

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

Mr Gordana R. Dimić

MIKOLOŠKI I MIKOTOKSIKOLOŠKI
ASPEKTI POJAVE PLESNI U ZAČINIMA

DOKTORSKA DISERTACIJA

NOVI SAD, 1999.

Svom mentoru Prof. Dr. Mariji Škrinjar najtoplije se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći i podršci tokom izrade doktorske disertacije.

Izražavam zahvalnost Prof. Dr. Ljiljani Petrović i Prof. Dr. Mitru Govedarici na korisnim savetima i sugestijama.

Zahvalnost dugujem i svim onima koji su mi na bilo koji način pomogli da ovaj rad dovedem do kraja.

Autor

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIONA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije:
TD Monografska publikacija

Tip zapisa:
TZ Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada:
VR Doktorska disertacija

Autor:
AU Mr Gordana Dimić

Mentor/ko-mentor
MN Dr Marija Škrinjar, redovan profesor, Tehnološki fakultet,
Univerzitet u Novom Sadu

Naslov rada:
NR "Mikološki i mikotoksikološki aspekti pojave plesni u začinicima"

Jezik publikacije
JP Srpski (latinica)

Jezik izvoda:
JI Srpski/engleski

Zemlja publikovanja:
ZP SR Jugoslavija

Uže geografsko područje:
UGP Vojvodina

Godina:
GO 1999.

Izdavač:
IZ Autorski reprint

Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, YU, Bulevar Cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja 7, strana 125, lit. citata 253, tabela 36, slika 43
Naučna oblast: NO	Prehrambena tehnologija
Naučna disciplina: ND	Mikrobiologija hrane
Predmetna odrednica/ključne reči PO	plesni, mikotoksini, začini, proizvodi od mesa
UDK	579.67:664.93:633.82:582.281/.282/.288:613.632
Čuva se: ČU	U Biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21 000 Novi Sad, YU, Bulevar Cara Lazara 1
Važna napomena: VN	Nema
Izvod/apstrakt: IA	<p>Ispitano je prisustvo plesni u začinskim smešama (za proizvodnju mortadele, mesnog nareška, srpske ljute kobasice, alpske i tirolske salame, viršle i šunkarice), crnom biberu u zrnju i mlevenoj začinskoj paprici. Intenzitet kontaminacije bio je najveći u začinskim smešama (46,13%), zatim crnom biberu (28,95%) i začinskoj paprici (24,92%).</p> <p>Uočena je dominacija grupe kserofilnih plesni iz rodova <i>Aspergillus</i>, <i>Emericella</i>, <i>Eurotium</i>, <i>Paecilomyces</i>, <i>Penicillium</i> i <i>Xeromyces</i>. Konstatovano je da su u začinskim smešama i crnom biberu najbrojniji bili predstavnici rodova <i>Aspergillus</i> i <i>Penicillium</i>, ali su po zastupljenosti u uzorcima (100%) dominirale plesni roda <i>Eurotium</i> (<i>E. herbariorum</i>). U uzorcima začinske paprike najčešće su detektovane plesni roda <i>Rhizopus</i> (<i>R. stolonifer</i>) (87,5%).</p> <p>Od ukupno 45 vrsta identifikovanih tokom mikoloških ispitivanja začina, 55,5% je bilo potencijalno toksigenih. Prisustvo aflatoksin B1 nije konstatovano ni u jednom od začina, ohratoksin A je pronađen kod dva uzorka crnog bibera (u tragovima; 32,00 µg/kg), a zearalenon kod tri uzorka crnog bibera (192,00 do 288,00 µg/kg).</p> <p>Sposobnost sinteze ohratoksin A utvrđena je kod 4 od 5 testiranih sojeva <i>Aspergillus ochraceus</i> (20,00 do 340,00 µg/l). Većina sojeva <i>A. versicolor</i> i 50% <i>E. herbariorum</i> sintetisali su sterigmatocistin u značajnim količinama (100,00 do 1600,00 µg/l, odnosno 100,00 do 400,00 µg/l). <i>A. versicolor</i> se pokazao prilično tolerantnim na uzlaganje visokim temperaturama, preživевši toplotni tretman na 80°C (5 i 10 min), ali je narušena fiziološka aktivnost rezultovala smanjenjem proizvodnje sterigmatocistina.</p>

Koncentracijom kalijum sorbata od 0,5% u potpunosti je inhibiran rast *A. versicolor* na čvrstoj hranljivoj podlozi, ali ne i u tečnoj; proizvodnja sterigmatocistina registrovana je samo pri nižim koncentracijama (0,05 i 0,1%).

Datum prihvatanja teme od strane NN Veća:

DP 06.03.1996.

Datum odbrane:

DO

28.02.2000

Članovi Komisije:

(Naučni stepen, ime i prezime/zvanje/fakultet)

KO

Predsednik:

Prof. Dr Ljiljana Petrović, redovan profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Član:

Prof. Dr Marija Škrinjar, redovan profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Član:

Prof. Dr Mitar Govedarica, redovan profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY

KEY WORDS DOCUMENTACION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual material, printed

Contents code:

CC

Ph.D. Thesis

Author:

AU

M.S. Gordana Dimić

Menthor/co-menthor:

MN

Ph.D. Marija Škrinjar, Full Professor, Faculty of Technology,
University of Novi Sad

Title:

TI

"Mycological and Mycotoxicological Aspects of Mould
Incidence In Spices"

Language of text:

LT

Serbian (Roman)

Language of abstract:

LS

Serbian (Roman)/ English

Country of publication:

CP

FR of Yugoslavia

Locality of publication:

LP

Vojvodina

Publication year:

PY

1999.

Publisher:

PB

Author's reprint

Publication place:
 PL 21000 Novi Sad, YU, Bulevar Cara Lazara 1

Physical description:
 N^o of chapters / pages / ref. / tables / figures / graphics / app.
 PD Chapter: 7/ pages: 125/ references: 253/ tables 36/ fig. 43

Scientific field:
 SF Food Technology

Scientific discipline:
 SD Food Microbiology

Subject/key words:
 SX moulds, mycotoxins, spices, meat products

UC 579.67:664.93:633.82:582.281/.282/.288:613.632

Holding data:
 HD Faculty of Technology Library, Novi Sad, 21000 Novi Sad, YU,
 Bulevar Cara Lazara 1

Note:
 N None

Abstract:
 A

The presence of moulds in spice mixtures (for production of mortadella, luncheon meat, "serbian" hot sausage, "alpine" and "tirol" salami, Frankfurter and ham sausage) was investigated. The highest intensity of contamination was in spice mixtures (46,13%), then in black pepper (28,95 %) and in ground red pepper (24,92%).

The group of xerophyllic moulds of genera *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* and *Xeromyces* was dominant. It was found out that the representatives of genera *Aspergillus* and *Penicillium* were the most numerous, but considering the incidence in samples (100%) the moulds of genus *Eurotium* (*E. herbariorum*) were dominant. In samples of ground red pepper the moulds of the genus *Rhizopus* (*R. stolonifer*) (87,5%) were the most frequently detected.

Among 45 species identified during mycological investigation of spices, 55,5% were possibly toxicogenic. The presence of aflatoxin B1 was not observed in any of spices tested, ochratoxin A was found in two samples of black pepper (from traces to 32,00 µg/kg), and zearalenone in three samples of black pepper (192,00 to 288,00 µg/kg).

The ability for synthesis of ochratoxin A was observed in 4 of 5 tested strains of *Aspergillus ochraceus* (20,00 to 340,00 µg/l). The majority of *A. versicolor* strains and 50% of *E. herbariorum* synthesized sterigmatocystin in significant quantities (100,00 up to 1600,00 µg/l, and 100,00 up to 400,00 µg/l, respectively).

A. versicolor showed to be rather tolerant to exposure to high temperatures by surviving the heat treatment at 80°C (5 and 10 min), but the disturbed physiological activity resulted in reduced production of sterigmatocystin.

By concentration of potassium sorbate of 0,5% the growth of *A. versicolor* on solid medium was totally inhibited, but not on liquid medium; the production of sterigmatocystin was registered only at lower concentrations (0,05 and 0,1%).

Accepted by the scientific board on:

ASB

06.03.1996.

Defended on:

DE

Thesis defend board:

(Degree/ Name and surname /title/ faculty):

DB

President:

Ph.D. Ljiljana Petrović, Full Professor, Faculty of Technology,
University of Novi Sad

Member:

Ph.D. Marija Škrinjar, Full Professor, Faculty of Technology,
University of Novi Sad

Member:

Ph.D. Mitar Govedarica, Full Professor, Faculty of Agriculture,
University of Novi Sad

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. ISTORIЈAT ZAČINA	3
2.2. VRSTE ZAČINA I NJIHOVA AROMATIČNA SVOЈSTVA	4
2.3. PRIMENA ZAČINA U INDUSTRIЈI MESA	8
2.4. PLESNI I MIKOTOKSINI	9
2.4.1. Aflatoksini	11
2.4.2. Ohratoksini	15
2.4.3. Zearalenon (F-2 toksin)	19
2.4.4. Sterigmatocistin	20
2.5. ANTIFUNGALNI AKTIVITET ZAČINA	21
2.6. SKLADIŠTENJE	23
2.7. DEKONTAMINACIЈA I DETOKSIKACIЈA	27
2.8. TEHNOLOŠKI PROCES PROIZVODNJE MLEVENE ZAČINSKE PAPIRIKE (mikrobiološki aspekti)	29
3. CILJ RADA	32
4. MATERIJAL I METODE RADA	34

4.1.	MIKOLOŠKA ISPITIVANJA	35
4.1.1.	Izolovanje i određivanje ukupnog broja plesni	35
4.1.2.	Determinacija plesni	36
4.2.	MIKOTOKSIKOLOŠKA ISPITIVANJA	36
4.2.1.	Određivanje mikotoksina u začinima	36
4.2.2.	Ispitivanje sposobnosti sinteze mikotoksina	38
4.2.3.	Ispitivanje uticaja temperature na inaktivaciju konidija <i>A. versicolor</i> i sintezu sterigmatocistina	40
4.2.4.	Ispitivanje uticaja kalijum sorbata na rast <i>A. versicolor</i> i sintezu sterigmatocistina.....	40
5.	REZULTATI I DISKUSIJA	41
5.1.	UKUPAN BROJ PLESNI U ZAČINIMA	41
5.2.	MIKOPOPULACIJE ZAČINSKIH SMEŠA	45
5.3.	MIKOPOPULACIJE CRNOG BIBERA U ZRNU	61
5.4.	MIKOPOPULACIJE MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE	71
5.5.	UTICAJ PODLOGA NA KVANTITATIVNO I KVALITATIVNO ODREĐIVANJE KSEROFILNIH PLESNI	77
5.6.	PRISUSTVO TOKSIGENIH PLESNI U ZAČINIMA	84
5.7.	PRISUSTVO TOKSIČNIH METABOLITA PLESNI U ZAČINIMA	87
5.8.	BIOSINTEZA OHRATOKSINA A	92
5.9.	BIOSINTEZA STERIGMATOCISTINA	95
5.10.	UTICAJ TEMPERATURE NA INAKTIVACIJU KONIDIJA <i>A. VERSICOLOR</i> I SINTEZU STERIGMATOCISTINA	97
5.11.	UTICAJ KALIJUM SORBATA NA RAST <i>A. VERSICOLOR</i> I SINTEZU STERIGMATOCISTINA	102
6.	ZAKLJUČAK	106
7.	LITERATURA	108

1. UVOD

Integralni problem zaštite životne sredine od zagađivanja obuhvata i zaštitu proizvoda biljnog i animalnog porekla od kontaminacije mikroorganizmima. Poznavanjem vrsta mikroorganizama, njihovih osobina, kao i odnosa prema faktorima koji mogu stimulisati, ili inhibirati njihov razvoj, bitno je za sprečavanje negativnog uticaja koji mogu imati kao kontaminanti životnih namirnica.

Začini predstavljaju grupu proizvoda biljnog porekla kod kojih su plesni permanentno zastupljene. Taj problem postaje još veći ako se zna da se začini intenzivno koriste kao značajni dodaci hrani u industrijskoj preradi i kulinarsvu, imajući presudnu ulogu u formiranju njenog specifičnog mirisa i ukusa. Naročito ih koristi industrija za preradu mesa, kontaminirajući tako mesni nadev plesnima, kod izrade kobasica, koje ponekad mogu biti veoma brojne. Uz to, zbog mogućih higijenskih i tehnoloških propusta u proizvodnji, skladištenju i prometu, tako proizvedena hrana podložna je kvarenju, a može biti i štetna, imajući u vidu efekte koje mikotoksini kao toksični metaboliti nekih rodova plesni mogu da izazovu kod ljudi.

Začini poseduju nisku aktivnost vode. Pri takvim uslovima primarno rastu i razmnožavaju se plesni i to kserofilne vrste iz rodova *Aspergillus*, *Eurotium* i *Penicillium*. Mada se kao kontaminanti javljaju i bakterije (najčešće sporogene) i kvasci, ovi mikroorganizmi zahtevaju uslove visoke vlažnosti kada postaju fiziološki i reproduktivno aktivni. Za skladištenje začina najvažniji faktor kojim se može ograničiti rast plesni je količina slobodne vode (aktivitet vode), dok se proizvodnja mikotoksina odvija u mnogo širem temperaturnom rasponu. Visok stepen kontaminacije plesnima često se javlja kod začina koji vode poreklo iz tropskih i subtropskih područja, gde su najveći proizvođači siromašne zemlje u kojima su primarna proizvodnja i higijenski uslovi prilično zapostavljeni.



Neki mikotoksini (aflatoksini, ohratoksini i sterigmatocistin) ispoljavaju visoku toplotnu otpornost. Postupkom termičke obrade, koji se često koristi u prehrambenoj industriji, ne mogu se uništiti. Mnoge kserofilne plesni se razmnožavaju na niskim temperaturama što predstavlja opasnost za one životne namirnice koje se skladište u rashladnim prostorijama. Nepoželjne promene se prvo zapažaju u neposrednoj okolini mesta oštećenja, sa kojih se brže ili sporije šire i obično su praćene pojavom neprijatnog mirisa.

Štetno dejstvo plesni na organizam čoveka i životinja, pored izlučivanja mikotoksina u hranu, ogleda se i u njihovom delovanju kao parazita izazivača oboljenja poznatih kao mikoze. Spore nekih vrsta (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *Alternaria alternata*, *Absidia corymbifera*, itd.) poznate su kao inhalacioni alergeni.

Sve više ima indicija da primarni karcinom jetre i druga teška oboljenja kod ljudi mogu biti indukovana konzumiranjem hrane i korišćenjem sirovina u prehrambenoj industriji koje su kontaminirane plesnima, odnosno mikotoksinima. Poslednjih decenija u razvijenom svetu poklanja se velika pažnja detektovanju mikotoksina u hrani i proučavanju faktora koji utiču na rast plesni i sintezu mikotoksina.



2. PREGLED LITERATURE

2.1. ISTORIJAT ZAČINA

Značajan broj vrsta biljaka zbog posedovanja karakterističnih aromatičnih svojstava koriste se za proizvodnju začina. Osnovna uloga ovih proizvoda je da jela učine ukusnijim i pikantnim.

Na najraniju upotrebu začina upućuju iskopine iz mlađeg kamenog doba u kojima su nađeni ostaci maka, anđelike i kima. Prvi pisani podaci ugrađeni u klianasto pismo potiču iz Mesopotamije. U njima se spominju susam, kardamom, kim, mirođija (kopar), komorač, timijan i šafran, koji su gajeni duž plodnih dolina reka Eufrata i Tigra.

Sve što je dobro mirisalo i imalo dobar ukus nije služilo samo za začinjavanje jela. Ostaci začina nađeni su na balzamovanim egipatskim mumijama (ulje cimeta, karanfilića, kasije), koristili su se u farmakologiji i kozmetici. Prilikom religioznih obreda prinosili su ih bogovima kao žrtveno bilje (Bullerman i sar., 1977; Sillicher i sar., 1980).

Po svojoj vrednosti začini su bili skoro izjednačavani sa zlatom, biserima, dragim kamenjem i poput njih, čuvani u dragocenim posudama. Ne tako davno zamenjivali su novac, bili kraljevski poklon, a vreća bibera vredela je koliko i ljudski život. Za posedovanje monopola na začine vekovima su se vodili ratovi, a svaki njihov delić nekada je morao preći pustolovni put oko sveta, pre nego što se prijatan miris počeo širiti Evropom.

Puna dva veka Venecijanci su držali monopol nad cimetom. Ratovi koje je Portugalija vodila sa Holandijom i Engleskom (od 1505. do 1796. god.) u osnovi su

za uzrok imali cimet. Ove pomorske sile borile su se oko Cejlona i rezultat toga bile su skoro potpuno uništene šikare cimeta.

Put začina postojao je još 2000.god. pre stare ere. Karavanima su prenošeni iz Južne Arabije do Egipta. Morskim putevima Indija ih je dovozila takođe u Egipat. Pre nego što je postala intelektualna prestonica Aleksandrija je bila ogromna tržnica začina na putu za zemlje Evrope (Corindarajan, 1977). Potraga za začinima vezana je za imena čuvenih moreplovaca, Kolumba, Vaska de Game, Magelana i osvajanje Novog Sveta.

2.2. VRSTE ZAČINA I NJIHOVA AROMATIČNA SVOJSTVA

Kao začini koriste se različiti delovi biljaka u kojima se nalaze aromatične materije, bilo da je to plod, seme, cvet, list, kora stabla, rizom, koren, ili cela biljka, uglavnom osušeni (tabela 1). Suše se najčešće prirodnim putem na suncu, a manji broj, kao začinska paprika, pod kontrolisanim uslovima. Sve više u upotrebi su i razne aromatične trave i sušeno povrće. U prometu se nalaze cele biljke, usitnjeni, a najčešće samleveni delovi biljaka različite granulacije, začinske smeše i ekstrakti začina (Oluški, 1988).

Aromatična svojstva potiču od eteričnih ulja, isparljivih ekskretornih produkata, koji određuju finoću i originalnost mirisa. Ona sadrže ugljovodonike, terpe-
ne, alkohole, aldehide, ketone, fenole, etre, estre, jedinjenja sumpora i druge aktivne materije (Shelef i sar., 1980). Čvrsti sastojci su mentol, timol, anetol, kamfor. Mnogi začini sadrže jedinjenja koja daju oštar i opor ukus (kapsaicin, piperin, alin, gingerolen i dr.). Ona mogu biti neisparljiva, ili delimično isparljiva i ne nalaze se u eteričnom ulju. U ekstrakt eteričnog ulja mogu preći ako se estrahuju odgovarajućim rastvaračima.

Od svih grana prehrambene industrije začini su svoju najširu primenu našli u industriji mesa. Načini začinjavanja, količine i vrste upotrebljenih začina variraju veoma mnogo, zavisno od navika potrošača, vrste mesa i mnogih drugih faktora. Umeće začinjavanja sastoji se u pravilnoj proceni, osećaju za meru, ukus i odvažnost u kombinovanju začina. Svako jelo uglavnom zahteva glavnu komponentu, dok ostale imaju dopunsku ulogu, strogo vodeći računa koje se međusobno podnose, a koje se ne mogu upotrebiti zajedno. Bez osećaja za meru ne mogu se postići one fine razlike toliko važne kod začinjavanja.

Beli luk (*Allium sativum* L.) spada među začine koji su najviše u upotrebi. Ima specifičan jak i prodoran miris i ljutkast ukus. Miris na sumpor potiče od derivata

Tabela 1. Vrste začinskog bilja

Biljna vrsta	Korisni deo
Anis (<i>Pimpinella anisum</i> L.)	plod
Bosiljak (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	list, stablo
Cimet (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> L.)	kora
Beli luk (<i>Allium sativum</i> L.)	lukovica
Čili paprika (<i>Capsicum frutescens</i> L.)	plod
Đumbir-ingver (<i>Zingiber officinale</i> L.)	koren (rizom)
Estragon (<i>Artemisia dracunculoides</i> L.)	list, cvet
Žalfija (<i>Salvia officinalis</i> L.)	list
Kapar (<i>Capparis spinosa</i> L.)	neotvoren cvet i pupoljak
Kardamom (<i>Elettaria cardamomum</i> L.)	plod
Kim (<i>Carum carvi</i> L.)	plod
Karanfilić (<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.)	neotvoreni cvetni pupoljak
Mirođija-kopar (<i>Anethum graveolans</i> L.)	list, cela biljka
Korijander (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	plod
Lovor (<i>Laurus nobilis</i> L.)	list
Crni luk (<i>Allium cepa</i> L.)	lukovica
Timijan-majčina dušica (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	list, stablo
Majoran-origano (<i>Majorana hortensis</i> L.)	list, stablo
Muskat cvet i orah (<i>Myristica fragrans</i> L.)	omotač semena, seme
Origano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	list
Biber (<i>Piper nigrum</i> L.)	plod
Paprika (<i>Capsicum annum</i> L.)	plod
Peršun (<i>Petroselinum crispum</i> L.)	list, koren
Piment-najkvirc (<i>Pimenta officinalis</i> L.)	plod
Ruzmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	list
Susam (<i>Sesamum indicum</i> L.)	seme
Vanila (<i>Vanilla planifolia</i> L.)	plod
Celer (<i>Apium graveolens</i> L.)	list, koren

aminokiseline cisteina, dok je za ukus odgovoran glukozid alicin. Sadrži vitamin C. Pitagora ga je smatrao kraljem začina. Postojbina mu je Azija (Indija) i Egipat, gde se gajio pre 5000 godina. Nalazimo ga na crtežima staroegipatskih grobnica.

Beli luk je važan sastojak sirovih, barenih i sušenih kobasica, raznih salata i majoneza. Otporan je na visoke temperature ne menjajući bitno senzorna svojstva, što je značajno za proizvode koji se podvrgavaju termičkom tretmanu. Jedinjenja radona snižavaju krvni pritisak izazivajući vazodilataciju krvnih sudova i poboljšavajući cirkulaciju krvi. Pripisuje mu se stimulatívno dejstvo na metabolizam i regulisanje funkcije endokrinih žlezda.

