

# Mikotoksini u uzorcima hrane

---

**Prica, Doroteja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:596163>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

**Doroteja Prica**

# **Mikotoksini u uzorcima hrane**

**Diplomski rad**

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

**Doroteja Prica**

# **Mikotoksini u uzorcima hrane**

**Diplomski rad**

Rijeka, 2022.

Mentor rada: Doc.dr.sc. Dijana Tomić Linšak. dipl.sanit.ing.

Diplomski rad ocjenjen je dana 15.7.2022. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc.dr.sc. Dijani Tomić Linšak
2. Izv.prof.dr.sc. Sandra Pavičić Žeželj
3. Doc.dr.sc. Željko Linšak

Rad sadrži 52 stranice, 3 slike, 7 tablica, 92 literaturna navoda.

## *Zahvale*

*Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Dijani Tomić Linšak na ukazanom povjerenju i pruženoj pomoći pri izradi ovoga rada. Veliko hvala mojim roditeljima i sestri koji su uvijek vjerovali u mene i činili najveći oslonac u svemu. Hvala svim prijateljicama koje su mi bile velika podrška i pratile me kroz godine studiranja.*

## SAŽETAK

Iako je prošlo više od 50 godina od otkrića mikotoksina, oni su i dalje najzastupljeniji prirodni kontaminanti velikog broja poljoprivrednih kultura u svijetu. Nastaju kao proizvodi sekundarnog metabolizma plijesni, zbog čega njihova produkcija ovisi o različitim okolišnim uvjetima. Zbog izrazite stabilnosti, ovi spojevi mogu biti zastupljeni „od polja do stola“. Glavni izvor mikotoksina u ljudskoj prehrani su različite vrste žitarica i sjemenki uljarica. Mikotoksini koji predstavljaju najveću potencijalnu opasnost za zdravlje ljudi su aflatoksini, okratoksini, fumonizini, patulin, zearalenon i deoksinivalenol, a bolesti uzorokovane njihovim trovanjem nazivaju se mikotoksikoze. Ipak, posebnu zabrinutost izaziva kancerogeno djelovanje utvrđeno kod pojedinih vrsta mikotoksina. Premda je produkciju mikotoksina često nemoguće spriječiti, veliki značaj pridaje se razvoju strategija i metoda uklanjanja ili inaktivacije mikotoksina. Ovaj globalni problem pokušava se riješiti usvajanjem strogih regulatornih smjernica za glavne vrste mikotoksina. Cilj rada bio je utvrditi u kojim su uzorcima prisutne najveće koncentracije mikotoksina te odstupaju li dobiveni rezultati od maksimalno dopuštenih koncentracija (MDK) u periodu od 2016. do 2021. godine. Najveća prisutnost aflatoksina B1 i ukupnih aflatoksina zabilježena je u uzorcima kikirikija, te je 7 od ukupno 81 uzorka (8.6%) sadržavalo koncentracije iznad MDK. Određene koncentracije deoksinivalenola pronađene su u 17% uzoraka pekarskih proizvoda, no niti u jednom ne prelaze MDK. Zearalenon i okratoksin A nisu utvrđeni niti u jednom uzorku u koncentraciji iznad granice kvantifikacije.

**Ključne riječi:** plijesni, mikotoksini, mikotoksikoze, MDK

## SUMMARY

Although more than 50 years have passed since the discovery of mycotoxins, they are still the most abundant natural contaminants of a large number of crops worldwide. They are products of secondary metabolism of molds, therefore their biosynthesis largely depends on different environmental conditions. Due to their extreme stability, these compounds can be present “from the field to the table”. The main source of mycotoxins in human nutrition are different types of cereals and oil seeds. Mycotoxins that represent the greatest potential risk for human health are aflatoxins, ochratoxins, fumonisins, pathulin, zearalenone and deoxynivalenol. Diseases caused by human poisoning with mycotoxins are called mycotoxicoses. Nevertheless, of a particular concern are the carcinogenic effects of certain types of mycotoxins. Although mycotoxin production is often impossible to prevent, strategies and methods for the removal or inactivation of mycotoxins are of great importance. One solution of this global problem is the adaptation of strict regulatory guidelines for the regulation of main mycotoxins. The aim of this study was to determine which samples had the highest concentration of mycotoxins and whether the obtained results deviate from the maximum allowed concentration in the period from 2016 to 2021. The highest presence of aflatoxin B1 and total aflatoxins was recorded in peanut samples, and 7 out of 81 samples (8.6%) contained concentrations above maximum allowed concentration. Certain concentrations of deoxynivalenol were found in 17% of bakery product samples, but in none of them maximum allowable concentration was exceeded. Zearalenone and ochratoxin A were not detected in any of the samples at concentrations above the quantification limit.

Keywords: molds, mycotoxins, mycotoxicoses, MAC

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Plijesni.....	2
1.2. Mikotoksini .....	4
1.3. Uvjeti nastanka mikotoksina .....	5
1.4. Izvori mikotoksina.....	6
1.5. Mikotoksikoze.....	6
1.6 Najznačajniji mikotoksini .....	7
1.6.1 Aflatoksini.....	7
1.6.2 Okratoksini.....	9
1.6.3 Fumonizini .....	10
1.6.4 Patulin .....	11
1.6.5 Zearalenon.....	11
1.6.6 Deoksinivalenol .....	12
1.7 Dokazivanje mikotoksina.....	13
1.7.1 Uzorkovanje.....	13
1.7.2 Priprema uzorka.....	14
1.7.3 Analitičke metode.....	15
1.7.3.1 Kromatografske metode .....	16
1.7.3.2 ELISA.....	16
1.8 Zakonska regulativa .....	17
1.9 Prevencija i suzbijanje prisutnosti mikotoksina u hrani.....	20
1.9.1 Fizikalne metode.....	21
1.9.2 Kemijske metode .....	22
1.9.3 Biološke metode.....	23
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	25
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	26
3.1 Materijali .....	26
3.2 Metode.....	27
<b>4. REZULTATI</b> .....	29



<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>34</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>36</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>37</b>
<b>8. POPIS SLIKA .....</b>	<b>47</b>
<b>9. POPIS TABLICA.....</b>	<b>48</b>
<b>10. POPIS KRATICA.....</b>	<b>49</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>52</b>

## 1. UVOD

U današnje vrijeme, globalnu zabrinutost izaziva sve učestalije povlačenje proizvoda s tržišta zbog neodgovarajuće kvalitete i/ili ozbiljnog rizika za zdravlje potrošača. Iz perspektive zajedničkog i integriranog pristupa istraživanja hrane, najznačajnija su tri aspekta prehrambenog lanca, a to su: kvaliteta, sigurnost i potencijalna nutritivna vrijednost hrane. Sigurnost hrane trenutno je prioritet u procesima proizvodnje, prerade i distribucije prehrambenih proizvoda (1).

Često se uzrokom prisutnosti toksičnih tvari u hrani smatra isključivo ljudsko djelovanje. No, zaboravlja se da su neki od kontaminanata prirodno prisutni kako u okolišu tako i u hrani (2). Među novonastalim problemima vezanim za sigurnost hrane, veliki značaj pripisuje se porastu broja biljnih bolesti povezanih s pojavom toksigenih vrsta plijesni i njihovih metabolita (3). Mikotoksini, kao sekundarni metaboliti plijesni predstavljaju kemijsku opasnost u raznovrsnim namirnicama. Kao vrlo stabilni i termički otporni spojevi mogu imati ozbiljan utjecaj na zdravlje ljudi čak i u niskim koncentracijama. Prema Centrima za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC), procjenjuje da je oko 4,5 milijardi ljudi kronično izloženo mikotoksinima (4).

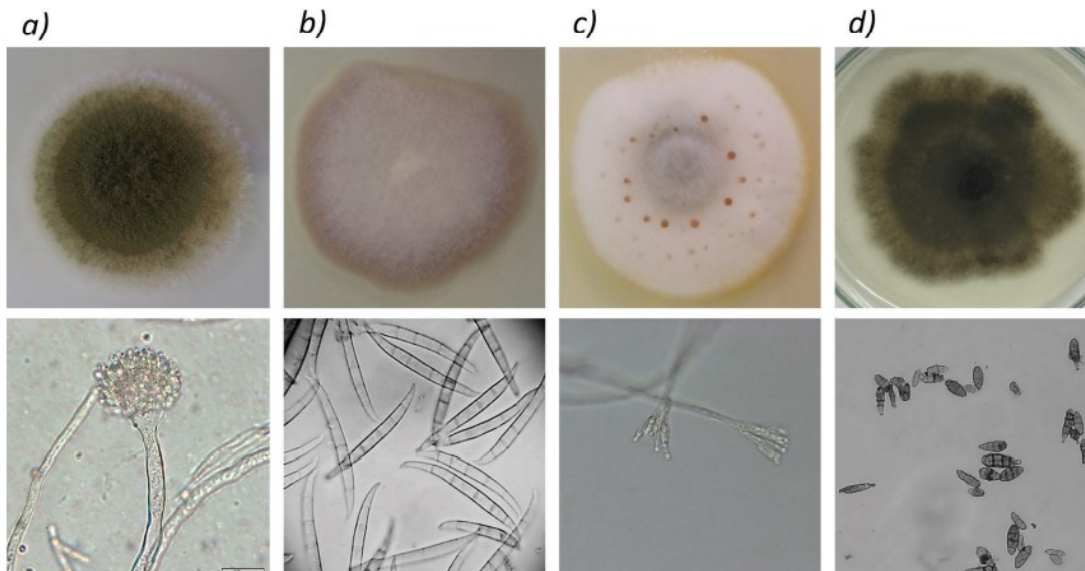
Organizacija Ujedinjenih naroda za hranu i poljoprivredu (FAO) procjenjuje da je oko 25 % usjeva u svijetu kontaminirano mikotoksinima. Međutim, nedavna izvješća ukazuju na puno veći udio kontaminacije, do čak 80 % (5).

## 1.1. Plijesni

Plijesni pripadaju velikoj skupini gljiva nitaste strukture građene od gusto zbijenih cjevastih stanica koje su bezbojne tj. ne sadrže klorofil. Njihove niti (hife) rastu u obliku isprepletene mase te čine micelij odnosno prašnjavu ili paučinastu prevlaku koja se rasprostire po podlozi. Većina hifa je vegetativna što znači da one kontinuirano rastu i formiraju tijelo plijesni u koloniju. Zračne hife na svojim krajevima imaju posebne stanice nazvane spore koje prilikom povoljnih okolišnih uvjeta mogu stvoriti novu koloniju plijesni. Plijesni mogu tvoriti i nespolne i spolne spore (6). Općenito, spore nastaju u velikom broju, lako se rasprostranjuju te su otporne na uvjete koji obično razaraju vegetativne stanice. Većina se plijesni razmnožava nespolnim načinom čije su spore odgovorne za početak infekcije u ljudi. Primarno su saprofiti koji organski materijal koriste kao izvor hrane potreban za reprodukciju i obranu. Zbog velike prilagodljivosti gljiva na nove izvore hrane, one mogu imati veliki raspon nepoželjnih učinaka na poljoprivredu i industriju. Sposobnost rasta pri maloj količini vlage osobito je važna u njihovoj ulozi biljnih patogena (7).

Postoji pet taksonomskih skupina odnosno razreda koji se međusobno razlikuju po tipu spora, morfologiji hifa i spolom ciklusu. To su skupine: *deuteromycetes (Deuteromycotina)*, *zygomycetes (Zygomycotina)*, *ascomycetes (Ascomycotina)*, *basidiomycetes (Basidiomycotina)* i *oomycetes (Oomycotina)* (8).

Plijesni koje mogu proizvoditi mikotoksine česti su kontaminanti prehrambenih sirovina. Prema općenitoj klasifikaciji, dijele se na plijesni polja, plijesni skladišta i plijesni uznapredovalog kvarenja. Plijesni, važne zbog potencijalne proizvodnje mikotoksina u hrani, pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichothecium*, *Cladosporium*, *Byssochlamys* i *Sclerotinia* (9).



**Slika 1.** Najvažnije vrste plijesni koje proizvode mikotoksine: a) *Aspergillus flavus*; b) *Fusarium verticillioides* c) *Penicillium expansum* i d) *Alternaria alternata* (5).

Većina mikotoksina sintetizira se samo kada plijesni rastu u okruženju s velikim udjelom vlage i pri visokim temperaturama. Takvi uvjeti često vladaju u silosima i u objektima u kojima se pohranjuju žitarice. Time se omogućava sinteza smrtonosne koncentracije mikotoksina puno prije no što se na zrnima pojavi vidljiv porast plijesni ili mikrobnog kvarenje (8). Međutim, prisutnost toksinogenih plijesni u prehrambenom proizvodu ne podrazumijeva i proizvodnju mikotoksina. S druge strane, odsutnost toksinogenih plijesni ne jamči da je proizvod slobodan od toksina jer oni mogu postojati u proizvodu dugo nakon nestanka plijesni (9).

Osim štetanih metabolita, brojni produkti gljiva pokazali su se izrazito korisnima za ljudsku primjenu. Primjerice, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* proizvodi etanol i CO<sub>2</sub> tijekom fermentacije glukoze. Proteini soje konvertiraju se do sojina mlijeka djelovanjem mikroskopske gljivice *Aspergillus oryzae*. Poznato je da neke od vrsta kvasaca i plijesni sudjeluju u proizvodnji kruha i sira. Također vitamini, enzimi, organske kiseline, antiasmatski lijekovi i antibiotici dobiveni su iz kulture gljiva (8).

## 1.2. Mikotoksini

Mikotoksin je opći izraz koji se upotrebljava za opisivanje spojeva ili metabolita plijesni koji su toksični ili imaju druge biološke učinke u živim organizmima. Brojni spojevi koji su danas klasificirani kao mikotoksini, najprije su proučavani kao potencijalni antibiotici tridesetih i četrdesetih godina prošloga stoljeća. No, kasnije je ustanovljeno da su previše toksični da bi bili korisni u liječenju bolesti kod ljudi ili životinja. Tada još nisu bili prepoznati potencijalni zdravstveni problemi koje bi ti spojevi mogli uzrokovati kao kontaminanti u opskrbi hranom (10).

