

# Razvoj multimikotoksinske lc-ms/ms metode i molekularna identifikacija plijesni producenata citrinina, ciklopiazonične kiseline i sterigmatocistina u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima

---

Lešić, Tina

Doctoral thesis / Disertacija

2022

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:148695>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Tina Lešić

**RAZVOJ MULTIMIKOTOKSINSKE LC-  
MS/MS METODE I MOLEKULARNA  
IDENTIFIKACIJA PLIJESNI  
PRODUCENATA CITRININA,  
CIKLOPIAZONIČNE KISELINE I  
STERIGMATOCISTINA U HRVATSKIM  
TRADICIONALNIM MESNIM  
PROIZVODIMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Tina Lešić

**RAZVOJ MULTIMIKOTOKSINSKE LC-  
MS/MS METODE I MOLEKULARNA  
IDENTIFIKACIJA PLIJESNI  
PRODUCENATA CITRININA,  
CIKLOPIAZONIČNE KISELINE I  
STERIGMATOCISTINA U HRVATSKIM  
TRADICIONALNIM MESNIM  
PROIZVODIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

prof. dr. sc. Jelka Pleadin

Zagreb, 2022



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Tina Lešić

**DEVELOPMENT OF MULTIMYCOTOXIN  
LC-MS/MS METHOD AND MOLECULAR  
IDENTIFICATION OF MOULD  
PRODUCERS OF CITRININ,  
CYCLOPIAZONIC ACID AND  
STERIGMATOCYSTIN IN CROATIAN  
TRADITIONAL MEAT PRODUCTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

PhD Jelka Pleadin, Full Professor

Zagreb, 2022



Tema doktorskog rada prihvaćena je na 3. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za akad. god. 2020./2021. održanoj dana 16. prosinca 2020. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na 6. redovitoj elektroničkoj sjednici, održanoj 16. veljače 2021. u 352. akademskoj godini (2020./2021.).

Doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za analitičku kemiju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jelke Pleadin, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost naziva „Mikotoksini u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima: molekularna identifikacija plijesni producenata i procjena izloženosti potrošača“ (HRZZ-IP-2018-01-9017) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Jelka Pleadin.

*Najiskrenije hvala mentorici prof. dr. sc. Jelki Pleadin na stručnom vodstvu, savjetima, podršci i svemu onome što je bilo potrebno da bi se ovaj rad ostvario. Zahvaljujem joj na inspiraciji svojom neiscrpnom životnom energijom, karijerom i ljubavi prema znanosti.*



*Hvala kolegicama, djelatnicama Laboratorija za analitičku kemiju Hrvatskog veterinarskog instituta na dijeljenju znanja, savjetima, pomoći i potpori tijekom izrade ovog rada, kao i na svakodnevnoj ugodnoj radnoj atmosferi.*



*Hvala i drugim djelatnicima Hrvatskog veterinarskog instituta, dr. sc. Manieli Zadravec te dr. sc. Draganu Brniću koji su uvelike pomogli u realizaciji ovoga rada.*



*Hvala prof. dr. sc. Nadi Vahčić te izv. prof. dr. sc. Bojanu Šarkanju na pomoći i izdvojenom vremenu.*



*Hvala roditeljima na potpori, bratu na grafičkoj podršci, te mojim dečkima Ivanu i Borni na ljubavi i poticaju.*

*Informacije o mentoru:*

Prof. dr. sc. Jelka Pleadin, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju, Hrvatski veterinarski institut

## **ŽIVOTOPIS**

Prof. dr. sc. Jelka Pleadin (rođ. Brešan) rođena je 12. lipnja 1974. godine u Trogiru. Diplomirala je 1998. godine na studiju Biokemijskog inženjerstva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu te potom tijekom godine dana volontirala u Laboratoriju za organsku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Zaposlila se 2001. godine kao znanstveni novak u Laboratoriju za analitičku kemiju, Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu, gdje je zaposlena i danas. Doktorski rad pod naslovom „Perzistentnost ostataka klenbuterola u tjelesnim tekućinama i tkivima svinja nakon subkronične izloženosti anaboličnoj dozi“ obranila je 2006. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te time stekla akademski stupanj doktora znanosti iz znanstvenog područja biotehničkih znanosti i znanstvenog polja prehrambena tehnologija.

Od 2007. godine prof. dr. sc. Jelka Pleadin je voditeljica Laboratorija za analitičku kemiju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu, koji broji osam djelatnika i provodi oko stotinu kemijskih analiza iz područja analitike hrane. Voditeljica je i dva nacionalna referentna laboratorija iz područja kvalitete i sigurnosti hrane. Od 2007. godine članica je Znanstvenog vijeća Hrvatskog veterinarskog instituta. Iste godine izabrana je u znanstveno zvanje znanstvenog suradnika, 2010. godine u višeg znanstvenog suradnika, 2011. godine u znanstvenog savjetnika, a od 2020. godine je znanstvena savjetnica u trajnom zvanju. U naslovno znanstveno-nastavno zvanje docenta iz znanstvenog područja biotehničkih znanosti i znanstvenog polja prehrambene tehnologije izabrana je 2011., u izvanrednog profesora 2016. godine, a u redovitog profesora 2021. godine.

Od 2011. godine kao nastavnik redovito sudjeluje u izvođenju nastave na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na dodiplomskim studijima Prehrambeno inženjerstvo i Upravljanje sigurnošću hrane, na kolegijima Suvremene metode u analitici hrane i Suvremene metode u kontroli kvalitete hrane te poslijediplomskom specijalističkom studiju Kvaliteta i sigurnost hrane, na kolegiju Analitičke tehnike za praćenje sigurnosti hrane. Od akademske godine 2015./2016. nositeljica je kolegija Kontrola kakvoće hrane na Agronomskom i Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Mostaru. Od 2011. godine sudjeluje i u provedbi ektramuralne nastave pri Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Bila je mentor četiri doktorska i jednog magistarskog rada te 50 završnih i diplomskih radova, a u koautorstvu sa studentima objavila je više desetaka znanstvenih i

stručnih radova. Trenutno je mentor u izradi tri doktorska rada prijavljena na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu i Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek.

Tijekom svojeg dvadesetogodišnjeg rada u struci prof. dr. sc. Jelka Pleadin stručno se usavršavala kroz pohađanje više desetaka edukacija i radionica u zemlji i inozemstvu. Od 2009. godine članica je Uredničkog odbora znanstveno-stručnog časopisa Veterinarska stanica, od 2017. uredničkog odbora znanstveno-stručnog časopisa Meso, od 2019. godine Hrvatskog časopisa za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam te časopisa Croatian Journal of Food Science and Technology. Članicom Znanstvenog odbora za kemijske opasnosti Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu u Osijeku bila je imenovana 2013. godine, a 2016. godine bila je izabrana predsjednicom Znanstvenog odbora za kemijske opasnosti u hrani.

Prof. dr. sc. Jelka Pleadin je kao suradnica ili voditeljica sudjelovala u provedbi osam domaćih i stranih znanstvenih projekata te kao konzultantica na jednom znanstvenom projektu. Trenutno je voditeljica istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost naziva „Mikotoksini u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima: molekularna identifikacija plijesni producenata i procjena izloženosti“ (2018. - 2022.) te voditeljica radnog paketa na međunarodnom projektu Interreg Italy-Croatia naziva „AdriAquaNet - Enhancing Innovation and Sustainability in Adriatic Aquaculture“ (2019. - 2022.).

Objavila je jedan sveučilišni udžbenik, 11 poglavlja u znanstvenim knjigama, oko 300 znanstvenih radova citiranih u svjetskim bazama podataka (h-indeks: 20) te 15 stručnih radova u domaćim časopisima. Recenzirala je više od 100 znanstvenih radova, jedan sveučilišni udžbenik, jedno poglavlje u stranoj knjizi i dva sveučilišna priručnika, te izradila i brojne recenzije za druge potrebe. Bila je član znanstvenih i organizacijskih odbora te je prezentirala rezultate znanstvenoistraživačkog rada i bila pozvani predavač na velikom broju domaćih i stranih znanstvenih skupova. Kontinuirano je član različitih radnih skupina iz područja kvalitete i sigurnosti hrane te je od 2019. godine član panela za vrednovanje projektnih prijava Hrvatske zaklade za znanost. Dobitnica je Državne nagrade za znanost za 2016. godinu u kategoriji značajnog znanstvenog dostignuća iz područja biotehničkih znanosti. Od 2022. godine obnaša funkciju predsjednice Znanstvenog vijeća Hrvatskog veterinarskog instituta.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 543.51:582.282.123.2:582.282.123:637.5(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### RAZVOJ MULTIMIKOTOKSINSKE LC-MS/MS METODE I MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA PLIJESNI PRODUCENATA CITRININA, CIKLOPIAZONIČNE KISELINE I STERIGMATOCISTINA U HRVATSKIM TRADICIONALNIM MESNIM PROIZVODIMA

*Tina Lešić, mag. ing. mol. biotech.*

**Rad je izrađen** u Laboratoriju za analitičku kemiju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu

**Mentor:** prof. dr. sc. Jelka Pleadin

#### Kratki sažetak

Cilj rada bio je razviti i validirati multimikotoksinsku metodu tekućinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) za detekciju i kvantifikaciju mikotoksina značajnih za mesne proizvode: aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), okratoksin A (OTA), citrinin (CIT), sterigmatocistin (STC) i ciklopiazonična kiselina (CPA) te ispitati njihovu pojavnost u hrvatskim trajnim tradicionalnim mesnim proizvodima (TMP). Također, cilj je identificirati plijesni s površine TMP te ih dovesti u vezu s kontaminacijom mikotoksinima, uz dokazivanje prisutnosti toksikotvornih plijesni i gena odgovornih za njihovu biosintezu. Sa površine 250 analiziranih uzoraka TMP koji uključuju kobasice i suhomesnate proizvode uzorkovane tijekom 2 godine iz 5 regija Republike Hrvatske, ukupno je izolirano 535 izolata i identificirano 38 vrsta plijesni iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus*. Identificirano je 9 različitih potencijalno toksikotvornih vrsta plijesni, od čega je 50 % potencijalnih AFB<sub>1</sub> producenata (*A. flavus*), 58 % potencijalnih OTA producenata (*P. nordicum*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*, *A. welwitschie*, *A. tubingensis*), 71 % potencijalnih CIT producenata (*P. citrinum*) te 48 % potencijalnih CPA producenata (*P. commune*, *A. flavus*, *P. polonicum*) imalo istraživane gene uključene u biosintezu mikotoksina. Razvijenom i validiranom visoko osjetljivom LC-MS/MS metodom odredile su se koncentracije mikotoksina STC do 3,93 µg/kg u 4 % uzoraka, OTA do 4,81 µg/kg u 10 % uzoraka te CPA do čak 335,5 µg/kg u 13 % uzoraka, dok AFB<sub>1</sub> i CIT nisu detektirani u niti jednom uzorku TMP. U 21 % uzoraka kontaminiranih mikotoksinima, određeni su njihovi producenti. Pojavnost mikotoksina i površinskih plijesni dovedena je u vezu sa uvjetima proizvodnje TMP, uključujući tehnologiju i regionalne vremenske čimbenike.

**Broj stranica:** 195

**Broj slika:** 63

**Broj tablica:** 39

**Broj literaturnih navoda:** 196

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** mikotoksini, kontaminacija, trajni mesni proizvodi, plijesni, *Penicillium*, *Aspergillus*, biosinteza mikotoksina, LC-MS/MS, regionalni vremenski čimbenici

**Datum obrane:** 01. lipnja 2022.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Prof. dr. sc. Ksenija Markov, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2. Prof. dr. sc. Blaženka Kos, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
3. Dr. sc. Ana Vulić, viša znanstvena suradnica, Hrvatski veterinarski institut

**Rad je pohranjen u:** knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb; Sveučilištu u Zagrebu, Trg republike Hrvatske 14.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

PhD thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 543.51:582.282.123.2:582.282.123:637.5(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

### DEVELOPMENT OF MULTIMYCOTOXIN LC-MS/MS METHOD AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF MOULD PRODUCERS OF CITRININ, CYCLOPIAZONIC ACID AND STERIGMATOCYSTIN IN CROATIAN TRADITIONAL MEAT PRODUCTS

*Tina Lešić, MSc*

**Thesis performed** in Laboratory for analytical chemistry of Croatian Veterinary Institute, Zagreb

**Supervisor:** PhD Jelka Pleadin, Full Professor

#### Short Abstract

The aim of this study was to develop and validate a multimycotoxin method of liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS /MS) for detection and quantification of mycotoxins important for meat products: aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), ochratoxin A (OTA), citrinin (CIT), sterigmatocystin (STC) and cyclopiazonic acid (CPA) and to investigate into their occurrence in Croatian dry-fermented traditional meat products (TMP). Also, the aim is to identify TMP surface molds and link them to the mycotoxin contamination, while proving the presence of toxigenic molds and genes responsible for their biosynthesis. From the surface of 250 analyzed samples including sausages and cured meat products sampled during 2 years from 5 Croatian regions, a total of 535 isolates and 38 species of molds of the genera *Penicillium* and *Aspergillus* were isolated. Nine different potentially toxigenic mold species were identified, of which 50% of the potential AFB<sub>1</sub> producers (*A. flavus*), 58% of potential OTA producers (*P. nordicum*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*, *A. welwitischii*, *A. tubingensis*), 71% of potential CIT producers (*P.citrinum*) and 48% of potential CPA producers (*P.commune*, *A. flavus*, *P. polonicum*) had the investigated gene involved in mycotoxin biosynthesis. With the developed and validated highly sensitive LC-MS/MS method, concentrations of STC up to 3.93 µg/kg in 4% of samples, OTA up to 4.81 µg/kg in 10% of samples, and CPA up to 335.5 µg/kg in 13% of samples were detected, while AFB<sub>1</sub> and CIT weren't detected in any TMP sample. In 21% of mycotoxin contaminated samples, their producers were identified. The occurrence of mycotoxins and surface molds has been linked to TMP production conditions including technology and regional weather factors.

**Number of pages:** 195

**Number of figures:** 63

**Number of tables:** 39

**Number of references:** 196

**Original in:** Croatian

**Key words:** mycotoxins, contamination, dry-cured meat products, moulds, *Penicillium*, *Aspergillus*, mycotoxin biosynthesis, LC-MS/MS, regional weather factors

**Date of the thesis defense:** June 1<sup>st</sup>, 2022

#### Reviewers:

1. PhD Ksenija Markov, Full Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology
2. PhD Blaženka Kos, Full Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology
3. PhD Ana Vulić, Senior scientific associate, Croatian Veterinary Institute

**Thesis deposited in:** Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb, Kačićeva 23; National and University Library in Zagreb, Hrvatske bratske zajednice bb; University of Zagreb, Trg republike Hrvatske 14.

## SAŽETAK

Plijesni roda *Penicillium* i *Aspergillus* obrastaju površinu trajnih tradicionalnih mesnih proizvoda tijekom zrenja te mogu producirati mikotoksine, toksične sekundarne metabolite. Najtoksičniji mikotoksini u mesu i mesnim proizvodima su aflatoksin B<sub>1</sub> i okratoksin A, dok pojavnost i utjecaj ciklopiazonične kiseline, citrinina i sterigmatocistina na sigurnost mesnih proizvoda i zdravlje ljudi za sada još nisu istraženi. Sposobnost plijesni da producira mikotoksine pod utjecajem je različitih okolišnih i bioloških čimbenika poput pH, aktiviteta vode ( $a_w$ ), temperature, relativne vlažnosti zraka (RH) i nutrijenata te prisutnosti i ekspresije gena za njihovu biosintezu.

Cilj ovog rada bio je razviti i validirati visoko osjetljivu multimikotoksinsku metodu tekućinske kromatografije u kombinaciji sa tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) te prikupiti podatke o pojavnosti svih mikotoksina značajnih za mesne proizvode: AFB<sub>1</sub>, OTA, STC, CIT i CPA. Dobiveni parametri validacije potvrdili su da se razvijena metoda s visokom pouzdanošću može koristiti kao potvrдна metoda za detekciju i kvantifikaciju istraživanih mikotoksina. Priprema uzoraka za analizu AFB<sub>1</sub>, OTA, STC i CIT uključivala je primjenu specifičnih imunoafinitetnih kolonica, dok je priprema uzoraka za analizu CPA uključivala primjenu tzv. roQ QuEChERS ekstrakcijskih soli (engl. *Quick, Easy Cheap Rough and Safe*).

Analizom pojavnosti navedenih pet mikotoksina u trajnim mesnim proizvodima obuhvaćeno je ukupno 250 tradicionalno proizvedenih uzoraka iz skupine trajnih kobasica i trajnih suhomesnatih proizvoda uzorkovanih tijekom 2020. i 2021. godine iz pet različitih regija Republike Hrvatske (istočne, sjeverne, središnje, zapadne te južne). Pojavnost istraživanih mikotoksina detektirana je u 27 % analiziranih uzoraka TMP, i to STC u koncentracijama do 3,93 µg/kg u 4 % uzoraka, OTA u koncentracijama do 4,81 µg/kg u 10 % uzoraka te CPA u koncentracijama do čak 335,5 µg/kg u 13 % uzoraka, dok AFB<sub>1</sub> i CIT nisu detektirani u niti jednom uzorku TMP. Na temelju podataka o vremenskim čimbenicima za pojedine hrvatske regije tijekom zrenja ovih proizvoda ustanovljen je odnos temperature zraka i količine padalina te pojavnosti detektiranih mikotoksina, koja je također dovedena i u vezu sa vrstom proizvoda za koje su parametri vrijeme zrenja u mjesecima, pH,  $a_w$  te udio soli u gotovom proizvodu.

Cilj rada također je bio i identificirati plijesni sa površine uzorkovanih TMP, uz određivanje toksikotvornih vrsta sposobnih producirati neki od istraživanih mikotoksina, dokazivanjem gena uključenih u njihovu biosintezu. Ispitivani geni uključeni u biosintezu STC i AFB<sub>1</sub> su



*aflD* (*nor-1*), koji kodira za norsolorinsku kiselinu reduktazu, *aflM* (*ver-1*), koji kodira za versikolorin A dehidrogenazu i *aflP* (*omt-A*) koji kodira za sterigmatocistin-O-metiltransferazu; OTA *otanpsPN* koji kodira za OTA neribosomalnu peptid sintetazu te *otapks* koji kodira za OTA poliketid sintetazu; CIT *pksCT* gen koji kodira za CIT poliketid sintetazu te CPA *dmaT* koji kodira za dimetilalil triptofansintazu.

Ukupno je izolirano 535 izolata i identificirano 38 vrsta plijesni, pri čemu značajno više roda *Penicillium* (61 %) u odnosu na rod *Aspergillus* (39 %). Identificiran je 181 izolat 9 različitih potencijalno toksikotvornih vrsta plijesni, od čega je 50 % identificiranih izolata potencijalnih AFB<sub>1</sub> producenata (*A. flavus*), 58 % izolata potencijalnih OTA producenata (*P. nordicum*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*, *A. welwitschie*, *A. tubingensis*), 71 % izolata potencijalnih CIT producenata (*P. citrinum*) te 48 % izolata potencijalnih CPA producenata (*P. commune*, *A. flavus*, *P. polonicum*) imalo istraživane gene uključene u biosintezu mikotoksina. Značajan producent STC nije određen, iako bi vrsta *A. flavus* potencijalno mogla producirati i STC budući da dijeli biosintetski put sa AFB<sub>1</sub>, međutim, poznato je da je većina STC kod ove vrste ipak prevedena u aflatoksine.

U 21 % uzoraka kontaminiranih nekim od detektiranih mikotoksina (STC, OTA ili CPA), određeni su njihovi producenti (koji posjeduju biosintetske gene) (*A. flavus*, *P. nordicum* i *P. commune*), dok se kontaminacija uzoraka u kojima producenti nisu identificirani može objasniti ili prethodnom kontaminacijom sastojaka TMP ili obrastanjem producenata drugim vrstama plijesni na kraju faze zrenja spriječavajući na taj način njihovu detekciju. Pojavnost broja i vrste identificiranih plijesni je također dovedena u vezu sa podacima o vremenskim čimbenicima prema regijama Republike Hrvatske i godini uzorkovanja proizvoda te tehnološkim svojstvima po vrstama proizvoda.

**KLJUČNE RIJEČI:** mikotoksini, kontaminacija, trajni mesni proizvodi, plijesni, *Penicillium*, *Aspergillus*, biosinteza mikotoksina, LC-MS/MS, regionalni vremenski čimbenici

## SUMMARY

Moulds of the genus *Penicillium* and *Aspergillus* overgrow the surface of dry-fermented traditional meat products during ripening and can produce mycotoxins, toxic secondary metabolites. The most toxic mycotoxins in meat and meat products are aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A, while the incidence and impact of cyclopiazonic acid, citrinin and sterigmatocystin on meat product safety and human health are not yet researched. The ability of molds to produce mycotoxins is influenced by various environmental and biological factors such as pH, water activity ( $a_w$ ), temperature, relative humidity (RH) and nutrients, as well as the presence and expression of genes involved in their biosynthesis.

The aim of this study was to develop and validate a highly sensitive multimycotoxin method of liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and to collect data on the occurrence of all mycotoxins important for meat products: AFB<sub>1</sub>, OTA, STC, CIT and CPA. The obtained validation parameters confirmed that the developed method can be used with high reliability as a confirmatory method for the detection and quantification of the studied mycotoxins. Preparation of samples for analysis of AFB<sub>1</sub>, OTA, STC and CIT included the use of specific immunoaffinity columns, while preparation of samples for analysis of CPA included the use of so-called roQ QuEChERS extraction salts (Quick, Easy Cheap Rough and Safe).

The analysis of the occurrence of these five mycotoxins in dry-fermented meat products includes a total of 250 traditionally produced samples from the group of dry-fermented sausages and dry-cured meat products sampled during 2020 and 2021 from five different regions of the Republic of Croatia (Eastern, Northern, Central, Western and Southern). The occurrence of investigated mycotoxins was detected in 27% of analyzed TMP samples, namely STC in concentrations up to 3.93  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 4% of samples, OTA in concentrations up to 4.81  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 10% of samples and CPA in concentrations up to 335.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in 13% of samples, while AFB<sub>1</sub> and CIT were not detected in any TMP sample. Based on data on weather factors for every Croatian regions during the ripening of these products, the relation of air temperature and precipitation and the occurrence of detected mycotoxins was established, which was also related to product types for which parameters included ripening time in months, pH,  $a_w$  and salt content in the finished product.

The aim of the study was also to identify molds from the surface of sampled TMPs with the determination of toxigenic species capable of producing some of the studied mycotoxins by proving the genes involved in their biosynthesis. The tested genes involved in STC and AFB<sub>1</sub>

biosynthesis are: *aflD* (*nor-1*) encoding norsolorinic acid reductase, *aflM* (*ver-1*) encoding versicolorin A dehydrogenase and *aflP* (*omt-A*) encoding sterigmatocystin-O-methyltransferase, OTA *otanpsPN* encoding OTA nonribosomal peptide synthetase and *otapks* encoding OTA polyketide synthase; CIT *pksCT* gene encoding CIT polyketide synthase, and CPA *dmaT* encoding dimethylalyl tryptophan synthase.

A total of 535 isolates and 38 mold species were isolated, with significantly more of the genus *Penicillium* (61%) compared to the genus *Aspergillus* (39%). A total of 181 isolates of 9 different potentially toxic mold species were identified, out of which 50% of the identified isolates of potential AFB<sub>1</sub> producers (*A. flavus*), 58% isolates of potential OTA producers (*P. nordicum*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*, *A. welwitschie*, *A. tubingensis*), 71% of isolates of potential CIT producers (*P. citrinum*) and 48% of isolates of potential CPA producers (*P. commune*, *A. flavus*, *P. polonicum*) had investigated genes involved in mycotoxin biosynthesis. No significant STC producer has been identified, although *A. flavus* could potentially produce STC as it shares the biosynthetic pathway with AFB<sub>1</sub>, however, it is known that most STC in this species are nevertheless converted to aflatoxins.

In 21% of samples contaminated with some of the detected mycotoxins (STC, OTA or CPA), their producers (possessing biosynthetic genes) (*A. flavus*, *P. nordicum* and *P. commune*) were determined, while contamination of samples in which producers were not identified can be explained either by previous contamination of TMP ingredients or by the possibility that producers were overgrown by other mould species at the end of the ripening stage and therefore skipped detection. The incidence of the number and identified mould species has also been linked to data on weather factors according to Croatian regions and the year of product sampling as well as technological properties by type of the product.

**KEY WORDS:** mycotoxins, contamination, dry-cured meat products, moulds, *Penicillium*, *Aspergillus*, mycotoxin biosynthesis, LC-MS/MS, regional weather factors

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Hrvatski trajni tradicionalni mesni proizvodi</b>	<b>4</b>
2.1.1. Tradicionalne trajne kobasice	4
2.1.2. Tradicionalni trajni suhomesnati proizvodi	5
<b>2.2. Plijesni</b>	<b>6</b>
2.2.1. Plijesni u tradicionalnim mesnim proizvodima	8
2.2.1.1. rod <i>Aspergillus</i>	10
2.2.1.2. rod <i>Penicillium</i>	11
2.2.2. Metode identifikacije plijesni	12
2.2.2.1. Tradicionalne metode identifikacije	12
2.2.2.2. Molekularne metode identifikacije	13
<b>2.3. Mikotoksini</b>	<b>19</b>
2.3.1. Mikotoksini u tradicionalnim mesnim proizvodima	20
2.3.1.1. Aflatoksin B <sub>1</sub>	30
2.3.1.2. Okratoksin A	32
2.3.1.3. Citrinin	33
2.3.1.4. Sterigmatocistin	35
2.3.1.5. Ciklopiazonična kiselina	36
2.3.2. Analitičke metode detekcije i kvantifikacije mikotoksina	37
2.3.2.1. Ekstrakcija i pročišćavanje	38
2.3.2.2. Tekućinska kromatografija i masena spektrometrija	40
2.3.2.3. Validacija	44
2.3.3. Kontrola, prevencija i zakonska regulativa	45
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Materijali</b>	<b>48</b>
3.1.1. Uzorci	48
3.1.2. Hranjive podloge	48
3.1.3. Kemikalije i reagensi	48
3.1.4. Početnice	50
3.1.5. Analitički standardi mikotoksina	50
3.1.6. Laboratorijski uređaji	51
3.1.7. Laboratorijski pribor	53
3.1.8. Ostali laboratorijski pribor	53
3.1.9. Računalni programi	54
<b>3.2. Metode rada</b>	<b>54</b>
3.2.1. Uzorkovanje i pohrana TMP	<b>54</b>
3.2.2. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava TMP	57
3.2.2.1. Određivanje aktiviteta vode	57
3.2.2.2. Određivanje pH vrijednosti	58
3.2.2.3. Određivanje udjela soli (NaCl)	58
3.2.3. Izolacija plijesni s površine TMP	58
3.2.4. Identifikacija plijesni s površine TMP	58
3.2.4.1. Tradicionalne metode identifikacije plijesni	60
3.2.4.2. Molekularne metode identifikacije plijesni	60
3.2.4.3. PCR detekcija gena uključenih u biosintezu mikotoksina	64
3.2.5. Razvoj i validacija LC-MS/MS metode za određivanje mikotoksina	67

3.2.5.1. Kromatografska analiza	67
3.2.5.2. MS/MS analiza	72
3.2.5.3. Validacija	76
3.2.6. Određivanje koncentracije mikotoksina u uzorcima TMP	78
3.2.6.1. Priprema uzoraka za određivanje koncentracije AFB <sub>1</sub> , OTA, STC i CIT	78
3.2.6.2. Priprema uzoraka za određivanje koncentracije CPA	79
3.2.7. Evidentiranje vremenskih čimbenika tijekom proizvodnje TMP	80
3.2.8. Statistička obrada podataka	80
<b>4. REZULTATI</b>	<b>81</b>
<b>4.1. Fizikalno-kemijska svojstva TMP značajna za razvoj plijesni i proizvodnju mikotoksina</b>	<b>83</b>
<b>4.2. Identifikacija plijesni s površine TMP</b>	<b>84</b>
4.2.1. Identificirane vrste površinskih plijesni prema geografsko-vremenskoj regiji proizvodnje	87
4.2.2. Identificirane vrste površinskih plijesni prema vrsti trajnih proizvoda - tehnologiji proizvodnje	92
4.2.3. Identificirane potencijalne toksikotvorne vrste plijesni	95
<b>4.3. Detekcija gena uključenih u biosintezu mikotoksina kod toksikotvornih vrsta plijesni</b>	<b>105</b>
4.3.1. Detekcija gena uključenih u biosintezu AFB <sub>1</sub> i STC	105
4.3.2. Detekcija gena uključenih u biosintezu OTA	107
4.3.3. Detekcija gena uključenih u biosintezu CIT	109
4.3.4. Detekcija gena uključenih u biosintezu CPA	111
<b>4.5. Razvoj i validacija LC-MS/MS metode</b>	<b>112</b>
<b>4.6. Pojavnost mikotoksina u hrvatskim TMP</b>	<b>119</b>
4.6.1. Pojavnost mikotoksina u odnosu na identificirane vrste plijesni proizvođače mikotoksina	121
4.6.2. Pojavnost mikotoksina prema geografsko-vremenskoj regiji proizvodnje	123
4.6.3. Pojavnost mikotoksina prema vrsti trajnih proizvoda-tehnologiji proizvodnje	125
<b>4.8. Utjecaj geografsko-vremenskih čimbenika i tehnologije proizvodnje TMP na pojavnost površinskih plijesni i mikotoksina</b>	<b>126</b>
4.8.1. Utjecaj geografsko- vremenskih čimbenika	126
4.8.2. Utjecaj tehnologije proizvodnje	132
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>138</b>
<b>5.1. Fizikalno-kemijska svojstva TMP značajna za razvoj plijesni i proizvodnju mikotoksina</b>	<b>139</b>
<b>5.2. Identificirane plijesni s površine TMP</b>	<b>140</b>
5.2.1. Identificirane vrste površinskih plijesni prema geografsko-vremenskoj regiji proizvodnje i utjecaj geografsko-vremenskih čimbenika na pojavnost površinskih plijesni	142
5.2.2. Identificirane vrste površinskih plijesni prema vrsti trajnih proizvoda - tehnologiji proizvodnje i utjecaj tehnologije proizvodnje na pojavnost površinskih plijesni	145
5.2.3. Identificirane potencijalne toksikotvorne vrste plijesni	148
<b>5.3. Detekcija gena uključenih u biosintezu mikotoksina kod toksikotvornih vrsta plijesni</b>	<b>149</b>
<b>5.4. Razvoj i validacija LC-MS/MS metode</b>	<b>151</b>
<b>5.5. Pojavnost mikotoksina u hrvatskim TMP</b>	<b>155</b>

5.5.1. Pojavnost mikotoksina prema geografsko-vremenskoj regiji proizvodnje i utjecaj geografsko-vremenskih čimbenika na pojavnost mikotoksina	158
5.5.2. Pojavnost mikotoksina prema vrsti trajnih proizvoda-tehnologiji proizvodnje i utjecaj tehnologije proizvodnje na pojavnost mikotoksina	161
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>164</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>167</b>
<b>8. PRILOZI</b>	<b>185</b>

## POPIS KRATICA

<b>AAC</b>	aptamer afinitetne kolone (engl. <i>Aptamer-Affinity Columns</i> )
<b>AFB<sub>1</sub></b>	aflatoksin B <sub>1</sub>
<b>APCI</b>	kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> )
<b>APPI</b>	fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. <i>Atmospheric Pressure Photoionization</i> )
<b>ASE</b>	ubrzana ekstrakcija otapalom (engl. <i>Accelerated Solvent Extraction</i> )
<b>ASP</b>	alkalin serin proteaza
<b>a<sub>w</sub></b>	aktivitet vode
<b>CaM</b>	kalmodulin (engl. <i>CALcium ModuLated proteIN</i> ),
<b>CI</b>	kemijska ionizacija (engl. <i>Chemical Ionisation</i> )
<b>CID</b>	kolizijski inducirana disocijacija (eng. <i>Collision Induced Dissociation</i> )
<b>CIT</b>	citrinin
<b>CONTAM</b>	Panel za kontaminante u lancu ishrane (engl. <i>Panel on Contaminants in the Food Chain</i> )
<b>CPA</b>	ciklopiazonična kiselina
<b>CREA</b>	kreatinin saharozni agar (engl. <i>Creatine Sucrose Agar</i> )
<b>CYA</b>	Czapekov agar (engl. <i>Czapek Yeast Extract Agar</i> )
<b>DAD</b>	detektor s nizom dioda (engl. <i>diode array</i> )
<b>dATP</b>	deoksiadenozin trifosfat
<b>dCTP</b>	deoksicitidin trifosfat
<b>DESI</b>	desorpcijska elektrosprej ionizacija (engl. <i>Desorption Electrospray Ionization</i> )
<b>dGTP</b>	deoksiguanozin trifosfat
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>Dr</b>	relativna gustoća izolacije plijesni
<b>dTTP</b>	deoksitimidin trifosfat
<b>EC</b>	Europska komisija (engl. <i>European Comission</i> )
<b>EFSA</b>	Europska agencija za sigurnost hrane (engl. <i>European Food Safety Authority</i> )
<b>EI</b>	elektronska ionizacija (engl. <i>Electron Impact</i> )

<b>ELISA</b>	engl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>ESI</b>	elektrosprej ionizacija (engl. <i>Electrospray Ionization</i> )
<b>FLD</b>	fluorescentni detektor (engl. <i>Fluorescence Detector</i> )
<b>Fr</b>	relativna frekvencija izolacije plijesni
<b>GC-MS/MS</b>	plinska kromatografija sa tandemskom spektrometrijom masa (engl. <i>Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i> )
<b>HACCP</b>	Sustav analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka (engl. <i>Hazard Analysis Critical Control Point</i> )
<b>HPLC</b>	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>IAC</b>	imunoafinitetne kolone (engl. <i>Immunoaffinity Columns</i> )
<b>IARC</b>	Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i> )
<b>ITS</b>	engl. <i>Internal Transcribed Spacer</i>
<b>LC-MS/MS</b>	tekućinska kromatografija sa tandemskom spektrometrijom masa (engl. <i>Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry</i> )
<b>LFD</b>	uređaj lateralnog protoka (engl. <i>Lateral Flow Devices</i> )
<b>LLE</b>	tekućinsko-tekućinska ekstrakcija (engl. <i>Liquid-Liquid Extraction</i> )
<b>LOD</b>	limit detekcije (engl. <i>Limit of Detection</i> )
<b>LOQ</b>	limit kvantifikacije (engl. <i>Limit of Quantification</i> )
<b>MAE</b>	ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. <i>Microwave-Assisted Extraction</i> )
<b>MALDI</b>	matriksom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization</i> )
<b>MEA</b>	maltozni agar (engl. <i>Malt Extract Agar</i> )
<b>MIP</b>	molekularno utisnuti polimeri (engl. <i>Molecularly Imprinted Polymers</i> )
<b>MP</b>	Ministarstvo poljoprivrede
<b>MRM</b>	praćenje višestrukih reakcija (engl. <i>Multiple Reaction Monitoring</i> )
<b>NDK</b>	najveće dopuštene količine kontaminanata
<b>NOAEL</b>	najviša doza koja ne uzrokuje oštećenje ( <i>no-observed-effect level</i> )
<b>NP-LC</b>	normalno-fazna tekućinska kromatografija (eng. <i>Normal Phase</i> )
<b>NRPS</b>	neribosomska peptid sintaza
<b>OAT</b>	zobeni agar (engl. <i>Oat Meal Agar</i> )



<b>OPG</b>	obiteljsko poljoprivredno gospodarstvo
<b>OTA</b>	okratoksin A
<b>PCA</b>	analiza glavnih komponenti (engl. <i>Principal Component Analysis</i> )
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PKS</b>	poliketid sintaza
<b>QqQ</b>	trostruki kvadrupol analizator masa
<b>QuEChERS</b>	engl. <i>Quick Easy Cheap Rough and Safe</i>
<b>rDNA</b>	ribosomska deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>ribosomal deoxyribonucleic acid</i> )
<b>RH</b>	relativna vlažnost zraka (engl. <i>relative humidity</i> )
<b>RP-LC</b>	reverzno-fazna tekućinska kromatografija (engl. <i>Reverse Phase</i> )
<b>rRNA</b>	ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribosomal ribonucleic acid</i> )
<b>SFE</b>	ekstrakcija superkritičnim fluidima (engl. <i>Supercritical Fluid Extraction</i> )
<b>SLE</b>	čvrsto-tekućinska ekstrakcija (engl. <i>Solid-Liquid Extraction</i> )
<b>SPE</b>	čvrsto-fazna ekstrakcija (engl. <i>Solid Phase Extraction</i> )
<b>SRM</b>	praćenje izabranih reakcija (engl. <i>Selected Reaction Monitoring</i> )
<b>STC</b>	sterigmatocistin
<b>TEF1</b>	elongacijski faktor 1-alpha
<b>TLC</b>	tankoslojna kromatografija (engl. <i>Thin-Layer Chromatography</i> )
<b>TMP</b>	tradicionalni mesni proizvodi
<b>TOF</b>	analizator vremena leta (engl. <i>Time of Flight</i> )
<b>VALDS-ME</b>	mikroekstrakcija otapalima niske gustoće potpomognuta vorteksom (engl. <i>Vortex Assisted Low Density Solvent Microextraction</i> )

## **1. UVOD**

U hrvatske tradicionalne trajne mesne proizvode (TMP) ubrajaju se različite vrste fermentiranih kobasica poput kulena te suhomesnati proizvodi poput pršuta, pancete, vratine i sl. U postupku proizvodnje, osim razlika u recepturi među domaćinstvima, značajne su i razlike u higijenskim te okolišnim uvjetima, što utječe na specifičnost mikroflore te razlike u kvaliteti i sigurnosti TMP. Tijekom procesa zrenja, površinu trajnih TMP obrastaju plijesni čije su spore najčešće podrijetlom sa žitnih polja u čijoj su blizini smještene komore za zrenje, a intenzitetu obrastanja proizvoda površinskim plijesnima doprinosi dugotrajnost procesa zrenja te tradicionalni uvjeti proizvodnje ove vrste proizvoda, bez upotrebe mikrobioloških filtera i tlačnih barijera te mogućnosti reguliranja temperature i relativne vlažnosti zraka (Asefa i sur., 2010; Zadravec i sur., 2020).

Plijesni s površine TMP dominantno čine rodovi *Penicillium* i *Aspergillus*, a utvrđeno je da pokazuju uglavnom pozitivno djelovanje na kvalitetu proizvoda doprinoseći razvoju njihovog specifičnog mirisa i okusa (Lešić i sur., 2020). Međutim, plijesni mogu producirati toksične spojeve, mikotoksine, te na taj način kontaminirati proizvod. Pojavnost mikotoksina u značajnijoj mjeri je posljedica produkcije plijesni koje obrastaju površinu TMP pod određenim uvjetima poput temperature, pH vrijednosti, aktiviteta vode ( $a_w$ ), oštećenja ovitka, prisutnosti kože (pršuti) ili pukotina te nedostatnog pranja i četkanja površine TMP, odnosno nekontroliranog rasta plijesni (Iacumin i sur., 2009; Rodríguez i sur., 2012a; Zadravec i sur., 2020; Iacumin i sur., 2011; Asefa i sur., 2010). Mikotoksini u TMP mogu biti podrijetlom i iz stočne hrane, ukoliko je farmska životinja putem hranidbe dobivala kontaminirano krmivo odnosno krmnu smjesu (*carry-over effect*) te iz začina koji se koriste u njihovoj proizvodnji (Bertuzzi i sur., 2013; Perši i sur., 2014). Mikotoksini se zadržavaju u sirovinama i finalnim proizvodima te kumuliraju u ljudskom organizmu, pritom uzrokujući izrazito štetne posljedice po zdravlje kao posljedicu konzumacije kontaminirane hrane (Hussein i Brasel, 2001).

Među mikotoksinima, aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) i okratoksin A (OTA) općenito imaju najveći javnozdravstveni značaj. AFB<sub>1</sub> je klasificiran od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) u grupu 1, dokazanih ljudskih karcinogena, dok OTA pripada skupini 2B, mogućih ljudskih karcinogena (IARC, 2002; IARC, 1993). Za AFB<sub>1</sub> je poznato da ga produciraju dvije vrste plijesni iz roda *Aspergillus*, *A. flavus* i *A. parasiticus*, a OTA produciraju različite vrste plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, od kojih je najznačajniji *A. ochraceus* (Iacumin i sur., 2009). Dosadašnja istraživanja o mikotoksinima u TMP iz europskih zemalja usmjerena su najviše na OTA te AFB<sub>1</sub>. Utvrđeno je da je OTA dominantni kontaminant mesnih proizvoda, dok se

AFB<sub>1</sub> pojavljuje s manjom učestalošću i u manjim koncentracijama (Markov i sur., 2013; Pleadin i sur., 2015a; Zadavec i sur., 2020).

Osim AFB<sub>1</sub> i OTA, neke vrste plijesni identificirane na površini TMP mogu producirati i druge mikotoksine, kao što su citrinin (CIT), ciklopiazonična kiselina (CPA) i sterigmatocistin (STC), no spoznaje o pojavnosti i izloženosti potrošača ovim mikotoksinima su nedostatne, iako su dokazano toksični (Bailly i Guerre, 2009; EFSA, 2012; EFSA, 2013). Zakonodavstvo još uvijek nije propisalo najveće dopuštene količine (NDK) mikotoksina u mesu i mesnim proizvodima (EC, 2006b), čime podaci o njihovoj pojavnosti također nisu dostupni. Ujedno, za ispitivanje CIT i STC u mesnim proizvodima nisu razvijene ni dovoljno osjetljive i specifične analitičke metode. CIT uglavnom producira *P. citrinum*, dok *P. verrucosum* može biti producent i CIT i OTA (Samson i sur., 2019) te je upravo i poznata zajednička pojavnost ovih mikotoksina u različitim vrstama namirnica (EFSA, 2012). STC je karcinogeni prekursor AFB<sub>1</sub> s kojim dijeli put biosinteze, a produciraju ga različite vrste roda *Aspergillus*, od kojih najviše *A. versicolor* (EFSA, 2013). Brojne plijesni iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus* sintetiziraju CPA, među kojima je plijesan *P. commune* poznata kao najznačajnija (Samson i sur., 2019) te je izdvojena s površine različitih TMP podrijetlom iz brojnih europskih zemalja (Andersen, 1995; Núñez i sur., 1996; Bailly i sur., 2005; Peromingo i sur., 2018).

Pojavnost CIT ispitana je u samo jednom istraživanju na hrvatskim mesnim proizvodima (Markov i sur., 2013), dok za STC podaci za mesne proizvode uopće nisu dostupni. Pojedini autori ističu moguću pojavnost CPA u mesnim proizvodima u značajnim koncentracijama (Bailly i sur., 2005; Bailly i Guerre, 2009), te su nedavno provedena dva istraživanja: na španjolskim trajnim suhomesnatim proizvodima (Peromingo i sur., 2018) te hrvatskim trajnim kobasicama (Vulić i sur., 2020), koja su potvrdila tu pretpostavku.

Cilj ovog rada je razviti i validirati potvrdnu multimikotoksinsku LC-MS/MS metodu za detekciju i kvantifikaciju mikotoksina AFB<sub>1</sub>, OTA, CIT, STC i CPA te ispitati pojavnost neistraženih CIT, STC i CPA u hrvatskim TMP uzimajući u obzir uvjete njihove proizvodnje. Također, cilj je identificirati plijesni s površine TMP u ovisnosti o vrsti TMP, regiji i godini proizvodnje te ih dovesti u vezu sa kontaminacijom mikotoksinima, uz dokazivanje prisutnosti toksikotvornih plijesni i gena odgovornih za njihovu biosintezu.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## **2.1. Hrvatski trajni tradicionalni mesni proizvodi (TMP)**

Proizvodnja trajnih mesnih proizvoda u Republici Hrvatskoj ima dugu tradiciju od kojih su najpoznatiji oni ujedno i zaštićeni od strane Europske Unije, a koji sve više dobivaju na vrijednosti, budući da je danas značajan trend povećanja potražnje za hranom koja se proizvodi na tradicionalni način. Tradicionalna proizvodnja trajnih mesnih proizvoda odvija se pod utjecajem kulturološke prakse koja se odnosi na geografsko područje proizvodnje. Ovi se proizvodi proizvode na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima (OPG) ili domaćinstvima koja se razlikuju po tradicionalnoj recepturi, ali i higijenskim te okolišnim uvjetima proizvodnje, što utječe na specifičnost mikroflore te razlike u kvaliteti i sigurnosti TMP. Tijekom procesa zrenja, površinu trajnih TMP obrastaju plijesni čijem intezitetu doprinose tradicionalni, ali i nekontrolirani i promjenjivi uvjeti proizvodnje, pod utjecajem sezone, bez upotrebe mikrobioloških filtera i tlačnih barijera te mogućnosti reguliranja temperature i relativne vlažnosti zraka (Asefa i sur., 2010; Asefa i sur., 2011; Kovačević, 2014; Kovačević, 2017). Prema Pravilniku o mesnim proizvodima, trajne proizvode se može podijeliti na trajne kobasice i trajne suhomesnate proizvode (MP, 2018).

### **2.1.1. Tradicionalne trajne kobasice**

Trajne kobasice su proizvodi od mesa i to uglavnom svinjskog ili u kombinaciji sa goveđim, masnog tkiva te dodatnih sastojaka, poput soli i začina, koji se nakon mljevenja i punjenja u crijeva podvrgavaju postupcima sušenja, fermentacije i zrenja sa ili bez dimljenja (MP, 2018). Tijekom faze zrenja kod svih trajnih mesnih proizvoda dolazi do niza biokemijskih reakcija, proteolize i lipolize, pri čemu nastaju spojevi koji daju specifičnu aromu proizvodu. Primarni razlog dodavanja soli u kobasice i u sve trajne mesne proizvode je očuvanje mesa od mikrobnog kvarenja, budući da sol snižava  $a_w$  proizvoda apsorbirajući vodu. Udio soli sa početnih 1,8 - 2,5 % u nadjevu kobasica sušenjem kontinuirano raste do prosječnih 3,5 - 5 % u gotovim proizvodima. Sol također daje specifičan okus mesnom proizvodu (Kovačević, 2014). Uz sol, najčešći začini koji se koriste u proizvodnji trajnih kobasica te u velikoj mjeri doprinose aromi proizvoda su paprika (slatka i ljuta), češnjak, papar, a mogu i senf, origano, ružmarin, korijander i sl. (Flores, 2011). Tijekom faze zrenja kobasica, koje se odvija tijekom zimskih mjeseci, temperatura se održava ispod 16 °C, a RH treba biti ispod 80 % (najčešće 75 – 78 %). Vrijeme sušenja i zrenja ovisi o promjeru kobasice i točnom sastavu, a najčešće je od 2 mjeseca za trajne kobasice manjeg promjera pa do 6 mjeseci za kulen. U konačnom proizvodu  $a_w$  kreće se od 0,80 do 0,90, a pH u rasponu 5,0 - 5,5 (Kovačević, 2014).

Najpoznatije hrvatske vrste trajnih kobasica su Slavonski i Baranjski kulen te Slavonska i Istarska kobasica od kojih su sve zaštićene oznakom zemljopisnog podrijetla (MP, 2014a; MP, 2014b; MP, 2020), osim Istarske kobasice koja je u postupku dobivanja te oznake.

### **2.1.2. Tradicionalni trajni suhomesnati proizvodi**

Trajni suhomesnati proizvodi su toplinski neobrađeni proizvodi najčešće od svinjskog mesa, sa ili bez pripadajućih kosti, potkožnog masnog tkiva i kože, s dodanim drugim sastojcima, koji se proizvode postupcima soljenja, salamurenja, sušenja i zrenja sa ili bez dimljenja te ne prolaze postupak toplinske obrade. U suhomesnate proizvode spadaju pršut, suha šunka, lopatica, vratina, pečenica, slanina i panceta u kojima  $a_w$  može biti najviše 0,93 (MP, 2018).

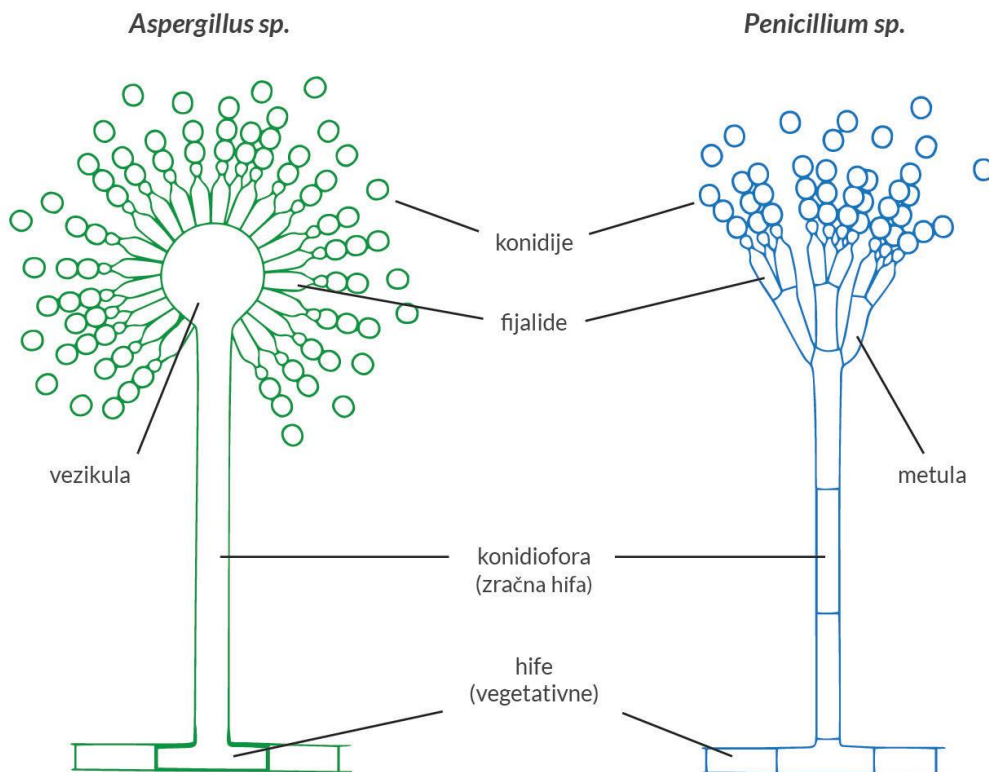
Među trajnim suhomesnatim proizvodima najpopularniji su pršut i šunka. Najpoznatije hrvatske vrste pršuta su Dalmatinski, Drniški i Krčki pršut sa zaštićenom oznakom zemljopisnog podrijetla te Istarski pršut sa zaštićenom oznakom izvornosti. Drugi poznati autohtoni hrvatski trajni suhomesnati proizvodi su Slavonska šunka, Dalmatinska panceta i Dalmatinska pečenica sa zaštićenom oznakom zemljopisnog podrijetla te drugi (MP, 2014c; MP, 2014d; MP, 2015a; MP, 2015b; MP, 2019a; MP, 2019b).

Za pršute se smatra da predstavljaju tipični mediteranski proizvod iako se također proizvode i izvan Južne Europe. U tradicionalnoj proizvodnji koriste se svinjski butovi, a proces proizvodnje se dijeli na fazu soljenja (salamurenja), u kojoj se sol (i začini) nanose na površinu, pri čemu se temperatura održava ispod 6 °C te fazu sušenja i zrenja sa ili bez dimljenja (Flores, 2011). Udio soli kreće se najčešće u rasponu 4 – 8 %. Za razliku od trajnih kobasica, pršuti i šunke zriju duži period, ovisno o masi buta i drugim čimbenicima, od minimalno 4 mjeseca za Slavonsku šunku pa do 18 mjeseci i više za pojedine pršute. Samim tim zrenje se odvija i tijekom toplijeg razdoblja, a ne samo u zimskim mjesecima, a temperatura pri kojoj zriju ovi proizvodi je uglavnom do 20 °C (Kovačević, 2017). Navedeni principi zajednički su u proizvodnji svih tipova pršuta, ali osnovna sirovina i tehnološki aspekti proizvodnje se mogu bitno razlikovati što rezultira različitim senzorskim svojstvima ovih proizvoda (Petričević i sur., 2018). Vrijednosti pH u gotovom proizvodu iznose prosječnih  $\text{pH} \leq 6$ , a  $a_w$  u rasponu 0,80 - 0,85 (Kovačević, 2017).

## 2.2. Plijesni

Plijesni su eukariotski nefotosintetički organizmi koji pripadaju carstvu gljiva. Plijesni su također i aerobni mikroorganizmi koji rastu samo u prisutnosti zraka te pripadaju skupini mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje hrane. Široko su rasprostranjeni u prirodi u obliku aktivno živućih vegetativnih tijela ili u obliku latentnih spora.

Tijelo im je građeno od gustog sustava cjevastih stanica koje su obično bezbojne i nazivaju se hife te rastu kao isprepletena masa – micelij. Većina hifa je vegetativna te rastući oblikuju tijelo plijesni u koloniju. Zračne hife sudjeluju u tvorbi paučinstog oblika kolonije plijesni (slika 1).



**Slika 1.** Morfološka struktura *Aspergillus sp.* i *Penicillium sp.* (modificirano prema Pitt i Hocking, 2009)

Na krajevima zračnih hifa izrastaju spore (nespolne ili rjeđe spolne) čija je funkcija razmnožavanje, širenje i zaštita vrste od štetnih okolišnih uvjeta budući da nastaju u velikim količinama, lagano se šire, mnoge su otporne na nepovoljne uvjete te svaka može stvoriti novu koloniju plijesni u povoljnim okolišnim uvjetima (Duraković i Duraković, 2003).



Plijesni svojim metabolizmom proizvode različite kemijske spojeve, od jednostavnijih organskih kiselina do složenijih molekula. Metabolizam plijesni možemo podijeliti na onaj primarni te sekundarni. Primarnim metabolizmom nastaju tvari nužne za život plijesni dok sekundarnim metabolizmom nastaju tvari koje nisu neophodne za preživljavanje i diferencijaciju stanica već ih plijesni sintetiziraju kao reakciju na okolinu te je njihova sinteza često limitirana na obitelj, rod, vrstu ili čak soj plijesni. Najčešći sekundarni metaboliti su antibiotici, mikotoksini, imunosupresivi, hipokolesterolni, antitumorski i antiparazitski agensi te bioinsekticidi (Duraković i Duraković, 2003). Sa stajališta sigurnosti hrane, jedna od važnijih skupina sekundarnih metabolita plijesni su mikotoksini budući da izlučeni u okolinu, odnosno, namirnicu mogu biti toksični za ljude i životinje koju takvu namirnicu konzumiraju (Pleadin i sur., 2018).

Plijesni se općenito mogu klasificirati na plijesni na prirodnim staništima, plijesni skladišta te plijesni uznapredovalog kvarenja, kako je prikazano na slici 2.



**Slika 2.** Općenita klasifikacija plijesni (modificirano prema Pleadin i sur., 2018)

Mnogi rodovi plijesni sadrže vrste koje mogu biti toksikotvorne, odnosno producirati mikotoksine poput *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Pithomyces*, *Phoma*, *Stachybotrys* i *Diplodia*, ali većinu mikotoksina ipak produciraju plijesni iz roda *Aspergillus*, *Penicillium* te *Fusarium*. Plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium* pripadaju

odjeljku *Ascomycota* te su jedne od značajnijih vrsta plijesni koje nalazimo u namirnicama i okolišu, a ujedno su i jedne od značajnijih producenata mikotoksina (Pitt i Hocking, 2009).

### 2.2.1. Plijesni u tradicionalnim mesnim proizvodima

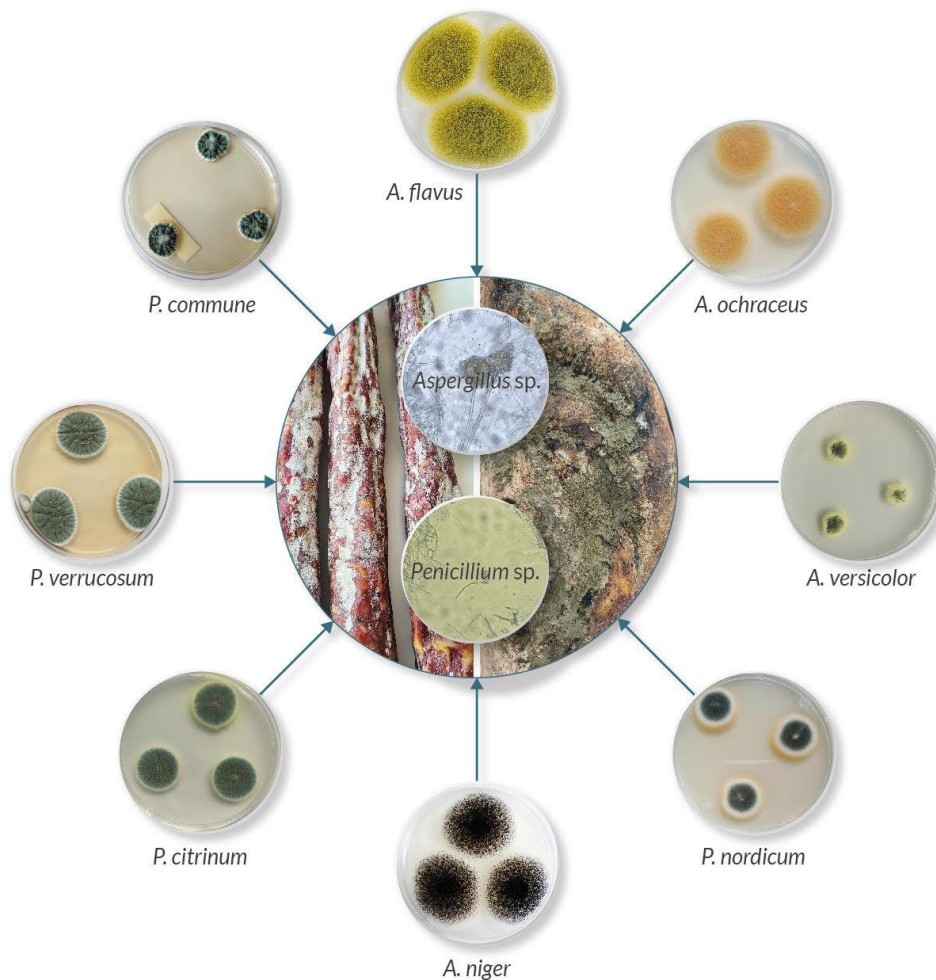
Spore plijesni koje obrastaju površinu trajnih mesnih proizvoda tijekom zrenja najčešće su podrijetlom sa žitnih polja u čijoj su blizini smještene komore za njihovo zrenje (Comi i sur., 2004). Kvaliteta sirovine, različiti fizikalni i biokemijski faktori, proizvođačka praksa te higijena proizvodnog okruženja određuju intezitet i vrstu plijesni koja će se pojaviti na ovim proizvodima. Uvjeti proizvodnje značajno utječu na rast površinskih plijesni, poput trajanja procesa, temperature i RH, pH,  $a_w$  i udjela soli u proizvodu (Asefa i sur., 2010) te omogućavaju u najvećoj mjeri rast kserofilnih, mezofilnih, aerobnih te halotolerantnih plijesni roda *Penicillium* i *Aspergillus* (Comi i sur., 2004; Asefa i sur., 2009; Sonjak i sur., 2011; Comi i sur., 2013; Canel i sur., 2013; Magista i sur., 2017; Zadavec i sur., 2019; Zadavec i sur., 2020). Za rast ovih plijesni na mesnim proizvodima potreban  $a_w$  od minimalno 0,6, temperaturni raspon od 10 do 45 °C, medij s pozitivnim redoks potencijalom te udio soli do 20 %. Većina plijesni raste u širokom rasponu koncentracije vodikovih iona (pH od 2 do 8,5), a optimalni za rast postižu pri oko pH 5 (Hamad, 2012; Zadavec i sur., 2019).

U usporedbi sa *Aspergillus* vrstama, *Penicillium* vrste preferiraju rast pri nešto nižem  $a_w$  (< 0,80) te imaju veću mogućnost rasta pri umjerenim temperaturama. Stoga su ove plijesni zastupljenije na trajnim kobasicama koje zriju kraći period tijekom zimskih mjeseci, dok *Aspergillus* vrste preferiraju rast pri  $a_w < 0,90$  uz nešto više temperature i time češće obrastaju površinu pršuta i šunki koje zriju kroz duži period godine, uključujući i ljetne mjesece (Pitt i Hocking, 2009; Zadavec i sur., 2020).

Površinske plijesni mogu imati pozitivno djelovanje na kvalitetu proizvoda kao rezultat aktivnog sudjelovanja njihovih lipolitičkih i proteolitičkih enzima u procesima fermentacije i zrenja, što doprinosi razvoju specifičnog mirisa i okusa proizvoda. Plijesni također svojim antioksidacijskim svojstvima kroz aktivnost katalaze i potrošnju kisika te zaštitom površine proizvoda od svjetla omogućavaju stabilizaciju boje te sprječavaju užeglost proizvoda, dok svojom sposobnosti da zadržavaju vlagu, sprječavaju površinsko isušivanje proizvoda i stvaranje kore koaguliranih proteina. Također, štite od spontane kolonizacije nepoželjnim plijesnima, kvascima i bakterijama te sprječavaju sluzavost i ljepljivost površine ovitka (Sunesen i Stahnke, 2003; Martin i sur., 2004; Martin i sur., 2006; Alapont i sur., 2015; Lešić i sur., 2021a). Iz tih razloga se u proizvodnji trajnih mesnih proizvoda koriste i

netoksikotvorne starter kulture plemenitih plijesni, poput *P. solitum*, *P. nalgiovense* i *P. chrysogenum* (Sunesen i Stahnke, 2003; Kovačević, 2014). S druge strane, plijesni mogu imati i negativno djelovanje na kvalitetu i sigurnost ovih proizvoda kroz nekontroliran rast plijesni koji omogućava razvoj nepoželjnih vrsta. Nepoželjne vrste su one koje mogu djelovati nepovoljno na senzorska svojstva proizvoda, stvarajući mrlje na površini proizvoda, neugodan miris i okus ili biti uzročnici kontaminacije proizvoda spomenutim mikotoksinima odgovornim za akutnu i kroničnu toksičnost ili antibioticima odgovornim za alergijske reakcije i antibiotsku rezistenciju (Sunesen i Stahnke, 2003; Magista i sur., 2017).

Vrste plijesni koje se pojavljuju na trajnim mesnim proizvodima te su prepoznate kao značajniji producenti mikotoksina su *P. commune*, *P. citrinum*, *P. nordicum*, *P. verrucosum* te *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger* i *A. versicolor* (slika 3) (Zadravec i sur., 2019; Samson i sur., 2019; Pitt i Hocking, 2009).



**Slika 3.** Odabrane vrste toksikotvornih plijesni koje mogu obrastati površinu trajnih mesnih proizvoda

### 2.2.1.1. Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* broji više od 200 poznatih vrsta te je jedan od najčešće prepoznatih među svim rodovima plijesni. Češće se javljaju u tropskim i subtropskim, nego u umjerenim klimatskim područjima. Kolonije uobičajeno rastu brzo, u bojama bijele, ružičaste, žute, smeđe do crne ili nijansama zelene boje, većinom se sastojeći od gustog micelija s uspravnim konidiosporama. Neke *Aspergillus* vrste imaju spolni oblik, a nedavno su pronađena i spolna stanja važnih vrsta poput *A. fumigatus*, *A. flavus* te *A. parasiticus*. Spolni oblici ovog roda prije su se nazivali *Chaetosartorya*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fennellia*, *Neopetromyces*, *Sclerocleista* i sl., ali su sve vrste unutar ovog roda preimenovane u *Aspergillus*. Vrste roda *Aspergillus* su među ekonomski najvažnijim vrstama plijesni zbog široke upotrebe u proizvodnji organskih kiselina i enzima te biosintetskih transformacija (*A. oryzae*, *A. niger*). Međutim, ove vrste značajne su u kvarenju namirnica te proizvode aflatoksine kao najznačajnije mikotoksine, ali i OTA, CPA i STC (Pleadin i sur., 2018; Samson i sur., 2019; Pitt i Hocking, 2009; Zadavec i sur., 2019).

Vrsta *A. flavus* je najznačajniji producent aflatoksina po kojem je i dobila ime, a također ima i sposobnost produkcije CPA. *A. flavus* je široko rasprostranjena zbog proizvodnje velikog broja spora koje se lako šire zrakom. Visoke temperature i relativno niska vlažnost zraka pogoduju njenom rastu. Optimalna temperatura rasta je oko 33 °C, a minimalni  $a_w$  za rast 0,78. Raspon temperature i  $a_w$  za proizvodnju AFB<sub>1</sub> kod vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus* je 12 - 40 °C te  $a_w$  veći od 0,84, dok pH može biti 3 - 8 ili veći. Optimalni uvjeti za proizvodnju AFB<sub>1</sub> kod *A. flavus* su pri temperaturi od 33 °C i  $a_w$  od 0,99 (Pitt i Hocking, 2009). Plijesan *A. versicolor*, koju se može naći na uskladištenim žitaricama, začinima, orašastim plodovima te trajnim mesnim proizvodima, može producirati mikotoksin STC. Može rasti pri nižim temperaturama nego većina drugih *Aspergillus* vrsta. Minimalna temperatura za rast je 9 °C, dok je optimalna oko 27 °C, a minimalni  $a_w$  za rast je 0,78. Optimalni temperaturni raspon za biosintezu STC kod *A. versicolor* je između 23 i 29 °C (Lešić i sur., 2019). *A. ochraceus* i *A. niger* mogu producirati OTA. *A. ochraceus* je jedan od najčešći producenata OTA, a uz njega sintetizira i u manjoj količini i manje toksične okratoksin B i C, penicilinsku kiselinu i emodin. Izolati *A. ochraceus* rastu intezivno pri 37 °C. Na mediju baziranom na NaCl, zabilježeni minimalni  $a_w$  za rast je 0,81 (Samson i sur., 2019; Pitt i Hocking, 2009). Raspon temperature pri kojoj može doći do produkcije OTA je 12 - 35 °C za *A. ochraceus*. *A. niger* se uobičajeno smatra bezopasnom plijesni budući ima široku primjenu u industriji poput proizvodnje enzima te biotransformaciji, ali istraživanje Arbaca i sur. (1994) pokazalo je da

su 2 od 19 izolata *A. niger* bila sposobna producirati OTA. Vrsta je lako prepoznatljiva, s bijelim micelijem te crnim glavama konidija. Crne spore omogućavaju zaštitu od sunčevog i UV svjetla, što omogućava kompetitivnu prednost u toplijim klimatskim regijama. Često je izoliran sa sušenih proizvoda, upravo poput trajnih mesnih proizvoda ili začina. Minimalne temperature rasta *A. niger* su 6 - 8 °C, optimalne oko 35 – 37 °C, a minimalni  $a_w$  za rast iznosi 0,77 (Samson i sur., 2019; Pitt i Hocking, 2009).

### 2.2.1.2. Rod *Penicillium*

*Penicillium* (lat. *penicillium* = kist) je raznovrsan rod plijesni s preko 354 prihvaćene vrste. U usporedbi sa *Aspergillus* vrstama, *Penicillium* vrste su brojčano raznovrsnije te imaju širi raspon staništa (sa širokim rasponom fizikalno-kemijskih okolnih čimbenika: temperature,  $a_w$ , pH i redoks potencijala). Mnoge *Penicillium* vrste su uobičajeni kontaminanti na različitim supstratima, ali neke vrste se povezuju sa specifičnim proizvodima, poput *P. digitatum* i *P. italicum* sa voćem. Kolonije uobičajeno rastu brzo, često u nijansama sivo-zelene boje, ponekad bijele, uglavnom se sastojeći od gustog micelija s konidiosporama. Svaka vrsta ima specifične uvjete za rast i proizvodnju ekstroлита, tj. sekundarnih metabolita. Velik broj vrsta povezuje sa potencijalnom proizvodnjom većeg broja mikotoksina, od kojih su najznačajniji OTA, patulin, CIT i CPA. Pored štetnog utjecaja nekih od ovih vrsta plijesni na zdravlje ljudi, neke se pak vrste koriste u proizvodnji fermentiranih namirnica, poput sireva, trajnih mesnih proizvoda i desertnih vina, kao starter kulture plemenitih plijesni ili pak u proizvodnji antibiotika penicilina. Najčešće kulture plijesni koje se koriste u proizvodnji plemenitih sireva su *P. camemberti*, *P. roqueforti*, a kod antibiotika *P. chrysogenum* te *P. notatum* (Pleadin i sur., 2018; Samson i sur., 2019; Pitt i Hocking, 2009).

Među *Penicillium* vrstama, *P. nordicum* i *P. verrucosum* su dobro poznati producenti OTA u hladnijim temperaturnim regijama. *P. nordicum* može rasti pri niskim temperaturama (10 - 25 °C) te na supstratima sa visokom koncentracijom proteina i soli (5 %) upravo poput trajnih mesnih proizvoda. Iako je *P. verrucosum* češći kontaminant žitarica, također se pronalazi na mesnim proizvodima, te uz OTA može producirati i CIT. *P. verrucosum* optimalno raste pri 20 °C, dok mu je minimalan  $a_w$  za potreban za rast 0,80. Obje vrste obitavaju u arktičkim i umjerenim temperaturnim regijama. *P. verrucosum* i *P. nordicum* mogu producirati OTA u širokom temperaturnom rasponu (2 – 31 °C). Minimalni  $a_w$  za produkciju OTA je 0,85 (Pitt i Hocking, 2009). Značajan producent CIT je *P. citrinum*, plijesan koja se općenito smatra jednom od najčešćih vrsta plijesni, dok su konidiospore citrinina jedna od najčešćih spora u

zraku. Njegova sposobnost rasta na  $a_w$  nižoj od 0,80 i temperatura od 5 °C pomaže ovoj vrsti da osigura nišu u širokom rasponu staništa, a također često predstavlja jednu od zastupljenijih vrsta plijesni u mesnim proizvodima. *P. citrinum* može producirati CIT u rasponu temperature 15 – 37 °C, a optimalno pri 30 °C (Pitt i Hocking, 2009). Plijesan *P. commune* je još jedan dominantni kontaminant na različitim vrstama trajnih mesnih proizvoda, a sposobna je producirati CPA. *P. commune* ima sposobnost rasta pri temperaturama hladnjaka. Dokazano je da *P. commune* proizvodi CPA u temperaturnom rasponu od 12 - 30 °C te  $a_w$  većem od 0,90 na mesnom supstratu. Primarno je prepoznata kao uzročnik kvarenja sira, ali zabilježeno je i da je uzročnik senzorskih promjena tijekom zrenja šunki opisanih kao “*phenol-defect*” (Samson i sur., 2019; Pitt i Hocking, 2009).

### **2.2.2. Metode identifikacije plijesni**

Identifikacija plijesni objavljena u istraživanjima iz posljednjih dvadesetak godina većinom se temeljila na primjeni pojedinačnih metoda identifikacije, bilo tradicionalne odnosno isključivo morfološke ili isključivo molekularne identifikacije koristeći ITS (engl. *Internal Transcribed Spacer*) regiju. U manjem broju istraživanja korištena je kombinacija morfologije i molekularnih podataka. ITS regija se smatrala službenim DNA markerom za identifikaciju plijesni na razini vrste. Međutim, taksonomija toksikotvornih plijesni je komplicirana, osobito za plijesni roda *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* i *Fusarium*, čija je klasifikacija još u tijeku, a nove vrste se i dalje opisuju (Raja i sur., 2017). Posljednjih godina je preporučeno u identifikaciji toksikovornih plijesni koristiti polifazni pristup, koji je predložen u bakteriologiji 1996. godine, a koji uz tradicionalni opis makro- i mikro- morfoloških karakteristika, uključuje i molekularne metode identifikacije analizom karakterističnih genskih markera DNA (Frisvald, 2011).

#### **2.2.2.1. Tradicionalne metode identifikacije**

U tradicionalnoj identifikaciji plijesni koristi se morfologija, makromorfologija koja podrazumijeva kolonije na hranjivoj podlozi te mikromorfologija za fenotipske karakteristike kao što su strukture spora koje nastaju kao rezultat spolne i nespodne reprodukcije. Tradicionalna metoda identifikacije je bitna kako bi se razumjela evolucija morfoloških karakteristika i rutinski se koristi u istraživanjima taksonomije plijesni do razine roda, međutim, primjena ove metode nije dovoljna i pomoću nje ne može se uvijek sa sigurnošću provesti identifikacija plijesni na razini vrste. Identifikacija plijesni samo na temelju

morfološkije je izazovna budući da postoji ograničen broj morfoloških karakteristika koje se mogu upotrijebiti za identifikaciju. Dodatni problemi mogu biti, primjerice, što neki sojevi plijesni ne razvijaju uvijek ni fenotipske karakteristike na temelju kojih ih se može morfološki identificirati (Raja i sur., 2017). Isto tako, sojevi okarakterizirani u jednom laboratoriju mogu izgledati drukčije kada se uzgoje u drugom laboratoriju zbog npr. razlike u temperaturi, osvjetljenju, vlažnosti ili hranjivim tvarima, što otežava usporedbu među rezultatima različitih istraživanja (Visagie i sur., 2014), iako je utjecaj navedenih čimbenika smanjen standardizacijom tehnika pripreme medija, nacjepljivanja i inkubacije (Okuda i sur., 2000).

Za identifikaciju plijesni potrebno je pravilno izolirati čiste kulture s određene namirnice. Čiste kulture se potom nacjepljuju na izabrane standardne hranjive podloge u tri točke na kojima se određuju makroskopska svojstva poraslih kolonija poput: boje površine i poledine porasle kolonije, promjera, oblika i teksture kolonije, boje podloge, stupnja rasta, prisutnosti eksudata te porast pri različitim temperaturama (npr. 4 °C i 37 °C) (Samson i sur., 2019). Pri opisu kolonija plijesni koristi se specifična terminologija, uz upotrebu atlasa. Knjige Samson i sur. (2019) te Domsch i sur. (2007) mogu se koristiti za morfološku identifikaciju do razine roda. *Penicillium* i *Aspergillus* izolati uglavnom se nacjepljuju na hranjive podloge kao što su Czapekov agar (engl. *Czapek Yeast Extract Agar*, CYA), maltozni agar (engl. *Malt Extract Agar*, MEA), kreatinin saharozni agar (engl. *Creatine Sucrose Agar*, CREA) te zobeni agar (engl. *Oat Meal Agar*, OAT) (Frisvald, 2011; Samson i sur., 2019). *Penicillium* izolati mogu se morfološki identificirati do razine vrste uz pomoć Samson i sur. (2019), Pitt i Hocking (2009), Frisvald i Samson (2004) te Pitt (1979). *Aspergillus* izolati se mogu identificirati do razine vrste morfološki uz primjenu Samson i sur. (2019), Pitt i Hocking (2009), Samson i Varga (2007) te Raper i Fennell (1965). Za promatranje mikromorfoloških značajki plijesni najčešće se izrađuju mikroskopski preparati u laktofenolnom modrilu. Prilikom promatranja mikroskopskih preparata važno je uočiti oblik, boju i dimenzije stijenki, vezikula i metula (u slučaju da su prisutne), fialida te konidija.

Tradicionalna metoda identifikacije plijesni zahtijeva puno vremena te dobro poznavanje taksonomije plijesni. Čak i u slučaju velikog iskustva i stručnosti, identifikacija je uobičajeno teška za rodove plijesni poput *Penicillium* i *Aspergillus* koji sadrže velik broj blisko vezanih vrsta. Stoga je u sklopu polifaznog pristupa identifikacije plijesni, izolate potrebno potvrditi ili dodatno identificirati do razine vrste uz primjenu molekularnih metoda koje omogućavaju precizniju identifikaciju vrsta.

### 2.2.2.2. Molekularne metode identifikacije

Identifikacija na temelju DNA sekvenci danas se može smatrati standardom u identifikaciji vrsta plijesni. Ona podrazumijeva tzv. *DNA barcoding* gdje se nepoznata sekvenca uspoređuje sa bazom podataka sekvenci te se vrsta identificira na temelju sličnosti sekvenci, a može podrazumijevati i DNA taksonomiju gdje se nepoznata vrsta pokušava identificirati stavljajući je u evolucijski okvir sa drugim homolognim sekvencama iz baze kako bi se procijenio filogenetski odnos (Raja i sur., 2017).

Pojam sekvenciranja DNA podrazumijeva određivanje slijeda nukleotidnih baza, adenina (A), gvanina (G), citozina (C) i timina (T) DNA fragmenata. Da bi se dobila DNA sekvenca, prethodno je potrebno genomsku DNA ekstrahirati iz stanica plijesni te nakon toga lokus od interesa umnožiti lančanom reakcijom polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). PCR produkti se po potrebi provjeravaju elektoroforezom i pročišćavaju te potom sekvenciraju kako bi se dobile DNA sekvence koje se uspoređuju sa drugim poznatim sekvencama istog lokusa u bazama podataka. Odabir lokusa odnosno genskog markera ili ciljane sekvence specifične za toksikotvorne plijesni predstavlja ključan korak prije početka analize. U identifikaciji vrsta plijesni mogu se koristiti različiti lokusi, ali dobar genski marker treba imati dovoljnu varijabilnost kako bi omogućio identifikaciju vrsta, ali sa niskom razinom varijacije unutar vrste te baze podataka s kojima se može usporediti (Samson i sur., 2019).

PCR metode su u širokoj upotrebi posljednjih desetljeća za najšire rasprostranjenje toksikotvorne kontaminante koji pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*, a također i *Alternaria*, *Claviceps*, *Monascus* i dr. PCR strategija promatra se u sklopu dva glavna komplementarna pristupa: ciljajući konzervirane funkcionalne gene ili regije od taksonomskog interesa ili se usmjeravajući na gene koji sudjeluju u proizvodnji mikotoksina (Munaut i Van Hove, 2011).

#### Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR je kao molekularna metoda razvijena 1985. godine za *in vitro* umnažanje specifičnih odsječaka DNA (Munaut i Van Hove, 2011). Za provođenje PCR reakcije potrebne su jednolančane oligonukleotidne početnice (engl. *primer*) koje su komplementarne početnom i završnom dijelu sekvence DNA koja se želi umnožiti. Početnice su DNA odsječci sastavljeni od 20-ak nukleotida čiji je redoslijed specifičan za određeni mikroorganizam. Za PCR reakciju potrebna su i sva četiri deoksiribonukleotid fosfata (deoksiadenozin trifosfat - dATP,



deoksiguanozin trifosfat - dGTP, deoksicitidin trifosfat - dCTP i deoksitimidin trifosfat - dTTP) te enzim DNA polimeraza (najčešće se koristi DNA polimeraza iz bakterije *Thermus aquaticus* - Taq polimeraza). PCR reakcija provodi se u PCR uređaju (engl. *thermocycler*) koji zagrijava i hladi uzorke na način da postižu temperature karakteristične za svaki korak PCR reakcije. PCR je ciklički postupak koji započinje denaturacijom ciljne DNA zbog zagrijavanja reakcijske smjese na temperaturu od 95 °C kako bi se aktivirale polimeraze. Zatim slijedi sniženje temperature na 55 °C kako bi se početnice mogle vezati za svoje komplementarne sekvence na odvojenim jednolančanim uzvojnica ciljne DNA. Povišenjem temperature na 72 °C se termostabilna DNA polimeraza ugrađuje u novi lanac DNA. Ponavljanjem ciklusa zagrijavanja i hlađenja, multiplicira se traženi DNA odsječak. Uobičajeni broj ciklusa denaturacije, vezanja početnica na kalup i produljivanja DNA kreće se od 20 – 40, u kojima količina umnožene DNA eksponencionalno raste. U konačnici nastaje  $2^n$  kopija odsječka DNA, gdje „n“ predstavlja broj ciklusa. Uspješnost PCR reakcije provjerava se elektroforezom (Katušić Hećimović, 2007).

Postoje inačice PCR-a poput višestrukog PCR-a koji omogućava istovremeno umnožavanje dva ili više odsječaka DNA u pojedinoj PCR reakciji smanjujući na taj način broj reakcija koje trebaju biti provedene ili PCR-a u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*) koji podrazumijeva praćenje PCR umnožavanja tijekom cijele reakcije te ne zahtijeva vizualizaciju elektroforezom (Katušić Hećimović, 2007).

