

Pertumbuhan Optimum *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella* spp. yang Diisolasi dari Pakan dan Efek Toksiknya pada Mencit (*Mus musculus*)

The Optimum Growth of *Penicillium* spp. and *Cunninghamella* spp. Isolated from Diet and Its Toxic Effect on Mice (*Mus musculus*)

N. Ramli^{a*}, M. Tafsir^b & A.D. Hasjmy^a

^a Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor
Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

^b Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Al-Azhar
Jln. Pintu Air IV Kuala Bekala Medan 20142

(Diterima 17-06-2008; disetujui 07-04-2009)

ABSTRACT

Fungi are a major microorganism present in the feedstuffs that able to reduce nutritive value and produce toxin that harmful for animal. *Penicillium* spp. and *Cunninghamella* spp. were dominant present in the feedstuffs in tropical regions. The objectives of this study were to find out the optimum pH and temperature of *Penicillium* spp. and *Cunninghamella* spp. on agar media and to find out the effect of feeding diet containing corn contaminated with the fungi at level of 0%, 50% and 100% on the performance and relative organ weight of 45 mice (*Mus musculus*). *Cunninghamella* spp. grew at pH range of 3-9, and *Penicillium* spp. at pH range of 3-7. The temperature for the optimum growth of both fungi was on room temperature (28±2 °C). Feed consumption and daily gain (ADG) of mice were not significantly affected by content of corn contaminated with *Cunninghamella* spp. Conversely, corn contaminated with *Penicillium* spp. significantly (P<0.05) reduced feed consumption and ADG of mice. Treatments had no effect on liver and hearth relative weight, but significantly influenced relative weight of kidney and lymph. Lymph relative weight of mice fed ration containing *Penicillium*-contaminated corn was lower (P<0.05) than that of control. Mice treated with contaminated corn from both fungi at the level 100% also significantly (P<0.05) had higher kidney relative weight than that of control. It was concluded that the toxic effect of *Penicillium* spp. was higher than that of *Cunninghamella* spp.

Key words: fungi, feedstuffs, growth, toxin, mice

PENDAHULUAN

* Korespondensi:
Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas
Peternakan, Institut Pertanian Bogor
Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680
e-mail: nahrowi@ipb.ac.id

Kontaminasi bahan pakan oleh mikroorganisme dapat terjadi pada saat pertumbuhan tanaman atau setelah panen. Mikroorganisme

yang umum menyerang bahan pakan adalah fungi. Kontaminasi fungi dalam pakan akan menurunkan nilai nutrisi dengan jalan mempengaruhi flavor yang dapat mempengaruhi penerimaan pakan oleh ternak. Faktor lain yang diakibatkan oleh kehadiran fungi dalam pakan yaitu dihasilkannya metabolit sekunder beracun (mikotoksin) yang akan membahayakan ternak. Fungi yang dominan dalam bahan pakan untuk daerah tropis, diantaranya adalah *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella* spp. Gayakwad *et al.* (2001) mengidentifikasi *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella* spp. masing-masing sebesar 17,47% dan 1,29% pada sampel pakan yang diuji.

Diperkirakan bahwa sekitar 50 spesies fungi dapat menyebabkan penyakit pada manusia. Penyakit yang diakibatkan oleh jamur sulit dikontrol karena tidak tersedianya antibiotika yang sesuai. Lebih dari 180 spesies fungi bersifat patogen atau berpotensi patogen dalam kondisi khusus (opportunistic fungi) sebagai contoh *Cunninghamella* spp. (de Hoog *et al.*, 2000). Ada sekitar 85 spesies *Penicillium* spp. dilaporkan beracun. Mikotoksin yang dihasilkan *Penicillium* spp. diantaranya adalah okratoksin A yang dikenal bersifat immunosupresif, berpengaruh pada embrio, dan kemungkinan karsinogenik (Pitt, 2000). *Cunninghamella* spp. menyebabkan terjadinya infeksi paru yang dapat terjadi karena terhirupnya spora jamur tersebut, dan *Cunninghamella* spp. sensitif terhadap terapi desferoxamine (Rickerts *et al.*, 2000).

