

# Mikotoksini aflatoksini i okratoksini – prijetnja sigurnosti tradicionalnih mesnih proizvoda

Jelka Pleadin<sup>1\*</sup>, Ana Vulić<sup>1</sup>, Irena Perković<sup>2</sup>, Nina Kudumija<sup>1</sup>, Tina Lešić<sup>1</sup>, Maja Kiš<sup>3</sup>,  
Manuela Zadravec<sup>4</sup>, Mario Mitak<sup>4</sup>

## Sažetak

Tijekom dugotrajnog zrenja površinu trajnih tradicionalnih mesnih proizvoda (TMP) uobičajeno obrastaju plijesni. Među njima, toksikotvorne vrste produciraju sekundarne metabolite mikotoksine, koji imaju izrazite štetne posljedice po zdravlje ljudi i životinja. Aflatoksini i okratoksini imaju dokazane karcinogene i mutagene učinke u organizmu, a njihova pojavnost u TMP najčešće je posljedica prekomjernog rasta površinske plijesni. Osim ovim izravnim putem, mikotoksini u TMP mogu biti prisutni i neizravno, putem kontaminirane stočne hrane, čija uporaba na farmskim životinjama rezultira prijenosom (*carry-over* efektom) u finalne mesne proizvode. Zbog učestalosti kontaminacije važan je razvoj potvrdnih analitičkih metoda za detekciju mikotoksina te primjena metoda za identifikaciju površinskih plijesni. Kako bi se spriječila kontaminacija TMP i mogući štetni učinci po zdravlje potrošača, potrebno je poduzeti sve preventivne radnje i provoditi sustavnu kontrolu ovih kontaminanata. Ovaj rad daje pregled svojstava aflatoksina i okratoksina kao mikotoksina od najvećeg značaja za pojavnost u mesnim proizvodima, plijesni koje ih produciraju te metoda detekcije, prevencije i redukcije kontaminacije TMP.

**Ključne riječi:** tradicionalni mesni proizvodi, mikotoksini, plijesni, toksičnost, prevencija, redukcija

## Uvod

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji mogu izazvati akutne i kronične toksične učinke u ljudi i životinja. Predstavljaju kemijske spojeve koji se međusobno razlikuju po vrsti plijesni koja ih proizvodi, kemijskoj strukturi, mehanizmu djelovanja i toksičnosti. Posebno je zabrinjavajuće što se različite vrste mikotoksina pronalazi u velikom broju

različitih prehrambenih proizvoda namijenjenih ljudskoj konzumaciji, a pritom njihov glavni izvor predstavljaju žitarice i proizvodi na bazi žitarica te proizvodi životinjskog podrijetla (CAST, 2003.). Mikotoksini su stabilni i u pravilu otporni na povišenu temperaturu, a njihova biosinteza ovisi o vrsti toksikotvorne plijesni, klimatskim i okolišnim uvjetima te fizikalno-kemijskim čimbenicima,

<sup>1</sup> Izv. prof. dr. sc. Jelka Pleadin, znanstveni savjetnik; dr. sc. Ana Vulić, znanstveni suradnik; dr. sc. Nina Kudumija, poslijedoktorand; Tina Lešić, mag. ing. biotehnologije, stručni suradnik, Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za analitičku kemiju, Savska cesta 143, Zagreb;

<sup>2</sup> Irena Perković, dipl. ing. preh. tehnol., asistent, Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Vinkovci, Laboratorij za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje, J. Kozarca 24, Vinkovci;

<sup>3</sup> Maja Kiš, mag. ing. bioproc. i mag. ing. agr., stručni suradnik, Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Križevci, Laboratorij za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje, Ul. Ivana Zakmardija Dijankovečkog 10, Križevci;

<sup>4</sup> dr. sc. Manuela Zadravec, znanstveni suradnik; dr. sc. Mario Mitak, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju; Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za mikrobiologiju hrane za životinje, Savska cesta 143, Zagreb

\*Autor za korespondenciju: [pleadin@veinst.hr](mailto:pleadin@veinst.hr)

uključujući temperaturu ( $T = -5 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), sadržaj vode u namirnici ( $w \geq 13\%$ ), aktivitet vode ( $a_w > 0,65$ ), kiselost ( $\text{pH} = 3 - 9$ ) te koncentraciju plinova u atmosferi i sastav namirnice (Pleadin i sur., 2018.a).

Toksični učinci mikotoksina na zdravlje ljudi i životinja nazivaju se mikotoksikoze, a njihovo djelovanje ovisi o toksičnosti mikotoksina, opsegu izloženosti, dobi i fizičkom stanju organizma te mogućim sinergističkim učincima više različitih mikotoksina ili s drugim toksinima u organizmu (Richard, 2007.). Mikotoksikoze su najčešće uzrokovane konzumiranjem hrane kontaminirane mikotoksinima, a u manjoj mjeri mogu se javiti i nakon udisanja ili njihova unosa preko kože u organizam (IARC, 1993.). Primarno se pojavljuju u zemljama lošeg socijalno-ekonomskog stanja i poljoprivredno-veterinarskog standarda i to u svim fazama proizvodnje hrane i hrane za životinje. Bolesti koje mikotoksini mogu izazvati kod ljudi mogu biti posljedica njihovog hepatotoksičnog, nefrotoksičnog, karcinogenog, dermonekrotičnog, neurotoksičnog i imunosupresijskog djelovanja, a neki djeluju i teratogeno i genotoksično (Hussein i Brasel, 2001.).

Literaturni podaci pokazuju da unosu mikotoksina u organizam potrošača, osim hrane biljnog podrijetla, pridonose i proizvodi životinjskog podrijetla, primarno meso i mesni proizvodi. Kontaminacija ovih proizvoda može biti posljedica neizravnog prijenosa mikotoksina od domaćih životinja koje se koriste za proizvodnju hrane životinjskog podrijetla, izloženih kontaminiranim krmivima i krmnim smjesama (*carry-over* efekt), ali i mješavinama začina koje se koriste u njihovoj proizvodnji te izravnog, kao posljedica produkcije plijesni koje pod određenim uvjetima mikotoksine produciraju na površini trajnih suhomesnatih proizvoda i fermentiranih kobasica (Comi i sur., 2004.; Bertuzzi i sur., 2013.; Pleadin i sur., 2013.; Perši i sur., 2014.). Među mikotoksinima, aflatoksin  $B_1$  ( $\text{AFB}_1$ ) i okratoksin A (OTA) općenito imaju najveći javnozdravstveni značaj.  $\text{AFB}_1$  je najpotentniji karcinogen jetre u sisavaca te je klasificiran od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC) u grupu 1, dokazanih ljudskih karcinogena (IARC, 2002.), dok OTA pripada skupini 2B, mogućih ljudskih karcinogena (IARC, 1993.).

Standardizacija kvalitete i sigurnost tradicionalnih mesnih proizvoda (TMP) zahti-

jevaju daljnja istraživanja potencijalnih izvora kontaminacije, naročito zato što je konzumacija ove vrste proizvoda svakim danom sve značajnija, budući općenito predstavljaju nutritivno bogate proizvode. Tijekom procesa zrenja, površinu trajnih TMP obrastaju plijesni čije su spore najčešće podrijetlom iz okoliša u kojem su smještene komore za zrenje, a intenzitetu obrastanja proizvoda površinskim plijesnima doprinosi dugotrajnost procesa zrenja te često nekontrolirani uvjeti proizvodnje na poljoprivrednim gospodarstvima. Ovaj rad daje pregled svojstava i pojavnosti aflatoksina i okratoksina kao mikotoksina od najvećeg značaja za kontaminaciju mesnih proizvoda, plijesni kao njihovih producenata te metoda detekcije, prevencije i redukcije njihove kontaminacije.

