

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

BIOLÓGIA DOKTORI PROGRAM

**AZ OCHRATOXIN TERMELÉS ELŐFORDULÁSÁNAK,
BIOKÉMIAI ÉS GENETIKAI HÁTTERÉNEK VIZSGÁLATA
ASPERGILLUS FAJOKBAN**

KÉSZÍTETTE: RIGÓ KRISZTINA

TÉMAVEZETŐ: DR. VARGA JÁNOS

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
MIKROBIOLÓGIA TANSZÉK**

2003

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
BEVEZETÉS	8
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	
1. 1. AZ OCHRATOXINOK JELLEMZÉSE	12
1. 1. 1. A mikotoxinok kutatásának kezdete	12
1. 1. 2. A mikotoxinok csoportosítása	12
1. 1. 3. <i>Penicillium</i> és <i>Aspergillus</i> fajok mikotoxinjai által okozott humán és állati mikotoxikózisok és egészségkárosodások	17
1. 1. 4. Az ochratoxinok felfedezése	19
1. 1. 5. Az ochratoxin A, B, C kémiai és fizikai jellemzői	20
1. 1. 6. Az ochratoxinok előfordulása. Ochratoxintermelő fajok.	21
1. 1. 7. Az ochratoxinok metabolizmusa és hatásmódja	24
1. 1. 8. Az ochratoxinok biológiai hatása	25
1. 1. 9. Ochratoxikózisok	26
1. 1. 10. Élelmezésegészségügyi határértékek	28
1. 2. AZ OCHRATOXINOK OKOZTA PROBLÉMÁK MÉRSÉKLÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI	31
1. 2. 1. Az ochratoxikózisok megelőzése	31
1. 2. 2. Az élelmiszerek és takarmányok OA tartalmának csökkentésére kidolgozott eljárások	32
1. 2. 3. Vegyületek hatása az ochratoxintermelő képességre	33
1. 3. AZ <i>ASPERGILLUS</i> NEMZETSÉG ÉS Néhány szekciójának jellemzése	34
1. 3. 1. Az <i>Aspergillus</i> nemzetség taxonómiája	34
1. 3. 2. A <i>Circumdati</i> szekció	36
1. 3. 3. A <i>Flavi</i> szekció	36
1. 3. 4. A <i>Fumigati</i> szekció	37
1. 4. A PENÉSZGOMBA KIMUTATÁSI MÓDSZEREK	38
1. 4. 1. Az leggyakrabban alkalmazott eljárások	38
1. 4. 2. Az ergoszterin előfordulása és jellemzése	39
1. 4. 3. Az ergoszterin tartalom meghatározásának lehetőségei	41
1. 5. GENOTÍPUSOS VIZSGÁLATOK	41
1. 5. 1. RAPD analízis	41
1. 5. 2. rDNA ITS vizsgálatok	42

1. 5. 3. A poliketid-szintáz	43
1. 5. 4. Mitokondriális DNS RFLP vizsgálatok	44
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	
2. 1. A FELHASZNÁLT TÖRZSEK	46
2. 2. AZ ALKALMAZOTT TÁPTALAJOK ÉS TÁPOLDATOK	46
2. 3. EGYÉB FELHASZNÁLT OLDATOK, REAGENSEK	48
2. 4. FENOTÍPUSOS VIZSGÁLATOK	49
2. 4. 1. Szénasszimilációs spektrum analízis	49
2. 4. 2. OA termelő <i>Aspergillus</i> törzsek izolálása	49
2. 4. 3. Morfológiai vizsgálatok	50
2. 4. 4. Az izolált törzsek ubikinon rendszere	50
2. 4. 5. Az <i>A. albertensis</i> mutagénkezelése	50
2. 5. AZ IZOLÁTUMOK MIKOTOXIN TERMELŐ ÉS LEBONTÓ KÉPESSÉGÉRE IRÁNYULÓ VIZSGÁLATOK	50
2. 5. 1. Az izolátumok ochratoxin termelésének vizsgálata ELISA-val	50
2. 5. 2. Az ochratoxin termelés vizsgálata TLC-vel	51
2. 5. 3. Az ochratoxin termelés vizsgálata HPLC-vel	51
2. 5. 4. Ochratoxin bontó képesség vizsgálata TLC-vel	51
2. 5. 5. A lebontott OA mennyiségének meghatározása HPLC-vel	52
2. 5. 6. Az ochratoxin bontás kinetikájának vizsgálata	52
2. 6. KÜLÖNBÖZŐ VEGYÜLETEK HATÁSA AZ OCHRATOXIN TERMELÉSRE	52
2. 7. AZ OA TERMELŐ TÖRZSEK MÁSODLAGOS METABOLIT PROFILJÁNAK VIZSGÁLATA	53
2. 8. A PENÉSZGOMBÁK KIMUTATÁSÁRA ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	53
2. 8. 1. Ergoszterin feltárás hagyományos módszerrel	53
2. 8. 2. Ergoszterin feltárás mikrohullámú energiával	54
2. 9. GENOTÍPUSOS VIZSGÁLATOK	55
2. 9. 1. Nukleinsav izolálás	55
2. 9. 2. PCR reakció ITS szekvencia analízishez	55
2. 9. 3. A 26S rDNS D1-D2 régiójának szekvencia analízise	56
2. 9. 4. A ketoszintáz és a C-metilációs domén szekvenciájának vizsgálata	56

2. 9. 5. β -tubulin gén szekvenciaanalízise <i>A. viridinutans</i> izolátumokban	56
2. 9. 6. RAPD analízis	56
2. 9. 7. RFLP analízis	57
2. 9. 8. Nukleinsavak elválasztása gélelektroforézissel	58
2. 9. 9. Nukleinsavak visszaizolálása agaróz gélből	58
2. 9. 10. DNS szekvenálás	58
2. 9. 11. Filogenetikai analízis	59
3. EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE	
3. 1. OCHRATOXIN TERMELŐ <i>ASPERGILLUS</i> TÖRZSEK IZOLÁLÁSA ÉLELMISZEREKRŐL	60
3. 2. A KINETIKAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI	65
3. 2. 1. Az ochratoxin termelés kinetikájának vizsgálata az <i>Aspergillus</i> fajokkal	65
3. 2. 2. Az <i>A. albertensis</i> ATCC 58745 OA termelésének hőmérsékletfüggése és kinetikája	68
3. 2. 3. Különböző vegyületek hatása az <i>A. albertensis</i> ATCC 58745 OA termelésére	70
3. 2. 4. Az OA bontás képességének vizsgálata <i>Aspergillus</i> izolátumokban	72
3. 2. 5. Az OA bontás kinetikájának vizsgálata <i>A. niger</i> CBS 120.49 törzsszel	74
3. 3. A FILOGENETIKAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI	76
3. 3. 1. A <i>Circumdati</i> szekció filogenetikai analízise	76
3. 3. 1. 1. Fenotipikus tulajdonságok vizsgálata	77
3. 3. 1. 2. A <i>Circumdati</i> szekció ITS szekvencia és fenotipikus tulajdonságai analízisének eredményei	80
3. 3. 2. A <i>Flavi</i> szekció filogenetikai analízise ITS szekvenciák alapján	83
3. 3. 2. 1. A <i>Flavi</i> szekció fiogenetikai analízisének eredményei ITS és 26S rDNS szekvenciák alapján	85
3. 3. 3. Az <i>A. viridinutans</i> intraspecifikus variabilitásának vizsgálata	88
3. 3. 3. 1. A növekedési tesztek eredményei	90

3. 3. 3. 2. Az RFLP és a β -tubulin gén szekvencia analízisének eredményei	90
3. 4. KÍSÉRLETEK AZ OA TERMELÉSBEN RÉSZTVEVŐ GÉNEK AZONOSÍTÁSÁRA	96
3. 4. 1. Mutánsok előállítása és vizsgálata RAPD analízissel	96
3. 4. 2. A KS (ketoszintáz) domén analízise	97
3. 4. 3. A C-metilációs domén analízise	99
4. ÖSSZEFOGLALÁS	100
5. SUMMARY	105
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	110
IRODALMI HIVATKOZÁSOK	111

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACN	acetonitril
CFU	telepképző egység
DNS	dezoxiribonukleinsav
RNS	ribonukleinsav
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav dinátriumsója
ELISA	enzimhez kötött immunszorbens analízis
HACCP	veszélyelemzés a kritikus irányítási pontokon
HPLC	nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia
HP-TLC	nagy hatékonyságú vékonyréteg kromatográfia
IGS	Intergenic Spacer
ITS	Internal Transcribed Spacer
kbp	kilobázispár
MAE	mikrohullámú extrakció
MeOH	metil-alkohol
mtDNS	mitokondriális DNS
O α	ochratoxin α
OA	ochratoxin A
PCR	polimeráz láncreakció
PKS	poliketid-szintáz
RAPD	random amplifikált polimorfikus DNS technika
rDNS	riboszómális RNS-t kódoló DNS szakasz
RFLP	restrikciós fragment hossz polimorfizmus
rRNS	riboszómális ribonukleinsav
SDS	nátrium-dodecilszulfát
TEF	toluol-etil-acetát-hangyasav 5:4:1 arányú keveréke
TLC	vékonyréteg kromatográfia
Tris	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán
UV	ultraibolya sugárzás

GYŰJTEMÉNYES KÓDOK:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
CBM	Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Chiba, Japán
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Hollandia
FRR	CSIRO Food Research Culture Collection, North Ryde, New South Wales, Ausztrália
FGSC	Fungal Genetics Stock Center, Kansas, USA
HD	Institut Pasteur, Párizs, Franciaország
ICMP	International Collection of Microorganisms from Plants, Manaaki Whenua, Új-Zéland
IFO	Institute for Fermentation, Osaka, Japán
IMI	International Mycological Institute, Egham, Surrey, Egyesült Királyság
JCM	Japan Collection of Microorganisms, Riken, Saitama, Japán
JHC	J. H. Croft's Fungal Collection, University of Birmingham, Egyesült Királyság
NCAIM	National Collection of Applied and Industrial Microorganisms, Szent István Egyetem, Budapest, Magyarország
NHL	National Institute of Hygienic Sciences, Tokió, Japán
NRRL	Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, Illinois, USA
RMF	Rocky Mountain Herbarium, Fungi, University of Wyoming, Laramie, Wyoming, USA
SZMC	Szeged Microbiological Collection, Szeged, Magyarország

BEVEZETÉS

Az Európai Unióhoz való csatlakozás küszöbén állva hazánknak is meg kell felelnie az élelmiszerbiztonsági szempontból előírt követelményeknek. Az élelmiszerek a gyártási folyamat során kémiai, fizikai és mikrobiológiai ellenőrzéseken mennek keresztül annak érdekében, hogy a megfelelő minőségű termék kerüljön a piacra. Emiatt 2002. január 1-én hazánkban bevezetésre kerültek a HACCP (Hazard Analysis on Critical Control Points) rendszerek, melyek révén a minőség biztosítása mellett a veszélyelemzés is kötelezővé vált.

A közegészségügyi kockázat minimálisra csökkenthető, ha a termék mikrobiológiai és toxikológiai szempontból az előírt határértékeknek megfelel. Az ellenőrzések végrehajtásához olyan módszerekre van szükség, amelyek kis mintamennyiségből nagy biztonsággal szolgáltatják a szükséges információkat. A kémiai analitikai módszerek fejlődésével egyre kisebb mintamennyiségből végezhető nagy pontosságú mérés, a molekuláris genetikai módszerek pedig lehetőséget nyújtanak a toxintermelés genetikai hátterének megismeréséhez.

A gombák körében az emberre és állatokra mérgező anyagként ismert másodlagos anyagcseretermékeknek két csoportja van. Az egyik a magasabbrendű gombák által termelt gombamérgek, melyek toxikus hatásukat akkor fejtik ki, ha a gombatestet elfogyasztjuk és azok a bélrendszerből felszívódnak. Az ilyen típusú mérgező anyagok termelését bazídiumos és néhány aszkuszos gomba végzi. A másik csoportot a mikotoxinok alkotják, amelyek kifejezetten a fonalgombák másodlagos anyagcseretermékei és a magasabbrendű élőlényekben egészségkárosodásokat okoznak. A mikotoxinok által kiváltott emberi megbetegedések forrásai elsősorban a növényi eredetű élelmiszerek. A szennyezett takarmány elfogyasztásával azonban a toxinok az állati szervezetbe kerülve végül a tápláléklánc csúcsán, vagyis az emberben halmozódnak fel. A mikotoxinok hatásmódja rendkívül sokféle, csakúgy mint a szerkezetük és a származásuk. Direkt élettani hatásuk mellett (pl. hormonális zavarok előidézése) daganatkeltő hatásuk is ismert. Egyes típusaik a szervezetbe kerülve, a májban aktiválódva válnak igazán veszélyessé. Bizonyos mikotoxinok esetében lassú metabolizmussal kell számolni és egyéb környezeti ártalmak hatását is (pl. nehézfémek mérgező hatása) erősíthetik.

A mikotoxinok származásukat tekintve nagyon különbözőek. Fajazonos vagy rokon szervezetek termelhetnek teljesen eltérő toxinokat, de a rendszertanilag egymástól távol álló fajok is rendelkezhetnek ugyanazon toxin termelésének képességével. A mikotoxinok

kémiai összetétele nagyon változatos. A mikotoxinok és a termelő szervezetek sokfélesége miatt nehéz egyszerre több mikotoxin részletes tanulmányozásával foglalkozni. Laboratóriumunkban az ochratoxinok előfordulásának, a termelő szervezetek típusainak, a termelés genetikai és biokémiai hátterének, valamint az ochratoxinbontó képesség előfordulásának vizsgálata történt. Az ochratoxinok jelenlétét kimutatták kávéban, kakaóban, raktározott szemesterményekben, lisztben, olajos magvakban, zöldség- és gyümölcsfélékben, fűszerfélékben, sörben, borban, anyatejben és emberi vérben. Az ochratoxinok csoportján belül akut toxicitással az ochratoxin A (OA) rendelkezik, a többi vegyület sokkal kisebb mértékben (ochratoxin C), illetve egyáltalán nem (ochratoxin B) fejt ki mérgező hatást. Az OA vesekárosító (nefrotoxikus) és májkárosító (hepatotoxikus) vegyület, ezenkívül kimutatták immunszuppresszív, daganatkeltő (karcinogén) és magzatkárosító (teratogén) hatását. Az OA a feltételezett okozója a balkáni endémikus nefropátiának, a sertések vesebetegségének (Danish porcine nephropathy), uroteliális tumoroknak és a hereráknak.

Ochratoxintermelő fajok legtöbbje az *Aspergillus* nemzetség *Aspergillus*, *Circumdati*, *Nigri*, *Fumigati*, *Cremeri*, *Terrei*, *Usti*, *Versicolores*, valamint a *Penicillium* nemzetség *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Eladia*, *Penicillium* szekcióiban fordulnak elő. A szekciók tagjai olyan penészgombák, amelyek élelmiszereken és takarmányokon nagy gyakorisággal fordulnak elő, azokat a betakarítás előtt vagy a tárolás, raktározás során fertőzik meg.

Az OA hőkezelés hatására kis mértékben bomlik, mérgező hatása akkor szűnik meg, ha a benne található peptidkötés felbomlik, fenil-alanin és ochratoxin α keletkezik. Az OA molekula lebontására alkalmasak fizikai módszerek (γ -sugárzás, ózonkezelés) és vegyi anyagok (hipoklorit, ammónia, H_2O_2), azonban egyik módszer sem tesz eleget az élelmiszeripar követelményeinek. Az OA szennyeződés mikrobiológiai úton történő megszüntetésére is van lehetőség, hiszen ismertek OA bontó baktériumok (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Phenilobacterium immobile*) és penészgombák (*Aspergillus niger*, *A. fumigatus*).

Az OA a pentaketid típusú vegyületek csoportjába tartozik, bioszintéziséért a poliketid-szintáz (PKS) felelős. A PKS vesz részt a baktériumok által termelt pl. eritrimicin és rapamicin bioszintézisében, valamint a penészgombák pl. aflatoxin és fumonizin termelésében. A fonalas gombák PKS-ének több doménjéhez primer párokat fejlesztettek ki, amelyekkel sikeresen amplifikálták a ketoszintáz, ketoreduktáz és a szén-metilációs

doméneket polimeráz láncreakcióval. A PKS szintáz doménjeinek bázissorrendjének ismerete lehetővé teszi génpróbák kifejlesztését, amelyekkel az OA termelésért felelős gének egyértelműen kimutathatók és a toxikológiai kockázat minimálisra csökkenthető.

CÉLKITŰZÉSEINK AZ ALÁBBIK VOLTAK:

- Munkánk során az elsődleges cél az volt, hogy az élelmiszerek és gabonafélék OA szennyezettségét gyors és pontos módszerrel meghatározzuk, erre kromatográfiás méréseket és az ELISA módszert alkalmaztuk.
- A vizsgált élelmiszerekből és gabonafélékből kis mennyiségű mintát táptalajra helyezve és az egyéb mikroorganizmusokat kizárva izoláltuk az OA szennyeződésért felelős *Aspergillus* fajokat. Az izolátumok és számos gyűjteményes törzs OA termelő képességét vizsgáltuk kromatográfiás és ELISA módszerrel.
- Az OA termelő törzsek közül kiválasztottunk néhányat, amelyek toxintermelésének kinetikáját vizsgáltuk több héten keresztül. Az izolátumok közül az OA-t legnagyobb mennyiségben termelő törzsszel (*A. albertensis* ATCC 58745) a toxintermelés hőmérsékleti optimumának meghatározását végeztük el. Mikrohullámú energiaközléssel feltártuk a micélium ergoszterintartalmát, valamint az OA termelés és a micélium ergoszterintartalma közötti összefüggést vizsgáltuk.
- Az élelmiszerekben már meglévő OA szennyeződés megszüntetése érdekében nagy számú izolátum toxinbontó képességét vizsgáltuk, hiszen a jelenleg kidolgozott fizikai és kémiai módszerek általában nem alkalmazhatók az élelmiszeriparban. Az OA bontó izolátumok között megtaláltuk az élelmiszeriparban is alkalmazható *A. niger* CBS 120.49 törzset.
- Az OA termelő fajok elsősorban a *Circumdati*, *Flavi* és a *Fumigati* szekciók tagjai, amelyeken belül a rokonsági kapcsolatok megállapítását az ITS szekvenciák, a 26 rDNS, a poliketid-szintáz gén ketoszintáz és C-metilációs domén szekvenciáinak analízisével, és morfológiai tulajdonságaik összehasonlításával végeztük.
- Az *A. albertensis* OA nem-termelő izolátumát γ -besugárzással hoztuk létre annak érdekében, hogy a vad típust és a nem-termelő mutáns izolátum genetikai anyagát összehasonlítsuk. RAPD analízissel olyan fragment jelenlétét kívántuk feltárni, ami az OA termelőképeség egyértelmű bizonyítékául szolgálna.

- Az *A. viridinutans* intraspecifikus variabilitását a morfológiai tulajdonságok, szénforrás hasznosítási tesztek, mitokondriális DNS és magi DNS RFLP analízis, valamint a β -tubulin génszekvenciák analízise alapján vizsgáltuk.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. 1. AZ OCHRATOXINOK JELLEMZÉSE

1. 1. 1. A mikotoxinok kutatásának kezdete

A mikotoxinok a hatvanas évek elején kerültek a tudományos érdeklődés középpontjába, amikor Nagy-Britanniában egy rejtélyes betegség több százezer pulyka elhullását eredményezte. A mikrobiológiai vizsgálatok nem vezettek eredményre, vírust vagy baktériumot nem tudtak kimutatni. A "post mortem" vizsgálatok minden esetben nekrotikus májkárosodásra utaltak, a májhomogenizátumból pedig egy UV fényben fluoreszkáló anyagot mutattak ki. Mindezzel párhuzamosan az állatokkal etetett takarmány, a Brazíliából származó földimogyoró dara vizsgálatát is elvégezték. A földimogyoró daráról *Aspergillus flavus*t izoláltak, ezért a mérgező anyag az aflatoxin nevet kapta. Az aflatoxinok felfedezésétől kezdve a mikotoxinokkal foglalkozó tudomány, a mikotoxikológia az egész világon hirtelen fejlődésnek indult.

Az azóta eltelt években rendszeres ellenőrzés folyt az élelmiszerek és a takarmányok fertőzésében szerepet játszó fonalas gombák és az általuk termelt mikotoxinok felderítésére. A kutatások során sikerült tisztázni pl. az aflatoxinok és más mikotoxinok hatásmódját. Nagy érzékenységgű immunkémiai és kromatográfiás módszereket dolgoztak ki a toxinok kimutatására és meghatározására. Több mikotoxin esetében folyamatban van a termelés genetikai hátterének vizsgálata, illetve a mezőgazdasági termékek mikotoxin szintjének csökkentése, valamint a mikotoxinok káros hatásainak kiküszöbölése is.

1. 1. 2. A mikotoxinok csoportosítása

A mikotoxinok penészgombák által a sejten kívüli térbe kiválasztott másodlagos anyagcseretermékek, amelyek erős fiziológiás és patológiás hatásúak, emberben és állatban kóros elváltozásokat okoznak. Ez a magasabbrendű eukariótákhoz kötődő meghatározás azonban nem zárja ki az alacsonyabbrendű élőlényekre, algákra, protozoonokra, gombákra, illetve prokariótákra gyakorolt hatásukat. A mikotoxinoknak ezt a tulajdonságát a toxin kimutatási módszerek esetében a gyakorlatban alkalmazzák.

A növények számos esetben szubsztrátjai különböző mikotoxinogén gombáknak, illetve mikotoxinok termelésének, azonban a csak fitopatogén hatású gombatoxinokat nem sorolják a mikotoxinok közé.

A mikotoxinok rendszerezése nagy számukból, változatos szerkezetükből, eredetükből és hatásmechanizmusukból adódóan összetett feladat. A mikotoxinok csoportosítása az alábbi szempontok szerint végezhető el.

1./ A legelfogadottabb a bioszintézis prekursorai alapján történő csoportosítás (1. ábra) (Turner, 1971, Smith és Moss, 1985), amely nem teljeskörű, hiszen számos mikotoxin bioszintézisének útja ma még nem ismert. A poliketidek és a rubratoxinok az acetyl-KoA és malonil-KoA kondenzációjából vezethetők le ("A" anyagcsereút). A mevalonát rendszerből származó szeszkviterpén típusú mikotoxinok kémiaiilag jól körülhatárolható egységet képeznek ("B" anyagcsereút). Az aminosavakból származtatható toxinok csoportja heterogén, mivel N-heterociklikus vegyületeket és ciklikus polipeptideket is tartalmaz ("C" anyagcsereút).

"A" ANYAGCSEREÚT:

- Zsírsavakból származtatható másodlagos metabolitok (pl. jázminsav, rubratoxinok);
- Poliketidek;
 - Tetraketidek (pl. patulin, penicillinsav)
 - Pentaketidek (pl. citrinin, ochratoxinok)
 - Hexaketidek (pl. maltorizin, monaszkin)
 - Heptaketidek (pl. viomellein, alternariol)
 - Oktaketidek (pl. rugulozin, luteoszkirin)
 - Nonaketidek (pl. citreoviridin, zearalenon)
 - Dekaketidek (pl. aflatoxinok, sterigmatocisztin);
- A Szentgyörgyi-Krebs ciklus intermediereiből származtatható másodlagos metabolitok (pl. tenuazonsav);

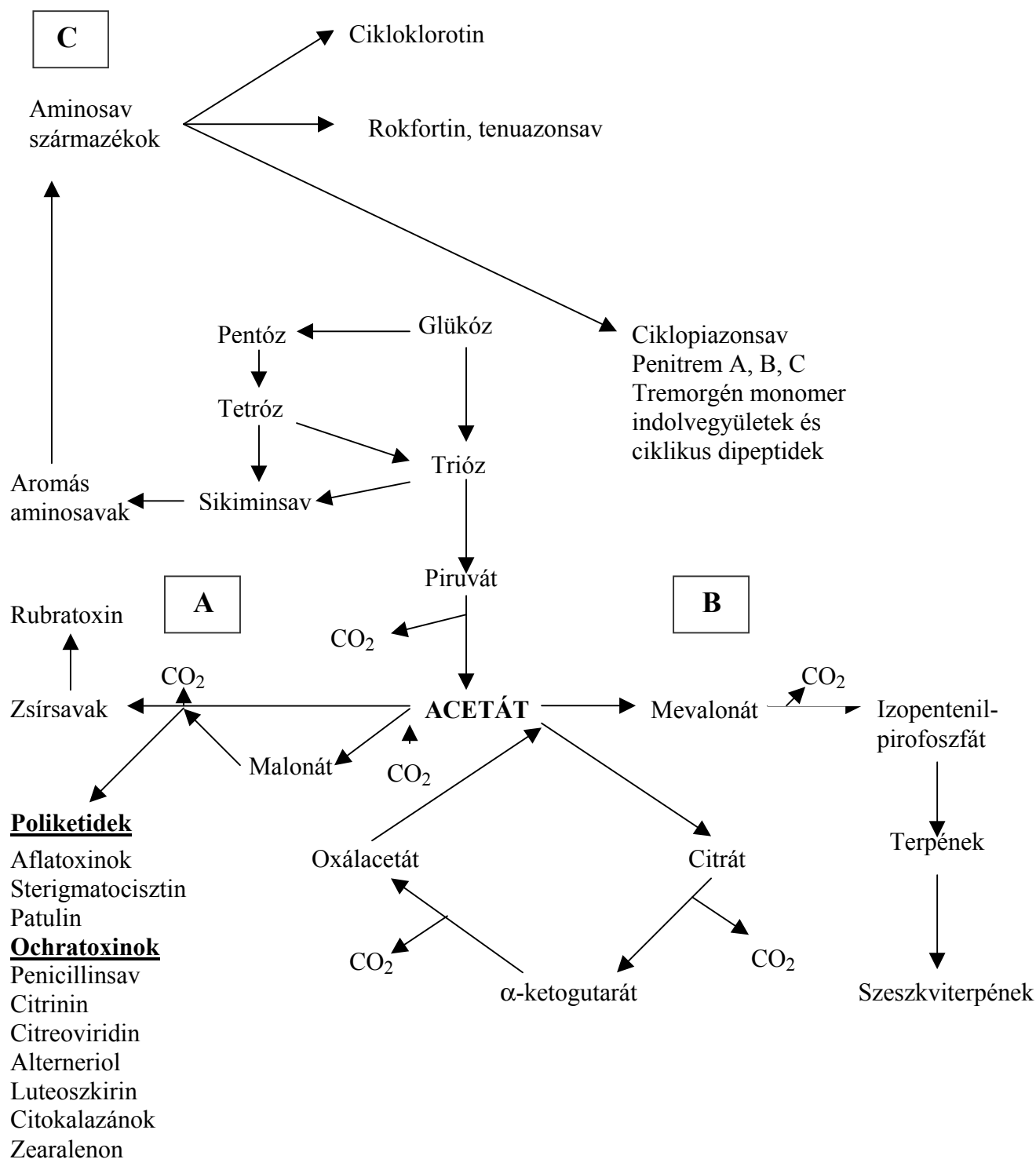
"B" ANYAGCSEREÚT:

- Terpének és szteroidok (pl. fumagillin, trichotecének, helvolsav);

"C" ANYAGCSEREÚT:

- Aminosavakból származtatható másodlagos anyagcseretermékek (pl. ergot alkaloidok, ciklopiazonsav, sporodezminek, gliotoxin);

- Protein toxinok (pl. restriktocin, fumigatoxin);
- Egyéb be nem sorolt másodlagos metabolitok (pl. citokalazinok, verzikolin);
- Nem acetátból származtatható másodlagos metabolitok (pl. kojisav, pirogallol, számos zuzmómetabolit).



1. ábra. A mikotoxinok bioszintézise

2./ A magasabbrendű élőlényekben kialakuló farmakológiai hatás alapján is lehet csoportosítani a mikotoxinokat, rangsorolva élettani veszélyességüket. A mikotoxinok hatását az emberi és állati szervezetre az 1. és 2. táblázat mutatja be. Néhány mikotoxin szerkezete az 2. és a 3. ábrán látható.

1. táblázat. Mikotoxinok hatása az emberi és állati szervezetre

Hatás	Fontosabb mikotoxinok
hepatotoxikus, hepatokarcinogén	aflatoxinok, sterigmatocisztin
teratogén	aflatoxinok, ochratoxinok, rubratoxin B
neurotoxikus	citreoviridin, patulin, ciklopiazonsav, rokfortin
nefrotoxikus	ochratoxinok, citrinin, viomellein, xantomegnin
immunszuppresszív	aflatoxinok, ochratoxinok, trichotecének
dermatotoxikus	trichotecének
emetikus	vomitoxin (dezoxinivalenol)
ösztrogén hatású	zearalenon
tremorgén	penitrem A, fumitremorgének
fotoszenzibilizáló	sporidezminek, viomellein, xanthomegnin, cerkosporin
hallucinogén	ergotoxinok

2. táblázat. A mikotoxinok által kiváltott humán és állati megbetegedések

Szindróma	Mikotoxin	Termelő faj
Alimentáris toxikus aleukia	trichotecének	<i>Fusarium</i> sp.
Balkáni endémikus nefropátia	ochratoxinok	<i>Aspergillus</i> sp.
Ergotizmus ("Szent Antal tüze")	ergotamin, ergometrin	<i>Claviceps</i> sp.
Balkáni endémikus nefropátia	glükoproteinek	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> sp.
"Sárga rizs betegség"	citrinin, citreoviridin	<i>Penicillium</i> sp.
Kardiális beri-beri	citreoviridin	<i>Penicillium</i> sp.
Májrák	aflatoxinok	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
"Onyalai" szindróma	tenuazonsav	<i>Phoma sorghina</i>
"Részeg kenyér"(Taumelbrot)	trichotecének	<i>Fusarium</i> sp.
Kaschin-Beck szindróma	trichotecének	<i>Fusarium</i> sp.
Dániai sertésnefropátia	ochratoxinok	<i>Aspergillus</i> sp.
Reye szindróma	aflatoxinok	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Nyelőcsőrák	fumonizinek	<i>Fusarium</i> sp.
Korai telarche	zearalenon	<i>Fusarium</i> sp.

1. 1. 3. A *Penicillium* és *Aspergillus* fajok mikotoxinjai által okozott humán és állati mikotoxikózisok és egészségkárosodások

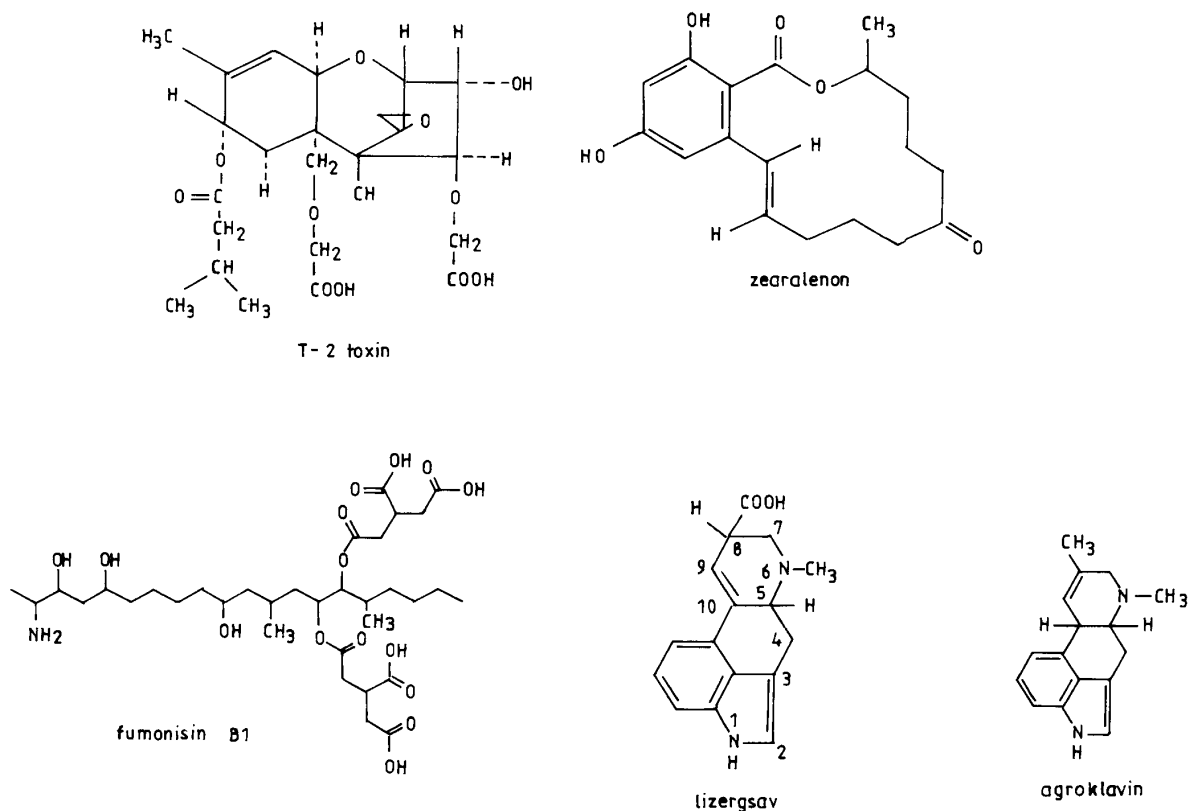
Régóta ismert a Távol-Keleten a "sárga rizs" (yellow rice) nevű betegség, amely idegzavarokkal, máj- és vesebántalmakkal jár. A kórokozó utáni kutatások során a fertőzött rizsről több gombafajt izoláltak és azonosítottak, köztük a *P. citrinum*-ot. A fajról az 1930-as években derítették ki, hogy citrinint termel, amely nem rákkeltő vegyület, azonban jelentős vesekárosító hatással rendelkezik. Állatkísérletekben nitrózaminok és más mikotoxinok, pl. ochratoxin és penicillinsav növelik a citrinin vesekárosító hatását. Az 1940-es évek elején azonosították a *P. citreoviride* fajt és toxinját, a citreoviridint (3. ábra), amely a légzőszervrendszert bénítja meg, szív és érrendszeri károsodásokat okoz. Az 1950-es években lezajlott megbetegedések kapcsán a sárgarizsról további kórokozó után kutattak, mert a fertőzött rizs cirrózist és hepatómát is okozott, így izolálták a *P. islandicum*-ot. A tápoldat szűrletéből izolált izlanditoxin állatkísérletekben májkárosító hatásának bizonyult. Ugyanennek a gombának a micéliumából luteoszkirint izoláltak, mely az állatkísérletekben májdaganatot okozott. Az antibiotikumok utáni kutatás során az 1940-es években vált ismertté a patulin, a *P. expansum*, *P. urticae* mérgező terméke. Állatkísérletek során görcsöket, cianózist, ödémákat, bevérzéseket, szövetelhalásokat tapasztaltak a tüdőben. Több kísérletsorozatban sem tudták azonban igazolni rákkeltő hatását. Hazánkban egy esetben humán megbetegedést hoztak kapcsolatba patulinnal szennyezett alma fogyasztásával (Téren és mtsai, 1990).

Több *Penicillium* faj mérgező anyagcsereterméke a penicillinsav, melyet már a század elején penészes kukoricából izoláltak, az embereknel előforduló pellagra okainak keresése során. Mutagenitása nem minden esetben volt bizonyítható. Helyi szarkómák kifejlődését észlelték szubkután adagolása során. Szintén *Penicillium*ok terméke a mikofenolsav, amely eleinte antibiotikumként, majd rákellenes vegyületként vált ismertté. Állatkísérletekben pete-implantáció gátlást és anémiát okozott, valamint mutagén hatásának bizonyult. Az 1950-es évek elején sertéseknél és borjaknál észlelt megbetegedések okait kutatva a *P. rubrum*-ra terelődött a figyelem. Káros anyagcsereterméke a rubratoxin B májkárosító, mutagén, magzatkárosító hatásának bizonyult. Rákkeltő hatását ezidáig nem írták le.

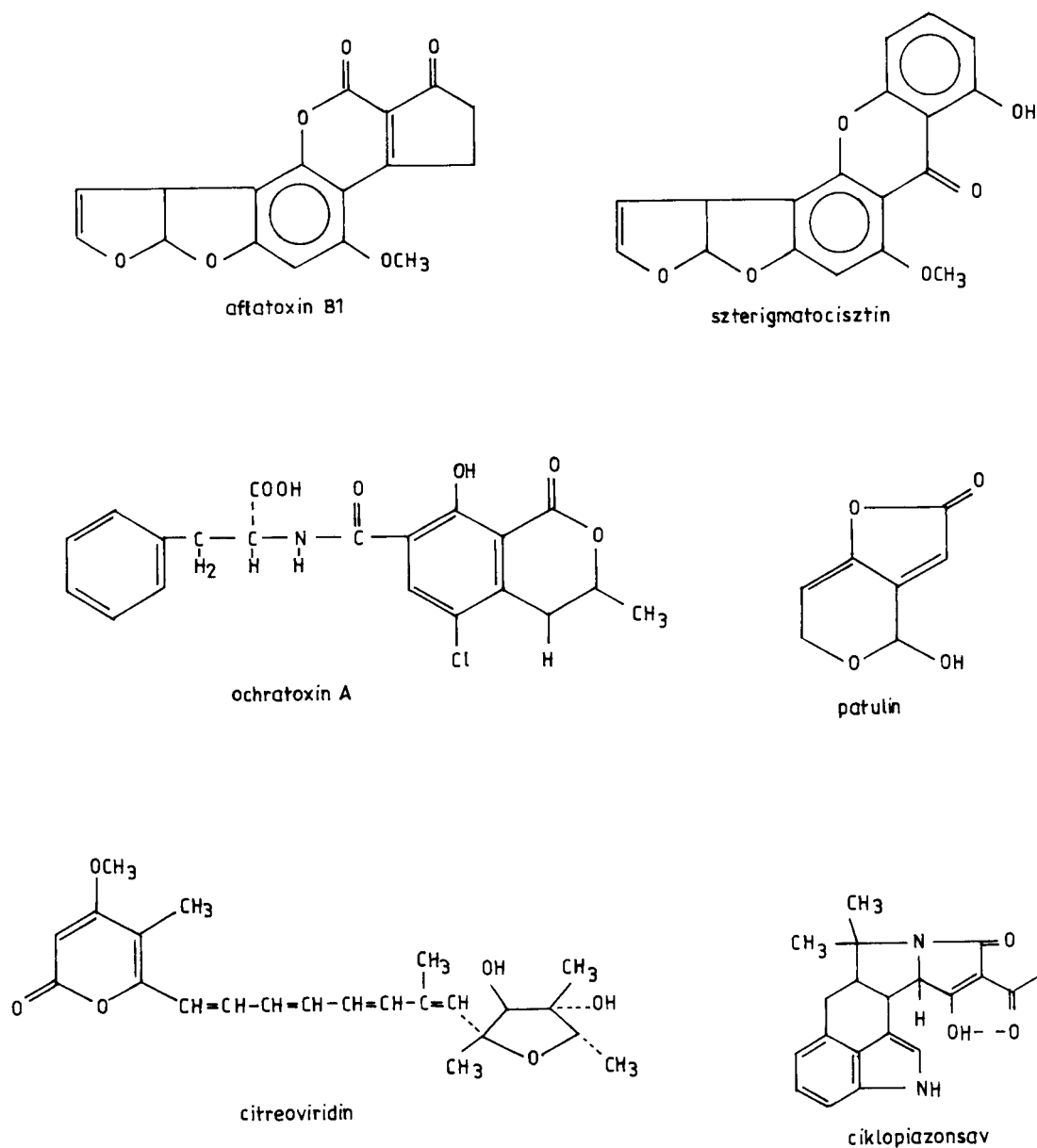
A rendkívül mérgező hatású és rákkeltő aflatoxinok kilétére az angliai pulykaelhullás kapcsán derült fény. Az aflatoxinok az *A. flavus* és *A. parasiticus* által termelt anyagok, amelyek szinte minden állatfaj esetében rákkeltőnek bizonyultak. Hatásuk állatfajonként különböző. A kísérleti adatok emberre történő vonatkoztatása sem egyértelmű, mert a

világrészek lakosságának érzékenysége nagy eltéréseket mutat. A táplálékösszetevőknek az aflatoxin toxicitására gyakorolt hatásának tanulmányozásakor kiderült, hogy a fehérjehiányos táplálkozás súlyosbítja a hatást, ami a fejlődő országok éhező lakosságára számára jelent veszélyt. Az A vitamin hiánya növelte a mortalitást hím patkányoknál, a C-vitamin adagolása nem gátolta a rákkeltő hatást. Több vegyület és elem közül a szelén esetében védő hatást észleltek, viszont a gyógyításhoz szükséges adagok már a vesét károsítják.