Biber (*Piper nigrum* L.) koristi se kao crni (sasušen nezreo plod) i beli biber (sasušen, zreo i oljušten plod). Poreklo ove kulture je Indija. Osim u Indiji danas se najviše gaji u tropskim oblastima afričkog kontinenta.

Od aktivnih materija u eteričnom ulju nalaze se felandren, citrol, limonen, pinen i kariofilen. Limonen, koji je najčešći terpen začina, u najvećoj količini (oko 96%) nalazi se u plodovima citrusa, a osim bibera sadrže ga takođe kim, korijander, anis, morač i celer. Oštar paleći ukus dolazi od piperina, koga više ima u crnom biberu, dok je beli aromatičniji.

Najveći potrošač bibera je mesna industrija i industrija za preradu ribe. Zrna bibera dodaju se u neke trajne i polutrajne kobasice. U novije vreme prave se "biber kobasice". To su trajne kobasice čiji se omotač posle potapanja u 2% mlaki rastvor želatina posipa grubo mlevenim crnim biberom.

Paprika (*Capsicum annum* L.) je poreklom iz Južne Amerike gde su je još pre više od 3000 god. gajile stare Inke, da bi se vremenom proširila na ostale delove američkog kontinenta. Posle otkrića Amerike (početkom XVI veka) preneti je u Evropu. Danas se najviše gaji u Aziji, Evropi i Americi, uglavnom u zoni umerenog pojasa i nešto manje u tropskim i subtropskim oblastima.

Zbog osobina koje poseduje, visoke hranljive i biološke vrednosti, kao i karakterističnih senzorskih svojstava, malo je biljnih vrsta koje su našle tako široku primenu u ishrani, prerađivačkoj industriji (pasterizovana, smrznuta, sušena) i industriji začina.

U narodnoj medicini poznata je kao sredstvo protiv smetnji u varenju i migrene. Ima veliku ulogu u proizvodnji kobasica. U nekim zemljama popularna je "papricirana slanina".

Kod začinske paprike koriste se sorte duguljastih plodova koje su u fiziološkoj zrelosti intenzivno crvene boje, sa visokim sadržajem suve materije (najmanje 15%) i bojnih materija (karotenoida). Najpoznatija i najraširenija kod nas je sorta Horgoška slatka (Marković i Vračar, 1998), bez ljutog sastojka alkaloida kap-

saicina i drugih materija oštrog ukusa. Kapsaicin koji se nalazi u ljutoj začinskoj paprici koristi se u farmakologiji kao komponenta antireumatskih masti, jer u dodiru sa kožom izaziva osećaj toplote i podstiče cirkulaciju krvi. Najvažniji pigment po količini i intenzitetu boje je kapsantin. Dejstvom kiseonika, svetla i toplote pigmenti se oksidišu. Mlevena začinska paprika bogata je vitaminom C u količini od 25 do 100 mg/100 g (Savić i Danon, 1982).

Korijander (*Coriandrum sativum* L.), spominje se u egipatskim papirusima i bibliji. Jedna je od najstarijih začinskih biljaka, poreklom iz jugoistočne Evrope, gde raste divlje, a u Indiji, Kini i Egiptu se gaji hiljadama godina (kultivisan je 1500 god. pre nove ere).

Glavni sastojak eteričnog ulja je linalool, zatim terpeni. Miris je blag, prijatno aromatičan, ukus sladunjav i neznatno paleći.

Korijander upotrebljava u velikim količinama industrija mesa, u svim vrstama mesnih proizvoda. Tipičan miris na korijander ima na primer mortadela. U mlevenom obliku poboljšava vezivanje vode u kobasicama, usled velike sposobnosti da bubri. Dodaje se i u salamuru (celi plodovi). U domaćinstvu se uglavnom upotrebljava za jela od gljiva. Sve više ga koristi kozmetička industrija za proizvodnju parfema, služi za aromatizovanje nekih vrsta rakija, likera i peciva.

Piment (*Pimenta officinalis* L.) sličan je biberu. Miris podseća na biber, karanfilić, muskat i cimet. Postojbina mu je Jamajka i Amerika (Srednja i Južna) gde se i danas najviše gaji. Fenolno jedinjenje eugenol je osnovna komponenta eteričnog ulja pimenta, karanfilića, cimeta, muskata i bibera (70 do 90%). Upotrebljava se u kulinarstvu za neke kolače, jela od ribe i mesa, supe, sosove, marinade. U sastavu je mnogih začinskih smeša za kobasice.

Začini stimulišu peristaltiku digestivnog trakta i potpomažu varenje. Podstiču apetit, lučenje pljuvačke i želudačnog soka. Korišćenjem u većoj količini, neka eterična ulja izazivaju zapaljenje sluzokože i pojavu rana. Iritacija gastrointestinalnog trakta može dovesti do povećanja propustljivosti kapilara, što je praćeno povraćanjem, dijarejom i abdominalnim grčevima. Zato začini mogu biti kontraindikovani kod osoba koje boluju od kataru želuca, ili creva (Savić i Danon, 1982). Muskat privlači posebnu pažnju zbog niza derivata fenilalanina koji imaju psihotropni efekat, odnosno deluju kao droga.

Tropske začinske biljke su najbogatije eteričnim uljima, pri čemu svetlost i temperatura imaju veću ulogu u njihovoj biosintezi nego zemljište. Količina eteričnih ulja u odnosu na pojedine komponente, menja se tokom perioda vegetacije. Može se govoriti čak i o dnevno-noćnom kolebanju, vezano za metaboličku aktivnost.

2.3. PRIMENA ZAČINA U INDUSTRIJI MESA

Principi tehnologije začinjavanja mesa danas se baziraju na upotrebi što većeg broja začina od kojih su neki osnovni, a neki pomoćni. Biber, začinska paprika, beli i crni luk i piment su prvenstveno osnovni začini (Savić i Bem, 1983; Stojšić, 1998). Kao takvi upotrebljavaju se u nešto većim količinama, za razliku od pomoćnih (karanfilić, kardamom, ingver, muskat, ruzmarin) koji služe da bi se dobio potpuniji ukus i miris gotovog proizvoda. Kim i timijan pripadaju obema kategorijama.

Osim osnovne uloge, poboljšanja arome, začini deluju nizom osobina i zajedno sa ostalim brojnim faktorima (drugi dodaci, pH supstrata, a_w vrednost, uslovi tehnološkog procesa prerade, skladištenja) utiču na kvalitet, održivost i zdravstvenu bezbednost mesnih proizvoda.

Poznato je antioksidativno dejstvo aktivnih komponenata, kiselina i fenola, koji vezujući za sebe kiseonik onemogućavaju njegovu adiciju na masne kiseline, sprečavajući na taj način užeglost lipida (Rašeta, 1981) (bosiljak, menta, ruzmarin, timijan, majoran, žalfija, lavanda). Ruzmarin i žalfija su izraziti antioksidansi. Uz to, njihove kiseline i fenolna jedinjenja su termostabilni, ispoljavajući aktivnost i posle toplotnog tretmana. Ispitujući uticaj prirodnih začina, njihovih ekstrakata i uslova čuvanja na promene masnog tkiva u sušenim fermentisanim kobasicama Rede i sar. (1990) imali su suprotno iskustvo. Prirodna žalfija dodata u količinama koje ne utiču na promene ukusa proizvoda nije imala željeni antioksidativni efekat, dok su ekstrakti začina i žalfije delovali čak slabo oksidativno.

Začini mogu da primaju i otpuštaju vodu, pri čemu stepen usitnjenosti ima znatnog uticaja na sposobnost bubrenja. Neki začini, na primer biber, kim, korijander, muskatni orah, ako su grubo usitnjeni, predstavljaju vlažna mesta u nadevu kobasica, što negativno utiče na kvalitet i održivost (Sušić i sar., 1990). Što je veći stepen usitnjenosti, bolje je primanje vode i veća sposobnost emulgovanja. Temperatura kao faktor ima pozitivan uticaj na sposobnost bubrenja. Savić i Bem (1983) iznose podatak da kim prima četiri puta više vode pri 40, nego pri 20°C.

U nekim slučajevima začini mogu imati negativno dejstvo. Nepravilno izbalansirana smeša začina već posle kratkog perioda skladištenja proizvoda može izgubiti aktivnost, izazvati promenu boje mesa, i nepoželjne oksidativne promene lipidnih komponenata.

Kod određenih proizvoda kao što je kulen i neke vrste suvih kobasica bitno je postići intenzivno crvenu boju. Ulogu u tome ima začinska paprika i njeni pig-

menti karotenoidi, naročito kapsantin kog ima najviše. Međutim, kada je reč o sosovima i gotovim jelima, bosiljak, majoran, karanfilić, ruzmarin, piment i mirođija menjaju boju svetlih sosova u smeđu, ili zelenu, što nije poželjno. Kora limuna boji sosove kod zamrzavanja, ali ne i kod zagrevanja.

Ekstrakti začina koji su sve više u upotrebi proizvode se u dva osnovna oblika:

- **ekstrakti**, koji sadrže samo eterična ulja, i
- **oleorizini**, koji su po sastavu heterogeni. Oleorizini pored eteričnih ulja sadrže i druge komponente kao što su nosioci ukusa, smole, celulozu, skrob, proteine, soli, itd. Oni su stabilniji, jer prisutne smole sprečavaju autooksidaciju eteričnih ulja.

Iz začinskih biljaka eterična ulja se najčešće izdvajaju destilacijom vodenom parom. Da bi se dobilo optimalno iskorišćenje biljni materijal se prethodno usitnjava. Oleorizini se dobijaju ekstrakcijom podesnim organskim rastvaračima (alkohol, etar, itd.). Jedinjenja ugljenika nisu poželjna kao ekstrakciona sredstva zbog toksičnosti.

Bitna prednost ekstrakata začina je da ne sadrže mikroorganizme, kojima su prirodni začini redovno kontaminirani. Osnovna mana ogleda se u nedostatku svih aktivnih materija začina i što ukus nije potpuno identičan. Pri njihovoj upotrebi pH vrednost u proizvodu sporije opada, a krajnja vrednost je viša. Osim toga, njihova primena je ograničena. Kod sušenih kobasica nastaju gubici arome i ukusa. Dobro je što kod fermentisanih kobasica ne koče aktivnost mlečnokiselih bakterija, ali nije dobro što nemaju efekat na nepoželjne mikroorganizme koji mogu biti prisutni u nadevu (Reise i sar., 1973).

2.4. PLESNI I MIKOTOKSINI

Kao i svi sušeni proizvodi začini nikad nisu sterilni. Pretežno sadrže sporogene bakterije i plesni. Svojom metaboličkom aktivnošću ovi mikroorganizmi mogu izazvati nastanak procesa kvarenja (Palumbo i sar., 1975, Surkiewicz i sar., 1976). Problem predstavlja prisustvo vrsta plesni koje mogu da rastu na organskim supstratima sa niskom količinom slobodne vode (ispod 0,80 a_w) i koje pod određenim uslovima, bilo u začinima, ili prehrambenim proizvodima, mogu da sintetišu toksične metabolite (Hitokoto i sar., 1980; Goto, 1990; Gqaleni i sar., 1997). Najveći broj takvih vrsta obuhvaćen je rodovima *Aspergillus* i *Penicillium* (Frisvad, 1988), koji su obično i najčešći kontaminanti začina (Horie, 1971; Stefanović i sar., 1973).

Mikotoksini dovode do akutnih intoksikacija i hroničnih toksikoza, tako da svako prisustvo plesni u začinima predstavlja potencijalnu opasnost po zdravlje ljudi. Pošto se začini zbog jake arome koriste u malim količinama često se zanemaruje činjenica da čak i minimalno unošenje toksina u organizam može kasnije da ima nesagledive posledice, posebno što je dokazan njihov kumulativni karakter. Vrlo teško se eliminišu, zbog čega se pojačava nevidljivo i dugotrajno razorno dejstvo na ćelije vitalnih organa, što je kod eksperimentalnih životinja već dokazano (Ueno, 1987; Babić i sar., 1989).

Za razliku od bakterijskih i virusnih oboljenja mikotoksikoze su vezane za hranu, bolest nije infektivna, niti se prenosi kontaktom. Tretiranje antibioticima nema efekta. Izazivaju patološke promene ne samo na parenhimatoznim organima, već i na kostima, ili centralnom nervnom sistemu. Simptomi bolesti se mogu svrstati u pet grupa (tabela 2). U nekim slučajevima mikotoksini mogu ispoljiti nekoliko tipova toksičnosti u zavisnosti od doze i vrste životinja. Oni ne izazivaju stvaranje antitela, tako da organizam ostaje trajno nezaštićen na njihovo delovanje.

Tabela 2. Biološki efekti mikotoksina

Efekat	Mikotoksini
Hepatotoksični (toksičnost-kancerogenost)	aflatoksini, ohratoksini, sterigmatocistin, rubratoksin B, citrinin, penicilinska kiselina, patulin, luteoskirin, rugulozin, citrinin
Nefrotoksični (toksičnost-kancerogenost)	ohratoksini, citrinin, rubratoksin B, aflatoksini, sterigmatocistin
Mutageni	ohratoksini, sterigmatocistin, citrinin, zearalenon, patulin, penicilinska kiselina
Teratogeni (embriotoksični)	aflatoksini, ohratoksini, rubratoksin B, trihoteceni, ergot alkaloidi
Neurotoksični	patulin, citreoviridin, koična kiselina, trihoteceni
Estrogeni	zearalenon
Dermatotoksični (fotosenzibilni faktori)	sporodezmini, trihoteceni, aflatoksini

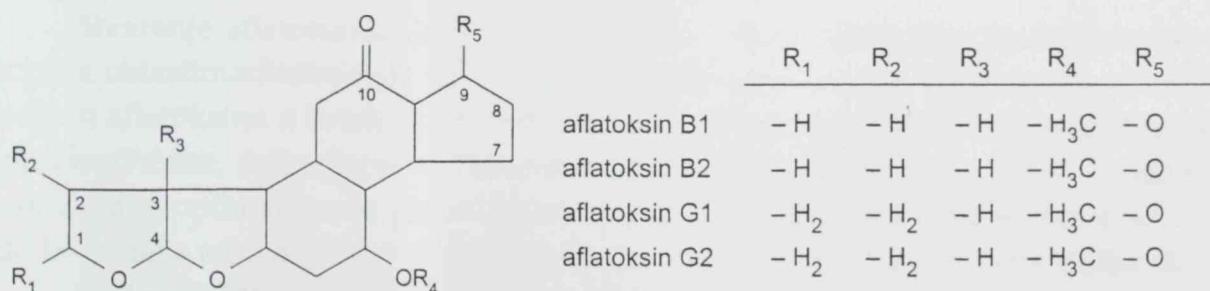
Ista vrsta plesni može stvarati više sekundarnih metabolita različitih nivoa toksičnosti. Do danas ih je prema podacima koje iznose Cole i Cox (Goto, 1990) i Samson (1997) pronađeno preko 300. Preko začina sintetisani mikotoksini izazivaju primarne mikotoksikoze kod ljudi. Put sekundarne mikotoksikoze u lanac ishrane

uključuje i životinje (zemljište → biljka → životinja → čovek) (Kovács i Vanyi, 1993).

Prisutna je navika da se namirnica sa čije je površine odstranjena plesan upotrebi za ishranu, mađutim, u njima se mogu nalaziti mikotoksini. Ingestijom mikotoksini mogu prouzrokovati karakterističnu iritaciju faringisa i oralne sluzokože. U većini slučajeva koncentracije mikotoksina u hrani nisu visoke, ali su rizične zbog mogućnosti izazivanja sekundarnih mikotoksikoza koje se teško detektuju. Prati ih pad opšte otpornosti organizma koji postaje podložan učestalim bakterijskim i virusnim infekcijama.

2.4.1. Aflatoksini

Aflatoksini su mikotoksini koji su bili prvi determinisani. Proizvode ih u toku sekundarnog metabolizma vrste iz grupe *Aspergillus flavus-oryzae* (*A. flavus* i *A. parasiticus*) (Luca i sar., 1995; Wilson i King, 1995). To su kompleksna heterociklična organska jedinjenja kumarinskog tipa slične hemijske strukture. Najznačajniji su aflatoksin B1 (AB1), AG1 i njihovi dihidroderivati AB2, i AG2 (slika 1). Kod svih se nalaze dva furanova i dva laktonska prstena i metoksilne grupe. OH grupe nisu prisutne. Empirijska formula AB1 je $C_{17}H_{12}O_6$.



Slika 1. Hemijska struktura aflatoksina

AB1 i AB2 pod dugotalasnim (365 nm) UV svetlom imaju karakterističnu jaku plavu fluorescenciju, čija je R_f vrednost 0,5 na silika gel pločama za tankoslojnu hromatografiju (TLC), u razvijaju hloroform:metanol (97:3). Zelenkasta fluorescencija sa nešto nižom R_f vrednošću (0,3), odgovara aflatoksinima grupe G (AG1 i AG2).

Osim ove četiri frakcije, u nizu do sada otkrivenih su i "mlečni aflatoksini" AM1 i AM2 koji nastaju konverzijom AB1 i AB2 u jetri, odakle prelaze u mleko, urin i feces.

Šutić i sar. (1986) detektovali su istovremeno prisustvo AB1 u stočnoj hrani i AM1 u 33% uzoraka mleka. Autori su utvrdili njihov negativni uticaj na morfološke i fiziološke osobine starter kultura mlečnokiselih bakterija koje se koriste u proizvodnji mlečnokiselih proizvoda i sireva, pri čemu je dejstvo na pojedine vrste i sojeve unutar vrsta bilo različito. Ukupan broj mikroorganizama u mleku znatno se smanjuje, što bez mikotoksikološke analize može dovesti do pogrešnog zaključka o higijenskoj ispravnosti proizvoda.

AB1 je najčešće prisutan u ljudskoj i stočnoj hrani, ujedno je i najtoksičniji. Smatra se jednim od najjačih hepatokancerogena među mikotoksinima koji izazivaju karcinom jetre. Slede AG1, AM1 AB2 (Duraković i sar., 1989). Hidroksilni derivati toksina AB2 i AG2, AB2a i AG2a, izolovani su kasnije. Aflatoksini pokazuju veliku stabilnost na uticaj visokih temperatura, na promene koncentracije vodonikovih jona, na zračenje UV i gama zracima. S toga njihova detoksikacija predstavlja težak problem. Zagrevanjem na 100°C u jakoj kiselini oko 90% AB1 prelazi u AB2a. Na 160°C gubi se samo 20% AB1 (Pantović i Adamović, 1974), a stabilan je i pri temperaturi od 250°C (Duraković, 1991). Razlaže se bez topljenja na 268 do 269°C (Davis i Diener, 1978). Aflatoksini se potpuno razaraju pod uticajem hromsumporne kiseline, natrijumhipohlorita, koncentrovanog natrijumhidroksida, kao i dužim izlaganjem uticaju svetlosti (Šutić i Stojanović, 1973).

Stvaranje aflatoksina zavisi od klimatskih uslova, zbog čega se češće sreću u toplim oblastima (Stefanović i sar., 1973). Istraživanja u svetu ukazuju na učestalu pojavu aflatoksina u hrani i karcinoma jetre kod ljudi u tropskim i subtropskim regionima Afrike, Azije, Japana, Tajlanda i Filipina (Duraković i sar., 1989). U takvim uslovima za optimalan rast plesni i proizvodnju aflatoksina potrebno je vreme od dve do tri nedelje na temperaturama između 25 i 30°C i 88 do 95% relativne vlažnosti.

Godine 1970. objavljen je slučaj endemičnog toksičnog hepatita u jednoj brazilskoj porodici sa dokazom o umešanosti *A. flavus* i aflatoksina, koji je prouzrokovao smrt petnaestogodišnjeg dečaka, dve godine nakon ispoljavanja simptoma izraženih abdominalnih smetnji i dekompenzacije srca. Na obdukciji su ustanovljene promene slične onima koje su se pojavile nakon ubrizgavanja aflatoksina u majmune (plućni edem, prošireno srce, difuzna nekroza u centralnom delu jetre). Utvrđeno je da je hrana bila kontaminirana sa *A. flavus* i aflatoksinom u izuzetno visokoj koncentraciji (1,7 mg/kg). Slični simptomi, ali u blažoj formi imali su brat i sestra ovog pacijenta (Stefanović i sar., 1973).

Stepen osetljivosti eksperimentalnih životinja je različit i varira u zavisnosti od vrste, pola, starosti, ishrane, stanja organizma, količine i dužine perioda unošenja. Kao jedan od prvih simptoma aflatoksikoze javlja se potištenost, smanjenje prirasta, ili gubitak težine. Jetra mladih životinja veoma brzo apsorbuje aflatoksine. Do trovanja dolazi samim toksinom, kao i produktima razgradnje koji su toksični. Mladi organizmi uginu već za nekoliko sati, ili dana (Vitez i sar., 1975). Kod većine simptomi trovanja javljaju se sa sadržajem u hrani 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksina, čak i manje (Munk, 1979). Količina od 0,01 mg/dan izaziva rak jetre pacova ako se duže hrane kontaminiranom hranom (Savić i Milosavljević, 1983). U tabeli 3 dat je prikaz kancerogene toksičnosti aflatoksina i pojave hepatoma kod životinja (Goto, 1990).

