uwagę fakt, że DON-3G jest hydrolizowany w jelitach przewodu pokarmowego. Wobec tego należy oczekiwać podobnych efektów toksycznych jak w przypadku DON. Na podstawie zebranych danych epidemiologicznych, wyznaczono wartość grupowej, ostrej dawki referencyjnej (ARfD), która dla grupy tych związków wynosiła 8 µg/kg masy ciała (EFSA, 2017). Pomimo uznania tych związków przez społeczność naukową za podobne pod względem toksykologicznym, wiele badań wskazuje na występowanie pomiędzy nimi istotnych różnic. Od kilku lat liczba danych toksykologicznych w odniesieniu do DON-3G stale wzrasta, a w większości z nich potwierdzana jest hipoteza o potencjalnej niższej toksyczności tego związku zarówno w badaniach *in vitro*, jak i w badaniach *in vivo* na zwierzętach. Niemniej jednak, należy pamiętać, że zmodyfikowane pochodne DON często towarzyszą DON i pomimo niekiedy ich obniżonej toksyczności, wielkość narażenia może być większa. Dlatego bardzo ważne jest gromadzenie danych dotyczących współwystępowania DON i jego zmodyfikowanych form w żywności, zwłaszcza, że publikowane w ostatnich latach doniesienia literaturowe wskazują na występowanie w ziarnie zbóż nowych metabolitów DON, jak pochodne siarczanowe DON. W tym zakresie nie są dostępne żadne dane pozwalające na porównanie ich toksyczności z macierzystym związkiem.

Podobnie jak w przypadku DON, badania toksykologiczne ZEN i jego pochodnych podkreślają złożoność procesu biotransformacji tej toksyny i wpływu jej pochodnych na organizmy żywe. W odniesieniu do zmodyfikowanych pochodnych ZEN, wciąż istnieje niewiele informacji w kontekście kierunku ich biotransformacji w organizmie ludzi i zwierząt. Koniugowane formy ZEN (II faza reakcji detoksykacji), jak dowiedziono w badaniach *in vitro* i *in vivo* na trzodzie chlewnej, najprawdopodobniej mogą być hydrolizowane także w przewodzie pokarmowym człowieka, chociaż nie należy wykluczać różnic w intensywności tych przemian występujących pomiędzy gatunkami. W bardzo złożonym procesie biotransformacji ważną rolę odgrywają mikroorganizmy zasiedlające przewód pokarmowy i metagenom w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego. Na poziom ZEN i skład jego pochodnych – jako związków silnie estrogennych – istotnie wpływają hormony steroidowe, które wchodzi w interakcje z toksynami. Ponadto, jak podkreślono, na obniżenie toksyczności ZEN i



jego metabolitów może mieć wpływ dieta zawierająca związki z grupy flawonoidów. Do przeprowadzenia oceny narażenia przeszkodą jest wciąż zbyt mała liczba danych naukowych w odniesieniu do wstępowania zmodyfikowanych pochodnych ZEN w żywności.

Dotychczasowe badania nad zmodyfikowanymi formami toksyn HT-2 i T-2 sygnalizują, że problem występowania glikozydów toksyn HT-2 i T-2 może być istotny w aspekcie bezpieczeństwa żywności, ponieważ stwierdza się wysoki odsetek próbek zawierających te pochodne. W przypadku tej grupy związków dostępnych jest najmniej wyników badań dotyczących ich potencjalnej toksyczności (zarówno w odniesieniu do hydrolizy w przewodzie pokarmowym jak i w kontekście cytotoxyczności). Dostępne są doniesienia, że są to substancje hydrolizowane w przewodzie pokarmowym zwierząt (jak wykazano w badaniach na drobiu), jednakże istnieje potrzeba przeprowadzenia szerokiego zakresu badań potwierdzających, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* na różnych gatunkach zwierząt. Ze względu na współwystępowanie macierzystych związków wraz z ich modyfikowanymi formami, wciąż niewiele podejmowanych jest działań nad poznaniem możliwego wpływu ich synergistycznego efektu na żywy organizm. Powyższy problem stanowi wyzwanie dla ośrodków naukowych podejmujących problematykę mikotoksyn. Niewątpliwie, we wszystkich badaniach nad toksycznością zmodyfikowanych form mikotoksyn (II faza reakcji detoksykacji), niezbędne jest podjęcie działań zapewniających dostępność standardów analitycznych tych związków (za wyjątkiem DON-3G, który jest komercyjnie dostępny). Brak dostępnych wzorców analitycznych jest przeszkodą nad rozwojem badań zarówno w odniesieniu do występowania tych związków w żywności i paszach, jak również w kontekście poznania ich profilu toksykologicznego. W konsekwencji przeszkody te utrudniają przeprowadzenie oceny ryzyka i zagrożenia dla bezpieczeństwa żywności.

Biorąc pod uwagę aktualny stan wiedzy z zakresu zmodyfikowanych mikotoksyn, podjęto badania nad opracowaniem odpowiednich procedur badawczych, umożliwiających oznaczenie nie tylko podstawowych analogów mikotoksyn, ale również ich zmodyfikowanych form. Wyniki tych badań zaprezentowano w publikacjach H2-H4.

Zboża i żywność na bazie zbóż są na ogół bardzo złożonymi matrycami. Problemem analitycznym w jednoczesnej analizie mikotoksyn jest zazwyczaj duża różnorodność budowy chemicznej tych związków, które mogą być obecne w próbce (Juan i wsp. 2016). Wykorzystywana technika analityczna w ilościowej analizie

mikotoksyn wymusza odpowiedni dobór rozpuszczalnika ekstrakcyjnego do ekstrakcji analitów i co najważniejsze sposobu oczyszczania próbki z zanieczyszczeń mogących wpływać na końcowy wynik oznaczenia. Co więcej, wykorzystywana technika wymaga stosowania wystarczająco selektywnej i czulej aparatury pomiarowej, która umożliwi oznaczenie badanych substancji na odpowiednim poziomie (Bryła i wsp. 2014). Stężenia mikotoksyn w ziarnie zbóż i wytworzonej z niego żywności są bardzo zróżnicowane i mogą kształtować się od  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (np. OTA, aflatoksyny, ZEN, toksyny HT-2, T-2) do nawet  $\text{mg}/\text{kg}$  (DON, fumonizyny, enniatyny). W przypadku matryc tak mocno zróżnicowanych pod względem poziomu zawartości mikotoksyn, ich jednoczesne oznaczenie może być bardzo kłopotliwe dla analityka.

W publikacji H2, podjęto działania zmierzające do opracowania metody badawczej możliwej do wykorzystania w analizie mikotoksyn w ziarnie zbóż. Metoda ta obejmowała oznaczenie 26 związków należących do różnych klas chemicznych. Wśród tej grupy związków należy wyróżnić DON i jego zmodyfikowane formy (3-AcDON i 15-AcDON, DON-3G), ZEN i jego metabolity I fazy reakcji detoksykacji ( $\alpha$  i  $\beta$ -ZEL), a także enniatyny, zaliczane do „nowych” mikotoksyn. Wszystkie badane związki analizowano za pomocą techniki ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczym spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu (UPLC-TOF-HRMS). W pierwszej kolejności dobrano odpowiednie warunki jonizacji badanych substancji, a także warunki rozdziału chromatograficznego, w których stosowano jako fazę ruchomą metanol i wodę modyfikowaną kwasem mrówkowym i mrówczanem amonu. Badane próbki do oznaczeń przygotowywano według złożonej, wieloetapowej procedury z wykorzystaniem kilku wzorców wewnętrznych znakowanych izotopem węgla. Opracowana procedura pozwoliła na uzyskanie próbek o czystości niegenerującej istotnych interferencji utrudniających proces rozdziału chromatograficznego, bądź analizy spektralnej. Metoda została poddana dokładnej walidacji polegającej na analizie próbek wzmocnionych laboratoryjnie, w różnych matrycach zbożowych. Wiarygodność metody była oceniana w ramach badań biegłości (ze względu na ograniczenia tych badań, tylko w przypadku niektórych analitów). Ze względu na złożoność procedury, a także różnorodność badanych związków, uzyskane wyniki eksperymentu walidacyjnego dla niektórych substancji (szczególnie dla bardzo polarnych, np. DON-3G) nie były w pełni zadowalające. W przypadku tych substancji ich zawartości w badanych próbkach korygowano o wartości odzysku.

Mając na uwadze zmodyfikowane mikotoksyny i wykorzystanie do ich oznaczenia bardziej powszechnych w laboratoriach narzędzi analitycznych, takich jak wysokosprawną chromatografię cieczową z różnymi detektorami, podjęto badania nad jednoczesnym oznaczeniem NIV, DON i jego glukozydu w ziarnie pszenicy i próbkach piw (publikacje H3-H4). Detektory UV są powszechnie wykorzystywanymi detektorami w analizie DON (Rahmani i wsp. 2009). Podstawową wadą tego typu technik są ograniczenia wynikające z braku selektywności. Dodatkowa trudność polega na przygotowaniu próbek o wysokim stopniu czystości, wolnych od wszelkiego rodzaju interferentów.

Do zapewnienia satysfakcjonującej eliminacji interferencji chromatograficznych mogą być zastosowane w procedurach analitycznych kolumnienki powinowactwa immunologicznego wykorzystujące odpowiednie przeciwciała. Tego typu kolumnienki są rutynowo wykorzystywane do oznaczania mikotoksyn. Jednakże, przeciwciała te mogą wykazywać reaktywność krzyżową, dzięki czemu oprócz podstawowych analogów, możliwe było przeprowadzenie procesu analitycznego względem ich modyfikowanych form. Specyficzne właściwości tych przeciwciał były opisywane przez kilku autorów (Geng i wsp. 2014; Yoshinari i wsp. 2014; Trombete i wsp. 2016). W zrealizowanych badaniach, do przygotowania próbek analitycznych, wykorzystano kolumny powinowactwa immunologicznego DON-NIV WB (Vicam, Watertown, USA), które (oprócz DON i NIV) można było z powodzeniem wykorzystać do analizy DON-3G w ziarnie pszenicy i próbkach piw. Opracowane metody charakteryzowały się wysokim stopniem dokładności, a eksperyment walidacyjny potwierdził poprawność uzyskiwanych wyników.

Opracowane metody badawcze wykorzystano do przeprowadzenia oceny zanieczyszczenia ziarna zbóż pochodzącego z polskich upraw (publikacje H2, H3), a także do oceny zanieczyszczenia próbek piw dostępnych na polskim rynku (publikacja H4).

W zrealizowanych badaniach (publikacja H2) opisano występowanie 26 mikotoksyn w 147 próbkach różnych genotypów pszenicy uprawianej w różnych regionach Polski, a także i innych zbóż pochodzących z sezonu wegetacyjnego 2014 roku. Próbki ziarna pszenicy o różnych genotypach pochodziły z pól eksperymentalnych położonych na terenie gminy Werbkowice (n=9), Borusowa (n=18), Osiny (n=18), Żeliszawki (n=18) i Wielichowo (n=36). We wszystkich pięciu rejonach upraw, uprawiano te same genotypy pszenicy ozimej. Dodatkowo na terenie gminy

Osiny zostało założone podobne doświadczenie dla jęczmienia jarego (n=8) i ozimego (n=16), owsa (n=4), a także pszenżyta (n=20). Podczas całego okresu wegetacyjnego roślin, w każdej lokalizacji, monitorowane były warunki pogodowe, tj. temperatura powietrza i ilość opadów. Poziom zanieczyszczenia próbek ziarna pszenicy ozimej był znacząco różny pomiędzy badanymi lokalizacjami. Stwierdzono, że największy stopień zanieczyszczenia mikotoksynami pszenicy ozimej wystąpił w próbkach pochodzących z upraw położonych na terenie gminy Borusowa, Werbkowice i Osiny. Na terenie gminy Osiny, uprawiany jęczmień jary i ozimy, owies i pszenżyto, podobnie jak pszenica, były również zanieczyszczone mikotoksynami, przy czym średni poziom ich zanieczyszczenia był zróżnicowany, w zależności od gatunku zboża. Głównymi zanieczyszczeniami ziarna zbóż były mikotoksyny grzybów *Fusarium*. Uzyskane różnice w poziomie zanieczyszczeń mikotoksynami między lokalizacjami Werbkowice, Borusowa i Osiny, a Żeliszawkami i Wielichowem, wydają się być zależne od panujących w okresie kwitnienia pszenicy warunków pogodowych.