A sterigmatocisztint, amely májkárosító, mutagén és rákkeltő hatású vegyület, az 1950-es évek elején *A. versicolor* szűrletéből izolálták japán kutatók. Karcinogén hatását minden alkalmazási helyen kifejti. Az aflatoxin bioszintetikus prekursora. A matorizint a fertőzött maláta takarmányozásából származó állati megbetegedések okait kutatva azonosították a 1960-as évek elején. Az *A. oryzae*vel fertőzött malátát fogyasztó szarvasmarhák májában és veséjében zsíros elváltozást, gócos szövetelhalást, továbbá sejtburjánzást, lépzsugorodást és mellékvese károsodást észleltek.



2. ábra. *Fusarium* és *Claviceps* fajok néhány mikotoxinja



3. ábra. *Aspergillus* és *Penicillium* fajok néhány mikotoxinja

1. 1. 4. Az ochratoxinok felfedezése

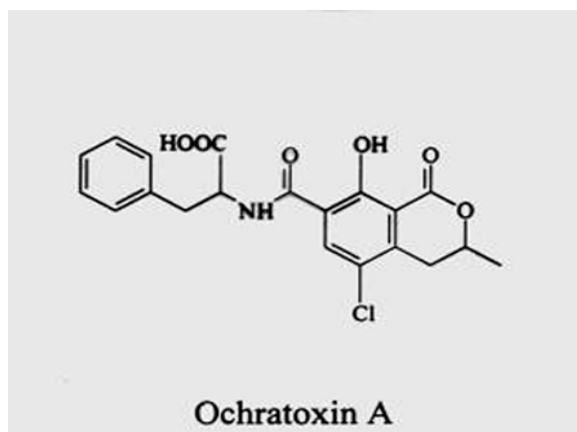
Nagyszámú penészgomba vizsgálatának eredményeként van der Merwe és mtsai (1965) izolálták az ochratoxin A-t (OA) (4. ábra) egy *Aspergillus ochraceus* törzs szűrletéből. Ezután Steyn és Holzapfel (1967) megtalálta az OA nem toxikus klór-mentes származékát, az ochratoxin B-t, valamint etil-és metil származékait.

Az ochratoxinokban a dihidroizokumarin váz hetedik C-atomjához L-β-fenilalanin kapcsolódik peptidkötéssel. Az OA-ban klóratom kapcsolódik a kumarinvázhoz. A

kumarinváz acetil-koA és malonil-koA egységekből épül fel, a karboxil csoport a C₁ poolból származik (Turner és Aldridge, 1983).

Az OA mérgező hatását először Purchase és Theron (1968) vizsgálta, ennek során kiderült, hogy vese és májkárosító hatással rendelkezik. Az *A. ochraceus* mellett az *Aspergillus* és a *Penicillium* nemzetség számos tagja rendelkezik az OA termelésének képességével.

Az ochratoxinhoz hasonló szerkezetű vegyületet először *Penicillium citrinum* tenyészetéből izolálták 1931-ben és a citromsárga telepeket képező termelő szervezet után citrininnek nevezték el. A dihidroizokumarin-vázzal rendelkező mellein (3-metil-8-hidroxi-3,4-dihidroizokumarin) és a 4-hidroximellein szintén az *A. ochraceus* által termelt metabolitok, és valószínűleg az OA prekursorai.



4. ábra Az ochratoxin A szerkezeti képlete

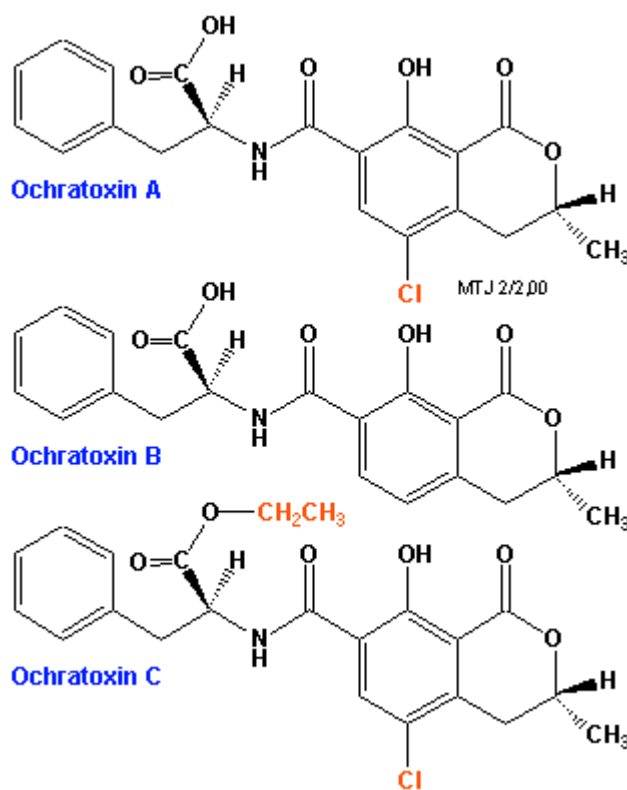
1. 1. 5. Az ochratoxin A, B, C kémiai és fizikai jellemzői

Az ochratoxin A (C₂₀H₁₈ClNO₆) színtelen kristályos vegyület. Szerkezetét, fizikai és kémiai tulajdonságait infravörös (IR), ultraviola (UV), mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópiai módszerekkel tárták fel. Benzolból kristályosítva az olvadáspontja (melting point, mp.): 90°. Az IR spektrumon karboxil-, szekunder amid-, és lakton csoport jelenléte látható. $[\alpha]_D = -118^\circ$ (c 1.1 kloroform), $\lambda_{\max} = 213$ nm és 332 nm.

Az ochratoxin B (5. ábra) (C₂₀H₁₉NO₆) az OA klórmentes származéka, színtelen, kristályos vegyület. Savanyított metanolból kristályosítható, mp: 221°, $[\alpha]_D = -35^\circ$ (c. 0.15), $\lambda_{\max} = 218$ nm és 318 nm.

Az ochratoxin C ($C_{22}H_{22}ClNO_6$) az OA etil-észtere. $[\alpha]_D = -100^\circ$ (c.1.2), $\lambda_{\max} = 213$ nm, 331 nm és 378 nm.

További ochratoxin származékokat izoláltak *A. ochraceus* törzsek szűrletéből. Az OA metil-észtere, az OB etil-észtere valamint az OB metil-észtere mellett számos bróm-származékot és aminosav analógot sikerült azonosítani.



5. ábra Ochratoxin A, B, C

1. 1. 6. Az ochratoxin előfordulása. Ochratoxintermelő fajok.

Az ochratoxinokat termelő *Aspergillus* és *Penicillium* fajok nagyon széles körben elterjedtek. Az OA-t kimutatták már talajból, zöldség és gyümölcsfélékből, gabonafélékből, kávé és kakaóbabból (Téren és mtsai, 1997), olajos magvakból, sörből, fűszerfélékből, chiliből, fűszepaprikából, szójababról, földimogyoróról, rizsről, kukoricáról, vérből és anyatejből (Moss, 1996). Szárított-sózott halban Távol-Keleten és hüvelyesek magvaiban Dél-Afrikában, szójababban az USA-ban szintén előfordult (Kozakiewicz, 1989). A különböző országokból származó kávéminták vizsgálata során kiderült, hogy a

közép-és kelet európai lakosság által fogyasztott kávé sokkal szennyezettebb OA-val, mint Nyugat-Európában, vagy az USA-ban piacra kerülő kávéfajták (Pittet és mtsai, 1996).

Az OA termelő képességgel rendelkező fajok többsége az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* szekciójának tagja, de a nemzetség más szekciójába tartozó fajok között is számos OA termelő fordul elő (3. táblázat). Az elsőként felfedezett *A. ochraceus* is a *Circumdati* szekció tagja, amely elsősorban a trópusi éghajlaton fordul elő, de mérsékelt éghajlaton előforduló növényekről, így cirokról, komlóról, borsóról is izolálták már. Az *A. auricomus* és *A. albertensis* OA termelő képességének leírása laboratóriumunkban történt meg (Varga és mtsai, 1996). A *Fumigati* szekciót alkotó fajok közül a tüdőaszpergillózis okozója, *A. fumigatus* rendelkezik OA termelő képességgel (Abarca és mtsai, 1998).

A *Penicillium* fajok között is számos OA termelő faj fordul elő (4. táblázat). Az elsőként leírt OA termelő *P. viridicatumot* és *P. cyclopiumot* eredetileg a *P. verrucosum* fajba sorolták (Pitt, 1987), mivel azt gondolták, hogy ez a faj az egyetlen OA termelő a *Penicillium* nemzetségen belül. Rövid időn belül számos fajról kiderült, hogy rendelkezik az OA termelő képességgel (Bridge és mtsai, 1989, Ueno és mtsai, 1991, El-Banna és mtsai, 1987) (4. táblázat). OA termelő *Penicillium* fajok elsősorban a mérsékelt éghajlati öv hőmérsékletén, 4 és 30°C közötti hőmérsékleten fordulnak elő.

Az ochratoxin termelő penészgombák lehetnek "post-harvest" szervezetek, vagyis a gabonaféléket a betakarítás után, a raktározás idején fertőzik meg. Ezzel szemben például a kávé esetében sokkal inkább valószínűsíthető a betakarítás előtti, "pre-harvest" fertőzés (Bucheli és mtsai, 1998). Mantle (2000) vizsgálta a kávénövények OA felvételét és azt tapasztalta, hogy annak legnagyobb része a talajból származik.

3. táblázat. Ismert ochratoxin termelő *Aspergillus* fajok

Faj	Szekció	Hivatkozások
<i>A. glaucus</i>	<i>Aspergillus</i>	Chelkowski és mtsai, 1987
<i>A. sydowii</i>	<i>Aspergillus</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>A. repens</i>	<i>Aspergillus</i>	El-Kady és mtsai, 1994
<i>A. alliaceus</i>	<i>Circumdati</i>	Ciegler, 1972a
<i>A. albertensis</i>	<i>Circumdati</i>	Varga és mtsai, 1996
<i>A. auricomus</i>	<i>Circumdati</i>	Varga és mtsai, 1996
<i>A. elegans</i>	<i>Circumdati</i>	Batista és mtsai, 2003
<i>A. insulicola</i>	<i>Circumdati</i>	Batista és mtsai, 2003
<i>A. melleus</i>	<i>Circumdati</i>	Ciegler, 1972a
<i>A. muricatus</i>	<i>Circumdati</i>	Frisvad és Samson, 2000
<i>A. ochraceus</i>	<i>Circumdati</i>	van der Merwe és mtsai, 1965
<i>A. ostianus</i>	<i>Circumdati</i>	Ciegler, 1972a
<i>A. petrakii</i>	<i>Circumdati</i>	Ciegler, 1972a
<i>A. sclerotiorum</i>	<i>Circumdati</i>	Ciegler, 1972a
<i>A. sulphureus</i>	<i>Circumdati</i>	Ciegler, 1972a
<i>A. wentii</i>	<i>Cremeri</i>	Varga és mtsai, 1996
<i>A. fumigatus</i>	<i>Fumigati</i>	Abarca és mtsai, 1998
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Fumigati</i>	Varga és mtsai, 2000
<i>A. awamori</i>	<i>Nigri</i>	Ono és mtsai, 1995; Téren és mtsai, 1996
<i>A. carbonarius</i>	<i>Nigri</i>	Horie, 1995; Wicklow és mtsai, 1996
<i>A. foetidus</i>	<i>Nigri</i>	Ueno és mtsai, 1991; Téren és mtsai, 1996
<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>	Abarca és mtsai, 1994; Téren és mtsai, 1996
<i>A. usami</i>	<i>Nigri</i>	Ono és mtsai, 1995
<i>A. terreus</i>	<i>Terrei</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>A. ustus</i>	<i>Usti</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>A. versicolor</i>	<i>Versicolores</i>	Abarca és mtsai, 1998

4. táblázat. Ismert ochratoxin termelő *Penicillium* fajok

Faj	Szekció	Hivatkozások
<i>P. spinulosum</i> (<i>P. purpurescens</i>)	<i>Aspergilloides</i>	El-Banna és mtsai, 1987 Ciegler és mtsai, 1972b
<i>P. cyaneum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. sclerotiorum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. implicatum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. montanense</i>	<i>Aspergilloides</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. variable</i>	<i>Biverticillium</i>	Ciegler és mtsai, 1972b
<i>P. purpurogenum</i>	<i>Biverticillium</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. verruculosum</i>	<i>Biverticillium</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. janczewskii</i>	<i>Eladia</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. melinii</i>	<i>Eladia</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. raistrickii</i>	<i>Eladia</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. miczynskii</i>	<i>Eladia</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. corylophilum</i>	<i>Eladia</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. corylophilum</i>	<i>Eladia</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. fuscum</i>	<i>Eladia</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. simplicissimum</i>	<i>Eladia</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. canescens</i>	<i>Eladia</i>	Ueno és mtsai, 1991
<i>P. verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	Pitt, 1987
<i>P. expansum</i>	<i>Penicillium</i>	Bridge és mtsai, 1989
<i>P. aurantiogriseum</i> (<i>P. solitum</i>)	<i>Penicillium</i>	Bridge és mtsai, 1989
<i>P. atramentosum</i>	<i>Penicillium</i>	Bridge és mtsai, 1989
<i>P. commune</i>	<i>Penicillium</i>	Ciegler és mtsai, 1972b

1. 1. 7. Az ochratoxinok metabolizmusa és hatásmódja

Az emberi és állati szervezetekben az OA a gyomorból felszívódva a vér plazma proteinjeihez, elsősorban a szérum-albuminhoz kötődik és a vesébe kerülve aktiválódik (Marquardt és Frohlich, 1992). A veséből az OA nagy része a vizeletbe választódik ki, a széklettel jóval kisebb mértékben ürül. Az emlősökben az OA elsősorban a vesét támadja

meg. A proximális tubulusokon megkötődik és fenntart a vesében egy állandóan magas OA szintet (Tsuda és mtsi, 1999), ami nefropátia kialakulásához vezethet.

Az emlősök OA érzékenysége eltérő, az LD₅₀ értékek még egy faj különböző nemű egyedeinél is eltérhetnek (pl. hím patkány: 28 µg/g, nőstény patkány: 20 µg/g, hím tengerimalac: 9.1 µg/g, nőstény tengerimalac: 8.1 µg/g) (Ueno, 1987).

1. 1. 8. Az ochratoxinok biológiai hatása

Az ochratoxinok közül elsősorban a klórszármazékok toxicitása nagy, amelyek hatása elsősorban a vese károsításban, a vese tubulusok nekrozisában nyilvánul meg (Smith és Moss, 1985). Számos stabil metabolitjukat (4-hidroxi származékok) azonosították kísérleti állatok májában és veséjében, ezért feltételezik, hogy az ochratoxinok toxicitásának kialakulásában szerepe van metabolikus aktivációnak.

Az ochratoxinok a Phe-tRNS létrehozásáért felelős enzimet, a Phe-tRNS-szintáz gátolják, ezen keresztül akadályozzák a fehérjeszintézist (McMasters és Vedani, 1999). Szabadgyökképzést, lipid peroxidációt képesek indukálni, így hatással vannak a biológiai membránokra, valamint gátolják a mitokondriális légzést (Wei és mtsai, 1985). Az említett hatásokon túl az OA zavarja az intercelluláris kalcium homeosztázist, ami a sejt pusztulását okozza. A fenil- alanin bioszintézisének gátlása előidéz a foszfoenol-piruvat-karboxikináz szint és a glukoneogenezis csökkenését, amely szintén sejtek pusztulásához vezet (Riley és Norred, 1996).

Az OA a magzat központi idegrendszerére hat, ezáltal fejlődési rendellenességet okozhat, valamint az immunrendszer kialakulását is gátolja (Stormer és Lea, 1995). Az OA mutagén hatását közvetetten fejt ki, mivel a máj citokróm P-450 enzimrendszere az OA-ból mutagén metabolitok, 4-hidroxi-ochratoxin és egyéb OA származékok keletkezését idézi elő (Obrecht-Pflumio és mtsai, 1999, Stormer és mtsai, 1980, Castegnaro és mtsai, 1998). A keletkező vegyületek a nukleinsavsintézis guanin tartalékait peroxidációval alkalmatlanná teszik az örökítőanyagba történő beépülésre (Pfohl-Leszkowicz és mtsai, 1993).

Az OA indukálja az apoptózist sejtkultúrákban (Seegers és mtsai, 1994), elősegíti a szabadgyök képződést (Hochler és mtsai, 1997). Csirkékben a karotinoidok metabolizmusában okoz változást (Schaffer és mtsai, 1987), sertésekben és pulykáknak takarmány visszautasítást idéz elő (Burditt és mtsai, 1984), csökkenti a glikogén mobilizálhatóságát sejtkultúrákban és broiler csirkékben (Huff és mtsai, 1979). Az OA

haematológiai rendellenességek (Gupta és mtsai, 1979), valamint a bélhurut kialakulásában is szerepet játszik (Kanisawa és mtsai, 1990). Az OA és OB prokarióták szaporodását gátolja, különösen a *Bacillus cereus* var. *mycoides* érzékeny (Harwig, 1974).

Az OA egyben rovarellenes hatású metabolit is, jelenlétével indokolják, hogy az *Aspergillus carbonarius* NRRL 369 szkleróciumaiból nyert metanolos extraktumok hatására a *Carpophilus hemipterus* lárváinak növekedési rátája 75%-al csökken. Hasonló eredményt kaptak a *Helicoverpa zea* kukoricakalász féregnél is, ahol 50%-os mortalitást tapasztaltak, ami a túlélő lárvák 99%-os súlycsökkenésével járt együtt (Wicklow és mtsai., 1996).

1. 1. 9. Ochratoxikózisok

A korábban leírt mikotoxikózisok pontos eredete később nem mindig vált ismertté a korabeli leírások eltérő nyelvezete miatt. A felderítések nehézségeinek másik oka, hogy az állatkísérletekben leggyakrabban tiszta toxinokat alkalmaznak, míg a gyakorlatban vegyes mikrobióta fordul elő, ami változó összetételű toxinelegyet termel. Az ochratoxinok által okozott megbetegedéseket nevezzük ochratoxikózisoknak.

Ochratoxinok által okozott sertés nefropátiát először Dániában és Svédországban írtak le (Buchmann és mtsai, 1985), de az elmúlt 5-10 évben több európai országban, pl. Bulgáriában is előfordult (Stoev és mtsai, 1998). Ochratoxinok hatására az állatok veséje megnagyobbodott és világos színűvé vált ("pale kidneys"), több esetben a vesében gócos elváltozásokat tapasztaltak, amelyeket borsónyi méretű, sárgásfehér színű, szabálytalan alakú, elmosódott határú szigetekként észleltek. A szövettani elváltozás alapja a nefrózis volt, amelynek súlyosabb eseteiben a parenchima sorvadása is bekövetkezett. Megfigyelték továbbá, hogy a gócokban vagy a vese nagyobb területein limfo-hisztiocisztás sejtes beszűrődés keletkezett, amely behatolt a kéregállományba és esetenként a velőállományba is. Máskor szembetűnő volt az eozinofiliás sejtes beszűrődés is. Viszonylag ritkán fordult elő a vesecsatornák cisztaszerű tágulata. Ezekben az esetekben az OA-t ki tudták mutatni az állatok véréből, a veséjéből és a májából is.

Nagy létszámú pulykaállományban is leírtak a fentihez hasonló megbetegedést 16 mg/kg OA tartalmú kukorica etetése után. A szennyezett takarmány elfogyasztása tömeges pusztulást okozott, ezen kívül csökkent a takarmányfelvétel, és romlott annak hasznosulása is. A vesék megduzzadtak és színük halványabbá vált, a proximális tubulusokban hámelhalást figyeltek meg.

A nefropátia előfordulását csirkékben is tapasztalták (Huff és mtsai, 1974). Az állatok veséi megnagyobbodtak, világossá váltak és kb. harmadrészükből lehetett 4-30 µg/kg ochratoxint kimutatni. Szövettanilag a proximális és disztális tubulusok hámjának elhalását figyelték meg. Az állatok testtömegének csökkenésén kívül a takarmányhasznosulás romlását tapasztalták. Tojótyúkoknál gyakran észlelték a tojások számának csökkenését. Jércékkel etetett 4 mg/kg ochratoxin tartalmú takarmány hatására az ivarérettség (a tojásrakás megkezdése) 9 hónap alatt sem következett be. 3 hetes broiler csirkében az ún. hatástalan dózis (no effect concentration) egyszeri toxinbevitellel hozzávetőlegesen 0,5-1,0 mg/kg. Ez a toxinadag a testtömeggyarapodásban még nem okoz elmaradást, de a veseműködésben már eltérés mutatkozik.

Az ochratoxinokra más háziállatok (Pier, 1973), kacsá (Burns és mtsa, 1987), japán fűrj és a patkány (Kanisawa és mtsai, 1990), egér (Kanisawa és Suzuki, 1978), nyúl (Galtier és mtsai, 1981, Zofair és mtsai, 1996)), tengerimalac is érzékenyek. Az OA valamint etil- és metilészterei esetében az orális LD₅₀ napos kacsákra 135-170 µg/állat, patkányokra 20-28 µg/ttg. A klórmentes származékok mérgező hatása egy nagyságrenddel kisebb. Ochratoxikózist kísérletileg pisztángokban is sikerült előidézni (Doster és mtsai, 1974).

Az OA hatására a szarvasmarha is érzékeny, gyakorlati körülmények között ochratoxikózissal mégis csak a borjak között, kb. fél éves korig találkozhatunk (Ribelin és mtsai, 1978). A szájon át felvett ochratoxin a bendőben átalakul és belőle ochratoxin α és fenil-alanin keletkezik, melyek mérgező hatással nem rendelkeznek. *In vitro* vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy a csak protozoonokat tartalmazó bendőkivonat képes hatástalanítani az OA-t a bendőfolyadékhoz hasonló mértékben, míg csak a bendő-baktériumok jelenlétében vagy a sterilizált bendőfolyadékban a teljes ochratoxin mennyiség változatlan marad. A bontás során karboxipeptidáz enzim az OA-ban található peptidkötést hidrolizálja. Egészséges felnőtt szarvasmarhában 1 kg bendőtartalom 12 mg ochratoxint képes 48 óra alatt hidrolizálni. Amennyiben több a felvett toxin mennyisége, vagy kísérleti úton parenterálisan juttatjuk azt az állat szervezetébe, akkor a kérődzőkben is kialakul a megszokott kórkép, a hozammaradás és a tejtermelés csökkenése. Fél évesnél fiatalabb borjakban kisebb terhelés is megbetegedést okozhat, étvágytalanság, emésztési rendellenesség, hasmenés és hashártyagyulladás figyelhető meg. Vérzések keletkezhetnek a szívbeltálya alatt. A szövettani vizsgálat során veseelfajulás, valamint diffúz hepatocelluláris nekrosis észlelhető neutrofil sejtes beszűrődéssel. Az OA LD₅₀ értéke szarvasmarhák esetében 20 mg/ttkg.

Néhány évtizede a balkáni országokban elsősorban a mezőgazdasággal foglalkozó lakosság körében előforduló krónikus vesekárosodásra figyeltek fel. A betegséget balkáni endémikus nefropátiának nevezték el. Egyik tünete volt fehérjék kiválasztása a vizeletbe, ami a glomerulusok szűrőképességének zavaraira utal. Szövettani leleteken a vesecsatornák elfajulását, a sejtközi tér rostosodását, a glomerulusok szétesését észlelték. A nefropátiások 30-40%-ában a vizeletkiválasztó rendszer valamilyen daganatos elváltozása is kimutatható volt (Chernozemsky és mtsai, 1977). A megbetegedéseket sokáig különböző okokra próbálták visszavezetni. A kutatások során dél-afrikai gabonáról és hüvelyesekről OA termelő *A. ochraceus* törzset izoláltak. A balkáni endémikus nefropátia kóroki összefüggéseinek közvetlen bizonyítékául szolgált, hogy az endémiás területek lakosságának szervezetében is kimutatható volt az OA (Krogh és mtsai, 1974).

Az OA szerepet játszik uroteliális tumorok kialakulásában (Wafa és mtsai, 1998) és más, ismeretlen eredetű veseműködési rendellenességekben. A nefropátiára a sertések rendkívül fogékonyak, ami azért érdekes, mert a balkáni országok sertéshúst nem fogyasztó mohamedán lakosságának körében sokkal kisebb mértékű a nefropátia előfordulása. Az ochratoxinok rákkeltő hatásának kérdése még vitatott, de állatkísérletek egyértelműen igazolják, hogy szerepük van daganatok kialakulásában (Bendele és mtsai, 1985).

1. 1. 10. Élelmezés egészségügyi határértékek

A penészgombák és a mikotoxinok előfordulása az élelmiszerekben és a takarmányokban nem hárítható el maradéktalanul. A kóros elváltozásokat még nem okozó mennyiségeket határértékekkel szabályozzák, ezzel a közegészségügyi kockázatot minimálisra csökkentik. Az élelmezés egészségügyi határértékekkel a nyersanyagok és a termékek tárolásra, további feldolgozásra és fogyaszthatóságra való alkalmasságát állapítják meg.

A mikotoxin határértékek meghatározása állatkísérletekből indul ki, melyek feltételeit - az állatfajt, az állatok számát, korát, nemét, az adagolás módját, a megfigyelésre kerülő paramétereket, az értékelés módját - nemzetközi megállapodások rögzítik. A kísérlet során megállapítják azt a toxin mennyiséget, mely huzamos fogyasztás mellett sem okoz kóros elváltozást.

Ezen adatok alapján - az ember esetleges nagyobb érzékenységet, a gyermekek és érzékenyebb egyének fogyasztási lehetőségeit figyelembe véve - számítják ki a napi

bevihető mennyiséget és adják meg testtömeg kg-ra. Ez az érték az ADI (Acceptable Daily Intake), mértékegysége a mg/testtömegkg/nap. Az egyes élelmiszerekre vonatkozó határértéket a fogyasztás gyakoriságát és átlagos napi fogyasztást figyelembe véve számítják ki. Magyarországon az Egészségügyi Minisztérium 17/1999. (VI.16) rendeletének 4. számú melléklete foglalja össze a mikotoxin határértékeket (5. táblázat).

Az aflatoxin B₁-re előírt határértékek élelmiszertől függően 1-8µg/kg között változnak. Az összes aflatoxin (B₁+B₂+G₁+G₂) mennyisége még földimogyoróban sem haladhatja meg a 15µg/kg-ot. Ezeknél alacsonyabb határértékeket követelnek meg az alapélelmiszerek és gyermektápszerek esetén.

Az OA-ra Dániában állapítottak meg 10µg/kg határértéket a sertés vesére és májra. Amennyiben e szervekben a toxin a 25µg/kg értéket meghaladja, az egész állatot emberi fogyasztásra alkalmatlannak minősítik. Nálunk a növényi eredetű élelmiszerek OA-ra megállapított határértékei 3-15µg/kg között változnak a terméktől függően. Legmagasabb a nyerskávé megengedett OA szintje.

Az Európai Unióban megállapított érték a napi OA bevitelre 1-2 ng/testsúlykg. Az OA élelmezés egészségügyi határértékére 77 országban létezik szabályozás, amely szerint a bébi ételek 1-5µg, a egyéb élelmiszerek 2-50µg, a takarmányok 5-300µg OA-t tartalmazhatnak kg-ként (van Egmond, 1996).

5. táblázat. Mikotoxin határértékek élelmiszerekben. (4. számú melléklet a 17/1999. (VI. 16.) EüM rendelethez).

AFLATOXINOK

Termék	Maximális szint (µg/kg)		
	B1	B1+B2+ G1+G2	M1
Dió, mogyoró, mandula, gesztenye, szárított gyümölcsök és ezek feldolgozott termékei (közvetlenül emberi fogyasztásra vagy élelmiszer-összetevőként való felhasználásra)	2	4	-
Földimogyoró (ha emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként való felhasználás előtt válogatással vagy más fizikai kezeléssel tisztítják)	8	15	-
Dió, mogyoró, mandula, gesztenye, szárított gyümölcs és zöldség (ha emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként való felhasználás előtt válogatással vagy más fizikai kezeléssel tisztítják)	5	10	-
Édesipari termékek	1	1	-
Gabonafélék (beleértve a hajdinát, <i>Fagopyrum</i> spp.) és gabonaőrlemények (közvetlen emberi fogyasztásra vagy élelmiszer-összetevőként való felhasználásra)	2	4	-
Gabonafélék (beleértve a hajdinát, <i>Fagopyrum</i> spp.) a kukorica kivételével (közvetlen emberi fogyasztásra vagy élelmiszer-összetevőként való felhasználásra)	2	4	-
Fűszerek - paprika (<i>Capsicum</i> spp.) egész vagy őrölt, beleértve a csilit, csiliport - bors (<i>Piper</i> spp.) fehér és fekete - szerecsendió (<i>Myristica fragrans</i>) - gyömbér (<i>Zingiber officinale</i>) - kurkuma (<i>Curcuma longa</i>)	5	10	-
Tej és tejtermékek (a felhasznált tej arányának megfelelően)	-	-	0,05

OCHRATOXIN A

Termék	Maximális szint (µg/kg)
Gabona (beleértve a rizst és hajdinát)	5
Minden gabona eredetű termék, beleértve az őrleményeket és a közvetlen emberi fogyasztásra kerülő gabona terményeket	3
Mazsola	10
Pörkölt kávé, kávé alapú termékek	10
Nyerskávé	15
Egyéb növényi élelmiszerek	10

EGYÉB MIKOTOXINOK

Termék	Mikotoxin	Maximális szint (µg/kg)
Lisztek, őrlemények, müzli cerealák része	Deoxinivalenol (DON)	1000
	Zearalenon (F-2)	100
	T-2 toxin	300
Étkezési korpa	Deoxinivalenol (DON)	1200
Gyümölcs- és zöldségkészítmények	Patulin	50

1. 2. AZ OCHRATOXINOK OKOZTA PROBLÉMÁK MÉRSEKELÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI**1. 2. 1. Az ochratoxikózisok megelőzése**

Annak megakadályozására, hogy a szervezetbe került OA mérgező hatását kifejtsen, alkalmazzák pl. a nátrium-karbonátot, amely hatékonyan gátolja az ochratoxinok felszívódását a gyomorból (Creppy és mtsai, 1995). Fenobarbitallal történt előzetes kezeléssel és fenilalanin adagolásával egerekben csökkentették az OA toxikus hatását (Moroi és mtsai, 1985). A fenilalanin adása az OA immunrendszert károsító hatását is képes kivédeni (Haubeck és mtsai, 1981). A fenilalanin analóg vegyületeinek (aszpartám és a piroxicam) adagolásával patkányokban elkerülhető az ochratoxikózis (Creppy és

mtsai, 1998). Az aszpartám az egész világon széles körben alkalmazott édesítőszer, ami gátolja az OA kötődését a vér plazmaproteinjeihez, különösen a szérum-albuminhoz. Az aszpirin és az indometacin védi az egereket az OA genotoxikus hatásától (Obrecht-Pflumio és mtsai, 1996). Antioxidáns vegyületek, a retinol, aszkorbinsav, E-vitamin szintén védenek az OA káros hatásai ellen (Marquardt és mtsai, 1992, Grosse és mtsai, 1997, Hoehler és mtsai, 1997). Patkányoknál megfigyelték, hogy a szuperoxid-dizmutáz és a kataláz védi a vesét (Baudrimont és mtsai, 1994), a metionin jelenlétében az OA teratogén hatását nem tudja kifejteni, valamint védi a máj és a vese szöveteit (Abdel-Wahhab és mtsai, 1999). Egereket vizsgálva megállapították, hogy a szőlőlé gátolja az OA karcinogén hatásának kialakulását (Jeswal, 1998).

Adszorbensek hatását is vizsgálták az OA káros hatásának megakadályozása érdekében. Ismeretes, hogy a kolesztiramin megköti az epesókat az emésztőtraktusban, serkentve ezáltal azok kiválasztódását a székletbe. Kolecisztiramin adagolása mellett adott, OA tartalmú táplálékkal etetett patkányok vérében sikerült kimutatni az OA szint csökkenését (Kerkadi és mtsai, 1999). Az OA *in vitro* nagy aktivitással kötődött aktív szénhez (Galvano és mtsai, 1998), azonban az aktív szén *in vivo*, csirkékben nem csökkentette a toxikus hatást (Rotter és mtsai, 1989).

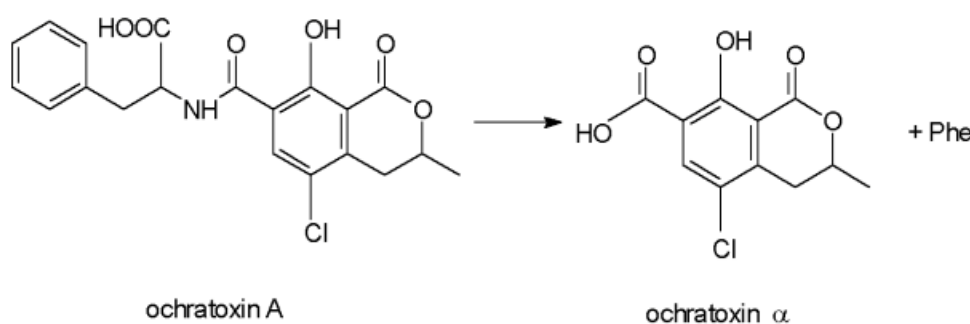
1. 2. 2. Az élelmiszerek és takarmányok OA tartalmának csökkentésére kidolgozott eljárások

Az élelmiszerekben és a takarmányokban előforduló mikotoxinok eltávolítására számos fizikai és kémiai módszert dolgoztak ki, azonban az élelmiszerek minőségével szemben felállított követelmények az ipari alkalmazást megakadályozzák. A toxinszennyeződés eltávolítása után az élelmiszer tápértékének és fogyaszthatóságának a kezelés előttivel meg kell egyeznie. A termék technológiai tulajdonságai sem változhatnak, valamint az eljárásnak nagyüzemi szinten is gazdaságosan kivitelezhetőnek kell lenni. Továbbá fő szempont, hogy a kezelés során toxikus bomlástermékek nem keletkezhetnek. A gabonafélék és kávék OA szennyezettségének ellenőrzésére HACCP rendszert dolgoztak ki (Frank, 1999, FAO, 2000).

Az OA és más mikotoxinok okozta szennyeződés eltávolítására alkalmaztak hipokloritot (Castegnaro és mtsai, 1991) és ammóniát (Chelkowski és mtsai, 1982). A szarvasmarha és a birka bendőjében élő *Butyrivibrio fibrisolvens* által termelt enzimek képesek átalakítani az OA-t nem toxikus O α -vá (6. ábra) (Galtier és mtsai, 1976, Xiao és

mtsai, 1991, Hult és mtsai, 1976), és részben az emberi bélmikrobióta is képes bontani az OA-t (Akiyama és mtsai, 1997) A *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* (Skrinjar és mtsai, 1996), *Acinetobacter calcoaceticus* (Hwang és mtsai, 1994), *Phenylobacterium immobile* (Wegst és mtsai, 1983), valamint az *A. niger* karboxipeptidáz A és lipáz enzimei is képesek bontani az OA-t (Deberghes és mtsai, 1995, Stander és mtsai, 2000). A *Bacillus pumilus*ból olyan antifungális metabolitokat izoláltak, amelyek akadályozzák az OA termelését (Munimbazi és Bullerman, 1998). Az eddig azonosított OA bontó mikroorganizmusok (élesztők, baktériumok) általában folyadékony tápközegben tudták lebontani az OA-t (pl. joghurt) (Skrinjar és mtsai, 1996), ezért nem alkalmazhatók élelmiszereink többsége és a takarmányok esetében sem.

A kukorica, a paradicsom és a búza sejt kultúrákban is elveszett az OA toxicitása, mert a peptid-kötés hidrolízise következett be (Ruhland és mtsai, 1994, 1996a, 1996b). Az *Anagasta kuniellara* nincs hatással az OA, ezért ezek esetleges forrásai lehetnek OA detoxifikáló enzimeknek (Karlovsy, 1999).



6. ábra. Az OA bomlásakor Oα és fenilalanin keletkezik

1. 2. 3. Vegyületek hatása az ochratoxintermelő képességre

Az *A. flavus* által termelt poliketid jellegű aflatoxin bioszintézisére bizonyos vegyületek serkentő, mások gátló hatással vannak. Hasonló jelenséget az *A. ochraceus* OA termelése esetében is megfigyeltek.

A dichlorvos (dimetil-2,2-dichlorovinil-foszfát) egy viszonylag erős anti-aflatoxinogén hatású vegyület, a toxin szintézisét a verzikonál-hemiacetál-acetátnak verzikolorinná történő konverziójánál gátolja *A. flavus*ban (Zaika és Buchanan, 1987, Wu és Ayres, 1974). A nitrát-ion az aflatoxin bioszintézist gátolta *A. parasiticus*ban az averufin keletkezésénél (Zaika és Buchanan, 1987). A fémek közül a cink *A. flavus*ban az aflatoxin

bioszintézise során a verzikolorin szintézisét stimulálja, ha azt a termelő szervezet az inkubáció 20-30. órájában veszi fel és a táptalajban mért koncentrációja nem haladja meg a 0.4-2 mg/l mennyiséget (Steele és mtsai, 1973). A molibdén nincs hatással az *A. flavus* aflatoxintermelő képességére (Zaika és Buchanan, 1987).

A koffein az *A. ochraceus* OA termelését 98%-al csökkentette, azonban a micéliumnövekedést kis mértékben stimulálta. A koffein gátolja a glükóz felvételét *A. parasiticus*ban, valószínűleg ezáltal válik a toxintermelés inhibitorává (Buchanan és mtsai, 1981). A cerulenin és a tetrahydrocerulenin zsírsav-szintetáz gátló hatása mellett az aflatoxin szintézist *A. parasiticus*ban a növekedés logaritmikus fázisában serkentette. A di-ill. hexa-hidrocerulenin nem rendelkezik ezzel a hatással, aminek magyarázata valószínűleg az előbbiek epoxid struktúrájában rejlik. Az aminosavak hatását vizsgálva az L-glutaminsav az ochratoxin termelés serkentőjének bizonyult, mert nitrogénforrásként szolgált a bioszintetikus folyamatokhoz.