Tabela 3. Kancerogenost aflatoksina

Vrsta	Aflatoksin	Doza	Vreme trajanja eksperimenta	Pojava hepatoma (a/b)
Miš	B1	3 mg/kg i. p.	82 nedelje	28/39
Pacov (mužjak)	B1	1 mg/kg p. o.	42–58 nedelja	18/18
Pacov	B1	1 mg/kg u hrani	41–64 nedelje	18/21
Riba iz akvarijuma (Gupi)	B1	6 mg/kg u hrani	11 meseci	7/11
Pastrmka	B1	4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u hrani	16 meseci	14/40
Patka	B1	30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u hrani	14 meseci	8/11
Majmun	B1	53–1369 mg ukupna doza	45–145 meseci	3/9
Majmun	B1	99–1354 mg ukupna doza	39–147 meseci	8/13
Pacov (mužjak)	M1	1 mg/kg u hrani	100 nedelja	1/29
Pacov (mužjak)	M1	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u hrani	16–19 meseci	2/31
Pastrmka	M1	4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u hrani	12 meseci	6/46

Legenda:

a – broj registrovanih hepatoma ; b – broj testiranih jedinki

Letalna doza za 50% tretiranih životinja (LD_{50}) varira od 0,3 do 10,0 mg/kg telesne težine. Pacov je umereno osetljiv na aflatoksinske toksične efekte. Metabolizam AB1 kod pacova zavisi od nivoa steroidnih hormona. Mnogo je brži kod žen-

ki tako da one ispoljavaju veću rezistentnost. Zbog velike osetljivosti uobičajeno je ispitivanje biološkog dejstva mikotoksina na pilećim embrionima. U tabeli 4 prikazana je akutna toksičnost AB1 za pojedine vrste životinja. Jetra je organ koji pokazuje inicijalno najveće oštećenje prilikom aplikacije aflatoksina.

Tabela 4. Akutna toksičnost aflatoksina B₁

Vrsta	LD ₅₀ (mg/kg telesne mase)
Pileći embrion	0,025*
Pačići (jednodnevni)	0,34 – 0,36
Pacovi (jednodnevni)	1,00
Pacovi (21 dan)	5,50
Pacovi (odrasli mužjaci)	5,50 – 7,20
Pacovi (odrasle ženke)	17,90
Zečevi	0,30
Hrčci (30 dana)	10,20
Zamorci	1,40
Ovce	1,00 – 2,00
Mačke	0,55 – 0,60
Miševi	7,00 – 9,00
Majmuni	2,20 – 7,80
Pastrmka	0,80

* $\mu\text{g}/\text{embrion}$

Pored izazivanja degenerativnih promena ćelija parenhimatoznih organa, krvarenja u mozgu i hiperplazija krvnih sudova mehanizam dejstva usmeren je na inhibiciju sinteze proteina, enzima i nukleinskih kiselina (Rašeta, 1981; Muntanjola-Cvetković, 1987). Koristeći konidije *A. fumigatus* kao čestice za ingestiju uz dodatak 0,03; 0,05; 0,07 i 0,09 mg AB1 dnevno tokom dve nedelje (kroz vodu i hranu) zečevima Richard i Thurston (1975) su potvrdili da aflatoksin izaziva oštećenja makrofaga smanjujući njihovu fagocitarnu aktivnost. U kombinaciji sa ciklopijazoničnom kiselinom Smith i sar. (1992) su pored uobičajenih patoloških promena na jetri i

bubrezima pilića konstatovali teško fibrotičnu slezinu. Kod mikroorganizama kao posledica interakcije između AB1 i DNA pojavljuju se indukovane mutacije. Nakon izlaganja dozama od 50 i 70 $\mu\text{g/ml}$ zabeleženo je povećanje frekvencije *Streptococcus lactis* mutanata rezistentnih na streptomycin za 21, odnosno 95 puta u odnosu na spontane mutacije (Banina, 1986).

Za sintezu aflatoksina najpogodnija temperatura je oko 30°C (Finoli i sar., 1995; Gqaleni i sar., 1997). Adebajo i sar. (1994) su proizvodnju AB1 i AB2 registrovali na 15, 20, 25, 30, 35 i 40°C, sa optimumom takođe na 30°C. Na niskim temperaturama (5°C) obično se ne proizvodi (Bullerman i Olivigni, 1974). Poznato je da se pored *A. flavus* sposobnost sinteze ovog toksina javlja, mada ređe i kod drugih *Aspergillus* vrsta (El-Kady i sar., 1994), i vrsta roda *Penicillium* (Škrinjar, 1990; Bočarov-Stančić, 1996 b).

A. flavus može da raste i da produkuje aflatoksine u različitim laboratorijskim podlogama i prirodnim supstratima. Potencijal proizvodnje pod istim uslovima kultivisanja zavisi od vrste supstrata. Soj *A. flavus* izolovan iz crnog bibera proizvodio je AB2 na nekoliko prirodnih supstrata. Koncentracija toksina bila je veća na kikirikiju, nego na podlozi od pirinča, kineske šećerne trske, ili semenu pamuka (Schroeder i Carlton, 1973).

2.4.2. Ohratoksini

Glavni proizvođači ohratoksina su plesni roda *Aspergillus* iz grupe *A. ochraceus* (*A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*). Varga i sar. (1996) ovaj mikotoksin detektovali su u skorije vreme kod *A. albertensis*, *A. auricomus* i *A. wentii*. Veruje se da je to prvi izveštaj o produkciji ohratoksina kod pomenutih plesni. Neke vrste roda *Penicillium* (Frazier i Westhoff, 1978; Škrinjar, 1992; Mills i sar., 1995; Creppy i sar., 1996) mogu takođe biti uključene (tabela 5). Među njima *P. viridicatum* (Ueno, 1987) i *P. aurantiogriseum* (Škrinjar, 1992; Škrinjar i sar., 1992) citiraju se kao najznačajnije plesni vezane za kontaminaciju ohratoksinom.

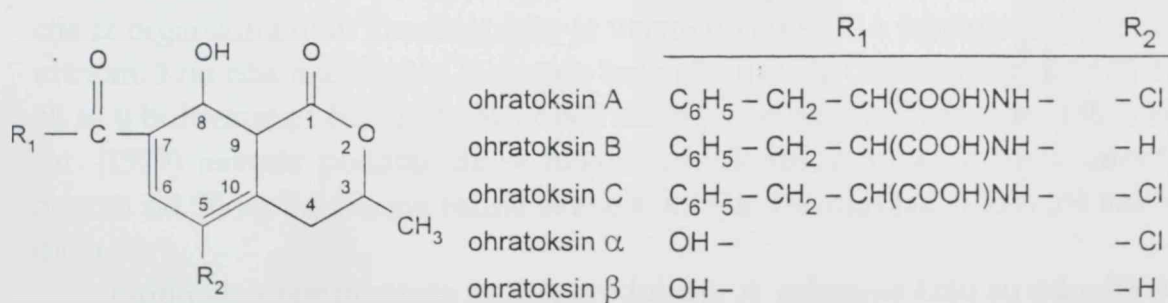
Od više do sada poznatih ohratoksina, koji predstavljaju derivate izokumarina (dihidroizokumarini) povezane preko COOH grupe sa L- β -fenil-alaninom dominantnu ulogu ima ohratoksin A (OA). To je bezbojno hlorisano kristalno jedinjenje ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$) rastvorljivo u polarnim organskim rastvaračima (metanol, hloroform). U alkoholnom rastvoru etanola prilično je stabilan i ne podleže promenama tokom dužeg vremena. Hemijski čist vrlo je nestabilan u prisustvu vazduha i svetla.

Prilikom hromatografisanja pod dugotalasnim UV zračenjem (365 nm) OA pokazuje zelenoplavu fluorescenciju. Izlaganjem amonijačnim parama fluorescencija postaje tamno plava. Rf vrednost iznosi oko 0,7 u smeši za hromatografisanje toluen:etilacetat:mravlja kiselina (6:3:1). Sa TLC limiti za detekciju u biljnim i životinjskim proizvodima su 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (van Egmond, 1991).

Tabela 5. *Penicillium* vrste proizvođači ohratoksina

Sekcija – Podsekcija	Vrsta
<i>Monoverticillata</i>	<i>P. purpurescens</i> Sopp
<i>Asymmetrica – Velutina</i>	<i>P. chrysogenum</i> Thom
<i>Asymmetrica – Lanata</i>	<i>P. commune</i> Thom
<i>Asymmetrica – Fasciculata</i>	<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx
	<i>P. verrucosum</i> Dierckx
	<i>P. viridicatum</i> Westling
<i>Biverticillata – Symetrica</i>	<i>P. variabile</i> Sopp

Strukturne formule ohratoksina prikazane su na slici 2. Ohratoksin B (OB) je takođe kristalno jedinjenje, ali nehlorisano ($\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_6$), dok je ohratoksin C (OC) ($\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{ClNO}_6$) amorfno jedinjenje po hemijskom sastavu etilestar OA. U prirodnim uslovima jedino je poznata sinteza OA i OB.



Slika 2. Hemijska struktura ohratoksina

Sa rasprostranjenjem OA u hrani može biti povezana pojava teškog hroničnog obostranog degenerativnog oboljenja bubrega nefritisa kod životinja i ljudi, karcinoma urinarnog trakta, kao i oštećenja imuno sistema. Prisutna je hipoteza o OA kao etiološkom agensu endemske nefropatije i tumora bešike kod ljudi na Balkanu. Češća pojava nekih mikotoksina u određenim oblastima među mikolozima

se tumači uticajem specifičnih klimatskih uslova (Petkova-Bocharova i Castegnaro, 1985). Sojevi *A. ochraceus* koje su Cvetnić i Pepeljnjak (1990) izolovali iz suvih kobasica, slanina i šunki sa područja Jugoslavije proizvodili su ovaj metabolit u količini od 0,7 do 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dugogodišnja istraživanja ljudske i stočne hrane od strane Škrinjar (1992) ukazuju na konstantnu i dominantnu pojavu *Penicillium spp.* koje sintetišu OA. Od 1983.god. Tunis se pojavljuje kao još jedna problematična tačka sa uočenom jasnom korelacijom između unosa hrane kontaminirane toksičnim plesnima i nefropatije kod ljudi tog područja (Maaroufi i sar., 1996). Pretraživanjem krvi i mleka detektovane su niske količine OA u humanoj populaciji i prisustvo aflatoksina u humanim tkivima (Scudamore, 1993).

Patološki efekat akutne ohratoksikoze praćen je nekrozom bubrežnih tubula. Akutna toksičnost se pojavljuje i u vidu gastroenteritisa. Toksin napada i jetru. Za razliku od aflatoksina mehanizam dejstva ohratoksina primarno je povezan sa metabolizmom ugljenih hidrata, a zatim i proteina. Fenilalaninsintetaza koja katališe vezivanje fenilalanina za tRNA "prepoznaje" fenilalanin OA blokirajući tako sintezu proteina. Uvećana jetra predstavlja posledicu akumulacije glikogena, dok kod aflatoksina dolazi do infiltracije masti (masna jetra). Simon (1996) upozorava na potencijalnu nefrotoksičnost za ljude ako se izlože OA konzumiranjem hrane i pića dobijenih od cerealija. Izbacuje se preko urina i fecesa kao slobodan metabolit, ili kao hidrolizovani alfa OA.

Kod miševa OA je bio prisutan u cirkulaciji 4 dana po aplikaciji. Vrlo dugo zadržavanje toksina u krvi je posledica vezivanja za proteine plazme, najvećim delom za albumine. Hepatobilijarni put ekskrecije zapažen je kao glavni put eliminacije iz organizma ovih životinja iako je utvrđeno da se OA izlučuje preko bubrega urinom. Kod riba markirani OA se vrlo brzo eliminiše iz cirkulacije (nakon 45 min.), ali se u bubrezima i žuči zadržava čak 8 dana po aplikaciji (Fuch i sar., 1986). Hult i sar. (1979) navode podatak da se nakon jednokratnog intravenoznog unosa OA dozom od 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne težine svinje toksin može zadržati u krvi još nakon 30 dana.

Optimalna temperatura za OA produkciju *A. ochraceus* koju su odredili Northolt i sar. (1979) iznosila je 31°C pri aktivnosti vode od 0,99 a_w , dok je pri a_w vrednosti od 0,95 to bila temperatura od 37°C. Ovi parametri su promenljivog karaktera i razlikuju se kod pojedinih sojeva u okviru vrste. Adebajo i sar. (1994) su za sintezu OA kod nekih sojeva *A. ochraceus* utvrdili optimalnu a_w od 0,90, kod drugih od 0,98 (temperatura 30°C).

Pri sterilizaciji u autoklavu OA se ne uništava (Frazier i Westhoff, 1978; Frisvad, 1988). Kod kristalizacije iz ksilena tačka topljenja iznosi 169°C (bez rastvaranja). OB je još stabilniji (221°C) i manje toksičan.

Doze potrebne da izazovu akutnu toksičnost nisu iste za sve životinje. LD₅₀ OA za pojedine testirane organizme kreću se od 0,2 (pileći embrion) do 30,0 mg/kg (pacov) (tabela 6). Kod pilića starih jedan dan, prema Pantoviću i Adamoviću (1974) LD₅₀ iznosi 166, a za OC 216 µg/kg telesne težine. Subletalne doze uzrokuju depresiju, smanjenu mlečnost kod krava i smanjenu proizvodnju jaja kod nosilja (Šutić, 1995).

U početku se smatralo da OB nije toksičan sve dok nisu obavljani eksperimenti na hromozomima, nosiocima naslednih osobina, dokazujući njegov mutageni efekat. Đuričić i Opačić (1982) su ispitivali hromozomske aberacije u ćelijama koštane srži u metafazi mitotičke deobe kod miševa. Oštećenja su indukovana u vidu fuzija hromozoma, odnosno slepljivanja njihovih hromatida. Interesantno je bilo zapažanje da je manja doza ohratoksina (5 mg/kg telesne težine) prouzrokovala veći procenat fuzija hromatida u odnosu na veću (10 mg/kg). Najveći efekti mutagenog delovanja ispoljili su se tokom prvih 48 sati, da bi postepeno slabili, ali su se i nakon 17 dana zadržali kod izvesnog broja ćelija.

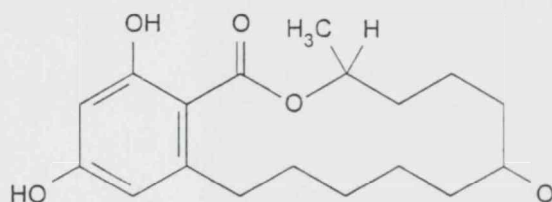
Tabela 6. Akutna toksičnost ohratoksina A

Vrsta	LD ₅₀ (mg/kg telesne mase)
Patka	1,88
Ćurka	5,90
Pileći embrion	0,2 – 0,34
Pilići (jednodnevni)	2,10
Kokoška	3,40 – 3,60
Prepelica	16,00
Pastrmka	4,67
Pacov (mužjak)	22,00 – 30,00
Pacov (ženka)	20,00 – 21,00
Zamorac	8,10 – 9,10
Svinja	1,00 – 2,00

2.4.3. Zearalenon (F-2 toksin)

Zearalenon (ZEA), ili F-2 toksin (slika 3) je lakton beta-rezorcilne kiseline ($C_{18}H_{22}O_5$). Topi se na 164 do 165°C. Kao sekundarni metabolit vrsta roda *Fusarium*, sintetiše ga prvenstveno *F. graminearum*, zatim *F. culmorum*, *F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani* i druge (Bočarov-Stančić 1996 a). Ove plesni često napadaju žitarice na polju (pšenica, ječam, kukuruz) izazivajući patološke promene na biljnom tkivu (Muntanjola-Cvetković i sar., 1982; Ivanović, 1992). Povećana koncentracija ZEA ispoljava se u hladnijim i vlažnim periodima. Većina sojeva raste na temperaturama nižim od 10°C i formiranje toksina može biti aktivirano upravo iznad 0°C.

Alimentarna toksična alukija (ATA), ili septička angina je teška intoksikacija registrovana konzumiranjem hrane biljnog porekla (žitarica) kontaminirane ZEA i drugim fuzariotoksinima (Davis i Diener, 1978; Goto, 1990; Šutić, 1995). Inicijalni simptomi oboljenja su relativno blagi, praćeni povraćanjem i dijarejom. Kasnije pacijentovo stanje postaje ozbiljno, sa pojavom lezija u ustima i grlu ukuljučujući anginu i leukemiju. Mortalitet može biti i do 50%.



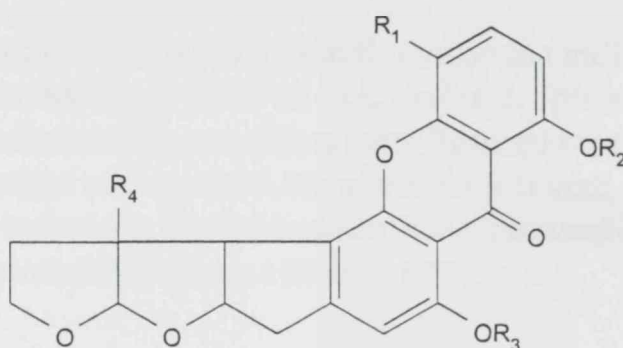
Slika 3. Hemijska struktura zearalenona

ZEA ispoljava efekte primarno na genitalnom traktu životinja (otečena i edematozna vulva, vaginalni i rektalni prolapsus, sterilitet, feminizirajući efekti sa atrofijom testisa i povećanjem grandula kod mužjaka) (Ueno, 1987). To je uterotropni mikotoksin koji uzrokuje hiperestrogenizam (deluje kao estrogenski hormon). Ženke sisara ga mogu mlekom preneti na potomstvo. Dok veće koncentracije dovode do odbijanja hrane, seksualne apatije, čak i smrti, vrlo male doze imaju stimulatívno dejstvo na rast životinja (Muntanjola-Cvetković, 1987;). Dokazano je da su za ispoljavanje izrazito toksičnih efekata neophodne visoke koncentracije, oko 1,2 i 20 g/kg telesne težine (Davis i Diener, 1978), a da su mnoge eksperimentalne životinje osetljive na 1 do 5 mg/kg ZEA (Duraković i sar., 1989).



2.4.4. Sterigmatocistin

Najznačajniji proizvođač sterigmatocistina (ST) je vrsta *Aspergillus versicolor* (Lund i sar., 1995). Vrste *A. glaucus*, *A. ustus*, *Eurotium herbariorum*, *Emericella nidulans*, *Drechlera*, *Bipolaris* i *Penicillium* (Davis i Diener, 1978; Frisvad, 1988) također su uključene u istu grupu. ST ($C_{19}H_{14}O_6$) je vrlo sličan AB1 (van Egmond, 1989). Kao i aflatoksini u hemijskoj strukturi ima difuranometoksi-benzenski sastav (slika 4). Smatra se da bi zbog toga ta dva mikotoksina mogla imati zajedničkog intermedijera u biosintezi. Taj zajednički intermedijer je norsolorinična kiselina (NOR) (Keller i sar., 1997). Kod vrste *A. nidulans* (= *E. nidulans*) i aflatoksigene plesni *A. parasiticus* opisani su geni *verA* i *ver-1* koji su potrebni za konverziju prekursora aflatoksina verzikolorina A u ST (Keller i sar., 1994).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
sterigmatocistin	- H	- H	- CH ₃	- H
o-metilsterigmatocistin	- H	- CH ₃	- CH ₃	- H
5-metoksisterigmatocistin	- OCH ₃	- H	- CH ₃	- H
demetilsterigmatocistin	- H	- H	- H	- H
aspertoksin	- H	- CH ₃	- CH ₃	- OH

Slika 4. Hemijska struktura sterigmatocistina

Ovaj mikotoksin je mnogo manje toksičan od AB1, ali su toksični efekti skoro isti, s obzirom da se u hranu izlučuje u većoj količini. Pored pojave hepatoma i lezije bubrega, kod eksperimentalnih životinja zabeleženi su slučajevi miokardijalne nekroze srca, pulmonalnih tumora, a sve češće se govori o ST kao mutagenom agensu (Ueno, 1987; van Egmond i sar., 1991). Kada se potkožno daje pacovima (0,5 mg

po pacovu, dva puta nedeljno za period od 24 nedelje) izaziva pojavu sarkoma (van Egmond, 1982). Nivoi toksičnih efekata kod nekih životinjskih vrsta dati su u tabeli 7.

Tabela 7. Akutna toksičnost sterigmatositina

Vrsta	LD ₅₀ (mg/kg telesne mase)
Pileći embrion	4,90
Majmun	32,00
Pacov (ženka)	120,00
Pacov (mužjak)	60-75
Miš	800,00

Pod UV svetlom ST se pojavljuje kao fluorescentna mrlja cigla boje, sa Rf oko 0,8 u hloroform:metanol smeši (98:2) na TLC pločama. Spreisanjem rastvorom aluminijumhlorida fluorescencija se menja u žutu. Rastvorljiv je u hloroformu, piridinu i drugim organskim rastvaračima. Nerastvorljiv je u vodi, natrijumhidroksidu i rastvoru natrijum karbonata. Sa ferihloridom koncentrovani rastvori ST daju zelenu boju. Raspada se na 265°C (Davis i Diener, 1978).

2.5. ANTIFUNGALNI AKTIVITET ZAČINA

Određeni začini ispoljavaju antifungalni aktivitet, koji može biti jače, ili slabije izražen. Vezan je za eterična ulja, odnosno njihov sastav i količinu. Poznato je da oni variraju čak i unutar jedne vrste začina, tako da efekti primene nisu uvek isti. Sastav i količina eteričnog ulja zavise od agrotehničkih mera, zemljišta, klime, uslova i dužine skladištenja.

Najviše eteričnog ulja sadrže karanfilić, piment, cimet, senf, beli i crni luk. (Silliker i sar., 1980). Mnogi začini nemaju antifungalni aktivitet, dok je druge potrebno koristiti u većim koncentracijama od standardnih (Frazier i Westhoff, 1978), što bitno menja ukus i miris hrane. Inhibitorno delovanje karanfilića pripisuje se velikom procentu eteričnog ulja (14% do 25%) i njegovoj aktivnoj komponenti eugenolu. Mabrouk i El-Shayeb (1980) su utvrdili da 0,5% karanfilića sprečava rast *A. flavus*. Ostali začini, kim (5,0%) i biber (10%) inhibirali su sintezu toksina, ali ne i rast. Dodatak 10% cimeta samo je smanjio proizvodnju aflatoksina.