W klimacie strefy umiarkowanej, bardzo często dochodzi do infekcji roślin zbóż grzybami z rodzaju *Fusarium* (Zachariášová i wsp. 2014). W Polsce głównymi patogenami pszenicy są *F. avenaceum*, *F. culmorum* i *F. graminearum* (Stępień i Chełkowski, 2010). Pomimo, że zarodniki *Fusarium* są wszechobecne w ziarnie pszenicy, to wśród czynników wpływających na rozwój fuzariozy kłosa (*Fusarium* head blight, FHB) należy wymienić sąsiedztwo z innymi uprawami, obecność na powierzchni gleby resztek poźniwnych kukurydzy lub pszenicy. Zdrewniałe tkanki kukurydzy służą jako miejsce zimowania patogenu i stanowią źródło inokulum w późniejszym etapie wzrostu rośliny (Lacey i wsp. 1999; Paul i wsp. 2004). Opady deszczu są podstawowym parametrem do prognozowania chorób zbóż. Umiarkowane temperatury (między 15-30°C) przy jednoczesnej wysokiej wilgotności względnej powietrza w czasie kłoszenia lub kwitnienia okazują się być najważniejszymi czynnikami decydującymi o występowaniu fuzariozy (De Wolf i wsp. 2003; Cowger i wsp. 2009).

We wszystkich pięciu rejonach upraw uprawiano te same genotypy pszenicy ozimej. Jednak tylko w trzech gminach (tj. Osiny, Borusowa i Werbkowice) odnotowano znaczące zanieczyszczenie ziarna zbóż mikotoksynami, głównie wytwarzanymi przez *Fusarium*. Co więcej, średnie zawartości mikotoksyn w obrębie próbek każdego genotypu były mocno zróżnicowane. Na podstawie przeprowadzonej jednoczynnikowej analizy wariancji nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy

poziomami zanieczyszczenia większości mikotoksyn w badanych genotypach pszenicy. Wyjątkiem był DON, którego zawartości różniły się istotnie pomiędzy genotypami Fidelius a Kampana, Forkida a Bamberka oraz pomiędzy Kepler, Dacanto a Bamberką. Najmniej zanieczyszczonym genotypem pszenicy, pod względem mikotoksyn, był Fidelius, natomiast najbardziej Bamberka.

Obecnie jedną z metod ograniczania występowania mikotoksyn w zbożach jest stosowanie w uprawach odmian odpornych na fuzariozę. Jednakże jak dotąd u żadnego z badanych genotypów pszenicy nie zaobserwowano źródła pełnej odporności (Góral, 2005). Odporność na fuzariozę kłosa jest cechą determinowaną przez większe i mniejsze geny umieszczone na wszystkich chromosomach pszenicy z wyjątkiem chromosomu 7D. Chińska, jara odmiana pszenicy Sumai 3, która zawiera geny odporności QTL i FHB<sub>1</sub>, jest powszechnie uznawana za najlepsze źródło odporności i jest szeroko stosowana w programach hodowlanych na całym świecie (Lv i wsp. 2014). Obecnie prowadzi się badania nad zwiększaniem odporności pszenicy na fuzariozę kłosa, czego efektem jest uzyskanie odmian o zbliżonej do pełnej odporności na fuzariozę, np. pszenica ozima Truman (Islam i wsp. 2016).

Uzyskane wyniki dowodzą, że poziom zanieczyszczenia mikotoksynami jest na ogół niższy niż limity ustalone przez UE, chociaż w odniesieniu do DON, w przypadku 10 próbek ziarna odnotowano przekroczenia maksymalnej dopuszczalnej zawartości (1250 µg/kg). Biorąc pod uwagę inne zmodyfikowane formy DON zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności może wynikać z obecności sumy 3-AcDON i 15-AcDON oraz DON-3G, które często były stwierdzane w badanych próbkach. We wszystkich próbkach pozytywnych identyfikowano zawartość DON-3G w ilości od 2 do 48% w odniesieniu do zawartości DON, z czego próbki pszenżyta charakteryzowały się najwyższym zanieczyszczeniem. W przeciwieństwie do DON dopuszczalna zawartość dla ZEN nie została przekroczona w żadnej z badanych próbek. Rzadziej znajdowano także zmodyfikowane formy ZEN. Tylko obecność β-ZEL stwierdzono w części próbek ziarna, a jego zawartość nie przekraczała 24 µg/kg. Obecność w próbkach ziarna zmodyfikowanych formy DON i ZEN, choć ich zawartość nie przekraczała zawartości ich wolnych analogów, może wpływać na bezpieczeństwo żywności.

W ramach opracowanej metody jednoczesnego oznaczania NIV, DON i DON-3G w pszenicy, przeprowadzono ocenę występowania tych związków w 92 próbkach pszenicy pochodzącej z upraw sezonu wegetacyjnego 2016 roku, rozmieszczonych na terenie całej Polski (publikacja H3).

Choć NIV nie jest tak często spotykany w żywności jak DON, to związek ten wykazuje wyższą toksyczność w badaniach na zwierzętach. Pomimo tego faktu przyjmuje się, że toksyczność NIV jest porównywalna z toksycznością DON, choć dostępnych danych dotyczących profilu toksykologicznego NIV jest zdecydowanie mniej (IARC, 1993). Na poziomie molekularnym DON i NIV, podobnie jak inne trichoteceny, wykazują hamujący wpływ na pierwotny metabolizm komórek eukariotycznych, w tym hamowanie syntezy białek, syntezę DNA i RNA (Rocha i wsp. 2005).

Obecność DON i NIV w badanych próbkach pszenicy związana była z infekcją *Fusarium*. DON występował w 82,6% próbkach pszenicy, natomiast NIV – 69,6%. Obecność w próbkach pszenicy DON-3G, powstającego w konsekwencji metabolizmu DON przez system enzymatyczny roślin, stwierdzono w 27,2% próbek. Względna zawartość DON-3G w badanych próbkach (względem DON) wynosiła od 4,3 do 37,0%.

Oceniając stopień zanieczyszczenia próbek pszenicy pochodzących z sezonu wegetacyjnego 2016 roku pod względem obecności NIV, DON i jego metabolitu DON-3G można stwierdzić, że próbki te charakteryzowały się niskim stopniem zanieczyszczenia. Analiza zawartości tych związków wykazała, że próbki pochodzące z Północno-Wschodniej Polski wykazywały względnie najwyższy stopień zanieczyszczenia tymi mikotoksynami.

Naturalne występowanie DON-3G jako metabolitu roślinnego DON występującego w ziarnie zbóż jest rzadko opisywane w literaturze. Niemniej jednak spośród wszystkich dostępnych danych na temat zmodyfikowanych mikotoksyn, większość dotyczy DON-3G (Berthiller i wsp. 2005). DON-3G często wykrywany jest razem z DON, przy czym należy pamiętać, że zawartość DON-3G w próbkach zbóż zależna jest bezpośrednio od genotypu rośliny. Sam fakt zdolności biotransformacji mikotoksyn przez genotypy pszenicy i innych zbóż do glukozydowych pochodnych otwiera drogę do badań nad jej rolą w mechanizmie odporności na fuzariozę kłosa (Dall'Asta i wsp. 2012). DON-3G jest najczęściej wykrywany w zanieczyszczonym ziarnie pszenicy spośród wszystkich zmodyfikowanych form mikotoksyn (Zhang i Wang, 2015). Badania wykazały w niektórych próbkach naturalnie zanieczyszczonej pszenicy wysokie stężenia DON-3G, przekraczające 1000 µg/kg. Ilość DON-3G w odniesieniu do niezmodyfikowanego DON oszacowano na poziomie 20-70% jego zawartości, w zależności od gatunku zbóż i genotypu, położenia geograficznego upraw i

warunków klimatycznych (Berthiller i wsp. 2009; Dall'Asta i wsp. 2012; De Boevre i wsp. 2014).

Jednym z produktów zbożowych jest piwo, które jest chętnie spożywane w wielu regionach świata. Od kilku lat spożycie piwa w Polsce utrzymuje się na stabilnym poziomie – rocznie ok. 100 l/os. (CSO, 2017), a więc na niewiele mniejszym poziomie w porównaniu z będącymi na drugim i trzecim miejscu na świecie Niemcami i Austriakami (pierwsze miejsce przypada dla Czech). Z roczną produkcją na poziomie 40 mln hl, Polska jest trzecim co do wielkości producentem piwa w Europie (Van de Walle, 2015). Piwo jako produkt wytwarzany ze słodu zbożowego, najczęściej jęczmiennego, może także być zanieczyszczony toksynami *Fusarium*. Przemysł browarniczy charakteryzuje się wysoką specyficznością w odniesieniu do przetwórstwa zbóż. Cechą tego przemysłu jest wykorzystanie w produkcji piwa procesu słodowania ziarna (Kostelanska i wsp. 2011). Słodowanie to skomplikowany proces rozwoju kielka liścieniowego i korzennego zarodka ziarna, w czasie którego aktywowane są glukozylotransferazy, które zdolne są do transformacji DON do DON-3G. Stąd możliwa jest biosynteza *de novo* DON-3G (Lancova i wsp. 2008; Maul i wsp. 2012). Efektem wtórnej aktywności enzymów uwalnianych podczas słodowania ziarna jest wzrost zawartości DON-3G. Jednocześnie procesy te prowadzą do pozornego spadku zawartości DON. Co więcej, DON-3G może być uwalniany także w trakcie procesu słodowania z wyższych glikozydów i nierozpuszczalnych kompleksów polisacharydowych i białkowych (Lancova i wsp. 2008).

Podobne badania do przeprowadzonych w próbkach ziarna pszenicy, dotyczące analizy NIV, DON i DON-3G, przeprowadzono także w odniesieniu do próbek piw (n=100), które zakupiono na polskim rynku (publikacja H4). Jak dotąd istnieje niewiele prac z zakresu występowania DON-3G w próbkach piw w porównaniu do jego podstawowego analogu. Badania te były jednymi z pierwszych, poświęconymi występowaniu tych związków, zrealizowanymi w Polsce.

Zrealizowane badania potwierdziły wysoką częstość występowania badanych mikotoksyn w próbkach piw (>50% próbek). Najczęściej znajdowaną w piwach substancją był DON (83% próbek). Poziomy zawartości badanych substancji były niskie, co wynika z wysokiego udziału wody w piwie oraz niskiego udziału ekstraktu słodowego. Z toksykologicznego punktu widzenia próbki te można uznać za bezpieczne. Jednakże, jak wykazano, piwo mocne (dłuższy proces fermentacji) o wysokiej zawartości ekstraktu brzezki, może charakteryzować się wyższym stężeniem

mikotoksyn. Umiarkowane spożycie piwa nie ma znaczenia toksykologicznego, jednakże spożycie już dwóch kufli piwa dziennie zwiększa ryzyko narażenia na działanie DON. Zakładając najgorszy scenariusz zanieczyszczenia piwa (jak wykazano w badaniach – 73,6 µg/L), jak również mając na uwadze wartość dziennego tolerowanego pobrania (TDI) sugerowaną przez Komitet Naukowy ds. Żywności – 1 µg/kg m.c. (EFSA, 2017), człowiek o masie ciała 70 kg musiałby wypić ok. 1 L piwa, aby przekroczyć wartość TDI. Ryzyko to znacznie wzrasta jeśli wzięta zostanie pod uwagę obecność DON-3G, a ta, jak wykazano w badaniach, może przekraczać stężenie DON. Obserwacja ta w próbkach ziarna zbóż nie została natomiast potwierdzona. Na podstawie badań można stwierdzić, że DON-3G w próbkach piw może stwarzać dużo większe ryzyko zagrożenia dla bezpieczeństwa zdrowotnego w porównaniu z innymi produktami zbożowymi. W chwili obecnej nie ma przepisów prawnych określających dopuszczalne poziomy zawartości DON-3G w piwach, nie mniej jednak wydaje się wskazane monitorowanie tych zawartości. W przyszłości, bardzo ważne jest uwzględnienie w monitoringu obecności DON-3G. Biorąc pod uwagę obecność DON-3G w próbkach piw, bardzo ważne jest także prowadzenie dalszych prac nad występowaniem innych mikotoksyn i ich zmodyfikowanych form.