1. 3. AZ ASPERGILLUS NEMZETSÉG ÉS NÉHÁNY SZEKCIÓJÁNAK JELLEMZÉSE

1. 3. 1. Az *Aspergillus* nemzetség taxonómiája

Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó 69 fajt Thom és Church 1926-ban (Raper és Fennell, 1965) 11 csoportba sorolta be. Ez a rendszerezés a telepek morfológiáját és az aspergillumok sajátosságait vette alapul a rokonság megállapításánál. Thom és Raper 1945-ben (Raper és Fennell, 1965) 77 *Aspergillus* faj 10 különböző tulajdonsága alapján 14 csoportot állított fel. 1965-ben készült el Raper és Fennell rendszertana, melyet ma is elfogadnak és referenciaként használnak az *Aspergillus*ok taxonómiájában. Ebben a rendszerben 132 faj leírása található, amelyeket 18 csoportba soroltak be. A fajcsoportok a Nemzetközi Botanikai Kód szerint nem rendelkeznek taxonómiai jelentéssel.

Gams és mtsai 1985-ben a csoportokat alnemzetségekbe és szekciókba sorolta be. Az *Aspergillus* nemzetséget hét alnemzetségre és 18 szekcióra osztotta (6. táblázat). Az rRNS szekvenciavizsgálatok alapján a *Wentii* szekcióba sorolt fajok közeli rokon fajaikkal azonos szekcióba kerültek, ami annak megszűnéséhez vezetett (Peterson, 1995). Később az *Aspergillus* nemzetséghez tartozó fajok rRNS gének szekvenciájának vizsgálata során Peterson (2000) a nemzetséget újból felosztotta.

Az *Aspergillus* fajok szexuális alakjai az aszkuszos gombák közé, a Webster-féle rendszer (1986) szerint az *Eurotiales* rend, *Trichocomaceae* családba tartoznak.

Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozik a számos növényi megbetegedést, mint pl. a mogyoró koronarothatását, mandulafák klorózisát, a hagyma rothatását okozó *A. niger*. Egyes fajok alacsony vízaktivitás mellett is képesek növekedni, mint az *A. glaucus*, *A. halophilus*, *A. restrictus*, *A. chevalieri*, *A. amstelodami*, ezért nagy károkat okozhatnak a raktározott gabonafélékben és szemesterményekben. A szárazföldeken az *A. flavus* és *A. parasiticus*, mint a gyapot és kukorica kártevői számottevők (Cotty és mtsai, 1994). Humán és állategészségügyi szempontból kiemelkedő jelentőséggel rendelkezik az *A. fumigatus* és *A. niger*, amelyek opportunista patogének, a tüdőmikózis okozói. Az *Aspergillus*ok közé számos iparilag fontos faj is tartozik. Az *A. niger*, *A. terreus*, *A. wentii*, *A. fumigatus* az élelmiszeriparban és gyógyszergyártásban nélkülözhetetlen enzimeket (amiláz, pektináz, laktáz, glükóz-oxidáz), antibiotikumokat (fumagillin) és szerves savakat (citromsav) termelnek. A Távol-Keleten élelmiszerek előállításához használják az *A. sojae*, *A. oryzae* fajokat.

Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozik a genetikai szempontból sokat tanulmányozott, a *Neurospora crassa*val együtt modellszervezetként számon tartott *A. nidulans* is.

6. táblázat. Az *Aspergillus* nemzetség felosztása Gams és mtsai (1985) és Peterson (2000) szerint

Szekció	Alnemzetség		Teleomorfa
	Gams et al. (1985)	Peterson (2000)	
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Eurotium</i>
<i>Restricti</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	-
<i>Cervini</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Aspergillus</i>	-
<i>Terrei</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Flavipedes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Nigri</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i>	-
<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Neopetromyces</i>
<i>Flavi</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Petromyces</i>
<i>Cremeri</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Chaetosartorya</i>
<i>Candidi</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i>	-
<i>Wentii</i>	<i>Circumdati</i>	-	-
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Neosartorya</i>
<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Neocarpenteles</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Emericella</i>
<i>Versicolores</i>	<i>Nidulantes</i>	-	-
<i>Usti</i>	<i>Nidulantes</i>	-	-
<i>Sparsi</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Nidulantes</i>	-
<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Sclerocleista</i>
<i>Warcupiella group</i>	<i>Ornati</i>	<i>Warcupiella group</i>	<i>Warcupiella</i>

1. 3. 2. A *Circumdati* szekció

Az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* szekciójába tartozó fajokra jellemző, hogy a konídiumfejek sárgák, narancssárgák, okkersárgák vagy bőrszínűek, alakjuk gömbölyű. A fialidok két sorban, sugarasan helyezkednek el. Konídiumaik lehetnek gömbölyűek vagy oválisak, felületük sima vagy tüskés. A konídiumtartók enyhén vagy erőteljesen pigmentáltak, sárgás vagy barnás színűek, felületük enyhén érdes vagy erőteljesen fogazott. A vezikulum általában gömbölyű, de kissé hosszúkas is lehet. Szklerócium egyes fajoknál megfigyelhető, alakjuk és színük igen változatos. Raper és Fennell (1965) a szkleróciumok termelését fontos taxonómiai bélyegként használták. Kleisztotécium képzést csak az *A. alliaceus*ban, *A. albertensis*ben és *A. muricatus*ban figyeltek meg, amelyek teleomorf alakjait Malloch és Cain (1972) a *Petromyces* nemzetségbe sorolta, de taxonómiai helyzetük máig tisztázatlan.

A szekció tagjainak nagy a gazdasági jelentősége is. Az *A. ochraceus*t és *A. sclerotiorum*ot szteroidok, alkaloidok és fenazin biokonverziójára alkalmazzák (Chen és mtsai, 1994, Petroski és mtsai, 1983, Hill és Johnson 1969). Az *A. melleus*t és *A. sclerotiorum*ot alkalmazva proteolitikus enzimeket állítanak elő (Kundu és mtsai, 1974, Luisetti és mtsai, 1991), míg néhány faj rovarellenes vegyületeket termel (Wicklow és mtsai, 1994, Whyte és mtsai, 1996, Ooike és mtsai, 1997).

1. 3. 3. A *Flavi* szekció

Az *Flavi* szekcióba tartozó fajok esetében a konídiumfejek világos vagy sötét sárgászöld, olajbarna vagy barna színűek, sötét színű szkleróciummal és általában kétsoros fialiddal rendelkeznek. A konídiumtartók színtelenek vagy enyhén pigmentáltak, felületük sima vagy erőteljesen fogazott. Konídiumaik általában gömbölyűek, gyakran fajon belül is variabilitást mutatnak, felületük sima vagy barázdált. Szkleróciumaik sötét színűek, érett állapotban vörösesbarna, lilásbarna vagy fekete színűek, gömb vagy ahhoz hasonló alakúak, de lehetnek hosszúkasak is.

Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába tartozó fajokat Raper és Fennell 1965-ben az *Aspergillus flavus* fajcsoportba sorolta. Christensen (1981) a szekcióba sorolt 14 faj morfológiai és fiziológiai hasonlóságait vizsgálta. Kurtzman és mtsai (1986) a vad típusú és a házasított (domesztikált) fajok rokonsági viszonyait DNS hibridizációs technikával elemezte. A szekció tagjainak izoenzim analízisét (Yamatoya és mtsai, 1990) és ubikinon rendszerük vizsgálatát is elvégezték (Kuraishi és mtsai, 1990). A szekció gazdaságilag

jelentős fajaiban Nikkuni és mtsai (1998), valamint Peterson (2000) vizsgálta az interspecifikus kapcsolatokat az rRNS génklaszter szekvencia analízise alapján. Samson (1994) 12 fajt és 2 alfajt rendelt a *Flavi* szekcióba, amely azóta az *A. caelatus*szal bővült. Peterson (1995) megállapította, hogy az *A. terricola* és az *A. thomii* is ebbe a szekcióba tartozik. Varga és mtsai (2000a) kutatásai alapján az *A. lanosus*, a *P. alliaceus* és a *P. albertensis* anamorf alakjai is a *Flavi* szekció tagjaival mutatnak rokonságot, amelyeket a *Circumdati* szekció tagjaként tartottak számon. Két további faj, az *A. coremiiformis* és az *A. toxicarius* valószínűleg szintén e szekcióba sorolandó (Christensen, 1981).

A szekció tagjainak egy része, az *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* élelmiszerekről izolálható, aflatoxin termelő faj (Smith és Moss, 1985), míg ezek házasított változatai, az *A. oryzae*, *A. soyae* Távol-keleti élelmiszerek fermentációjában játszanak szerepet (Campbell-Platt és Cook, 1989).

1. 3. 4. A *Fumigati* szekció

A *Fumigati* szekció tagjaira jellemző, hogy a konídium fejek oszloposak, színük a világos kékesszürkétől a sötétszürkéig terjedhet. A vezikulum alakatlan, jellemzően szürkés pigmentációval ellátott. A fialid réteg egysoros, gyakran olyan színű, mint a vezikulum. A konídiumtartók enyhén fogazottak, általában szürkés árnyalatúak, ami különösen a végekre jellemző. A konídiumok gömb, ritkán ellipszis alakúak, kissé durva felületűek. Kleisztotécium jelenléte néhány fajra jellemző, fehér, krém, bőrszínű, sárga vagy narancs színű lehet.

Az *A. fumigatus* fajcsoportba Raper és Fennell (1965) 10 fajt és 3 további alfajt sorolt, valamint további két alcsoportra osztott aszerint, hogy rendelkeznek e szexuális alakkal. A későbbi publikációkban további 5 fajt soroltak ebbe a csoportba. A fajok között van aszexuális és szexuális (*Neosartorya* sp.), homo- és heterotallikus is. Gams és mtsai (1985) elvégezték a nemzetség egzakt rendszertani felosztását, amelyben az *A. fumigatus* fajcsoportot a *Fumigati* alnemzetségbe, ezen belül a *Fumigati* szekcióba sorolták.

A *Fumigati* szekcióba tartozó legtöbb faj optimális növekedési hőmérséklete 37°C, azonban előfordulnak közöttük termofil fajok is. Az *A. viridinutans* az *Aspergillus* nemzetség *Fumigati* szekciójának tagja, amely viridotoxin és más izokumarin származékok termelésére képes. Morfológiai érdekessége a "bólintó" konídiumos fej ("nodding conidial head"). Az elnevezés Raper és Fennelltől származik, akik először figyelték meg, hogy az *A. viridinutans* konídiumtartója szöveget zár be a vezikulummal.

1. 4. A PENÉSZGOMBA KIMUTATÁSI MÓDSZEREK

1. 4. 1. Az leggyakrabban alkalmazott eljárások

A HACCP rendszerek és velük összefüggésben a prediktív mikrobiológia egyre inkább elterjedt az élelmiszerek minőségének meghatározásában, alkalmazásukkal minimálisra csökkenthető a humán- és állategészségügyi kockázat. A penészgombák jelenlétének kimutatására alkalmazzák az élőcsíraszám meghatározást, a lemezöntéses vagy szélesztéses módszert, a mikroszkópos vizsgálatokat, elektromos méréseket, felhasználva a tenyésztő közegben bekövetkező vezetőképesség vagy más elektromos jellemző változását (7. táblázat). A hagyományos mérések legtöbbje anyag- és időigényes, valamint a hőkárosodott vagy inaktiválódott penészek kimutatására nem alkalmasak. A micéliumok mikroszkópos meghatározása pontatlan és nagy szubjektív hibával terhelt.

Immunológiai módszerekkel az élelmiszereket fertőző penészgombák szintén meghatározhatók (Notermans és mtsai, 1986, Lin és Cousin, 1987, Tsai és Cousin, 1990), így ELISA-t alkalmaznak pl. extracelluláris poliszacharidok mérésére, Kamphuis és mtsai (1989) érzékeny latex agglutinációs technikát fejlesztettek ki. Az ELISA alkalmazása lehetővé teszi az élelmiszerek gyors és rutinszerű vizsgálatát, azonban specifikusságuk miatt csak korlátozottan alkalmazhatók, valamint nagyon költségigényesek.

A penésztartalom mérésének egyik új területe a NIR (Near Infrared) technika, ahol ígéretes kísérletek folynak az élelmiszerek fertőzöttségének meghatározására. Davies 1987-ben NIR technika alkalmazásával sikeresen határozta meg a paradicsompürében lévő penészszámot, Aramaki és mtsai (1995) nagy pontossággal becsülték meg a micélium mennyiségét kójában.

A penészszenyezettség kimutatására alkalmazzák továbbá a hőstabil enzimek és egyéb sejtalkotók, mint a kitin vagy az ergoszterin mennyiségének meghatározását. A sejtek kitintartalmának mérése pontatlan a különböző penészgomba fajok glükózamin tartalmának változása és az esetlegesen rovarrészekkel történt szennyeződés miatt, valamint a módszer érzékenysége sem megfelelő.

A penészgombák mennyiségének meghatározására egyre gyakrabban alkalmazzák az élelmiszerek és takarmányok ergoszterin tartalmán alapuló mérést (Seitz és mtsai, 1977). Az ergoszterin kizárólag gomba sejtekben fordul elő, nem fordul elő a baktérium, a növényi és az állati sejtekben sem. A penészgombák kimutatására jelenleg alkalmazott módszerek közül a ez tekinthető a legoptimálisabbnak.

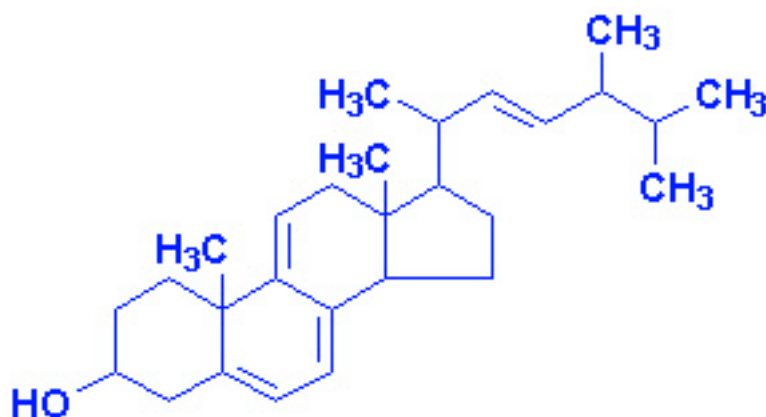
7. táblázat. A penészgombák meghatározására leggyakrabban alkalmazott módszerek

PENÉSZGOMBÁK MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSÁRA ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	Élőcsíraszám meghatározás (CFU), elektromos mérések, mikroszkópos detektálás, ergoszterintartalom mérés , kitintartalom meghatározása, fertőzött gabona-szemek vizuális értékelése és tömegará-nyának érése
FAJSZINTŰ MEGHATÁROZÁS	Mikroszkópos morfológiai vizsgálatok DNS/RNS meghatározási módszerek Biológiai tesztek, immunkémiai mérések

1. 4. 2. Az ergoszterin előfordulása és jellemzése

Az ergoszterin megtalálható minden *Eumycotaban*, kivéve a *Chitridiomycotákat*, rozsdagombákat, néhány élesztőt, és hiányzik vagy nagyon kis mennyiségben fordul elő az *Oomycoták* és a *Hyphochytridiomycoták* sejtjeiben. Néhány alga és protozoa fajban is megtalálható.

Az ergoszterin a gombabiomassza száraztömegének 0.2-0.6 %-át teszi ki, ami függ a micélium korától és a növekedés feltételeitől. Az ergoszterin a membránlipidekhez kötött, illetve a citoplazmában szabad formában van jelen. A molekula két kettős kötést tartalmaz az 5-ös és a 7-es szénatomoknál (7. ábra), amelyek jelenléte eredményezi a specifikus abszorpciós maximumot 282 nm-en, ezért az ergoszterin mennyisége TLC-vel és HPLC-vel könnyen meghatározható.



7. ábra. Az ergoszterinmolekula szerkezeti képlete

Az ergoszterin mennyisége korrelál az élőcsíraszámmal, a micélium száraztömeggel, a hifa hosszúsággal, felületi antigének mennyiségével, a spóraszámmal, az illékony metabolitok (pl. CO₂) mennyiségével, a sejtfal kitartalmával, a volutilszemcsék és a termelt DON mennyiségével is (Börjesson és mtsai, 1990, Schnürer, 1993, Young és mtsai, 1984, Lamper és mtsai, 2000, 2001).

Francia kutatók nagyszámú gabona minta ergoszterin tartalmának meghatározása után a módszert alkalmasnak találták élelmiszerek és állati eledel minősítésére (Schnürer, 1995). Élelmiszerek esetében négy minőségi osztályt alakítottak ki. Az élelmiszeripari célra felhasználható gabonafélék esetében a határérték <5 ppm, takarmányozási célra 5-10 ppm volt. 10-20 ppm esetén kötelezően végre kell hajtani a multitoxin analízist, 20 ppm fölötti érték "tüzelőanyag" minőségi besorolást kapott.

Az állati eledel minősítésére szintén Franciaországban került sor, aminek eredményeképpen szabványba foglalták a határértékeket és a minőségi kategóriákat (AFNOR V18-112). A szabvány alapján mikotoxin kontaminációval akkor nem kell számolni, ha a gabona ergoszterintartalma 8 ppm alatt van, ebben az esetben a termék a "normal quality" (normális minőségű) minősítést kapja. Amennyiben a mért érték meghaladja a 12 ppm-et, a takarmányozási célra használandó gabona a "doubtful quality" (kétséges minőségű) kategóriába kerül, teljes körű multitoxin analízis válik szükségessé (Maupetit és mtsai, 1993).

1. 4. 3. Az ergoszterin tartalom meghatározásának lehetőségei

A gombamembrán ergoszterin tartalmának kivonására általánosan elterjedt módszer a szerves oldószeres extrakció. A feltárás körülbelül 80 °C-on visszafolyásos hűtővel (refluxáltatással) történik, lúgos körülmények között. Az extrakció alkoholokkal, a membránlipidek elszappanosítása KOH-al történik (Schnürer, 1995). Tekintettel arra, hogy a szerves oldószeres extrakció anyag- és időigényes nem alkalmas kis mennyiségű, nagyszámú minta ergoszterin tartalmának vizsgálatára, mert anyag- és időigényes. Ugyanakkor nagyszámú mintavétel és vizsgálat esetén, különös tekintettel a HACCP rendszerek kötelező alkalmazására, szükséges újabb gyorsvizsgálati módszerek kidolgozása.

Az elmúlt évtizedtől kezdve egyre elterjedtebben alkalmazzák a mikrohullámú energiaközlést, meggyorsítva ezzel a termikus kezelés folyamatát. Mikrohullámú energiaközléssel nagy mértékben lehet gyorsítani a különböző kémiai reakciókat és számos előnyös tulajdonságát az élelmiszeriparban is hasznosítják (pl. Szabó és mtsai, 1991, 1993, 1998, Rajkó és mtsai, 1997). Jelentősen lerövidíthető többek között a szárítás, elősűrités, blansírozás, pasztörözés, melegítés, puffasztás, felengedtetés műveleti ideje és az intenzív energiadiSSIPáció eredményeként baktericid hatás is kimutathat (Szabó, 1999). Young (1995) bizonyította, hogy a mikrohullámú extrakció (MAE) alkalmas kis mennyiségű mintából történő feltárássra. A 10-100 mg tömegű minta lehet gombamicélium, gabonaőrlemény vagy más penészszennyezett anyag. Az eljárás előnyösen alkalmazható filteren megszűrt levegőből származó körülbelül 500-25 000 mennyiségű spóra kimutatására is.

A hagyományos melegítéskor a hőenergia a felületről a magbelső felé áramlik. Ez olyan nem kívánatos folyamatokkal jár együtt, mint a kéregképződés, ami adott esetben megakadályozhatja a folyadéknek a minta felületére jutását, ezzel végeredményben lassítja a feltárás műveletét. A mikrohullámú energia alkalmazásakor a mintában jelenlevő, nagy dipólus momentummal rendelkező vízmolekulák a gyorsan váltakozó nagyfrekvenciás (2, 45 GHz) erőterben követik az elektromos erőter változásait. A vízmolekulák orientálódásakor felszabaduló súrlódási energia, amely a magbelső irányából melegíti a mintát, azonos irányban a folyadéktranszporttal. A gabonafélék őrleménye vagy a liofilizált penészmicélium rendelkezik megfelelő nedvességtartalommal, ami biztosítja a minta mikrohullámú kezelésével történő gyors ergoszterin feltárását (Szabó és mtsai, 2001, Tanács és mtsai, 2002).

1. 5. GENOTÍPUSOS VIZSGÁLATOK

1. 5. 1. RAPD analízis

A DNS polimorfizmus vizsgálatához sokféle lehetőséget nyújt a PCR alkalmazása (Foster és mtsai, 1993), ezek egyike a RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) technika (Bowditch és mtsai, 1993, Williams és mtsai, 1990a). A RAPD számos mikroszkópikus gomba, pl. *Fusarium* (Crowhurst és mtsai, 1991), *Colleotrichum*, (Guthrie és mtsai, 1992), *Aspergillus* (Megnegneau és mtsai, 1993) *Botrytis* (Büttner és mtsai, 1994) *Coprinus* (Laroche és mtsai, 1995) *Phytium* (Motoaki és mtsai, 1998), esetében alkalmasnak bizonyult fajon belüli különbségek kimutatására is. A RAPD technikával hozzájuthatunk nagy specifitású diagnosztikai próbákhoz is (Foster és mtsai, 1993), valamint lehetőséget nyújt szegregációs analízisre (Fabritus és Judelson, 1997, Judelson és mtsai, 1995), genetikai térképezésre (pl. Williams és mtsai, 1990b), homokarion/heterokarion állapot meghatározására (Foster és mtsai, 1993). További alkalmazását teszi lehetővé, hogy a RAPD termékek közvetlenül szekvenálhatók és felhasználhatók hibridizációs próbaként is, pl. pulzáltatott mezejű gélelektroforézissel (PFGE) elválasztott kromoszómák markerezésére (Tudzynski és Weltring, 1993).

Aufauvre-Brown és mtsai (1993), valamint Loudon és mtsai (1993) *A. fumigatus* izolátumok megkülönböztetésére használták a RAPD markereket. Szintén ezen faj esetében Mondon és mtsai (1995) a virulencia és a RAPD mintázatok között keresett összefüggést. Egy 0,95 kbp-os amplifikált DNS fragment jelenléte vagy hiánya összefüggésben volt a fertőzés természetével (invazív vagy nem invazív), és a beteg immunstátusával. Az *A. fumigatus* faj variabilitás vizsgálatában Rinyu és mtsai (1995) a fajon belül csak kismértékű eltéréseket tapasztaltak.

1. 5. 2. rDNS ITS vizsgálatok

Filogenetikai szempontból fontosak azok a gének, amelyek azonos funkcióval rendelkeznek a különböző szervezetekben és körülbelül azonos az evolúciós rátájuk, valamint genomként egy van belőlük (vagy egységes egésként viselkednek). Ilyenek pl. az rRNS gének, a citokró-m-oxidáz gén és bizonyos riboszómális fehérje elongációs faktorok. Szem előtt kell tartani, hogy olyan szekvenciákkal dolgozzunk, amelyek nem túl variábilisak. Az rRNS gének tartalmazzák ilyen szekvenciákat (28S, 5.8S és 18S rRNS gének), melyeket nem kódoló régiók, ITS (Internal transcribed spacer) és IGS (intergenic

spacer) választanak el egymástól. Az rRNS gének konzervált volta lehetővé tette primerek szerkesztését az ITS régiók amplifikálásához.

Berbee és mtsai (1995) *Penicillium* fajok 18S, 5.8S és ITS rDNS szekvenciáit elemezte. A vizsgálatok alapján a *Talaromyces* szexuális alakkal rendelkező *Penicillium* fajok külön csoportot képeznek, míg az *Eupenicillium* teleomorf alakú fajok az *Aspergillus* és a *Monascus* fajokhoz állnak közelebb. Az *Aspergillus* nemzetség monofiletikusnak bizonyult. Szintén *Penicillium*ok ITS régiójának szekvencia analízisét végezték el Skouboe és mtsai (1999). Az eredmények összhangban vannak az aszkospórák felszíni morfológiája alapján történt elkülönítéssel, azonban nincsenek összhangban az aszexuális szaporítóképletek alakja szerinti felosztással.

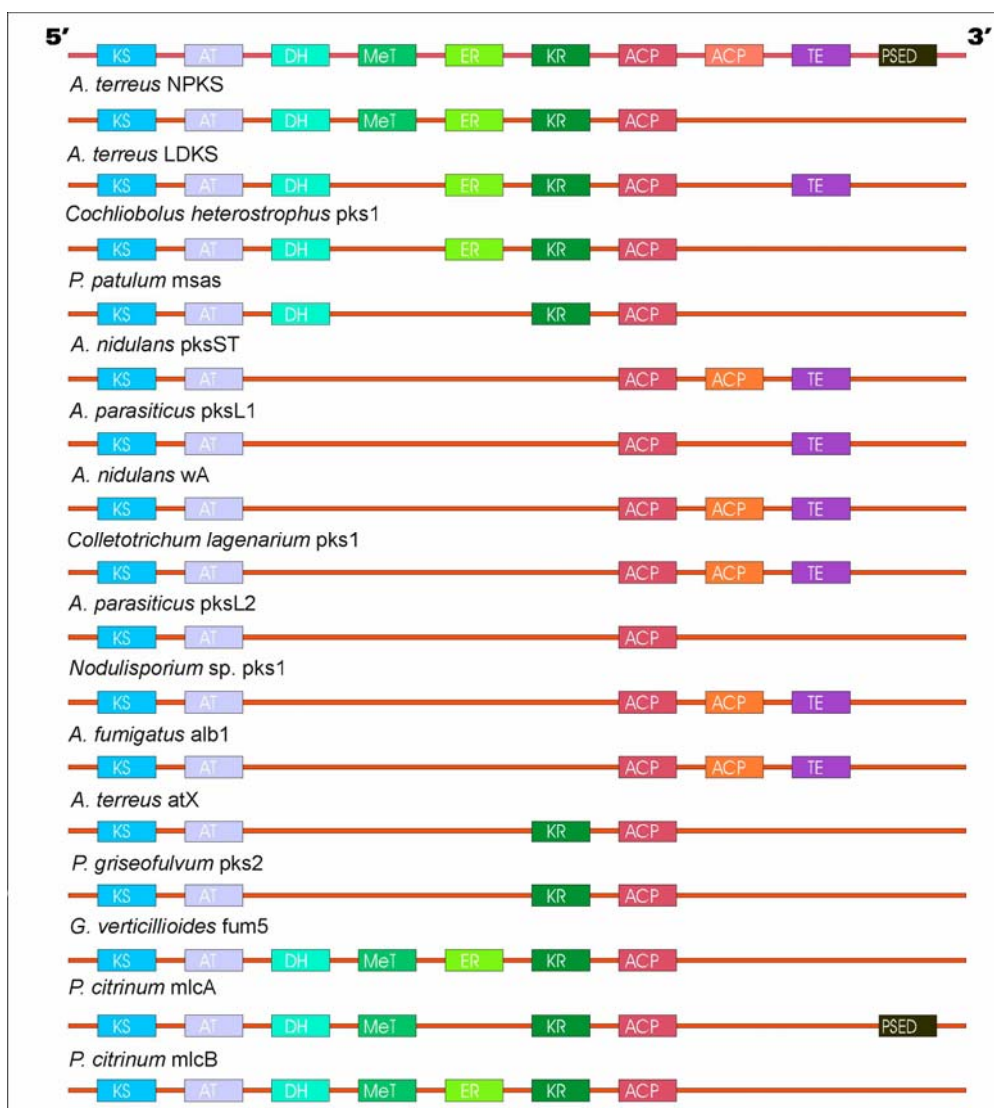
1. 5. 3. A poliketid-szintáz

A poliketid típusú mikotoxinok a zsírsavakhoz hasonlóan egyszerű sav monomerekből épülnek fel. A poliketidek bioszintézisében megfelelő számú acetyl-KoA és a malonyl-KoA vesz részt (Simpson, 1995, Hutchinson és Fujii, 1995). A bioszintézist katalizáló kulcs enzim a poliketid-szintáz (PKS), ami a zsírsav-szintázokhoz hasonló felépítésű és működésű enzim.

Szerkezetük alapján a poliketid-szintázokat 3 csoportba soroljuk (Hopwood, 1997). A gombák PKS génje ismétlődő egységekből felépülő I. típusú poliketid-szintázt kódol. Ez a típusú enzim fordul elő pl. az aflatoxin vagy a fumonizin termeléséért felelős fonalagombák esetében (8. ábra). A baktériumok I. típusú PKS-e több aktív domént tartalmazó, moduláris szerkezetű enzim, doménjei a bioszintézis során következő lépéseinek katalizálásában vesznek részt. Ilyen enzim pl. az eritromicin vagy a rapamicin bioszintéziséért felelős. A II. típusú PKS elsősorban a baktériumoknál előforduló moduláris felépítésű monofunkciós enzim, mint például az aktinorodin bioszintéziséért felelős PKS. A III. típusú PKS szintén ismétlődő egységekből felépülő, homodimer szerkezetű enzim, amelyet növényekből és baktériumokból izoláltak, például a kalcon-szintáz tartozik ebbe a csoportba.

Az elsőként leírt fonalagomba PKS a *Penicillium patulum* 6-metil-szalicilsav-szintáza (MSAS) (Beck és mtsai, 1990). A különböző mikroorganizmusok PKS génjei konzervált doménekből épülnek fel. Fonalas gombák PKS-ének doménjeihez primer párokat fejlesztettek ki, amelyekkel sikeresen amplifikálták a ketoszintáz, ketoreduktáz illetve C-metilációs doméneket polimeráz láncreakcióval (Bingle és mtsai, 1999, Nicholson és

mtsai, 2001, Lee és mtsai, 2001). Bingle és mtsai (1999) két csoportot azonosított a gomba PKS-eken belül. A WA típusú PKS-ek felelősek a különböző színanyagok és az aflatoxin bioszintéziséért, az MSAS csoportot alkotók a 6-metil-szalicilsav felépítésében vesznek részt. Ezen primerek alkalmazhatóak különböző fonalgombák, rovarok és nematódák gombái, zuzmók és endofiták esetében is PKS szekvenciák azonosítására (Bingle és mtsai, 1999, Miao és mtsai, 2001, Lee és mtsai, 2001, Sauer és mtsai, 2002).



8. ábra. A gombák PKS génjeinek felépítése. KS, ketoszintáz domain; KR, ketoreduktáz; DH, dehidratáz; MeT, metil-transzferáz; ER, enoil-reduktáz; AT; aciltranszferáz; ACP, acil-csoportot szállító domain (acyl-carrier protein); TE, tioészteráz (cikláz); PSED, peptid szintáz elongációs domain.

1. 5. 4. Mitokondriális DNS RFLP vizsgálatok

A mtDNS igen kedvelt célpontja az RFLP vizsgálatoknak. Kis mérete (19-121 kbp), könnyű tisztíthatósága lehetővé teszi a gombasejtben viszonylag nagy mennyiségben jelenlevő DNS állomány vizsgálatát. A restrikciós enzimek specifikus felismerőhellyel rendelkeznek a DNS molekulán. A DNS szekvencia megváltozása egy adott hasítóhely eltűnését vagy éppen megjelenését eredményezheti, így a restrikciós endonukleázzal történő kezelés során kapott mtDNS fragmentek méretei a hasítóhelyek számától és elhelyezkedésétől függően változhatnak. A gombák rokonsági viszonyainak megállapítására felhasználható a restrikciós fragment hossz polimorfizmus, mivel a közelebbi rokon fajoknál a restrikciós enzimek hasítóhelyei azonos helyen találhatók, illetve a törzsfejlődés során a restrikciós felismerőhelyekben bekövetkező változások száma kevesebb, mint a távolabbi rokon fajoknál.

Korábbi vizsgálatok már bebizonyították, hogy ez a módszer alkalmas az interspecifikus variabilitás vizsgálatára pl. *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fajok között (Kozłowski és Stepień, 1982) és intraspecifikus variabilitás mérésére, pl. *Aspergillus* nemzetség *Nigri* szekciójába sorolt fajok esetében (Varga és mtsai, 1993, 1994).

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2. 1. A felhasznált törzsek

A munkám során végzett különböző kísérletekhez alkalmazott törzsek listája általában eltérő volt, ezért azokat az "Eredmények ismertetése és értékelés" c. fejezetben az adott vizsgálathoz érve táblázatban foglalom össze.

2. 2 Az alkalmazott táptalajok és tápoldatok

Malátakivonatos táptalaj (MO)

0.5% malátakivonat

0.5% élesztőkivonat

1% glükóz

3% agar

Czapek-Dox minimál táptalaj (CZ) (Samson és Pitt, 1985)

0.2% NaNO_3

0.05% KCl

0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.1% K_2HPO_4

3% szacharóz

10 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

10 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3 mg/l CuSO_4

2% agar

Szénforrásmentes minimál táptalaj (MM)

1 % KH_2PO_4

0.5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.1 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0.1 % Wickerham-vitaminoldat

2 % agar

Wickerham-vitaminoldat (Wickerham, 1951)

0.01% biotin

0.01% piridoxin-HCl

0.01% tiamin

0.01% riboflavin,

0.01% p-aminobenzoésav

0.01% nikotinsav

Pontecorvo minimál tápoldat (PM) (Pontecorvo és mtsai, 1953)

0.6% NaNO_3

0.15% KH_2PO_4

0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.05% KCl

1% glükóz

0.1% élesztőkivonat

FeSO_4 és ZnSO_4

0.1 % Wickerham-vitaminoldat

2% agar

Élesztőkivonat-szacharóz tápoldat (YES)

2% élesztőkivonat

15% szacharóz

Élesztőkivonat-szacharóz táptalaj (YES)

2% élesztőkivonat

15% szacharóz

1.5 % agar

Diklorán-bengálvörös tartalmú táptalaj (DRB) (King és mtsai, 1979)

0.5% pepton

0.1% KH_2PO_4

1% glükóz

0.05% MgSO_4

0.05% (v/v) bengálvörös törzsoldat (5%)
0.1% (v/v) diklorán törzsoldat (0.2% EtOH-os oldat)
0.01% sztreptomicin
2 % agar

2. 3. Egyéb felhasznált oldatok, reagensek

AZ OCHRATOXIN TLC-S MEGHATÁROZÁSÁNAL HASZNÁLT OLDATOK:

TEF: 50% toluol:40% etilacetát:10% hangyasav keveréke

TOTÁL DNS TISZTÍTÁSHOZ HASZNÁLT OLDATOK:

LETS: 0.1M LiCl, 10mM Na₂EDTA, 10mM Tris/HCl (pH8.0), 0.5% SDS

TE: 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8

PCI: fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke

CI: kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú keveréke

RAPD-PCR-HOZ FELHASZNÁLT ANYAGOK:

CORE puffer (10 reakcióra)

5-5 µl dNTP (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

25 µl 10x inkubációs puffer

25 µl MgCl₂

5 µl steril desztillált víz

COCKTAIL (10 reakcióra)

1 µl *Taq* polimeráz (5 U/µl) (Promega)

5 µl primer (10 µM)

144 µl steril desztillált víz

A NUKLEINSAVAK GÉLELEKTROFORÉZISÉNÉL HASZNÁLT OLDATOK:

Etidium-bromid (SIGMA) 10%-os törzsoldat

TAE puffer: 40 mM TRIS/ecetsav, 1mM EDTA, pH 8

Agaróz (Reanal)

Loading puffer: 40 % szacharóz, 0.25 M brómfenolkék, 0.2 M EDTA, pH 8.2

ENZIMEK:

RNáz (Sigma bovin pancreas)

Restrikciós endonukleázok: *HaeIII*, *SmaI* (Amersham International, Fermentas Ltd.)

A restrikciós emésztésekhez az enzimeket gyártó cég által javasolt puffereket használtuk.

2. 4. FENOTÍPUSOS VIZSGÁLATOK

2. 4. 1. Szénasszimilációs spektrum analízis

A vizsgálatot Manczinger és Polner (1987) által leírt módon végeztük el. A kísérletsorozatban mintegy 100 féle szénforrást, cukrokat, poliszacharidokat, aminosavakat és származékaikat, valamint szerves savakat alkalmaztunk egyedüli szénforrásként 0.2%-os koncentrációban, minimál táptalajban.

Az izolátumok számának megfelelő mennyiségű forró minimál táptalajt öntöttünk steril lombikba, amelybe előzetesen beletettük a tesztelendő vegyületet. Miután jól elkevertük kiöntöttük Petri-csészékre, mindegyikre 20-20 ml-t. A közeg kémhatása mindig pH 5-6 között volt. Minden csészére 12 törzset konídium szuszpenzióikkal pontban oltottunk, majd 30°C-on inkubáltunk. A szuszpenziók koncentrációja 10^7 konídium/ml volt. A törzsek növekedését 4 és 7 nap után hasonlítottuk össze szénforrás nélküli kontroll csészén mutatott növekedésükkel.

2. 4. 2. OA termelő *Aspergillus* törzsek izolálása

A zöld kávészemek felszínét 5 percig 70%-os EtOH-val mostuk, hogy a felületi szennyeződéseket eltávolítsuk, majd 4-5 szemet MO és DBR táptalajra helyeztünk. A többi élelmiszerből származó minta fertőzöttségét szintén mindkét táptalajra helyezve vizsgáltuk. A DBR táptalajban lévő diklorán és bengálvörös akadályozza a járomspórás gombák növekedését, így az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok könnyen izolálhatók. A lemezeket 7 napig 30°C-on inkubáltuk, ezután az *Aspergillus* törzseket többszöri szélesztéssel, átoltással tisztítottuk. A tiszta izolátumokat 3-3 ml YES tápoldatba oltottuk és 30°C-on 10 napig inkubáltuk. Az izolátumok által termelt OA mennyiségét ELISA-val, majd TLC-vel határoztuk meg az alábbiakban ismertetett receptúrák szerint.

2. 4. 3. Morfológiai vizsgálatok

A vizsgálatban alkalmazott törzseket maláta kivonatos (MEA, Sigma) tápatalajon, Czapek-Dox agaron (CZA, Sigma) illetve CZ20 agaron (20% szacharózzal kiegészített CZA) inkubáltuk 5-8 napig 25°C-on és 37°C-on. A telepek átmérőjét, illetve a mikroszkópikus tulajdonságokat vizsgáltuk és értékeltük Christensen módszere (1982) alapján.

2. 4. 4. Az izolált törzsek ubikinon rendszere

Az izolátumok ubikinon rendszerének összehasonlítását Paterson (1993) módszerével végeztük el. A leírástól annyiban térünk el, hogy az ubikinonokat a TLC-s detektáláskor rodamin B 0.5%-os EtOH-os oldatával tettük láthatóvá UV (365 nm) alatt.

2. 4. 5. Az *A. albertensis* mutagénkezelése

A *P. albertensis* UAMH 2976 sztrómákat nem termelő izolátumának egy hetes tenyészetéről 10^6 konídium/ml szuszpenziót készítettünk és γ -sugárzással kezeltük (^{60}Co sugárforrás, 1241 Gray h^{-1}). A besugárzott konídiumokból megfelelő hígításokat készítettünk és MO lemezekre szélesztettük őket. Az egyedi telepeket tisztítás után YES tápoldatba oltottuk és TLC-vel vizsgáltuk a termelt ochratoxinok mennyiségét.

2. 5. AZ ISZOLÁTUMOK MIKOTOXIN TERMELŐ ÉS LEBONTÓ KÉPESSÉGÉRE IRÁNYULÓ VIZSGÁLATOK

2. 5. 1. Az izolátumok ochratoxin termelésének vizsgálata ELISA-val

Az izolátumok YES tápoldatos tenyészetéből 1-1 ml-t 1. 25 ml 1 N HCl oldattal és 2 ml diklór-metánnal vortexeltünk, majd centrifugáltuk (10 perc, 4000 rpm). Ezt követően a szerves fázishoz 2 ml 1%-os NaHCO_3 (pH 8.3) oldatot adtunk, majd ismét centrifugáltuk (10 perc, 4000 rpm). Az OA mennyiségének meghatározását a hidrogén-karbonátos fázisból Toxiklon ochratoxin detektáló ELISA kittel (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő) a gyártó instrukcióinak megfelelően végeztük el (Barna-Vetró és mtsai, 1996, Téren és mtsai, 1996).