Do danas je poznato preko 400 različitih mikotoksina, od kojih je opsežnije opisano samo njih oko 50. Opisani su kao vrlo stabilni spojevi, otporni na različite uvjete proizvodnje, prerade i skladištenja hrane i hrane za životinje (11).

Mikotoksini, gledano biogenetički i strukturno, pripadaju različitim vrstama prirodnih kemijskih spojeva. Svi mikotoksini su sekundarni metaboliti čija se sinteza može izvesti iz pojedinih etapa glikolize i ciklusa karboksilnih kiselina. Glavni putevi uključeni u tvorbu mikotoksina su: poliketidni put (aflatoksini), terpentiski put (trihoteceni), aminokiselinski put (gliotoksini) i put trikarbonskih kiselina (rubratoksini). Neki mikotoksini sintetiziraju se u kombinaciji dvaju ili više glavnih putova. Raznolikost strukture sekundarnih metabolita posljedica je biološke metilacije, halogeniranja i enzimski kataliziranih oksidoredukcija (8).

Akutne bolesti uzrokovane mikotoksinima nazivaju se mikotoksikoze. Mikotoksini koji predstavljaju najveću potencijalnu opasnost za zdravlje ljudi kao kontaminanti hrane su aflatoksini (AF), okratoksini, fumonizini, patulin, zearalenon (ZON) i trihoteceni uključujući deoksinivalenol (DON) i T-2 toksin (9).

### 1.3. Uvjeti nastanka mikotoksina

Količina i vrsta plijesni te mikotoksini koje tvore na nekoj namirnici ovise o međudjelovanju brojnih faktora, kao što su: vrsta podloge (supstrata), raspoloživost nutrijenata, udio vlage u supstratu i okolišu, potentnost kolonije, oštećenja supstrata zbog napada insekata i dr. Štetnici poput insekata svojim djelovanjem na usjeve potpomažu kontaminaciji toksotvornim plijesnima, a posljedično i nastanku toksina. No, pojavnost štetnika prije svega ovisi o postupcima prilikom uzgoja samih usjeva te o klimatskim prilikama koje ih prate. Stoga su okolišni uvjeti odnosno klimatski čimbenici od presudnog značaja za sintezu mikotoksina (12,13).

Interakcije klimatskih promjena kao što su: povećana razina koncentracije ugljikovog dioksida, povišenje prosječnih temperatura te nagle izmjene sušnih i kišnih perioda; imaju presudan utjecaj na razvoj plijesni i tvorbu mikotoksina. Povišene temperature zajedno sa natprosječnim količinama kiše ili izrazito sušnim periodima uzorkuju stres kod biljaka, te one postaju izloženije napadima plijesni i njihovim mikotoksinima (14).

Geografski gledano, *Aspergillus* vrste plijesni najčešće su u dijelovima svijeta gdje prevladava umjereno do topla klima, dok *Penicilium* vrste prevladavaju u hladnijim područjima. U skladu s tim, veće koncentracije aflatoksina nalazimo u tropskom i suptropskom pojasu sa dužim sušnim razdobljima, fuzarijske mikotoksine u umjerenom pojasu s više kišnih radoblja, a okratoksine u hladnijim predjelima (15). Kao posljedica klimatskih promjena, početkom 2000-ih, primjećena je značajnija kontaminacija aflatoksinima u južnoj Europi, dok je i u sjevernom dijelu Europe njihova pojavnost postala sve češća. Pa je tako kod uzgoja kukuruza u južnom dijelu Europe zbog iznimno vrućih ljeta došlo do sve veće pojave kolonija *A. flavus* i iznimno toksičnog AFB1, a nešto manje pojavnosti vrsta *Fusarium* i fuzarijskih mikotoksina koji su uobičajni za to područje (16). Ovakva pojava nije zaobišla ni Hrvatsku, što dokazuje istraživanje provedeno na kukuruzu uzgojenom tijekom 2012. godine kada su klimatski uvjeti bili nalik tropskim odnosno izrazito toplo i suho vrijeme (17).

Zadnjih nekoliko godina, od velikog su značaja istraživanja sa ciljem razvoja modela kojim bi se mogli predvidjeti geografski predjeli gdje postoji najveća mogućnost uticaja klimatskih čimbenika na razvoj toksikotvornih plijesni. Pored toga, značajna istraživanja potaknuta su saznanjima da se više različitih mikotoksina učestalo pojavljuju zajedno, te je cilj razviti model za procjenu rizika njihovog sinergijskog učinka (18).

## 1.4. Izvori mikotoksina

Put ulaska mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka može biti direktna ili indirektna kontaminacija namirnica. Kada plijesni određeni prehrambeni materijal koriste kao osnovu za svoj rast dolazi do direktne kontaminacije. Do indirektno kontaminacije dolazi kada su neki od dodataka namirnicama prethodno onečišćeni mikotoksinima. Gotovo svi prehrambeni proizvodi mogu biti pogodna podloga za rast plijesni tijekom proizvodnje, prerade, uskladištenja ili transporta (8).

Glavnim izvorom mikotoksina u prehrani ljudi smatraju se različite vrste žitarica i proizvodi na bazi žitarica, te začini i orašasti plodovi. Također, poznato je da su žitarice koje se koriste u proizvodnji krmiva nerijetko kontaminirane mikotoksinima, što dovodi do kontaminacije cijele krmne smjese za prehranu farmskih životinja. Potrošač time može na neizravan način biti izložen mikotoksinima akumuliranim u hrani životinjskog podrijetla kao što su jaja, mlijeko ili meso (19).

## 1.5. Mikotoksikoze

Prvi zabilježeni podaci o masovnim otrovanjima ljudi i životinja povezana s konzumacijom pljesnive hrane i krme datiraju još iz srednjega vijeka. Prvom opisanom mikotoksikozom smatra se ergotizam, bolest povezana s otrovanjem ergot alkaloidima, koja je usmrtila tisuće ljudi u srednjovjekovnoj Europi (8). Međutim, značajna istraživanja toksični učinaka mikotoksina započinja tek 1960. godine kada se u Velikoj Britaniji dogodila teška toksična epidemija, poznat kao "X bolest purana". Osim purana, bolest je također pogodila pačice i druge mlade domaće životinje. Kasnije je dokazano da je uzrok bolesti bila prisutnost visokog udjela aflatoksina u krmivu koje je kao glavni sastojak sadržavalo kikiriki onečišćen plijesnima *A. flavus*. Otprilike u isto vrijeme u SAD-u zabilježena je pojava hepatoma pastrve. Analizom je ustanovljeno da je u ovom slučaju pamuk koji se koristio u prehrani pastrva sadržavao velike koncentracije aflatoksina (9).

Mikotoksikoze su alimentarna trovanja ljudi i životinja toksičnim produktima plijesni odnosno mikotoksinima. Utvrđen je niz štetnih učinaka na ljude i životinje, kao što su kancerogenost, imunotoksičnost, probavne smetnje, neurotoksičnost, hepatotoksičnost,

nefrotoksičnost, reproduktivne i razvojne poremećaje i dr. (20). Ovisno o vrsti mikotoksina, dozi i vremenu izloženosti, poznato je da mogu istovremeno djelovati na više različitih načina i na više mjesta u organizmu. Različite bolesti i alimentarna trovanja ljudi i životinja uzorokvana su unosom mikotoksina putem hrane (oralni put unosa), udisanjem spora (respiracijski pute unosa) te putem kože (izravnim dodirrom) (21).

Zajedničke značajke svih mikotoksikoza su da se ne prenose s oboljelog na zdravog čovjeka, uvijek su povezane s kontaminiranom hranom, ne mogu se liječiti antibioticima i imaju simptome slične avitaminozama. Velik dio do danas poznatih mikotoksina spadaju u relativno stabilne organske spojeve koji ne potiču stvaranje antitijela, pa je time organizam ljudi i životinja trajno nezaštićen od njihovih učinaka (22).

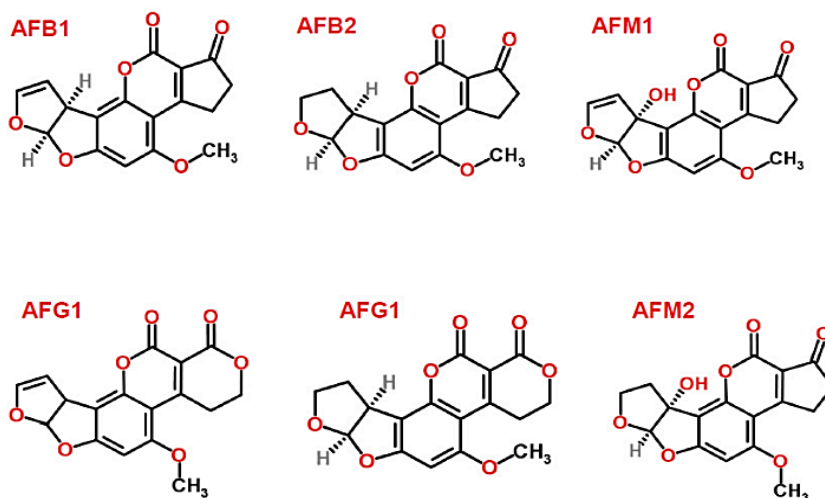
## 1.6 Najznačajniji mikotoksini

### 1.6.1 Aflatoksini

Aflatoksini su najviše proučavana skupina mikotoksina koju proizvode različite vrste plijesni iz roda *Aspergillus*. Prvotno su izolirani i identificirani kao uzročnici bolesti „Turkey X” odnosno hepatične nekroze koja je usmrtila 100 000 mladih purana u Velikoj Britaniji 1960. godine (23, 24). Najzastupljenije plijesni koje sintetiziraju aflatoksine pripadaju rodovima *A. flavus* i *A. Parasiticus* (25). One najčešće rastu na namirnicama kao što su žitarice (kukuruz, riža, ječam, zob i sirak), orašasto voće (kikiriki, pistacij, bademi, orasi), sušeno voće, sjemenke pamuka i sl. (24). Optimalni uvjeti za rast *Aspergillus* vrsta pijesni su relativna vlažnost u rasponu od 88 - 95 %, temperatura oko 37 °C za rast same plijesni i temperatura iznad 27 °C za maksimalnu proizvodnju toksina (26).



Do danas je opisano preko 14 različitih vrsta prirodno sintetiziranih aflatoksina, a najznačajniji predstavnici ove skupine su: aflatoksini B1 i B2 (AFB1 i AFB2), aflatoksini G1 i G2 (AFG1 i AFG2) i aflatoksini M1 i M2 (AFM1 i AFM2) (11). Aflatoksini B2 i G2 su dihidroderivati (roditeljskih) aflatoksina B1 i B2. AFM1 i AFM2 nastaju kao produkti biološke pretvorbe AFB1 i AFB2 u mliječnim žlijezdama sisavaca hranjenih krmom onečišćenom prethodno navedenim aflatoksinima B skupine. Prvotno su detektirani u mlijeku (po kojem su i nazvani aflatoksini M skupine), a nalazimo ih i u raznim mliječnim proizvodima (8).



**Slika 2.** Kemijske strukture aflatoksina (24).

Aflatoksini dokazano su visokotoksični, izrazito teratogeni i karcinogeni spojevi, koji u organizmu ljudi i životinja ujedno djeluju i imunosupresijski, pri čemu je jetra glavni zahvaćeni organ. (24,25). Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC), AFB1 klasificiran je kao kancerogen Skupine 1, s visokim rizikom od hepatocelularnog karcinoma (HCC) kod osoba izloženih aflatoksinima, dok je AFM1 naveden u skupini 2B (mogući kancerogen za ljude) (27).

Vrijednosti LD<sub>50</sub> kreću se između 0,5-10 mg/kg tjelesne težine kod različitih životinjskih vrsta. U ljudi, akutnu aflatoksikozu karakterizira povraćanje, bol u trbuhu, plućni i cerebralni edem, koma, konvulzije, pa čak i smrt. Kod životinja su prijavljeni simptomi gastrointestinalne disfunkcije, smanjena reprodukcija, smanjena konverzija i učinkovitost hrane, smanjena proizvodnja mlijeka i jaja te anemija (24).

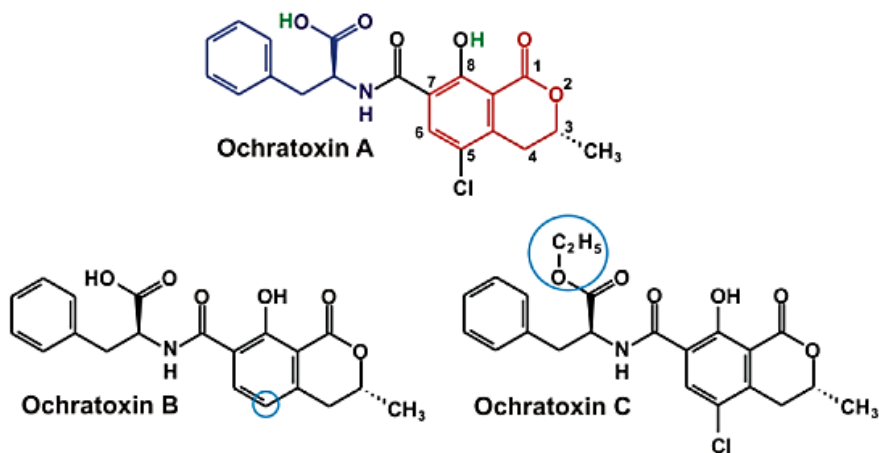
Zbog izuzetne zabrinutosti oko kontaminacije hrane i krmiva, te njihovog negativnog utjecaja na javno zdravlje i ekonomiju, AF se pomno kontroliraju od strane FDA od 1969. Među

svim mikotoksinima, AF su jedini regulirani utvrđenim razinama djelovanja FDA, dok drugi podliježu samo savjetodavnim razinama (24).