## Svojstva, sinteza i metabolizam

### Aflatoksini

Aflatoksini mogu kontaminirati različite vrste hrane i hrane za životinje, uzrokujući ozbiljan ekonomski i zdravstveni problem diljem svijeta. Predstavnici ove skupine su aflatoksin  $B_1$  ( $\text{AFB}_1$ ), aflatoksin B2 ( $\text{AFB}_2$ ), aflatoksin  $G_1$  ( $\text{AFG}_1$ ) i aflatoksin  $G_2$  ( $\text{AFG}_2$ ), među kojima je najzasupljeniji i najtoksičniji  $\text{AFB}_1$ . Osim navedenih, značajni su i aflatoksin  $M_1$  ( $\text{AFM}_1$ ) i aflatoksin  $M_2$  ( $\text{AFM}_2$ ), ali je njihova pojavnost u hrani vezana isključivo za mlijeko i mliječne proizvode. Aflatoksini su slabo topljivi u vodi, polarnim organskim otapalima, poput metanola i kloroforma te u dimetil sulfoksidu, a netopljivi su u nepolarnim otapalima. Nestabilni su pri pH vrijednostima manjim od 3 i većim od 10. Pojavnost aflatoksina uglavnom se povezuje sa suptropskim i tropskim regijama, a brzina i stupanj onečišćenja ovise o različitim čimbenicima, kao što su temperatura, vlaga, aktivitet vode, fizičko oštećenje supstrata i ostali uvjeti skladištenja (EFSA, 2007.). Produciraju ih pretežno plijesni iz roda *Aspergillus* (tablica 1) (Varga i sur., 2015.).

U tijelu se  $\text{AFB}_1$  biotransformira pomoću CYP (citokrom) enzima do različitih metabolita od kojih je  $\text{AFB}_1$ -egzo-8,9-epoksid (AFBO) osobito aktivan te se veže na biomolekule u tijelu (DNA, RNA). Biotransformacija aflatoksina uglavnom se odvija u jetri, no moguća je i u bubrezima te

**Tablica 1.** *Aspergillus* vrste koje u optimalnim uvjetima produciraju aflatoksine (Varga i sur., 2015.)**Table 1** *Aspergillus* species that produce aflatoxins in optimal conditions (Varga et al., 2015)

ROD/GENUS	SEKCIJA/SECTION	VRSTA/SPECIES	VRSTA AFLATOKSINA/ TYPE OF AFLATOXIN
<b><i>Aspergillus</i></b>	Flavi	<i>Aspergillus arachidicola</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus bombycis</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus flavus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus nomius</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus novoparasiticus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus parasiticus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus pseudocaelatus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus pseudonomius</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	AFB <sub>1</sub>
		<i>Aspergillus togoensis</i>	AFB <sub>1</sub>
		<i>Aspergillus transmontanensis</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus mottae</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
	<i>Aspergillus sergii</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>	
	Ochraceorosei	<i>Aspergillus ochraceoroseus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus rambellii</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub>
	Nidulantes	<i>Aspergillus astellatus</i> (= <i>Emericella astellata</i> )	AFB <sub>1</sub>
		<i>Aspergillus olivicola</i> (= <i>Emericella olivicola</i> )	AFB <sub>1</sub>
		<i>Aspergillus venezuelensis</i> (= <i>Emericella venezuelensis</i> )	AFB <sub>1</sub>

AFB<sub>1</sub> – aflatoksin B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub> – aflatoksin B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub> – aflatoksin G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub> – aflatoksin G<sub>2</sub>  
 AFB<sub>1</sub> – aflatoxin B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub> – aflatoxin B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub> – aflatoxin G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub> – aflatoxin G<sub>2</sub>

enterocitima koji imaju velike količine CYP3A enzima te metabolizmom smanjuju apsorpciju u tankom crijevu (Wild i Turner, 2002). Biotransformacija omogućuje produktu iz faze I da se uklopi u enzimski sustav faze II, gdje se konjugira s drugom tvari što rezultira nastankom polarne ili u vodi topljive tvari koja se može lako izlučiti iz organizma putem bubrega (Bbosa i sur., 2013). Najvažniji CYP enzimi koji sudjeluju u metabolizmu aflatoksina su: CYP3A4 – pomoću kojeg nastaje AFBO, AFP1 (aflatoksin P1) i AFQ1 (aflatoksin Q1) dok CYP1A2 može dovesti do stvaranja nekih egzoepoksida, ali i visokog udjela endoepoksida i AFM1. CYP3A5 može stvoriti egzoepoksid i nešto manje AFQ1. Kod ljudi, kao i kod drugih vrsta, vezanje DNA i karcinogenost AFB1 rezultat je njegove pretvorbe u AFBO pomoću CYP3A4 (IARC, 2012). Poput ostalih kumarina i aflatoksini slijede poliketidni put biosinteze gdje se acetat prevodi u poliketid pa antrakinon, ksanton te na

kraju u molekulu aflatoksina.

Biosintetski put aflatoksina može se podijeliti u tri dijela. U prvom dijelu dolazi do stvaranja osnovnog dijela aflatoksina od acetata do deketida norsolorinske kiseline (NOR), koja je prvi stabilni metabolit. Drugi dio obuhvaća transformaciju NOR-a do versikolorina B (VERB), dok u trećem dijelu dolazi do oblikovanja i transformacije ogranaka do konačne podjele aflatoksina na AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub> (Cleveland i sur., 2009.). Na biosintezu aflatoksina utječu mnogi okolišni faktori, a posebno nutritivni sastav supstrata na kojem plijesan raste. Izvori ugljika i dušika imaju glavnu ulogu u regulaciji biosinteze. Jednostavni ugljikohidrati (glukoza, saharoza, maltoza, galaktoza) potiču biosintezu aflatoksina za razliku od složenih ugljikohidrata (škrob) ili tvari poput peptona (Yu i sur., 2003.).

## Okratoksini

Najtoksičniji predstavnik skupine okratoksina je okratoksin A (OTA) koji je izoliran iz plijesni *Aspergillus ochraceus* i identificiran 1965. godine u Južnoj Africi (Van der Merwe, 1965.). Postoji još nekoliko metabolita povezanih s OTA i to okratoksin B (OTB), okratoksin C (OTC), okratoksin  $\alpha$  (OT $\alpha$ ) i okratoksin  $\beta$  (OT $\beta$ ). Po fizikalno-kemijskim svojstvima OTA je slaba organska kiselina, bijeli prah kristalinične strukture, s temperaturom taljenja oko 90 °C. Pod UV svjetlom OTA pokazuje intenzivnu zelenu fluorescenciju u kiselom mediju te plavu fluorescenciju u alkalnim uvjetima. U kiselom i neutralnom pH području topljiv je u organskim otapalima (alkoholi, ketoni, kloroform), slabo je topljiv u vodi i nije topljiv u petroleteru. U alkalnim uvjetima topljiv je u vodenoj otopini natrijevog hidrogen-bikarbonata (El Khoury i Atoui, 2010.; Abrunhosa i sur., 2010.). OTA produciraju različite vrste plijesni

rodova *Aspergillus* i *Penicillium* (tablica 2). U hladnijim zemljopisnim regijama zastupljene su uglavnom plijesni iz rodova *Penicillium*, najčešće *Penicillium verrucosum* i *Penicillium nordicum*, dok su rodovi *Aspergillus*, najčešće *Aspergillus ochraceus*, karakteristični za toplije regije (Marin i sur., 2009.; Sonjak i sur., 2011.; Comi i lacumin, 2013.).