Penelitian ini mencoba menggali informasi mengenai kondisi optimum pertumbuhan dan efek toksik *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella* spp. yang diisolasi dari pakan pada mencit.

MATERI DAN METODE

Bahan yang digunakan yaitu *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella* spp. yang diisolasi dari pakan. Kultur media untuk pertumbuhan fungi terdiri atas 1% glukosa; 0,6% pepton; 0,1% yeast extract; 0,5% NH_4NO_3 ; 0,05% MgSO_4 ; 0,05% KCl; 0,001% FeSO_4 ; 0,05%

K_2HPO_4 ; dan 2% bacto agar (Difco) dengan pH medium 6,7 (Ramli *et al.*, 1995).

Derajat keasaman (pH) yang digunakan untuk mengevaluasi pertumbuhan *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella* spp. dalam penelitian ini adalah pH 3, 5, 7 dan 9. Penentuan kondisi optimum pH dilakukan dengan membuat selang pH lebih kecil yaitu 5; 5,5; 6; 6,5; dan 7. Isolat fungi terlebih dahulu diencerkan secara serial dengan konsentrasi 10^6 CFU, dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang mengandung media agar. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 3-4 hari pada suhu kamar (28 ± 2 °C). Pengamatan dilakukan terhadap jumlah koloni yang terbentuk (log CFU) dan diameter koloni. Pertumbuhan fungi diuji pada temperatur 10 ± 1 ; 28 ± 2 ; 40 ± 1 ; dan 60 ± 2 °C pada pH medium 6,8. Media, lama inkubasi dan pengamatan yang dilakukan sama dengan pada perlakuan pH.

Uji toksisitas *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella* spp. dilakukan pada 15 ekor mencit (*Mus musculus*). Bahan baku pakan perlakuan menggunakan jagung kuning halus yang ditumbuhi fungi dalam cawan petri. Koloni yang diinokulasikan sebanyak 10^6 - 10^7 /ml untuk setiap cawan yang berisi 15 g jagung steril. Inkubasi dilakukan selama 7 hari, dan selanjutnya jagung dikeringkan menggunakan oven suhu 40 °C selama 24 jam. Ransum perlakuan yaitu mengandung komponen jagung yang ditumbuhi fungi sebanyak 0%, 50% dan 100% dari total jagung yang digunakan.

Ransum perlakuan mengandung protein kasar 18% dan energi 2800 kkal/kg. Susunan ransum selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1. Mencit yang digunakan sebanyak lima ekor setiap unit percobaan, dan setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Pemberian ransum dilakukan selama empat minggu dan sebelumnya diberi perlakuan pendahuluan menggunakan ransum kontrol selama satu minggu. Perubahan yang diamati pada penelitian ini yaitu konsumsi ransum, pertambahan bobot badan (PBB), konversi ransum dan bobot relatif organ dalam yang meliputi bobot hati, jantung, ginjal dan limfa.

Tabel 1. Susunan ransum percobaan (% as fed)

Bahan pakan	Kontrol	C1	C2	P1	P2
Susu skim	11	11	11	11	11
Jagung	40	20	0	20	0
Jagung terkontaminasi <i>Cunninghamella</i> spp.	0	20	40	0	0
Jagung terkontaminasi <i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	20	40
Bungkil kedelai	8	8	8	8	8
Tepung ikan	7	7	7	7	7
Dedak padi	16	16	16	16	16
Tepung beras	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
Premiks	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Jumlah	100	100	100	100	100

Keterangan: kontrol: jagung yang tidak ditumbuhi fungi; C1: 50% jagung yang digunakan dalam ransum ditumbuhi *Cunninghamella* spp.; C2: 100% jagung yang digunakan dalam ransum ditumbuhi *Cunninghamella* spp.; P1: 50% jagung yang digunakan dalam ransum ditumbuhi *Penicillium* spp.; P2: 100% jagung yang digunakan dalam ransum ditumbuhi *Penicillium* spp.