Začin *Aframomum danielli* ima veoma izraženo dejstvo na vrste roda *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* i *A. niger*), formirajući minimalnu zonu inhibicije na hranljivoj podlozi veličine od 20 do 22 mm u prečniku (Adegoke i Skura, 1994). Eterična ulja kima, karanfilića, crnog i belog luka kompletno inhibiraju sintezu sterigmatocistina, delom i aflatoksina. Njihovim korišćenjem može se preventivno delovati na sintezu nekih mikotoksina (Hasan i Mahmoud, 1993). Ekstrakti čilija, korijandera, kima, kurkuma i bibera (10 mg/ml) pokazali su obećavajuće rezultate u inhibiciji rasta *Rhizopus oligosporus*, *Mucor dimorphosporus*, *Penicillium commune* i *Fusarium solani* (Thyagaraja i Nosoho, 1996).

Mei-Chin i Wen-Shen (1998) ispitivali su uticaj toplote, pH i soli na antifungalni efekat tri vrste luka (zeleni, crni, beli) prema *A. flavus* i *A. niger*. Kiselinski tretmani (pH 2,0; 4,0; 6,0) i so (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 M) nisu uticali na aktivnost začina, dok su sa temperaturama dobijeni interesantni rezultati. Rast temperature od 60 pa do 100°C doveo je do značajnog slabljenja inhibitornog uticaja belog i zelenog luka na obe vrste plesni. Crni luk je ostao termički stabilan ispoljavajući aktivitet prema *A. flavus*, ali ne i prema *A. niger*.

S obzirom da su istovremeno nosioci mikrobiološke kontaminacije, smatra se da antifungalnu ulogu začina i njihovih aktivnih komponenata ne bi trebalo precejivati (Bem i Adamič, 1991). U prisustvu ekstrakta belog luka u koncentraciji od 2% neke *Penicillium* vrste pokazale su se prilično otpornim (*P. camemberti*, *P. cyclospium*, *P. notatum*, *P. spinulosum*) (Tansey i Appleton, 1975). Sporulacija *P. claviforme* i *Mucor plumbeus* bila je veća uz ekstrakt belog luka, dok je na *P. vermiculatum* ispoljen potpun inhibitorni efekat. Od testirane tri vrste roda *Aspergillus*, *A. amstelodami* i *A. nidulans* pokazali su veću osetljivost u odnosu na *A. niger*.

Od 15 aktivnih komponenata eteričnih ulja, nezasićeni aldehidi (citrol, cinamaldehyd, citronelal), geraniol nezasićeni alkohol i mentol terpenški alkohol, najviše su inhibirali testirane kulture *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* i *Mucor sp.*, pri čemu je fungistatski efekat bio jači na čvrstoj agar podlozi, nego u tečnoj. Moleyar i Narasimham (1986) ovu pojavu objašnjavaju isparavanjem komponenata eteričnih ulja, koje su se akumulirale iznad podloge. Procenat inhibicije bio je različit zavisno od vrste plesni i vrste komponenti.

Kod dva soja *A. parasiticus* u tečnoj podlozi sa ekstraktom kvasca i saharozom (YES) Bullerman (1974) je registrovao različito reagovanje na cimet. Pri koncentraciji od 2% rast je redukovao od 13 (soj NRRL 3000) do 31% (soj NRRL 2999), a sinteza aflatoksina za 99 i 97%. Povećanjem koncentracije na 20%, još je bio moguć

razvoj plesni. Bullerman i sar. (1977) u drugom slučaju uočili su snažniji efekat cimeta na rast, nego na produkciju mikotoksina.

Hitokoto i sar. (1980) ispitivali su uticaj većeg broja praškastih začina na vrste *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus* i *A. versicolor*. Od testiranih 29 uzoraka karanfilić, seme anisa i pimenta potpuno su sprečili rast, dok je većina drugih kod ovih plesni inhibirala samo produkciju toksina. Koncentracijom 0,2 mg/ml timola ekstrahovanog iz timijana (majčina dušica) u potpunosti je sprečen rast *A. versicolor*, formiranje OA od strane *A. ochraceus*, a *A. flavus* je i dalje proizvodio AB1. Fungicidni efekat postignut je dodatkom timola u količini od 0,4 mg/ml.

Preživljavanje plesni zavisi i od koncentracije i ekspozicije vremena izlaganja spora prema ekstraktu. Etanolski ekstrakt velškog luka pri koncentraciji od 10 mg/ml, tokom 30 dana inkubiranja na 25°C, potpuno je inhibirao micelarni rast kultura *A. flavus* i *A. parasiticus* i dozvoljavao malu produkciju aflatoksina pri koncentraciji od 5 mg/ml nakon dve nedelje inkubiranja u tečnoj kvašćev-ekstrakt saharoznoj podlozi (Fan i Chen, 1999).

2.6. SKLADIŠTENJE

Da bi toksigena plesan proizvela toksin mora posedovati genetičku sposobnost, a onda od brojnih faktora, abiotičkih i biotičkih, zavisi da li će oni tu sposobnost i indukovati. Kontrola plesni u začinima vezana je za strogo pridržavanje uslova skladištenja, kako bi se onemogućilo njihovo razmnožavanje, kao i sekundarna kontaminacija iz vazduha. S druge strane, pre skladištenja oni treba da budu dobro osušeni da bi se sprečio kvar i sačuvala karakteristična svojstva. Granica kritične vlažnosti zavisno od vrste začina kreće se od 7 do 15% (tabela 8). Čuvanjem u uslovima povećane vlage (a_w , relativna vlažnost vazduha) i toplote stepen kontaminacije mikroorganizmima se povećava.

Treba imati u vidu da kserofilne plesni proizvode mikotoksine već pri relativnoj vlažnosti iznad 65%. Utvrđeno je da su za optimalno stvaranje toksina od strane *Aspergillus* vrsta neophodne povišene temperature, najčešće između 25 i 30°C i viša relativna vlažnost (iznad 90%), a da su za rast dovoljne niže vrednosti ovih faktora. Neke vrste roda *Penicillium* toksične metabolite mogu da sintetišu pri veoma niskim temperaturama (5°C), vrste rodova *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria* i pri nižim (0°C) (Vitez i sar., 1975; Duraković i sar., 1989). U toku rasta *P. expansum* pri 4 do 10°C ustanovljeno je prisustvo veće količine patulina nego pri sobnoj tem-

peraturi (Bem i Adamič, 1991). Prema navodima Rašete (1981), za mikotoksine je temperaturni raspon vrlo širok i iznosi od -3 do 58°C .

Da bi se sprečila produkcija aflatoksina i ohratoksina Bullerman (1985) predlaže temperaturu skladištenja od 5°C , a za prevenciju stvaranja patulina i zearale nona nižu.

Tabela 8. Maksimalno dozvoljen sadržaj vlage nekih začina

Začin	Vlaga (%)
Anis	10,0
Biber beli	15,0
Biber crni	12,0
Đumbir	12,5
Muskat cvet	8,0
Kardamom	13,0
Kim	11,5
Korijander	9,0
Kumin	9,0
Kurkum	10,0
Origano	10,0
Paprika	12,0
Piment	12,0
Timijan	9,0
Lovor	7,0
Ruzmarin	8,0

Kikiriki mahune inokulisane sa *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* i *A. ochraceus* inkubirane su pri relativnoj vlažnosti od 100% na 25°C sedam nedelja. Vlaga mahuna sa 5,8 porasla je na 20,4%. Do pet nedelja sadržaj sahara, slobodnih aminokiselina treonina i tirozina se povećavao, dok je sadržaj glutaminske kiseline linearno opadao sa vremenom inkubiranja usled razvoja plesni (Robin i Chiou, 1997).

Prevenција rehidracije sušenih proizvoda je najvažniji faktor u rešavanju problematike skladištenja, s obzirom na činjenicu da plesni rastu i proizvode toksične metabolite u mnogo širem temperaturnom rasponu.

Adebajo i sar. (1994) ispitivali su uticaj a_w (0,65; 0,70; 0,80; 0,90; 0,98) i temperature (15, 20, 25, 30, 35, 40°C) na produkciju aflatoksina i OA od strane dve *Aspergillus* spp. (*A. flavus* i *A. ochraceus*). Toksini su bili detektovani na a_w samo iznad 0,80. Aflatoksin je detektovan na svim temperaturama, a OA iznad 25°C. Šutić i Stojanović (1973) utvrdili su da je mnogo veći broj plesni iz roda *Aspergillus* prisutan na šunkama u uslovima čuvanja sa manje vlage, a sa više vlage rod *Penicillium*. U tabeli 9 dat je pregled minimalnih a_w vrednosti za rast ovih i još nekih kserofilnih vrsta plesni.

Tabela 9. Minimalna aktivnost vode (a_w) kserofilnih plesni

Vrsta plesni	a_w
<i>Apergillus candidus</i>	0,75
<i>A. flavus</i>	0,81
<i>A. fumigatus</i>	0,82
<i>A. niger</i>	0,77
<i>A. ochraceus</i>	0,78
<i>A. restrictus</i>	0,75
<i>A. sydowii</i>	0,78
<i>A. terreus</i>	0,78
<i>A. versicolor</i>	0,78
<i>A. wentii</i>	0,84
<i>Emericella nidulans</i>	0,78
<i>Eurotium herbariorum</i>	0,72
<i>Monascus (Xeromyces) bisporus</i>	0,61
<i>Paecilomyces variotii</i>	0,84
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	0,84
<i>P. brevi-compactum</i>	0,81
<i>P. chrysogenum</i>	0,84
<i>P. frequentas</i>	0,81
<i>P. griseofulvum</i>	0,83

Vazduh u prostorijama za skladištenje može da postane značajan izvor mikrobiološke kontaminacije. U studiji Langseth-a i sar. (1993) koja se odnosila na pojavu rasta plesni i mikotoksina na zrnima žita u zavisnosti od strujanja vazduha (800, 600, 400, 200, 0 m³/čas tona) predstavljeni su rezultati kojima je pokazano da suva semena mogu pružiti dobre uslove za rast poljskih (*Fusarium spp.*) i skladišnih plesni (*Aspergillus* i *Penicillium spp.*) ako je ventilacija slaba, jer se povećava frekvencija spora u vazduhu. Uz to, dobro je poznato da napadi bronhijalne astme mogu biti izazvani posle dužeg udisanja spora nekih vrsta roda *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* i drugih (Stefanović i sar., 1973).

Za duže skladištenje (godina i duže) aktivnost vode proizvoda se mora održavati na a_w 0,70 i nižoj. Za šest meseci a_w od 0,75 je dovoljna, dok je vrednost iznad 0,77 nesiguran faktor, izuzev za kratko skladištenje. Kvar dehidriranih proizvoda (cerealije, sušeno jezgrasto voće, suvo meso, mleko u prahu, začini) uzrokuju kserofilne plesni koje su sposobne za brz rast iznad 0,77 a_w i sporiji na 0,75 (Pitt i Hocking, 1985). Imajući u vidu uslove vlažnosti vazduha, prema iskustvima iz prakse, pri relativnoj vlazi oko 75% i temperaturi od 20°C osigurano je relativno bezbedno skladištenje začina za vreme od šest do devet meseci. Nesterilisana paprika i crni luk mogu postati plesnivi već sa procentom vlage u vazduhu od 55% (Savić i Danon, 1982). Pojam relativne bezbednosti proizvoda u mikrobiološkom smislu istaknut je zbog toga što ona zavisi i od drugih faktora, konkretno od stepena kontaminacije, a naročito tipa plesni koje preovlađuju.

Pri temperaturama oko 15°C skladištenje polutrajnih kobasica duže od dve nedelje nije preporučljivo. Trajne kobasice šireg dijametra (zimski salama, kulen) mogu se držati tri meseca, užeg dijametra (sremska) do šest nedelja (Rašeta, 1981). Rašeta (1981) navodi podatak Tauchmann-a i sar. (1971) o proizvodnji aflatoksina *A. flavus* za 27 dana u jednoj vrsti brzo biofermentisane kobasice (Jagerwurst) držanoj na temperaturi od 15°C.

Vremenski faktor ne igra značajnu ulogu ako postoji kontaminacija mikotoksinima bilo pre, ili za vreme skladištenja, s obzirom na njihovu i u tom pogledu poznatu stabilnost. Krogh i sar. (1974) su iz ječma nakon dve godine ponovo izolovali OA. Za ovo vreme njegova količina smanjena je sa 4 na 1,5 mg/kg.

Dovođenjem plesni u stanje anabioze obezbeđenjem i održavanjem dovoljno niskog sigurnosnog procenta vlage kod začina sprečava se rast, međutim, pošto njihove spore (konidije, askospore i druge) mogu da prežive dug period u suvoj sredini i kontaminiraju ostalu hranu, mogu izazvati probleme posle rehidratacije. U poslednje vreme začini koji su previše kontaminirani ovim mikroorganizmima, koriste se za dobijanje eteričnih ulja destilacijom vodenom parom, za dobijanje ole-

rizina, ali ovi rastvarači mogu takođe ekstrahovati i mikotoksine (Silliker i sar., 1980), tako da se postavlja pitanje mogućnosti njihovog razaranja u samim proizvodima. Budući da nisu uklopljeni u ćelije biljke, ekstrakti začina za vreme izlaganja hrane termičkom tretmanu gube veću količinu isparljivih komponenata, što ima uticaja na antifungalnu aktivnost.

2.7. DEKONTAMINACIJA I DETOKSIKACIJA

Kod upotrebe začina proizvođači i prehrambena industrija permanentno se suočavaju sa mikrobiološkom kontaminacijom.

Verovatnoća da plesni kontaminanti začina prouzrokuju kvarenje i neke od vrsta izluče toksične metabolite, smanjuje se, odnosno povećava u zavisnosti od toga da li je hrana pasterizovana, kuvana i hlađena, fermentisana, samo zagrevana, ili na neki drugi način tretirana da bi se dobio koliko toliko stabilan proizvod. Ukoliko do sinteze mikotoksina nije došlo u začinima, oni se u gotovom proizvodu mogu pojaviti za vreme skladištenja, ili kasnije, u prometu. Ovi problemi danas pokušavaju da se prevaziđu sterilizacijom.

Opisani su različiti postupci dekontaminacije i detoksikacije kao mere zaštite, koji se mogu grupisati u fizičke, hemijske i biološke. Neki autori zastupaju mišljenje da se pomoću njih efikasno mogu eliminisati plesni i mikotoksini, međutim, u mnogim slučajevima nisu dobijeni zadovoljavajući rezultati, naročito kada je u pitanju detoksikacija.

Termički tretman kojim bi se uništile spore bakterija i plesni nije pogodan, jer se na visokim temperaturama (90°C i višim) narušavaju aromatična svojstva mnogih začina (Thiessen i Scheide, 1970; Pfeiffer, 1975; Sirnik i Jamšek, 1983; Chaco i sar., 1996). Donekle zadovoljavajući rezultati postignuti su u sterilizaciji crnog i belog bibera (Žakula, 1980).

Sterilizacija gasom (fumigacija) je ranije često korišćen metod za dekontaminaciju začina i kakaoa, naročito etilen oksid (De Boer, 1988). Prema nekim literaturnim navodima (Katušin-Ražem i sar., 1983) ovaj gas ne uništava spore plesni i bakterija. Upotrebljava se čist ili sa ugljen dioksidom (9:1). Poslednjih godina u mnogim zemljama zabranjen je zbog zaostajanja rezidua koji su toksični (Bem i Adamič, 1991). Svojevremeno je Kanada zakonom limitirala količinu etilen-hlorhidrina, reakcionog proizvoda etilen oksida, do 1500 µg/kg (Silliker i sar., 1980). Takođe, njegovom upotrebom pogoršavaju se ukus i boja začina, dolazi do gubitaka

eteričnih ulja i isušivanja. Za neke vrste semenki (senf) preporučuje se smeša sa metil formatom da bi se izbegle nepoželjne promene boje i ukusa.

Hlor postiže detoksikaciju mikotoksina u hrani i do 90%, ali nema praktičnu vrednost, jer je takva hrana zbog prisustva rezidualnog hlora neupotrebljiva (Pantović i Adamović, 1974).

Tretmani kiselim, baznim i neutralnim neorganskim hemijskim jedinjenjima, od kojih su neki aditivi hrane, korišćeni su za detoksikaciju mikotoksina pretežno u eksperimentalne svrhe. Od aflatoksina dodatih u kukuruz AB1 je bio degradiran sa 0,25% natrijumhlorita (NaClO_2), pri pH 4,0 na 60°C za 48 časova. Posle tretmana pod istim uslovima sa rastvorom 0,5% natrijumbisulfita (NaHSO_3) zaostalo je 20% AB1 (Tabata i sar., 1994). Vodoni peroksid (H_2O_2) redukuje toksičnost OA zagrevanjem u alkalnoj sredini i uklanja citrinin na sobnoj temperaturi (Fouler i sar., 1994). Marsh i sar. (1996) pratili su uticaj nekih fosfatnih rastvora (5%) na redukciju mikotoksina nakon potapanja Frankfurter kobasica inokulisanih sa *A. flavus* i *A. parasiticus*. Natrijum pirofosfat i tetranatrijum pirofosfat su povećali aflatoksinsku aktivnost *A. flavus*.

Kao antimikrobni agensi u prehrambenoj industriji koriste se organske kiseline kao što su sorbinska, benzoeva, propionska, sirćetna, mravlja i njihove soli koje su rastvorljive u vodi (kalijumove, natrijumove, kalcijumove).

Biološka detoksikacija takođe se ne koristi u praksi, mada ima slučajeva njene primene tokom skladištenja stočne hrane (Bauer, 1994). Utvrđeno je da *Acinetobacter calcoaceticus* razgrađuje OA (Hwang i Draughon, 1994). Prosečno uklonjene koncentracije iznosile su 0,1005 i 0,0636 $\mu\text{g/ml/čas}$ na 25 i 30°C. Pretpostavka je da ova bakterija transformiše OA u manje toksičan alfa ohratoksin. Kao biološki destruktora aflatoksina veoma je efikasan *Flavobacterium auranticum* (Ramzin, 1973).

Jonizujuće zračenje gama zracima je najefikasniji metod za dekontaminaciju mikroorganizama. Kao izvor zračenja koristi se radioaktivni izotop kobalta Co^{60} , ili cezijum Ce^{137} koji emituju gama zrake i ne indukuju radioaktivnost (Duraković, 1991). Dozama od 4 do 7 kGy (0,4 i 0,7 Mrad) postiže se značajna redukcija njihovog broja u začinima. Za skoro potpunu sterilnost utvrđene doze kreću se od 10 do 20 kGy (1 do 2 Mrad) zavisno o inicijalnoj kontaminaciji (Silliker i sar., 1980; Katušin-Ražem i sar., 1983).

Gama radijacija je bila predložena za dekontaminaciju stočne hrane od plesni pre nego što dođe do proizvodnje mikotoksina. Pri 4 kGy rast *A. ochraceus* u koncentratu za piliće bio je potpuno inhibiran. Mnogo jača doza od 20 kGy bila je dovoljna za potpunu destrukciju OA u kukuruzu i soji. U koncentratu za nosilje i brojere uništeno je samo 47, odnosno 36% OA (Refai i sar., 1996).

Smatra se da za praktične svrhe nisu potrebni potpuno sterilisani začini, jer kako Katušin-Ražem i sar. (1983) navode Farkas-a, da je dovoljno postići samo povećanu osetljivost preživelih mikroorganizama, koji samim tim postaju manje otporni na tehnološke postupke prerade hrane. Utvrđeno je da je zračenje od 3 kGy sasvim zadovoljavajuće. Preživeli mikroorganizmi bili su značajno osetljiviji na toplotu i so, nego u neozračenim začinima. Time se kombinovanjem radijacijskih i tradicionalnih postupaka omogućava postizanje istog efekta (slabije zračenje, ili redukcija toplotnog procesa).

Na osnovu dugogodišnjih istraživanja zračene hrane nisu pronadjeni štetni efekti delovanja jonizujućeg zračenja. Komitet eksperata (Agencija za hranu i poljoprivredu-FAO, za atomsku energiju-IAEA, Svetska zdravstvena organizacija-WHO) ozvaničio je doze do 10 kGy kao potpuno neškodljive za tretirani proizvod i zdravlje ljudi. Nakon zračenja mlevenog bibera, paprike, belog luka i još nekih začina (10 kGy) Todorović i sar. (1985) nisu konstatovali odstupanja u njihovom dejstvu. Eksperimenti sa većim radijacionim dozama (30 kGy) nisu pokazivali promene u mirisu, ukusu i oštrini začina, osim neznatnog uticaja na boju kod đumbira, Kajenske paprike (svetlija) i prahu luka i belog luka (tamnija). Kurkum (žuti koren koji se obično koristi za bojenje) zadržava uobičajenu boju (Lescano i sar., 1991).