Zbog sličnosti s fenilalaninom OTA inhibira biosintezu makromolekula (proteini, DNA, RNA) i adenozin trifosfata (ATP), povećava lipidnu peroksidaciju te negativno utječe na metabolizam glukoze i homeostazu kalcija u biološkom sustavu (Petrik i sur. 2003.; Marin i sur., 2009.). OTA se biotransformira enzimima faze I i faze II, a u crijevima se hidrolizira u netoksičan OTa koji nastaje cijepanjem peptidne veze (Kőszegi i Poór, 2016.). Pokazalo se *in vitro* da ovu hidrolizu mogu potaknuti karboksipeptidaza A, tripsin, kimotripsin i katepsin C (Ringot i sur., 2006.). U

**Tablica 2.** Plijesni producenti okratoksina A (Moss, 2002.; Abrunhosa i sur., 2010.; El Khoury i Atoui, 2010.)  
**Table 2** Moulds producers of ochratoxin A (Moss, 2002; Abrunhosa et al., 2010; El Khoury and Atoui, 2010)

ROD/GENUS	SEKCIJA/SECTION	VRSTA/SPECIES
<i>Aspergillus</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus cretensis</i> ; <i>Aspergillus flocculosus</i> ; <i>Aspergillus ochraceus</i> ; <i>Aspergillus pseudoelegans</i> ; <i>Aspergillus roseoglobulosus</i> ; <i>Aspergillus sclerotiorum</i> ; <i>Aspergillus steynii</i> ; <i>Aspergillus sulphureus</i> ; <i>Aspergillus westerdijkiae</i> ; <i>Neopetromyces muricatus</i>
	<i>Flavi</i>	<i>Aspergillus alliaceus</i> ; <i>Petromyces albertensis</i>
	<i>Nigri</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i> ; <i>Aspergillus lacticoffeatus</i> ; <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Aspergillus sclerotioniger</i> ; <i>Aspergillus citricus</i> ; <i>Aspergillus fonsecaeus</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Viridicata</i>	<i>Penicillium nordicum</i> ; <i>Penicillium verrucosum</i>

jetri OTA metabolizira u nekoliko manjih metabolita poput 4(R)-, 4(S)-hidroksiokratoksin i 10 hidroksiokratoksin A (Marin i sur., 2009.).

Za razliku od ostalih važnih mikotoksina, nije poznato mnogo o biosintetskom putu OTA u bilo kojoj vrsti plijesni. Neki eksperimenti su pokazali da je dihidroizokumarinski dio molekule formiran iz acetata i malonata preko puta poliketidne sinteze dok fenilalaninski dio potječe od puta šikiminske kiseline (Ringot i sur., 2006.; El Khoury i Atoui, 2010.). Prvi korak u sintezi izokumarinskog poliketida sastoji se od kondenzacije jedne acetatne jedinice (acetyl-CoA) do četiri jedinice malonata. Taj korak zahtjeva aktivnost enzima poliketid-sintaze koji se smatra ključnim enzimom u biosintezi OTA. Gen

koji kodira poliketid-sintazu razlikuje se između *Penicillium* i *Aspergillus* vrsta. Naime, *Aspergillus ochraceus* ima gen za poliketid-sintazu koji se eksplicira samo u optimalnim uvjetima za sintezu OTA i samo tijekom ranog stadija sinteze mikotoksina. Jednom formiran, poliketidni se lanac modificira stvaranjem laktonskog prstena (sinteza meleina) i dodavanjem karboksilne skupine koja potječe od S-metilmetionina ili natrij formata (sinteza OT $\beta$ ). Nakon toga, atom klora ugrađuje se djelovanjem kloroperoksidaze (sinteza OT $\alpha$ ). Sintetaza katalizira povezivanje OT $\alpha$  i fenilalanina pri čemu dolazi do sinteze OTA (Ringot i sur., 2006.).

## Pojavnost mikotoksina u mesnim proizvodima

Na površini TMP-a AFB<sub>1</sub> najčešće produciraju plijesni iz roda *Aspergillus* i to *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*, a OTA različite vrste plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* (Iacumin i sur., 2009.; Duarte i sur., 2010.; Iacumin i sur., 2011.). Utvrđeno je da OTA predstavlja dominantni kontaminant mesnih proizvoda, dok se AFB<sub>1</sub> pojavljuje s manjom učestalošću i u manjim koncentracijama. Brojna istraživanja su pokazala da površinske plijesni pod određenim uvjetima proizvodnje i to temperature, pH vrijednosti, aktiviteta vode, oštećenja ovitka, prisutnosti ili nepresutnosti kože (pršuti) ili pukotina, kao i pohrane te nedostatnog pranja i četkanja površine TMP, odnosno nekontroliranog rasta plijesni, produciraju upravo ove mikotoksine (Iacumin i sur., 2009.; Asefa i sur., 2011.; Rodríguez i sur., 2012.; Rodríguez i sur., 2015.).

OTA je u najvećim koncentracijama prisutan u mesnim proizvodima dobivenih iz kontaminiranih sirovina kao posljedice prirodne kontaminacije krmnih smjesa korištenih tijekom hranidbe životinja za proizvodnju mesa (Gareis, 1996.; Gareis i Scheuer 2000.; Pleadin i sur., 2013.; Perši i sur., 2014.). Raspodjela OTA u tkivima pokazuje da se njegova koncentracija smanjuje ovim slijedom: bubreg > pluća > jetra > slezena > mišićno tkivo > masno tkivo > srce > mozak (Bailly i Guerre, 2009.; Pleadin i sur., 2013.). Najviše OTA stoga sadrže mesni proizvodi na bazi iznutrica, kao što su krvavice, jetrenjače i paštete (Petzinger i Weidenbach, 2002.; Perši i sur., 2014.). Dall'Asta i sur. (2010.) i Pleadin i sur. (2013.) navode dimljene mesne proizvode, a Pfohl-Leszkowicz i Manderville (2007.) i druge mesne proizvode u kojima su detektirane značajne razine OTA upravo kao posljedica neizravne kontaminacije.

Osim AFB<sub>1</sub> i OTA, neke vrste plijesni mogu producirati i druge mikotoksine, kao što su citrinin (CIT), ciklopiazonična kiselina (CPA) i sterigmatocistin (STC), no njihov utjecaj na kvalitetu i sigurnost mesnih proizvoda te posljedično i na ljudsko zdravlje, još uvijek nije dovoljno istražen (Bailly i Guerre, 2009.). Dok OTA najviše producira *Aspergillus ochraceus*, a CIT *Penicillium citrinum*, *Penicillium verrucosum* proizvodi oba navedena mikotoksina (Sweeney i Dobson, 1998.), a pozna-

ta je i zajednička pojavnost OTA i CIT u različitim vrstama namirnica (EFSA, 2012.; Pleadin i sur., 2018.b). STC predstavlja karcinogeni prekursor AFB<sub>1</sub> te dijeli svoj put biosinteze s aflatoksinima, a produciraju ga različite vrste plijesni iz roda *Aspergillus*, od kojih najviše *Aspergillus versicolor* (EFSA, 2013.).