### **i) PCR detekcija pomoću konzerviranih gena**

- ***Ribosomska DNA - ITS regija***

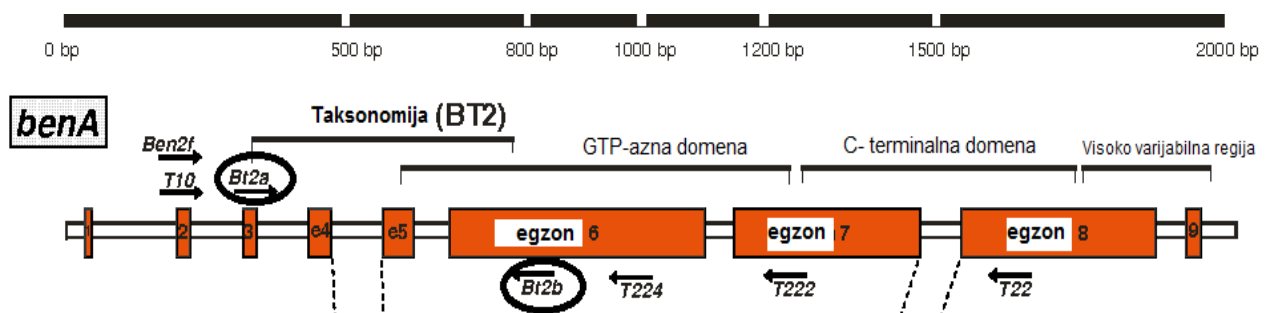
Upotreba molekularnih podataka za identifikaciju plijesni započela je prije više od dva desetljeća sa istraživanjem White i sur. (1990) koje opisuje početnice nuklearnog ribosomskog operona plijesni. ITS regija podrazumijeva slijed nukleotida ponavljajućih slijedova nekodirajuće DNA smještenih između male i velike podjedinice ribosomske RNA (rRNA). Sastoji se od dva segmenta ITS1 i ITS2 podijeljena sa 5.8S rDNA. Postoji velik broj istraživanja u kojima je sekvenciran ovaj lokus te posljedično i veliki broj referentnih sekvenci koje su prisutne u bazama podataka, iako one mogu biti i netočne. Također, ograničavajući faktor primjene ove regije je loša rezolucija za identifikaciju vrsta nekih rodova plijesni sa velikim brojem vrsta poput *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Trichoderma*. ITS regija se stoga pokazala kao pomoć u identifikaciji, ali ne i dovoljno informativnom za točnu identifikaciju vrsta unutar ovih rodova plijesni zbog

nedostatne varijabilnosti. ITS regija svakako može biti dobra početna točka u identifikaciji potpuno nepoznatog izolata plijesni (Samson i sur., 2019; Raja i sur., 2017).

- **Geni koji kodiraju za proteine**

Općenito najčešće korišteni su elongacijski faktor 1-alpha (TEF1 $\alpha$ ), kalmodulin (CaM, engl. *CALcium ModuLated proteIN*),  $\beta$ -tubulin (BenA, tub2) (slika 4), aktin (Act) te druga najveća podjedinica RNA polimeraze (RPB2). Ovi geni imaju veću varijabilnost među vrstama u odnosu na ITS regiju i često sadrže introne koji su visoko varijabilni, što ih čini dobrim odabirom za identifikaciju vrsta. Odabir gena ovisi o samom organizmu odnosno rodu plijesni pa se tako za identifikaciju *Penicillium* vrste preporuča regija  $\beta$ -tubulina, a za *Aspergillus* vrste regija kalmodulina ili obje (Samson i sur., 2019).

$\alpha$ - i  $\beta$ -tubulin su dvije podjedinice od 55 kDa koje su u ekvimolarnim količinama sastavni dio mikrotubula, glavnih elemenata citoskeleta pronađenih u svim eukariotskim stanicama te imaju ključnu ulogu u nekoliko vitalnih staničnih mehanizama kao što je segregacija kromosoma u mitozu, unutarstanični transport, cilijarno i flagelarno vezivanje te strukturna potpora citoskeleta. Geni koji kodiraju za  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulin imaju određene evolucijske razlike u sekvencama između rodova i vrsta pa se mogu koristiti u svrhu taksonomije (Munaut i Van Hove, 2011).



**Slika 4.** Prikaz *benA* regije  $\beta$ -tubulina kod vrste *A. aculeatus* te položaj početnica Bt2a i Bt2b (modificirano prema Hubka i Kolarik, 2012)

**Kalmodulin** je protein koji veže kalcij te je eksprimiran u svim eukariotskim stanicama gdje sudjeluje u signalnim putevima koji reguliraju mnoge neophodne procese kao što su rast, proliferacija i kretanje. Kalmodulin je 17 kDa protein s četiri mjesta vezivanja za Ca<sup>2+</sup>. Pripada skupini obitelji “EF šaka” proteina. “EF šaka” nastaje iz slijeda uzvojnica-petlja-uzvojnica te je mjesto vezivanja Ca<sup>2+</sup> iona u mnogim proteinima koji su osjetljivi na promjene koncentracije kalcija. Protein je relativno malen, a evolucijski visoko konzerviran što gen koji

kodira za ovaj protein čini dobrim izborom za taksonomske i filogenetske studije, odnosno, PCR testove (Chin i Means, 2000).

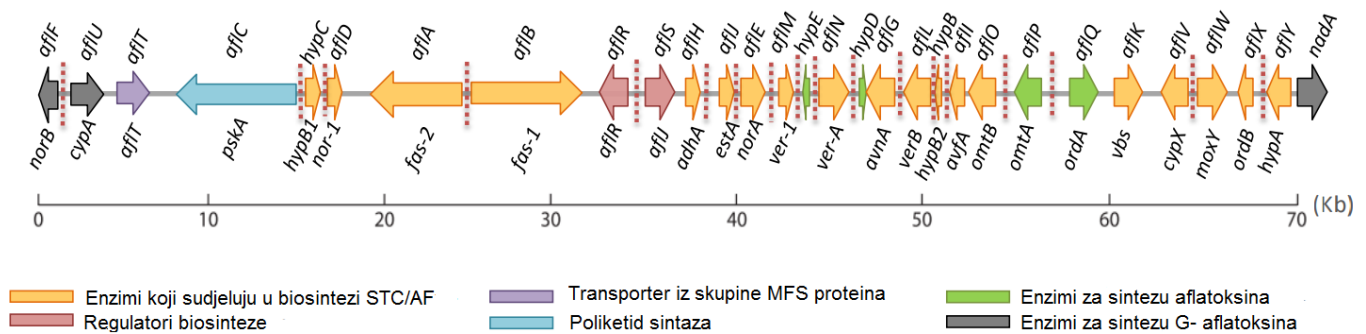
## ii) PCR detekcija pomoću gena uključenih u biosintezu mikotoksina

Za potrebu brze identifikacije toksikotvornih plijesni koje kontaminiraju hranu istraživanja su usmjerena na razvoj osjetljivih i specifičnih metoda detekcije uz pomoć PCR umnožavanja jednog ili više gena koji kodiraju za enzime ili regulatorne faktore uključene u biosintezu mikotoksina. Međutim, za većinu mikotoksina biosintetski putevi nisu potpuno okarakterizirani pa su tako i geni koji kodiraju za enzime uključene u biosintezu ovih sekundarnih metabolita slabije poznati (Munaut i van Hove, 2011).

Iako je OTA jedan od značajnijih mikotoksina, njegov put biosinteze nije još potpuno razjašnjen. Klaster gena za biosintezu OTA koji uključuje gen koji kodira za alkalni serin proteazu (ASP), OTA neribosomsku peptid sintazu (NRPS) te jedan dio gena koji kodira za OTA poliketid sintazu (PKS) identificirani su kod vrste *P. nordicum* (Geisen i sur., 2006). Pronađeno je da je PKS gen kod *A. ochraceus* eksprimiran zajedno sa 2 gena za P450 monooksigenaze, što upućuje na njihovu uključenost zajedno sa PKS u biosintezu OTA (O'Callaghan i sur., 2006). Geisen i sur. (2004) koristili su degenerativne početnice kako bi detektirali i okarakterizirali dio gena OTA PKS kod *P. nordicum*. Pokazalo se da ova metoda PCR-a u stvarnom vremenu sa početnicama koje generiraju fragment od 500 pb OTA PKS omogućava specifičnu detekciju te praćenje produkcije OTA kod *P. nordicum*, ali daje negativne rezultate s drugim *Penicillium* i *Aspergillus* vrstama koje su potencijalni OTA producenti, kao što su *P. verrucosum*, *A. carbonarius*, *A. niger* te *A. ochraceus*. Dao i sur. (2005) su dizajnirali dva seta specifičnih početnica DNA sekvence PKS gena iz *A. ochraceus* koji umnaža specifičnu regiju bilo iz OTA (*A. carbonarius*, *A. melleus*, *A. ochraceus* i *P. verrucosum*) ili CIT (*P. citrinum*, *M. ruber*) producenata.

Sinteza aflatoksina temelji se na kompleksnom biosintetskom putu koji uključuje najmanje 25 strukturnih te 2 regulatorna gena. Put biosinteze sterigmatocistina dijeli homologne gene izuzev zadnjeg koraka pretvorbe sterigmatocistina u aflatoksine (Yu i sur., 2004). Klaster gena za biosintezu aflatoksina i sterigmatocistina prikazan je na slici 5. Koristeći početnice dizajnirane na *aflD* (*nor-1*), *aflM* (*ver-1*) te *aflP* (*omtA*) genima, razvijen je tripleks PCR koji daje uzorak od tri vrpce kod aflatoksin producirajućih sojeva *A. favus* i *A. parasiticus* te također i sterigmatocistin- producirajuće plijesni *A. versicolor* (Geisen, 1996). Slično su i kod kvadrupleks PCR-a sa 4 seta početnica za *aflD* (*nor-1*), *aflM* (*ver-1*), *aflP* (*omtA*) te *aflR* gene

Criseo i sur (2001) pokazali kako aflatoksikogeni sojevi daju četverostruki uzorak. U oba istraživanja, ne-aflatoksikogeni sojevi su dali različite rezultate sa jednom, dvije, tri ili čak i četiri vrpce, tako da se nisu mogli razlikovati od producirajućih sojeva, te je zaključeno da je potrebno razviti tehnike kojima bi bila omogućeno potpuno razlikovanje producirajućih i ne-producirajućih sojeva. Yang i sur. (2004) su opisali uspješnu primjenu multipleks PCR za detekciju potencijanih aflatoksikogenih vrsta koristeći početnice za 3 biosintetska gena *aflI* (*avfA*), *aflM* (*ver-1*) i *aflP* (*omtA*) uz ITS regiju kao pozitivnu kontrolu. Četiri DNA fragmenta su umnožena kod svih aflatoksikogenih *A. flavus* i *A. parasiticus* sojeva. Istraživanje je također pokazalo kako niti jedan od ne-aflatoksikogenih sojeva *A. flavus* i *A. oryzae* nije imao sve fragmente, upućujući na to da su različiti tipovi mutacija doveli do inaktivacije aflabiosintetskog puta.



**Slika 5.** Shematski prikaz klastera gena za biosintezu aflatoksina/sterigmatocistina uključujući stariju i noviju nomenklaturu (modificirano prema Caceres i sur., 2020)

Utvrđeno je i da se uz klaster gena za sintezu aflatoksina kod vrsta *A. flavus* i *A. oryzae* nalazi i klaster gena za sintezu CPA. U tom klasteru karakterizirana su tri gena: *maoA* koji kodira za monoamin sintazu, *dmaT* koji kodira za dimetilaliltriptofan sintazu i *pks-nrps* koji kodira za hibrid poliketid sintazu-neribosomsku peptid sintazu (Chang i sur., 2009). PCR metoda u stvarnom vremenu koja umnaža *dmaT* gen pokazala se efikasnom u određivanju plijesni koje mogu producirati CPA u hrani (Rodriguez i sur., 2012a).

### Baze podataka – sekvenci

Dobivena sekvenca specifičnog izolata plijesni se uspoređuje sa drugim sekvencama u javnim bazama podataka, od kojih su one najpoznatije navedene u tablici 1. Od navedenih jedino GenBank sadrži podatke sa regijama  $\beta$ -tubulina i kalmodulina, dok se ostale baze uglavnom temelje na ITS regiji. Pristup na kojem se temelji interpretacija sličnosti sekvence je pomoću

tzv. "percent identity score". Točna identifikacija plijesni na temelju DNA sekvenci ovisi o količini podataka odnosno sekvenci u bazama podataka. U grubo rečeno, postoje dva tipa rezultata, ili je sekvenca 100 % identična jednoj ili više sekvenci iz baze ili to nije. Ako je sekvenca od upita 100 % identična sekvenci iz baze to je indikacija da su vrste iste. Ako postoji manje od 100 % podudaranosti, nekoliko je načina za tumačenje rezultata (Samson i sur., 2019). Prema Geiseru i sur. (2004), rezultati se tada mogu interpretirati na slijedeći način: i) sekvenca od upita može biti alel poznate vrste - u tom će slučaju usporedba sekvenci dati također podatke blisko vezanih vrsta; ii) sekvenca predstavlja poznatu vrstu, ali nema podataka o sekvenciranom lokusu ove vrste u javnim bazama podataka; iii) sekvenca od upita predstavlja novu vrstu te iv) sekvenca od upita odgovara vrsti koja je trenutno slabo opisana.

**Tablica 1.** Popis baza podataka za identifikaciju vrsta plijesni (Raja i sur., 2017; Samson i sur., 2019)

Ime baze podataka	URL
Barcode of Life Database, BOLD	<a href="http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine">http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine</a>
CBS-KNAW	<a href="http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICSSequences.aspx">http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICSSequences.aspx</a>
Fusarium-ID	<a href="http://isolate.fusariumdb.org">http://isolate.fusariumdb.org</a>
Fungal barcoding	<a href="http://www.fungalbarcoding.org">http://www.fungalbarcoding.org</a>
RefSeq Target Loci (RTL)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/</a>
ISHAM, The international society for Human and Animal Mycology	<a href="http://its.mycologylab.org">http://its.mycologylab.org</a>
GenBank	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/</a>

### 2.3. Mikotoksini

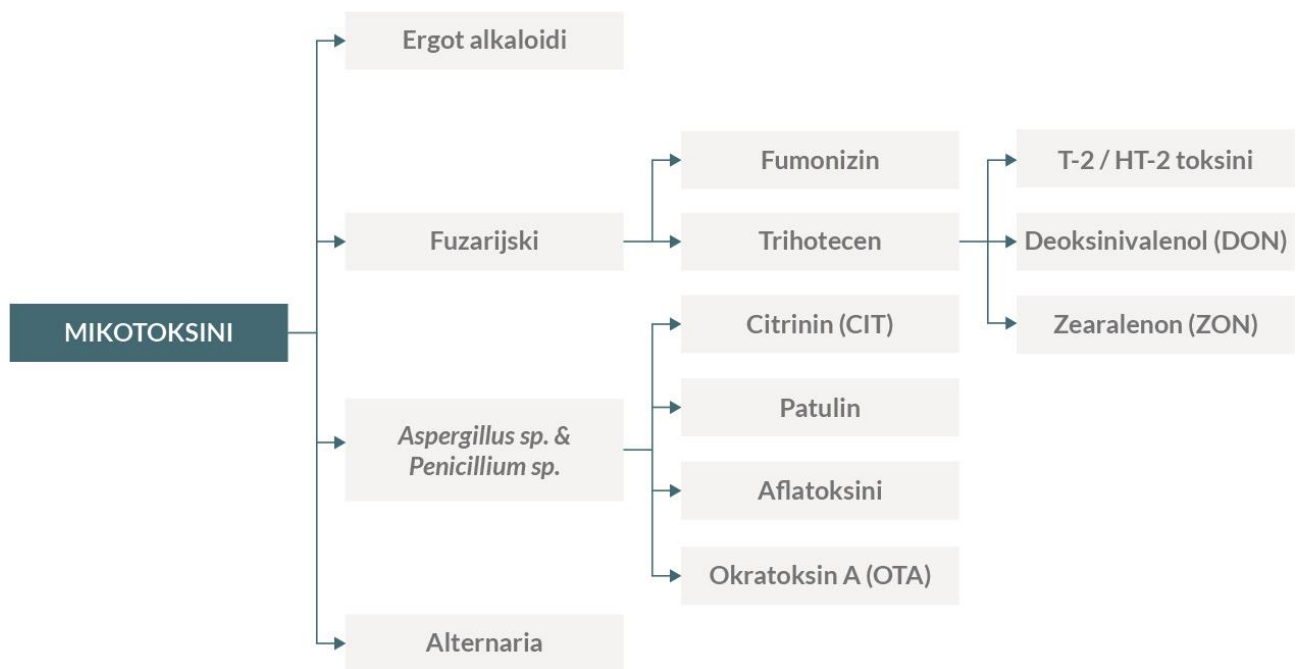
Mikotoksini (grč. *myces* = gljiva, *toxicon* = otrov) su sekundarni metaboliti plijesni, kemijski spojevi niske molekularne mase ( $M_r < 700$ ) koji se razlikuju svojom kemijskom strukturom, sintetskim putem, podrijetlom i biološkim učincima u živim organizmima. Do danas je identificirano oko 300 vrsta toksikotvornih plijesni koje sintetiziraju preko 1000 različitih mikotoksina i njihovih metabolita (Delaš, 2010).

U prehrambeni lanac ljudi i životinja mikotoksini ulaze putem hrane. Glavni izvor mikotoksina kod ljudi predstavljaju različite žitarice i proizvodi na bazi žitarica, začini,

orašasti plodovi te proizvodi životinjskog podrijetla, kao što su meso i mesni proizvodi te mlijeko i mliječni proizvodi. Kontaminacija namirnica mikotoksinima započinje još na polju i moguća je u svim fazama proizvodnje „od polja do stola“, uključujući skladištenje. Mikotoksini uneseni u organizam izazivaju bolesti nazvane mikotoksikozama, čija težina ovisi o toksičnosti mikotoksina, opsegu izloženosti, dobi i nutritivnom statusu pojedinca te mogućim synergističkim učincima više različitih mikotoksina (Pleadin i sur., 2018).

Upravo zbog velike raznolikosti, jedinstvena sistematizacija mikotoksina nije moguća, ali ih se može podijeliti s obzirom na vrstu plijesni koja ih proizvodi (aspergillus i penicilium toksini, fuzarijski toksini, alternaria toksini), kemijsku strukturu (npr. kumarini, laktoni, seskviterpeni), način djelovanja u organizmu (hepatotoksični, nefrotoksični, citotoksični, imunotoksični te estrogene) te prema mjestu nastanka, odnosno podrijetlu (mikotoksini polja te mikotoksini skladištenja) (Pleadin i sur., 2018).

Najznačajnije skupine i vrste mikotoksina koje kontaminiraju hranu prikazane su na slici 6.

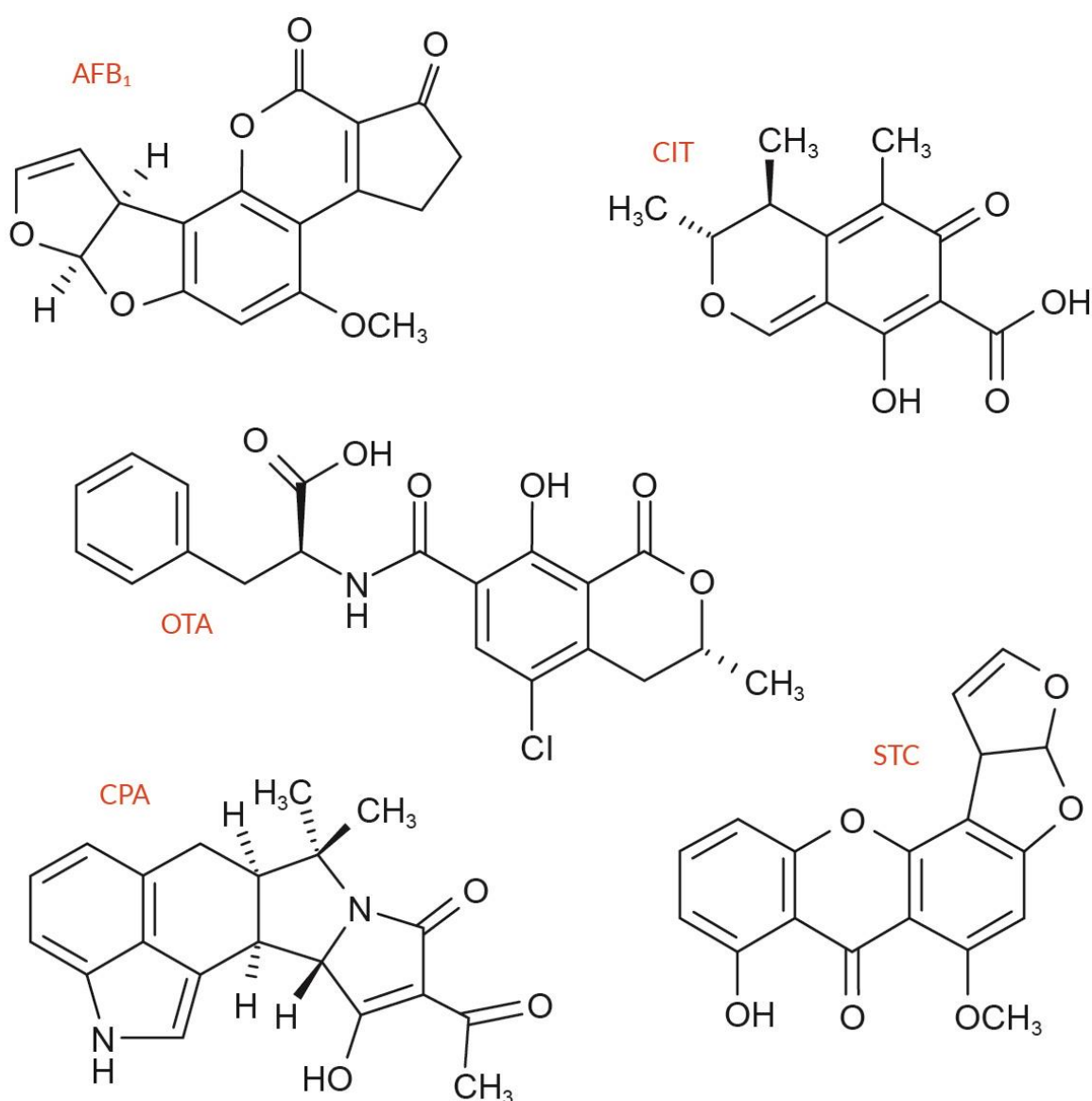


**Slika 6.** Prikaz najznačajnijih skupina mikotoksina

### 2.3.1. Mikotoksini u tradicionalnim mesnim proizvodima

Mikotoksini koji općenito imaju najveći javnozdravstveni značaj s obzirom na njihovu toksičnost i pojavnost u mesu i mesnim proizvodima su AFB<sub>1</sub> i OTA. Utvrđeno je da je OTA dominantni kontaminant mesnih proizvoda, dok se AFB<sub>1</sub> pojavljuje s manjom učestalošću i u

manjim koncentracijama (Markov i sur., 2013; Pleadin i sur., 2015a; Zdravec i sur., 2019; Roncanda i sur., 2020). Osim AFB<sub>1</sub> i OTA, neke vrste plijesni pronađene na površini TMP, mogu producirati i mikotoksine kao što su CIT, CPA i STC (Zdravec i sur., 2019) (slika 7), no njihov utjecaj na kvalitetu i sigurnost mesnih proizvoda, te posljedično i na ljudsko zdravlje, još uvijek nije dovoljno istražen (Bailly i Guerre, 2009). Spoznaje o pojavnosti i izloženosti potrošača CIT, STC i CPA su nedvojbeno nedostatne, iako su i ovi mikotoksini dokazano toksični (Bailly i Guerre, 2009; EFSA, 2012; EFSA, 2013). Literaturno je opisana i moguća zajednička pojavnost CIT i OTA te AFB<sub>1</sub> i STC, odnosno AFB<sub>1</sub> i CPA, u različitim namirnicama (EFSA, 2012; EFSA, 2013; Ostry i sur., 2018).



**Slika 7.** Strukture mikotoksina koji se mogu naći u mesnim proizvodima: AFB<sub>1</sub> - aflatoksin B<sub>1</sub>, OTA - okratoksin A, CIT – citrinin, STC – sterigmatocistin, CPA – ciklopiazonična kiselina (modificirano prema Pleadin i sur., 2018)

Budući da neka istraživanja pokazuju prisutnost STC u začinima te hrani za životinje, postoji i mogućnost takve neizravne kontaminacije mesa i proizvoda od mesa ovim mikotoksinom. Prvi podatak o STC u začinima odnosio se na začine iz Indije, gdje je STC detektiran u crnom papru (105 - 125 µg/kg) te komoraču (142 µg/kg) (Saxena i Mehrotra, 1989). Također, STC kao prekursor AFB<sub>1</sub> i sekundarni metabolit plijesni rodova *Aspergillus* i drugih, može i izravno kontaminirati mesne proizvode.

Budući da su pojedini autori u svojim ranijim studijama istaknuli moguću pojavnost CPA u mesnim proizvodima čak i u vrlo visokim koncentracijama, u posljednjem desetljeću istraživanja su usmjerena na razvoj osjetljivih analitičkih metoda za analizu CPA te je i potvrđena pojavnost ovog mikotoksina u visokim koncentracijama u pojedinim vrstama mesnih proizvoda (Bailly i sur., 2005; Bailly i Guerre, 2009; Alapont i sur., 2014; Vulić i sur., 2021). U analiziranoj hrani, CPA se često pojavljuje zajedno sa aflatoksinima ili drugim mikotoksinima te je iz tog razloga EFSA CONTAM Panel naglasio važnost za procjenom istovremene izloženosti CPA i AFB<sub>1</sub> (Ostry i sur., 2018).

Nastanak mikotoksina je također klimatski uvjetovan, tako da njihova pojavnost može varirati po godinama proizvodnje TMP. Nepredvidive vremenske prilike i učestala pojavnost različitih bolesti porijeklom iz hrane, koje uzrokuju mikotoksini i ostali kontaminanti uvjetovani promjenom klime, negativno utječu na produktivnost poljoprivrede i narušavaju globalnu dostupnost zdravstveno ispravne hrane. Utjecaj klimatskih promjena na nastanak mikotoksina je teško predvidjeti zbog kompleksnog međudjelovanja različitih faktora (Pleadin i sur., 2020).

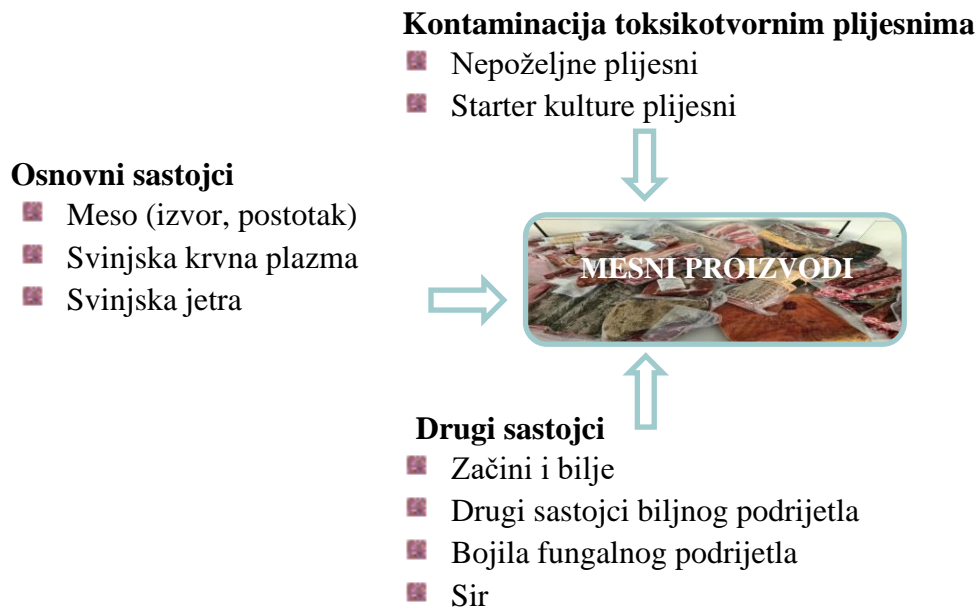
Koncentracije mikotoksina određene u ranijim istraživanjima hrvatskih tradicionalnih mesnih proizvoda te u mesnim proizvodima iz drugih zemalja prikazane su u tablici 2.



**Tablica 2.** Pojavnost mikotoksina u mesnim proizvodima

Vrsta proizvoda	Mikotoksin	Br. analiziranih uzoraka	% pozitivnih uzoraka	Raspon koncentracija ( $\mu\text{kg}^{-1}$ )	Zemlja	Referenca
Kobasice	AFB <sub>1</sub>	10	0	< LOD i LOQ	Španjolska	Bernáldez i sur., 2013
	OTA	10	0	< LOD i LOQ		
Kobasice	AFB <sub>1</sub>	150	0,6	7	Egipat	Aziz i Youssef, 1991
Kobasice	OTA	100	45	7 - 8	Italija	Iacumin i sur., 2009
Slavonski kulen		99	41	1,82 - 17,00	Hrvatska	Pleadin i sur., 2015c
Parma		22	4	56 - 158	Danska	Sorensen i sur., 2010
Trajne kobasice		450	24	0,11 - 625,7	Italija	Iacumin i sur., 2011
Trajne kobasice		96	25 ovitaka	0,25 - 98,52	Italija	Roncada i sur., 2020
Fermentirani mesni proizvodi		OTA	90	64	1,23 – 7,83	Hrvatska
	CIT	4		1,0 – 1,3		
	AFB <sub>1</sub>	10		1,0 - 3,0		
Tradicionalni mesni proizvodi	AFB <sub>1</sub>	410	do 11	do 1,69	Hrvatska	Pleadin i sur., 2015a
	OTA		do 20	do 9,95		
Tradicionalni mesni proizvodi	AFB <sub>1</sub>	160	8	do 1,92	Hrvatska	Zadravec i sur., 2020
	OTA		14	do 6,86		
Trajne kobasice	OTA	88	15	do 0,48	Hrvatska	Kudumija i sur., 2020
	AFB <sub>1</sub>	88	0	< LOD		
Pršuti	CPA	61	44	36 - 540	Španjolska	Peromingo i sur., 2018
Trajne kobasice		47	15	2,55 - 59,80	Hrvatska	Vulić i sur., 2021

Mikotoksini se u TMP mogu naći izravnim putem, kao posljedica produkcije toksikotvorne plijesni ili putem tzv. *carry-over* efekta, odnosno prijenosom od mesa domaćih životinja koje su konzumirale krmiva ili krmne smjese onečišćene mikotoksinima, te neizravnim putem preko kontaminiranih začina i drugih sirovina koje se koriste u njihovoj proizvodnji (Pleadin i sur., 2021) (slika 8).



**Slika 8.** Izvori kontaminacije mesnih proizvoda mikotoksinima

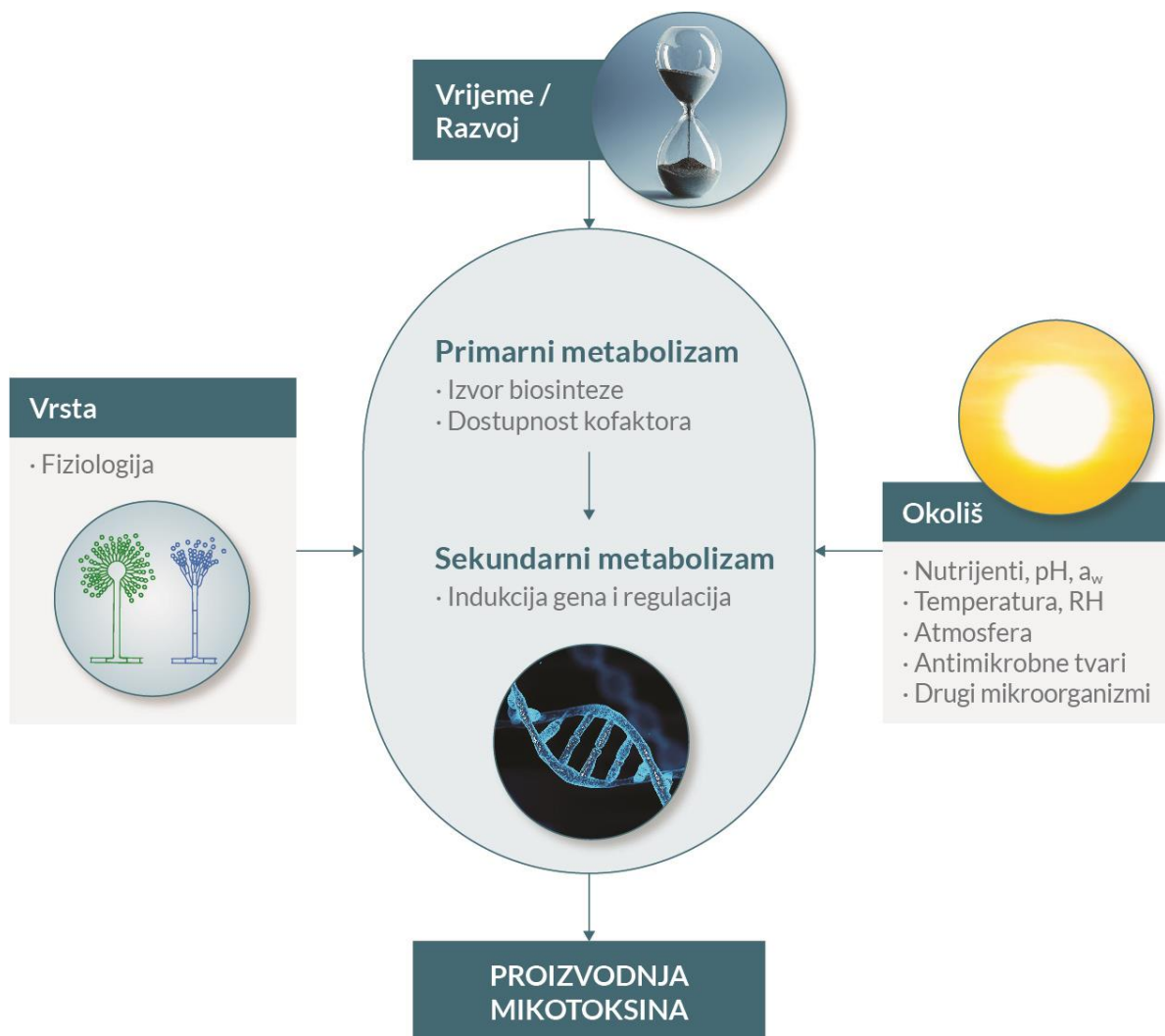
### ***Kontaminacija mikotoksinima kao posljedica produkcije plijesni***

Brojna istraživanja su pokazala da su mikotoksini pronađeni u TMP u najvećoj mjeri posljedica proizvodnje toksikotvornih vrsta površinskih plijesni rodova *Penicillium* i *Aspergillus* (Comi i sur., 2004; Iacumin i sur., 2009; Asefa i sur., 2010; Iacumin i sur., 2011). Međutim, rast toksikotvornih plijesni ne znači nužno da su mikotoksini prisutni u namirnici, a isto tako, odsutnost vidljivih plijesni ne znači da nema prisutnih mikotoksina (Pleadin i sur., 2018). Na proizvodnju mikotoksina u mesnim proizvodima utječu različiti biološki i okolišni čimbenici (slika 9) (Sørensen i sur., 2009).

Površinske plijesni produciraju mikotoksine pod određenim uvjetima proizvodnje i pohrane, i to temperature, pH vrijednosti,  $a_w$ , oštećenja ovitka, prisutnosti kože, pukotina te nedostatnog pranja i četkanja površine TMP odnosno nekontroliranog rasta plijesni (tablica 3) (Iacumin i sur., 2009; Asefa i sur., 2011; Rodríguez i sur., 2012b; Zadravec i sur., 2019). Uvjeti proizvodnje mogu utjecati izravno ili neizravno na nastanak mikotoksina, ili utječući na sam

rast i razvoj plijesni, na dostupnost prekursora potrebnih u biosintezi ili na ekspresiju i aktivnost enzima uključenih u biosintetski put (Sørensen i sur., 2009).

Produkcija mikotoksina ovisi o klimatskim čimbenicima koji su karakteristični za određeno geografsko područje, a variraju na godišnjoj razini. Interakcija klimatskih promjena, kao što je povišena koncentracija ugljičnog dioksida, porast temperature te ekstremne izmjene kišnih i sušnih razdoblja, imaju značajan utjecaj na rast plijesni i pojavu mikotoksina (Pleadin i sur., 2020). Optimalna temperatura za proizvodnju većine mikotoksina je između 20 – 30 °C, a  $a_w$  iznad 0,65 (Pleadin i sur., 2018).



**Slika 9.** Čimbenici koji mogu utjecati na proizvodnju mikotoksina (modificirano prema Sørensen i sur., 2009)

**Tablica 3.** Raspon aktiviteta vode ( $a_w$ ) i temperature za produkciju mikotoksina u mesnim proizvodima (prema Sørensen i sur., 2009; Pleadin i sur., 2021)

Mikotoksin	Vrsta plijesni	Temperatura (°C)	Aktivitet vode ( $a_w$ )
Aflatoksin B <sub>1</sub>	<i>A. flavus</i> / <i>A. parasiticus</i>	12 - 35	≥ 84
Oktratoksin A	<i>A. ochraceus</i> / <i>A. niger</i>	10 - 35	≥ 87 / ≥ 90
	<i>P. nordicum</i>	15 - 30	-
	<i>P. verrucosum</i>	2 - 34	≥ 85
Citrinin	<i>P. citrinum</i>	15 - 37	-
Ciklopiazonična kiselina	<i>P. commune</i>	12 - 30	≥ 90

Citrinin mogu sintetizirati plijesni iz roda *Penicillium* od kojih uz najznačajniju *P. citrinum* mogu i *P. verrucosum*, *P. expansum* te *P. notatum*, ali i plijesni roda *Monascus*, poput *Monascus ruber* i *M. purpureus* te vrste roda *Aspergillus*. Pokazalo se da je *P. citrinum* producirala CIT nakon 4 dana inkubacije pri 20 °C na šunkama, pri čemu je koncentracija nakon 16 dana bila 1330 mg/kg, dok se standard ovog mikotoksina se nije pokazao stabilnim na površini trajnih šunki (Bailly i sur., 2005).

AFB<sub>1</sub> proizvode uglavnom *Aspergillus* vrste poput najznačajnije *A. flavus* te *A. parasiticus* ili *A. nominus* te se stoga u većim koncentracijama nalaze u tropskim i subtropskim područjima. Također, duga sušna razdoblja tijekom godine pogoduju produkciji aflatoksina.

STC poput njegovog prekursora AFB<sub>1</sub> također najčešće sintetiziraju plijesni roda *Aspergillus*, a uz najznačajnijeg producenta *A. versicolor* mogu ga producirati i *A. flavus*, *A. parasiticus* te *A. nidulans*. Plijesni koje imaju sposobnost biosinteze STC broje oko 55 vrsta, a u njih uz *Aspergillus* spadaju i rodovi *Emericella*, *Chaetomium*, *Botryotrichum* i *Humicola*.

CPA uglavnom sintetiziraju plijesni iz roda *Penicillium* kao što su *P. griseofulvum*, *P. camemberti*, *P. commune*, *P. dipodomyicola* te *Aspergillus* poput *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii*. Pokazano je da se izolati *A. flavus* razlikuju s obzirom na sposobnost proizvodnje CPA (Kiš i sur., 2019). Alapont i sur. (2014) su u istraživanju prirodne mikroflore tradicionalnog španjolskog pršuta izolirali 33,7 % sojeva plijesni koje produciraju CPA, od čega su 66,6 % činili sojevi *P. commune*. U tom istraživanju se također za 2 od 5 analiziranih sojeva *P. polonicum*, pokazalo da su visoko toksikotvorni i sposobni producirati CPA, međutim, za to je potrebno sakupiti još dokaza. Inokulacijom *P. griseofulvum* na trajnim kobasicama došlo je do značajne proizvodnje CPA pri nižim temperaturama (npr. 12 °C). Proizvodnja CPA je je tijekom procesiranja kobasica rasla vjerojatno kao posljedica otpuštanja slobodnih aminokiselina, kao što je triptofan, izravni CPA prekursor. Smanjenjem

$a_w$  ispod 0,85 u trajnim šunkama reducirala se proizvodnja CPA kod *P. griseofulvum* (Peromingo i sur., 2019).

### ***Kontaminacija mikotoksinima putem začina***

U mesnoj industriji koriste se različiti začini kako bi mesnim proizvodima dali karakterističan okus, među kojima se u svijetu uobičajeno koriste crveni, bijeli i crni papar, slatka i ljuta paprika, senf, češnjak, papar, lovor, ružmarin i cimet. Poznato je da se začini uglavnom uvoze iz zemalja u razvoju s tropskom i/ili suptropskom klimom, gdje uvjeti poput visokih temperatura, obilnih oborina i vlage često potiču rast plijesni i proizvodnju mikotoksina odnosno dovode do onečišćenja začina mikotoksinima (Pickova i sur., 2020; Pleadin i sur., 2021). Vrste roda *Penicillium* i *Aspergillus* su najčešći kontaminanti na začinima, kao i na mesnim proizvodima (slika 10).

Nadalje, začini se obično suše na tlu na otvorenom u lošim higijenskim uvjetima koji još više potiču razvoj plijesni i proizvodnju mikotoksina (Mandeel, 2005). U začinima koji se najčešće koriste u mesnoj industriji, poput paprike i crnog papra zabilježene su visoke razine AFB<sub>1</sub> (155,7 µg/kg; 75,8 µg/kg) (Gambacorta i sur., 2018) i OTA (177,4 µg/kg; 79,0 µg/kg) (Gambacorta i sur., 2018; Pleadin i sur., 2015c). S druge strane, iako začini mogu biti izvor kontaminacije mikotoksinima, u isto vrijeme neki začini mogu inhibirati rast plijesni (Pleadin i sur., 2021).



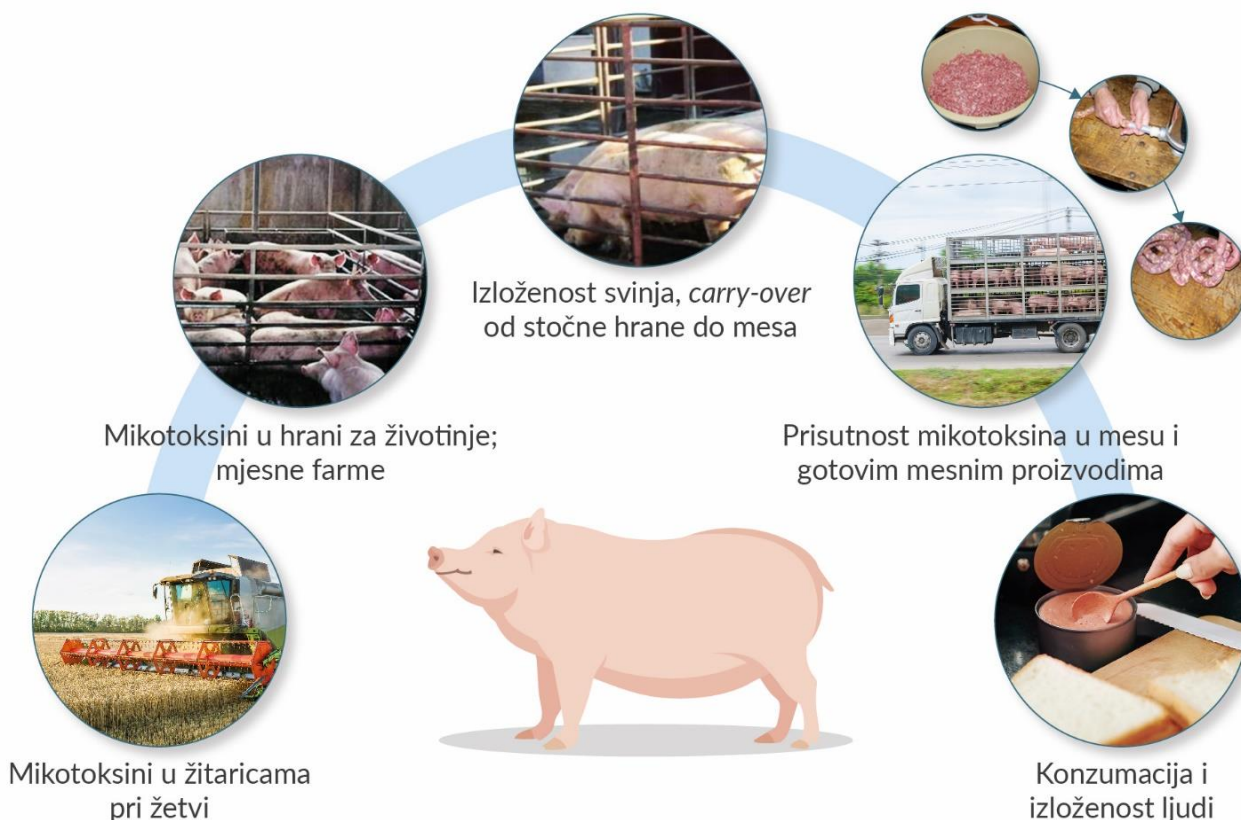
**Slika 10.** Kontaminacija trajnih mesnih proizvoda mikotoksinima putem začina (modificirano prema Pleadin i sur., 2021)

### ***Kontaminacija mikotoksinima carry-over efektom***

Pojam *carry-over* definiran je kao prijelaz neželjenih spojeva iz kontaminirane hrane za životinje u hranu životinjskog podrijetla. Prirodna kontaminacija žitarica i hrane za životinje mikotoksinima često je zabilježena u svijetu (Binder i sur., 2007), a također su i mnoga istraživanja pokazala da prisutnost mikotoksina u hrani životinjskog podrijetla može nastati kao posljedica hranjenja domaćih životinja kontaminiranom hranom tijekom proizvodnog procesa (Pleadin i sur., 2013a; Perši i sur., 2014). S obzirom na funkciju u organizmu, općenito se kod farmskih životinja mogu vidjeti veći omjeri prijenosa mikotoksina (OTA) u tkivo jetre i bubrega u usporedbi s drugim organima ili mišićnim tkivom.

Kada se životinje hrane kontaminiranom hranom ili sirovinama, te namirnice su podvrgnute enzimskim i mikrobnim transformacijama što dovodi do stvaranja metabolita u crijevima. Nastali metaboliti se mogu apsorbirati u krvotok životinje, a kasnije se mogu izlučiti urinom i izmetom. Toksini koji se ne izlučuju iz organizma općenito ostaju kao ostaci u jestivim organima i mišićima. Shematski prikaz kontaminacije mesnih proizvoda i izloženosti ljudi mikotoksinima dan je na slici 11. Međutim, svi detalji o prijenosu mikotoksina još nisu u potpunosti razjašnjeni te je potrebno provesti daljnja istraživanja. Značajan je prijenos zabilježen za mikotoksin OTA i to u svinja koje su se pokazale kao najosjetljivija vrsta životinja za ovaj mikotoksin (Völkel i sur., 2011; Pleadin i sur., 2013a; Perši i sur., 2014; Adegbeye i sur., 2020). Hranidba svinja tijekom 40 dana sa 0,68 mg OTA dnevno rezultirala je koncentracijom OTA u dimljenim šunkama u rasponu od 1,26 – 5,65 µg/kg (Dall'Asta i sur., 2010). Koncentracije naravno variraju ovisno o duljini izloženosti, dozi i načinu unosa, ali najveće su razine zabilježene u tkivima bubrega, krvi i krvne plazme, što zapravo predstavlja opasnost za proizvodnju specijaliteta poput krvavica, pašteta i kobasica u čijoj se proizvodnji navedeni sastojci koriste. Za AFB<sub>1</sub> je također zabilježen *carry-over* u meso svinja i to u jetri, mišićima i masnom tkivu (Beaver i sur., 1990). Novije istraživanje za CIT također pokazuje mogućnost *carry-over* efekta u jestiva tkiva svinja, ali sa niskom stopom prijenosa (0,1 – 2 %) (Meerpoel i sur., 2020).





**Slika 11.** Kontaminacija trajnih mesnih proizvoda mikotoksinima *carry-over* efektom (modificirano prema Pleadin i sur., 2021)

### 2.3.1.1. Aflatoksin B<sub>1</sub>

#### *Struktura i fizikalno kemijska svojstva*

Aflatoksini su derivati difurokumarina, a uz AFB<sub>1</sub> važni predstavnici su još: aflatoksin B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoksin G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), aflatoksin G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), aflatoksin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) i aflatoksin M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>). AFB<sub>1</sub> je prema svojoj strukturi 4-(methyloxy)-2,3,6a,9a-tetrahidrociklopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]kromen-1,11-dion, molekulske formule C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> i molekulske mase 312,3 g/mol. Aflatoksini su bezbojni do blijedo žuti kristali koji fluoresciraju pod UV svjetlom: aflatoksini B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> plavo po čemu su i dobili ime (engl. *Blue*). Nestabilni su pod UV svjetlom i u prisutnosti kisika, ekstremnog pH (< 3 ili > 10) ili u prisutnosti oksidirajućih reagenasa. Netopljivi su u nepolarnim otapalima dok su topljivi u umjerno polarnim organskim otapalima kao što je kloroform i metanol. Topljivost u vodi je 10 – 20 mg/L (EFSA, 2020).



### ***Biosinteza i metabolizam***

Put biosinteze aflatoksina zajednički je sa STC te započinje formiranjem norsolorinske kiseline, prvog stabilnog metabolita, iz acetil-CoA (Ac-CoA) i malonil-CoA (Ma-CoA), uz djelovanje enzimskog kompleksa norsolorinska kiselina sintaza. NOR se zatim nizom reakcija transformira u versikolorin B (VERB). VERB je međuprodukt za sintezu aflatoksina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) i G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), dok međuprodukt za biosintezu AFB<sub>1</sub> i AFG<sub>1</sub> nastaje dehidrogenacijom VERB u versikolorin A (VERA). Konverzijom VERA i VERB, uz djelovanje kompleksa demetilsterigmatocistin sintaza, nastaju dimetilsterigmatocistin (DMST) i dihidrodemetilsterigmatocistin (DHDMST). Metilacijom slobodnih hidroksilnih skupina DMST i DHDMST, djelovanjem enzima O-metiltransferaze I i II, nastaju sterigmatocistin (STC) i dihidrosterigmatocistin (DHST), odnosno O-metilsterigmatocistin (OMST) i dihidro-O-metilsterigmatocistin (DHOMST). OMST se prevodi u AFB<sub>1</sub> i AFG<sub>1</sub>, a DHOMST u AFB<sub>2</sub> i AFG<sub>2</sub> (Cleveland i sur., 2009; Yabe i Nakajima, 2004). Vrste *A. nidulans* i *A. versicolor* ne mogu sintetizirati OMST koji je izravan prekursor AFB<sub>1</sub> iz STC. Kao posljedica toga, supstrati obrasli ovim plijesima mogu sadržavati veće količine STC koji nije metaboliziran do AFB<sub>1</sub>, dok suprotno tome, supstrati koje obrastaju *A. flavus* i *A. parasiticus* imaju niske razine STC jer je većina prevedena u aflatoksine (Yu i sur., 2004).

Najčešći put unosa gotovo svih aflatoksina jest ingestija, no AFB<sub>1</sub> u organizam može ući i putem kože. Najveća radioaktivnost izotopa <sup>14</sup>C-AFB<sub>1</sub> zabilježena je u jetri različitih vrsta životinja bez obzira na put izloženosti. AFB<sub>1</sub> se apsorbira u tankom crijevu te distribuira do jetre gdje prolazi metabolizam faze I. CYP1A2, 2B6, 3A4, 3A5, 3A7, 2A13 te GSTM1 su enzimi koji kataliziraju metabolizam aflatoksina u ljudi. CYP konvertiraju AFB<sub>1</sub> u epokside, koji su se sposobni kovalentno vezati na DNA i proteine. AFB<sub>1</sub> i njegovi metabolit izlučuju se fecesom i urinom. Istraživanja su pokazala da se njegova 95%-tna eliminacija urinom provede tijekom 24 h (EFSA, 2020).

### ***Toksični učinci u organizmu***

AFB<sub>1</sub> je jedan od najprisutnijih prirodnih karcinogena sa izrazito visokom toksičnošću te je prema IARC-u svrstan u skupinu 1 - spojeva sa dokazanim karcinogenim učinkom (IARC, 2002). Uzročnik je karcinoma jetre, ali može prouzročiti i karcinom drugih organa. Ostale bolesti koje se povezuju sa izloženosti ljudi AFB<sub>1</sub> su hepatitis i fibroza jetre, sporiji rast kod djece i Rejev sindrom.

Za štakore su nakon oralnog unosa utvrđene LD<sub>50</sub> vrijednosti 1 - 18 mg/kg tjelesne mase, dok su za druge vrste LD<sub>50</sub> vrijednosti iznosile < 1 mg/kg tjelesne mase.

U različitim organizmima pokazuju genotoksična, teratogena, mutagena, karcinogena i imunosupresivna svojstva, a klinički simptomi aflatoksikoza uključuju vrućicu, povraćanje, anoreksiju, tahikardiju i edeme. Istraživanja načina djelovanja ovog mikotoksina su pokazala njegov inhibicijski učinak na replikaciju DNA i RNA te sintezu proteina. Genotoksična svojstva se očituju kroz stvaranje DNA adukata te indukciju oksidativnog stresa (EFSA, 2020).

### **2.3.1.2. Okratoksin A**

#### ***Struktura i fizikalno kemijska svojstva***

OTA je prema svojoj strukturi L-fenilalanin-N-[(5-kloro-3,4-dihidro-8hidroksi-3-metil-1-okso-1H-2-benzopiran-7-il)karbonil]-(R)-izokumarin, molekulske formule  $C_{20}H_{18}ClNO_6$ , a molekulske mase 403,82 g/mol. Sadrži  $\beta$ -fenilalanin povezan amidnom vezom s dihidroizokumarinskom skupinom. OTA je slaba organska kiselina s kristalnom strukturom koja varira od bezbojne do bijele boje. Pri kiselom i neutralnom pH, OTA je topljiv u polarnim organskim otapalima, kao što su alkoholi, ketoni i kloroform, a slabo je topljiv u vodi, dok je pri alkalnim pH vrijednostima topljiv u vodenoj otopini natrijevog bikarbonata. U etanolnoj otopini pohranjenoj na 4 – 8 °C, zaštićenoj od svjetla, stabilan je preko godinu dana, dok je u metanolnoj otopini pohranjen na -20 °C stabilan i nekoliko godina. Pod UV svjetlom OTA pokazuje intenzivnu zelenu fluorescenciju u kiselom mediju te plavu fluorescenciju u alkalnim uvjetima. OTA je otporan na kisele uvjete i visoku temperaturu, čime je teže postići dekontaminaciju namirnica (el Khoury i Atoui, 2010).

#### ***Biosinteza i metabolizam***

Dihidroizokumarinski dio molekule OTA formira se iz acetata i malonata uz pomoć poliketid sintaze, što uključuje kondenzaciju jedne acetatne jedinice (acetyl-CoA) do četiri jedinice malonata, dok fenilalaninski dio potječe od puta šikiminske kiseline (Ringot i sur., 2006.; El Khoury i Atoui, 2010). 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 i sintetizira se OT $\alpha$ . Sintetaza OTA katalizira povezivanje OT $\alpha$  i fenilalanina što podrazumijeva sintezu OTA (Ringot i sur., 2006).

OTA se brzo apsorbira i distribuira u organizmu, ali se sporo eliminira i izlučuje, što dovodi do potencijalne kumulacije u organizmu, uglavnom kao posljedicu vezanja na proteine plazme i njegov spori metabolizam. OTA se metabolizira djelovanjem jetrenih mikrosoma te

izlučuje putem žuči, urina i fecesa, a glavni korak je hidroliza do OT $\alpha$ , nakon koje slijedi konjugacija s glukuronskom kiselinom (EFSA, 2006).

### ***Toksični učinci u organizmu***

OTA je prema IARC-u svrstan u 2B skupinu mogućih ljudskih karcinogena (IARC, 1993). Može djelovati nefrotoksično, hepatotoksično, neurotoksično, teratogeno i imunotoksično. Mehanizmi koji dovode do nefrotoksičnosti, hepatotoksičnosti i imunotoksičnosti OTA mogu se povezati s inhibicijom sinteze proteina, lipoperoksidacijom i modulacijom kaskade mitogenom aktivirane protein (MAP) kinaze, dok njegova karcinogenost nastaje nakon metaboličke aktivacije koja dovodi do formiranja DNA adukta (Malir i sur., 2016). LD<sub>50</sub> vrijednosti unesene oralno u rasponu su od 0,2 mg/kg kod pasa do 58,3 mg/kg tjelesne mase kod miševa (EFSA, 2006).

### **2.3.1.3. Citrinin**

#### ***Struktura i fizikalno kemijska svojstva***

Citrinin je po svojoj strukturi (3R,4S)-4,6-dihidro-8-hidroksi-3,4,5-trimetil-6-okso-3H<sup>2</sup>-benzopiran-7-karboksilna kiselina molekulske formule C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, poliketidni mikotoksin molekulske mase 250,25 g/mol. CIT predstavlja žuti ciklički spoj slobodne karboksilne skupine sa sposobnošću formiranja kelatnih kompleksa. Dobro je topljiv u većini organskih otapala poput otopine natrij hidroksida, natrij karbonata, natrij acetata, metanola i acetonitrila, dok je slabo topljiv u vodenim otopinama. Razgdiv je u kiselim i lužnatim medijima te pod utjecajem topline. Temperatura tališta citrinina je 172 °C, a UV apsorpcijski maksimum pri 333 nm u metanolu (Xu i sur., 2006).

#### ***Biosinteza i metabolizam***

Ovaj se mikotoksin sintetizira sekundarnim metabolizmom plijesni iz roda *Aspergillus* poliketidnim biosintetskim putem, kondenzacijom jedne acetil-koenzim A molekule i četiri molekule malonil-koenzim A, uz adiciju tri metilne jedinice. Opisana je i mogućnost njegovog nastanka kondenzacijom jedne molekule acetil-koenzim A i tri molekule malonil-koenzima A kod vrste *Monascus ruber*. Dodatkom još jedne molekule acetil-koenzima A nastaje prvi međuprodukt, ali se ne može isključiti ni mogućnost da molekula malonil-koenzima A reakcijom kondenzacije i dekarboksilacije s tetraketidom tvori prvi međuprodukt. Sljedeća reakcija uključuje O-alkilaciju i cijepanje jednostruke veze između C1 i C9 atoma te nastanak drugog i trećeg međuprodukta podjednake molekulske mase. Nastali tetraketid

tijekom rasta *M. ruber* uzrokuje proizvodnju CIT i crvenog pigmenta. Cjeloviti proces biosinteze CIT još nije u potpunosti razjašnjen (Hajjaj i sur., 1999; Pleadin i sur., 2015b).

Apsorpcija CIT je brza bez obzira na način primjene, iako je apsorpcija iz probavnog sustava oslabljena. Nakon intravenoznog injektiranja <sup>14</sup>C-CIT štakorima najznačajnija radioaktivnost uočena je u jetri te bubrezima kao mjestima najznačajnije kumulacije u organizmu. CIT se iz organizma eliminira u najvećoj mjeri urinom te je tako u prvih 24 h 74 % radioaktivnosti zabilježeno u urinu te 4 % u fecesu (IARC, 1986).

### ***Toksični učinci u organizmu***

Nema dovoljno istraživanja o toksičnosti CIT u ljudi, posebice onih koji se odnose na njegovu karcinogenost, te je stoga Međunarodna agencija za istraživanje uvrstila CIT u 3. skupinu, kao spoj koji se ne može okarakterizirati kao ljudski karcinogen (IARC, 1986).

Toksičnost CIT za pojedine pokusne životinje, izražena kao LD<sub>50</sub> vrijednost, kreće se u rasponu 35 - 134 mg/kg tjelesne mase, ovisno o vrsti životinje, dozi i načinu primjene. Ciljni organi toksičnih učinaka su prvenstveno bubrezi. Dokazano je da CIT utječe na mišji embrionalni rast, djeluje na reproduktivne organe kroz smanjenje koncentracije testosterona te smanjuje fertilitet. Također, ovaj mikotoksin utječe na gubitak permeabilnosti stanične membrane, što uzrokuje poremećaj stanične ravnoteže i dovodi do smrti stanice (Pleadin i sur., 2015b). Kancerogena i mutagena svojstva CIT povezuju se s negativnim učincima na sintezu makromolekula. Dokazano je da CIT nepovoljno djeluje na sintezu ribonukleinske kiseline (RNA) i to mnogo brže nego na sintezu proteina (Flajs i sur., 2011). Istraživanja zajedničkih toksičnih učinaka CIT i OTA potaknula su izvješća o njihovoj zajedničkoj pojavnosti u hrani i hrani za životinje. Osim što djeluje nefrotoksično, pojedina istraživanja pokazuju da CIT, kao i OTA, djeluje i hepatotoksično, teratogeno, fetotoksično te genotoksično (Liu i sur., 2003).

S obzirom na njegovu nefrotoksičnost doneseni NOAEL (*no-observed-effect level*) za CIT iznosi 20 µg/kg tjelesne mase/dan. Bazirajući se na zdravstvenim vodičima, EFSA je odredila da količina CIT od 0,2 µg/kg tjelesne mase/dan predstavlja dozu koja ne izaziva nefrotoksičnost, ali je moguća genotoksičnost i karcinogenost. Općenito, podaci o izloženosti CIT nisu dostatni te bi za utemeljenu procjenu rizika trebalo biti raspoloživo više podataka. Stoga je EFSA dala preporuku za prikupljanje podataka o pojavnosti CIT u hrani i hrani za životinje te provođenju dobro dizajniranih toksikoloških studija (EFSA, 2012).

#### **2.3.1.4. Sterigmatocistin**

##### ***Struktura i fizikalno kemijska svojstva***

Sterigmatocistin je po svojoj strukturi (3aR,12cS)-3a,12c-dihidro-8-hidroksi-6-metoksi-7H-furo[3',2':4,5] furo[2,3-c] ksanton-7 molekulske formule C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, poliketidni mikotoksin molekulske mase 324,28 g/mol strukturno povezan s AFB<sub>1</sub>. STC pripada u furofuransku skupinu metabolita plijesni, pri čemu AFB<sub>1</sub> sadrži kumarin, a STC ksantonski prsten fuzioniran s dihidrodifuranskim prstenom (Van der Watt, 1974). Policiklička aromatska molekula STC ima hidroksilnu i metoksi skupinu kao supstituente. STC je topljiv u organskim otapalima poput metanola, acetonitrila, kloroforma i drugih, dok je slabije topljiv u vodenim otopinama. Kristalizira u obliku svijetlo žutih iglica. Temperatura tališta mu je 246 °C, a UV apsorpcijski maksimum pri 245 i 325 nm. STC je okarakteriziran slabom fluorescencijom (Davis, 1981; Versilovskis i De Saeger, 2010).

##### ***Biosinteza i metabolizam***

STC i AFB<sub>1</sub> dijele svoj put biosinteze te je time njegov put već opisan u poglavlju o AFB<sub>1</sub>. Nakon oralnog tretmana štakora sa <sup>3</sup>H-STC, radioaktivnost je zabilježena uglavnom u jetri, želucu, bubrezima, dvanaesniku i plućima (Wang i sur., 1991). Ograničeni podaci o biotransformaciji STC ukazuju na njegovo metaboliziranje u jetri i plućima uz pomoć citokrom P450 enzima u različite hidroksimetabolite i njihove reaktivne ekso-epokside koji tvore DNA adukte. Ekskrecija konjugiranog STC i njegovih hidroksiliranih metabolita odvija se putem žuči i urina. Istraživanje na štakorima pokazalo je da se većina STC oralno unesena izlučila putem fecesa (64 - 92 %), a manji dio urinom (oko 10 %) (EFSA, 2013).

##### ***Toksični učinci u organizmu***

Toksični učinci STC slični su onima AFB<sub>1</sub> te se u literaturi također navode njegova potencijalna karcinogena, mutagena i teratogena svojstva, ali je akutna toksičnost STC ipak 10 i više puta manja u odnosu na AFB<sub>1</sub> (Davis, 1981).

IARC je svrstala STC u skupinu 2B potencijalnih karcinogena za ljude (IARC, 2002). Karcinogenost STC je uočena nakon oralne, intragastrične, intraperitonealne i dermalne izloženosti različitih analiziranih vrsta životinja. Nakon oralne izloženosti, primjećene su premaligne te maligne lezije kao što su hepatocelularni karcinom, hemangiosarkom u jetri, angiosarkom u masnom tkivu te plućni adenomi (Purchase i Van der Watt, 1970).

Akutna toksičnost ovisno o čimbenicima kao što su način primjene i vrsta životinja za STC, izražena kao LD<sub>50</sub> vrijednost, kreće se u rasponu od 32 mg/kg tjelesne mase u majmuna do 800 mg/kg u miševa (Purchase i Van der Watt, 1969; Davis, 1981). Ciljni organi toksičnih

učinaka su jetra i bubrezi (Purchase i Van der Watt, 1969; Purchase i Van der Watt, 1970). Jedan od mehanizama kojim STC ispoljava mutagenost podrazumijeva nastajanje reaktivne epoksi skupine koja se kovalentno veže na DNA molekulu stvarajući STC-N<sup>7</sup>-gvanin adukt. Drugi mehanizam podrazumijeva hidroksilaciju aromatskog prstena, formirajući katehol koji zatim reagira s DNA. STC inducira kromosomske aberacije i izmjenu sestrinskih kromatida te povećava nastanak reaktivnih kisikovih radikala i lipidnu peroksidaciju u eksperimentalnim životinjama *in vivo* (EFSA, 2013).

### **2.3.1.5. Ciklopiazonična kiselina**

#### ***Struktura i fizikalno kemijska svojstva***

CPA je po svojoj strukturi (6aR,11aS,11bR)-10-acetill-11-didroksi-7,7-dimetill-2,6,6a,7,11a,11b-heksahidro-9H-pirollo[1',2':2,3]izoindolo[4,5,6-cd]indol-9-on, molekulske formule C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Predstavlja indol-tetraminsku kiselinu, lipofilnu jednobaznu kiselinu, relativno male molekulske mase od 336,39 g/mol.

CPA ima sposobnost keliranja metala, netopljiva je u vodi, a slabo topljiva u puferiranim otopinama. Topljivost CPA u kloroformu, diklormetanu, metanolu i acetonitrilu iznosi oko 20 mg/mL, a u etanolu 1,68 mg/mL (Ostry i sur., 2018). CPA je optički aktivna molekula, bez boje i mirisa, s temperaturom tališta od 245 - 246 °C. CPA je stabilna prilikom čuvanja u krutom stanju pri 4 °C, dok je njena stabilnost u otopinama značajno manja (Diaz i sur., 2010).

#### ***Biosinteza i metabolizam***

Ovaj se mikotoksin sintetizira mevalonat/acetatnim biosintetskim putem u sekundarnom metabolizmu plijesni iz mevalonske kiseline i ciklo-acetoacetyl-L-triptofana nastalog kondenzacijom dvije molekule octene kiseline i triptofana (Chang i sur., 2009). U ranijoj fazi biosinteze nastaje tetraminska kiselina, nakon čega reakcijama alkilacije nastaje β-CPA, direktni biosintetski prekursor α-CPA.

Istraživanja pokazuju brzu apsorpciju CPA u organizam bez obzira na način primjene. Manja apsorpcija CPA odvija se u kiselom mediju želuca u odnosu na neutralno područje peritoneuma. Nakon intraperitonealne primjene radioaktivno označene <sup>14</sup>C-CPA na štakorima, najveća radioaktivnost je zabilježena u plućima, srcu, bubrezima, jetri i skeletnim mišićima. Mjesto najznačajnije kumulacije CPA su skeletni mišići u kojima je nakon 12 h zabilježeno 50 % ukupne radioaktivne doze povezano sa simptomima slabosti, nekoordinacije i letargije uočenih na pokusnim životinjama. Eliminacija CPA iz organizma provodi se putem fecesa i

urina, pri čemu je nakon 72 h 37 % radioaktivne doze eliminirano putem fecesa, a 23 % putem urina (Kiš i sur., 2019).

### ***Toksični učinci u organizmu***

Zbog vrlo malo dostupnih podataka o toksičnosti i nedovoljno relevantnih istraživanja o karcinogenosti, IARC do sada nije objavila procjenu toksičnosti CPA.

CPA se ne smatra vrlo potentnim akutnim toksinom. LD<sub>50</sub> vrijednost kod glodavaca kreće se u rasponu 30 – 70 mg/kg tjelesne mase (Burdock i Flamm, 2000). Dokazano je da su na toksično djelovanje CPA najosjetljiviji probavni organi, mišići, jetra i slezena, iako se simptomi toksičnosti razlikuju ovisno o vrsti, dobi i spolu životinje, te načinu primjene (Ostry i sur., 2018). Istraživanja akutne toksičnosti ukazuju na pojavu smanjenja motoričkih funkcija, gubitak koordinacije mišićnih pokreta, hipotermiju, tremor i konvulzije, nastanak lezija i nekroze i stanica na jetri, slezeni, gušterači, bubrezima i srcu (Purchase, 1971). Istraživanja kronične toksičnosti CPA kod eksperimentalnih i domaćih životinja do sada nisu provedena. Prema novijim istraživanjima, CPA djeluje izravno toksično na limfocite i limfne organe kao što su timus i slezena (Ostry i sur., 2018). Toksični učinci CPA potječu od njegove sposobnosti inhibicije specifične Ca<sup>2+</sup> ATP-aze koja se nalazi u membrani sarkoplazmatskog ili endoplazmatskog retikuluma i pri čemu dolazi do promjene u normalnom unutarstaničnom prijenosu kalcija koji je dio ciklusa mišićne kontrakcije i relaksacije. Gradijent kalcija ključan je u procesima diobe, diferencijacije i smrti stanice.

CPA u kombinaciji s drugim mikotoksinima pokazuje sinergistički učinak pa je tako zabilježen aditivni toksični učinak u istraživanjima CPA s AFB<sub>1</sub> i OTA (Kiš i sur., 2019).

### **2.3.2. Analitičke metode detekcije i kvantifikacije mikotoksina**

Za procjenu izloženosti mikotoksinima i rizika koje predstavljaju za zdravlje ljudi i životinja za njihovo određivanje neophodna je primjena brzih, točnih i dovoljno osjetljivih analitičkih metoda. Analitika mikotoksina općenito je složen proces koji uključuje pravilno uzorkovanje i homogenizaciju, pripremu uzorka te detekciju i kvantifikaciju odgovarajućim analitičkim metodama. Za određivanje mikotoksina dostupne su brojne metode koje se mogu podijeliti na kvalitativne i kvantitativne te na potvrdne i orijentacijske (*screening*) metode. Priprema uzorka za analizu podrazumijeva ekstrakciju mikotoksina iz uzorka prikladnim ekstrakcijskim otapalom, pročišćavanje dobivenog ekstrakta s ciljem eliminacije mogućih interferencija iz matrice i koncentriranje ekstrakta. Za određivanje mikotoksina u TMP treba uzeti u obzir činjenicu da mikotoksini uobičajeno hranu kontaminiraju pri vrlo niskim koncentracijama te

da ovi proizvodi predstavljaju kompleksnu matricu čije komponente mogu interferirati sa analitom (Rahmani i sur., 2009; Razzazi- Fazeli i Reiter, 2011).

Analitička metoda koja se koristi od najranijih faza otkrića mikotoksina, pa sve do danas, je imunoenzimska ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) jer omogućuje brzi *screening* niskih koncentracija mikotoksina na velikom broju uzoraka (Pleadin i sur., 2015b). Brze metode ispitivanja podrazumijevaju i primjenu uređaja lateralnog protoka (engl. *lateral flow devices*, LFD) koje omogućavaju detekciju mikotoksina na mjestu provjere te biosenzora - uređaja koji sadrže biološki element na površini mjerne elektrode. Njihova je prednost što su prijenosni, osjetljivi brzi, jednostavni te jeftiniji u odnosu na tradicionalnije pristupe (Agriopoulou i sur., 2020; Tittlemier i sur., 2021).

Od kromatografskih metoda, koristi se tankoslojna kromatografija (engl. *Thin-Layer Chromatography*, TLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) u kombinaciji sa različitim detektorima, kao što su fluorescentni (engl. *Fluorescence Detector*, FLD), detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array*, DAD) ili UV (engl. *Ultraviolet*), tekućinska kromatografija u sprezi s masenom spektrometrijom (engl. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, LC-MS) te tekućinska ili plinska kromatografija sa tandemskom spektrometrijom masa (engl. *Liquid/Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS i GC-MS/MS). U većini slučajeva ekstrahirani uzorci analiziraju se LC-MS metodom za analizu mikotoksina na vrlo niskim razinama, dok se u novije vrijeme razvijaju multimikotoksinske LC-MS/MS metode za simultanu detekciju više različitih mikotoksina (Agriopoulou i sur., 2020; Tittlemier i sur., 2021). LC-MS metode omogućavaju značajno veću selektivnost i osjetljivost te pouzdanost identifikacije analita u usporedbi s konvencionalnim detektorima. Nedostaci ovakvih tehnika su što zahtijevaju prethodnu dužu obradu uzoraka, upotrebu sofisticirane laboratorijske opreme i provedbu složenih analitičkih postupaka (Španjer, 2011).

### **2.3.2.1. Ekstrakcija i pročišćavanje**

Pogodno ekstrakcijsko otapalo je ono koje sa visokom učinkovitošću uklanja samo mikotoksine iz uzorka, nije skupo, sigurno je za upotrebu i smanjuje utjecaj matrice. U analizi mikotoksina najčešće korištena otapala su mješavina metanola ili acetonitrila sa vodom u različitim omjerima. Masne kiseline i ulja prisutne u uzorcima otežavaju ekstrakciju te stoga zahtijevaju upotrebu i drugih otapala, kao što je mješavina etil acetata i mravlje kiseline.



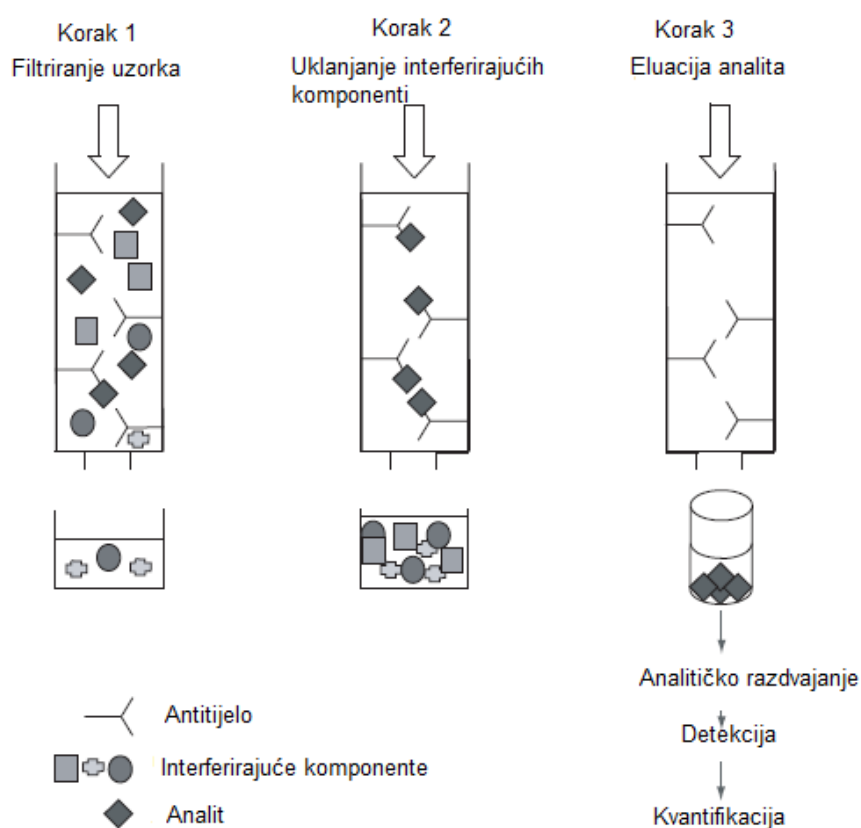
Za izdvajanje i ekstrakciju mikotoksina iz uzoraka osim tradicionalnih ekstrakcijskih metoda organskim otapalima, koriste se i druge metode te sredstva, kao što su QuEChERS (engl. *Quick Easy Cheap Rough and Safe*), tekućinsko-tekućinska ekstrakcija (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE), čvrsto-tekućinska ekstrakcija (engl. *Solid-Liquid extraction*, SLE), ubrzana ekstrakcija otapalom (engl. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE), ekstrakcija superkričnim fluidima (engl. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave-Assisted Extraction*, MAE), čvrsto-fazna ekstrakcija (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE), mikroekstrakcija otapalima niske gustoće potpomognuta vorteksom (engl. *Vortex Assisted Low Density Solvent-Microextraction*, VALDS-ME), aptamer afinitetne kolone (engl. *Aptamer-Affinity Columns*, AAC), molekularno utisnuti polimeri (engl. *Molecularly Imprinted Polymers*, MIP) te imunoafinitetne kolone (engl. *Immunoaffinity Columns*, IAC) (Turner i sur., 2009; Agriopoulou i sur., 2020; Razzazi- Fazeli i Reiter, 2011).

QuEChERS metoda izvorno je razvijena za analizu pesticida, ali se upotrebljava i u analizi mikotoksina. Temelji se na ekstrakciji analita acetonitrilom uz prisutnost smjese soli (magnezijev sulfat i natrijev klorid). Metoda je brza i ekonomski isplativa, međutim, QuEChERS priprema ponekad nije dovoljna za učinkovito uklanjanje komponenata matrice, posebno kada se radi o kompleksnim uzorcima, a također zahtijeva i modifikaciju postupka ovisno o mikotoksinu kojeg se želi odrediti (Razzazi- Fazeli i Reiter, 2011; Agriopoulou i sur., 2020). Kod hrane biljnog podrijetla od najvažnijeg interesa je uklanjanje ugljikohidrata, dok kod hrane životinjskog podrijetla glavni izazov u pripremi uzorka predstavlja uklanjanje masti i bjelančevina (Vulić i sur., 2021).

Jedna od prvih ekstrakcijskih metoda koja koristila za analizu aflatoksina u hrani i hrani za životinje nakon njihovog otkrića 1960.-ih godina je LLE. Kod LLE koriste se dva različita otapala koja stvaraju dvije faze, pri čemu su u jednoj fazi uklonjene nepoželjne supstance, a u drugoj mikotoksini. Koristi se uglavnom za tekuće uzorke dok se SLE koristi za krute uzorke najčešće uz primjenu ultrazvučne ekstrakcije i miješanje.

Nakon ekstrakcije uzorka slijedi pročišćavanje koje za cilj ima eliminirati komponente matrice te prekoncentraciju analita. SPE metoda je vrlo popularna, brza, ne zahtjeva velike količine otapala te pročišćava uzorak adsorpcijom mikotoksina na čvrsti adsorbent koji je pakiran u punila kolona. Postoji širok raspon komercijalno dostupnih punila SPE kolona s različitim sorbentima poput silikagela, C18, florisil, fenil, aminopropil, ionsko-izmjenjivačke tvari i polimera s molekularnim biljegom (Turner i sur., 2009). Međutim, u novije vrijeme, pročišćavanje uzoraka ipak se najčešće odvija pomoću IAC kao bi se postigli čišći ekstrakti a

time dobili i bolji limiti kvantifikacije te preciznost. IAC imaju punila sa antitijelima specifičnim za određeni mikotoksin koji su prilikom prolaska uzoraka kroz kolonu u interakciji sa mikotoksinima (antigenima) uzoraka. U isto vrijeme, interferirajuće komponente uzoraka uklanjaju se ispiranjem kolone te se naposljetku mikotoksini eluiraju organskim otapalom (Agriopoulou i sur., 2020). Shematski prikaz dan je slikom 12. Nedostatak primjene ovih kolona je svakako njihov ograničen vijek trajanja i cijena, a ponekad mogu imati i ograničavajuću sposobnost adsorpcije mikotoksina, uslijed brojnih komponenti koje se nalaze u matrici, a koje mogu interferirati sa antitijelima ili inhibirati mikotoksine sprječavajući ih u vezanju na antitijela. Danas se razvijaju i sintetički sistemi poput MIP, aptamera i peptida koji predstavljaju jeftiniju verziju koja može zamijeniti antitijela (Razzazi- Fazeli i Reiter, 2011).



**Slika 12.** Shematski prikaz imunoafinitetnog pročišćavanja (modificirano prema Razzazi-Fazeli i Reiter, 2011)

### 2.3.2.2. Tekućinska kromatografija i masena spektrometrija

Kromatografija je kao fizikalno-kemijska metoda za razdvajanje komponenti u kompleksnim smjesama otkrivena početkom 20. stoljeća. Princip kromatografskog razdvajanja temelji na

različitoj raspodjeli komponenti uzorka između stacionarne (inertne) i mobilne (pokretne) faze uzrokovane razlikama u adsorpciji, ionskoj izmjeni, razdiobi između faza ili veličini tvari koje se razdvajaju, a koje rezultiraju različitim vremenom zadržavanja na kromatografskoj koloni. Za identifikaciju analita služi vrijeme retencije odnosno vrijeme zadržavanja na koloni, koje se definira kao udaljenost maksimuma pika od točke injektiranja u jedinici vremena. Priroda stacionarne i mobilne faze te način transporta kroz kolonu predstavlja osnovu za klasifikaciju kromatografskih tehnika pa tako između ostalog postoji plinska kromatografija u kojoj je mobilna faza plin te tekućinska u kojoj je mobilna faza tekućina. Jedna od vrsta tekućinske kromatografije je TLC u kojoj tekuća mobilna faza putuje pod djelovanjem kapilarnih sila ili HPLC gdje se kreće djelovanjem povišenog tlaka (Kazakevich i LoBrutto, 2007).