### 1.6.2 Okratoksini

Okratoksini su široko rasprostranjeni sekundarni metaboliti plijesni *Penicillium ochraceus* i *Aspergillus ostianius* (28). Razvoju ovih plijesni najviše pogoduje vlažnost od 15-19% i temperatura  $\geq 15^{\circ}\text{C}$ , dok se maksimalna proizvodnja mikotoksina odvija pri pH 5.5 uz prisustvo željeza, cinka i bakra (29) Najistraženiji i najtoksičniji je okratoksin A, nešto manje toksičan je okratoksin B, a okratoksin C do sad je sintetiziran samo u laboratorijskim uvjetima. Ovu vrsta mikotoksina obično nalazimo na usjevima žitarica nakon žetve, te kod drugih brojnih kultura kao što su mahunarke, sušeno voće, orašasto voće, začini, kava, vino, pivo i sl. (30). Kao posljedica konzumacije pljesnive krme, okratoksini pronađeni su i u svinjskome mesu, iznutricama te kobasicama koje su sadržavale svinjsku krv (29).

Okratoksin A (OTA) umjereno je stabilan mikotoksin koji može podnijeti većinu postupaka pripreme hrane i ostati neuništen (30). Izloženost OTA preko hrane predstavlja ozbiljan zdravstveni problem koji se povezuje s nekoliko vrsta bolesti u ljudi i životinja; uključujući okratoksikozu peradi, nefropatiju svinja, ljudske endemske nefropatije i tumore mokraćnog sustava u ljudi (31). Posljedično tome, IARC je 1993. godine klasificirala okratoksin A kao mogući kancerogen (2B skupina) (29).



Slika 3. Kemijske strukture okratoksina (28).

Premda su bubrezi jedan od ciljnih organa štetnog učinka okratoksina A, često se povezuje kao mogući uzrok balkanske endemske nefropatije (BEN) (30). BEN je kronična progresivna bolest koja u razdoblju od 6-10 godina dovodi do ireverzibilnog zatajenja bubrega (28). Pojava ove bolesti zabilježena je u određenim geografskim regijama Bosne i Hercegovine, Bugarske, Hrvatske, Rumunjske i Srbije (32). Iako još uvijek nisu sa sigurnošću ustanovljeni konkretni uzroci ove bolesti, u jednom od brojnih istraživanja utvrđena je povišena razina okratoksina A u krvi stanovnika na području Podunavlja i Brodske Posavina. U navedenim regijama učestalost tumora gornjeg dijela urotela je za 55 puta veća nego u ostalim područjima u Hrvatskoj (33).

### 1.6.3 Fumonizini

Fumonizini pripadaju skupini mikotoksina koje proizvode plijesni roda *Fusarium*, od kojih su najčešće prisutne vrste *F. verticillioides* i *F. poliferatum* (34). Najrašireniji i najtoksičniji u ovoj skupini mikotoksina je fumonizin B1 (FB1). Osim njega, opisani su još i fumonizin B2 (FB2), fumonizin B3 (FB3), fumonizin B4 (FB4), fumonizin A1 (FA1) i fumonizin A2 (FA2) (35). Za maksimalnu proizvodnju fumonizina, plijesnima je potrebna visoka temperatura (20-30°C) i aktivitet vode (0.98). Fumonizini se najviše mogu pronaći u kukuruzu i hrani na bazi kukuruza. FB1 najzastupljeniji je fumonizin u ljudskoj hrani te ga osim u kukuruzu možemo pronaći i u pivu, riži, mahunarkama, soji, šparogama i sl.

FB1 izrazito je toksičan za konje kod kojih se povezuje s nastankom leukoencefalomalacije, te za svinje kod kojih može uzrokovati edem pluća (35). Također, oboljenja kao što su tumori jetre i bubrega zabilježeni su u studijama na glodavcima (36). Kod ljudske populacije, sumnja se da njegov toksičan učinak može uzrokovati tumor jednjaka. Zbog svoje hidrofilnosti, FB1 nije prisutan u mlijeku te se u niskim razinama asporbira u tkiva (37). S obzirom na toksičan i kancerogeni učinak ovog spoja, prema IARC klasifikaciji, svrstan je u skupinu 2B kao potencijalni karcinogen za ljude (35).

Privremeni maksimalni prihvatljivi dnevni unos (PMTDI) fumonizina, prema WHO, iznosi 2 µg/kg tjelesne težine. Europska unija je 2007. godine izmjenom zakona o maksimalnim razinama fumonizina odredila dopuštenu razinu od 4000 µg/kg u kukuruzu i proizvodima na bazi kukuruza, dok za kukuruz namjenjen izravnoj prehrani ljudi ona iznosi 1000 µg/kg (38).

#### 1.6.4 Patulin

Patulin je produkt različitih vrsta plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Byssoschlamys*. U prošlosti se patulin koristio kao antibiotik za liječenje prehlade, te se primjenjivao i kod liječenja gljivičnih infekcija kože. Kada su se 60-ih godina prošloga stoljeća, temeljitim istraživanjima ustanovili njegovi toksični učinci, patulin postaje klasificiran kao mikotoksin. Najviše se može pronaći u voću kao što su jabuke i proizvodi od jabuka, kruške, trešnje, šljive, grožđe i smokve (11). Izoliran je i iz nekoliko vrsta povrća, žitarica, sireva te morskih plodova kao što su školjke (39). Proizvodnja patulina ovisi o različitim čimbenicima, kao što su temperatura, pH i drugi fizikalni parametri. No, još uvijek nije jasno ustanovljeno koji su uvjeti najpogodniji za njegovu sintezu. Na primjer, razina patulina koju luči *P. expansum* tijekom infekcije jabuke može varirati od 2 do 100 µg/g, te nije ustanovljena korelacija koncentracije toksina sa potencijalom razvoja gljivične vrste, niti s njenom patogenošću (40).

Prema WHO, maksimalna prihvatljiva razina patulina u soku od jabuke iznosi 50 µg/L (41). Ova koncentracija u skladu je s preporukama FDA i Europske unije (EU), koji su ograničili razinu patulina u čvrstoj jabuci na 50 µg/kg, a u hrani na bazi jabuke za djecu i bebe na 10 µg/L. Prema preporuci Europske komisije i na temelju utvrđene NOEL razine (43 µg/kg tjelesne težine), privremeni maksimalni podnošljivi dnevni unos patulina (PMTDI) postavljen je na 0,4 µg/kg tjelesne težine. Ovu razinu usvojila je većina analiza procjene zdravstvenog rizika za patulin (42, 43).

Akutna izloženost patulinu može uzrokovati gastrointestinalne tegobe uključujući mučninu, povraćanje, čireve, crijevna krvarenja i lezije u dvanaesniku. Procjenom toksičnosti patulina utvrđena su oštećenja na vitalnim organima poput jetre i bubrega (40). Prema IARC-u, patulin je kancerogen skupine 3, što znači da nema dovoljno studija utemeljenih na istraživanju na životinjama ili epidemioloških studija koje bi dokazale njegovu karcinogenezu (44).

#### 1.6.5 Zearalenon

Zearalenon (ZEA ili ZON) proizvode vrste roda *Fusarium*, od kojih su najčešće *F. graminearum* i *F. semitectum* (24). Do danas je otkriveno preko 150 derivata zearalenona, među kojima su najznačajniji  $\alpha$  – zearalenol, koji je oko 3 do 4 puta toksičniji od ZON-a te  $\beta$  izomer čiji je učinak približno jednak ZON-u (45). Zbog svoje strukturne sličnosti s prirodnim estrogenima,

ZON se često opisuje kao estrogene mikotoksin koji inducira estrogene učinke kod ljudi i životinja (24). ZON i njegovi derivati otkriveni su u značajnim količinama usjeva kukuruza, pšenice, sirka, ječma, zobi, sjena, sjemenki sezama i sl. Njegovoj proizvodnji najviše pogoduje visoka vlažnost (16% vlage) i nešto niže temperature (od 10 do 15°C). Toplinski je stabilan, što ga čini teškim za uklanjanje i/ili razgradnju u hrani (46).

ZON se često povezuje s pojedinim bolestima u ljudi i hiperestrogenizmom u životinja. Njegova tendencija za vezanje na estrogenske receptore dokazana je u brojnim in vitro i in vivo modelima u različitim životinjskim vrstama. Posljedice toga vidljive su prema promjenama i lezijama posebice kod reproduktivnog sustava ženki (23). Od domaćih životinja, svinje su najosjetljivije, dok je perad pokazala nisku osjetljivost na njegovo estrogeno djelovanje. U goveda, konzumacija hrane kontaminirane velikom količinom ZON-a može biti izravno povezana s neplodnošću, smanjenom proizvodnjom mlijeka i hiperestrogenizmom (38). Od strane IARC-a, klasificiran je kao kancerogen Skupine 3.

Europski odbor regulirao je maksimalne razine ZON-a u rasponu od 20 do 100 ppb u različitim prehrambenim proizvodima (24). Najveća zabrinutost javlja se zbog mogućeg štetnog učinka ZON-a posebno kod dojenčadi i djece, stoga je za dječju hranu navedena maksimalno dopuštena razina koja iznosi 20 mg/kg. Maksimalne dopuštene razine ZON-a u kukuruza i drugim žitaricama za odrasle nalaze se u rasponu od 50 do 100 mg/kg (47).

#### 1.6.6 Deoksinivalenol

Deoksinivalenol (DON) pripada velikoj skupini mikotoksina zvanih trihoteceni. Proizvode ga biljne patogene plijesni roda *Fusarium*, od kojih najviše vrste *F. graminearum* i *F. culmorum*. Ove plijesni pretežito rastu na žitaricama u umjerenim klimatskim predjelima Europe. (48). DON se najčešće nalazi kod usjeva pšenice, ječma, zobi, raži i kukuruza. Kemijski je stabilan spoj i relativno otporan na termičku obradu (49). Kao rezultat toga, DON je pronađen i u hrani na bazi žitarica koja je spremna za konzumaciju (50, 51). Poznato je da se istovremeno može pojaviti zajedno sa svojim acetilnim derivatima kao što su 3-acetil deoksinivalenol (3-Ac-DON), 15-acetil deoksinivalenol (15-Ac-DON) i 3,15-diacetil deoksinivalenol (3,15-Ac-DON) (52).

Konzumacijom izrazito kontaminirane hrane DON-om kod životinja može dovesti do akutnih gastrointestinalnih simptoma kao što su povraćanje, odbijanje hrane i krvavi proljev. Zbog sposobnosti da izazove akutno povraćanje kod svinja, dodijeljen mu je trivijalni naziv 'vomitoksin'.

Najčešći učinci dugotrajne prehrambene izloženosti životinja DON-u su supresija debljanja i anoreksija. Njegovi akutni učinci kod ljudi slični su onima kod životinja (53).

IARC, 1993. godine procijenila je kancerogeni učinak DON-a i zaključila da se DON ne može klasificirati kao karcinogen za ljude (Skupina 3). Europska komisija 1999. godine iznosi znanstveno mišljenje o DON-u i uspostavlja TDI od 1 µg/kg t.m./dan. U to vrijeme još se nije razmatralo donošenje posebne mjere zbog zajedničkog pojavljivanja i derivata DON-a. No konačno, 2017. godine, EFSA uspostavlja grupni TDI od 1 µg/kg t.m./dan za zbroj DON-a, 3-Ac-DON-a, 15-Ac-DON-a i DON-3- glukoze. (54).

## 1.7 Dokazivanje mikotoksina

Pouzdana procjena rizika za zdravlje ljudi prvenstveno ovisi o nedvosmislenoj identifikaciji i točnoj kvantifikaciji mikotoksina u namirnicama (55). Većina analitičkih postupaka za određivanje mikotoksina imaju sljedeće zajedničke korake: uzorkovanje, homogenizacija, ekstrakcija i čišćenje koje može uključivati koncentriranje uzorka. Konačno odvajanje i detekcija spojeva od interesa postiže se kromatografskim tehnikama praćenim različitim metodama detekcije ili imunokemijskim metodama. Dok se imunokemijske metode baziraju na separaciji specifičnim antitijelima za svaki mikotoksin posebno, kromatografske tehnike mogu odvojiti velik broj analita (56).

### 1.7.1 Uzorkovanje

Ključni korak kod analize mikotoksina u hrani čini pravilan princip uzorkovanja. O ispravnosti uzorkovanja uvelike može ovisiti pouzdanost rezultata i konačna odluka o sukladnosti ili nesukladnosti za cijelu seriju hrane (57,58). S izuzetkom uzoraka tekuće hrane (npr. mlijeko) ili neka visoko obrađena hrana (npr. maslac od kikirikija), tradicionalne metode uzorkovanja hrane obično nisu prikladne za analizu mikotoksina jer oni nisu homogeno prisutni u hrani. Takva neravnomjerna raspodjela mikotoksina u hrani čini ovaj postupak prikupljanja reprezentativnog uzorka mase vrlo izazovnim (59,60). Stoga, bitno je provesti temeljito razmotren plan uzorkovanja kojim će se osigurati reprezentativan uzorak za ukupnu masu serije (61). Za rješavanje tog problema, razvijeni su i koriste se mnogi planovi uzorkovanja na temelju statističkih parametara kojima se želi uravnotežiti sigurnost potrošača i zaštititi proizvođač (62, 63). Takve metode uzorkovanja opisuje EU prema Uredbi Komisije (EZ) br. 401/2006. Ipak,

kontinuirani su napori usmjereni ka poboljšanju plana uzorkovanja kojim upravljaju vladine regulatorne agencije diljem svijeta (64).

### 1.7.2 Priprema uzorka

Većina metoda koje se danas koriste za analizu mikotoksina u hrani zahtijeva intenzivnu pripremu uzoraka kako bi se toksini odvojili od matrice hrane. Ekstrakcija mikotoksina iz uzoraka čvrste hrane u tekuću fazu prvi je korak u pripremi uzorka, nakon čega slijede postupci čišćenja kako bi se poboljšala osjetljivost i specifičnost dane metode detekcije (64, 65). Prilikom odabira metoda za ekstrakciju i čišćenje mikotoksina iz uzoraka hrane bitno je voditi se trima glavnim čimbenicima: kemijskim svojstvima mikotoksina, prirodom matrice hrane i metodom detekcije koja se najmjerava koristiti (60). Većina uzoraka tekuće hrane, kao što su mlijeko, vino i sok od jabuke, podvrgnuti su ekstrakciji tekuće-tekuće. Za ekstrakciju mikotoksina iz žitarica, proizvoda od žitarica i drugih čvrstih materijala najpogodnija je kruto-tekuća ekstrakcija (66).