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga ulangan. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisa menggunakan analisis ragam (ANOVA) dan dilanjutkan uji beda nyata terkecil (Steel & Torrie, 1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi Optimum Pertumbuhan Fungi

Cunninghamella spp. dapat tumbuh pada rentang pH 3-9. Jumlah koloni yang terbentuk (CFU) antar perlakuan pada rentang pH tersebut tidak menunjukkan adanya perbedaan. Perbedaan terjadi pada diameter koloni dan kecepatan tumbuhnya. Perlakuan pH 3 mempunyai diameter koloni sebesar 3 mm, sedangkan pada pH 5, 7 dan 9 berturut turut sebesar 17, 16 dan 15 mm. *Cunninghamella* spp. pada rentang pH 3-7 sudah tumbuh pada hari kedua, sedangkan pada pH 9 muncul pada hari ketiga. Data pengamatan kondisi optimum pertumbuhan disajikan pada Tabel 2.

Penicillium spp. tumbuh pada rentang pH 3-7 (Tabel 2) dan jumlah koloni yang terbentuk tidak menunjukkan perbedaan antar perlakuan.

Perbedaan nampak pada diameter koloni yang terbentuk yaitu sebesar 2, 6 dan 5 mm berturut turut untuk perlakuan pH 3; 5; dan 7. Diameter koloni dan kecepatan tumbuh menunjukkan bahwa kisaran pH optimum untuk kedua fungi tersebut adalah pada rentang 5,0-7,0. Henson *et al.* (2005) melaporkan bahwa *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella elegans* yang diisolasi dari Yellow Stone National Park, Anaconda, Montana, dapat tumbuh optimal pada pH 5.

Pengujian terhadap kondisi temperatur optimum untuk pertumbuhan kedua fungi menunjukkan hasil terbaik pada temperatur ruang (28 ± 2 °C). Jumlah koloni yang terbentuk pada temperatur tersebut untuk *Penicillium* spp. sebanyak $8,40 \pm 0,09$ dan untuk *Cunninghamella* spp. sebanyak $6,77 \pm 0,26$. Kedua fungi tersebut tidak tumbuh pada kondisi temperatur 10, 40 dan 60 °C. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kedua fungi tersebut tergolong pada fungi mesofilik. Kisaran temperatur optimum untuk fungi mesofilik adalah 15-40°C dengan temperatur optimal untuk pertumbuhannya 18-22 °C (Burge, 2006). Henson *et al.* (2005) mengklasifikasikan *Penicillium* sebagai fungi thermotoleran meskipun fungi ini tidak dapat

Tabel 2. Jumlah koloni *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella* spp. pada pH media yang berbeda (log CFU)

Perlakuan pH	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Cunninghamella</i> spp.
3	9,06±1,03	8,12±0,19
5	8,76±1,12	8,00±0,27
7	8,77±0,91	8,06±0,30
9	0	7,54±0,28
pH optimum		
5	9,28±0,46	6,92±0,94
5,5	9,34±0,23	7,30±0,35
6	9,12±0,32	6,82±0,66
6,5	9,26±0,32	7,23±0,42
7	9,15±0,17	7,08±0,53

tumbuh pada suhu 55 °C, dan *Cunninghamella* sebagai fungi mesofilik.

Toksisitas Fungi pada Mencit

Data pengamatan terhadap beberapa peubah uji toksik mencit terdapat pada Tabel 3. Perlakuan jagung terkontaminasi *Cunninghamella* spp. sampai tingkat 100% (C2) dalam ransum tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan kontrol. Hal sebaliknya ditunjukkan oleh perlakuan *Penicillium* spp. Konsumsi ransum dan PBB mencit dengan ransum yang terkontaminasi *Penicillium* spp. nyata lebih rendah dibandingkan kontrol. Konsumsi ransum yang terkontaminasi *Penicillium* spp. secara linear semakin menurun dengan meningkatnya perlakuan mengikuti persamaan $Y=30,573-0,3828x$ ($R^2=0,952$), dan pada perlakuan 100% penurunan konsumsi mencapai 48,93%. Hal serupa terjadi juga untuk peubah PBB yang secara linear semakin menurun dengan semakin tingginya jagung terkontaminasi mengikuti persamaan $Y=3,04-0,0758x$ ($R^2=0,90$), dan terjadi penurunan pertambahan bobot badan mencapai 102,7% dibandingkan kontrol.