2. 5. 2. Az ochratoxin termelés vizsgálata TLC-vel

Az OA termelő törzseket 20 ml YES folyadék kultúrában tenyésztettük. Először a tápoldatot 5 ml 1 N HCl hozzáadásával savanyítottuk, majd 40 ml diklór-metán hozzáadásával és 30 percig rázatótölcsérben történő rázatással vontuk ki a termelt ochratoxinokat. A diklór-metános fázist dehidratálás céljából vízmentes Na₂SO₄-on átszűrtük. A szerves fázis 2-2 ml mennyiségeit bepároltuk, felvettük ACN-ben, majd 1-10 µl mennyiségeket vittünk fel a rétegre (Kieselgel G 60 fluoreszcens indikátor nélkül, No. 5626, vagy HPTLC lemez 10x10 cm, No. 5633. Merck, Darmstadt, Germany). Futtatóelegyként TEF-et használtunk. A lemezeket szárítás után UV lámpa alatt vizsgáltuk (365 nm), sztenderdként a Makor Chemicals (Jerusalem, Israel) által forgalmazott ochratoxin A-t használtuk.

2. 5. 3. Az ochratoxin termelés vizsgálata HPLC-vel

Az ochratoxin tartalmú minták előkészítése a TLC-nél leírtakkal megegyezően történt. Az ochratoxin HPLC meghatározásához ebben az esetben 600E típusú HPLC készüléket használtunk (Waters Chromatography Div., Milford, MA, USA, fluoreszcens detektor, gerjesztés: 330 nm, emisszió: 460 nm, Hitachi 650-10S), Supelcosil ABZ + Plus oszloppal, eluensként 57% acetonitrilt, 41% vizet és 2% ecetsavat tartalmazó oldatban, áramlási sebesség 1.5 ml/perc).

2. 5. 4. Ochratoxin bontó képesség vizsgálata TLC-vel

Az OA bontásának vizsgálata egyrészt az *A. albertensis* fermentlevének alkalmazásával történt. Az *A. albertensis* ATCC 58745 törzset 200 ml YES tápoldatban előtenyésztettük 4 napig, majd a sterilre szűrt fermentlé 2-2 ml-ét oltókaccsal leoltottuk nagyszámú *Aspergillus* izolátum-mal. 10 napig 30 °C-on, sötétben inkubáltuk, majd azonos térfogatú diklór-metánnal extraháltuk. A diklór-metános extraktumokból 0.7-1 ml mennyiséget kivettünk, ezt bepároltuk, majd 200 µl ACN-ben felvettük. A OA bontás eredményét TLC-vel határoztuk meg a fentebb leírt módon.

2. 5. 5. A lebontott OA mennyiségének meghatározása HPLC-vel

Az OA bontás szempontjából ígéretesnek tűnő törzseket 3 µg OA-t (SIGMA) tartalmazó 2 ml YES tápoldatra oltottuk, 1 hétig inkubáltuk 30°C-on sötétben, leszűrtük és extraháltuk. A beszárított extraktumot ebben az esetben ACN:víz:ecetsav (57:41:2) elegyében vettük fel, majd HPLC-vel vizsgáltuk az összetételét. A HPLC vizsgálathoz a következő készülék állt rendelkezésünkre: SYKAM HPLC S 1100 izokratikus pumpa, S5110 injektor 20 µl loop, Linear Instruments Model 200 detektor, gerjesztés: 333 nm, GmbH, Germany. A méréshez BST Rutin C18 BD HPLC oszlopot használtunk (250 x 4 mm, szemcseméret: 10 µm, BioSeparation Techniques Budapest). Eluensként 99% víz-99% ACN-2% ecetsav elegyét használtuk, az alkalmazott áramlási sebesség 1 ml/perc volt. Sztenderdként OA-t (SIGMA), valamint savas hidrolízissel előállított Oα-t használtunk (Xiao és mtsai, 1995).

2. 5. 6. Az ochratoxin bontás kinetikájának vizsgálata

Az *A. niger* CBS 120.49 törzsét használtuk az OA bontás kinetikájának vizsgálatához. A törzs OA bontó képességét 2 ml YES tápoldatban, valamint táptalajon egyaránt vizsgáltuk. A tápközegek mindkét esetben 2.5 µg/ml mennyiségben tartalmaztak OA-t. A leoltás három 20 µl konídium szuszpenzióval (10^7 konídium/ml) történt. Az inkubációs idő YES tápoldatban 1, 3, 5, 7, 9, a táptalaj esetében 1, 2, 4, 5, 6, 9 nap volt.

Az extrakcióhoz a tápoldat teljes mennyiségét felhasználtuk, a táptalajból 4 mm belső lyukátmérőjű steril dugófúróval két agar hengert vágunk ki a vizsgálatokhoz. A minták előkészítése és bomlástermékek meghatározása TLC-vel, "Az ochratoxin termelés vizsgálata TLC-vel" c. részben leírtaknak megfelelően történt.

2. 6. KÜLÖNBÖZŐ VEGYÜLETEK HATÁSA AZ OCHRATOXIN TERMELÉSRE

A vizsgálatot az *A. albertensis* ATCC 58745 törzsével végeztük. A vegyületek hatása OA termelő képességére koncentráció függvénye lehet, ezért ennek tisztázásához azokat különböző koncentrációkban alkalmazva vizsgáltuk a hatásukat. A vizsgálandó vegyületeket (8. táblázat) az alapján választottuk ki, hogy irodalmi adatok szerint serkentő vagy gátló hatással vannak az *A. ochraceus* OA, illetve az *A. flavus* aflatoxin termelő képességére. A vegyületeket megfelelő mennyiségeit 2-2 ml YES tápoldatba mértük, majd az *A. albertensis* ATCC 58745 törzs 10^7 konídium/ml koncentrációjú szuszpenziójának 50-

50 µl-ével leoltottuk, majd 3 napos inkubáció után a toxint diklórmetánnal extraháltuk TLC-vel vizsgáltuk hatásukat az ochratoxin termelés mértékére.

8. táblázat. A vizsgált vegyületek és alkalmazott koncentrációik

VEGYÜLET	KONCENTRÁCIÓ TARTOMÁNY	VEGYÜLET	KONCENTRÁCIÓ TARTOMÁNY
DICHLORVOS	1-500µg/ml	L-FENILALANIN	10-1000 µg/ml
KOFFEIN	50-1000 µg/ml	Na ₂ SeO ₃	10-1000 µg/ml
TRITON X-100	0.1-10 v/v %	NH ₄ MoO ₄	10-1000 µg/ml
LOVASZTATIN	10-1000 µg/ml	NaNO ₃	0.017-1.7 g/ml
SZALICILSAV	0.7-35 mg/ml	ZnSO ₄	10-1000 µg/ml
BÓRSAV	0.031-3.1 mg/ml	CCl ₄	10-1000 µg/ml
L-GLUTAMINSAV	10-1000 µg/ml	CERULENIN	1-1000 mg/ml
L-TIROZIN	10-1000 µg/ml		

2. 7. AZ OA TERMELŐ TÖRZSEK MÁSODLAGOS METABOLIT PROFILJÁNAK VIZSGÁLATA

A Czapek-Dox és a malátakivonatos táptalajon nevelt egy hetes telepekből 4 mm belső lyukátmérőjű steril dugófúróval agar hengereket vágunk ki. A darabok konídiumos felére kloroform:metanol 2:1 arányú elegyét cseppentettük, majd a vékonyréteglemez (UV₂₅₄ indikátort nem tartalmazó 0.2 mm szilikagél 60-nal borított 20x20 cm Merck alumínium lemez, Cat. No. 5553) kezdőpontjához nyomtuk és néhány perc elteltével eltávolítottuk onnan. Ezzel a módszerrel a sejten belüli másodlagos metabolitokat lehet azonosítani. A másodlagos metabolitok TLC-s meghatározásához a lemezeket TEF-ben futtattuk, majd szárítás után UV (254 és 360 nm) és látható fényben értékeltük (Filtenborg és mtsai, 1983, Paterson és mtsai, 1986).

2. 8. A PENÉSZGOMBÁK KIMUTATÁSÁRA ALKLAMAZOTT MÓDSZEREK

2. 8. 1. Ergoszterin feltárás hagyományos módszerrel

Az ergoszterintartalom meghatározásához 1g búzaőrleményt használtunk fel. A feltárást szerves oldószeres refluxszal végeztük, amelyet 80°C-on 75 ml etanol, 50 ml metanol, és 10 g KOH alkalmazásával hajtottunk végre (Schnürer, 1995). A KOH hatására

a mintákban jelenlevő egyéb zsírok elszappanosíthatók és eltávolíthatók, ezért a mintákat leszűrtük Whatman 3 szűrőpapírral. Ezután a szűrlethez 20 ml desztillált vizet adtunk, majd minden mintából 2×10 ml mennyiséget pipettáztunk ki. A minták mindegyikéhez további 2-2 ml desztillált vizet és mivel az ergoszterin n-hexánnal vagy n-pentánnal kivonható a vizes fázisból, mindegyikhez 3 ml n-hexánt adtunk, azokat 1 percig vortexeltük., majd a felülúszót csiszold dugós kémcsőbe gyűjtöttük. A n-hexános kezelést háromszor ismételtük meg, mert az első extrakcióval az ergoszterinnek csak kb. 75%-a vonható ki. Ezt követően az ergoszterin tartalmú mintákat súlyállandóságig szárítottuk, végül 1 ml MeOH-ban vettük fel és HPLC-vel határoztuk meg az ergoszterin mennyiségét. A méréshez használt készülék SYKAM HPLC S 1100, a detektor Linear Instruments Mod 202 UV típusú volt. BST Rutin C18 BD analitikai oszlopot (250 mm × 4 mm, 10 µm szemcseméret) használtunk. A mintafelvitelhez használt loop térfogata 20 µl volt, az izokratikus elúcióhoz ACN:MeOH (80%:20%) keverékével történt, áramlási sebesség 2 ml/min, a nyomás 6.8 Bar volt. Az eredmények értékeléshez SKI 202 analóg-digitális konvertert és Peak Simple szoftvert használtunk.

2. 8. 2. Ergoszterin feltárás mikrohullámú energiával

A feltárni kívánt *A. albertensis* elporított liofilizált micéliumból 250 mg-ot kimértünk csavaros tetejű "teflonbombacsőbe", majd 2.0 ml MeOH-t, illetve 0.5 ml 2 M KOH-t adtunk hozzá. A csöveket professzionális mikrohullámú készülékben (Labotron 500) 500 W teljesítményen, 60 másodpercig sugároztuk be. A mikrohullámú kezelést követően a csöveket szobahőmérsékletűre hűtöttük és tartalmukat 1.0 ml 1 N sósavval semlegesítettük. Az ergoszterin extrakcióját a vizes fázisból 3×2 ml n-hexánnal végeztük. A szerves fázis összegyűjtése után a mintákat bepároltuk, majd 1 ml ACN-ben vettük fel. A minták analízise nagyhatékonyságú folyadék kromatográfiával történt, amelyhez HP Chemstation szoftver vezérlésű Hewlett-Packard 1090 Series II típusú HPLC készüléket használtunk. Az ergoszterin mennyiségének kimutatására diódasoros UV és fluoreszcens detektort (HP1046A, gerjesztés: 330 nm emisszió: 450 nm) alkalmaztunk. Az analitikai oszlop BST Rutin C18 (250 x 4mm, 10 µm szemcseméret) (BioSeparation Techniques, Budapest) volt, az izokratikus elúcióhoz ACN:MeOH 80%:20% elegyét használtuk 1.5 ml/perc áramlási sebességgel, az injektált minta térfogata 5 µl volt. Az ochratoxin bontási kísérletek során szintén használtuk az ergoszterin mennyiségének meghatározásán alapuló biomassza mérést a biomassza változásának mérésére.

2. 9. GENOTÍPUSOS VIZSGÁLATOK

2. 9. 1. Nukleinsav izolálás (Leach és mtsai, 1986 nyomán, módosítva)

0.2 g liofilezett micéliumot dörzsmozsárban elporítottunk vagy kávédarálón ledaráltunk, 1.5 ml LETS pufferrel és 0.5 mm átmérőjű üveggyöngyökkel 1-3 percig kevertük. Ezután 1 ml PCI-t adtuk hozzá, és ismételt vortexelést követően 4°C-on 10 percig 3000 rpm-el centrifugáltuk. A felülúszóhoz kétszeres mennyiségű EtOH-t adtunk, a DNS-t 30 percig -70°C-on kifagyasztottuk, majd centrifugálással (10 perc, 3000 rpm, 4°C) kiülepítettük. A csapadékot vákuum alatt beszárítottuk és 800 µl TE-ben felszusszpendáltuk. Az így kapott DNS oldatot többszöri fenolozással, majd CI-vel tovább tisztítottuk. A DNS-t kétszeres mennyiségű EtOH-al kicsaptuk, végül 100 µl TE-ben szuszpendáltuk fel és további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

2. 9. 2. PCR reakció ITS szekvencia analízishez

100 µl reakcióelegy összetétele (White és mtsai, 1990):

200-200 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP

1-1 µM primer

10 µl reakciópuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 1% Triton X-100)

10 µl MgCl₂ (25 mM)

10 µl DNS (0.02 µg/µl)

2.5 U Taq-polimeráz (Promega)

39 µl steril desztillált víz

A reakcióelegyet elkeverés után 40 µl ásványi olajjal rétegeztük felül és egy PTC 100-60 típusú programozható PCR készülékbe (MJ Research Inc, Watertown, USA) helyeztük. A reakciót az alábbi paraméterek mellett végeztük:

94°C, 5 perc láncszétválasztás (elődenaturáció)

35 ciklus: 94°C, 1 perc láncszétválasztás (denaturáció)

55°C, 1 perc primerkötődés (annealing)

72°C, 2 perc lánchosszabbítás (elongáció)

72°C, 5 perc lánchosszabbítás (utóelongáció)

A vizsgált primerek szekvenciái:

ITS-1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS-4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

2. 9. 3. A 26S rDNS D1-D2 régiójának szekvenciaanalízise

A 26S rDNS D1-D2 régiójának szekvencia analízise Peterson (2000) módszere szerint történt. A β -tubulin gén szekvenciájának analízisét a Geiser és mtsai (1998) által kidolgozott módszer alapján végeztük.

2. 9. 4. A ketoszintáz és A C-metilációs domén szekvenciájának vizsgálata

A poliketid szintáz gén ketoszintáz domén analízisét az LC1 és LC2c (Bingle és mtsai, 1999), a C-metil-transzferáz domén vizsgálatát a Cmet1 és Cmet2 primerek alkalmazásával végeztük el (Nicholson és mtsai, 2001).

2. 9. 5. β -tubulin gén szekvenciaanalízise *A. viridinutans* izolátumokban

A β -tubulin gén szekvenciájának vizsgálatához a génszakaszt bena1 és benA2 primerekkel amplifikáltuk (Geiser és mtsai, 1998).

2. 9. 6. RAPD analízis

25 μ l reakcióelegy összetétele:

7.5 μ l CORE puffer

15.0 μ l COCKTAIL

2.5 μ l templát DNS (0.02 μ g/ μ l).

A reakcióelegyet 40 μ l ásványi olajjal rétegeztük felül, majd a PCR készülékbe helyeztük.

A reakciót az alábbi paraméterek mellett végeztük:

45 ciklus: 92°C, 1 perc (lánc szétválasztás)

35°C, 1 perc (primer kötődés)

72°C, 2 perc (lánc hosszabbítás)

A vizsgált primerek szekvenciái (Operon primer kit C):

OPC-01	5'-TTCGAGCCAG-3'
OPC-02	5'-GTGAGGCGTC-3'
OPC-03	5'-GGGGGTCTTT-3'
OPC-04	5'-CCGCATCTAC-3'
OPC-05	5'-GATGACCGCC-3'
OPC-06	5'-GAACGGACTC-3'
OPC-07	5'-GTCCCGACGA-3'
OPC-08	5'-ACCTGGCCAC-3'
OPC-09	5'-CTCACCGTCC-3'
OPC-10	5'-TGTCTGGGTG-3'
OPC-11	5'-AAAGCTGCGG-3'
OPC-12	5'-TGTCATCCCC-3'
OPC-13	5'-AAGCCTCGTC-3'
OPC-14	5'-TGCGTGCTTG-3'
OPC-15	5'-GACGGATCAG-3'
OPC-16	5'-CACACTCCAG-3'
OPC-17	5'-TTCCCCCCAG-3'
OPC-18	5'-TGAGTGGGTG-3'
OPC-19	5'-GTTGCCAGCC-3'
OPC-20	5'-ACTTCGCCAC-3'

2. 9. 7. RFLP analízis

Totál DNS emésztése 100 µl reakcióelegyben:

10 µl templát DNS (0.02 µg/µl)

10 µl 10×enzimpuffer

78 µl steril desztillált víz

1 µl *Hae*III

1 µl *Sma*I

A totál DNS emésztést 12 órán keresztül 37°C-on végeztük.

Mitokondriális DNS emésztése 30 µl reakcióelegyben:

10 µl templát DNS

2 µl 10×enzimpuffer

16 µl steril desztillált víz

1 µl *HaeIII*

1 µl *SmaI*

A mitokondriális DNS emésztést 2 órán keresztül 37°C-on végeztük.

Az emésztések során használt enzimek felismerőhelyei:

HaeIII 5'-GG/CC-3'

SmaI 5'-CCC/GGG-3'

Az emésztőelegyhez kétszeres mennyiségű abszolút EtOH-t adtunk, összeráztuk, ezután 20 percig -20°C-on a DNS-t kifagyasztottuk, majd centrifugálással (10 perc, 10000 rpm, 4°C) kiülepítettük. A csapadékot vákuum alatt beszárítottuk, 17 µl steril desztillált vízben felfuszpendáltuk.

2. 9. 8. Nukleinsavak elválasztása gélelektroforézissel

A nukleinsavak elválasztását 0.8 vagy 1%-os agaróz/TAE gélben elektroforézissel végeztük el. A géleket etidium-bromiddal festettük és UV fényben értékeltük. Molekulasúly markerként leggyakrabban Hind III vagy Hind III-EcoR1 emésztett λ DNS-t használtunk.

2. 9. 9. Nukleinsavak visszaizolálása agaróz gélből

Az amplifikált PCR terméket tartalmazó gélkockát kivágtuk, Genelute (Supelco) oszlopon centrifugálással (10 perc, 12000 rpm, 20°C) átszívattuk, majd kétszeres mennyiségű EtOH és tizedrésnyi Na-acetát hozzáadásával kicsaptuk. A DNS-t -70°C-on kifagyasztottuk, centrifugálással ülepítettük, beszárítottuk, végül 10 µl desztillált vízbe felvettük.

2. 9. 10. DNS szekvenálás

A DNS fragmentumok szekvenálása az MTA Szegedi Biológiai Központban történt ABI 373A DNS automata szekvenáló készülékkel.

2. 9. 11. Filogenetikai analízis

A morfológiai, fiziológiai és szekvencia vizsgálatok eredményeit filogenetikai analízishez használtuk fel, amelyet a PHYLIP szoftvercsomag 3.57c verziójával végeztünk el (Felsenstein, 1995). A adatokat lineáris mátrixokká konvertáltuk a PHYLTOOLS program segítségével (Buntjer, 1997). Ezen mátrixok alapján genetikai távolsági mátrixokat hoztunk létre, melyek inputként szolgáltak a programcsomag NEIGHBOR programjához. A fák gyökereztetéséhez minden esetben kulcsoportot alkalmaztunk.

A szekvenciákat a CLUSTAL-X programmal illesztettük és szekvencia mátrixok analízisét a PHYLIP programcsomag DNAPARS programjával végeztük, míg a neighbor-joining analízishez a NEIGHBOR programot használtuk. A kapott törzsfák megbízhatóságát bootstrap analízissel vizsgáltuk a SEQBOOT, MIX, CONSENSE programok alkalmazásával végeztük. A Bremer értékeket a SEPAL programmal határoztuk meg (Salisbury, 1999).

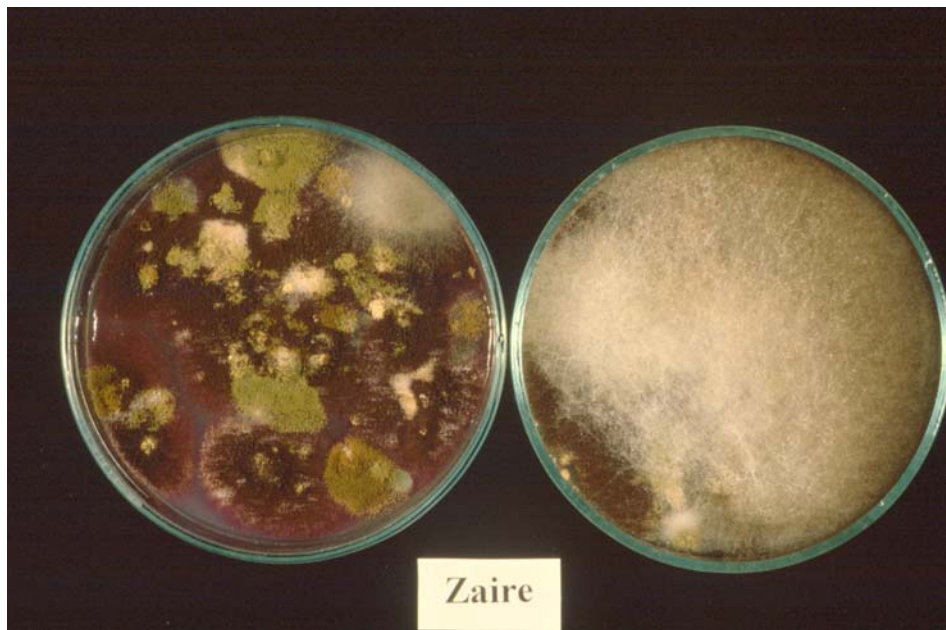
3. EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS ÉRTÉKELÉS

3. 1. Ochratoxin termelő *Aspergillus* törzsek izolálása élelmiszerekről

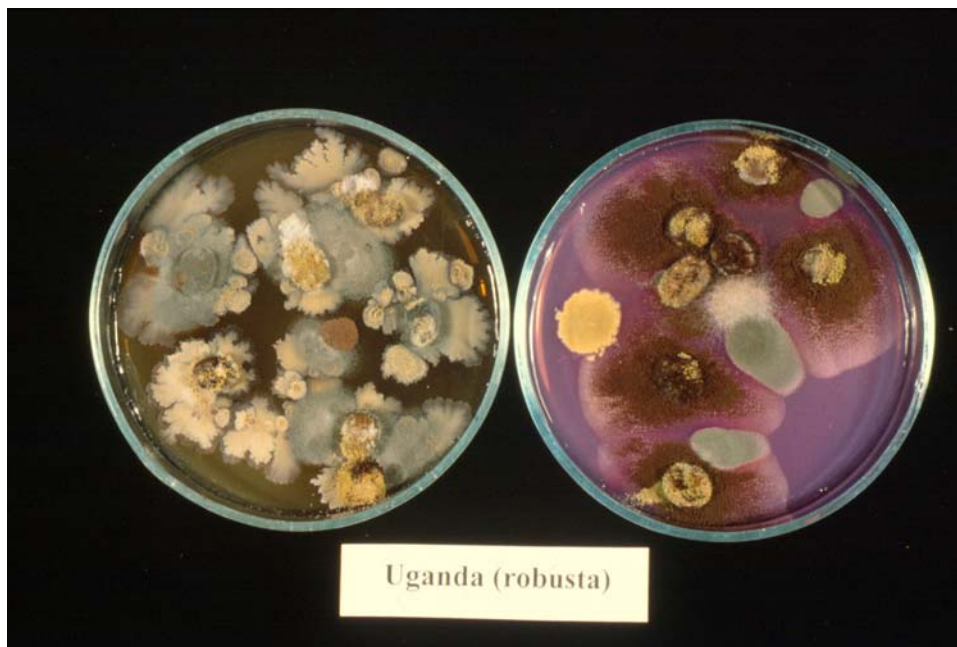
Munkánk során 7 zöld kávébab mintát, és számos fűszerfélét, például chilipaprikát, ánizst, curryt, őrölt paprikát, borsot, vaníliát, illetve müzlit, pörkölt szóját és tapétát vizsgáltunk. A maláta kivonatos táptalajon inkubált minták esetében a lassabb növekedésű *Aspergillus* fajokat általában túlnőtték a járomspórás gombák, ami különösen a zairei kávé minta esetében szinte lehetetlenné tette a fajok azonosítását és izolálását (9. ábra). A DBR táptalaj összetevői lassítják a járomspórás gombák növekedését (10, 11. ábra), így 1 hetes inkubálás után az *Aspergillus* fajok könnyen izolálhatóak. Az élelmiszerek OA tartalmát és a róluk izolált *Aspergillus* fajokat mutatja a 9. táblázat.

Az izolált -és gyűjteményes- törzsek OA termelő képességét először ELISÁ-val vizsgáltuk. Az izolátumok egy része kis mennyiségű, 0.1-0.6 µg/ml OA termelésére képes, aminek meghatározására az ELISA a legmegfelelőbb módszer, így nem szükséges a szűrletek töményítése. A nagy mennyiségű, 100-1000 µg/ml OA termelő törzseket TLC-vel vizsgáltuk (10. táblázat).

A vizsgált *Aspergillus* izolátumok közül néhány *A. ochraceus* és *A. niger* törzsnél észleltünk ochratoxintermelést a Toxiklon ochratoxin detektáló ELISA kittel. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az élelmiszerek OA szennyezettségének nem az *A. ochraceus* az egyedüli forrása, hanem a fekete *Aspergillus* izolátumok között is van több OA termelő. A legszennyezettebb zairei kávé mintából nem tudtunk OA termelő *Aspergillus* törzseket izolálni.



9. ábra. A zairei zöld kávébab mikrobiótája MO és DRB táptalajon. A jobboldali csészén láthatóak *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus* tenyészetek, a jobboldalon ezek növekedését a járomspórás gombák akadályozzák.



10. ábra. Az ugandai zöld kávébab mikrobiótája MO és DRB táptalajon. A jobboldali csészén láthatóak *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. tamarii* tenyészetek, a baloldalin ezek növekedését a járomspórás gombák akadályozzák.



11. ábra. A kakaóbab mikrobiótája MO és DRB táptalajon. Az ismeretlen eredetű kakaóbabról *A. fumigatus*-t izoláltunk.

9. táblázat. A zöld kávéminták és egyéb élelmiszerek OA tartalma és mikrobiótája
(az OA termelő izolátumok vastagon szedve láthatók)
(ND=not determined, a termelt OA mennyiségét nem határoztuk meg)

Termény eredete	OA ($\mu\text{g/kg}$)	Izolált <i>Aspergillus</i> fajok
zöld kávé (Brazília)	6.0	<i>A. niger</i>
zöld kávé (Brazília, Santos)	2.5	<i>A. niger</i>, <i>A. ochraceus</i>, <i>A. tamarii</i>
zöld kávé (Guatemala)	<1	<i>A. niger</i>, <i>A. ochraceus</i>, <i>A. tamarii</i>, <i>A. fumigatus</i>, <i>A. flavus</i>
zöld kávé (Uganda, robusta)	2.0	<i>A. niger</i>, <i>A. ochraceus</i>, <i>A. tamarii</i>, <i>A. fumigatus</i>, <i>A. flavus</i>
zöld kávé (Uganda)	4.8	<i>A. niger</i>, <i>A. ochraceus</i>, <i>A. fumigatus</i>, <i>A. flavus</i>
zöld kávé (Vietnam)	3.5	<i>A. niger</i>, <i>A. fumigatus</i>
zöld kávé (Zaire)	9.0	<i>A. niger</i>, <i>A. ochraceus</i>, <i>A. fumigatus</i>
kakaóbab (?)	ND	"<i>A. fumigatus</i>"
chilipaprika (?)	ND	<i>A. niger</i>, <i>A. ochraceus</i>, <i>A. fumigatus</i>
müzli (Magyarország)	ND	<i>A. niger</i>, <i>A. fumigatus</i>, <i>A. flavus</i>, <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.
sage (Anglia)	ND	<i>A. niger</i>
kókuszosogyoró (Vietnam)	ND	<i>A. niger</i>
ogyoró (USA)	ND	<i>A. niger</i>, <i>A. ochraceus</i>, <i>A. fumigatus</i>, <i>Fusarium</i> sp.
ánizs (Olaszország)	ND	<i>A. niger</i>
curry por (India)	ND	<i>A. niger</i>, <i>A. flavus</i>
pecandió (Hollandia)	ND	<i>A. niger</i>, <i>A. flavus</i>
száritott paszternák (Magyarország)	ND	<i>A. niger</i>, <i>A. ochraceus</i>, <i>A. flavus</i>
őrlött paprika (Dél-Afrika)	ND	<i>A. niger</i>, <i>A. flavus</i>, <i>Alternaria</i>, <i>Fusarium</i> sp., <i>Trichotecium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.
tapéta (Magyarország)	ND	<i>A. niger</i>
bors(?)	ND	-
vanília(?)	ND	-

10. táblázat. Az OA termelőképeség vizsgálata során alkalmazott *Aspergillus* fajok

Faj	Gyűjteményes kód	OA termelőképeség
<i>A. albertensis</i>	ATCC 58745	250 $\mu\text{g/ml}$
<i>A. alliaceus</i>	FRR 4340	-
<i>A. aurata</i>	NRRL 4379	-
<i>A. aureola</i>	NRRL 2391	-
<i>A. botucatensis</i>	CBM FA 0672	?
<i>A. brevipes</i>	NRRL 2439	-
<i>A. bridgeri</i>	RMF 7745	-

<i>A. carbonarius</i>	IMI 041875	0.06-0.08µg/ml
<i>A. duricaulis</i>	IMI 217288	-
<i>A. fennelliae</i>	NHL 2953	-
<i>A. fennelliae</i>	NRRL 5534	-
<i>A. fennelliae</i>	NRRL 5535	-
<i>A. fischeri</i>	NRRL A-7223	-
<i>A. fischerianus</i>	NRRL A-7223	-
<i>A. fumigatus</i>	FK3	-
<i>A. fumigatus</i>	NCAIM F 056	-
<i>A. fumigatus</i>	NRRL 163	-
<i>A. fumigatus</i>	SZMC 1012	-
<i>A. fumigatus</i>	SZMC 1058	-
<i>A. fumigatus</i>	SZMC 1180	-
<i>A. fumigatus</i> var. <i>ellipticus</i>	NRRL 5109	-
<i>A. fumigatus</i> mut. <i>helvola</i>	NRRL 174	-
<i>A. fumigatus</i> var. <i>acolumnaris</i>	NRRL 5587	-
<i>A. hiratsukae</i>	IMI 349860	-
<i>A. hiratsukae</i>	NRRL 3008	-
<i>A. hiratsukae</i>	NRRL 3009	-
<i>A. japonicus</i>	JHC 564	-
<i>A. multiplicatus</i>	CBM FA 0710	?
<i>A. muricatus</i>	IMI 368521	-
<i>A. nidulans</i>	7-143	-
<i>A. nidulans</i>	NRRL 4992	-
<i>A. niger</i>	B6	+
<i>A. niger</i>	chili	+
<i>A. niger</i>	curry	+
<i>A. niger</i>	diól	+
<i>A. niger</i>	JHC 607	-
<i>A. niger</i>	CBS 120.49	-
<i>A. niger</i>	paszternák	+
<i>A. niger</i>	sage1	+
<i>A. niger</i>	sage2	+
<i>A. nomius</i>	IMI 331920	-
<i>A. obscurus</i>	NCAIM F 6601189	-
<i>A. ochraceus</i>	FRR 3815	-
<i>A. ochraceus</i>	FRR 3846	240 µg/ml
<i>A. ochraceus</i>	FRR 543	+
<i>A. paulistensis</i>	CBM FA 0690	?
<i>A. primulinus</i>	CBM FA 0685	?
<i>A. pseudofischeri</i>	NRRL 3946	-
<i>A. quadricinctus</i>	IMI 058374	-
<i>A. sclerotiorum</i>	NRRL 4491	0.8-1µg/ml
<i>A. sepultus</i>	ATCC 58705	-
<i>A. spathulata</i>	NHL 2948	-
<i>A. spinosus</i>	NRRL 3435	-
<i>A. stramineus</i>	NRRL 4652	-
<i>A. tatenoi</i>	CBM FA 0022	?

<i>A. udagawae</i>	CBM FA 0702	?
<i>A. udagawae</i>	CBM FA 0703	?
<i>A. unilateralis</i>	NRRL 577	-
<i>A. versicolor</i>	SZMC 560	-
<i>Aspergillus sp.</i>	FRR 1266	-
<i>Aspergillus sp.</i>	NRRL 4179	?
<i>Aspergillus sp.</i>	JV 3	+

- OA-t nem termelő törzsek

+ termel OA-t, de mennyiségét nem határoztuk meg

3. 2. A KINETIKAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

3. 2. 1. Az ochratoxin termelés kinetikájának vizsgálata *Aspergillus* fajokkal

Az *Aspergillus* nemzetséget alkotó fajok fenotipikus, fiziológiai és genetikai szempontból rendkívül sokfélék, ami megmutatkozik az OA termelésükben is. Az *A. niger* (Abarca és mtsai, 1994) és a *P. verrucosum* (Walbeek és mtsai, 1969) esetében irodalmi adatokat használtunk fel. A vizsgálatban résztvevő törzseket a 11. táblázatban foglaltam össze.

Az *A. melleus*, *A. ochraceus* NRRL 3174, *P. verrucosum* és az *A. albertensis* izolátuma 0.1-1 mg/ml OA termelésére képes volt YES tápoldatban. Ezeket a törzseket ezután "nagytermelőnek" nevezem. A két *A. carbonarius*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger* és az *A. ochraceus* O4 izolátumok 100-590 ng/ml OA-t termelt, amiket a továbbiakban "kistermelőknek" hívok.

A "nagytermelő" izolátumok közül az *A. ochraceus* NRRL 3174 törzs esetében a fermentlében mérhető OA szint a hetedik napon érte el maximumát (12. ábra). A *P. verrucosum* izolátum esetében a legmagasabb OA szintet a tizedik napon mértük. Ezután mindkét esetben az OA szint egyenletes csökkenését tapasztaltuk. Az *A. albertensis* és az *A. melleus* izolátumok szintén a hetedik napon érték el OA termelésük maximumát és a fermentlé OA szintje az inkubáció további napjain sem csökkent. Mindkét izolátum esetében megállapítottuk, hogy azok még 21 napos inkubáció után sem termeltek kevesebb OA-t (kb. 250 µg/ml), ezért ezeket az izolátumokat konstitutív OA termelőknél tekinthetjük és az *A. albertensis* ATCC 58745 törzset felhasználtuk más, nagy mennyiségű ochratoxint igénylő kísérletekhez és további kinetikai vizsgálatokhoz.

A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy az inkubációs idő a különböző izolátumok esetében eltérő hatással van az OA termelésre. A "kistermelők" közül az *A. awamori*, *A.*

foetidus, *A. niger* tenyésztésében a hetedik napon volt legmagasabb a tápközeg OA szintje, míg mindkét *A. carbonarius* és az *A. ochraceus* O4 a tizedik napon termelte legnagyobb mennyiségben a toxint (13. ábra). Az *A. foetidus*, *A. carbonarius* és *A. ochraceus* O4 izolátumok esetében a tizedik napon hirtelen csökkenni kezdett a termelt OA mennyisége, ami valószínűleg amiatt következett be, hogy a tenyészetek a tápközeg nitrogéntartalékait elhasználták és a további asszimilációs folyamataikhoz az OA molekula fenil-alanin csoportját használták fel nitrogénforrásként.

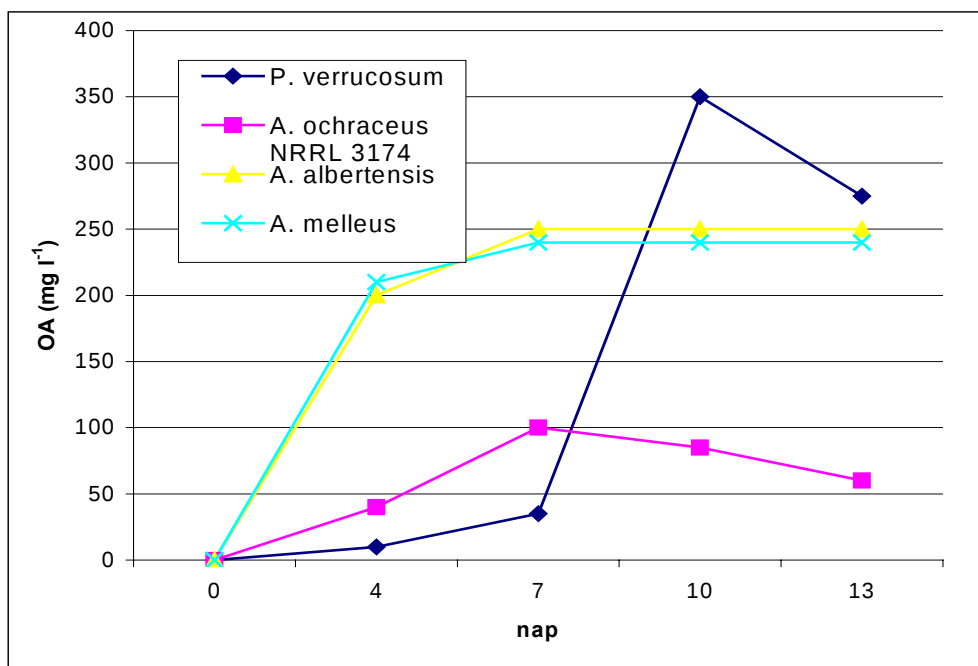
11. táblázat. Az OA termelés kinetikájának vizsgálatában szereplő törzsek

Faj	Gyűjteményes kód és származás	OA termelés(ng/ml) ^a
<i>A. albertensis</i>	ATCC 58745	3×10^5
<i>A. awamori</i>	NRRL 311	120
<i>A. carbonarius</i> (1)	IMI 041875	100
<i>A. carbonarius</i> (2)	N1 (J. F. Peberdy)	150
<i>A. foetidus</i>	CBS 618.78	100
<i>A. melleus</i>	IMI 257368	3×10^5
<i>A. niger</i>	A136 (CECT20157, M.L. Abarca)	590 ^b
<i>A. ochraceus</i>	NRRL 3174	1×10^5
<i>A. ochraceus</i>	O4 (zöld kávé, Uganda)	500
<i>P. verrucosum</i>	ATCC 18411	5×10^5 ^c

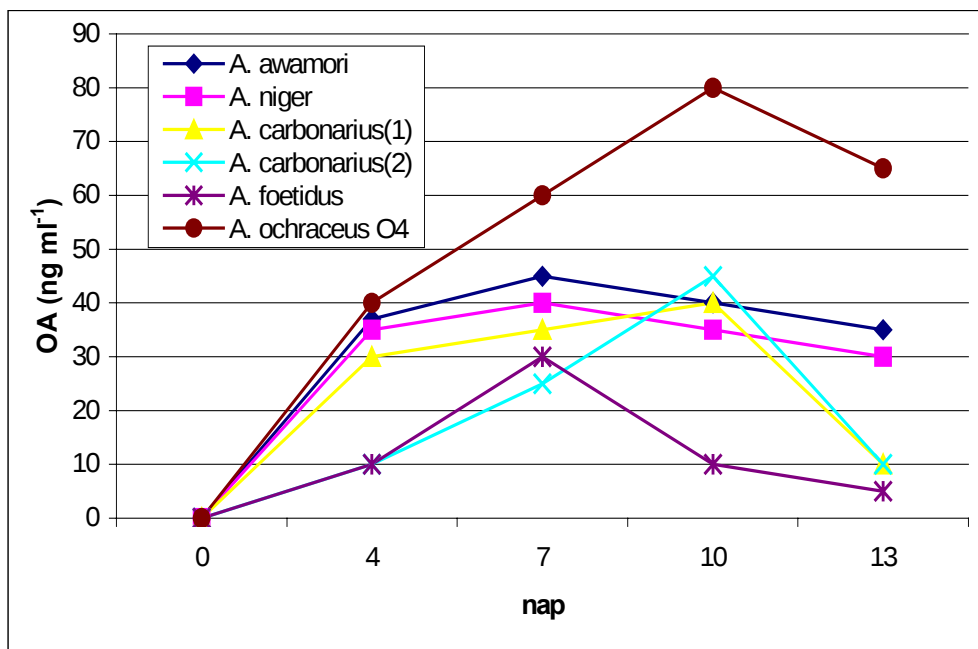
^a YES tápoldatban termelt legnagyobb mennyiség

^b Abarca és mtsai (1994)

^c Walbeek és mtsai (1969)



12. ábra. A "nagytermelő" izolátumok OA termelésének kinetikája. A vizsgált *Aspergillus* izolátumok közül az *A. melleus* IMI 257368 és az *A. albertensis* ATCC 58745 termelt legnagyobb mennyiségben OA-t.