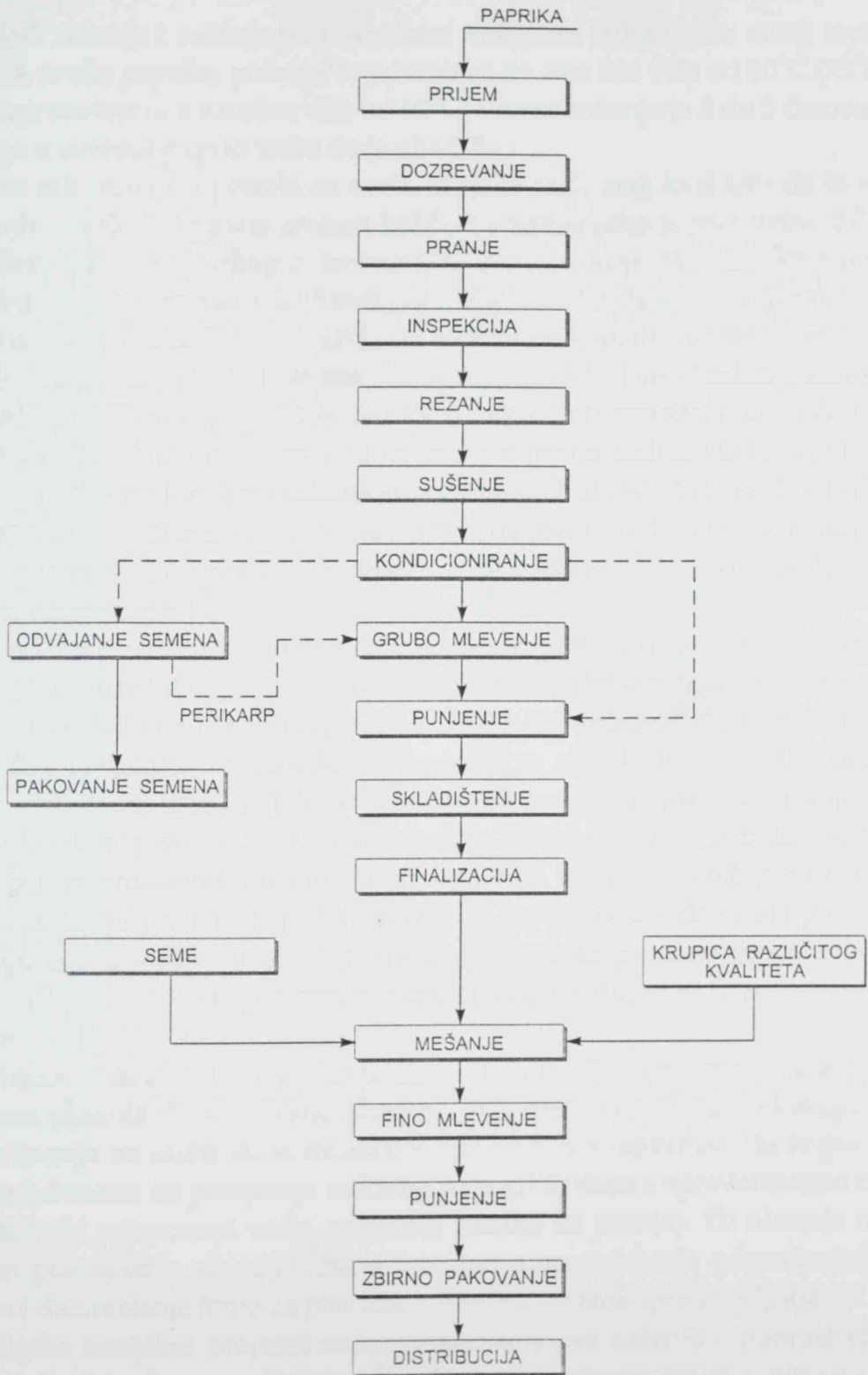
Zbog velike prodorne moći gama zraka začini se mogu zračiti originalno upakovani, čime se sprečava izlaganje naknadnoj kontaminaciji. Jonizujućim zračenjem se ne razvija toplota, što je bitno i za začine i za ambalažu u koju su upakovani (papir, plastika).

U slučajevima gde se ne koristi proces toplotne obrade, kao kod nekih proizvoda u industriji mesa, poželjno je da ovi dodaci budu sterilisani pre korišćenja.

2.8. TEHNOLOŠKI PROCES PROIZVODNJE MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE (mikrobiološki aspekti)

Prerada mlevene začinske paprike, koja je značajan proizvod našeg podneblja, odvija se kroz sledeće faze prikazane na slici 5 (Marković i Vračar, 1998).

Nakon prijema paprika se skladišti uz naknadno dozrevanje, zatim se prenosi do bazena sa vodom gde se grubo pere. Preko elevatora prebacuje se u mašinu za fino pranje sa barboterom, ili rotacionim bubnjem sa ugrađenim tuševima sa pritiskom vode do 2 bara. Oprana sirovina pada na inspekcionu traku gde se odstranjuje preostala mehanička nečistoća, truli i zeleni plodovi.



Slika 5. Šema tehnološkog postupka proizvodnje mlevene začinske paprike

Sledi sečenje i sušenje na pokretnim trakastim sušarama u struji toplog vazduha. Za svežu papriku početna temperatura ne sme biti viša od 80°C (75°C za delimično prosušenu), a završna viša od 60°C. Vreme sušenja je 3 do 5 časova, a sadržaj vlage u sušenoj paprici treba da je oko 5%.

Pre mlevenja po potrebi se meša krupica različitog kvaliteta da bi se dobio standardni kvalitet i dodaje izvesna količina semena (ako je prethodno bilo izdvojeno). Seme se dodaje zbog potrebne količine ulja, koje rastvarajući karotenoide stvara intenzivno crvenu boju. Smeša se melje između dva kamena do čestica veličine 10 do 500 μ . Pri mlevenju razvija se toplota pri čemu treba voditi računa da ne dođe do pregrevanja. Usled povišene temperature dolazi do oksidacije karotenoida i gubitka boje. Mlevena paprika se pakuje u originalnu ambalaži, ili vreće i skladišti do distribucije. Često se dešava da začinska paprika sadrži visok broj bakterija i plesni, što utiče na kvalitet i održivost proizvoda. Mikrobiološkom kontrolom procesa proizvodnje mogu se tačno naznačiti ona mesta, odnosno faze, koje su bilo zbog higijenskih, ili tehnoloških propusta, ili i jednih i drugih, uticali na mikrobiološku neispravnost.

Ono što je veoma bitno za gotov proizvod podrazumeva što bolji kvalitet sirovine i sa tehnološkog i zdravstvenog aspekta. Naknadno dozrevanje paprike najčešće se odvija na betonskom platou. Treba napomenuti da ovakvo rešenje ne daje dobre rezultate, jer između plodova nema cirkulacije vazduha, prisutna je povećana vlažnost usled stalnih temperaturnih promena i procesa disanja koji nastavljaju i nakon berbe. U ovakvim uslovima dolazi do razvoja mikroorganizama, nastanka fermentativnih i truležnih procesa, koji se sa oštećenih plodova prenose na zdrave. Ispod površinskog sloja dolazi do promena konzistencije plodova i pojave neprijatnog mirisa. To značajno umanjuje kvalitet polazne sirovine. Usled razvoja plesni može doći do proizvodnje mikotoksina i njihovog difundovanja u plod paprike.

Proces pranja koji bi trebalo da dovede do značajne redukcije broja mikroorganizama (Žakula, 1980; Niketić-Aleksić, 1982) često nema zadovoljavajući efekat. Kontaminacija ne samo što se ne smanjuje, već može višestruko da se poveća (ako se voda u bazenu za potapanje redovno ne menja, slabo i neravnomerno tuširanje, mikrobiološki neispravna voda, nečistoća mašine za pranje). To ukazuje na neophodnost poboljšanja sistema pranja i redovno sprovođenje odgovarajućih mera čišćenja i dezinfekcije linije za preradu, vode, kao i celokupnog pogona.

Visoka inicijalna brojnost mikroorganizama pre sušenja umanjuje efikasnost tretmana, koji inače ne podleže suviše oštrom toplotnom režimu, niti se sušenjem mogu eliminisati mikotoksini.

3. CILJ RADA

Proizvodnju začina i sve veće korišćenje u prehrambenoj industriji, posebno klaničnoj, prate problemi vezani za učestaliju pojavu plesni. Nezavisno od stepena kontaminacije, prisustvo plesni u začinima, a samim tim i u mesnim proizvodima, pored stvaranja neprijatnog mirisa i ostalih nepoželjnih promena pod određenim uslovima, vodi ka mogućnosti izlučivanja toksičnih metabolita.

Mikotoksikoze koje nastaju kao posledica unosa mikotoksina preko hrane dobro su proučene kod životinja, ali je povećana potreba za sveobuhvatnijim istraživanjima iz ove oblasti zbog negativnog uticaja na zdravlje humane populacije.

S obzirom da primarna kontaminacija začina nastaje za vreme vegetacije i teško se može sprečiti, rizik od mikotoksina može biti značajno smanjen preventivnim delovanjem, poznavajući identitet plesni i uslove pod kojima može doći do sinteze ovih metabolita. Sprečavanje razvoja plesni nameće se kao jedno od najvažnijih pitanja od praktičnog značaja.

Imajući sve ovo u vidu cilj rada bio je da se utvrdi:

- kontaminacija začina i začinskih smeša plesnima,
- rasprostranjenost rodova, kserofilnih predstavnika i njihov udeo u izolovanim mikopopulacijama,
- pogodnost primenjenih podloga za kvalitativno i kvantitativno određivanje kserofilnih plesni u začinima i drugim suvim supstratima,
- prisustvo toksigenih plesni, proizvođača mikotoksina,

- kontaminacija začina najznačajnijim mikotoksinima,
- sposobnost sinteze mikotoksina u laboratorijskim uslovima od strane nekih potencijalno toksigenih izolata,
- uticaj temperature na inaktivaciju konidija *A. versicolor* i sintezu sterigmatocistina, i
- antifungalno dejstvo kalijum sorbata na rast *A. versicolor* i sintezu sterigmatocistina.

4. MATERIJAL I METODE RADA

Za mikološka i mikotoksikološka ispitivanja korišćene su začinske smeše namenjene industriji mesa za proizvodnju različitih prerađevina, crni biber u zrnu i mlevena začinska paprika.

Uzorci začinskih smeša dobijeni su od fabrike "Aleva", Novi Kneževac, a crnog bibera u zrnu i mlevene začinske paprike od fabrike "Vitamin", Horgoš. Analizama je obuhvaćeno po 8 uzoraka od svake vrste začina. Pregled vrsta i sastav začinskih smeša dati su u tabeli 10.

Tabela 10. Vrste i sastav začinskih smeša

Uzorak broj	Vrsta začinske smeše	Sastav
1	za mortadelu	crni i beli biber, crni i beli luk, začinska paprika (slatka), muskat orah, korijander, kim piment
2	za mesni narezak	crni i beli biber, beli luk, piment, muskat orah
3	za srpsku ljutu kobasicu	crni biber, začinska paprika (slatka i ljuta), beli luk, kim, korijander
4	za tirolsku salamu	crni i beli biber, beli luk, piment, kim
5	za viršlu I	beli biber, crni i beli luk, začinska paprika (slatka), kim, korijander
6	za viršlu II	beli biber, crni i beli luk, začinska paprika (slatka), kim, korijander
7	za alpsku salamu	crni i beli biber, beli luk, piment, kim
8	za šunkaricu	crni biber, beli luk, piment, korijander

4.1. MIKOLOŠKA ISPITIVANJA

4.1.1. Izolovanje i određivanje ukupnog broja plesni

Ukupan broj plesni u 1,0 g začina određen je metodom razređenja po Koch-u. Pored standardne mikološke podloge Sabouraud maltoznog agara (SMA) sa dodatkom antibiotika (po 1,0 ml 1% rastvora hloramfenikola i 1% rastvora oksitetra ciklina na 100,0 ml podloge), za izolovanje plesni korišćene su i dve podloge koje Pitt i Hocking (1985) preporučuju za izolovanje kserofilnih plesni iz supstrata sa redukovanom količinom slobodne vode. To su Czapek kvasac autolizat agar sa 20% saharoze (CY20S) i modifikovani Sladni ekstrakt kvašćev ekstrakt 50% glukozi agar (MY50G). Neposredno pre upotrebe u CY20S takođe su dodati pomenuti antibiotici iako za ovu podlogu nisu bili predviđeni.

Zasejane Petri ploče inkubirane su 7 dana na 25°C, a rezultati očitavani petog i sedmog dana, zbog kasnije pojave rasta nekih plesni.

Czapek kvasac autolizat agar sa 20% saharoze (CY20S)

K ₂ HPO ₄	1,0 g
Czapek koncentrat	10,0 ml
Ekstrakt kvasca	5,0 g
Saharoza	200,0 g
Agar	15,0 g
Destilovana voda.....	1000,0 ml
Sterilizacija 15 min/110°C	

Czapek koncentrat

NaNO ₃	30,0 g
KCl.....	5,0 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	5,0 g
FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,1 g
Destilovana voda.....	100,0 ml
<u>Sladni ekstrakt kvašćev ekstrakt agar sa 50% glukoze (MY50G)</u>	

Sladni ekstrakt kvašcev ekstrakt agar sa 50% glukoze (MY50G)

Ekstrakt slada.....	10,0 g
Ekstrakt kvasca	2,5 g
Agar	10,0 g
Destilovana voda.....	1000,0 ml
Glukoza.....	500,0 g
Sterilizacija 15 min/110°C	

4.1.2. Determinacija plesni

Za ispitivanje makromorfoloških i mikromorfoloških karakteristika kolonija, na osnovu kojih se utvrđuje taksonomska klasifikacija, izolovane plesni su monokulturisane na SMA (*Zygomycetes*, *Dematiaceae*) i Czapek agaru sa 3% saharoze (CZ) (*Ascomycetes*, *Deuteromycetes*) za identifikaciju.

Determinacija izolovanih vrsta plesni izvedena je prema ključevima Raper-a i Fennell (1965), Ellis-a (1971), Pidoplička i Miljka (1971), Samson-a i sar. (1976) i Samson-a i van Reenen-Hoekstra (1988).

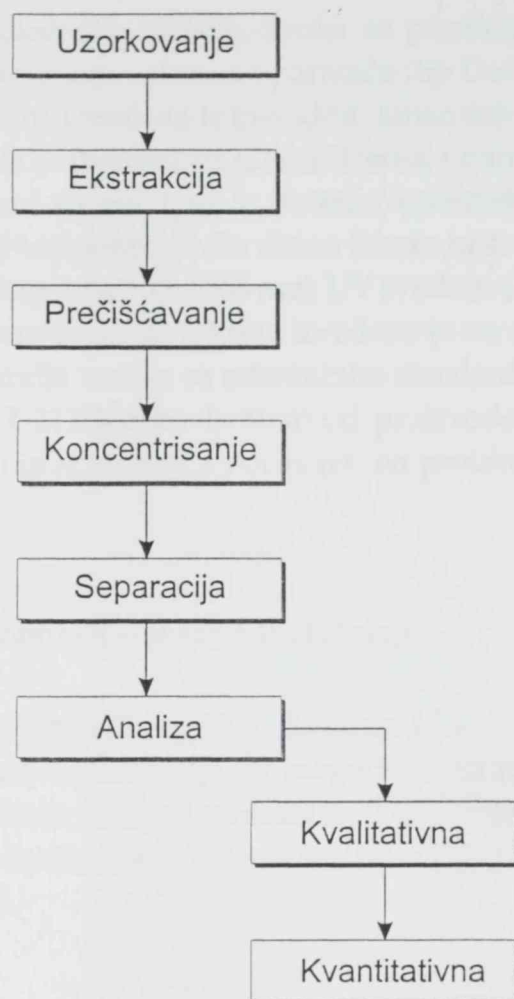
Do daljih ispitivanja monokulture su održavane na kosom SMA i čuvane u frižideru na temperaturi od 4°C.

4.2. MIKOTOKSIKOLOŠKA ISPITIVANJA

4.2.1. Određivanje mikotoksina u začinima

Sve hemijske metode analize mikotoksina uključuju postupke prikazane na slici 6.

Kvalitativno i kvantitativno određivanje toksičnih metabolita plesni, aflatoksina B1 (AB1), ohratoksina A (OA) i zearalenona (F-2 toksin) u začinima (24 uzorka) izvedeno je primenom multimikotoksinske metode Balzer-a i sar. (1978).



Slika 6. Šematski prikaz analize mikotoksina

Prva faza metode sastoji se u ekstrahovanju test uzorka iz matičnog (25,0 g) razblaženim acetonitrilom (90,0 ml acetonitrila + 10,0 ml česemske vode) kao ekstrakcionim sredstvom, uz mućkanje na mućkalici oko 1 sat, nakon čega se ekstrakt filtrira kroz naboran filter papir.

Ekstrakt (50,0 ml) zatim se podvrgava procesima prečišćavanja i odmašćivanja (2 × 25,0 ml n-heksana) i separacije toksinskih frakcija, koji se odvijaju u levkovima za razdvajanje. Prečišćavanjem se odstranjuju komponente koje bi mogle da ometaju determinaciju toksina.

Ohratoksinska frakcija kao kisela, ekstrahuje se zasićenim rastvorom NaHCO_3 (8,0 ml). Slabo kisela F-2 toksinska frakcija ekstrahuje se bazom 1 N NaOH (2 × 10,0 ml), iz rastvora iz kojeg je izvučen ohratoksin. U rastvoru koji ostaje nalazi se re-

lativno neutralna aflatoksinska frakcija. Svaka se posebno filtrira kroz bezvodni Na_2SO_4 i uparava u rotacionom vakuum uparivaču (tip Devarot), na 60°C .

Determinacija toksina izvedena je metodom tankoslojne hromatografije (TLC). Upareni ekstrakti filtrata rastvoreni su u hloroformu i nanošeni na ploče sa silikagelom H. Hromatogrami su razvijani u sistemu toluol:etilacetat:mravlja kiselina (50:40:10 v/v) na sobnoj temperaturi, do visine fronta rastvarača 14 cm i nakon sušenja posmatrani pod dugotalasnim (365 nm) UV svetlom (Kabinet, Camag).

Kvantifikacija determinisanih toksina izvedena je na osnovu upoređivanja intenziteta fluorescencije mrlje uzorka sa referentnim standardom. Čist AB1 (A-6636) iz *A. flavus* i zearalenon (Z-2125) nabavljeni su od proizvođača Sigma Chemical Co., USA, dok je OA (74711) iz *A. ochraceus* nabavljen od proizvođača Fluka Biochemica, Švajcarska.

4.2.2. Ispitivanje sposobnosti sinteze mikotoksina

Čiste kulture toksigenih *Aspergillus*, *Eurotium* i *Penicillium* vrsta izolovanih iz začina, koje su odabrane za testiranje na mogućnost sinteze toksina, gajene su u tečnoj podlozi sa ekstraktom kvasca i saharozom (YES) i inkubirane 14 dana na 25°C , stacionarno. Za gajenje su korišćene Erlenmajer boce (300,0 ml), a količina tečne podloge iznosila je 50,0 ml.

Podloga za stimulaciju sinteze mikotoksina (YES)

Ekstrakt kvasca 20,0 g
Saharoza 150,0 g
Destilovana voda..... 1000,0 ml
Sterilizacija 15 min/ 110°C

Inokulum je pripreman tako što su sa površine test kultura izraslih na kosom SMA, uz dodatak oko 5,0 ml YES podloge, ezom skidane konidije i suspenzija prebačena u Erlenmajer boce.

Nakon 14 dana od inokulisanja kulture su profiltrirane kroz filter papir. Izmerena je pH vrednost podloge za svaki soj i masa micelijuma, kroz ukupan sadržaj suve materije. pH vrednost merena je potenciometrijski (pH metar MA 5730 Iskra), a uku-

pan sadržaj suve materije dobijen je iz razlike u masi nakupljene kulture pre i posle sušenja 24 časa na 102°C.

Od potencijalno ohratoksigenih vrsta plesni, za testiranje na OA odabrano je 17 sojeva i to: *A. ochraceus* (5), *P. aurantiogriseum* (5), *P. chrysogenum* (6) i *P. variotii* (1).

Kvalitativno i kvantitativno određivanje OA izvedeno je prema navedenoj metodi (Balzer i sar., 1978).

Sposobnost sinteze sterigmatocistina (ST) ispitana je kod 10 sojeva *A. versicolor* i 10 sojeva *E. herbariorum*. Korišćena je metoda za određivanje ST tankoslojnom hromatografijom po van Egmond-u i sar. (1982).

Test uzorak za detekciju ST pripreman je tako što je u Erlenmajer bocu (300,0 ml) sa kulturom i YES podlogom (50,0 ml) dodato 180,0 ml acetonitrila i 20,0 ml 4% rastvora KCl. Ekstrakcija se odvijala na mućkalici, oko 1 sat.

Sadržaj je profiltriran kroz naborani filter papir, pri čemu je acetonitrilski filtrat (100,0 ml) dalje prečišćavan u levkovima za razdvajanje. Nakon odmašćivanja filtrata n-heksanom (2×50,0 ml) i daljeg prečišćavanja hloroformom (1×50,0 i 1×25,0 ml), u hloroformsku frakciju dodat je NaCl (5,0 g) i ostavljen da stoji 30 minuta. Ova frakcija je potom propuštana kroz naborani filter papir, koji je prethodno ispran hloroformom (10,0 ml).

Rastvarač (hloroform) je otparen u rotacionom vakuum uparivaču, na 35°C, do suvog ostatka ekstrahovanog uzorka.

Ekstrahovani test uzorci kultura rastvoreni su u hloroformu i zajedno sa standardom ST nanošeni na ploče sa silikagelom. Za razvijanje hromatograma korišćen je sistem benzen:glacijalna sirćetna kiselina (9:1 v/v). Hromatogrami su razvijani dok front rastvarača nije dostigao visinu oko 16 cm, zatim sušeni 15 min na sobnoj temperaturi. Vidljivost ST bila je pojačana prskanjem razvijenih ploča rastvorom AlCl₃ sprej reagensom i zagrevanjem 30 min na 70°C.

Prskan sa AlCl₃ reagensom sterigmatocistin se pod UV svetlom (365 nm) pojavljuje kao žuta fluorescentna mrlja. Vizuelnim upoređivanjem boje i intenziteta fluorescencije mrlja uzoraka sa intenzitetom standardnih određene su masene frakcije ST ispitivanih kultura. Kao standard korišćen je ST 85832 (Fluka Biochemica, Švajcarska).

Zbog sumnje da su neke kulture *E. herbariorum* sintetisale i aflatoksin, prisustvo ovog mikotoksina provereno je metodom tečne hromatografije pod pritiskom (HPLC) u Institutu za veterinarstvo u Novom Sadu.