Dosadašnja istraživanja o mikotoksinima u TMP iz europskih zemalja usmjerena su najviše na OTA te AFB<sub>1</sub>, dok su spoznaje o pojavnosti i izloženosti potrošača CIT, STC i CPA nedvojbeno nedostatne, iako su i ovi mikotoksini dokazano toksični (EFSA, 2012.; EFSA, 2013.). Ujedno, za ispitivanje STC i CPA u mesnim proizvodima nisu razvijene ni dovoljno osjetljive i specifične analitičke metode, a pojedini autori ističu moguću pojavnost upravo tih mikotoksina u TMP u značajnim koncentracijama (Bailly i Guerre, 2009.; Alapont i sur., 2014.). Svakako, u TMP je, osim razine kontaminacije mikotoksinima, neupitno važno identificirati i vrstu plijesni koje ih produciraju te ispitati čimbenike utjecaja, kao što su klimatski faktori, pri kojima dolazi do njihove produkcije (Miličević i sur., 2012.; Plavšić i sur., 2015.).

## Kontaminacija hrvatskih TMP

U istraživanjima pojavnosti mikotoksina u mesnim proizvodima s hrvatskog tržišta dokazana je prisutnost AFB<sub>1</sub> i OTA i to u: Slavonskoj kobasici (OTA 2,03 - 6,68 µg/kg (Markov i sur., 2013.; Vulić i sur., 2014.); AFB<sub>1</sub> < 1 - 1,2 µg/kg (Markov i sur., 2013.), Slavanskom kulenu (OTA = 0,9 - 5,17 µg/kg (Frece i sur., 2010.; Vulić i sur., 2014.; Pleadin i sur., 2017.) i AFB<sub>1</sub> = 0,1 - 4,49 µg/kg (Frece i sur., 2010.; Pleadin i sur., 2015.a). Istraživanje pojavnosti ovih mikotoksina, provedeno na većem broju različitih vrsta trajnih i polutrajnih TMP uzorkovanih tijekom razdoblja 2011. - 2014. godine, ukazalo je na pojavnost OTA u TMP u rasponu od 1,23 µg/kg u Slavonskoj kobasici do 9,95 µg/kg u Istarskom pršutu, a AFB<sub>1</sub> od 1,06 µg/kg u Istarskom pršutu do 1,69 µg/kg u kuhanoj kobasici (Pleadin i sur., 2015.a). Istim istraživanjem utvrđena je pojavnost mikotoksina uglavnom u uzorcima nepoznatog podrijetla, dok uvjeti u kojima su mikotoksini nastali nisu analizirani.

Također, pojavnost mikotoksina i u

hrvatskim TMP može biti posljedica kontaminirane stočne hrane (*carry-over effect*) ili začina koji se koriste u njihovoj proizvodnji (Pleadin i sur., 2013; Perši i sur., 2014). Nakon tretmana svinja hranom koja je sadržavala OTA tijekom tova, utvrđen je značajan prijenos ovog mikotoksina iz hrane za životinje u sirovine uzorkovane od izloženih životinja, primarno u iznutrice, ali i meso (prve i druge kategorije) te posljedično i u finalne mesne proizvode, kao što je kulen, domaća kobasica, panceta i ostale vrste trajnih kobasica i suhomesnatih proizvoda koji se proizvode na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima u Hrvatskoj. Nakon tretmana svinja dozom od 300 µg OTA/kg stočne hrane tijekom 30 dana, najveća prosječna koncentracija OTA određena je u krvavicama (14,02±2,75 µg/kg), zatim u jetrenjačama (13,77±3,92 µg/kg) te najniža u pašteti (9,33±2,66 µg/kg). Rezultati su pokazali da subkronična izloženost svinja dovodi do akumulacije OTA u sirovinama i posljedično u mesnim proizvodima, čija razina onečišćenja izravno ovisi o sadržaju OTA u sirovinama koje se koriste za njihovu proizvodnju (Perši i sur., 2014.).

Iako se kontaminacija TMP s AFB<sub>1</sub> u našim dosadašnjim istraživanjima pokazala zanemarivom, treba imati na umu da je nedugo u Hrvatskoj određena izrazito visoka kontaminacija kukuruza i krmnih smjesa upravo ovim mikotoksinom (Pleadin i sur., 2014.b.), što je moglo pridonijeti i značajnoj kontaminaciji mesnih proizvoda. Međutim, daljnja istraživanja koja bi se odnosila na prijenos AFB<sub>1</sub> u lancu proizvodnje od hrane za životinje do hrvatskih TMP putem *carry-over* efekta nisu provedena.

U istraživanjima provedenim na hrvatskim TMP zaključeno je da je kontaminacija s AFB<sub>1</sub> i OTA uglavnom posljedica neadekvatne kontrole proizvodnje i uvjeta pohrane proizvoda, ukazujući na neophodnost prevencije i sustavnog nadzora te daljnje praćenje uvjeta nastanka ovih izrazito toksičnih mikotoksina. Utvrđeno je da vanjska oštećenja ovitka dodatno intenziviraju difuziju mikotoksina u unutrašnjost trajnih fermentiranih kobasica (Pleadin i sur., 2015.ab.). Dok u uzorcima Slavenskog kulena s neoštećenim ovitkom nije utvrđena kontaminacija tijekom cijelog proizvodnog procesa, u oštećenim uzorcima AFB<sub>1</sub> je detektiran u završnim fazama zrenja u rasponu od 1,62–4,49 µg/kg (Pleadin i

sur., 2015.b).

Također u oštećenim uzorcima, prosječna vrijednost koncentracije OTA utvrđena 180-og dana proizvodnje kulena bila je 7,92±6,50 µg/kg, dok je maksimalna utvrđena vrijednost iznosila 17,0 µg/kg (Pleadin i sur., 2017.). Rezultati dobiveni u oba istraživanja na Slavenskom kulenu pokazali su da oštećenje ovitka može prouzročiti kontaminaciju temeljem difuzije ovih mikotoksina s površine proizvoda u njegovu unutrašnjost. Pritom dubina do koje mikotoksini prodiru u meso i mesne proizvode te ih posljedično kontaminiraju, ovisi o sposobnosti prodiranja micelija vrste koja ga producira te sposobnosti mikotoksina da migrira u određeni proizvod. Difuzija mikotoksina u mesne proizvode također ovisi i o kemijskim svojstvima mikotoksina, kao što su polaritet i naboj te kemijskim i fizikalnim svojstvima mesnih proizvoda, kao što su distribucija vode i masti te pH vrijednost (Sørensen i sur., 2009.).

## Mjere prevencije kontaminacije

Najveće dopuštene količine (NDK) u EU za aflatoksine u hrani, uključujući posebno razinu AFB<sub>1</sub> te ukupnu razinu aflatoksina, propisane su Uredbom Komisije br. 1881/2006 te dodatno Uredbom Komisije br. 165/2010. Međutim, navedene Uredbe ne propisuju NDK vrijednosti ovih mikotoksina u mesu i mesnim proizvodima. NDK za OTA u hrani također su definirane Uredbom 1881/2006, međutim, ne propisuje ni NDK za OTA u mesu i proizvodima od mesa. Ipak, pojedine zemlje Europske unije, npr. Italija i Danska, u okviru nacionalnog zakonodavstva, za ovu skupinu proizvoda (meso, mesne proizvode i iznutrice) imaju propisanu NDK vrijednost od 1 µg/kg. U Hrvatskoj nacionalno zakonodavstvo u ovom području nije doneseno, ali proizvođači trebaju biti svjesni mogućnosti kontaminacije TMP te trebaju provoditi sustavnu kontrolu mikotoksina propisanu u okviru svojih HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*) programa. Slanjem uzoraka u ovlaštene laboratorije, koji trebaju koristiti osjetljive i validirane analitičke metode za ovakve matrikse, potrebno je ispitati moguću pojavnost AFB<sub>1</sub> i OTA u finalnim proizvodima.

