

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Biológia Doktori Program

AZ OCHRATOXIN TERMELÉS ELŐFORDULÁSÁNAK, BIOKÉMIAI

ÉS GENETIKAI HÁTTÉRÉNEK VIZSGÁLATA

***ASPERGILLUS* FAJOKBAN**

Készítette:

Rigó Krisztina

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Kar

Mikrobiológia Tanszék

Szeged

2004

I. BEVEZETÉS

2002. január 1-től hazánkban az élelmiszeriparban kötelezően érvényben van a HACCP rendszerek alkalmazása, amelyek garanciát szolgáltatnak arra, hogy a termékek a gyártási folyamatban mikrobiológiai, kémiai és fizikai ellenőrzések sorozatán menjenek keresztül, és egyben komoly feladatot jelentenek a kutatóknak hiszen 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 szervezetek 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.

Az 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 és raktározás során fertőzik meg.

Az OA hőkezelés hatására kis mértékben bomlik, mérgező hatása akkor szűnik meg, ha a benne található peptidkötés felbomlik, fenilalanin 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*

calcoeticus, *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 ezzel a toxikológiai kockázat minimálisra csökkenthető.

CÉLKITŰZÉSEINK AZ ALÁBBIK VOLTAK:

- 1./ Munkánk során az elsődleges cél az volt, hogy az élelmiszerek és gabonafélék OA szennyezettségét gyors és pontos módszerrel meghatározzuk.
- 2./ A vizsgált élelmiszerekből és gabonafélékből kis mennyiségű mintát táptalajra helyezve és az egyéb mikroorganizmusokat kizárva izolálni tudjuk az OA szennyeződéséért felelős *Aspergillus* fajokat.
- 3./ Az OA termelő törzsek közül kiválasztottunk néhányat, amelyek toxintermelésének kinetikáját vizsgáltuk több héten keresztül. Az izolátumok közül az OA-t legnagyobb mennyiségben termelő törzzsel (*A. albertensis* ATCC 58745) a toxintermelés hőmérsékleti optimumának meghatározását kívántuk elvégezni. Mikrohullámú energiaközléssel feltártuk a micélium ergoszterin tartalmát, valamint az OA termelés és a micélium ergoszterin tartalma közötti összefüggést vizsgáltuk.
- 4./ Az élelmiszerekben már meglévő OA szennyeződés megszüntetése érdekében nagy számú izolátum és gyűjteményes törzs toxinbontó képességét vizsgáltuk.
- 5./ Az OA termelő fajok elsősorban a *Circumdati*, *Flavi* és a *Fumigati* szekciók tagjai, amelyeken belül a rokonsági kapcsolatok megállapítását az ITS szekvenciák és 26S rDNS szekvenciák összehasonlításával kívántuk megállapítani. 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.

6./ Az *A. albertensis* OA nem-termelő izolátumát γ -besugárással 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.

7./ A poliketid-szintáz gén ketoszintáz és C-metilációs domén szekvenciáinak analízisével, és morfológiai tulajdonságaik összehasonlításával kívántuk megállapítani az OA termelő *Aspergillus* fajok rokonsági kapcsolatait.

II. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

Az izolátumok ochratoxin termelő képességének vizsgálatát ELISA, valamint TLC és HPLC módszerrel végeztük el. Az OA termelő képességgel rendelkező fajok filogenetikai analízise során genetikai sajátosságokat (ITS, β -tubulin gén, 26S rRNS szekvencia, mitokondriális és magi RFLP mintázat) és fenotipikus karaktereket vettünk figyelembe. Az ochratoxin termelés genetikai hátterének tisztázása érdekében OA termelő izolátumokból γ -besugárással OA nem-termelő izolátumokat állítottunk elő, és azokat poliketid-szintázuk ketoszintáz és szén-metilációs doménjének vizsgálatával és RAPD analízissel hasonlítottuk össze. Az ochratoxin bontásra irányuló kísérleteket, illetve a kinetikai vizsgálatok eredményeit szintén kromatográfiás módszerekkel határoztuk meg. Az ergoszterin feltárást mikrohullámú energiával hajtottuk végre és mennyiségét HPLC-vel határoztuk meg.

III. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1./ Munkánk során megállapítottuk, 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 az OA 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 fertőzésről.

2./ Az OA termelés kinetikájának megállapítása során az általunk izolált és a gyűjteményes *Aspergillus* törzseket vizsgáltuk. Az izolátumok által termelt OA mennyisége 0.1-1000 µg/ml között változott. A "kistermelő" izolátumok (0.1-0.6 µg/ml) az *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. carbonarius* és az *A. ochraceus* O4 voltak. A "nagytermelő" izolátumok, az *A. melleus*, *A. ochraceus* NRRL 3174, *P. verrucosum* és az *A. albertensis* 100-1000 µg/ml OA termelésére képesek. Minden izolátum esetében megállapítottuk, hogy az OA termelés a 7-10. napon érte el a maximumát. Az *A. albertensis* és *A. melleus* izolátumok állandóan majdnem azonos mennyiségben, konstitutívan képesek termelni az OA-t. Az *A. albertensis* ATCC 58745 izolátum esetében a termelt OA mennyisége és a mért ergoszterin érték az inkubáció 10. napjáig hasonló tendenciát mutatott.

3./ Az OA bontó képesség vizsgálata során számos *A. fumigatus*, *A. niger* és *Rhizopus* sp. törzset találtunk, melyek képesek lebontani az OA-t Oα-vá, azonban ezek közül csak az *A. niger* faj rendelkezik az "általában biztonságosnak tekinthető" minősítéssel, vagyis csak az általa termelt enzimek és savak használhatók élelmiszeradalékként. További vizsgálatok irányulnak az *A. niger* CBS 120.49 izolátum, illetve az általa termelt enzim gyakorlati alkalmazhatóságára.

4./ Számos vegyület, amely 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.

5./ A *Circumdati* szekció, a fajok fenotipikus sajátosságai, az ITS régió és az 5.8S rRNS gének szekvenciája alapján, parafiletikus. Az *A. campestris*, *A. lanosus*, *A. dimorphicus* az *A. sepultus* az *Aspergillus* nemzetség *Candidi*, *Flavi* és *Cremei* szekciójának tagjaival mutat rokonságot. Az *A. robustus* és *A. ochraceoroseus* egyik vizsgált fajjal sem mutatott rokonságot. Az általunk javasolt, ITS szekvencia adatok alapján kialakított *Circumdati* szekcióba tartozó fajok két csoportba sorolhatók, amelyek jól elkülöníthetők fenotipikus sajátosságaik alapján is. Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójának filogenetikai analízise során megállapítottuk, hogy a szekció szekvencia adatok alapján három, jól elkülöníthető ("*A. flavus*", "*A. tamarii*" és "*A. alliaceus*") csoportra osztható. Ezen megfigyelést a telepek

színe, valamint az izolátumok ubikinon rendszere is alátámasztja. Három faj, az *A. nomius*, *A. avenaceus* és az *A. leporis* különálló csoportot képez, nem mutat rokonságot a *Flavi* szekció egyik csoportjának tagjaival sem.

6./ Az *A. viridinutans* intraspecifikus vizsgálatát, valamint rokon fajainak filogenetikai analízisét morfológiai vizsgálatok, szénforrás hasznosítási teszt, a mitokondriális és magi DNS RFLP mintázatának összehasonlítása, valamint a β -tubulin gén szekvenciájának ismertetében végeztük el. Az *A. viridinutans* ochratoxin termelő IMI 306135 izolátuma legközelebbi rokonságot egy aszexuális izolátummal mutatta. Vizsgálataink alapján e két utóbbi izolátum közelebbi rokonságban van az *A. fumigatus* és a *N. fisheri* fajokkal, mint az *A. viridinutans* többi izolátumával, ezért elképzelhető, hogy az *Aspergillus* nemzetség *Fumigati* szekciójának új fájával állunk szemben.