Tipični HPLC sustav sastoji se od (slika 13):

*Spremnika pokretne faze* koji pohranjuje dovoljnu količinu otapala

Odplinjača (engl. *degasser*) koji uklanja plinove otopljene u otapalima

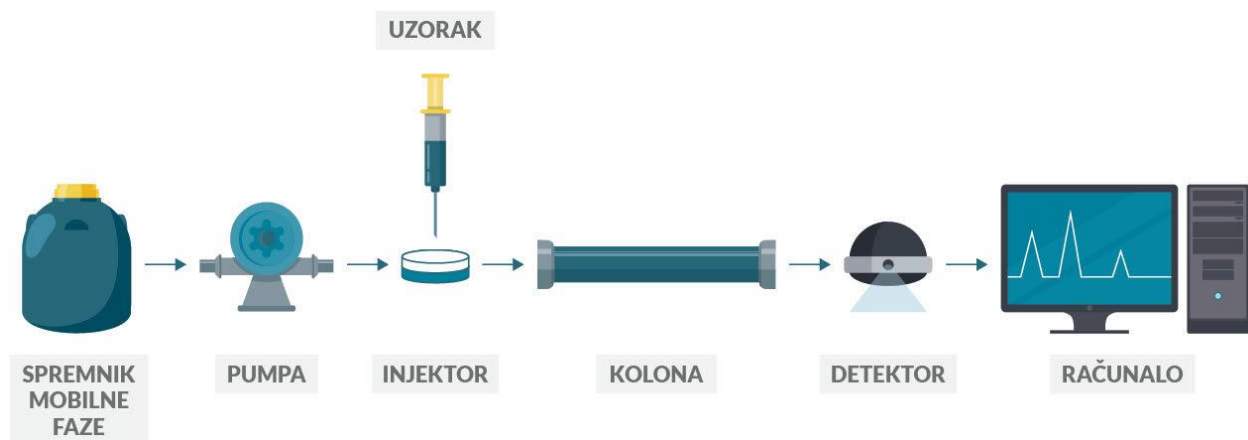
*Pumpe*. Sustav za dobavu mobilne faze koji omogućava njen kontinuirani protok te miješanje različitih otapala.

*Injektora*. Sustav za injektiranje uzorka u struju mobilne faze (većinom automatski injektor ili tzv. *autosampler*).

*Kolone* koja je središte sustava i na kojoj se zapravo odvija razdvajanje analita i gdje je mobilna faza u kontaktu sa stacionarnom fazom.

*Detektora* u kojeg ulazi eluat te generira električni signal.

*Računala* i softvera koji bilježi i pohranjuje podatke te ima mogućnost kontrole parametara instrumenta.



**Slika 13.** Shematski prikaz sustava za tekućinsku kromatografiju

Razdvojene komponente smjese prikazuju se u obliku kromatograma pri čemu je svaki pojedini analit u kromatogramu predstavljen pikom. U odsustvu jakih interakcija analita sa stacionarnom fazom te relativno niskih koncentracija analita pikovi su simetrični te nalikuju Gausovoj krivulji pri normalnoj distribuciji.

Među vrstama tekućinske kromatografije, reverzno-fazna tekućinska kromatografija (engl. *Reverse Phase*, RP) je najpopularnija vrsta kromatografije te se preko 90 % analiza svih nisko molekularnih analita provodi upravo koristeći RP. Bazira se na disperzivnim silama (hidrofobnim ili van der Waalsovima interakcijama), gdje je stacionarna faza hidrofobna (porozna silika sa različitim lignadima), a mobilna faza je polarna (smjesa vode ili pufera i nekog polarnog organskog otapala). S druge strane, normalno-fazna (engl. *Normal Phase*, NP) tekućinska kromatografija se temelji na razlikama u jačini polarnih interakcija analita i stacionarne faze, pri čemu je mobilna faza nepolarna (nepolarno organsko otapalo) za analizu visoko hidrofobnih spojeva (Kazakevich i LoBrutto, 2007).

**Maseni spektrometri** su vrsta detektora koji rade na način da ioniziraju molekule analita te se nastali ioni i/ili fragmenti iona analiziraju s obzirom na omjer mase i naboja pri uvjetima visokog vakuuma. U principu postoje četiri koraka u generiranju masenog spektra: uvođenje uzorka, ionizacija molekula uzorka da bi se prevele neutralne molekule u ione u plinskoj fazi nekom od metoda ionizacije te daljnja fragmentacija nastalih iona, sortiranja dobivenih iona prema omjeru mase i naboja u masenom analizatoru te detekcija razdvojenih iona (Pitt, 2009). Postoji nekoliko različitih tehnologija za ionizaciju (ionizatora) i analizu iona (analizatora) koji rezultiraju različitim tipovima masenih spektrometara sa različitim kombinacijama ova dva procesa. Tijekom godina razvijene su različite metode ionizacije poput elektronske ionizacije (engl. *Electron Impact*, EI), kemijske ionizacije (engl. *Chemical Ionisation*, CI), matriksom potpomognute laserske desorpcije/ionizacije (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI), desorpcijska elektrosprej ionizacija (engl. *Desorption Electrospray Ionization*, DESI), elektrosprej ionizacija (engl. *Electrospray Ionization*, ESI), kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) i fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI) (Chen i sur., 2007).

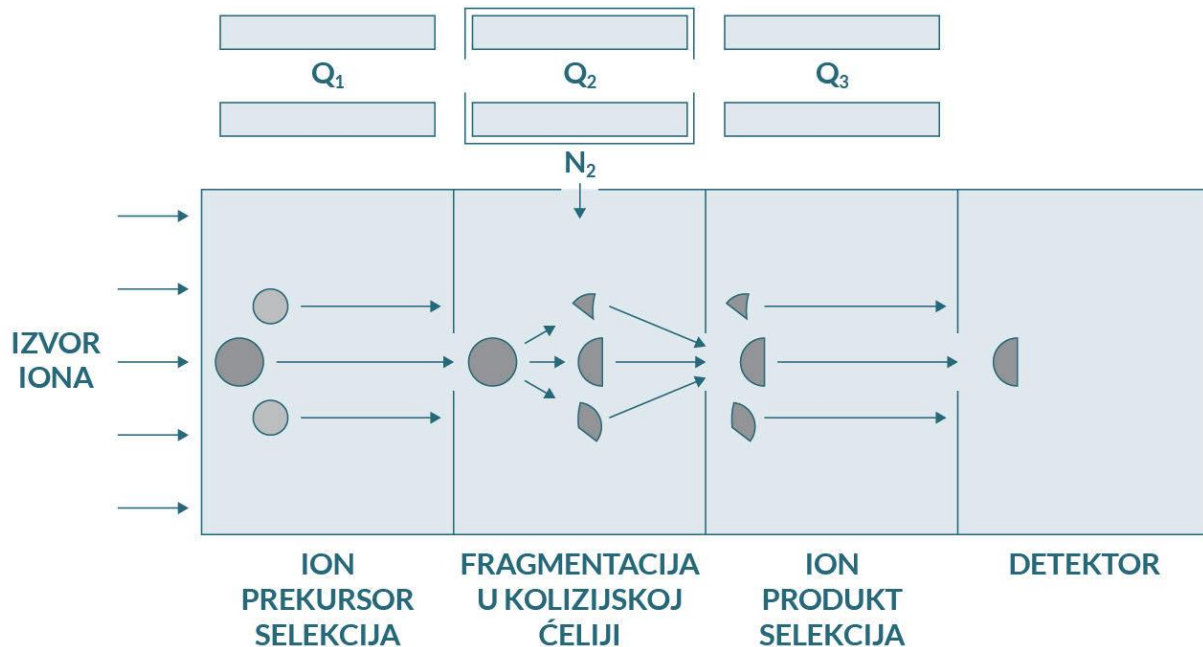
ESI je najzastupljeniji način ionizacije kada se radi o većini bioloških molekula, uključujući mikotoksine. Analit otopljen u mobilnoj fazi iz tekućinskog kromatografa ulazi u ionizator pri atmosferskom tlaku kroz metalnu kapilaru koja predstavlja elektrodu pod visokim naponom. Na vrhu kapilare nastaje maglica sastavljena od nabijenih kapljica otapala. Pod

utjecajem temperature i struje dušika otapalo se isparava te se kapljice smanjuju, a naboj prenosi na molekule analita pri čemu dolazi do njihove ionizacije. Ionizirane molekule analita se tada prenose pod visokim vakuumom u spektrometar masa. Izvor iona te ionska optika mogu raditi na način da generiraju odnosno detektiraju pozitivne i/ili negativne ione. ESI se smatra blagom ionizacijskom tehnikom, što podrazumijeva da se relativno malo energije prenosi analitu te se stoga odvija i manji broj fragmentacija. Kod analita male molekulske mase, sa jednom nabijenom funkcionalnom skupinom dolazi do stvaranja jednostruko nabijenih iona - dodatak protona analitu ( $M+H^+$ ) u pozitivnom načinu rada odnosno gubitak protona ( $M-H^-$ ) u negativnom načinu rada. Moguća je i adukcija kationa ( $M+NH_4^+$ ,  $M+Na^+$ ,  $M+K^+$ ) i aniona ( $M+formate^-$ ,  $M+acetate^-$ ) kada su prisutne soli u mobilnoj fazi (najčešće amonijeva acetat ili formijat) (Pitt, 2009; Cindrić i sur., 2009).

Osnovna funkcija analizatora masa je mjerenje omjera mase i naboja ( $m/z$ ) nastalih iona te razdvajanje na temelju tog omjera. Najčešće upotrebljavani analizatori masa su magnetni, električni, kvadrupolni analizator, ionska zamka (engl. *Ion Trap*), analizator vremena leta (engl. *Time of Flight*, ToF) te ion ciklotronska rezonancija, kao i kombinacija pojedinih vrsta koji se razlikuju s obzirom na parametre poput sposobnosti razlučivanja, točnosti mjerenja mase, područja mjerenja mase i brzine snimanja spektra (Chen i sur., 2007).

Jedna od najpopularnijih kombinacija je trostruki kvadrupol analizator masa (QqQ) koji je primjer tandemске spektrometrije masa (MS/MS). Kvadrupol se sastoji od četiri štapne elektrode postavljene u kvadratnu konfiguraciju, između kojih je generirano električno polje i koje su dijagonalno električki povezane, pri čemu jedan par ima pozitivni, a drugi negativni naboj. Dodatno su ti parovi još spojeni s radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje. Ioni koji ulaze u analizator imaju različite vrijednosti  $m/z$  i u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju, mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili se neutralizirati. Trostruki kvadrupol analizator masa ima konfiguraciju takvu da sadrži dva kvadrupola koji djeluju kao filter masa, a jedan kvadrupol služi kao kolizijska ćelija koja sadrži inertni plin pod niskim tlakom (Chen i sur., 2007; Pitt, 2009; Kovač, 2020) (slika 14). Prvi i treći kvadrupol mogu biti istovremeno postavljeni na različite vrijednosti omjera  $m/z$  te se mogu stvoriti različiti parovi prekursor i produkt iona za otkrivanje velikog broja ciljanih analita. Taj se proces naziva praćenjem višestrukih reakcija (engl. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM), a još i SRM (engl. *Selected Reaction Monitoring* - praćenje izabranih reakcija) i zahtjeva posebno optimizirane uvjete. Na osnovu  $m/z$  vrijednosti u prvom kvadrupolu (Q1) se izabire prekursorski ion koji je najčešće protonirana ili deprotonirana molekula ciljanog analita. U drugom kvadrupolu (q2) se prekursorski ion podvrgava fragmentaciji u sudaru s inertnim

plinom (dušik ili argon) što se naziva kolizijski inducirana disocijacija (CID, engl. *Collision Induced Dissociation*) i rezultira stvaranjem nekoliko produkt iona od koji se najčešće odabiru dva (kvantifikacijski i kvalifikacijski ion) koji se prate i odabiru pomoću trećeg kvadrupola (Q3) (Pitt, 2009; Kovač, 2020).



**Slika 14.** Prikaz rada trostrukog kvadrupola analizatora masa (QqQ) u MRM načinu (modificirano prema Kovač, 2020)

### 2.3.2.3. Validacija metode

Prema definiciji, validacija podrazumijeva postupke kojima se dokazuje da su utvrđeni zahtjevi prikladni za namjeravanu uporabu. Validacijom analitičkih metoda ispituje se primjenjivost metode kroz određivanje validacijskih parametara, uključujući limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ), linearnost, iskorištenje, istinitost, ponovljivost, unutarlaboratorijska obnovljivost, točnost, robusnost, utjecaj matrice. Kad se radi o mikotoksinima, kriterije učinkovitosti metode za njihovo određivanje propisuje Uredba Komisije br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani (EC, 2006a) te Provedbena Uredba Komisije 2021/808 od 22. ožujka 2021. o provođenju analitičkih metoda za rezidue farmakološki djelatnih tvari koje se upotrebljavaju na životinjama koje se koriste za proizvodnju hrane i o tumačenju rezultata kao

i o metodama koje treba primjenjivati za uzorkovanje te o stavljanju izvan snage odluka 2002/657/EZ i 98/179/EZ (EC, 2021).

Određivanjem linearnosti metode provjerava se da li metoda unutar određenog koncentracijskog područja daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u ispitivanom uzorku. Ona je opisana koeficijentom korelacije ( $R^2$ ) za koji je općeprihvaćeni kriterij za kromatografske metode  $\geq 0,99$ . LOD odgovara najnižoj koncentraciji analita u uzorku koji može biti detektiran s prihvatljivom točnošću, a LOQ najnižu koncentraciju analita u uzorku koji se može kvantificirati uz odgovarajuću istinitost i preciznost. Iskorištenje predstavlja postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analitičkog postupka. Iskorištenjem dodataka poznate količine analita na slijepu matricu može se ocijeniti istinitost mjerenja. Prema Uredbi Komisije br. 401/2006 (EC, 2006a) iskorištenje za mikotoksine na razini  $< 1 \mu\text{g/kg}$  treba biti u rasponu od -50 do 120 %, dok je prema Provedbenoj Uredbi Komisije 2021/808 (EC, 2021) granica istinitosti kvantitativne metode od -50 % do +20 %. U širem smislu, utjecaj matrice se odnosi na zajednički utjecaj svih komponenti uzorka, koji ne predstavljaju analit, na mjerenje količine prisutnog analita, odnosno analitički rezultat. U užem smislu, radi se o čimbeniku koji utječe na ionizacijski proces koji se odvija u izvoru iona te se može očitovati kao pojačanje ili smanjenje signala iona analita, a time i parametra metode (Kruve i sur., 2015).

### **2.3.3. Kontrola, prevencija i zakonska regulativa**

Ključan korak u prevenciji kontaminacije TMP mikotoksinima je prevencija i kontrola upotrebe kontaminiranih sirovina, kao i efektivna kontrola rasta plijesni imajući na umu da je njihova aktivnost značajna za razvoj senzorskih svojstava proizvoda. Tijekom procesa proizvodnje trajnih mesnih proizvoda koristi se konzerviranje soljenjem, sušenjem, fermentacijom i u nekim slučajevima dimljenjem, što obično služi za kontrolu rasta plijesni u kombinaciji sa skladištenjem pri temperaturi hlađenja ili pakiranjem u modificiranoj atmosferi. Međutim, istraživanja pokazuju da navedene tehnološke operacije nemaju značajan utjecaj na smanjenje količine mikotoksina u gotovom mesnom proizvodu (Bullerman i Bianchini, 2007; Pleadin i sur., 2014; Pleadin i sur., 2021). Da bi se spriječio nekontrolirani rast plijesni potrebno je kontinuirano uklanjati (četkanjem odnosno pranjem) plijesni s površine proizvoda te omogućiti dovoljan razmak između proizvoda u komorama za zrenje koji se ne smiju dodirivati, čime se osigurava nesmetano strujanja zraka. Isto tako, neuobičajeno visoke koncentracije spora plijesni u zraku mogu dovesti do veće pojave plijesni

na proizvodu, što se može spriječiti biološkim mikrofilterima zraka te tlačnim barijerama na ulazu u komoru, čime ruralna domaćinstva većinom nisu opremljena (Kovačević, 2014). Uvjeti u komorama za zrenje, poput temperature i RH, trebaju se kontrolirati. Također, kontrolom  $a_w$  supstrata koji je bitan faktor i za rast plijesni i proizvodnju mikotoksina moguće je prevenirati kontaminaciju. Primjerice, značajno je veća proizvodnja mikotoksina uočena pri  $a_w$  0,99 u odnosu na  $a_w$  0,97 i 0,95 (Asefa i sur., 2011). Kontrolom ovih parametara može se spriječiti značajan utjecaj eksternih faktora koji ovise i o klimatskom geografskom području, a idu u korist pojavnosti toksikotvornih vrsta i kontaminaciji TMP.

Zakonodavstvo u Europskoj uniji, ujedno i u Republici Hrvatskoj, još uvijek nije propisalo najveće dopuštene količine (NDK) mikotoksina u mesu i mesnim proizvodima (EC, 2006b). Iznimku čine Danska (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u burezima svinja), Estonija (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u jetri svinja), Rumunjska (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u bubrezima, jetri i mesu svinja) i Slovačka (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u mesu i mlijeku), u kojima su NDK OTA regulirane zakonodavstvom, dok u Italiji postoji preporuka za najveću vrijednost OTA od 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u mesu svinja i proizvodima od svinjskog mesa (Pleadin i sur., 2021). Unatoč nedostatku legislative, proizvođači bi trebali biti svjesni potencijalne opasnosti od kontaminacije te trebaju provoditi sustavne kontrole kroz HACCP sustav (eng. *Hazard Analysis Critical Control Point*). Prema Uredbi Komisije br. 1881/2006 (EC, 2006a), NDK za AFB<sub>1</sub> u začinima koji se mogu koristiti i u proizvodnji mesnih proizvoda iznosi 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  za čili, papriku, bijeli i crni papar, muškadni oraščić, đumbir te kurkumu, dok za OTA u istim vrstama začina iznosi 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , odnosno za čili i papriku 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uzorci

U istraživanju je analizirano 250 uzoraka tradicionalnih mesnih proizvoda, od čega: 38 kulena ili kulenovih seka, 70 trajnih kobasica, 41 pršut ili šunka, 22 vratine ili buđole, 29 pečenica, ombola, karea ili zagrebnjaka te 50 slanina, panceta ili špeka. Uzorci su proizvedeni na tradicionalan način na OPG-ovima iz pet različitih regija Republike Hrvatske (Istočne, Sjeverne, Središnje, Južne i Zapadne).

#### 3.1.2. Hranjive podloge:

- DG-18 (engl. *Dichloran-18% Glycerol agar*) (Merck, Darmstadt, Njemačka)  
sastav podloge: tripton 5,0 g/L; glukoza 10,0 g/L; mononatrijev fosfat 1,0 g/L; magnezijev sulfat 0,5 g/L; dikloran 0,002 g/L; kloramfenikol 0,1 g/L; glicerol 220,0 g/L; agar 13,0 g/L
- MEA (engl. *Malt Extract Agar*) (BD, New Jersey, SAD)  
sastav podloge: maltoza 12,75 g/L; dekstrin 2,75 g/L; glicerol 2,35 g/L; pepton 0,78 g/L; agar 15,0 g/L
- CYA (engl. *Czapeak Yeast Extract Agar*) (BD, New Jersey, SAD)  
sastav podloge: sukroza 30,0 g/L; ekstrakt kvasca 5,0 g/L; dikalijev hidrogen fosfat 1,0 g/L; natrijev nitrat 0,3 g/L; kalijev klorid 0,05 g/L; magnezijev sulfat 0,05 g/L; željezov sulfat 0,001 g/L; cinkov sulfat 0,001 g/L; bakrov sulfat 0,0005 g/L; agar 15,0 g/L
- CREA (engl. *Creatine Sucrose Extract agar*) prema recepturi:  
kreatin (1 H<sub>2</sub>O) 3 g/L; saharoza 30 g/L; KCl 0,5 g/L; MgSO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O 0,5 g/L; FeSO<sub>4</sub>x7 H<sub>2</sub>O 0,001 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x3 H<sub>2</sub>O 1,3 g/L; ljubičasti bromokrezol ,005 g/L, agar 15 g/L  
pH 8,0± 0,2

#### 3.1.3. Kemikalije i reagensi

- Metanol HPLC čistoće, Honeywell, Offenbach, Njemačka
- Acetonitril HPLC čistoće, Honeywell, Offenbach, Njemačka
- Octena kiselina za LC/MS, Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska
- Octena kiselina HPLC čistoće, J.T.Baker, Center Valley, SAD

- Amonij acetat za masenu spektrometriju, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Tween 20, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- rOQ QuEChERS ekstrakcijske soli (4,0 g MgSO<sub>4</sub>, 1,0 g NaCl, 1,0 g trinatrij citrat dihidrat (SCTD), 0,5 g dinatrij citrat seskvihidrat (SCDS), Phenomenex, Torrance, SAD
- Kreatin monohidrat, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Cink acetat dihidrat, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Kalij heksacijanoferat trihidrat, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Natrij klorid, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalij klorid, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalij dihidrogen fosfat, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Dikalij hidrogen fosfat, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Dinatrij hidrogen fosfat, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- DIPA–HCL-ISA 1 mol/L (diizopropilamin hidroklorid), Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska
- Na<sup>+</sup> standard 2000 mg/L (ppm) u 0,5 mol/L ISA, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska
- Tween 80, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Illustra ExoProStar, GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija
- NucleoSpin Microbial DNA kit za izolaciju DNA plijesni, Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Njemačka (sadrži proteinazu K, pufere za lizu MG, za pranje BW i B5 te ispiranje BE, NucleoSpin tubice tip B, NucleoSpin Microbial DNA kolone, tubice za prikupljanje 2 mL)
- GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix, Promega, Madison, SAD (sadrži GoTaq G2 Hot Start DNA polimerazu, nukleotid trifosfate - dNTP, magnezij klorid i reakcijske pufere)
- Universal Mastermix za PCR u stvarnom vremenu, Diagenode, Liege, Belgija (sadrži Hotstart Taq NA polimerazu, nukleotid trifosfate - dNTP, magnezij klorid, reakcijske pufere te ROX, SYBR<sup>®</sup> Green i FITC)
- Agaroza SeaKem<sup>®</sup> LE, Lonza, Rockland, SAD
- TAE puffer 50x (sa 2 M tris acetatom i 0,05 M EDTA), Lonza, Verviers, Belgija
- Fluorescentna boja GelStar Nucleic Acid Gel, Lonza, Rockland, SAD
- DNA ljestve 100 bp, Takara, Kusatsu, Japan

- Marker molekulske mase DNA (engl. *size marker*, 100 - 2500 pb) (Qiagen, Njemačka)
- Marker za sravnjenje (engl. *alignment marker*, 15 - 3000 pb) (Qiagen, Njemačka)
- Pufer za razrjeđivanje DNA (Qiagen, Njemačka)
- Mineralno ulje (Qiagen, Njemačka)
- QIAxcel DNA Screening Kit, Qiagen, Hilden, Njemačka
- Voda za molekularnu upotrebu (DNA/RNA slobodna), Lonza, Verviers, Belgija
- Fiziološka otopina za čuvanje izolata plijesni: natrijev klorid 9,0 g/L

#### 3.1.4. Početnice (5'-3')

- Početnica Cmd5 (CCGAGTACAAGGARGCCTTC), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica Cmd6 (CCGATRGAGGTCATRACGTGG), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica nor1 (ACCGCTACGCCGGCACTCTCGGCAC), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica nor2 (GTTGGCCGCCAGCTTCGACACTCCG), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica ver1 (GCCGCAGGCCGCGGAGAAAGTGTT), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica ver2 (GGGGATATACTCCCGCGACACAGCC), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica omt1 (GTGGACGGACCTAGTCCGACATCAC), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica omt2 (GTCGGCGCCACGCACTGGGTTGGGG), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica F1OT (GCCCAACGACAACCGCT), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska

- Početnica R10T (GCCATCTCCAAACTCAAGCGTC), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica AoLC35-12L (GCCAGACCATCGACTGCATGCTC), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica AoLC35-12R (CGACTGGCGTTCCAGTACCATGAGCC), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica za pksCT F (ATGTCGATTACGAGGACAAC), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica za pksCT R (CCTGTTCCGTGTGCCTCAAC), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica dmaTF (TTCACGCTCGTGGA ACTTCT), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- Početnica dmaTR (GGGTCACAAAGATCGCAAGAT), Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska
- TaqMan proba dmaTp ([HEX]-TACTGCCTCCCCCGAC-[BHQ1]), Sigma Aldrich, Madrid, Spain

### 3.1.5. Analitički standardi mikotoksina

- Aflatoksin B<sub>1</sub> od *Aspergillus flavus*, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Okratoksin A u acetonitrilu 10 µg/ mL, LGC Standards, Wesel, Njemačka
- Ciklopiazonična kiselina od *Penicillium cyclopium*, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Sterigmatocistin, LGC Standards, Wesel, Njemačka
- Citrinin u acetonitrilu 100 µg/ mL, LGC Standards, Wesel, Njemačka

### 3.1.6. Laboratorijski uređaji

- Tekućinski kromatograf, Agilent Infinity 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) opremljen sa binarnom pumpom, otplinjačem, automatskim injektorom i termostatiranim odjeljkom za kolonu
- Maseni detektor tipa trostruki kvadrupol, 6410 QQQ (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) sa izvorom elektrosprej ionizacije (ESI, engl. *Electro Spray Ionization*)
- Uređaj za ultračistu vodu, Direct-Q 3 UV, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Uređaj za određivanje natrija, Easy Plus Analyzer, Scwerzenbach, Švicarska

- Uređaj za kapilarnu elektroforezu, QIAxcel Advanced, Qiagen, Hilden, Njemačka
- Mikroskop, Carl ZeissAxio Imager A2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Njemačka
- PCR uređaj, Prime Thermal Cyclers 51149-2, Staffordshire, Velika Britanija
- PCR uređaj za PCR u stvarnom vremenu, Rotor–Gene Q, Qiagen, Hilden, Njemačka
- Uređaj za određivanje aktiviteta vode, HygroPalm Aw sa sondom Hygro Clip Aw, EminTech, Lund, Švedska
- Miješalica (vorteks), LQ1, Heidolph, Schwabach, Njemačka
- Centrifuga s hlađenjem, Universal 320 R, Hettich, Tuttlingen, Njemačka
- Miješalica rotirajuća, Multi RS-60, Biosan, Riga, Litva
- Homogenizator, Grindomix GM 200, Retsch, Haan, Njemačka
- Analitička digitalna vaga sa preciznošću od 0,0001 g, GF-2000, A&D, Shanghai, Kina
- Analitička vaga, AUW220D, Shimadzu, Kyoto, Japan
- SPE vakuum pročišćivač, Visiprep, Supelco, Bellefonte, SAD
- Vakuum pumpa, NO35AN18, KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Njemačka
- Uparivač u struji dušika, Thermo Scientific, Waltham, SAD
- Ultrazvučna kupelj, Bandelin electronic, Berlin, Njemačka
- pH-metar, Seven Compact, Scwerzenbach, Švicarska
- Magnetna miješalica sa mogućnošću zagrijavanja, TMA 2071 Assistant, Sondheim vor der Rhön, Njemačka
- Tresilica, HS 260 control, IKA, Staufen, Njemačka
- Ledenica, LTH, Škofja Loka, Slovenija
- Termostat pri 25 °C, INE 500, Memmert, Schwabach, Njemačka
- Homogenizator, FastPrep-24™ 5G, MP Biomedicals, Solon, SAD
- Mini centrifuga, MiniSpin plus, CL 771576, Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka
- UV sterilizacijski kabinet, GLE-UVSC 30036899, Scie-Plas, Cambrige, Velika Britanija
- Sustav za horizontalnu elektroforezu, Vari-Gel Midi, TVG-SYS, Scie-Plas, Cambrige, Velika Britanija
- Uređaj za napajanje za provedbu elektroforeze, Mini PRO 300V, EEPS-300, Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Njemačka
- Sustav za snimanje UVIDOC, UVITEC, Cambrige, Velika Britanija

### 3.1.7. Laboratorijski pribor

- Kolona za tekućinsku kromatografiju Gemini (150 x 4,6 mm, 5 µm,) Phenomenex, Torrance, SAD
- Predkolona SecurityGuard™ Cartridges Gemini (C18 4 x 3,0 mm ID), Phenomenex, Torrance, SAD
- Imunoafinitetne kolonice AFLAOCHRAPREP®, R-Biopharm, Darmstadt, Njemačka
- Imunoafinitetne kolonice Easi-extract CITRININ®, R-Biopharm, Darmstadt, Njemačka
- Imunoafinitetne kolonice Easi-extract STERIGMATOCYSTIN®, R-Biopharm, Darmstadt, Njemačka
- Captiva EMR Lipid SPE (engl. *Solid Phase Extraction*) kolonice (3 mL, 300 mg), Agilent, Santa Clara, SAD
- Kolonice sa filtraciju Reservoir frit Bond Elut, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD
- Jednokanalne pipete, 0,1 – 5000 µL, Eppendorf Research, Hamburg, Njemačka

### 3.1.8. Ostali laboratorijski pribor

- Konusne epruvete PTFE sa čepom na navoj volumena 50 mL
- Menzure volumena 50 – 1000 mL
- Staklene epruvete za jednokratnu upotrebu volumena 10 mL
- Filteri PTFE 4,5 mm, 0,2 µm
- Vijali za HPLC sa i bez inserata i čepovi
- PCR epruvete 0,2 mL
- Posudice za pohranu uzoraka
- Erlenmeyer tikvice volumena 50 mL
- Odmjerne tikvice od 250 i 1000 mL
- Plastične čaše za analizu originalne uz uređaj za mjerenje natrija
- Plastični i stakleni ljevci
- Staklene čaše volumena 100 mL
- Filter papir crna vrpca promjera 125 mm 640 w
- Magneti za miješanje
- Pasterove pipete 5 mL

- Termometar
- Skalpel jednokratni
- Plastične Petrijeve zdjelice promjera 90 mm
- Mikrobiološke ušice i igle
- Igle za seciranje (lancete) dužine 50 mm
- Adapteri za kolonice
- Mikrocentrifugalne tubice 2 mL
- Predmetnice i pokrovnice
- Plinski plamenik

### **3.1.9. Računalni programi**

- Microsoft Excel 2007, Microsoft, Redmond, SAD
- SPSS Statistics 22.0, IBM Inc., New York, SAD
- Statistica 10.0, StatSoft, Tulsa, SAD
- Lasergene 16, DNASTAR, Madison, SAD
- MassHunter mass spectrometry (uz LC-MS/MS sustav), Agilent, Santa Clara, SAD
- Google Fusion Tables, Google, Mountain View, SAD

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. Uzorkovanje i pohrana TMP**

Uzorci hrvatskih TMP (n = 250) iz skupine trajnih kobasica i trajnih suhomesnatih proizvoda dostupni na tržištu uzorkovani su na sajmovima ili izravno na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima (OPG) u količini od 1000 do 1500 g. Uzorkovanje je provedeno tijekom dvogodišnjeg razdoblja (2020. – 2021.) na način da se u obje godine uzorkovanja uzela ista količina i vrsta uzoraka sa istih lokaliteta, ukoliko je to bilo moguće. Za uzorke uzorkovane 2020. godine zrenje je trajalo 2019. godinu pa do polovice 2020. godine, a za uzorke uzorkovane 2021. godine, 2020. godinu pa do prve polovice 2021. godine. Od ukupno 250 uzoraka tradicionalnih mesnih proizvoda, uzorkovano je šest vrsta proizvoda (slika 15). Uzorkovanje je provedeno u središnjoj (Krapinsko-zagorska, Zagrebačka županija, n = 24), sjevernoj (Koprivničko-križevačka, Varaždinska, Virovitičko-podravska županija, n = 62), istočnoj (Vukovarsko-srijemska, Osječko-baranjska, Požeško-slavonska županija, n = 52),



zapadnoj (Istarska, Primorsko- goranska županija, n = 55) te južnoj (Splitsko-dalmatinska, Dubrovačko-neretvanska, Šibensko-kninska županija, n = 57) regiji (tablica 4, slika 16). Prilikom uzorkovanja zabilježeni su podaci o trajanju zrenja proizvoda kako bi se mogli povezati s vremenskim čimbenicima.



**Slika 15.** Primjeri uzorkovanih vrsta TMP: a) kulen; b) kobasice c) šunka d) buđola e) pečenica f) slanina (vlastita fotografija)

Nakon uzorkovanja, prvotno je provedeno brisanje površine za identifikaciju plijesni te su potom uzorci homogenizirani i određena su im fizikalno-kemijska svojstva značajna za

nastanak plijesni. Uzorci su potom pohranjeni u plastične posudice i čuvani na -20 °C do analize mikotoksina.

**Tablica 4.** Prikaz raspodjele uzorkovanih TMP prema vrsti proizvoda, godini i regiji Hrvatske

Regija	Županija	Godina uzorkovanja	Kobasice			Suhomesnati proizvodi		
			Kulen/kulenova seka	Trajne kobasice	Pršut/šunka	Vratina/budola	Pečenica/ombolo/kare/zagrebnjak	Slanina/panceta/špek
Istočna	Osječko - baranjska	2020	5	2	1			1
		2021	6	3	1			2
	Vukovarsko - srijemska	2020	8	5	2			
		2021	4	2	2			
	Požeško - slavonska	2020	2	1	1			
		2021	2	1	1			
Sjeverna	Koprivničko - križevačka	2020	1	4	1	2	1	5
		2021	3	6		2	2	2
	Virovitičko - podravska	2020	1	1	1	1	1	
		2021			1	1	1	1
	Varaždinska	2020	2	6		1	1	2
		2021	1	5		1	1	4
Središnja	Zagrebačka	2020	1	2				
		2021	1	3				1
	Krapinsko - zagorska	2020		3		2		3
		2021		4	1	1		2
Zapadna	Istarska	2020		8	3		5	5
		2021		7	5	2	6	5
	Primorsko - goranska	2020	1	3			1	
		2021		2			1	1
Južna	Splitsko - dalmatinska	2020		1	2	1		3
		2021		1	6	1	1	4
	Šibensko - kninska	2020			4	3	4	3
		2021			6	4	4	4
	Dubrovačko - neretvanska	2020			2			1
		2021			1			1



**Slika 16.** Karta županija odnosno regija RH na kojima je provedeno uzorkovanje TMP

### 3.2.2. Određivanje fizikalno–kemijskih svojstava TMP

#### 3.2.2.1. Određivanje aktiviteta vode

Aktivitet vode u uzorcima TMP određen je internom metodom na način da se prethodno usitnjenim uzorkom napunila originalna posudica za uzorke do oznake te stavila u uređaj za mjerenje aktiviteta vode. Pritiskom na tipku *enter*, započinje automatsko mjerenje  $a_w$  u tzv. *quick mode*-u. Po isteku određenog vremena mjerenja, odnosno, do pojave vizualnog signala, na ekranu je očitana vrijednost  $a_w$  u uzorku.

### **3.2.2.2. Određivanje pH vrijednosti**

Postupak mjerenja pH vrijednosti u uzorcima TMP proveden je pomoću pH metra. Odvagano je 5 g homogeniziranog uzorka u Erlenmayerovu tikvicu i dodano 50 mL demineralizirane vode. Sadržaj tikvice je ostavljen mućkati 15 min na tresilici. Nakon mućkanja pomoću pH metra izmjerena je pH vrijednost uzorka.

### **3.2.2.3. Određivanje udjela soli (NaCl)**

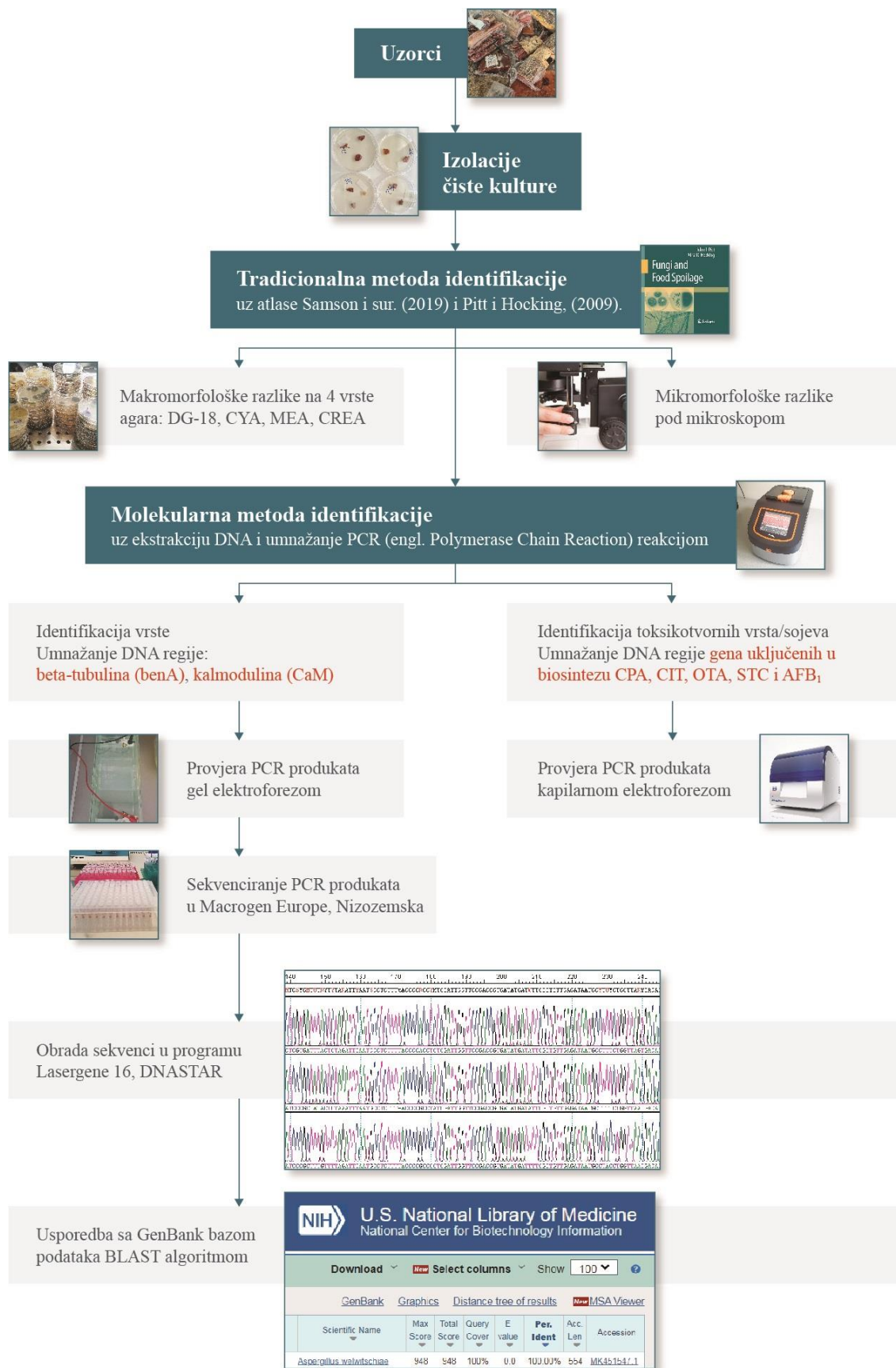
Postupak određivanja soli, odnosno, natrijevog klorida u uzorcima TMP proveden je primjenom potenciometrijske metode višestrukog dodavanja standarda uz pomoć uređaja za mjerenje natrija sa ion- selektivnom elektrodom.. U odmjernu tikvicu od 250 mL odvagan je 1 g uzorka te je tikvica dopunjena ultračistom toplom vodom ( $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$ ) do  $\frac{3}{4}$  volumena. U tikvicu je potom stavljen magnet za miješanje te je uzorak miješan tijekom 30 min na magnetnoj miješalici uz grijanje na  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sadržaj tikvice ohlađen je na sobnu temperaturu pod mlazom vode te je nadopunjen vodom do oznake. Nakon toga, 20 mL uzorka je filtrirano u plastičnu čašicu za mjerenje, dodano je 20 mL 1M DIPA-HCL-ISA otopine i magnet za miješanje, čašica je postavljena na uređaj za mjerenje natrija te je u nju uronjena elektroda. Prije početka mjerenja u program uređaja upisana je masa uzorka te nakon provedenog mjerenja uređaj ispisuje rezultat tj. udio natrija iz kojeg se potom stehiometrijski računa udio natrijeva klorida na način da se udio natrija pomnoži sa 2,5.

### **3.2.3. Izolacija plijesni s površine TMP**

U svrhu izolacije čiste kulture plijesni s TMP, vidljivo porasle kolonije plijesni odvojile su se od površine TMP skalpelom te se također površina TMP pobrisala vatom namočenom s Tween 80 i nacjepila u Petrijevu zdjelicu sa DG-18 agarom. Inkubacija je trajala 7 dana u mraku pri  $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  u termostatu.

### **3.2.4. Identifikacija plijesni s površine TMP**

Shematski prikaz procesa identifikacije vrsta plijesni s površine TMP dan je na slici 17.



**Slika 17.** Shematski prikaz procesa identifikacije plijesni s površine TMP



### 3.2.4.1. Tradicionalne metode identifikacije plijesni

Tradicionalnim metodama identifikacije plijesni su identificirane do razine roda određivanjem njihovih makro- i mikro- skopskih karakteristika i upotrebom atlasa Samson i sur. (2019) te Pitt i Hocking (2009). Postupak je proveden na način da su izolirane čiste kulture plijesni naciepljene na DG-18, MEA, CYA agar te dodatno na CREA agar za *Penicillium* vrste, uz inkubaciju 7 dana u mraku pri  $25 \pm 1$  °C u termostatu. Kod određivanja makroskopskih karakteristika poraslih kolonija plijesni promatrala se boja površine i poledine kolonije, boja podloge, veličina i tekstura kolonija. Za mikroskopske karakteristike, preparati za mikroskopiranje pripremljeni su s MEA agarom nakon inkubacije. Na predmetnicu je stavljena kap plavog laktofenola i mikrobiološkom iglom uzet je dio micelija i spora plijesni s agara. Uzorak plijesni je razvučen u što tanjem sloju mikrobiološkom iglom te pokriven pokrovnicom. Preparat je mikroskopiran pod povećanjem od 1000 x uz upotrebu imerzionog ulja. Izolirane čiste kulture plijesni sa agara izrezane su lancetom i čuvane u fiziološkoj otopini u hladnjaku do molekularne identifikacije.

### 3.2.4.2. Molekularne metode identifikacije plijesni

Molekularne metode identifikacije plijesni nastavljaju se na tradicionalne metode sa svrhom identifikacije vrste plijesni koje se nisu mogle identificirati tradicionalnim metodama. Ove metode obuhvaćaju izolaciju i umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR), vizualizaciju PCR produkata, sekvencioniranje te obradu i usporedbu dobivenih sekvenci s bazama podataka.

#### Izolacija DNA

U svrhu izolacije DNA, izolirane čiste kulture plijesni koje su čuvane u fiziološkoj otopini inokulirane su na MEA agaru i inkubirane pri  $25 \pm 1$  °C tijekom 7 dana u termostatu. DNA je ekstrahirana iz oko 40 µg kolonija plijesni pomoću NucleoSpin Microbial DNA kita, pridržavajući se uputa proizvođača:

1. Priprema i liza uzoraka - Mikrobiološkom iglom izrezan je isječak plijesni koja je porasla na MEA agaru i stavljen je u NucleoSpin tubicu tip B u koju je dodano 100 µL pufera za pranje BE, 40 µL pufera za lizu MG i 10 µL proteinaze K te je izvršeno mehaničko razaranje stanica plijesni u homogenizatoru pri 6,0 m/s tijekom 100 s. Nakon toga, sadržaj tubice je centrifugiran 30 s pri 11,000 g.

2. Podešavanje uvjeta za vezanja DNA - Dodano je 600  $\mu\text{L}$  pufera za lizu MG, vorteksirano 3 s te ponovno centrifugirano 30 s pri 11,000 g.
3. Vezanje DNA - Oko 500 - 600  $\mu\text{L}$  supernatanta prebačeno je u NucleoSpin Microbial DNA kolonu koja je stavljena u 2 mL tubicu za prikupljanje. Sve je centrifugirano 30 s pri 11,000 g. Tubica za prikupljanje je odbačena, a NucleoSpin Microbial DNA kolona stavljena u novu tubicu od 2 mL za prikupljanje.
4. Ispiranje silika membrane - Dodano je 500  $\mu\text{L}$  pufera za pranje BW te centrifugirano 30 s pri 11,000 g. Protok je odbačen, a NucleoSpin Microbial DNA kolona stavljena ponovno u tubicu od 2 mL za prikupljanje. Dodano je 500  $\mu\text{L}$  pufera za pranje B5 te centrifugirano 30 s pri 11,000 g.
5. Sušenje silika membrane - Protok je odbačen, a NucleoSpin Microbial DNA kolona je stavljena ponovno u tubicu od 2 mL za prikupljanje. Kolona je centrifugirana 30 s pri 11,000 g.
6. Eluiranje DNA - NucleoSpin Microbial DNA kolona je stavljena u mikrocentrifugalnu tubicu od 2 mL i dodano je 100  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje BE. Inkubirano je pri sobnoj temperaturi 1 min. Sve je centrifugirano 30 s pri 11,000 g. Mikrocentrifugalne tubice s izoliranom DNA su označene i spremljene u ledenicu do daljne analize.

### **Umnažanje DNA - PCR reakcija**

Za provedbu PCR reakcije korišten je GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix kit prema uputama proizvođača i specifične početnice Bt2a i Bt2b za umnažanje DNA regije beta-tubulina (benA) te Cmd5 i Cmd6 za umnažanje DNA regije kalmomodulina (CaM).

#### **Priprema otopina početnica:**

- *Stock* otopina 100  $\mu\text{M}$ :  $100 \mu\text{M} = X \text{ nmol liofilizirana početnica} + (X \cdot 10 \mu\text{L vode za molekularne pretrage})$
- Radna otopina svake pojedine početnice 10  $\mu\text{M}$ : 10  $\mu\text{L}$  *stock* otopine 100  $\mu\text{M}$  pojedine početnice (Cmd5/Cmd6/Bt2a/Bt2b) razrijeđeno s 90  $\mu\text{L}$  vode za molekularne pretrage
- Radna otopina svake pojedine početnice 5  $\mu\text{M}$ : 5  $\mu\text{L}$  *stock* otopine 100  $\mu\text{M}$  pojedine početnice (Cmd5/Cmd6/Bt2a/Bt2b) razrijeđeno s 95  $\mu\text{L}$  vode za molekularne pretrage

Prije upotrebe svi reagensi su temperirani i kratko vorteksirani. PCR reakcijske smjese pripremljene su u mikrocentrifugalnoj tubici.

Svaka reakcijska smjesa od 25  $\mu\text{L}$  sadržavala je:

- 12,5  $\mu\text{L}$  PCR pufera
- 0,4  $\mu\text{M}$  početnice uzvodne (engl. *forward*) (Bt2a ili Cmd5) i nizvodne (engl. *reverse*) (Bt2b ili Cmd6)
- 9,5  $\mu\text{L}$  vode za molekularne pretrage
- 1  $\mu\text{L}$  ekstrahirane DNA

Reakcijska smjesa je promiješana pipetiranjem i kratko centrifugirana u mini centrifugi kako bi cijeli sadržaj tubice ostao na dnu. Za svaku PCR reakcijsku smjesu rađena je pozitivna i negativna kontrola. Za pozitivnu kontrolu korištena je ekstrahirana DNA plijesni iz prethodnih postupaka molekularne identifikacije, a za negativnu kontrolu voda za molekularne reakcije u količini od 1  $\mu\text{L}$ .

PCR tubice s reakcijskom smjesom te pozitivnom i negativnom kontrolom stavljene su u PCR uređaj uz odvijanje reakcije prema protokolu u tablici 5:

**Tablica 5.** Protokol umnažanja DNA regije *benA* i CaM PCR reakcijom

KORAK	VRIJEME	TEMPERATURA
Početno zagrijavanje	2 min	95 °C
40 ciklusa:		
• Denaturacija	30 s	95 °C
• Sparivanje početnica	30 s	56 °C
• Produljivanje DNA lanca	1 min	72 °C
• Završno produljivanje DNA lanca	5 min	72 °C
Hlađenje reakcijske smjese	$\infty$	4 °C

### Vizualizacija PCR produkata gel elektroforezom

Za elektroforezu na gelu pripremljen je 1,5 % agarozni gel. U tikvicu je dodano 1,5 g agaroze i 98,5 mL 1x TAE pufera (1x TAE pufer pripremljen je na način da je u bocu stavljeno 20 mL 50x TAE pufera i 980 mL deionizirane vode). Sadržaj Erlenmayerove tikvice je postupno zagrijavan sve dok se gel nije potpuno otopio, zatim ohladio pod mlazom vode na oko 60 °C te je dodano 5  $\mu\text{L}$  GelStar boje. U kalup je izlivena agarozna i sve je zajedno promiješano nastavkom za pipete te je umetnut češalj za jažice. Skrutnuti gel uronio se u kadicu s TAE puferom. PCR produkt (5  $\mu\text{L}$ ), DNA ljestve te pozitivna i negativna kontrola nanešeni su mikropipetom u jažice gela. Gel je pokrenut pri naponu od 70 V tijekom 90 min. Po završetku elektroforeze, isključeno je napajanje, a gel je pažljivo uklonjen iz posude i postavljen u UV transluminator. Pod upaljenim UV svjetlom vizualizirani su fragmenti DNA.



### **Pročišćavanje PCR produkata i slanje na sekvenciranje**

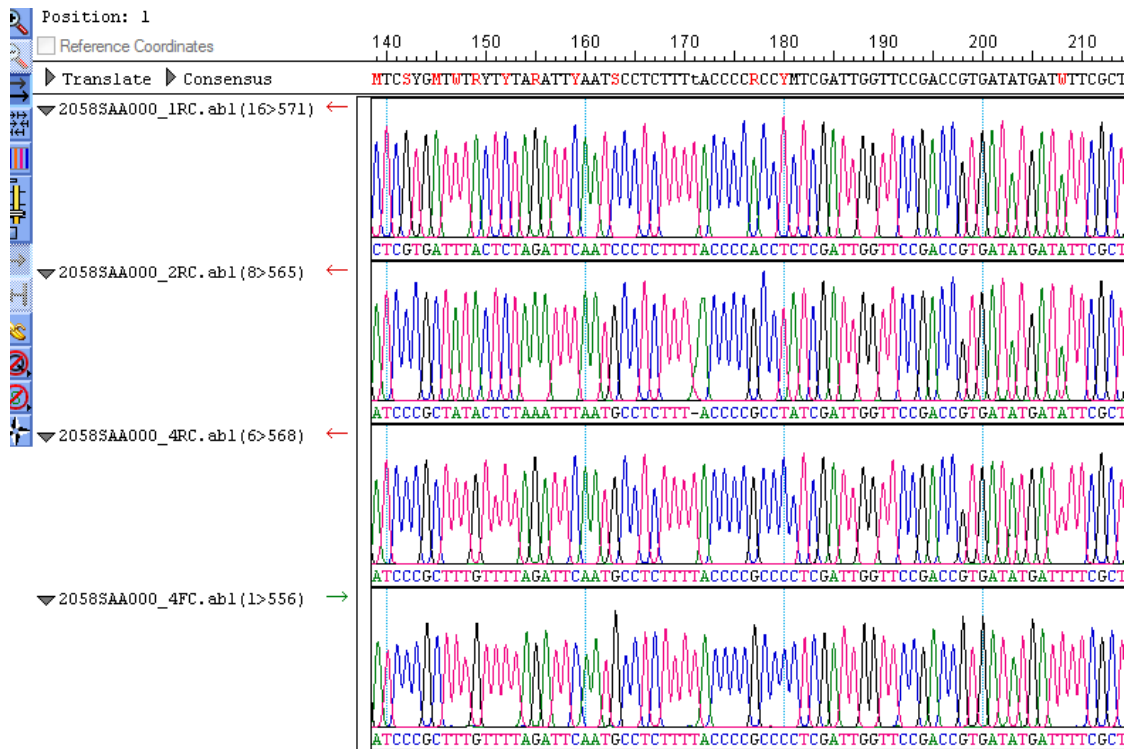
PCR produkti su pročišćeni korištenjem Illustra ExoProStar reagensa koji je čuvan na ledu za vrijeme korištenja. U svaku tubicu s PCR produktom dodano je 2 µL illustra ExoProStar. Tubice su stavljene u PCR aparat uz program za pročišćavanje: 45 min na temperaturi od 37° C te 15 min na 80 °C. Nakon pročišćavanja, sadržaj svake tubice podijeljen je dodatno u dvije tubice sa po 5 µL pročišćenog produkta. U jednu je tubicu dodano 5 µL 5 µM uzvodne početnice odnosno Bt2a za regiju beta-tubulina te Cmd5 za regiju kalmodulina, a u drugu 5 µL 5 µM nizvodne početnice odnosno Bt2b za regiju beta-tubulina te Cmd6 za regiju kalmodulina. Tako pripremljeni uzorci poslani su na sekvencioniranje u komercijalnu ustanovu Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska.

### **Obrada sekvenci**

Sekvence dobivene od Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska obrađene su pomoću programa Lasergene 16 DNASTAR, sučelja SeqManPro (slika 18). Uređene sekvence uspoređene su s onima koje su dostupne u GenBank bazi podataka pri NCBI (Nacionalni centar za biotehnoške informacije) upotrebom BLAST algoritma putem linka: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), kako bi se identificirala vrsta plijesni na temelju sličnosti sekvenci u bazi. Dobivene nukleotidne sekvence toksikotvornih plijesni su također upisane u GenBank bazu podataka kako bi se dobio pristupni broj za identificiranu vrstu plijesni.

Rezultati dobivenih izolata plijesni su prikazani kao:

- Relativna gustoća, Dr (engl. *relative density*) = broj izolata vrste / ukupan broj izolata x 100
- Relativna frekvencija, Fr (engl. *relative frequency*) = broj uzoraka na kojem je odabrana vrsta plijesni prisutna / ukupan broj uzoraka x 100



**Slika 18.** Primjer obrade sekvenci u SeqManPro sučelju programa Lasergene 16, DNASTAR, Madison, SAD (vlastita fotografija)

### 3.2.4.3. PCR detekcija gena uključenih u biosintezu mikotoksina

Na izoliranim DNA čistih kultura plijesni, ovisno o vrsti identificirane plijesni koja može biti potencijalni producent nekih od analiziranih mikotoksina, provedena je PCR detekcija gena uključenih u njihovu biosintezu. Reakcijska smjesa pripravljena prema dolje navedenim uputama za svaki pojedini mikotoksin promiješana je pipetiranjem i kratko centrifugirana u mini centrifugi kako bi sav sadržaj tubice ostao na dnu. Za svaku PCR reakcijsku smjesu napravljena je pozitivna i negativna kontrola. Za pozitivnu kontrolu korištena je DNA plijesni iz prethodnih postupaka detekcije gena koja je sekvencirana, a za negativnu kontrolu voda za molekularne reakcije u količini u kojoj se prema protokolu dodaje DNA. PCR tubice s reakcijskom smjesom te pozitivnom i negativnom kontrolom stavljene su u PCR uređaj uz odvijanje reakcije prema protokolima u tablicama 6 - 8. PCR produkti provjereni su kapilarnom elektroforezom.

#### **AFB<sub>1</sub> i STC geni**

Za provedbu višestruke PCR reakcije korišten je GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix kit i specifične početnice *nor1* i *nor2* za umnažanje gena *nor-1* koji kodira za norsolorinsku kiselinu reduktazu, početnice *ver1* i *ver 2* za umnažanje gena *ver-1* koji kodira za versikolorin

A dehidrogenazu i početnice *omt1* i *omt2* za umnažanje gena *omt-A* koji kodira za sterigmatocistin-O-metiltransferazu (Geisen, 1996).

Svaka reakcijska smjesa od 15  $\mu$ L sadržavala je:

- 7,5  $\mu$ L PCR pufera
- 0,4  $\mu$ M početnice (*nor1*, *nor2*, *ver1*, *ver2*, *omt1*, *omt2*)
- 2,4  $\mu$ L vode za molekularne pretrage
- 1,5  $\mu$ L ekstrahirane DNA

**Tablica 6.** Protokol umnažanja DNA višestrukom PCR reakcijom

KORAK	VRIJEME	TEMPERATURA
Početno zagrijavanje	2 min	95 °C
40 ciklusa:		
• Denaturacija	1 min	94 °C
• Sparivanje početnica	1 min	60 °C
• Produljivanje DNA lanca	1 min	72 °C
• Završno produljivanje DNA lanca	5 min	72 °C
Hlađenje reakcijske smjese	$\infty$	4 °C

### OTA geni

Za provedbu PCR reakcije korišten je GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix kit i specifične početnice F1OT i R1OT za umnažanje *otanpsPN* gena koji kodira za OTA neribosomalnu peptid sintetazu te AoLC35-12R i AoLC35-12F za umnažanje *otapks* koji kodira za OTA poliketid sintetazu (Luque i sur., 2013; Dao i sur., 2005).

Svaka reakcijska smjesa od 15  $\mu$ L sadržavala je:

- 7,5  $\mu$ L PCR pufera
- 0,4  $\mu$ M početnice (F1OT, R1OT ili AoLC35-12R i AoLC35-12F)
- 4,8  $\mu$ L vode za molekularne pretrage
- 1,5  $\mu$ L ekstrahirane DNA

**Tablica 7.** Protokol umnažanja DNA PCR reakcijom

KORAK	VRIJEME	TEMPERATURA
Početno zagrijavanje	2 min	95 °C
35 ciklusa:		
• Denaturacija	30 s	94 °C
• Sparivanje početnica	40 s	57 °C
• Produljivanje DNA lanca	1 min	72 °C
• Završno produljivanje DNA lanca	5 min	72 °C
Hlađenje reakcijske smjese	$\infty$	4 °C

## CIT gen

Za provedbu PCR reakcije korišten je GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix kit i specifične početnice pksCT F i pksCT R za umnažanje *pksCT* gena koji kodira za citrinin poliketid sintazu (Shimizu i sur., 2007).

Svaka reakcijska smjesa od 15  $\mu$ L sadržavala je:

- 7,5  $\mu$ L PCR pufera
- 0,4  $\mu$ M početnice (pksCT F i pksCT R)
- 4,8  $\mu$ L vode za molekularne pretrage
- 1,5  $\mu$ L ekstrahirane DNA

**Tablica 8.** Protokol umnažanja DNA PCR reakcijom

KORAK	VRIJEME	TEMPERATURA
Početno zagrijavanje	2 min	95 °C
40 ciklusa:		
• Denaturacija	30 s	95 °C
• Sparivanje početnica	30 s	59 °C
• Produljivanje DNA lanca	30 s	72 °C
• Završno produljivanje DNA lanca	5 min	72 °C
Hlađenje reakcijske smjese	$\infty$	4 °C

## Provjera PCR produkata kapilarnom elektroforezom

PCR produkti vizualizirani su kapilarnom elektroforezom na način da su marker molekulske mase DNA (engl. *size marker*), tubice sa uzorcima, pozitivna i negativna kontrola postavljene u uređaj za kapilarnu elektroforezu, zajedno sa markerom za sravnjenje (engl. *alignment marker*) i QIAxcel DNA Screening kitom te je pokrenuto razdvajanje. U softveru uređaja QIAxcel ScreenGel, vidljivi su fragmenti DNA bilo u obliku elektroferograma ili prikaza slike gela.

## CPA gen

Za provedbu PCR reakcije u stvarnom vremenu na PCR uređaju Rotor-Gene Q korišten je Universal Mastermix kit i specifične početnice dmaTF i dmaTR te proba dmaTP za umnažanje *dmaT* gena koji kodira za dimetilalil triptofansintaza (Rodriguez i sur., 2012a).

Svaka reakcijska smjesa od 25  $\mu$ L sadržavala je:

- 12,5  $\mu$ L PCR pufera
- 2,5  $\mu$ M 10x koncentriranog miksa početnica i probe (dmaTF, dmaTR i dmaTP)
- 5  $\mu$ L vode za molekularne pretrage

- 5  $\mu\text{L}$  ekstrahirane DNA

Koncentrirani miks početnica (10x) i probe u volumenu 50  $\mu\text{L}$  pripravljen je na način da je dodano po 2  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  dmaTF i dmaTR, 1  $\mu\text{L}$  dmaTP te 45  $\mu\text{L}$  vode.

Temperaturni program umnožavanja DNA PCR reakcijom u stvarnom vremenu uključuje inicijalnu denaturaciju 10 min na 95 °C te 45 ciklusa 15 s pri 95 °C i nakon toga 60 s na 60 °C. Nakon svakog ciklusa slijedi očitavanje fluorescencije svjetlosti valne duljine 520 nm za fluorescentnu boju FAM.

### **3.2.5. Razvoj i validacija LC-MS/MS metode za određivanje mikotoksina**

#### **3.2.5.1. Kromatografska analiza**

Razvoj metode za detekciju i kvantifikaciju mikotoksina AFB<sub>1</sub>, OTA, STC, CIT i CPA proveden je primjenom spregnutih tehnika tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS/MS) pri čemu je maseni spektrometar opremljen trostrukim kvadrupol masenim detektorom sa ESI izvorom (slika 19).

Kromatografsko razdvajanje spojeva provedeno je na C18 koloni za tekućinsku kromatografiju, dimenzija 150 x 4,6 mm, veličine čestica 5  $\mu\text{m}$ , s C18 predkolonom dimenzija 4 x 3,0 mm. S obzirom da se radilo o razvoju multimikotoksinske bilo je neophodno gradijentno razdvajanje. Zbog kombinacije analitičke strukture i kompleksnog matriksa kromatografska analiza CPA pokazala se vrlo zahtjevnom te je razvijena zasebna kromatografska metoda za određivanje ovog mikotoksina u odnosu na ostale mikotoksine. Stoga se mobilna faza A i model gradijenta mobilne faze za određivanje CPA i određivanje AFB<sub>1</sub>, OTA, STC i CIT razlikuju.

Za analizu CPA korištena je mobilna faza pH 2,5 koja se pokazala optimalna vezano uz oblik pika. Gradijent mobilne faze za određivanje mikotoksina odvija se na dolje opisan način, pri brzini protoka od 1 mL/min i temperaturi kolone od 25 °C koja rezultiraju ukupnim vremenom analize 25 min za određivanje CPA odnosno 22 min za određivanje AFB<sub>1</sub>, OTA, STC i CIT (Vulić i sur., 2020; Lešić i sur., 2021b).

Gradijent mobilne faze:

CPA	AFB <sub>1</sub> , OTA, STC i CIT
<ul style="list-style-type: none"><li>• 0 – 1 min 100% A</li><li>• 1 - 14 min 100% B</li><li>• 14 – 16 min održavanje pri 100% B</li><li>• 16 – 18 min 100% A</li><li>• 4 min <i>post-run</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 0 – 14 min 100% A</li><li>• 14 – 18,10 100% B</li><li>• 18,10 – 20,5 min 100% A</li></ul>

Volumen injektiranja metoda je 40 µL uz ispiranje igle u mobilnoj fazi A i B kako bi se spriječila potencijalna unakrsna kontaminacija.



**Slika 19.** Tekućinski kromatograf sa tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) Agilent Technologies (vlastita fotografija)

Mobilna faza A za određivanje CPA ( 5 mM amonij acetata pH = 2,5). Pripremila se na način da se u odmjernu tikvicu od 1000 mL dodalo oko 900 mL ultračiste vode te 1 mL 5 mM

amonij acetata te se octenom kiselinom podesila vrijednost pH do 2,5. Amonij acetat (5 mM) pripremio se na način da se 3,85 g amonij acetata otopilo u 10 mL ultračiste vode.

Mobilna faza A za određivanje AFB<sub>1</sub>, OTA, STC i CIT sastojala se od ultračiste vode i metanola u omjeru 90/10 sa 5 mM amonij acetatom i 1% octenom kiselinom. Pripremila se na način da se pomiješalo 900 mL vode i 100 mL metanola, pipetom se oduzmelo 11 mL te se dodalo 10 mL octene kiseline i 1 mL 5 mM amonij acetata.

Mobilna faza B za određivanje CPA, AFB<sub>1</sub>, OTA, STC i CIT sastojala se od ultračiste vode i metanola u omjeru 97/3 sa 5 mM amonij acetatom i 1% octenom kiselinom. Pripremila se na način da se pomiješalo 970 mL metanola i 30 mL vode, pipetom se oduzelo 11 mL te dodalo 10 mL octene kiseline i 1 mL 5 mM amonij acetata.

### **Priprema standardnih otopina mikotoksina**

#### **AFB<sub>1</sub>**

- *Stock* standardna otopina AFB<sub>1</sub> (1 mg/mL; 1000 ppm): 1 mg AFB<sub>1</sub> otopljeno u 1 mL acetonitrila
- Radna standardna otopina AFB<sub>1</sub> (10 µg/mL; 10 ppm): 100 µL *stock* standardne otopine 1 mg/mL razrijeđeno do ukupnog volumena od 10 mL s acetonitrirom
- Radna standardna otopina AFB<sub>1</sub> (100 ng/mL; 100 ppb): 10 µL *stock* standardne otopine AFB<sub>1</sub> (10 µg/mL) razrijeđeno s 990 µL acetonitrila
- Radna standardna otopina AFB<sub>1</sub> (10 ng/mL; 10 ppb): 100 µL *stock* standardne otopine AFB<sub>1</sub> (100 µg/mL) razrijeđeno s 900 µL acetonitrila
- Radna standardna otopina AFB<sub>1</sub> (1 ng/mL; 1 ppb): 100 µL *stock* standardne otopine AFB<sub>1</sub> (10 µg/mL) razrijeđeno s 900 µL acetonitrila

#### **OTA**

- Radna standardna otopina OTA (100 ng/mL; 100 ppb): 10 µL originalne standardne otopine OTA (10 µg/mL) razrijeđeno s 990 µL acetonitrila
- Radna standardna otopina OTA (10 ng/mL; 10 ppb): 100 µL radne standardne otopine OTA (100 ng/mL) razrijeđeno s 900 µL acetonitrila

#### **STC**

- *Stock* standardna otopina STC (100 µg/mL; 100 ppm): 1 mg STC otopljeno u 10 mL acetonitrila

- Radna standardna otopina *STC* (1 µg/mL; 1 ppm): 10 µL *stock* standardne otopine *STC* (100 µg/mL) upareno u struji dušika na 40 °C i otopljeno u 1000 µL acetonitril/voda/octena kiselina (49,5/49,5/1)
- Radna standardna otopina *STC* (100 ng/mL; 100 ppb): 100 µL radne standardne otopine *STC* (1 µg/mL) razrijeđeno s 900 µL acetonitril/voda/octena kiselina (49,5/49,5/1)
- Radna standardna otopina *STC* (10 ng/mL; 10 ppb): 100 µL *stock* standardne otopine *STC* (100 ng/mL) razrijeđeno s 900 µL acetonitril/voda/octena kiselina (49,5/49,5/1)

### **CIT**

- Radna standardna otopina *CIT* (1 µg/mL; 1 ppm): 10 µL originalne standardne otopine *CIT* (100 µg/mL) upareno u struji dušika na 40 °C i otopljeno u 1000 µL acetonitril/voda/octena kiselina (49,5/49,5/1)
- Radna standardna otopina *CIT* (100 ng/mL; 100 ppb): 100 µL radne standardne otopine *CIT* (1 µg/mL) razrijeđeno s 900 µL acetonitril/voda/octena kiselina (49,5/49,5/1)
- Radna standardna otopina *CIT* (10 ng/mL; 10 ppb): 100 µL *stock* standardne otopine *CIT* (100 ng/mL) razrijeđeno s 900 µL acetonitril/voda/octena kiselina (49,5/49,5/1)

### **CPA**

- *Stock* standardna otopina *CPA* (100 µg/mL; 100 ppm): 1 mg *CPA* otopljeno u 10 mL acetonitrila
- Radna standardna otopina *CPA* (1 µg/mL; 1 ppm): 10 µL *stock* standardne otopine *CPA* (100 µg/mL) razrijeđeno s 990 µL acetonitrila
- Radna standardna otopina *CPA* (100 ng/mL; 100 ppb): 10 µL radne standardne otopine *CPA* (1 µg/mL) razrijeđeno s 900 µL acetonitrila
- Radna standardna otopina *CPA* (10 ng/mL; 10 ppb): 100 µL *stock* standardne otopine *CPA* (100 ng/mL) razrijeđeno s 900 µL acetonitrila

Otopine standarada za izradu kalibracijske krivulje pripremaju se svježe za svaku analizu u otopini acetonitril/voda/octena (49,5/49,5/1) prema tablicama 9 - 12:



**Tablica 9.** Priprema standardne kalibracijske krivulje u otapalu za AFB<sub>1</sub> i OTA

Točka kalibracije	c (AFB <sub>1</sub> stand. otopine) (ng/mL)	V (AFB <sub>1</sub> stand. otopine) (μL)	c (OTA stand. otopine) (ng/ mL)	V (OTA stand. otopine) (μL)	V (Acn/H <sub>2</sub> O/Oct) (μL)
Kal1	1	50	10	20	930
Kal2	10	10	10	40	950
Kal3	10	50	100	10	940
Kal4	100	10	100	25	965
Kal5	100	50	100	50	900

**Tablica 10.** Priprema standardne kalibracijske krivulje u otapalu za STC

Točka kalibracije	c (STC stand. otopine) (ng/mL)	V (STC stand. otopine) (μL)	V (Acn/H <sub>2</sub> O/Oct) (μL)
Kal1	10	10	990
Kal2	10	50	950
Kal3	100	25	975
Kal4	100	50	950
Kal5	100	100	900

**Tablica 11.** Priprema standardne kalibracijske krivulje u otapalu za CIT

Točka kalibracije	c (CIT stand. otopine) (ng/mL)	V (CIT Stand. otopine) (μL)	V (Acn/H <sub>2</sub> O/Oct) (μL)
Kal1	10	100	900
Kal2	100	20	980
Kal3	100	40	960
Kal4	100	80	920
Kal5	100	100	900

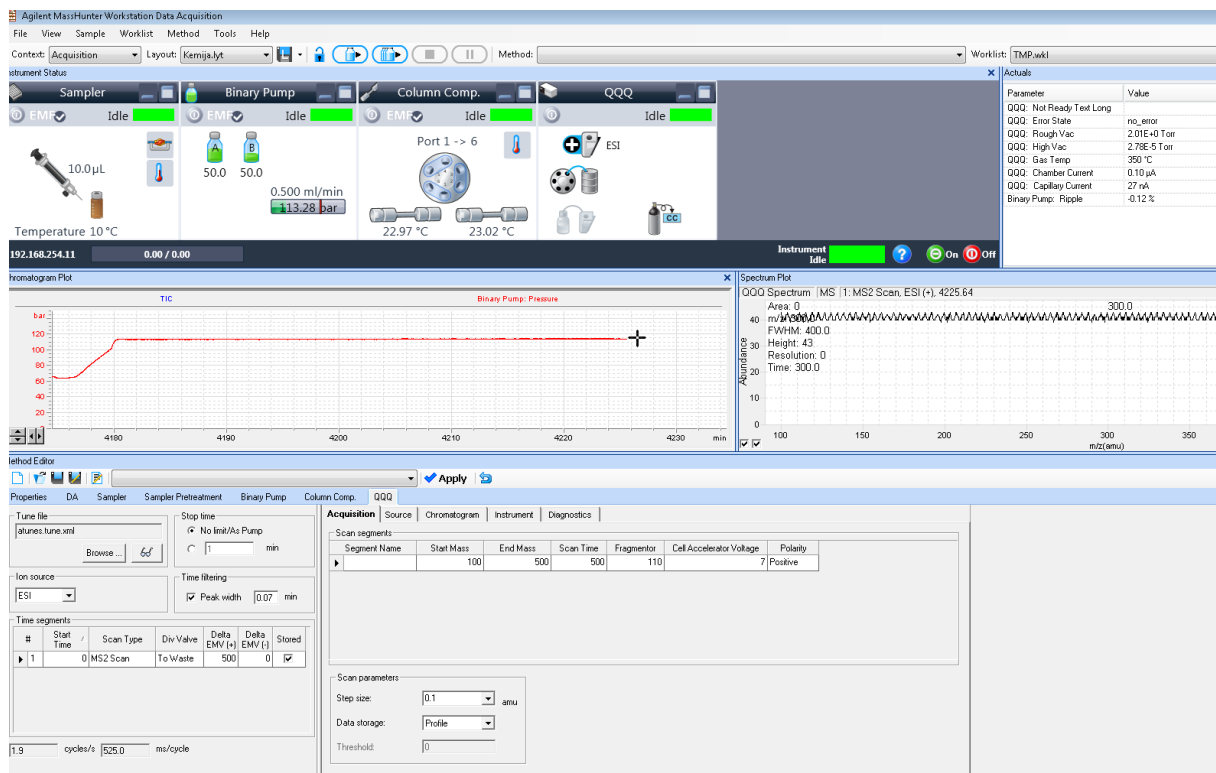
**Tablica 12.** Priprema standardne kalibracijske krivulje u otapalu za CPA

Točka kalibracije	c (CPA stand. otopine) (ng/mL)	V (CPA stand. otopine) ( $\mu$ L)	V (Acn/H <sub>2</sub> O/Oct) ( $\mu$ L)
Kal1	10	50	950
Kal2	100	25	975
Kal3	100	100	900
Kal4	1000	15	985
Kal5	1000	20	980

### 3.2.5.2. MS/MS analiza

Za kvantifikaciju i potvrdu analiziranih mikotoksina masenom spektrometrijom praćeni su jedan prekursor i dva produkt iona. Spektar mase svakog mikotoksina snimljen je injektiranjem 1  $\mu$ L otopine standarda (koncentracije 5  $\mu$ g/mL) svakog pojedinog mikotoksina u maseni spektrometar s ciljem odabira prekursor i produkt iona te optimizacije parametara masenog detektora masenog detektora za svaki pojedini analit (slika 20). Prekursor ion odabran je u *MS2 scan* modu., a kako bi se utvrdili uvjeti pri kojima se postiže najjači odziv produkt ioni su snimani pri različitim energijama kolizije te je ion s jačim odzivom izabran za kvantifikaciju, dok je ion sa slabijim odazivom korišten kao potvrdni ion spoja od interesa (slike 21 - 25). Optimizirani parametri masenog detektora su prikazani u tablici 13. Za svaki analizirani mikotoksin odabran je  $[M+H]^+$  adukt kao ion prekursor. Maseni spektrometar radio je u *Multiple Reaction Monitoring* modu (MRM), dok je ionizacija provedena u pozitivnom načinu rada (ESI +). Ostali parametri izvora masenog spektrometra su također optimizirani te su odabrani uvjeti pri kojima se za svaki analit postiže najjači odziv, kako slijedi:

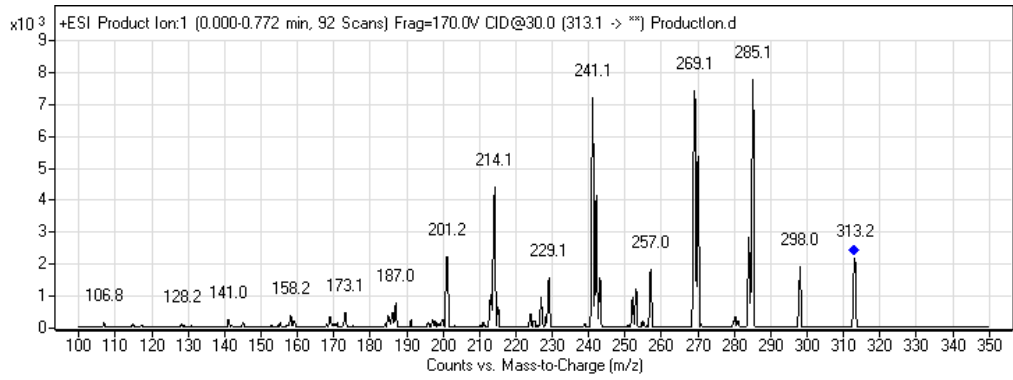
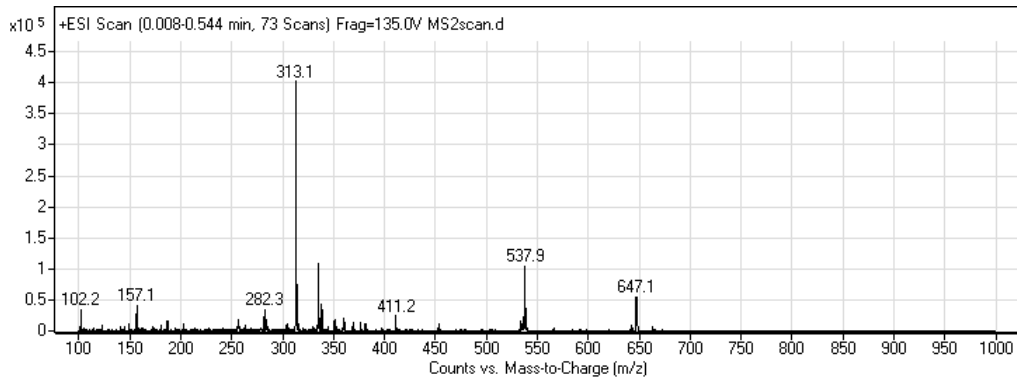
- temperatura plina 350 °C
- protok plina 12 L/min
- tlak u raspršivaču 20 psi
- napon u kapilari 4000 V (+) i 2000 V (-).