Konsumsi ransum yang semakin rendah akibat perlakuan *Penicillium* spp. terkait dengan palatabilitas hewan terhadap ransum.

Jagung yang terkontaminasi *Penicillium* spp. berbau tidak enak, sedangkan untuk *Cunninghamella* spp. tidak terjadi perubahan dibandingkan jagung kontrol. Pertambahan bobot badan mencit menunjukkan hasil yang sejalan dengan konsumsi ransum, dan hal ini terkait dengan aspek flavor dan produksi toksin yang mengganggu aspek organoleptik hewan yang berakibat menurunnya penerimaan pakan (Francis & Wood, 1982). Betina (1989) mengemukakan gejala keracunan mikotoksin yang bersifat kronis akibat konsumsi ransum pada tingkat rendah sampai sedang adalah menurunnya produktivitas diantaranya pertumbuhan yang lebih lambat. Pertambahan bobot badan pada perlakuan jagung terkontaminasi *Penicillium* spp. 100% (P2) menunjukkan hasil negatif dan angkanya mendekati nilai nol yang menunjukkan hewan mengkonsumsi hanya untuk pemenuhan hidup pokok saja.

Matter & Aziz (2007) melaporkan bahwa 58% species *Penicillium* spp. yang diisolasi dari 150 sampel pakan menghasilkan mikotoksin, seperti sitrinin, patulin, okratoksin A, rubratoksin B dan asam siklopiazonat dengan kandungan yang bervariasi. Lebih jauh, Charoenpornsook & Kavisarasai (2006) melaporkan bahwa 30% sampel pakan mengandung okratoksin A sebesar 11,32 ppb. Toksin ini menyebabkan menurunnya bobot badan

Tabel 3. Penampilan dan bobot relatif organ dalam mencit yang mendapat perlakuan *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella* spp. dalam ransum

Peubah	Perlakuan				
	Kontrol	C1	C2	P1	P2
Penampilan mencit					
Konsumsi (g/ekor/mg)	31,29±0,58 ^a	30,35±0,37 ^a	30,68±0,72 ^a	21,49±1,24 ^b	15,98± 1,55 ^c
PBB (g/ekor/mg)	2,95±0,59 ^a	2,38±0,55 ^{ab}	2,31±0,71 ^{ab}	1,69±0,47 ^b	-0,08± 0,71 ^c
Konversi ransum	10,87±2,01	13,18±2,73	14,31±4,95	13,20±2,60	-347,20±855,40
Bobot relatif organ dalam (g/100 g bobot badan)					
Hati	4,65±0,25 ^a	5,06±0,24 ^a	4,91±0,39 ^a	4,86±0,09 ^a	5,20± 0,67 ^a
Jantung	0,42±0,02 ^a	0,49±0,01 ^a	0,45±0,02 ^a	0,48±0,16 ^a	0,47± 0,06 ^a
Limfa	0,27±0,05 ^{bc}	0,32±0,04 ^c	0,29±0,04 ^{bc}	0,23±0,01 ^{ab}	0,19± 0,04 ^a
Ginjal	1,14±0,03 ^a	1,31±0,23 ^{ab}	1,45±0,06 ^{bc}	1,32±0,09 ^{ab}	1,55± 0,12 ^c

Keterangan: superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$); kontrol: jagung yang tidak ditumbuhi fungi; C1: 50% jagung yang digunakan dalam ransum ditumbuhi *Cunninghamella* spp.; C2: 100% jagung yang digunakan dalam ransum ditumbuhi *Cunninghamella* spp.; P1: 50% jagung yang digunakan dalam ransum ditumbuhi *Penicillium* spp.; P2: 100% jagung yang digunakan dalam ransum ditumbuhi *Penicillium* spp.

unggas, rendahnya konversi ransum, menurunnya produksi telur, rendahnya kualitas kerabang telur dan rusaknya hati (Betina, 1989).