Zjawisko modyfikacji dotyczy również mikotoksyn z grupy fumonizyn. Wyniki obszernych badań nad zmodyfikowanymi fumonizynami opisano w pracach Bryła i wsp. (2014, 2015 i 2016). Fumonizyny to grupa związków syntezowanych przez grzyby *F. verticillioides* i *F. proliferatum* często znajdowanych w kukurydzy i jej produktach (szczególnie z grupy B). Fumonizyny w ziarnie zbóż są czynnikami wywołującymi wiele chorób u ludzi i zwierząt (m.in. działanie nowotworowe). W oparciu o wyniki badań epidemiologicznych u ludzi zamieszkujących południową Afrykę wykazano wysoką korelację pomiędzy występowaniem fumonizyn w żywności a zachorowalnością na nowotwór przełyku (Waśkiewicz i wsp. 2012).

Fumonizyny są związkami stabilnymi podczas obróbki termicznej żywności na bazie kukurydzy. Jednakże, stabilność ta może różnić się w zależności od warunków środowiska reakcji. Ścieżki przemian fumonizyn w trakcie różnych procesów technologicznych stosowanych w przetwórstwie żywności, były badane w kilku pracach, jednak mechanizmy leżące u podstaw tych przemian wciąż nie do końca zostały wyjaśnione. Podejrzewa się, że fumonizyny w trakcie tych procesów mogą wchodzić w reakcje ze składnikami matrycy żywnościowej (Humpf i Voss, 2004; Castells i wsp. 2008). Sugeruje się, że fumonizyny mogą występować w surowej,



nieprzetworzonej kukurydzy, w postaci „ukrytej” poprzez oddziaływania supramolekularne z biopolimerami zawartymi w matrycy żywnościowej (Dall’Asta i wsp. 2009a i 2009b). Obecność „ukrytych” fumonizyn w nieprzetworzonej kukurydzy, jak również możliwość tworzenia związanych kowalencyjnie fumonizyn z innymi związkami obecnymi w żywności w trakcie procesów technologicznych, znacznie utrudnia zrozumienie mechanizmów tych reakcji. Dostępne są również doniesienia o możliwości występowania w nieprzetworzonej kukurydzy estrów fumonizyn z kwasami tłuszczowymi, prawdopodobnie przy udziale enzymów grzybowych, a także pochodnych *N*-acylowych, powstałych w podobnych warunkach (Bartók i wsp. 2013; Falavigna i wsp. 2013).

W ramach badań (publikacja H5) przeprowadzono eksperyment w celu określenia wpływu oddziaływania temperatury i pH środowiska na stabilność fumonizyn w cieście wytworzonym z mąki kukurydzianej, naturalnie zanieczyszczonej fumonizynami. W badaniach omówiono przebieg zmian zawartości fumonizyn w cieście modelowym na bazie mąki kukurydzianej, przygotowanym w buforze fosforanowym o pH 3,50, 5,50 i 7,50. Ciasto poddawano ogrzewaniu w temperaturze od 100–250°C i dokonywano oceny zawartości sumy wolnych i ogółem fumonizyn (po hydrolizie w środowisku alkalicznym). Wykorzystana do badań nad tymi związkami technika UPLC-TOF-HRMS pozwoliła na identyfikację w surowcu wyjściowym innych zmodyfikowanych pochodnych fumonizyn (wolnych związków częściowo zhydrolizowanej fumonizyny B<sub>1</sub> (izomery PHFB<sub>1a</sub> i PHFB<sub>1b</sub>) i zhydrolizowanej fumonizyny B<sub>1</sub> (HFB<sub>1</sub>)), dlatego też również i w ich przypadku, przeprowadzono ocenę przebiegu zmian ich zawartości. Hydroliza fumonizyn w środowisku alkalicznym powoduje powstawanie hydrolizowanych form, które następnie mogą być analizowane przy zastosowaniu techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Powyższa metoda pozwoliła na analizę zawartości fumonizyn ogółem (obejmującą wolne, związane kowalencyjnie, jak również „ukryte” fumonizyny). Z różnicy zawartości fumonizyn ogółem i wolnych, uzyskuje się całkowitą zawartość zmodyfikowanych fumonizyn, obejmujących fumonizyny związane kowalencyjnie z makroskładnikami np. białkami, węglowodanami (za pośrednictwem grup propanotrikarboksylowych cząsteczek fumonizyn), „ukryte” fumonizyny (supramolekularne oddziaływania fumonizyn z makroskładnikami), wolne częściowo zhydrolizowane fumonizyny oraz związane estrowo fumonizyny z kwasami tłuszczowymi.

Fumonizyny wykazywały wysoką stabilność podczas pieczenia ciasta na bazie mąki kukurydzianej. Pomimo tego odnotowano pewien trend w spadku zawartości fumonizyn podczas pieczenia ciasta w temperaturze powyżej 220°C. Najwyższą stabilność fumonizyn odnotowywano podczas pieczenia ciasta w warunkach modelowych przy pH 5,50. Najniższą zaś przy pH wynoszącym 3,50 i 7,50. W modelach o pH 3,50 i 5,50, odnotowano istotnie wyższą zawartość fumonizyn ogółem, niż zawartość wolnych fumonizyn. W przypadku modelu o pH 7,50 tych różnic nie wykazano. Stwierdzono, że pH środowiska decyduje o możliwości występowania reakcji fumonizyn z innymi substancjami w żywności. W trakcie procesu ogrzewania obserwowano wzrost zawartości częściowo zhydrolizowanych fumonizyn (model o pH 3,50 i 7,50), a także wzrost zawartości wolnej HFB<sub>1</sub> do temperatury wynoszącej 200°C, po czym zawartość HFB<sub>1</sub> malała. Taka obserwacja wskazuje, że mechanizm degradacji fumonizyn, przebiega w pierwszym etapie w drodze eliminacji grup propanotrikarboksylowych z cząsteczki, a następnie poprzez dalszą degradację polegającą na rozpadzie HFB<sub>1</sub>.

Dostępne dane literaturowe potwierdzają wysoką stabilność fumonizyn podczas ogrzewania (Jackson i wsp. 1996 i 1997; Seefelder i wsp. 2003). O ile dostępne dane dotyczą wolnych form fumonizyn, to praktycznie nie ma informacji na temat stabilności termicznej form zmodyfikowanych. W większości dotychczas zrealizowane badania, koncentrowały się na przebiegu zmian zawartości wolnych fumonizyn w trakcie procesów technologicznych. Uznaje się, że znaczący spadek stężenia fumonizyn obserwowany jest podczas procesów technologicznych, w których stosowana jest obróbka cieplna w temperaturze powyżej 150°C (Waśkiewicz i wsp. 2012). Przeprowadzonych zostało kilka badań nad stabilnością wolnych fumonizyn w układach modelowych na wodnych roztworach buforowych. Fumonizyny B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> były najmniej stabilne w trakcie procesu ogrzewania w tych samych warunkach temperaturowych przy pH 4,00, a następnie przy pH 10,00 i 7,00 (Jackson i wsp. 1996 i 1997). Jednakże dane te odnoszą się do substancji wzorcowych, w środowisku wodnym. W przeprowadzonym eksperymencie (publikacja H5), spośród trzech modeli, dla różnych warunków ogrzewania, w modelu o pH wynoszącym 3,50 i 7,50, fumonizyny wykazywały względnie najniższą stabilność, natomiast najwyższą termostabilność - przy pH wynoszącym 5,50. Uzyskane wyniki są zbieżne z wynikami uzyskanymi przez wymienionych wyżej autorów, niemniej jednak należy zaznaczyć, że w zastosowanej

temperaturze ogrzewania (100-250°C) w czasie 25 min pomimo uzyskania istotnych różnic w stabilności, nie były one wyraźne.

Jak dotąd brak jest dostępnych w literaturze informacji o dokładnym mechanizmie degradacji/transformacji fumonizyn. Należy jednak podkreślić, że w przeszłości próbowano wyjaśnić złożone mechanizmy reakcji fumonizyn, oparte na kowalencyjnych wiązaniach, które zachodzą pod wpływem różnych procesów technologicznych (Seefelder i wsp. 2003). Jednak wydaje się, że wraz z pojawiającymi się później doniesieniami o występowaniu w nieprzetworzonej kukurydzy mechanizmu opartego na supramolekularnych interakcjach fumonizyn z makrokonstytutywnymi składnikami żywności (białka, węglowodany) (Dall'Asta i wsp. 2009a i 2009b), zrozumienie problemu dotyczącego przemian fumonizyn w trakcie przetwarzania żywności jest bardzo złożone. Proces ogrzewania kukurydzy, w którym mogą zachodzić złożone reakcje chemiczne, nie pozwala na prześledzenie poszczególnych mechanizmów modyfikacji fumonizyn. Choć brak jest jednoznacznych dowodów, to należy przypuszczać, że w czasie pieczenia, mogą zachodzić jednoczesne procesy prowadzące do uwalniania się form „ukrytych”, oddziałujących w sposób niekowalencyjny z biopolimerami żywności lub też proces ogrzewania sprzyja tworzeniu kowalencyjnych oddziaływań z tymi biopolimerami. Oba rodzaje interakcji mogą być modyfikowane poprzez pH środowiska reakcji. W zrealizowanym doświadczeniu, zastosowano bufor o pH=7,50, a na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji (One-Way ANOVA) nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy zawartościami fumonizyn wolnych i ogółem. Zaobserwowane zjawisko mogło być wynikiem słabej stabilności "ukrytych" fumonizyn w tych warunkach i/lub niesprzyjających warunkach do tworzenia reakcji na zasadzie tworzenia wiązań kowalencyjnych. Ponadto, w środowisku alkalicznym fumonizyny mogą być hydrolizowane do form, które są wynikiem całkowitego lub częściowego usunięcia grup kwasu propanotrikarboksylowego z cząsteczki fumonizyn. Należy zatem przypuszczać, że stopień hydrolizy fumonizyn jest proporcjonalny do pH. Łagodne alkaliczne warunki środowiska stosowane podczas nixtamilizacji (bardzo popularnego procesu gotowania kukurydzy w wodzie wapiennej, stosowanego do produkcji tortilli w krajach Ameryki Środkowej i Południowej), przyczyniały się do powstawania zarówno zhydrolizowanych, jak i częściowo zhydrolizowanych fumonizyn (De Girolamo i wsp. 2016).

**AD. 2. Wybrane „nowe” mikotoksyny i ich wpływ na bezpieczeństwo żywności.**

„Nowe” mikotoksyny to grupa różnorodnych chemicznie mikotoksyn, dla których obecnie nie ma żadnych prawnych regulacji w odniesieniu do dopuszczalnej zawartości. Rozwój technik spektroskopowych, w tym spektrometrii mas, pozwala na zdobywanie informacji dotyczących struktury nowo odkrywanych metabolitów grzybowych. W chwili obecnej prowadzona jest ocena ryzyka, w ramach przygotowań do wdrożenia odpowiednich aktów prawnych. W grupie „nowych” związków znajdują się, obok wielu innych, enniatyny i alkaloidy sporyszu. „Nowe” mikotoksyny potencjalnie stanowią istotne zagrożenie z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności (Kovalsky i wsp. 2016).

W zaprezentowanych wynikach badań (publikacja H2), wśród omawianych wielu zagadnień warty zwrócenia uwagi jest problem związany z występowaniem enniatyn. Niewiele jest informacji o występowaniu tych substancji w ziarnie zbóż uprawianych w Polsce.

Tak jak opisywano we wcześniejszych rozważaniach przedmiotem badań było m.in. omówienie występowania 26 mikotoksyn w 147 próbek ziarna pszenicy różnych genotypów uprawianych w różnych lokalizacjach, a także próbek jęczmienia ozimego, jarego, owsa i pszenżyta. Enniatyny należą do toksyn grzybów *Fusarium*. Najbardziej popularnymi są enniatyna A, A1, B i B1 (Enn-A, Enn-A1, Enn-B i Enn-B1). Enniatyny są związkami o charakterze fitotoksycznym, należącymi do heksadepsipeptydów, działającymi jak antybiotyki i środki owadobójcze. Mogą być one wytwarzane przez różne gatunki *Fusarium*, takie jak *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutianans*, *F. oxysporum*, *F. poae*, i *F. avenaceum* (Chrpová i wsp. 2016). Enniatyny wykazują silne właściwości jonoforowe. Ułatwiają transport jedno- lub dwuwartościowych kationów takich jak  $K^+$  i  $Ca^{2+}$  przez błony komórkowe. W szlaku mitochondrialnym pośredniczą w indukcji apoptozy. Ich obecność, jako substancji lipofilnych, potwierdzana była w tkankach bogatych w tłuszcz (mięso, skóra i wątroba kurcząt brojlerów oraz jaja). Z powodu braku dostatecznych wyników badań co do toksyczności enniatyn w warunkach *in vivo* nie można sformułować jednoznacznych wniosków w odniesieniu do narażenia przewlekłego (EFSA, 2014b). Ponieważ są one często wykrywane w ziarnie zbóż, mogą stanowić problem dla bezpieczeństwa żywności (Vaclavikova i wsp. 2013). Dane dotyczące występowania tych substancji są rzadko prezentowane.

Spośród analizowanych próbek ziarna, praktycznie wszystkie próbki zbóż pochodzące z upraw na terenie gminy Borusowa, Werbkowice i Osiny (podobnie jak w przypadku innych mikotoksyn) zawierały enniatyny, przy czym najczęściej i w największych zawartościach dominowały Enn-B a następnie Enn-B1. Stwierdzono, że spośród wszystkich gatunków zbóż, próbki pszenżyta zawierały relatywnie wysokie stężenia enniatyn. W zależności od rodzaju substancji, zawartość ta wynosiła od 8 do 3328  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . W tych samych próbkach obserwowano relatywnie wysoką zawartość DON (196–1326  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Co więcej, w tych samych próbkach znajdowano wiele innych mikotoksyn. Aż 69% próbek zawierało przynajmniej 3 mikotoksyny. Podkreślono, że takie współwystępowanie mikotoksyn, jest nie tylko ważne z punktu widzenia zawartości tych związków, lecz może także być ważnym problem toksykologicznym. Niektóre badania podkreślają, że wysokiej zawartości tzw. "emerging mycotoxins" (nowych), może towarzyszyć także wysoka zawartość DON (Alassane-Kpembé i wsp. 2013). Efekty działania niepożądanego wywołane obecnością DON i enniatyn mogą mieć charakter synergistyczny lub antagonistyczny, jednak dane dotyczące efektów toksyczności są bardzo ograniczone. Rzeczywiste zagrożenie dla zdrowia wywołane obecnością tych związków w organizmie człowieka lub innych gatunków zwierząt nie są jeszcze poznane. Zagrożenie to może dotyczyć różnych kombinacji współwystępowania mikotoksyn (Błajet-Kosicka i wsp. 2014).

Sporysz to powszechna nazwa grzyba należącego do rodzaju *Claviceps*, który infekuje wiele gatunków dzikich traw i zbóż. Forma przetrwalna tego grzyba, o ciemnym, bardzo często czarnym zabarwieniu, składa się ze zbitej masy strzępek i często także nazywana jest sklerocją (Naudé i wsp. 2005). Przetrwalniki te mogą syntetyzować do ok. 40 alkaloidów o różnej budowie chemicznej, z których może powstawać kwas D-lizergowy, powodujący halucynacje i nadmierne pobudzenie (Lerner i wsp. 2003). Grupa „nowych” mikotoksyn obejmuje sześć alkaloidów sporyszu i ich epimery. Należą do nich ergometryna, ergokornina, ergokrystyna, ergokryptyna, ergozyna i ergotamina (konfiguracja R). Związki te wykazują wysoką toksyczność. Nazwy enancjomerycznych form alkaloidów posiadają przyrostek „-inina” (konfiguracja „S”) i są biologicznie nieaktywne (Pierri i wsp. 1982). Alkaloidy sporyszu wykazują dwa rodzaje objawów ergotyzy, do których należy działanie konwulsyjne oraz gangrenowate (Hulvová i wsp. 2013). Panel naukowy ds. środków zanieczyszczeń w łańcuchu żywnościowym („CONTAM”) Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) określił grupową ostrą dawkę referencyjną (ARfD) dla alkaloidów

sporyszu w wysokości 1 µg/kg masy ciała i grupowe tolerowane dzienne pobranie (TDI) w wysokości 0,6 µg/kg masy ciała (EFSA, 2012). Spośród zbóż, żyto, którego Polska jest trzecim największym producentem w Europie, jest najbardziej podatne na choroby kwiatostanu spowodowane przez grzyby z rodzaju *Claviceps*. Spośród znanych około 40 gatunków *Claviceps* największe znaczenie wykazuje *Claviceps purpurea* (Geiger i wsp. 2009). Obecnie w Unii Europejskiej nie obowiązują żadne ograniczenia dotyczące maksymalnego dopuszczalnego występowania alkaloidów sporyszu zarówno w nieprzetworzonym ziarnie zbóż, jak i produktach z niego wytworzonych. Natomiast ograniczenia wprowadzono dla przetrwalników sporyszu, których zawartość w nieprzetworzonym ziarnie zbóż nie może przekraczać 0,5 g/kg. Pomimo obowiązującej regulacji dotyczącej zawartości przetrwalników sporyszu w nieprzetworzonym ziarnie zbóż istnieje ryzyko, że ustalony limit może nie zapewniać bezpieczeństwa żywności.

W zrealizowanych badaniach (publikacja H6) dokonano oceny zanieczyszczenia sporyszem i jego alkaloidami różnych odmian ziarna żyta, które uprawiano w Polsce w sezonie wegetacyjnym lat 2016 i 2017. Materiał badawczy stanowiły próbki żyta, które pochodziły ze Stacji Doświadczalnych Oceny Odmian Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (Zakład Doświadczalny Oceny Odmian w Marianowie, Lućmierzu i Uhininie). W badanych próbkach określono wagowo zawartość sklerocji, a następnie ziarno wraz z przetrwalnikami poddano rozdrobnieniu w młynie laboratoryjnym.

W badaniach stwierdzono, że niezależnie od położenia miejsca upraw, wszystkie analizowane 126 próbek ziarna zawierało przetrwalniki sporyszu. W Marianowie w 2016 i w 2017 roku ponad połowa próbek ziarna żyta zawierała sklerocje na poziomie wyższym niż regulowany (0,5 g/kg, odpowiednio 57 i 62% próbek w 2016 i 2017 roku). W obu latach średnia zawartość sporyszu była na podobnym poziomie. Sumaryczną zawartość 12 alkaloidów sporyszu odnotowano dla wszystkich badanych próbek, jednakże zawartość w większości z nich była poniżej 400 µg/kg. Ponieważ zawartość alkaloidów sporyszu w formach przetrwalnych jest mocno zróżnicowana, mając na uwadze dyskusje nad wprowadzeniem regulacji prawnych w odniesieniu do dopuszczalnych zawartości tych związków, bardzo ważne jest znalezienie zależności pomiędzy zawartościami sklerocji a alkaloidami w ziarnie zbóż. We wszystkich analizowanych próbkach znaleziono liniową istotną ( $\alpha=0,05$ ) zależność logarytmiczną pomiędzy zawartościami przetrwalników i alkaloidów sporyszu w ziarnie zbóż. Bardzo ważny jest też rodzaj występujących epimerów alkaloidów. W większości zbadanych

próbek ziarna żyta dominowały enancjomery alkaloidów o konfiguracji R, a najczęściej wykrywanymi związkami były ergokryptyna, ergokornina i ergokrystyna.

Choć możliwa jest eliminacja sklerocji z ziarna, należy pamiętać, że podczas zbioru ziarna, sklerocje, mogą ulegać łamaniu i kruszeniu. W związku z czym, drobne elementy i powstały pył mogą pozostać w ziarnie. Współcześnie ochrona zbóż przed sporyzmem koncentruje się na ograniczaniu obecności sklerocji sporyszu w ziarnie zbóż. Margines bezpieczeństwa (limit prawny sklerocji w ziarnie – 0,5 g/kg) niekoniecznie może zapewniać bezpieczeństwo żywności, ponieważ jak wykazano, w próbkach poniżej tego poziomu możliwa jest znaczna zawartość alkaloidów. Stwierdzono duże zróżnicowanie pod względem występowania dominujących związków, które może być wynikiem pochodzenia uprawy ziarna, a ściślej czynników geograficznych (Mainka i wsp. 2007; Franzmann i wsp. 2010). Różnice te w dużym stopniu mogą również wynikać z faktu, że w pojedynczych sklerocjach pochodzących z tego samego pola mogą występować różne dominujące związki (Young, 1981).

Zrealizowane badania (publikacja H6) zwracają uwagę na wysoki odsetek próbek ziarna żyta zanieczyszczonego sporyzmem. To pokazuje, że pomimo dużego postępu w rolnictwie na przestrzeni ostatnich lat, problem występowania sporyszu i jego alkaloidów w ziarnie zbóż (szczególnie żyta) jest nadal aktualny. Należy podkreślić, że bardzo ważnym aspektem w ochronie zbóż przed infekcją sporyzmem jest rozwój prac hodowlanych przyczyniających się do zwiększenia odporności roślin.

#### **4.3.3. Podsumowanie**

Przedstawiony w Osiągnięciu cykl publikacji pozwolił na pogłębienie wiedzy na temat występowania wtórnych metabolitów grzybów strzępkowych w roślinach zbożowych w aspekcie bezpieczeństwa żywności. Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań:

- Wykazano przydatność opracowanych metod bazujących na sprzężonej technice chromatografii cieczowej i spektrometrii mas, a także chromatografii cieczowej z detektorem UV-VIS do oznaczania mikotoksyn i ich zmodyfikowanych form. Opracowane sposoby oczyszczania próbek umożliwiły uzyskanie próbek analitycznych o stopniu czystości umożliwiającym ich analizę.
- Poziom zanieczyszczenia próbek ziarna zbóż w odniesieniu do regulowanych mikotoksyn, za wyjątkiem DON, był na ogół niski. W przypadku DON, w ziarnie zbóż pochodzącym z 2014 r. spośród 147 próbek ziarna, aż w 10 stwierdzono

przekroczenie dopuszczalnej zawartości. Zmodyfikowane formy DON były najczęściej znajdowanymi substancjami z tej grupy związków. Zawartość tych substancji może wpływać negatywnie na bezpieczeństwo żywności.

- Poziom zanieczyszczenia próbek ziarna zbóż jest uzależniony od warunków pogodowych (temperatura i ilość opadów atmosferycznych) panujących w danym sezonie wegetacyjnym. Poziom ten może zależeć także od gatunku zboża i jego genotypów. Również szlaki detoksykacyjne DON są uzależnione od genotypu pszenicy.
- Piwo, jako produkt na bazie zbóż, nie jest głównym źródłem pobrania mikotoksyn przez człowieka. Powodem jest duży udział wody i niewielki udział ekstraktu słodowego w piwie, dlatego też zawartości tych związków w próbkach były niskie. Jednak biorąc pod uwagę całkowite spożycie produktów zbożowych, częste picie piwa może zwiększać ryzyko narażenia na mikotoksyny. Spośród analizowanych substancji (NIV, DON i DON-3G) to DON był najczęściej znajdowaną substancją, jednak biorąc pod uwagę pozostałe metabolity, ich częstość występowania również była wysoka. W dużej części próbek piw, stwierdzono wyższe zawartości DON-3G niż DON. Było to wynikiem wtórnej aktywności glukozylotransferaz uwalnianych podczas słodowania ziarna zbóż. Zawartość mikotoksyn w próbkach piw była zależna od rodzaju piwa. Uogólniając, im wyższy udział ekstraktu słodowego, tym średnia zawartość mikotoksyn była większa.
- Ziarno kukurydzy, oprócz podstawowych struktur fumonizyn (z grupy B), może zawierać zmodyfikowane formy („ukryte”, częściowo zhydrolizowane fumonizyny). Fumonizyny są wysoko stabilnymi związkami podczas ogrzewania (np. pieczenie ciasta). Tylko niewielka część tych substancji może ulegać transformacji, a ich kierunek i intensywność tych przemian mogą być zależne od pH środowiska reakcji. Zrozumienie procesów związanych z przemianami fumonizyn podczas obróbki termicznej żywności jest bardzo skomplikowane, przypuszczalnie ze względu na mnogość zmodyfikowanych form fumonizyn występujących zarówno przed, jak i po przeprowadzonym procesie technologicznym.
- Obecność „nowych” mikotoksyn może stanowić poważne ryzyko dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Zawartość enniatyn w próbkach zbóż była zależna od lokalizacji uprawy, gatunku i genotypu zbóż. Spośród enniatyn najczęściej i w



największych stężeniach obserwowano obecność enniatyn z grupy B. Relatywnie wysokie stężenia enniatyn wykryto w próbkach pszenżyta. Wysokim zawartościom enniatyn w próbkach zbóż może towarzyszyć również wysoka zawartość DON. Z toksykologicznego punktu widzenia jednoczesna wysoka zawartość DON i enniatyn może budzić niepokój ze względu na ich efekt synergistyczny lub antagonistyczny.

- Poziom zanieczyszczenia próbek ziarna żyta sporyszem, pochodzącego z upraw z sezonu wegetacyjnego lat 2016 i 2017 był wysoki. Duży odsetek próbek charakteryzował się zawartością sporyszu powyżej dopuszczalnej zawartości sklerocji w ziarnie (0,5 g/kg). W przypadku próbek, w których zawartość przetrwalników nie przekraczała dopuszczalnej wartości, zawartość alkaloidów sporyszu mogła być znaczna. Obserwacja ta zależna była od zawartości alkaloidów w przetrwalnikach. W próbkach żyta dominowały enancjomery alkaloidów o konfiguracji R, a najczęściej wykrywanymi związkami były ergokryptyna, ergokornina i ergokrystyna. Stwierdzono istotną zależność pomiędzy zawartościami przetrwalników a sumaryczną zawartością alkaloidów sporyszu w ziarnie żyta.
- Obecnie stosowane w rolnictwie zabiegi agrotechniczne nie zapewniają skutecznej ochrony przed występowaniem mikotoksyn. Przewiduje się, że problem ten będzie narastał ze względu na zmiany zachodzące w środowisku naturalnym (ocieplenie klimatu). Wydaje się, że jedną z najlepszych dotychczas metod dla zapewnienia bezpieczeństwa w kontekście występowania mikotoksyn w ziarnie zbóż jest wprowadzenie do uprawy odmian roślin odpornych na infekcję grzybową. Dlatego bardzo ważnym zagadnieniem jest intensyfikacja prac hodowlanych, polegających m.in. na poszukiwaniu źródeł odporności u roślin zbożowych.

## Literatura

1. Abrunhosa L., Morales H., Soares C., Calado T., Vila-Chã A.S., Pereira M., Venâncio A. A review of mycotoxins in food and feed products in Portugal and estimation of probable daily intakes. *Critical Reviews in Food Sci. Nut.* 2016, 56, 249-265.
2. Alassane-Kpembé I., Kolf-Clauw M., Gauthier T., Abrami R., Abiola F.A., Oswald I.P., Puel O. New insights into mycotoxin mixtures: The toxicity of low doses of type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013, 272, 191–198.

3. Bartók T., Szécsi Á., Juhász K., Bartók M., Mesterházy Á. ESI-MS and MS/MS identification of the first ceramide analogues of fumonisin B mycotoxin from a *Fusarium verticillioides* culture following RP-HPLC separation. *Food Addit. Contam. Part A* 2013, 30, 1651-1659.
4. Berthiller F., Crews C., Dall'Asta C., Saeger S.D., Haesaert G., Karlovsky P., Oswald I.P., Seefelder W., Speijers G., Stroka J. Masked mycotoxins: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, 57, 165–186.
5. Berthiller F., Dall'Asta C., Corradini R., Marchelli R., Sulyok M., Krska R., Adam G., Schuhmacher R. Occurrence of deoxynivalenol and its 3- $\beta$ -d-glucoside in wheat and maize. *Food Addit. Contam. Part A* 2009, 26, 507–511.
6. Berthiller F., Dall'Asta C., Schuhmacher R., Lemmens M., Adam G., Krska R. Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 3421–3425.
7. Błajet-Kosicka A., Twarużek M., Kosicki R., Sibiorowska E., Grajewski J. Co-occurrence and evaluation of mycotoxins in organic and conventional rye grain and products. *Food Control* 2014, 38, 61–66.
8. Bryła M., Roszko M., Szymczyk K., Jędrzejczak K., Obiedziński M.W. Fumonisin and their masked forms in maize products. *Food Control* 2016, 59, 619-627.
9. Bryła M., Roszko M., Szymczyk K., Jędrzejczak K., Słowik E., Obiedziński M.W. Effect of baking on reduction of free and hidden fumonisins in gluten-free bread. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 10341–10347.
10. Bryła M., Szymczyk K., Jędrzejczak K., Obiedziński M.W. Free and hidden fumonisins in various fractions of maize dry milled under model conditions. *LWT-Food Sci. Tech.* 2015, 64, 171-176.
11. Castells M., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J. Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. *Int. J. Food Microbiol.* 2008, 123, 81–87.
12. Chakraborty S., Newton A.C. Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathol.* 2011, 60, 2-14.
13. Chrpová J., Šíp V., Sumíková T., Salava J., Palicová J., Štočková L., Džuman Z., Hajšlová J. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in wheat grain collected in the Czech Republic. *World Mycotox. J.* 2016, 9, 317-327.
14. Cowger C., Patton-Özkurt J., Brown-Guedira G., Perugini L. Postanthesis moisture increased *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in North Carolina winter wheat. *Phytopathology* 2009, 99, 320–327.

15. CSO 2017. Statistical Yearbook of Agriculture. Central Statistical Office, Warsaw, Poland. Dostęp pod adresem: <https://stat.gov.pl/en/topics/statistical-yearbooks/statistical-yearbooks/statistical-yearbook-of-agriculture-2017,6,12.html>.
16. Dall'Asta C., Dall'Erta A., Mantovani P., Massi A., Galaverna G. Occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in durum wheat. *World Mycotox. J.* 2012, 6, 83–91.
17. Dall'Asta C., Galaverna G., Mangia M., Sforza S., Dossena A., Marchelli R. Free and bound fumonisins in glutenfree food products. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009a, 53, 492–499.
18. Dall'Asta C., Mangia M., Berthiller F., Molinelli A., Sulyok M., Schuhmacher R., Krska R., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R. Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009b, 395, 1335–1345.
19. De Boevre M., Landschoot S., Audenaert K., Maene P., Di Mavungu D., Eeckhout M., Haesaert G., De Saeger S. Occurrence and within field variability of *Fusarium* mycotoxins and their masked forms in maize crops in Belgium. *World Mycotox. J.* 2014, 7, 91–102.
20. De Girolamo A., Lattanzio V.M.T., Schena R., Visconti A., Pascale M. Effect of alkaline cooking of maize on the content of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> and their hydrolysed forms. *Food Chem.* 2016, 192, 1083–1089.
21. De Wolf E.D., Madden L.V., Lipps P.E. Risk assessment models for wheat *fusarium* head blight epidemics based on within-season weather data. *Phytopathology* 2003, 93, 428–435.
22. Dohlman E. Mycotoxin hazards and regulations: impacts on food and animal feed crop trade J. Buzby (Ed.), *International Trade and Food Safety: Economic Theory and Case Studies* (2003) Agricultural Economic Report No. 828, USDA, ERS.
23. EFSA 2012. Scientific opinion on ergot alkaloids in food and feed. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J.* 2012, 10(158).
24. EFSA 2014a. Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J.* 2014a,12(12).
25. EFSA 2014b. Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J.* 2014b,12(8).
26. EFSA 2017. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA J.* 2017, 15.
27. Falavigna C., Lazzaro I., Galaverna G., Battilani P., Dall'Asta Ch. Fatty acid esters of fumonisins: first evidence of their presence in maize. *Food Addit. Contam. Part A* 2013, 30, 1606-16013.
28. Ferrigo D., Raiola A., Causin R. *Fusarium* toxins in cereals: occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management. *Molecules* 2016, 21, 627.

29. Franzmann C., Wachter J., Dittmer N., Humpf H.U. Ricinoleic acid as a marker for ergot impurities in rye and rye products. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 4223-4229.
30. Fruhmann P., Warth B., Hametner C., Berthiller F., Horkel E., Adam G., Sulyok M., Krska R., Fröhlich J., Berthiller F. et al. Synthesis of deoxynivalenol-3-β-D-O-glucuronide for its use as biomarker for dietary deoxynivalenol exposure. *World Mycotox. J.* 2012, 5, 127–132.
31. Geiger H.H., Miedaner T. Rye breeding. In *Cereals (Handbook of Plant Breeding)*, 1<sup>st</sup> ed.; Carena, M.J., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 157–181.
32. Geng Z., Yang D., Zhou M., Zhang P., Wang D., Liu F., Zhu Y., Zhang M. Determination of deoxynivalenol-3-glucoside in cereals by hydrophilic interaction chromatography with ultraviolet detection. *Food Anal. Methods* 2014, 7, 1139–1146.
33. Góral T. Sources of wheat resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. *Bull. Plant Breed. Acclim. Inst.* 2005, 235, 115–131.
34. Gruber-Dorninger Ch., Novak B., Nagl V., Berthiller F. Emerging mycotoxins: Beyond traditionally determined food contaminants. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 7052–7070.
35. Habler K., Frank O., Rychlik M. Chemical synthesis of deoxynivalenol-3-β-D-[13C6]-glucoside and application in stable isotope dilution assays. *Molecules* 2016, 21, 838.
36. Hulvová H., Galuszka P., Frébortová J., Frébort I. Parasitic fungus *Claviceps*. as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnol. Adv.* 2013, 31, 79–89.
37. Humpf H.U., Voss K.A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.* 2004, 48, 255–269.
38. IARC 1993. International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; World Health Organization, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1993; pp. 397–444.
39. Islam M.S., Brown-Guedira G., Van Sanford D., Ohm H., Dong Y., McKendry A.L. Novel QTL associated with the *Fusarium* head blight resistance in Truman soft red winter wheat. *Euphytica* 2016, 207, 571–592.
40. Jackson L.S., Hlywka J.J., Senthil K.R., Bullerman L.B., Musser S.M. Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B<sub>1</sub> in an aqueous model system. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 906–912.
41. Jackson L.S., Katta S.K., Fingerhut D.D., De Vries J.W., Bullerman L.B. Effects of baking and frying on the fumonisin B<sub>1</sub> content of cornbased foods. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 4800–4805.
42. Jestoi M. Emerging *Fusarium* mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin – a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008, 48, 21–49.

43. Juan C., Covarelli L., Beccari G., Colasante V., Mañes J. Simultaneous analysis of twenty-six mycotoxins in durum wheat grain from Italy. *Food Control* 2016, 62, 322–329.
44. Kapusta F. Zboża jako składnik rolnictwa i gospodarki Polski. *Ekonomia XXI wieku*, 2016, 2, 121-137.
45. Kluger B., Bueschl C., Lemmens M., Berthiller F., Häubl G., Jaunecker G., Adam G., Krska R., Schuhmacher R. Stable isotopic labelling-assisted untargeted metabolic profiling reveals novel conjugates of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 5031–5036.
46. Kostelanska M., Zachariasova M., Lacina O., Fenclova M., Kollos A.L., Hajslova J. The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC-TOFMS method. *Food Chemistry* 2011, 126, 1870-1876.
47. Kovalsky P., Kos G., Nährer K., Schwab C., Jenkins T., Schatzmayr G., Sulyok M., Krska R. Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in Finished feed and maize—an extensive survey. *Toxins* 2016, 8, 363.
48. Lacey J., Bateman G.L., Mirocha C.J. Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium spp.* in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 1999, 134, 277–283.
49. Lancova K., Hajslova J., Poustka J., Krplova A., Zachariasova M., Dostalek P., et al. Transfer of *Fusarium* mycotoxins and ‘masked’ deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Addit. Contam. Part A* 2008, 25, 732-744.
50. Lerner A.G., Gelkopf M., Skladman I., Rudinski D., Nachshon H., Bleich A. Clonazepam treatment of lysergic acid diethylamide-induced hallucinogen persisting perception disorder with anxiety features. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2003,18, 101-105.
51. Lv C., Song Y., Gao L., Yao Q., Zhou R., Xu R., Jia J. Integration of QTL detection and marker assisted selection for improving resistance to *Fusarium* head blight and important agronomic traits in wheat. *Crop J.* 2014, 2, 70–78.
52. Magan N., Medina A., Aldred D. Possible climate change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and post-harvest. *Plant Pathol.* 2011, 60, 150-163.
53. Mainka S., Dänicke S., Böhme H., Ueberschär K.H., Liebert F. On the composition of ergot and the effects of feeding two different ergot sources on piglets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2007, 139, 52-68.
54. Maul R., Muller C., Rieß S., Koch M., Methner F. J., Nehls I. Germination induces the glucosylation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in various grains. *Food Chemistry* 2012, 131, 274-279.