Većina mikotoksina je vrlo topljiva u organskim otapalima poput metanola, acetonitrila, acetona, kloroforma, diklormetana ili etil acetata, ali su izrazito slabo topljivi u vodi (60, 67). Međutim, za fumonizine je poznato da su topljivi u vodi jer sadrže četiri slobodne karboksilne skupine i jednu amino skupinu, a FB1 je vrlo stabilan u mješavini vode i acetonitrila (20). Stoga se za ekstrakciju mikotoksina često koristi mješavina organskih otapala s dodatkom određene količine vode ili kiselog pufera. Time voda poboljšava prodiranje organskih otapala u matricu hrane, dok kiselo otapalo može razbiti jake veze između analita i drugih komponenti hrane kao što su proteini i šećeri čime se postiže bolja učinkovitost ekstrakcije (65, 67). Za uzorke s visokim sadržajem lipida koriste se nepolarna otapala kao što su heksan i cikloheksan (68).

Nedavno su se mnoge instrumentalne automatizirane metode ekstrakcije otapalima koristile u analizi mikotoksina, uključujući ekstrakciju superkritičnim fluidom (SFE), ubranu ekstrakciju otapalom (ASE) i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE). U usporedbi s konvencionalnim metodama, ove metode ubrzavaju ekstrakciju mikotoksina, zahtijevaju manje količine kemijskog otapala (ekološki prihvatljivije) i obično daju bolju učinkovitost ekstrakcije; međutim, takve automatizirane metode mogu imati visoku cijenu (66, 69).

Nakon ekstrakcije mikotoksina, filtracija i centrifugiranje važni su koraci za uklanjanje svih ometajućih čestica prije izvođenja daljnjih koraka čišćenja. Čišćenje ekstrakta bitan je proces za uklanjanje onih tvari koje mogu ometati naknadno otkrivanje mikotoksina. Čišćenjem ekstrakta

povećava se specifičnost i osjetljivost što rezultira poboljšanom točnosti i preciznosti (68). Primijenjuju su različite metode čišćenja uključujući ekstrakcija tekuće-tekuće, ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE), imunoafinitetne kolone (IAC), kolonsku kromatografiju, kolone za ionsku izmjenu i multifunkcionalne kolone za čišćenje kao što je Mycosep™ (66, 67).

Najčešće korištene metode za čišćenje mikotoksina su SPE i IAC, jer su brze, učinkovite, ponovljive i sigurne, sa širokim rasponom selektivnosti (70, 71). Većina brzih metoda temeljenih na imunokemijskim tehnikama obično ne zahtijevaju čišćenje, stoga se razrijeđeni ekstrakti mogu koristiti izravno za imunoanalitičke metode, kao što je ELISA. Također, postoje neke metode određivanja mikotoksina s LC–MS/MS za koje nije potrebno čišćenje (67).

### 1.7.3 Analitičke metode

Danas je poznato između 300 do 400 mikotoksina koji pokazuju vrlo različita fizikalna i kemijska svojstva što je dovelo do razvoja brojnih analitičkih metoda za detekciju pojedinačnih ili cijele skupine mikotoksina u različitim matricama (56). Zbog činjenice da većina mikotoksina već u vrlo niskim koncentracijama može imati toksičan učinak nužno je imati osjetljive i pouzdane metode za njihovo otkrivanje. Primjena jednostavnijih, jeftinijih i učinkovitijih rješenja za detekciju mikotoksina sve je više potrebna zbog njihove utvrđene toksičnosti i postavljenih zahtjeva zakonodavstva za ograničenja količine u hrani. Uspješna metoda detekcije trebala bi biti robusna, osjetljiva i imati visok stupanj fleksibilnosti, u širokom rasponu spojeva, ali koja može biti vrlo specifična kada je potrebno. Sve tehnike trebaju biti ponovljive na visokoj razini, a dobiveni rezultati moraju biti relevantni i laki za analizu (68).

Detekcija mikotoksina provodi se pomoću nekoliko konvencionalnih metoda, kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC; eng. High Performance Liquid Chromatography), tekućinska kromatografija i masena spektrometrija (LC-MS; eng. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry), tankoslojna kromatografija (TLC), plinska kromatografija (GC; eng. Gas Chromatography), imunoafinitetni test na koloni (ICA) i enzimski imunosorbentni test (ELISA; eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (1).



### 1.7.3.1 Kromatografske metode

U vrijeme otkrića aflatoksina, TLC je bila prevladavajuća kromatografska tehnika i našla je široku primjenu u određivanju aflatoksina i drugih toksičnih sekundarnih metabolita plijesni. Iako se TLC još uvijek koristi u nekim laboratorijima u zemljama u razvoju, osobito ako je povezan s UV ili fluorescentnim detektorom, sada je uglavnom zamijenjen unaprijednim GC i HPLC metodama. Modernim razvojem HPLC povezan s UV i fluorescentnim detektorima i, u novije vrijeme, MS-om, postao je glavna metoda za određivanje mikotoksina (61).

HPLC je kromatografska metoda u kojoj pokretnu (mobilnu) fazu čini tekućina, dok je nepokretna (stacionarna) faza krutina različite polarnosti. Prilikom prolaska uzorka kroz kolonu, zbog međudjelovanja tvari koje se analizira i stacionarne faze dolazi do separacije ciljanih komponenti u koloni. Tekućina visokog tlaka, kao mobilna faza, utječe na interakcije analita i nepokretne faze te se u analizama najčešće primjenjuje gradijentna promjena sastava pokretne faze. Otapala koja se najviše koriste su voda, metanol i acetonitril, kojima se dodatkom različitih pufera može poboljšati razdvajanje analiziranih komponenata. Vrijeme zadržavanja komponenata ovisi o prirodi tvari koja se analizira i karakteristično je za određenu tvar. Primjena visokog tlaka povećava linearnu brzinu i daje komponentama manje vremena za zadržavanje, što poboljšava rezoluciju kromatograma i smanjuje vrijeme analize, uz uštedu otapala (30).

Najvažniji mikotoksin kao što su AF, OTA, FB i ZON rutinski se analiziraju pomoću HPLC-FD, a DON pomoću HPLC-UV s dobrom točnošću i preciznošću. HPLC-FD je vrlo osjetljiv, selektivan i ponovljiv, pa su razvijeni specifični reagensi za derivatizaciju nefluorescentnih mikotoksina u fluorescentne derivate (72). U novijim analizama HPLC često se kombinira i sa masenom spektrometrijom (MS). MS omogućava izrazito točnu i specifičnu detekciju, ali njegovu primjenu najviše ograničava visoka cijena potrebne opreme, složenost procesa ekstrakcije i separacija te detekcije i kvantifikacije ovih vrsta spojeva (68).

### 1.7.3.2 ELISA

Od svih objavljenih imunološki utemeljenih metoda, za određivanje mikotoksina najčešće se koristi enzimski imunosorbentni test (ELISA). ELISA omogućuje brzi probir, s mnogo komercijalno dostupnih kompleta za otkrivanje i kvantificiranje svih glavnih mikotoksina

uključujući AF, OTA, ZON, DON, fumonizine i T-2 toksin. ELISA metode su validirane u širokom rasponu matrica hrane (66, 67).

Princip ELISA temelji se na kompetitivnim interakcijama između mikotoksina (koji djeluju kao antigen) i dodijeljenih antitijela obilježenih konjugatom toksin-enzim za mnoga mjesta vezanja. Količina konjugata toksin-enzim vezana na protutijelo odredit će razinu razvoja boje. Ova tehnika pruža brzu, specifičnu i relativno jednostavnu metodu za analizu mikotoksina u hrani. Međutim, ELISA ima određene nedostatke uključujući potencijalnu križnu reaktivnost i ovisnost o specifičnoj matrici. Osim toga, komplet otkriva samo jedan mikotoksin i dizajniran je za jednokratnu upotrebu; stoga može biti skupo ako treba testirati uzorke kontaminirane višestrukim mikotoksinima (67, 73). Štoviše, svaki ispitni komplet specificiran je od strane proizvođača. Provjere trećih strana provedene su za neke ELISA komplete, te su validirane i namijenje za upotrebu samo za specifične toksine pod određenim razinama kontaminacije unutar određenih matrica, stoga se komplet ne može koristiti za sve matrice hrane i sve razine kontaminacije (73). Pozitivne rezultate ELISA-e treba potvrditi odgovarajućom kromatografskom metodom, osobito kada se koristi u matrici koju nije naveo proizvođač (61).

## 1.8 Zakonska regulativa

Mnoga nacionalna i internacionalna tijela javnog zdravstva posvećuju ozbiljnu pozornost kontaminaciji mikotoksina u hrani i hrani za životinje kao što su Američka agencija za hranu i lijekove (FDA), Svjetska zdravstvena organizacija (WHO), Organizacija za prehranu i poljoprivredu (FAO) i Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA). Oni ovaj globalni problem pokušavaju riješiti usvajanjem strogih regulatornih smjernica za glavne vrste mikotoksina u hrani i hrani za životinje. Trenutno je oko 100 zemalja u svijetu uspostavilo ograničenja prisutnosti glavnih mikotoksina (24).

Europska unija postavila je jedan od najviših standarda za sigurnost hrane u svijetu. Za najvažnije mikotoksine, na temelju opsežne procjene sigurnosti i izloženosti, provedena je analiza rizika i utvrđena vrijednost sigurne dnevne izloženosti (TDI) te su definirane maksimalne dopuštene koncentracije (MDK) koje se mogu nalaziti u hrani (74). Uredba propisuje najviše dopuštene količine kontaminanata koje su razumno ostvarive uz dobre proizvođačke ili dobre poljoprivredne prakse.

U svrhu provedbe uredbe Europske komisije, Republika Hrvatska je Zakonom o kontaminantima (NN 39/13, izmjene i dopune NN 114/18) utvrdila nadležna tijela, zadaće nadležnih tijela, službene kontrole i načini postupanja te izvještavanja nadležnih tijela i Europske komisije kao i obveze službenih laboratorija i subjekata u poslovanju s hranom (75). Pravilnikom o sustavu brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (NN 155/2013) propisuje se djelokrug RASFF sustava i definira djelokrug rada i odgovornosti nacionalne kontakt-točke (NKT). NKT je središnja kontakt-točka koja upravlja i koordinira HR RASFF sustavom i koja je kontakt-točka prema Europskoj komisiji (76).

**Tablica 1.** Granične vrijednosti reguliranih mikotoksina za pojedine kategorije hrane (74).

MIKOTOKSIN	KATEGORIJE HRANE	MDK ( $\mu\text{g/kg}$ )
AFLATOKSINI	Bademi, kikiriki i druge sjemenke uljarica, orašasti plodovi, sušeno voće, žitarice, kukuruz, začini, hrana na bazi žitarica i hrana za dojenčad i malu djecu	0,1 – 12,0 (B1)
	Kikiriki i druge sjemenke uljarica, orašasti plodovi, sušeno voće, žitarice, kukuruz, začini	4,0 – 15,0 (Zbroj B1, B2, G1, G2)
OKRATOKSIN A	Sirovo mlijeko, hrana za dojenčad, hrana za posebne medicinske potrebe (dojenčad)	0,025 – 0,050 (M1)
	Začini, neprerađene žitarice i proizvodi od žitarica, grožđice, hrana za dojenčad i malu djecu na bazi žitarica, hrana za posebne medicinske potrebe (isključivo namijenjena dojenčadi)	0,5 - 20
PATULIN	Voćni sokovi, jabučni proizvodi, dječja hrana (osim hrane za dojenčad i malu djecu na bazi žitarica)	10 – 50
DEOKSINIVALENOL	Neprerađeni kukuruz, neprerađene žitarice, tjestenina, kruh, kolači, keksi, snack proizvodi od žitarica i žitarice za doručak, prerađena hrana na bazi žitarica i hrana za dojenčad i malu djecu	200 - 1750
ZEARALENON	Rafinirano kukuruzno ulje, neprerađene žitarice, neprerađeni kukuruz, kolači, kruh, keksi, snack proizvodi, prerađena hrana za dojenčad i malu djecu na bazi žitarica	20 – 400
FUMONIZINI	Neprerađeni kukuruz, kukuruzni proizvodi, žitarice za doručak na bazi kukuruza i snack proizvodi od kukuruza, prerađena hrana na bazi kukuruza i hrana za dojenčad i malu djecu	200 – 4000 (Zbroj B1 i B2)
CITRININ	Dodatci prehrani na osnovi riže fermentirane crvenim kvascem <i>Monascus purpureus</i>	100

## 1.9 Prevenirica i suzbijanje prisutnosti mikotoksina u hrani

Već je poznato da mikotoksini najčešće ulaze u prehrambeni lanac životinja i ljudi putem poljoprovrednih proizvoda kao što su zrna žitarica te sjemenke uljarica. Budući da toksogene plijesni produktivno rastu na žitaricama za vrijeme uzgoja, žetve i tijekom skladištenja, uspješan sustav suzbijanja njihovog rasta trebao bi obuhvaćati sve faze proizvodnje usjeva (8, 77). Kako bi se postigao glavni cilj, a to je zdravstvena ispravnost krajnjeg proizvoda, razvile su se metode koje djelimo na one za sprječavanje onečišćenja plijesnima, rasta i razvoja plijesni, te metode detoksikacije onečišćenih proizvoda (25). Prvenstveno primjenom dobre gospodarske prakse za proizvodnju zdravih i kvalitetnih uroda moguće je smanjiti prisutnost toksogenih plijesni te njihovih toksina. Odabirom sorti ili hibrida koje će biti manje osjetljive na određene vrste plijesni, te kombinirajući vrijeme njihovog sazrijevanja s najpovoljnijim okolišnim uvjetima moguće je već na polju značajno smanjiti opasnost od kvarenja i tvorbe mikotoksina (78).