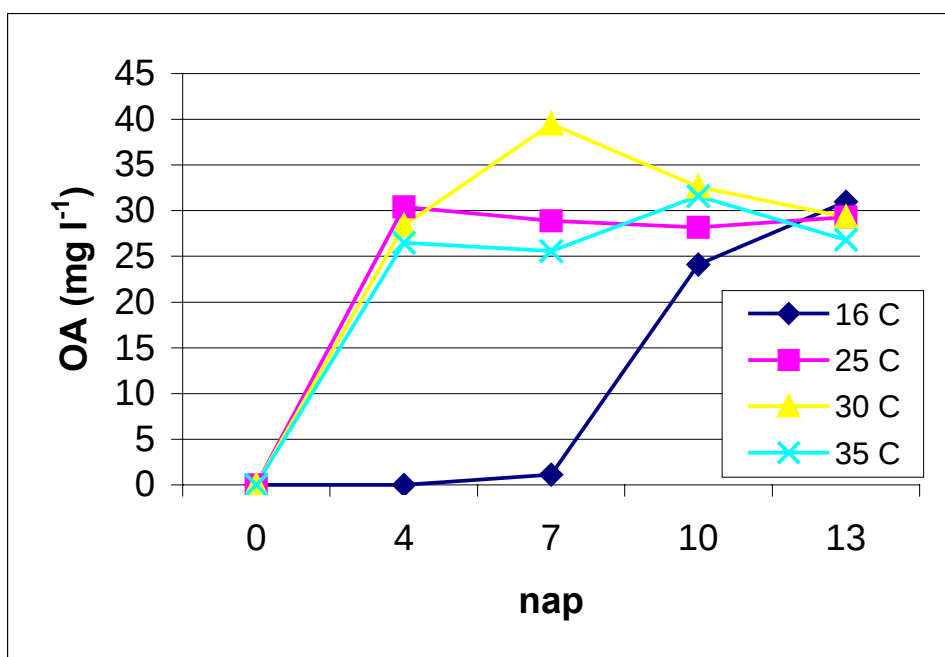
13. ábra. A "kistermelő" izolátumok OA termelésének kinetikája.

3. 2. 2. Az *A. albertensis* ATCC 58745 OA termelésének hőmérsékletfüggése és kinetikája

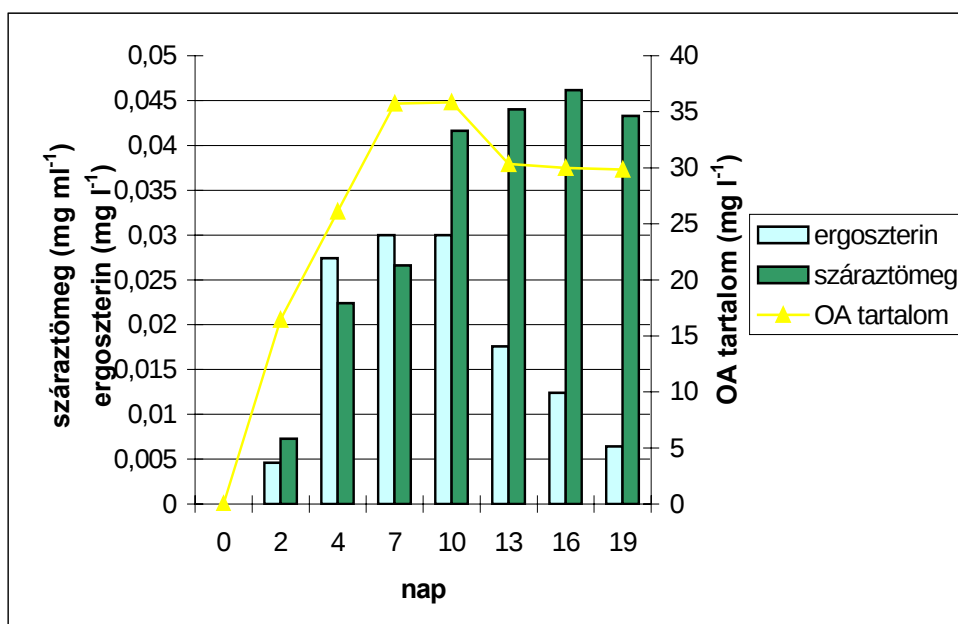
Az *A. albertensis* ATCC 58745 izolátumot YES tápoldatban tenyésztettük, mivel ebben a közegben termel legnagyobb mennyiségben OA-t. A kísérlet célja az OA termelés hőmérsékleti optimumának megtalálása volt. A tenyészeteket 19 napig inkubáltuk 16, 25, 30, 35°C-on (14. ábra). A vizsgált törzs 30°C-on inkubálva a hetedik napon termelte a legnagyobb mennyiségű OA-t, majd kis mértékű visszaesés volt tapasztalható, de a 10. naptól kezdve a tápközeg OA szintje kb. 30 µg/ml értéken állandósult. 16°C-on a toxintermelés lassan indult, de a 7. naptól kezdve hirtelen emelkedés volt tapasztalható a fermentlé OA szintjében, a 10. naptól egyre kisebb mértékben. 25°C-on és 35°C-on hasonló tendenciát mutatott az OA szint változása. A 3. napig növekedést tapasztaltunk, majd a 4. naptól kezdve a kísérlet befejezéséig megközelítőleg azonos mennyiségű OA-t tudtunk kimutatni a tápközegből. Az *A. albertensis* ATCC 58745 törzs OA termeléséhez az optimális hőmérséklet 30°C, vagyis a növekedési optimumával megegyezett.

Az *A. albertensis* ATCC 58745 törzs OA termelésének 30°C-on végzett vizsgálatát a micélium száraztömegének és a micélium ergoszterin tartalmának értékeivel hasonlítottuk össze (15. ábra). Az ergoszterin tartalom és az OA mennyiségének változása az inkubáció alatt hasonló tendenciát mutatott. Mindkét érték a hetedik napig nőtt, ezt követően mindkettő csökkenni kezdett. A micélium száraztömeg a 16. napig növekedett, majd a közeg tápanyagainak felhasználása után a tenyészet előregedésével lassan csökkent.

Az eredményekből látható, hogy az *A. albertensis* ATCC 58745 tenyészet esetében az OA tartalom és az ergoszterin mennyisége a 7-10. napig hasonlóképpen változik. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az élelmiszerek és gabonafélék ergoszterintartalma - meghatározott körülmények között és ideig - információt szolgáltat a termelt OA értékére. Ennek a megfigyelésnek az a gyakorlati jelentősége, hogy az ergoszterin mennyiségének gyors meghatározása elkerülhetővé teheti az OA szennyezettség mérését, valamint új lehetőséget nyújt az élelmiszerek mikrobiológiai kockázatának becslésére.



14. ábra. Az inkubációs hőmérséklet hatása az *A. albertensis* ATCC 58745 OA termelésének mértékére. Az OA termelés 30°C-on volt a legnagyobb.



15. ábra. Az *A. albertensis* ATCC 58745 OA termelése, micélium száraz-tömege és ergoszterin tartalma közötti összefüggés. A OA és az ergoszterin mennyiségének változása a 10. napig hasonló tendenciát mutat.

3. 2. 3. Különböző vegyületek hatása az *A. albertensis* ATCC 58745 OA termelésére

Azt tapasztaltuk, hogy számos vegyület, mely az irodalomban fellelhető kutatási eredmények szerint gátolja az OA bioszintézist *A. ochraceus*ban (12. táblázat), nincs hatással az *A. albertensis* OA termelésére. Így pl. a koffein nem befolyásolta *A. albertensis*ben az OA termelést, míg *A. ochraceus*ban gátolta (13. táblázat). Ezek az adatok felvetik annak a lehetőségét, hogy a két faj között az OA bioszintézisében, illetve annak szabályozásában jelentős eltérések lehetségesek. Ennek tisztázására további kísérletek szükségesek.

12. táblázat. A vizsgált vegyületek hatása az OA szintézisre *A. ochraceus*ban, illetve az aflatoxin (AT) bioszintézisre *A. flavus*ban és *A. parasiticus*ban

Vegyületek	Ochratoxin termelés	Aflatoxin termelés	
DICHLORVOS	-	-	Zaika és Buchanan, 1987, Wu és Ayres, 1974
BÓRSÁV	ND	ND	-
CERULENIN	ND	+	Fanelli és mtsi, 1983
ETANOL	ND	+	Maggon és mtsi, 1977
L-FENIL-ALANIN	-?	0	Ferreira, 1968
L-GLUTAMINSÁV	+	0	Ferreira, 1968
KOFFEIN	-	-	Buchanan és mtsi, 1982, 1983
LOVASZTATIN	ND	ND	-
METANOL	ND	ND	Maggon és mtsi, 1977
Mo	ND	0	Zaika és Buchanan, 1987
NO ₃ ⁻	ND	-	Zaika és Buchanan, 1987
NONIDET P-40	ND	-	Rodriguez és Mahoney, 1994
SZALICILSÁV	ND	-	Zaika és Buchanan, 1987
Se	ND	+/-	Zaika és Buchanan, 1987
SZÉNTETRAKLORID	ND	+	Zaika és Buchanan, 1987
L-TIROZIN	ND	0	Ferreira, 1968
TRITON X-100	ND	-	Rodriguez és Mahoney, 1994
Zn ²⁺	ND	+	Steele és mtsi, 1973

(-) gátol

(+)serkent

(+/-) kis koncentrációban serkent, nagyobb koncentrációban gátol

(0) nincs hatás

(ND) nem vizsgálták

13. táblázat. Különböző koncentrációkban alkalmazott vegyületek hatása *A. albertensis* ATCC 58745 OA termelő képességére

Vegyületek	Koncentráció	OA termelés	Vegyületek	Koncentráció	OA termelés
DICHLORVOS	1 µg/ml	+	L-GLUTAMINSÁV	10 µg/ml	+++
	5 µg/ml	+		100 µg/ml	+++
	10 µg/ml	+		1000 µg/ml	+++
	50 µg/ml	+	L-TIROZIN	10 µg/ml	+++
	100 µg/ml	+		100 µg/ml	+++
	200 µg/ml	+		1000 µg/ml	+++
	500 µg/ml	+	L-FENILALANIN	10 µg/ml	+++
KOFFEIN	50 µg/ml	++		100 µg/ml	+++
	100 µg/ml	++		1000 µg/ml	+++
	250 µg/ml	++	Na ₂ SeO ₃	10 µg/ml	+
	500 µg/ml	++		100 µg/ml	++
	750 µg/ml	++		1000 µg/ml	+++
	1000 µg/ml	++	NH ₄ MoO ₄	10 µg/ml	+++
TRITON X-100	0.1 v/v %	+++		100 µg/ml	+++
	1 v/v %	++		1000 µg/ml	+++
	10 v/v %	++	NaNO ₃	17 mg/ml	+++
LOVASZTATIN	10 µg/ml	-		170mg/ml	+++
	50 µg/ml	+		1.7 g/ml	+++
	100 µg/ml	+	ZnSO ₄	10 µg/ml	+++
	250 µg/ml	+		100 µg/ml	+++
	500 µg/ml	+		1000 µg/ml	+++
	1000 µg/ml	+	CCl ₄	10 µg/ml	+++
SZALICILSÁV	700 µg/ml	++		100 µg/ml	+++
	3.5 mg/ml	++		1000 µg/ml	+++
	7.0 mg/ml	++	CERULENIN	1 mg/ml	++
	35 mg/ml	++		10 mg/ml	+++
BÓRSÁV (H ₃ BO ₃)	31 mg/ml	+++		100 mg/ml	+++
	310 mg/ml	+++			
	3.1g/ml	+++			

(-) az *A. albertensis* ATCC 58745 izolátum OA termelő képességét teljesen gátolta, (+) kismértékben gátolta a vizsgált izolátum OA termelését, (++)/(+++) nincs számottevő hatása a vegyületnek a vizsgált izolátum OA termelésére

3. 2. 4. Az OA bontás képességének vizsgálata *Aspergillus* izolátumokban

Munkánk során az *Aspergillus* nemzetség 6 különböző szekciójába tartozó több, mint 60 izolátum ochratoxin bontó képességét vizsgáltuk (14. táblázat). Az OA molekulában található peptidkötés karboxi-peptidáz hatására bomlik, fenil-alanin és ochratoxin α keletkezésével. Az ochratoxin α nem mérgező hatású vegyület, amely TLC-vel az OA mellett kimutatható, a lemezen UV fény alatt kékeslilán fluoreszkáló foltot eredményez. A nagyszámú vizsgált izolátum közül csak az *A. fumigatus*, *A. japonicus* és az *A. niger* fajhoz

tartozó törzsek között találtunk olyanokat, amelyek tíz napos inkubálás során átalakították az OA-t ochratoxin α -vá.

Az *A. niger* faj rendelkezik a U. S. Food and Drug Administration által a GRAS (Generally Regarded As Safe) státusszal, vagyis az "általában biztonságosnak tekinthető" minősítéssel, tehát az *A. niger* törzsek által termelt enzimek (amiláz) és savak (citromsav) felhasználhatók élelmiszeradalékként, ezért az OA bontás kinetikájának vizsgálatához csak az *A. niger* CBS 120.49 izolátumot használtuk.

14. táblázat. A vizsgált *Aspergillus* fajok OA termelő és lebontó képessége

Faj	Gyűjteményes kód	OA bontó képesség
<i>A. albertensis</i>	ATCC 58745	-
<i>A. alliaceus</i>	FRR 4340	-
<i>A. aurata</i>	NRRL 4379	-
<i>A. aureola</i>	NRRL 2391	-
<i>A. botucatensis</i>	CBM FA 0672	-
<i>A. brevipes</i>	NRRL 2439	-
<i>A. bridgeri</i>	RMF 7745	-
<i>A. carbonarius</i>	IMI 041875	-
<i>A. duricaulis</i>	IMI 217288	-
<i>A. fennelliae</i>	NHL 2953	-
<i>A. fennelliae</i>	NRRL 5534	-
<i>A. fennelliae</i>	NRRL 5535	-
<i>A. fischeri</i>	NRRL A-7223	-
<i>A. fischerianus</i>	NRRL A-7223	-
<i>A. fumigatus</i>	FK3	-
<i>A. fumigatus</i>	NCAIM F 056	-
<i>A. fumigatus</i>	NRRL 163	-
<i>A. fumigatus</i>	SZMC 1012	-
<i>A. fumigatus</i>	SZMC 1058	-
<i>A. fumigatus</i>	SZMC 1180	+
<i>A. fumigatus</i> var. <i>ellipticus</i>	NRRL 5109	-
<i>A. fumigatus</i> mut. <i>helvola</i>	NRRL 174	+
<i>A. fumigatus</i> var. <i>acolumnaris</i>	NRRL 5587	+
<i>A. hiratsukae</i>	IMI 349860	-
<i>A. hiratsukae</i>	NRRL 3008	-
<i>A. hiratsukae</i>	NRRL 3009	-
<i>A. japonicus</i>	JHC 564	+/-
<i>A. multiplicatus</i>	CBM FA 0710	-
<i>A. muricatus</i>	IMI 368521	-
<i>A. nidulans</i>	7-143	-
<i>A. nidulans</i>	NRRL 4992	-
<i>A. niger</i>	B6	-
<i>A. niger</i>	chili	-
<i>A. niger</i>	curry	-

<i>A. niger</i>	diól	-
<i>A. niger</i>	JHC 607	+/-
<i>A. niger</i>	CBS 120.49	+
<i>A. niger</i>	paszternák	-
<i>A. niger</i>	sage1	-
<i>A. niger</i>	sage2	-
<i>A. nomius</i>	IMI 331920	-
<i>A. obscurus</i>	NCAIM F 6601189	-
<i>A. ochraceus</i>	FRR 3815	-
<i>A. ochraceus</i>	FRR 3846	-
<i>A. ochraceus</i>	FRR 543	-
<i>A. paulistensis</i>	CBM FA 0690	-
<i>A. primulinus</i>	CBM FA 0685	-
<i>A. pseudofischeri</i>	NRRL 3946	-
<i>A. quadricinctus</i>	IMI 058374	-
<i>A. sclerotiorum</i>	NRRL 4491	-
<i>A. sepultus</i>	ATCC 58705	-
<i>A. spathulata</i>	NHL 2948	-
<i>A. spinosus</i>	NRRL 3435	-
<i>A. stramineus</i>	NRRL 4652	-
<i>A. tatenoi</i>	CBM FA 0022	-
<i>A. udagawae</i>	CBM FA 0702	-
<i>A. udagawae</i>	CBM FA 0703	-
<i>A. unilateralis</i>	NRRL 577	-
<i>A. versicolor</i>	SZMC 560	-
<i>Aspergillus</i> sp.	FRR 1266	-
<i>Aspergillus</i> sp.	NRRL 4179	-
<i>Aspergillus</i> sp.	VJ 3	-

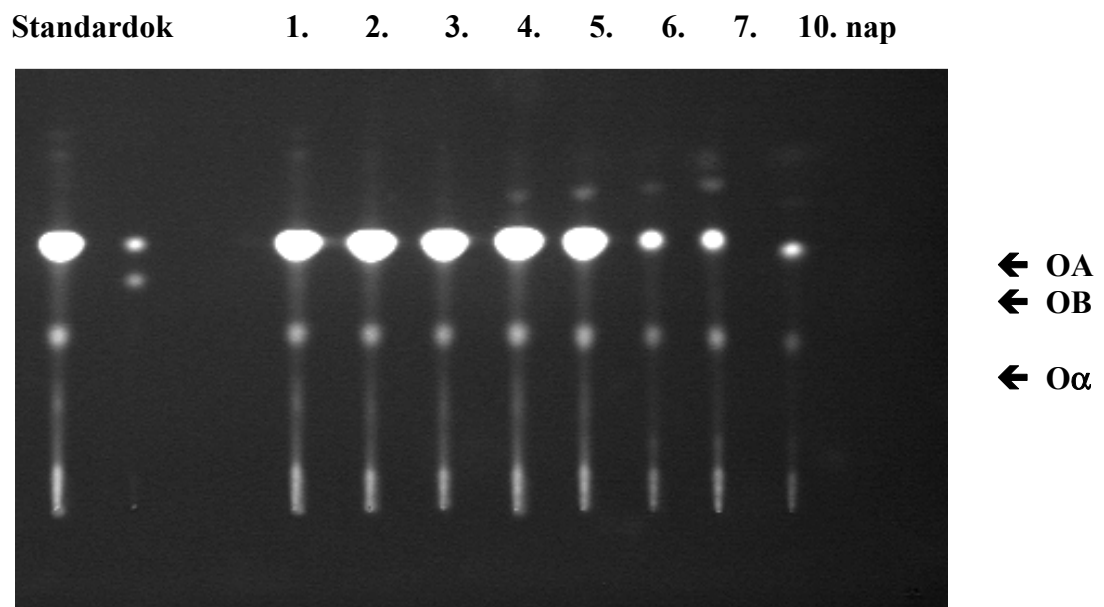
(+) OA bontó képességgel rendelkezik

(+/-) OA-t részlegesen képes bontani

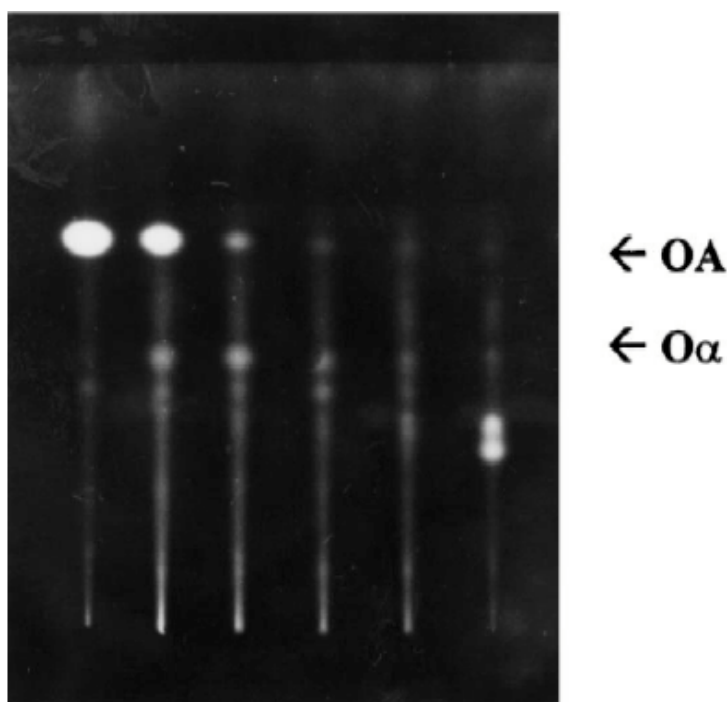
(-) OA bontó képességgel nem rendelkezik

3. 2. 5. Az OA bontás kinetikájának vizsgálata *A. niger* CBS 120.49 törzsszel

Az *A. niger* CBS 120.49 izolátum OA bontó képességét folyékony és szilárd YES tápközegben egyaránt vizsgáltuk. A kísérletek eredményeként megállapítottuk, hogy YES tápoldatban az OA lassan bomlik (16. ábra), még a hetedik napon sem tapasztaltuk, hogy teljesen átalakult Oα-vá. YES táptalajon tenyésztve a CBS 120. 49 törzs sokkal gyorsabban "felélte" az OA-t (17. ábra), aminek mennyisége három napon belül kevesebb, mint 20%-ára (kb. 0.5µg/ml) csökkent, az ötödik napon pedig már jelenléte nem volt kimutatható a



16. ábra. Az *A. niger* CBS 120.49 törzs OA bontásának vizsgálata YES tápoldatban



17. ábra. Az *A. niger* CBS 120.49 törzs OA bontásának vizsgálata YES táptalajon

3. 3. A FILOGENETIKAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

3. 3. 1. A *Circumdati* szekció filogenetikai analízise

Az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* szekciójának és rokon fajainak (*A. candidus*, *A. wentii*, *Petromyces alliaceus*) filogenetikai analízisét végeztük el az 500-600 nukleotidot tartalmazó ITS régió szekvenciájának analízise és morfológiai sajátosságaik alapján. A vizsgálatba bevont izolátumokat a 15. táblázat tartalmazza. A szekvencia adatok alapján megállapítható, hogy az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* szekciója parafiletikus. Azoknak

a fajoknak egy része, melyeket jelenleg a *Circumdati* szekció tagjaként tartanak számon, vizsgálataink alapján közelebbi rokonságot mutat más szekció(k) tagjaival.

15. táblázat A *Circumdati* szekció filogenetikai vizsgálatába bevont izolátumok, származásuk és génbanki azonosítójuk

Faj	Gyűjteményes kód ^a	Eredet	Génbanki azonosító
<i>P. alliaceus</i> ^T	IMI 126711	talaj, Ausztrália	AF149753 ^c
<i>A. auricomus</i>	FRR 3944	földimogyoró, Indonézia	AF203795
<i>A. auricomus</i> ^T	IMI 172277P.	Biourge-G. Smith	AF203792
<i>A. bridgeri</i> ^T	RMF 7745	talaj, Wyoming, USA	AF203803
<i>A. campestris</i> ^T	IMI 259099	talaj, Dakota, USA	AF203805
<i>A. candidus</i> ^T	IMI 091889	C. Thom	AF203804
<i>A. dimorphicus</i> ^T	IMI 131553	kerti talaj, Bihar, India	AF203807
<i>A. elegans</i> ^T	IMI 133962	A. Blochwitz	AF128860 ^a
<i>A. insulicola</i> ^T	ATCC 26220	talaj, Aves Sziget	AF203799
<i>A. lanosus</i>	IMI 226007	talaj, Calicut Egyetem	AF203810
<i>A. melleus</i>	IMI 257368	mandarin talaj, India	AF203797
<i>A. melleus</i> ^T	IMI 235600	talaj, India	AF203796
<i>P. muricatus</i> ^T	IMI 368521	talaj, Fülöp-szigetek	AJ005674 ^b
<i>A. ochraceoroseus</i> ^T	IMI 223071	talaj, Elefántcsont-part	AF203809
<i>A. ochraceus</i>	NRRL 3174	cirok mag, Dél-Afrika	AF128852 ^a
<i>A. ochraceus</i>	Z1	zöld kávé, Zaire	AF128857 ^a
<i>A. ochraceus</i>	ICMP 939	rovar, Auckland, Új-Zéland	AF128850 ^a
<i>A. ochraceus</i>	O4	zöld kávé, Uganda	AF128856 ^a
<i>A. ochraceus</i> ^T	IMI 016247	A. Blochwitz	AF128851 ^a

<i>A. ostianus</i> ^T	IMI 015960	C. Wehmer, CBS 103.07	AF203794
<i>A. petrakii</i>	NRRL 416	D. Hanzawa (<i>A. melleus</i>)	AF203793
<i>A. petrakii</i> ^T	IMI 172291	<i>L. decemlineata</i> , Mo.	AF203798
<i>A. robustus</i>	NRRL 6362	erdő talaj, Kenya	AF203808
<i>A. sclerotiorum</i> ^T	IMI 056673	rohadó alma, USA	AF203802
<i>A. sclerotiorum</i>	FRR 4491	talaj, Thaiföld	AF203801
<i>A. sepultus</i> ^T	IMI 294498	löss talaj (1m), USA	AF203806
<i>A. sulphureus</i> ^T	IMI 211397	talaj, Mysore, India	AF203800
<i>A. wentii</i> ^T	ATCC 1023	szója, Indonézia	AF149752 ^c
<i>N. glabra</i>	FRR 1833	talaj, Ausztrália	U18355 ^d

T, típus törzs

^aVarga és mtsai. (1999a)

^bSkouboe és mtsai (1999)

^cVarga és mtsai (1999b)

^dBerbee és mtsai (1995)

3. 3. 1. 1. Fenotipikus tulajdonságok vizsgálata

Az izolátumok fenotipikus vizsgálatát Christensen (1982) módszere alapján végeztük el. A kísérlet során figyelembe vett morfológiai tulajdonságokat a 16. táblázat tartalmazza. A szkleróciumok morfológiáját azért nem vettük figyelembe, mert az egymáshoz közel rokon fajok is képeznek nagyon különböző szkleróciumot, pl. *P. alliaceus* és *P. albertensis* (Varga és mtsai, 2000). A fenotipikus tulajdonságok parszimónia analízise (19. ábra) alapján kapott eredmények alátámasztják az ITS szekvencia analízise során kapottakat. Az *A. campestris* és *A. lanosus* például mindkét vizsgálat során közeli rokonságot mutatott az *A. candidusszal* és a *P. alliaceusszal*, vagy az *A. dimorphicus* és *A. sepultus*. Az *A. wentii* közelében található mindkét törzsfán. Azonban a vizsgált fajok bármelyike mindkét törzsfán azonos fajok környezetében található. Továbbá a szekvenciadatok hasonlósága alapján az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* szekciója két csoportra osztható, az egyikbe az *A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. petrakii*, *A. ostianus*, *P. muricatus*, a másikba az *A. sulphureus*, *A. bridgeri* és *A. sclerotiorum* típustörzsei tartoznak.

16. táblázat. A vizsgált morfológiai tulajdonságok

Tulajdonság	Állapot	Kód
Másodlagos anyagcseretermékek		
1. CAN1	termel nem termel	1 0
2. cirkumdatin A	termel nem termel	1 0
3. CAN 3	termel nem termel	1 0
4. inzulikolid A	termel nem termel	1 0
5. PE-1	termel nem termel	1 0
Növekedési és telep sajátosságok		
6. telepátmérő CZA, 37°C	nagyobb, mint 2 cm kisebb, mint 2 cm	1 0
7. növekedés 37°C-on 25°C-hoz képest (CZA)	nőtt nem nőtt	1 0
8. telepátmérő CZA, 37°C	nagyobb, mint 1 cm kisebb, mint 1 cm	1 0
9. konídiumos fej színe (25°C)	erős sárga más színű	1 0
10. konídiumos fej színe (25°C)	sárga, barnássárga más	1 0
11. telepszín (MEA, 10 nap, 25°C)	fekete nincs fekete pigment	1 0
12. telepszín (MEA, 10 nap, 25°C)	vöröses-barna más színű	1 0
13. telepszín, (MEA, 10 nap, 25°C)	fakó sötét barna nincs barna pigment	1 0
14. telepátmérő (MEA, 10 nap, 25°C)	nagyobb, mint 4 cm kisebb, mint 4 cm	1 0
15. telepátmérő (MEA, 10 nap, 25°C)	nagyobb, mint 2 cm kisebb, mint 2 cm	1 0
16. növekedés (CZ 20, 25°C)	kissé ozmofil ozmofil	1 0
17. növekedés (CZA, 30°C)	korlátozott növekedés normális növekedés	1 0
18. telepszín	zöld sárgás-barna	1 0
Mikroszkópikus tulajdonságok		
19. konídiumtartó hossza	eléri vagy több mint 3500 µm kisebb, mint 3500 µm	1 0
20. konídiumtartó	több, mint 1600 µm	1

	kevesebb, mint 1600 µm	0
21. konídiumtartó felszíne	érdes sima	1 0
22. konídiumtartó felszíne	színes színtelen	1 0
23. vezikulum átmérője	több, mint 55 µm kevesebb, mint 55 µm	1 0
24. vezikulum átmérője	több, mint 30 µm kevesebb, mint 30 µm	1 0
25. konídium felszíne	érdes sima	1 0
26. konídium	gömb, 3-4.5 µm eltérő	1 0
27. konídium	gömb, 2-3 µm eltérő	1 0
28. konídium	gömbszerű, 2.4-3.5 µm eltérő	1 0
29. sterigmata	egyrétegű kétrétegű	1 0
30. fialidok eredete	vezikulum 1/3 vezikulum felszíne	1 0
31. konídium felszíne (SEM)	hálószerű eltérő	1 0
32. konídium felszíne (SEM)	mikrogömbös eltérő	1 0
33. konídium formája (SEM)	hengeres, mikrogömbös eltérő	1 0
Ubikinon rendszer		
34. Q-10 ubikinon	van nincs	1 0
35. Q-9 ubikinon	van nincs	1 0
36. Q-10 (H ₂) ubikinon	van nincs	1 0

3. 3. 1. 2. A *Circumdati* szekció ITS szekvencia és a fenotipikus tulajdonságok analízisének eredményei

Molekuláris és morfológiai tulajdonságai alapján az *A. sepultus* és *A. dimorphicus* az *A. wentii* közeli rokona (Peterson, 1995). Ezen eredményeket támasztja alá, hogy mindegyik faj Q-9 ubikinon rendszerrel rendelkezik, 37°C-on CZA táptalajon egyik sem, ezzel szemben CZ 20 táptalajon mindhárom faj tenyészthető, valamint mérsékelten ozmofil sajátosságokkal rendelkeznek (Peterson, 1995), ezért a *Cremei* szekció tagjai.

Az *A. campestris* az ITS szekvencia alapján legközelebbi rokonságot az *Aspergillus* nemzetség *Candidi* szekciójának tagjával, az *A. candidussal* mutat (Gams és mtsai, 1985),

amit bizonyít mindkét faj korlátozott növekedése MEA és CZA tápközegben (Christensen, 1982) és azonos *SmaI*-emésztett riboszómális RFLP mintázatuk (Croft és Varga, 1994). Hasonló megállapításokra jutott Peterson (1997), aki e fajok 28S RNS génjeit, valamint Rahbaek és mtsai (2000), aki másodlagos anyagsere profiljaikat vizsgálta.

Az *A. lanosus* jól elkülöníthető csoportot alkot a *P. alliaceus*szal, ezért az ITS szekvencia adatai és morfológiai sajátosságai alapján közelebbi rokonságban az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójának tagjaival áll. Ezen fajok Q-10 ubikinon rendszerrel (Kuraishi és mtsai, 1990), valamint hasonló felületi díszítésű konídiumokkal rendelkeznek (Kozakiewicz, 1989). A két faj *SmaI*-emésztett riboszómális DNS mintázata azonos (Croft és Varga, 1994), valamint a másodlagos anyagsere profiljuk is nagyon kis eltérést mutat (J. C. Frisvad, szem. közlés).

Az *A. ochraceoroseus* és *A. robustus* ITS szekvenciájuk alapján a vizsgált fajok egyikével sem mutatott rokonságot. Az *A. ochraceoroseus* taxonómiai helyzetének megállapításakor ellentmondások merültek fel. Több morfológiai sajátossága az *A. petrakiival* való rokonságra utaltak (Samson, 1979), míg Christensen vizsgálatai alapján (1982) a faj a *Cremeri* szekció tagjaival mutatott rokonságot. Christensen véleményét azzal indokolta, hogy az *A. ochraceoroseus* konídiumtartója - a *Cremeri* szekció tagjaival megegyezően - a vezikulum alatt összeszűkül. Azonban a *Cremeri* szekció tagjainak egyéb tulajdonságai, pl. ozmofil sajátosságok, konídium mintázat, az *A. ochraceoroseus* esetében nem figyelhetők meg (Kozakiewicz, 1989).

Az *A. robustus* és a *P. alliaceus* közeli rokonságát a mindkét faj által termelt fekete színű szklerócium miatt Samson (1979) állapította meg, azonban a szekvencia adatok ezt nem indokolják. Az *A. ochraceoroseus* és *A. robustus* rendszertani helyének megállapításához további szekciók vizsgálatára van szükség. A fentiek alapján úgy véljük, hogy ezek a fajok nem az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* szekciójának tagjai, és tisztázatlan rendszertani helyzetük miatt az *incertae sedis* kategóriába sorolandók. Későbbi vizsgálataink tisztázták, hogy az *A. ochraceoroseus* a *Nidulantes* szekció tagjaival mutat rokonságot (Varga és mtsai, 2003) ITS és D1-D2 szekvencia adatok alapján.

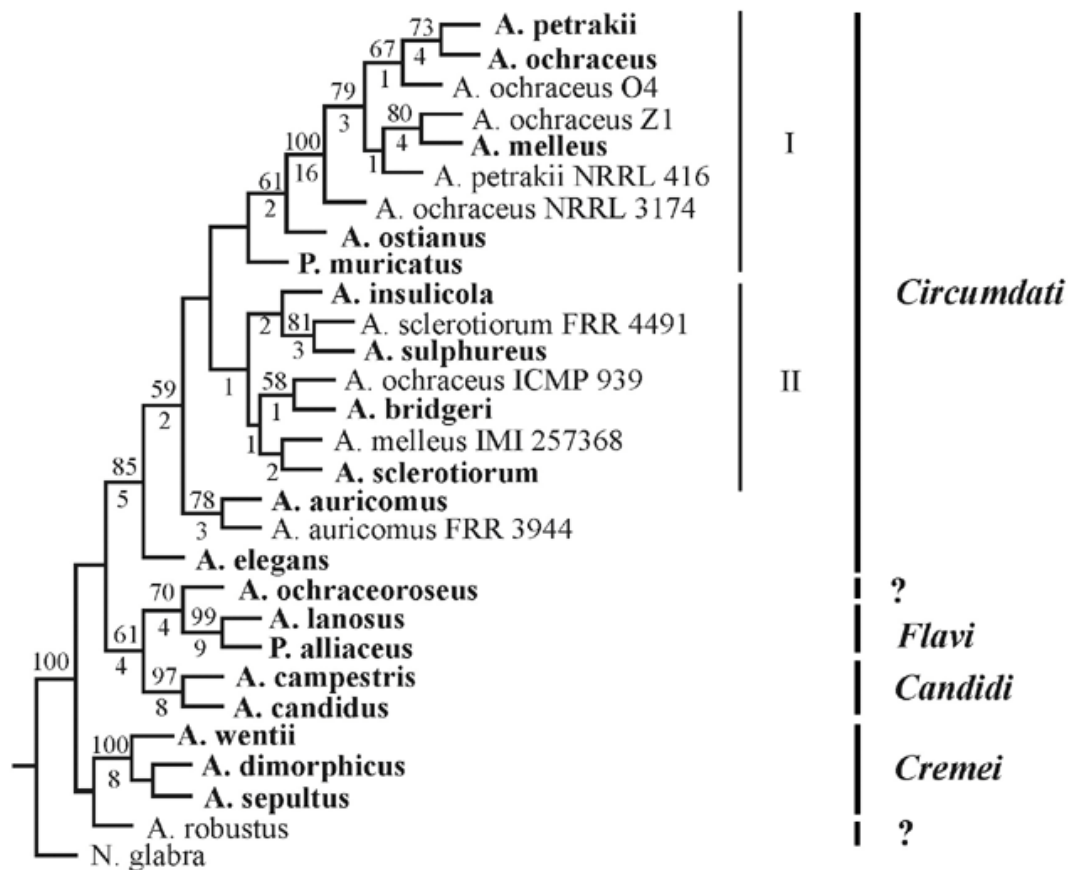
Az általunk ITS szekvencia alapján vizsgált izolátumok legtöbbje az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* szekciójának tagja, rokonságukat a magas bootstrap értékek bizonyítják. A szekcióba tartozó fajok mindegyike Q-10(H₂) ubikinon rendszerrel rendelkezik, kétsoros fialid rétegük van és gömb alakú, sárgás konídiumfej jellemzi őket, kis méretű konídiumaik vannak, és sárgás, piros vagy levendula színű szkleróciumot termelnek.

A *Circumdati* szekción belül két csoport különíthető el. Az egyikbe az *A. ochraceus*, *A. petrakii*, *A. melleus*, *A. ostianus* és a *P. muricatus* tartoznak, amelyekre jellemző a viszonylag rövid konídiofór, a gömb alakú konídiumok és a barnássárga, téglavörös illetve levendula színű szkleróciumok (kivéve az *A. petrakiit*, amely nem képez szkleróciumot). Az *A. ochraceus*, *A. petrakii*, *A. ostianus* *SmaI*-emésztett riboszómális DNS mintázatai azonosak (Croft és Varga, 1994). Vizsgálataink eredményét az is alátámasztja, hogy az *A. ochraceus*, *A. ostianus* és *P. muricatus* izolátumok termelnek egy alkaloid származékot, a cirkumdatin A-t, amelyet a *Circumdati* szekció tagjai közül más nem termel. Az *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus* és *P. muricatus* esetében egy ismeretlen másodlagos anyagcsere termék (PE1) mutatható ki, amelyet szintén kizárólag ezen fajok termelnek (J. C. Frisvad, szem. közlés).