Data pada Tabel 3 menunjukkan bobot relatif hati dan jantung mencit yang diberi perlakuan kedua fungi tidak berbeda. Bobot relatif ginjal dan limfa menunjukkan perbedaan ($P < 0,05$). Bobot ginjal untuk perlakuan ransum yang terkontaminasi kedua fungi pada tingkat 100% dari ransum menunjukkan bobot yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Bobot limfa juga dipengaruhi oleh perlakuan ransum yang terkontaminasi *Penicillium* spp., sedangkan untuk perlakuan *Cunninghamella* spp. tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan kontrol. Bobot relatif limfa yang menerima perlakuan P2 menunjukkan penurunan sebesar 29,63% dibandingkan kontrol.

Pembesaran ginjal menunjukkan bahwa toksin mempengaruhi ginjal. Perlakuan *Cunninghamella* spp. 100% (C2) menunjukkan pembesaran ginjal sebesar 15,79%, sedangkan perlakuan P2 sebesar 35,96%. Pembesaran ginjal merupakan indikator terjadinya keracunan oleh mikotoksin pada sistem pembuangan kemih. Gejala yang ditimbulkan ini mirip dengan

toksin yang dihasilkan *Penicillium citrinum* yang dilaporkan FAO (1985). Rundberget *et al.* (2003) melaporkan bahwa beberapa spesies *Penicillium* dari sampel sisa makanan musim panas menghasilkan toksin dengan kisaran sebagai berikut: asam mikofenolat sebesar 75–19 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, roquefortin C sebesar 40–920 $\mu\text{g}/\text{kg}$, penitrem A sebesar 35–7500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, thomitrem A sebesar 20–2100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dan thomitrem E sebesar 20–3300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Selanjutnya European Communities (2006) menyatakan bahwa toksin dari *Penicillium* spesies bersifat karsinogenik, neprotoksik, teratogenik, immunotoksik dan bisa juga dapat bersifat neurotoksik. Intake okratoksin mingguan yang bisa ditoleransi manusia adalah sebesar 120 ng/kg bobot tubuh (Verstraete, 2006).

Faktor lain yang menyebabkan perubahan bobot ginjal adalah kandungan asam nukleat yang tinggi dalam ransum yang terkontaminasi fungi. Mikroba mempunyai kandungan asam nukleat yang tinggi yang dapat meningkatkan kandungan asam urat, dan sebagian besar asam nukleat berupa RNA (Ribonucleic Acid) yang dimetabolisasi menjadi asam urat sebelum diekskresikan melalui urin (Shetty &

Kinsella, 1981). Selanjutnya Jay *et al.* (2005) menyatakan bahwa batu ginjal akan terbentuk pada hewan monogastrik yang diberi pakan mengandung asam nukleat tinggi seperti *single cell protein*.

Penurunan bobot relatif limfa mencit akibat perlakuan ransum yang terkontaminasi *Penicillium* spp. menunjukkan indikasi terjadinya imunotoksisitas. Limfa adalah salah satu organ yang berfungsi dalam pembentukan sistem kekebalan tubuh. Spesies *Penicillium* spp. menghasilkan toksin seperti okratoksin yang bersifat immunosupresif dan imunotoksisitas pada ternak (Al-Anati L & Petzinger, 2006). Penurunan konsumsi, PBB dan perubahan bobot relatif ginjal dan limfa pada mencit yang menerima perlakuan *Penicillium* spp. mengindikasikan bahwa spesies *Penicillium* spp. lebih berbahaya dibandingkan *Cunninghamella* spp.