Poznato je da tehnološki postupci pri proizvodnji TMP, kao što su termička obrada,

soljenje, sušenje i zrenje te skladištenje, nemaju značajan utjecaj na smanjenje količine ovih toksina u finalnom proizvodu (Bullerman i Bianchini, 2007.; Amézqueta i sur., 2009.; Pleadin i sur., 2014.a.). Kako bi se spriječila pojavnost mikotoksina u trajnim TMP ključni čimbenici predstavljaju kontrolu i prevenciju rasta toksikotvornih plijesni (Núñez i sur., 2015.; Pleadin i sur., 2015.c). Rast plijesni općenito se može učinkovito kontrolirati u mesnim proizvodima tijekom čije proizvodnje se dodaju konzervansi ili se ti proizvodi pakiraju u modificiranoj atmosferi. Međutim, ovi postupci nisu prikladni za trajne TMP, budući da je aktivnost plijesni ključna za organoleptička svojstva ovih proizvoda (Andersen, 1995.; Toldrá, 1998.; Ockerman i sur., 2000.; Núñez i sur., 2015.). Budući da  $a_w$  supstrata utječe na sposobnost produkcije mikotoksina od strane plijesni, moguće je spriječiti njihovu produkciju kontrolom ovog parametra u postupku proizvodnje, uz podešavanje temperature sušenja i zrenja. Primjerice, značajno veća produkcija mikotoksina utvrđena je pri  $a_w$  0,99 u usporedbi sa 0,97 i 0,95 (Asefa i sur., 2011.).

Plijesni s površine proizvoda je potrebno kontinuirano uklanjati tijekom procesa zrenja, postupcima četkanja i pranja, u cilju sprječavanja prekomjerne pljesnivosti površine proizvoda (Sørensen i sur., 2008.). Proizvođači uobičajeno ispiru polusušene mesne proizvode između procesa sušenja i zrenja kako bi uklonili vidljive kolonije plijesni koje rastu na površini (Asefa i sur., 2011.) budući da potrošači uglavnom radije kupuju proizvode bez površinskih plijesni. Utvrđeno je da je koncentracija OTA na vanjskoj površini (crijevu) trajnih kobasica koje su tretirane četkanjem i pranjem bila manja od granice detekcije analitičke metode. Uobičajeno je i da se rižino brašno rasprši po površini zrelih kobasica nakon uklanjanja sloja plijesni četkanjem, pranjem ili pod pritiskom zraka. Iacumin i sur. (2009.) predlažu prvotno četkanje, a potom pranje površine trajnih kobasica, kako bi se smanjila koncentracija OTA te na taj način eliminirala potencijalna opasnost za zdravlje potrošača.

Ujedno, kako bi se spriječila prekomjerna pljesnivost površine proizvoda tijekom procesa zrenja, neophodno je osigurati razmak među proizvodima kako se proizvodi ne bi dodirivali, a čime se osigurava nesmetano strujanje zraka. Zrenje proizvoda potrebno je provoditi

u komorama za zrenje opremljenim biološkim mikrofilterima za dovod svježeg zraka, površine komore za zrenje neophodno je prethodno (prije unosa i postupka zrenja) premazati fungicidnim premazima, a na uzlazu u komoru za zrenje potrebno je osigurati tlačnu barijeru koja sprječava ulaz vanjskog zraka u komoru (Kovačević i sur., 2014.). Na seoskim domaćinstvima u Hrvatskoj koja proizvode TMP uglavnom su prisutni nekontrolirani uvjeti proizvodnje, što rezultira značajnim utjecajem vanjskih čimbenika na pojavnost površinske plijesni, odnosno uvjetima koji su pogodni za nastanak toksikotvornih plijesni i kontaminaciju TMP mikotoksinima.

## Metode dekontaminacije

Metode dekontaminacije mikotoksina se općenito mogu podijeliti na kemijske, biološke i fizikalne. Primjena kemijskih metoda općenito je pokazala značajne nedostatke, kao što su gubitak prehrambene vrijednosti, izmijenjena organoleptička svojstva i neželjeni učinci na proizvod, visoki troškovi opreme i značajni praktični problemi u primjeni ovih metoda. Jedina metoda koja ima učinkovitu primjenu u kontroli rasta plijesni je primjena ozona ( $O_3$ ), koji je jedan od najsnažnijih dezinficijensa i odobren je za primjenu izravno kao antimikrobno sredstvo u prehrambenoj industriji. Njegova primjena inaktivira rast bakterija, sprječava nekontrolirani rast plijesni te sprječava produkciju pojedinih mikotoksina (Udomkun i sur., 2017.).

Biološke metode, temeljene na kompetitivnoj isključenosti netoksikotvornih sojeva plijesni, pokazale su se kao obećavajući pristup u redukciji mikotoksina (Udomkun i sur., 2017.). Među biološkim metodama, biokontrola toksikotvornih plijesni pomoću antagonističkih mikroorganizama alternativa je kemijskim i fizikalnim metodama (Núñez i sur., 2015.). Upotreba autohtonih kvasaca i netoksikotvornih plijesni kao bioprezervirajućih sredstava u trajnim mesnim proizvodima pokazala se vrijednom strategijom za sprečavanje rasta plijesni producenata OTA (Bernáldez i sur., 2013.; Andrade i sur., 2014.; Simoncini i sur., 2014.). Primjerice, na pršutu je postignuta inhibicija rasta toksikotvornih plijesni pomoću *Debaryomyces hansenii* uz upotrebu natrijevog klorida (Schmidt-Heydt i

sur., 2011.), pri čemu je smanjen njihov rast za 65 % (Andrade i sur., 2014.). Bernáldez i sur. (2013.), a primjenom *Penicillium nalgiovense* i *Penicillium verrucosum* na kobasicama uočili smanjenje produkcije OTA za 49 do 75 %.

Na uzorcima kontaminiranim s OTA provedena su i istraživanja redukcije ovog mikotoksina fizikalnim metodama primjenjivim u domaćinstvu (kuhanje, pečenje) (Pleadin i sur., 2014.a). Provedena istraživanja rezultirala su uglavnom niskim stupnjem redukcije OTA (20-30 %), što pokazuje da primjena različitih termičkih metoda ne daje visoku učinkovitost redukcije te da je stoga naročito potrebno osigurati preventivne mjere s ciljem sprječavanja kontaminacije. Naime, OTA predstavlja stabilnu molekulu, otpornu na visoke temperature te se održava tijekom većine faza obrade hrane, kao što je ključanje, kuhanje, prženje, fermentacija, između ostalih, čime se značajno povećava rizik od pojavnosti ovog mikotoksina u finalnim mesnim proizvodima (Pleadin i sur., 2014.a; Domijan i sur., 2015.).