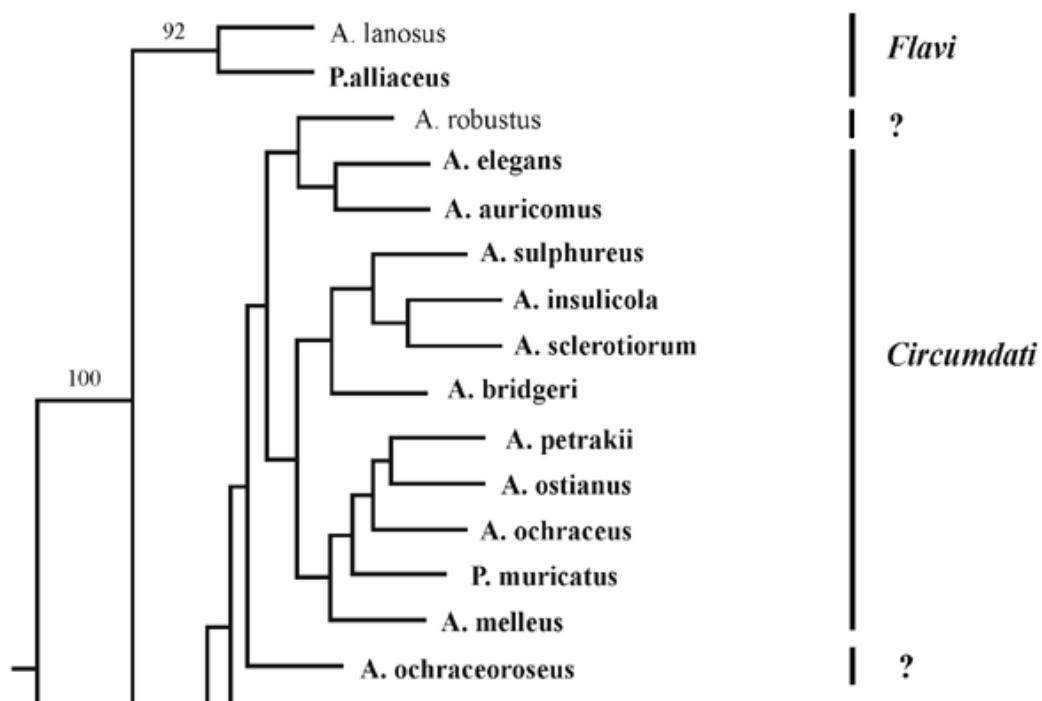
A szekció másik csoportját alkotja az *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. bridgeri*, *A. insulicola*. Morfológiai sajátosságaik a durva felszínű, 1.6-3 mm hosszú konídiumtartó, (kivéve az *A. insulicola* fajt), a 30-55 µm átmérőjű vezikulum, valamint az általában gömb alakú 2-3 µm nagyságú konídiumok (Christensen, 1982), szkleróciumaik krémszínűek vagy halványsárgák. Rahbaek és mtsai (1997) Találtak egy szeszkviterpén típusú vegyületet, az inzulikolid A-t, amit kizárólag az *A. insulicola*, *A. bridgeri* és az *A. sclerotiorum* termel. Az *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum* és az *A. bridgeri* *SmaI*-emésztett riboszómális DNS mintázata csaknem azonos (Croft és Varga, 1994).

Az *A. auricomus* és az *A. elegans* a *Circumdati* szekció egyik tagjával sem mutatott közeli rokonságot. Az *A. auricomus* jelentősen különbözik a szekció többi tagjától, mivel élénk narancs színű szkleróciumokat hoz létre és a konídiumos fejek kankalinsárga színűek (Kozakiewicz, 1989). Az *A. elegans* izolátumai nagyon hasonlítanak az *A. ochraceus*-ra, azonban kisebb konídiumokat képez és szkleróciumai fehér, sárgás vagy krém színűek. Korábban az *A. elegans*-t az *A. ochraceus* egy alfajaként kezelték a konídiumaik hasonló felszíni díszítése miatt (Kozakiewicz, 1989), a szekvencia adatok ezt nem támasztják alá.

A két *A. auricomus* izolátum egymással, az *A. sclerotiorum* FRR 4491 izolátuma az *A. sulphureus*-szal, az *A. ochraceus* ICMP 939 izolátum az *A. bridgeri*-vel van közeli rokonságban az ITS szekvencia adatok alapján. Ez utóbbit régebben az *A. ochraceus* fajba sorolták, de fehér szkleróciumai miatt nem lehet e fajba tartozónak tekinteni. Az IMI 257368 izolátum az *A. melleus* fajba tartozik, sárga szkleróciumokat termel, az ICMP 939 az *A. bridgeri*, FRR 4491 az *A. sulphureus* faj izolátuma. Az izolátumok ochratoxin termelő képessége és az ITS szekvenciák alapján elfoglalt rendszertani helyük egymástól független (Varga és mtsai, 1996).



18. ábra. Az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* szekciójához tartozó és rokon izolátumok filogenetikai analízise ITS szekvenciák alapján. A vonal feletti számok a bootstrap, a vonal alattiak a Bremer értékek. A típustörzsek vastagon szedve láthatók.



19. A fenotipikus karakterek filogenetikai analízise révén kapott törzsfá

3. 3. 2. A *Flavi* szekció filogenetikai analízise

Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójának ITS szekvenciák alapján végzett filogenetikai analízise során 23 törzset vizsgáltunk (17. táblázat). Az analízis alapjául szolgáló rDNA szakasz 65 polimorf hellyel rendelkezik, amiből 45 hordozott megfelelő információt az analízishez. A fajok közötti rokonsági kapcsolatok megállapításához azok ubikinson rendszerét is vizsgáltuk. Az összes vizsgált tulajdonság alapján a szekción belül három, egymástól elkülöníthető csoport hozható létre. Az egyik csoportba az *A. flavus* és rokonai, a másikba az *A. tamarii* és rokonai, a harmadikba az *A. alliaceus* és rokonai tartoznak.

17. táblázat. A *Flavi* szekció analízise során felhasznált törzsek

Fajok	Gyűjteményes kód ^a	Eredet	Génbanki azonosító
<i>A. albertensis</i> ^{Tb}	ATCC 58745	fül tampon, Kanada	AF128859a
<i>A. alliaceus</i> ^T	IMI 126711	talaj, Ausztrália	AF149753a
<i>A. avenaceus</i> ^T	IMI 016140	borsó, UK	AF257797

<i>A. caelatus</i> ^T	IMI 375694	talaj, Georgia, USA	AF257800
<i>A. clavatoflavus</i> ^T	IMI 124937	erdőtalaj, Ausztrália	AF257798
<i>A. coremiiformis</i> ^T	IMI 223069	talaj, Elefántcsont-part	AF257793
<i>A. flavofurcatis</i> ^T	IMI 124938	táptalaj, Brazil	AF257794
<i>A. flavus</i> ^T	ATCC 16883	celofán, UK	AB008416b
<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i> ^T	IMI 124932	ismeretlen gazda	AF257792
<i>A. lanosus</i>	IMI 226007	talaj, India	AF203810a
<i>A. leporis</i> ^T	IMI 259100	nyúl ürülék, USA	AF257796
<i>A. nomius</i> ^T	NRRL 13137	penészes búza, USA	AF027860b
<i>A. oryzae</i> ^T	ATCC 1011	Thom (No. 113)	AB008417b
<i>A. parasiticus</i> ^T	NRRL 502	Hawaii	AF027862c
<i>A. sojae</i>	IFO 4386	Japán	AB008419b
<i>A. subolivaceus</i> ^T	IMI 044882	gyapot, UK	AF257795
<i>A. tamarii</i>	JCM 2259	ismeretlen eredet	AB008420b
<i>A. terricola</i> ^T	IMI 172294	Thom (WB 426)	AF257802
<i>A. terricola</i> var. <i>american.</i> ^T	IMI 016127	talaj, USA	AF257791
<i>A. terricola</i> var. <i>indicus</i> ^T	IMI 172295	kenyér, India	AF257801
<i>A. thomii</i> ^T	IMI 045644	táptalaj, UK	AF257790
<i>A. toxicarius</i> ^T	IFO 31250	mogyoró, Uganda	AB008421b
<i>A. zonatus</i> ^T	IMI 124936	talaj, Costa Rica	AF257799
<i>N. glabra</i>	FRR 1833	talaj, Ausztrália	U18355d

T, típus törzs

^a Varga és mtsai (2000a)

^b Nikkuni és mtsai (1998)

^c Ito és mtsai (1998)

^d Berbee és mtsai (1995)

3. 3. 2. 1. A *Flavi* szekció filogenetikai analízisének eredményei ITS és 26S rDNS szekvenciák alapján

A *Flavi* szekció filogenetikai analízise ITS szekvenciák, valamint a morfológiai tulajdonságok alapján olyan törzsfát eredményezett, amelyen három csoportot lehet elkülöníteni (20. ábra). A 26S rDNS szekvenciák vizsgálata hasonló eredményeket szolgáltatott (21. ábra).

Az ITS szekvenciadatokat a morfológiai tulajdonságok a *Flavi* szekció esetében is alátámasztják, amelyek alapján a szekció tagjai három csoportba sorolhatók. Az *A. flavus* és rokon fajai a *Flavi* szekció legnagyobb gazdasági jelentőséggel rendelkező csoportja. A fajokra jellemző, hogy a konídiumos fejek zöldes árnyalatúak és szkleróciumaik sötét színűek, ubikinon rendszerük Q-10(H₂) típusú. A filogenetikai analízis során kiderült, hogy az ide tartozó fajok 26S rRNS génje azonos D1-D2 régió szekvenciával rendelkezik (Peterson, 2000). Az *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. subolivaceus*, *A. flavus* var. *columnaris* izolátumok rokonságát bizonyítja a 18S rRNS gének szekvenciájának hasonlósága is (Nikkuni és mtsai, 1998, Peterson, 2000), amit az általunk végzett vizsgálatok is alátámasztanak. Az *A. oryzae* morfológiai sajátosságai alapján elkülöníthető az *A. flavustól* (Klich és Mullaney, 1987, Klich és Pitt, 1985), mégis Kurtzman és mtsai (1986) szerint egy fajba tartoznak. Az ITS szekvenciák analízise alapján az *A. parasiticus*, *A. sojae*, *A. toxicarius* a törzsfán egy különálló csoportot alkotnak, ami alátámasztja Nikkuni és mtsai (1998) és Peterson (2000) eredményeit. Az *A. toxicarius* Kozakiewicz (1989) szerint konspecifikus az *A. parasiticussal*, amit az ITS szekvencia adatok igazolnak. Az *A. flavus* csoport tagjai monofiletikus eredetűek (Gomi és mtsai, 1989, Murakami és mtsai, 1982, Yuan és mtsai, 1995). Szekvencia adatok támasztják alá, hogy az *A. oryzae* az *A. flavus*, és az *A. sojae* az *A. parasiticus* házasított változatai, de külön fajként kell kezelnünk őket (Cruikshank és Pitt, 1990, Geiser és mtsai, 1998). Az *A. thomii* és az *A. terricola* var. *americanus* szintén a csoport tagjai, bár morfológiai szempontból eltérnek a többi fajtól, mert barna színű konídiumfejekkel rendelkeznek. Konídiumaik felszíni mintázata (Kozakiewicz, 1989) és az ITS szekvencia adataik alapján indokolt őket az *A. flavus* és rokon fajai közé sorolni.

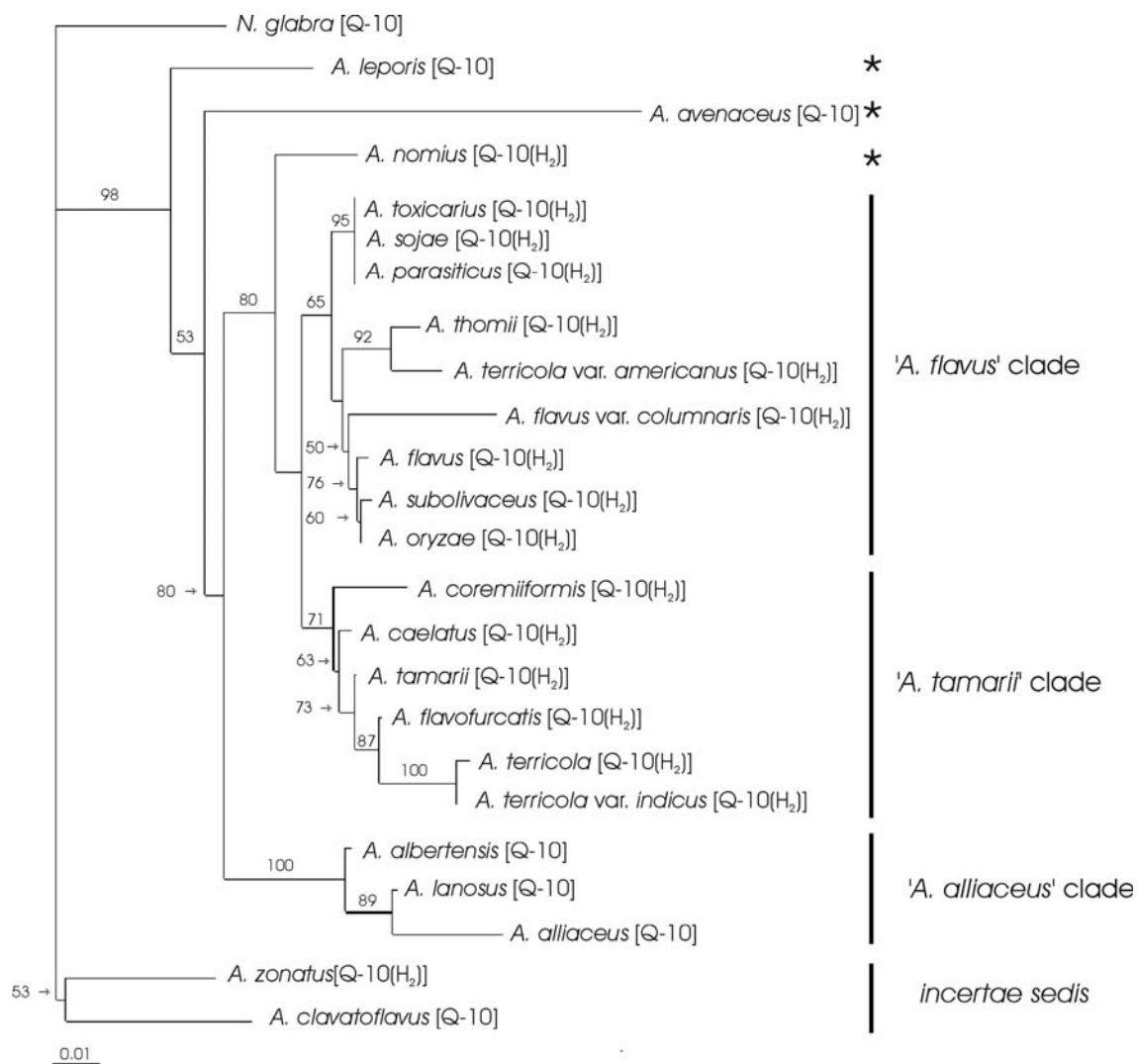
Az *A. tamarii* és rokonai, az *A. caelatus*, *A. terricola*, *A. terricola* var. *indicus*, *A. coremiiformis* és az *A. flavofurcatis* különálló csoportot alkotnak. Konídiumaik olajzöld

vagy barna színűek, ubikinon rendszerük Q-10(H₂). Az *A. caelatus* a *Flavi* szekció új tagja, morfológiai szempontból nagyon hasonlít az *A. tamarii*hoz, azonban vele ellentétben nem termel ciklopiazonsavat (Horn, 1997, Ito és mtsai, 1999). Az *A. tamarii*, *A. flavofurcatis* és *A. terricola* 26S rRNS génje D1-D2 régiójának szekvenciája megegyező (Peterson, 2000). Az ITS szekvencia adatok alapján az *A. terricola* és az *A. terricola* var. *indicus* konspecifikusak. Az *A. coremiiformis* korémiumképző faj, ITS szekvencia adatok alapján a *Flavi* szekció ezen csoportjának tagjaival mutat rokonságot (Christensen, 1981, Samson, 1979, Roquebert és Nicot, 1985). Ez a faj az aflatoxin bioszintézis egyik köztes termékét, a sterigmatocisztint termeli, megerősítve ezzel a *Flavi* szekció tagjaival való rokonságát (Wicklow és mtsai, 1989).

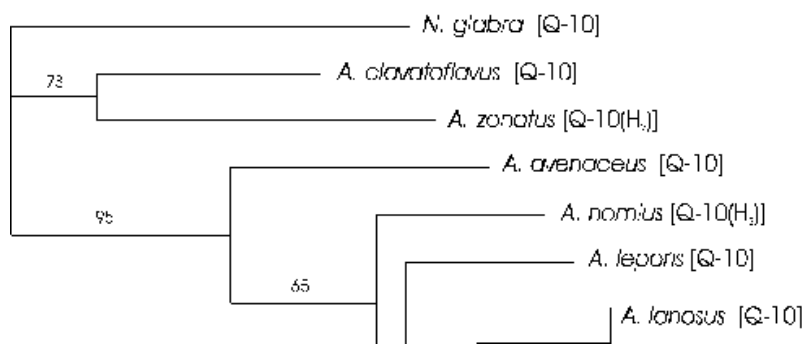
Az *A. alliaceus* és rokonai a szekción belül a legkisebb, csupán három taggal rendelkező csoportot alkotják (Varga és mtsai, 2000). A *P. alliaceus*, *P. albertensis* és az *A. lanosus* Q-10 ubikinon rendszerrel rendelkezik és a 26S rRNS génjük D1-D2 régiójának szekvenciája is azonos (Peterson, 2000).

Az *A. leporis* ITS szekvencia analízis alapján elkülönül a szekció többi tagjától. A *A. leporis* Q-10 ubikinon rendszerrel, olajzöld színű konídiumfejekkel rendelkezik és fahéj színű szkleróciumot képez (Christensen, 1981, Kuraishi és mtsai, 1990).

Az *A. zonatus* és *A. clavatoflavus* ITS szekvencia adatok alapján egymáshoz közel találhatók a törzsfán, de nem mutatnak közeli rokonságot a *Flavi* szekció egyik tagjával sem, D1-D2 régió szekvenciáik is eltérnek azokétól (Peterson, 2000). Mindkét faj telepe olajzöld színű, a konídiumfejek kétsoros fialid réteggel rendelkeznek, kis méretű konídiumokat termelnek és mindkettőt trópusi esőerdők talajából izolálták. Különbség kettőjük között, hogy az *A. zonatus* nem tenyésztethető CZ táptalajon, MO-on viszont igen, konídiumtartója fogazott oldalú, az *A. clavatoflavus* mindkét táptalajon jól tenyésztethető és konídiumtartójának érdes az oldala. ITS szekvenciáik alapján ezen fajok kizsorulnak a *Flavi* szekcióból és az *incertae sedis* kategóriába sorolandók.



20. ábra. A *Flavi* szekció tagjainak rokonsági viszonyai ITS szekvenciák alapján



21. A *Flavi* szekció filogenetikai analízise a 26S rRNS szekvenciája alapján.

3. 3. 3. Az *A. viridinutans* intraspecifikus variabilitásának vizsgálata

Az *A. viridinutans* az *Aspergillus* nemzetség *Fumigati* szekciójának tagjaként (Gams és mtsai, 1985) számos mikotoxin termelésének képességével rendelkezik, mint pl. a viriditoxin, a fumifunginok és fumitremorginok (Geiser és mtsai, 1998), valamint számos – az ochratoxinokhoz hasonló - izokumarin származék (Aldridge és mtsai, 1966, Turner és Aldridge, 1983, Lillehoj és Milburn, 1973, Wiesleder és Lillehoj, 1971). Az *A. viridinutans* intraspecifikus variabilitását morfológiai sajátosságok, szénforrás hasznosítás tesztek, mitokondriális DNS és magi DNS RFLP analízis, valamint a β -tubulin gén szekvenciák analízise alapján vizsgáltuk. A vizsgált izolátumokat a 18. táblázat tartalmazza.

18. táblázat. A vizsgálatban részt vevő *A. viridinutans* izolátumok és rokon fajok

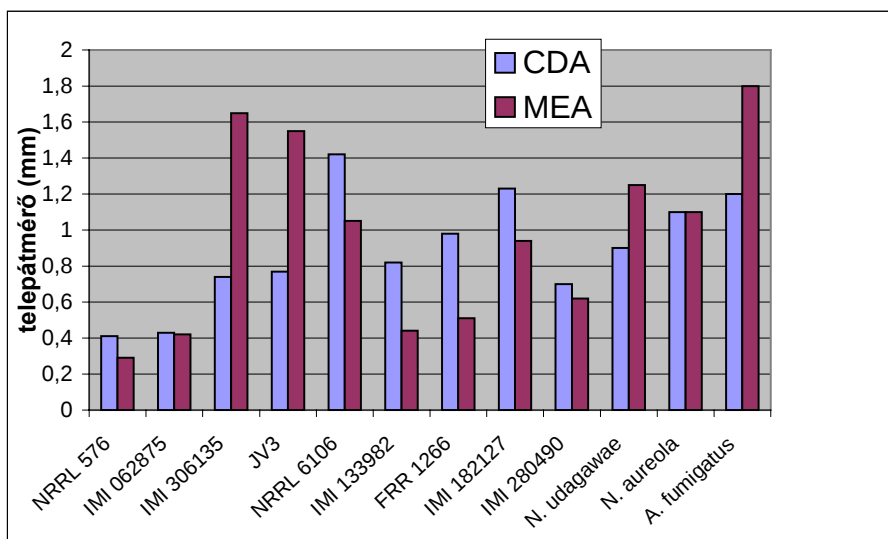
Fajok	A törzs száma	Származása	Génbanki azonosító
<i>A. fumigatus</i> ^{T1}	HD133	Latgé J-P	AF057315 ^a
<i>Aspergillus</i> sp.	FRR 1266	talaj, Ausztrália	AF132223 ^b
<i>Aspergillus</i> sp.	JV3	IMI 381888; kakaóbab	AF132222 ^b
<i>A. viridinutans</i>	IMI 133982	talaj, Moszkva, USSR	AF134775
<i>A. viridinutans</i>	IMI 182127	<i>P. caribea</i> , Sri Lanka	AF134777
<i>A. viridinutans</i>	IMI 280490	talaj, Zambia	AF134780
<i>A. viridinutans</i>	IMI 306135	talaj, W. Ausztrália	AF134776
<i>A. viridinutans</i>	IMI 062875	nyúlürülék, Ausztrália	AF134779
<i>A. viridinutans</i>	NRRL 576	nyúlürülék, Ausztrália	AF057316 ^a
<i>A. viridinutans</i>	NRRL 6106	ismeretlen eredet	AF134778
<i>N. aureola</i> ^T	NRRL 2244	talaj, Ghana	AF057319 ^a
<i>N. fischeri</i> ^T	NRRL 181	konzerv alma	AF057322 ^a
<i>N. pseudofischeri</i> ^T	NRRL 20748	ember csigolya, USA	AF057325 ^a
<i>N. spinosa</i> ^T	NRRL 5034	talaj, Nikaragua	AF057329 ^a
<i>N. udagawae</i> ^T	CBM-FA 0702	talaj, Brazília	AF132226 ^b
<i>N. udagawae</i> ^T	CBM-FA	talaj, Brazília	AF132230 ^b

T, típus törzs

^a Geiser és mtsai szekvencia adatai (1998)^b Varga és mtsai. szekvencia adatai (1999a)

3. 3. 3. 1. A növekedési tesztek eredményei

A vizsgált *A. viridinutans* izolátumok mindegyike jobban növekszik 37°C-on, mint 30°C-on (22. ábra), és legtöbbjük malátás táptalajon rosszul tenyészik, míg a Czapek-Dox táptalajt kedvelik. Az előbbi megállapítás alól kivétel az IMI 306135 és a JV3 izolátum, amelyek az *A. fumigatus* növekedési sajátosságaival mutatnak hasonlóságot. Az IMI 306135 izolátum esetében az *A. viridinutans*-ra jellemző "bólintó" konídiumfejek is ritkábban fordulnak elő.



22. ábra. A vizsgált izolátumok növekedése malátás (MEA) és Czapek-Dox (CDA) táptalajokon

3. 3. 3. 2. Az RFLP és a β -tubulin gén szekvencia analízisének eredményei

A *Hae*III emésztett mitokondriális DNS, valamint a *Sma*I emésztett magi DNS mintázatok a *N. udagawae* és a *N. aureola*, illetve a JV3 és az IMI 306135 esetében azonos voltak (19. táblázat, 23. ábra) (Rinyu és mtsai, 2000). A szénforrás hasznosítás vizsgálatok során 62 szénforrást alkalmaztunk, a kísérletből származó eredményeket az RFLP adatokkal együtt törzsfán foglaltuk össze (24. ábra).

A benA1 és benA2 primer minden esetben egy kb. 450 bp-os fragment sokszorozódását eredményezte. Ebből 135 variábilis nukleotid van, melyek közül az analízis szempontjából 73 hordoz információt. A β -tubulin gén szekvenciájának analízise alapján az *A. viridinutans* izolátumok külön csoportot képeznek (25. ábra). Az *A. viridinutans* IMI 062876 és NRRL 6106 izolátum közötti genetikai távolság nagyobb, mint a *N. fisheri* és *A. fumigatus* közötti. A faj legtöbb izolátuma, beleértve a típus törzseket is (NRRL 576 és IMI 062875) egy csoportba tartozik az FRR 1266 törzsszel. Az FRR 1266 izolátumot korábban az *A. fumigatus*

fajba sorolták morfológiai adatok alapján (Rinyu és mtsai, 1995), mind szekvencia adatok alapján. A β -tubulin gén szekvenciája szerint az FRR 1266 izolátum az *A. viridinutans* faj tagja, annak ellenére, hogy nem rendelkezik a faj - jellemzőnek mondott - rendszertani bélyegével, a "bólintó" konídiumfejjel. Vizsgálataink alapján az *A. viridinutans* faj ezen sajátossága rendszertani analízisben gyakran félrevezető lehet, hiszen a *Fumigati* szekció más tagjai (*A. brevipes*, *A. duricaulus*, *A. thermomutatus*) is rendelkeznek kis számú "bólintó" konídiumos fejjel (Raper és Fennell, 1965).

A vizsgálataink eredményeként megállapítható, hogy az *A. viridinutans* IMI 306135 izolátum legközelebbi rokona a kakaóbabról izolált *Aspergillus* sp. JV3 törzs. Mindkét törzs ochratoxin termelő képességgel rendelkezik, amit immunkémiai módszerrel bizonyítottak (Varga és mtsai, 1996) és az RFLP mintázataik is azonosak. Ez utóbbi izolátum lehet az *Aspergillus* nemzetség *Fumigati* szekciójának eddig ismeretlen tagja, vagy az *A. fumigatus*-nak egy atipikus törzse. Az izolátum rendszertani helyének megállapításához további *A. fumigatus* izolátumok β -tubulin gén szekvenciájának analízisére lenne szükség. Az eredmények alapján a JV3 és az IMI 306135 izolátum távolabbi rokona az *A. fumigatus*-nak, mint a *N. fisheri*-nek, ami arra utal, hogy esetleg egy új fajról van szó.

A szénforrás hasznosítás vizsgálatból és az RFLP mintázatból adódó összevont eredményekből törzsfa nagyon hasonló a szekvencia analízis alapján készített.

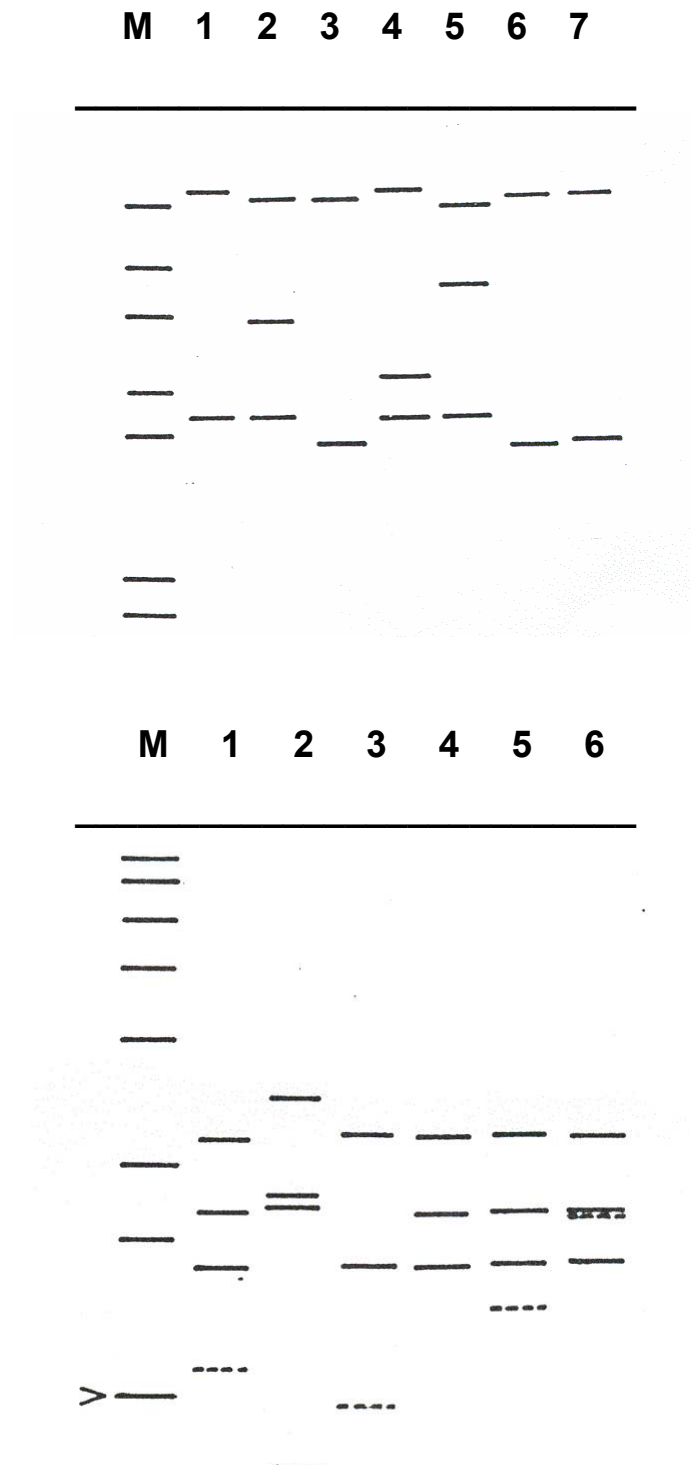
19. táblázat. A vizsgálatba bevont *A. viridinutans* és rokon fajok *HaeIII* emésztett mtDNS és *SmaI* emésztett rDNS mintázatai (a mintázatokat lsd. a 23. ábrán)

Fajok	A törzs száma	mtDNS mintázat	rDNS mintázat
<i>A. fumigatus</i> ^{T1}	HD133	2	1
<i>Aspergillus</i> sp.	FRR 1266	4	2
<i>Aspergillus</i> sp.	JV3	7	4
<i>A. viridinutans</i>	IMI 133982	6	4
<i>A. viridinutans</i>	IMI 182127	6	4
<i>A. viridinutans</i>	IMI 280490	6	4
<i>A. viridinutans</i>	IMI 306135	4	4
<i>A. viridinutans</i>	IMI 062875	5	4
<i>A. viridinutans</i>	NRRL 576	5	4
<i>A. viridinutans</i>	NRRL 6106	6	3
<i>N. aureola</i> ^T	NRRL 2244	3	6
<i>N. fischeri</i> ^T	NRRL 181	2	4
<i>N. pseudofischeri</i> ^T	NRRL 20748	1	4
<i>N. spinosa</i> ^T	NRRL 5034	1	5
<i>N. udagawae</i> ^T	CBM-FA 0702	3	6
<i>N. udagawae</i> ^T	CBM-FA	3	6

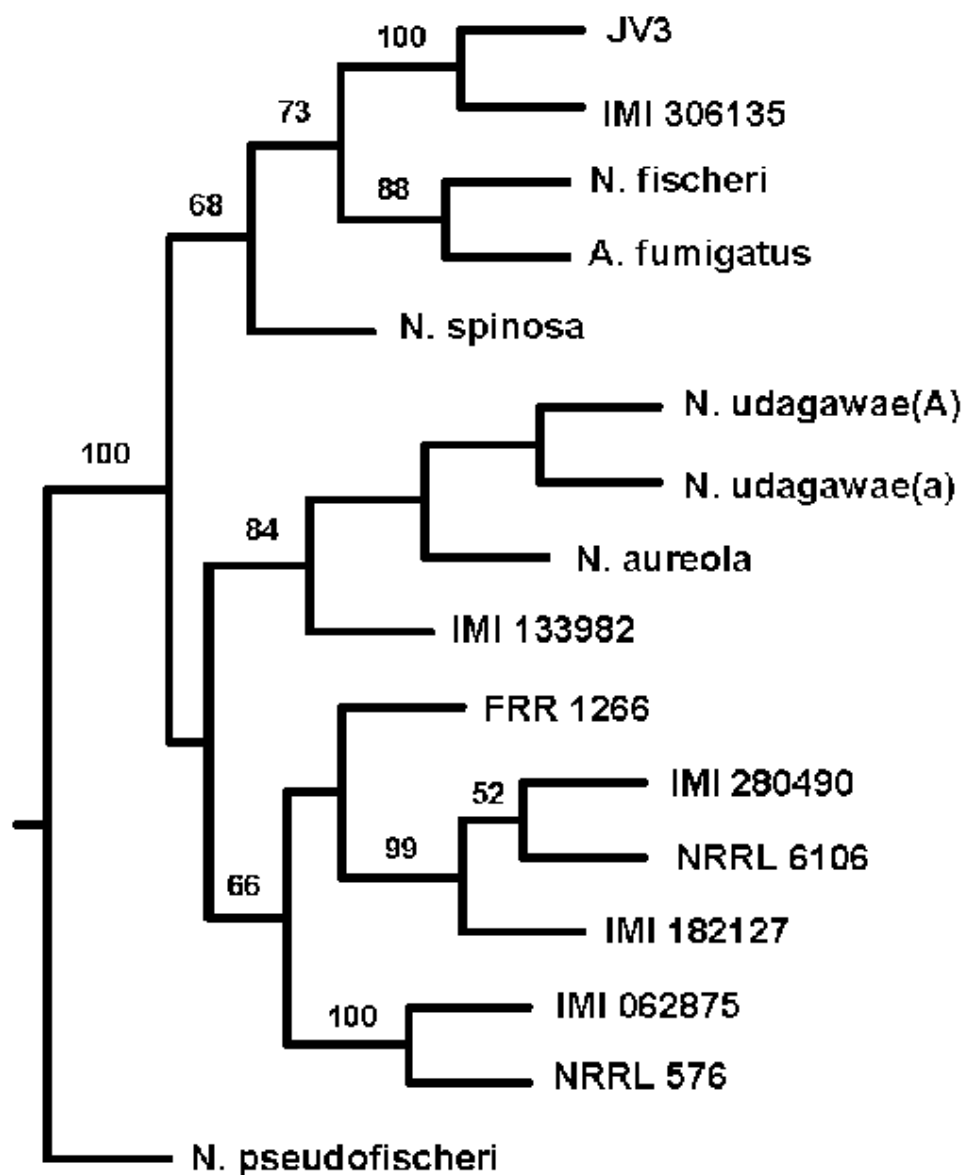
1, T, típus törzs

2, Geiser és mtsai szekvencia adatai (1998)

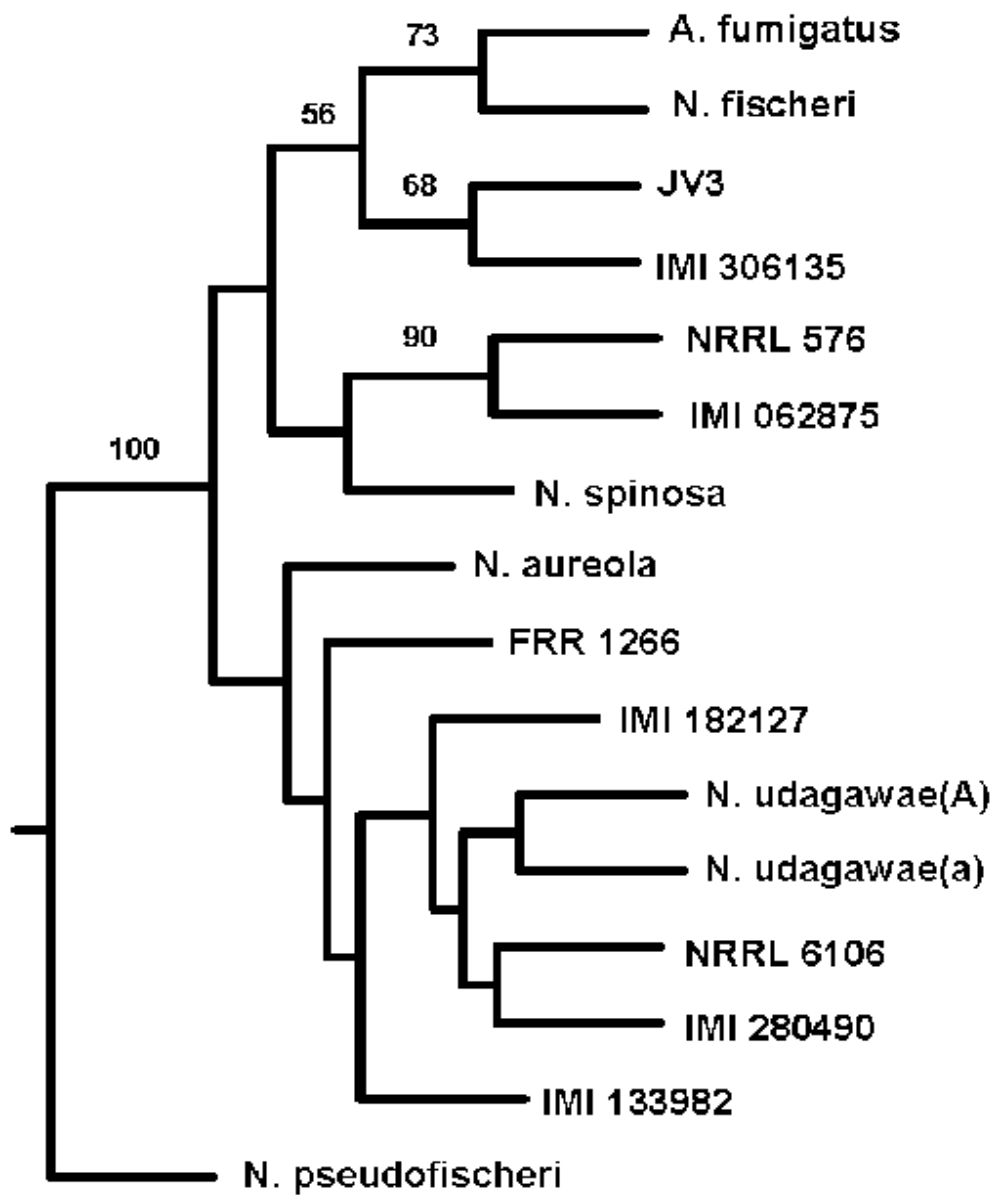
3, Varga és mtsai. szekvencia adatai (1999)



23. ábra. Az *A. viridinutans* és rokon törzsek *HaeIII* emésztett mtDNS mintázatai (felül), és *SmaI* emésztett sejtmagi DNS mintázatai (alul)



24. ábra. Az *A. viridinutans* intraspecifikus variabilitás vizsgálatának eredménye a szénforrás hasznosítás és az RFLP adatok alapján.