7./ 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 vetettünk alá. Az *Aspergillus* izolátumok KS domén szekvenciájuk alapján szétszórtnak helyezkednek el a törzsfán, ami azt jelzi, hogy a PKS-ük feltehetőleg különböző metabolitok bioszintézisében vesz 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.

IV. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

KÖNYVFEJEZET

Rigó, K., Szabó, G., Téren, J., Varga, J. (2001) Application of microwave-assisted ergosterol extraction (MAE) method to assess fungal contamination in plant products. In Biologically active phytochemicals in food. Analysis, metabolism, bioavailability and function (Pfannhauser, W., Fenwick, G.R., Khokhar, S. eds.). Royal Society of Chemistry Press, pp. 253-255.

TELJES CIKKEK

Varga, J., Rigó, K., Téren, J. (2000) Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. Int. J. Food Microbiol. 59, 1-7.

Varga, J., Tóth, B., Rigó, K., Téren, J., Hoekstra, R. F., Kozakiewicz, Z. (2000) 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., Tóth, B., Rigó, K., Debets, F., Kozakiewicz, Z. (2000) Genetic variability within the *Aspergillus viridinutans* species. Folia Microbiol. 45, 423-425.

Rigó, K., Varga, J., Tóth, B., Mesterházy, Á., Kozakiewicz, Z. (2000) Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8 S rRNA gene. J. Gen. Appl. Microbiol. 48, 9-16.

Varga, J., Rigó, K., Téren, J., Mesterházy, Á. (2001) Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. Cereal Res. Commun. 29, 85-92.

Varga, J., Rigó, K., Téren, J., Mesterházy, Á. (2001) Recent advances in ochratoxin research II. Biosynthesis, mode of action and control of ochratoxins. Cereal Res. Commun. 29, 93-100.

Rigó, K., Varga, J., Téren, J., Szabó, G. (2001) Mikotoxin vizsgálatok *Aspergillus* fajokkal. SZÉF Tudományos Közlemények 22, 111-121.

Varga, J., Rigó, K., Lamper, C., Téren, J., Szabó, G. (2002) Kinetics of ochratoxin A production in different *Aspergillus* species. Acta Biologica Hungarica 53, 381-388.

Varga, J., Rigó, K., Tóth, B., Mesterházy, Á., Téren, J. (2002) A mikotoxin kutatás újabb eredményei. Élelmézési Ipar 56, 139-145.

Varga, J., Rigó, K., Molnár, J., Szencz, S., Téren, J., Kozakiewicz, Z. (2003). Mycotoxin production and evolutionary relationships among species of *Aspergillus* section *Clavati*. Antonie van Leeuwenhoek 83, 191-200.

Varga, J., **Rigó, K.**, Tóth, B., Téren, J., Kozakiewicz, Z. (2003) Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. Food Technol. Biotechnol. 41(1), 29-36.

Varga, J., **Rigó, K.**, Kocsubé, S., Farkas, B., Pál, K. (2003) Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species. Res. in Microbiol. 154, 593-600.

ELŐADÁSOK, POSZTEREK

Kevei, É., Tóth, B., **Rigó, K.**, Téren, J., Varga, J. (1998) Molecular analysis of the ochratoxinogenic *Petromyces* genus. Symposium on Medical Biotechnology, Szeged.

Varga, J., Tóth, B., Kevei, É., **Rigó, K.** (1999) *Aspergillus* fajok filogenetikai analízise ITS szekvenciák alapján. IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, 1999. április 11-14.

Rigó, K., Téren, J., Varga, J. (1999) Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* strains. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 46, 346.