Održati nisku vlažnost usjeva prilikom sjetve osnovni je zahtjev koji se mora kontrolirati, jer što je veća suhoća uroda, manja je mogućnost razvoja plijesni kako u polju tako i u skladištu. Stoga, za većinu žitarica smatra se da vlaga ne smije prelaziti 13-14%. No, pored kontrolirane razine vlažnosti, temperatura u rasponu 15-20°C uz dulje razdoblje skladištenja može potaknuti razvoj plijesni. Sprečavanje ili inhibicija rasta plijesni kod skladištenja obično se obavlja modifikacijom okolišnih uvjeta, odnosno sadržaja vode, temperature i plinovite atmosfere (8).

Većina plijesni koje uzrokuju kvarenje usjeva uglavnom su aerobni organizmi. Kontrola plinovite atmosfere kisika i CO<sub>2</sub> onemogućuje rast plijesni i prilikom skladištenja supstrata visoke vlažnosti zbog osjetljivosti plijesni na visoke koncentracije CO<sub>2</sub> odnosno niske koncentracije kisika. Stoga, da bi se smanjio njihov rast potrebno je smanjiti koncentraciju kisika na manje od 0.14% ili povećati koncentraciju CO<sub>2</sub> na više od 15%. Međutim treba imati na umu da plijesni pritom nisu uništene, te da one mogu nastaviti svoj razvoj i proizvodnju mikotoksina čim se uvjeti promjene u njihovu korist (22).

Premda prevenirica kontaminacije mikotoksinima nije uvijek učinkovita, veliki značaj pridaje se napredovanju u razvoju strategija i metoda uklanjanja ili inaktivacije mikotoksina te njihovoj primjeni u industriji. Dekontaminacija mikotoksina u kasnijim fazama proizvodnje hrane izuzetno je zahtjevna i pored toga rezultati nisu uvijek obećavajući (79).

Prema FAO-u, procesom dekontaminacije mora se postići sljedeće:

- uništiti, inaktivirati ili ukloniti mikotoksin

- ne proizvesti ili ostaviti toksični, kancerogeni ili mutageni ostatak u konačnim proizvodima ili u prehrambenim proizvodima dobivenim od životinja hranjenih dekontaminiranom hranom
- zadržati nutritivnu vrijednost i prihvatljivost proizvoda
- ne mijenjati bitno tehnološka svojstva
- uništiti spore gljivica i micelije koje bi se mogle, pod povoljnim uvjetima, razmnožavati i stvarati nove toksine (79).

Općenito, metode redukcije dijele se na fizikalne, kemijske i biološke. Neki od ključnih parametara o kojima ovisi njihova učinkovitost su sastav proizvoda, sadržaj vlage, razina kontaminacije i dr. Fizikalne metode detoksikacije uključuju mehaničko odvajanje onečišćenih frakcija, primjenu topline, ozračivanje, uporaba adsorbensa te ekstrakcija pomoću otapala (80). Kod primjene kemijskih metoda, kao što su amonizacija, tretmani s kiselinama, alkalna hidroliza, peroksidacija, ozoniranje i primjena bisulfita, postoji opasnost od potencijalne toksičnosti i negativnih učinaka na kakvoću sirovina. Nedovoljna saznanja o produktima degradacije i promjeni nutritivnih i organoleptičkih svojstava hrane i krmiva koje nastaju kod fizikalnih i kemijskih tretmana, još uvijek ograničavaju primjenu navedenih metoda (76).

### 1.9.1 Fizikalne metode

Uklanjanje oštećenih dijelova usjeva koji su uz to najčešće kontaminirani plijesnima, moguće je kod neravnomjernog ili djelomičnog onečišćenja. Tako npr. fizičko uklanjanje obojenih, oštećenih ili neadekvatno razvijenih jezgri kikirikija značajno smanjuje koncentraciju aflatoksina, fumonizina i ergot alkaloida (78). Iako je ovo najraširenija tehnika dekontaminacije u industriji kikirikija i pistacija, nije praktična za kukuruz i sjeme pamuka (81). Kod kukuruza kontaminiranog aflatoxinima primjenjuje se metoda fluorescentnog sortiranja zbog fluorescirajućeg svojstva kojične kiseline, produkta metabolizma *Aspergillus flavus* i drugih plijesni. Fluorescentno sortiranje može se koristiti za kukuruz, sjemenke pamuka i suhe smokve, ali je neučinkovito za dekontaminaciju kikirikija (78). Poznato je da kontaminirano sjeme pluta na vodi pa se tako primjenom flotacije mogu smanjiti visoke koncentracije aflatoksina u kontaminiranom kukuruzu i kikirikiju za čak 90%.

Ispiranje zrna vodom ili vodenom otopinom natrijevog karbonata može smanjiti koncentraciju mikotoksina DON, ZON i fumonizina u pšenici i kukuruza. Ove metode su ograničene cijenom sušenja sjemena, a koriste se samo prije mokrog mljevenja i kuhanja (82).

Mikotoksini su relativno otporni na termičku inaktivaciju. Aflatoksini uništavaju se tek na temperaturama od oko 250 °C, stoga procesi koji uključuju zagrijavanje trebaju doseći taj temperaturni raspon. Kod bilo koje vrste toplinske obrade, uništavanje mikotoksina ovisi prvenstveno o temperaturi i vremenu izlaganja. Na primjer, prženje zrna zelene kave na 200 °C tijekom 12 minuta uzrokovalo je smanjenje sadržaja aflatoksina od 79 %, dok je nakon 15 minuta uništeno 94 % toksina. Također, na razgradnju mikotoksina utječu neki dodatni parametri, kao što su sadržaj vlage proizvoda, razina toksina, vrsta matrice hrane i prisutnost aditiva (83). Okratoksin A je vrlo stabilan na toplinsku obradu i ne uništava se ni na 200 °C. Iako prisutnost vode povećava razgradnju, njegovo potpuno uništenje u suhim ili u mokrim žitaricama, nije postignuto pri 200 °C niti na 250 °C (84).

Za detoksikaciju mikotoksina također su ispitane različite vrste zračenja poput  $\gamma$ , X-zraka, UV, VIS, i mikrovalnog zračenja. U pšenici,  $\gamma$ -zračenje uspješno smanjuje koncentraciju ZON, DON i T-2 toksina (78). No, kod zračenja može doći do proizvodnje opasnog metabolita AFB1, te je učinkovitost dekontaminacije zračenjem moguća samo kada se nanese na tanak sloj zrna. Kako bi se to izbjeglo, utvrđeno je da sunčeva svjetlost najučinkovitije detoksicira AFB1, te se najviše primjenjivati u tropskim krajevima za detoksikaciju kokosa, kikirikija i kukuruza (85).

Organska otapala kao što su etanol, izopropanol, metoksimetan, učinkovito detoksiciraju aflatoksine kod različitih vrsta prehrambenih proizvoda. Pored ograničavajuće visoku cijenu organskih otapala, ovi spojevi nisu praktični za industrijsku upotrebu jer se sami teško uklanjaju iz tretiranih proizvoda (82, 86).

### 1.9.2 Kemijske metode

Učinkovitost kemijskih spojeva, kao što su kiseline (mravlja i propionska kiselina), alkalni spojevi (amonij, natrijev hidroksid), oksidirajući spojevi (vodikov peroksid, ozon), reduksijski spojevi (bisulfit) i klorirajući (klorid), testirana je u brojnim istraživanjima s ciljem dekontaminacije mikotoksina. Iako je dokazana visoka učinkovitost kemijske detoksikacije, primjena je dosta ograničena. Postoji opasnost kod primjene nekih od navedenih spojeva jer

stvaraju svoje toksične metabolite, a pored toga mogu smanjiti nutritivnu vrijednost tretirane hrane i hrane za životinje (86).

Propionska kiselina djelotvorna je za inhibiciju rasta plijesni, no potreban je oprez pri rukovanju zbog korozivnog učinka. Vodikov peroksid može uništiti veliku količinu AFB1 u kukuruzu i detoksificirati aflatoksine koji sadrže kikiriki (87). Za uklanjanje aflatoksina iz hrane za životinje najviše se koriste vodikov peroksid i amonijak. Pokazalo se da ove metode ne ostavljaju toksične metabolite mikotoksina u hrani, ali amonijak smanjuje njihovu nutritivnu vrijednost smanjenjem lizina i aminokiselina koje sadrže sumpor (78).

Dobra učinkovitost amonizacije pokazala se kod razaranja AFB1 u sjemenu pamuka, kikirikiju i kukuruzu. Također, utvrđena je smanjena koncentracija AFM1 u mlijeku krava u laktaciji hranjenih obrokom od kikirikija koji je tretiran amonijakom. Uz odgovarajuću aeraciju za uklanjanje zaostalog amonijaka, ova metoda smatra se sigurnom i praktičnom za dekontaminaciju aflatoksina u hrani za životinje. Nedostaci ove metode su relativno dugo razdoblje prozračivanja i visoka cijena što može povećati cijenu proizvoda za 5-20%. (79, 25).

Natrijev bisulfit uobičajen je dodatak hrani koji može značajno smanjiti DON i AFB1 u hrani za svinje na bazi kukuruza. Dodatak natrijevog klorida može smanjiti koncentraciju aflatoksina u neoljuštenom kikirikiju kuhanom pod pritiskom. Iako je dokazana visoka učinkovitost kemijske detoksikacije, primjena je dosta ograničena. Razlog tome je jer neki od spojeva stvaraju svoje toksične metabolite, a pored toga mogu i smanjiti nutritivnu vrijednost tretirane hrane i krmiva (79). Zbog toga su do danas kemijske metode detoksikacije odobrene iznimno u cilju smanjenja prisutnosti AFB1 u krmivima (25).

### 1.9.3 Biološke metode

Kod biološke metode detoksifikacije primjenjuju se mikroorganizmi ili enzimi koji mogu metabolizirati, razoriti ili inaktivirati mikotoksine do stabilnih, manje toksičnih ili bezopasnih oblika (77). Mnogi mikroorganizmi kao što su bakterije, kvasci, plijesni, aktinomicete i alge, imaju sposobost ukloniti ili smanjiti količine mikotoksina u hrani i krmivu, ali je u većini slučajeva mehanizam njihova djelovanja ostao nepoznat. Od navedenih potencijalnih mikroorganizama, bakterije mliječne kiseline (BMK) i kvasci, a posebno, *Saccharomyces cerevisiae* predstavljaju izrazito korisnu skupinu. Odavno je poznato da se već uveliko koriste u proizvodnji i očuvanju



fermentiranih proizvoda. No, osim toga djelotvorni su i kod uklanjanja mikotoksina iz hrane tako da ih vežu na površinu stanice ili ih mogu transformirati u manje toksične produkte (88, 89). Osim razaranja AFB1 pomoću BMK i bakterijom *Flavobacterium aurantiacum*, mnogi kvasci i sojevi BMK mogu ukloniti ili degradirati i ostale mikotoksine kao što su OTA PAT, ZON, DON i fumonizini. Daljnim istraživanjima primjene mikrobnih kultura i njihovih staničnih komponenti u svrhu uklanjanja mikotoksina, želi se izbjeći ili smanjiti buduće korištenje fizikalnih i kemijskih metoda (76).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja bio je analizirati podatke o koncentraciji različitih mikotoksina u određenim prehrambenim namirnicama koje su dostavljene na analizu na Odjel zdravstvene ekologije Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije. Također, cilj je bio utvrditi postoje li odstupanja dobivenih rezultata od maksimalno dopuštenih koncentracija (MDK) prema Uredbi komisije (EZ) br. 1881/2006. Uzorci su analizirani u sklopu Programa javnozdravstvenih mjera zaštite zdravlja od štetnih čimbenika u periodu od 2016. do 2021. godine.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Materijali

Za određivanje aflatoksina B1 koristi se kit RomerLabsa "Aflstoxin B1 Assay" u rasponu koncentracija 2-50 µg/kg koji sadrži sve potrebne reagense i stanadarde za analizu aflatoksina.

Ukupni aflatoksini određuju se pomoću kit RomerLabsa "Total Aflatoxin Assay" u rasponu koncentracija 1-20 µg/kg koji sadrži sve potrebne reagense i stanadarde za analizu aflatoksina.

Kod određivanja okratoksina A koristi se kit Romer Labsa „Ochratoxin Assay 2/40" u rasponu koncentracija 2 – 40 µg/kg koji sadrži sve potrebne reagense i standarde za analizu. Kemikalije koje se koriste za aflatoksine i okratoksin A su metanol i destilirana voda. Potrebna oprema za određivanje navedenih mikotoksina je:

- Elektronska analitička vaga AX204
- Elektronska precizna vaga
- Elisa čitač – Tecan Sunrise Absorbance Reader (karton opreme (OB 20-600))
- Tresilica
- pH metar
- Mikropipetori: 1-kanalni (5 – 50 µL; 10 – 100 µL; 200 – 1000 µL)
- Erlenmayerova tikvica sa šlifom i čepom od 250 - 300 mL, široko grlo, tamno staklo
- Menzura 100 mL
- Stakleni ljevak
- Filter papir Whatman br. 1
- Pipete 1 mL, 5 mL, 10 mL

Za određivanje DON-a koristi se DONQ test trakice, DONQ “buffer” za razrjeđivanje, DON pozitivna kontrola, ROSA inkubator i ROSA čitač. Reagens koji se koristi, a nije sadržan u kitu je destilirana/deionizirana voda.

Od ostale opreme potrebna je:

- Elektronska precizna vaga
- Eprivete od 25 mL
- Menzura od 50 mL
- Tresilica
- Mikrokivete
- Centrifuga
- Mikropipetor (1-kanalni; 10-100 $\mu$ L; 200-1000 $\mu$ L)

Za određivanje ZON-a koriste se ZEARQ test trakice, ZEAR “buffer” za razrjeđivanje, ZEAR pozitivna kontrola, ROSA incubator i ROSA čitač. Reagens koji se još koristi je 70%-tni metanol. Ostala oprema jednaka je kao kod određivanja DON-a.