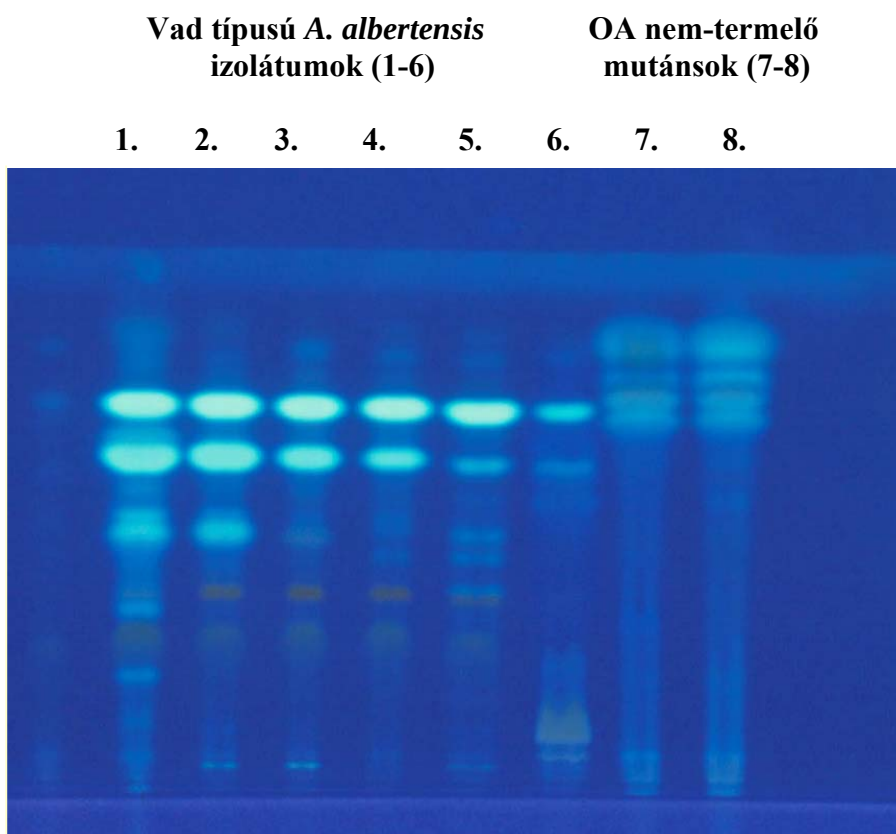


25. ábra. Az *A. viridinutans* intraspecifikus variabilitás vizsgálatának eredménye a β -tubulin gén szekvencia adatok alapján.

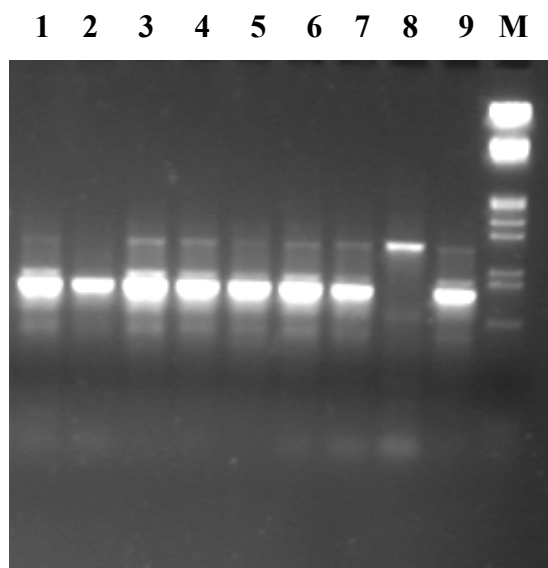
3. 4. KÍSÉRLETEK AZ OA TERMELÉSBEN RÉSZTVEVŐ GÉNEK AZONOSÍTÁSÁRA

3. 4. 1. Mutánsok előállítása és vizsgálata RAPD analízissel

Az *A. albertensis* ATCC 58745 törzsből γ -besugárzás után számos olyan variánst izoláltunk, melyeknek megváltozott az OA termelő képessége. A VII/1 izolátum egyáltalán nem termelt OA-t és OB-t (26. ábra). Nagyszámú RAPD-primerrel teszteltük a variánsokat és a szülői törzset annak érdekében, hogy olyan fragmentet azonosítsunk, mely csak az OA termelő variánsokban van jelen (27. ábra). Ezen kísérleteink során számos fragmentet azonosítottunk, melyek szekvenciaszintű jellemzése folyamatban van.



26. ábra. A vad típusú és γ -besugárzással nyert *A. albertensis* variánsok OA termelése YES tápoldatban



27. ábra. OA termelésben megváltozott *A. albertensis* mutánsok tesztelése RAPD-dal. 1 és 9, szülői törzs, 2-7, OA hipertermelők, 8, OA nemtermelő mutáns, M, HindIII-EcoRI emésztett DNS marker.

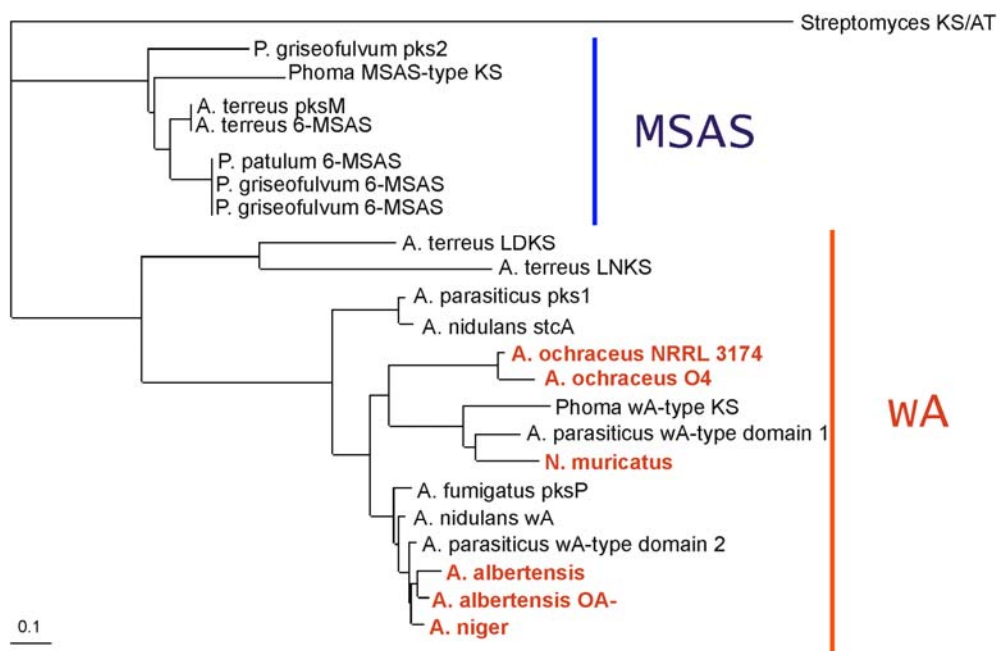
3. 4. 2. A KS (ketoszintáz) domén analízise

Munkánk során a Bingle és mtsai (1999) által kidolgozott primer párt (*LC1* és *LC2c* primerek) alkalmaztuk OA termelő *Aspergillus* izolátumok KS doménjének vizsgálatára. A primer pár alkalmazása révén valamennyi vizsgált OA termelő *Aspergillus* fajban sikerült egy-egy mintegy 700 bp méretű fragmentet amplifikálni, melyet szekvenáltunk, majd a kapott szekvenciákat egyéb gombákban azonosított KS domén szekvenciákkal (28. ábra) együtt filogenetikai analízisnek vetettük alá. Két *A. ochraceus* izolátum KS doménjében intron jelenlétét észleltük, melyet nem vettünk figyelembe a filogenetikai analízis során. Az *Aspergillus* izolátumokban észlelt KS szekvenciák szétszórtan helyezkednek el a törzsfán (29. ábra), ami azt jelzi, hogy feltehetőleg különböző metabolitok szintézisében vesznek részt. Az *A. albertensis* és *A. niger* KS domén szekvenciák az *A. nidulans* és a *P. patulum* konídiumpigment bioszintézisében szerepet játszó *wA* génekkel, míg az *A. muricatus* KS domén szekvencia az *A. parasiticus* *wA* génjével mutatott nagyfokú homológiát. Az *A. ochraceus* izolátumokban észlelt KS domén szekvenciák külön csoportot alkottak egy *A. terreus*-ban azonosított naftopiron szintáz gén szekvenciával együtt. Az analízisbe bevontunk három további *A. ochraceus* KS domén szekvenciát is, melyeket Edwards és mtsai (2002) azonosítottak *A. ochraceus* NRRL 3174 törzsben. Ezekről bizonyították, hogy nem játszanak

szerepet az OA bioszintézisben. További vizsgálatokat folytatunk annak tisztázására, hogy az általunk azonosított KS domén szekvenciák szerepet játszanak-e az OA bioszintézisben.

A.alb. VII1 1 DIDTYFIPGGDRAFTPGRVNYFYKFSGPSVSVDTACSSSLAAIHMACNSIWRNDCDAPITGGVNIILTNPDNHAGLDR
A.alb. 1 DIDTYFIPGGRRAFTPGRINYYFKFSGPSVSVDTACSSSLAAIHMACNSLWRSDCDAPITGGVNIILTNPDNHAGLDR
A.foet. 1 DIDTYFIPGGNRAFTPGRINYYFKFSGPSVSVDTACSSSLAAIHMACNSIWRNDCDAITGGVNIILTSNDNHAGLDR
A.ochr.3174 1 NVDTYFIPGGNRAFTLSGRIYFFRF CGPSLTIDTACSSIFAAIILTYAYLWRGECDTALAGGVYVMTNPDNFAGLDK
A.ochr.O4 1 NVDTYFIPGGNRAFTLSGRIYFFRF CGPSLTIDTAYSSIFAAIILTYAYLWGSXCDSDLAGGVYVMTNPDNFAGLDK
A.terr.ATNP 1 DVGTYFIPGGNRAFTVPGRIYFFRFSGPSLSIDTACSSSFAAIQAACSYLWRGECDTAIAGGTNIIILTNPDNFAGLDR
A.mur.706 1 NIGTYFIPGGIRAFGPVGQFYFFGLGGPSYNVDTACSSSLAAIHLACTSLQIGHCDTAVAGGLSVLTSPDLYSGLSR
A.ochr.PKS-7 1 ELPHYTATGTARSIISNRVSYFFDWHGPSMTIDTACSSSLVALHLAAKALRDGECRVVVASGTNLIILAPNMYISESK
A.ochr.PKS-J2 1 TMARYNATGTARSIISNRISYFFDLKGASMTIDTACSSSLVALHQAVALSLQNRFAEASIVAGANLLDPTMYIAESN
A.ochr.pks1 1 HVEPVMGICTAYCGVANRISYHLNLMGPSTAVDAACASSLVAIHLGRQAII LSGESKVAIVGGVNAFGPGLTSVLDK

28. ábra. Az *Aspergillus* izolátumokban azonosított KS domáinak illesztése. *A. alb.*, *A.albertensis*; *A. ochr.*, *A. ochraceus*; *A. terr. ATNP*, *A. terreus* naftopiron szintáz; *A. mur.*, *A. muricatus*; *A. foet.*, *A. foetidus*.



29. ábra. Az *Aspergillus* izolátumokban azonosított KS domáinak rokonsági viszonyai más gombákban azonosított KS domain szekvenciákkal

3. 4. 3. A C-metilációs domén analízise

Az OA bioszintézise során a pentaketid vázhoz egy C-atom kapcsolódik feltehetőleg egy metiláz működése révén. Ellentétben az O- és N-metilációban szerepet játszó enzimekkel, melyeket külön gének kódolnak, a C-metilációban szerepet játszó aktivitásról feltételezik, hogy a PKS gén részét képezi (pl. a fumonizin, jersiniabaktin, epotilon bioszintézisben szerepet játszó PKS-ek esetében; Nicholson és mtsi, 2001). Feltehetőleg az OA bioszintézisben szerepet játszó PKS génen is megtalálható egy ilyen C-metilációs domén. A doménre tervezett primer pár (CmeT1 és CmeT2c) kb. 300-350 bp PCR terméket eredményez. A doménre tervezett primer párt sikerrel alkalmaztuk OA termelő *A. albertensis* izolátum esetében. Az amplifikált fragment további vizsgálata folyamatban van.

További munkánk során az azonosított DNS szakaszokat próbaként alkalmazva egy OA termelő izolátumból létrehozott génbankból hibridizáció révén azonosítjuk a homológ klónokat és azokat jellemezzük. Vizsgáljuk az OA bioszintézis gének elrendeződését, funkcióját, és alkalmazhatóságát OA specifikus génpróbák kifejlesztésére.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

2002. január 1-től hazánkban kötelezően érvényben van a HACCP rendszerek alkalmazása az élelmiszeriparban, amelyek garanciát szolgáltatnak arra, hogy a termékek a gyártási folyamat során mikrobiológiai, kémiai és fizikai ellenőrzések sorozatán menjenek keresztül és egyben komoly feladatot jelentenek a kutatóknak hiszen mindig újabb, megbízhatóbb és gyorsabb módszerek kidolgozására van szükség. A gyorsvizsgálati módszerek fejlesztésével és alkalmazásával a közegészségügyi kockázat minimálisra csökkenthető. A kémiai analitikai módszerek fejlődése lehetővé teszi kis mennyiségű anyag kimutatását, a molekuláris technikák alkalmazása a genetikai háttérrel nyújt információkat. Munkánk során a termelt mikotoxin mennyiségét a genetikai analízis eredményeivel hoztuk összefüggésbe, megoldást keresve a termelő szervezet molekuláris módszerekkel történő kimutatására.

A mikotoxinok a fonalasgombák másodlagos anyagcseretermékei, melyek az emberre és állatra mérgező hatásúak. Ezek egyik csoportját az ochratoxinok alkotják. Az ochratoxinok máj- és vesekárosító vegyületek, feltételezett okozói uroteliális tumoroknak és a hereráknak. Emberi és állati nefropátiák kialakításában vesznek részt, valamint magzatkárosító és rákkeltő hatással rendelkeznek. Az ochratoxinok csoportján belül legjelentősebb az ochratoxin A (OA) mérgező hatása, amit a molekula izokumarinvázához kapcsolódó klór-atom jelenlétével hoznak összefüggésbe. Az OA-t kimutatták már szemes kávéból, gabonafélékből, sörből, borból, olajos magvakból, gyümölcs- és zöldségfélékből, fűszerekből, anyatejből és emberi vérből. A termelő szervezetek elsősorban az *Aspergillus* nemzetség tagjai, azonban nagy számmal megtalálhatók a *Penicillium* fajok között is. Az OA jelenlétének kimutatására alkalmasak a kromatográfiás módszerek (TLC, HPLC), illetve megbízható ELISA kit is rendelkezésre áll a kis szennyezettség meghatározására.

A kávéminták és fűszerfélék OA szennyezettségének meghatározása után a mintákat táptalajra helyezve izoláltuk a termelő szervezeteket. Vizsgálataink azt igazolták, hogy az élelmiszerek OA szennyezettségének nem az elsőként leírt *A. ochraceus* az egyedüli forrása. Számos *Aspergillus* faj (pl. *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. tamarii*) rendelkezik e toxin termelésének képességével. A termékek OA szennyezettségét okozó fajok elsősorban a raktározás során fertőznek, és bár jelenlétük később nem mindig igazolható, de a nehezen eltávolítható toxinok tanúskodnak az általuk okozott fertőzöttségről.

Az *Aspergillus* fajok által termelt OA mennyisége tág határok, 0.1-1000µg/ml között változott. A "kistermelő" izolátumok (0.1-0.6µg/ml) közül az *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger* tenyészetében a hetedik napon volt legmagasabb a tápközeg OA szintje, míg mindkét *A. carbonarius* és az *A. ochraceus* O4 a tizedik napon termelte legnagyobb mennyiségben a toxint. A "nagytermelő" izolátumok közül az *A. albertensis* és az *A. melleus* szintén a hetedik napon érték el OA termelésük maximumát és a fermentlé OA szintje az inkubáció további napjain sem csökkent. Mindkét izolátum esetében megállapítottuk, hogy azok még 21 napos inkubáció után sem termeltek kevesebb OA-t (kb. 250 µg/ml), ezért ezeket az izolátumokat konstitutív OA termelőknek tekinthetjük és az *A. albertensis* ATCC 58745 törzset felhasználtuk más, nagy mennyiségű ochratoxint igénylő kísérletekhez és további kinetikai vizsgálatokhoz.

Az *A. albertensis* ATCC 58745 izolátum ochratoxin termelésének hőmérsékleti optimuma megtalálásához a tenyészeteket különböző hőmérsékleteken neveltük. A törzs 30°C-on termelt legnagyobb mennyiségben OA-t, vagyis a növekedési optimuma megegyezik a toxintermelés optimumával. Az *A. albertensis* ATCC 58745 törzs OA termelésének 30°C-on végzett vizsgálatát a termelt OA mennyiségét a micélium ergoszterin tartalmánál összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a két érték változása az inkubáció alatt hasonló tendenciát mutatott. Ennek a megfigyelésnek az a gyakorlati jelentősége, hogy az ergoszterin mennyiségének gyors meghatározása az OA szennyezettség meghatározására ad lehetőséget, ezáltal elvégezhető a közegészségügyi kockázat becslése.

Az élelmiszerekben és a takarmányokban előforduló mikotoxinok eltávolítására számos fizikai és kémiai módszert dolgoztak ki, azonban a módszerek okozta minőségbeli eltérések kizárják az ipari alkalmazást. A mikroorganizmusok közül a *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* fajok, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Phenylobacterium immobile*, valamint az *A. niger* karboxipeptidáz A és lipáz enzimei is képesek bontani az OA-t nem toxikus Oα-vá. *Bacillus pumilus*ból olyan antifungális metabolitokat izoláltak, amelyek akadályozzák az OA termelését. Munkánk során számos *A. fumigatus*, *A. niger* és *Rhizopus* sp. törzset találtunk, melyek képesek lebontani az OA-t, de ezek közül csak az *A. niger* rendelkezik GRAS státusszal, vagyis csak az általa termelt enzimek (pl. amiláz) és savak (pl. citromsav) használhatók fel élelmiszeradalékként.

Az *A. niger* CBS 120. 49 izolátum szilárd táptalajon sokkal gyorsabban felélte az OA-t, így 2 nap után a 2.5 µg/ml mennyiségből csak 5 µg/ml-t tudtunk kimutatni, az 5. nap után pedig már nem észleltük OA jelenlétét a táptalajban. Ezzel szemben a tápoldatban az OA-t

sokkal lassabban bontotta és még a hetedik napon is ki tudtuk mutatni az OA jelenlétét a fermentlében. További vizsgálatok vannak folyamatban az OA és ochratoxin α bontásáért felelős enzimek és génjeik azonosítására, illetve más gombafajok OA bontó képességének megtalálására.

Az *A. flavus* által termelt poliketid jellegű aflatoxin bioszintézisére bizonyos vegyületek serkentő, mások gátló hatással vannak, amit az *A. ochraceus* OA termelése esetében is megfigyeltek. Azt tapasztaltuk, hogy számos vegyület, mely az irodalomban fellelhető kutatási eredmények szerint gátolja az OA bioszintézist *A. ochraceus*-ban, nincs hatással az általunk vizsgált *A. albertensis* ATCC 58745 izolátum OA termelésére. Így pl. a koffein nem befolyásolta *A. albertensis*-ben az OA termelését, míg az *A. ochraceus* esetében gátolta. A megfigyeléseink felvetik annak a lehetőségét, hogy a két faj között az OA bioszintézisében, illetve annak szabályozásában jelentős eltérések vannak. Ennek tisztázására további kísérletek szükségesek.

Ochratoxintermelő képességgel az *Aspergillus* nemzetség különböző szekcióiba tartozó fajok rendelkeznek, ezért a köztük kialakult rokonsági kapcsolatokat vizsgáltuk. A filogenetikai analízishez ITS szekvencia adatokat, RFLP és RAPD mintázatokat és a fenotipikus tulajdonságokat használtuk fel. A szekvencia adatok alapján megállapítható, hogy az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* szekciója parafiletikus. Azoknak a fajoknak egy része, melyeket jelenleg a *Circumdati* szekció tagjaként tartanak számon, vizsgálataink alapján közelebbi rokonságot mutat más szekció(k) tagjaival. Az ITS szekvencia adatok analízisének eredményeit a morfológiai vizsgálatok nagymértékben alátámasztották. Vizsgálataink alapján pl. az *A. lanosus* a *P. alliaceus*-szal alkot jól elkülöníthető csoportot és a *Flavi* szekció tagjaival áll közelebbi rokonságban. Az *A. ochraceoroseus* és *A. robustus* ITS szekvencia adataik alapján a vizsgált fajok egyikével sem mutatott rokonságot. Ezek a fajok tisztázatlan rendszertani helyzetük miatt az *incertae sedis* kategóriába sorolandók. Az *A. campestris* az ITS szekvencia alapján legközelebbi rokonságot az *Aspergillus* nemzetség *Candidi* szekciójának tagjával, az *A. candidus*-sal mutat, amit morfológiai és szekvencia adatok is alátámasztanak. A *Cremeri* szekció tagjaival mutat rokonságot az *A. sepultus* és az *A. dimorphicus* is, mind morfológia, mind ITS szekvenciaadataik alapján az *A. wentii* rokonai.

Az általunk vizsgált izolátumok legtöbbje az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* szekciójának tagja, rokonságukat a magas bootstrap értékek bizonyítják. A *Circumdati* szekción belül két csoport különíthető el. Az egyikbe az *A. ochraceus*, *A. petrakii*, *A. melleus*, *A. ostianus* és a *P. muricatus* tartoznak, amelyekre jellemző a viszonylag rövid

konídiumtartó, a gömb alakú konídiumok és a barnássárga, téglavörös illetve levendula színű szkleróciumok (kivéve az *A. petrakiit*, amely nem képez szkleróciumot). A szekció másik csoportját alkotja az *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. bridgeri*, *A. insulicola*. Morfológiai sajátosságaik a durva felszínű, hosszú konídiumtartó, (kivéve az *A. insulicola* fajt), valamint az általában gömb alakú konídiumok, szkleróciumaik krémszínűek vagy halványsárgák.

A *Flavi* szekció filogenetikai analízise ITS szekvenciák, valamint a morfológiai tulajdonságok alapján olyan törzsfát eredményezett, amelyen három csoportot lehet elkülöníteni, amit a 26S rDNS szekvenciák vizsgálatának eredményei is alátámasztottak.

Az *A. flavus* és rokon fajai a *Flavi* szekció legnagyobb gazdasági jelentőséggel rendelkező csoportja. A fajokra jellemző, hogy a konídiumos fejek zöldes árnyalatúak és szkleróciumaik sötét színűek, ubikinon rendszerük Q-10(H₂) típusú. A filogenetikai analízis során kiderült, hogy az ide tartozó fajok 26S rRNS génje azonos D1-D2 régió szekvenciával rendelkezik. Az *A. tamarii* és rokonai, az *A. caelatus*, *A. terricola*, *A. terricola* var. *indicus*, *A. coremiiformis* és az *A. flavofurcati* s alkotják a másik csoportot. Konídiumaik olajzöld vagy barna színűek, ubikinon rendszerük Q-10(H₂). Az *A. alliaceus* és rokonai a szekción belül a legkisebb, csupán három taggal rendelkező csoportot alkotnak, amelyek Q-10 ubikinon rendszerrel rendelkeznek és a 26S rRNS génjük D1-D2 régiójának szekvenciája azonos. Az *A. zonatus* és *A. clavatoflavus* ITS szekvencia adatok alapján egymáshoz közel találhatók a törzsfán, de nem mutatnak közeli rokonságot a *Flavi* szekció egyik tagjával sem, valamint az *A. leporis* is elkülönül a *Flavi* szekció többi tagjától.

Az *A. viridinutans* az *Aspergillus* nemzetség *Fumigati* szekciójának tagjaként számos mikotoxint termel, pl. a viriditoxint, a fumifunginokat és fumitremorginokat, valamint számos – az ochratoxinokhoz hasonló - izokumarin származékot. Az *A. viridinutans* intraspecifikus variabilitását morfológiai sajátosságok, szénforrás hasznosítás tesztek, mitokondriális DNS és magi DNS RFLP analízis, valamint a β -tubulin gén szekvenciák analízise alapján vizsgáltuk. Az *A. viridinutans* fajhoz tartozó törzsek többsége hasonló genetikai, morfológiai és növekedési sajátosságokkal rendelkezik, kivételt képez az IMI 306135 és a JV3 izolátum, amelyek az *A. fumigatus* növekedési sajátosságaival mutat hasonlóságot. Az IMI 306135 izolátum esetében az *A. viridinutans*ra jellemző "bólintó" konídiumfejek is ritkán találhatók. Mindkét törzs ochratoxin termelő képességgel rendelkezik, amit immunkémiai módszerrel bizonyítottak, valamint RFLP mintázataik is azonosak. Az eredmények alapján a JV3 és az IMI 306135 törzsek távolabbi rokonai az *A. fumigatus*nak, mint a *N. fisherine*nek, mindezek alapján elképzelhető, hogy új fajról van szó.

Az ochratoxinok bioszintéziséért az *Aspergillus* fajokban is a poliketid-szintáz (PKS) enzim felelős, amelynek ketoszintáz (KS) doménjeinek szekvenciáját polimeráz láncreakcióval történő sokszorosítás után filogenetikai analízisnek vetettük alá. Az *Aspergillus* izolátumokban észlelt KS szekvenciák szétszórtan helyezkednek el a törzsfán, ami azt jelzi, hogy feltehetőleg különböző metabolitok bioszintézisében vesznek részt. További vizsgálatokat folytatunk annak tisztázására, hogy az általunk azonosított KS domén szekvenciák szerepet játszanak-e az OA bioszintézisben. Az OA bioszintézise során a pentaketid vázhoz egy C-atom kapcsolódik feltehetőleg egy metiláz enzim révén, így valószínűleg a PKS génen is megtalálható egy ilyen C-metilációs domén. A doménre tervezett primer párt sikerrel alkalmaztuk OA termelő *A. albertensis* izolátum esetében. Az amplifikált fragment további vizsgálata folyamatban van.

További munkánk során az azonosított DNS szakaszokat próbaként alkalmazva egy OA termelő izolátumból létrehozott génbankból hibridizáció révén azonosítjuk a homológ klónokat és azokat jellemezzük. Vizsgáljuk az OA bioszintézis gének elrendeződését, funkcióját és alkalmazhatóságát OA specifikus génpróbák kifejlesztésére.

5. SUMMARY

Application of HACCP systems in the food industry is a rule, operative from 1. January 2002. in Hungary. In one hand it provides a guarantee for the products to undergo a series of microbiological, chemical and physical examinations during the production process, while on the other hand it is a serious task for researchers to develop newer, more reliable and quicker methods continuously. The public-health hazard can be reduced to a minimum by application of quick assays. Improvement of the chemical analytical methods makes possible to detect less quantity of substances and the application of molecular techniques provides information about the genetic background of mycotoxin production. Quantity of the produced mycotoxin was correlated with the results of a genetic analysis to find a solution for identifying the producing organism by means of molecular biological methods.

Mycotoxins are products of the secondary metabolism of fungi that are toxic for human and animals. Among them, ochratoxins are hepatotoxic and nephrotoxic compounds and the presumed causative agents of the urothelial tumors and testicular cancer. They contribute to the formation of human and animal nephropathy moreover they have an embryo-damaging and carcinogen effect. Ochratoxin A (OA) has the most significant toxic effect among ochratoxins that corresponds to the presence of chlorine in its isocoumarine skeleton. OA was detected from coffee, cereals, beer, wine, oil-seeds, fruits and vegetables, spices, breast-milk and human blood. For the most part the producing species are members of the *Aspergillus* genus but *Penicillium* species can also produce OA. Chromatographic methods (HPLC, TLC) are suitable for the detection of OA and an ELISA kit can be used for the detection of low-level contamination.

To determine the contamination of coffee and spice the samples were put on a culture medium to isolate the producing organisms. Our data revealed that the primary source of the contamination of food products is not only *A. ochraceus* as described previously. A number of other *Aspergillus* species (e.g.: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. tamarii*) also has the ability to produce this toxin. The species causing OA contamination of the products contaminate mainly during storage, although their presence not always can be proven later, but the toxins can be removed hardly and indicate the contamination caused by the species.

A wide range of fluctuation of the amount of OA produced by the *Aspergillus* species – 0.1-1000 µg/ml – could be observed. Of the “less productive” isolates (0.1-0.6

µg/ml) in the culture of *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger* the highest OA level of the medium can be observed on the seventh day, while both *A. carbonarius* isolates and *A. ochraceus* produced the highest level of toxin on the tenth day. The “high productive” isolates of *A. albertensis* and *A. melleus* reached the maximum level of their production on the seventh day and the OA level of the broth didn’t decrease on the further days of incubation. It was established in case of both isolates that their OA production didn’t decrease even after 21 days of incubation (approx.: 250µg/ml) thus they can be regarded as constitutive OA producers and *A. albertensis* ATCC 58745, was utilized to other experiments with high ochratoxin demand and further kinetic assays.

To find the temperature optimum of the ochratoxin production of *A. albertensis* ATCC 58745 the cultures were grown at different temperatures. *A. albertensis* ATCC 58745 produced the highest amount of OA at 30°C thus the optimum of growth is the same as the optimum of toxin production. Making comparison OA production, dry weight and ergosterol production of *A. albertensis* ATCC 58745 it was found that changes in these two values showed similar tendencies during the incubation period. The practical consequence is that: quick determination of the amount of ergosterin makes possible to determine the OA contamination and the prediction of microbiological hazard can be carried out.

A number of chemical and physical methods were worked out for removing mycotoxins from foods and feeds but the quality requisites for them have made their industrial application impossible. Carboxypeptidase A and lipase enzymes *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Phenylobacterium immobile* and the *A. niger* can dissociate OA to nontoxic Oα. Antifungal agents were isolated from *Bacillus pumilus* that interfere with OA production. A number of *A. fumigatus*, *A. niger* és *Rhizopus* sp. isolates were found during our work that can dissociate OA, but only *A. niger* has GRAS status of them namely enzymes (e.g.: amylase) and acids (e.g.: citric-acid) produced by *A. niger* can be utilized as food additive.

A. niger isolate CBS 120.49 consumed OA much quicker in solid culture medium, OA could not be detected after 5 days incubation. However, OA degradation was much slower in liquid culture medium. Further experiments are in progress for the identification of enzymes responsible for degradation of OA and ochratoxin α.

Certain compounds have a facilitating others have an inhibiting effect on the biosynthesis of the polyketid aflatoxin and the same were observed in the case of OA production of *A. ochraceus*. We found that a number of compounds that inhibits the OA

biosynthesis in *A. ochraceus* has no effect on OA production of the *A. albertensis* ATCC 58745 isolate examined by us. For example the OA production of *A. albertensis* was't affected by caffein, but caffein was an inhibitor of OA production in *A. ochraceus*. These observations suggested that there are significant differences in the OA biosynthesis or its regulation between these two species. Further experiments are necessary to make these findings clear.

Species of different sections of *Aspergillus* has the ability of producing ochratoxin therefore the degree of relationship between them was examined. ITS sequence data, RFLP and RAPD patterns and phenotypic properties were used for phylogenetic analysis. The *Circumdati* section of *Aspergillus* genus is paraphyletic as concluded from the sequence data. By our examinations some of the species classified in the *Circumdati* section show more closer relation to the members of other section(s). Data of the ITS sequences are particularly supported by morphological examinations. According to our examinations for example *A. lanosus* and *P. alliaceus* form a clearly isolable group close by related to section *Flavi*. *A. ochraceoroseus* and *A. robustus* have no relatives between the examined species on the basis of the ITS sequence data. These species can be classified to the *incertae sedis* category because of their uncertain position in the systematics. According to the ITS sequence data *A. campestris* is in the closest relationship with *A. candidus* that is the member of *Candidi* section. *A. sepultus* and *A. dimorphicus* are relatives, of members of *Cremeri* section according to either the morphological or the ITS sequence data.

Most of the isolates examined by us are members of the section *Circumdati* of *Aspergillus* genus and their relatedness is supported by high bootstrap values. Two groups can be separated in section *Circumdati*. *A. ochraceus*, *A. petrakii*, *A. melleus*, *A. ostianus* and *P. muricatus* can be classified in one group and their characteristics are the relatively short conidiophore, the sphere shaped conidia and the buff, brick-red, or lavender sclerotia (except for *A. petrakii*, which doesn't form sclerotium). *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. bridgeri*, *A. insulicola* can be classified in the other group of the section. Three groups could be separated from phylogenetic tree was resulted by the phylogenetic analysis of section *Flavi* by ITS sequences and morphological features that was also supported by the results of 26r DNA sequence analysis.

A. flavus and its relatives have the most significant economical importance in *Flavi* section. The characteristic feature of these species is that the heads of conidia has a greenish hue, their sclerotia are dark green and their ubiquinone system is of Q-10(H₂) type. Phylogenetic analysis revealed that the 26S rRNA genes of the species classified in

this group have identical D1-D2 region sequence. The other group is formed by the relatives of *A. tamari*: *A. caelatus*, *A. terricola*, *A. terricola* var. *indicus*, *A. coremiiformis* and *A. flavofurcatis*. Their conidia are olive-green or brown and their ubiquinone system is of Q-10(H₂) type. The smallest group of the section that has only three members is formed by the relatives of *A. alliaceus*, they have ubiquinone system of Q-10(H) type and identical D1-D2 region sequences. According to the ITS sequence data *A. zonatus* and *A. clavatoflavus* are related to each other, but they are not related closely to any members of *Flavi* section. *A. leporis* also segregates from the other members of the section *Flavi*.

A. viridinutans is a member of section *Fumigati* of the *Aspergillus* genus, and has the ability of producing a number of mycotoxins such as viriditoxin, fumifungins, fumitremorgins and several isocoumarine derivatives. The intraspecific variability of *A. viridinutans* was examined by morphological characteristics, carbon source utilization tests, mitochondrial DNA and nuclear DNA RFLP analysis and by the analysis of β -tubulin gene sequences.

Most of the isolates belonging to *A. viridinutans* have similar genetic, morphological and growth characteristics except IMI 306135 and JV3 isolates, which show similarity to the growth characteristics of *A. fumigatus*. In the case of IMI 306135 isolate “nodding” heads of conidia typical for *A. viridinutans* can be found rarely. Both isolates have the ability of producing ochratoxin, which was proved by an immunochemical method, besides their RFLP patterns are the same too. According to our results isolates JV3 and IMI 306135 are more distant relatives of *A. fumigatus* than *N. fisheri* and possibly represent a new species.

A polyketide-synthase (PKS) is responsible for the biosynthesis of ochratoxins in *Aspergillus* species, whose ketosynthase (KS) domain sequences – after an amplification by polymerase chain reaction (PCR) – were examined by phylogenetic analysis. The KS sequences detected in *Aspergillus* isolates are scattered on the phylogenetic tree, which indicates that supposedly take part in the biosynthesis of different metabolites. Further experiments are in progress for the elucidation whether KS domain sequences identified by us play a role in OA biosynthesis. During the biosynthesis of OA the pentaketid skeleton binds a carbon atom possibly by the help of a methyl-transferase enzyme thus the presence of such a C-methylthion domain is presumable. The primer pair designed was used with success for the amplification of C-methylation domain sequences in the case of OA producing *A. albertensis* isolate. Further examination of the amplified fragment is in progress.

During our further work clones will be identified homologous to the already identified DNA fragments in a gene bank of an OA producing isolate. The applicability of OA biosynthesis genes will also be examined for developing OA specific gene probes.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm dr. Varga Jánosnak és dr. Téren Józsefnek a munkám során nyújtott sok segítséget és azt, hogy megosztották velem a témához fűződő összes ismeretüket és tapasztalatukat.

Köszönöm néhai dr. Kevei Ferenc tanár Úrnak a lehetőséget, hogy a Mikrobiológiai Tanszéken dolgozhattam, és itt készíthettem el a szakdolgozatomat, illetve a doktori disszertációm is.

Köszönöm dr. Szabó Gábornak, az Élelmiszeripari Főiskola akkori főigazgatójának, hogy lehetőséget adott kísérleteim egy részének intézményükben történő végrehajtásához.

Köszönettel tartozom a családomnak, Csabának és a kislányomnak, Lillának, hogy lehetővé tették dolgozatom megírását, valamint Szüleimnek, hogy mindvégig támogatták tanulmányaimat, mellettem álltak a nehéz időszakokban is.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának tanácsaikért, segítőkészségükért és munkám iránt tanúsított figyelmükért.

IRODALOMJEGYZÉK

- ABARCA, M. L., BRAGULAT, M. R., CASTELLÁ, G., CABAÑES, F. J. (1994) Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2650-2652.
- ABARCA, M. L., BRAGULAT, M. R., CASTELLÁ, G., ACCENSI, F., CABAÑES, F. J. (1998) New ochratoxigenic species in the *Aspergillus* genus. J. Food Prot. 60, 1580-1582.
- ABDEL-WAHAB, M. A., NADA, S. A., ARBID, M. S. (1999) Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats. J. Appl. Toxicol. 19, 7-12.
- AKIYAMA, H., TOYODA, M., KATO, M., IGIMI, S., KUMAGAI, S. (1997) The degradation of several mycotoxins by human intestinal microflora cultured by continuous flow culture system. Mycotoxins 44, 21-27.
- ALDRIDGE, D. C., GROVE, J. F., TURNER, W. B. (1966) 4-acetyl-6,8-dihydroxy-5-methyl-2-benzopyran-1-one, a metabolite of *Aspergillus viridinutans*. J. Chem. Soc. C 1966, 126-129.
- ARAMAKI, I., FUKUDA, K., HASHIMOTO, T., ISHIKAWA, T., KIZAKI, Y., OKAZAKI, N. (1995) Near infrared diffuse reflectance spectrophotometric analysis of mycelial weight in rice Koji and search for characteristic wavelength for Mycelia. Seibutsu Kogaku Kaishi 73, 33-36.
- AUFAUVRE-BROWN, A., TANG, C., HOLDEN, D. W. (1993) Detection of gene-disruption events in *Aspergillus* transformants by polimerase chain reaction direct from conidiospores. Curr. Genet. 24, 177-178.
- BARNA-VETRÓ, I., SOLTÍ, L., TÉREN, J., GYÖNGYÖSI, Á., SZABÓ, E., WÖFLING, A. (1996) Sensitive ELISA test for determinatin of ochratoxin A. J. Agric, Food Chem. 44, 4071-4074.
- BATISTA, L. R., CHALFOUN, S. M., PRADO, G., SCHWAN, R. F., WHEALS, A. E. (2003) Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.).Int J. Food Microbiol. 85(3), 293-300.
- BAUDRIMONT, I., BETBEDER, A. M., GHARBI, A., PFOHL-LESZKOWICZ, A., DIRHEIMER, G., CREPPY, E. E. (1994) Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. Toxicology 89, 101-111.
- BECK, J., RIPKA, S., SIEGNER, A., SCHILTZ, E., SCHWEIZER, E. (1990) The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*: Its gene structure relative to that of other poliketide synthases. Eur. J. Biochem. 192, 487-498.
- BENDELE A. M., CARLTON W. W., KROGH P., LILLEHOJ E. B. (1985) Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3H)F1 mouse. J. Natl. Cancer Inst. 75(4), 733-42.