4.2.3. Ispitivanje uticaja temperature na inaktivaciju konidija *A. versicolor* i sintezu sterigmatocistina

Test mikroorganizam *A. versicolor* B-155 kod koga je prethodno u laboratorijskim uslovima konstatovana sposobnost sinteze ST, uzgajan je na kosom SMA, na temperaturi od 25°C, dok nije dobro sporulisao. Suspenzija konidija za dve vremenske serije termičkih tretmana, 5 i 10 min, pripremana je u 2 puta po 100,0 ml sterilnog fiziološkog rastvora, spiranjem sa površine kosog agara (2×2). Njihov inicijalni broj određen je metodom razređenja, na istoj podlozi na kojoj je test mikroorganizam uzgajan.

Po 10,0 ml suspenzije konidija u epruvetama (10^6 /ml) zagrevane su na temperaturama od 60, 70, 75 i 80°C. Nakon toga epruvete su hlađene pod česmenskom vodom. Efekat termičkih tretmana na stepen destrukcije konidija određen je brojanjem izraslih kolonija *A. versicolor* na SMA, četvrtog i sedmog dana inkubiranja na 25°C. Pored toga, praćeno je vreme pojave rasta i sporulacija.

Za mikotoksikološka ispitivanja, nakon termičkog tretmana, po 5,0 ml inokuluma (10^6 /ml konidija) dodato je u Erlenmajer boce (300,0 ml) sa 100,0 ml tečne YES podloge. Inkubiranje je trajalo 14 dana, na 25°C. Kao i kod mikoloških ispitivanja praćeno je vreme pojave rasta i sporulacija.

Određivanju mikotoksina ST (van Egmond i sar., 1982) prethodilo je merenje mase micelijuma i pH vrednosti podloge.

4.2.4. Ispitivanje uticaja kalijum sorbata na rast *A. versicolor* i sintezu sterigmatocistina

Inhibitorni efekat kalijum sorbata (0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5%) na rast *A. versicolor* B-155 ispitivan je na podlozi Czapek agaru. Zasejane podloge inkubirane su 7 dana, na 25°C. Tokom ovog vremena praćeni su rast i sporulacija kulture. Nakon inkubiranja merenjem dijametra izraslih kolonija upoređivani su efekti primenjenih koncentracija kalijum sorbata.

Istovremeno, praćen je uticaj kalijum sorbata na rast i sposobnost sinteze ST *A. versicolor* u tečnom medijumu, tokom 14 dana na 25°C. Tečna YES podloga (100 ml) inokulisana je sa po 5,0 ml inokuluma, koji je sadržavao 10^6 /ml konidija. Pre ekstrakcije ST prema opisanoj metodi (van Egmond i sar., 1982) mereni su masa micelijuma i pH.

Svi ogledi (mikološki i mikotoksikološki) izvedeni su u dva ponavljanja.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. UKUPAN BROJ PLESNI U ZAČINIMA

Ispitivanjem kontaminacije začinskih smeša, crnog bibera u zrnu i mlevene začinske paprike utvrđeno je prisustvo plesni u svim uzorcima (tabele 11, 12 i 13). Korišćene su uporedo tri podloge različitog aktiviteta vode i sastava ugljenih hidrata (maltoza, saharoza, glukoza).

Tabela 11. Ukupan broj plesni u začinskim smešama

Uzorak broj	Vrsta začinske smeše	Ukupan broj plesni / g		
		SMA	CY20S	MY50G
1	za mortadelu	$3,5 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$
2	za mesni narezak	$2,4 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$5,6 \times 10^3$
3	za srpsku ljutu kobasicu	$2,4 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$
4	za tirolsku salamu	$1,5 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$
5	za viršlu I	$9,2 \times 10^2$	$2,1 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$
6	za viršlu II	$7,2 \times 10^2$	$3,2 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$
7	za alpsku salamu	$5,0 \times 10^2$	$9,5 \times 10^2$	$1,4 \times 10^3$
8	za šunkaricu	$5,3 \times 10^2$	$2,6 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$

Ukupan broj plesni u 1,0 g začinskih smeša na standardnoj SMA podlozi kretao se od $5,0 \times 10^2$, u začinskoj smeši za alpsku salamu (uzorak 7), do $3,5 \times 10^3$ u začinskoj smeši za mortadelu (uzorak 1). Na podlozi CY20S sa 20% saharoze isti uzorci imali su najmanji, odnosno najveći broj kontaminenata, i to od $9,5 \times 10^2$ do $5,2 \times 10^3$. Upoređivanjem dobijenih rezultata može se konstatovati da je u oba slučaja na ovoj podlozi izolovano više plesni. Isto se ponovilo i kod ostalih uzoraka. Najviše plesni izolovano je pomoću MY50G sa 50% glukoze.

Kod crnog bibera (tabela 12) sa 65 (SMA), 85 (CY20S) i $5,4 \times 10^2$ (MY50G) kolonija po gramu uzorak 7 bio je najmanje kontaminiran plesnima. Pomoću SMA najveći broj izolovan je iz uzorka 1 ($2,1 \times 10^3$). Međutim, na podlogama CY20S i MY50G maksimalna kontaminacija ustanovljena je kod uzorka 2, $5,3 \times 10^3$, odnosno $5,9 \times 10^3$.

Tabela 12. Ukupan broj plesni u crnom biberu u zrnju

Uzorak broj	Ukupan broj plesni / g		
	SMA	CY20S	MY50G
1	$2,1 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$
2	$1,6 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$	$5,9 \times 10^3$
3	$1,6 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$
4	82,0	$3,8 \times 10^2$	$7,2 \times 10^2$
5	85,0	$1,5 \times 10^2$	$8,8 \times 10^2$
6	$3,0 \times 10^2$	$7,6 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$
7	65,0	85,0	$5,4 \times 10^2$
8	$5,4 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$

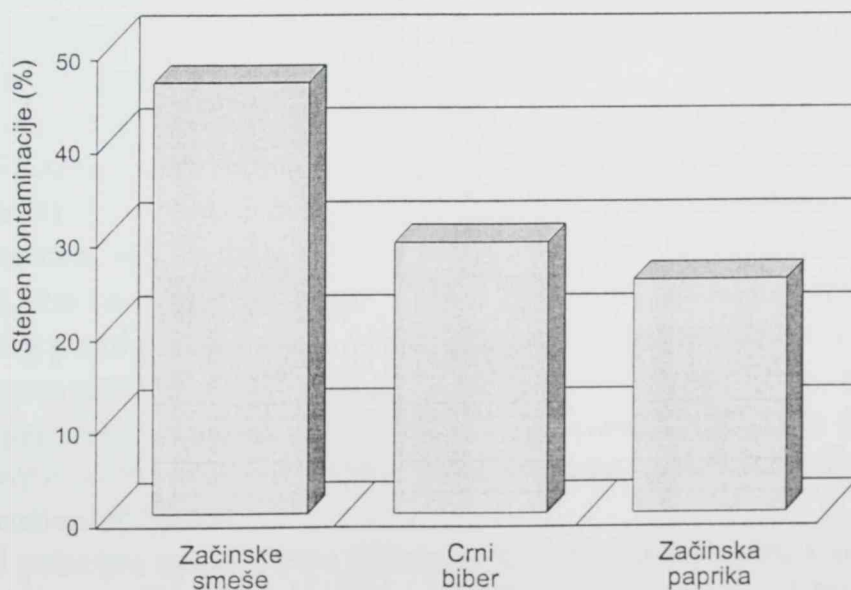
Ukupan broj plesni u začinskoj paprici (tabela 13) izolovan pomoću SMA kretao se između 10 (uzorak 1) i $9,4 \times 10^3$ (uzorak 5), a pomoću podloge CY20S od 20 do $8,5 \times 10^3$ (isti uzorci). Kod dva uzorka na MY50G nije bilo rasta, dok je kod četiri došlo do povećanja brojnosti. Najviše plesni izolovano je iz uzorka 5 ($1,1 \times 10^4$).

Kao što se iz tabela može videti na pojedinim podlogama kod istih uzoraka plesni su izolovane u različitom broju. Prema rezultatima prikazanim na slici 7 mikopopulacija je bila u proseku najbrojnija u začinskim smešama, što iznosi 46,13%.

Sa 28,95 i 24,92% intenzitet kontaminacije crnog bibera i začinske paprike bio je skoro upola manji.

Tabela 13. Ukupan broj plesni u mlevenoj začinskoj papriki

Uzorak broj	Ukupan broj plesni / g		
	SMA	CY20S	MY50G
1	10,0	20,0	0
2	$3,4 \times 10^2$	$7,0 \times 10^2$	$9,5 \times 10^2$
3	$8,7 \times 10^2$	$5,1 \times 10^2$	$1,8 \times 10^3$
4	30,0	25,0	0
5	$9,4 \times 10^3$	$8,5 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$
6	80,0	$1,8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
7	$2,1 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	37,0
8	55,0	57,0	$4,1 \times 10^2$



Slika 7. Intenzitet kontaminacije začina plesnima

Brojnost plesni od 10^3 može se smatrati uobičajenim, s obzirom da je i od strane drugih autora (Silliker i sar., 1980; Sirnik i Gorišek, 1983; Bem i Adamič, 1991; Škrišnjar i Boldocky, 1994) zabeležen kao najčešći nivo kontaminacije začina. Hocking (1981) ističe da mikopopulacija tropskih začina može biti veoma brojna, naročito kada se radi o crnom biberu. Broj plesni koje su Finoli i sar. (1995) izolovali iz začina, u nekim slučajevima bio je veći od $10^7/g$.

Permanentna kontaminacija plesnima uslovljena je pre svega poreklom začina, tj. ekološkim činiocima sredine u kojoj se oni gaje. Uslovi prerade, skladištenja i prometa, su takođe faktori koji mogu dovesti do daljeg povećanja broja i vrsta ovih mikroorganizama.

Novija istraživanja pokazuju da se u zemljama sa toplom i vlažnom klimom, odakle potiče najveći broj vrsta začina, javlja visok procenat kontaminacije hrane plesnima. Primitivni uslovi gajenja i žetve, promena vremena i vlažna klima otežavaju sušenje. Na Jamajci, bobice pimenta nakon branja i fermentacije suše se na betonu. Noću za vreme padavina koje su iznenadne i obilne, skupljaju se na gomilu i pokrivaju. Na vlažnim bobicama plesni se brzo razvijaju. Tokom suvog vremenskog perioda vreme potrebno za sušenje do sigurnosnog sadržaja vlage (12%) je oko pet dana. Proces sušenja rezultuje gubitkom oko 10% bobica, zbog mehaničkih oštećenja i rasta plesni (Breag i sar., 1972; Rosengarten, 1973). Pranje vodom primenjuje se retko, samo kod nekih začina kao što je na primer beli biber (Silliker i sar., 1980). Osim toga, sušenje se odvija prirodnim putem, na suncu, pa nema ni značajnije redukcije broja mikroorganizama. Pojedini vegetativni oblici biće uništeni, ali spore plesni i bakterija ostaju.

Kod začina koji se suše veštačkim putem sušenje se odvija u struji toplog vazduha. U suprotnom, visoke temperature bi svakako značajno redukovale broj kontaminenata, ali bi mogle dovesti i do gubitka aromatičnih svojstava (biber, muskatni cvet, paprika, kim, beli luk, timijan), ili nepoželjnog ukusa (muskat orah, karanfilić, piment, crni luk, cimet, majoran). Pfeifer (1975) smatra da nepoželjna svojstva nastaju zbog promena na nezasićenim ugljovodonicima eteričnih ulja, pri čemu su istovremeno prisutni oksidacioni i polimerizacioni procesi. Chaco i sar. (1996) su nakon zagrevanja crnog bibera ($100^{\circ}C/15$ min) konstatovali da je došlo do degradacije glavnih komponenata eteričnog ulja (limonen, pinen, kariofilen), što je rezultovalo promenom ukusa.

U principu spore plesni pokazuju veću otpornost prema suvoj, nego prema vlažnoj toploti. Mnoge *Aspergillus* i neke *Penicillium spp.*, kao i *Mucor spp.* su termorezistentne. Vrste koje formiraju sklerocije mogu da prežive kraće zagrevanje na 90

do 100°C, a poznati su i slučajevi da su spore nekih vrsta izdržale 30 min na 120°C (Žakula, 1980).

Ukoliko su na odgovarajući način osušeni i skladišteni, začini su rezistentni na mikrobiološko dejstvo. Povećan sadržaj vlage u začinima povećava brojnost plesni i pored visokog sadržaja antimikrobnih eteričnih ulja. Analizirajući beli luk koji se smatra začinom sa izrazitim mikrobicidnim i mikrobiostatskim dejstvom, Škrišnjar i Boldocky (1994) su ustanovili prisustvo većeg broja plesni nego što su ih sa državale začinske smeše.

Učestalost pojave plesni u začinima ukazuje na činjenicu da su oni najčešći izvor kontaminacije proizvoda od mesa u prehrambenoj industriji. Uopšteno je mišljenje da su suvi proizvodi sa niskim brojem ovih mikroorganizama (do 10³/g) boljeg kvaliteta i sigurniji, što je pogrešno ako se uzmu u obzir vrste poznate po sposobnosti da u supstrat, na kojem se razvijaju, izlučuju toksične metabolite.

5.2. MIKOPOPULACIJE ZAČINSKIH SMEŠA

Iz začinskih smeša determinisane su 23 vrste koje su pripadale rodovima *Absidia*, *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* i *Syncephalastrum*.

Najveći deo kontaminacione mikopopulacije zauzimale su vrste koje Pitt i Hocking (1985) i Beuchat i Hocking (1990) opisuju kao umereno kserofilne, a nalaze se u rodovima *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium*, *Penicillium*, uključujući tu i *Paecilomyces* (Pitt, 1975). One pripadaju različitim taksonomskim grupama, ali su ekološki slične po sposobnosti da rastu u uslovima kada je količina slobodne vode znatno ograničena (tabela 14).

Sa 7 vrsta, ili 30,43% svih izolata, dominirao je rod *Penicillium*. Slede plesni roda *Aspergillus* koje su bile zastupljene u manjem broju (5), predstavljajući 21,74% ukupno determinisanih vrsta.

Po broju vrsta značajno je bio zastupljen i rod *Mucor* (4) (17,39%). Kao kontaminanti začinskih smeša rodovi *Absidia*, *Emericella*, *Eurotium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* i *Syncephalastrum* registrovani su sa najmanjim učešćem u mikopopulaciji (1) (4,35%).

Tabela 14. Vrste plesni izolovane iz začinskih smeša

Rod	Vrsta	Zastupljenost vrsta (%)
<i>Absidia</i>	<i>A. corymbifera</i> (Cohn) Sacc. i Trotter	4,35
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i> Link <i>A. niger</i> van Tieghem <i>A. sydowii</i> (Bain. i Sart.) Thom i Church <i>A. terreus</i> Thom <i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	21,74
<i>Emericella</i>	<i>E. nidulans</i> (Eidam) Vuill.	4,35
<i>Eurotium</i>	<i>E. herbariorum</i> (Wiggers) Link	4,35
<i>Mucor</i>	<i>M. circinelloides</i> van Tieghem <i>M. hiemalis</i> Wehmer <i>M. plumbeus</i> Bon. <i>M. racemosus</i> Fres.	17,39
<i>Paecilomyces</i>	<i>P. variotii</i> Bain.	4,35
<i>Penicillium</i>	<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx <i>P. brevi-compactum</i> Dierckx <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>P. griseofulvum</i> Dierckx <i>P. implicatum</i> Biourge <i>P. jensenii</i> Zaleski <i>P. nigricans</i> Bain. i Thom	30,43
<i>Rhizopus</i>	<i>R. stolonifer</i> (Ehrenb.) Lind	4,35
<i>Scopulariopsis</i>	<i>S. fusca</i> Zach	4,35
<i>Syncephalastrum</i>	<i>S. racemosum</i> Cohn	4,35

Rod *Penicillium*, koji je dominirao po broju vrsta, nije bio i najzastupljeniji u ispitivanim začinskim smešama. Iz tabele 15 vidi se da su ove plesni izolovane iz 87,5% uzoraka, isto kao i *Aspergillus*. Sa najvećim rasprostranjenjem pojavile su se plesni roda *Eurotium*, čiji je jedini predstavnik *E. herbariorum* detektovan u svim uzorcima. Prisustvo rodova *Absidia* i *Scopulariopsis* ustanovljeno je kod 75,0% uzoraka. Plesnima roda *Mucor* bilo je obuhvaćeno 62,5% uzoraka, 37,5% plesnima roda *Paecilomyces*, dok je zastupljenost ostalih predstavnika (*Emericella*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*) iznosila svega 12,5%.

Tabela 15. Zastupljenost rodova plesni u uzorcima začinskih smeša

Rod	Broj kontaminiranih uzoraka	Zastupljenost rodova (%)
<i>Absidia</i>	6	75,0
<i>Aspergillus</i>	7	87,5
<i>Emericella</i>	1	12,5
<i>Eurotium</i>	8	100
<i>Mucor</i>	5	62,5
<i>Paecilomyces</i>	3	37,5
<i>Penicillium</i>	7	87,5
<i>Rhizopus</i>	1	12,5
<i>Scopulariopsis</i>	6	75,0
<i>Syncephalastrum</i>	1	12,5

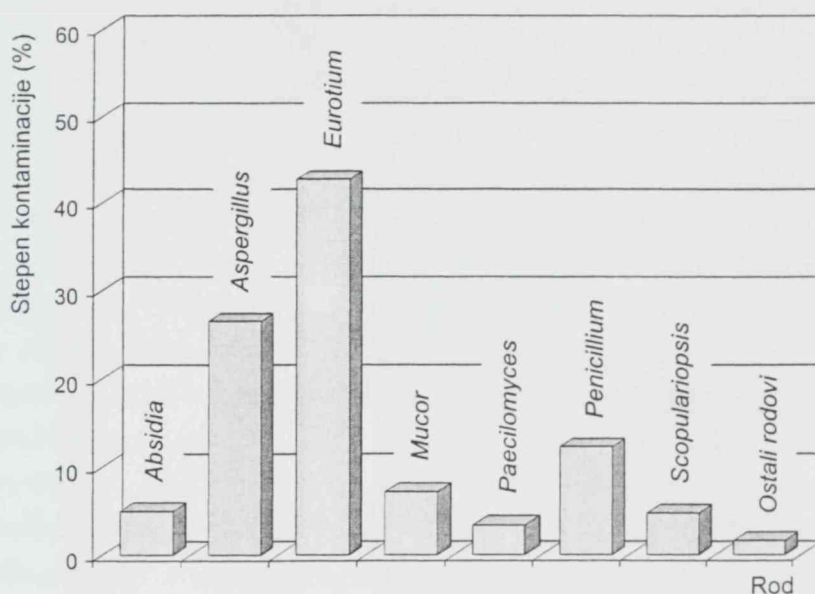
Istraživanja koja su izveli Hadlok (1969), Horie (1971), Sirnik i Gorišek (1983), Škrinjar (1983) i drugi, potvrđuju da su najčešći kontaminanti začina *Aspergillus* i *Penicillium* vrste. Vrste izolovane iz začinskih smeša ukazuju da je značajan broj predstavnika sposoban da opstane pod uslovima smanjene vlažnosti. Istovremeno šire rasprostranjenje roda *Eurotium* može se objasniti tolerantnijim odnosom prema nivoima vlage dehidriranih supstrata. Zahvaljujući ovoj osobini kserofilne plesni su primarni uzročnici kvarenja sušenog biljnog materijala u skladištima i prehrambenih proizvoda sa visokim osmotskim pritiskom. Aktivno se razvijaju pri relativnoj vlažnosti vazduha od 70% (Žakula, 1980).

Ekonomske štete koje mogu da nastanu u industriji za preradu mesa samo su jedan od aspekata posmatranja prisustva plesni u začinima. Daleko značajniji je negativni uticaj koji toksigene plesni mogu imati na zdravlje ljudi. Njihovo destvo može biti mehaničko, toksično, alergeno i kancerogeno. Rašireno je mišljenje da skoro i ne postoji razlika između toksigenih i netoksigenih plesni, kao i između antiobotskog i toksičnog dejstva antibiotika koje proizvode neke vrste.

Prema Hadlok-u i sar. (1976), od mikotoksigenih plesni koje su izolovane iz raznih mesnih proizvoda, najinteresantnije su one koje sintetišu aflatoksine, ohratoksine, sterigmatocistin, tremortin, penicilinsku i ciklopiazoničnu kiselinu. Od 23

izolovane vrste, prema literaturnim podacima (Smith i sar., 1983; Frisvad, 1988), više od polovine, tačnije 65,22%, su potencijalni producenti različitih toksičnih metabolita.

Kao što je prikazano na slici 8, dominirale su plesni skladišta od kojih je većina toksigena. S frekventnošću od 41,89% u ukupnoj mikopopulaciji intenzitet kontaminacije začinskih smeša *Eurotium* sojevima bio je najveći. Učestalost *Aspergillus* vrsta bila je manje izražena (26,48%). Još manje frekventan bio je rod *Penicillium* (12,06%).



Slika 8. Učestalost pojedinih rodova u mikopopulacijama začinskih smeša

Relativno široko rasprostranjeni, ali malobrojni predstavnici familije *Mucoraceae*, *Mucor* (6,61%) i *Absidia* (4,61%), nisu tipične skladišne plesni koje bi mogle biti odgovorne za pojavu kvarenja začina. Suvi supstrati ne predstavljaju pogodnu sredinu za njihov razvoj. Njima više odgovara sredina sa relativnom vlažnošću vazduha od 80 do 90% (Žakula, 1980) i supstrati sa sadržajem slobodne vode iznad 0,93 (Krispien, 1978).

Absidia corymbifera je kontaminant biljaka tropskih područja, obligatni termofil, sa maksimalnom temperaturom rasta oko 50°C. Izaziva samozagrevanje biljnog materijala koji se skladišti pod neadekvatnim uslovima (Bilaj i Zaharčenko, 1987). Patogena je za čoveka i životinje i sposobna da inficira različite organe (Pitt i Hocking, 1985; Fassatiouva, 1986).