55. McCormick S.P., Kato T., Maragos C.M., Busman M., Lattanzio V.M.T., Galaverna G., Dall'Asta C., Crich D., Price N.P.J., Kurtzman C.P. Anomerism of T-2 toxin-glucoside: Masked mycotoxin in cereal crops. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 731–738.
56. Miedaner T., Geiger H.H. Biology, genetics, and management of ergot (*Claviceps spp.*) in rye, sorghum, and pearl millet. *Toxins* 2015, 7, 659-678.
57. Naudè T.W., Botha C.J., Vorster J.H., Roux C., Van der Linde E.J., Van der Walt S.I., Rottinghaus G.E., Van Jaarsveld L., Lawrence A.N., Onderstepoort *Claviceps cyperi*, a new cause of severe ergotism in dairy cattle consuming maize silage and teff hay contaminated with ergotised *Cyperus esculentus* (nut sedge) on the Highveld of South Africa. *J. Vet. Res.* 2005, 72, 23-37.
58. Nesic K., Ivanovic S., Nesic V. Fusarial toxins: secondary metabolites of *Fusarium* fungi. *Rev Environ. Contam. Toxicol.* 2014, 228, 101-120.
59. Paul P.A., El-Allaf S.M., Lipps P.E., Madden L.V. Rain splash dispersal of *Gibberella zeae* within wheat canopies in Ohio. *Phytopathology*, 2004, 94, 1342–1349.
60. Pierri L., Pitman I.H., Rae I.D., Winkler D.A., Andrews P.R. Conformational analysis of the ergot alkaloids ergotamine and ergotaminine. *J. Chem.* 1982, 25, 937- 942.
61. Rahmani A., Jinap S., Soleimany F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2009, 8, 202-251.
62. Rocha O., Ansari K., Doohan F.M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Addit. Contam.* 2005, 22, 369–378.
63. Rychlik M., Humpf H.U., Marko D., Dänicke S., Mally A., Berthiller F., Klaffke H., Lorenz N. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Res.* 2014, 30, 197–205.
64. Seefelder W., Knecht A., Humpf H.U. Bound Fumonisin B<sub>1</sub>: Analysis of fumonisin-B<sub>1</sub> glyco and amino acid conjugates by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5567–5573.
65. Smith M.C., Madec S., Coton E., Hymery N. Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. *Toxins* 2016, 8, 94.
66. Stępień L., Chełkowski J. *Fusarium* head blight of wheat: Pathogenic species and their mycotoxins. *World Mycotox. J.* 2010, 3, 107–119.
67. Stuper-Szablewska K., Perkowski J. Contamination of wheat grain with microscopic fungi and their metabolites in Poland in 2006–2009. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2014, 21, 504-509.
68. Syp A. Ocena efektywności ekonomicznej i środowiskowej uprawy pszenicy ozimej. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu*, 2015, 17, 314-318.

69. Trombete F., Barros A., Vieira M., Saldanha T., Venâncio A., Fraga M. Simultaneous determination of deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside and nivalenol in wheat grains by HPLC-PDA with immunoaffinity column cleanup. *Food Anal. Methods* 2016, 9, 2579-2586.
70. UE 2015/1940. Commission Regulation (EU) 2015/1940 of 28 October 2015 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of ergot sclerotia in certain unprocessed cereals and the provisions on monitoring and reporting.
71. Uhlig S., Stanic A., Hofgaard I.S., Kluger B., Schuhmacher R., Miles C.O. Glutathione-conjugates of deoxynivalenol in naturally contaminated grain are primarily linked via the epoxide group. *Toxins*, 2016, 11, 329.
72. Vaclavikova M., Malachova A., Veprikova Z., Dzuman Z., Zachariasova M., Hajslova J. 'Emerging' mycotoxins in cereals processing chains: changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chem.* 2013, 136, 750-757.
73. Van de Walle M. (Ed.). *The Brewers of Europe. (2015). Beer statistics 2015 edition* (Brussels).
74. Warth B., Fruhmann P., Wiesenberger G., Kluger B., Sarkanj B., Lemmens M., Hametner C., Frohlich J., Adam G., Krska R., et al. Deoxynivalenol-sulfates: Identification and quantification of novel conjugated (masked) mycotoxins in wheat. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 1033–1039.
75. Waśkiewicz A., Beszterda M., Goliński P. Occurrence of fumonisins in food-an interdisciplinary approach to the problem. *Food Control* 2012, 26, 491–499.
76. Yoshinari T., Sakuda S., Furihata K., Furusawa H., Ohnishi T., Sugita-Konishi Y., Ishizaki N., Terajima J. Structural determination of a nivalenol glucoside and development of an analytical method for the simultaneous determination of nivalenol and deoxynivalenol, and their glucosides, in wheat. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 1174–1180.
77. Young J.C. Variability in the content and composition of alkaloids found in Canadian ergot. I. Rye. *J. Env. Sci. Heal. Part B* 1981, 16, 83– 111.
78. Zachariášová M., Dzuman Z., Vepříková Z., Hájková K., Jiru M., Vaclavíková, M., Zachariášová A., Pospíchalová M., Florián M., Hajslová J. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2014, 193, 124–140.
79. Zhang H., Wang B. Fates of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during bread and noodle processing. *Food Control* 2015, 50, 754–757.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)

### 5.1. Zestawienie dorobku przed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

	<b>Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</b>	<b>Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</b>	<b>Łącznie</b>
<b>1. Publikacje znajdujące się w bazie JCR</b>			
1.1. w j. polskim	0	0	0
1.2. w j. angielskim	4	12	16
<b>2. Publikacje i rozdziały w monografiach nie znajdujące się w bazie JCR</b>			
2.1. w j. polskim	4	0	4
2.2. w j. angielskim	3	0	3
<b>Razem publikacje</b>			<b>23</b>
<b>3. Projekty naukowo-badawcze</b>			
3.1. Projekty badawcze finansowane przez NCN, NCBiR, MNiSW	2	3	5
3.2. Projekty badawcze finansowane z działalności statutowej IBPRS	5	6	11
<b>Razem projekty</b>			<b>16</b>
<b>4. Doniesienia konferencyjne</b>			
4.1. Komunikaty na międzynarodowych konferencjach	0	1	1
4.2. Komunikaty na krajowych konferencjach	0	3	3
4.3. Postery na międzynarodowych konferencjach	6	4	10
4.4. Postery na krajowych konferencjach	4	1	5
<b>Razem doniesienia</b>			<b>19</b>



Lp.	Nazwa czasopisma	Ilość	Pkt MNiSW <sup>1</sup>	IF <sup>2</sup>	IF <sup>2</sup> <sub>5-letni</sub>
<b>Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</b>					
1	Food Analytical Methods	1	25	1,956	1,932
2	Food Additives and Contaminants - Part A	1	30	2,341	2,621
3	Journal of Separation Science	1	30	2,594	2,643
4	Analytica Chimica Acta	1	40	4,387	4,344
5	Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego	2	0	-	-
6	Aparatura Badawcza i Dydaktyczna	2	6	-	-
7	Przemysł Fermentacyjny i Owocowo – Warzywny	1	6	-	-
8	Analityka	1	0	-	-
9	Rozdziały w monografiach	1	7	-	-
<b>Razem (1-9)</b>		<b>11</b>	<b>150</b>	<b>11,278</b>	<b>11,540</b>
<b>Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</b>					
<b>Wchodzące w skład Osiągnięcia</b>					
5	Molecules	1	30	2,861	2,988
6	Toxins	3	35	3,030	3,450
7	Food Control	1	40	3,496	3,584
8	World Mycotoxin Journal	1	25	2,189	2,279
<b>Razem (5-8)</b>		<b>6</b>	<b>200</b>	<b>17,636</b>	<b>19,201</b>
<b>Pozostałe po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</b>					
9	Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju- Archives of Industrial Hygiene and Toxicology	1	15	1,395	1,320
10	Quality Assurance and Safety of Crops & Foods	1	20	0,597	0,713
11	Food Control	1	40	3,496	3,584
13	LWT-Food science and Technology	1	35	2,711	3,290
14	Food Technology and Biotechnology	1	25	1,179	1,570
15	Journal of Agricultural and Food Chemistry	1	45	2,912	3,269
<b>Razem (9-15)</b>		<b>6</b>	<b>180</b>	<b>12,290</b>	<b>13,746</b>
<b>RAZEM (1-15)</b>		<b>23</b>	<b>530</b>	<b>41,204</b>	<b>44,487</b>

<sup>1</sup>Zgodnie z punktacją MNiSW obowiązującą w roku opublikowania.

<sup>2</sup>Zgodnie z rokiem opublikowania. W przypadku publikacji z roku 2017 lub 2018, dla których IF nie został obliczony podano ostatni aktualny IF.

## 5.2. Sumaryczny impact factor (IF) według listy Journal Citation Reports (JCR)

IF<sup>1</sup> = 41,204 (IF<sup>1</sup><sub>5-letni</sub> = 44,487), w tym po uzyskaniu stopnia naukowego doktora: IF<sup>1</sup> = 29,926 (IF<sup>1</sup><sub>5-letni</sub> = 32,947).

## 5.3. Sumaryczna liczba punktów według MNiSW

530<sup>2</sup>, w tym po uzyskaniu stopnia naukowego doktora: 380<sup>2</sup>.

## 5.4. Liczba cytowań publikacji

według bazy Web of Science (WoS): 91, według bazy Scopus: 100.

## 5.5. Indeks Hirscha

według bazy Web of Science (WoS): 6, według bazy Scopus: 6.

## 5.6. Udział i rola w projektach badawczych

### 5.6.1. Projekty badawcze finansowane przez NCN, NCBiR, MNiSW

[G1] Projekt badawczy 2016/21/D/NZ9/02597, Biosynteza maskowanych mikotoksyn u roślin pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) oraz ich przemiany w wybranych procesach technologicznych, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, (27.02.2017 – 26.02.2021), Sonata 11, Narodowe Centrum Nauki, **kierownik projektu**.

[G2] Projekt badawczo-rozwojowy Nr ID wniosku: 385521, Platforma Żywnościowa, umowa w trakcie podpisywania (2018 – 2020), Program: Gospostrateg Konkurs 1: Strategiczny program badań naukowych i prac rozwojowych „Społeczny i gospodarczy rozwój Polski w warunkach globalizujących się rynków”, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, **wykonawca projektu**.

[G3] Projekt badawczy 2014/15/B/NZ9/02169, Biochemiczne, fizjologiczne i anatomiczne czynniki modyfikujące podatność kukurydzy cukrowej na infekcję

---

<sup>1</sup> Zgodnie z rokiem opublikowania. W przypadku publikacji z roku 2017 lub 2018, dla których IF nie został obliczony podano ostatni aktualny IF.

<sup>2</sup> Zgodnie z punktacją MNiSW obowiązującą w roku opublikowania.

wywołaną patogenicznymi grzybami rodzaju *Fusarium*, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, (18.09.2015 – 17.09.2018), Opus 9, Narodowe Centrum Nauki, **wykonawca projektu**.

[G4] Projekt badawczy 2012/05/N/NZ9/01316, Występowanie wolnych i sprzężonych fumonizyn w różnym asortymencie przetworów zbożowych oraz ich kierunek przemian w trakcie operacji technologicznych w warunkach modelowych, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, (02.05.2013 – 01.05.2015), Preludium 3, Narodowe Centrum Nauki, **kierownik projektu**.