### 3.2 Metode

Kod postupka analize AFB<sub>1</sub>, nakon homogenizacije uzorka odvaži se 20,0 g uzorka (50 g “slurry-a”) i doda 100 mL metanola:voda u omjeru 70:30 (ili za “slurry” 70 mL metanola) u Elenmayerovu tikvicu s brušenim grlom i čepom. Uzorak se stavi na tresilicu cca 3 minute, pusti da se slojevi odvoje te se profiltrira kroz filter papir Whatman #1. Filtrat se razrijedi s puferском otopinom tako da u 100  $\mu$ L puferske otopine. Nakon razrjeđivanja uzorci se analiziraju pomoću komercijalno dostupnog kita za aflatoksine Romer Labs: Aflatoxin B<sub>1</sub> Assay.

Pripreme se jažice sa zelenim obrubom. Svaki standard i uzorak radi se u duplikatu. Mikropipetom se otpipetira 100 $\mu$ L konjugata (aflatoksin-enzim konjugat), potom se doda 50  $\mu$ L svakog standarda i uzorka koristeći nove nastavke za pipetiranje. Standardi i uzorci se pomiješaju uvlačenjem i ispuštanjem iz mikropipete, te se 100  $\mu$ L prebaci u jažice s odgovarajućim antičjelima. Inkubacija traje 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga sadržaj iz jažice se baca, a jažice se ispiru destiliranom vodom. Postupak se ponovi 5 puta. Između svakog pipetiranja jažice treba osušiti na papiru. Dno jažice mora ostati potpuno suho.

U svaku jažicu pipetira se 100  $\mu$ L supstrata i inkubira 5 minuta na sobnoj temperature. Konverziju dodanog supstrata katalizira enzim iz aflatoksin-enzim konjugata i pri ovoj se reakciji razvija plavo obojenje ove otopine. Intenzitet obojenja otopine dobivene nakon ovdje opisanog postupka obrnuto je proporcionalan koncentraciji aflatoksina u uzorku. Zatim se dodaje 100  $\mu$ L stop otopine koja će zaustaviti specifičnu kompetitivnu imuno-kemijsku reakciju i pri tome se boja otopine mijenja iz plave u žutu.

Intenzitet obojenja ili optička gustoća (eng. Optical Density, OD) otopine određuje se pomoću čitača mikro-titar ploča I to pri valnoj duljini od 450 nm. Vrijednost dobivena za OD usporedi se s vrijednošću OD dobivenoj kod standardnih otopina i odredi koncentracij aflatoksina u uzorku. Koncetracija AFLB1 koji se određuje ovom metodom kreće se u rasponu od 2 do 50  $\mu$ g/kg.

## 4. REZULTATI

Na Odsjek za kontrolu namirnica, predmeta opće uporabe, unapređenja prehrane i mikrobiologije Zdravstveno ekološkog odjela Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije u sklopu navedenog programa u periodu od 2016. do 2021. godine, dostavljeno je ukupno 87 uzoraka na analizu prisutnosti AFB<sub>1</sub> i ukupnih aflatoksina. U tablicama 2 i 4 prikazani su podaci samo za periode analiza tijekom kojih je u navedenim namirnicama pronađena određena koncentracija traženih mikotoksina. Ružičastom bojom sjenčane su vrijednosti koje prelaze zadani MDK. U tablicama 3 i 5 navedene su srednje vrijednosti utvrđenih koncentracija po godinama ispitivanja pojedinih vrsta uzoraka.

**Tablica 2.** Koncentracije AFB<sub>1</sub> u uzorcima orašastog voća u razdoblju od 2016. do 2021. godine.

Godina analize	Vrsta uzorka	Zemlja podrijetla	Koncentracija (µg/kg)	MDK (µg/kg)
2017.	Orasi	Srbija	6.17	2
	Kikiriki	Egipat	35.42	8
2018.	Kikiriki	Egipat	71.14	8
	Kikiriki	Egipat	7.41	8
	Kikiriki	Egipat	29.25	8
	Kikiriki	Egipat	7.32	8
	Kikiriki	Egipat	7.24	8
2019.	Orasi	Hrvatska	7.21	2
2020.	Kikiriki	Kina	2.16	8
	Kikiriki	Kina	2.48	8
	Kikiriki	Kina	2.97	8
	Kikiriki	Kina	6.11	8
2021.	Kikiriki	Kina	6	8
	Kikiriki	Kina	2.08	8
	Kikiriki	Kina	16.8	8
	Kikiriki	Kina	42.15	8

**Tablica 3.** Srednje vrijednosti koncentracija AFB1 u uzorcima kikirikija u razdoblju od 2017. do 2021. godine ( $\bar{X} \pm SD$ ).

Godina ispitivanja	Kikiriki
2017.	6.2
2018.	24.5 ± 27.8
2019.	-
2020.	3.4 ± 1.8
2021.	16.8 ± 18.0

**Tablica 4.** Koncentracije ukupnih AF u uzorcima orašastog voća u razdoblju od 2016. do 2021. godine.

Godina analize	Vrsta uzorka	Zemlja podrijetla	Koncentracija(µg/kg)	MDK (µg/kg)
2016.	Kikiriki	USA	1.0	15
	Lješnjak	Hrvatska	1.2	15
2017.	Kikiriki	Egipat	2.1	15
	Orah	Srbija	8.4	4
	Kikiriki	Egipat	36.5	15
2018.	Kikiriki	Egipat	111.0	15
	Kikiriki	Egipat	13.2	15
	Kikiriki	Egipat	30.7	15
	Kikiriki	Egipat	8.9	15
	Kikiriki	Egipat	8.8	15
2019.	Orah	Hrvatska	6.8	4
2020.	Kikiriki	Kina	1.8	15
	Kikiriki	Kina	7.2	15
2021.	Kikiriki	Kina	1.1	15
	Kikiriki	Kina	7.2	15
	Kikiriki	Kina	2.5	15
	Kikiriki	Kina	20.1	15
	Kikiriki	Kina	59.9	15

**Tablica 5.** Srednje vrijednosti koncentracija ukupnih AF u razdoblju od 2016. do 2020. godine ( $\bar{X} \pm SD$ )

Godina analize	Kikiriki
2016.	1.0
2017.	19.3 $\pm$ 24.4
2018.	34.5 $\pm$ 43.7
2019.	-
2020.	4.5 $\pm$ 3.8
2021.	18.2 $\pm$ 24.5

Osim aflatoksina, kod 31 uzoraka različitih vrsta namirnica testirana je prisutnost okratoksina A. No, niti u jednom uzorku nije pronađena koncentracija veća od granice kvantifikacije koja za ovaj mikotoksin iznosi 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Također, prilikom utvrđivanja prisutnosti ZON-a, od 111 uzoraka niti jedan nije sadžavao traženi mikotoksin iznad granice kvantifikacije (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).



**Tablica 6.** Koncentracija DON-a u uzorcima pekarskih proizvoda sa područja Primorsko-goranske županije od 2018. do 2020. godine

Godina analize	Vrsta uzorka	Koncentracija (µg/kg)	Granica (µg/kg)
2018.	Kruh	200	500
	Kruh	350	500
	Kruh	400	500
2019.	Kruh	150	500
	Krafna	275	500
	Kruh	200	500
	Kruh	100	500
	Kruh	150	500
	Kruh	100	500
	Kruh	100	500
2020.	Kruh	150	500
	Kruh	250	500
	Kruh	200	500
	Keks	125	500
	Keks	150	500
	Keks	300	500
	Keks	100	500
	Kruh	250	500
	Keks	150	500

**Tablica 7.** Srednje vrijednosti koncentracija DON-a u uzorcima pekarskih proizvoda u razdoblju 2018.-2019. ( $\bar{X} \pm SD$ )

Godina analize	Kruh	Krafna	Keksi
2018.	317 ± 104	-	-
2019.	140 ± 41	-	-
2020.	200 ± 50	275	169 ± 90

Od ukupno 111 uzoraka pekarskih proizvoda dostavljenih na analizu sa područja Primorsko-goranske županije, kod njih 19 zabilježena je prisutnost DON-a u koncentracijama navedenim u tablici 6. U tablici 7 navedene su srednje vrijednosti spomenutih koncentracija po godinama analize i namirnicama u kojima je određena.

Svi navedeni podaci obrađeni su pomoću programa Microsoft Excel ver. 2016.

## 5. RASPRAVA

Analizom namirnica prikupljenih tijekom šestogodišnjeg razdoblja, prisutnost aflatoksina B1 utvrđena je kod 16 od ukupno 81 uzorka, što čini udio od oko 18%. Analizirani uzorci bili su kikiriki i drugi orašasti plodovi poput oraha i pistacija, te sušeno voće kao što su smokve i datule. Od navedenih namirnica po broju uzoraka uvelike prednjači kikiriki sa 72 prikupljena uzorka (oko 88%) od kojih njih 14 sadrži određenu koncentraciju AFB<sub>1</sub> (19%). Zabilježeno je 5 uzoraka kikirikija čija koncentracija prelazi granicu MDK (8 µg/kg), a najveća od njih iznosila je 71.14 µg/kg (2018.). Također, granicu MDK postavljenu za orašaste plodove namijenjene izravnoj ljudskoj potrošnji (2 µg/kg) prelaze 2 uzorka oraha podrijetlom iz Srbije (2017.) i Hrvatske (2019.). Dakle, od ukupno 81 uzorka, 8.6% čine uzorci koji prelaze granicu MDK.

Kod istih uzoraka ispitana je i prisutnost ukupnih aflatoksina (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub>), a određena količina utvrđena je kod 18 uzoraka (oko 22%). Zabilježeno je 7 uzoraka čija vrijednost prelazi zadani MDK (4 µg/kg za orah i 15 µg/kg za kikiriki). Najveća vrijednost ukupnih AF zabilježena je u kikirikiju podrijetlom iz Egipta (2018.). Najveća srednja vrijednost, kao i kod AFB<sub>1</sub>, utvrđena je 2018. godine.

Jedan od mogućih uzroka najveće pojavnosti aflatoksina u 2018. godini mogu biti ekstremno visoke temperature na globalnoj razini u tom periodu, a pogotovo u suptropskim područjima kojima pripada država Egipat, odakle su i uvezeni prethodno spomenuti uzorci. Osim klimatskih čimbenika, važno je spomenuti i mogući utjecaj visokih temperaturama i vlage tijekom skladištenja usjeva što je uobičajena pojava u suptropskim područjima.

Prisutnost DON-a najviše se ispituje u žitaricama i proizvodima od žitarica, kao što su kruh i drugi pekarski proizvodi. U ovoj studiji, od ukupno 111 pekarskih proizvoda, kod 19 je kvantificirana koncentracija ovog mikotoksina, što čini udio od oko 17%. Niti jedan od njih ne prelazi granicu MDK koja iznosi 500 µg/kg za ovu vrstu namirnica. Najviša srednja vrijednost bila je 2018. godini u uzorcima kruha koji je ujedno i najzastupljenija vrsta namirnice u ovom slučaju. Premda je poznato da su uvjeti za sintezu DON-a najpovoljniji u umjerenim klimatskim predjelima Europe, ne iznenađuje činjenica njegove pojavnosti i u hrani s našega područja. Također, zbog njegove stabilnosti pri termičkoj obradi, koncentracija sadržana u žitaricama odnosno brašnu, bit će prisutna i u proizvodima od istog. Stoga, posebnu pažnju potrebno je posvetiti proizvodima namijenjenim izravnoj ljudskoj potrošnji i redovito provjeravati razine mikotoksina prvenstveno

u žitaricama koje se korsite za proizvodnju istih. Očekuje se da bi do porasta navedenih brojki moglo doći uz korištenje osjetljivijih metoda i opreme za otkrivanje, čime bi se povećala i baza podataka pojedinih mikotoksina.

Sličnu studiju proveli su Gallo i sur. 2021. godine u Italiji. U njoj su prikazali rezultate praćenja AFB<sub>1</sub> i ukupnih aflatoksina u periodu od 2017. do 2020. godine u hrani biljnog podrijetla (većinom orašasti plodovi i sušeno voće) uvezene u južnu Italiju iz zemalja izvan EU. Ukupno je analizirano 1675 uzoraka akreditiranom HPLC metodom s fluorescentnom detekcijom. Utvrdili su da je 295 uzoraka (17,6%) kontaminirano aflatoksinom B<sub>1</sub>, 204 aflatoksinima B/G (12,2%), te 75 (4,5%) uzoraka nije bilo sukladno maksimalnim granicama propisanim zakonima EU. Ovom studijom također je utvrđeno da su orašasti plodovi poput kikirikija, pistacija, lješnjaka i badema glavni izvori izloženosti potrošača aflatoksinima (90).

Ediage i sur., 2011. godine osmislili su studiju u Belgiji u svrhu razvoja LC-MS/MS kako bi istovremeno mogli otkriti i kvantificirati do 25 mikotoksina u različitim uzorcima hrane. Metoda je primijenjena za analizu prirodno kontaminiranih uzoraka kolača od kikirikija (15 uzoraka), brašna manioke (4 uzorka) i kukuruza (4 uzorka) iz Republike Benin. Svi analizirani uzorci bili su pozitivni na jedan ili više mikotoksina. Ukupni aflatoksini (10-346 µg/kg) i okratoksin A (<2 µg/kg) otkriveni su u uzorcima kolača od kikirikija, dok su fumonizin B<sub>1</sub> (4-21 µg/kg), aflatoksin B<sub>2</sub> (<8 µg/kg), aflatoksin B<sub>1</sub> (<9 µg/kg) i zearalenon (<12 µg/kg) otkriveni i kvantificirani u uzorcima brašna manioke. Fumonizin B<sub>1</sub> (13-836 µg/kg), fumonizin B<sub>2</sub> (5-221 µg/kg), fumonizin B<sub>3</sub> (375 µg/kg) i beauvericin (<25 µg /kg) otkriveni su u uzorcima kukuruza (91).