Gama zračenje ( $\gamma$ ) se smatra učinkovitom fizikalnom metodom redukcije, budući da uspješno uništava mikroorganizme koji negativno utječu na kvalitetu hrane u smislu nutritivnih i senzorskih svojstava.  $\gamma$ -zračenje je metoda koja djeluje na način da oštećuje DNA mikrobnih stanica (Domijan i sur., 2015.; Udomkun i sur., 2017.). Dodatni učinak  $\gamma$ -zračenja je interakcija energije s vodom i molekulama prisutnim u supstratima ili hrani, stvarajući slobodne radikale i ione koji napadaju DNK mikroorganizama. Učinkovitost  $\gamma$ -zračenja po pitanju redukcije mikotoksina ovisi o mnogim čimbenicima, kao što su broj i vrsta rodova plijesni, doza, sastav hrane i vlažnost zraka (Udomkun i sur., 2017.). Međutim, proveden je vrlo mali broj istraživanja o njegovom utjecaju na koncentracije mikotoksina u mesnim proizvodima, a i rezultati tih svega nekoliko istraživanja su uglavnom kontradiktorni. Dok su neke studije pokazale da  $\gamma$ -zračenje može smanjiti razinu OTA, čak i ako se primjenjuju niske doze zračenja, pojedina istraživanja su pokazala da se smanjenje količine OTA u mesnim proizvodima, iako ne značajno (22,5 %), može postići samo pri većim dozama zračenja (10 kGy) (Domijan i sur., 2015.).

## Zaključak

Osim prijenosom putem kontaminirane stočne hrane do finalnih proizvoda, pojavnost mikotoksina aflatoksina i okratoksina u TMP najčešće je posljedica produkcije površinskih plijesni. Zbog utvrđene moguće kontaminacije važan je daljnji razvoj potvrdnih analitičkih metoda te primjena tradicionalnih i molekularnih metoda u identifikaciji površinskih plijesni. Kako bi se spriječili mogući štetni učinci po zdravlje potrošača, tijekom proizvodnje i skladištenja TMP, primarno tijekom faze zrenja, potrebno je poduzeti sve preventivne radnje u cilju sprječavanja kontaminacije te provoditi sustavnu kontrolu pojavnosti. Daljnja istraživanja trebaju obuhvatiti različite čimbenike utjecaja na pojavnost mikotoksina u TMP, kao što su proizvodni uvjeti na seoskim domaćinstvima te klimatski čimbenici proizvodnog područja. Istraživanjima treba obuhvatiti i ostale neistražene mikotoksine, kao što su CIT, STC i CPA, za koje literaturni podaci navode da je njihova pojavnost u TMP moguća i u visokim koncentracijama.

## Zahvala

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Mikotoksini u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima: molekularna identifikacija plijesni producenata i procjena izloženosti potrošača“ (IP-2018-01-9017).



## Literatura

- [1] **Abrunhosa, L., R.R. Paterson, A. Venâncio (2010):** Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins* 2, 1078-1099.
- [2] **Alapont, C., M.C. López-Mendoza, J.V. Gil, P.V. Martínez-Culebras (2014):** Mycobiota and toxigenic *Penicillium* species on two Spanish dry-cured ham manufacturing plants. *Food Additives and Contaminants: Part A* 31, 93-104.
- [3] **Amézqueta, S., G.E. Peñas, M.M. Arbizu, A.L. De Certain (2009):** Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* 20, 326-333.
- [4] **Andersen, S.J. (1995):** Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 58, 426-429.
- [5] **Andrade, M.J., L. Thorsen, A. Rodríguez, J.J. Córdoba, L. Jespersen (2014):** Inhibition of ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 170, 70-77.
- [6] **Asefa, D.T., C.F. Kure, R.O. Gjerde, S. Langsrud, M.K. Omer, T. Nesbakken, I. Skaar (2011):** A HACCP plan for mycotoxigenic hazards associated with dry-cured meat production processes. *Food Control* 22, 831-837.
- [7] **Bailly, J.D., P. Guerre (2009):** Mycotoxins in meat and processed meat products. U: F. Toldrá (ed.), *Food microbiology and food safety - Safety of meat and processed meat*, (pp. 83-124). New York: Springer.
- [8] **Bbosa, G.S., D. Kitya, J. Odda, J. Ogwal-Okeng (2013):** Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health* 5, 14-34.
- [9] **Bernáldez, V., J.J. Córdoba, M. Rodríguez, M. Cordero, L. Polo, A. Rodríguez (2013):** Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage "salchichón". *Food Control* 32, 69-76.
- [10] **Bertuzzi, T., A. Gualla, M. Morlacchini, A. Pietri (2013):** Direct and indirect contamination with ochratoxin A of ripened pork products. *Food Control* 34, 79-83.
- [11] **Bullerman, L.B., A. Bianchini (2007):** Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology* 119, 140-146.
- [12] **CAST (2003):** *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Ames, Iowa, USA: Council for Agricultural Sciences and Technology.
- [13] **Cleveland, T.E., J. Yu, N. Fedorova, D. Bhatnagar, G.A. Payne, W.C. Nierman, J.W. Bennett (2009):** Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in biotechnology* 27, 151-157.
- [14] **Comi, G., L. Iacumin (2013):** Ecology of moulds during the pre-ripening and ripening of San Daniele dry cured ham. *Food Research International* 54, 1113-1119.
- [15] **Comi, G., S. Orlić, S. Redžepović, R. Urso, L. Iacumin (2004):** Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *International Journal of Food Microbiology* 96, 29-34.
- [16] **Dall'Asta, C., G. Galaverna, T. Bertuzzi, A. Moseriti, A. Pietri, A. Dossena, R. Marchelli (2010):** Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chemistry* 120, 978-983.
- [17] **Domijan, A.M., J. Pleadin, B. Mihaljević, N. Vahčić, J. Frece, K. Markov (2015):** Reduction of ochratoxin A in dry-cured meat products using gamma irradiation. *Food Additives and Contaminants: Part A* 32, 1185-1191.
- [18] **Duarte, S.C., A. Pena, C.M. Lino (2010):** Ochratoxin A in Portugal: A review to assess human exposure. *Toxins* 2, 1225-1249.
- [19] **El Khoury A., A. Atoui (2010):** Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins* 2, 461-493.
- [20] **European Food Safety Authority (EFSA) (2007):** Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. Question N° EFSA-Q-2006-174. *EFSA Journal* 446, 1-127.
- [21] **European Food Safety Authority (EFSA) (2012):** Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA Journal* 10, 2605.
- [22] **European Food Safety Authority (EFSA) (2013):** Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA Journal* 11, 3254.
- [23] **Frece, J., K. Markov, D. Kovačević (2010):** Determination of indigenous microbial populations, mycotoxins and characterization of potential starter cultures in Slavonian kulen. *Meso* 12, 92-99.
- [24] **Gareis, M., R. Scheuer (2000):** Ochratoxin A in meat and meat products. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 51, 102-104.
- [25] **Geisen, R. (1996):** Multiplex Polymerase Chain Reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 388-392.
- [26] **Hussein, H.S., J.M. Brasel (2001):** Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 101-134.
- [27] **Iacumin, L., L. Chiesa, D. Boscolo, M. Manzano, C. Cantoni, S. Orlić, G. Comi (2009):** Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiology* 26, 65-70.
- [28] **Iacumin, L., S. Milesi, S. Pirani, G. Comi, L.M. Chiesa (2011):** Ochratoxigenic mold and ochratoxin A in fermented sausages from different areas in Northern Italy: Occurrence, reduction or prevention with ozonated air. *Journal of Food Safety* 31, 538-545.
- [29] **International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993):** Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans*, Vol. 56. Lyon, France: IARC Press.
- [30] **International Agency for Research on Cancer (IARC) (2002):** Aflatoxins. In some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Vol. 82. Lyon, France: IARC Press.
- [31] **International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012):** Aflatoxins. *IARC monographs*. Vol. 100F. Lyon, France: IARC Press.
- [32] **Kószegi T, M. Poór (2016):** Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins* 8, 111.
- [33] **Kovačević D., J. Pleadin, K. Mastanjević, J. Frece (2014):** Opasnosti od površinske kontaminacije plijesnima u tradicionalnoj proizvodnji kulena. *Meso* 16, 162-168.
- [34] **Marin D.E., I. Tăranu, C. Tabuc, M. Burgehelea (2009):** Ochratoxin: nature, origin, metabolism and toxic effects in pigs. *Archiva Zootechnica* 12, 5-17.
- [35] **Markov, K., J. Pleadin, M. Bevardi, N. Vahčić, D. Sokolić-Mihalek, J. Frece (2013):** Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control* 34, 312-317.
- [36] **Miličević, D.R., S. Stefanović, S. Janković, T. Radičević (2012):** Risk analysis and exposure assessment of Ochratoxin A in Serbia. *Veterinary World* 5, 412-416.
- [37] **Moss, M.O. (2002):** Mycotoxin review-1. *Aspergillus and Penicillium*. *Mycologist* 16, 116-119.