[G5] Projekt badawczy N N312 102738, Ocena różnych asortymentów przetworów zbożowych w aspekcie obecności wybranych ksenobiotyków naturalnych i środowiskowych, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, (2010 – 2012), Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, **wykonawca projektu**.

#### **5.6.2. Projekty badawcze finansowane z działalności statutowej IBPRS**

[G6] Temat statutowy 500-01-ZA-2, Chemiczna synteza siarczanów deoksyniwalenolu i toksykologiczna ocena powstałych produktów reakcji na zarodkach drobiowych, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie, (01.04.2018 – 30.03.2020), **kierownik projektu**.

[G7] Temat statutowy 500-01-ZA-3, Wpływ procesu pieczenia pieczywa i produkcji piwa w warunkach modelowych na zawartość deoksyniwalenolu, niwalenolu i ich glukozydów, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, (01.04.2018 – 30.03.2019), **wykonawca projektu**.

[G8] Temat statutowy 500-01-ZA-01, Opracowanie metody jednoczesnego oznaczania zawartości niwalenolu i deoksyniwalenolu w ziarnie zbóż i produktach zbożowych, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, (01.01. – 31.12.2017), **kierownik projektu**.

[G9] Temat statutowy 500-01-ZA-02, Stabilność toksyn *Claviceps purpurea* pod wpływem procesu wypieku pieczywa oraz ich występowanie w produktach spożywczych na bazie żyta, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, (01.01. – 31.12.2016), **kierownik projektu**.

[G10] Temat statutowy 500-01-ZA-05, Ocena występowania ukrytych form mikotoksyn w produktach rolno-zbożowych, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, (01.2013 – 06.2014), **kierownik projektu.**

[G11] Temat statutowy 510-01-ZA-01, Opracowanie procedury oznaczania glicerolu i dihydroksyacetonu w podłożach pochodowlanych, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, (09.2014 – 12.2014), **kierownik projektu.**

[G12] Temat statutowy 500-01-ZA-04, Ocena występowania wybranych substancji pożądaných i niepożądaných w produktach przemiału ziarna pszenicy, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, (2013-2014), **wykonawca projektu.**

[G13] Temat statutowy 500-01-ZA-01, Opracowanie procedury analitycznej oznaczania wybranych alkaloidów sporyszu w ziarnie zbóż techniką LC/MS/MS, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, (04.2012 – 12.2013), **wykonawca projektu.**

[G14] Temat statutowy 3.3.2. Opracowanie procedury analitycznej jednoczesnego oznaczania wybranych mikotoksyn w produktach spożywczych metodą LC/MS/MS, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, (2011-2012), **wykonawca projektu.**

[G15] Temat statutowy 3.3.5, Zastosowanie technik HPLC/FLD oraz LC-MS/MS w analizie ilościowej fumonizyn, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, (04.2011 – 12.2012), **wykonawca projektu.**

### **5.6.3. Inne**

[G16] 15/ZAŻ/ZZ/2005 /63 z dn. 29.09.2005 Aneks nr 16 z dn. 04.02.2016, umowa na czas nieokreślony z Agencją Rynku Rolnego (obecnie Krajowym Ośrodkiem Wsparcia Rolnictwa), Analiza ryzyka wystąpienia substancji skażających w ziarnie zbóż, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie, Agencja Rynku Rolnego, (2005-obecnie), **wykonawca projektu.**

**5.7. Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową**

1. Wyróżnienie Uchwałą Rady Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za pracę doktorską pt. "Występowanie fumonizyn w kukurydzy i produktach kukurydzianych oraz ich przemiany w wybranych operacjach technologicznych", 8.09.2014.
2. Dyplom Uznania JM Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego za osiągnięcia naukowe, 2013.

**5.8. Staże naukowe i uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych**

1. Staż Naukowy w Katedrze Chemii, Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydziału Technologii Drewna Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, poświęcony zastosowaniu technik chromatograficznych i spektrometrii mas w analizie metabolitów grzybów strzępkowych, 01.09-30.09.2016.
2. Staż Naukowy w Zakładzie Uprawy Roślin Zbożowych Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach, poświęcony wzrostowi, rozwojowi, biologii kwitnienia oraz wymaganiom agrotechnicznym gatunków i odmian zbóż i w różnych warunkach siedliska i agrotechniki, 01.06-29.06.2016.
3. Szkolenie w ramach Erasmus Intensive Programme „Regulatory Aspects and Scientific Risk Assessment of Food & Feed Safety” – RASAFF-Safety, Suleyman Demirel University, Isparta, Turkey, 17-28.09.2012.

**5.9. Recenzje publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych**

Łączna liczba zrecenzowanych artykułów w latach 2013-2018 wynosiła 30.

**5.9.1. Z listy czasopism posiadających współczynnik wpływu IF (Lista A czasopism MNiSW):**

1. African Journal and Biotechnology – 1 recenzja
2. Analytical Letters – 1 recenzja
3. Environmental Toxicology – 1 recenzja
4. Food Additives and Contaminants, Part A – 4 recenzje
5. Food Analytical Methods – 4 recenzje
6. Food Chemistry – 1 recenzja
7. Food Control – 3 recenzje

8. Journal of Agricultural and Food Chemistry – 2 recenzje
9. Journal of Chromatography, Part B – 1 recenzja
10. Journal of Food Science – 1 recenzja
11. Journal of Separation Science – 1 recenzja
12. Journal of Veterinary Research – 1 recenzja
13. LWT-Food Science and Technology – 5 recenzji
14. Toxin Reviews – 1 recenzja.

#### **5.9.2. Z listy czasopism nieposiadających współczynnika wpływu IF (Lista B czasopism MNiSW):**

1. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych – 1 recenzja
2. Croatian Journal of Food Science and Technology – 2 recenzje.

#### **5.10. Opis działalności naukowej**

W 2008 roku ukończyłem studia inżynierskie na Wydziale Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie na kierunku technologia żywności i żywienie człowieka uzyskując tytuł inżyniera. Pracę magisterską wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Mieczysława W. Obiedzińskiego obroniłem w 2009 roku, na tym samym Wydziale.

W 2009 roku rozpocząłem studia doktoranckie na Wydziale Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. W trakcie trwania studiów doktoranckich, w 2010 r. podjąłem pracę na stanowisku technologa w Zakładzie Analizy Żywności Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie (obecnie Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego). W czasie trwania studiów doktoranckich do najważniejszych podejmowanych przeze mnie zagadnień należała szeroko pojęta problematyka mikotoksyn.

Pierwsze podejmowane przez mnie działania naukowe skupiały się na realizacji badań nad jednoczesnym oznaczaniem wybranych mikotoksyn w środkach spożywczych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrem mas z analizatorem typu pułapka jonowa (LC-IT-MS/MS). Efektem realizacji tych badań było potwierdzenie przydatności tej techniki do jednoczesnego oznaczania wybranych trichotecenów (niwalenol, deoksyniwalenol, fusarenon-X,

neosolaniol, 3-acetylo-deoksyniwalenol, diacetoksyscirenol, toksyna HT-2 i T-2) do oceny ich zawartości w produktach zbożowych. Za pomocą opracowanej metody, przeprowadzono analizę stopnia zanieczyszczenia tymi mikotoksynami produktów spożywczych na bazie zbóż. Wyniki tych prac zostały opublikowane w czasopiśmie posiadającym współczynnik oddziaływania (IF) (załącznik 5, pozycja II.A.1.1).

Ze względu na różną budowę chemiczną mikotoksyn i ich właściwości, nie zawsze stosując tę samą technikę i procedurę badawczą możliwe jest przeprowadzenie jednoczesnej ich analizy. Fumonizyny są grupą związków, których budowa chemiczna opiera się na alifatycznym łańcuchu węglowym (C<sub>20</sub>), do którego przyłączone są grupy kwasu propanotrikarboksyłowego, hydroksylowe, metylowe i jedna aminowa. Pod tym względem znacznie różnią się od pozostałych mikotoksyn, co stwarza trudność ich jednoczesnej analizy. Dlatego też kolejnym etapem moich badań było opracowanie procedury oznaczania fumonizyn w kukurydzy i jej produktach za pomocą techniki LC-IT-MS/MS. W badaniach wykorzystano kolumny SPE wypełnione specyficznymi polimerami z nadrukiem molekularnym. W przeprowadzonym eksperymencie walidacyjnym uzyskano wyniki, które potwierdziły skuteczność tej metody, a rezultaty tych badań zamieszczono w publikacji w czasopiśmie z IF (załącznik 5, pozycja II.A.1.3). Jednocześnie, obok badań nad opracowaniem metody oznaczania fumonizyn w kukurydzy i jej produktach, przeprowadzono analizę aktualnego stanu wiedzy z zakresu charakterystyki budowy, właściwości toksycznych i występowania fumonizyn. Szczegółowa charakterystyka obecnego stanu wiedzy z tego zakresu, pozwoliła na przygotowanie artykułu przeglądowego, który został opublikowany w czasopiśmie z IF (załącznik 5, pozycja II.A.1.2). Wnioski z tych prac, pozwoliły mi na zwrócenie uwagi na występowanie nowego problemu wśród badań nad mikotoksynami, jakim są zmodyfikowane fumonizyny (ze względu na wcześniejsze braki w ujednoczeniu nazewnictwa, bardzo często w literaturze nazywano je „zamaskowanymi” lub „sprzężonymi” mikotoksynami). Zmodyfikowane fumonizyny obejmują te cząsteczki, które mogą być kowalencyjnie związane z innymi substancjami obecnymi w żywności. Należą do nich białka, węglowodany i kwasy tłuszczowe. Fumonizyny (ze względu na swoją budowę chemiczną) mogą także tworzyć z białkami i cukrami złożonymi supramolekularne oddziaływania. Oddziaływania te mogą przyczyniać się do niedostatecznej ekstrakcji fumonizyn z próbki, co może prowadzić do niedoszacowania ich zawartości w badanych próbkach. W wyniku obecności mnogiej liczby zmodyfikowanych form fumonizyn w kukurydzy i jej produktach, ryzyko

występowania zagrożenia dla bezpieczeństwa żywności może wzrastać. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na przygotowanie projektu badawczego „Występowanie wolnych i sprzężonych fumonizyn w różnym asortymencie przetworów zbożowych oraz ich kierunek przemian w trakcie operacji technologicznych w warunkach modelowych”, który uzyskał finansowanie z Narodowego Centrum Nauki w ramach programu Preludium 3 (załącznik 5, pozycja II.I.1.4). Tematyka objęta projektem, była również przedmiotem mojej pracy doktorskiej pt. „Występowanie fumonizyn w kukurydzy i produktach kukurydzianych oraz ich przemiany w wybranych operacjach technologicznych”, która została obroniona i wyróżniona podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej 12 czerwca 2014 roku. Uzyskane wyniki w ramach tych badań, pozwoliły na przygotowanie publikacji w czasopiśmie z IF (załącznik 5, pozycje II.A.2.7, II.A.2.8, II.A.2.10).

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora (2010-2014), w ramach funduszu IBPRS na utrzymanie potencjału badawczego, realizowałem badania związane z przygotowaniem procedury analitycznej oznaczania w ziarnie zbóż sześciu podstawowych alkaloidów *Claviceps purpurea* i ich epimerów przy zastosowaniu techniki LC-IT-MS/MS (załącznik 5, pozycja II.I.2.9). Podjęte działania nad opracowaniem odpowiedniej procedury oznaczania alkaloidów sporyszu w ziarnie zbóż były efektem apeli w środowisku naukowym nad potrzebą rozwoju w pełni zwalidowanych metod badawczych, umożliwiających uzyskanie wiarygodnych wyników. Po kilku miesiącach pracy, badania pozwoliły na opracowanie metody, która została wykorzystana do analizy zawartości alkaloidów sporyszu w ziarnie żyta i jego produktach. Efekty realizacji tych badań zostały również zamieszczone w publikacji zamieszczonej w czasopiśmie posiadającym IF (załącznik 5, pozycja II.A.2.9). Procedura przygotowania próbki do oznaczenia alkaloidów sporyszu, była w późniejszym okresie wykorzystana do ich analizy w ziarnie żyta przy zastosowaniu techniki UPLC-TOF-HRMS (publikacja wykazana w Osiągnięciu jako publikacja H6). W chwili obecnej trwają przygotowania do akredytowania opracowanej metody przez Polskie Centrum Akredytacji.