KESIMPULAN

Kisaran pH optimum untuk *Penicillium* spp. dan *Cunninghamella* spp. berada pada rentang 5,0-7,0. Kedua fungi tersebut tergolong pada fungi mesofilik dengan kondisi temperatur optimum untuk pertumbuhan berada pada kisaran ruang (28±2 °C). Penurunan konsumsi, PBB dan perubahan bobot relatif ginjal dan limfa pada mencit yang menerima perlakuan *Penicillium* spp. mengindikasikan bahwa spesies *Penicillium* spp. lebih berbahaya dibandingkan *Cunninghamella* spp.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Anati, L. & E. Petzinger. 2006. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29: 79-90.
- Betina, V. 1989. *Mycotoxin: Chemical, Biological and Environmental Aspect.* Elsevier, Amsterdam.
- Burge, H. 2006. How does heat affect fungi?. *The Environmental Reporter: Vol 4 Issue 3. EM Lab.* http://www.thermapure.com/pdf/dr_burge_paper.pdf [23 Desember 2008].
- Charoenpornsook, K. & P. Kavisarasai. 2006. Mycotoxins in animal feedstuffs of Thailand. *KMITL Sci. Tech. J.* 6: 25-28.
- de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gene, & M. J. Figueras. 2000. *Atlas of Clinical Fungi.* 2nd Ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- European Communities. 2006. Commission regulation (Ec) No 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities L 364:5-24.*
- FAO. 1985. *Toxigenic Aspergillus and Penicillium species.* In: R.L. Semple, A.S. Frio, P.A. Hicks & J.V. Lozare (Edit.). *Micotoxin Prevention and Control in Food Grains.* FAO, Rome.
- Francis, B.J. & J.F. Wood. 1982. Changes in The Nutritive Content and Value of Feed Concentrate During Storage. In: M. Rechigl (Ed). *Handbook of Nutritive Value of Processed Food,* CRC Press, Florida.
- Gayakwad, S.R., S.D. Harne, D.R. Kalorey, & V.C. Ingle. 2001. Prevalence of toxigenic fungi in poultry feed of Nagpur Region. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* 22: 78-80.
- Henson, J., R. Redman, R Rodriguez, & R. Stout. 2005. Fungi in Yellowstone's geothermal soils and plants. *Yellowstone Science* 13: 25-30.
- Jay, J.M., M.J. Loessner & D.A. Golden. 2005. *Modern Food Microbiology.* 7th Ed. Springer, New York.
- Matter, Z.A. & N.H. Aziz. 2007. Influence of gamma-radiation on the occurrence of toxigenic *Penicillium* strains and mycotoxins production in different feedstuffs. *Egypt.J. Biotech.* 25: 130-144.
- Pitt J. I. 2000. Toxigenic fungi: which are important? *Med Mycol.* 38:17-22.
- Ramli, N., F. Michiko, M. Tabuchi, K. Takegawa & S. Iwahara. 1995. Isolation and characterization of novel endo β -Glactofuranosidase from *Bacillus* Sp. *Biosci. Biotech Biochemist.* 59: 1856-1860.
- Rickerts, V., A. Bohme, A. Viertel, G. Behrendt, V. Jacobi, K. Tintelnot, & G. Just-Nubling. 2000. Cluster of pulmonary infections caused by *Cunninghamella bertholletiae* in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 31:910-913.
- Rundberget, T., I. Skaar & A. Flåøyen. 2003. The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 181-188.
- Shetty, K.J. & J.E. Kinsella. 1981. *Reversible Modifications of Lysine: Separations of Protein and Nucleic Acids in Yeast.* American Chemical Society, Washington.

Steel, R.G.D. & J.H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics. Mc Graw Hill, Tokyo.

Verstraete, F. 2006. Decision-Making Process and Overview of Recent and Future European Union Legislation on Mycotoxins in Food

and Feed. In: D. Barug, D. Bhatnagar, H.P. van Egmond, J.W. van der Kamp, W.A. van Osenbruggen & A. Visconti (Edit). The Mycotoxin Factbook, Food and Feed Topics. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.