- [38] Núñez, F., M.S. Lara, B. Peromingo, J. Delgado, L. Sanchez-Montero, M.J. Andrade (2015): Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dryfermented sausages. *Food Microbiology* 46, 114-120.
- [39] Ockerman, H.W., F.J. Céspedes Sánchez, F. León Crespo (2000): Influence of molds on flavor quality of Spanish ham. *Journal of Muscle Foods* 11, 247-259.
- [40] Perši, N., J. Pleadin, D. Kovačević, G. Scortichini, S. Milone (2014): Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. *Meat Science* 96, 203-210.
- [41] Petrik, J., T. Žanić-Grubišić, K. Barišić, S. Pepeljnjak, B. Radić, Ž. Ferencić, I. Čepelak (2003): Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. *Archives of toxicology* 77, 685-693.
- [42] Petzinger, E., A. Weidenbach (2002): Mycotoxin in feed chain: the role of ochratoxin. *Livestock Production Science* 76, 245-250.
- [43] Pfohl-Leszkowicz, A., R.A. Manderville (2007): Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular nutrition & food research* 51, 61-99.
- [44] Plavšić, D., D. Okanović, J. Gubić, Z. Njezić (2015): Microbiological and chemical evaluation of dried smoked meat product. *Procedia Food Science* 5, 239-242.
- [45] Pleadin, J., N. Perši, D. Kovačević, N. Vahčić, G. Scortichini, S. Milone (2013): Ochratoxin A in traditional dry-cured meat products produced from subchronic-exposed pigs. *Food Additives and Contaminants: Part A* 30, 1827-1836.
- [46] Pleadin, J., N. Perši, D. Kovačević, A. Vulić, J. Frece, K. Markov (2014a): Ochratoxin A reduction in meat sausages using processing methods practiced in households. *Food Additives & Contaminants: Part B* 7, 239-246.
- [47] Pleadin, J., K. Markov, J. Frece, A. Vulić, N. Perši (2014b): Bio-Prevalence, Determination and Reduction of Aflatoxin B1 in Cereals. U: A.G. Faulkner (ed.), *Aflatoxins: Food Sources, Occurrence and Toxicological Effects* (pp. 1-34). New York: Nova Science Publishers.
- [48] Pleadin, J., M. Malenica Staver, N. Vahčić, D. Kovačević, S. Milone, L. Saftić, G. Scortichini (2015a): Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. *Food Control*, 52, 71-77.
- [49] Pleadin, J., D. Kovačević, I. Perković (2015b): Impact of casing damaging on aflatoxin B1 concentration during the ripening of dry-fermented sausages. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 36, 655-666.
- [50] Pleadin, J., D. Kovačević, N. Perši (2015c): Ochratoxin A contamination of the autochthonous dry-cured meat product "Slavonski Kulen" during a six-month production process. *Food Control*, 57, 377-384.
- [51] Pleadin, J., M. Zdravec, D. Brnić, I. Perković, M. Škrivanko, D. Kovačević (2017): Moulds and mycotoxins detected in the regional speciality fermented sausage "slavonski kulen" during a 1-year production period. *Food Additives and Contaminants: Part A* 34, 282-290.
- [52] Pleadin, J., V. Vasilj, D. Petrović (2018a): Mikotoksini: pojavnost, prevencija i redukcija. Sveučilište u Mostaru, Mostar.
- [53] Pleadin, J., M. Zdravec, T. Lešić, N., Vahčić, J., Frece, M., Mitak, K. Markov (2018b): Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in unprocessed cereals established during a three-year investigation period. *Food Additives & Contaminants: Part B* 11, 20-25.
- [54] Richard, J.L. (2007): Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *International Journal of Food Microbiology* 119, 3-10.
- [55] Ringot, D., A. Chango, Y.J. Schneider, Y. Larondelle (2006): Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions* 159, 18-46.
- [56] Rodríguez, A., D. Capela, Á. Medina, J.J. Córdoba, N. Magan (2015): Relationship between ecophysiological factors, growth and ochratoxin A contamination of dry-cured sausage based matrices. *Internal Journal of Food Microbiology* 194, 71-77.
- [57] Rodríguez, A., M. Rodríguez, A. Martín, F. Nuñez, J.J. Córdoba (2012): Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control* 27, 118-126.
- [58] Schmidt-Heydt, M., E. Graf, J. Batzler, R. Geisen (2011): The application of transcriptomics to understand the ecological reasons of ochratoxin A biosynthesis by *Penicillium nordicum* on sodium chloriderich dry cured foods. *Trends in Food Science & Technology* 22, S39-S48.
- [59] Simoncini, N., R. Virgili, G. Spadola, P. Battilani (2014): Autochthonous yeasts as potential biocontrol agents in dry-cured meat products. *Food Control* 46, 160-167.
- [60] Sonjak, S., M. Ličen, J.C. Frisvad, N. Gunde-Cimerman (2011): The microbota of three dry-cured meat products from Slovenia. *Food Microbiology* 28, 373-376.
- [61] Sørensen, L.M., J.C. Frisvad, P.V. Nielsen, R. Lametsch, A.G. Koch, T. Jacobsen (2009): Filamentous fungi on meat products, their ability to produce mycotoxins and a proteome approach to study mycotoxin production. Disertacija. Tehničko sveučilište u Danskoj, 2009. <http://orbit.dtu.dk/files/5022914/Marie%20S%20C%20B8rensen%20til%20tryk..pdf> (pristupljeno 10.01.2019.)
- [62] Sørensen, L.M., T. Jacobsen, P.V. Nielsen, J.C. Frisvad, A.G. Koch (2008): Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *International Journal of Food Microbiology* 124, 58-64.
- [63] Sweeney, M.J., A.D. Dobson (1998): Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 43, 141-158.
- [64] Toldrá, F. (1998): Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry cured meat products. *Meat Science* 49, 101-110.
- [65] Udomkun, P., A.N. Wiredu, M. Nagle, J. Müller, B., Vanlauwe, R. Bandyopadhyay (2017): Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of applications – A review. *Food Control* 76, 127-138.
- [66] Uredba Komisije (EU) br. 165/2010 od 26. veljače 2010. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani u odnosu na aflatoksine. L 050/8.
- [67] Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani. Službeni list Europske unije. L 364/5.
- [68] Van der Merwe, K.J., P.S. Steyn, L. Fourie, D.B. Scott, J.J. Theron (1965): Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205, 1112-1113.
- [69] Varga, J., N. Baranyi, M. Chandrasekaran, C. Vágvölgyi, S. Kocsubé (2015): Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. *Acta Biologica Szegediensis* 59, 151-167.
- [70] Vulić, A., N. Perši, N. Vahčić, B. Hengl, A. Gross-Bošković, M. Jurković, D. Kovačević, J. Pleadin (2014): Procjena moguće izloženosti okratoksinu A putem konzumacije kontaminiranih mesnih proizvoda. *Meso*, 16, 138-144.
- [71] Wild, C.P., P.C. Turner (2002): The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis* 17, 471-481.
- [72] Yu, J., S.M. Mohawed, D. Bhatnagar, T.E. Cleveland (2003): Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of applied microbiology* 95, 1334-1342.