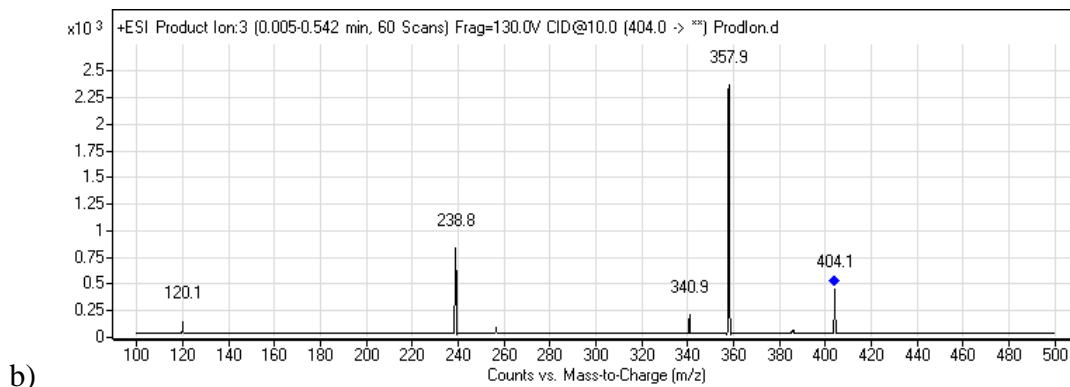
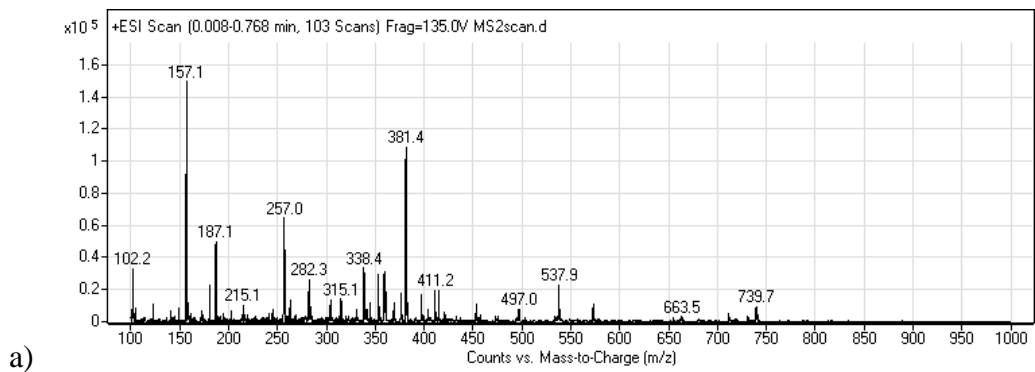
**Slika 20.** Sučelje DataAcquisition programa MassHunter, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD (vlastita fotografija)

**Tablica 13.** Dijagnostički ioni analiziranih mikotoksina i uvjeti masenog spektrometra

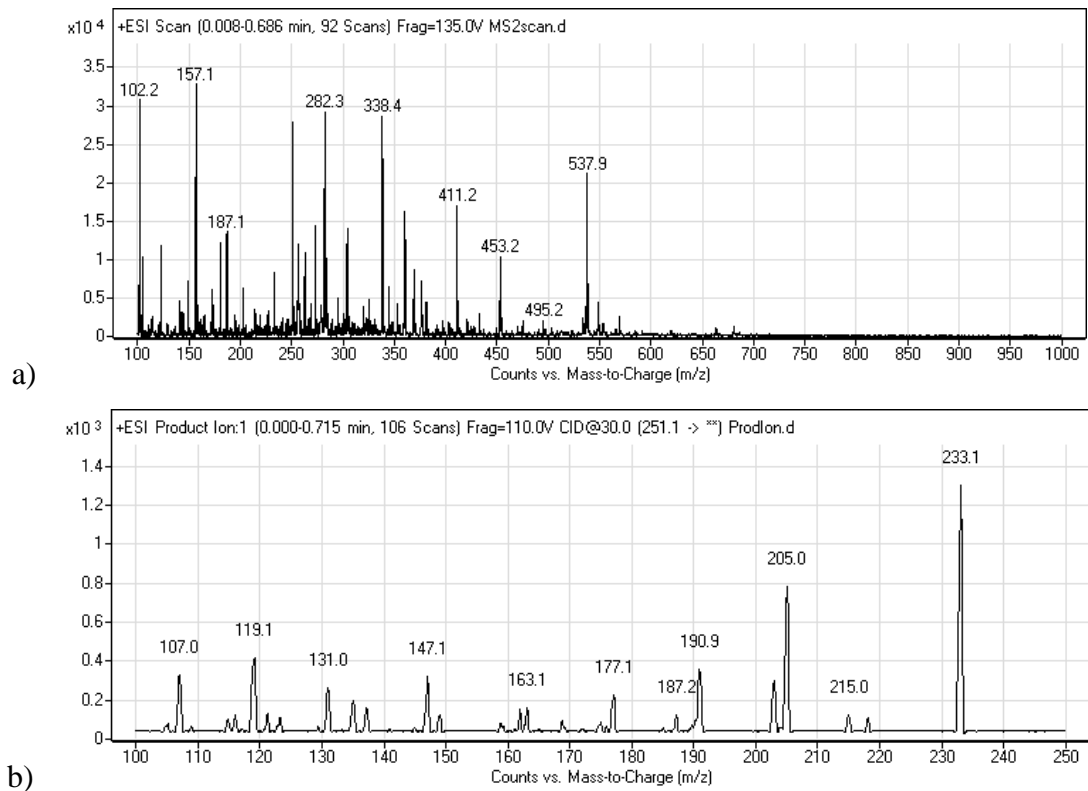
Analit	Prekursor ion	Napon fragmentora (V)	Produkt ioni	Kolizijska energija (eV)	Polarnost
<b>AFB<sub>1</sub></b>	313,1	170	285,1	23	Pozitivna
			269,1	30	
<b>OTA</b>	404,0	130	357,9	10	
			239,0	25	
<b>CPA</b>	337,2	110	196,3	25	
			182,1	20	
<b>STC</b>	325,1	130	310,0	25	
			281,0	40	
<b>CIT</b>	251,1	110	233,1	15	
			205,0	25	



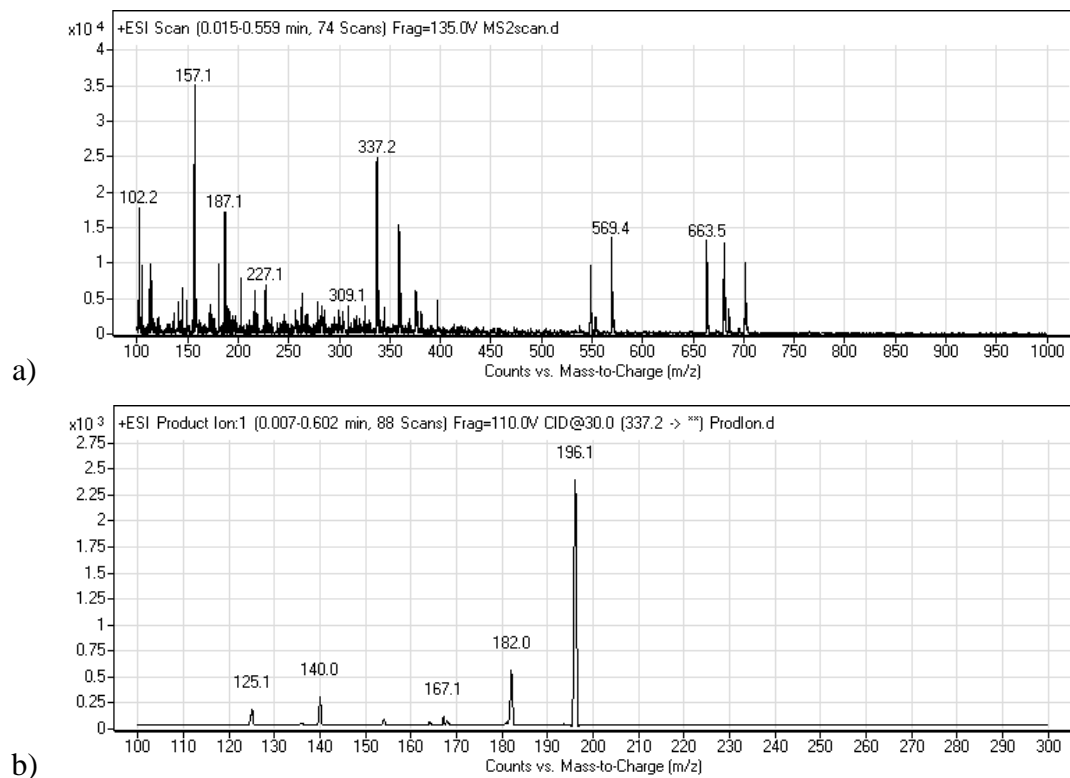
**Slika 21.** Maseni spektar AFB<sub>1</sub>: a) *MS2 scan* b) *Product Ion scan*



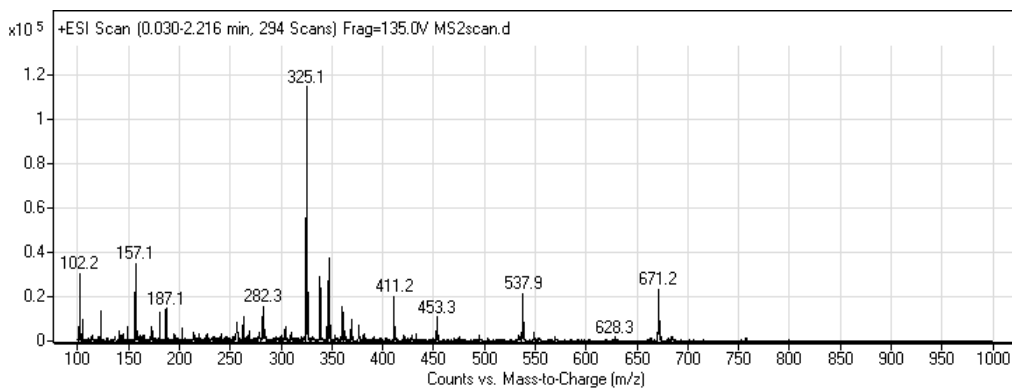
**Slika 22.** Maseni spektar OTA: a) *MS2 scan* b) *Product Ion scan*



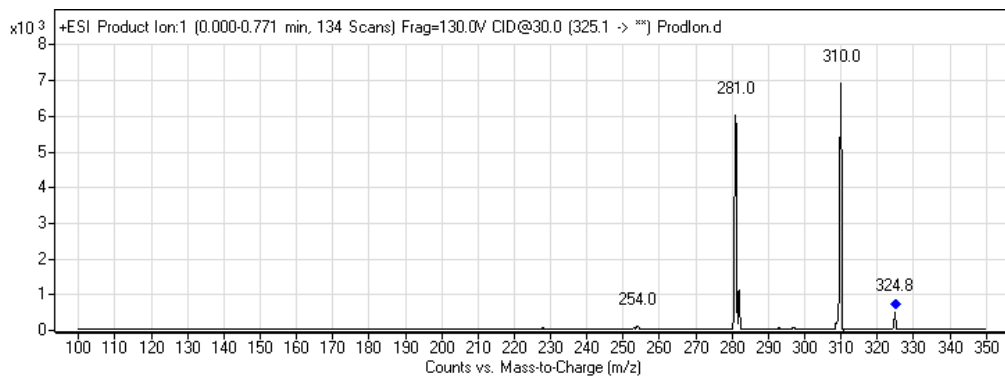
**Slika 23.** Maseni spektar CIT: a) *MS2 scan* b) *Product Ion scan*



**Slika 24.** Maseni spektar CPA: a) *MS2 scan* b) *Product Ion scan*



a)



b)

**Slika 25.** Maseni spektar STC: a) *MS2 scan* b) *Product Ion scan*

### 3.2.5.3. Validacija

Validacija metode provedena je prema dokumentu „Guidance document on the estimation of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for measurements in the field of contaminants in feed and food“ (Wenzl i sur., 2016). Prilikom validacije metode određivani su parametri linearnost, specifičnost, limit detekcije (LOD, engl. *Limit of Detection*) i limit kvantifikacije (LOQ, engl. *Limit of Quantification*), istinitost odnosno iskorištenje te utjecaj matrice. Za validaciju su korišteni obogaćeni *blank* uzorci, odnosno, uzorak koji je obogaćen poznatom količinom analita koji se treba detektirati. *Blank* uzorci za validaciju su izabrani prema nedostatku interferirajućeg signala u vremenu zadržavanja svakog analita.

#### Linearnost

Linearnost metode je provjerena u odgovarajućem koncentracijskom području mjerenja analizom pet standardnih otopina svakog pojedinog mikotoksina u otopini acetonitril/voda/octena kiselina. Standardne otopine mikotoksina razrijeđene su na način da se dobiju sljedeće koncentracije:

- CPA: 0,5, 2,5, 10, 15 i 20 ng/mL
- AFB<sub>1</sub>: 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 i 1 ng/mL
- OTA: 0,2, 0,4, 1, 2,5 i 5 ng/mL

- STC: 0,1, 0,5, 2,5, 5 i 10 ng/mL
- CIT: 1, 2, 4, 8 i 10 ng/mL

Kalibracijske krivulje su korigirane linearnom regresijom te je određena jednadžba kalibracijskog pravca i  $R^2$  za pojedini mikotoksin.

### Specifičnost

Odsutnost kromatografskog signala u očekivanom vremenu zadržavanja na kromatografskoj koloni ukazuje na specifičnosti razvijene metode. Određivanje specifičnosti metode provedeno je injektiranjem otapala i *blank* uzorka.

### LOD i LOQ

U svrhu određivanja LOD, deset slijepih proba odnosno tzv. *blank* uzoraka trajnih mesnih proizvoda obogaćeni su tako da koncentracija mikotoksina iznosi:

- 3  $\mu\text{g/kg}$  matriksa za CPA
- 2  $\mu\text{g/kg}$  matriksa za CIT
- 0,1  $\mu\text{g/kg}$  matriksa za STC
- 0,1  $\mu\text{g/kg}$  matriksa za AFB<sub>1</sub>
- 0,3  $\mu\text{g/kg}$  matriksa za OTA

Uzorci su potom pripremljeni i analizirani prema razvijenoj metodi pripreme uzoraka. Vrijednost LOD izračunata je iz nagiba kalibracijskog pravca (b) i standardne devijacije površine pikova obogaćenih uzoraka (SD) na način da je LOD jednako  $3,9 \cdot \text{SD}/b$ . LOQ je izračunat množenjem faktora 3,3 sa LOD.

### Iskorištenje

Iskorištenje metode određeno je na način da su *blank* uzorci trajnih mesnih proizvoda obogaćeni standardom svakog mikotoksina u deset ponavljanja na razinu 0,3  $\mu\text{g/kg}$  za OTA, 2  $\mu\text{g/kg}$  za CIT, 0,1  $\mu\text{g/kg}$  za STC, 0,1  $\mu\text{g/kg}$  za AFB<sub>1</sub> te 3  $\mu\text{g/kg}$  za CPA, odnosno na koncentracije nešto veće od dobivenih LOQ vrijednosti, te su pripremljeni i analizirani prema razvijenoj metodi pripreme uzoraka. Izračunate su srednje vrijednosti dobivenih koncentracija deset ponavljanja za svaki mikotoksin te je iskorištenje izraženo kao postotak.

### Utjecaj matrice

Utjecaj matrice je određen na način da se deset *blank* uzoraka trajnih mesnih proizvoda nakon pripreme uzoraka, odnosno postekstrakcijski, obogatilo na razine od 2 ng/mL za CIT, 0,5 ng/mL za STC, 0,25 ng/mL za AFB<sub>1</sub>, 0,4 ng/mL za OTA te 1 ng/mL za CPA te se usporedilo sa standarnim otopinama mikotoksina iste razine, pri čemu se također pripremlilo deset

zasebnih razrijeđenja. Utjecaj matrice je izračunat dijeljenjem srednjih vrijednosti površine pikova standardnih otopina sa srednjim vrijednostima površine pikova obogaćenih uzoraka, izražavajući dobivenu vrijednost kao postotak.

### 3.2.6. Određivanje koncentracije mikotoksina u uzorcima TMP

#### 3.2.6.1. Priprema uzoraka za određivanje koncentracije AFB<sub>1</sub>, OTA, STC i CIT

##### Priprema otopina

- Fosfatni pufer (PBS) sa 0,1 % Tween 20 pripremljen je na način da se 8 g natrij klorida, 0,2 g kalij klorida, 0,2 g kalij hidrogenfosfata i 1,16 g dinatrij hidrogenfosfata otopilo u 900 mL deionizirane vode, prema potrebi pH se podesio na 7,4 sa 1 M NaOH, dodalo se 1 mL Tween 20 te nadopunilo vodom do 1000 mL.
- Fosfatni pufer (PBS) (bez Tween 20) pripremljen je na način da se 8 g natrij klorida, 0,2 g kalij klorida, 0,2 g kalij hidrogenfosfata i 1,16 g dinatrij hidrogenfosfata otopilo u 900 mL deionizirane vode, prema potrebi pH se podesio na 7,4 sa 1 M NaOH te nadopunilo vodom do 1000 mL.

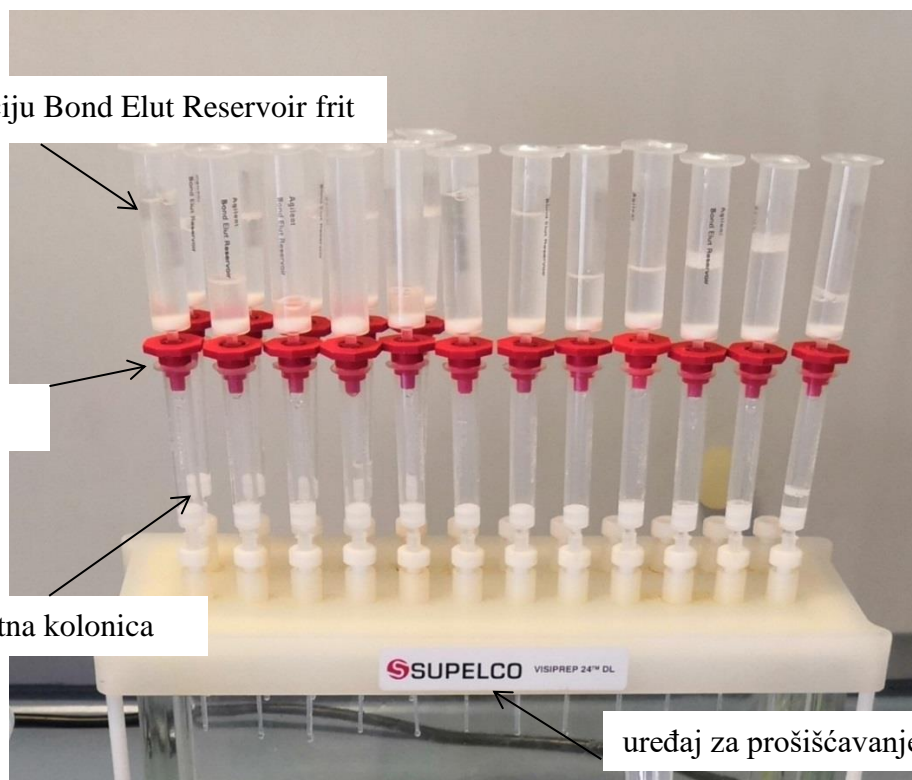
Određivanje koncentracije mikotoksina AFB<sub>1</sub>, OTA, STC i CIT provedeno je pomoću visokospecifičnih imunoafinitetnih kolonica. U konusne epruvete od 50 mL odvagano je 5 g homogeniziranog uzorka te je dodano 20 mL 80 %-tnog metanola za ekstrakciju uz vorteksiranje najvećom brzinom 2 min te je uslijedilo centrifugiranje na 2150 g 10 min. 12 mL supernatanta razrijeđeno je sa 60 mL 0,1 % Tween 20 PBS pufera u tikvici volumena 100 mL te je sve lagano promiješano. Imunoafinitetna kolonica postavljena je na SPE vakuum otparivač, a prethodno je povezana adapterom sa kolonicom za filtraciju Bond Elut Reservoir frit (slika 26). Na tako postavljene imunoafinitetne kolonice aplicirano je 48 mL otopine uzorka.. Kolonice su potom isprane sa 20 mL PBS pufera bez Tween kako bi se uklonile nevezane komponente te osušene pod vakuumom uz uporabe vakuum pumpe tijekom 3 min. Uslijedilo je eluiranje mikotoksina sa 1 mL 100 % metanola uz tzv. *backflush*, odnosno dodatno propuštanje eluata kroz kolonicu još 3 puta, te ispiranje sa 1 mL ultračiste vode. Na kraju je na kolonice još jednom primijenjen vakuum. Uzorci su potom vorteksirani i stavljeni u vijale (Lešić i sur., 2021b). Vijale sa dobivenim pročišćenim uzorcima postavljene su u automatski injektor LC te su uzorci analizirani LC-MS/MS metodom opisanom u poglavlju 3.2.5. MassHunter računalni program potom izračunava koncentracije mikotoksina AFB<sub>1</sub>, OTA, STC i CIT na temelju kalibracijske krivulje.



kolonica za filtraciju Bond Elut Reservoir frit

adapter

imunoafinitetna kolonice



uređaj za pročišćavanje SPE vakuum

**Slika 26.** Oprema za pročišćavanje uzoraka imunoafinitetnim kolonicama (vlastita fotografija)

### 3.2.6.2. Priprema uzoraka za određivanje koncentracije CPA

#### Priprema otopina za određivanje koncentracije CPA

- Carrez I otopina pripremljena se na način da se 10,6 g kalij heksacijanoferrat trihidrata otopilo u 100 mL deionizirane vode
- Carrez II otopina pripremljena se na način da se 21,9 g cink acetat dihidrata otopilo u 32 mL octene kiseline te nadopunilo vodom do volumena od 100 mL

Određivanje koncentracije CPA provedeno je uz upotrebu rOQ QuEChERS ekstrakcijskih soli. U konusne epruvete od 50 mL odvagano je 2 g homogeniziranog uzorka te je dodana 25%-tna octena kiseline. Uzorak je vorteksiran 10 min najvećom brzinom. Zatim je dodano 5 mL acetonitrila te su se uzorci miješali na rotirajućoj miješalici 30 min. Nakon ekstrakcije, samo u slučaju uzoraka trajnih kobasica zbog kompleksnijeg matriksa, dodano je po 500  $\mu$ L otopine Carrez I i Carrez II, dok su za sve vrste uzoraka dodane rOQ QuEChERS ekstrakcijske soli te su uzorci kratko vorteksirani. Potom je uslijedilo centrifugiranje 15 min na 2150 g i sobnoj temperaturi. U slučaju masnijih vrsta proizvoda, uzoraka trajnih kobasica i špeka/slanine/pancete, supernatanti su propušteni kroz Captiva EMR Lipid kolonice, dok su

za sve vrste uzoraka dobiveni supernatanti filtrirani kroz PTFE filtere u vijale (Vulić i sur., 2020).

Vijale sa dobivenim ekstraktima uzoraka postavljene su u automatski injektor te su uzorci analizirani LC-MS/MS metodom opisanom u poglavlju 3.2.5. Koncentraciju CPA MassHunter računalni program računa na temelju kalibracijske krivulje. U konačni izračun uzet je u obzir faktor razrjeđenja koji za CPA u svim vrstama proizvoda iznosi 5.

### **3.2.7. Evidentiranje vremenskih čimbenika tijekom proizvodnje TMP**

Evidentiranje vremenskih čimbenika, odnosno, temperature zraka (°C) i količine oborina (mm) tijekom razdoblja proizvodnje uzorkovanih vrsta TMP (od 2019. do 2021.) provedeno je korištenjem podataka Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ).

Na temelju podataka o temperaturi zraka i količini oborina na pojedinim mikrolokacijama u programu Google Fusion Tables izrađeni su kartografski prikazi padalina i temperature te pojavnosti mikotoksina u analiziranim uzorcima TMP uzorkovanih 2020. i 2021. godine, te je izrađena mapa pojavnosti toksikotvornih plijesni u TMP tijekom obje godine uzorkovanja prema županijama RH.

### **3.2.8. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada podataka provedena je primjenom računalnog programa SPSS Statistics. Prilikom obrade podataka korištena je deskriptivna statistika te različiti testovi. Normalnost distribucije podataka testirana je Shapiro-Wilk testom, a homogenost varijance Levene testom. Za usporedbu između dviju odnosno više od dviju varijabli za podatke koji nisu normalno distribuirani korišten je Mann-Whitney U, odnosno Kruskal-Wallis test. Kod normalno distribuiranih podataka, korišten je t-test, odnosno analiza varijance (ANOVA) sa Scheffe ili Tamhane T2 *post hoc* testom, ovisno o homogenosti varijance. Rezultati brojevnih vrijednosti koncentracija mikotoksina, fizikalno-kemijskih parametara te broja ili postotka izolata plijesni uspoređivani su s obzirom na vrstu proizvoda, godinu uzorkovanja te regiju Republike Hrvatske, dok su postotci izolata plijesni uspoređivani i s obzirom na rod plijesni. Statistički značajne razlike izražavane su na razini značajnosti od 5 %. Spearman Rank korelacijski test je korišten za određivanje odnosa između parametara za vrstu proizvoda ( $a_w$ , vrijeme zrenja, pH, udio soli) i određenih koncentracija pojedinog mikotoksina. Program Statistica korišten je za analizu glavnih komponenti (PCA) parametara za vrstu proizvoda i vrsta identificiranih plijesni, odnosno, koncentracija mikotoksina.

## **4. REZULTATI**

Sukladno ciljevima disertacije, provedena su sljedeća istraživanja:

- i. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava uzoraka TMP značajnih za razvoj plijesni i nastanak mikotoksina
- ii. Izolacija i identifikacija plijesni s površine uzoraka TMP
- iii. Dokazivanje prisutnosti specifičnih gena potencijalno toksikotvornih vrsta plijesni odgovornih za biosintezu mikotoksina
- iv. Razvoj i validacija visoko osjetljive potvrdne LC-MS/MS metode za određivanje koncentracija pet mikotoksina (AFB<sub>1</sub>, OTA, CIT, CPA i STC) u TMP
- v. Ispitivanje pojavnosti pet mikotoksina u hrvatskim trajnim TMP i dovođenje u vezu prisutnosti mikotoksina u proizvodima sa izoliranim vrstama površinskih plijesni
- vi. Povezivanje identificiranih vrsta plijesni i određenih koncentracija mikotoksina s uvjetima proizvodnje: okolišnim geografsko-vremenskim čimbenicima te tehnologijom proizvodnje TMP, odnosno, vrstom proizvoda

#### 4.1. Fizikalno-kemijska svojstava TMP značajna za razvoj plijesni i proizvodnju mikotoksina

Rezultati analize fizikalno-kemijskih svojstava uzoraka TMP značajnih za razvoj plijesni i proizvodnju mikotoksina:  $a_w$ , pH i udio soli, prikazani su u tablici 14 prema vrsti proizvoda (trajne kobasice i trajni suhomesnati proizvodi) te za svaku godinu uzorkovanja posebno. Statistički značajne razlike u navedenim parametrima s obzirom na godinu uzorkovanja te vrstu proizvoda prikazane su u obliku p vrijednosti u tablicama 15 - 17.

**Tablica 14.** Fizikalno-kemijska svojstva TMP prema vrsti proizvoda i godini uzorkovanja

Parametar	Godina	Vrsta trajnog TMP	
		Kobasice	Suhomesnati proizvodi
Broj uzoraka	2020.	57	63
	2021.	50	80
	2020.- 2021.	107	143
$a_w$	2020.	0,83±0,06	0,84±0,06
	2021.	0,84±0,06	0,84±0,06
	2020.- 2021.	0,84±0,06	0,84±0,06
pH	2020.	5,46±0,47*	6,05±0,35*
	2021.	5,58±0,50*	6,20±0,36*
	2020.- 2021.	5,52±0,49*	6,13±0,36*
Sol (%)	2020.	3,73±0,53*	5,59±1,79*
	2021.	4,18±1,07*	5,52±1,88*
	2020.- 2021.	3,95±0,86*	5,55±1,83*

\*statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ )

**Tablica 15.** Rezultati statističke obrade za  $a_w$  TMP prema vrsti proizvoda i godini uzorkovanja

Grupacija za statističku obradu	P vrijednost	Statistički test
Trajne kobasice	0,227	t-test
Trajni suhomesnati proizvodi	0,174	t-test
2020.- 2021. god	0,783	t-test
2020. god	0,745	t-test
2021. god	0,791	t-test

**Tablica 16.** Rezultati statističke obrade za pH vrijednosti TMP prema vrsti proizvoda i godini uzorkovanja

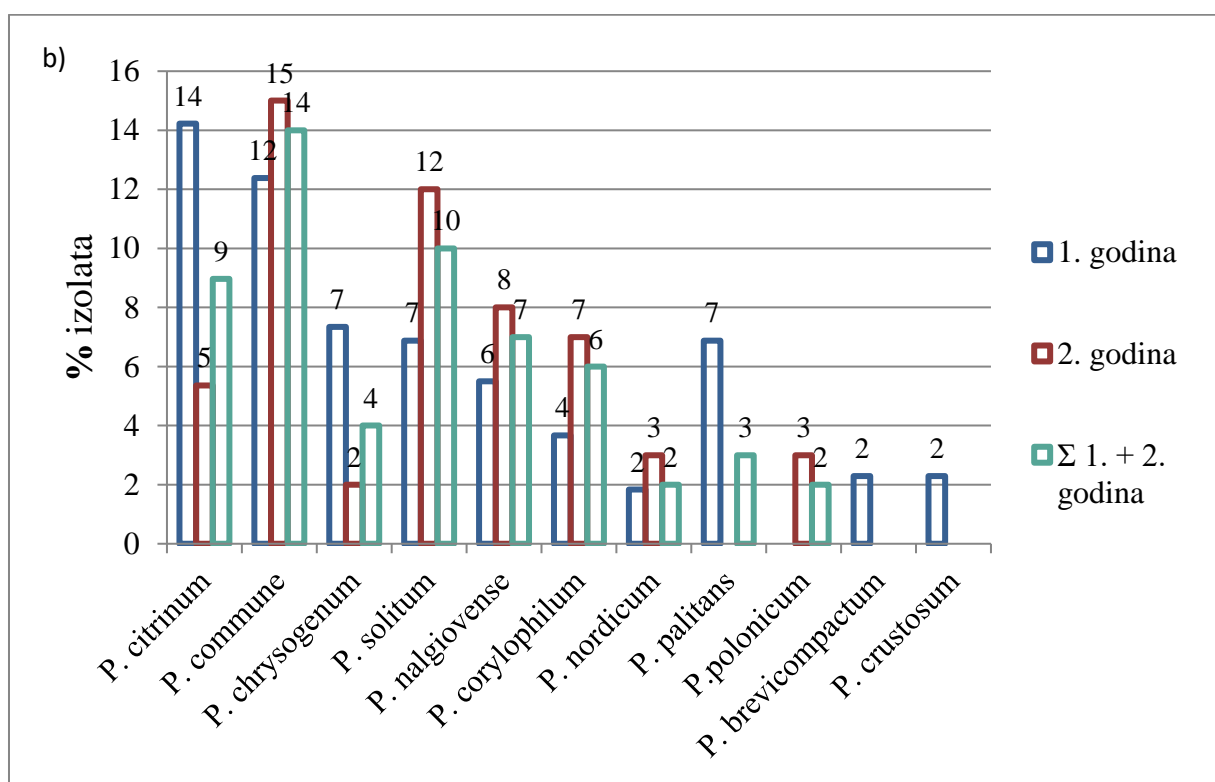
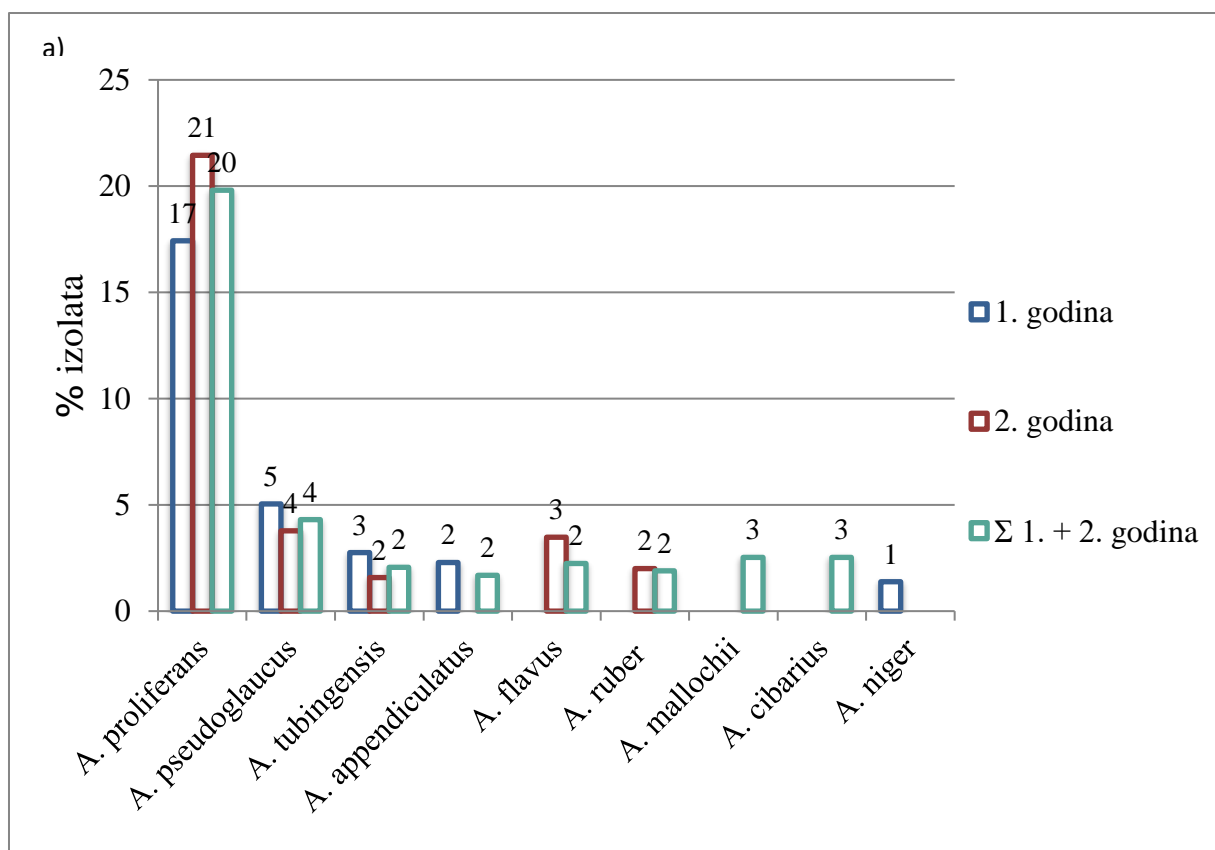
Grupacija za statističku obradu	P vrijednost	Statistički test
Trajne kobasice	0,226	t-test
Trajni suhomesnati proizvodi	0,388	t-test
2020.- 2021. god	< 0,001	t-test
2020. god	< 0,001	t-test
2021. god	< 0,001	t-test

**Tablica 17.** Rezultati statističke obrade za udio soli TMP prema vrsti proizvoda i godini uzorkovanja

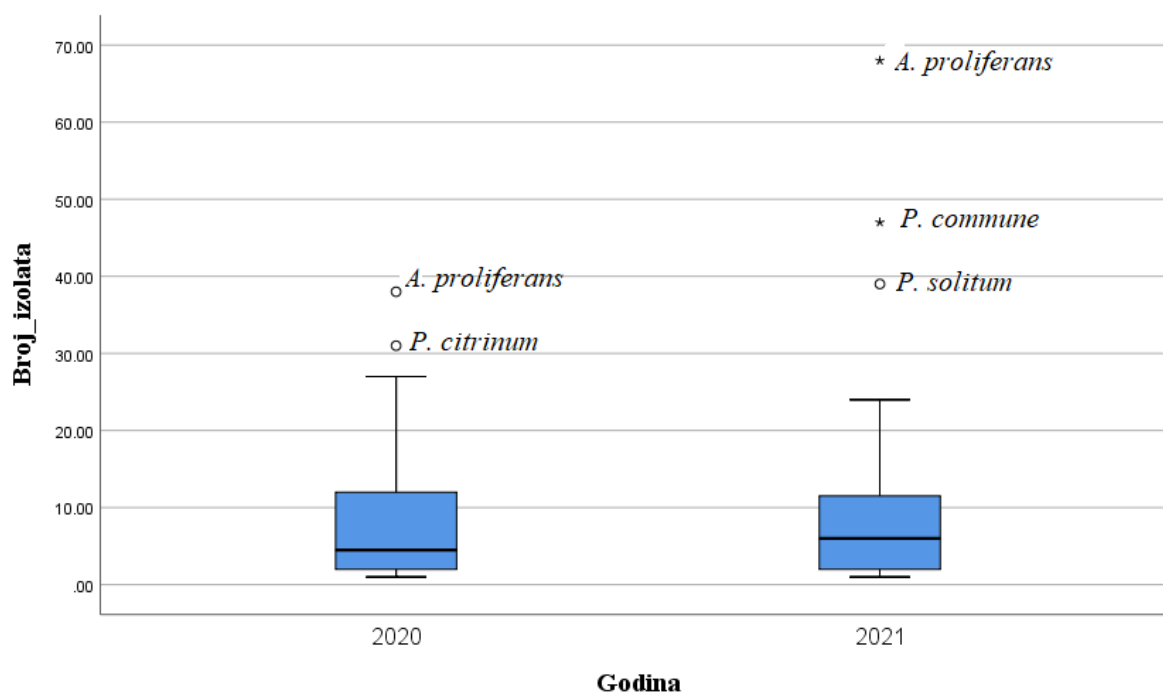
Grupacija za statističku obradu	P vrijednost	Statistički test
Trajne kobasice	0,035	t-test
Trajni suhomesnati proizvodi	0,613	t-test
2020.- 2021. god	< 0,001	t-test
2020. god	< 0,001	t-test
2021. god	< 0,001	t-test

#### 4.2. Identifikacija plijesni s površine TMP

Najzastupljenije vrste plijesni iskazane kao postotak ukupnih izolata s površine uzorkovanih TMP dobivene su tradicionalnim i molekularnim metodama identifikacije, a rezultati identifikacije su prikazani na slici 27. Slika 28. prikazuje *Box-plot* dijagram raspodjele broja izolata pobrojanih prema vrsti identificiranih plijesni za svaku godinu uzorkovanja posebno. Rezultati statističke značajnosti u broju izolata plijesni pobrojane prema vrsti identificiranih plijesni s obzirom na godinu uzorkovanja te rod plijesni prikazane su u obliku p vrijednosti u tablici 18.



**Slika 27.** Najzastupljenije vrste plijesni (%) a) roda *Aspergillus* b) roda *Penicillium* sa površine TMP prema godini uzorkovanja



**Slika 28.** Box-plot dijagram broja izolata plijesni prema identificiranim vrstama za svaku godinu uzorkovanja posebno

**Tablica 18.** Rezultati statističke obrade za broj izolata plijesni prema godini uzorkovanja i rodu plijesni

Grupacija za statističku obradu		P vrijednost	Statistički test
Godina uzorkovanja		0,045	Mann-Whitney U
	2020.god	0,118	Mann-Whitney U
	2021. god	0,277	Mann-Whitney U
	2020.- 2021. god	0,047	Mann-Whitney U
<i>Penicillium</i>	Godina uzorkovanja	0,713	Mann-Whitney U
<i>Aspergillus</i>	Godina uzorkovanja	0,357	Mann-Whitney U



#### 4.2.1. Identificirane vrste površinskih plijesni prema geografsko-vremenskoj regiji proizvodnje

Identificirane vrste plijesni s površine TMP s obzirom na geografsku regiju i godinu uzorkovanja prikazane su u tablicama 19 - 23.

**Tablica 19.** Identificirane vrste plijesni s površine TMP uzoraka iz središnje regije prema godini uzorkovanja

Središnja regija	2020. (n=11)			2021. (n=13)			2020.- 2021. (n=24)		
	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)
<i>P. commune</i>	3	15,8	27,3	4	10,8	30,8	7	12,5	29,2
<i>P. citrinum</i>	7	36,8	63,6	7	18,9	53,8	14	25,0	58,3
<i>P. corylophilum</i>	1	5,3	9,1	6	16,2	46,2	7	12,5	29,2
<i>P. palitans</i>	1	5,3	9,1	/	/	/	1	1,8	4,2
<i>P. solitum</i>	/	/	/	7	18,9	53,8	7	12,5	29,2
<i>P. nalgiovense</i>	/	/	/	4	10,8	30,8	4	7,1	16,7
<i>P. roqueforti</i>	/	/	/	1	2,7	7,7	1	1,8	4,2
<i>P. antarcticum</i>	/	/	/	1	2,7	7,7	1	1,8	4,2
<b><i>Penicillium sp.</i></b>	<b>12</b>			<b>24</b>			<b>36</b>		
<i>A. proliferans</i>	5	26,3	45,5	6	16,2	46,2	11	19,6	45,8
<i>A. tubingensis</i>	2	10,5	18,2	/	/	/	2	3,6	8,3
<i>A. pseudoglaucus</i>	/	/	/	2	5,4	15,4	2	3,6	8,3
<i>A. mallochii</i>	/	/	/	1	2,7	7,7	1	1,8	4,2
<i>A. appendiculatus</i>	/	/	/	1	2,7	7,7	1	1,8	4,2
<i>A. chevalieri</i>	/	/	/	2	5,4	15,4	2	3,6	8,3
<i>A. flavus</i>	/	/	/	1	2,7	7,7	1	1,8	4,2
<b><i>Aspergillus sp.</i></b>	<b>7</b>			<b>13</b>			<b>20</b>		
<b>Ukupan N</b>	<b>19</b>			<b>37</b>			<b>56</b>		

n = broj uzoraka; N = broj izolata; Dr (%) = relativna gustoća izolacije, Fr (%) = relativna frekvencija izolacije

**Tablica 20.** Identificirane vrste plijesni s površine TMP uzoraka iz istočne regije prema godini uzorkovanja

Istočna regija	2020. (n=27)			2021. (n=24)			2020.- 2021. (n=52)		
	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)
<i>P. corylophilum</i>	1	2,1	3,4	3	4,7	12,5	4	3,6	8,3
<i>P. nordicum</i>	3	6,4	10,3	2	3,1	8,3	5	4,5	10,4
<i>P. citrinum</i>	5	10,6	17,2	1	1,6	4,2	6	5,4	12,5
<i>P. solitum</i>	4	8,5	13,8	8	12,5	33,3	12	10,8	25,0
<i>P. commune</i>	11	23,4	37,9	14	21,9	58,3	25	22,5	52,1
<i>P. brevicompactum</i>	2	4,3	6,9	1	1,6	4,2	3	2,7	6,3
<i>P. chrysogenum</i>	2	4,3	6,9	/	/	/	2	1,8	4,2
<i>P. crustosum</i>	3	6,4	10,3	/	/	/	3	2,7	6,3
<i>P. allii</i>	1	2,1	3,4	/	/	/	1	0,9	2,1
<i>P. nalgiovense</i>	2	4,3	6,9	2	3,1	8,3	2	1,8	4,2
<i>P. expansum</i>	1	2,1	3,4	/	/	/	1	0,9	2,1
<i>P. polonicum</i>	/	/	/	7	10,9	29,2	7	6,3	14,6
<b><i>Penicillium sp.</i></b>	<b>35</b>			<b>38</b>			<b>73</b>		
<i>A. pallidofulvus</i>	1	2,1	3,4	/	/	/	1	0,9	2,1
<i>A. tubingensis</i>	2	4,3	6,9	2	3,1	8,3	4	3,6	8,3
<i>A. creber</i>	1	2,1	3,4	/	/	/	1	0,9	2,1
<i>A. pseudoglaucus</i>	5	10,6	17,2	1	1,6	4,2	6	5,4	12,5
<i>A. flavus</i>	1	2,1	3,4	4	6,3	16,7	5	4,5	10,4
<i>A. proliferans</i>	2	4,3	6,9	14	21,9	58,3	16	14,4	33,3
<i>A. montevidensis</i>	/	/	/	1	1,6	4,2	1	0,9	2,1
<i>A. mallochii</i>	/	/	/	2	3,1	8,3	2	1,8	4,2
<i>A. glaucus</i>	/	/	/	1	1,6	4,2	1	0,9	2,1
<i>A. ruber</i>	/	/	/	1	1,6	4,2	1	0,9	2,1
<b><i>Aspergillus sp.</i></b>	<b>12</b>			<b>26</b>			<b>38</b>		
<b>Ukupan N</b>	<b>47</b>			<b>64</b>			<b>111</b>		

n = broj uzoraka; N = broj izolata; Dr (%) = relativna gustoća izolacije, Fr (%) = relativna frekvencija izolacije

**Tablica 21.** Identificirane vrste plijesni s površine TMP uzoraka iz sjeverne regije prema godini uzorkovanja

Sjeverna regija	2020. (n=31)			2021. (n=31)			2020.- 2021. (n=62)		
	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)
<i>P. brevicompactum</i>	3	5,4	10,0	/	/	/	3	2,7	4,9
<i>P. citrinum</i>	5	8,9	16,7	2	3,6	6,5	7	6,3	11,5
<i>P. palitans</i>	8	14,3	26,7	/	/	/	8	7,2	13,1
<i>P. solitum</i>	7	12,5	23,3	8	14,5	25,8	15	13,5	24,6
<i>P. corylophilum</i>	2	3,6	6,7	7	12,7	22,6	9	8,1	14,8
<i>P. chrysogenum</i>	6	10,7	20,0	1	1,8	3,2	7	6,3	11,5
<i>P. commune</i>	4	7,1	13,3	13	23,6	41,9	17	15,3	27,9
<i>P. polonicum</i>	1	1,8	3,3	2	3,6	6,5	3	2,7	4,9
<i>P. atramentosum</i>	1	1,8	3,3	/	/	/	1	0,9	1,6
<i>P. nalgiovense</i>	/	/	/	1	1,8	3,2	1	0,9	1,6
<i>P. nordicum</i>	/	/	/	1	1,8	3,2	1	0,9	1,6
<b><i>Penicillium sp.</i></b>	<b>37</b>			<b>35</b>			<b>72</b>		
<i>A. tubingensis</i>	2	3,6	6,7	/	/	/	2	1,8	3,3
<i>A. pseudoglaucus</i>	5	8,9	16,7	5	9,1	16,1	10	9,0	16,4
<i>A. proliferans</i>	6	10,7	20,0	5	9,1	16,1	11	9,9	18,0
<i>A. chevalieri</i>	1	1,8	3,3	/	/	/	1	0,9	1,6
<i>A. niger</i>	3	5,4	10,0	/	/	/	3	2,7	4,9
<i>A. creber</i>	1	1,8	3,3	/	/	/	1	0,9	1,6
<i>A. astelodami</i>	1	1,8	3,3	/	/	/	1	0,9	1,6
<i>A. mallochii</i>	/	/	/	1	1,8	3,2	1	0,9	1,6
<i>A. montevidensis</i>	/	/	/	1	1,8	3,2	1	0,9	1,6
<i>A. ruber</i>	/	/	/	1	1,8	3,2	1	0,9	1,6
<i>A. sloanii</i>	/	/	/	1	1,8	3,2	1	0,9	1,6
<i>A. tubingensis</i>	/	/	/	2	3,6	6,5	2	1,8	3,3
<b><i>Aspergillus sp.</i></b>	<b>19</b>			<b>20</b>			<b>39</b>		
<b>Ukupan N</b>	<b>56</b>			<b>55</b>			<b>111</b>		

n= broj uzoraka; N= broj izolata; Dr (%)= relativna gustoća izolacije, Fr (%)= relativna frekvencija izolacije

**Tablica 22.** Identificirane vrste plijesni s površine TMP uzoraka iz zapadne regije prema godini uzorkovanja

Zapadna regija	2020. (n=26)			2021. (n=29)			2020.- 2021. (n=55)		
	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)
<i>P. crustosum</i>	2	3,6	7,7	/	/	/	2	1,5	3,8
<i>P. nalgiovense</i>	10	18,2	38,5	15	20,0	51,7	25	19,2	48,1
<i>P. citrinum</i>	12	21,8	46,2	3	4,0	10,3	15	11,5	28,8
<i>P. corylophilum</i>	1	1,8	3,8	/	/	/	1	0,8	1,9
<i>P. chrysogenum</i>	4	7,3	15,4	3	4,0	10,3	7	5,4	13,5
<i>P. commune</i>	10	18,2	38,5	3	4,0	10,3	13	10,0	25,0
<i>P. nordicum</i>	1	1,8	3,8	6	8,0	20,7	7	5,4	13,5
<i>P. expansum</i>	1	1,8	3,8	/	/	/	1	0,8	1,9
<i>P. polonicum</i>	/	/	/	1	1,3	3,4	1	0,8	1,9
<i>P. palitans</i>	3	5,5	11,5	/	/	/	3	2,3	5,8
<i>P. solitum</i>	1	1,8	3,8	13	17,3	44,8	14	10,8	26,9
<i>P. allii</i>	1	1,8	3,8	/	/	/	1	0,8	1,9
<i>P. brevicompactum</i>	/	/	/	1	1,3	3,4	1	0,8	1,9
<b><i>Penicillium sp.</i></b>	<b>46</b>			<b>45</b>			<b>91</b>		
<i>A. ruber</i>	1	1,8	3,8	2	2,7	6,9	3	2,3	5,8
<i>A. proliferans</i>	7	12,7	26,9	13	17,3	44,8	20	15,4	38,5
<i>A. pseudoglaucus</i>	1	1,8	3,8	4	5,3	13,8	5	3,8	9,6
<i>A. flavus</i>	/	/	/	4	5,3	13,8	4	3,1	7,7
<i>A. sydowii</i>	/	/	/	2	2,7	6,9	2	1,5	3,8
<i>A. welwitschie</i>	/	/	/	1	1,3	3,4	1	0,8	1,9
<i>A. tubingensis</i>	/	/	/	1	1,3	3,4	1	0,8	1,9
<i>A. tonophilus</i>	/	/	/	2	2,7	6,9	2	1,5	3,8
<i>A. westerdijkiae</i>	1	1,8	3,8	/	/	/	1	0,8	1,9
<b><i>Aspergillus sp.</i></b>	<b>9</b>			<b>30</b>			<b>39</b>		
<b>Ukupan N</b>	<b>55</b>			<b>75</b>			<b>130</b>		

n = broj uzoraka; N = broj izolata; Dr (%) = relativna gustoća izolacije, Fr (%) = relativna frekvencija izolacije

**Tablica 23.** Identificirane vrste plijesni s površine TMP uzoraka iz južne regije prema godini uzorkovanja

Južna regija	2020. (n=24)			2021. (n=33)			2020.- 2021. (n=57)		
	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)
<i>P. citrinum</i>	2	4,4	8,3	10	11,6	30,3	12	9,2	21,1
<i>P. commune</i>	3	6,7	12,5	13	15,1	39,4	16	12,2	28,1
<i>P. polonicum</i>	1	2,2	4,2	1	1,2	3,0	2	1,5	3,5
<i>P. palitans</i>	3	6,7	12,5	/	/	/	3	2,3	5,3
<i>P. corylophilum</i>	3	6,7	12,5	6	7,0	18,2	9	6,9	15,8
<i>P. solitum</i>	3	6,7	12,5	3	3,5	9,1	6	4,6	10,5
<i>P. chrysogenum</i>	4	8,9	16,7	2	2,3	6,1	6	4,6	10,5
<i>P. sumatraense</i>	1	2,2	4,2	/	/	/	1	0,8	1,8
<i>P. brevicompactum</i>	/	/	/	1	1,2	3,0	1	0,8	1,8
<i>P. magnielliptisporum</i>	/	/	/	1	1,2	3,0	1	0,8	1,8
<i>P. nalgiovense</i>	/	/	/	2	2,3	6,1	2	1,5	3,5
<b><i>Penicillium sp.</i></b>	<b>20</b>			<b>39</b>			<b>59</b>		
<i>A. proliferans</i>	18	40,0	75,0	30	34,9	90,9	48	36,6	84,2
<i>A. appendiculatus</i>	5	11,1	20,8	3	3,5	9,1	8	6,1	14,0
<i>A. ruber</i>	2	4,4	8,3	/	/	/	2	1,5	3,5
<i>A. cibarius</i>	/	/	/	8	9,3	24,2	8	6,1	14,0
<i>A. mallochii</i>	/	/	/	2	2,3	6,1	2	1,5	3,5
<i>A. flavus</i>	/	/	/	2	2,3	6,1	2	1,5	3,5
<i>A. welwitschie</i>	/	/	/	2	2,3	6,1	2	1,5	3,5
<b><i>Aspergillus sp.</i></b>	<b>25</b>			<b>47</b>			<b>72</b>		
<b>Ukupan N</b>	<b>45</b>			<b>86</b>			<b>131</b>		

n = broj uzoraka; N = broj izolata; Dr (%) = relativna gustoća izolacije, Fr (%) = relativna frekvencija izolacije

Rezultati statističke značajnosti u broju izolata plijesni pobrojanih prema vrstama identificiranih plijesni s obzirom na godinu uzorkovanja, regiju proizvodnje i rod plijesni prikazane su u obliku p vrijednosti u tablici 24.

**Tablica 24.** Rezultati statističke obrade za broj izolata plijesni prema regiji, godini uzorkovanja i rodu plijesni

Grupacija za statističku obradu		P vrijednost	Statistički test
	Istočna regija	0,460	t-test
	Središnja regija	0,075	t-test
	Sjeverna regija	0,804	t-test
	Zapadna regija	0,514	t-test
	Južna regija	0,304	t-test
	2020. god	0,064	Kruskal-Wallis
	2021. god	0,447	Kruskal-Wallis
	2020.- 2021.	0,821	Kruskal-Wallis
	Regije (2020.)	0,290 - 0,839	Mann-Whitney U
	Regije (2021.)	0,244 - 0,430	Mann-Whitney U
	Regije (2020.- 2021.)	0,077 - 0,677	Mann-Whitney U
<i>Aspergillus</i>	Regije (2020.)	0,358	Kruskal-Wallis
	Regije (2021.)	0,321	Kruskal-Wallis
	Regije (2020.- 2021.)	0,265	Kruskal-Wallis
<i>Penicillium</i>	Regije (2020.)	0,836	Kruskal-Wallis
	Regije (2021.)	0,960	Kruskal-Wallis
	Regije (2020.- 2021.)	0,960	Kruskal-Wallis

#### 4.2.2. Identificirane vrste površinskih plijesni prema vrsti trajnih proizvoda - tehnologiji proizvodnje

Identificirane vrste plijesni s površine trajnih proizvoda (kobasice i suhomesnati proizvodi) s obzirom na godinu uzorkovanja prikazane su u tablicama 25. – 26.

**Tablica 25.** Identificirane vrste plijesni s površine uzoraka trajnih kobasica prema godini uzorkovanja

Trajne kobasice	2020. (n=57)			2021. (n=50)			2020.- 2021. (n=107)		
	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)
<i>P. commune</i>	18	18,9	31,6	17	14,4	34,0	35	16,4	32,7
<i>P. corylophilum</i>	2	2,1	3,5	8	6,8	16,0	10	4,7	9,3
<i>P. nalgiovense</i>	3	3,2	5,3	6	5,1	12,0	9	4,2	8,4
<i>P. citrinum</i>	14	14,7	24,6	3	2,5	6,0	17	8,0	15,9
<i>P. palitans</i>	9	9,5	15,8	/	/	/	9	4,2	8,4
<i>P. nordicum</i>	2	2,1	3,5	2	1,7	4,0	4	1,9	3,7
<i>P. solitum</i>	6	6,3	10,5	20	16,9	40,0	26	12,2	24,3
<i>P. brevicompactum</i>	3	3,2	5,3	2	1,7	4,0	5	2,3	4,7
<i>P. allii</i>	3	3,2	5,3	/	/	/	3	1,4	2,8
<i>P. crustosum</i>	1	1,1	1,8	/	/	/	1	0,5	0,9
<i>P. polonicum</i>	1	1,1	1,8	6	5,1	12,0	7	3,3	6,5
<i>P. chrysogenum</i>	4	4,2	7,0	/	/	/	4	1,9	3,7
<i>P. antarcticum</i>	/	/	/	1	0,8	2,0	1	0,5	0,9
<i>P. roqueforti</i>	/	/	/	1	0,8	2,0	1	0,5	0,9
<b>Penicillium sp.</b>	<b>66</b>			<b>66</b>			<b>132</b>		
<i>A. pseudoglaucus</i>	4	4,2	7,0	6	5,1	12,0	10	4,7	9,3
<i>A. pallidofulvus</i>	1	1,1	1,8	/	/	/	1	0,5	0,9
<i>A. tubingensis</i>	5	5,3	8,8	5	4,2	10,0	10	4,7	9,3
<i>A. mallochii</i>	/	/	/	2	1,7	4,0	2	0,9	1,9
<i>A. proliferans</i>	11	11,6	19,3	19	16,1	38,0	30	14,1	28,0
<i>A. ruber</i>	1	1,1	1,8	5	4,2	10,0	6	2,8	5,6
<i>A. flavus</i>	1	1,1	1,8	8	6,8	16,0	9	4,2	8,4
<i>A. appendiculatus</i>	1	1,1	1,8	/	/	/	1	0,5	0,9
<i>A. chevalieri</i>	1	1,1	1,8	2	1,7	4,0	3	1,4	2,8
<i>A. niger</i>	2	2,1	3,5	/	/	/	2	0,9	1,9
<i>A. creber</i>	1	1,1	1,8	/	/	/	1	0,5	0,9
<i>A. astelodami</i>	1	1,1	1,8	/	/	/	1	0,5	0,9
<i>A. welwitschie</i>	/	/	/	1	0,8	2,0	1	0,5	0,9
<i>A. tonophilus</i>	/	/	/	1	0,8	2,0	1	0,5	0,9
<i>A. montevidensis</i>	/	/	/	1	0,8	2,0	1	0,5	0,9
<i>A. westerdijkiae</i>	1	1,1	1,8	/	/	/	1	0,5	0,9
<b>Aspergillus sp.</b>	<b>29</b>			<b>52</b>			<b>80</b>		
<b>Ukupan N</b>	<b>95</b>			<b>118</b>			<b>212</b>		

n = broj uzoraka; N = broj izolata; Dr (%) = relativna gustoća izolacije, Fr (%) = relativna frekvencija izolacije

**Tablica 26.** Identificirane vrste plijesni s površine uzoraka trajnih suhomesnatih proizvoda prema godini uzorkovanja

Trajni suhomesnati proizvodi	2020. (n=63)			2021. (n=80)			2020.- 2021. (n=143)		
	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)	N	Dr (%)	Fr (%)
<i>P. allii</i>	1	0,8	1,6	/			1	0,3	0,7
<i>P. nalgiovense</i>	9	7,1	14,3	17	8,6	21,3	26	8,0	18,2
<i>P. commune</i>	13	10,2	20,6	28	14,2	35,0	40	12,7	28,7
<i>P. palitans</i>	4	3,1	6,3	/	/	/	4	1,2	2,8
<i>P. chrysogenum</i>	12	9,4	19,0	6	3,0	7,5	18	5,6	12,6
<i>P. brevicompactum</i>	2	1,6	3,2	1	0,5	1,3	3	0,9	2,1
<i>P. solitum</i>	9	7,1	14,3	18	9,1	22,5	27	8,3	18,9
<i>P. nordicum</i>	2	1,6	3,2	8	4,1	10,0	10	3,1	7,0
<i>P. citrinum</i>	17	13,4	27,0	15	7,6	18,8	32	9,9	22,4
<i>P. expansum</i>	2	1,6	3,2	/	/	/	2	0,6	1,4
<i>P. corylophilum</i>	6	4,7	9,5	14	7,1	17,5	20	6,2	14,0
<i>P. polonicum</i>	1	0,8	1,6	5	2,5	6,3	6	1,9	4,2
<i>P. crustosum</i>	2	1,6	3,2	/	/	/	2	0,6	1,4
<i>P. palitans</i>	2	1,6	3,2	/	/	/	2	0,6	1,4
<i>P. magnielliptisporum</i>	/	/	/	1	0,5	1,3	1	0,3	0,7
<i>P. atramentosum</i>	1	0,8	1,6	/	/	/	1	0,3	0,7
<i>P. sumatraense</i>	1	0,8	1,6	/	/	/	1	0,3	0,7
<b><i>Penicillium sp.</i></b>	<b>84</b>			<b>113</b>			<b>197</b>		
<i>A. ruber</i>	2	1,6	3,2	1	0,5	1,3	3	0,9	2,1
<i>A. proliferans</i>	27	21,3	42,9	48	24,4	60,0	75	23,1	52,4
<i>A. appendiculatus</i>	4	3,1	6,3	4	2,0	5,0	8	2,5	5,6
<i>A. tubingensis</i>	1	0,8	1,6	1	0,5	1,3	2	0,6	1,4
<i>A. creber</i>	1	0,8	1,6	/	/	/	1	0,3	0,7
<i>A. pseudoglaucus</i>	7	5,5	11,1	6	3,0	7,5	13	4,0	9,1
<i>A. tonophilus</i>	/	/	/	1	0,5	1,3	1	0,3	0,7
<i>A. montevidensis</i>	/	/	/	1	0,5	1,3	1	0,3	0,7
<i>A. mallochii</i>	/	/	/	6	3,0	7,5	6	1,9	4,2
<i>A. sydowii</i>	/	/	/	1	0,5	1,3	1	0,3	0,7
<i>A. cibarius</i>	/	/	/	8	4,1	10,0	8	2,5	5,6
<i>A. flavus</i>	/	/	/	3	1,5	3,8	3	0,9	2,1
<i>A. welwitschie</i>	/	/	/	2	1,0	2,5	2	0,6	1,4
<i>A. niger</i>	1	0,8	1,6	/	/	/	1	0,3	0,7
<i>A. sloanii</i>	/	/	/	1	0,5	1,3	1	0,3	0,7
<i>A. glaucus</i>	/	/	/	1	0,5	1,3	1	0,3	0,7
<b><i>Aspergillus sp.</i></b>	<b>43</b>			<b>84</b>			<b>127</b>		
<b>Ukupan N</b>	<b>127</b>			<b>197</b>			<b>324</b>		

n = broj uzoraka; N = broj izolata; Dr (%) = relativna gustoća izolacije, Fr (%) = relativna frekvencija izolacije



Rezultati statističke značajnosti u broju izolata plijesni pobrojanih prema vrsti identificiranih plijesni s obzirom na godinu uzorkovanja, vrstu proizvoda i rod plijesni prikazane su u obliku p vrijednosti u tablici 27.

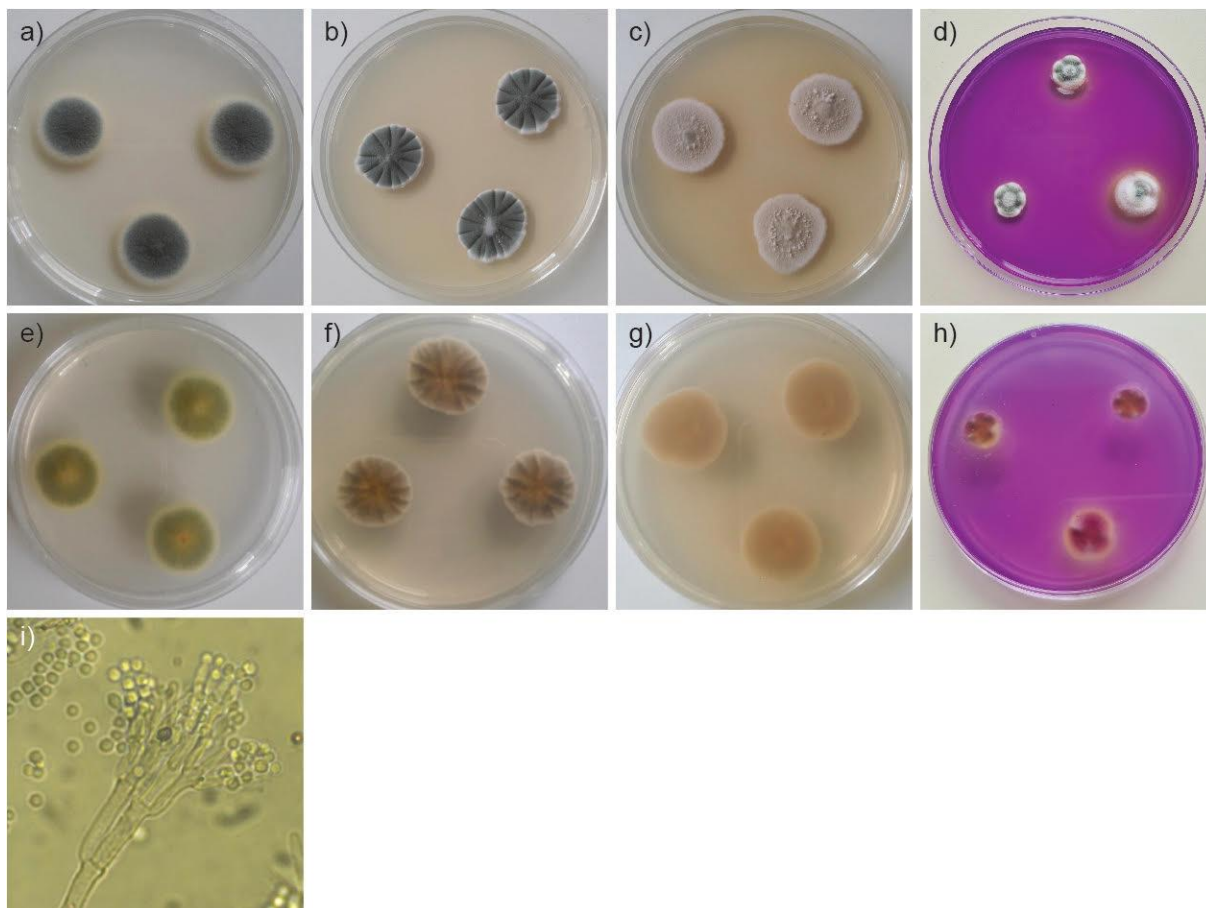
**Tablica 27.** Rezultati statističke obrade za broj izolata plijesni prema vrsti proizvoda, godini uzorkovanja te rodu plijesni

Grupacija za statističku obradu		P vrijednost	Statistički test
	Trajne kobasice	0,205	Mann-Whitney U
	Trajni suhomesnati proizvodi	0,671	Mann-Whitney U
	2020. god	0,463	Mann-Whitney U
	2021. god	0,753	Mann-Whitney U
	2020.- 2021	0,048	Mann-Whitney U
	Vrsta proizvoda (2020. god)	0,039 - 0,971	Mann-Whitney U
	Vrsta proizvoda (2021. god)	0,568 - 0,255	Mann-Whitney U
	Vrsta proizvoda (2020.- 2021.)	0,455 - 0,634	Mann-Whitney U
<i>Aspergillus</i>	Vrsta proizvoda ( 2020.- 2021.)	0,615	Mann-Whitney U
	Vrsta proizvoda (2020. god)	0,329	Mann-Whitney U
	Vrsta proizvoda (2021. god)	0,315	Mann-Whitney U
<i>Penicillium</i>	Vrsta proizvoda (2020.- 2021.)	0,558	Mann-Whitney U
	Vrsta proizvoda (2020. god)	0,903	Mann-Whitney U
	Vrsta proizvoda (2021. god)	0,508	Mann-Whitney U

#### 4.2.3. Identificirane potencijalne toksikotvorne vrste plijesni

Na slikama 29. – 37. prikazane su kolonije potencijalnih toksikotvornih vrsta plijesni poraslih na različitim hranjivim podlogama nakon sedam dana inkubacije pri 25 °C i mikroskopske slike istih. Ujedno je navedena dobivena sekvenca  $\beta$ -tubulina za *Penicillium* toksikotvorne vrste i CaM za *Aspergillus* toksikotvorne vrste, pristupni broj sekvence pohranjene u Genbank bazi podataka te mikotoksini koje pojedina vrsta može producirati. Ukupno je identificirano devet potencijalno toksikotvornih vrsta plijesni koje bi mogle producirati neke od istraživanih mikotoksina.

Dobivene sekvence identificiranih netoksikotvornih vrsta plijesni dane su kao prilozi P1 1. – 29., pri čemu su za *Penicillium* vrste prikazane sekvence  $\beta$ -tubulina, a za *Aspergillus* vrste sekvence CaM.



**Slika 29.** *Penicillium commune* nakon 7 dana pri 25 °C

Površina (*avere*): a) DG-18 b) CYA c) MEA d) CREA

Poledina (*reverse*): e) DG-18 f) CYA g) MEA h) CREA

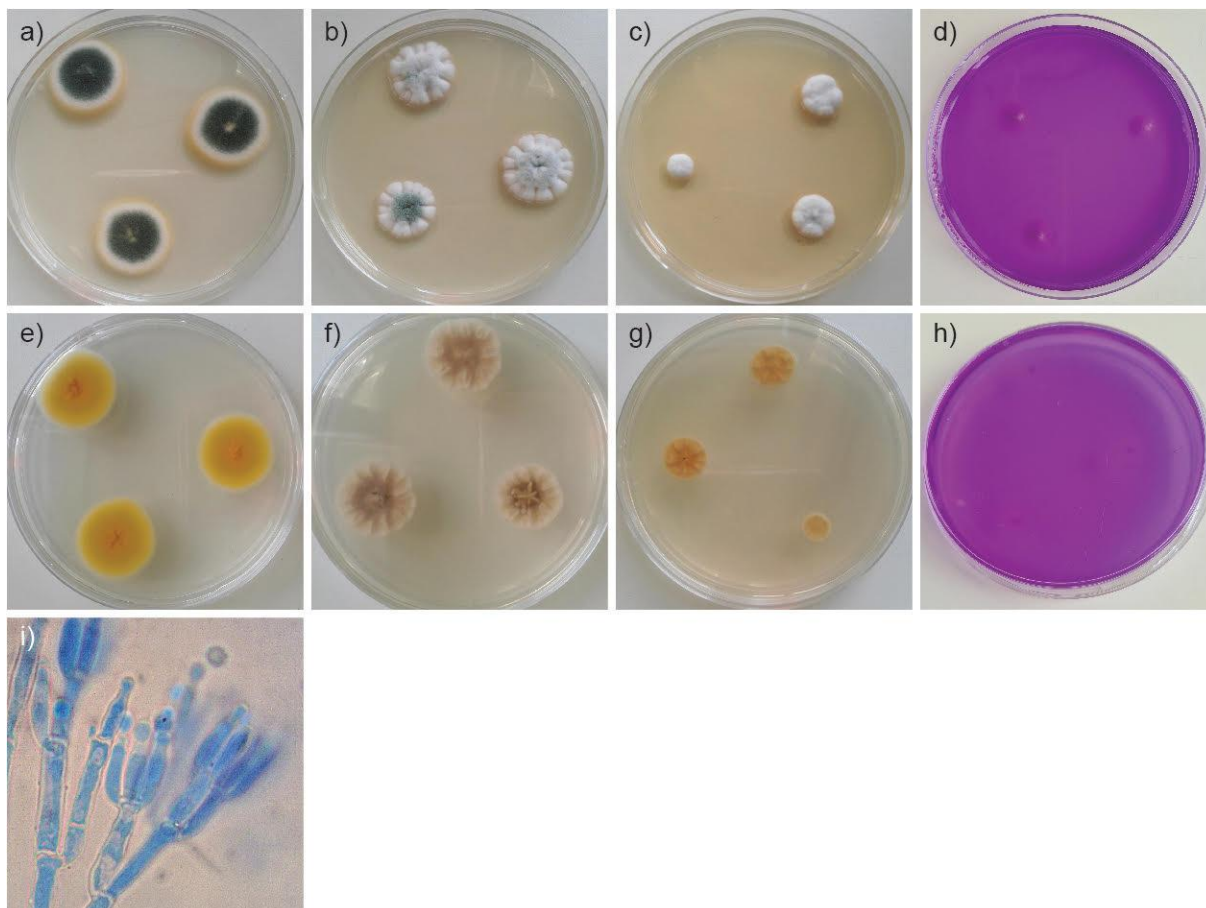
i) mikroskopska slika (povećanje 100x) (vlastite fotografije)

Mikotoksin: CPA

Genbank pristupni broj: OK562720

Sekvenca  $\beta$ - tubulina:

```
GTATCAATTGACAGGTTACTAACTGGATTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGTCT
CGATGGCGATGGACAGTAAGTTTTAACTGTGATGGGGGGTTCCGGTAGATCATACTG
ATATCTTCCTAGGTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTCTACTTC
AACCATGTGAGTCCAACGACTGGAAACCGAATAATCGTGCATCATCTGATCGGATGTTTT
CTTTGATAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTTCTCGTTCGATTTGGA
GCCTGGTACCATGGACGC
```



**Slika 30.** *Penicillium nordicum* nakon 7 dana pri 25 °C

Površina (*aversa*): a) DG-18 b) CYA c) MEA d) CREA

Početina (*reversa*): e) DG-18 f) CYA g) MEA h) CREA

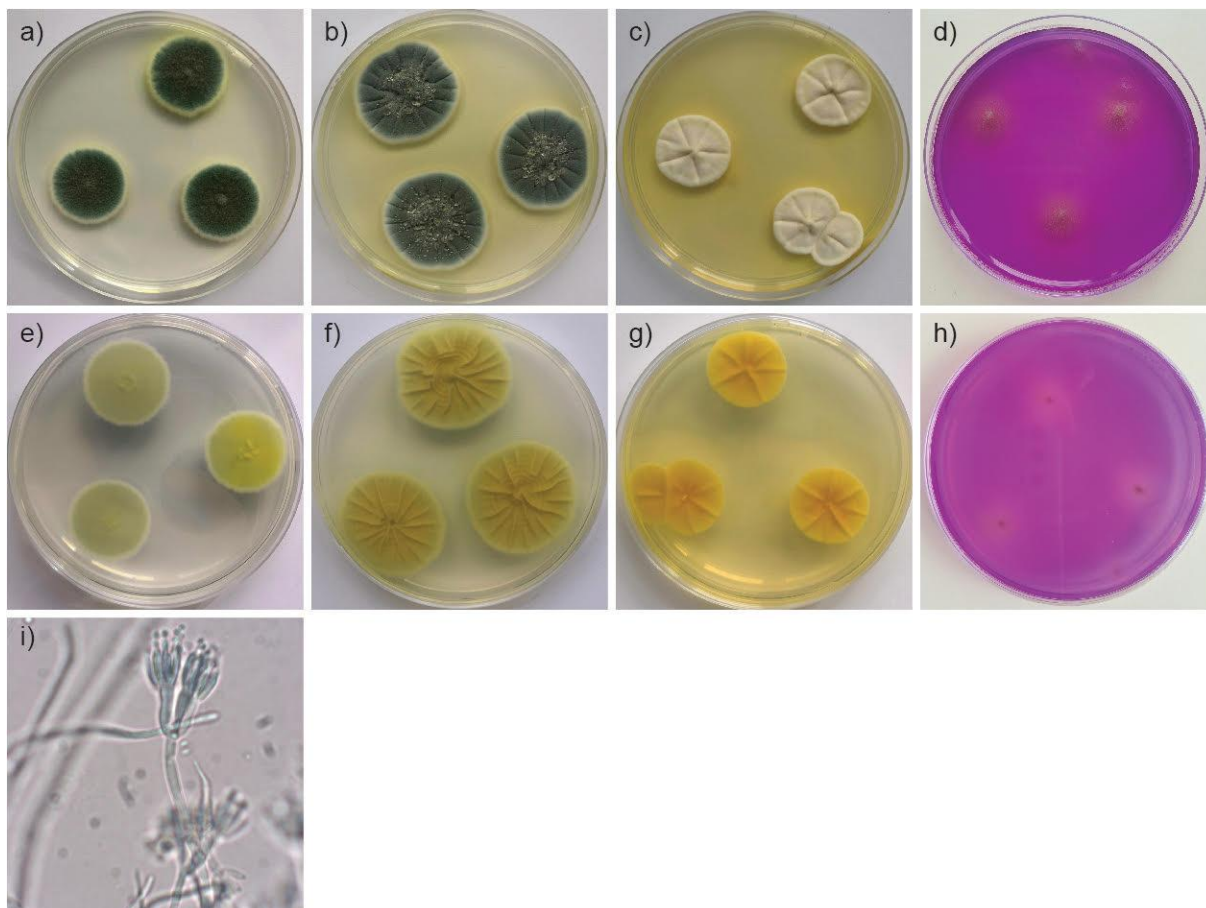
i) mikroskopska slika (povećanje 100x) (vlastite fotografije)

Mikotoksin: OTA

Genbank pristupni broj: OK562719

Sekvenca  $\beta$ - tubulina:

```
ACGGGTTACTAACTGGATTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCATGGTCTCGATGGTGAC
GGACAGTAAGTTTCAATGGTGATGTTGGTTTCTGGTGGATTGCACGTCTGATATCTTGCTA
GGTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACCATGTGA
GTTCAACGACTGGAACCGGAATAAACGTGCATCATCTGATCGGATGTTTTTCTTTGATAAT
CTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCGTGCCGTTCTCGTCGATTTGGACCCCGGTAC
CATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCGACAACCTTCGTCTTC
GGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCC
```



**Slika 31.** *Penicillium citrinum* nakon 7 dana pri 25 °C

Površina (*aversa*): a) DG-18 b) CYA c) MEA d) CREA

Poledina (*reversa*): e) DG-18 f) CYA g) MEA h) CREA

i) mikroskopska slika (povećanje 100x) (vlastite fotografije)

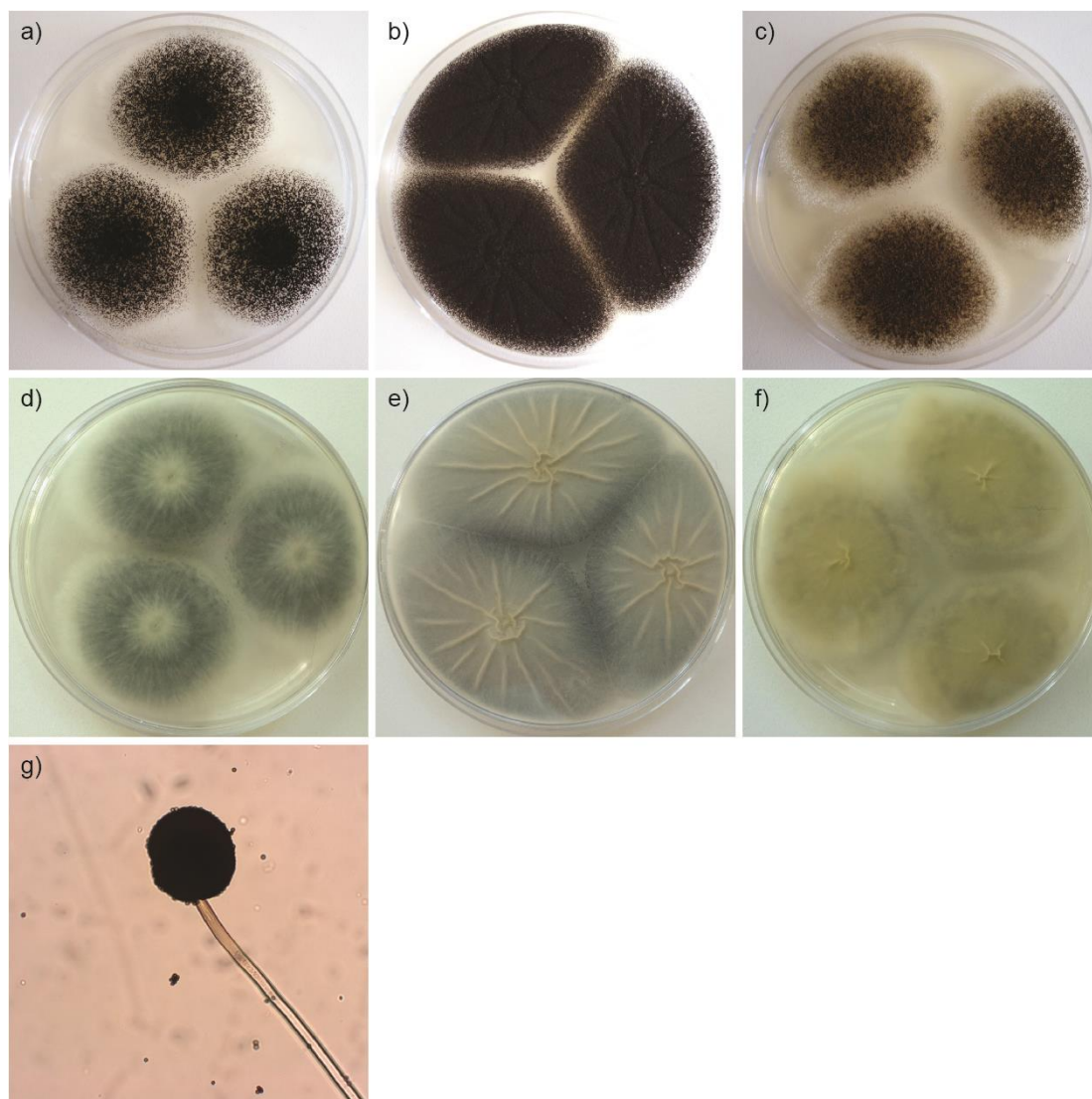
Mikotoksin: CIT

Genbank pristupni broj: OK562713

Sekvenca  $\beta$ - tubulina:

```
GCTGCTTTCTGGTACGTGCTGCAAATCCTGAAAGATCAATTGTTGGATACAAAGAGCAAT
ATACTGACCAATTCTATAGGCAAACCATTGCTGGCGAGCACGGCCTTGATGGCGATGGAC
AGTAAGTTCTTTTCGACAAAGAAGTGTTTACGTTTTTTTCGAGAATGGCGGTCTGATATTTTT
GGGAGCTACAACGGAACCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCACCCA
CGTAAGTGATACTGACCCCAATGCCATTGGAATCATTATCTAACCAACTATTGTTTGTGTTT
ATCAATAGGCTTCCGGTGACAAGTATGTTCCCCGTGCCGTCTGGTTCGACTTGGAGCCCG
GTACCATGGACGCTGTCCGTGCTGGTCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGTCCCGACAACCTTCGT
TTTCGGTCAATCCGGTGCTGGT
```





**Slika 32.** *Aspergillus niger* nakon 7 dana pri 25 °C

Površina (*aversa*): a) DG-18 b) CYA c) MEA

Poledina (*reverse*): d) DG-18 e) CYA f) MEA

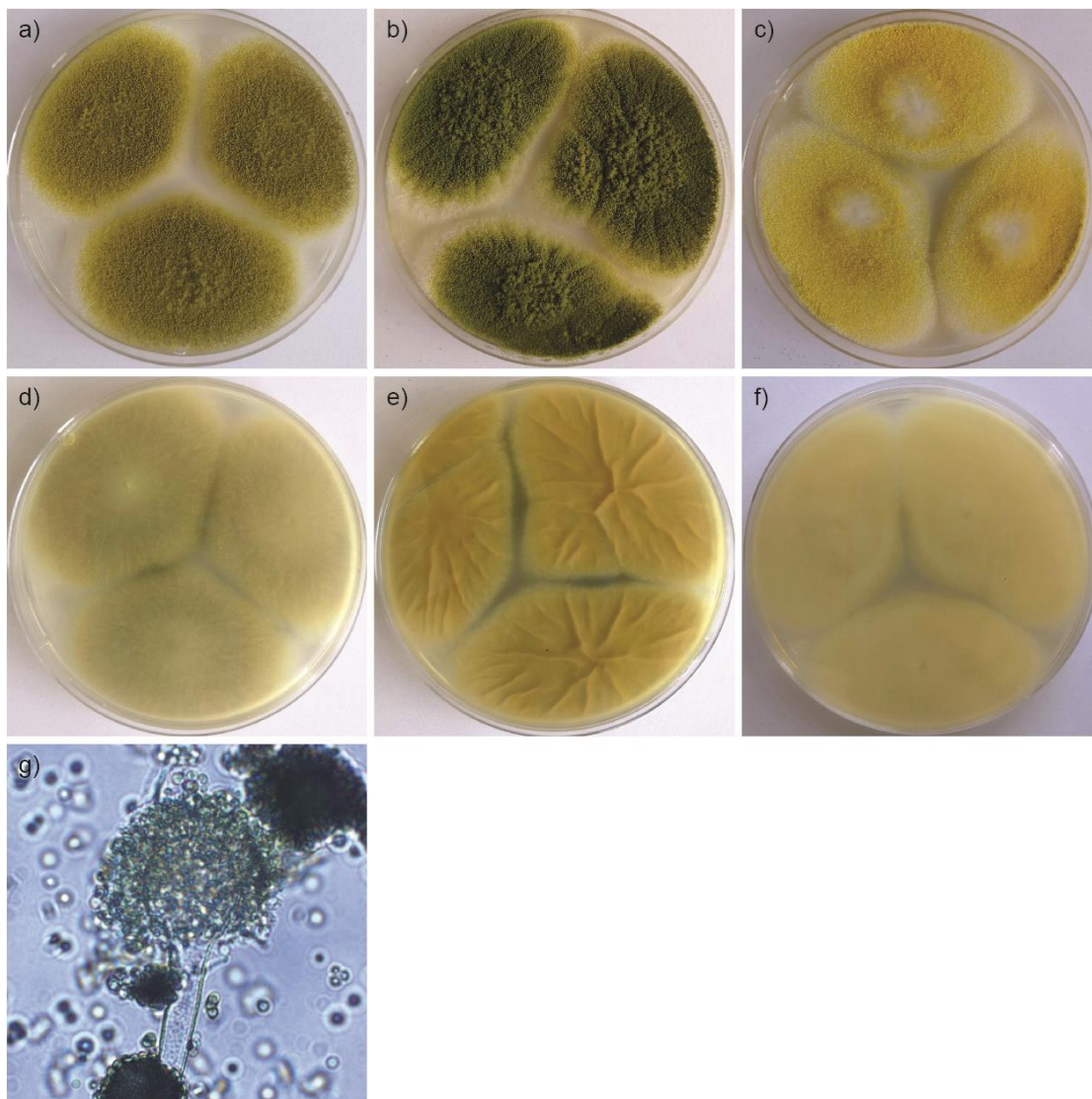
g) mikroskopska slika (povećanje 100x) (vlastite fotografije)