Rodovi *Mucor* i *Rhizopus*, koji pripadaju istoj porodici, poznatiji su kao izazivači vlažne truleži voća i povrća (Thorne, 1975; Varma i Verma, 1987; Fassatiouva, 1986) na koje dospevaju iz zemljišta (Škrinjar i sar., 1996 a). Vrsta *R. stolonifer* sintetizira toksične ciklične peptide (Frisvad, 1988) i napada korenski sistem biljaka. Često se sreće na supstratima bogatim ugljenim hidratima, a registrovana je i kao kontaminant začina (Škrinjar, 1983). *Mucor spp.* opisane su kao uzročnici anaerobnog kvarenja voćnih sokova (Pitt i Hocking, 1985).

Plesni roda *Scopulariopsis* koje su činile 4,29% mikopopulacija su prisutne u hrani sa niskim a_w . Rastu na proteinskim supstratima (Beuchat, 1978), tako da je njihovo prisustvo u začinima, preko kojih dospevaju u meso, nepoželjno.

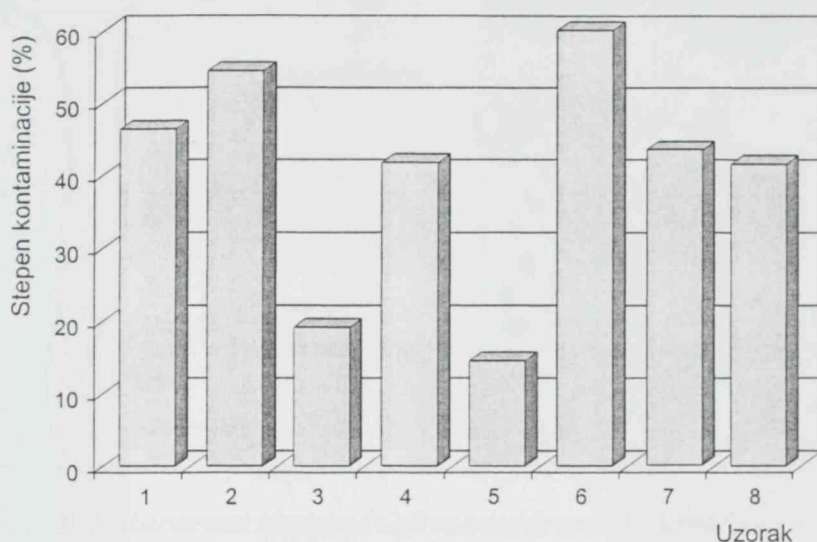
Prisustvo roda *Paecilomyces* u začinskim smešama i pored niskog procentualnog udela (2,76%) ne bi trebalo zanemariti. Predstavlja potencijalnu opasnost kao uzročnik kvarenja mesnih proizvoda iz više razloga. U poređenju sa drugim vrstama, *Paecilomyces spp.* su veoma termorezistentne (Obeta i Ogwuanyii, 1995) i sposobne su da rastu pri izrazito niskoj koncentraciji kiseonika. Splittstoesser i sar. (1971) utvrdili su rast *P. variotii* nakon toplotnog tretiranja konidija na 80°C. Naročito otporan je njegov teleomorfni askogeni oblik *Byssochlamys*. Pored navedenih osobina, *P. variotii* ispoljava otpornost prema nekim kiselinama (sorbinska, benzojeva, propionska) koje se koriste u prehrambenoj industriji kao konzervansi (Samson i van Reenen-Hoekstra, 1988). Registrovan je kao toksična plesan. Zajedno sa još nekim vrstama roda *Penicillium* i *Aspergillus* (Canas i Aranda, 1996) spada u grupu proizvođača mikotoksina patulina (Anderson i sar., 1979; Hacking i Rosser, 1981).

Ostali rodovi izolovani iz začinskih smeša, *Emericella*, *Rhizopus* i *Syncephalastrum*, bili su zastupljeni sa veoma niskim nivoom kontaminacije (1,30%).

Emericella nidulans (= *A. nidulans*) za koju je utvrđeno da proizvodi sterigmatocistin (Keller i sar. 1994; Keller i sar. 1997) bila je vrsta koju je Horvat-Skenderović (1989) pronašla u začinskoj smeši za čajnu kobasicu. Od strane Cuppers i sar. (1997) citirana je kao čest uzročnik kvarenja hrane.

E. herbariorum je predstavljao najveći deo mikopopulacija začinskih smeša, kako po zastupljenosti u uzorcima, tako i po ukupnom broju izolata. Sa slike 9 vidi se da brojnost ovih plesni u većini uzoraka premašuje 40,0%. Prema podacima Silliker-a i sar. (1980), *Eurotium spp.* su često dominantna mikopopulacija u raznim začinima. Za razliku od većine vrsta rodova *Aspergillus* i *Penicillium* mogu da se razvijaju pri a_w znatno ispod 0,80. Klijanje njihovih spora zabeleženo je pri sadržaju slobodne vode ispod 0,75, što je karakteristika ekstremnih kserofila, kao što su *Chrysosporium fastidum*, ili *Xeromyces bisporus* (Pitt i Hocking, 1985; Beuchat i Hocking, 1990).

Plesni roda *Eurotium* (Samson i van Reenen-Hoekstra, 1988) su ranije citirane kao rod *Aspergillus* (Christensen i sar., 1967; Horie i sar., 1971), a *E. herbariorum* kao *A. repens*, mada se može sresti još i pod imenom *E. repens*. U suštini, *E. herbariorum* je teleomorfni (polni), a *E. repens* anamorfni (bespolni) oblik jedne te iste vrste u okviru klase *Ascomycetes*, koja obuhvata sve one plesni kod kojih se pored bespolnog javlja i polni stadijum razmnožavanja.



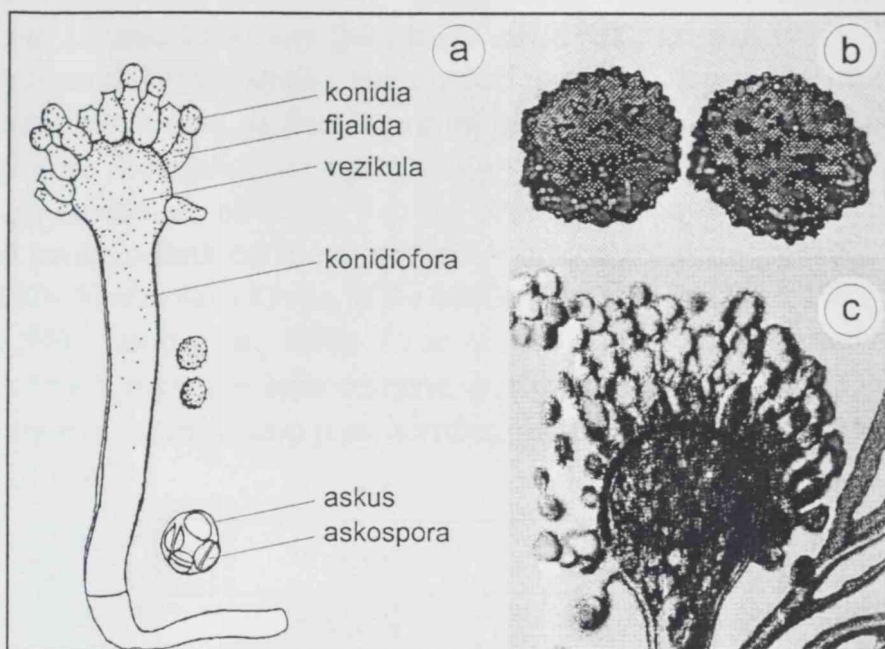
Slika 9. Učestalost *E. herbariorum* u uzorcima začinskih smeša

Mikromorfologija reproduktivnih struktura plesni bitna je za determinaciju vrste (slika 10). Na glatkim konidioforama vazdušne micelije nalaze se globusne vezikule sa fialidama i konidijama. Polne spore, askospore, smeštene su u okruglastim askusima, koji se oslobađaju iz plodonosnih tela kleistotecija. Askospore su lentikularne, glatke, sa ekvatorijalnom brazdom.

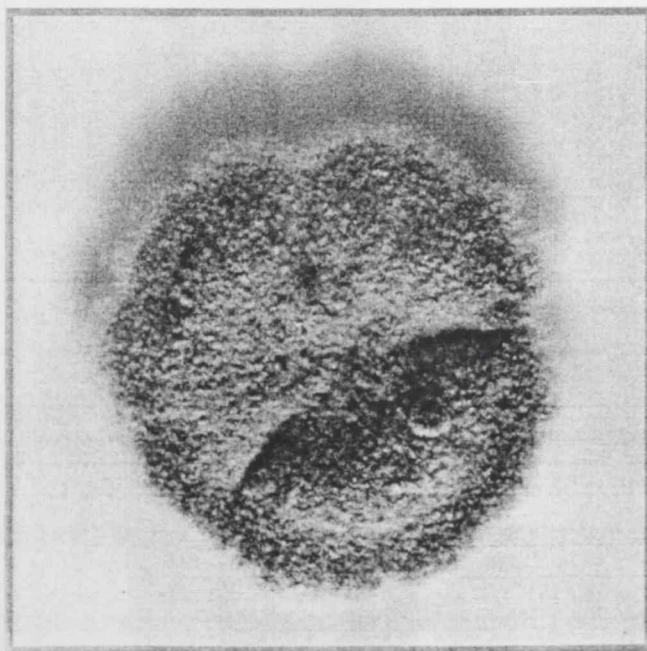
Na supstratima na kojima raste *E. herbariorum* formira kolonije koje su u početku bele. Sa razvojem reproduktivnih struktura one variraju od žutozelenih, okeržutih, do okerbraon nijansi (slika 11). Naličje je žute, okeržute do skoro crne boje. Vrsta je u praksi poznata pod nazivom "žuta buđ", zbog mase žutih kleistotecija. Smatra se najopasnijim razaračem lisnog tkiva.

Kvarenje skladištenih začina i namirnica sa niskim sadržajem vode, kao što su orasi, bademi, lešnici, kesten, seme suncokreta (Beuchat i Hocking, 1990; Abdelgawad i Zohri, 1993; Weidenborner i Kunz, 1994) pretežno se dovodi u vezu sa prisustvom *E. herbariorum* i ostalim *Eurotium* vrstama (*E. rubrum*, *E. chevalieri*, *E. amstelodami*) koje su sposobne da rastu ispod 0,75 a_w (Beuchat i Hocking, 1990).

E. herbariorum (= *A. repens*) je bio redovni kontaminant začina koje su ispitali Takatori i sar. (1977), Horvat-Skenderović, (1989), Škrinjar i Boldocky (1994).



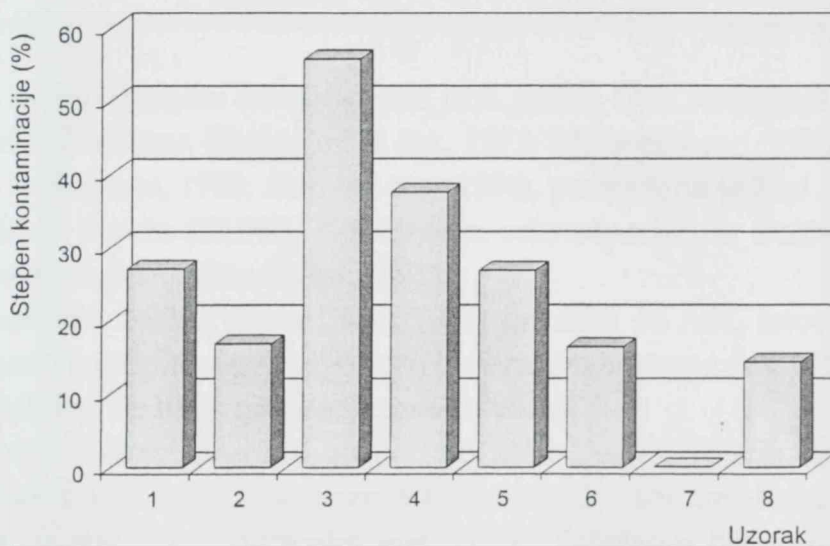
Slika 10. *E. herbariorum*: a) reproduktivne strukture; b) konidije ($\times 1600$); c) vezikula sa fialidama i konidijama ($\times 650$)



Slika 11. *E. herbariorum*: kolonija na CZ agaru

Izolovan je iz proizvoda od mesa (Leistner i Ayres, 1968; Hadlok i sar., 1976; Škrinjar, 1983), kukuruza (Richard i sar., 1969; Muntanjola-Cvetković, 1987), raznih pekarskih proizvoda (Davis i sar., 1975), suvog voća (Beuchat i Hocking, 1990; Weidenborner i Kunz, 1994), sira (Northolt i sar., 1980; Škrinjar, 1984).

U uzorcima začinskih smeša, izuzimajući uzorak 7, *Aspergillus* mikopopulacije su takođe bile frekventne, sa dominantnim prisustvom u uzorku 3 (55,81%) (slika 12). Pojavljivanje *Aspergillus* vrsta je značajno imajući u vidu da *A. flavus*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. versicolor* i drugi predstavnici ove velike grupe mogu u začinima, ili proizvodima od mesa, sintetisati brojne toksične metabolite (Frazier i Westhoff, 1978; Kiermeier i Kraus, 1980; Müller, 1983; Smith i sar. 1983; Singh i sar., 1991; Šutić, 1995; Lund i sar., 1995). To se odnosi posebno na one mikotoksine koji spadaju u najjače prirodne kancerogene, pre svih AB1, OA i ST. Ohratoksigene *Aspergillus* vrste u ovom slučaju nisu utvrđene kao kontaminanti začinskih smeša.



Slika 12. Učestalost roda *Aspergillus* u uzorcima začinskih smeša

Najčešće zastupljene bile su vrste iz grupe *A. versicolor*, *A. versicolor* i *A. sydowii* (tabela 16), koje proizvode ST (Schroeder i Carlton, 1973; Frisvad, 1988; Bohm i Sayed, 1994; Lund i sar., 1995). One su izolovane iz 87,5% uzoraka. Prisustvu ST poklanja se sve veća pažnja zbog sposobnosti konverzije u AB1 (Duraković i sar., 1989).

Na *A. niger* (grupa *A. niger*) neophodno je skrenuti pažnju ne samo zbog širokog rasprostranjenja (62,5%). Ustanovljeno je da neki sojevi proizvode aflatoksin, mada vrsta nije poznata kao aflatoksigena (Škrinjar i sar., 1989; Škrinjar, 1990). Osim

toga, *A. niger* se javlja kao etiološki agens u izazivanju alergijskih reakcija kod ljudi (Škrinjar, 1980). Inhalacijom konidija dolazi do bronhijalne hipersenzibilizacije, koja može preći u bronhijalnu astmu.

Tabela 16. Zastupljenost *Aspergillus spp.* u uzorcima začinskih smeša

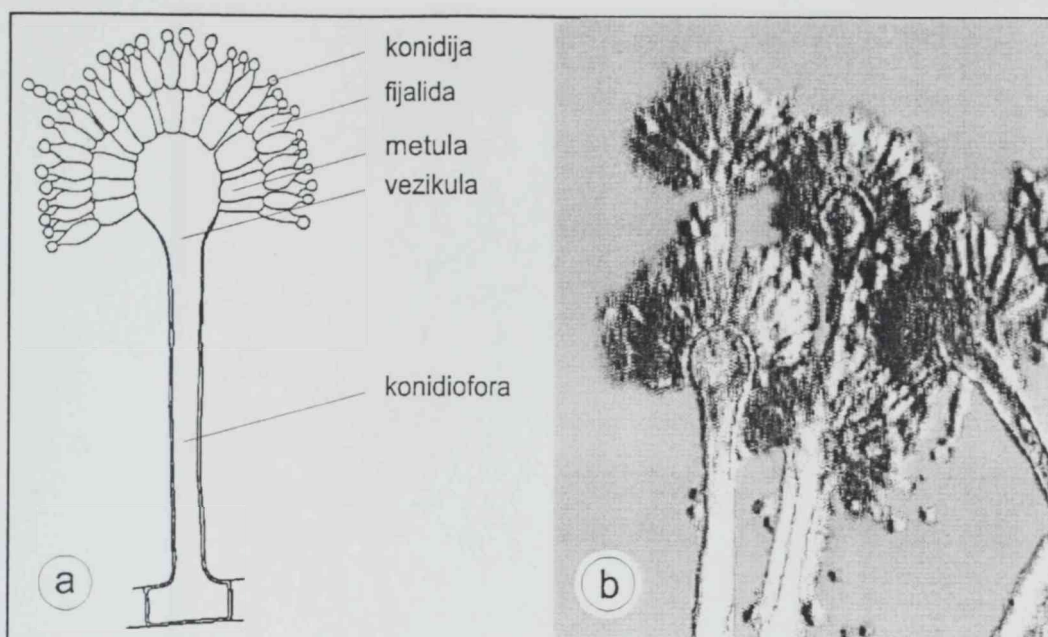
Grupa	Vrsta	Broj kontaminiranih uzoraka	Zastupljenost vrsta (%)
<i>A. flavus-oryzae</i>	<i>A. flavus</i>	4	50,0
<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	5	62,5
<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	1	12,5
<i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>	7	87,5
	<i>A. sydowii</i>		

Iz grupe *A. flavus-oryzae* identifikovan je *A. flavus*. Ova vrsta koja je najznačajniji proizvođač aflatoksina (Stefanović i sar., 1973; Mislivec i sar., 1975; Goto, 1990; Karunaratne i Bullerman, 1990; Abarca i sar., 1994), pronađena je kod znatnog broja uzoraka začinskih smeša (50,0%). Konidije su vrlo otporne na isušivanje zadržavajući vitalnost 15 i više godina (Blinc, 1971).

U 40% uzoraka začina Selim i sar. (1996) pronašli su AB1, istovremeno ukazujući na njegovo zabrinjavajuće prisustvo i u drugim vrstama suvog biljnog materijala (cerealije, lekovito bilje, povrće, jezgrasto voće).

Sve izolovane *Aspergillus spp.* pripadaju klasi *Deuteromycetes*, koja obuhvata imperfektne forme kod kojih nije poznat teleomorfni stadijum. Konidiofore, osim kod *A. flavus* su glatke, sa cilindričnim metulama i flašolikim fialidama na vezikulama (slika 13). U zavisnosti od vrste, konidije su globusne do elipsoidne, kod *A. flavus* i *A. terreus* sa glatkim zidovima, kod ostalih sa rapavim, naročito kod *A. niger*.

Na slikama od 14 do 16 prikazane su makromorfološke karakteristike najfrekventnijih *Aspergillus* mikopopulacija, gajenih i determinisanih na Czapek agaru. *A. versicolor* (slika 14) formira kompaktne kolonije, ispupčene, radijalno izbrazdane, plišane teksture. Preovladavaju grašak zelene nijanse. Boja kolonija ponekad delimično, ili potpuno prelazi u žućkastosmeđu, sa belim rubom. Naličje je bezbojno do crvenobraon. Ponekad je prisutan ružičast, ili crvenobraon pigment. Pojedini sojevi stvaraju crvenkastobraon eksudat.

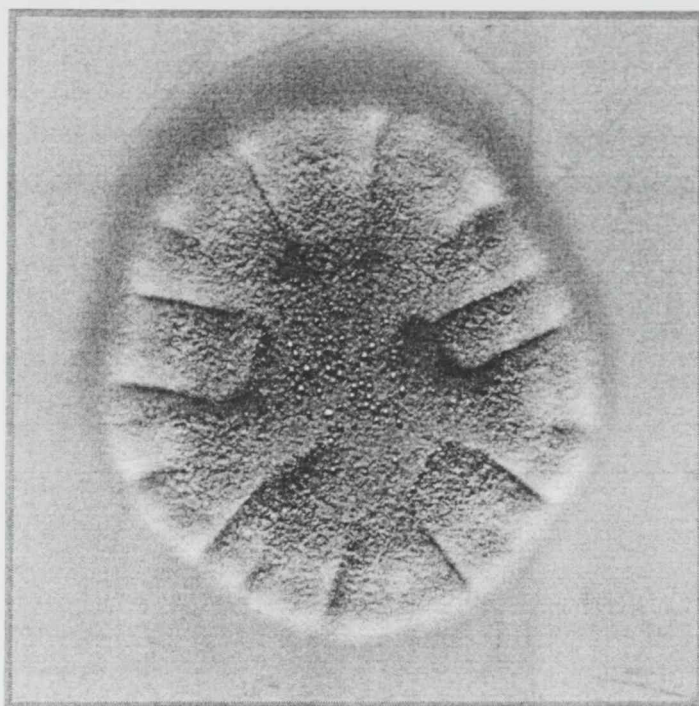


Slika 13. *Aspergillus* spp: a) reproduktivne strukture; b) vezikule sa metulama i fjalidama ($\times 900$)

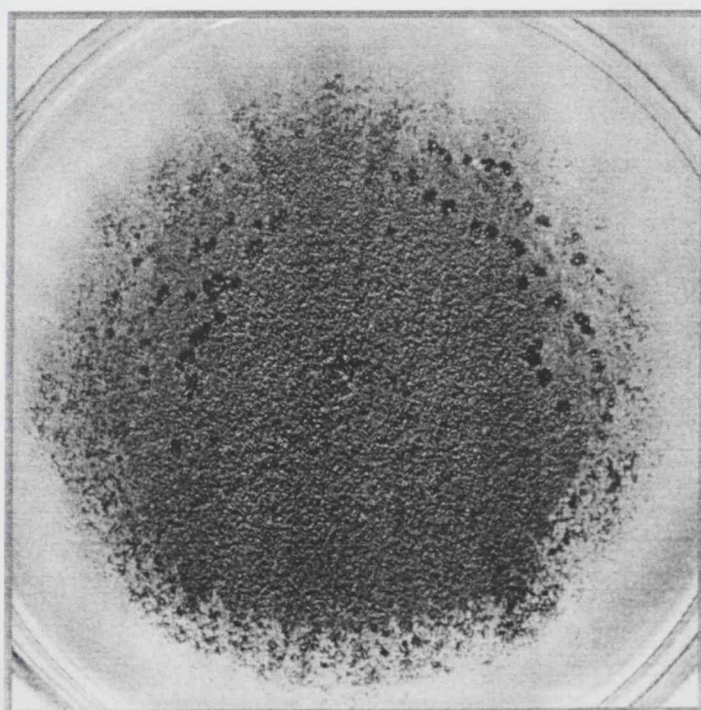
Kolonije *A. flavus* (slika 15) su razučene, najčešće granularne teksture, zelenožute, ili maslinastožute. Kod nekih sojeva javljaju se braon sklerocije i bezbojan do braon eksudat. Naličje je bezbojno do braon.