Dostavljeno: 11.02.2019.

Prihvaćeno: 12.03.2019.

## Mycotoxins aflatoxins and ochratoxins - a threat to the safety of traditional meat products

### Abstract

During long-lasting ripening, the surface of dry traditional meat products (TMP) is usually overgrown by moulds. Among them, toxicogenic species produce mycotoxins as secondary metabolites, which have significant adverse effects on human and animal health. Aflatoxins and ochratoxins have proven carcinogenic and mutagenic effects in the body, and their occurrence in TMP is the most common consequence of overexpression of surface moulds. In addition to this direct route, mycotoxins in TMP may also be present indirectly through contaminated animal feed, whose use in farm animals results in carry-over effects in final meat products. Due to the frequency of contamination, development of confirmatory analytical methods for mycotoxin detection and the application of surface moulds identification methods is important. To prevent TMP contamination and possible adverse effects on consumer health, all preventive actions should be taken and systematic control of these contaminants should be undertaken. This paper gives an overview of the properties of aflatoxins and ochratoxins as mycotoxins of the greatest importance for the occurrence of meat products, the moulds which produce them and the methods of detection, prevention and reduction of TMP contamination.

**Key words:** traditional meat products, mycotoxins, moulds, toxicity, prevention, reduction

## Mykotoxine Aflatoxine und Ochratoxine - eine Gefahr für die Sicherheit traditioneller Fleischprodukte

### Zusammenfassung

Während einer langen Reifung wird die Oberfläche traditioneller Dauerfleischprodukte (TMP) normalerweise durch Schimmelpilze befallen. Unter ihnen produzieren toxische Spezies Mykotoxine als Sekundärmetabolite, die sich sehr nachteilig auf die Gesundheit von Mensch und Tier auswirken. Aflatoxine und Ochratoxine haben im Körper nachweislich karzinogene und mutagene Wirkungen; ihr Auftreten in Dauerfleischprodukten ergibt sich am häufigsten aus einem übermäßigen Wachstum von Schimmelpilzen. Neben diesem direkten Weg können Mykotoxine in Dauerfleischprodukten auch indirekt durch kontaminierte Futtermittel vorhanden sein, deren Verwendung bei Nutztieren zu Verschleppungseffekten in Fleischerzeugnissen führt. Aufgrund der Häufigkeit der Kontamination sind die Entwicklung von Analyseverfahren zum Nachweis von Mykotoxinen und die Anwendung von Methoden zur Identifizierung von Oberflächenschimmel von großer Bedeutung. Um eine Fleischkontamination und mögliche nachteilige Auswirkungen auf die Gesundheit der Verbraucher zu verhindern, sollten alle vorbeugenden Maßnahmen ergriffen und eine systematische Kontrolle dieser Kontaminanten vorgenommen werden. Diese Arbeit gibt einen Überblick über die Eigenschaften von Aflatoxinen und Ochratoxinen, die als Mykotoxine von größter Bedeutung für das Auftreten in Fleischprodukten sind, die Schimmelpilze, die diese produzieren, sowie die Methoden zum Nachweis, zur Verhinderung und Verringerung der Kontamination von Dauerfleischprodukten.

**Schlüsselwörter:** traditionelle Fleischprodukte, Mykotoxine, Schimmel, Toxizität, Vorbeugung, Reduktion

## Micotoxinas aflatoxinas y ocratoxinas – la amenaza para la seguridad de los productos cárnicos tradicionales

### Resumen

Durante la larga maduración, la superficie de los productos cárnicos tradicionales crudo-curados (PCT) normalmente está cubierto de molde. Entre ellos, los tipos de molde toxicogénicos producen las micotoxinas como metabolitos secundarios, los cuales tienen efectos sumamente adversos sobre la salud humana y animal. Las aflatoxinas y ocratoxinas tienen efectos carcinogénicos y mutagénicos en el organismo comprobados su manifestación en los PCT en general es la consecuencia del crecimiento excesivo del molde sobre la superficie. Además de esta manera directa, las micotoxinas pueden aparecer en PCT indirectamente a través del pienso contaminado usado para los animales de granja y a través del efecto residual (carry-over effect) en los productos cárnicos finales. Debido a la frecuencia de la contaminación es importante desarrollar los métodos analíticos confirmatorios para la detección de las micotoxinas, y la aplicación de los métodos de identificación de los moldes en la superficie. Para evitar la contaminación de los PCT y posibles efectos nocivos sobre la salud de los consumidores, es necesario tomar medidas de prevención y llevar a cabo un control sistemático de estos contaminantes. Este trabajo da un resumen de las propiedades de las aflatoxinas y ocratoxinas como tipos de micotoxinas de mayor importancia para la manifestación en los productos cárnicos, de los moldes que les producen y de los métodos de detección, de prevención y de reducción de la contaminación de los PCT.

**Palabras claves:** productos cárnicos tradicionales, micotoxinas, molde, toxicidad, prevención, reducción

## Micotossine aflatossine e ocratossine – una minaccia alla sicurezza dei tradizionali prodotti a base di carne

### Riassunto

Nel corso del lungo processo di stagionatura, la superficie dei tradizionali prodotti secchi a base di carne (TPC) viene solitamente ricoperta di muffa. Tra esse, le specie tassicogene producono metaboliti secondari delle micotossine che hanno conseguenze estremamente nocive per la salute dell'uomo e degli animali. Le aflatossine e le ocratossine hanno comprovati effetti cancerogeni e mutageni nell'organismo, e la loro presenza nei TPC è il più delle volte conseguenza dell'eccessiva crescita delle muffe superficiali. Oltre che direttamente, le micotossine possono essere presenti nei TPC anche indirettamente, mediante il mangime contaminato assunto degli animali, il cui impiego in zootecnia comporta la trasmissione (effetto carry-over) nei prodotti finali a base di carne. A causa della frequenza delle contaminazioni, è importante lo sviluppo dei metodi analitici di conferma per la rilevazione delle micotossine e l'applicazione del metodo per l'identificazione delle muffe superficiali. Per prevenire la contaminazione dei TPC e i possibili effetti nocivi per la salute del consumatore, è necessario adottate tutte le misure preventive e eseguire un controllo sistematico di questi agenti contaminanti. Questo studio dà un quadro delle proprietà delle aflatossine e delle ocratossine quali micotossine di maggior rilievo per la loro presenza nei prodotti a base di carne, delle muffe che le producono e dei metodi di rilevazione, prevenzione e riduzione della contaminazione dei TPC.

**Parole chiave:** tradizionali prodotti a base di carne, micotossine, muffe, tossicità, prevenzione, riduzione