Wykorzystane w badaniach metody oraz procedury analityczne stanowią nie tylko uzupełnienie dostępnej techniki i wiedzy w dziedzinie, ale są też niejednokrotnie wdrażane do rutynowych prac laboratoryjnych w Zakładzie Analizy Żywności na potrzeby analiz wykonywanych dla klientów zewnętrznych IBPRS.



Problem występowania zmodyfikowanych mikotoksyn w ziarnie zbóż i ich produktach, dotyczy nie tylko fumonizyn, ale również i innych mikotoksyn. Ponadto, bardzo ważne badania dotyczą występowania w ziarnie zbóż i jego produktach „nowych” mikotoksyn. Dlatego też, na potrzeby badań dotyczących tego zagadnienia, podjąłem współpracę z innymi ośrodkami naukowymi, takimi jak Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (UP) i Instytut Uprawy i Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach (IUNG). W tych ośrodkach naukowych odbyłem także miesięczne staże (Katedra Chemii, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Technologii Drewna UP w Poznaniu oraz Zakład Upraw Roślin Zbożowych IUNG w Puławach). Podczas realizacji tych staży rozwijałem swoje zainteresowania z zakresu technik chromatograficznych i spektrometrii mas w analizie mikotoksyn, a także zdobywałem wiedzę z zakresu uprawy zbóż, w tym także biologii ich rozwoju. Efektem współpracy z wymienionymi ośrodkami naukowymi, były publikacje objęte osiągnięciem naukowym będące podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego (H1-H6), jak również inne efekty w postaci publikacji w czasopismach posiadających IF (załącznik 5, pozycje II.A.2.5 i II.A.2.6).

W pracy II.A.2.6 (załącznik 5), dokonano oceny wpływu genotypu pszenicy ozimej oraz poziomu nawożenia azotem (120 i 200 kg N/ha) na zawartość toksyn *Fusarium* w dwóch sezonach wegetacyjnych lat 2014 i 2015. Przeprowadzone badania wyodrębniły trzy grupy odmian, tj. mało podatne na występowanie mikotoksyn (Astoria, Fidelius), odmiany o średniej podatności na gromadzenie mikotoksyn (Oxal, Kepler, Forkida, KWS Dacanto) oraz odmiany gromadzące duże zawartości toksyn (Bamberka, Kampana, Meister). W przypadku większości mikotoksyn udowodniono, że większa dawka azotu (200 kg/ha) stosowana podczas nawożenia roślin pszenicy, powodowała istotny wzrost akumulacji mikotoksyn, w porównaniu do upraw gdzie zastosowano niższą dawkę azotu (120 kg/ha). Ponadto, wykazano istotny wpływ interakcji odmiany i dawki azotu na zawartość zdecydowanej większości mikotoksyn w badanym ziarnie pszenicy.

W przeglądowej publikacji II.A.2.5 (załącznik 5), podkreślono znaczenie bakterii kwasu mlekowego, posiadających potencjalną zdolność do hamowania wzrostu grzybów i rozkładu mikotoksyn w zanieczyszczonej żywności. Zwrócono także uwagę, na problemy praktycznego wykorzystania tych mikroorganizmów do eliminacji mikotoksyn z żywności, będącymi w najbliższej przyszłości dużym wyzwaniem dla naukowców.

Efektem współpracy z ośrodkami w Poznaniu i w Puławach, było przygotowanie w ramach programu Sonata 11 (Narodowe Centrum Nauki) obecnie realizowanego projektu, którego jestem kierownikiem, pt. „Biosynteza maskowanych mikotoksyn u roślin pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) oraz ich przemiany w wybranych procesach technologicznych” (2016/21/D/NZ9/02597, 2017-2021, załącznik 5, pozycja II.I.1.1). Przedmiotem badań w ramach przyznanego projektu jest scharakteryzowanie metabolitów deoksynivalenolu (DON) u 6 genotypów pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) różniących się odpornością na fuzariozę (FHB); wykazanie wpływu obecności na roślinie patogenu (*Fusarium*) na kierunek i intensywność przemian DON; weryfikacja hipotezy, że warunki środowiskowe istotnie wpływają i modulują procesy detoksykacji DON w uprawach pszenicy; określenie wpływu procesu technologicznego wytwarzania pieczywa na bazie mąki pszennej na zawartość zmodyfikowanych form mikotoksyn. Trzyletnie badania zostały rozpoczęte w 2017 r. Część eksperymentalna (doświadczenia polowe) prowadzona jest w stacjach doświadczalnych IUNG, a także Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu (IOR). Efektem tych badań, na dzień dzisiejszy są dwie publikacje w czasopismach posiadających IF, wykazane jako Osiągnięcie (publikacje H1 i H3). Ponieważ głównym problemem ograniczającym rozwój badań nad zmodyfikowanymi mikotoksynami jest brak komercyjnie dostępnych substancji wzorcowych, w ramach projektu podjęto także współpracę międzynarodową z prof. Tomoya Yoshinari (Zakład Mikrobiologii, Narodowy Instytut Nauk o Zdrowiu w Tokio, Japonia), odpowiedzialnego za ich syntezę.

Współpraca z UP w Poznaniu, zaowocowała także przygotowaniem obecnie realizowanego projektu pt. „Biochemiczne, fizjologiczne i anatomiczne czynniki modyfikujące podatność kukurydzy cukrowej na infekcję wywołaną patogenicznymi grzybami rodzaju *Fusarium*”, w ramach programu Opus 9 (Narodowe Centrum Nauki, 2014/15/B/NZ9/02169), którego jestem wykonawcą (załącznik 5, pozycja II.I.1.3). W ramach tych badań, przeprowadzono analizę analogów fumonizyn w różnych genotypach kukurydzy cukrowej przy zastosowaniu techniki UPLC-TOF-HRMS. Efektem realizacji tych badań było wykrycie w analizowanych próbkach, oprócz podstawowych związków (fumonizyny z grupy B) również w znaczących stężeniach fumonizyn zaliczanych do grupy A i C. Wyniki badań zamieszczono w raporcie II.E.7 (załącznik 5). Także efektem realizacji tych badań, była także publikacja w czasopiśmie posiadającym IF, włączona Osiągnięcie (publikacja H5).

W chwili obecnej, w ramach środków z funduszu na utrzymanie potencjału badawczego IBPRS, przy współpracy z UP w Poznaniu i Szkołą Główną Gospodarstwa Wiejskiego (Wydział Nauk o Zwierzętach), realizuję badania pt. „Chemiczna synteza siarczanów deoksyniwalenolu i toksykologiczna ocena powstałych produktów reakcji na zarodkach drobiowych” (załącznik 5, pozycja II.I.2.6). W ostatnich latach wykazano, że w szlaku biologicznej transformacji DON przez rośliny zbóż, występują reakcje siarczanowania DON (obok reakcji glikozylacji). Po wprowadzeniu DON do organizmu rośliny, wykryto DON-3-siarczan i w znacznie mniejszym stężeniu – DON-15-siarczan. DON-15-siarczan wykazywał zdecydowanie mniejszą zdolność do hamowania syntezy białek pszenicy, podczas gdy w przypadku DON-3-siarczanu – nie obserwowano toksyczności. Ponieważ w przypadku tych metabolitów, wiedza naukowa w odniesieniu do potencjalnej toksyczności na ludziach i zwierzętach jest bardzo znikoma, podjęto badania w celu przeprowadzenia reakcji syntezy chemicznej siarczanów deoksyniwalenolu, a następnie wykorzystania produktów reakcji do oceny toksykologicznej na zarodkach kurcząt drobiowych. Badania te obecnie są kontynuowane.

Ponieważ glikozydy toksyn *Fusarium* mogą odgrywać istotną rolę w bezpieczeństwie żywności i pasz, w ramach środków z funduszu na utrzymanie potencjału badawczego IBPRS (załącznik 5, pozycja II.I.2.7), realizowane są obecnie także prace pt. „Wpływ procesu pieczenia pieczywa i produkcji piwa w warunkach modelowych na zawartość deoksyniwalenolu, niwalenolu i ich glikozydów”. Prace te stanowią kontynuację zakończonych badań w ramach projektu II.I.2.8 (załącznik 5). Celem tych badań jest ocena wpływu procesu pieczenia pieczywa na bazie mąki pszennej zanieczyszczonej DON, NIV i ich glikozydami na ich zawartość w produkcie. Oceniany jest także wpływ technologicznego procesu produkcji piwa na zmiany zawartości omawianych substancji. Realizowane badania w ramach projektu, którego jestem wykonawcą, są bardzo istotne. Dotyczą nie tylko deoksyniwalenol-3-glikozydu, ale także niwalenol-3glikozydu. W ostatnim przypadku, niewiele wiadomo o tej pochodnej, dlatego też szczególny nacisk położono na ocenę jej występowania w piwie i zbadanie przebiegu zmian jej zawartości w trakcie procesów technologicznych przetwarzania żywności. Ze względu na brak dostępnych substancji badania są realizowane przy współpracy z prof. Tomoya Yoshinari (Zakład Mikrobiologii, Narodowy Instytut Nauk o Zdrowiu w Tokio, Japonia).

W chwili obecnej jestem także wykonawcą realizowanego projektu badawczo-rozwojowego pt. „Platforma Żywnościowa”, przyznanego z funduszy Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, w ramach konsorcjum w programie Gospostrateg 1: „Społeczny i gospodarczy rozwój Polski w warunkach globalizujących się rynków”) (załącznik 5, pozycja II.I.1.2). W ramach projektu przewiduje się uruchomienie platformy do obrotu towarowego surowcami rolnymi, w którym IBPRS ma za zadanie między innymi zapewnianie bezpieczeństwa żywności oraz przeprowadzenie oceny ryzyka występowania substancji skażających w surowcach.

Bezpośrednią przyczyną podejmowanych przeze mnie badań jest istotność tematyki modyfikowanych mikotoksyn w kontekście ich powstawania, występowania i właściwości toksykologicznych. Obecnie brakuje badań, a także istnieje wiele niejasności na temat szkodliwości tych substancji dla zdrowia człowieka. Zainteresowanie tą problematyką wiąże się także z dużym brakiem danych dotyczących występowania tych związków w żywności, ich właściwości na skutek oddziaływania różnych czynników środowiska, aż wreszcie niedostatecznej wiedzy na temat genezy tych substancji przy udziale systemu enzymatycznego drobnoustrojów, roślin i zwierząt. Istnienie potrzeby regulacji prawnych w odniesieniu do dopuszczalnych zawartości zmodyfikowanych mikotoksyn jest uznawane przez europejskie organy legislacyjne jako zasadne, jednakże z powodu braku wyników badań toksykologicznych, ustalenie tych wartości w chwili obecnej nie jest możliwe. Rosnące zainteresowanie mikotoksynami i sprzężonymi ich formami, spowodowało utworzenie przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) w 2014 roku Grupy Roboczej ds. Maskowanych Mikotoksyn w Żywności i Paszy. Na prośbę tej grupy, od 2017 roku jestem z nią w stałym kontakcie, a wyniki moich prac są przekazywane grupie i wykorzystywane na potrzeby sporządzania opinii naukowych EFSA. Biorąc pod uwagę realizowane przeze mnie zagadnienia związane z modyfikowanymi mikotoksynami, otrzymałem propozycję reprezentowania IBPRS w konkursie TWINNING w programie Horyzont 2020, przez Uniwersytet w Parmie. W chwili obecnej prowadzone są rozmowy nad przygotowaniem wniosku w tym konkursie.

Podsumowując, mój obecny całkowity dorobek publikacyjny, w których jestem autorem lub współautorem składa się z 23 publikacji naukowych w recenzowanych czasopiśmie oraz 19 doniesień konferencyjnych, głównie na konferencjach międzynarodowych. Sumaryczna liczba punktów wg punktacji MNiSW za publikacje

wynosi 530, a sumaryczny współczynnik wpływu IF 41,204 ( $IF_{5-letni} = 44,487$ ). Prace był cytowane 91 razy, a mój indeks Hirscha wynosi 6.

Koniec załącznika 2.

A handwritten signature in blue ink, reading "Marcin Bryła". The signature is written in a cursive style with a large, stylized initial 'M' and 'B'.