Mikotoksin: OTA

Genbank pristupni broj: OK442621

Sekvenca CaM:

```
TGGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTACGTATAACAACCTGCCATTGGATTGGGGATGG
AACATCGTCTCTTAGGCTATCTCAGCTTGAGTTCAGATGTTGTCCATTAGGTACATGCTAT
CGGTCTAAGAACACGTCTAACAATTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTG
ACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTCACACCTCTCAATTGGTCAACAATGGGCAAA
GGGTTGGGTCTTCTGACACGCAGGATAGTTACAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGC
GCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGAGATCCATCGGACCTTTGCTTTTACACGACAATA
TCATCAATGTCCTAATCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTTCTCGTGCCGTCC
TCGTCGACCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTTTCGGCCAGCTCTT
CCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGTGTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCA
```



**Slika 33.** *Aspergillus flavus* nakon 7 dana pri 25 °C

Površina (*aversa*): a) DG-18 b) CYA c) MEA

Poledina (*reversa*): d) DG-18 e) CYA f) MEA

g) mikroskopska slika (povećanje 100x) (vlastite fotografije)

Mikotoksini: CPA, AFB<sub>1</sub>, STC

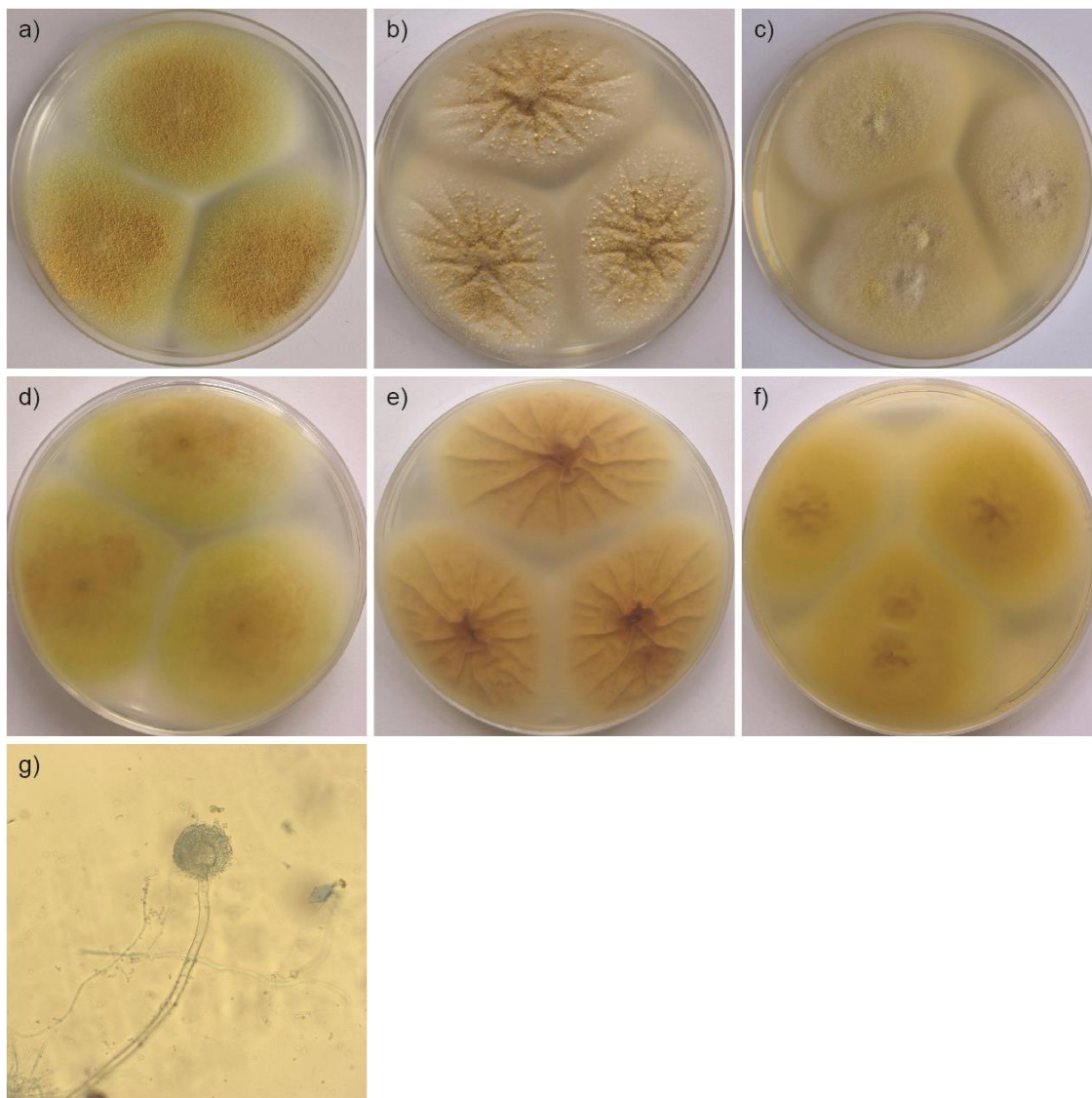
Genbank pristupni broj: OM897485

Sekvenca CaM:

```

TTGTTAGTCGTCATGATTTGAACACAAGCTGACTTGGCTTTTCTTGGGTTTCCTATAGGAC
AAGGACGGTGATGGTTAGTACAGTTTATTTTATTCATTCTCCCTTCAAATGCGATCAATAT
GTTTTAGCCGCCATAATTTTATCCAGTTTCTGTTCGATCGGCTGAAGTCTTGGCATTGATG
AATTGACTTGATATGCAGGCCAGATCACCACCAAGGAGTTGGGCACTGTCATGCGCTCTC
TGGGCCAAAACCCCTCTGAGTCGGAACCTCCAGGACATGATTAACGAGGTTGACGCCGAC
ACAATGGCACCATTGACTTCCCTGGTACGAGACGGCTTCCGTACGATTCATAAATGAAA
TAGCTGTAAATGTTCAAATAGAGTTCCTTACGATGATGGCGAGAAAGATGAAGGATACCG
ACTCTGAGGAGGAGATCCGGGAGGCTTTC AAGGTTTTTCGACCGCGATAACAACGGCTTCA
TCTCCGCTGCCGAATTGCGCCACGT

```



**Slika 34.** *Aspergillus westerdijikiae* nakon 7 dana pri 25 °C

Površina (*aversa*): a) DG-18 b) CYA c) MEA

Poleđina (*aversa*): d) DG-18 e) CYA f) MEA

g) mikroskopska slika (povećanje 100x) (vlastite fotografije)

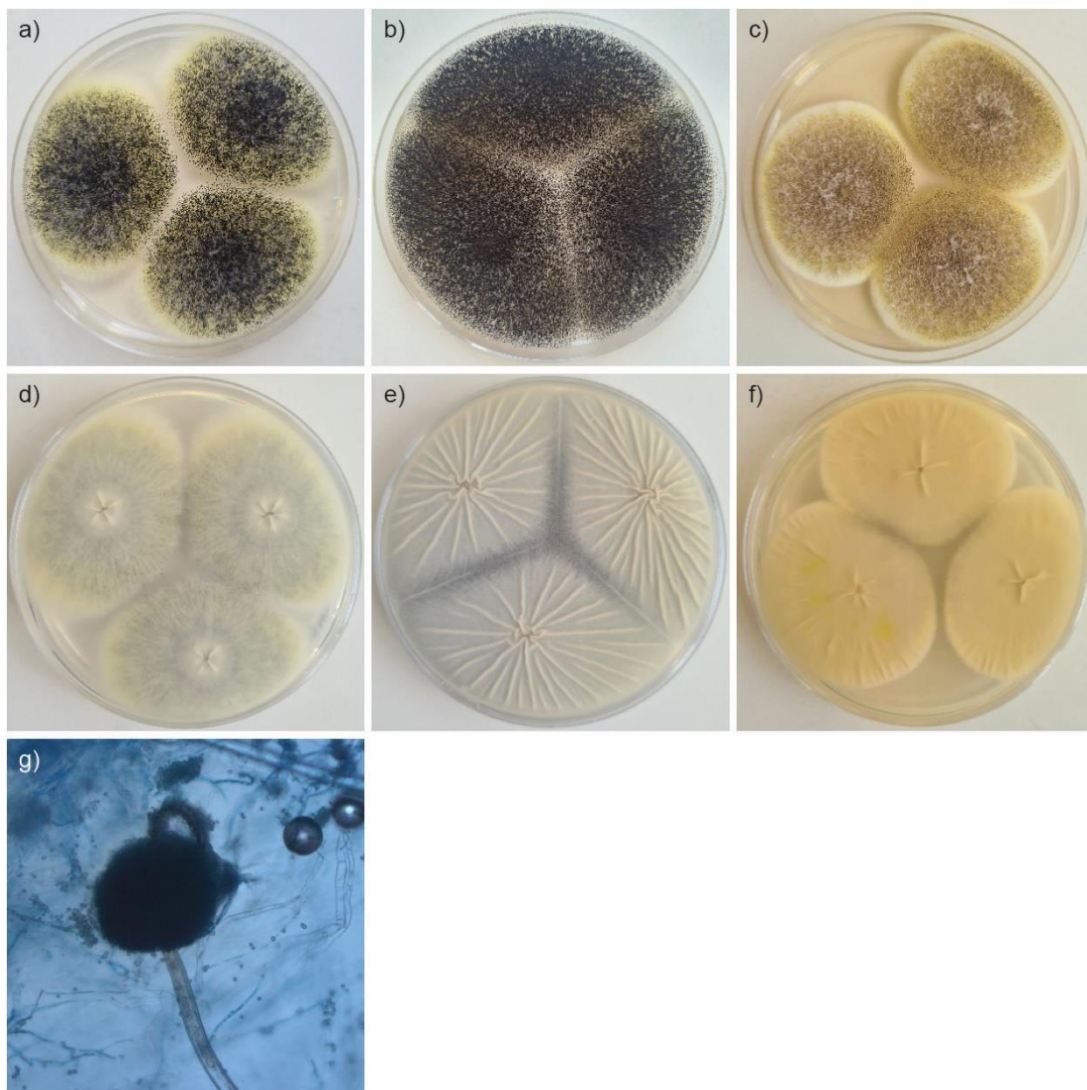
Mikotoksin: OTA

Genbank pristupni broj: OK562721

Sekvenca CaM:

```
GACGCTCAATCCTAGATACTTGTTTACTGATAGGTGAATAGGCAAACATCTCTGGCGAG
CACGGCCTTGACGGCGCCGGTGTGTAAGTACATCTCGCGTTTACACCTATCGAAATCAGA
ATCGAAGAGAGAAGAAATAAACGACCATGGTGAGAGATTGATTGTCTGATGGGATGAAC
AGTTACAATGGCTCCTCCGACCTTCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTT
CGTTGCCCGAAAATTTTCTATCTCCCTTCACCTATCCGAAACGCCCCGTACAAAGCTCTAA
CCCACGCTCTCTTCATTTTTTAAAGCTTCCGGTGGCAAGTATGTTCCCCGTGCCGTTCTGGTC
GATCTTGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTTT
```





**Slika 35.** *Aspergillus welwitschie* nakon 7 dana pri 25 °C

Površina (*averse*): a) DG-18 b) CYA c) MEA

Poleđina (*reverse*): d) DG-18 e) CYA f) MEA

g) mikroskopska slika (povećanje 100x) (vlastite fotografije)

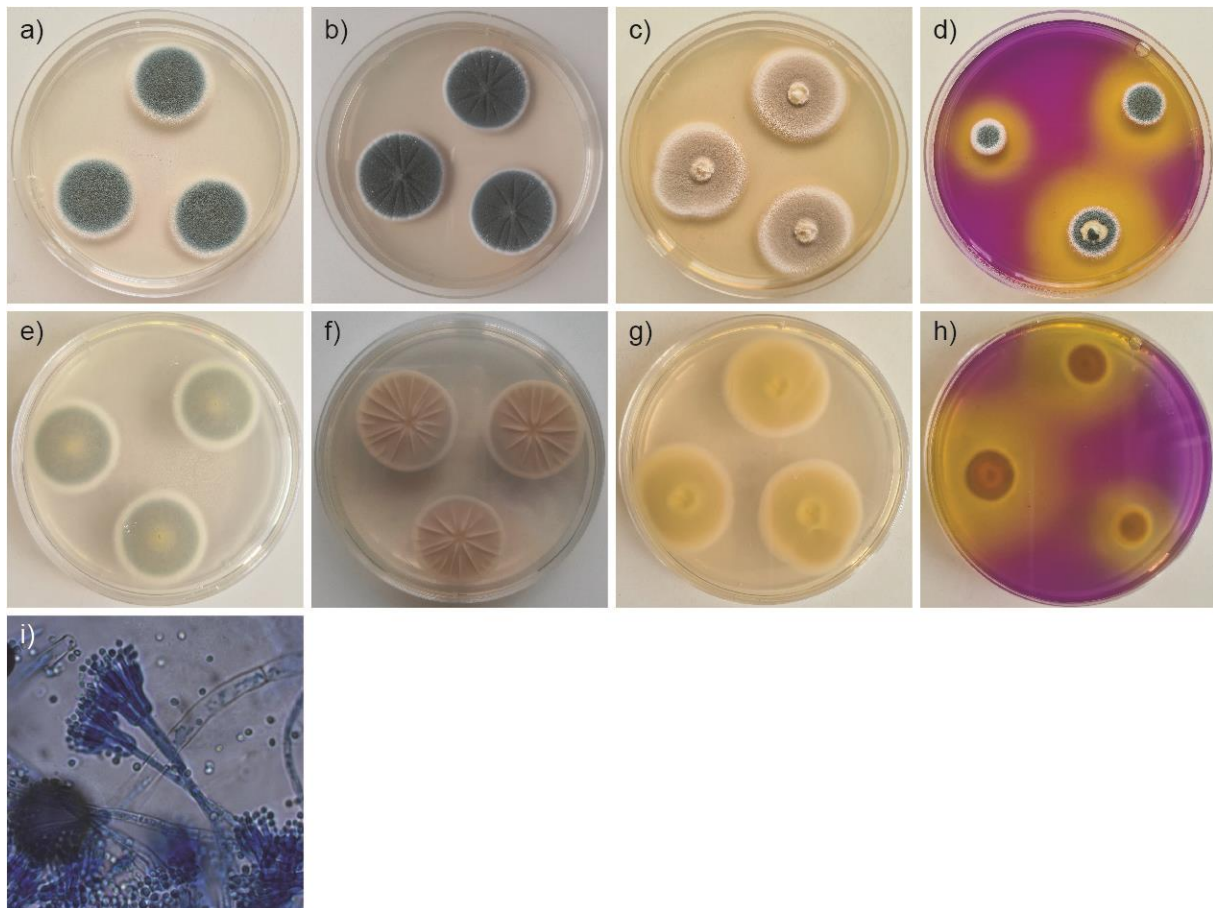
Mikotoksin: OTA

Genbank pristupni broj: OM897484

Sekvenca CaM:

```
TGTGAGTGCTCCCTGAATGACCCTCCGATCATCCTGATCGATGAGCTATCTTTACCGGAGC
ATAATGCTAATGTGTTTTCGGACTTAATAGGACAAGGATGGCGATGGTGGGTGGAATCCT
ATCCCCTTCACATTTTACCTGTAGCGCTCGATCCGACCGCGGGATTTGACAGCATTCTC
AGAATTATTTGGATCATAATACTAATTTAATCGGTGAATCAGGCCAGATCACCACCAAGG
AGCTCGGCACTGTGATGCGCTCCCTTGGCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACA
TGATCAACGAGGTTGACGCTGACAACAACGGAACGATCGACTTCCCCGGTATGTGTTAGA
TTTACGCCTGTAAGGCGGAAATGCGGGCTGGATTGTGATTGACTTTTGCCGCCAGAATTC
CTTACCATGATGGCTCGTAAGATGAAGGACACCGACTCCGAGGAGGAAATCCGCGAGGC
TTTCAAGGTCTTTGACCGCGACAACAATGGTT
```





**Slika 36.** *Penicillium polonicum* nakon 7 dana pri 25 °C

Površina (*averse*): a) DG-18 b) CYA c) MEA d) CREA

Poledina (*reverse*): e) DG-18 f) CYA g) MEA h) CREA

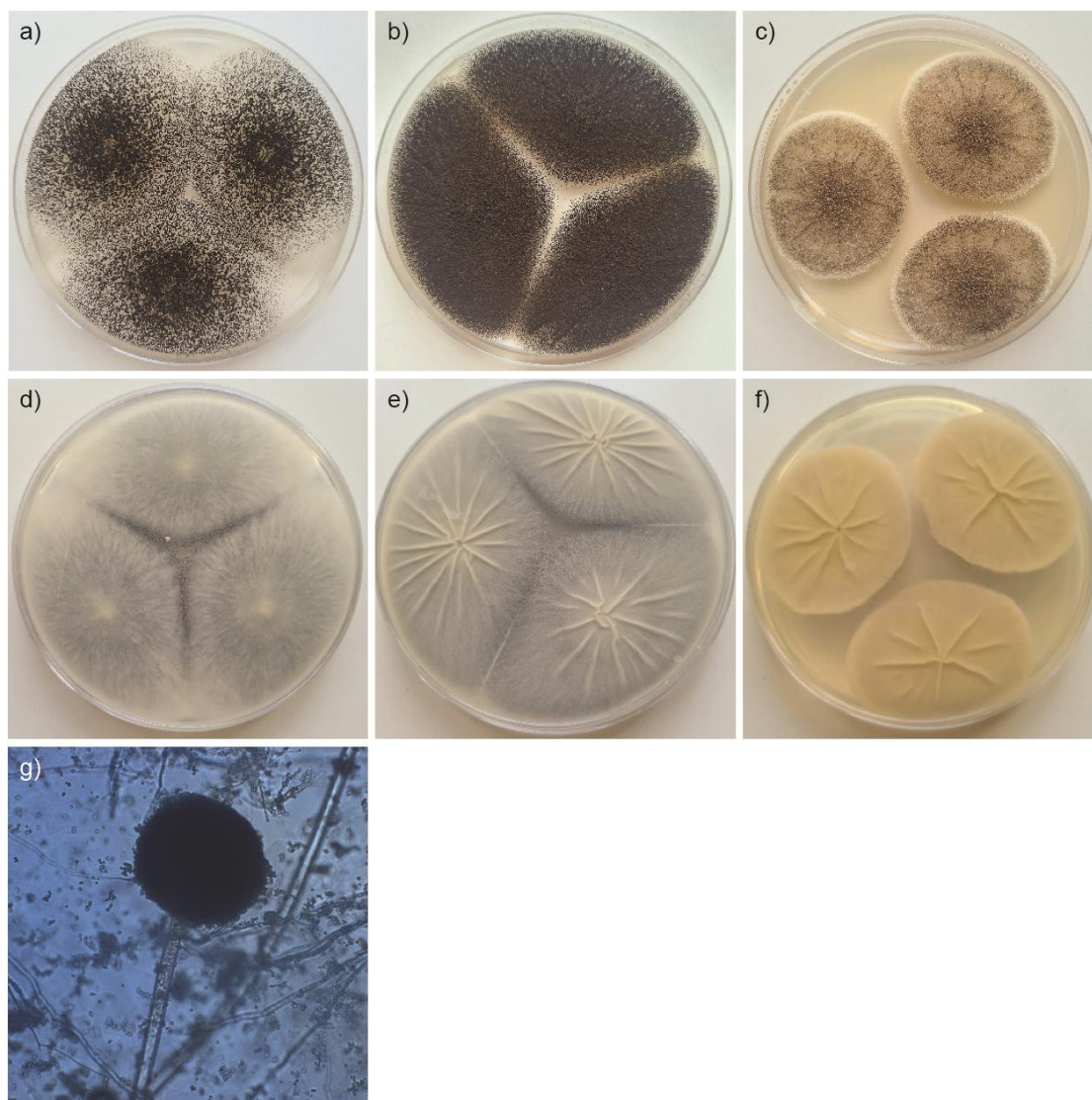
i) mikroskopska slika (povećanje 100x) (vlastite fotografije)

Mikotoksin: istražuje se produkcija CPA

Genbank pristupni broj: MT664974

Sekvenca  $\beta$ - tubulina:

```
GCTGCTTTCTGGTAAGTGCCGAGCTTTTTTTTCTTCTTCGCGTTGGGTATCAATTGACAGGT
TACTAACTCGATTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGTCTCGATGGCGATGGACAG
TAAGTTTTAATGGTGATGTGGGTTTCCGGTAGATCACACGTCTGATATCTTGCTAGGTACA
ATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACCATGTGAGTCCAA
TCACTGGAAACCGAATAATCGTGCATCATCTGATCAGATGTTTTTCTTTGATATCTAGGCC
AGCGGTGACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTTCTCGTCGATTTGGAGCCTGGTACCATGGAC
GCTGTCCGCTCCGGTCCTTTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTCAGT
CCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCAC
```



**Slika 37.** *Aspergillus tubingensis* nakon 7 dana pri 25 °C

Površina (*averse*): a) DG-18 b) CYA c) MEA

Poledina (*reverse*): d) DG-18 e) CYA f) MEA

g) mikroskopska slika (povećanje 100x) (vlastite fotografije)

Mikotoksin: istražuje se produkcija OTA

Genbank pristupni broj: OK562710

Sekvenca CaM:

```

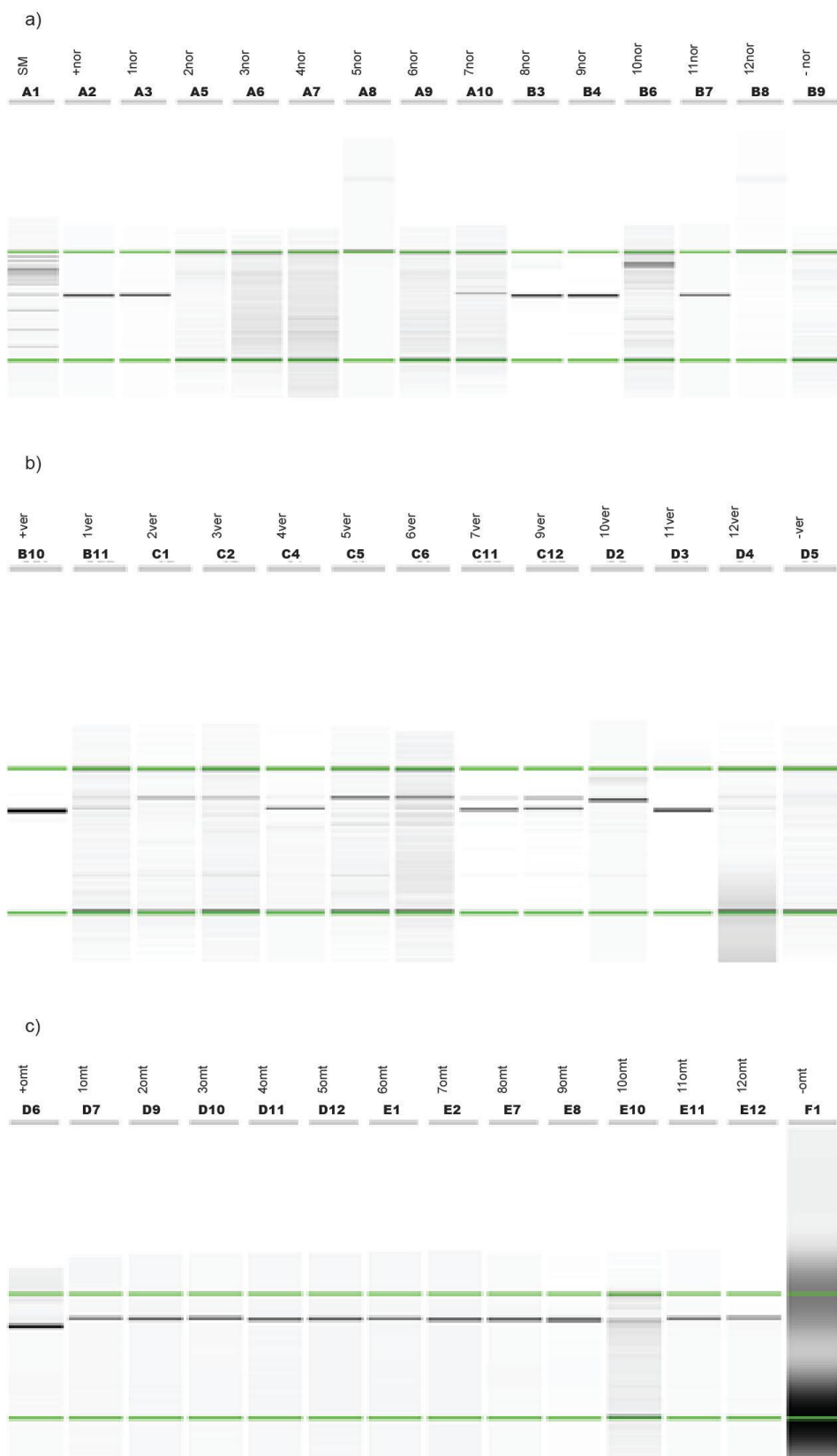
ATGTCCTATCTTAACCGGCTCATAATGCTAATGTATTTTCAAACCTCAATAGGACAAGGAT
GGCGATGGTGGGTGGAATTCTGTCCCCTTCACGTTTTACCTGTAGCGCCCGATCCGACCGC
GGGATTTTCGACAGCTATTTCCCCCTTCGATCTGAATCATAATACTGATGTAATCTGGAAAT
AGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTCGGCACTGTGATGCGCTCCCTCGGCCAGAACCCTC
CGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCTGACAACAACGGAACGATCG
ACTTCCCCGGTATGTGATAGATCTACGCCTGTAAGGCGGGAATGCCGTATGGATTGTGAT
TGACTTTTGCCGCCAGAATTCCTTACCATGATGGCTCGTAAGATGAAGGACACCGACTCC
GAGGAGGAAATCCGCGAGGCTTTCAAGGTCTTCGACCGCGACAACAATGGTTTTCATCTCC
GCCGCGGAGTTGCGCC

```

### **4.3. Detekcija gena uključenih u biosintezu mikotoksina kod toksikotvornih vrsta plijesni**

#### **4.3.1. Detekcija gena uključenih u biosintezu AFB<sub>1</sub> i STC**

S površine TMP nije identificirana vrsta plijesni koja bi bila potencijalni producent STC, dok je za AFB<sub>1</sub> identificirano 12 izolata vrste *A. flavus* koji su testirani na prisutnost gena *aflD* (*nor-1*) koji kodira za norsolorinsku kiselina reduktazu, *aflM* (*ver-1*) koji kodira za versikolorin A dehidrogenazu i *aflP* (*omt-A*) koji kodira za sterigmatocistin-O-metiltransferazu. Na slici 38. prikazana je slika gela kao rezultat kapilarne elektroforeze PCR produkata dobivenih umnožavanjem navedenih gena iz svih identificiranih izolata *A. flavus*.



**Slika 38.** Kapilarna elektroforeza PCR produkata dobivenih umnožavanjem DNA s početnicama a) nor-1 i nor-2 veličine 400 pb b) ver-1 i ver-2 veličine 537 pb c) omt-1 i omt-2 veličine 797 pb iz identificiranih izolata *A. flavus* s površine uzoraka TMP

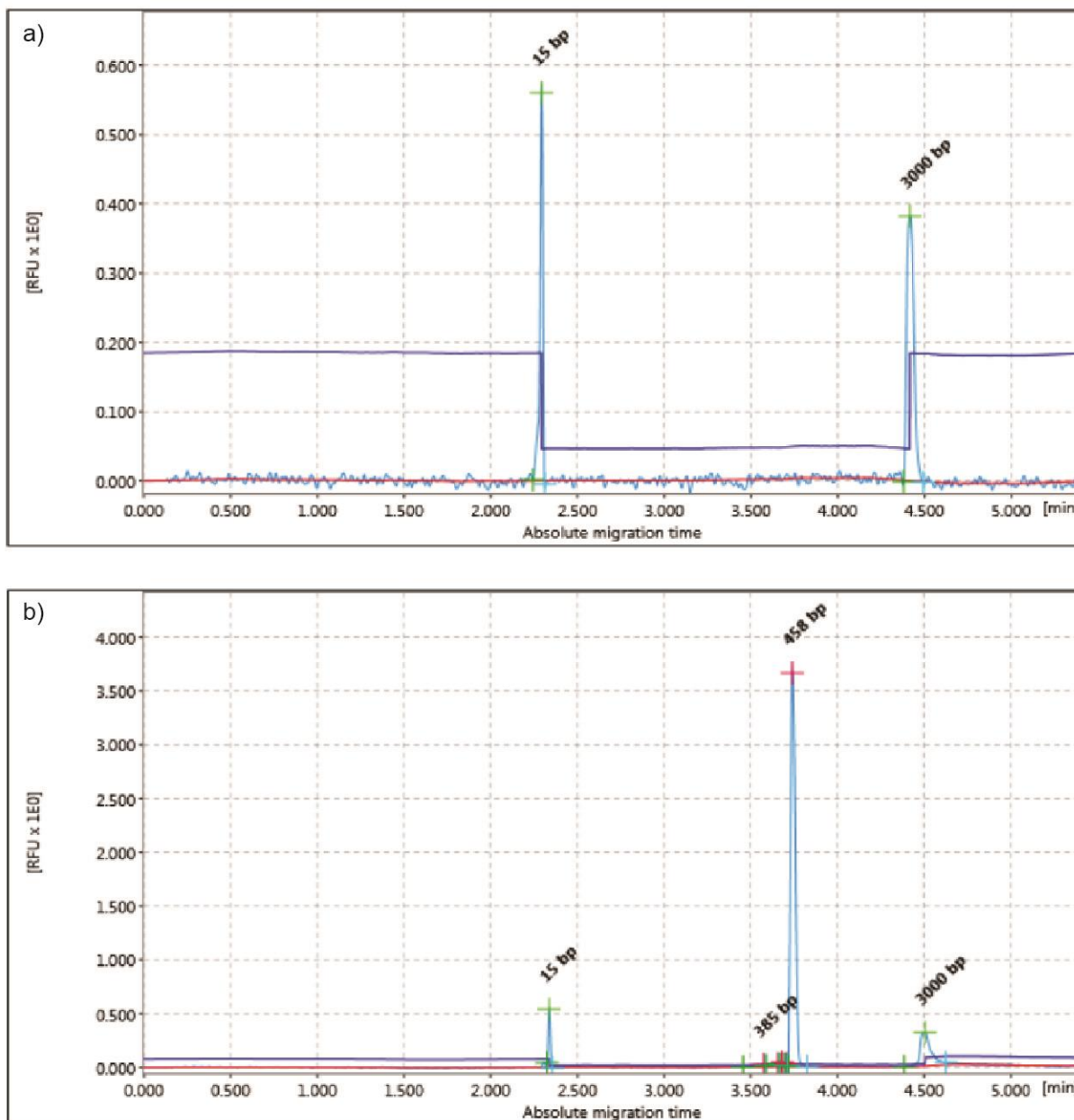
#### 4.3.2. Detekcija gena uključenih u biosintezu OTA

Vrste koje su identificirane sa površine svih analiziranih uzoraka TMP, a potencijalno imaju sposobnost produkcije OTA su *P. nordicum* (14 izolata), *A. niger* (3 izolata), *A. westerdijkiae* (1 izolat) i *A. welwitschie* (3 izolata). Za vrstu *A. tubingensis* (12 izolata) postoje oprečni rezultati o produkciji OTA stoga je i ona testirana na prisutnost gena uključenih u biosintezu OTA. Izolati potencijalnih vrsta producenata testirani su na prisutnost gena *otanpsPN* koji kodira za OTA neribosomsku peptid sintetazu te na prisutnost gena *otapks* koji kodira za OTA poliketid sintazu. Rezultati su prikazani u tablici 28., a primjeri elektroferograma PCR produkata dobivenih umnožavanjem navedenih gena prikazani su na slikama 39. - 40.

**Tablica 28.** Prisutnost gena *otanpsPN* i *otapks* koji sudjeluju u biosintezi OTA kod potencijalnih vrsta producenata

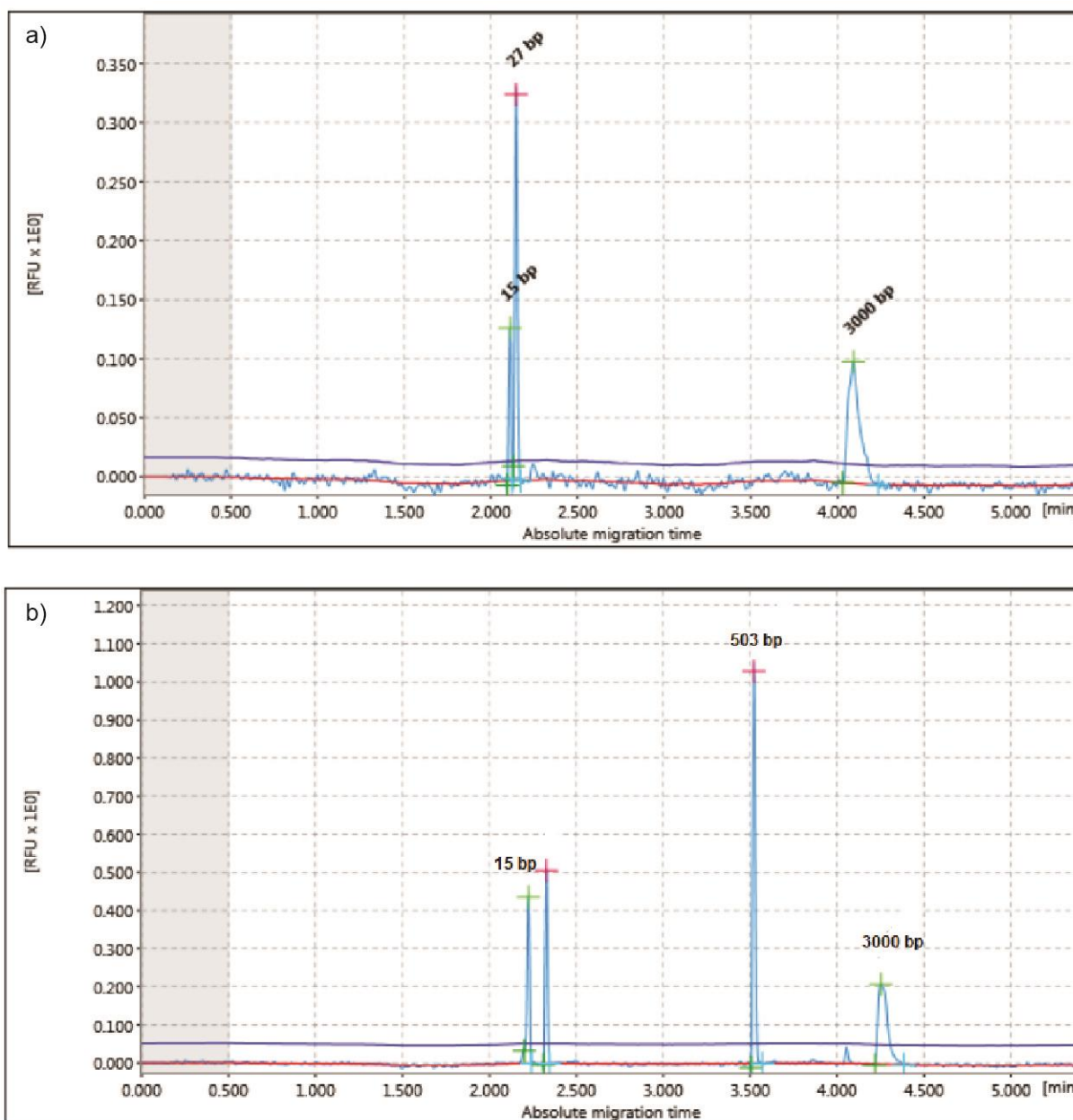
Vrsta plijesni	N	N <i>otanpsPN</i>	N <i>otapks</i>	N oba gena	% producenata
<i>P. nordicum</i> *	14	14	14	14	100
<i>A. niger</i>	3	0	0	0	0
<i>A. westerdijkiae</i> *	1	0	1	0	100
<i>A. welwitschie</i>	3	0	0	0	0
<i>A. tubingensis</i> *	12	0	4	0	33

N = broj izolata; \* izolati sa nekim od 2 istraživana OTA biosintetska gena



**Slika 39.** Primjer elektroferograma dobivenog kapilarnom elektroforezom PCR produkata dobivenih umnožavanjem DNA (*otanpsPN*) s početnicama F1OT i R1OT veličine 459 pb iz identificiranih izolata potencijalnih producenata OTA s površine uzorka TMP a) negativnog uzorka b) pozitivnog uzorka



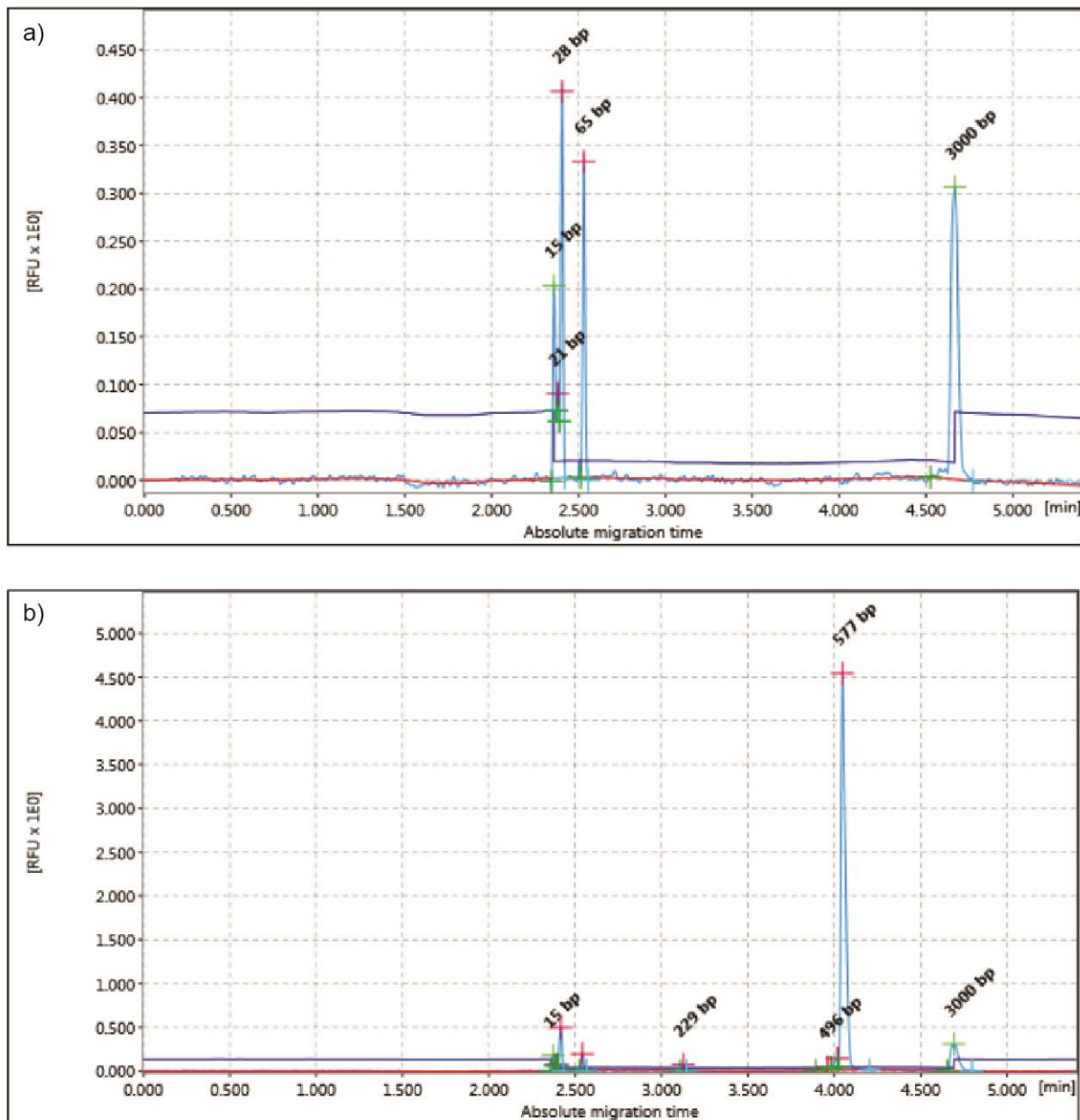


**Slika 40.** Primjer elektroferograma dobivenog kapilarnom elektroforezom PCR produkata dobivenih umnožavanjem DNA (*otapks*) s početnicama AoLC35-12R i AoLC35-12F veličine 520 pb iz identificiranih izolata potencijalnih producenata OTA s površine uzoraka TMP a) negativnog uzorka b) pozitivnog uzorka

#### 4.3.3. Detekcija gena uključenih u biosintezu CIT

Od potencijalnih producenata CIT s površine TMP identificirano je 49 izolata vrste *P. citrinum* koji su testirani na prisutnost *pkcCT* gena koji kodira za CIT poliketid sintazu. Na slici 41. prikazan je primjer elektroferograma dobivenog kapilarnom elektroforezom PCR produkata dobivenih umnožavanjem navedenog gena iz identificiranih sojeva *P. citrinum*. Od

ukupno 49 izolata *P. citrinum*, njih 35 se pokazalo pozitivnim, odnosno da posjeduju navedeni gen.

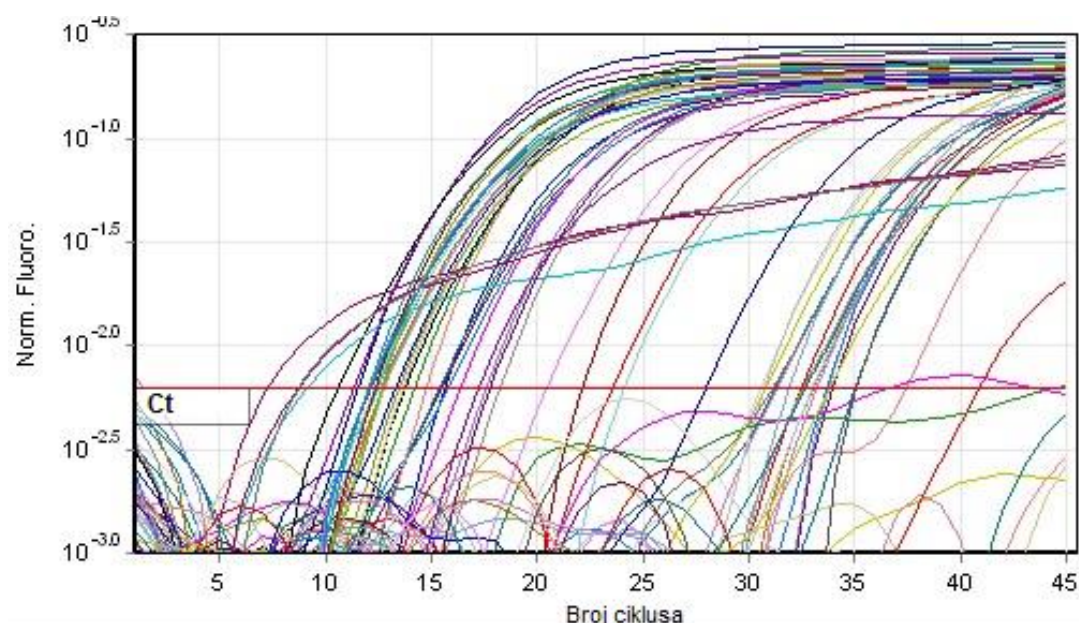


**Slika 41.** Primjer elektroferograma dobivenog kapilarnom elektroforezom PCR produkata dobivenih umnožavanjem DNA s početnicama pksCT F i pksCT R veličine 556 pb iz identificiranih izolata *P. citrinum* s površine uzorka TMP a) negativnog uzorka b) pozitivnog uzorka



#### 4.3.4. Detekcija gena uključenih u biosintezu CPA

Vrste koje su identificirane s površine svih analiziranih uzoraka TMP, a potencijalno imaju sposobnost produkcije CPA su *P. commune* (74), *A. flavus* (12 izolata) te *P. polonicum* (13 izolata). Izolati su testirani na prisutnost gena *dmaT* koji kodira za dimetilalil triptofansintazu. Rezultati sa brojem ciklusa detekcije (engl. *threshold cycle*, Ct vrijednost) prikazani su u tablici 29., a primjer krivulje dobivene PCR-om u stvarnom vremenu prikazan je na slici 42. Ct vrijednost je broj ciklusa potreban za dobivanje fluorescentnog signala. Uzorci sa Ct > 33 promatrani su kao negativni.



**Slika 42.** Krivulja dobivena PCR-om u stvarnom vremenu umnožavanjem DNA s početnicama *dmaTF* i *dmaTR* iz identificiranih izolata potencijalnih producenata CPA s površine uzoraka TMP

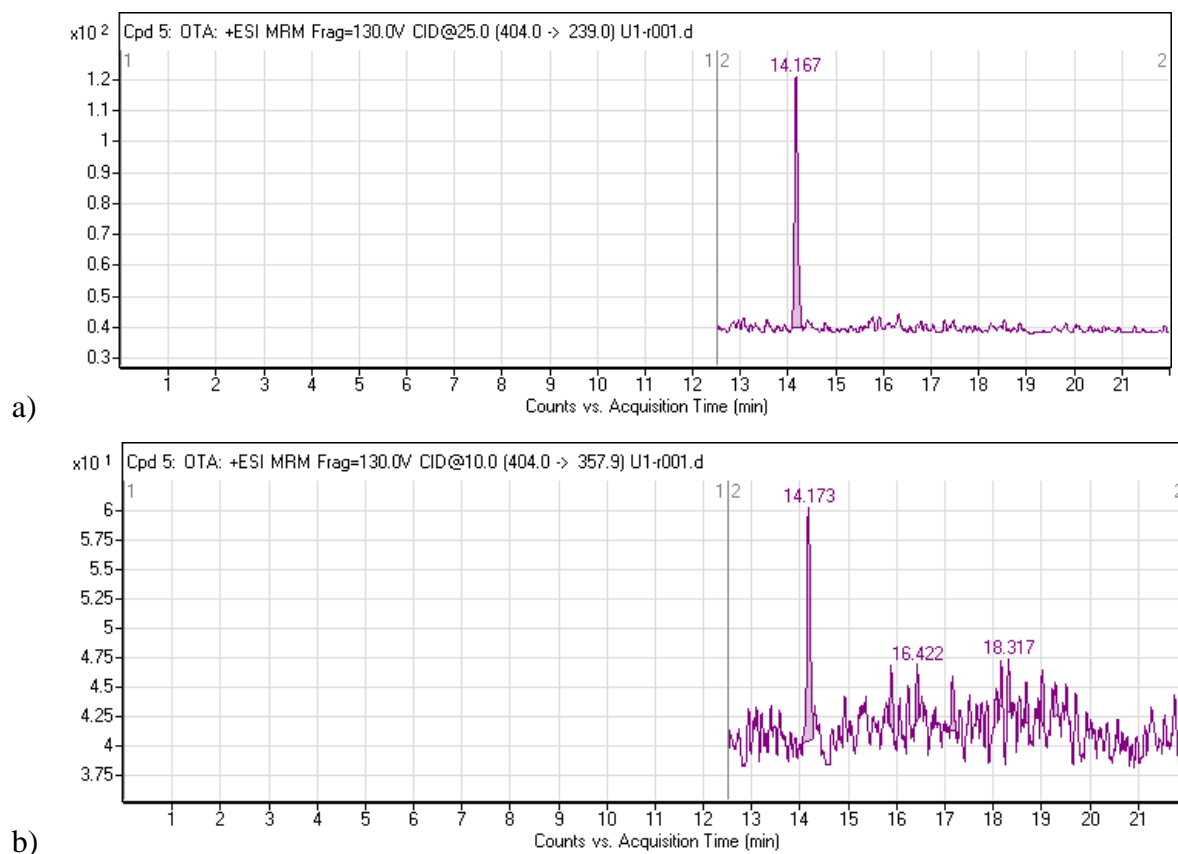
**Tablica 29.** Prisutnost gena *dmaT* koji sudjeluje u biosintezi CPA kod potencijalnih vrsta producenata

Vrsta	N	N <i>dmaT</i>	Raspon Ct	% producenata
<i>P. commune</i> *	74	45	11,30 – 32,46	61
<i>A. flavus</i> *	12	2	24,26 – 32,59	17
<i>P. polonicum</i>	13	0	-	0

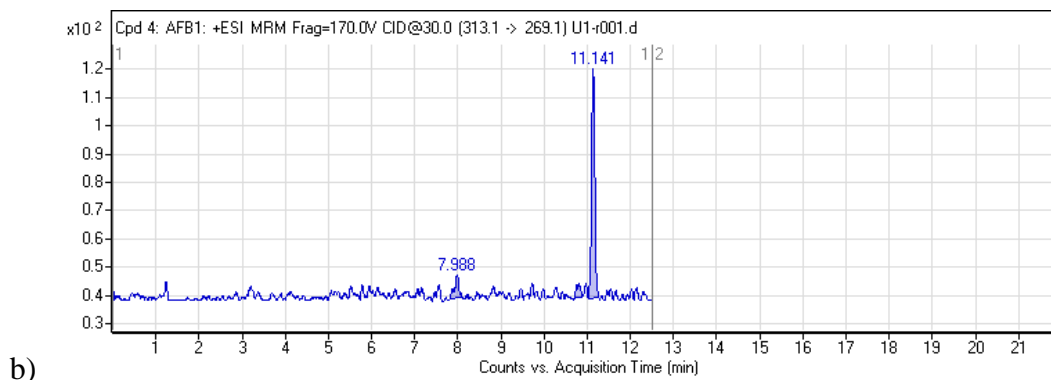
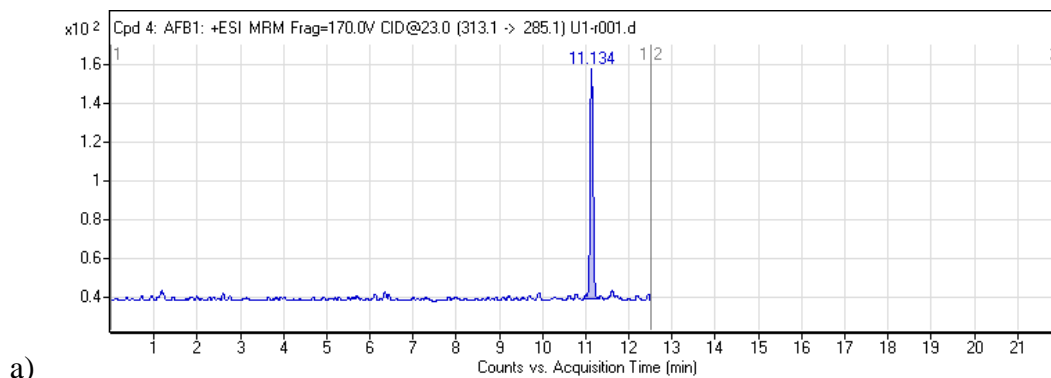
N = broj izolata; \* izolati sa istraživanim CPA biosintetskim genom

#### 4.5. Razvoj i validacija LC-MS/MS metode

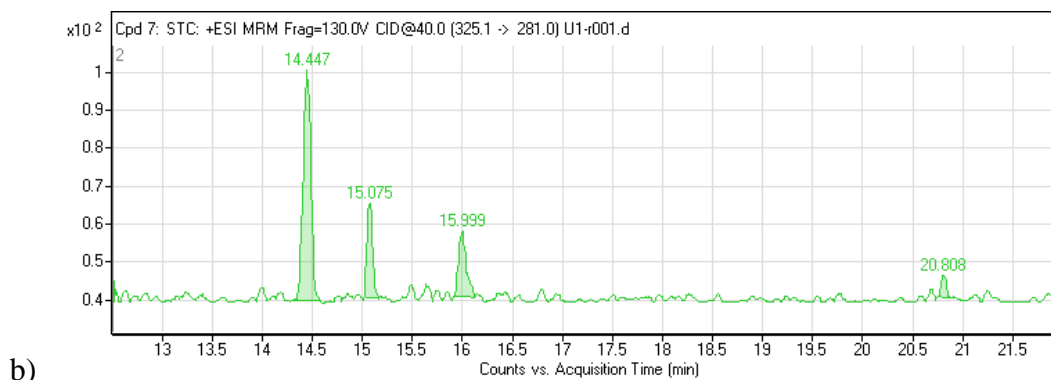
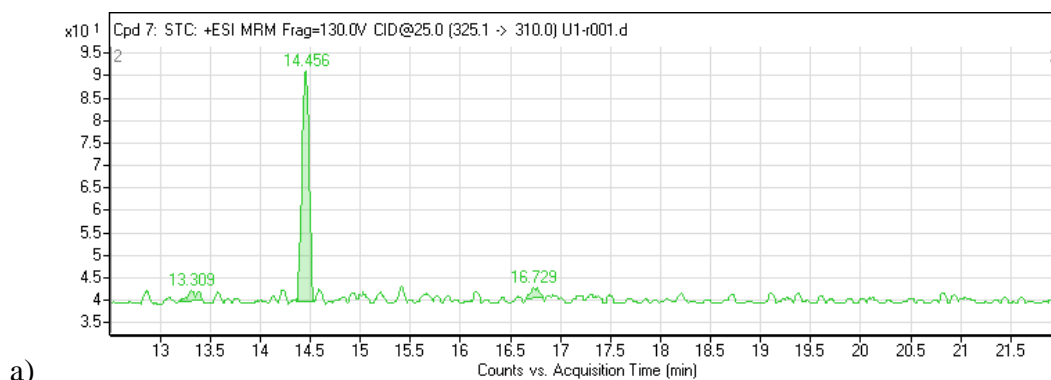
Tipični LC-MS/MS-MRM kromatogrami *blank* uzorka tradicionalnih mesnih proizvoda obogaćenih istraživanim mikotoksinima prikazani su slikama 43. – 47.



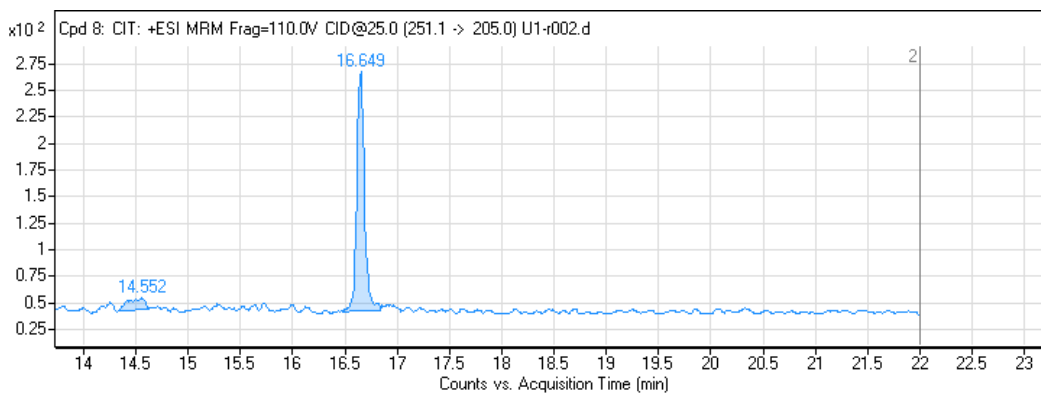
**Slika 43.** LC-MS/MS-MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) kromatogrami *blank* uzorka obogaćenog OTA na razini od 0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a) 404,0  $\rightarrow$ 239,0; b) 404,0  $\rightarrow$ 357,9



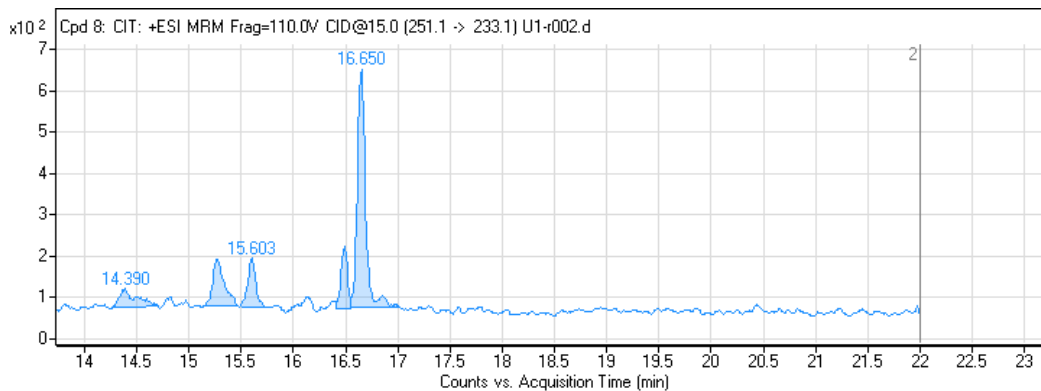
**Slika 44.** LC-MS/MS-MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) kromatogrami *blank* uzorka obogaćenog AFB<sub>1</sub> na razini od 0,1 µg/kg a) 313,1,0 →285,1; b) 313,1 →269,1



**Slika 45.** LC-MS/MS-MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) kromatogrami *blank* uzorka obogaćenog STC na razini od 0,1 µg/kg a) 325,1 →310,0; b) 325,1 →281,0

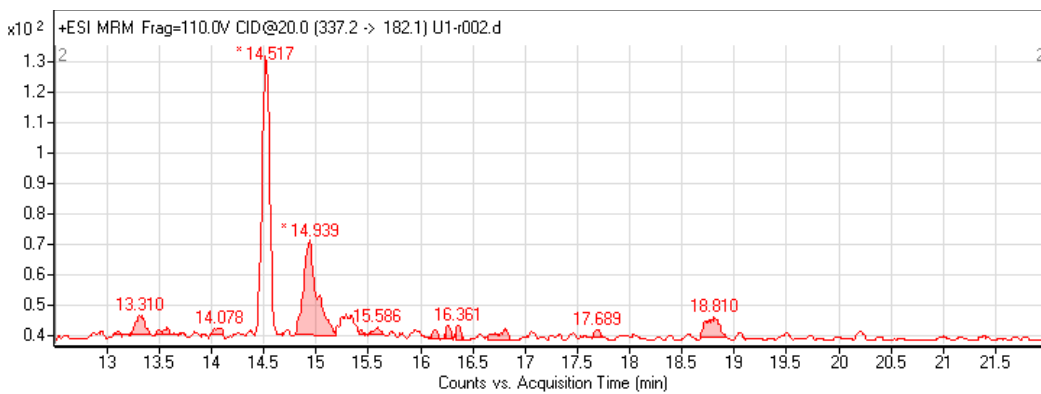


a)

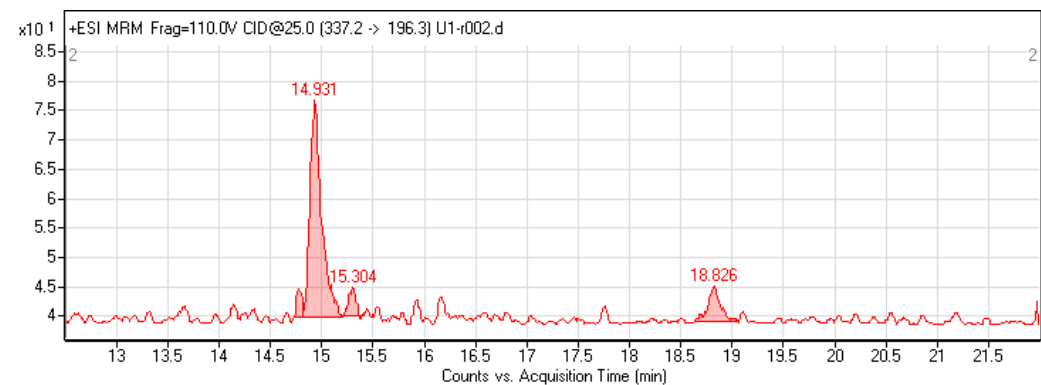


b)

**Slika 46.** LC-MS/MS-MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) kromatogrami *blank* uzorka obogaćenog CIT na razini od 2,0 µg/kg a) 251,1 →205,0; b) 251,1 →233,1



a)



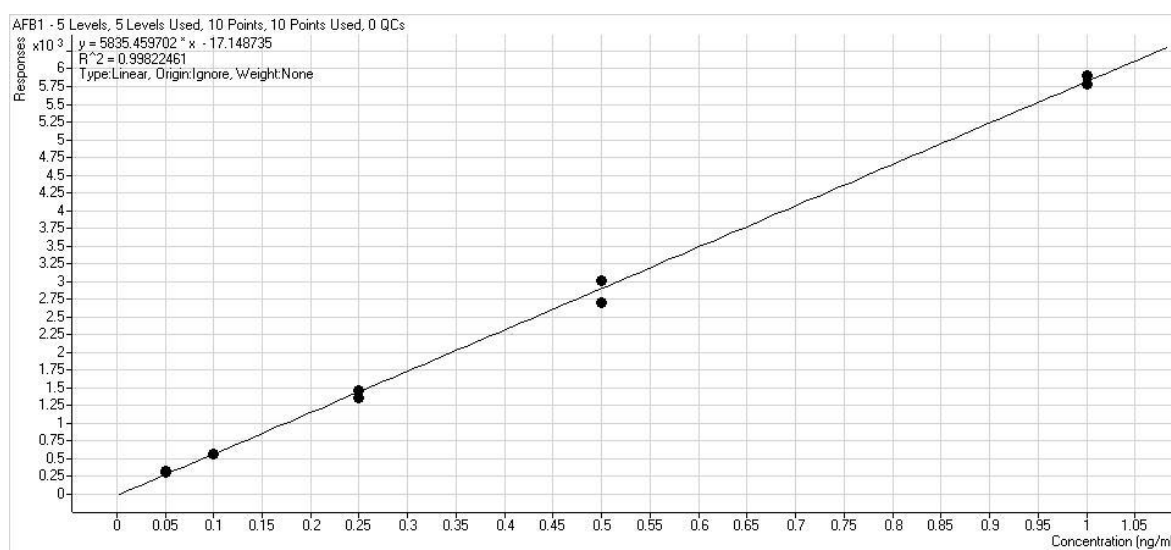
b)

**Slika 47.** LC-MS/MS-MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) kromatogrami *blank* uzorka obogaćenog CPA na razini od 3,0 µg/kg a) 337,2 →182,1; b) 337,2 →196,3

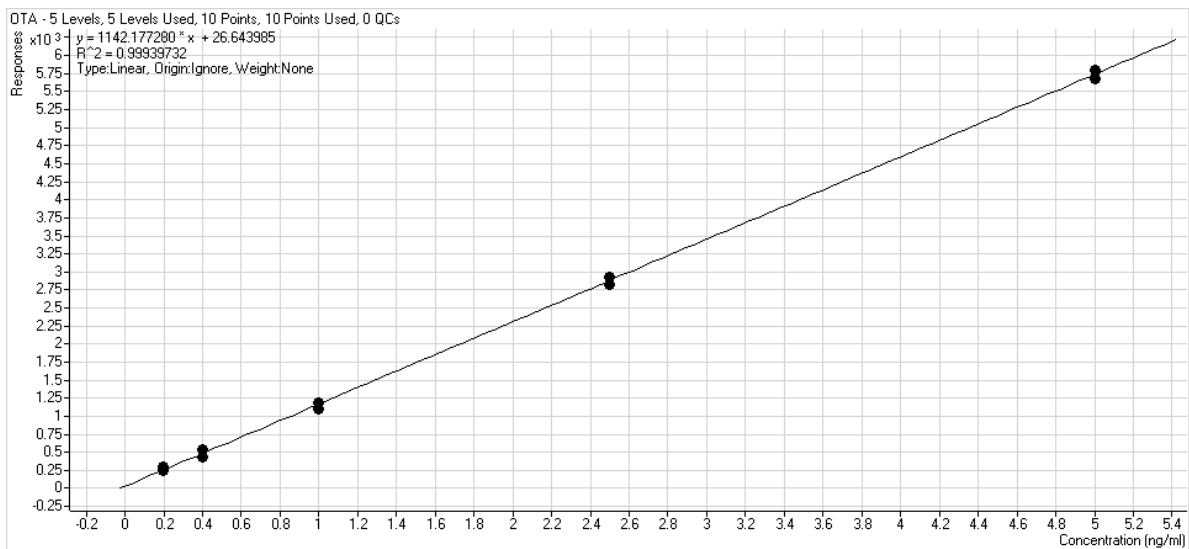
Validacija metode je provedena ispitivanjem validacijskih parametara linearnosti, LOD, LOQ, istinitosti odnosno iskorištenja te utjecaja matrice. Rezultati validacije udovoljavaju zadanim kriterijima prema „Guidance document on the estimation of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for measurements in the field of contaminants in feed and food“ (Wenzl i sur., 2016) i Provedbenoj uredbi Komisije 2021/808 (EC, 2021) te se stoga metoda smatra prihvatljivom za korištenje u određivanju koncentracije mikotoksina (AFB<sub>1</sub>, OTA, STC CPA i CIT) u TMP.

Odsutnost kromatografskog signala u očekivanom vremenu zadržavanja na kromatografskoj koloni ukazuje na specifičnosti razvijene metode. Određivanje specifičnosti metode provedeno je injektiranjem otapala i *blank* uzorka.

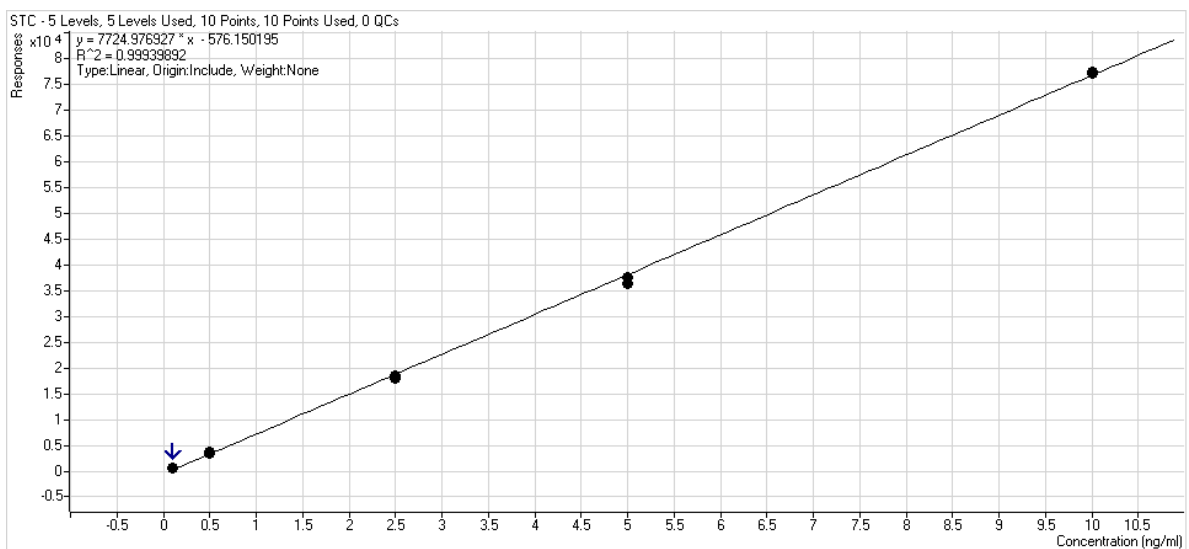
Linearnost je ispitana pomoću linearizirane kalibracijske krivulje pojedinog mikotoksina određivanjem koeficijenta korelacije R<sup>2</sup> koji opisuje ovisnost koncentracije mikotoksina i površine njihovih pikova. Pri linearizaciji se teži postizanju vrijednosti koeficijenta korelacije R<sup>2</sup> što bliže 1. Rezultati određivanja koeficijenta korelacije prikazani su kalibracijskim krivuljama za analizirane mikotoksine na slikama 48. - 52.



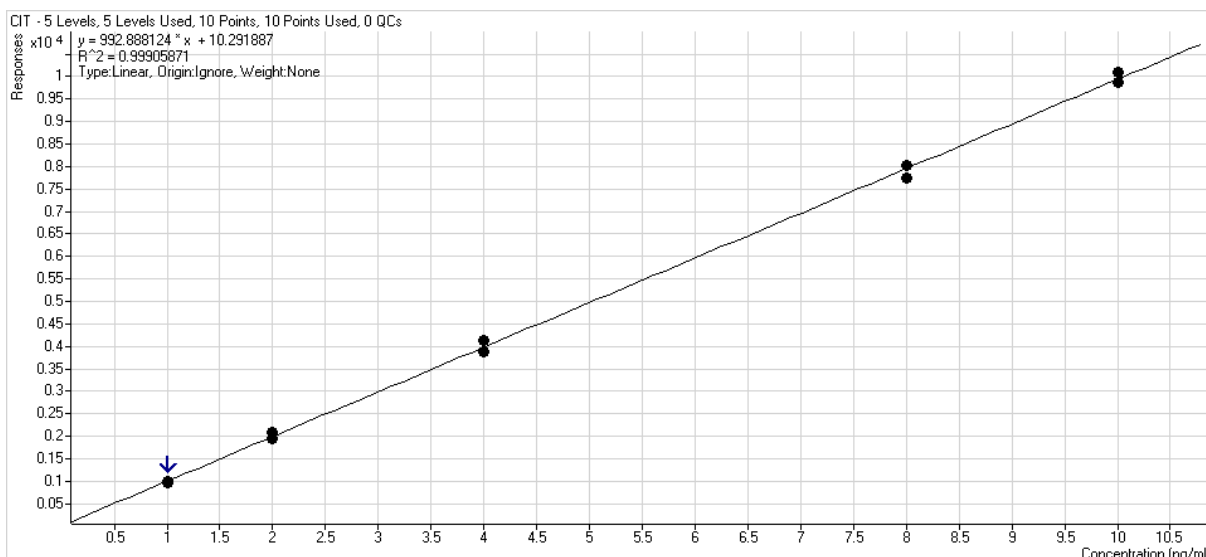
**Slika 48.** Standardna kalibracijska krivulja AFB<sub>1</sub> - linearnost u koncentracijskom rasponu od 0,05 - 1,00 ng/mL



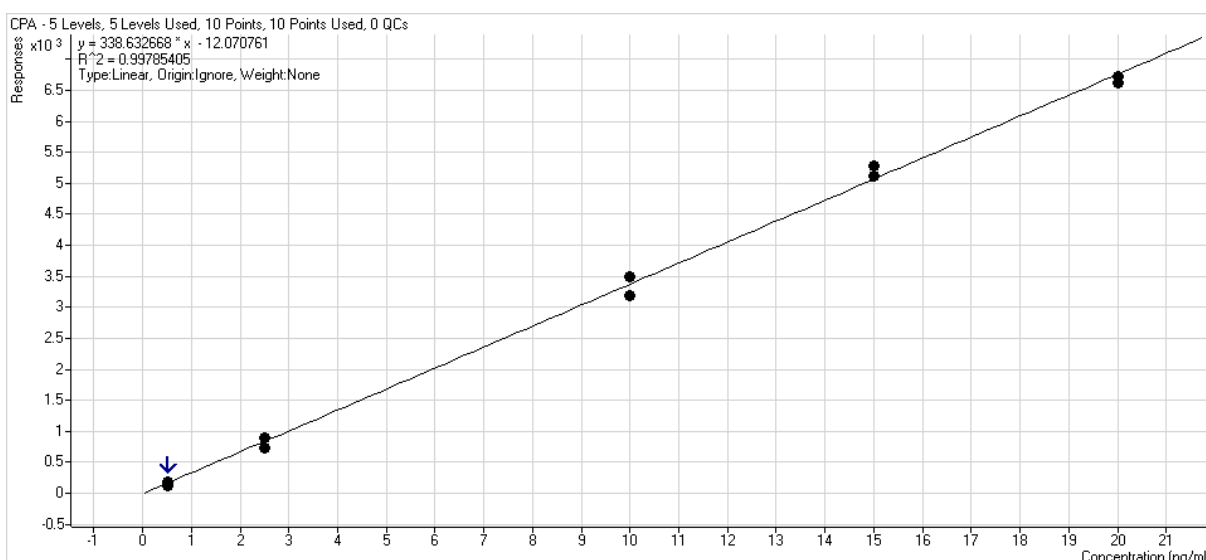
**Slika 49.** Standardna kalibracijska krivulja OTA – linearnost u koncentracijskom rasponu od 0,20 - 5,00 ng/mL



**Slika 50.** Standardna kalibracijska krivulja STC – linearnost u koncentracijskom rasponu od 0,10 - 10,00 ng/mL



**Slika 51.** Standardna kalibracijska krivulja CIT – linearnost u koncentracijskom rasponu od 1,00 - 10,00 ng/mL



**Slika 52.** Standardna kalibracijska krivulja CPA – linearnost u koncentracijskom rasponu od 0,50 - 20,00 ng/mL

Limit detekcije i kvantifikacije su ispitivani koristeći obogaćene *blank* uzorke mesnih proizvoda te su postignute vrijednosti prikazane u tablici 30.

**Tablica 30.** Limiti detekcije i kvantifikacije metode za mikotoksine

<b>Analit</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>
AFB <sub>1</sub>	0,03	0,11
OTA	0,18	0,59
CIT	0,60	1,98
STC	0,02	0,06
CPA	0,43/ 2,17*	1,43/ 7,15*

\*LOD i LOQ u matrici s obzirom na faktor razrijeđenja 5

Utjecaj matrice određen je koristeći postekstrakcijski obogaćene *blank* uzorke mesnih proizvoda te usporedbom sa standardnim otopinama iste razine svakog mikotoksina, a rezultat je izražen kao postotak. Rezultati za svaki mikotoksin prikazani su u tablici 31.

**Tablica 31.** Rezultati određivanja utjecaja matrice (ME) za analizu mikotoksina

	<b>STC</b>	<b>CIT</b>	<b>CPA</b>	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>OTA</b>
	A površina pika				
Uzorak 1	4081	2449	263	1244	299
Uzorak 2	4349	2233	336	1203	245
Uzorak 3	4588	2373	336	1209	245
Uzorak 4	4389	2305	290	1171	217
Uzorak 5	4727	2379	370	1285	321
Uzorak 6	4143	2212	303	1152	278
Uzorak 7	4044	2160	278	1129	329
Uzorak 8	3899	2335	320	1222	244
Uzorak 9	4300	2329	179	1179	290
Uzorak 10	4397	2428	153	1248	326
Sred. vrijednost	4291	2320	283	1204	279
Razina standardne otopine	0,50 ng/mL	2,00 ng/mL	1,00 ng/mL	0,25 ng/mL	0,40 ng/mL
Standardna otopina	3585	2073	280	1019	247
<b>ME %</b>	<b>7,7</b>	<b>0,7</b>	<b>1,0</b>	<b>6,36</b>	<b>1,81</b>

Iskorištenje metode određeno je koristeći obogaćene *blank* uzorke mesnih proizvoda standardom svakog mikotoksina a rezultat je izražen kao postotak. Rezultati za svaki mikotoksin prikazani su u tablici 32.

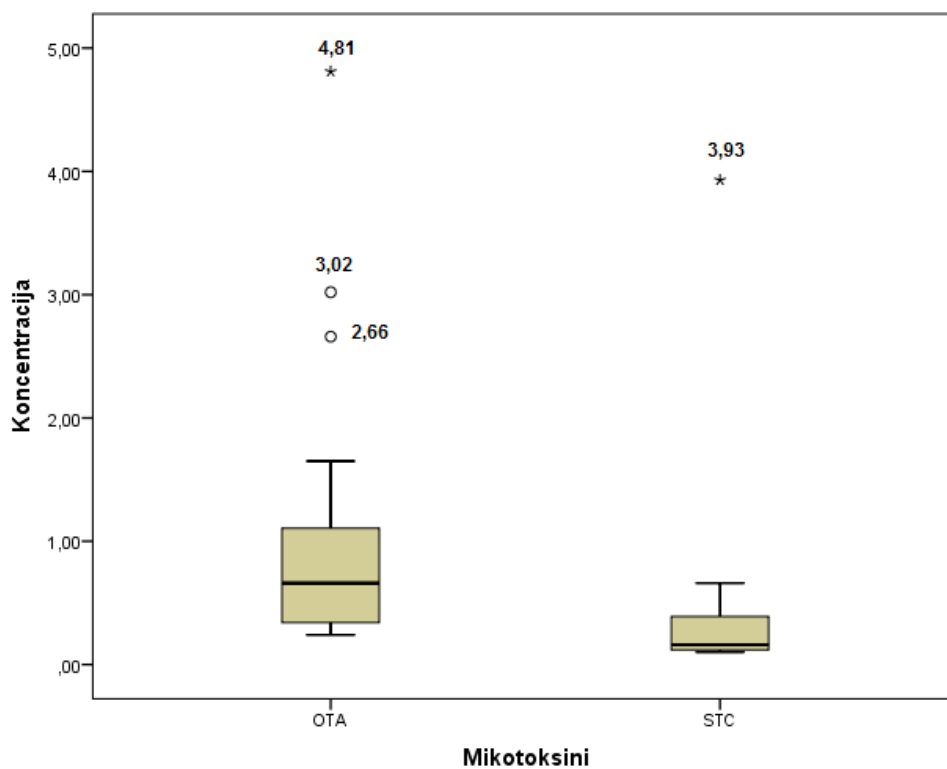


**Tablica 32.** Rezultati određivanja iskorištenja metode za analizu mikotoksina

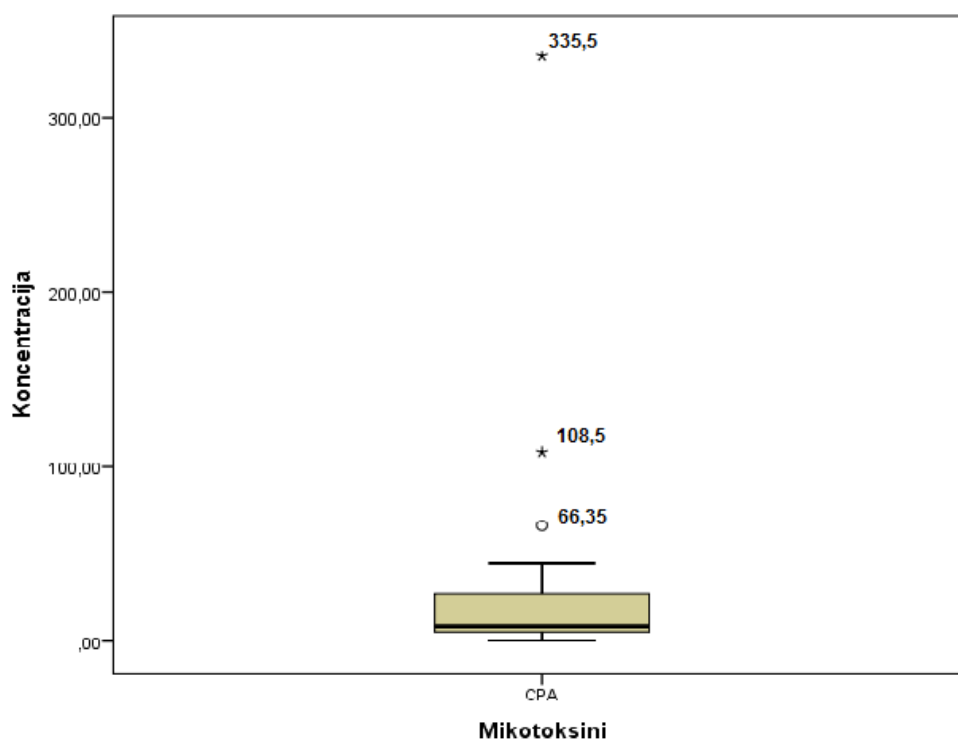
	<b>STC</b>	<b>CIT</b>	<b>CPA</b>	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>OTA</b>
	Koncentracija (µg/kg)				
Obogaćena razina	0,1	2,0	3,0	0,1	0,3
Uzorak 1	0,12	2,28	3,14	0,10	0,34
Uzorak 2	0,13	2,17	3,17	0,09	0,38
Uzorak 3	0,12	1,95	2,95	0,10	0,39
Uzorak 4	0,13	1,91	3,15	0,10	0,40
Uzorak 5	0,12	2,16	3,11	0,09	0,38
Uzorak 6	0,13	2,04	3,07	0,09	0,30
Uzorak 7	0,12	2,06	2,95	0,09	0,33
Uzorak 8	0,13	1,96	3,12	0,09	0,36
Uzorak 9	0,13	1,83	1,36	0,07	0,34
Uzorak 10	0,12	1,82	2,62	0,09	0,36
Sred. vrijednost	0,12	2,02	2,86	0,09	0,35
<b>Iskorištenje %</b>	<b>114,4</b>	<b>100,9</b>	<b>95,49</b>	<b>91,37</b>	<b>119,41</b>

#### 4.6. Pojavnost mikotoksina u hrvatskim TMP

Na slici 53. prikazani su *box-plot* dijagrami koncentracija određenih mikotoksina CPA, OTA i STC (µg/kg) u uzorcima analiziranih TMP određenih iznad limita detekcije (> LOD). Mikotoksini AFB<sub>1</sub> i CIT nisu detektirani u niti nijednom uzorku TMP. Pojavnost dva mikotoksina zajedno zabilježena je samo za OTA i CPA u 4 uzorka te OTA i STC u 2 uzorka.



a)



b)

**Slika 53.** Box-plot dijagram koncentracije ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a) OTA i STC b) CPA u uzorcima TMP određenih iznad limita detekcije ( $> \text{LOD}$ )

LOD: OTA -  $0,18 \mu\text{g}/\text{kg}$ , STC -  $0,02 \mu\text{g}/\text{kg}$ , CPA  $\mu\text{g}/\text{kg}$   $0,43/ 2,17 \mu\text{g}/\text{kg}$  u matrici

#### 4.6.1. Pojavnost mikotoksina u odnosu na identificirane vrste plijesni producente mikotoksina

Pojedinačne koncentracije mikotoksina određene u uzorcima TMP u poveznici sa identificiranim vrstama producentima prikazane su u tablicama 33. - 35.

**Tablica 33.** Koncentracije CPA određene u uzorcima TMP u odnosu na identificirane vrste plijesni producente

Vrsta proizvoda/ OPG	Regija	Godina uzorkovanja	CPA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Producent	Gen
Šunka	Istočna	2020	4,80	/	
Kulenova seka			3,55	<i>P. commune</i>	-
Kulen			5,80	/	
Kobasica			6,55	<i>P. commune</i>	+
Šunka			36,50	/	
Kulen			13,35	<i>P. commune</i>	+
Kulen		2021	17,45	/	
Kobasica			5,45	<i>P. polonicum</i>	-
Kulenova seka			27,25	<i>P. polonicum</i>	-
Šunka			4,20	/	
Kulenova seka			19,75	<i>P. commune</i>	-
Kobasica			335,50	<i>P. commune</i>	+
Kulenova seka		6,50	<i>P. commune</i>	+	
Šunka		20,90	<i>P. polonicum</i>	-	
Dalmatinski pršut	Južna	2020	108,50	<i>P. commune</i>	+
Buđola		2021	6,75	/	
Pršut	Zapadna	2020	2,25	/	
Ombolo			66,35	<i>P. commune</i>	-
Trajna kobasica			3,10	<i>P. commune</i>	+
Istarski zagrebnjak		2021	6,25	/	
Kobasica			24,65	/	
Ombolo			7,30	/	
Kosnica			44,70	/	
Istarski žlomprt			27,05	/	
Panceta			9,90	/	
Klanječka salama	Središnja	2021	5,55	<i>P. commune</i>	+
Panceta		2020	12,80	/	
Vinogradarska	Sjeverna	2021	28,85	<i>P. commune</i>	+
Špek			7,15	/	
Kare			44,25	<i>P. commune</i>	+
Vratina		6,10	<i>P. commune</i>	+	
Slavonska kobasica		2020	39,25	/	
Špek			3,20	/	

**Tablica 34.** Koncentracija OTA određene u uzorcima TMP u odnosu na identificirane vrste plijesni proizducente

Vrsta proizvoda/ OPG	Regija	Godina uzorkovanja	OTA (µg/kg)	Producent	Gen
Kulen	Istočna	2020	0,29	<i>P. nordicum</i>	+
Kobasica			0,24	<i>P. nordicum</i>	+
Slavonski kulen			0,85	/	
Kulenova seka			1,65	/	
Kobasica		2021	0,51	/	
Kobasica			1,04	/	
Vratina	Južna	2020	2,66	/	
Istarska salama	Zapadna	2020	0,35	<i>P. nordicum</i>	+
Kulen			1,00	/	
Goveda kobasica			0,75	/	
Trajna kobasica		1,17	/		
Istarski zagrebnjak		2021	0,64	/	
Istarski pršut			4,81	/	
Panceta	Središnja	2020	0,68	/	
Trajna kobasica			0,61	/	
Trajna salama			1,61	/	
Salama		2021	3,02	/	
Čajna kobasica			0,46	/	
Zagorska kobasica			0,27	/	
Kare	0,33	/			
Zimska salama	Sjeverna	2020	0,29	/	
Kulenova seka			0,70	/	
Salama od divljači			0,29	/	
Kulenova seka		2021	0,36	/	

**Tablica 35.** Koncentracija STC određene u uzorcima TMP u odnosu na identificirane vrste plijesni proizducente

Vrsta proizvoda/ OPG	Regija	Godina uzorkovanja	STC (µg/kg)	Producent	Gen
Vratina	Južna	2020	0,12	/	
Pečenica			0,16	/	
Istarska panceta	Zapadna		0,49	/	
Istarski ombolo			0,13	/	
Istarska salama			0,24	/	
Klanječka salama	Središnja		2021	0,11	/
Kobasica		0,12	<i>A.flavus</i>	+	
Varaždinski kulen	Sjeverna	2020	0,66	/	
Varaždinska seka			3,93	/	
Jalkovečka kobasica			0,29	/	
Jalkovečka kobasica		2021	0,10	/	

#### 4.6.2. Pojavnost mikotoksina prema geografsko-vremenskoj regiji proizvodnje

Rezultati statističke značajnosti među koncentracijama mikotoksina s obzirom na godinu uzorkovanja te regiju proizvodnje prikazane su u obliku p vrijednosti u tablici 36., a deskriptivna statistika prikazana je u tablici 37.

**Tablica 36.** Rezultati statističke obrade za koncentracije mikotoksina prema regiji proizvodnje i godini uzorkovanja

Grupacija za statističku obradu	OTA		CPA	
	P vrijednost	Statistički test	P vrijednost	Statistički test
Istočna regija	0,979	Mann-Whitney U	0,345	Mann-Whitney U
Središnja regija	0,400	Mann-Whitney U	/	/
Sjeverna regija	/	/	0,800	Mann-Whitney U
Zapadna regija	0,217	Mann-Whitney U	0,548	Mann-Whitney U
Južna regija	/	/	/	/
2020. god	0,394	Kruskal-Wallis	0,769	Mann-Whitney U
2021. god	0,293	Kruskal-Wallis	0,536	Kruskal-Wallis

**Tablica 37.** Deskriptivna statistika pojavnosti mikotoksina s obzirom na regiju i godinu uzorkovanja

Mikotoksin	Godina	Regija RH														
		Južna			Zapadna			Istočna			Sjeverna			Središnja		
		n% / n	Sred.konc.±SD (Min.-maks.)	Med	n% / n	Sred.konc.±SD (Min.-maks.)	Med	n% / n	Sred.konc.±SD (Min.-maks.)	Med	n% / n	Sred.konc.±SD (Min.-maks.)	Med	n% / n	Sred.konc.±SD (Min.-maks.)	Med
AFB <sub>1</sub>	2020	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
	2021	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
OTA	2020	4/1	2,66±n.p.	n.p.	15/4	0,82±0,36 (0,75-1,17)	0,88	14/4	0,76±0,66 (0,24-1,65)	0,57	10/3	0,43±0,24	0,29	27/3	0,97±0,56 (0,61-1,61)	0,68
	2021	0/0	< LOD	n.p.	7/2	2,73±2,95 (0,64-4,81)	2,73	8/2	0,78±0,37 (0,51-1,04)	0,78	3/1	0,36±n.p.	n.p.	31/4	1,02±1,34 (0,27-3,02)	0,40
	2020.- 2021.	2/1	2,66±n.p.	n.p.	12/6	1,45±1,67	0,88	13/6	0,76±0,54	0,68	7/4	0,41±0,20	0,33	29/7	1,00±1,00	0,61
CIT	2020	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
	2021	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
STC	2020	8/2	0,14±0,03 (0,12-0,16)	0,14	12/3	0,29±0,18 (0,13-0,49)	0,24	< LOD	< LOD	< LOD	10/3	1,63±2,00 (0,29-3,93)	0,66	0/0	< LOD	< LOD
	2021	0/0	< LOD	< LOD	0/0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	3/1	0,10±n.p.	n.p.	15/2	0,12±0,01 (0,11-0,12)	0,12
	2020.- 2021.	4/2	0,14±0,03	0,14	6/3	0,29±0,18	0,24	< LOD	< LOD	< LOD	7/4	1,25±1,81	0,10	8/2	0,12±0,01	0,12
CPA	2020	4/1	108,50±n.p.	n.p.	12/3	23,57±37,06 (1,25-66,35)	3,10	21/6	11,76±12,59 (3,55-36,50)	6,18	7/2	21,23±25,49 (3,20-39,25)	21,23	18/2	6,51±8,90 (0,21-12,80)	6,51
	2021	3/1	6,75±n.p.	n.p.	21/6	19,98±15,06 (6,25-44,70)	17,28	33/8	54,63±113,80 (4,20-335,50)	18,60	13/4	21,59±18,39 (6,10-44,25)	18,00	8/1	5,55±n.p.	n.p.
	2020.- 2021.	7/2	57,63±71,95	57,63	17/9	21,17±22,10	9,90	29/14	36,25±86,71	9,95	10/6	21,47±18,25	18,00	13/3	6,19±6,32	5,55

< LOD ispod limita detekcije; n% postotak uzoraka >LOD; n broj uzoraka > LOD, Sred.konc. srednja koncentracija uzoraka > LOD; SD standardna devijacija; Med medijan uzoraka > LOD

#### 4.6.3. Pojavnost mikotoksina prema vrsti trajnih proizvoda - tehnologiji proizvodnje

Deskriptivna statistika pojavnosti mikotoksina u uzrocima TMP s obzirom na vrstu trajnih proizvoda (kobasice i suhomesnate proizvode), odnosno, tehnologiju proizvodnje i godinu uzorkovanja prikazana je u tablici 38. Statistički značajne razlike u koncentracijama mikotoksina s obzirom na godinu uzorkovanja te vrstu proizvoda prikazane su u obliku p vrijednosti u tablici 39.

**Tablica 38.** Deskriptivna statistika pojavnosti mikotoksina s obzirom na vrstu proizvoda i godinu uzorkovanja

Mikotoksin	Godina	Vrsta proizvoda					
		Trajne kobasice			Suhomesnati proizvodi		
		n% / n	Sred.konc.±SD (Min.-maks.)	Med	n% / n	Sred.konc.±SD (Min.-maks.)	Med
AFB <sub>1</sub>	2020.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	2021.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	2020.- 2021.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
OTA	2020.	21/13	0,75 ± 0,49 (0,24 - 1,65)	0,70	4/2	1,67 ± 1,40 (0,68 - 2,66)	1,67
	2021.	6/5	1,08 ± 1,12 (0,36 ± 3,02)	0,51	8/4	1,51 ± 2,20 (0,27 - 4,81)	0,49
	2020.- 2021.	13/18	0,84±0,70	0,70	6/6	1,57 ± 1,82	0,66
CIT	2020.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	2021.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	2020.- 2021.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
STC	2020.	6/4	1,28 ± 1,78 (0,24 - 3,93)	0,48	7/4	0,23 ± 0,18 (0,12 - 0,49)	0,15
	2021.	4/3	0,11 ± 0,01 (0,10 - 0,12)	0,11	< LOD	< LOD	< LOD
	2020.- 2021.	5/7	0,78 ± 1,40	0,24	4/4	0,23 ± 0,18	0,15
CPA	2020.	11/7	10,26 ± 13,42 (0,21 - 39,25)	5,80	12/7	33,34 ± 40,67 (3,20 - 108,50)	12,80
	2021.	11/9	54,56 ± 106,15 (5,45 - 335,50)	19,75	22/11	23,60 ± 26,57 (4,20 - 44,25)	7,30
	2020.- 2021.	11/16	35,18 ± 81,22	9,95	17/18	22,11 ± 27,64	8,60

< LOD ispod limita detekcije; n% postotak uzoraka >LOD; n broj uzoraka > LOD; Sred.konc. srednja koncentracija uzoraka > LOD; SD standardna devijacija; Med medijan uzoraka > LOD

**Tablica 39.** Rezultati statističke obrade za koncentracije mikotoksina > LOD prema vrsti proizvoda i godini uzorkovanja

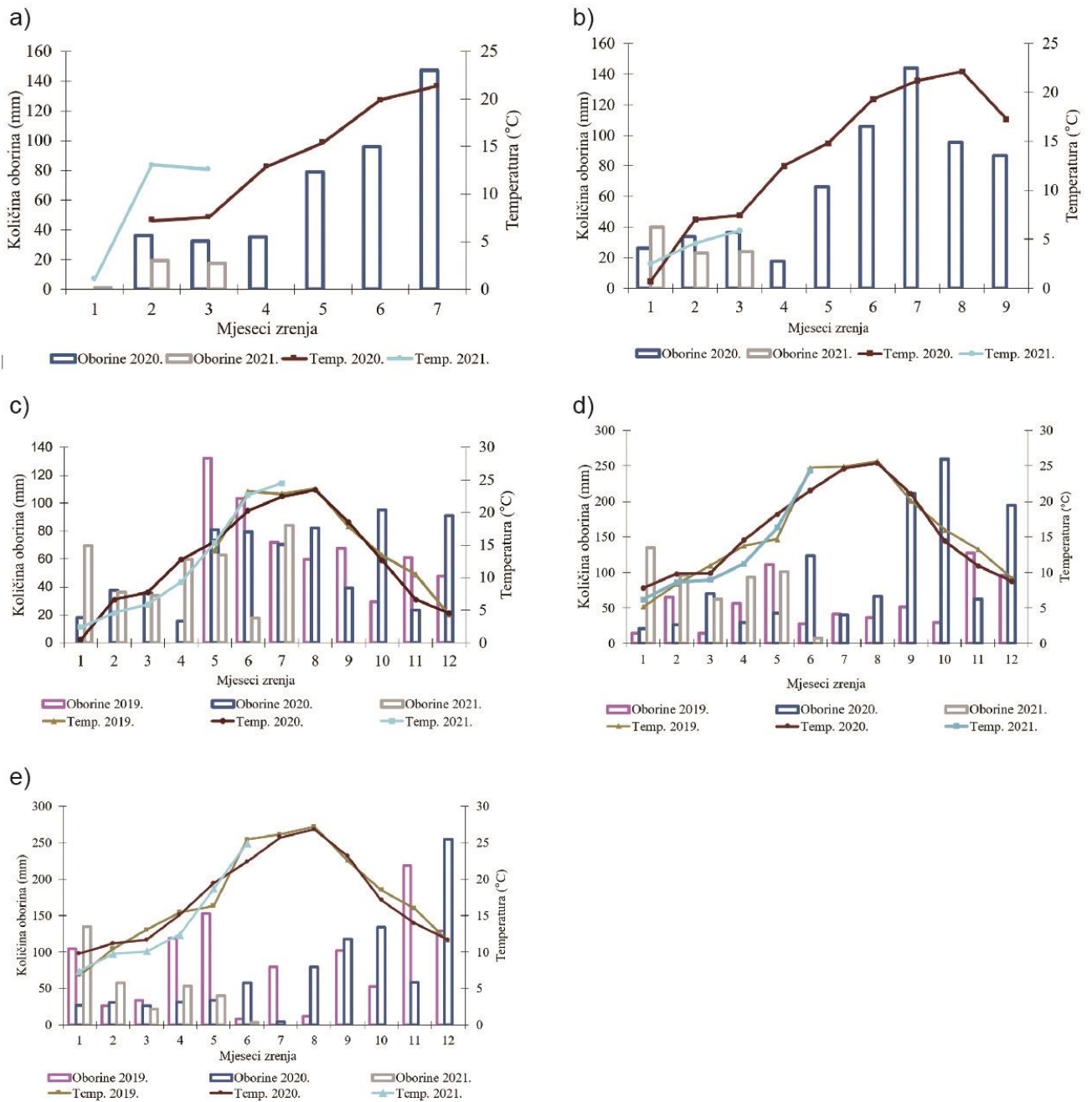
Grupacija za statističku obradu	OTA		STC		CPA	
	P vrijednost	Statistički test	P vrijednost	Statistički test	P vrijednost	Statistički test
Trajne kobasice	0,393	Mann-Whitney U	0,057	Mann-Whitney U	0,091	Mann-Whitney U
Trajni suhomesnati proizvodi	0,533	Mann-Whitney U	/	/	0,890	Mann-Whitney U
2020. god	0,070	Mann-Whitney U	0,114	Mann-Whitney U	0,456	Mann-Whitney U
2021. god	0,730	Mann-Whitney U	/	/	0,412	Mann-Whitney U

#### **4.8. Utjecaj geografsko-vremenskih čimbenika i tehnologije proizvodnje TMP na pojavnost površinskih plijesni i mikotoksina**

##### **4.8.1. Utjecaj geografsko-vremenskih čimbenika**

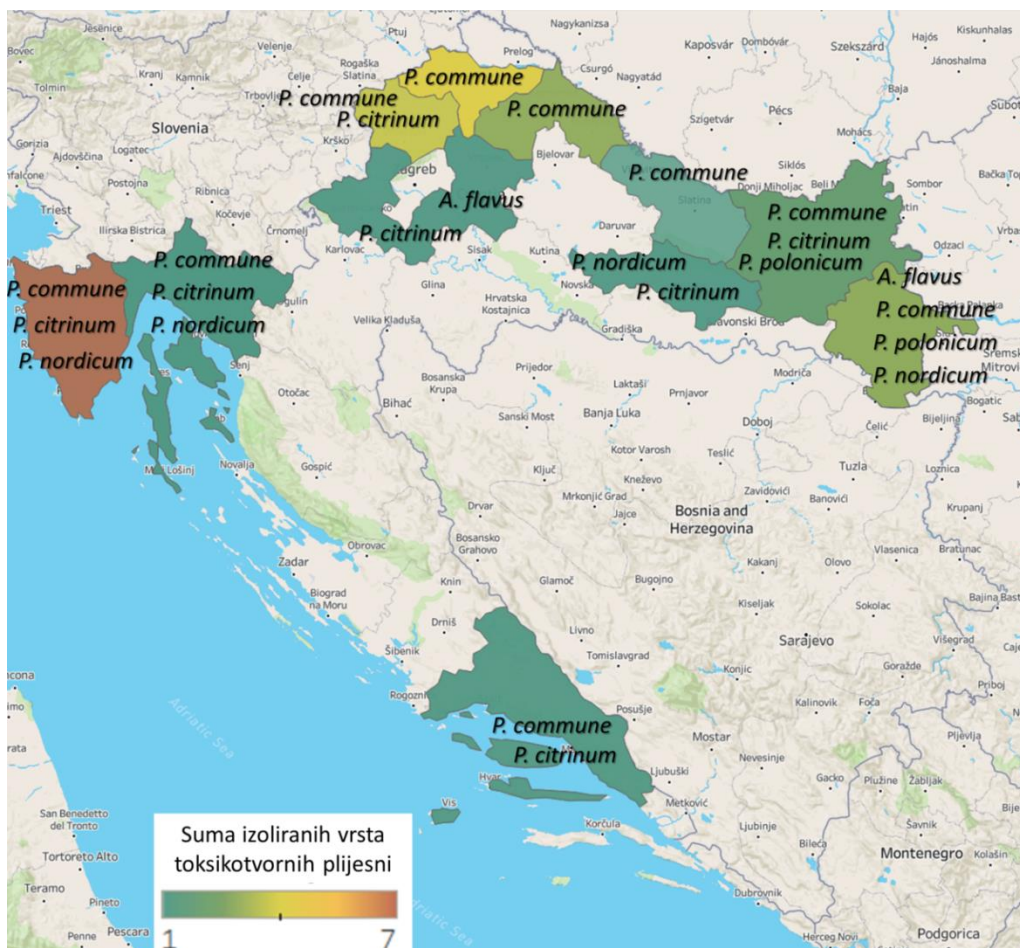
Srednje vrijednosti temperature i količine oborina tijekom zrenja proizvoda prema geografsko-vremenskim regijama Republike Hrvatske prikazane su na slici 54. Temperaturne i kišne mape Hrvatskog hidrometeorološkog zavoda za spomenuta relevantna vremenska razdoblja koja pokrivaju vrijeme zrenja proizvoda 2019., 2020. i 2021. godinu nalaze se u prilogu 2.





**Slika 54.** Srednje vrijednosti temperature i količine oborina u regijama Republike Hrvatske po mjesecima zrenja proizvoda uzorkovanih 2020. i 2021. godine: a) Središnja regija b) Sjeverna regija c) Istočna regija d) Zapadna regija e) Južna regija

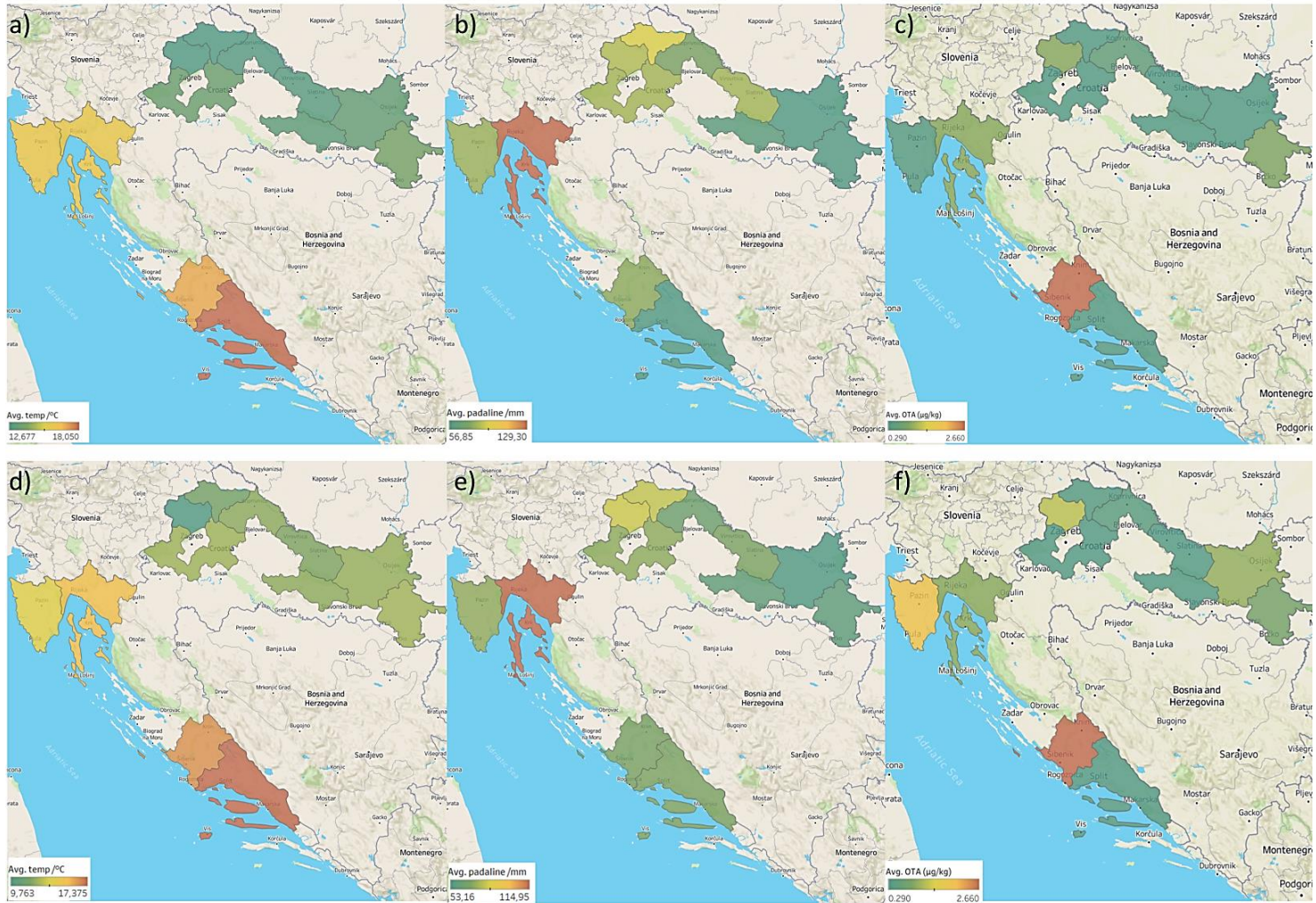
Na slici 55. su prikazani podaci o sumi izolata identificiranih vrsta toksikotvornih plijesni za obje godine uzorkovanja prema hrvatskim županijama odnosno regijama. Raspon suma izolata identificiranih toksikotvornih vrsta prikazan je pomoću boja od zelene do narančaste, a koje predstavljaju sume od niskih do visokih.



**Slika 55.** Kartografski prikaz pojavnosti toksikotvornih vrsta plijesni u tradicionalnim mesnim proizvodima tijekom obje godine uzorkovanja

Na temelju podataka o vremenskim čimbenicima tijekom zrenja TMP u regijama proizvodnje izrađeni su kartografski prikazi odnosa temperature i padalina te pojavnosti mikotoksina OTA, CPA i STC u analiziranim TMP uzorkovanim tijekom 2020. i 2021. godine (slike 56. – 58.). Raspon pronađenih koncentracija mikotoksina predstavljaju koncentracije od niskih do visokih, a prikazan je pomoću boja od zelene do narančaste.

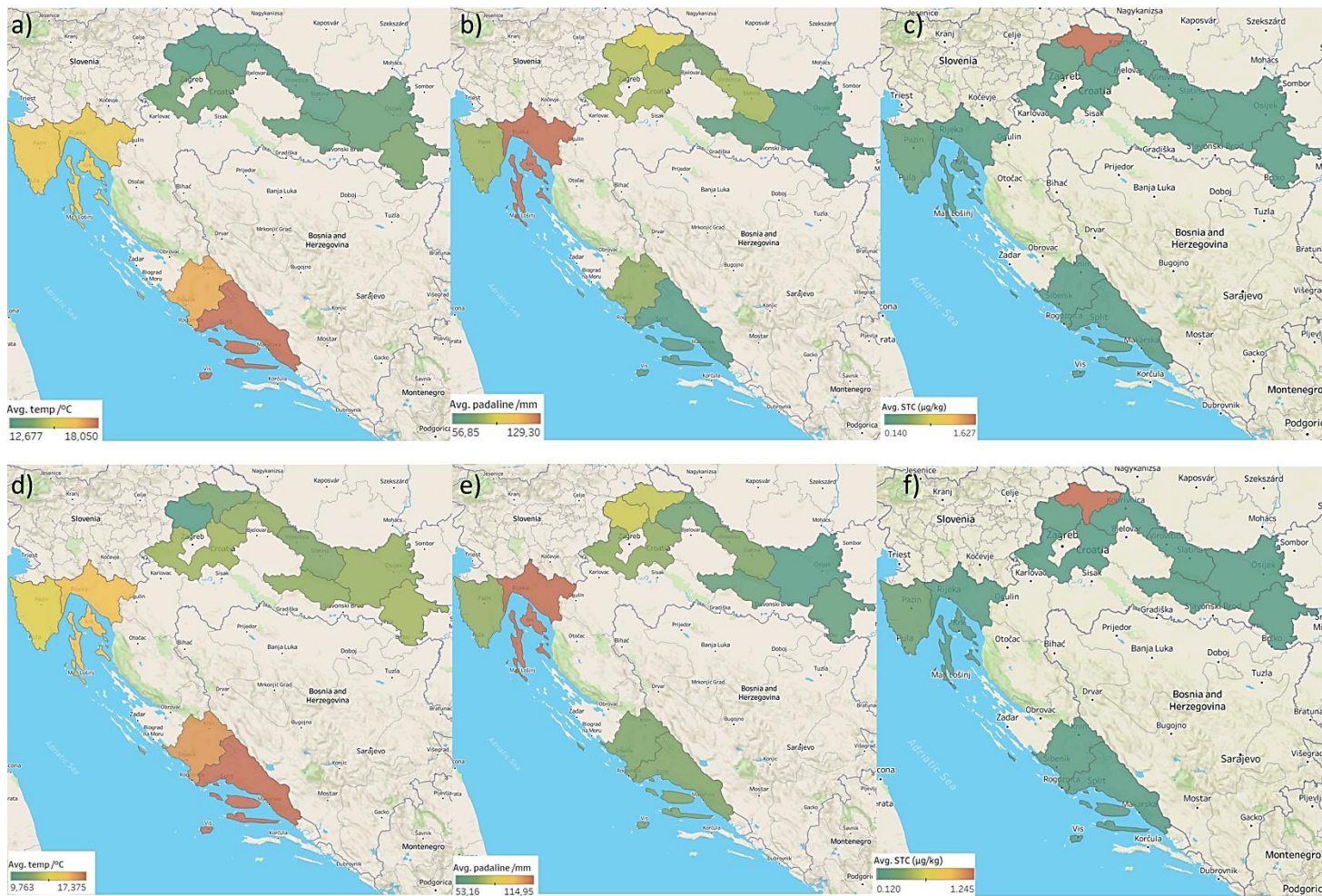




**Slika 56.** Kartografski prikazi vremenskih uvjeta i pojavnosti mikotoksina OTA u analiziranim uzorcima TMP:

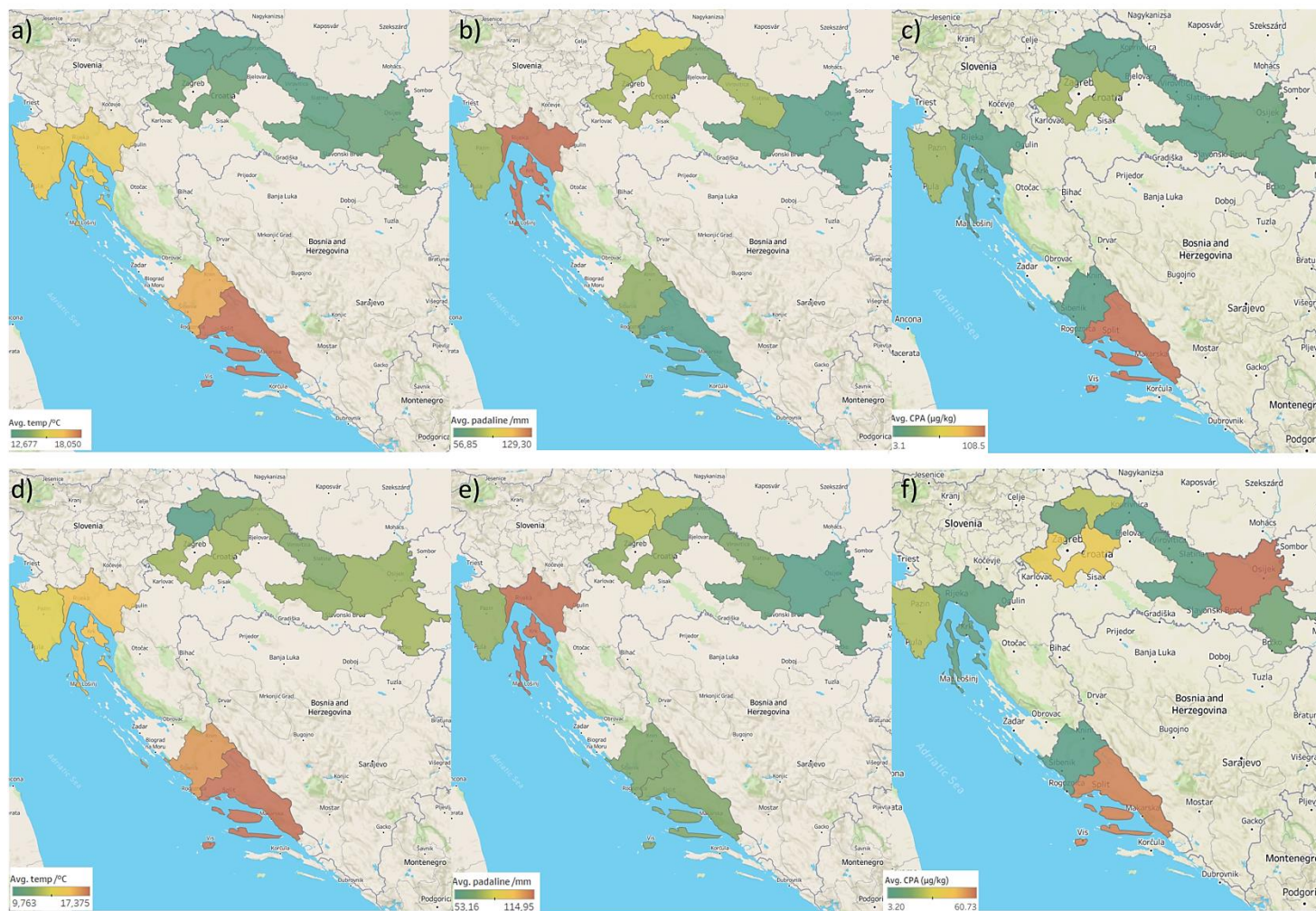
1. godina uzorkovanja (zrenje 2019. do prve polovice 2020.): a) temperaturne prilike, b) oborinske prilike, c) mapa pojavnosti
2. godina uzorkovanja (zrenje 2020. do prve polovice 2021.): d) temperaturne prilike, e) oborinske prilike, f) mapa pojavnosti





**Slika 57.** Kartografski prikazi vremenskih uvjeta i pojavnosti mikotoksina STC u analiziranim uzorcima TMP:

1. godina uzorkovanja (zrenje 2019. do prve polovice 2020.): a) temperaturne prilike, b) oborinske prilike, c) mapa pojavnosti
2. godina uzorkovanja (zrenje 2020. do prve polovice 2021.): d) temperaturne prilike, e) oborinske prilike, f) mapa pojavnost



**Slika 58.** Kartografski prikazi vremenskih uvjeta i pojavnosti mikotoksina CPA u analiziranim uzorcima TMP:

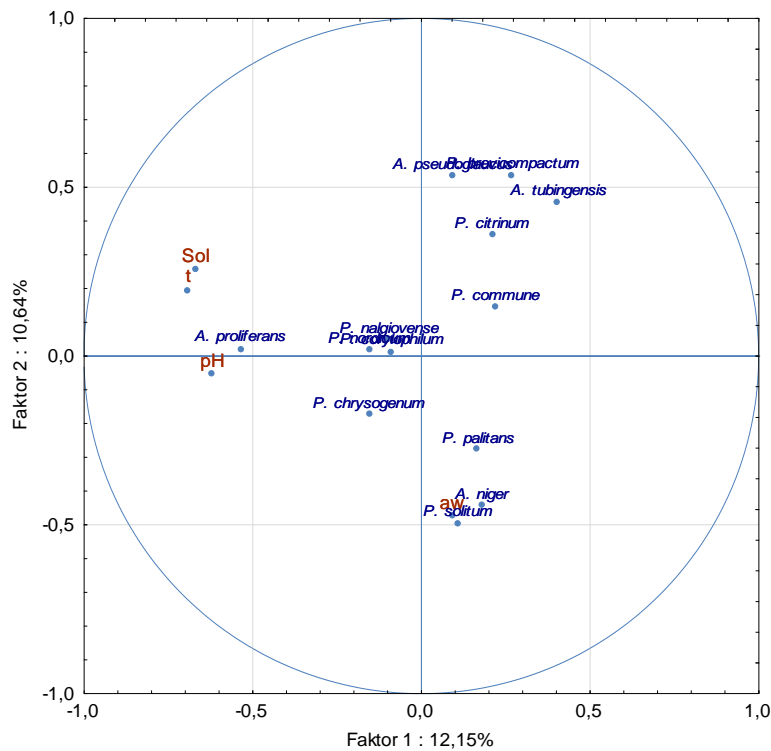
1. godina uzorkovanja (zrenje 2019. do prve polovice 2020.): a) temperaturne prilike, b) oborinske prilike, c) mapa pojavnosti
2. godina uzorkovanja (zrenje 2020. do prve polovice 2021.): d) temperaturne prilike, e) oborinske prilike, f) mapa pojavnosti



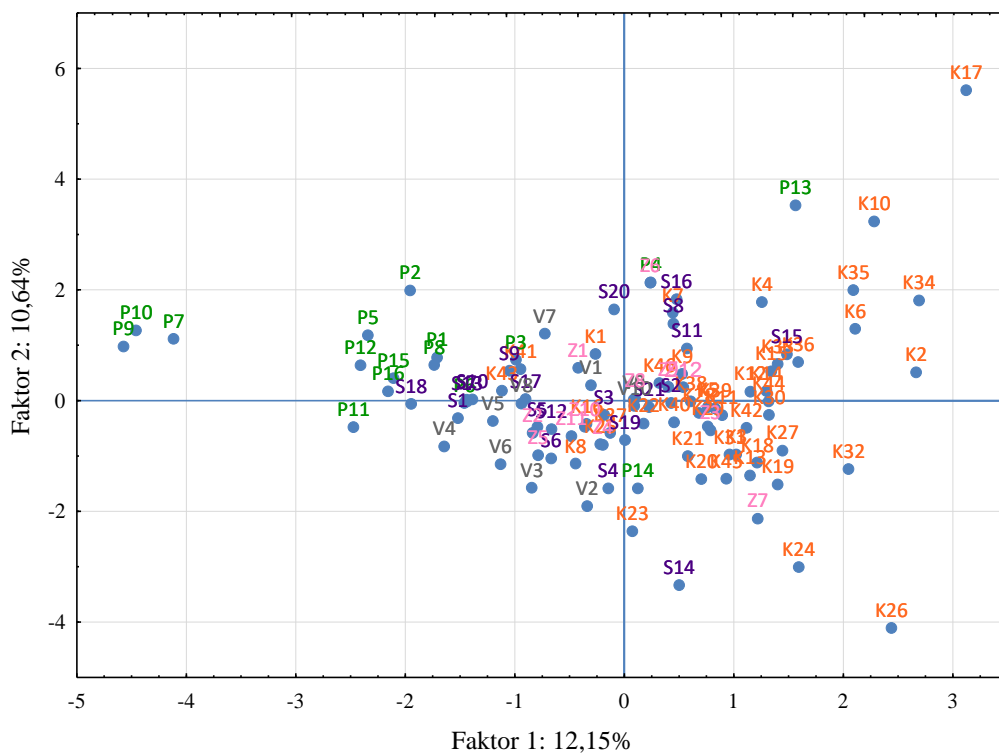
#### 4.8.2. Utjecaj tehnologije proizvodnje

Odnos vrste proizvoda, odnosno tehnologije proizvodnje i sastava površinske mikoflore prikazan je kroz analizu glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) za svaku godinu zasebno (slike 59. i 60.), pri čemu su parametri za vrstu proizvoda: vrijeme zrenja u mjesecima(t), pH i  $a_w$  proizvoda te udio soli (%) u gotovom proizvodu.

Odnos vrste proizvoda, odnosno, tehnologije proizvodnje i mikotoksina STC, CPA i OTA određenih u koncentracijama  $> LOD$  u uzorkovanim proizvodima prikazan je kroz PCA analizu za svaki mikotoksin posebno (slike 61. – 63.), pri čemu su parametri za vrstu proizvoda: vrijeme zrenja u mjesecima (t), pH i  $a_w$  proizvoda te udio soli (%) u gotovom proizvodu.



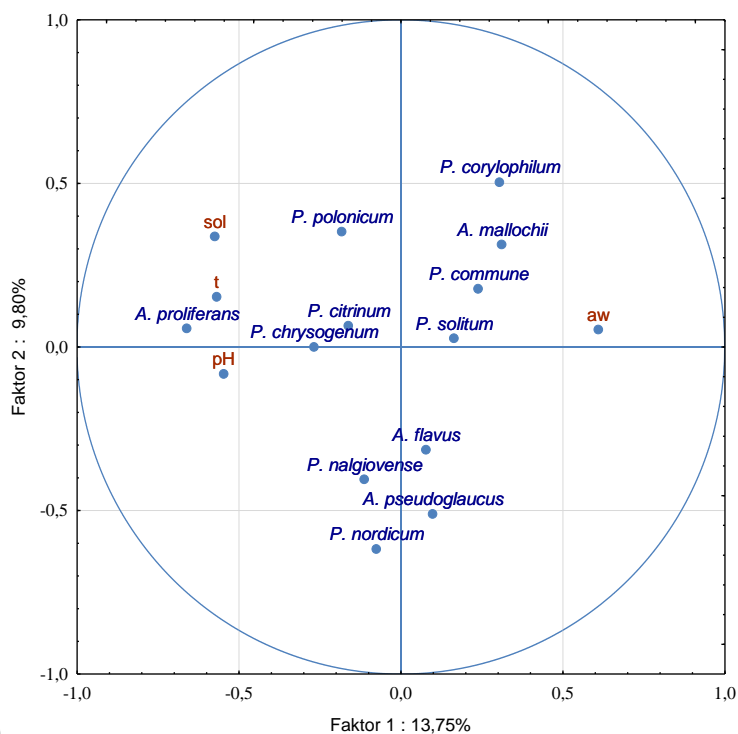
a)



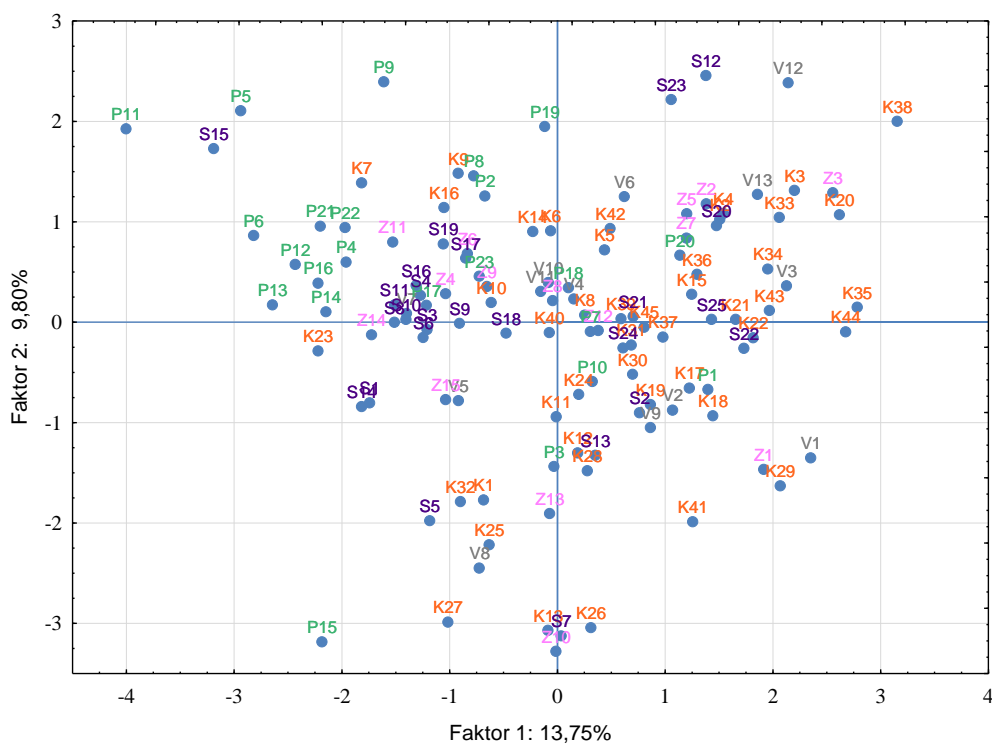
b)

K- kobasice/ kulenova seka; P- pršuti/šunka; V- vratina/buđola; S- slanina/panceta; Z- zagrebnjak/omobolo/kare

**Slika 59.** Analiza glavnih komponenti (PCA): a) prikaz varijabli (fizikalno-kemijski parametri, vrsta plijesni) b) prikaz uzoraka (vrste TMP) uzorkovanih 2020. godine na faktorsku ravninu PC1xPC2



a)

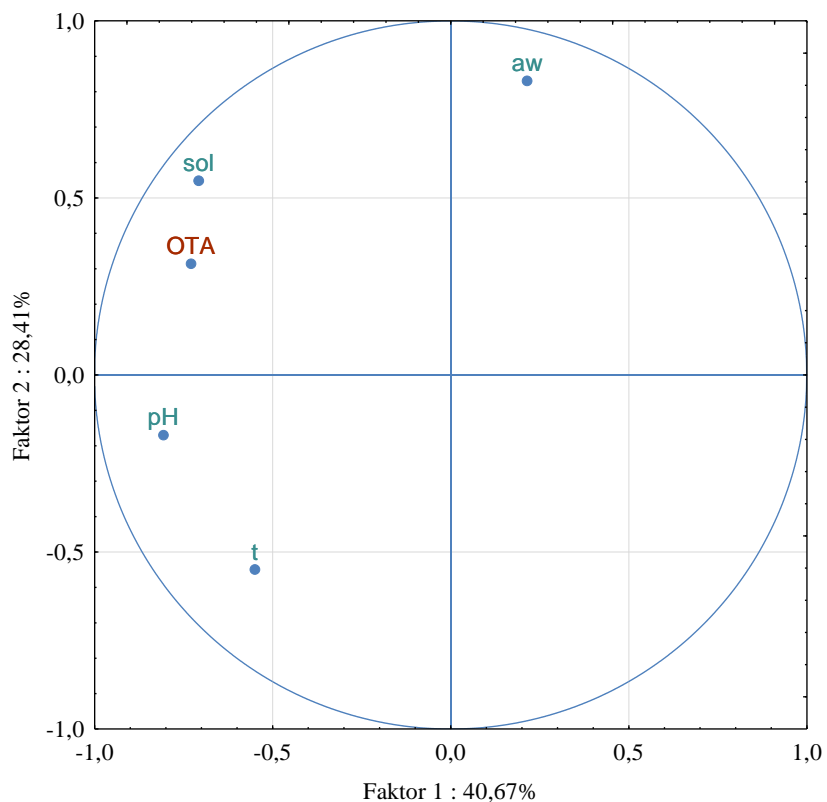


b)

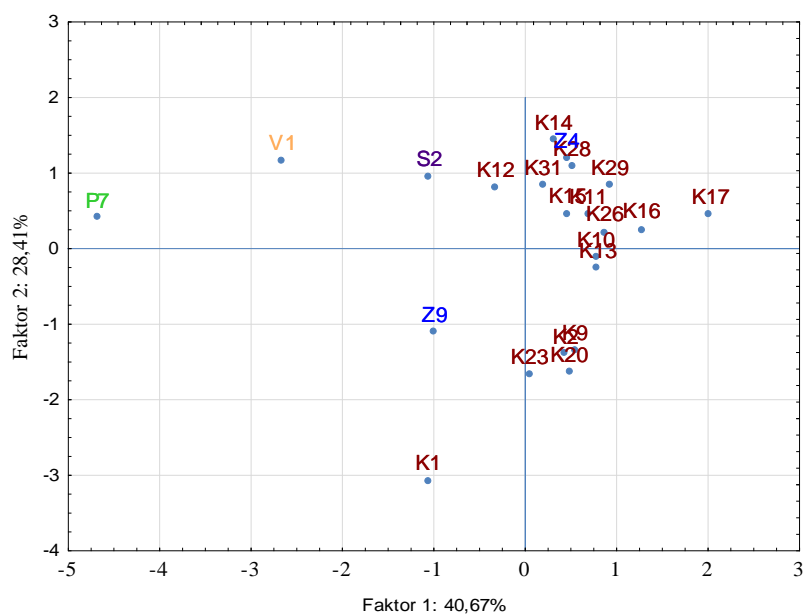
K- kobasice/ kulenova seka; P- pršuti/šunka; V- vratina/buđola; S- slanina/panceta; Z- zagrebniak/omobolo/kare

**Slika 60.** Analiza glavnih komponenti (PCA): a) prikaz varijabli (fizikalno-kemijski parametri, vrsta plijesni) b) prikaz uzoraka (vrste TMP) uzorkovanih 2021. godine na faktorsku ravninu PC1xPC2





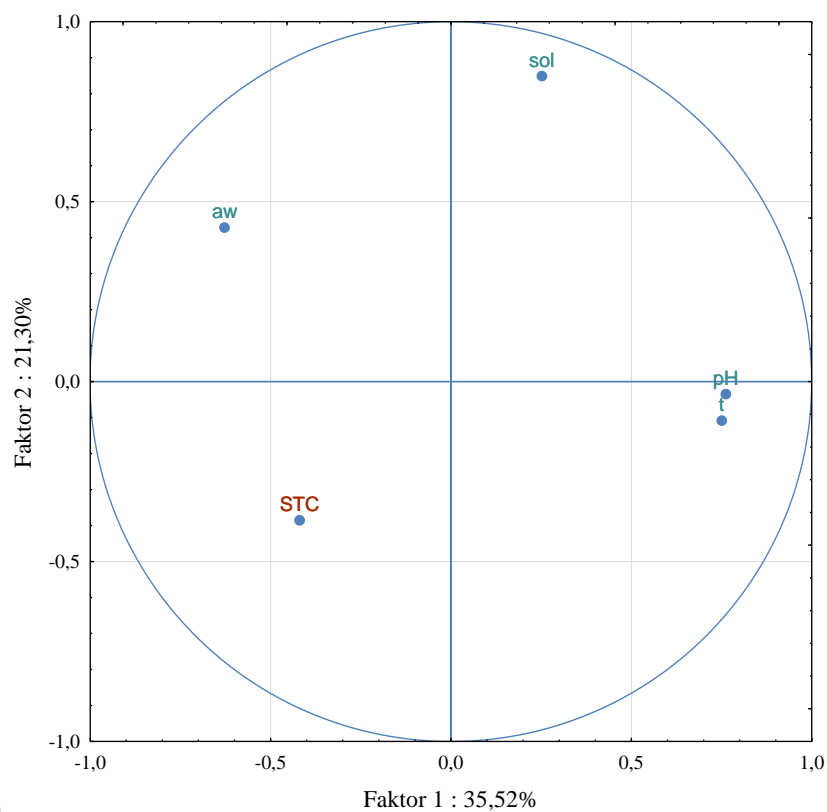
a)



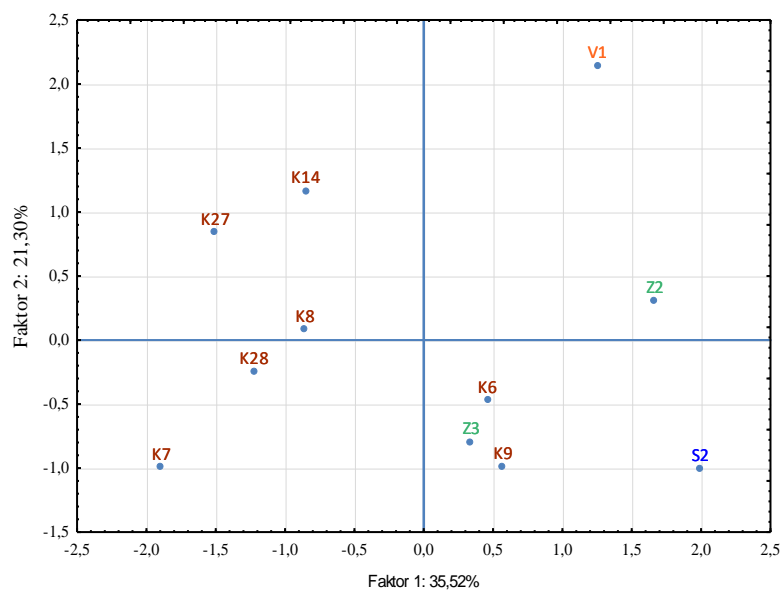
b)

K- kobasice/ kulenova seka; P- pršuti/šunka; V- vratina/budola; S- slanina/panceta; Z- zagrebniak/omobolo/kare

**Slika 61.** Analiza glavnih komponenti (PCA): a) prikaz varijabli (fizikalno-kemijski parametri, koncentracije OTA) b) prikaz uzoraka (vrste TMP) na faktorsku ravninu PC1xPC2



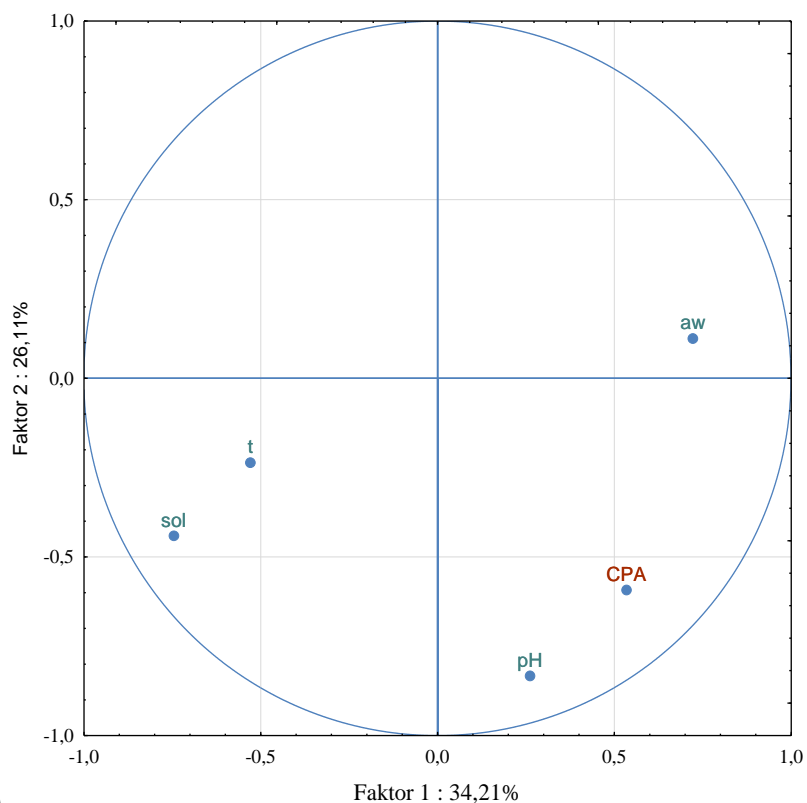
a)



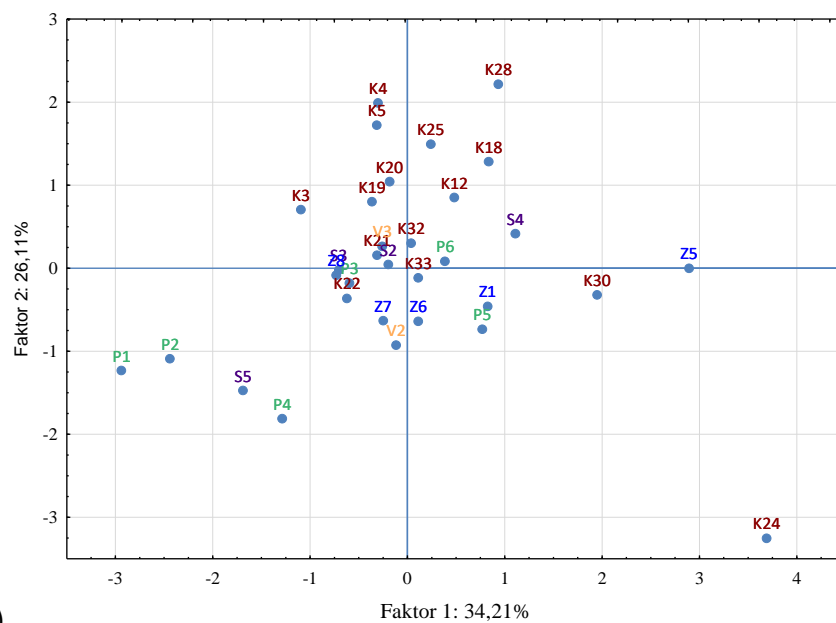
b)

K- kobasice/ kulenova seka; V- vratina/buđola; S- slanina/panceta; Z- zagrebnjak/omobolo/kare

**Slika 62.** Analiza glavnih komponenti (PCA): a) prikaz varijabli (fizikalno-kemijski parametri, koncentracije STC) b) prikaz uzoraka (vrste TMP) na faktorsku ravninu PC1xPC2



a)



b)

K-kobasice/kulenova seka; V-vratina/buđola; S-slanina/panceta; Z-zagrebnjak/omobolo/kare; P- pršuti/šunka

**Slika 63.** Analiza glavnih komponenti (PCA): a) prikaz varijabli (fizikalno-kemijski parametri, koncentracije CPA) b) prikaz uzoraka (vrste TMP) na faktorsku ravninu PC1xPC2

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. Fizikalno-kemijska svojstava TMP značajna za razvoj plijesni i proizvodnju mikotoksina

S obzirom da je razvoj plijesni, kao i proizvodnja mikotoksina, između ostalog, uvjetovana fizikalno-kemijskim svojstvima supstrata, uključujući udio soli,  $a_w$  i pH, ovi parametri su analitički i određeni u svim gotovim trajnim mesnim proizvodima iz ovog istraživanja (tablica 14.).

Tijekom fermentacije i zrenja trajnih mesnih proizvoda dolazi do smanjenja pH i  $a_w$  vrijednosti, što je neophodno za osiguranje stabilnosti i sigurnosti proizvoda (Kovačević, 2014). Dobivene srednje vrijednosti  $a_w$  nisu se značajno razlikovale s obzirom na vrstu proizvoda - trajne kobasice i trajne suhomesnate proizvode, kao ni za godinu uzorkovanja proizvoda (tablica 15.). Vrijednosti su bile manje od 0,84, što je na donjoj granici u usporedbi sa tradicionalnim trajnim mesnim proizvodima iz Hrvatske i drugih Mediteranskih zemalja 0,82 – 0,92 (Comi i sur., 2005; Rason i sur., 2007; Kovačević i sur., 2010; Elias i Carrascosa, 2010; Prado i sur., 2019). Prema Pravilniku o mesnim proizvodima (MP, 2018),  $a_w$  trajnih suhomesnatih proizvoda mora biti manji od 0,93 te su svi istraživani proizvodi zadovoljavali taj uvjet.

Dobivene srednje vrijednosti pH za sve analizirane proizvode u rasponu od 5,46 – 6,20 su općenito tipične za ove vrste mesnih proizvoda (pH 5,3 - 6,2) (Elias i i Carrascosa, 2010). Vrijednosti se nisu značajno razlikovale s obzirom na godinu uzorkovanja, ali postojala je značajna razlika između vrsta proizvoda, pri čemu su veće pH vrijednosti dobivene za suhomesnate proizvode u odnosu na kobasice (tablica 16.). Vrijednost pH predstavlja indikator fermentacije i zrenja mesnog proizvoda. Nakon procesa fermentacije i zrenja, kada se pH vrijednost kobasica smanjuje uslijed glikolizne aktivnosti mikroorganizama te nastanka mliječne kiseline, zbog proteolize i rasta kvasaca koji troše mliječnu kiselinu, pH vrijednost kobasica raste te u konačnom proizvodu biva slična početnim uvjetima (Kovačević, 2014). Isto tako, vrijednost pH pršuta/ šunki s početnih 5,4 – 5,8 se polako povećava do prosječnih  $\text{pH} \geq 6$  (Kovačević, 2017).

Dobivene prosječne pH vrijednosti kobasica su oko 5,5, dok su pH vrijednosti u literaturi za tradicionalne trajne kobasice iz Hrvatske i drugih Mediteranskih zemalja u rasponu od 5,1-6,3 (Comi i sur., 2005; Rason i sur., 2007; Kovačević i sur., 2010; Elias i Carrascosa, 2010; Prado i sur., 2019). Istraživanje Lešić i sur. (2020) na različitim vrstama hrvatskih trajnih kobasica pokazalo je da su pH vrijednosti slavonskih kobasica te kulenovih seka (5,2 - 5,3) niže, budući zriju duži period, u odnosu na različite vrste istarskih kobasica (5,9 – 6,3).

Dobiveni raspon pH vrijednosti suhomesnatih proizvoda od 6,05 - 6,20 prosječna je vrijednost svih vrsta suhomesnatih proizvoda: pršuta/šunki, slanine, vratine i sl. te je na gornjoj granici u usporedbi sa literaturnim podacima. pH vrijednosti pršuta i šunki iz različitih zemalja u literaturi su 5,7 - 6,2 (Kovačević, 2017), dok slanine, primjerice, 5,2 - 5,4 (Pleadin i sur., 2013b).

Što se tiče udjela soli u analiziranim mesnim proizvodima, rezultati također pokazuju značajnu razliku s obzirom na vrstu proizvoda (tablica 17.) i to značajno veći udio soli u suhomesnatim proizvodima (5,52 – 5,59 %) u odnosu na trajne kobasice (3,73 – 4,18 %) (tablica 14.). Prethodno navedeno je u skladu sa literaturnim podacima, u kojima je prosječni udio soli u kobasicama 3 - 6 % (Bogdanović i sur., 2016), a pršutima 6 - 9 % (Marušić i sur., 2011; Marušić Radovčić i sur., 2016; Bogdanović i sur., 2016; Kovačević, 2017). Također, rezultati analize autora Pleadin i sur. (2015d) pokazali su najveći udio soli u suhomesnatim proizvodima ( $6,16 \pm 0,68$  %), zatim u slanini ( $5,30 \pm 0,71$  %) te najmanji u trajnim kobasicama ( $4,20 \pm 0,60$  %). U istraživanju Lešić i sur. (2020) udio soli na različitim vrstama trajnih hrvatskih kobasica bio je 3,4 - 3,6 % te se nije značajno razlikovao s obzirom na vrstu kobasica. Zaštićeni pršuti, poput Istarskog i Dalmatinskog, imaju najveći dopušteni udio soli od 8 %, odnosno, 7,5 % (MP, 2014d; 2015a). Dobivena prosječna vrijednost za trajne suhomesnate proizvode u ovom istraživanju, uključujući zaštićene pršute, iznosila je 5,55 %. S obzirom na godinu uzorkovanja i proizvodnje mesnih proizvoda, u udjelu soli, kao ni po pitanju prethodnih parametara nije bilo značajne razlike.

## **5.2. Identificirane plijesni s površine TMP**

S površine 250 analiziranih uzoraka TMP, ukupno je izolirano 535 izolata i identificirano 38 vrsta plijesni, od čega značajno više izolata ( $p < 0,05$ ), i to 317 sa 130 uzoraka iz 2021. godine u odnosu na 218 izolata sa 120 uzoraka iz 2020. godine (tablica 18.). Ujedno, za obje godine je identificiran podjednak broj vrsta plijesni, točnije, 26 vrsta iz 2020. godine te 27 vrsta iz 2021. godine. Brojevi izolata i vrsta plijesni iz drugih istraživanja na trajnim mesnim proizvodima bili su primjerice: 79 uzoraka sa 196 izolata i 17 vrsta (Vila i sur., 2019), 128 uzoraka sa 630 izolata i 22 vrste (Rodrigues i sur., 2019), 57 uzoraka sa 95 izolata i 10 vrsta (Canel i sur., 2013) te 160 uzoraka sa 595 izolata i 25 vrsta (Zadravec i sur., 2020). Prosječan broj izolata po uzorku kretao se od 2 - 5, a u ovom istraživanju iznosi 2.

Od ukupnog broja izoliranih vrsta, podjednak broj vrsta, njih 18, bio je roda *Penicillium*, a 20 roda *Aspergillus*. Od ukupnog broja izolata, značajno veći broj izolata ( $p < 0,05$ ), njih 327 (61

%), bio je roda *Penicillium*, a 208 (39 %) roda *Aspergillus* (tablica 18.). Od toga je, prema godinama (2020./2021.), postotak izolata roda *Penicillium* iznosio 67 %, odnosno 57 % za 2020. te 2021. godinu, a roda *Aspergillus* 33 %, odnosno 43 % (zbroy tablica 19. – 23.). Dominantnost roda *Penicillium* je u skladu sa ranijim istraživanjima na trajnim mesnim proizvodima, posebice na trajnim kobasicama i u skladu je sa činjenicom da je većina *Penicillium* vrsta psihrotolerantana i psihrofilna te se veći dio zrenja ovih proizvoda odvija tijekom zimskih mjeseci (Asefa i sur., 2009; Rodrigues i sur., 2019; Vila i sur., 2019; Zdravec i sur., 2020). Alapont i sur. (2014) pokazali su kako je rod *Penicillium* dominantan u uzorcima mesnih proizvoda uzetih iz komora za zrenje, ukazujući da je unutarnji zrak jedan od važnijih izvora kontaminacije.

Od ukupno 18 *Penicillium* vrsta, na slici 27. prikazano je njih 11 čiji je postotak izolacije veći od 1 %. Gledajući obje godine uzorkovanja, *P. commune* (14 %), *P. solitum* (10 %), *P. citrinum* (9 %) i *P. nalgiovense* (7 %) su bile najzastupljenije vrste. S nešto većim postotkom izolacije tu su još i *P. corylophilum* (6 %) i *P. chrysogenum* (4 %). *P. commune* i *P. solitum* su blisko vezane i često dominantne vrste izolirane iz trajnih mesnih proizvoda (Pitt i Hocking, 2009). Ranija istraživanja pokazuju da u većini slučajeva, *P. commune* i *P. solitum* uvelike predstavljaju površinsku mikofloru trajnih mesnih proizvoda, posebice kobasica, odmah uz *P. nalgiovense* te *P. chrysogenum* (Papagianni i sur., 2007; Alapont i sur., 2014; Vila i sur., 2019; Zdravec i sur., 2020). *P. nalgiovense*, *P. solitum* i *P. chrysogenum* navode se kao komercijalne starter kulture budući su predstavljene kao one sa blagotvornim učinkom u hrani (Bourdichon i sur., 2012). *P. citrinum* se općenito smatra jednom od najčešćih vrsta plijesni na zemlji budući dok su konidiospore citrinina najčešće nađene spore u zraku. Sposobnost *P. citrinum* da raste pri  $a_w$  manjem od 0,80 te temperaturama od 5 °C osigurava ovoj vrsti nišu u širokom rasponu staništa (Geisen i sur., 2018).

Od ukupno 20 *Aspergillus* vrsta, na slici 27. prikazano je njih 9 s najvećim brojem izolata. Gledajući obje godine uzorkovanja, dominantna vrsta bila je *A. proliferans* (20 %) sa značajno većim brojem izolata u odnosu na druge *Aspergillus* vrste, primjerice *A. pseudoglaucus* (4 %), koja je iduća po zastupljenosti *Aspergillus* vrsta. Visoka prevalencija *A. proliferans* (te *A. pseudoglaucus*) može se objasniti činjenicom da askospore *Aspergillus* telemorfa mogu preživjeti širok raspon temperatura (4 – 43 °C), te vrlo niske  $a_w$  vrijednosti (0,71) do 120 dana (Pitt i Hocking, 2009). *A. pseudoglaucus* te *A. proliferans* bile su dominantne među *Aspergillus* vrstama i u drugim istraživanjima na različitim vrstama hrvatskih trajnih mesnih proizvoda (Lešić i sur., 2020; Zdravec i sur., 2020; Lešić i sur., 2021a).

*Box-plot* dijagram broja izolata plijesni prema identificiranim vrstama za svaku godinu uzorkovanja posebno je prikazan na slici 28. Za uzorke iz 2020. godine najveći broj izolata je određen za vrste *A. proliferans* te *P. citrinum*, a 2021. godine *A. proliferans* u još puno većem broju izolata u odnosu na prethodnu godinu te dodatno *P. commune* i *P. solitum*.

Dominante vrste plijesni pronađene na trajnim mesnim proizvodima iz drugih zemalja, poput Španjolske, Italije, Norveške, Slovenije, Argentine i Portugala, bile su u skladu s rezultatima ovog istraživanja za *Penicillium* vrste te su podrazumijevale *P. commune*, *P. chrysogenum*, *P. nalgiovense*, *P. solitum*, ali i *P. nordicum* i *P. milanense*, dok su dominantne *Aspergillus* vrste bile *A. fumigatus*, *A. flavus* i *A. proliferans* (Núñez i sur., 1996; Asefa i sur., 2009; Sonjak i sur., 2011; Comi i sur., 2013; Alapont i sur., 2014; Vila i sur., 2019; Rodrigues i sur., 2019). Rodrigues i sur. (2019) su uočili trend rasta *Aspergillus* vrsta pri kojem je duži proces zrenja dovodio do redukcije rasta manje kserofilnih vrsta poput *A. flavus* te većeg rasta onih kserofilniji vrsta kao što su *A. proliferans* i *A. pseudoglaucus*, a koje su se pokazale dominantne u ovom istraživanju. Razlike u vrstama ili broju izolata plijesni mogu se pripisati različitom okolišu komora za zrenje s kojih spore plijesni većinom dolaze te uvjetima zrenja u tim komorama, budući da domaći trajni mesni proizvodi većinom zriju u nekontroliranim uvjetima (Alapont i sur., 2014).

### **5.2.1. Identificirane vrste površinskih plijesni prema geografsko-vremenskoj regiji proizvodnje i utjecaj geografsko-vremenskih čimbenika na pojavnost površinskih plijesni**

Okolišni uvjeti zajedno sa sezonskom proizvodnjom TMP utječu na rast površinskih plijesni te su one karakteristične za područje proizvodnje. Stoga su u tablicama 18. – 23. prikazane identificirane vrste plijesni prema geografsko-vremenskim regijama proizvodnje u Republici Hrvatskoj: središnjoj, istočnoj, sjevernoj, zapadnoj i južnoj. Okolišni parametri tehnološke proizvodnje, koji utječu na prevalenciju površinskih plijesni, uključuju trajanje procesa zrenja, regionalne okolišne klimatske uvjete, kao što su temperatura, količina padalina i RH zraka, te imaju posebno značajan utjecaj u proizvodnji u domaćinstvima, gdje ti parametri većinom nisu kontrolirani te su jako podložni utjecaju sezone (Comi i sur., 2004; Asefa i sur., 2010).

Što se tiče broja izolata plijesni, značajna razlika među regijama nije utvrđena, kao niti među godinama proizvodnje za svaku regiju posebno (tablica 24.). Broj izolata dvaju različitih rodova plijesni *Aspergillus* i *Penicillium* također se nije značajno razlikovao među regijama. Međutim, razlika u identificiranim i dominantnim vrstama među regijama postoji. U



središnjoj regiji ukupno je identificirano najmanji broj vrsta s obzirom na najmanji broj uzorkovanih proizvoda u odnosu na druge regije - 15, od toga 8 *Penicillium* i 7 *Aspergillus*, zatim u južnoj regiji 18 vrsta (11 *Penicillium* i 7 *Aspergillus*), a u istočnoj, sjevernoj i zapadnoj regiji identificiran je podjednak broj vrsta - 22 (12 *Penicillium* i 10 *Aspergillus*), 23 (11 *Penicillium* i 12 *Aspergillus*) te 22 (13 *Penicillium* i 9 *Aspergillus*).

Južna regija je jedina regija koja ima veći broj *Aspergillus* izolata (72) u odnosu na *Penicillium* (59), iako ne značajno, te je najdominantnija plijesan roda *Aspergillus* - *A. proliferans* sa Fr čak 84 %, a potom slijede *P. commune* (Fr 28 %) i *P. citrinum* (Fr 21 %). U ostalim regijama najdominantnije su bile vrste roda *Penicillium*: *P. citrinum* (58 %) u središnjoj, *P. commune* u istočnoj (Fr 52 %) i sjevernoj (Fr 27 %) te *P. nalgiovense* u zapadnoj regiji (Fr 48 %), poslije kojih je kao druga najdominantnija vrsta slijedila *A. proliferans* (Fr 18 - 46 %). U Sjevernoj regiji kao dominantnija je određena još jedna *Aspergillus* vrsta - *A. pseudoglaucus* (Fr 16 %), dok su u ostalim regijama bile zastupljene *P. solitum* (Fr 25 - 29 %), *P. commune* (Fr 25 - 29 %) i *P. citrinum* (Fr 21 - 29 %).

Općenito manji broj izolata određen u 2020. godini u odnosu na 2021. za svaku regiju posebno, iako ne značajno, odnosi se na istočnu, južnu i zapadnu regiju, koje su imale 2 - 3 puta manje *Aspergillus* izolata, ali i vrsta, u proizvodima iz 2020. u odnosu na 2021. godinu. Sjeverna regija je za obje godine uzorkovanja imala podjednak broj izolata i vrsta.

Geografske hrvatske regije se klimatski i vremenski razlikuju te su srednje vrijednosti temperature i količine oborina po mjesecima u kojima su proizvodi zri prikazane na slici 54. Zapadna regija- Istarski poluotok ima umjerenu sredozemnu klimu sa toplim i suhim ljetima, te blagim i ugodnim zimama, s rijetkom pojavom snijega. Godišnji prosjek temperatura zraka duž sjevernog dijela obale iznosi oko 14 °C. Siječanj je najhladniji mjesec sa srednjom temperaturom uglavnom oko 6 °C, a srpanj i kolovoz najtopliji, sa srednjom temperaturom oko 24 °C. Količina padalina povećava se od zapadne obale prema unutrašnjosti (MP, 2014d). Južna regija – područje Dalmacije obuhvaća najveći dio hrvatskog primorja duž Jadranskog mora. Klima je sredozemna s toplim i suhim ljetima, često uspoređenim sa tropskim i subtropskim područjima, te blagim i vlažnim zimama. U najtoplijim mjesecima, dnevna se temperatura često podiže iznad 35 °C, dok se i u najhladnijim mjesecima održava iznad 4 °C (MP, 2015a). Područje istočne Hrvatske - Slavonije i Baranje, ima klimu sličnu središnjoj i zapadnoj, umjereno kontinentalnu s hladnim zimama i toplim ljetima. Uobičajene niske temperature u istočnoj Hrvatskoj tijekom zimskih mjeseci osiguravaju dobre prirodne uvjete za procese prerade mesa. Primjerice, prosječna srednja temperatura zraka na području Slavonije od studenog do ožujka kreće se između 0,2 i 6,9 °C (MP, 2014a).

Period zrenja svih uzorkovanih proizvoda obuhvaća razdoblje od siječnja 2019. do lipnja 2021. godine. Godišnje srednje temperature zraka i količina oborina za godine u kojima su proizvodi zriili (2019., 2020. i 2021.) dane su kao prilog 2. Proizvodi iz istočne, zapadne i južne regije uključuju dugozrijuće proizvode poput kulena, šunke i pršuta. Središnja i sjeverna regija tradicionalno ne proizvode takve dugozrijuće proizvode, nego većinom kobasice, slaninu ili vratinu čiji je period zrenja kraći.

Iz slike 54. vidljivo je da južna i zapadna regija imaju veće temperature u odnosu na druge regije i tijekom zimskih i ljetnih mjeseci. Veći broj *Aspergillus* izolata nego *Penicillium*, iako ne značajno, u južnoj regiji može se pripisati upravo višim temperaturama i suhoj klimi često sličnoj onoj u tropskim područjima koje *Aspergillus* vrste preferiraju, a čije spore također imaju veću otpornost na suhi zrak i visoke temperature, dok su za *Penicillium* vrste optimalnije niže okolišne temperature (Pitt i Hocking, 2009; Comi i sur., 2004). Unatoč tome što zapadna regija ima veće temperature kao i južna, u odnosu na druge regije, zapadna regija također ima prosječnu najveću količinu padalina tijekom zrenja proizvoda (78 mm) u odnosu na ostale regije (46 - 67 mm), što manje pogoduje rastu *Aspergillus* vrsta. Ono po čemu je zapadna regija još specifična je to da proizvodi tijekom zrenja ne prolaze proces dimljenja, za kojeg je poznato da može utjecati na površinsku mikofloru u smislu redukcije određenih vrsta plijesni te je takav trend i zamijećen za *P. solitum* i *P. commune* u dimljenim proizvodima (Asefa i sur., 2009). Isto je utvrđeno i u istraživanju Zadravec i sur. (2020), budući da se pokazala veća raznolikost i broj izolata *Aspergillus* vrsta na mesnom proizvodu iz južne regije u odnosu na proizvode iz istočne i zapadne regije. Značajno manji broj izolata u 2020. godini u odnosu na 2021. godinu, kao posljedica manjeg broja *Aspergillus* izolata u zapadnoj, južnoj te istočnoj regiji, može se ponovno objasniti činjenicom da je 2019. godina, u kojoj su dugozrijući proizvodi iz prve faze uzorkovanja iz tih regija zriili, okarakterizirana kao kišna u odnosu na 2020. te 2021. godinu, što manje pogoduje rastu *Aspergillus* vrsta. Broj izolata se također nije značajno razlikovao u istraživanju vrsta kobasica iz različitih regija Hrvatske (Lešić i sur., 2020), dok su se u drugom istraživanju različitih vrsta trajnih mesnih proizvoda, proizvodi iz zapadne Hrvatske razlikovali od onih u istočnoj (Zadravec i sur., 2020).

Kartografski prikaz pojavnosti toksikotvornih plijesni u TMP tijekom obje godine uzorkovanja prema hrvatskim županijama je na slici 55. Najveću sumu izoliranih toksikotvornih vrsta plijesni imala je zapadna regija, zatim sjeverna, dok je najveća raznolikost toksikotvornih vrsta plijesni bila u zapadnoj i istočnoj regiji.

### 5.2.2. Identificirane vrste površinskih plijesni prema vrsti trajnih proizvoda - tehnologiji proizvodnje i utjecaj tehnologije proizvodnje na pojavnost površinskih plijesni

Uz nabrojane okolišne čimbenike, na prisutnost plijesni na površini trajnih mesnih proizvoda utječe i vrsta proizvoda, odnosno i fizikalno-kemijska svojstva proizvoda kao što su  $a_w$ , pH, udio soli te trajanje zrenja (Comi i sur., 2004; Asefa i sur., 2010). Svaka plijesni ima svoj optimalni  $a_w$ , kao i raspon potreban za rast (Pitt i Hocking, 2009). Vrijednost  $a_w$  snižavaju tvari topljive u vodi, kao što je sol (NaCl), a s obzirom na osmotski tlak koji nastaje otapanjem soli u mesnim proizvodima vrste plijesni koje rastu na njima su halofilne ili halotolerantne (Živković, 1986). Optimum pH za rast plijesni je oko 5, ali mogu rasti u širokom rasponu vrijednosti (Duraković i Duraković, 2003). Vrijeme zrenja također utječe na vrstu plijesni koje će biti dominantne, pri čemu proizvodi koji se proizvode s dužim razdobljem zrenja uobičajeno zriju i tijekom toplijih razdoblja.

U tablicama 25. – 26. prikazane su identificirane vrste plijesni prema vrsti trajnih proizvoda (kobasice i suhomesnati proizvodi) te godini uzorkovanja. Što se tiče broja izolata plijesni, utvrđena je značajna razlika među vrstama proizvoda te je broj izolata veći u trajnim suhomesnatim proizvodima u odnosu na trajne kobasice ( $p < 0,05$ ), dok značajna razlika među godinama uzorkovanja za svaku vrstu proizvoda posebno nije utvrđena (tablica 27.). Na ukupno 107 uzoraka trajnih kobasica izolirano je 213 izolata, a na ukupno 143 uzorka trajnih suhomesnatih proizvoda izolirano je 324 izolata te je prosječan broj izolata po uzorku za trajne kobasice, ali i suhomesnate proizvode, iznosio 2.

Podjednak broj vrsta identificiran je i na kobasicama i na trajnim suhomesnatim proizvodima: 30, odnosno, 33. Od toga je jednak broj *Aspergillus* vrsta, točnije 16, identificirano i na kobasicama i suhomesnatim proizvodima te 14 *Penicillium* vrsta na kobasicama, a 17 na suhomesnatim proizvodima. Najdominatnije vrste na kobasicama s obzirom na broj uzoraka bile su redom *P. commune* (33 %), *A. proliferans* (28 %) te *P. solitum* (24 %). Od *Aspergillus* vrsta među zastupljenijima su bile *A. flavus* (9%), *A. tubingensis* (9 %) te *A. pseudoglaucus* (9 %), a od *Penicillium* su *P. citrinum* (16 %), *P. corylophilum* (9 %), *P. nalgiovense* (8 %) i *P. palitans* (8 %). Najdominatnije vrste na trajnim suhomesnatim proizvodima bile su redom *A. proliferans* (52 %), ujedno sa najvećom Fr određenom za vrstu plijesni u ovom istraživanju, zatim *P. commune* (29 %) te *P. citrinum* (22 %). Od *Penicillium* vrsta, među zastupljenijima bile su jos *P. nalgiovense* (19 %), *P. solitum* (18 %), *P. corylophilum* (14 %) te *P. chrysogenum* (13 %), a od *Aspergillus* vrsta *A. pseudoglaucus* (9 %).

Dominante vrste na suhomesnatim proizvodima su imale općenito veću Fr nego kod kobasica, što je povezano sa određenim i većim brojem izolata. Značajno veći postotak izolata u pršutima kao trajnim mesnim proizvodima u odnosu na trajne kobasice određen je i u istraživanju Zadavec i sur. (2020), sa ujedno i većom raznolikošću vrsta, dok je u ovom istraživanju broj vrsta bio podjednak. Aktivitet vode koji se nije razlikovao među skupinama proizvoda, te je bio u oba slučaja 0,84, može ići u prilog podjednakom broju vrsta određenom za obje skupine proizvoda. Poznato je da *Penicillium* vrste preferiraju  $a_w < 0,80$ , a *Aspergillus* vrste  $a_w < 0,90$  (Pitt i Hocking, 20002). U radu Zadavec i sur. (2020), veći broj izolata tumačio se trajanjem zrenja pršuta pri temperaturama optimalnim za rast plijesni (oko 20 °C), budući da zriju i tijekom toplijih perioda, a samo trajanje zrenja daje plijesnima veću mogućnost za obrastanje površine.

Istraživanje utjecaja pH na rast nekih toksikotvornih *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta pokazalo je da su sve ispitivane vrste mogle rasti u širokom rasponu ispitivanog pH od 2 do 11. Međutim, općenito, *Aspergillus* vrste bile su više tolerantne na lužnatiji pH, dok su *Penicillium* vrste bile tolerantnije na kiseliji pH (Wheeler i sur., 1991), što se može dovesti u vezu s činjenicom da su određene pH vrijednosti iz ovog istraživanja značajno veće kod suhomesnatih proizvoda ( $6,13 \pm 0,36$ ) u odnosu na trajne kobasice ( $5,52 \pm 0,49$ ).

Općenito, dominantnost *P. commune*, *P. solitum*, *P. nalgiovense* i *P. citrinum* u trajnim mesnim proizvodima može se objasniti i tolerancijom na visoku razinu soli koju ovakve vrste proizvoda imaju (Danilović i Savić, 2017), pogotovo u slučaju trajnih suhomesnatih proizvoda koji imaju značajno veći udio soli u odnosu na kobasice. Kada se usporedi pojavnost vrsta prema skupinama proizvoda, kod kobasica se više *Aspergillus* vrsta pojavljuje s podjednakom Fr, odnosno uz *A. proliferans* te *A. pseudoglaucus* pojavljuju se i vrste *A. flavus* i *A. tubingensis* s većom Fr u odnosu na njihovo pojavljivanje u suhomesnatim proizvodima, dok je kod suhomesnatih proizvoda Fr *A. proliferans* uvjerljivo najveća, skoro 2 x veća od Fr najzastupljenije vrste plijesni u kobasicama (*P. commune*). Zastupljenost drugih *Aspergillus* vrsta u kobasicama, poput *A. flavus*, može se objasniti činjenicom da kobasice zriju tijekom kraćeg perioda pri čemu ne dolazi do smanjenja i obrastanja manje kserofilnih vrsta kao što je *A. flavus* sa onim kserofilnijim, poput *A. proliferans* i *A. pseudoglaucus*, kao što je slučaj kod trajnijeg procesa zrenja (Rodrigues i sur., 2019).

Identifikacija plijesni na hrvatskim trajnim suhomesnatim proizvodima provedena je dosad u tri istraživanja (Comi i sur., 2004; Zadavec i sur., 2020; Lešić i sur., 2021a), i to na pršutima. U dva različita istraživanja Dalmatinskog i Istarskog pršuta dominantne vrste bile su *P. solitum*, *P. nalgiovense*, *P. commune* i *P. polonicum* te *P. citrinum*, *A. proliferans* i *A.*

*chevalieri*, kao i vrste dobivene u ovom istraživanju trajnih suhomesnatih proizvoda. Identifikacija plijesni na drugim vrstama suhomesnatih proizvoda prema dosadašnjim saznanjima nije provedena. U istraživanju Istarskog pršuta, autora Comi i sur. (2004), najčešće izolirane vrste bile su *P. frequentas*, *P. verrucosum*, *P. lanosocoeruleum*, *P. chrysogenum*, *P. commune* i *P. expansum*, od kojih su u ovom istraživanju određene jedino *P. commune*, *P. chrysogenum* i *P. expansum*, ali treba imati na umu da je istraživanje Comi i sur. (2004) provedeno tradicionalnim, a ne molekularnim metodama identifikacije. Dominantne vrste plijesni pronađene na suhomesnatim proizvodima, točnije pršutima iz drugih Europskih zemalja, su primjerice u slučaju Španjolske za Iberijski pršut *P. commune* i *P. chrysogenum* (Núñez i sur., 1996; Alapont i sur., 2014), u slučaju Italije San Daniele *P. chrysogenum* te *A. fumigatus* (Comi i sur., 2013), Norveške *P. nalgiovense*, *P. solitum*, i *P. commune* (Asefa i sur., 2009) te Slovenije *P. nordicum*, *P. nalgiovense* i *P. milanense* (Sonjak i sur., 2011). Općenito, veća zastupljenost *Aspergillus* vrsta u ovom istraživanju u odnosu na druge zemlje može se objasniti činjenicom da Istarski, a posebice Dalmatinski pršut, zriju u toplijoj i sušnjoj klimi u odnosu na prethodno navedena istraživanja.

Po pitanju istraživanja vrsta plijesni na hrvatskim kobasicama, provedeno je pet istraživanja u zadnje četiri godine (Pleadin i sur., 2017; Zadravec i sur., 2020; Lešić i sur., 2020; Zadravec i sur. 2021.; Lešić i sur., 2021b). U svim istraživanjima određen je veći broj i veća raznolikost vrsta roda *Penicillium* u odnosu na *Aspergillus*, što je već i pojašnjeno. Istraživanja su provedena na različitim vrstama kobasica, uključujući i kulen i kulenovu seku, te su određene dominantne vrste plijesni *P. nalgiovense*, *P. solitum*, *P. commune* i *P. polonicum*, a u jednom istraživanju i *A. pseudoglaucus* (Lešić i sur., 2021b). Rezultati *Penicillium* vrsta u skladu su sa ovim istraživanjem, a ono što se razlikuje je zastupljenost *Aspergillus* vrsta, iako se manji broj vrsta može pripisati i manjem broju analiziranih uzoraka iz ranijih istraživanja. Rezultati istraživanja površinske mikoflore kobasica iz drugih zemalja, poput Argentine (Vila i sur., 2019; Canel i sur., 2013), Grčke (Papagianni i sur., 2007) i Italije (Iacumin i sur., 2009), pokazuju slične rezultate sa dominantnim *P. nalgiovense* te *P. olsonii*, *P. chysogenum*, *P. commune* i *P. solitum* (Magista i sur., 2017).

Općenito, različitost vrsta koje koloniziraju trajne mesne proizvode može se pripisati različitoj okolini koje okružuju komore za zrenje, iz kojih većinom potječu spore plijesni, te uvjetima zrenja u tim komora i kombinacijom svih navedenih čimbenika koji mogu utjecati na rast plijesni.

PCA analiza odnosa vrste proizvoda i sastava površinske mikoflore prema godini uzorkovanja prikazana je na slikama 59. i 60. Prva i druga glavna komponenta opisuju 22,79 %, odnosno

23,55 % ukupne varijabilnosti za TMP uzorkovane 2020. odnosno 20121. godine. Slika 59a. pokazuje kako neke pršute karakterizira udio soli, vrijeme zrenja te plijesan *A. proliferans*, pri čemu se iz tablica 14 i 26 vidi da je riječ o visokim udjelima soli, dugom vremenu zrenja i znatnim količinama *A. proliferans*. Na slici 59b. vidljiva je dobro razdvajanje uzoraka trajnih kobasica i pršuta duž PC1, ali može se općenito reći da su se i sve vrste TMP dobro grupirale osim uzoraka zagrebnjaka i vratine. Isti trend uočen je i za TMP uzorkovane 2021. godine (slika 60.).

### 5.2.3. Identificirane potencijalne toksikotvorne vrste plijesni

Sa površine 250 analiziranih TMP identificirano je ukupno sedam toksikotvornih vrsta plijesni koje produciraju neke od istraživanih mikotoksina, od čega tri *Penicillium*: *P. commune*, *P. nordicum*, *P. citrinum* te četiri *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. niger*, *A. westerdijkiae* i *A. welwitschie*, kao i dvije potencijalno toksikotvorne vrste za koje o produkciji mikotoksina postoje oprečni rezultati: *P. polonicum* i *A. tubingensis* (slike 29. – 37.). Jedna vrsta plijesni može producirati više mikotoksina, dok jedan mikotoksin može biti produciran od više vrsta plijesni. Vrsta *P. citrinum* poznati je producent CIT, a AFB<sub>1</sub> *A. flavus* (Pitt i Hocking, 2009). *A. flavus* bi potencijalno mogla producirati i STC, budući da dijele biosintetski put, međutim, većina STC kod ove vrste bude prevedena u aflatoksine (Yu i sur., 2004). Četiri identificirane vrste su poznati producenti OTA: *P. nordicum*, *A. niger*, *A. westerdijkiae* i *A. welwitschie* (Samson i sur., 2019), dok za vrstu *A. tubingensis* postoje oprečni rezultati o mogućnosti njegove produkcije (Storari i sur., 2012). Isto tako, dvije identificirane vrste su poznati producenti CPA - *P. commune* i *A. flavus* (Samson i sur., 2019), dok za *P. polonicum* postoje oprečni rezultati (Alapont i sur., 2014). Jedna identificirana vrsta iz ovog istraživanja- *A. flavus* producent je dva mikotoksina i to AFB<sub>1</sub> i OTA (Samson i sur., 2019). Najveću Fr imaju *P. commune* (30 %) i *P. citrinum* (20 %), zatim podjednaku Fr imaju *P. nordicum* (6 %), *A. flavus* (5 %), *P. polonicum* (5 %) te *A. tubingensis* (5 %) i naposljetku *A. niger* (1 %) te *A. westerdijkiae* i *A. welwitschie* (sa po 0,4 %) U ranijim istraživanjima na tradicionalnim mesnim proizvodima iz Hrvatske također su kao i u ovom istraživanju u velikom broju identificirane vrste *P. commune* i *P. citrinum* te vrsta *A. niger* (Lešić i sur., 2020; Zdravec i sur., 2021; Lešić i sur., 2021a). U istraživanju Lešić i sur. (2021a) još su identificirane i *P. nordicum* te *A. westerdijkiae*, dok su u istraživanju Zdravec i sur. (2020) identificirani *A. ochraceus* i *P. verrucosum* kao producenti OTA te *A. versicolor* kao producent STC, koji nisu identificirani u ovom istraživanju. U istraživanju Pleadin i sur. (2017) identificirana je samo

toksikotvorna plijesan *A. versicolor*. *A. versicolor* plijesan može rasti pri nižim temperaturama nego većina drugih *Aspergillus* vrsta (Samson i sur., 2019)., dok je *P. verrucosum* inače češće prisutna na žitaricama te njena izolacija u prethodno spomenutom istraživanju može biti posljedica blizine žitnih polja komorama za zrenje ovih proizvoda i moguće kontaminacije sporama (Zadravec i sur., 2020). Sve spomenute toksikotvorne plijesni se mogu naći i u trajnim mesnim proizvodima iz drugih zemalja, pri čemu je *A. westerdijkiae* vrlo rijetko izolirana (Papagianni i sur., 2007; Iacumin i sur., 2009; Asefa i sur., 2009; Comi i sur., 2013; Alapont i sur., 2014; Rodriguez i sur., 2019; Perrone i sur., 2019).

### **5.3. Detekcija gena uključenih u biosintezu mikotoksina kod toksikotvornih vrsta plijesni**

Glavni razlog istraživanja vrsta plijesni u hrani njihova je sposobnost produkcije mikotoksina koji imaju toksično djelovanje, bilo da se želi eliminirati rast toksikotvornih vrsta i na taj način osigurati zdravstvenu ispravnost hrane, bilo da se želi detektirati vrsta/soj plijesni koje nemaju sposobnost produkcije mikotoksina kako bi se mogle koristiti u druge svrhe poput proizvodnje fermentirane hrane.

Identificirane toksikotvorne vrste plijesni, ovisno o istraživanom mikotoksinu kojeg potencijalno mogu producirati, testirane su na prisutnost gena uključenih u njihovu biosintezu. Slika 37. prikazuje rezultate testiranja na prisutnost gena uključenih u biosintezu AFB<sub>1</sub> i STC kod vrste *A. flavus* kao jedinog identificiranog potencijalnog producenta. Od ukupno 12 izoliranih izolata vrste *A. flavus*, 7 izolata je pozitivno na gen *nor-1*, 6 izolata na gen *ver-1*, a svih 12 izolata na gen *omt-A*. Ukupno 6 izolata (50 %) ima sva 3 gena te se mogu smatrati da imaju sposobnost produkcije AFB<sub>1</sub>. U istraživanju Geisen (1996) ova tri gena, sa istim parovima početnica kao i u ovom radu, zaključeno je da je metoda specifična za potencijalne aflatoksikotvorne vrste *A. flavus* i *A. parasiticus* te STC- producirajuću plijesan *A. versicolor*. Općenito se pretpostavlja da 40 do 50 % izolata *A. flavus* ima sposobnost produkcije AFB<sub>1</sub> (Geisen, 1996). Nedostatak signala za neki od ispitanih gena upućuje na deleciju tog gena ili u slučaju kada soj pokazuje sve 3 vrpce za 3 gena, a nema sposobnost produkcije, pretpostavlja se druga vrsta mutacije, možda u regulatornim genima (Munaut i Van Hove, 2011).

Tablica 28. prikazuje rezultate testiranja na prisutnost gena uključenih u biosintezu OTA. Istraživani OTA biosintetski geni mogu se dovesti u vezu sa istraživanjima Luque i sur. (2013) te Dao i sur. (2005). Od ukupno 33 izolata svih potencijalnih OTA producenata, njih

19, odnosno 58 % ima *otapks* gen te se mogu smatrati da imaju sposobnost produkcije OTA. Među njima svi izolati *P. nordicum* i *A. westerdijkiae* imali su navedeni gen te 33 % izoliranih i ispitivanih izolata *A. tubingensis*. Za *P. nordicum* je poznato da može producirati OTA te rasti na trajnim mesnim proizvodima sa visokim udjelom soli i bjelančevina, ujedno pri niskim temperaturama (Pitt i Hocking, 2009). *P. nordicum* može producirati OTA u širokom temperaturnom rasponu te pod relativno stresnim abiotičkim uvjetima. Zabilježena je proizvodnja OTA pri  $a_w$  0,85, iako optimalni uvjeti podrazumijevaju temperaturu od 15 °C i  $a_w$  0,90 (Perrone i sur., 2019). Istraživanja su također potvrdila da *A. westerdijkiae* može producirati OTA (Perrone i sur., 2019). Za *A. tubingensis* iz sekcije *A. Nigri* u koje spadaju i okratoksikotvorne vrste *A. niger* i *A. carbonarius*, postoje objavljeni kontradiktorni podaci o njegovoj sposobnosti produkcije OTA. U istraživanju Storari i sur. (2012), OTA nije detektiran u niti jednom ekstraktu *A. tubingensis*, ali je jednostavno određen kod *A. niger*, dok su u istraživanju Luque i sur. (2013) detektirani geni i produkcija OTA 2 izolata *A. tubingensis*. U ovom radu niti jedan izolat *A. niger* i *A. welwitschiae* nije imao jedan od ispitivanih gena. Susca i sur. (2014) navode da su u neproducirajućim izolatima *A. niger* i *A. welwitschiae* uočili da je OTA klaster gotovo potpuno izbrisan. U ovom je istraživanju utvrđeno da PCR metoda s početnicama koje generiraju fragment od 459 pb OTA *otanpsPN* omogućava specifičnu detekciju kod *P. nordicum*, gdje su svi analizirani izolati imali taj gen, ali daje negativne rezultate s drugim *Aspergillus* vrstama koje su potencijalni OTA producenti. Istraživanje Luque i sur. (2013) sa početnicama F1OT i R1OT (*otanpsPN*), korištene i u ovom radu, detektiralo je OTA gen u različitim vrstama producentima: *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tubingensis*, *A. westerdijkiae*, *P. nordicum* i *P. verrucosum*.

Primjer rezultata testiranja na prisutnost gena uključenog u biositezu CIT kod 49 izolata *P. citrinum* kao jedinog identificiranog potencijalnog producenta prikazan je na slici 40. Ukupno 71 % izolata je imalo analizirani gen te se mogu smatrati da imaju sposobnost produkcije CIT. Općenito, većina sojeva *P. citrinum* su organizmi koji dosljedno i u visokim koncentracijama produciraju CIT (Geisen i sur., 2018). Istraživanje Touhami (2018) pokazalo je kako inaktivacija *pkcCT* gena kod *P. verrucosum*, *P. expansum* te *P. citrinum* dovodi do transformacije sojeva u CIT neproducirajuće.

Tablica 29. prikazuje rezultate testiranja na prisutnost gena uključenog u biosintezi CPA. Od ukupno 99 izolata svih potencijalnih CPA producenata, njih 47, odnosno 48 %, ima *dmaT* gen te se mogu smatrati da imaju sposobnost produkcije CPA. Među njima, 61 % izolata vrste *P. commune* te 17 % izolata *A. flavus* imalo je navedeni gen, dok niti jedan izolat *P. polonicum*



nije imao ispitivani gen te se ova vrsta u ovom istraživanju nije pokazala kao potencijalni CPA producent. Rodriguez i sur. (2012a) su ovom metodom detektirali gen u vrsta *A. flavus*, *P. camemberti*, *P. commune* te *P. griseofulvum*. CPA se dosljedno proizvodi u hrani od strane vrsta *P. griseofulvum*, *P. camemberti*, *P. commune*, *A. flavus*, *A. oryzae* i *A. tamarii* (Ostry i sur., 2018). Nakon inokulacije trajnih kobasica sa *P. griseofulvum*, značajna produkcija CPA uočena je pri niskim temperaturama (npr. 12 °C), te je rasla tijekom proizvodnje vjerojatno kao posljedica intenzivne proteolize te posljedično oslobađanja aminokiselina, među ostalima i triptofana, koji je izravni CPA prekursor (Perrone i sur., 2019; Peromingo i sur., 2019). *P. griseofulvum* nije identificirana u ovom istraživanju, ali *P. commune* predstavlja dominantnu vrstu na analiziranim mesnim proizvodima. Istraživanje prirodne mikrobiote na španjolskim pršutima (Alapont i sur., 2014) je pokazalo da je 33,7 % izoliranih sojeva plijesni produciralo CPA, od čega su 66,6 % bili CPA producirajući sojevi *P. commune*. Autori istraživanja su također naveli da se 2 od 5 analiziranih sojeva *P. polonicum* pokazalo visoko toksikotvornim i sposobnim producirati CPA. U ovom istraživanju niti jedan od 13 izolata *P. polonicum* nije imao CPA biosintetske gene. *P. atramentosum* i *P. solitum* izolirani sa pršuta u prethodno spomenutom istraživanju također su imali sposobnost CPA produkcije, ali u vrlo niskim koncentracijama. Međutim, te vrste se ne smatraju CPA producentima (Samson i sur., 2019), te je stoga potrebno prikupiti više dokaza. Također, identifikacija plijesni je provedena na temelju ITS regije te je moglo doći i do pogrešne identifikacije u bazi podataka.

#### **5.4. Razvoj i validacija LC-MS/MS metode**

U svrhu procjene izloženosti mikotoksinima i rizika koje predstavljaju za zdravlje ljudi i životinja za njihovo određivanje neophodna je primjena preciznih i dovoljno osjetljivih analitičkih metoda kako bi se jamčila sigurnost sirovina i gotovih proizvoda namijenjenih prehrani ljudi i hranidbi životinja. Tako je, primjerice, u znanstvenom mišljenju EFSA CONTAM panela iz 2013. godine dana preporuka o prikupljanju podataka o prisutnosti STC u hrani i hrani za životinje uz primjenu visokoosjetljivih analitičkih metoda s LOQ manjim od 1,5 µg/kg (EFSA, 2013). Za određivanje mikotoksina u TMP treba uzeti u obzir činjenicu da mikotoksini uobičajeno hranu (naročito meso i mesne proizvode) kontaminiraju pri vrlo niskim koncentracijama te da ovi proizvodi predstavljaju kompleksnu matricu čije komponente mogu utjecati na osjetljivost analitičke metode suprimirajući signal analita.

U ovom radu je proveden razvoj i validacija multimikotoksinske LC-MS/MS metode za detekciju i kvantifikaciju 5 mikotoksina (AFB<sub>1</sub>, OTA, CIT, STC i CPA) koja se nadalje

koristila u svrhu određivanja pojavnosti mikotoksina u TMP. Razvoj metode za određivanje ovih mikotoksina uključivao je optimizaciju instrumentalnih parametara s ciljem postizanja maksimalne osjetljivosti i selektivnosti instrumenta. Analiza mikotoksina je provedena pomoću spregnute tehnike tekućinske kromatografije s masenom detekcijom s detektorom tipa trostruki kvadrupol u ESI pozitivnom ionizacijskom modu. Kromatografsko razdvajanje CPA se pokazalo analitički vrlo zahtjevnim zbog kombinacije analitičke strukture i kompleksne matrice u odnosu na ostale mikotoksine. Kromatografsko razdvajanje mikotoksina provedeno je uz gradijent mobilnih faza koje su sadržavale 5 mM amonij acetata (otapalo A) i metanola (otapalo B), dok je kromatografsko razdvajanje CPA zahtijevalo optimizaciju pH mobilne faze te se mobilna faza pH 2,5 pokazala optimalna i rezultirala zadovoljavajućim oblikom pika.

Dijagnostički ioni i uvjeti masenog spektrometra prikazani su u tablici 13. Kako bi se postigla veća osjetljivost metode, ispitani su odzivi prekursor iona pri promjeni vrijednosti napona fragmentora. Najveći odziv za prekursor ion AFB<sub>1</sub> (m/z = 313,1) postignut je pri naponu fragmentora od 170 V, za OTA (m/z = 404,0) 130 V, za CPA (m/z = 337,2) 110 V, za STC (m/z = 325,1) 130 V, dok je za CIT (m/z = 251,1) napon fragmentora iznosio 100 V. Analizom produkt iona analiziranih mikotoksina određena su dva produkt iona, pri čemu je ion jačeg intenziteta za OTA pri m/z = 239,0; za AFB<sub>1</sub> pri m/z = 285,1; za STC pri m/z m/z = 310,0; za CIT pri m/z m/z = 205,0 te CPA pri m/z = 182,1 odabran kao kvantitativni ion (slike 21. – 25.). Temperatura plina za analizu podešena je na 350 °C, dok je protok plina na izvoru iznosio 12 L/min. Optimalan prijenos iona postignut je pri tlaku u raspršivaču od 20 psi. Za sve mikotoksine optimalni signali postignuti su pri naponu kapilare 4000 V (+) i 2000 V (-).

Optimizacija postupka ekstrakcijske procedure za analizu CPA zbog kombinacije kemijske strukture CPA te matrice u kojoj se određuje bila je izazovna, što je utvrđeno u ranijem istraživanju Vulić i sur. (2021). Kemijski sastav, npr. trajnih kobasica, karakterizira visok udio masnoće (do 40 g/100 g) i sadržaj bjelančevina (iznad 16 g/100 g) (Lešić i sur., 2020), što je važno sa aspekta pripreme uzorka. Razvoj pripreme uzorka za analizu CPA uz upotrebu QuEChERS soli, uključivao je različite eksperimente pri kojima se pokazalo da je ključna pH vrijednost ekstrakcijskog otapala te uklanjanje masti. Upotreba mravlje kiseline nije dala prihvatljive rezultate budući da je ranije navedeno da u prisutnosti mravlje kiseline CPA postaje nestabilna (Ostry i sur., 2018) te je tako za podešavanje pH korištena octena kiselina. Visok postotak octene kiseline (25 %) korišten je za dobivanje niske pH vrijednosti ekstrakcijske smjese da bi se CPA mogla ekstrahirati kao neutralna molekula. Za odabir organskog dijela otapala za ekstrakciju u obzir su uzeti acetonitril i metanol te je acetonitril

dao bolje rezultate, budući da je ekstrakcija posredovana metanolom rezultirala pojavom želatinoznog sloja, a supernatant nakon centrifugiranja nije bilo bistar. Nakon toga, uklanjanje bjelančevina i masti optimizirano je dodatkom različitih volumena Carrezovih otopina, pri čemu se manji volumen (500 µL) pokazao adekvatnijim.

Do sada objavljene tehnike pripreme uzorka za ekstrakciju CPA iz različite hrane životinjskog podrijetla zahtijevale su više vremena i otapala s obzirom da su postupci ekstrakcije ili obuhvaćali više koraka, koristili veće volumene otapala ili zahtijevale dulje vrijeme ekstrakcije (Sosa i sur., 2002; Moldes-Anaya i sur., 2009; Ansari i Häubl, 2016; Kiš i sur., 2019;). Poboljšanje u analizi CPA u mesnim proizvodima objavili su autori Peromingo i sur. (2018) u istraživanju na trajnim suhomesnatim proizvodima, u kojem su također koristili QuEChERS tj. metodu koja je brza, učinkovita i jeftina sama po sebi, kako joj naziv kaže. Isti pristup, ali u analizi trajnih kobasica, koristili su u istraživanju Delgado i sur. (2019), prema metodi Peromingo i sur. (2018).

Ekstrakcijska procedura i pročišćavanje uzoraka za analizu ostalih mikotoksina (AFB<sub>1</sub>, OTA, STC i CIT) podrazumijevala je upotrebu specifičnih imunoafinitetnih kolnica prema uputama dobivenim od proizvođača te nije zahtijevala postupke optimizacije unatoč kompleksnoj matrici.

Linearnost odgovora instrumenta je testirana pomoću pet kalibracijskih točaka pripremljenih prema tablicama 9. – 12. s rasponima od 0,05 - 1,00 ng/mL za AFB<sub>1</sub>, 0,20 - 5,00 ng/mL za OTA, 10 - 10,00 ng/mL za STC, 1,00 - 10,00 ng/mL za CIT te 0,50 - 20,00 ng/mL za CPA. Iz dobivenih kalibracijskih krivulja za svaki pojedini mikotoksin (slike 48. – 52.) vidljivo je da koeficijent determinacije ( $R^2$ ) linearne regresije standardne kalibracije iznosi > 0,997 za CPA, > 0,999 za CIT, STC i OTA te >0,998 za AFB<sub>1</sub>. Na temelju toga može se zaključiti kako metoda ima dobru linearnost u ispitivanom koncentracijskom području uz zadovoljavanje kriterija prihvatljivosti za linearnost od  $k > 0,995$ .

Prilikom obogaćenja *blank* uzoraka na najnižu kvantifikacijsku razinu s masenim udjelom od 0,3 µg/kg OTA, 0,1 µg/kg AFB<sub>1</sub>, 0,1 µg/kg STC, 2,0 µg/kg CIT te 3,0 µg/kg CPA dobiveni su tipični LC-MS/MS-MRM kromatogrami prikazani na slikama 43. - 47. Dobivene vrijednosti LOD i LOQ pri ovim uvjetima iznose za AFB<sub>1</sub> 0,03 µg/kg odnosno 0,11 µg/kg, za OTA 0,18 µg/kg odnosno 0,59 µg/kg, za STC 0,02 µg/kg odnosno 0,06 µg/kg, za CIT 0,60 µg/kg odnosno 1,98 µg/kg te za CPA 0,43 µg/kg odnosno 1,43 µg/kg. Za CPA zbog faktora razrijeđenja 5 tijekom pripreme uzoraka konačni LOD i LOQ u matrici iznose 2,17 µg/kg odnosno 7,15 µg/kg (tablica 30.). Najniže LOD i LOQ vrijednosti su postignute za STC i AFB<sub>1</sub>, a najviše za CPA.

Dobivene LOD i LOQ vrijednosti u ovom radu predstavljaju malo poboljšanje u osjetljivosti metode za detekciju CPA u mesnim proizvodima u usporedbi sa radovima Peromingo i sur. (2018) te Delgado i sur. (2019), koji su prikazali vrijednosti LOD 3,3 µg/kg i LOQ 10 µg/kg za suhomesnate proizvode te LOD 12,0 µg/kg i LOQ 40,0 µg/kg za trajne kobasice. Dobivene LOD i LOQ vrijednosti metode za određivanje STC u mesnim proizvodima u ovom radu usporedive su s vrijednostima LOD 0,03 µg/kg i LOQ 0,1 µg/kg LC-MS/MS metode za određivanje STC u siru (Versilovskis i De Saeger, 2010) ili sa LC-MS/MS metodom koja se također bazira na pročišćavanju na imunoafinitetnim kolonicama u hrani, poput brašna, pekarskih proizvoda, žitarica i alkoholnih pića sa LOQ 0,05 µg/kg (Yoshinari i sur., 2019). Multimikotoksinska LC-MS/MS metoda sa čvrsto-tekućinskom ekstrakcijom u sušenoj govedini rezultirala je sa sljedećim LOD vrijednostima: OTA 0,13 µg/kg, AFB<sub>1</sub> 2 µg/kg, CIT 18 µg/kg, CPA 7 µg/kg te STC 8 µg/kg (Dada i sur., 2020).

Budući da je korištena kalibracija u otapalu i bez upotrebe internog standarda za kvantifikaciju, ispitan je utjecaj matrice. Utjecaj matrice na ionizaciju ovisi o samom analitu te komponentama matrice koje se ekstrahiraju tijekom analize te se može očitovati kao pojačanje ili smanjenje signala iona analita, a time i parametra metode (Kruve i sur., 2015). Rezultati određivanja utjecaja matrice koristeći postekstrakcijski obogaćene *blank* uzorke mesnih proizvoda i uspoređujući ih sa standardnim otopinama iste razine svakog mikotoksina prikazani su u tablici 31. Sve dobivene vrijednosti su niske i kreću se u rasponu 0,7 % - 7,7 % te ukazuju na blago pojačanje signala iona analita. Najveća vrijednost dobivena je za STC od 7,7 % te potom za AFB<sub>1</sub> 6,4 %, dok se vrijednosti dobivene za CIT, CPA i OTA mogu smatrati zanemarivim (oko 1 %) i pripisati efikasnom pročišćavanju uzoraka.

Iskorištenje metode određeno je koristeći obogaćene *blank* uzorke (tablica 32.). Dobivene vrijednosti iskorištenja kretale su se u rasponu od 91,37 % za AFB<sub>1</sub> do 119,41 % za OTA. Prema Uredbi Komisije br. 401/2006 (EC, 2006a) iskorištenje za analitičku metodu određivanja mikotoksina na razini < 1 µg/kg treba biti u rasponu od 50 do 120 %, dok je prema Provedbenoj uredbi Komisije 2021/808 (EC, 2021) granica istinitosti kvantitativne metode od -50 % do +20 % stoga se može zaključiti da su dobivene vrijednosti unutar zadanih vrijednosti.

Rezultati validacije LC-MS/MS metode, razvijene u ovom istraživanju, ukazuju na dobru osjetljivost i ponovljivost metode za određivanje mikotoksina AFB<sub>1</sub>, OTA, CIT, STC i CPA u trajnim mesnim proizvodima. Prema određenim parametrima LOQ i LOD, može se zaključiti da je metoda primijenjiva za analizu mesnih proizvoda i s vrlo niskim masenim udjelima ovih mikotoksina.

## 5.5. Pojavnost mikotoksina u hrvatskim TMP

Ispitivanje pojavnosti mikotoksina u mesnim proizvodima značajno je za procjenu ljudske izloženosti ovim kontaminatima putem ove vrste namirnica koji predstavljaju značajan dio prehrane, procjenu rizika koje predstavljaju za zdravlje ljudi te za uspostavu najvećih dopuštenih količina mikotoksina u mesnim proizvodima koje dosad zakonodavstvom nisu ustanovljene u zemljama Europske unije.

Pojavnost istraživanih mikotoksina detektirana je u 27 % analiziranih uzoraka TMP, i to STC u rasponu koncentracija 0,10 - 3,93  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u 4 % uzoraka, OTA u rasponu koncentracija 0,24 - 4,81  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u 10 % uzoraka te CPA u koncentracijama 2,25 - 335,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u 13 % uzoraka, dok AFB<sub>1</sub> i CIT nisu detektirani u niti jednom uzorku TMP. Vidljivo je da je CPA određena u najvećem postotku uzoraka od svih analiziranih mikotoksina i to u vrlo visokim koncentracijama, a zatim OTA (tablice 33. – 35.). Dobiveni podaci statističke analize sumirani su i prikazani *box-plot* dijagramima za detektirane mikotoksine iznad LOD: CPA, OTA i STC (slika 53.). Prosječna vrijednost svih određenih CPA koncentracija iznosi  $29,11 \pm 59,31 \mu\text{g}/\text{kg}$ , a medijan 9,90  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Glavnina koncentracija kreće se u rasponu do 45  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , uz tri ekstremne koncentracije od 66,35  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 108,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  te 335,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Prosječna vrijednost svih određenih OTA koncentracija iznosi  $1,02 \pm 1,09 \mu\text{g}/\text{kg}$ , a medijan 0,66  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Većina koncentracija je u rasponu do 1,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , uz tri ekstremne koncentracije od 2,66  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 3,02  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i 4,81  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Prosječna vrijednost svih određenih STC koncentracija iznosi  $0,58 \pm 1,13 \mu\text{g}/\text{kg}$ , a medijan 0,16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Većina koncentracija je u rasponu do 0,70  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , uz jednu ekstremnu koncentraciju od 3,93  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Kontaminacija istim mikotoksinom u tri od četiri uzorkovana proizvoda sa istog OPG-a zamijećena je u 7 OPG-ova od njih 30-tak što upućuje na postojanje kontaminacije u domaćinstvu i potrebu sustava kontrole.

Literaturno je opisana i moguća zajednička pojava CIT i OTA te AFB<sub>1</sub> i STC, odnosno AFB<sub>1</sub> i CPA, u različitim namirnicama (EFSA, 2012; EFSA, 2013; Ostry i sur., 2018), ali s obzirom da mikotoksini AFB<sub>1</sub> i CIT nisu detektirani, zajednička pojava mikotoksina zabilježena je u samo 4 uzorka za OTA i CPA te u 2 uzorka OTA i STC, ali ne kao posljedica zajedničkih ili sličnih vrsta producenata.

U 21 % uzoraka kontaminiranih nekim od detektiranih mikotoksina (STC, OTA ili CPA), određeni su njihovi producenti (koji posjeduju biosintetske gene) (*A. flavus*, *P. nordicum* i *P. commune*), dok se kontaminacija uzoraka u kojima producenti nisu identificirani može objasniti ili prethodnom kontaminacijom sastojaka TMP ili obrastanjem producenata drugim vrstama plijesni na kraju faze zrenja, spriječavajući na taj način njihovu detekciju. Značajan

producent STC, primjerice *A. versicolor*, nije identificiran. Gledajući uzorke koji su kontaminirani STC, u samo jednom uzorku određen je *A. flavus* sa biosintetskim genima uključenim u njegovu biosintezu. Vrsta *A. flavus* bi potencijalno mogla producirati STC budući da dijeli biosintetski put sa AFB<sub>1</sub>, međutim, poznato je da je većina STC kod ove vrste ipak prevedena u aflatoksine. Budući da neka istraživanja pokazuju prisutnost STC u začinima te u hrani za životinje, postoji i mogućnost takve neizravne kontaminacije mesa i proizvoda od mesa ovim mikotoksinom, iako o tome nedostaje podataka (EFSA, 2013). Među kontaminiranim OTA uzorcima, u 3 uzorka je identificirana vrsta *P. nordicum* sa dokazanim OTA biosintetskim genima, dok je među kontaminiranim CPA uzorcima *P. commune* identificirana u 13 uzoraka, od čega u 10 sa CPA biosintetskim genima.

U ovom istraživanju mikotoksin AFB<sub>1</sub>, kao ni CIT nisu detektirani ni u jednom analiziranom uzorku, iako su identificirane vrste producenti *A. flavus* te *P. citrinum* sa dokazanim biosintetskim genima sposobne producirati ove mikotoksine u mesnim proizvodima. To potvrđuje činjenicu da rast toksikotvornih plijesni ne znači nužno da su mikotoksini prisutni u namirnici, budući da njihova proizvodnja između ostalog ovisi o brojnim okolišnim čimbenicima (Sørensen i sur., 2009). Istraživanja pokazuju da okolišni čimbenici (poput kombinacije temperature x a<sub>w</sub> x CO<sub>2</sub>) direktno utječu na ekspresiju AFB<sub>1</sub> biosintetskih gena, dok nemaju značajan utjecaj na rast *A. flavus* (Medina i sur., 2014). Bailly i sur. (2005) izvjestili su o relativno visokim količinama CIT proizvedenom u trajnim mesnim proizvodima od strane toksikotvornog soja *P. citrinum* nakon 16 dana inkubacije pri 20 °C. Što se tiče drugih istraživanja koja se bave kontaminacijom mesnih proizvoda sa AFB<sub>1</sub>, u nedavnom istraživanju na različitim vrstama trajnih kobasica (Kudumija i sur., 2020), također nije određena konaminacija aflatoksinima AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> niti AFG<sub>2</sub>, dok su neka prijašnja istraživanja na mesnim proizvodima zabilježila koncentracije AFB<sub>1</sub> u rasponu od 0,92 - 3,0 µg/kg (Markov i sur., 2013; Pleadin i sur., 2015a; Zadravec i sur., 2020). U Slavonskom kulenu utvrđena je veća prosječna koncentracija AFB<sub>1</sub> od 11,79 µg/kg u slučaju kada se proizvod nije četkao tijekom proizvodnje, tako da se površinske plijesni nisu uklanjale i neometano su rasle (Pleadin i sur., 2017). Pojavnost CIT ispitana je samo u jednom istraživanju na hrvatskim mesnim proizvodima ELISA metodom, unatoč tome što se producirajući sojevi plijesni ovog mikotoksina često izoliraju iz trajnih mesnih proizvoda, u kojem se ovaj mikotoksin nije pokazao značajnim kontaminantom (4,44 % uzoraka) sa utvrđenim koncentracijama oko LOD analitičke metode (1,0 - 1,3 µg/kg) (Markov i sur., 2013). Postoje studije o pojavnosti CIT u hrani za životinje (do 998 µg/kg), što predstavlja mogući rizik za prijenos u mesne proizvode, te u začinima kao što je crni papar (50 µg/kg)

koji se koriste u proizvodnji mesnih proizvoda (Kamle i sur., 2022). Unatoč tome što kontaminacija AFB<sub>1</sub> nije utvrđena ovim istraživanjem, te unatoč njegovoj slaboj zastupljenosti određenoj u drugim istraživanjima na mesnim proizvodima, potrebno je provoditi redovite kontrole korištenjem visoko osjetljivih potvrdnih metoda, budući da kontaminacija mikotoksinima ovisi o različitim čimbenicima, od kojih se na neke ne može utjecati, poput regionalnih vremenskih uvjeta koji se mijenjaju svake godine. Na primjer, nekoliko godina prije, zbog vremenskih uvjeta, utvrđene su visoke koncentracije AFB<sub>1</sub> u hrani za životinje, ne samo u Hrvatskoj, nego i u drugim europskim zemljama, što je ukazivalo na mogućnost neizravne kontaminacije namirnica životinjskog podrijetla (Pleadin i sur., 2015e; Kos i sur., 2018).

U nedavnom istraživanju kontaminacije tradicionalnog kulena mikotoksinima, OTA koncentracije su u 2 od 16 uzoraka prelazile preporučenu vrijednost od 1 µg/kg određenu za meso svinja i proizvode od svinjskog mesa donesenu od Ministarstva zdravstva Italije (3,91 i 6,95 µg/kg) (Lešić i sur., 2021). U ovom radu određene OTA koncentracije u 7 od 24 (29 %) uzoraka prelaze spomenutu preporuku o najvećoj vrijednosti OTA od 1 µg/kg. U većini uzoraka kontaminiranih s OTA, nije određen producent, tako da osim kao posljedica izravne produkcije plijesni, utvrđene niske koncentracije OTA mogu biti posljedica upotrebe kontaminiranih začina, poput crvene paprike, budući da je veći dio OTA koncentracija određen u trajnim kobasicama u čijoj se recepturi ona koristi (Perši i sur., 2014; Pleadin i sur., 2016). Pleadin i sur. (2015c) odredili su koncentracije OTA u začinima za proizvodnju Slavenskog kulena, i to do 8,11 µg/kg u crvenoj paprici, dok u svježem mesu OTA nije određen. U ranijim istraživanjima hrvatskih trajnih mesnih proizvoda, određene koncentracije OTA bile su u rasponu 0,14 µg/kg - 19,84 µg/kg u Slavenskom kulenu čija se površina tijekom zrenja nije četkala kako bi se uklonile plijesni (Zadravec i sur., 2020; Pleadin i sur., 2017; Kudumija i sur., 2020; Pleadin i sur., 2015c; Markov i sur., 2013). U trajnim mesnim proizvodima iz drugih Europskih zemalja, OTA koncentracije su bile u rasponu od < LOD – 625,70 µg/kg (Roncanda i sur., 2020; Iacumin i sur., 2009; Bernáldez i sur., 2013; Sorensen i sur., 2010; Iacumin i sur., 2011). Na uzorcima kontaminiranim sa OTA provedena su i istraživanja redukcije ovog mikotoksina fizikalnim metodama primjenjivim u domaćinstvu kao kuhanje i pečenje (Pleadin i sur., 2014) te gama zračenjem (Domijan i sur., 2015). Provedena istraživanja rezultirala su uglavnom niskim stupnjem redukcije OTA (20 – 30 %), što pokazuje da primjena različitih metoda ne daje visoku učinkovitost redukcije te da je stoga naročito potrebno osigurati preventivne mjere s ciljem sprječavanja kontaminacije.

Pojavnost CPA u mesnim proizvodima je slabo istražena, a jedan od razloga je što ja analitički izazovna (Vulić i sur., 2021). Dosad objavljeni podaci govore o širokom rasponu koncentracija CPA u trajnim suhomesnatim proizvodima (36 – 540 µg/kg) (Peromingo i sur., 2018). Dva istraživanja o pojavnosti CPA u hrvatskim tradicionalnim trajnim kobasicama dokazala su njenu prisutnost u 7 od 47 (15 %) analiziranih uzoraka u koncentracijama 2,55 µg/kg - 59,80 µg/kg (Vulić i sur., 2021) te u 5 od 16 (31 %) analiziranih uzoraka u koncentracijama 2,50 - 13,35 µg/kg (Lešić i sur., 2021b). CPA se može akumulirati u mesnim proizvodima tijekom skladištenja budući se pokazala stabilnija u odnosu na OTA i CIT (Bailly i sur., 2005). U usporedbi sa istraživanjem Lešić i sur. (2021b), rezultati istraživanja Vulić i sur. (2021) ukazuju na slične CPA koncentracije, izuzev jedne više vrijednosti od 59,80 µg/kg. Rezultati ovog istraživanja, koje obuhvaća i trajne kobasice i suhomesnate proizvode u usporedbi sa dosadašnjim istraživanjima, pokazuju više koncentracije CPA u odnosu na istraživanja prevedena na hrvatskim kobasicama, a nešto niže u usporedbi sa španjolskim istraživanjima na pršutima.

Prema dosadašnjim saznanjima, rezultati istraživanja o pojavnosti STC u mesnim proizvodima nisu dostupni. Postoje istraživanja o njegovoj pojavnosti u hrani za životinje, primjerice na farmama svinja gdje je detektiran i u do 50 % uzoraka različite hrane za životinje (Viegas i sur., 2020) te u začinima poput papra (do 125 µg/kg) i crvene paprike (do 23 µg/kg) (EFSA, 2013).

### **5.5.1. Pojavnost mikotoksina prema geografsko-vremenskoj regiji proizvodnje i utjecaj geografsko-vremenskih čimbenika na pojavnost mikotoksina**

Okolišni uvjeti u većoj mjeri utječu na samu proizvodnju mikotoksina nego na rast plijesni. Produkcija mikotoksina ovisi o vremenskim čimbenicima koji su karakteristični za određeno geografsko područje, a variraju na godišnjoj razini (Medina i sur., 2014).

Pojavnost mikotoksina s obzirom na geografsku regiju proizvodnje u Hrvatskoj (središnju, istočnu, sjevernu, zapadnu i južnu) i godinu uzorkovanja prikazana je u tablici 37. Iako nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji pojedinih mikotoksina s obzirom na regiju proizvodnje mesnih proizvoda, postoji razlika u njihovoj pojavnosti (tablica 36.).

Visoke koncentracije mikotoksina su, dakle, povezane s vremenskim uvjetima, pri čemu vlaga i temperatura imaju najvažniji doprinos za nastanak plijesni i proizvodnju mikotoksina. Stoga je u ovom radu ispitan odnos najznačajnijih vremenskih čimbenika, temperature zraka i količine padalina i pojavnosti mikotoksina u mesnim proizvodima (slike 56. – 58.). Na



temelju podataka o vremenskim čimbenicima za pojedine mikrolokacije (županije) proizvodnje TMP, izrađeni su kartografski prikazi. Podaci o pojavnosti analiziranih mikotoksina u mesnim proizvodima koji su zriili od 2019. do 2021. godine poslužili su za kreiranje mapa pojavnosti i pregled kontaminacije mesnih proizvoda iz svake hrvatske županije tj. regije.

Prema službenim podacima DHMZ, toplinske prilike u promatranim regijama Republike Hrvatske tijekom razdoblja zrenja TMP (2019. - 2021. godine), mogu se općenito opisati kategorijom toplo – vrlo toplo, dok se prema podacima o količini padalina pokazuju kišne - normalne oborinske prilike na promatranom području (prilog 2).

Najveći broj kontaminiranih uzoraka nekim od detektiranih mikotoksina imaju istočna (20) i zapadna (18) regija, a najmanji južna (5). Prehodno se može povezati sa rezultatima najveće sume izoliranih toksikotvornih vrsta plijesni u zapadnoj regiji, zatim sjevernoj, dok je najveća raznolikost toksikotvornih vrsta plijesni bila u zapadnoj i istočnoj regiji (slika 55.). Istočna i zapadna regija imaju općenito sličnu umjerenu klimu, dok je južna regija često uspoređena sa tropskim i subtropskim područjima, stoga je kako je već navedeno, u njoj određen najveći broj *Aspergillus* vrsta, dok su detektirani mikotoksini većinom OTA i CPA, vjerojatno u većoj mjeri posljedica produkcije *Penicillium* vrsta. Sagledajući svaki mikotoksin zasebno, najveći postotak uzoraka u kojima je detektirana CPA je iz istočne regije (41 %), potom zapadne (26 %) te zatim sjeverne (18 %), središnje (9 %) i južne (6 %). Pojavnost OTA najveća je u središnjoj (29 %) te zapadnoj (25 %) i istočnoj regiji (25 %), zatim u sjevernoj (17 %) i južnoj (4 %). Najviše koncentracije mikotoksina, iako ne značajno, za STC su određene u sjevernoj regiji ( $1,25 \pm 1,81 \mu\text{g/kg}$ ), za OTA u zapadnoj ( $1,45 \pm 1,67 \mu\text{g/kg}$ ), uz jednu detektiranu visoku koncentraciju u južnoj regiji ( $2,66 \mu\text{g/kg}$ ), a za CPA u istočnoj ( $36,25 \pm 86,71 \mu\text{g/kg}$ ), uz jednu detektiranu visoku koncentraciju također u južnoj regiji ( $108,50 \mu\text{g/kg}$ ). Zapadna regija sa najvećom prosječnom koncentracijom OTA, okarakterizirana je sa umjerenim oborinama te prosječnom temperaturom od  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  (slika 56.), optimalnom za proizvodnju OTA kod vrste *P. nordicum*, koja je i identificirana u zapadnoj regiji (slika 54.). Istočna regija s najvećom prosječnom koncentracijom CPA okarakterizirana je slabim oborinama te prosječnom temperaturom od  $10 - 12 \text{ }^\circ\text{C}$  (slika 58.). U istočnoj su regiji identificirane plijesni producenti *A. flavus* te *P. commune* (slika 55.). Pojavnost STC podjednaka je u svim regijama, osim u istočnoj u kojoj nije detektiran. Promatrajući detaljno vrijeme zrenja proizvoda u kojima je STC detektiran može se zaključiti da su za razliku od drugih regija, u istočnoj regiji proizvodi zriili samo tokom zime, dakle, pri nižim temperaturama, dok su u drugim regijama uzorci u

kojima je STC detektiran zrijeti tijekom proljeća/ljeta, odnosno pri višim temperaturama, što više pogoduje *Aspergillus* vrstama, glavnim STC producentima.

Općenito je veći broj uzoraka kontaminiranih OTA i STC određen u prvoj godini (2020.) uzorkovanja u odnosu na drugu (2021.), dok je za CPA obratno, veći broj kontaminiranih CPA uzoraka određen za drugu godinu uzorkovanja. Vremenske prilike tijekom zrenja proizvoda iz prve godine uzorkovanja opisuju se kao ekstremno toplo – vrlo toplo, dok iz druge godine uzorkovanja samo kao toplo. Što se tiče oborinskih prilika, za zrenje proizvoda iz prve godine uzorkovanja, opisuju se kao ekstremno kišno – vrlo kišno, a za drugu godinu kao normalne. S obzirom na to, teško je zaključiti utjecaj vremenskih prilika na proizvodnju mikotoksina od strane toksikotvornih vrsta plijesni, budući da se istovremeno javlja vrlo toplo i kišno vrijeme, te iako se smatra da okolišni uvjeti visoke temperature i vlažnosti općenito povećavaju rizik od rasta plijesni i produkcije mikotoksina, toplije i suše vrijeme bolje pogoduje rastu *Aspergillus* vrsta, dok *Penicillium* vrste mogu rasti i pri hladnijim temperaturama i vlažnijim vremenskim prilikama. Tako je navedeno da postoji povećan rizik da europske zemlje s umjerenom klimom imaju veću izloženost plijesnima i mikotoksinima zbog klimatskih promjena, što su neki autori već identificirali (Battilani i sur. 2012; Viegas i sur., 2020). Klimatske prilike u tim zemljama vjerojatno će postati toplije dostižući temperature od 33 °C, što je, na primjer, temperatura vrlo blizu optimalnoj temperaturi za rast *Aspergillus* sekcije *Versicolores* (30 °C) i proizvodnju STC (optimalna temperatura između 23 °C i 29 °C) (Viegas i sur., 2020). Primjeri modificiranih vremenskih režima koji utječu na mikotoksine pokazali su se tijekom ljetnih sezona 2003./2004., a potom i 2012. godine u mediteranskoj regiji, gdje su suša i povišene temperature rezultirale značajnom kontaminacijom kukuruza s *A. flavus* i aflatoksinima te ulazak aflatoksina M<sub>1</sub> u mliječni lanac putem lanca hrane za životinje (Medina i sur., 2014; Pleadin i sur., 2015e). Isto tako, istraživanje uzoraka kukuruza 2009. - 2011. godine podrijetlom iz Srbije nije detektiralo aflatoksine, međutim, dugotrajno vruće i suho vrijeme u 2012. rezultiralo je sa 69 % uzoraka koji su sadržavali aflatoksine (Kos i sur., 2013). *Aspergillus* vrste mogu producirati i OTA, također pri relativno visokim temperaturama (Akbar i sur., 2016), dok je za *P. nordicum* dokazana produkcija OTA u temperaturnom rasponu 15 – 30 °C (Perrone i sur., 2019). Istraživanje Sosa i sur. (2002) pokazalo je da je *P. commune* mogla rasti pri svakoj ispitivanoj temperaturi (12 – 30 °C) uz optimalne uvjete okoliša za rast od 20 - 25 °C pri a<sub>w</sub> 0,96, ali najveća količina CPA proizvedena je pri 30 °C, i a<sub>w</sub> 0,96. Ova činjenica ide u prilog određenim koncentracijama CPA iz ovog rada u vremenskim prilikama okarakteriziranim kao

toplom. Sosa i sur. (2002) su zaključili da nije postojala izravna korelacija između stope rasta i proizvodnje CPA. Zaključeno je da je temperatura najvažniji čimbenik koji utječe na proizvodnju CPA, ali da su bitne i interakcije različitih čimbenika poput temperature i  $a_w$ .

Prikaz vremenskih prilika obuhvaća period zrenja svih proizvoda u kojima su detektirani mikotoksini i on obuhvaća dugo razdoblje i od 1,5 god za svaku fazu uzorkovanja, dok neki proizvodi ipak zriju samo nekoliko mjeseci te su uvjeti u tim mjesecima pretpostavljeno bili drugačiji s obzirom na općenito karakterizirane godišnje uvjete što također otežava uvid utjecaja vremenskih prilika na pojavnost mikotoksina. Za ove proizvode također postoji razlika u usporedbi sa primjerice biljkama, odnosno žitaricama, koje su direktno izložene vremenskim prilikama i rastu plijesni, dok trajni mesni proizvodi zriju u komorama gdje neki od okolišnih čimbenika mogu biti i regulirani, iako to nije običaj u domaćinstvima, te mogu biti kontaminirani mikotoksinima i drugim putevima, preko kontaminiranih sirovina, posebice začina te *carry-over* efektom od kontaminirane stočne hrane (Pleadin i sur., 2013; Perši i sur., 2014). Zbog interakcije različitih čimbenika koji tijekom proizvodnje mesnih proizvoda mogu utjecati na biosintezu mikotoksina, zabilježene koncentracije ne mogu biti povezane isključivo s vremenskim čimbenicima.

### **5.5.2. Pojavnost mikotoksina prema vrsti trajnih proizvoda-tehnologiji proizvodnje i utjecaj tehnologije proizvodnje na pojavnost mikotoksina**

Uvjeti za proizvodnju mikotoksina su specifični i neovisni od onih koji potiču rast plijesni. Vrsta proizvoda razlikuje se se svojom tehnologijom proizvodnje te fizikalno-kemijskim svojstvima koja mogu utjecati na pojavnost mikotoksina.

Tablica 38. pokazuje podatke o pojavnosti mikotoksina u uzrocima TMP s obzirom na vrstu trajnih proizvoda - kobasice i suhomesnate proizvode, odnosno, tehnologiju proizvodnje i godinu uzorkovanja. Iako nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji pojedinih mikotoksina s obzirom na vrstu proizvoda (tablica 39.), 3 puta je veći broj uzoraka u kojima je OTA detektiran, a koji pripadaju skupini trajnih kobasica (75 %) u odnosu na trajne suhomesnate proizvode (25 %), dok je prosječna OTA koncentracija bila veća u suhomesnatim proizvodima ( $1,57 \pm 1,82 \mu\text{g/kg}$ ) u odnosu na kobasice ( $0,84 \pm 0,70 \mu\text{g/kg}$ ), iako ne statistički značajno. Općenito je veći broj uzoraka iz skupine trajnih kobasica kontaminiran mikotoksinima (59 %) u odnosu na skupinu trajnih suhomesnatih proizvoda (41 %). Sagledavajući svaki mikotoksin pojedinačno, ukupna pojavnost CPA i STC za obje godine podjednaka je u kobasicama i suhomesnatim proizvodima. Najveća koncentracija CPA i STC

određena je u kobasicama (335,50  $\mu\text{g/kg}$ , 3,93  $\mu\text{g/kg}$ ), a najveća koncentracija OTA u suhomesnatim proizvodima (4,81  $\mu\text{g/kg}$ ). Dosadašnja istraživanja o pojavnosti CPA u trajnim mesnim proizvodima govore o većoj koncentraciji u pršutima u odnosu na kobasice (Peromingo i sur., 2018; Vulić i sur., 2021; Lešić i sur., 2021). Kontaminacija OTA iznad preporučene razine za mikotoksine u mesnim proizvodima ( $< 1 \mu\text{g/kg}$ , Italija) podjednako se javlja u kobasicama i pršutima (14 % i 13 %) (Perrone i sur., 2019).

Relativno niske OTA razine u kobasicama mogu se objasniti i prisutnošću ovitaka, koji netaknuti mogu djelovati kao zaštitni sustav za kobasice (Pleadin i sur., 2015f). U istraživanju Rocanda i sur. (2020) OTA je detektiran u 25 % analiziranih ovitaka u koncentracijama do 98,52  $\mu\text{g/kg}$ , dok su jestivi dijelovi bili kontaminirani samo u 3 uzorka u koncentraciji većoj od 1  $\mu\text{g/kg}$ .

PCA analiza odnosa vrste proizvoda, odnosno tehnologije proizvodnje i pojavnosti mikotoksina STC, CPA i OTA, određenih u koncentracijama  $> \text{LOD}$  prema godini uzorkovanja, prikazana je na slikama 61. - 63. Parametari proizvodnje koji karakteriziraju svaki proizvod uključuju vrijeme zrenja u mjesecima (t), pH i  $a_w$  proizvoda te udio soli (%) u gotovom proizvodu. Prve dvije glavne komponente opisuju 40,67 % i 28,41 % varijance (69,08 % ukupne varijabilnosti) za proizvode kontaminirane OTA, 35,52 % i 21,30 % varijance (ukupno 56,82 %) za proizvode kontaminirane STC te 34,21 % i 26,11 % varijance (ukupno 60,32 %) za proizvode kontaminirane CPA.

Ispitana je i korelacija odnosa između parametara vrste proizvoda i određenih koncentracija pojedinog mikotoksina te je značajna pozitivna korelacija dobivena samo za udio soli i koncentraciju OTA ( $r_s=0,516$ ,  $p=0,014$ ) te ispada da su veće OTA koncentracije određene u proizvodima s većim udjelom soli. Dobiveno je u skladu s podatkom da povećanje koncentracije NaCl, ali i sastava prirodnog supstrata (proteinima) inducira biosintezu OTA, što očito dovodi do bolje prilagodbe na okolinu trajnih mesnih proizvoda zbog homeostaze klorida (Schmidt-Heydt i sur., 2011). Istraživanje Uraih i Chipley (1976) o utjecaju soli na rast producirajuće *A. flavus* pokazalo je da je koncentracija NaCl veća od 12 g/100 mL inhibirala rast *A. flavus* i proizvodnju AFB<sub>1</sub>, dok su pri 8 g/100 mL ili manje, rast i proizvodnja AFB<sub>1</sub> bili stimulirani.

*Aspergillus* i *Penicillium* vrste rastu i proizvode mikotoksine pri relativnoj vlažnosti od 80 do 90 %, odnosno, 80 % i manje. Tijekom skladištenja, ako vlažnost u okolišu premašuje ravnotežnu relativnu vlažnost hrane, hrana će postati vlažna i  $a_w$  hrane će se povećati. Povećanje  $a_w$  tijekom skladištenja povezano je s osjetljivošću na rast plijesni i proizvodnju mikotoksina. Općenito se smatra da je  $a_w$  veći od 0,78 pogodan za rast plijesni i proizvodnju

mikotoksina (Daou i sur., 2021). Vrijednosti  $a_w$  analiziranih skupina proizvoda nisu se statistički značajno razlikovale te su iznosile 0,84 što omogućava produkciju istraživanih mikotoksina.

Također se pokazalo da pH vrijednost utječe na ekspresiju biosintetskih gena. Učinak pH na proizvodnju određenih vrsta mikotoksina tek treba istražiti za svaku vrstu posebno, ali je dobro poznato da u većini slučajeva kiseliji uvjeti potiču stvaranje mikotoksina. Tako je, primjerice, za proizvodnju AFB<sub>1</sub> pogodna pH vrijednost 4,0 i u ovom slučaju, što je niži pH to je veća sinteza. Slično se opaža i za OTA gdje je mnogo veća koncentracija kada *A. ochraceus* raste u nižim rasponima pH (Daou i sur., 2021). Značajno kiseliji pH određen je za skupine trajnih kobasica ( $5,52 \pm 0,49$ ) u usporedbi sa suhomesnatim proizvodima ( $6,13 \pm 0,36$ ), koje ujedno imaju i veću pojavnost mikotoksina, iako značajna korelacija nije određena.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju rezultata provedenih istraživanja u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Razvijena i validirana LC-MS/MS metoda za detekciju i kvantifikaciju 5 mikotoksina (AFB<sub>1</sub>, OTA, STC, CIT i CPA) značajnih za mesne proizvode, potvrđna je metoda visoke osjetljivosti i točnosti za određivanje ovih mikotoksina u trajnim mesnim proizvodima.
2. Upotrebom razvijene i validirane LC-MS/MS multimikotoksinske metode određeni su STC, OTA i CPA, dok AFB<sub>1</sub> i CIT nisu detektirani u niti jednom analiziranom uzorku trajnih mesnih proizvoda, a istovremena pojavnost dva mikotoksina zabilježena je samo za OTA i CPA u 4 uzorka te za OTA i STC u 2 uzorka.
3. Pojavnost detektiranih mikotoksina je dovedena u vezu s podacima o regionalnim vremenskim prilikama tijekom zrenja proizvoda. Iako nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji pojedinih mikotoksina s obzirom na regiju proizvodnje mesnih proizvoda, postoji razlika u njihovoj pojavnosti.
4. Pojavnost detektiranih mikotoksina je dovedena u vezu sa tehnologijom proizvodnje tj. vrstom proizvoda. Iako nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji pojedinih mikotoksina s obzirom na vrstu proizvoda, postoji razlika u njihovoj pojavnosti. Općenito je veći broj uzoraka iz skupine trajnih kobasica kontaminiran mikotoksinima u odnosu na skupinu trajnih suhomesnatih proizvoda te je određen 3 puta veći broj uzoraka kontaminiranih s OTA iz skupine trajnih kobasica (75 %) u odnosu na trajne suhomesnate proizvode (25 %).
5. Ukupno je izolirano 535 izolata i identificirano 38 vrsta plijesni uz značajno veći broj izolata roda *Penicillium* (61 %) u odnosu na rod *Aspergillus* (39 %), ali podjednak broj vrsta: 18 roda *Penicillium* i 20 roda *Aspergillus*. Najzastupljenije vrste na uzorcima TMP bile su *A. proliferans* (20 %), *P. commune* (14 %), *P. solitum* (10 %) te *P. citrinum* (9 %).
6. Ukupno je identificirano 9 različitih potencijalno toksikotvornih vrsta plijesni: *A. flavus*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*, *A. welwitschie*, *A. tubingensis*, *P. nordicum*, *P. citrinum*, *P. commune* i *P. polonicum*. Od toga je 50 % identificiranih izolata potencijalnih AFB<sub>1</sub> producenata (*A. flavus*), 58 % izolata potencijalnih OTA producenata (*P. nordicum*, *A. westerdijkiae*, *A. tubingensis*), 71 % izolata potencijalnih CIT producenata (*P. citrinum*) te 48 % izolata potencijalnih CPA producenata (*P. commune*, *A. flavus*), odnosno 6 vrsta, imalo gene uključene u biosintezu mikotoksina te su se mogli smatrati producentima.

7. U 21 % uzoraka kontaminiranih nekim od detektiranih mikotoksina (STC, OTA ili CPA), određeni su njihovi producenti (koji posjeduju biosintetske gene) (*A. flavus*, *P. nordicum* i *P. commune*). Kontaminacija uzoraka u kojima producenti nisu identificirani može biti posljedica ili prethodne kontaminacije sastojaka trajnih mesnih proizvoda ili obrastanja producenata drugim vrstama plijesni na kraju faze zrenja spriječavajući na taj način njihovu detekciju.
8. Pojavnost broja i vrste identificiranih plijesni sa površine svih analiziranih proizvoda je dovedena u vezu sa podacima o regionalnim vremenskim čimbenicima tijekom zrenja proizvoda. Pokazalo se da se broj izolata plijesni nije značajno razlikovao među regijama, ali da postoji razlika u identificiranim i dominantnim vrstama. Južna regija je jedina regija koja ima određen veći broj *Aspergillus* izolata u odnosu na *Penicillium*. Određen je i značajno manji broj izolata u uzorcima uzorkovanim 2020. godine u odnosu na 2021. godinu.
9. Pojavnost broja i vrste identificiranih plijesni sa površine svih analiziranih proizvoda je dovedena u vezu s tehnologijom proizvodnje tj. vrstom proizvoda. Značajno veći broj izolata utvrđen je na trajnim suhomesnatim proizvodima u odnosu na trajne kobasice, uz podjednak broj identificiranih vrsta, kao posljedica prosječno dužeg zrenja trajnih suhomesnatih proizvoda u odnosu na kobasice.
10. Iz dobivenih rezultata istraživanja moći će se razviti preporuke proizvođačima koji proizvode ove proizvode u domaćinstvima ili na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima u cilju prevencije od kontaminacije ovih vrsta proizvoda nepoželjnim vrstama plijesni i mikotoksinima.
11. Primjena razvijene potvrdne metode velike preciznosti, s niskim razinama detekcije dat će doprinos u daljnjim istraživanjima pojavnosti ovih mikotoksina u mesnim proizvodima, a rezultati će se moći koristiti za izradu znanstvenog mišljenja, kao podloga nadležnim tijelima u području hrane za procjenu izloženosti ovim kontaminatima putem mesnih proizvoda koji predstavljaju značajan dio prehrane, procjenu rizika koje predstavljaju za zdravlje ljudi te za uspostavu najvećih dopuštenih količina mikotoksina u mesnim proizvodima, koje do sada zakonodavstvom nisu ustanovljene u zemljama Europske unije.



## **7. LITERATURA**

1. Adegbeye, M.J., Reddy, P.R.K., Chilaka, C.A., Balogun, O.B., Elghandour; M.M.M.Y., Rivas-Caceres, R.R., Salem, A.Z.M. (2020) Mycotoxin toxicity and residue in animal products: Prevalence, consumer exposure and reduction strategies – A review. *Toxicon* **177**, 96-108.
2. Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Varzakas, T. (2020) Advances in analysis and detection of major mycotoxins in foods. *Foods* **9**, 3-23.
3. Akbar, A., Medina, A., Magan, N. (2016) Impact of interacting climate change factors on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Circumdati* and *Nigri* species on coffee. *World Mycotoxin J.* **9**, 863-874.
4. Alapont, C., López-Mendoza, M.C., Gil, J.V., Martínez-Culebras, P.V. (2014) Mycobiota and toxigenic *Penicillium* species on two Spanish dry-cured ham manufacturing plants. *Food Addit. Contam. A* **31**, 93–104.
5. Alapont, C., Martinez-Culebras, P.V., Lopez-Mendoza, M.C. (2015) Determination of lipolytic and proteolytic activities of mycoflora isolated from dry-cured teruel ham. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 5250–5256.
6. Andersen, S. J. (1995) Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *J. Food Prot.* **58**, 426–429.
7. Ansari, P., Häubl, G. (2016) Determination of cyclopiazonic acid in white mould cheese by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) using a novel internal standard. *Food Chem.* **211**, 978–982.
8. Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Cabañes, F.J. (1994) Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2650-2652.
9. Asefa, D.T., Gjerde, R.O., Sidhu, M.S., Langsrud, S., Kure, C.F., Nesbakken, T., Skaar, I. (2009) Moulds contaminants on Norwegian dry – cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 435 – 439.
10. Asefa, D.T., Kure, C.F., Gjerde, R.O., Omer, M.K., Langsrud, S., Nesbakken, T., Skaar, I. (2010) Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. *Int. J. Food Microbiol.* **140**, 131-135.
11. Asefa, D.T., Kure, C.F., Gjerde, R.O., Langsrud, S., Omer, M.K., Nesbakken, T., Skaar, I. (2011) A HACCP plan for mycotoxigenic hazards associated with dry-cured meat production processes. *Food Control* **22**, 831-837.
12. Aziz, N.H., Youssef, A.Y. (1991) Occurrence of aflatoxins and aflatoxin-producing moulds in fresh and processed meat in Egypt. *Food Addit. Contam.* **8**, 321-331.

13. Bailly, J.D., Tabuc, C., Quérin, A., Guerre, P. (2005) Production and stability of patulin, ochratoxin A, citrinin, and cyclopiazonic acid on dry cured ham. *J.Food Prot.* **68**, 1516–1520.
14. Bailly, J. D., Guerre, P. (2009) Mycotoxins in meat and processed meat products. U: *Food microbiology and food safety - Safety of meat and processed meat* (Toldrá, F., ured.), Springer, New York, str. 83-124.
15. Barac, A. (2018) Mycotoxins and Human Disease. U: *Clinically Relevant Mycoses* (Presterl, I., ured.), Springer, Berlin, str. 213–225.
16. Battilani, P., Rossi, V., Giorni, P., Pietri, A., Gualla, A., Van der Fels-Klerx, H.J., Booij, C.J.H., Moretti, A., Logrieco, A., Toscano, P., i sur. (2012) Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. Scientific report submitted to EFSA. < <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-223>>. Pristupljeno 08. ožujka 2021.
17. Beaver, R.W., Wilson, D.M., James, M.A., Haydon, K.D., Colvin, B.M., Sangster, L.T., Pikul, A.H., Groopman, J.D. (1990) Distribution of Aflatoxins in Tissues of Growing Pigs Fed an Aflatoxin-Contaminated diet amended with a High-Affinity Aluminosilicate Sorbent. *Vet. Hum. Toxicol.* **32**, 16-18.
18. Bertuzzi, T., Gualla, A., Morlacchini, M., Pietri, A. (2013) Direct and indirect contamination with ochratoxin A of ripened pork products. *Food Control* **34**, 79-83.
19. Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Rodríguez, M., Cordero, M., Polo, L., Rodríguez, A. (2013) Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage “salchichón”. *Food Control* **32**, 69–76.
20. Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J. (2007) Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* **137**, 265-282.
21. Bogdanović, T., Pleadin, J., Vahčić, N., Petričević, S. (2016) Chemical and sensorial properties of fermented meat products. U: *Fermented Meat Products: Health Aspects* (Zdolec, N., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 359-388.
22. Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., i sur. (2012) Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* **154**, 87–97.
23. Bullerman, L.B., Bianchini, A. (2007) Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 140-146.

24. Burdock, G.A., Flamm, W.G. (2000) Safety Assessment of the Mycotoxin Cyclopiazonic Acid. *Int. J. Toxicol.* **19**, 195-218.
25. Caceres, I., Al Khoury, A., El Khoury, R., Lorber, S.P., Oswald, I., El Khoury, A., Atoui, A., Puel, O., Bailly, J.D. (2020) Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review. *Toxins* **12**, 150.
26. Canel, R.S., Wagner, J.R., Stenglein, S.A., Ludemann, V. (2013) Indigenous filamentous fungi on the surface of Argentinean dry fermented sausages produced in Colonia Caroya (Cordoba). *Int. J. Food Microbiol.* **164**, 81-86.
27. Chang P.K., Ehrlich K.C., Fujii I. (2009) Cyclopiazonic Acid Biosynthesis of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Toxins* **1**, 74-99.
28. Chen, G., Li-Kang Zhang, Birendra N. Pramanik. (2007) LC/MS: Theory, instrumentatation, and applications to small molecules. U: *HPLC for pharmaceutical scientists* (Kazakevich, J., LoBrutto, R., ured.), John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
29. Chin, D., Means, A.R. (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor?. *Trends Cell Biol.* **10**, 322–328.
30. Cindrić, M., Marković, A., Horvatić, A. (2009) Spregnute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* **45**, 218-232.
31. Cleveland, T.E., Yu, J., Fedorova, N., Bhatnagar, D., Payne, G.A., Nierman, W.C., Bennett J.W. (2009) Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* **27**, 151-157.
32. Comi, G., Orlić, S., Redžepović, S., Urso, R., Iacumin, L. (2004) Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *Int. J. Food Microbiol.* **96**, 29-34.
33. Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Canttaneo, P., Cantoni, C., Cocolin, L. (2005) Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Sci.* **69**, 381-392.
34. Comi, G., Iacumin, L. (2013) Ecology of moulds during the pre-ripening and ripening of San Daniele dry cured ham. *Food Research Int.* **54**, 1113–1119.
35. Criseo, G., Bagnara, A., Bisignano, G. (2001) Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**, 291–295.
36. Dada, T.A., Ekwomadu, T.I., Mwanza, M. (2020) Multi Mycotoxin Determination in Dried Beef Using Liquid Chromatography Coupled with Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Toxins* **12**, 357.

37. Dall'Asta, C., Galaverna, G., Bertuzzi, T., Moseriti, A., Pietri, A., Dossena, A., Marchelli, R. (2010) Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chem.* **120**, 978-983.
38. Danilović, B., Savić, D. (2017) Microbial ecology of fermented sausages and dry-cured meats. U: *Fermented meat products* (Zdolec, N., ured.), CRC press, Boca Raton, str. 127-166.
39. Dao, H.P., Mathieu, F., Lebrihi A. (2005) Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *Int. J. Food Microbiol.* **104**, 61–70.
40. Daou, R., Joubrane, K., Maroun, R.G., Khabbaz, L. R., Ismail, A., El Khour, A. (2021) Mycotoxins: Factors influencing production and control. *Agriculture and Food* **6**, 416-447.
41. Davis N.D. (1981) Sterigmatocystin and other mycotoxins produced by *Aspergillus* Species. *J. Food Prot.* **44**, 711-714.
42. Delaš, F. (2010) Mikrobni toksini. U: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani* (Hengl, B., ured.), Hrvatska agencija za hranu, Osijek, str. 31-49.
43. Delgado, J., Peromingo, B., Rodríguez, A., Rodríguez, M. (2019) Biocontrol of *Penicillium griseofulvum* to reduce cyclopiazonic acid contamination in dry-fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **293**, 1–6.
44. Diaz G.J., Thompson, W., Martos, P.A. (2010) Stability of cyclopiazonic acid in solution. *World Mycotoxin J.* **3**, 25-33.
45. DHMZ (2022) Ocjena mjeseca, sezone, godine, <[https://meteo.hr/klima.php?section=klima\\_pracenje&param=ocjena](https://meteo.hr/klima.php?section=klima_pracenje&param=ocjena)>. Pristupljeno 10. veljače 2022.
46. Domijan, A. M., Pleadin, J., Mihaljević, B., Vahčić, N., Frece, J., Markov, K. (2015) Reduction of ochratoxin A in dry-cured meat products using gamma irradiation. *Food Addit. Contam. A* **32**, 1185-1191.
47. Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. (2007) Compendium of Soil Fungi, IHW-Verlag, Eching.
48. Duraković, S., Duraković, L. (2003) *Mikologija u biotehnologiji*, Kugler, Zagreb.
49. EFSA (2006) Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to ochratoxin A in food. *EFSA J.* **365**, 1-56.
50. EFSA (2012) Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA J.* **10**, 2605.

51. EFSA (2013) Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA J.* **11**, 3254.
52. EFSA (2020) Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA J.* **18**, 6040.
53. el Khoury, A., Atoui, A. (2010) Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins* **2**, 461-493.
54. Elias, M., Carrascosa, A.V. (2010) Characterisation of the Paio do Alentejo, a traditional Portuguese Iberian sausage, in respect to its safety. *Food Control* **21**, 97-102.
55. EC (2006a) Commission Regulation No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. OJEU L70, 12-34.
56. EC (2006b) Uredba komisije br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani. OJEU L364.
57. EC (2021) Provedbena uredba Komisije (EU) 2021/808 od 22. ožujka 2021. o provođenju analitičkih metoda za rezidue farmakološki djelatnih tvari koje se upotrebljavaju na životinjama koje se koriste za proizvodnju hrane i o tumačenju rezultata kao i o metodama koje treba primjenjivati za uzorkovanje te o stavljanju izvan snage odluka 2002/657/EZ i 98/179/EZ. OJEU L 180, 84-109.
58. Flajs, D., Mladinić, M., Željezić, D., Peraica, M. (2011) Citrinin potentiates ochratoxin A toxicity. *Toxicol. Lett.* **205**, 220-221.
59. Flores, M. (2011) Sensory descriptors for dry-cured meat products. U: *Sensory Analysis of Foods of Animal Origin* (Nolet, L.M., Toldra, F., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 173–190.
60. Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of the food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* **49**, 1–173.
61. Frisvald, J.C. (2011) Rationale for a polyphasic approach in the identification of mycotoxigenic fungi. U: *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed* (De Saeger, S., ured.), Woodhead Publishing limited, Cambridge, str. 280-296.
62. Gambacorta, L., Magistà, D., Perrone, G., Murgolo, S., Logrieco, A.F., Solfrizzo, M. (2018) Co-occurrence of toxigenic moulds, aflatoxins, ochratoxin A, *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in fresh sweet peppers (*Capsicum annuum*) and their processed products. *World Mycotoxin J.* **11**, 159–174.
63. Geisen, R. (1996) Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematic Appl. Microbiol.* **19**, 388–392.

64. Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A., Färber, P.F. (2004) Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic Appl. Microbiol.* **27**, 501–507.
65. Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Karolewicz, A. (2006) A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. *Mycotoxin Res.* **22**, 134–141.
66. Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Touhami, N., Himmelsbach, A. (2018) New aspects of ochratoxin A and citrinin biosynthesis in *Penicillium*. *Curr. Opin. Food Sci.* **23**, 23-31.
67. Geiser, D., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T., Zhang, N., Kuldau, G. O'Donnell, K. (2004) *Fusarium-ID* v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant. Pathol.* **110**, 473–479.
68. Hajjaj, H., Klaébé, A., Loret, M.O., Goma, G., Blanc, P.J., François J. (1999) Biosynthetic Pathway of citrinin in the Filamentous Fungus *Monascus ruber* as Revealed by <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 311-314.
69. Hamad, S.H. (2012) Factors Affecting the growth of Microorganisms in food. U: *Progress in food preservation* (Bhat, R., Alias, A.K., Paliyath, G. , ured.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, str. 405-427.
70. Hubka, V., Kolarik, M. (2012)  $\beta$ -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persooni* **29**, 1-10.
71. Hussein, H.S., Brasel, J.M. (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167**, 101-134.
72. Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlić, S., Comi, G. (2009) Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiol.* **26**, 65-70.
73. Iacumin, L., Milesi, S., Pirani, S., Comi, G., Chiesa, L.M. (2011) Ochratoxigenic mold and ochratoxin a in fermented sausages from different areas in Northern Italy: Occurrence, reduction or prevention with ozonated air. *J. Food Saf.* **31**, 538-545.
74. IARC (1986) Citrinin. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC - International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
75. 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. IARC - International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

76. IARC (2002) Aflatoxins. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC - International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
77. Kamle, M., Mahato, D.K., Gupta, A., Pandhi, S., Sharma, N., Sharma, B., Mishra, S., Arora, S., Selvakumar, R., Saurabh, V., Dhakane-Lad, J., Kumar, M., Barua, S., Kumar, A., Gamlath, S., Kumar, P. (2022) Citrinin Mycotoxin Contamination in Food and Feed: Impact on Agriculture, Human Health, and Detection and Management Strategies. *Toxins* **14**, 85.
78. Katušić Hećimović, S. (2007) Analiza DNA i RNA uporabom lančane reakcije polimerazom (PCR). Osnovna metoda PCR. U: *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, str. 361 – 362.
79. Kazakevich, J., LoBrutto, R. (2007) HPLC Theory and Practice, Introduction. U: *HPLC for pharmaceutical scientists* (Kazakevich, J., LoBrutto, R., ured.), John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
80. Kiš, M., Vulić, A., Kmetič, I., Lešić, T., Murati, T., Pleadin, J. (2019) Ciklopiazonična kiselina: toksičnost i pojavnost nedovoljno istraženog mikotoksina. *CJFST* **14**, 33-38.
81. Kos, J., Janić Hajnal, E., Šarić, B., Jovanov, P., Mandić, A., Đuragić, O., Kokić, B. (2018) Aflatoxins in maize harvested in Republic of Serbia over the period 2012–2016. *Food Addit. Contam. B.* **11**, 246–255.
82. Kovač, M. (2020). Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
83. Kovačević, D. (2014) *Technology of Kulen and other fermented sausages*, University of J.J. Strossmayer, Faculty of Food Technology, Osijek.
84. Kovačević, D. (2017) *Kemija i tehnologija šunki i pršuta*, Prehrambeno- tehnološki fakultet, Osijek, Hrvatska.
85. Kovačević, D. Mastanjević, K., Šubarić, D., Jerković, I., Marijanović, Z. (2010) Physico-chemical, colour and textural properties of Croatian traditional dry sausage (Slavonian Kulen). *Meso* **12**, 270-275.
86. Krueve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M.L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., Leito, I. (2015) Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Anal. Chim. Acta* **870**, 29-44.



87. Kudumija, N., Vulić, A., Lešić, T., Vahčić, N., Pleadin, J. (2020) Aflatoxins and ochratoxin A in dry-fermented sausages in Croatia, by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. B.* **13**, 225-232.
88. Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A.C., Potes, M.E., Cabrita, M.J., Garcia, R., Rocha, J.M., Roseiro, L.C., Fernandes, M.J., Fernandes, M.H., Fraqueza, M.J., Elias, M. (2016) Characterisation of „Catalao“ and „Salsichao“ Portuguese traditional sausages with salt reduction. *Meat Sci.* **116**, 34-42.
89. Lešić, T., Kmetič I., Kiš, M., Vulić, A., Kudumija, N., Zadavec, M., Murati, T., Pleadin, J. (2019) Sterigmatocistin – prekursor aflatoksina B<sub>1</sub> u hrani i hrani za životinje. *HČPTBN* **14**, 105-112.
90. Lešić, T., Vahčić, N., Kos, I., Zadavec, M., Sinčić Pulić, B., Bogdanović, T., Petričević, S., Listeš, E., Škrivanko, M., Pleadin, J. (2020) Characterization of Traditional Croatian Household- Produced Dry- Fermented Sausages. *Foods* **9**, 990.
91. Lešić, T., Vahčić, N., Kos, I., Zadavec, M., Milićević, D., Perković, I., Listeš, E., Pleadin, J. (2021a) The Influence of Surface Mycobiota on Sensory Properties of “Istarski pršut” and “Dalmatinski pršut”. *Processes* **9**, 1-15.
92. Lešić, T., Zadavec, M., Zdolec, N., Vulić, A., Perković, I., Škrivanko, M., Kudumija, N., Jakopović, Ž., Pleadin, J. (2021b) Mycobiota and Mycotoxin Contamination of Traditional and Industrial Dry-Fermented Sausage Kulen. *Toxins* **13**, 1-13.
93. Liu, B.H., Yu, F.Y., Wu, T.S., Li, A.Y., Su, M.C., Wang, M.C., Shih, S.M. (2003) Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **191**, 255-263.
94. Luque, M.I., Cordoba, J.J., Rodriguez, A., Nunez, F., Andrade, M.J. (2013) Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products. *Food Control* **29**, 270-278.
95. Magista, D., Susca, A., Ferrara, M., Logrieco, A.F., Perrone, G. (2017) *Penicillium* species: crossroad between quality and safety of cured meat production. *Curr. Opin. Food Sci.* **17**, 36-40.
96. Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., Toman, J. (2016) Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins* **8**, 191.
97. Mandeel, Q.A. (2005) Fungal contamination of some imported spices. *Mycopat.* **159**, 291-298.

98. Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalek, D., Frece, J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control* **34**, 312-317.
99. Martín, A., Córdoba, J.J., Núñez, F., Benito, M.J., Asensio, M.A. (2004) Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 55-66.
100. Martín, A., Córdoba, J. J., Aranda, E., Córdoba, M.G., Asensio, M.A. (2006) Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* **110**, 8 - 18.
101. Marušić Radovčić, N., Vidaček, S., Janči, T., Medić, H. (2016) Characterization of volatile compounds, physico-chemical and sensory characteristics of smoked dry-cured ham. *J. Food Sci. Technol.* **53**, 4093–4105.
102. Marušić, N., Petrović, M., Vidaček, S., Petrak, T., Medić, H. (2011) Characterization of traditional Istrian dry-cured ham by means of physical and chemical analyses and volatile compounds. *Meat Sci.* **88**, 786-790.
103. Meerpoel, C., Vidal, A., Tangni, E.K., Huybrechts, B., Couck, L., De Rycke, R., De Bels, L., De Saeger, S., Van den Broeck, W., Devreese, M., Croubels, S. A. (2020) Study of Carry-Over and Histopathological Effects after Chronic Dietary Intake of Citrinin in Pigs, Broiler Chickens and Laying Hens. *Toxins* **12**, 719.
104. Medina A., Rodriguez A., Magan N. (2014) Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B<sub>1</sub> production. *Front. Microbiol.* **5**, 1-6.
105. MP (2014a) Specifikacija proizvoda Slavonski kulen, <[https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/101/Izmijenjena\\_Specifikacija\\_proizvoda\\_slavonski\\_kulen.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/101/Izmijenjena_Specifikacija_proizvoda_slavonski_kulen.pdf)>. Pristupljeno 23. listopada 2021.
106. MP (2014b) Specifikacija proizvoda Baranjski kulen, <[https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/102/Izmijenjena\\_Specifikacija\\_proizvoda\\_Baranjski\\_kulen.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/102/Izmijenjena_Specifikacija_proizvoda_Baranjski_kulen.pdf)>. Pristupljeno 23. listopada 2021.
107. MP (2014c) Specifikacija proizvoda Krčki pršut, <[https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/105/2016-6-16\\_-\\_Krcki\\_prsut\\_-\\_Izmijenjena\\_specifikacija\\_proizvoda.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/105/2016-6-16_-_Krcki_prsut_-_Izmijenjena_specifikacija_proizvoda.pdf)>. Pristupljeno 23. listopada 2021.
108. MP (2014d) Specifikacija proizvoda Istarski pršut, <[https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/97/Izmijenjena\\_Specifikacija\\_proizvoda\\_Istarski\\_prsut-Istrski\\_prsut.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/97/Izmijenjena_Specifikacija_proizvoda_Istarski_prsut-Istrski_prsut.pdf)>. Pristupljeno 23. listopada 2021.

109. MP (2015a) Specifikacija proizvoda Dalmatinski pršut, <https://www.prsut-vostane.hr/hr/specifikacija-dalmatinski-prsut.pdf>>. Pristupljeno 23. listopada 2021.
110. MP (2015b) Specifikacija proizvoda Drniški pršut, <[https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/104/SPECIFIKA\\_CIJA\\_PROIZVODA\\_-\\_Drniski\\_prsut\\_izmjena.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/104/SPECIFIKA_CIJA_PROIZVODA_-_Drniski_prsut_izmjena.pdf)>. Pristupljeno 23. listopada 2021.
111. MP (2018) Pravilnik o mesnim proizvodima, <[https://narodnenovine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2018\\_07\\_62\\_1292.htm](https://narodnenovine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2018_07_62_1292.htm)>. Pristupljeno 20. siječnja 2020.
112. MP (2019a) Specifikacija proizvoda Dalmatinska panceta, <[https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/hrana/proizvodi\\_u\\_postupku\\_z\\_astite-zoi-zozpzs/Specifikacija%20proizvoda%20Dalmatinska%20panceta%202019..pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/hrana/proizvodi_u_postupku_z_astite-zoi-zozpzs/Specifikacija%20proizvoda%20Dalmatinska%20panceta%202019..pdf)>. Pristupljeno 23. listopada 2021.
113. MP (2019b) Specifikacija proizvoda Dalmatinska pečenica, <[https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/hrana/proizvodi\\_u\\_postupku\\_z\\_astite-zoi-zozp-zts/Specifikacija%20proizvoda%20Dalmatinska%20pe%C4%8Denica%202019.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/hrana/proizvodi_u_postupku_z_astite-zoi-zozp-zts/Specifikacija%20proizvoda%20Dalmatinska%20pe%C4%8Denica%202019.pdf)>. Pristupljeno 23. listopada 2021.
114. MP (2020) Specifikacija proizvoda Slavonska kobasica, <<https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/hrana/zoi-zozp-zts/dokumenti-zoi-zozp-zts/SPECIFIKACIJA%20SLAVONSKA%20KOBASICA.pdf>>. Pristupljeno 23. listopada 2021.
115. Moldes-Anaya, A.S., Asp, T.N., Eriksen, G.S., Skaar, I., Rundberget, T. (2009) Determination of cyclopiazonic acid in food and feeds by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1216**, 3812–3818.
116. Munaut, F., Van Hove, F. (2011) Molecular identification of mycotoxigenic fungi in food and feed. U: *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed* (De Saeger, S., ured.), Woodhead Publishing limited, Cambridge, str. 298-329.
117. Núñez, F., Rodríguez, M.M., Bermúdez, M.E., Córdoba, J.J., Asensio, M.A. (1996) Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *Int. J. Food Microbiol.* **32**, 185–197.
118. O’Callaghan, J., Stapleton, P.C., Dobson A.D.W. (2006) Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics Biol.* **43**, 213–221.

119. Okuda, T., Klich, M.A., Seifert, K.A., Ando, K. (2000) Media and incubation effect on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. U: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (Samson R.A., Pitt J.I., ured.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, str. 83-99.
120. Ostry, V., Toman, J., Grosse, Y., Malir, F. (2018) Cyclopiazonic acid: 50th anniversary of its discovery. *World Mycotoxin J.* **11**, 135–148.
121. Papagianni, M., Ambrosiadis, I., Filiouis, G. (2007) Mould growth on traditional Greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. *Meat Sci.* **76**, 653–657.
122. Peromingo, B., Rodriguez, M., Nunez, F., Silva, A., Rodriguez A. (2018) Sensitive determination of cyclopiazonic acid in dry-cured ham using a QuEChERS method and UHPLC–MS/MS. *Food Chem.* **263**, 275-282.
123. Peromingo, B., Rodríguez, A., Delgado, J., Cordoba, J.J., Rodríguez, M. (2019) Relationship between cyclopiazonic acid production and gene expression in *Penicillium griseofulvum* under dry-cured ham processing environmental conditions. *Mycotoxin Res.* **35**, 353–361.
124. Perrone, G., Rodriguez, A., Magistà, D., Magan, N. (2019) Insights into existing and future fungal and mycotoxin contamination of cured meats. *Curr. Opin. Food Sci.* **29**, 20–27.
125. Perši, N., Pleadin, J., Kovačević, D., Scortichini, G., Milone, S. (2014) Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. *Meat Sci.* **96**, 203-210.
126. Petričević, S., Marušić Radovčić, N., Lukić, K., Listeš, E., Medić, H. (2018) Differentiation of dry-cured hams from different processing methods by means of volatile compounds, physico-chemical and sensory analysis. *Meat Sci.* **137**, 217-227.
127. Pickova, D., Ostry V., Malir J., Toman J., Malir F. (2020) Review on mycotoxins and microfungi in spices in the light of the last five years. *Toxins* **12**, 789.
128. Pitt, J.I. (1979) *The genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*, Academic Press, London.
129. Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009) *Fungi and Food Spoilage*, 3. izd., Springer, New York.
130. Pitt, J.J. (2009) Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* **30**, 19-34.
131. Pleadin, J., Perši, N., Kovačević, D., Vahčić, N., Scortichini, G., Milone, S. (2013) Ochratoxin A in traditional dry-cured meat products produced from subchronic-exposed pigs. *Food Addit. Contam. Part A* **30**, 1827-1836.

132. Pleadin, J., Vahčić, N., Perši, N., Kovačević, D. (2013) Varijabilnost fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava autohtonih mesnih proizvoda između proizvodnih domaćinstava. *Meso* **15**, 122-131.
133. Pleadin, J., Perši, N., Kovačević, D., Vulić, A., Frece, J., Markov, K. (2014) Ochratoxin A reduction in meat sausages using processing methods practiced in households. *Food Addit. Contam. B* **7**, 239-246.
134. Pleadin, J., Malenica Staver, M., Vahčić, N., Kovačević, D., Milone, S., Saftić, L., Scortichini, G. (2015a) Survey of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. *Food Control* **52**, 71-77.
135. Pleadin, J., Kudumija, N., Frece, J., Petrović, D., Markov, K. (2015b) Citrinin u hrani i hrani za životinje. *HČPTBN* **11**, 84-90.
136. Pleadin, J., Kovačević, D., Perši, N. (2015c) Ochratoxin A contamination of the autochthonous dry-cured meat product “Slavonski Kulen” during a six-month production process. *Food Control* **57**, 377-384.
137. Pleadin, J., Koprivnjak, O., Krešić, G., Gross-Bošković, A., Buzjak Služek, V., Tomljanović, A., Kovačević, D. (2015d) Dnevni unos soli putem tradicionalnih mesnih proizvoda u Hrvatskoj. *Meso* **6**, 534 - 540.
138. Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., Cvetnić, Ž. (2015e) Annual and regional variations of aflatoxin B<sub>1</sub> levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control* **47**, 221–225.
139. Pleadin, J., Kovačević, D., Perković, I. (2015f) Impact of casing damaging on aflatoxin B<sub>1</sub> concentration during the ripening of dry-fermented meat sausages. *J. Immunoassay Immunochem.* **36**, 655-666.
140. Pleadin, J., Kudumija, N., Kovačević, D., Scortichini, G., Milone, S., Kmetič, I. (2016) Comparison of ochratoxin A levels in edible pig tissues and in biological fluids after exposure to a contaminated diet. *Mycotoxin Res.* **32**, 145–155.
141. Pleadin, J., Zadavec, M., Brnić, D., Perković, I., Škrivanko, M., Kovačević, D. (2017) Moulds and mycotoxins detected in the regional speciality fermented sausage ‘slavonski kulen’ during a 1-year production period. *Food Adit. Contam. A* **34**, 282-290.
142. Pleadin, J., Vasilj, V., Petrović, D. (2018) *Mikotoksini – Pojavnost, prevencija i redukcija*, Sveučilište u Mostaru, Mostar.

143. Pleadin, J., Zadavec, M., Lešić, T., Frece, J., Vasilj, V., Markov, K. (2020) Klimatske promjene - Potencijalna prijetnja još znatnijoj pojavnosti mikotoksina. *Veterinarska stanica* **51**, 659-671.
144. Pleadin, J., Lešić, T., Milićević, D., Markov, K., Šarkanj, B., Vahčić, N., Kmetič, I., Zadavec, M. (2021) Pathways of Mycotoxin Occurrence in Meat Products: A Review. *Processes* **9**, 1-14.
145. Prado, N., Sampayo, M., Gonzalez, P., Lombo, F., Diaz, J. (2019) Physicochemical, sensory and microbiological characterisation of Asturian Chorizo, a traditional fermented sausage manufactured in Northern Spain. *Meat Sci.* **156**, 118-124.
146. Purchase, I.F.H. (1971) The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **18**, 114-123.
147. Purchase, I.F.H., Van der Watt, J.J. (1969) Acute toxicity of sterigmatocystin to rats. *Food Cosmet. Toxicol.* **7**, 135-139.
148. Purchase, I.F.H., Van der Watt J.J. (1970) Carcinogenicity of sterigmatocystin. *Food Cosmet. Toxicol* **8**, 289-295.
149. Rahmani, A., Jinap, S., Soleimany, F. (2009) Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **8**, 202-251.
150. Raja, A.H., Miller, A.N., Pearce, C.J., Oberlies, N.H. (2017) Fungal identification using molecular tools. a primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod.* **80**, 756-770.
151. Raper, K.B., Fennell, D.I. (1965) *The Genus Aspergillus*, Williams and Wilkins, Baltimore.
152. Rason, J., Laquet, A., Berge, P., Dufour, E., Lebecque, A. (2007) Investigation of the physicochemical and sensory homogeneity of traditional French dry sausage. *Meat Sci.* **75**, 359-370.
153. Razzazi-Fazeli, E., Reiter, E.V. (2011) Sample preparation and clean up in mycotoxin analysis: principles, applications and recent developments. U: *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed* (De Saeger, S., ured.), Woodhead Publishing Series, Cambridge, str. 37-70.
154. Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.J., Larondelle, Y. (2006) Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem. Biol. Interact.* **159**, 18-46.
155. Rodríguez, A., María L. Werning, Mar Rodríguez, Elena Bermúdez, Juan J. Córdoba (2012a) Quantitative real-time PCR method with internal amplification control to quantify cyclopiazonic acid producing molds in foods. *Food Microbiol.* **32**, 397-405.

156. Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Nuñez, F., Córdoba, J. J. (2012b) Evaluation of hazard of aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control* **27**, 118-126.
157. Rodrigues, P., Silva, D., Costa, P., Abrunhosa, L., Venancio, A., Teixeira, A. (2019) Mycobiota and mycotoxins in Portuguese pork, goat and sheep dry-cured hams. *Mycotoxin Res.* **35**, 405–412.
158. Roncada, P., Altafini, A., Fedrizzi, G., Guerrini, A., Polonini, G.I., Caprai, E. (2020) Ochratoxin A contamination of the casing and the edible portion of artisan salamis produced in two Italian regions. *World Mycotoxin J.* **13**, 553-562.
159. Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. Andersen, B. (2019) *Food and Indoor Fungi*, 2. izd., Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht.
160. Samson, R.A., Varga, J. (2007) *Aspergillus* systematics in the genomic era. *Stud. Mycol.* **59**, 1–206.
161. Saxena J., Mehrotra B. (1989) Screening of spices commonly marketed in India for natural occurrence of mycotoxins. *J. Food Compost. Anal.* **2**, 286-292.
162. Schmidt-Heydt, M., Graf, E., Batzler, J., Geisen, R. (2011) The application of transcriptomics to understand the ecological reasons of ochratoxin a biosynthesis by *Penicillium nordicum* on sodium chloride rich dry cured foods. *Trends Food Sci. Technol.* **22**, 39-48.
163. Shimizu, T., Kinoshita, H., Nihira, T. (2007) Identification and *in vivo* functional analysis by gene disruption of ctnA, an activator gene involved in citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Appl. Environ. Microb.* **73**, 5097-5103.
164. Sonjak, S., Ličen, M., Frisvald, J.C., Gunde-Cimerman, N. (2011) The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. *Food Microbiol.* **28**, 373-376.
165. Sosa, M.J., Córdoba, J.J., Díaz, C., Rodríguez, M.A.R., Bermúdez, E., Asensio, M.A., Núñez, F. (2002) Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* isolated from dry-cured ham on a meat extract-based substrate. *J. Food Prot.* **65**, 988 – 992.
166. Sørensen, L.M., Frisvad, J.C., Nielsen, P.V., Lametsch, R., Koch, A.G., Jacobsen, T. (2009) Filamentous fungi on meat products, their ability to produce mycotoxins and a proteome approach to study mycotoxin production. Doktorska disertacija. <<http://orbit.dtu.dk/files/5022914/Marie%20S%C3%B8rensen%20til%20tryk.pdf>>.  
Pristupljeno 13.travnja 2021.

167. Sørensen, L.M., Mogensen, J., Nielsen, K.F. (2010) Simultaneous determination of ochratoxin A, mycophenolic acid and fumonisin B2 in meat products. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 1535–1542.
168. Spanjer, M.C. (2011) Mass spectrometry in multi-mycotoxin and fungal spore analysis. U: *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed* (De Saeger, S., ured.), Woodhead Publishing Series, Cambridge, str. 37-70.
169. Storari, M., Bigler, L., Gessler, C., Brogгинi, G.A.L. (2012) Assessment of the ochratoxin A production ability of *Aspergillus tubingensis*. *Food Addit. Contam. A* **29**, 1450-1454.
170. Susca, A., Proctor, R.H., Butchko, R.A., Haidukowski, M., Stea, G., Logrieco, A., Moretti, A. (2014) Variation in the fumonisin biosynthetic gene cluster in fumonisin-producing and nonproducing black aspergilli. *Fungal Genet. Biol.* **73**, 39-52.
171. Sunesen, L.O., Stahnke, L.H. (2003) Mould starter cultures for dry sausages-selection, application and effects. *Meat Sci.* **65**, 935–948.
172. Tittlemier, S., Brunkhorst, J., Cramer, B., DeRosa, M.C., Lattanzio, V.M.T., Malone, R., Maragos, C., Stranska, M. (2021) Developments in mycotoxin analysis: An update for 2019 - 2020. *World Mycotoxin J.* **14**, 3–26.
173. Touhami, N. (2018) Doktorska disertacija. Karlsruhe institut za tehnologiju.
174. Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. (2009) Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta* **632**, 168-180.
175. Uraih, N., Chipley, J.R. (1976) Effects of various acids and salts on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* NRRL 3145. *Microbios.* **17**, 51-59.
176. Van der Watt, J.J. (1974) Sterigmatocystin. U: *Mycotoxins* (Purchase I.F.H., ured.), Elsevier Scientific Pub.Co., New York, str. 370-382.
177. Versilovskis A., De Saeger S. (2010) Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods- an overview. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 136-147.
178. Viegas, C., Nurme, J., Pieckova, E., Viegas, S. (2020) Sterigmatocystin in foodstuffs and feed: aspects to consider. *Mycology* **11**, 91-104.
179. Vila, G., Segura, J.A., Ludemann, V., Pose, G.N. (2019) Surface mycobiota of home-made dry cured sausages from the main producing regions of Argentina and morphological and biochemical characterization of *Penicillium nalgiovense* populations. *Int. J. Food Microbiol.* **309**, 108312.



180. Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A. (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* **78**, 343-371.
181. Völkel, I., Schröer-Merker, E., Czerny C.P. (2011) The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with specialr to its implications for the European Food Safety Legislation. *Food Nutr. Sci.* **2**, 852-867.
182. Vulić, A., Lešić, T., Kudumija, N., Zadavec, M., Kiš, M., Vahčić, N., Pleadin, J. (2021) The development of LC-MS/MS method of determination of cyclopiazonic acid in dry-fermented meat products. *Food Control* **123**, 107814.
183. Wang, D.S., Sun H.L., Xiao, F.Y., Ji, X.H., Liang, Y.X., Han, F.G. (1991) Distribution and excretion of 3H-sterigmatocystin in rats. IARC Scientific Publications, 424-426.
184. Wenzl, T., Haedrich, J., Schaechtele, A., Robouch, P., Stroka, J. (2016) Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food. Publications Office of the European Union, EUR 28099.
185. Wheeler, K.A., Hurdman, B.F., Pitt, J.I. (1991) Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 141-149.
186. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. U: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. White, T.J., ured.), Academic Press, San Diego, str. 315-322.
187. Xu, B., Jia, X., Gu, L., Sung, C. (2006) Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control* **17**, 271-285.
188. Yabe, K., Nakajima, H. (2004) Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 745-755.
189. Yang, Z.Y., Shim, W.B., Kim, J.H., Park, S.J., Kang, S.J., Nam, B.S., Chung D.H. (2004) Detection of aflatoxin-producing molds in Korean fermented foods and grains by multiplex PCR. *J. Food Protect.* **67**, 2622–2626.
190. Yoshinari, T., Takeuchi, H., Kosugi, M., Taniguchi, M., Waki, M., Hashiguchi, S., Fujiyoshi, T., Shichinohe, Y., Nakajima, M., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y., Sugita-Konishi, Y. (2019) Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. *Food Addit Contam. A* **36**, 1404-1410.

191. Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P., Bennett, J.W. (2004) Clustered pathway genes in aflatoxin Biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1253-1262.
192. Yu, J.J., Bhatnagar, D. Cleveland, T.E. (2004) Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS Lett.* **564**, 126–130.
193. Zadravec, M., Markov, K., Frece, J., Perković, I., Jakopović, Ž., Lešić, T., Mitak, M., Pleadin, J. (2019) Toxicogenic fungi and the occurrence of mycotoxins in traditional meat products. *CJFSC* **11**, 272-282.
194. Zadravec, M., Lešić, T., Perković, I., Jakopović, Ž., Vahčić, N., Jaki Tkalec, V., Pleadin, J. (2021) Differences in the mycoflora of dry-fermented sausages casings before and after six months of refrigerated storage. *Veterinarska stanica* **52**, 141-147.
195. Zadravec, M., Vahčić, N., Brnić, D., Markov, K., Frece, J., Beck, R., Lešić, T., Pleadin, J. (2020) A study of surface moulds and mycotoxins in Croatian traditional dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **317**, 108459.
196. Živković, 1986. Higijena i tehnologija mesa, Gro tipografija, Đakovo i Veterinarija, Zagreb.

## **8. PRILOZI**

**PRILOG 1 - Dobivene sekvence za svaku vrstu netoksikotvorne plijesni nakon sekvencioniranja i obrade**

**1) *P. roqueforti***

GATGAACCCGTTGTTATCACGATCGAAGACCTTGAATGCCTCGCGAATCTCCTCC  
TCGGAATCGGTGTCCTTCATCTTACGAGCCATCATAGTGAGGAATTCTACCGCAC  
GTCAGTAGCCGTCTCTCGTTTATAACCAGGAGGTTATGGTCAAATACCGGGGAAGT  
CAATAGTGCCGTTGTGTGCGGCGTCAACCTCGTTGATCATATCCTGCAACTCAGACT  
CGGAGGGGTTCTGGCCCAGCGAGCGCATGACGGTGCCAAGCTCCTTGGTGGTGAT  
TTGTCCTATTAGTAGGATTGTATGTTAGAATACTTTTCTCGTGAAATTCGATCGCA  
GAGGACACTGAGCTGTGCGGGCGCGACCACACGTACCATCGCCATCCTTGTCTAT  
TTCGCAATCAAACCAACTCCGGTC

**2) *P. antarcticum***

GCGTCATTGGTTTATAATTCACCTAACTGGATTACAGGCAAACCATCTCCGGCGAG  
CACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTCGTTGAGATTTGTTGTGGTGGATTG  
GGCAGCTGATATCTCGTTAGGTACAACGGTACTTCCGACCTCCAGCTCGAGCGCA  
TGAACGTCTACTTCAACCATGTGAGTACAGGACAATGAAATTGGCTATCTCGACA  
TTATCTGATTGTTATGTTTTGACCGCTCAGGCCACGGTGACAAGTACGTTCCCCG  
TGCCGTCTCGTCTGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCTT  
TCGGCAAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTTGGTCAGTCCGGTGCTGGTAAC  
AACTGGGCC

**3) *P. atramentosum***

ACTAACCGAATTACAGGCAAACCTATCTCTGGCGAGCACGGTCTCGATGGTGATGG  
ACAGTAAGTTCATTGTGATGGGCTTTGCAATGGTGGATCAGGCAATTGATGTCTA  
GTCAGGTACAATGGAACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTCTACTTCA  
ACCATGTGAGTCTAATGTCATGGGTCCAATTCACCGACCATCATCTAATTGGGTCT  
CTTTCTTTTGATAATATAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTTCTGG  
TCGATTTGGAGCCCGGCACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCCTTCGGCAAGCT  
CTTCCGCCCCGATAACTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCCGGTAACAACCTGGGCC  
AAGGGTC

**4) *P. palitans***

GCGTTGGGTATCAATTGACAGGTTACTAACTGGAGTACAGGCAAACCATCTCTGG  
CGAGCACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTTTAACTGTGATGGGGGGTTCC  
GGTATATCATACATCTGACATCTTCCTAGGTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCT  
CGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACCATGTGAGTCCAACGACTGGAAACCGAATA  
ATCGTGCATTATCTGATCGGATGTTTTCTTTGATAATCTAGGCTAGCGGTGACAAG  
TACGTTCCCCGTGCCGTTCTCGTTCGATTTGGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCG  
CTCCGGTCCCTTCGGCAAGCT

**5) *P. corylophilum***

GACCGGCACGGACAGCGTCCATGGTACCGGGCTCCAAGTCGACCAGAACGGCAC  
GGGGAACGTACTTGTTCGTTGCTAGCCTGCAGGGAAACAAATTGAGATTAGATTAG  
ATCGGTCGAGGCATTAATGTGACACATACCTCGTTGAAGTAGACGTTTCATGCGCT  
CGCGCTGGAGATCGGAAACACCAGCGTACCTATATCAAACATCAGACCGCTATT  
TCCTGTCAGGTCGGATTTTGGGCGCCTTACTGGCCATCGCCGTCAAGGCCGTGCTC  
GCCAGCAATGGTTTGCCTGGAATTAAGTCA

6) *P. solitum*

GTGCTGCTTTCTGGTAAGTGCCGAGCTTTTTTTACTCGCGTTGGGTATCAATTGAC  
AGGTTACTAACTGGTTTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGTCTCGATGGC  
GATGGACAGTAAGTTTTAACTGTGATGGGGGTTTCCGGTGGATCACACATCTGAC  
ATCTTCCTAGGTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTCTA  
CTTCAACCATGTGAGTCCAACGACCGGAAACCGAATAATCGTGCATCATCTGATC  
GGATGTTTTCCCTGATAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCCGTGCCGT  
TCTCGTCGATTTGGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCCTTCGGCA  
AGCTTTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGG  
GCCAAGGGTCAC

7) *P. brevicompactum*

AAGACGAAGTTGTCGGGGCGGAAAAGCTTGCCGAAGGGACCGGAGCGGACAGC  
GTCCATGGTACCGGGCTCCAAGTCGACGAGGACGGCACGGGGAACGTACTTGTC  
ACCACTAGCCTGGGCGGTCAAGAATATGAGGGTGAGAAAATGCACAACAAGAGTT  
CTTCACATCATTGTACTCACATGGTTGAAGTAGACGTTTCATACGCTCGAGCTGGA  
GGTCGGAGGTGCCATTGTACCTAACAAGATCTCAGACCCAATCCACGCGTAATTC  
GAACACAGTCGTCCACTTACTGTCCATCGCCATCGAGACCGTGCTCGCCGGAGAT  
AGTTTGCCTTTGAATCAGTTAGCAAAAATGTTAATTGATACCCAGCCATAGCGGGA  
AAAGAAAAGACATGGTGCGATACATACCAGAAAGCAGCACCG

8) *P. chrysogenum*

GGTGCTGCTTTCTGGTAAGTCTCGGAGCTTTTTTTTCGCGTTGGGTATCAATTGAC  
AAGTTGCTAACTGGATTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGTCTCGATGGC  
GATGGACAGTAAGTTTAAACAGTGATGGGGATTCTGGTGGATCACACGTCTGATAT  
CTTGCTAGGTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTCTACT  
TCAACCATGTGAGTACAATGACTGGGAATCTTAATTGTGCATCATCTGATCGGGC  
GTTTTTCTTTGACAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTTCTG  
GTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCCTTCGGCAAGC  
TTTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCC  
AAGGGTCA

9) *P. crustosum*

TTTTTCGCGTTGGGTATCAATTGACAGGTTCCCTAACTGGATTACAGGCAAACCATCT  
CTGGCGAGCACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTTTTAAACAGTGATAGGGGT  
TTCCGGTGGATTACACATCTGATATCTTCCTAGGTACAATGGTACCTCCGACCTCC  
AGCTCGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACCATGTGAGTCCAACGACAGGAAACCG  
ATAAATAGTGCATCATCTGATCGGATGTTTTCCCTTGATAATCTAGGCCAGCGGTG

ACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTTCTCGTCGATTTGGAGCCTGGTACCATGGACGC  
TGTCCGCTCCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTC  
AGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGG

*10) P. allii*

TTGGCCCAGTTGTTACCAGGGCCGGACTGACCGAAGAAGAAGTTGTCGGGGCGG  
AAAAGCTTGCCGAAGGGACCGGAACGGACAGCGTCCATGGTACCGGGCTCCAAA  
TTGACGAGAACGGCACGGGGAACGTACTTGTCAACTGGCCTAGATTATCAAAG  
AAAAAAATTTGATCAGGTGATGCACGATTTTTCGGTTTCCCGTCATTGGACTCAC  
ATGGTTGAAGTAGACGTTACATACGTTTCGAGCTGGAGGTTGGAGGTACCATTGTAC  
CTAGCAAGATATCAGACGTGTGATCCACCGGAAACCTCCATCACAGTTAAAAATT  
ACTGTCCATTGCCATCGAGACCGTGCTTGCCAGAGATGGTTTGCCTGTAATCCAG  
TTAGTAACCTATCAA

*11) P. nalgiovense*

TTTTCGCGTTGGGTATCAATTGACAAGTTACTAACTGGATTACAGGCAAACCATC  
TCTGGCGAGCACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTTAAACAGTGATGGGGAT  
TCTGGTGGACTACACGTCTGATATATTGCTAGGTACAATGGTACCTCCGACCTCC  
AGCTCGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACCATGTGAGTACAATGACTGGGAATCG  
ATCAATCGTGCATCATCTGATCGGATGTTTTTCTTTGATAATCTAGGCCAGCGGTG  
ACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTTCTGGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGC  
TGTCCGCTCCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTT

*12) P. expansum*

TTTTCGCGTTGGGTATCAATTGACAATTTACTAACTGGATTGCAGGCAAACCATCT  
CTGGCGAGCACGGTCTCGATGGTGATGGACAGTAAGTTCAACGGTGATGGGTTTC  
TAGTAGATCACACGTCTGATATCTTGCTAGGTACAATGGTACCTCCGACCTCCAG  
CTCGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACCATGTGAGTACACCGACTAGTTACCGAA  
TAATCGTGCATCATCTGATCGGATCTTTTTCTTTGATAATCTAGGCCAGCGGTGAC  
AAGTACGTTCCCCGTGCCGTTCTCGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTG  
TCCGCTCCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTCAG  
TCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTAC

*13) P. sumatraense*

TGCTTTCTGGTACGTGCTGCAATCCCAAACAATCAATTGTTGAATGCATGAAGC  
AATAAACTAATCAATTCAACAGGCAAACCATTTGCTGGCGAGCACGGCCTTGATGG  
CGATGGACAGTGAGTGATTTTCGACCAGGTTTTGATTTTCGAGAATAGCGGTCTGA  
TATTTTTGGGCAGCTACAACGGTACCTCTGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGT  
TACTTCACCCATGTAAGCGACAACAATCCCATCAATAAACTTAGTCTTGAGATT  
CTAATGGCTTGTTTTTCTGTTTACAATAGGCTTCCGGTGACAAGTATGTTCCCGT  
GCCGTTCTGGTTGATCTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTT  
CGGCAAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTCAGTCTGGTGCTGGTAAC  
AACTGGGCCA

*14) P. magnielliptisporum*

ACTAACTGGATCACAGGCAAACCTATCTCTGGCGAGCACGGTCTTGATGGCGATGG  
ACAGTAAGTTCAATGTGATGGGTTTTGCAATGGTGGATCAGGCAATTGATGTCTT  
GTCAGGTACAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTCTACTTCA  
ACCATGTGAGTACAATGTCATAGGTCCAATTCATCTAGCATCATCTAATCGAGCC  
TTTTTCTTTGATAATTTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCCGTGCTGTTCTGG  
TCGATTTGGAGCCCAGGACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCCTTCGGCAAGCT  
CTTCCGCCCCGATAACTTCGTCTTCGGTCAGTC

*15) A. appendiculatus*

TTTTATATCAGGGCGATCGCATAACCAGGGAAATCGATGGTGCCGTTGTTGTCAGC  
GTCGACCTCGTTGATCATGTCCCTGCAACTCCGACTCGGAGGGGTTCTGGCCCAGC  
GAGCGCATGACAGTACCCAATTCCTTGGTGGTGTCTGGCCTGTTATCGCGGAAA  
TCCATCAGTATTGTGTCGTTAACCAGGAAGGCATTATCTCAACAGCGAATATCAT  
ATCACGGTCGGAACCAATCGAGAGGTGGGGTAAAGAGGCATTGAATATAGAGTA  
AAGCGGGATCACTAACCATCGCCATCCTTGTCCTATTAATAATGCAA

*16) A. pallidofulvus*

TGCTGCTTTCTGGTAAGTCTACACGTTGGCATTGGCAGTCTGGGCTATCCAGGATC  
ATCTTCGATACCTTGTGACCTATGACTCTCAATCCTTGATACTTGATACTTGTTTA  
CTGATAGGTGAATAGGCAAACATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGATGGCGCCGGT  
GTGTAAGTACATCCCGCGTTTACACCTATCGAAATCAGAATCGACAAGAGAAGA  
AAAGAAAGAAATGATCATGGTGGGATTGATTGTCTGATGGGATGAACAGTTACA  
ATGGCTCCTCCGACCTTCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTTCCG  
TTGCCCGAAAATTTTCTATCTCCTTTTCGCCGATCCGAAACGCCCCGTACAAGGCTC  
TAACCCACGCTTTCTTCATCTTCTAGGCTTCCGGTGGCAAGTATGTTCCCCGTGCC  
GTTCTGGTCGATCTTGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTCGG  
TCAGCTTTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCTGGTGCCGGTAACAAC  
GGCCAAGGGTCA

*17) A. creber*

GGTGCTGCTTTCTGGTGCCTCGAAAATTTTCATCCATTTTCAGATGGTATTTCCCTTCC  
GTGCTTTTTTGCTAACGACTCTATAGGCAGACCATCTCCGGTGAGCACGGCCTCG  
ATGGCTCCGGTGTGTGAGTACAACCCGTCCAGGACTCGAGCAAAACACGAGACA  
GAACACAACCCCTGATATAATGCAGTTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGA  
GCGTATGAACGTCTACTTCAACGAAGCCAGCGGCAACAAGTACGTTCCCTCGTGCC  
GTCCTCGTCGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTCG  
GTCAGCTTTTCCGTCCCGACAACCTTCGTCTTTGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAAC  
TGGCCAAGGGTCACT

*18) A. pseudoglaucus*

CCCTCTTCGTAAGTGCGCTGGCCATTTCCATGTGGCATTTCCTCGTCGGGCGTTG  
AAGAATGTAACTGACCACGATTTTTGCACTTAAATAGGACAAGGATGGCGATG  
GTTAGTGATCCCGCTTTGTTTTAGATTCAATGCCTCTTTTACCCCGCCCCTCGATTG  
GTTCCGACCGTGATATGATTTTCGCTGTTGAGATAATGCCTACCTGGTTAACGACA  
CAATACTGATGGATTTCCGCGATTACAGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTGGGTA

CCGTTATGCGCTCGCTGGGCCAGAACCCCTCCGAGTCGGAGTTGCAGGACATGAT  
CAACGAGGTCGACGCTGACAACAACGGCACCATCGATTTCCCTGGTATGCGATCG  
TCCCGACATAAAAGCCCCGTAATAAGATAGGCGATTCTGACCATAGTAGAATTCC  
TTACCATGATGGCACG

**19) *A. proliferans***

TTGCATTATAACAGGACAAGGATGGCGATGGTTAGTGATCCCGCTATACTCTAAA  
TTTAATGCCTCTTTACCCCGCCTATCGATTGGTTCCGACCGTGATATGATATTCGC  
TGTTGAGATAATGCTTTTCTGGTTAACGACACAATACTGATGGATTTCCGCGATTA  
CAGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTGGGTACCGTCATGCGCTCGCTGGGCCAGA  
ACCCCTCCGAGTCGGAGTTGCAGGACATGATCAACGAGGTCGACGCTGACAACA  
ACGGCACCATCGATTTCCCTGGTATGCGATCGTCCCGACATAAAAGCCCCGTAA  
CAAGATAGGCGAATCTGACCATAATAGAATTCCCTTACCATGATGGCACGGAAGAT  
GAAGGACACCGA

**20) *A. chevalieri***

GCGTTGAGGGCAGTAAACTGACCACGATTTCTGCATTTCTACAGGACAAGGATGG  
CGATGGTTAGTGATCCCGCTCTACTCTGCATCAAATGCCTCTTTTACTCCACCATT  
CGATTGGTTCCGACCGTGATATCATATTCGCTGTTGAAATAATATCTTTCCGGTTA  
ACGACATAATACTGATGGATCTCTGCGATTACAGGCCAGATCACCACCAAGGAGC  
TGGGTACCGTTATGCGCTCGCTGGGCCAGAACCCCTCCGAGTCGGAGTTGCAGGA  
CATGATCAACGAGGTTGACGCTGACAACAACGGCACCATTGATTTCCCTGGTATG  
CGATCGTCCCGACATGAAAGGTCCCGTAACAAGATAGGCGATTCTGACCATACTA  
GAATTCCTTACCATGATGGCACGGAAGATGAAGGACACCGATTCCGAGGAAGAG  
ATCCGGGAAGCTTTCAAGGTCTTCGATCGCGACAACAACGGTTTCATTTCCGCTG  
CGGAGCTGCGCCACGTCA

**21) *A. amstelodami***

TGCTGCTTTCTGGTATGTTTTTAAAATATTGGGAGATGGATTGGGAGATATACTAA  
CAGTATCACAGGCAGACTATCTCCGGCGAGCACGGTCTCGACGGCTCTGGTGTGT  
AAGTACAGTCGGGTCTCCGAGATGGACGCGTATCGGATATGGATATCTAACGGAT  
TTCAGCTACAACGGATCCTCCGACCTCCAGTTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCA  
ACGAGGTTTGCCTATCCGTTTCGTGTTTGTGGAAACAGCTCTGACAGTGATAGG  
CCTCCAACAACAAATATGTCCCCCGTGCCGTCTCGTCGACCTTGAGCCAGGTAC  
CATGGATGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCG  
TCTTCGGCCAGTCCGGTGCCGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACT

**22) *A. ruber***

TCCCGTCGGGCGTCGAGGACTGTAAACTGACCACGATTTTTGCATTTAACAGG  
ACAAGGATGGCGATGGTTAGTTCTCGTGATTTACTCTAGATTCAATCCCTCTTTTA  
CCCCACCTCTCGATTGGTTCCGACCGTGATATGATATTCGCTGTTGAGATAATGCC  
TTTCTGGTTAGTGACACAATACTGATGGGTTCTGCGATTACAGGCCAGATCACC  
ACCAAGGAGCTGGGCACCGTTATGCGCTCGCTGGGCCAGAACCCCTCCGAGTCGG  
AGTTGCAAGATATGATCAACGAGGTCGACGCTGACAACAACGGCACCATCGATTT



CCCTGGTATGCGATCGCCCTGATATAAACTTCCGTAACAAGATTGACGATTCTG  
ACCATAACAGAATTCCTTACCATGATGGCACGGAA

23) *A. montevidensis*

TCCCCGTCGAACGTCGAGGACAGTGAACCTGACCATGATTTTTGCATTTCTACAGG  
ACAAGGATGGCGATGGTTAGTGATCCCGCTCTACTCTATATTCAATGTCTCTTTTA  
CCCCACCATTTCGATTGGCTCCGACCGTGATATCATATTCGCTGTTGAAATAATGCT  
CTTCCGTTACGACATGATACTGATGTATCTTCGCGACTACAGGCCAGATCACCAC  
CAAGGAGCTGGGTACCGTTATGCGCTCGCTGGGCCAGAACCCTTCCGAGTCGGAG  
TTGCAGGACATGATCAATGAGGTTGACGCTGACAACAACGGCACCATCGATTTCC  
CTGGTATGCGATCGTCCCGACATAAAACGTTCTGTAACATGATAGGCGATTCTGA  
CCCAAATAGAATTCCTTACCATGATGGCACGGAAAGATGAAG

24) *A. mallochii*

AACGCGTGGATATCTAATGGATTGCAGCTACAATGGCTCCTCTGACCTCCAGTTG  
GAGCGTATGAACGCTCTACTTCAACGAGGTTGGTGCATTTATCTCTCATTGACGAA  
CAGTTCTGACTTGACAGGCCTCCAACAACAATATGTCCCCCGTGCCGTCCTCGT  
CGACCTTGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCGTCGCGGTCCCTTCGGTCAGCTC  
TTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTG

25) *A. glaucus*

GTCGAGGACAGTGAACCTGACCACGATTTTTGCATTATAACAGGACAAAGATGGC  
GATGGTTAGTGATCCCGCTATACTCTAAATTCAATGCCTCTTTACCCCGCCTATCG  
ATTGGTTCCGACCGTGATATGATATTCGCTGTTGAGATAATGCTTTTTCTGGTTAAC  
GACACAATACTGATGGATTTCCGCGATTACAGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTG  
GGTACCGTCATGCGCTCGCTGGGCCAGAACCCTCCGAGTCGGAGTTGCAGGACA  
TGATCAACGAGGTCGACGCTGACAACAACGGCACCATCGATTTCCCTGGTATGCG  
ATCGTCCCGACATGAAAGCCCCCGTAACAAGATAGGCGAATCTGACCATAATAG  
AATTCCTTACCATGATGGCACGGAAAGATGAAGGACACCG

26) *A. sloanii*

ACTTCCCCGTCGGGCGTCGAGAACAGTGAACCTGACCACGATTTTTGCATTATAAC  
AGGACAAGGATGGCGATGGTTAGTGATCCCGCTATACTCTAAATTCAATGCCTCT  
TTTACCCCGCCTATCGATTGGTTCCGACCGAGATATGATATTCGCTGTTGAGATAA  
TGCCTTTCTGGTTAACGACACAATGCTGATGAATTTCCGCGATTACAGGCCAGAT  
CACCACCAAGGAGCTGGGTACCGTCATGCGCTCGCTGGGTCAGAACCCTCCGAG  
TCGGAGTTGCAGGACATGATCAACGAGGTCGACGCTGACAACAACGGCACCATC  
GATTTCCCTGGTATGCGATCGTCCCGACATAAAAGCCCCCGTAACAAGATAGGCG  
AATTTGACCATAATAGAATTCCTTACCATGATGGCACGGAAAGATGAAGGACACCG  
ACTCCGAGGAGGAGATCCGGGAAGCTTTCAAGGTCTTCGATCGCGACAACAACG  
GTTTTATTTCC

27) *A. sydowii*

TTTACTAACGACTCTATAGGCAGACCATCTCCGGTGAGCACGGCCTCGATGGCTC  
CGGTGTGTGAGTACAGCCCGTCCAGGACTCGATCAAAACACGACAGAACACAGC

CCCTGATATAATACAGTTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATGAA  
CGTCTACTTCAACGAGGCCAGCGGCAACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTCCCTCGTC  
GATCTCGAGCCTGGTACTATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTT  
CCGTCCCGACAACCTTCGTCTTTGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGG

**28) *A. tonophilus***

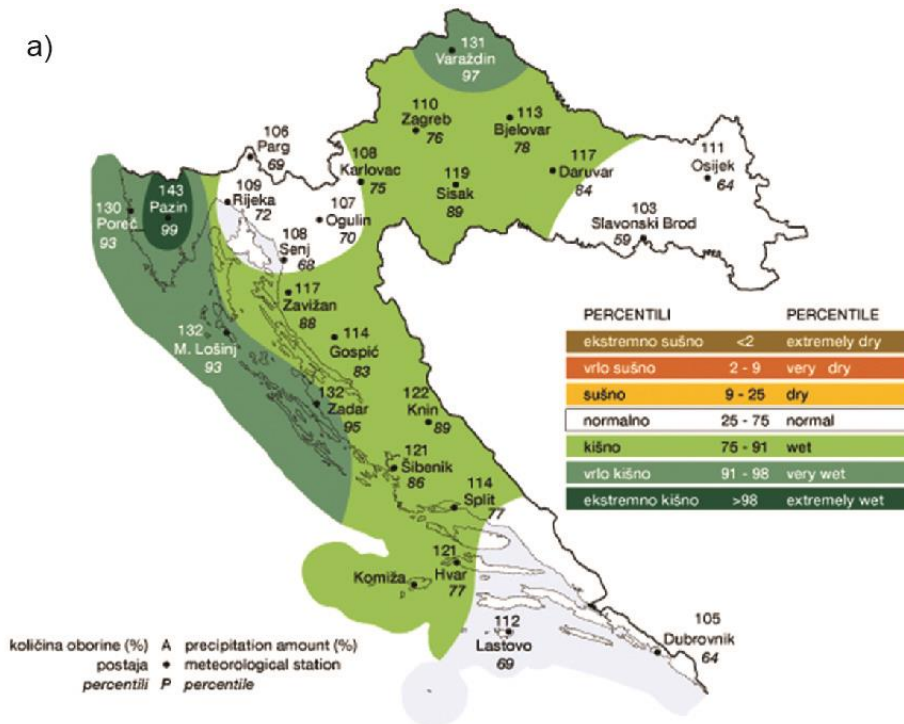
AGGATGGCGATGGTTAGTTCTCCCGATTTACTCTAGATTTCGATGCCTCTTTTACCC  
CACCTCTCGATTGGTTCCGACCGTGATATGATATTCGCTGTTGAGATAATGCCTTT  
CTGGTTAACGACACAATACTGATGGATTTCCGCGATTACAGGCCAGATTACCACC  
AAGGAGCTGGGTACCGTTATGCGCTCGCTGGGCCAAAACCCCTCCGAGTCGGAGT  
TGCAGGACATGATCAACGAGGTCGACGCTGACAACAACGGCACCATCGATTTCCC  
TGGTATGCGATCGTCCCGACATAAAAGCCCCCGTAACAAGATAGGCGATTCTGAC  
CATAATAGAATTCCTTACCATGATGGCACGGAAAATGAAGGACACCGACTCCGA  
G

**29) *A. cibarius***

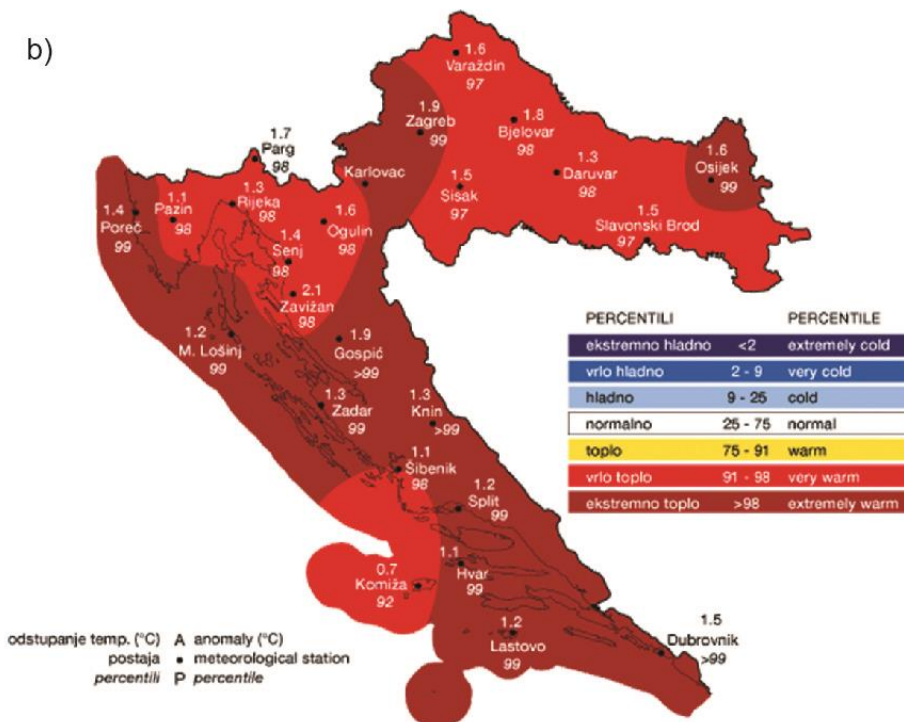
GCGTTGAGGACTGAACTGACCACGATTTTTGCATTTTAATAGGACAAGGATGGCG  
ATGGTTAGTGATCCGCTTTACTCTATATCCAATGCCTCTTTTACCCACCTCTCGA  
TTGGTTCCGACCGTGATATGATAGTCGCTGTTGAGATAATGCCTTTCTGGTTAGCG  
ACACAATATTGATGGATTTCCGCAATTACAGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTGG  
GTACCGTTATGCGCTCGCTGGGCCAGAACCCCTCCGAGTCGGAGTTGCAGGACAT  
GATTAACGAGGTCGACGCTGACAACAACGGCACCATTGATTTCCCTGGTATGCGA  
TCGCCCTGATATAAAAACTTTTGTAACAAGATTGGCGTTTCTGACCATAATAGAA  
TTCCTTACCATGATGGCACGGAAGATGAAGGACACCGACTCCGAGGAGGA

**PRILOG 2 – Kartografski prikaz godišnjih količina oborina i temperatura za 2019., 2020. i 2021. godinu**

a)

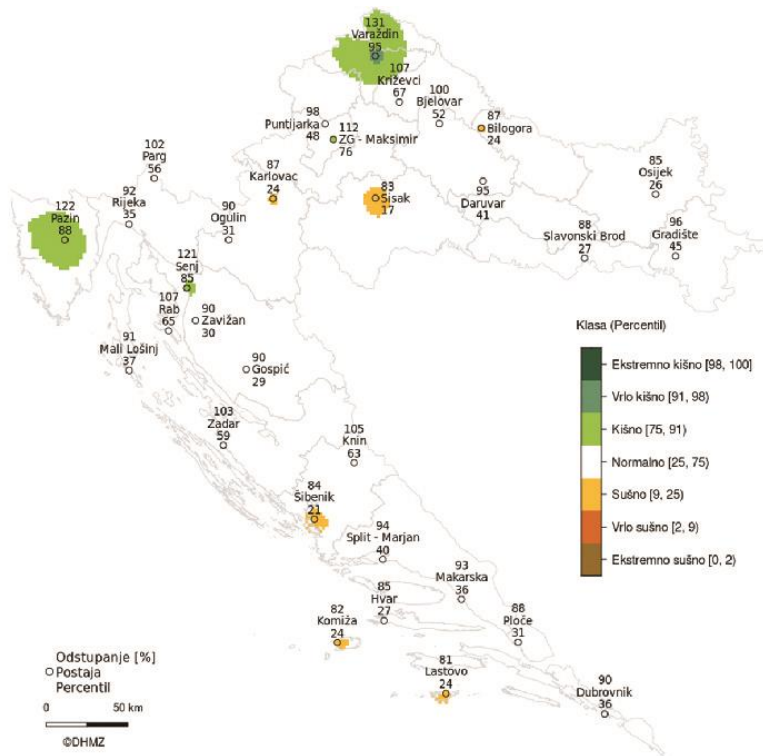


b)

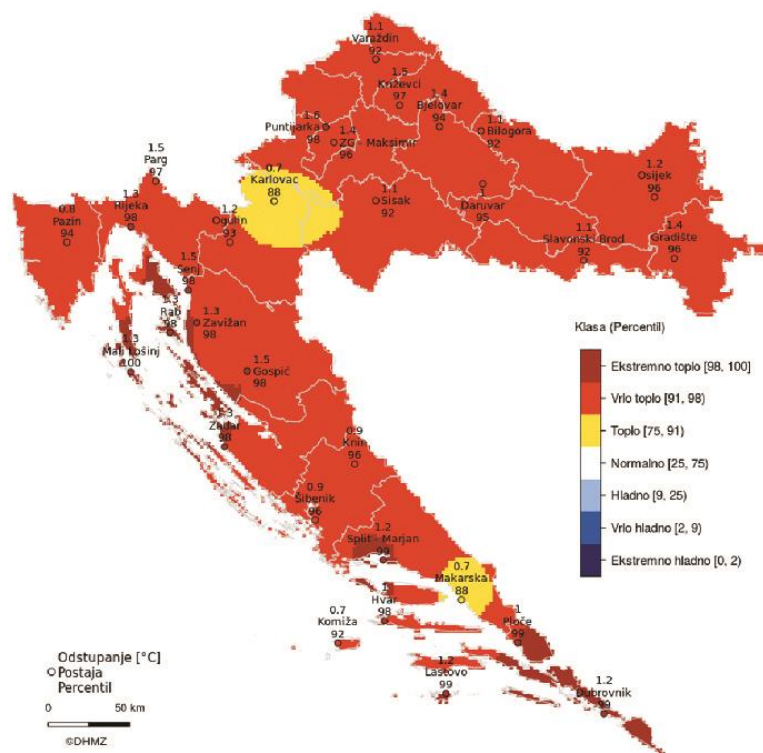


- a) Godišnja srednja količina oborina za 2019. (DHMZ, 2022)
- b) Godišnja srednja temperatura zraka za 2019. (DHMZ, 2022)

a)

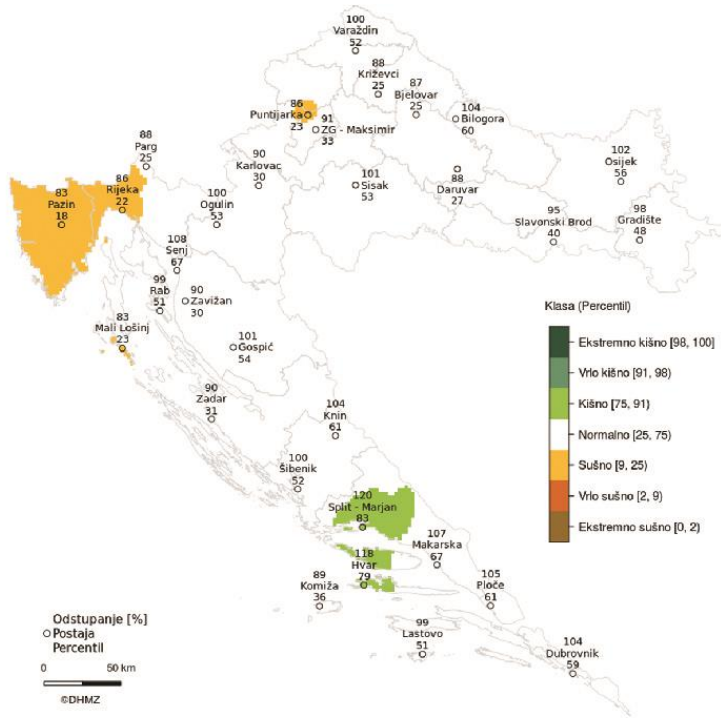


b)

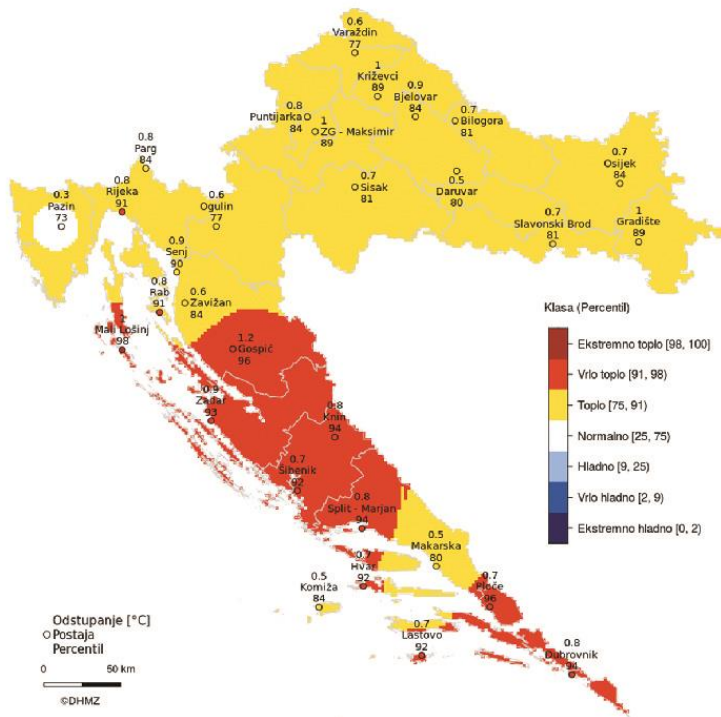


- a) Godišnja srednja količina oborina za 2020. (DHMZ, 2022)  
 b) Godišnja srednja temperatura zraka za 2020. (DHMZ, 2022)

a)



b)



- a) Godišnja srednja količina oborina za 2021. (DHMZ, 2022)  
 b) Godišnja srednja temperatura zraka za 2021. (DHMZ, 2022)

## ŽIVOTOPIS

Tina Lešić (rođ. Barbir) rođena je 21.11.1988. u Vinkovcima. Srednju matematičku gimnaziju završila je u Županji, a Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu završila je 2013. godine i stekla zvanje magistre inženjerke molekularne biotehnologije (*mag.ing.mol.biotechn.*), uz dekanovu nagradu za najbolji ukupni prosjek 5,00 na drugoj godini diplomskog studija.

Kao stručna suradnica u sustavu znanosti zaposlena je u Hrvatskom veterinarskom institutu od 2013. godine, a kao viša stručna suradnica od 2020. godine i to u Laboratoriju za analitičku kemiju gdje se bavi ispitivanjem kvalitete i sigurnosti hrane i hrane za životinje i primjenjuje brojne standardne i interne imunoenzimske i instrumentalne analitičke metode (LC-MS/MS, GC-FID, HPLC-UV/FLD, AAS), kao i brojne statističke analize. U sklopu znanstvenog istraživanja primjenjuje još i molekularne metode u identifikaciji plijesni.

Znanstvena istraživanja na kojima je sudjelovala rezultirala su objavljivanjem dvadesetidva (22) znanstvena rada u visoko rangiranim stranim časopisima, od kojih je prva autorica četiri (4) rada u časopisima Q1 razine. Osim navedenog, objavila je i veći broj drugih znanstvenih i stručnih radova te prezentirala rezultate istraživanja na većem broju skupova, i to: dvadesetpet (25) znanstvenih radova u domaćim časopisima, od kojih je na osam (8) prvi autor, jedno (1) poglavlje u knjizi, jedan (1) znanstveni rad u kategoriji radova u zbornicima skupova, devet (9) stručnih radova te dvadesetišest (26) sažetaka sa međunarodnih ili domaćih znanstvenih skupova koji su prezentirani usmenim priopćenjem ili putem postera. U velikom broju provedenih istraživanja ispitana je pojavnost kemijskih kontaminanata poput mikotoksina, biotoksina ili tvari s anaboličkim učinkom te zastupljenost toksikotvornih plijesni u hrani. Također, provodila je istraživanja utjecaja različitih čimbenika na nutritivni, odnosno, masnokiselinski sastav hrane.

Sudjelovala je na projektu Hrvatske agencije za hranu „T-2 i HT-2 toksini u žitaricama uzgojenim u Republici Hrvatskoj“ (2017. - 2018. godine). Bila je voditeljica manjeg istraživačkog projekta financiranog sredstvima Ministarstva znanosti i obrazovanja „Usporedba površinskih plijesni i kontaminacije mikotoksinima u tradicionalno i industrijski proizvedenim kulenima“ tijekom 2020. godine. Trenutno sudjeluje na projektu Europske unije „AdriAquaNet Enhancing Innovation and Sustainability in Adriatic Aquaculture“ Interreg Italija–Hrvatska (2019. – 2022. godine) te na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Mikotoksini u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima: molekularna identifikacija plijesni producenata i procjena izloženosti potrošača“ (2018. - 2022. godine).

## POPIS RADOVA

### Poglavlja u knjigama

- Pleadin, J., Zdravec, M., Lešić, T., Vulić, A., Vahčić, N., Kudumija, N., Frece, J., Markov, K. (2020) Ochratoxin A contamination of traditional dry-cured meat products. U: *Ochratoxin A and aflatoxin B<sub>1</sub> - New Research* (Hess, R., ured.), Nova Science Publishers, New York, str. 31-66.

### Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

- Kvrgić, K., Lešić, T., Džafić, N., Pleadin, J. (2022) Occurrence and Seasonal Monitoring of Domoic Acid in Three Shellfish Species from the Northern Adriatic Sea. *Toxins* **14**, 1-12.
- Pleadin, J., Lešić, T., Vujačić, V., Milićević, D., Buneta, A., Šušnić, S., Lukanić, I., Krešić, G. (2021) Comparison of Chemical Composition and Fatty Acid Profile of Traditional Meat Products from Croatia and Montenegro. *Journal of food quality* ,1-10.
- Pleadin, J., Lešić, T., Milićević, D., Markov, K., Šarkanj, B., Vahčić, N., Kmetič, I., Zdravec, M. (2021) Pathways of Mycotoxin Occurrence in Meat Products: A Review. *Processes* **9**, 1-14.
- Lešić, T., Vahčić, N., Kos, I., Zdravec, M., Milićević, D., Perković, I., Listeš, E., Pleadin, J. (2021) The Influence of Surface Mycobiota on Sensory Properties of “Istarski pršut” and “Dalmatinski pršut”. *Processes* **9**, 1-15.
- Vulić, A., Lešić, T., Kudumija, N., Zdravec, M., Kiš, M., Vahčić, N., Pleadin, J. (2021) The development of LC-MS/MS method of determination of cyclopiazonicacid in dry-fermented meat products. *Food control* **123**, 107814.
- Lešić, T., Zdravec, M., Zdolec, N., Vulić, A., Perković, I., Škrivanko, M., Kudumija, N., Jakopović, Ž., Pleadin, J. (2021) Mycobiota and Mycotoxin Contamination of Traditional and Industrial Dry-Fermented Sausage Kulen. *Toxins* **13**, 1-13.
- Kvrgić, K., Lešić, T., Aysal Ayhan I., Džafić, N., Pleadin, J. (2020) Cyclic imines in shellfish and ascidians in the northern Adriatic Sea. *Food Additives & Contaminants Part B* **14**, 12-22.

- Lešić, T., Vahčić, N., Kos, I., Zadravec, M., Sinčić Pulić, B., Bogdanović, T., Petričević, S., Listeš, E., Škrivanko, M., Pleadin, J. (2020) Characterization of Traditional Croatian Household-Produced Dry-Fermented Sausages. *Foods* **9**, 1-19.
- Krešić, G., Pleadin, J., Kvirgić, K., Lešić, T., Džafić, N., Zrnčić, S., Vulić, A., Bogdanović, T., Oraić, D., Vahčić, N. (2020) Seasonal and geographical variati chemical composition and fatty acid profile of Mediterranean mussels. *Journal of food and nutrition research* **59**, 163-173.
- Pleadin, J., Lešić, T., Krešić, G., Bogdanović, T., Malenica, M., Kos, I., Sinčić Pulić, B., Petričević, S., Kušec, G., Vahčić, N. (2020) Quality of Istrian and Slavonian dry-fermented sausages. *Italian journal of food sciences* **32**, 605-62.
- Kudumija, N., Vulić, A., Lešić, T., Vahčić, N., Pleadin, J. (2020) Aflatoxins and ochratoxin A in dry-fermented sausages in Croatia, by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants Part B* **4**, 225-232.
- Zadravec, M., Vahčić, N., Brnić, D., Markov, K., Frece, J., Beck, R., Lešić, T., Pleadin, J. (2020) A study of surface moulds and mycotoxins in Croatian traditional dry-cured meat products. *International journal of food microbiology* **317**, 108459.
- Vulić, A., Lešić, T., Kudumija, N., Mikuš, T., Pleadin, J. (2019) Resorcylic acid lactones in urine samples of Croatian farm animals. *Journal of analytical toxicology* **43**, 126-133.
- Pleadin, J., Kvirgić, K., Zrnčić, S., Lešić, T., Koprivnjak, O., Vulić, A., Džafić, N., Oraić, D., Krešić, G. (2019) Variations in nutritive composition of three shellfish species. *Italian journal of food sciences* **4**, 716-730.
- Abbas, O., Zadravec, M., Baetan, V., Mikuš, T., Lešić, T., Vulić, A., Prpić, J., Jemeršić, L., Pleadin, J. (2018) Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. *Food chemistry* **246**, 6-17.
- Pleadin, J., Zadravec, M., Lešić, T., Vahčić, N., Frece, J., Mitak, M., Markov, K. (2018) 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.
- Pleadin, J., Lešić, T., Krešić, G., Barić, R., Bogdanović, T., Oraić, D., Vulić, A., Legac, A., Zrnčić, S. (2017) Nutritional quality of different fish species farmed in the Adriatic Sea. *Italian journal of food sciences* **29**, 537-549.



- Krešić, G., Koprivnjak, O., Lešić, T., Jurković, M., Sokolić, D., Gross-Bošković, A., Branežec, K., Pleadin, J. (2017) Consumption of canned oily fish as a source of fatty acids. *Rivista italiana delle sostanze grasse* **94**, 239-249.
- Pleadin, J., Frece, J., Lešić, T., Zadavec, M., Vahčić, N., Malenica Staver, M., Markov, K. (2017) Deoxynivalenol and zearalenone in unprocessed cereals and soybean from different cultivation regions in Croatia. *Food Additives & Contaminants Part B* **10**, 268-274.
- Lešić, T., Pleadin, J., Krešić, G., Vahčić, N., Markov, K., Vrdoljak, M., Frece, J. (2016) Chemical and fatty acid composition of cow and sheep milk cheeses in a lamb skin sack. *Journal of food composition and analysis* **46**, 70-77.
- Pleadin, J., Mihaljević, Ž., Barbir, T., Vulić, A., Kmetič, I., Zadavec, M., Brumen, V., Mitak, M. (2015) Natural incidence of zearalenone in Croatian pig feed, urine and meat in 2014. *Food additives and contaminants Part B* **8**, 277-283.
- Aladić, K., Jarni, K., Barbir, T., Vidović, S., Vladić, J., Bilić, M., Jokić, S. (2015) Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Industrial crop and products* **76**, 472-478.

### Znanstveni radovi u drugim časopisima

- Milićević, D., Kresić, G., Vranić, D., Lešić, T., Nedeljković-Trailović, J., Janković, S., Pleadin, J. (2022) Characterization and nutritional assessment of traditional dairy products from the Zlatibor region, Republic of Serbia. *Veterinarska stanica* **53**, 17-32 .
- Perković, I., Kovačević, D., Zadavec, M., Lešić, T., Pleadin, J., Škrivanko, M. (2022) Utjecaj lokaliteta na sigurnost i kvalitetu slavonske kobasice. *Veterinarska stanica* **53**, 237-250.
- Zadavec, M., Lešić, T., Perković, I., Jakopović, Ž., Vahčić, N., Jaki Tkalec, V., Dujić, T., Pleadin, J. (2021) Differences in the mycoflora of dry-fermented sausages casings before and after six months of refrigerated storage. *Veterinarska stanica* **52**, 141-147.
- Vulić, A., Kudumija, N., Lešić, T., Tanković, S., Jelušić, V., Ferizbegović, J., Bilandžić, N., Pleadin, J. (2021) Chemical composition and fatty acid profile of Alpine and Saanen goat milk from Bosnia and Herzegovina. *Veterinarska stanica* **52**, 13-21.
- Lešić, T., Vahčić, N., Krešić, G., Pleadin, J. (2020) Prirodne i industrijske trans masne kiseline – pojavnost i utjecaj na ljudsko zdravlje. *Meso* **22**, 56-67.

- Zdolec, N., Kiš, M., Cvrtila, Ž., Mikuš, T., Kazazić, S., Pleadin, J., Lešić, T., Kozačinski, L., Dobranić, V., Mazija, H. (2020) Mikrobiološka i fizikalno-kemijska svojstva autohtone trajne kobasice od kokošnjeg mesa. *Meso* **22**, 368-377.
- Pleadin, J., Zdravec, M., Lešić, T., Frece, J., Vasilj, V., Markov, K. (2020) Klimatske promjene - Potencijalna prijetnja još znatnijoj pojavnosti mikotoksina. *Veterinarska stanica* **51**, 659-671.
- Pleadin, J., Lešić, T., Kmetič, I., Markov, K., Zdravec, M., Frece, J., Kiš, M., Šarkanj, B. (2020) Toksični učinci mikotoksina: Mehanizam djelovanja i mikotoksikoze. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **15**, 3-10.
- Mastanjević, K., Kovačević, D., Bušić, N., Čepić, D., Lešić, T., Pleadin, J. (2019) Sastav masnih kiselina slavonske šunke soljene s krupnom morskom i sitnom kamenom soli. *Meso* **21**, 62-70.
- Lešić T., Kmetič, I., Kiš, M., Vulić, A., Kudumija, N., Zdravec, M., Murati, T., Pleadin J. (2019) Sterigmatocistin – prekursor aflatoksina B<sub>1</sub> u hrani i hrani za životinje. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **14**, 105-112.
- Kiš, M., Vulić, A., Kmetič, I., Lešić, T., Murati, T., Pleadin, J. (2019) Ciklopiazonična kiselina: toksičnost i pojavnost nedovoljno istraženog mikotoksina. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **14**, 33-38 .
- Zdravec, M., Markov, K., Frece, J., Perković, I., Jakopović, Ž., Lešić, T., Mitak, M., Pleadin, J. (2019) Toxicogenic fungi and the occurrence of mycotoxins in traditional meat products. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **11**, 272-282.
- Lešić, T., Krešić, G., Cvetnić, L., Petrović, M., Pleadin, J. (2017) The influence of hen age on fatty acid composition of commercial eggs. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **9**, 158-167.
- Pleadin, J., Vulić, A., Perković, I., Kudumija, N., Lešić, T., Kiš, M., Zdravec, M., Mitak, M. (2019) Mikotoksini aflatoksini i okratoksini - prijetnja sigurnosti tradicionalnih mesnih proizvoda. *Meso* **21**, 186-197.
- Lešić, T., Kolarić Kravar, S., Krešić, G., Pleadin, J. (2017) Nutritivna kvaliteta masti industrijskih kobasica. *Meso* **6**, 496-503.
- Pleadin, J., Vasilj, V., Lešić, T., Frece, J., Markov, K., Krešić, G., Vulić, A., Bogdanović, T., Zdravec, M., Vahčić, N. (2017) Kemijski sastav i pojavnost

mikotoksina u tradicionalnim mesnim proizvodima podrijetlom s domaćinstava Bosne i Hercegovine. *Meso* **19**, 309-316.

- Pleadin, J., Vulić, A., Zadravec, M., Lešić, T., Benić, M., Jaki Tkalec, V., Vahčić, N. (2017) Presence of *Fusarium* mycotoxins in feedstuffs and cow milk sampled from Croatian farms during 2015. *Mljekarstvo* **67**, 102-111.
- Jakopović, Ž., Čanak, I., Lešić, T., Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2016) Usporedba osnovnog kemijskog i masno-kiselinskog sastava te mikrobiološke ispravnosti guščjih, kokošnjih, pačjih i purećih jaja. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**, 152-158.
- Lešić, T., Krešić, G., Koprivnjak, O., Kovačević, D., Gross-Bošković, A., Sokolić, D., Jurković, M., Pleadin, J. (2016) Estimation of dietary fat intake via the consumption of traditional meat products. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**, 138-144.
- Pleadin, J., Demšar, L., Polak, T., Vulić, A., Lešić, T., Kovačević, D. (2016) Sastav masnih kiselina tradicionalnih hrvatskih i slovenskih suhomesnatih proizvoda. *Meso* **18**, 44-52.
- Pleadin, J., Vahčić, N., Malenica Staver, M., Krešić, G., Bogdanović, T., Lešić, T., Raspović, I., Kovačević, D. (2015) Sezonske varijacije u sastavu masnih kiselina Istarskog i Dalmatinskog pršuta. *Meso* **17**, 428-434.
- Lešić, T., Vulić, A., Cvetnić, L., Kudumija, N., Škrivanko, M., Pleadin, J. (2015) Udio masti i sastav masnih kiselina u kokošnjim jajima hrvatskih proizvođača. *Veterinarska stanica* **46**, 349-358.
- Barbir, T., Vulić, A., Pleadin, J. (2014) Masti i masne kiseline u hrani životinjskog podrijetla. *Veterinarska stanica* **45**, 97-110.
- Barbir, T., Pleadin, J., Zrnčić, S., Oraić, D., Vulić, A., Milinović, I., Petrović, M. (2014) Udjel masti i sastav masnih kiselina tržišnog lubina (*Dicentrarchus labrax*) uzgojenog na području Jadrana. *Meso* **16**, 304-310.
- Pleadin, J., Krešić, G., Barbir, T., Petrović, M., Milinović, I., Kovačević, D. (2014) Promjene u osnovnom nutritivnom i masno- kiselinskom sastavu tijekom proizvodnje Slavenskog kulena. *Meso* **16**, 487-492.

#### **Znanstveni radovi u zbornicima skupova**

- Pleadin, J., Krešić, G., Lešić, T., Vulić, A., Kudumija, N., Oraić, D., Zupičić, I.G., Zrnčić, S. (2021) Kvaliteta lubina i komarče uzgojenih na području Jadrana. Zbornik radova znanstveno-stručnog skupa s međunarodnim sudjelovanjem Veterinarski dani Zagreb: Hrvatska veterinarska komora, str. 391-400.

### Sažeci u zbornicima i časopisima

- Pleadin, J., Lešić, T., Kos, I., Zdravec, M., Jakopović, Ž., Vahčić, N. (2021) Surface moulds affecting the sensory properties of traditional Croatian dry-cured hams. 13<sup>th</sup> Conference With food to health, Osijek, Hrvatska, str. 132-132.
- Lešić, T., Zdolec, N., Vulić, A., Kudumija, N., Pleadin, J. (2021) Cyclopiazonic acid in industrially and traditionally produced Croatian dry-fermented sausage. 1<sup>st</sup> International Conference Food and Climate Change, Koprivnica, Hrvatska, str. 57-57.
- Lešić, T., Vulić, A., Kudumija, N., Vahčić, N., Zdravec, M., Pleadin, J. (2021) Determination of sterigmatocystin in traditional dry-fermented sausages using LC-MS/MS method. 13<sup>th</sup> Conference With food to health, Osijek, Hrvatska, str. 102-102.
- Lešić, T., Vahčić, N., Kos, I., Zdravec, M., Jakopović, Ž., Jaki, V., Perković, I., Škrivanko, M., Pleadin, J. (2021) Influence of the Surface Moulds on Sensory Quality of Croatian Dry-Cured Meat Products. 35<sup>th</sup> EFFoST International Conference Lausanne, Švicarska, str. P 1104.
- Pleadin, J., Lešić, T., Zdravec, M., Vahčić, N., Vulić, A., Kudumija, N., Frece, J., Jaki, V., Markov, K. (2021) Toxicogenic Moulds and Mycotoxins in Croatian Traditional Dry-Cured Meat Products. 35<sup>th</sup> EFFoST International Conference Lausanne, Švicarska, str. P 1212.
- Kvirgić, K., Lešić, T., Džafić, N., Pleadin, J. (2021) Differential accumulation of domoic acid in *European oysters*, *Queen scallops* and ascidians *Microcosmus spp.* 13<sup>th</sup> Conference With food to health, Osijek, Hrvatska, str. 101-101.
- Pleadin, J., Lešić, T., Vulić, A., Zrnčić, S., Krešić, G. (2020) Fatty acids profile and lipid quality indices of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) sampled along the Adriatic coast. 12<sup>th</sup> Nordic Nutrition Conference, Helsinki, Finska, str. 45-45.
- Pleadin, J., Lešić, T., Brnić, D., Perković, I., Kiš, M., Zdravec, M. (2020) Detection of aflatoxin-producing moulds from the surface of Istrian and Slavonian sausage. 18<sup>th</sup> Ružička Days, Vukovar, Hrvatska, str. 113-113.

- Vahčić, N., Lešić, T., Zadravec, M., Perković, I., Kiš, M., Jaki, V., Pleadin, J. (2020) The impact of physicochemical properties of traditional dry-fermented sausages on surface mould nascence. 34<sup>rd</sup> EFFoST International Conference, *online*, str. PT 1044.
- Pleadin, J., Zadravec, M., Lešić, T., Perković, I., Kiš, M., Vahčić, N. (2020) Influence of regional climate on prevalence and diversity of moulds overgrowing prosciutto surface. 34<sup>rd</sup> EFFoST International Conference, *online*, str. PT 1043.
- Pleadin, J., Lešić, T., Zadravec, M., Vahčić, N. (2021) Mycotoxin hazard in traditional meat products. 14<sup>th</sup> International congress on nutrition, Beograd, Srbija, str. 103-104.
- Lešić, T., Zadravec, M., Vahčić, N., Brnić, D., Perković, I., Jakopović, Ž., Pleadin, J. Toxigenic moulds growing on the surface of traditional Croatian household-produced dry-fermented sausages. 18<sup>th</sup> Ružička Days, Vukovar, Hrvatska, str. 105-105.
- Pleadin, J., Kudumija, N., Vulić, A., Zadravec, M., Lešić, T., Škrivanko, M., Perković, I., Vahčić, N. (2019) Ochratoxin A in Traditional Meat Products from Croatian Households. International Research Conference, Prag, Češka, str. 538-538.
- Zadravec, M., Jakopović, Ž., Lešić, T., Kiš, M., Perković, I., Pleadin, J. (2019) Cyclopiazonic acid producers in dry-fermented sausages. 12. skup Hranom do Zdravlja, Osijek, Hrvatska, str. 108-108.
- Pleadin, J., Lešić, T., Vulić, A., Kudumija, N., Vahčić, N. (2019) Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in traditional dry-fermented sausages using LC-MS/MS method. 33<sup>rd</sup> EFFoST International Conference, Rotterdam, Nizozemska, str. P2204.
- Pleadin, J., Krešić, G., Lešić, T., Vulić, A., Kudumija, N., Bogdanović, T., Malenica Staver, M., Kos, I., Sinčić Puljić, B., Vahčić, N. (2019) Nutritive and sensorial quality of Istrian and Slavonian dry-fermented sausages. 12. skup Hranom do Zdravlja, Osijek, Hrvatska, str. 136-136 .
- Lešić, T., Zadravec, M., Brnić, D., Jakopović, Ž., Kiš, M., Pleadin, J. (2019) Detection of ochratoxigenic moulds in traditional Croatian sausages. 12. skup Hranom do Zdravlja, Osijek, Hrvatska, str. 100-100.
- Pleadin, J., Kvirgić, K., Vahčić, N., Zrnčić, S., Vulić, A., Lešić, T., Džafić, N., Oraić, D., Krešić, G. (2018) Impact of locality on fatty acids composition of the mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). 17<sup>th</sup> Ružička days Osijek, Hrvatska, str. 89-89.

- Pleadin, J., Kvirgić, K., Zrnčić, S., Lešić, T., Vulić, A., Džafić, N., Oraić, D., Krešić, G. (2018) Variations in fatty acid composition of the European flat oyster (*Ostrea edulis*) from the Adriatic Sea. 9<sup>th</sup> International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Zagreb, Hrvatska, str. 167-167.
- Vulić, A., Kudumija, N., Lešić, T., Pleadin, J. (2018) Flavour enhancer monosodium glutamate (MSG) in pate sampled from the Croatian market. 9<sup>th</sup> International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Zagreb, Hrvatska, str. 166-166.
- Lešić, T., Pleadin, J., Vulić, A., Krešić, G. (2017) Masnokiselinski sastav trajnih i polutrajnih kobasica na hrvatskom tržištu. 10. skup Hranom do zdravlja, Osijek, Hrvatska, str. 113-113.
- Pleadin, J., Krešić, G., Lešić, T., Vulić, A., Barić, R., Bogdanović, T., Oraić, D., Legac, A., Zrnčić, S. (2017) Comparison of fatty acids composition of three commercial fish species farmed in the Adriatic Sea. 19<sup>th</sup> World Academy of Science, Engineering and Technology, Lisabon, Portugal, str. 713-713.
- Lešić, T., Zrnčić, S., Barić, R., Oraić, D., Vulić, A., Legac, A., Pleadin, J. (2016) Nutritivna vrijednost zubatca (*Dentex dentex*) i komarče (*Sparus aurata*) uzgojenih u jadranskome moru. 9. skup Hranom do zdravlja, Osijek, Hrvatska, str. 9-9.
- Pleadin, J., Krešić, G., Kolarić Kravar, S., Lešić, T., Vahčić, N. (2016) Alergeni gluten i soja u mesnim proizvodima sa hrvatskog tržišta. 9. skup Hranom do zdravlja Osijek, Hrvatska, str. 54-54.
- Pleadin, J., Kovačević, D., Vulić, A., Barbir, T., Malenica Staver, M., Vahčić N. (2015) Fat content and fatty acid composition of traditional dry-fermented sausages coming from Croatian households. 3<sup>rd</sup> North and East European NEEFOOD Congress on Food, Brasov, Rumunjska.
- Pleadin, J., Vahčić, N., Malenica Staver, M., Vulić, A., Barbir, T., Raspović, I., Mikuš, T., Kovačević, D. (2015) Differences in fatty acid composition of Istrian vs Dalmatian prosciutto. Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, Tekirdag, Turska, str. 142-142.