- BERBEE, M. L., YOSHIMURA, A., SUGIYAMA, J., TAYLOR J. W. (1995) Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. *Mycologia* 87, 210-222.
- BINGLE L. E. H., SIMPSON T. J., LAZARUS C. M. (1999) Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genet Biol* 26, 209-223.
- BOWDITCH, B. M., ALBRIGHT, D. G., WILLIAMS, J. G. K., BRAUN, M. J. (1993) Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods Enzymol.* 224, 194-309.
- BÖRJESSON, T., STÖLLMAN, U., SCHNÜRER, J. (1990) Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. *Appl. Environ. Microbil.* 56, 3705-3710.
- BRIDGE, P. D., HAWKSWORTH, D. L., KOZAKIEWICZ, Z., ONIONS, A. H. S., PATERSON, R. R. M., SACKIN, M. J., SNEATH, P. H. A. (1989) A reappraisal of terverticillate *Penicillia* using biochemical, physiological and morphological features. I. Numerical taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2941-2966.
- BUCHANAN, R. L., TICE, G., MARINO, D. (1982) Caffeine inhibition of ochratoxin A production. *J. Food Sci.* 47, 319-321.
- BUCHANAN, R. L., HOOVER, D. G., JONES, S. B. (1983) Caffeine inhibition of aflatoxin production: mode of action. *Appl Environ Microbiol.* 46 (5), 1193-1200.
- BUCHELI, P., MEYER, I., PITTET, A., VUATAZ, G., VIANI, R. (1998) Industrial storage of green robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. *J. Agricult. Food Chem.* 46, 4507-4511.
- BUCHMANN, N. B., HALD, B. (1985) Analysis, occurrence and control of Ochratoxin A residues in Danish pig kidneys. *Food Addit. Contam.* 2(3), 193-199.
- BURDITT, S. J., HAGLER, W. M. JR, HAMILTON, P. B. (1984) Feed refusal during ochratoxicosis in turkeys. *Poult. Sci.* 63, 2172-2174.
- BURNS, R. B., MAXWELL, M. H. (1987) Ochratoxicosis A in young Khaki Campbell ducklings. *Res Vet Sci.* 42 (3), 395-403.
- BUNTJER, J. B. (1997) Phylogenetic computer tools (PhylTools). Version 1.32 for Windows. Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University, Netherland.
- BÜTTNER, P., KOCH, F., VOIGT, K., QUIDDE, T., RISCH, S., BLAICH, R., BRÜCKNER, B., TUDZYNSKI, P. (1994) Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Curr. Genet.* 25, 445-450.
- CAMPBELL-PLATT, G., COOK, P. E. (1989) Fungi in the production of foods and their ingredients. *J. Appl. Bacteriol.* 18 (Suppl.), 117S-131S.

- CASTEGNARO, M., BAREK, J., FREMY, J. M., LAFONTAINE, M., MIRAGLIA, M., SANSONE, E. G., TELLING, G. M. (1991) Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: some mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- CASTEGNARO, M., MOHR, U., PFOHL-LESZKOWICZ, A., ESTEVE, J., STEINMANN, J., TILLMANN, T., MICHELON, J., BARTSCH, H. (1998) Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *Int. J. Cancer* 77, 70-75.
- C HELKOWSKI, J., SZEBIOTKO, K., GOLINSKI, P., BUCHOWSKI, M., GODLEWSKA, B., RADOMYRSKA, W., WIEWIOROWSKA, M. (1982) Mycotoxins in cereal grain. 5. Changes of cereal grain biological value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation. *Nahrung* 26, 1-7.
- CHELKOWSKI, J., SAMSON, R. A., WIEWIOROWSKA, M., GOLINSKI, P. (1987) Ochratoxin A formation by isolated strains of the conidial stage of *Aspergillus glaucus* Link ex Grey (= *Eurotium herbariorum* Wiggers Link ex Grey) from cereal grains. *Nahrung* 31, 267-270.
- CHEN, K. C., YIN, W. S., TIU, C., HOUNG, J.Y. (1994) 11 alpha-hydroxylation of progesterone using modified alginate-immobilized cells. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 551-555.
- CHERNOZEMSKY I. N., STOYANOV I. S., PETKOVA-BOCHAROVA T. K., NICOLOV I. G., DRAGANOV I. V., STOICHEV I. I., TANCHEV Y., NAIDENOV D., KALCHEVA N. D. (1977) Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in Vratza district, Bulgaria. *Int. J. Cancer* 19 (1), 1-1.
- CHRISTENSEN, M. (1981) A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia* 73, 1056-1084.
- CHRISTENSEN, M. (1982) The *Aspergillus ochraceus* group: two new species from western soils and a synoptic key. *Mycologia* 74, 210-225.
- CIEGLER, A. (1972a) Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. *Can. J. Microbiol.* 18, 631-636.
- CIEGLER, A., FENNELL, D. J., MINTZLAFF, H. J., LEISTNER, L. (1972b) Ochratoxin synthesis by *Penicillium* species. *Naturwissenschaften* 59, 365-366.
- COTTY, P. J., BAYMAN, P., EGEL, D. S., ELIAS, K. S. (1994) Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In *The genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial applications* (Powell, K. A., Renwick, A., Peberdy, J. F. eds.), Plenum Press, London, pp. 1-28.

- CREPPY, E. E., BAUDRIMONT, I., BETBEDER, A. M. (1995) Intoxication by ochratoxin A (OTA): prevention of toxic effects. *Toxicol.* 33, 1115-1116.
- CREPPY, E. E., BAUDRIMONT, I., BETBETER, A. M. (1998) How aspartame prevents the toxicity of ochratoxin A. *J. Toxicol. Sci.* 23 (Suppl. 2), 165-172.
- CROFT, J. H., VARGA, J. (1994) Application of RFLPs systematics and population genetics of *Aspergilli* pp. 277-289 in K. A. Powell, A. Renwick, J. F. Peberdy, Eds.: *The genus Aspergillus: from Taxonomy and Genetics to Industrial Application*. Plenum Press, New York.
- CROWHURST, R. N., HAWTHORNE, B. T., RIKKERINK, E. H. A., TEMPLETON, M. D. (1991) Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *Cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.* 20, 391-396.
- CRUICKSHANK, R. H., PITT, J. I. (1990) Isoenzyme patterns in *Aspergillus flavus* and closely related species. In *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*, ed. by Samson, R. A. and Pitt, J. I., Plenum Press, New York. 259-265.
- DAVIES, A. M. C., GRANT, A. (1987) Review: near infra-red analysis of food. *Int. J. Food Sci. Technol.* 22 (3), 191-207.
- DEBERGHES, P., BETBEDER, A. M., BOISARD, F., BLANC, R., DELABY, J. F., KRIVOBOK, S., STEIMAN, R., SEIGLE-MURANDI, F., CREPPY, E. E. (1995) Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. *Mycotoxin Res.* 11, 37-47.
- DOSTER, R. C., SINNHUBER, R. O., PAWLOWSKI, N. E. (1974) Acute intraperitoneal toxicity of ochratoxin A and B derivatives in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Food Cosmet Toxicol.* 12 (4), 499-505.
- EDWARDS, S. G., O'CALLAGHAN, J., DOBSON, A. D. W. (2002) PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi, *Mycol. Res.* 106 1005–1025.
- EL-BANNA, A., PITT, J. I., LEISTNER, L. (1987) Production of mycotoxins by *Penicillium* species. *System. Appl. Microbiol.* 10, 42-46.
- EL-KADY, I., EL-MARAGHY, S., ZOHRI, A. N. (1994) Mycotoxin producing potential of some isolates of *aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products. *Microbiol. Res.* 149, 297-307.
- FABRITIUS, A. L., JUDELSON, H. S. (1997) Mating-type loci segregate aberrantly in *Phytophthora infestans* but normally in *Phytophthora parasitica*: implications for models of mating-type determination. *Curr. Genet.* 32(1), 60-65.
- FANELLI, C., FABBRI, A. A., FINOTTI, E., PASSI, S. (1983) Stimulation of aflatoxin biosynthesis by lipophilic epoxides. *J. Gen. Microbiol.* 129 (Pt 6), 1721-1723.

- FAO 2000. Proposed draft code of practice for the prevention of contamination by ochratoxin A in cereals. Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Beijing, China (Codex Alimentarius Commission Agenda item 16B).
- FELSENSTEIN, J. (1995) PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.57c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- FERREIRA, N. P. (1968) The effect of amino acids on the production of ochratoxin A in chemically defined media. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 34(4), 433-440.
- FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C., SVENDSEN, J. A. (1983) Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 581-585.
- FOSTER, L. M., KOZAK, K. R., LOFTUS, M. G., STEVENS, J. J., ROSS, I. K. (1993) The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycol. Res.* 97, 769-781.
- FRANK, M. (1999) HACCP and its mycotoxin control potential: an evaluation of ochratoxin A in coffee production. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, Tunis.
- FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. (2000) *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. *Stud. Mycol.* 45, 201-207.
- GALTIER, P., ALVINERIE, M. (1976) In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Ann. Rech. Vet.* 7, 91-98.
- GALTIER, P., ALVINERIE, M., CHARPENTEAU, J. L. (1981) The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food Cosmet. Toxicol.* 19(6), 735-738.
- GALVANO, F., PIETRI, A., BERTUZZI, T., PIVA, A., CHIES, L., GALVANO, M. (1998) Activated carbons: in vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J. Food Protect.* 61, 469-475.
- GAMS, W., CHRISTENSEN, M., ONIONS, A. H. S., PITT, J. I., SAMSON, R. A. (1985) Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In *Advances in Aspergillus and Penicillium systematics* (ed. by Samson, R. A. and Pitt, J. I.), Plenum Press, New York, pp. 55-62.
- GEISER, D. M., FRISVAD, J. D., TAYLOR, J. W. (1998) Evolutionary relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial β -tubulin and hydrophobin DNA sequences. *Mycologia* 90, 831-845.
- GOMI, K., TANAKA, A., IIMURA, Y., AND TAKAHASHI, K. (1989) Rapid differentiation of four related species of koji molds by agarose gel electrophoresis of genomic DNA digested with *Sma*I restriction enzyme. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 35, 225-232.

- GROSSE, Y., CHEKIR-GHEDIRA, L., HUC, A., OBRECHT-PFLUMIO, S., DIRHEIMER, G., BACHA, H., PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1997) Retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Lett.* 114, 225-229.
- GUPTA, M., BANDOPADHYAY, S., PAUL, B., MAJUMDER, S. K. (1979) Hematological changes produced in mice by ochratoxin A. *Toxicology* 14, 95-98.
- GUTHRIE, P. A. I., MAGILL, C. W., FREDERIKSEN, R. A., ODVODY, G. N. (1992) Random Amplified Polimorphic DNA Markers: A System for Identifying and Differentiating Isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathol.* 82, 832-835.
- HARWIG, J. (1974) Ochratoxin A and related metabolites. I. F. H. Purchase (ed.). *Mycotoxins*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- HAUBECK, H. D., LORKOWSKI, G., KOLSCH, E., ROSCHENTHALER, R. (1981) Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 1040-1042.
- HILL, J. C., JOHNSON, G. T. (1969) Microbial transformation of phenazines by *Aspergillus sclerotiorum*. *Mycologia* 61, 452-467.
- HOEHLER, D., MARQUARDT, R. R., MCINTOSH, A. R., HATCH, G. M. (1997) Induction of free radicals in hepatocytes, mitochondria and microsomes of rats by ochratoxin A and its analogs. *Biochim. Biophys. Acta* 1357, 225-233.
- HOPWOOD, D. A. (1997) Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem. Biol.* 97, 2465-2497.
- HORIE, Y. (1995) Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakkai Kaiho* 36, 73-76.
- HORN, B. W. (1997) *Aspergillus caelatus*, a new species in section *Flavi*. *Mycotaxon* 61, 185-191.
- HUFF, W. E., WYATT, R. D., TUCKER, T. L., HAMILTON, P. B. (1974) Ochratoxicosis in the broiler chicken. *Poult. Sci.* 53(4), 1585-1591.
- HUFF, W. E., DOERR, J. A., HAMILTON, P. B. (1979) Decreased glycogen mobilization during ochratoxicosis in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 122-126.
- HULT, K., TEILING, A., GATENBECK, S. (1976) Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 443-444.
- HUTCHINSON C. R., FUJII I. (1995) Polyketide synthase gene manipulation: structure-function approach in engineering novel antibiotics. *An. Rev. Microbiol.* 49, 201-238.
- HWANG, C. A., DRAUGHON, F. A. (1994) Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Food Protect.* 57, 410-414.

- ITO, Y., PETERSON, S. W., GOTO, T. (1999) Properties of *Aspergillus tamarii*, *A. caelatus* and related species from acidic tea field soils in Japan. *Mycopathologia* 144, 169-175.
- JESWAL, P. (1998) Antidotal effect of grape juice (*Vitis vinifera*) on ochratoxin A caused hepatorenal carcinogenesis in mice (*Mus musculus*). *Cytobios* 93, 123-128.
- JUDELSON, H. S., SPIELMAN, L. J., SHATTOCK, R. C. (1995) Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora Infestans*. *Genetics* 141(2), 503-512.
- KAMPHUIS, H. J., NOTERMANS, S., VEENEMAN, G. H., BOOM, J. H. VAN, ROMBOUTS, F. M. (1989) A rapid and reliable method for the detection of molds in foods: using the latex agglutination assay. *J. Food. Prot.*, 52(4), 244-247.
- KANISAWA, M., SUZUKI, S. (1978) Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann*. 69(4), 599-600.
- KANISAWA, M., SUZUKI, S., MOROI, K. (1990) The mode of action of ochratoxin A in acute enteritis in rats. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 10, 56-63.
- KARLOVSKY, P. (1999) Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Nat. Toxins* 7, 1-23.
- KERKADI, A., BARRIAULT, C., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A., YOUSEF, I. M., ZHU, X. X., TUCHWEBER, B. (1999) Cholestyramine protection against ochratoxin A toxicity: role of ochratoxin A sorption by the resin and bile acid enterohepatic circulation. *J. Food Protect.* 62, 1461-1465.
- KING, A. D. JR., HOCKING, A. D., PITT, J. I. (1979) Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 959-964.
- KLICH, M. A., MULLANEY, E. J. (1987) DNA restriction enzyme fragment polymorphism as a tool for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae*. *Exp. Mycol.* 11, 170-175.
- KLICH, M. A., PITT, J. I. (1985) The theory and practise of distinguishing species of the *Aspergillus flavus* group. In *Advances in Aspergillus and Penicillium systematics*, ed. by Samson, R. A. and Pitt, J. I., Plenum Press, New York, pp. 211-220.
- KOZAKIEWICZ, Z. (1989) *Aspergillus* species on stored products. *Mycol. Papers* 161, 1-188.
- KOZLOWSKI, M., STEPIEN, P. P. (1982) Restriction analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Aspergillus* as an aid in taxonomy. *Jour. Gen. Microbiol.* 128, 471-476.
- KROGH, P., HALD, B., GIERSTEN, P., MYKEN, F. (1974) Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments. *Appl. Microbiol.* 28, 31-34.

- KUNDU, A. K., MANNA, S., PAL, N. (1974) Purification and properties of a new extracellular collagenase from *Aspergillus sclerotiorum*. Indian J. Exp. Biol. 12, 441-443.
- KURAISHI, H., ITOH, M., TSUZAKI, N., KATAYAMA, Y., YOKOYAMA, T., SUGIYAMA, J. (1990) The ubiquinone system as a taxonomic aid in *Aspergillus* and its teleomorphs. In Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification, ed. by Samson, R. A. and Pitt, J. I., Plenum Press, New York, pp. 407-421.
- KURTZMAN, C. P., SMILEY, M. J., ROBNETT, C. J., WICKLOW, D. T. (1986) DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. Mycologia 78, 955-959.
- LAMPER, CS., TÉREN, J., BARTÓK, T., KOMORÓCZY, R., MESTERHÁZY, Á., SÁGI, F. (2000) Predicting DON contamination in Fusarium-infected wheat grains via determination of the ergosterol content. Cer. Res. Comm. 28, 337-344.
- LAMPER, CS. (2001) Hatékony módszerek *Fusarium* fajok trichotecén-vázis toxinjainak (DON, NIV) szteroid-és zsírsavprofiljainak vizsgálatára és a gombafertőzöttség objektív meghatározására. Ph. D. értekezés.
- LAROCHE, A., GAUDET, D. A., SCHAALJE, G. B., ERICKSON, R. S., GINNS, J. (1995) Grouping and identification of low temperature basidiomycetes using mating, RAPD and RFLP analyses. Mycol. Res. 99(3), 297-310.
- LEACH, J., FINKELSTEIN, D.B., RAMBOSEK, J.A. (1986). Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi. Fungal Genet. Newslett. 33, 32-33.
- LEE, T., YUN, S. H., HODGE, K. T., HUMBER, R. A., KRASNOFF, S. B., TURGEON, G. B., YODER, O. C., GIBSON, D. M. (2001) Polyketide synthase genes in insect- and nematode-associated fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 181-187.
- LILLEHOJ, E. B., MILBURN, M. S. (1973) Viriditoxin production by *Aspergillus viridinutans* and related species. Appl. Microbiol. 26, 202-205.
- LIN, H. H., COUSIN, M. A. (1987) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of molds in foods. J. Food. Sci., 52, 1089-1094, 1096.
- LOUDON, K. W., BURNIE, J. P., COKE, A. P., MATTHEWS, R. C. (1993) Application of polymerase chain reaction to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by random amplification of polymorphic DNA. J. of Clin. Microbiology, 31, 1117-1121
- LUISSETTI, M., PICCIONI, P. D., DYNE, K., DONNINI, M., BULGHERONI, A., PASTURENZI, L., DONNETTA, A. M., PEONA, V. (1991) Some properties of the alkaline proteinase from *Aspergillus melleus*. Int. J. Tissue React. 13, 187-192.
- MAGGON, K. K., GUPTA, S. K. (1977) Venkatasubramanian TA. Biosynthesis of aflatoxins. Bacteriol Rev. 41 (4), 822-855.

- MANTLE, P. G. (2000) Uptake of radiolabelled ochratoxin A from soil by coffee plants. *Phytochem.* 53, 377-378.
- MANCZINGER, L., POLNER, G. (1987) Cluster analysis of carbon source utilization patterns of *Trichoderma* isolates. *System. Appl. Microbiol.* 9, 214-217.
- MALLOCH, D., CAIN, R. F. (1972) The *Trichocomaceae*: ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces* and *Penicillium* imperfect states. *Can. J. Bot.* 50, 2613-2628.
- MAUPETIT, P., GATEL, F., CAHAGNIER, B., BOTOREL, G., CHARLIER, M., COLLET, B., DAUVILLIER, P., LAFFITEAU, J., ROUX, G. (1993) Quantitative estimation of fungal infestation of feedstuffs by determining ergosterol content. 44th Annual Meeting of the EAAP, Aarhus, Denmark, 16-19 August, 1993.
- MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A. (1992) A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70, 3968-3988.
- MCMASTERS, D. R., VEDANI, A. (1999) Ochratoxin binding to phenylalanyl-tRNA synthetase: computational approach to the mechanism of ochratoxicosis and its antagonism. *J. Med. Chem.* 42, 3075-3086.
- MEGNEGNEAU, B., DEBETS, F., HOEKSTRA, R. F. (1993) Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.* 23, 323-329.
- MIAO, V., COFFET-LE GAL, M. F., BROWN, D., SINNEMANN, S., DONALDSON, G., DAVIES, J. (2001) Genetic approaches to harvesting lichen products. *Trends Biotechnol.* 19, 349-355.
- MONDON, P., THELU, J., LEBEAU, B., AMBROISE-THOMAS, P., GRILLOT, R. (1995) Virulence of *Aspergillus fumigatus* strains investigated by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Med. Mycol.* 42, 299-303.
- MOROI, K., SUZUKI, S., KUGA, T., YAMAZAKI, M., KANISAWA, M. (1985) Reduction of ochratoxin A toxicity in mice treated with phenylalanine and phenobarbital. *Toxicol. Lett.* 25, 1-5.
- MOSS, M. O. (1996) Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 13 (Suppl.), 5-9.
- MOTOAKI, T., NAKAZONO, E., TSUSHIMA, S., MORICAWA, T., MTSUMOTO, N. (1998) Characterization of two morphological groups of isolates of *Phytium ultimum* var. *ultimum* in a vegetable field. *Mycoscience* 39, 135-144.
- MUNIMBAZI, C., BULLERMAN, L. B. (1998) Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.* 84, 959-968.

- MURAKAMI, H., HAYASHI, K., USHIJIMA, S. (1982) Useful key characters separating three *Aspergillus* taxa: *A. sojae*, *A. parasiticus* and *A. toxicarius*. J. Gen. Appl. Microbiol. 28, 55-60.
- NICHOLSON, T. P., RUDD, B. A. M., DAWSON, M., LAZARUS, C. M., SIMPSON, T. J., COX R. J. (2001) Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. Chem Biol 8, 157-178.
- NIKKUNI, S., NAKAJIMA, H., HOSHINA, S., OHNO, M., SUZUKI, C., KASHIWAGI, Y., MORI, K. (1998) Evolutionary relationships among *Aspergillus oryzae* and related species based on the sequences of 18S rRNA genes and internal transcribed spacers. J. Gen. Appl. Microbiol. 44, 225-230.
- NOTERMANS, S., SOENTORO, P. S. (1986) Immunological relationship of extra-cellular polysaccharide antigens produced by different mould species. Antonie Van Leeuwenhoek 52(5), 393-401.
- OBRECHT-PFLUMIO, S., GROSSE, Y., PFOHL-LESZKOWICZ, A., DIRHEIMER, G. (1996) Protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney. Arch. Toxicol. 70, 244-248.
- OBRECHT-PFLUMIO, S., CHASSAT, T., DIRHEIMER, G., MARZIN, D. (1999) Genotoxicity of ochratoxin A by *Salmonella* mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. Mutat. Res. 446, 95-102.
- ONO, H., KATAOKA, A., KOAKUTSU, M., TANAKA, K., KAWASUGI, S., WAKAZAWA, M., UENO, Y., MANABE, M. (1995) Ochratoxin A producibility by strains of *Aspergillus niger* group stored in IFO culture collection. Mycotoxins 41, 47-51.
- OOIKE, M., NOZAWA, K., UDAGAWA, S. I., KAWAI, K. I. (1997) Bisindolylbenzenoids from ascostromata of *Petromyces muricatus*. Can. J. Chem. 75, 625-628.
- PATERSON, R. (1986) Standardized one- and two dimensional thin-layer chromatographic methods for the identification of secondary metabolites in *Penicillium* and other fungi. J. Chromatog. 368, 249-264.
- PATERSON, R. R. M. (1993) Effects of growth on taxonomically useful ubiquinone-lipid profiles from *Penicillium*. Mycol. Res. 97, 173-178.
- PETERSON, S. W. (1995) Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremeri* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences. Mycol. Res. 99, 1349-1355.
- PETERSON, S. W. (1997) A phylogeny of *Aspergillus* based on rDNA sequences. In Third International Workshop on *Penicillium* and *Aspergillus*. Abstracts (R. A. Samson and J. I. Pitt, Eds.), p. 18-19. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.

- PETERSON, S. W. (2000) Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based upon rDNA sequence analysis. In *Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification*, ed. by Samson, R. A. and Pitt, J. I., Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 323-355.
- PETROSKI, R. J., BATES, R. B., LINZ, G. S., ROSAZZA, J. P. (1983) Microbial transformation of natural antitumor agents. XII. Conversion of bouvardin to o-desmethyl-bouvardin and bouvardin catechol. *J. Pharm. Sci.* 72, 1291-1293.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., GROSSE, Y., KANE, A., CREPPY, E. E., DIRHEIMER, G. (1993) Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. *Mutat. Res.* 289, 265-273.
- PIER, A. C. (1973) An overview of the mycotoxicoses of domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 163 (11), 1259-1261.
- PITT, J. I. (1987) *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 266-269.
- PITTET, A., TORNARE, D., HUGGETT, A., VIANI, R. (1996) Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3564-3569.
- PONTECORVO, G., ROPER, J. A., HEMMONS, L. M., MACDONALD, K. D., BUFTON, A.W. J. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 141-238.
- PURCHASE, I. F. H., THERON, J. J. (1968) The acute toxicity of ochratoxin A to rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 6, 479-483.
- RAHBAEK, L., CHRISTOPHERSEN, C., FRISVAD, J., BENGGAARD, H. S., LARSEN, S., RASSING, B. R. (1997) Insulicolide A: a new nitrobenzoyloxy-substituted sesquiterpene from the marine fungus *Aspergillus insulicola*. *J. Nat. Prod.* 60, 811-813.
- RAHBAEK, L., FRISVAD, J.C., CHRISTOPHERSEN, C. (2000) An amendment of *Aspergillus* section *Candidi* based on chemotaxonomical evidence. *Phytochemistry* 53, 581-586.
- RAJKÓ, R., SZABÓ, G., VIDAL-VALVERDE, C., KOVÁCS, E. (1997) Designed experiments for reducing antinutritive agents in soybean by microwave energy. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3565-3569.
- RAPER, K. B., FENNELL, D. I. (1965) *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- RIBELIN, W. E., FUKUSHIMA, K., STILL, P. E. (1978) The toxicity of ochratoxin to ruminants. *Can. J. Comp. Med.* 42 (2), 127-136.
- RILEY, R. T., NORRED, W. P. (1996) Mechanisms of mycotoxicity. In: Howard, D. H., Miller, J. D. (eds) *The Mycota*. Vol. VI. Springer Verlag, Berlin. pp. 193-211.

- RINYU, E., VARGA, J., FERENCZY, L. (1995). Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 33, 2567-2575.
- RINYU, E., VARGA, J., KOZAKIEWICZ, Z., FERENCZY, L. (2000) Phenotypic and genotypic variability within *Aspergillus section fumigati*. pp. 483-492, in Samson, R. A., Pitt, J. I.: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Publishers, Reading 2000.
- RODRIGUEZ, S. B., MAHONEY, N. E. (1994) Inhibition of Aflatoxin Production by Surfactants. Appl Environ Microbiol. 60, (1), 106–110.
- ROQUEBERT, M. F., NICOT, J. (1985) Similarities between the genus *Stilbothamnium* and *Aspergillus*. In Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics, ed. By Samson, R. A. and Pitt, J. I., Plenum Press, New York, 221-229.
- ROTTER, R. G., FROHLICH, A. A., MARQUARDT, R. R. (1989) Influence of dietary charcoal on ochratoxin A toxicity in Leghorn chicks. Can. J. Vet. Res. 53, 449-453.
- RUHLAND, M., ENGELHARDT, G., WALLNOFER, P. R., SCHAFER, W. (1994) Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in wheat and maize cell suspension cultures. Naturwissenschaften 81, 453-454.
- RUHLAND, M., ENGELHARDT, G., SCHAFER, W., WALLNOFER, P. R. (1996a) Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants: 1. Isolation and identification of metabolites formed in cell suspension cultures of wheat and maize. Nat. Toxins 4, 254-60.
- RUHLAND, M., ENGELHARDT, G., WALLNOFER, P. R. (1996b) Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants. 2. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspension cultures of different crop plants. Mycopathologia 134, 97-102.
- SALISBURY, B. A. (1999) Strongest evidence: Maximum apparent phylogenetic signal as a new cladistic optimality criterion. Cladistics 15, 137-149.
- SAMSON, R. A. (1979) A compilation of the *Aspergilli* described since 1965. Stud. Mycol. 18, 1-38.
- SAMSON, R.A., PITT, J.I. (1985) Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. Plenum Press, New York.
- SAMSON, R. A. (1994) Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. In *Aspergillus: Biology and industrial applications*, ed. by Bennett, J. W. and Klich, M. A., Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 355-390.
- SAUER, M., LU, P., SANGARI, R., KENNEDY, S., POLISHOOK, I., BILLS, G., AN, Z. (2002) Estimating polyketide metabolic potential among non-sporulating fungal endophytes of *Vaccinium macrocarpon*. Mycol. Res. 106, 460-470.

- SCHAEFFER, J. L., TYCZKOWSKI, J. K., HAMILTON, P. B. (1987) Alterations in carotenoid metabolism during ochratoxicosis in young broiler chickens. *Poult. Sci.* 66, 318-324.
- SCHNÜRER, J. (1993) Comparison of methods for estimating the biomass of three food borne fungi with different growth patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 552-555.
- SCHNÜRER, J. (1995) Detection and quantification of fungi in foods. *Proceedings from the Workshop Fungal Identification Techniques. Barcelona, 5 to 8 April 1999.* pp. 153-159.
- SEEGERS, J. C., BOHMER, L. H., KRUGER, M. C., LOTTERING, M. L., DE KOCK, M. (1994) A comparative study of ochratoxin A-induced apoptosis in hamster kidney and HeLa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 129, 1-11.
- SEITZ, L. M., MOHR, H. E., BURROUGHS, R., SAUER, D. B. (1977) Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chem.* 54, 1201-1217.
- SIMPSON, T. J. (1995) Polyketide biosynthesis. *Chem. Ind.* 407-411.
- SKOUBOE, P., FRISVAD, J. C., TAYLOR, J. W., LAURITSEN, D., BOYSEN, M., ROSSEN, L. (1999) Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycol. Res.* 103, 873-881.
- SKRINJAR, M., RASIC, J. L., STOJICIC, V. (1996) Lowering ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. *Folia Microbiol.* 41, 26-28.
- SMITH, J. E., MOSS, M. O. (1985) *Mycotoxins. Formation, analysis and significance.* John Wiley and Sons, Chichester.
- STANDER, M. A., BORNSCHEURER, U. T., HENKE, E., STEYN, P. S. (2000) Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5736-5739.
- STEELE, J. A., DAVIS, N. D., DIENER, U. L. (1973) Effect of Zinc, Copper, and Iron on Ochratoxin A Production. *Appl Microbiol.* 25 (5), 847-849.
- STEYN P. S., HOLZAPFEL C.W. (1967) *J. South African Chem. Inst.* 20, 186.
- STORMER, F. C., PEDERSEN, J. I. (1980) Formation of 4-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rat liver microsomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 971-975.
- STORMER, F. C., LEA, T. (1995) Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. *Toxicology* 95, 45-50.
- STOEV, S. D., HALD, B., MANTLE, P. G. (1998) Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex or uncertain (mycotoxin) aetiology. *Vet Rec.* 21, 142 (8), 190-194.
- SZABÓ, G. (1991) A mikrohullámú technika alkalmazása az élelmiszeripari és biotechnológiai gyakorlatban. *Szeszipar*, 4, 124-127.

- SZABÓ, G. (1993) Intensification of food- and biotechnological operations by microwave energy. *Acta Alimentaria*. 22 (3), 264-266.
- SZABÓ, G., RAJKÓ, R., HODÚR, C. (1998) Combined energy transfer by microwave-convective drying of agriculture materials. *Hung. Agric. Eng.* 11, 23-25.
- SZABÓ, G. (1999) Mezőgazdasági anyagok kombinált energiaközlésű (mikrohullám-konvektív) szárítása. *JATE Élelmiszeripari Főiskolai Kar Tudományos Közlemények*. 20/2., 62-77.
- SZABÓ, G., KOVÁCS, E. T., MARÁZ-SZABÓ, L., VARGA, J. (2001) Influence of variety emulsifier and microwave heat treatment for the quality of Amaranth based pasta products. *Cereals 2000. Proceedings of the 11th ICC Cereal and Bread Congress and of the 50th Australian Cereal Chemistry Conference*. Edited by: Wotton, M., Wrigley, C. W. (ISBN 1876892 0 14). 650-654.
- TANÁCS, L., SOÓS, J., GERŐ, L., FEHÉR, L., RIGÓ, K., SZABÓ, G. (2002) Fungicidkezelt búzaállományok sütőipari paramétereinek, mikroflórájának és ergoszterin szintjének alakulása. V. Nemzetközi Élelmiszertudományi Konferencia. Szeged, 2002. Október 24-25.
- TÉREN, J., DRASKOVICS, I., NOVÁK, E. K. (1990) Mikotoxinok, toxinogén gombák, mikotoxikózisok. Magyar Élelméztudományi Egyesület.
- TÉREN, J., VARGA, J., HAMARI, Z., RINYU, E., KEVEI, F. (1996) Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134, 171-176.
- TÉREN, J., PALÁGYI, A., VARGA, J. (1997) Isolation of ochratoxin producing *Aspergilli* from green coffee beans of different origin. *Cereal Res. Commun.* 25, 303-304.
- TSAI, G. J., COUSIN, M. A. (1990) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of molds in cheese and yoghurt. *J Dairy Sci.* 73(12), 3366-3378.
- TSUDA, M., SEKINE, T., TAKEDA, M., CHA, S. H., KANAI, Y., KIMURA, M., ENDOU, H. (1999) Transport of ochratoxin A by renal multispecific organic anion transporter I. *J. Pharm. Exp. Therap.* 289, 1301-1305.
- TUDZYNSKI, P., WELTRING, K. M. (1993) Molecular genetics of Phytopathogenic fungi. *Progress in Botany*. 54, 358-372.
- TURNER, W. B. (1971) Fungal metabolites. Academic Press, London.
- TURNER, W. B., ALDRIDGE, D. C. (1983) Fungal metabolites II. Academic Press.
- UENO, Y., KAWAMURA, O., SUGIURA, Y., HORIGUCHI, K., NAKAJIMA, M., YAMAMOTO, K., SATO, S. (1991) Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. In: Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I. N., Bartsch, H. (eds.) *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tumors*. IARC Sci. Publ. Lyon. pp. 71-75.

- VAN DER MERWE, K. J., STEYN, P. S., FOURIE, L., SCOTT, D. B., THERON, J. J. (1965) Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature 13, 205, 1112-1113.
- VAN EGMOND, H. P. (1996) Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. Food Addit. Contam. 13 (Suppl.), 11-13.
- VARGA, J., KEVEI, F., FEKETE, C., COENEN, A., KOZAKIEWICZ, Z., CROFT, J. H. (1993) Restriction fragment length polymorphism in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. Mycol. Res. 97, 1207-1212.
- VARGA, J., KEVEI, F., VÁGVÖLGYI, C., VRIESEMA, A., CROFT, J. H. (1994) Double stranded RNA mycoviruses in section *Nigri* of the *Aspergillus* genus. Can. J. Microbiol. 40, 325-329.
- VARGA, J., KEVEI, É., RINYU, E., TÉREN, J., KOZAKIEWICZ, Z. (1996) Ochratoxin production by *Aspergillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4461-4464.
- VARGA, J., KEVEI, É., TÓTH, B., KOZAKIEWICZ, Z., HOEKSTRA, R.F. (1999a) Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. Can. J. Microbiol.
- VARGA, J., TÉREN, J. (1999b) Recent progress in mycotoxin research. Acta Immunol. Hung. 46, 233-243.
- VARGA, J., KEVEI, É., PALÁGYI, A., TÓTH, B., KOZAKIEWICZ, Z. (2000) Analysis of genetic variability within the *Petromyces* genus. Antonie van Leeuwenhoek 77, 83-89.
- VARGA, J., TÓTH, B., RIGÓ, K., TÉREN, J., HOEKSTRA, R. F., KOZAKIEWICZ, Z. (2000a) Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Circumdati* based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8 S rRNA gene. Fungal Genet. Biol. 30, 71-80.
- VARGA, J., VIDA, Z., TÓTH, B., DEBETS, F., HORIE, Y. (2000b) Phylogenetic analysis of newly described *Neosartorya* species. Antonie van Leeuwenhoek 77, 235-239.
- VARGA, J., RIGÓ, K., TÓTH, B., TÉREN, J., KOZAKIEWICZ, Z. (2003) Evolutionary relationship among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. Food Technol. Biotechnol. 29-36.
- WAFI, E. W., YAHYA, R. S., SOBH, M. A., ERAKY, I., EL BAZ, H., EL GAYAR, H. A. M., BETBEDER, A. M., CREPPY, E. E. (1998) Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. Hum. Exp. Toxicol. 17, 124-129.
- WALBEEK, W. VAN, SCOTT, P. M., HARWING, J., LAWRENCE, J. W. (1969) *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. Can. J. Microbiol. 15, 1281-1285.

- WEBSTER, J. (1986) Introduction to fungi. Cambridge University Press, Cambridge
- WEGST, W., LINGENS, F. (1983) Bacterial degradation of ochratoxin A. FEMS Microbiol. Lett. 17, 341-344.
- WEI, Y. H., LU, C. Y., LIN, T. N., WEI, R. D. (1985) Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. Toxicology 36, 119-130.
- WEISLEDER, D., LILLEHOJ, E. B. (1971) Structure of viriditoxin, a toxic metabolite of *Aspergillus viridinutans*. Tetrahedron Lett. 48, 4705-4706.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A guide to methods and applications (M.A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, Eds.), pp. 315-322. Academic Press, San Diego.
- WHYTE, A.C., GLOER, J.B., WICKLOW, D.T., DOWD, P.F. (1996) Sclerotiamide: a new member of the paraherquamide class with potent antiinsectan activity from the sclerotia of *Aspergillus sclerotiorum*. J. Nat. Prod. 59, 1093-1095.
- WICKERHAM, L.J. (1951) Taxonomy of yeasts. Techn. Bull. No. 1029, US. Dept. Agriculture.
- WICKLOW, D. T., VESONDER, R. F., MCALPIN, C. E., COLE, R. J., ROQUEBERT, M. F. (1989) Examination of *Stilbothamnium togoense* for *Aspergillus flavus* group mycotoxins. Mycotaxon 34, 249-252.
- WICKLOW, D. T., DOWD, P. F., GLOER, J. B. (1994) Antiinsectan effects of *Aspergillus* metabolites. In The genus *Aspergillus*. From taxonomy and genetics to industrial application (K. A. Powell, A. Renwick and J. F. Peberdy, Eds.), pp. 93-114. Plenum Press, New York.
- WICKLOW, D. T., DOWD, P. F., ALFATAFTA, A. A., GLOER, J. B. (1996) Ochratoxin A: an antiinsectan metabolite from the sclerotia of *Aspergillus carbonarius* NRRL 369. Can. J. Microbiol. 42, 1100-1103.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. .A., TINGEY, S. V. (1990a) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18, 6531-6535.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., RAFALSKI, J. .A., TINGEY, S. V. (1990b) Genetic analysis with RAPD markers. In: More gene manipultaion in fungi.
- WU, M. T., AYRES, J. C. (1974) Effects of dichlorvos on ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus*. J. Agr. Food. Chem. 22, 536-537.
- ZAICA, L.L. & BUCHANAN, R.L. (1987) Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. Journal of Food Protection 50, 691-708.

- ZOFAIR, S. M., MATHEW, S., VERMA, R. J. (1996) Ochratoxin induced hemolysis in rabbits. *Indian J. Exp. Biol.* 34(6),592-593.
- XIAO, H., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A., PHILLIPS, G. D., VITTI, T. G. (1991) Effect of hay and a grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 69, 3706-3714.
- XIAO, H., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A., LING, Y. Z. (1995) Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. *Agric. Food Chem.* 43, 524-530.
- YAMATOYA, K., SUGIYAMA, J., KURAISHI, H. (1990) Electrophoretic comparison of enzymes as a chemotaxonomic aid among *Aspergillus* taxa: (2) *Aspergillus* sect. *Flavi*. In *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*, ed. by Samson, R. A. and Pitt, J. I., Plenum Press, New York, pp. 395-405.
- YOUNG, J. C. , FULCHER, R. G., HAYHOE, J. H., SCOTT, P. M., DEXTER, J. E. (1984) Effects of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern Canadian wheats. *J. Agric. Food Chem.* 32, 659-664.
- YOUNG, J. C. (1995) Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids. *J. Agric. Food. Chem.* 43, 2904-2910.
- YUAN, G. F., LIU, C. S., CHEN, C.C. (1995) Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2384-2387.