Rigó, K., Téren, J., Varga, J. (2000) Ochratoxin contamination and decomposition caused by *Aspergillus* species. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 47, 281.

Varga, J., Kevei, É., **Rigó, K.**, Tóth, B. (2000) Phylogenetic analysis of the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 47, 336-337.

Rigó, K., Varga, J., Tóth, B. (2000) Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Circumdati*. First Joint Meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely.

Rigó, K., Tóth, B., Varga, J. (2000) Analysis of genetic variability within the *Aspergillus viridinutans* species. First Joint Meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely.

Szabó, G., **Rigó, K.**, Téren, J., Varga, J. (2000) Application of microwave-assisted ergosterol extraction method for fungal contamination in plant products. IVth International Symposium on Regional Multidisciplinary Research, Temesvár, Románia.

Szabó, G., **Rigó, K.**, Téren, J., Varga, J. (2000) Predictive modelling of fungal contamination in plant products using microwave-assisted ergosterol extraction method. Proceedings of the 3rd International Conference on Predictive modelling in Foods, pp. 126-128. Leuven, Belgium.

Varga, J., **Rigó, K.**, Molnár, J., Szencz, S., Tóth, B., Téren, J., Kozakiewicz, Z. (2001) Examination of mycotoxin production and genetic variability within *Aspergillus* section *Clavati*. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 50, 188-189.

Rigó, K., Varga, J., Szabó, G., Lamper, C., Téren, J. (2001) Examination of biochemical background of ochratoxin production in different *Aspergillus* species. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 50, 189-190.

Varga, J., Tóth, B., **Rigó, K.**, Téren, J., Kozakiewicz, Z. (2001) Phylogenetic analysis of toxigenic *Aspergillus* species based on sequences of the ITS region. Fungal Metabolites Symposium. Swansea, UK.

Varga, J., **Rigó, K.**, Bartók, T., Lampert, C., Téren, J. (2001) Examination of ochratoxin production in *Aspergillus albertensis*. Fungal Metabolites Symposium. Swansea, UK.

Varga, J., **Rigó, K.**, Molnár, J., Szencz, S., Tóth, B., Téren, J., Kozakiewicz, Z. (2001) Evolutionary relationships and toxin production among species of *Aspergillus* section *Clavati*. Fungal Metabolites Symposium. Swansea, UK.

Rigó, K., Varga, J., Tóth, B., Téren, J., Mesterházy, Á., Kozakiewicz, Z. (2002) Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Flavi* based on ITS sequences. 6th European Conference on Fungal Genetics. Pisa, Abstract Book, 421.

Varga, J., **Rigó, K.**, Tábori, K., Péteri, Z., Téren, J., Vágvolgyi, C. (2002) Degradation of mycotoxins by filamentous fungi. "Power of Microbes in Industry and Environment" Symposium, Opatija, 2002. Jún. 7-9.

Varga, J., **Rigó, K.**, Tóth, B., Téren, J., Kozakiewicz, Z. (2002) Evolutionary relationships among mycotoxin producing *Aspergilli*. "Power of Microbes in Industry and Environment" Symposium, Opatija, 2002. Jún. 7-9.

Varga, J., Tóth, B., **Rigó, K.**, Téren, J., Kozakiewicz, Z. (2002) Phylogenetic analysis of toxigenic *Aspergillus* species based on sequences of the ITS region. 2. Magyar Mikológiai Konferencia, Szeged, 2002. május 29-31.

Varga, J., **Rigó, K.** (2002) Az ochratoxin bioszintézis biokémiai és genetikai hátterének vizsgálata *Aspergillus* fajokban. MTA Általános Mikrobiológiai Bizottsága, 2002. április 18.

Varga, J., **Rigó, K.**, Péteri, Z., Tábori, K., Téren, J., Vágvolgyi, C. (2002) Degradation of mycotoxins by *Rhizopus* and *Aspergillus* isolates. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred.