

Originalni naučni rad

PLIJESNI I MIKOTOKSINI U ZAČINIMA

Željka Marjanović-Balaban¹, Vesna Kalaba², Dragana Kalaba³

¹Šumarski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, Republika Srpska,
Bosna i Hercegovina,

²JU Veterinarski institut Republike Srpske "Dr Vaso Butozan" Banja Luka,
Republika Srpska, Bosna i Hercegovina,

³Medicinski fakultet-Odsjek Farmacija, Univerzitet u Banja Luci, Republika Srpska,
Bosna i Hercegovina

Sažetak: *Plijesni su velika grupa mikroorganizama koji mogu uticati na zdravstvenu ispravnost namirnica, bilo svojim prisustvom, bilo sposobnošću da proizvede sekundarne metabolite – mikotoksine. Neophodno je provoditi redovnu mikološku i mikotoksikološku kontrolu sirovina koje se koriste u prehrambenoj industriji, kako bi se smanjio rizik po zdravlje ljudi, ali i štete koje mogu nastati u procesu proizvodnje. U ovom radu je na prisustvo plijesni analizirano ukupno jedanaest vrsta začina (origano, karanfilić, crni i bijeli biber, crni i bijeli luk, kim, muskatni orah, ljuta i slatka crvena začinska paprika i korijander). Izolacija i identifikacija plijesni je izvršena Sabouraud maltoznim agarom (SMA). Prisustvo mikotoksina aflatoksina (B1+G1), ohratoksina A i zearalenona je ispitano metodom ELISA testa. U svim ispitanim uzorcima začina utvrđeno je prisustvo plijesni. Izolovane plijesni su pripadnici sedam rodova i to: Penicillium spp., Aspergillus spp., Eurotium spp., Paecilomyces spp., Fesarium spp., Mucor spp. i Rhizopus spp. Najzastupljenije su vrste roda Penicillium spp., Aspergillus spp. i Fesarium spp. Ispitivanjem mikotoksina utvrđeno je prisustvo aflatoksina B1 u jednom uzorku mljevenog bijelog bibera. Mikotoksikološka kontrola začina izuzetno je rijetka, te je neophodno uvesti organizovanu kontrolu začina, ali i preventivnih mjera u toku skladištenja biljne sirovine, što je od velikog značaja za zdravlje potrošača.*

KLjučne riječi: začini, plijesni, mikotoksini

Uvod

Plijesni (filamentozne gljive) su velika grupa mikroorganizama u carstvu gljiva. Mikotoksini (*mykes*-gljiva, *toxicon*-otrov) su toksični proizvodi sekundarnog metabolizma nekih vrsta plijesni. S obzirom na ciljni organ djelovanja mogu se klasifikovati kao hepatotoksini, nefrotoksini ili neurotoksini, a mogu imati karcinogena, mutagena, imunotoksična i teratogena svojstva. Plijesni su prisutne u prirodi, pojavljuju se u hrani biljnog i životinjskog porijekla, a u vazduhu su prisutne u obliku spora. Čovjek koristi plijesni u proizvodnji sira, kobasica te u farmaceutskoj industriji. Sa druge strane spektra nalaze se toksični metaboliti plijesni poput mikotoksina, koji osim što mogu imati negativne posljedice na ljudsko zdravlje, imaju negativne posljedice i na privredu zemlje. Pretpostavlja se da su mikotoksini bili prisutni u hrani od početka života na zemlji, a prvi podaci o štetnim efektima upotrebe plijesnive hrane u Kini datiraju još od prije 5000 godina. Danas se pouzdano

zna da su mikotoksini vezani za pojavu nekoliko trovanja širokih razmjera, kao i smrt stotine hiljada ljudi i životinja u Evropi i drugim kontinentima: bolest konja i svinja u SAD povezana je sa uzimanjem raži koja je bila kontaminirana sa *Fusarium graminearum*; stahibotrikoza konja u bivšem SSSR-u i ovaca u Slovačkoj i Mađarskoj; facijalni ekcem ovaca na Novom Zelandu; tumori jetre indukovani "žutim pirinčanim toksinom" u Japanu nakon II svetskog rata; alimentarna toksična aleukija (ATA) u Sibiru 1913. godine; balkanska endemska nefropatija, i dr. Međutim, mikotoksinima i mikotoksikozama se nije pridavala velika pažnja sve do 1960. godine, kada je "X"-bolest ćurana, pačića i fazana prouzrokovala velike ekonomske štete u Engleskoj i dovela do otkrića uzročnika-aflatoksina (Samson i sar., 2004; Wyatt i sar., 2005; Diaz, 2005).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), procjenjuje se da je oko 25% ukupne svjetske proizvodnje namirnica biljnog porijekla, na godišnjem nivou kontaminirano mikotoksinima (FAI/IAEO, 1997). Mikotoksini zbog svoje stabilnosti dugo ostaju u biljnim i životinjskim proizvodima te su potencijalno velika opasnost za zdravlje ljudi i životinja u brojnim zemljama svijeta, naročito u zemljama u razvoju (Bennett i Klich, 2003). Izloženost mikotoksinima i način unosa u ljudski organizam uglavnom je putem kontaminirane hrane, a rjeđe udisanjem ili transdermalnim putem. Bolesti koje uzrokuju nazivaju se mikotoksikoze. Rizik od mikotoksikoza je moguće značajno smanjiti poznavanjem identiteta plijesni i njihovog toksičnog potencijala. Međutim, iako je do sada izolovano više od 300 različitih mikotoksina, samo je za nekolicinu poznat njihov toksičan, mutagen, genotoksičan, karcinogen i teratogen potencijal (Peraica i Rašić, 2020). Zato, ne bez razloga, mikotoksini nose naziv "tihe ubice", "skrivena opasnost", "neizbježni kontaminanti" i "prirodni toksini". Generalno to su prirodni kontaminanti hrane, što predstavlja veliki problem širom svijeta. Mada su skoro svi mikotoksini citotoksični (utiču na vitalne ćelijske procese), brojnim istraživanjima utvrđeno je da 20-30 mikotoksina, prema svojoj toksičnosti i zastupljenosti, ima nutritivni, ekološki, ekonomski i što je najvažnije i medicinski značaj (Smith, 2016). Zbog svoje povezanosti s velikim brojem mikotoksikoza na istaknutom su mjestu tri roda plijesni: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (Kocić-Tanackov i Dimić, 2013). Najznačajniji po svom toksičnom i karcinogenom djelovanju su: aflatoksini (B1, B2, G1, G2), ohratoksini (A, B, C, α , β), zearalenon fumonizini (B1, B2, B3, B4), trihoteceni (DAS, T-2, deoksinivalenol i dr.) (Blunden i sar., 1991). Biološko djelovanje mikotoksina može biti: nefrotoksično (toksičnost-kancerogenost) (ohratoksin, citrinin, sterigmatocistin, aflatoksin, putrin), neurotoksično (toksičnost-kancerogenost) (patulin, fumonizin B1, rubrotoksini B), hepatotoksično (aflatoksin B1, ohratoksin, sterigmatocistin, rubrotoksini B, citrini, luteoskirini, rugulozin, putrin, penicilinska kiselina), estrogeno (zearalenon), kancerogeno (aflatoksin B1, ohratoksin A, fumonizin B1), imunosupresivno (aflatoksin B1, ohratoksin A, T-2 toksin), mutageno (ohratoksin, zearalenon, sterigmatocistin, citrimin, patulin, penicilinska kiselina) i dermatotoksično (fotosenzibilni faktor) (sporodezinin, trihoteceni, aflatoksini) (Pleadin i sar., 2018). Njihova biosinteza zavisi o vrsti plijesni, o klimatskim uslovima i uslovima sredine, fizičko-hemijskim faktorima (vlaga, temperatura, sastav substrata, pH sredine, koncentracija CO₂, O₂, vrijeme i dr.) (Turner i sar., 2009). Temperatura, aktivitet vode,

pH i relativna vlažnost vazduha su parametri rasta koji su konstantni za svaku pojedinu plijesan i sintezu mikotoksina. Osim toga, za sintezu mikotoksina ključni su supstrat, stres, mehanička oštećenja na biljci te antagonistički odnosi s drugim bakterijama i plijesnima (Champ i Highley, 1988). Iako je prema procjeni FAO-a u svijetu mikotoksinima kontaminirano oko 25 % usjeva, procjenjuje se da je taj postotak i mnogo viši, čak 60-80% (Eskola i sar., 2019). Mikotoksini osim štetnog djelovanja na zdravlje mogu imati i značajan negativan ekonomski uticaj na poljoprivredu i prehrambenu industriju. Ekonomski gubici uzrokovani mikotoksinima mjere se u milijardama dolara širom svijeta svake godine (Marin i sar., 2013) i pogađaju sve, od poljoprivrednih proizvođača, prerađivača, distributera do samih potrošača.

Više vrsta plijesni može proizvesti isti mikotoksin, ali isto tako jedna vrsta plijesni može proizvesti više vrsta mikotoksina (Smith i sar., 2016). Većina mikotoksina je hemijski stabilna pa može preživjeti skladištenje i preradu namirnica, čak i tretiranje visokim temperaturama (Turner i sar., 2009). Prisutnost plijesni u namirnici ne znači nužno prisutnost mikotoksina (ukoliko plijesan nije dovoljno porasla), ali s druge strane, odsutnost plijesni ne znači da nema mikotoksina, jer se mogu zadržati u supstratu dugo nakon nestanka plijesni. Poseban problem predstavlja i pojava tzv. maskiranih mikotoksina koji se u hrani nalaze u promijenjenom obliku. Mikotoksini kao sekundarni metaboliti plijesni jedni su od najtoksičnijih onečišćivača hrane koji uzrokuju značajne gubitke tokom procesa njene proizvodnje i skladištenja. Glavni izvor mikotoksina predstavljaju različite vrste žitarice i proizvodi na bazi žitarica, začini, sušeno voće, orašasti plodovi, kafa, čajevi te proizvodi životinjskog porijekla i brojne druge namirnice (Turner i sar., 2009; Marin i sar., 2013). Do onečišćenja može doći već na poljoprivrednoj površini, odnosno polju, ali i za vrijeme transporta i skladištenja sirovina i gotovih proizvoda. Mikotoksini kod ljudi uzrokuju različite simptome i bolesti kao što su smanjena elastičnost krvnih sudova, unutrašnje krvarenja, dijareja, povraćanje, krvarenje iz crijeva, oštećenje jetre, nekroza, fibroza, oštećenja sluznice probavnog sistema, anoreksija, poteškoće s disanjem, krvarenje iz pluća, drhtavica, nekoordinirani pokreti, depresija, glavobolja, sterilnost, promjene u reproduktivnim ciklusima, oštećenje bubrega, osip, osjećaj vrućine, fotosenzitivnost, promjene ili potpuno uništenje imunog sistema (Vasić-Rački i sar., 2010). Zbog interakcije mnogih bioloških faktora ne može se sa sigurnošću utvrditi koji je od njih uzročnik određene bolesti zbog čega je dijagnoza mikotoksikoza uvijek otežana. Za razliku od bakterijskih i virusnih oboljenja mikotoksikoze su vezane za hranu, bolest nije infektivna niti se prenosi kontaktom. Terapija za mikotoksikoze ne postoji, pa se liječenje usmjerava ka zahvaćenom organskom sistemu, a najdjelotvornija mjera je promjena prehrane nakon dijagnostikovane mikotoksikoze (Mitak, 2015). Strategija uklanjanja mikotoksina i nadalje je u eksperimentalnoj fazi razvoja. U nedostatku odgovarajućih toksikoloških podataka za oblike mikotoksina koji se stvaraju tokom prerade hrane treba pretpostaviti da imaju istu toksičnost, istu biološku raspoloživost i isti karcinogeni potencijal kao i izvorna jedinjenja, a pri razvoju metoda uklanjanja prioritet trebaju imati mikotoksini nepoželjnoga toksikološkoga profila koji se učestalo i u značajnim koncentracijama javljaju u najčešće konzumiranim vrstama namirnicam (Pleadin i sar., 2017).

Začini su proizvodi biljnog porijekla, svojstvenog mirisa i ukusa koji se dodaju prehrambenim proizvodima radi postizanja odgovarajućeg mirisa i ukusa ili radi bolje svarljivosti. Pravilnim izborom začina postiže se potpuno gastronomsko zadovoljstvo, ali i određeni ljekoviti efekti. Začini zbog svog bogatog sadržaja različitih hemijskih jedinjenja imaju veliku primjenu osim u kulinarstvu i u medicini, jer posjeduju antimikrobna, antioksidativna, antiinflamatorna i mnoga druga pozitivna svojstva. Zavisno od vrste, začini mogu biti kontaminirani raznim plijesnima, odnosno mikotoksinima. Iako se dodaju u malim količinama u namirnice, ne treba zanemariti činjenicu da za pojedine mikotoksine ne postoji apsolutno tolerantna doza i da unošenje manjih količina mikotoksina duži vremenski period može dovesti do istih posljedica kao i jednokratno unošenje većih količina. Najčešće vrste plijesni izolovane iz začina su: *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. candidus*, *A. versicolor*, *Eurotium* spp., *Wallemia sebi*, *P. islandicum*, *P. neopurpureogenum*, *P. citrinum*, *P. aurantiogriseum* (Filtenborg i sar., 2005). Sa aspekta bezbjednosti i kvaliteta krajnjeg proizvoda, nameće se pitanje higijenske ispravnosti, standardnog kvaliteta i uslova čuvanja začina. Kao nesterilni biljni materijal, pogodan su ambijent za razvoj plijesni, a dodati kao takvi u prehrambenim proizvodima mogu izazvati niz nepoželjnih efekata, od promjene mirisa i ukusa, do produkcije mikotoksina i alimentarnih trovanja (Leistner, 1985).

Cilj ovoga rada je da se dobije objektivna slika o prisutnosti plijesni u začinima koji se koriste u prehrambenoj industriji i učestalosti pojave toksigenih vrsta, koje su od prevashodnog značaja sa zdravstvenog aspekta.

Materijal i metode rada

Mikološkim i mikotoksikološkim ispitivanjima obuhvaćeno je jedanaest vrsta začina koji se najčešće koriste u prehrambenoj industriji: mljeveni bijeli biber, mljeveni crni biber, bijeli luk u prahu, crni luk-sjeckani, kim, muskatni orah, mljevena ljuta paprika, mljevena slatka paprika, koriander, origano i karanfilić. Svi uzorci su uzeti u paru.

Kao medij za utvrđivanje kontaminacije plijesnima korišten je standardni Sabouraud maltozni agar (SMA) sa 20 mg/1 hloramfenikola, za mezofilne i higrofilne vrste, te modifikovani SMA kojem smo dodali 6% NaCl, za kserofilne plijesni.

Priprema uzoraka i zasijavanje podloga rađeno je standardnom laboratorijskom procedurom. Ovako pripremljene ploče inkubirane su na 25°C i 35°C. Očitavanje je vršeno poslije 5 i 7 dana inkubacije zbog kasnijeg rasta plijesni, a identifikacija izraslih kolonija nakon 8 dana.

Kod svih uzoraka ispitan je postotak vode metodom sušenja na 105°C.

Koncentracija mikotoksina u izdvojenim uzorcima određena je primjenom komercijalnih testova proizvođača Euro-Dijagnostika iz Holandije. Testovi se zasnivaju na principu tzv. kompetitivne ELISA reakcije (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Rezultati i diskusija

Vlaga, temperatura i vrijeme bitni su faktori koji utiču na to da određeni supstrati podrže rast i razmnožavanje toksina-produkujućih plijesni. Aktivnost vode i temperatura rasta karakteristične su za svaku vrstu plijesni i bitne u proizvodnji mikotoksina, tako da čuvanje začina u uslovima povećane vlage (a_w -relativna vlažnost vazduha) i toplote dovodi do povećanja kontaminacije mikroorganizmima.

Granica kritične vlažnosti zavisno od vrste začina kreće se od 7 do 15% (Sl. Glasnik BiH, 68/14). Istraživanja u ovome radu pokazala su da se postotak vode kretao u propisanim granicama i to od 3,67% do 12,36%.

U Tabeli 1 prikazani su rezultati mikoloških analiza 11 uzoraka različitih začina na dvije različite temperature. Najveći stepen kontaminacije bio je kod uzoraka mljevenog bijelog bibera na temperaturi inkubacije od 25°C, a nešto slabiji na temperaturi od 35°C. Kod muskatnog oraha i mljevene slatke paprike, plijesni su bile podjednako zastupljene na obe temperature inkubacije, dok je kod jednog uzorka bijelog luka u prahu i karanfilića izostao rast plijesni na obe temperature. Kod oba uzorka kima i po jedanog uzorka origana, karanfilića, crnog luka i mljevenog crnog bibera plijesni su rasle samo na temperaturi od 25°C. Inhibitorno djelovanje karanfilića pripisuje se velikoj količini eteričnog ulja (14%-25%) i njegovoj aktivnoj komponenti eugenolu (Kalaba i Đurđević Milošević, 2009).

Rodovi plijesni izolovani iz začina prikazani su u Tabeli 2.

Tabela 1. Rast plijesni na različitim temperaturama inkubacije
Table 1. Fungus moulds on different incubation temperatures

R. br. N ^o	Vrsta začina Name of spice	25°C			35°C		
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
1.	Mljeveni bijeli biber /White pepper	+++	++	+	+	+	-
2.	Mljeveni bijeli biber/White pepper	+++	++	+	+	+	+
3.	Mljeveni crni biber /Bleck pepper	++	+	-	-	-	-
4.	Mljeveni crni biber /Bleck pepper	++	+	-	+	-	-
5.	Bijeli luk u prahu /Garlic ground	-	-	-	-	-	-
6.	Bijeli luk u prahu/Garlic ground	+	-	-	+	-	-
7.	Crni luk/Orion cutting	++	+	-	+	-	-
8.	Crni luk/Orion cutting	+	+	-	-	-	-
9.	Kim/Caraway-gruond	++	+	-	-	-	-
10.	Kim /Caraway-gruond	+	-	-	-	-	-
11.	Muskatni orah/ Nutmeg	++	+	-	++	+	-
12.	Muskatni orah/ Nutmeg	++	+	-	++	-	-
13.	Mljevena ljuta paprika/ Red hot paprika-ground	+	-	-	+	-	-
14.	Mljevena ljuta paprika/ Red hot paprika-ground	++	-	-	++	-	-
15.	Mlevena slatka paprika/ Red paprika-ground	++	+	-	++	+	-

16.	Mljevena slatka paprika/ Red hot paprika-ground	+	-	-	+	-	-
17.	Koriander/Coriander	+	+	-	+	-	-
18.	Koriander /Coriander	+	+	-	-	-	-
19.	Origano/Oregano	+	+	-	+	+	-
20.	Origano/Oregano	+	-	-	-	-	-
21.	Karanfilić/Caraway ground	+	-	-	-	-	-
22.	Karanfilić/Caraway ground	-	-	-	-	-	-

Tabela 2. Pregled izolovanih rodova plijesni iz začina

Table 2. Review of moulds genera isolated from spices

R. br. N ⁰	Naziv začina Name of spice	Rodovi izolovanih plijesni Genera of moulds
1.	Mljeveni bijeli biber/White pepper	<i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.
2.	Mljeveni bijeli biber/White pepper	<i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.
3.	Mljeveni crni biber/Bleck pepper	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Paecilomyces</i> spp.
4.	Mljeveni crni biber/Bleck pepper	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Paecilomyces</i> spp.
5.	Bijeli luk u prahu/Garlic ground	<i>Eurotium</i> spp.
6.	Bijeli luk u prahu/Garlic ground	-
7.	Crni luk/Orion cutting	<i>Paecilomyces</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Mucor</i> spp.
8.	Crni luk/Orion cutting	<i>Paecilomyces</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp.
9.	Kim/Caraway-gruond	<i>Penicillium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.
10.	Kim/Caraway-gruond	<i>Penicillium</i> spp.
11.	Muskatni orah/Nutmeg	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Eurotium</i> spp.
12.	Muskatni orah/Nutmeg	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Eurotium</i> spp.
13.	Mljevena ljuta paprika/Red hot paprika-ground	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.
14.	Mljevena ljuta paprika/Red hot paprika-ground	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp.
15.	Mljevena slatka paprika/Red paprika-ground	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Mucor</i> spp.
16.	Mljevena slatka paprika/Red paprika-ground	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.
17.	Korijander/Coriander	<i>Penicillium</i> spp.
18.	Korijander/Coriander	<i>Penicillium</i> spp.
19.	Origano/Oregano	<i>Penicillium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.
20.	Origano/Oregano	<i>Penicillium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.
21.	Karanfilić/Caraway ground	<i>Penicillium</i> spp.
22.	Karanfilić/Caraway ground	-

Kod svih ispitivanih začina utvrđeno je prisustvo plijesni. Izolovane plijesni su svrstane u sedam rodova. Plijesni iz roda *Penicillium* spp. izolovane su iz 54,54% uzoraka, *Aspergillus* spp. iz 36,36%, vrste iz roda *Rhizopus* spp. iz 27,27% uzorka,

Fusarium spp. iz 22,72% uzoraka, *Paecilomyces* spp. iz 18,18%, *Eurotium* spp. i *Mucor* spp. iz 13,63% uzoraka. Najveća kontaminacija plijesni je u uzorcima mljevene ljute paprike (20%), a najmanja u jednom uzorku bijelog luka u prahu (2,5%) i jednom uzorku karanfilića (2,5%). Većina plijesni izolovanih iz ispitanih uzoraka začina su toksične. Dominirali su *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp., proizvođači aflatoksina i ohratoksina.

Vrste rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Eurotium* su "skladišne" plijesni koje se razvijaju pri a_w vrijednosti 0,85 i nižim, tako da se mogu izolovati iz začina. Vrste iz rodova *Fusarium* su "poljske" gljive za čiji razvoj je potreban veći sadržaj vlage u supstratu i niža temperatura (Jay i sar., 2005; Hashem i Alamri, 2010). Zabrinjava značajno prisustvo "skladišnih" plijesni koje ukazuju na greške u manipulaciji i neadekvatne uslove skladištenja.

Rezultati ovog istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživača (Janković i sar., 2013; Kalaba i Đurđević Milošević, 2009; Dimić i sar., 2008).

Utvrđeno je da su optimalne temperature za stvaranje toksina od strane *Aspergillus* vrste povišene temperature, najčešće između 25 i 30°C i viša relativna vlažnost (iznad 90%), a da su za rast dovoljne niže vrijednosti ovih faktora. Za mikotoksine je temperaturni raspon vrlo širok i kreće se od -3°C do 58°C. Da bi se spriječila produkcija aflatoksina i ohratoksina predlaže se temperatura skladištenja od 5°C, a za stvaranje patulina i zearalenona i niža (Bem i Adamić, 1991; Rašeta, 1981; Dimić i sar., 2008).

Mikotoksikološkom analizom ispitanih začina nije detektovano prisustvo ohratoksina A (OTA) i zearalenona metodom ELISA testa ni kod jednog uzorka, dok je aflatoksina B1 detektovan kod jednog uzorka bijelog bibera. Kod sisara aflatoksini prouzrokuju akutne aflatoksikoze, koje se manifestuju prije svega oštećenjem jetre, mada mogu biti oštećeni i bubrezi, pluća i slezena. Izloženost aflatoksinima dovodi do smanjenja imunološkog odgovora organizma, a posebno mijenja osjetljivost prema virusima, čineći organizam osjetljivim i podobnim za razvoj brojnih virusnih oboljenja (Weidenbörner, 2008; Verbanac, 2013). Za razliku od rezultata ovih ispitivanja, nalazi drugih autora (Karan i sar., 2005; Bugno i sar., 2006) ukazuju na prisustvo aflatoksina, ohratoksina i zearalenona u uzorcima crnog bibera u zrnju, mljevene začinske paprike, korijandera i drugih začina. Rezultati ovih ispitivanja su u saglasnosti sa ispitivanjima koja je izvršio Mandeel (2005), a koja su utvrdila prisustvo potencijalno toksičnih plijesni kod 17 analiziranih začina, pri čemu su dominantni rodovi *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp., kod kojih je utvrđeno da ne proizvode toksine.

Hemijski i fizički procesi obrade hrane mogu dovesti do otpuštanja mikotoksina iz "maskiranih" oblika i time ih učiniti biološki raspoloživim, odnosno konvertovati mikotoksine u oblike koji se konvencionalnim analitičkim metodama ne mogu detektovati, a da pri tom zadrže svoj toksični potencijal ili pospješe plijesni koje su prisutne na namirnici da proizvede mikotoksine (Suman i Generotti, 2015). O djelovanju prerade na nivou mikotoksina u začinima nedostaje literaturnih podataka. Postoje izvještaji o umjerenom smanjenju količine OTA i aflatoksina u biberu nakon

ozračivanja gama zracima (Jalili i sar., 2012). Potrebno je razviti analitičke metode koje mogu detektovati mikotoksine koji se u procesu prerade hrane mogu transformisati u različite oblike. Veći dio istraživanja o mikotoksinima usmjeren je na mikotoksine čije su najveće dopuštene količine zakonski regulisane. Otkriće plijesni *Stachybotrys chartarum* u bilju koje se koristi u kulinarstvu (Biermaier i sar., 2015) ukazuje na to da je spektar istraživanja potreba proširiti.

Zaključak

Rezultati ovog ispitivanja ukazuju na veliku zastupljenost plijesni u začinima. 90,90 % ispitanih uzoraka je pozitivno na prisustvo plijesni. Mikotoksini gotovo da nisu prisutni u ispitanim uzorcima začina. Aflatoksin B1 izolovan je samo iz jednog uzorka mljevenog bijelog bibera.

Mikotoksikološka kontrola začina izuzetno je rijetka ili je uopšte nema. Kako bi se izbjegle moguće negativne posljedice mikotoksina po zdravlje potrošača potrebno je uz organizovanu kontrolu hrane provoditi i preventivne mjere u proizvodnji i skladištenju biljnih proizvoda i proizvoda životinjskog porijekla. Kvalitetna i zdravstveno ispravna sirovina najkraći je i najjeftiniji put za prehrambenu industriju da bi se zadovoljili svi relevantni zakonski propisi i tako očuvalo zdravlje potrošača.

Literatura

- Bem, Z., Adamić, J. (1991): *Mikrobiologija mesa i proizvoda od mesa*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Bennett, J. W. and M. Klich (2003): Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 497-516.
- Biermaier, B., Gottschalk, C., Schwaiger, K., Gareis, M. (2015): Occurrence of *Stachybotrys chartarum* chemotype S in dried culinary herbs. *Mycotoxin Research*, 31, 23–32.
- Blunden, G., Roch, O.G., Ogers, D.J., Coker., R.D., Bradburn, N., John, A.E.(1991): Mycotoxins in fod. *Medical laboratory sciences*, 48, 271-282.
- Bugno, A., Buzzo Almodovar, A.A., Caldas Pereira, T., de Jesus Andreoli Pinto, T., Champ, B.R., Highley, E. (1988): Bulk handling and storage of grain. *22th Australian centre for International Agricultural Research (ACIAR)*, Canberra, Proseedings, 67-78.
- Diaz, D. (2005): *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham.
- Dimić, G., Kocić-Tanackov, S.D., Tepić A.N., Vujičić B.L., Šumić, Z.M. (2008): Mycopopulation of spices, *APTEFF*, 39, 1-212 doi: 10.2298/APT0839001D.
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C.T., Hajšlová, J., Mayar, S., Krska, R. (2019): Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17.
- FAO/IAEO (1997): *Consultans meeting on analitical methods for determining mycotoxin contamination of food/feed*. Trade Wienna, Austria.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Samson, A.R. (2004): *Introduction to Foodborne Fungi: Specific Association of Fungal to Foods and Influence of Physical Environmental Factors*. Centra- albureau voor Schimmelcultures, Baarn-Delft.

- Hashem, M. and S. Alamri (2010): Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxinproducing fungi. *Saudi J. Biol. Sci.*, 17, 167–175.
- Jalili, M., Jinap, S., Noranizan, M.A. (2012): Aflatoxins and ochratoxin a reduction in black and white pepper by gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 1786–1788.
- Janković, V., Škrinjar, M., Vukojević, J., Borović, B., Radmili, M. (2013): Izolovanje i identifikacija kserofilnih plesni iz začina koji se koriste u industriji mesa. *Tehnologija mesa*, 49(1–2), 30–35.
- Jay, J., Loessner, M., Golden, D. (2005): *Modern Food Microbiology*. Springer Science + Business Media, Inc., New York, USA.
- Kalaba, V. i D. Đurđević Milošević (2009): Mikološka kontaminacija začina u mesnoj industriji. *Veterinarski žurnal RS*, IX(2), 159-162.
- Karan, D., Vukojević, J., Milićević, D., Ljajević–Grbić, M., Janković, V. (2005): Kontrola prisustva plesni i mikotoksina u pojedinim začinima koji se koriste u industriji mesa. *Tehnologija mesa*, 46(5–6), 306–310.
- Kocić-Tanackov, S.D. i G.R. Dimić (2013): Gljive i mikotoksini – kontaminanti hrane. *Hemijska industrija*, 67(4), 639–653.
- Leistner, L. (1985): Microorganisms in spices storage. *Začimba-tehnologija začinjavanja*, 1, 6-16.
- Mandeel, Q. (2005): Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, 159(2), 291–298.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013): Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-238.
- Mitak, M. (2015): *Patologija hranidbe domaćih životinja*. Medicinska naklada, Zagreb.
- Peraica, M. i D. Rašić (2020): Rizik izloženosti najvažnijim mikotoksinima roda *Apergillus* za ljudsko zdravlje. *Glasilo biljne zaštite*, 20(3), 340-345.
- Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2017): Utjecaj postupaka prerade na transformaciju i smanjenje koncentracije mikotoksina u određenim skupinama hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 12(1-2), 4-13.
- Pleadin, J., Vasilj, V., Petrović, D. (2018): *Mikotoksini: pojavnost, prevencija i redukcija*. Sveučilište u Mostaru, Mostar.
- Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani. Sl. Glasnik BiH, br. 68/14.
- Rašeta, J. (1981): *Higijena mesa*. Naučna knjiga, Beograd.
- Sabino, M. (2006): Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brasilian Journal of Microbiology*, 37(1), 317 – 326.
- Samson, A.R., Hoekstra, S.E., Frisvad, C.J. (2004): *Introduction to Food-and Airborne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Smith, M. C., Madec, S., Coton, E., Hymery, N. (2016): Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. *Toxins*, 8(4), 84-94.
- Smith, M.C., Madec, S., Coton, E., Hymery, N. (2016): Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. *Toxins*, 8(4), 94.
- Suman M. i S. Generotti (2015): Transformation of mycotoxins upon food processing: masking, binding and degradation phenomena. U C. Dall'Asta, & F. Berthiller (Eds.), *Masked mycotoxins in food: formation, occurrence and toxicological relevance* (pp.73-89). RSC Publishing, Cambridge.
- Turner, N. W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S. A. (2009): Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180.

- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. (2009): Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180.
- Vasić-Rački, Đ., Galić, K., Delaš, F., Klapac, T., Kipčić, D., Katalenić, M., Dimitrov, N., Šarkanj, B. (2010): *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek.
- Verbanac, D. (2013): *Aflatoxin*. Prehrana, Pliva, Zdravlje.
- Weidenbömer, M. (2008): *Mycotoxins in Foodstuffs*. Springer Science+Business Media, LLC, New York.
- Wyatt, D.R. (2005): *The Mycotoxin Blue Book: Mycotoxin Interactions*. Nottingham University Press, Nottingham.

MOULDS AND MYCOTOXINS IN SPICES

Željka Marjanović-Balaban¹, Vesna Kalaba², Dragana Kalaba³

¹Faculty of Forestry, University of Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Hercegovina

²Veterinary Institute of the Republic of Srpska "Dr Vaso Butozan" Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Hercegovina

³Faculty of Medicine-Department of Pharmacy, University of Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Hercegovina

Abstract: Moulds are a large group of microorganisms which could influence the food quality, either by their presence or ability of producing secondary metabolites-mycotoxins. It is necessary to perform permanent mycological and mycotoxicological control of basic commodities which are used in food industry in order to reduce risk for health and losses in food production. The total number of moulds in 11 different spices samples (oregano, clove, black and white pepper, garlic, onion, cumin, nutmeg, coriander, red paper spice and sweet chilli) was analyzed. Isolation and identification of moulds were done on Sabouraud/malt agar (SMA). The presence of aflatoxins (B1 + G1), ochratoxins A and zearalenone was done using ELISA test. Mould was found in all tested spices. Isolated moulds belonged to 7 genera *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Eurotium* spp., *Paecilomyces* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp. and *Rhizopus* spp. The most frequent were *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. and *Fusarium* species spp., respectively. The presence of aflatoxin B1 was found by testing mycotoxins in one ground white pepper sample. Mycotoxins analysis of spices is incredibly rare, thus it is necessary to implement organised control of spices, but also preventative measures during the storage of plant mass, which is of great importance to the health of the consumer.

Key words: spices, fungi, mycotoxins