Golge i sur., 2020 godine u sličnom istraživanju ispitivali su koncentracije DON-a i ZON-a u žitaricama i proizvodima od žitarica prikupljenih u Turskoj od 2015. do 2018. Ukupno 240 žitarica i proizvoda od žitarica analizirano je pomoću HPLC-PDA. Trinaest uzoraka pšenice (58–1092 µg/kg), dva kukuruza (313–331 µg/kg), tri ječma (138–973 µg/kg), sedam neoljuštene riže (136–256/µg kg), tri pšeničnog brašna (92–151 µg/kg), dva keksa (31,2–71,3 µg/kg) i samo jedne tjestenine (49,3 µg/kg) sadržavali su DON, ali su razine bile ispod MDK propisanog u EU. ZON je pronađena u 2 uzorka pšenice, 3 kukuruza, 11 neoljuštenih riža i 2 pšenična brašna sa srednjom vrijednosti od 1,34, 28,0, 42,9 i 2,66 µg/kg (istim redom). Među uzorcima kontaminiranim ZON-om, samo je jedna neoljuštena riža sadržavala razinu iznad MDK (92).

Premda su toksotvorne plijesni široko rasprostranjene na globalnoj razini, nemoguće ih je potpuno iskorijeniti. No, kako bi se prisutnost mikotoksina u namirnicama svela na najmanju moguću razinu, potrebno je zajedničko djelovanje svih uključenih sudionika od proizvodnje do prodaje hrane na tržištu. U skladu s primjenom svih nacionalnih i međunarodnih zakona i propisa o hrani, potrebno je kontinuirano provoditi kontrolu razina mikotoksina, kako od strane subjekta u poslovanju s hranom, tako i od strane nadležnih tijela. Za poboljšanje sustavnog praćenja kontaminacije hrane mikotoksinima, potrebno je kontinuirano usavršavati metode detekcije i kvantifikacije za postizanje što bržih, preciznijih i točnijih rezultata. Daljnja saznanja o uvjetima nastanka mikotoksina te njihovoj zastupljenosti u sirovinama i gotovim proizvodima, doprinijet će razvoju sve učinkovitijih metoda analiza te njihovog pravovremenog suzbijanja u svrhu očuvanja zdravlja ljudi i životinja.

## **6. ZAKLJUČAK**

Prema rezultatima provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- najveća prisutnost aflatoksina B1 i ukupnih aflatoksina zabilježena je u uzorcima kikirikija
- uzorci koji su sadržavali koncentraciju AFB1 iznad granice MDK čine 8.6% od ukupnih analiziranih uzoraka, te isti udio čine i ukupni aflatoksini
- deoksinivalenol pronađen je u 17% uzoraka pekarskih proizvoda
- zearalenon i okratoksin A nisu utvrđeni niti u jednom uzorku u koncentraciji iznad granice kvantifikacije

## 7. LITERATURA

1. Nazhand A, Durazzo A, Lucarini M, Souto E. B, Santini A. Characteristics, occurrence, detection and detoxification of aflatoxins in foods and feeds. *Foods*, (2020), 9(5), 644. [Citirano 2.5.2022.] Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/5/644/pdf?version=1589769512>
2. Jašić M. Toksične tvari u hrani. Enciklopedija; Tehnologija hrane (2009.). [Citirano 23.6.2022.] Dostupno na: <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/toksične-tvari-hrani>
3. Moretti A, Susca A. Mycotoxigenic fungi. Springer New York, (2017.) [Citirano 2.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0>.
4. Emmott, A. Market-led aflatoxin interventions: Smallholder groundnut value chains in Malawi. *Int. Food Policy Res. Inst.* 2013, 20. [Citirano 2.5.2022.] Dostupno na: [http://cdm15738.contentdm.oclc.org/utis/getfile/collection/p15738coll2/id/127878/file\\_name/128089.pdf](http://cdm15738.contentdm.oclc.org/utis/getfile/collection/p15738coll2/id/127878/file_name/128089.pdf)
5. Kovač M, Šubarić D, Bulaić M, Kovač T, Šarkanj B. Yesterday masked, today modified; what do mycotoxins bring next?. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, (2018), 69(3), 196-214. [Citirano 2.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3108>
6. Ainsworth GC, Sussman AS, editors. *The fungal population: an advanced treatise*. Elsevier; (2013.) [Citirano 3.5.2022.] Dostupno na: [https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=cDfLBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=the+fungi+an+advanced+treatise&ots=orZ1s5Yf2\\_&sig=U2Vn5F04J-3\\_sBLPiDxSKpxcukQ](https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=cDfLBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=the+fungi+an+advanced+treatise&ots=orZ1s5Yf2_&sig=U2Vn5F04J-3_sBLPiDxSKpxcukQ)
7. Burge H.A, Otten J. A. *Fungi*. ASTM Special Technical Publication 1071 (1990): 136-162. Dostupno na: <http://insulationinstitute.org/wp-content/uploads/2016/01/RP032.pdf>
8. Duraković S, Duraković L. *Mikologija u biotehnologiji*. Zagreb: Kugler, (2003.)
9. Bullerman L. B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *Journal of Food Protection*, (1979.) Val 42, No. 1, Pages 65-86 [Citirano: 3.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-42.1.65>
10. Goldblatt L. A. Implications of Mycotoxins. *Clinical Toxicology*, 5(4),(1972.), 453–464. [Citirano 3.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3109/15563657208991026>

11. Pleadin J. i sur. Toksični učinci mikotoksina: Mehanizam djelovanja i mikotoksikoze. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 2020, 15.1-2: 3-10. [Citirano: 3.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.31895/hcptbn.15.1-2.9>
12. Magan N, Sanchis V, Aldred, D. Role of spoilage fungi in seed deterioration. (2003.) Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications, 311-323. [Citirano: 8.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1201/9780203913369.ch28>
13. Pleadin J, Vasilj V, Petrović D. Mikotoksini: pojavnost, prevencija i redukcija (2018), Mostar: Sveučilište u Mostaru.
14. Pleadin J, Zadavec M, Lešić T, Frece J, Vasilj V, Markov K. Klimatske promjene- Potencijalna prijetnja još znatnijoj pojavnosti mikotoksina. Veterinarska stanica, 51(6), (2020), 659-671. [Citirano: 10.5.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/354231>
15. Sweeney M. J, Dobson A. D. W. Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species. Int. J. Food Microbiol. 43, (1998), 141-158 [Citirano: 11.5.2022.] Dostupno na: [https://www.academia.edu/download/50853495/s0168-1605\\_2898\\_2900112-320161212-28331-z70yev.pdf](https://www.academia.edu/download/50853495/s0168-1605_2898_2900112-320161212-28331-z70yev.pdf)
16. Pleadin, J., A. Vulić, N. Perši, M. Škrivanko, B. Capek And Ž. Cvetnić: Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. Food Control 47, (2015.) 221–225. [Citirano: 15.5.2022.] Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514003934>
17. Pleadin J, Vulić A, Perši N, Škrivanko M, Capek B, Cvetnić Ž. Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. Food Control, (2014), 40, 286-291 [Citirano: 20.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.022>
18. Paterson R. R. M, Lima N. Further mycotoxin effects from climate change. Food Res. Int. 44, (2011), 2555-2566. [Citirano: 20.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.038>
19. Pleadin J. Mikotoksini u hrani – izloženost potrošača i javnozdravstveni značaj, izlaganje sa simpozija Sigurnost hrane i zaštita potrošača (2020.) [Citirano: 23.5.2022.] Dostupno na: <https://veterina.com.hr/?p=84279>

20. Bennett J.W, Klich M. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. (2003.) 16, 497–516. [Citirano: 23.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1128/cmr.16.3.497-516.2003>
21. Woloshuk C.P, Shim W.B. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: A convergence of knowledge. FEMS Microbiology Reviews, (2013), 37 (1) 94-109. [Citirano: 23.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12009>
22. Ožegović L., Pepeljnjak S.: Mikotoksikoze, školska knjiga, Zagreb, (1995.)
23. Hussein H. S, Brasel J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, (2001). 167(2), 101-134 [Citirano: 25.5.2022.] Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)
24. Alshannaq A, Jae-Hyuk Y : Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. International journal of environmental research and public health 14.6 (2017.): 632. [Citirano: 25.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
25. Pleadin J, Frece J, Markov K. Aflatoksini-Onečišćenje, učinci i metode redukcije; Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam (2014) 9(3-4): 75-82. [Citirano: 29.5.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/200993>
26. Varga I, Solomun Kolanović B , Varenina I, Božić Luburić Đ, Bilandžić N. Kontaminacija mliječnih proizvoda aflatoksinom M1. Veterinarska stanica 51.5 (2020): 547-556 [Citirano: 29.5.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/347049>
27. Ostry V, Malir F, Toman J, Grosse Y. Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification. Mycotoxin Res. (2017.), 33, 65–73. [Citirano: 25.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>
28. Koszegi T, Poór M. Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. Toxins, (2016), 8(4), 111. [Citirano: 8.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/toxins8040111>
29. Petzinger E, Ziegler K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, (2000), 23(2), 91-98. [Citirano: 8.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2000.00244.x>
30. Kecerin R, Petrović M, Prskalo I, Jagić V, Lasić, D. Kontrola okratoksina A u sušenom voću. Journal of Applied Health Sciences, 4(2), (2018), 233-247. [Citirano: 8.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.24141/1/4/2/9>



31. Heussner A. H, Bingle L. E. Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins*. (2015), 7(10), 4253-4282. [Citirano: 8.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/toxins7104253>
32. Peraica, M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. Toxic effects of mycotoxins in humans; *Bulletin of the World Health Organization*, (1999) 77(9), 754. [Citirano: 8.6.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2557730/pdf/10534900.pdf>
33. Peraica M, Flajs D, Domijan AM, Ivić D, Cvjetković B. Ochratoxin A Contamination of Food from Croatia. *Toxins* (2010), 2, 2098-2105. [Citirano: 25.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/toxins2082098>
34. Smith G. W. Fumonisin, *Veterinary toxicology*. Academic Press, (2018.) 1003-1018. [Citirano: 9.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00071-4>
35. Sokolović M, Šimpraga B, Berendika M. Pregled pojavnosti mikotoksina u EU. Hrvatski veterinarski institut, Peradarski dani 2015, Zagreb (2015.) [Citirano: 9.6.2022.] Dostupno na: <https://veterina.com.hr/?p=44343>
36. Marasas W.F.O., Fumonisin: history, world-wide occurrence and impact. In: Jackson, L.S., DeVries, J.W., Bullerman, L.B. (Eds.), *Fumonisin in Food*. Plenum Press, (1996.) New York, pp. 1–17. Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1379-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1379-1_1)
37. Richard J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview; *International journal of food microbiology* (2007), 119.1-2: 3-10. [Citirano: 9.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>
38. Yazar S, Omurtag G.Z. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *Int. J. Mol. Sci.* (2008), 9, 2062–2090. Dostupno na: <https://www.mdpi.com/6714>
39. Wright, S. A. Patulin in food. *Current opinion in food science*, (2015), 5, 105-109. [Citirano: 10.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.10.003Get>
40. Saleh I, Goktepe I. The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin. *Food and chemical toxicology*, (2019), 129, 301-311. [Citirano: 10.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.036>
41. WHO, 2005. *Children's health and the environment*.
42. EU, 2002. *Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU member state*. [Citirano: 10.6.2022.] Dostupno na: [https://ec.europa.eu/food/system/files/2016-10/cs\\_contaminants\\_catalogue\\_patulin\\_3.2.8\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/system/files/2016-10/cs_contaminants_catalogue_patulin_3.2.8_en.pdf)

43. FDA, 2005. CPG Sec.510.150 apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products - adulteration with patulin. [Citirano: 16.6.2022.] Dostupno na: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cpg-sec-510150-apple-juice-apple-juice-concentrates-and-apple-juice-products-adulteration-patulin>
44. IARC, 2018. Agents Classified by the International Agency of Research on Cancer Monographs. Dostupno na: [https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/List\\_of\\_Classifications.pdf](https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/List_of_Classifications.pdf).
45. Perši N, Pleadin J, Vulić A, Zadavec M, Mitak M. Mikotoksini u žitaricama i hrani životinjskog podrijetla. Veterinarska stanica br.4/2011 (2011.) [Citirano: 11.6.2022.] Dostupno na: <https://veterina.com.hr/?p=18652>
46. Gromadzka K, Waskiewicz A, Chelkowski J, Golinski P. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. World Mycotoxin Journal, (2008), 1(2), 209–220. [Citirano: 11.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.x015>
47. Caglayan M. O, Şahin S, Üstündağ Z. Detection Strategies of Zearalenone for Food Safety: A Review. Critical Reviews in Analytical Chemistry, (2020.) 1–20. [Citirano: 11.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1797468>
48. World Health Organization (WHO). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series, (2001.) No. 47; FAO Food and Nutrition Paper 74. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42467>
49. Kabak B, The fate of mycotoxins during thermal food processing. J Sci Food Agric. (2009.) 89: 549 – 554 [Citirano: 12.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3491>
50. Sirot V, Fremy JM, Leblanc JC, Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. Food Chem Toxicol. (2013.), 52, 1-11. [Citirano: 12.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.036>
51. Schothorst R C, Jekel A A, Van Egmond H P, de Mul A, Boon P E and Van Klaveren J D, Determination of trichothecenes in duplicate diets of young children by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. Food Additives and Contaminants (2005.), 22:1, 48 – 55. [Citirano: 12.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/02652030400019414>

52. Pestka J, Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 84 (2010.), 663 – 679. [Citirano: 13.6.2022.] Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-010-0579-8>
53. International Agency for Research on Cancer (IARC). WHO IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occuring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone X. IARC, Lyon, France, (1993.) 56: 397 – 444. [Citirano: 12.6.2022.] Dostupno na: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=WHOLIS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=9283212568&indexSearch=ID>
54. EFSA, European Food Safety Authority, Panel on Contaminants in the Food Chain : Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed, (2017), *EFSA Journal*. [Citirano: 12.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>
55. Zöllner P, Mayer-Helm B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A*. (2006) 15;1136(2):123-69. [Citirano: 12.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.055>
56. Berthiller F, Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International journal of food microbiology*, (2007), 119(1-2), 33-37. [Citirano:12.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.022>
57. Turner N.W, Bramhmbhatt H, Szabo-Vezse M, Poma A, Coker R, Piletsky S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Anal. Chim. Acta* (2015), 901, 12–33. [Citirano: 12.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010>
58. Richard J.L, Bennett G.A, Ross P.F, Nelson P.E. Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food. *J. Anim. Sci.* (1993), 71, 2563–2574. [Citirano: 15.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.2527/1993.7192563x>

59. Whitaker T.B. Sampling foods for mycotoxins. *Food Addit. Contam.* (2006), 23, 50–61. [Citirano: 15.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/02652030500241587>
60. Ridgway K, Scientific R. Sample preparation for food contaminant analysis. *LC GC Eur.* (2012.), 25, 1–8. [Citirano: 15.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00115-0>
61. Shephard G. S. Current status of mycotoxin analysis: a critical review. *Journal of AOAC International*, (2016.), 99(4), 842-848. [Citirano: 25.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0111>
62. Whitaker T.B, Johansson A.S. Sampling uncertainties for the detection of chemical agents in complex food matrices. *J. Food Prot.* (2005), 68, 1306–1313. [Citirano: 15.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.6.1306>
63. Shephard G.S. Determination of mycotoxins in human foods. *Chem. Soc. Rev.* (2008), 37, 2468–2477. [Citirano: 15.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1039/b713084h>
64. Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, MacDonald S, Crews C. Mycotoxin analysis: An update. *Food Addit. Contam. Part A* (2008), 25, 152–163. [Citirano: 15.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/02652030701765723>
65. Krska R. Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of Fusarium mycotoxins in cereals. *J. Chromatogr. A* (1998), 815, 49–57. [Citirano: 18.6.2022.] Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00003-X)
66. Pereira, V.L, Fernandes J.O, Cunha S.C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends Food Sci. Technol.* (2014), 36, 96–136. [Citirano: 18.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.005>
67. Turner N.W, Subrahmanyam S, Piletsky S. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta* (2009), 632, 168–180. [Citirano: 18.6.2022.] <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010>
68. Maragos C.M, Busman M. Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: A review. *Food Addit. Contam. Part A* (2010), 27, 688–700. [Citirano: 18.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/19440040903515934>
69. Spanjer M.C, Rensen P.M, Scholten J.M. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes,

- raisins and figs. *Food Addit. Contam. Part A* (2008), 25, 472–489. [Citirano: 20.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/02652030701552964>
70. Hu, X.; Hu, R.; Zhang, Z.; Li, P.; Zhang, Q.; Wang, M. Development of a multiple immunoaffinity column for simultaneous determination of multiple mycotoxins in feeds using UPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016, 408, 6027–6036. [Citirano: 20.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9626-5>
71. Pascale M. N. Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR), Via G. Amendola 122/O, (2009.) Italy [Citirano: 23.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.2298/ZMSPN0917015P>
72. Yao H, Hruska Z, Mavungu D. Developments in detection and determination of aflatoxins. *World Mycotoxin J.* (2015), 8, 181–191. [Citirano: 22.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1797>
73. Uredba komisije (EC) br. 1881/2006 s izmjenama i dopunama [Citirano: 25.6.2022.] Dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02006R1881-20220503>
74. Zakon o kontaminantima, Urednički pročišćeni tekst, „Narodne novine”, broj 39/13 i 114/18 [Citirano: 18.6.2022.] <https://www.zakon.hr/z/575/Zakon-o-kontaminantima>
75. Palfi M, Knežević N, Vrandečić K. i Ćosić J. Mikotoksini u hrani – zakonodavni okvir. *Glasilo biljne zaštite*, 20 (2020), (4), 472-483. [Citirano: 18.6.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/240792>
76. Pleadin J, Zadravec M, Frece J, Rezić, T, Kmetič I, Markov K. Biološka detoksifikacija mikotoksina: dosadašnje spoznaje i budući aspekti. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* (2019), 14(1-2), 39-46. [Citirano: 31.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.31895/hcptbn.14.1-2.3>
77. Cvjetković B. Upravljanje rizikom od mikotoksina počinje u polju. *Glasilo biljne zaštite*, (2014). 14(4), 317-328. [Citirano: 31.5.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/249823>
78. Scott PM. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Rev Med Vet* (1998);149:543–8. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1080/19440040903571747>

79. Peraica M, Domijan A. M, Jurjević Ž, Cvjetković B. Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, (2002), 53(3), 229-237. [Citirano: 31.5.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/1014>
80. Vanhoutte I, Audenaert K, De Gelder L. Biodegradation of Mycotoxins: Tales from Known and Unexplored Worlds. *Frontiers in Microbiology*, (2016) 7 561. [Citirano: 31.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00561>
81. De Koe WJ. Regulations of the European Union for mycotoxins in foods. *Arh Hig Rada Toksikol* (1999);50: 37–46. [Citirano: 31.5.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/file/5156>
82. Phillips TD, Clement BA, Park DL. Approaches to reduction of aflatoxin in foods and feeds. In: Eaton DL, Groopman JD, editors. *The toxicology of aflatoxins*. New York (NY): Academic Press; (1994.), p. 383–406. [Citirano: 31.5.2022.] Dostupno na: [https://books.google.com/books?hl=hr&lr=&id=6SAIBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA383&dq=Phillips+TD,+Clement+BA,+Park+DL.+Approaches+to+reduction+of+aflatoxin+in+foods+and+feeds.+In:+Eaton+DL,+Groopman+JD,+editors.+The+toxicology+of+aflatoxins.+New+York+\(NY\):+Academic+Press%3B+1994,+p.+383%E2%80%93406.&ots=\\_E2Hz4S6Gm&sig=I9BMEs\\_5G4coRQIOmGa9IolcMXM](https://books.google.com/books?hl=hr&lr=&id=6SAIBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA383&dq=Phillips+TD,+Clement+BA,+Park+DL.+Approaches+to+reduction+of+aflatoxin+in+foods+and+feeds.+In:+Eaton+DL,+Groopman+JD,+editors.+The+toxicology+of+aflatoxins.+New+York+(NY):+Academic+Press%3B+1994,+p.+383%E2%80%93406.&ots=_E2Hz4S6Gm&sig=I9BMEs_5G4coRQIOmGa9IolcMXM)
83. Magan N, Olsen M. *Mycotoxins in food: detection and control*. Woodhead Publishing, (2004). [Citirano: 31.5.2022.] Dostupno na: [https://www.researchgate.net/profile/Naresh-Magan/publication/235334797\\_Mycotoxins\\_in\\_Food\\_Detection\\_and\\_Control/links/02e7e5326d7082f043000000/Mycotoxins-in-Food-Detection-and-Control.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Naresh-Magan/publication/235334797_Mycotoxins_in_Food_Detection_and_Control/links/02e7e5326d7082f043000000/Mycotoxins-in-Food-Detection-and-Control.pdf)
84. Boudra H, Le Bars P and Le Bars J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(3). (1995), 1156–8. [Citirano: 31.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1128/aem.61.3.1156-1158.1995>
85. Samarajeewa U, Sen AC, Cohen MD, Wei CI. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *J Food Prot* (1990);53: 489–501. [Citirano: 31.5.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-53.6.489>
86. Basappa SC, Shantha T. Methods for detoxification of aflatoxins in foods and feeds – a critical appraisal. *J Food Sci Technol* (1996) ;33:95–107. [Citirano: 1.6.2022.] Dostupno na: <https://www.sciencebase.gov/catalog/item/505355cee4b097cd4fcd2ce8>

87. Park DL, Lopez–Garcia R, Trujillo–Preciado S, Price R. Reduction of risk associated with fumonisin contamination in corn. In: Jackson LS, de Vries JW, Bullerman LB, editors. Fumonisin in food. New York (NY): Plenum Press; (1996.) p. 335–44. [Citirano: 18.5.2022.] Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1379-1\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1379-1_29)
88. Styriak I, Concova E. Microbial binding and biodegradation of mycotoxins. Veterinary and human toxicology, 44, (2002). 358-361 . [Citirano: 20.6.2022.] Dostupno na: <https://europepmc.org/article/med/12458642>
89. Piotrowska M., Masek A. Saccharomyces cerevisiae Cell Wall Components as Tools for Ochratoxin A Decontamination. Toxins, 7, (2015) 1151-1162 . [Citirano: 20.6. 2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/toxins7041151>
90. Gallo P. i sur, Contamination by Aflatoxins B/G in Food and Commodities Imported in Southern Italy from 2017 to 2020: A Risk-Based Evaluation. Toxins (2021.), 13, 368. [Citirano: 25.6.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/toxins13060368>
91. Ediage E. N, Di Mavungu J. D, Monbaliu S, Peteghem C, Saeger S. A Validated Multianalyte LC–MS/MS Method for Quantification of 25 Mycotoxins in Cassava Flour, Peanut Cake and Maize Samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2011), 59(10), 5173–5180. [Citirano: 25.6.2022.] Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf2009364>
92. Golge O, Kabak B. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals and cereal products from Turkey. Food Control, (2020), 110, 106982. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106982>

## 8. POPIS SLIKA

**SLIKA 1.** Najvažnije vrste plijesni koje proizvode mikotoksine: a) *Aspergillus flavus*; b) *Fusarium verticillioides* c) *Penicillium expansum* i d) *Alternaria alternata*

**SLIKA 2.** Kemijske strukture aflatoksina

**SLIKA 3.** Kemijske strukture okratoksina



## 9. POPIS TABLICA

**TABLICA 1.** Granične vrijednosti reguliranih mikotoksina za pojedine kategorije hrane

**TABLICA 2.** Koncentracije AFB1 u uzorcima orašastog voća u razdoblju od 2016. do 2021. godine.

**TABLICA 3.** Srednje vrijednosti koncentracija AFB1 u uzorcima kikirikija u razdoblju od 2017. do 2021. godine ( $\bar{X} \pm SD$ )

**TABLICA 4.** Koncentracije ukupnih AF u uzorcima orašastog voća u razdoblju od 2016. do 2021. godine.

**TABLICA 5.** Srednje vrijednosti koncentracija ukupnih AF u razdoblju od 2016. do 2020. godine ( $\bar{X} \pm SD$ )

**TABLICA 6.** Koncentracija DON-a u uzorcima pekarskih proizvoda sa područja Primorsko-goranske županije od 2018. do 2020. godine

**TABLICA 7.** Srednje vrijednosti koncentracija DON-a u uzorcima pekarskih proizvoda u razdoblju 2018.-2019. ( $\bar{X} \pm SD$ )

## 10. POPIS KRATICA

CDC Centers for Disease Control and Prevention (Centri za kontrolu i prevenciju bolesti)

FAO Food Agriculture Organization (Organizacija za prehranu i poljoprivredu)

AF Aflatoksin

ZON Zearalenon

DON Deoksinivalenol

AFB1 Aflatoksin B1

AFB2 Aflatoksin B2

AFG1 Aflatoksin G1

AFG2 Aflatoksin G2

AFM1 Aflatoksin M1

AFM2 Aflatoksin M2

IARC International Agency for Research on Cancer (Međunarodna agencija za istraživanje raka)

HCC Hepatocellular carcinoma (Hepatocelularni karcinom)

LD<sub>50</sub> letalna doza, 50%

FDA U.S. Food and Drug Administration (Američka agencija za hranu i lijekove)

OTA Okratoksin A

BEN Balkanska endemska nefropatija

FB1 Fumonizin B1

FB2 Fumonizin B2

FB3 Fumonizin B3

FA1 Fumonizin A1

FA2 Fumonizin A2

PMTDI Privremeni maksimalni prihvatljivi dnevni unos

WHO World Health Organization (Svjetska zdravstvena organizacija)

NOEL No Observed Effect Level ( najviša doza koja ne izaziva učinak)

EFSA European Food Safety Authority ( Europska agencija za sigurnost hrane)

SFE Supercritical fluid extraction (ekstrakcija superkritičnim fluidom)

ASE Accelerated Solvent Extraction (ubrzana ekstrakcija otapalima)

MAE Microwave-assisted extraction (ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima)

SPE Solid-phase extraction (ekstrakcija na čvrstoj fazi)

IAC immunoaffinity chromatography (imunoafinitetne kolone)

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzimski povezani imunosorbentni test)

LC-MS/MS Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (tekućinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa)

HPLC High Performance Liquid Chromatography (Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti)

LC-MS Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (tekućinska kromatografija i masena spektrometrija)

TLC Thin-layer chromatography (tankoslojna kromatografija)

GC Gas Chromatography (plinska kromatografija)

ICA Immunochromatography Assay (imunoafinitetni test na koloni)

UV Ultraljubičasto zračenje

MS Masena spektrometrija

HPLC-UV High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection (Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s ultraljubičastom detekcijom)

HPLC-FD High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescent Detection (Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s fluorescentnom detekcijom)

TDI Tolerable Daily Intake (Prihvatljivi dnevni unos)

MDK Maksimalna dopuštena koncentracija

RASFF The Rapid Alert System for Food and Feed (Sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje)

NKT Nacionalna kontakt-točka

VIS Visible spectrophotometry (vidljivi dio spektra)

BMK Bakterije mliječne kiseline

ROSA Rapid One Step Assay

OD Optical Density

HPLC-PDA High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array (Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s nizom fotodioda)

## 11. ŽIVOTOPIS

Doroteja Prica rođena je 25.1.1999. godine u Osijeku. Osnovnu školu završava 2013. godine u mjestu Dalj. Iste godine upisuje prirodoslovnu gimnaziju u sklopu Tehničke škole i prirodoslovne gimnazije Ruđera Boškovića u Osijeku. Nakon završetka srednje škole, 2017. godine upisuje studij sanitarnog inženjerstva na Zdravstvenom veleučilište u Zagrebu. Nakon stečenog zvanja bacc.sanit.ing, svoje studentsko obrazovanje nastavlja upisom diplomskog studija sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.