Crne kolonije *A. niger* (slika 16) granulirane teksture ponekad nose krem, mrkožute, ili ružičaste sklerocije. Naličje je bezbojno ili žuto.

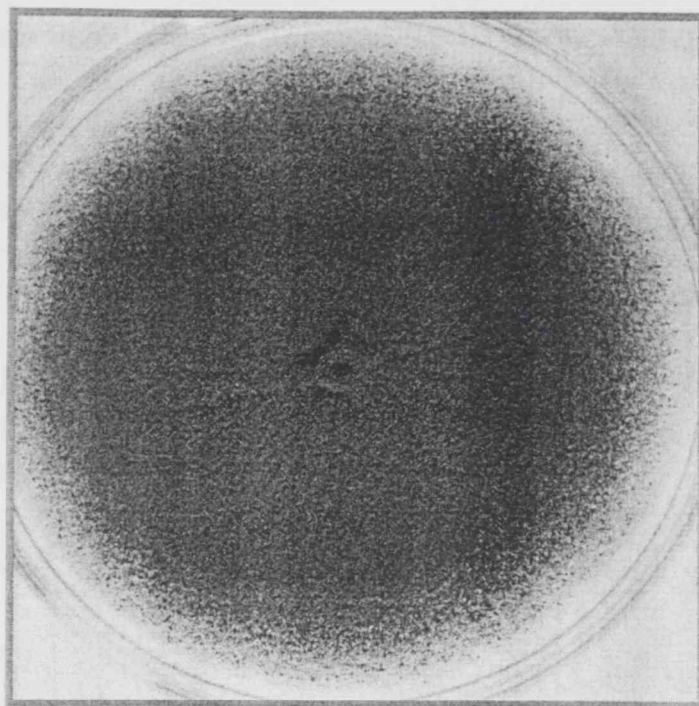
Pojavu *Aspergillus* vrsta u začinima i proizvodima u koje se oni dodaju proučavali su Hadlok i Toure (1973), Fiedler (1973), Aganović i sar. (1982), Škrinjar i Ač (1992) i drugi. Hadlok i Schipper (1974) su u mesnim proizvodima našli iste mikropopulacije kojima su bili kontaminirani upotrebljeni začini, pored onih koje su dospale u sadržaj iz okolne sredine u kojoj se meso prerađuje.



Slika 14. *A. versicolor*: kolonija na CZ agaru

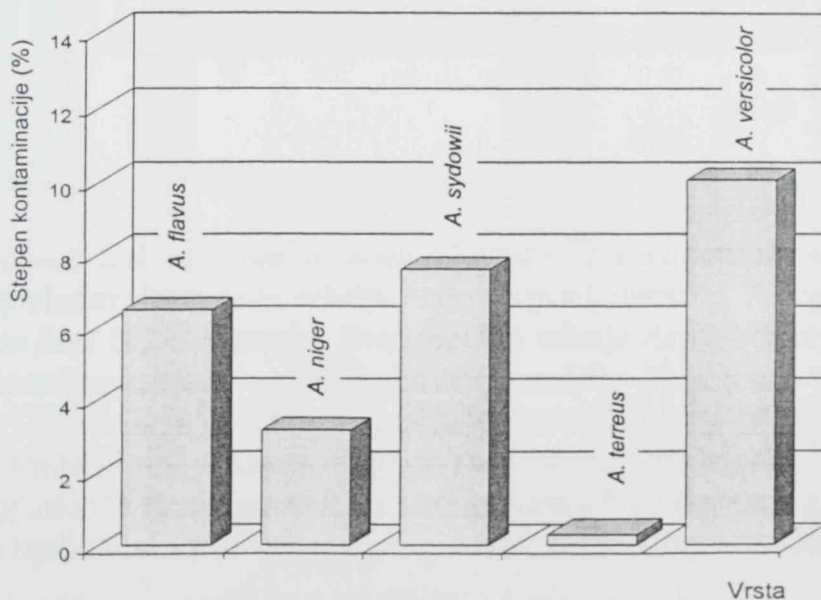


Slika 15. *A. flavus*: kolonija na CZ agaru



Slika 16. *A. niger*: kolonija na CZ agaru

Od ukupnog broja izolata začinskih smeša dominirali su *A. versicolor* i *A. sydowii* (9,79 i 7,45%). Sledeći je bio *A. flavus* (6,10%), a zatim *A. niger* (3,05%) (slika 17).

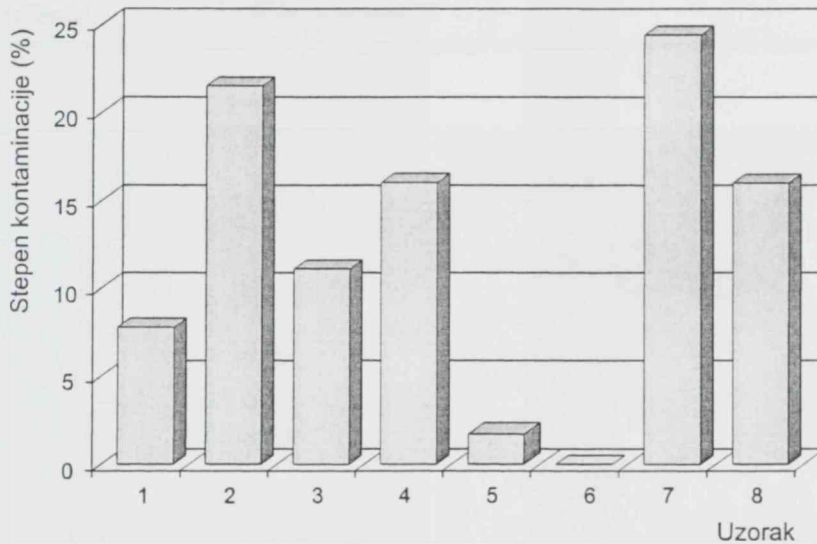


Slika 17. Učestalost *Aspergillus* spp. u mikopopulacijama začinskih smeša

Vrsta *A. terreus* se veoma retko pojavljivala, što se vidi po zastupljenosti od svega 0,09% u ukupnoj mikopopulaciji uočenoj tokom ovih istraživanja, mada je, Klich i Pitt (1988) citiraju kao frekventnu u zemljištu tropskih i suptropskih područja.

A. versicolor je široko rasprostranjena skladišna plesan. Često se može naći na tvrdim i polutvrdim sirevima, naročito u kasnijim fazama zrenja (Northolt i sar., 1980; Škrinjar, 1986; van Egmond, 1989; Lund i sar., 1995), zrnima i zrnastim proizvodima, voću i proizvodima od voća, sušenim proizvodima od mesa (van Egmond, 1982).

Plesni roda *Penicillium* nisu bile tako brojni kontaminanti kao *Aspergillus* vrste. Njihov udeo u mikopopulacijama uzoraka začinskih smeša najviše je iznosio 24,07% (uzorak 7) (slika 18).

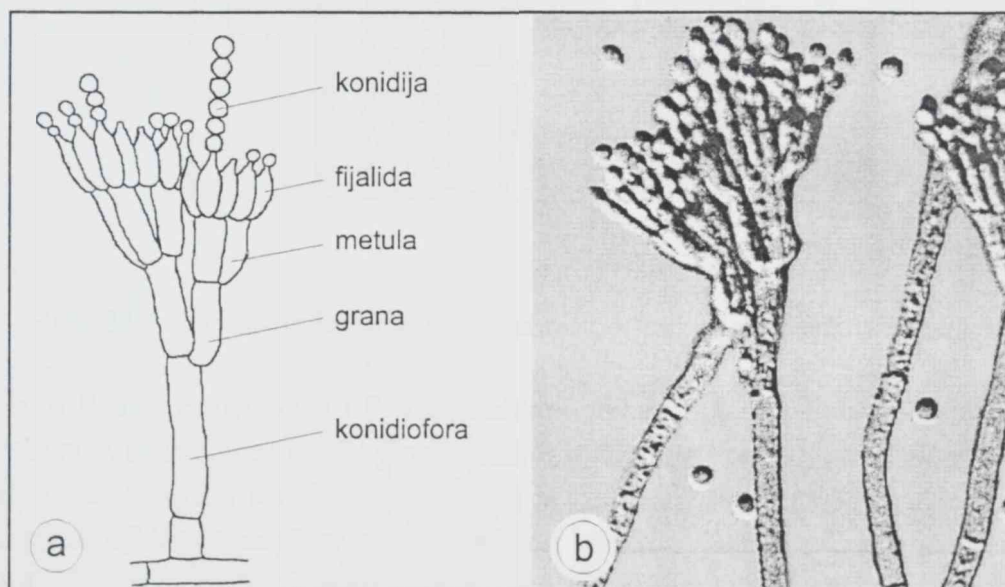


Slika 18. Učestalost roda *Penicillium* u uzorcima začinskih smeša

Na osnovu rezultata datih u tabeli 17 može se zaključiti da su po rasprostranjenju preovladavale vrste iz sekcije *Asymmetrica-Divaricata*. *P. nigricans* i *P. jensenii* uočeni su kod 50,0% uzoraka. Predstavnici sekcije *Asymmetrica-Fasciculata*, sa vrstama *P. aurantiogriseum* i *P. griseofilvum* i *Asymmetrica-Velutina*, sa vrstama *P. breviscompactum* i *P. chrysogenum* bili su podjednako zastupljeni (37,5%). Zajednička osobina ovih vrsta plesni je asimetrično grananje konidiofora (slika 19). Zidovi konidiofora su glatki i/ili fino rapavi (*P. aurantiogriseum*). Na vrhovima grana obrazuju se metule sa fialidama i konidijama, sa glatkim, ili fino rapavim zidom (*P. breviscompactum*).

Tabela 17. Zastupljenost *Penicillium* spp. u uzorcima začinskih smeša

Sekcija-Subsekcija	Vrsta	Broj kontaminiranih uzoraka	Zastupljenost vrsta (%)
<i>Asymmetrica-Divaricata</i>	<i>P. nigricans</i>	4	50,0
	<i>P. jensenii</i>		
<i>Asymmetrica-Fasciculata</i>	<i>P. aurantiogriseum</i>	3	37,5
	<i>P. griseofulvum</i>		
<i>Asymmetrica-Velutina</i>	<i>P. brevi-compactum</i>	3	37,5
	<i>P. chrysogenum</i>		
<i>Monoverticillata</i>	<i>P. implicatum</i>	1	12,5

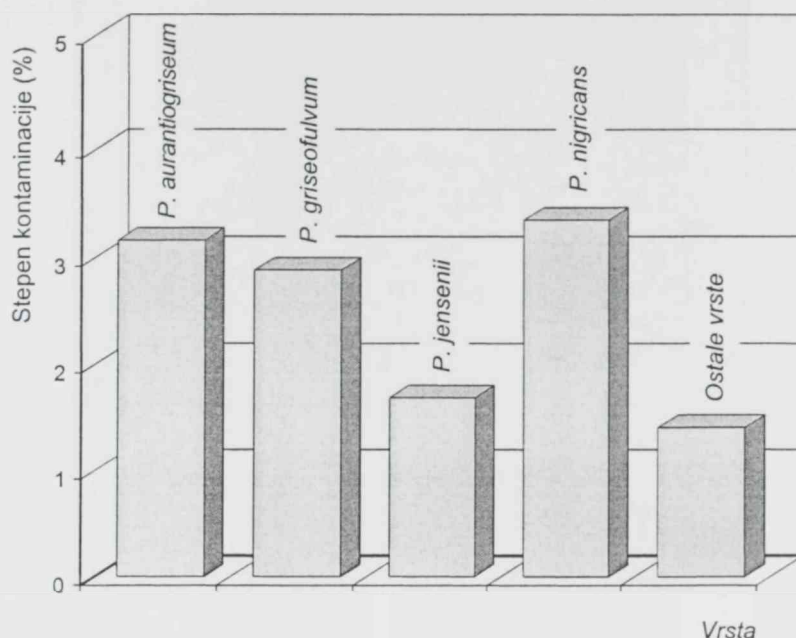


Slika 19. *Penicillium* sp. (sekcija *Asymmetrica*): a) reproduktivne strukture; b) konidiofore sa metulama, fjalidama i konidijama ($\times 1000$)

P. nigricans, *P. aurantiogriseum*, *P. brevi-compactum* i *P. chrysogenum* su izraziti kserofili, po čemu se izdvajaju od ostalih vrsta istog roda, sa minimumom a_w za rast od 0,78. Za *P. nigricans* u dostupnoj literaturi nema konkretnih podataka o rasprostranjenju u začinima. Spominje se da je izolovan uglavnom iz hrane koja je bila izložena prašini, prisutan samo kao kontaminant, ali ne i kao uzročnik kvare-

nja (Pitt i Hocking, 1985). Nije zabeleženo da li eventualno proizvodi neki od toksičnih metabolita.

Među *Penicillium* izolatima dominirali su sojevi *P. nigricans* (3,28%) i *P. aurantiogriseum* (3,12%) (slika 20). Sledeći je bio *P. griseofulvum* (2,83%), zatim *P. jensenii* (1,59%), dok su ostale vrste bile zastupljene sa 1,3% mikopopulacija.

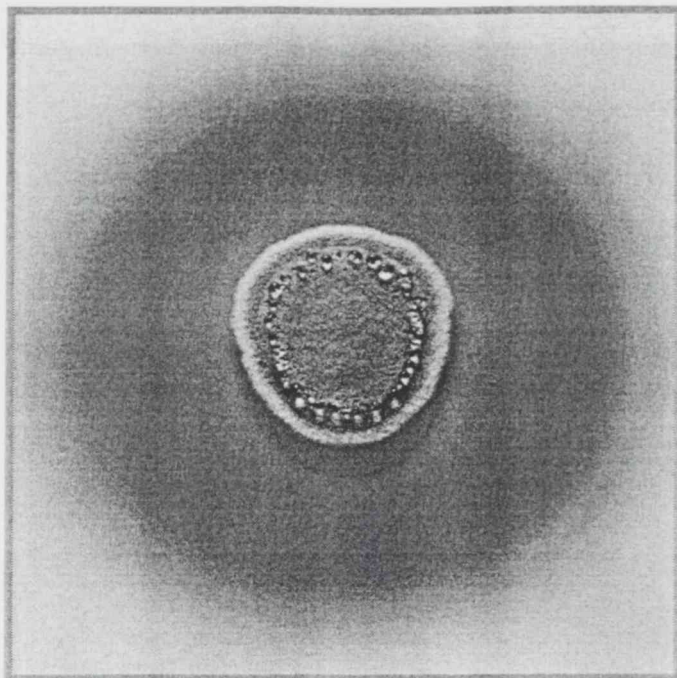


Slika 20. Učestalost *Penicillium* spp. u mikopopulacijama začinskih smeša

Osim *P. aurantiogriseum* i *P. griseofulvum*, još dve plesni, *P. brevi-compactum* i *P. chrysogenum* svrstavaju se među potencijalno toksigene i patogene (Fassatiova, 1986, Frisvad, 1988; Singh i sar., 1991). Poznato je da vrsta *P. aurantiogriseum* proizvodi penicilinsku, ciklopiazoničnu i mikofenolnu kiselinu, penitrem, ksantomenin, grizeofulvin, patulin, citrinin, neki sojevi i OA (Škrinjar, 1985; 1992; Galić i Pajnović, 1989; Surekha i Reddy, 1991; Škrinjar i sar., 1992; Krivobok i sar., 1995). Potrebna aktivnost vode za proizvodnju OA je 0,91 (Northolt i Soentoro, 1988), tako da mesni proizvodi predstavljaju pogodnu sredinu u kojoj se ova plesan može veoma dobro razvijati. Pre nekoliko godina Vesely i sar. (1995) izvestili su o sposobnosti *P. aurantiogriseum* da sintetiše ketoglobozin A. To je prvi izveštaj o izolaciji ovog toksičnog metabolita iz plesni roda *Penicillium*. Scheuer (1995) je registrovao sposobnost formiranja verukozidina u sirovim kobasicama tokom zrenja.

P. aurantiogriseum (= *P. verrucosum* var. *cyclopium*) prepoznaje se po sivozeletoj, plavozelenoj, ili sivoplavoj boji kolonija (slika 21). Konidiofore su grupisane u

snopiće (fascikule), što je naročito vidljivo duž ivične zone. Naličje je od bezbojne, preko žute, do kesten boje. Eksudat je većinom prisutan, nebojen. Neki izolati produkuju braon, ili crvenobraon pigment koji difunduje u podlogu.

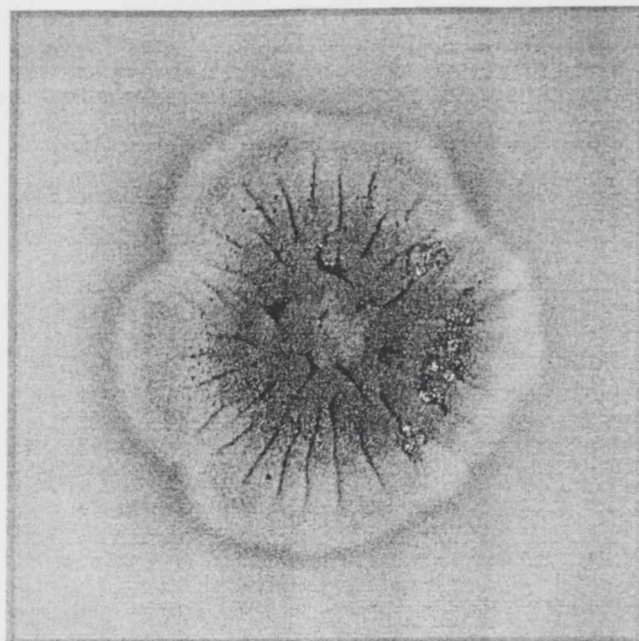


Slika 21. *P. aurantiogriseum*: kolonija na CZ agaru

Vrsta je ubikvitarna i veoma prilagodljiva. Sreće se na čitavom nizu supstrata biljnog i animalnog porekla najrazličitijeg nutritivnog sastava i a_w (Davis i sar., 1975; Norholt i sar., 1980; Žakula i sar., 1982; Škrinjar, 1986). Jedna je od redovnih kontaminenata začina i proizvoda od mesa (Hadlok, 1969; Takatori i sar., 1975; Hadlok i sar., 1976, Škrinjar, 1983). Razvija se na biljkama za vreme vegetacije izazivajući penicilijumsku trulež, mada se češće sreće u mikopopulacijama skladištenih proizvoda. Tokom deset dana zrenja u model kobasice sojevi *P. aurantiogriseum* izlučili su od 12,00 do 20,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OA (Horvat-Skenderović, 1989). Ekstrakti monokultura koje su ispitivali Davis i sar. (1975) bili su visoko toksični, uzrokujući 100% smrtnost pilećih embriona. Rezultati na pilećim embrionima objavljeni od strane Škrinjar (1985) pokazali su da je svega 13,3% preživelo ogled. Zbog široke rasprostranjenosti *P. aurantiogriseum* u prirodi, relativno su česte kontaminacije hrane OA.

Davis i sar. (1975) i Bullerman (1981) zapazili su da *Penicillium spp.* dobro rastu na niskoj temperaturi skladištenja i visokoj vlažnosti hrane.

P. griseofulvum (= *P. patulum*) kao jedna od frekventnijih *Penicillium* vrsta u začinskim smešama raste i sintetizira mikotoksin patulin (Frisvad, 1988) na 5°C, pri pH 3,5 (Bullerman, 1985). Obrazuje sivo do žutozelene kolonije, obično bez eksudata, sa žuto, okerbraon do crvenobraon naličjem (slika 22).



Slika 22. *P. griseofulvum*: kolonija na CZ agaru

5.3. MIKOPOPULACIJE CRNOG BIBERA U ZRNU

U tabeli 18 prikazani su rezultati mikoloških ispitivanja crnog bibera u zrnu. Kao i kod začinskih smeša najbrojnije vrste su bile iz rodova *Aspergillus* (12) i *Penicillium* (12), koje su predstavljale 35,29% svih izolata. Ostale plesni pripadale su rodovima *Absidia*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Syncephalastrum* i *Xeromyces*. Ukupno su determinisane 34 vrste.

Poznato je da se najveći broj toksigenih vrsta nalazi u rodovima *Aspergillus* i *Penicillium*. Pored roda *Eurotium* oni su bili najčešći kontaminanti crnog bibera (tabela 19). *Aspergillus* i *Eurotium* izolovani su iz svih uzoraka (100%), dok je 62,5% bilo kontaminirano *Penicillium* vrstama, a 25,0% rodovima *Absidia* i *Rhizopus*. Ostali su se pojavljivali sporadično. Neke od plesni (*Cladosporium*, *Mucor* i *Rhizopus*) su

biljni patogeni i izazivači sistemskih mikoza kod ljudi, koje mogu nastati inhalacijom, ili ingestijom spora preko kontaminirane hrane (Karakašević i sar.,1989).

Tabela 18. Mikopopulacije izolovane iz crnog bibera

Rod	Vrsta	Zastupljenost vrsta (%)
<i>Absidia</i>	<i>A. corymbifera</i> Cohn.	2,94
<i>Aspergillus</i>	<i>A. awamorii</i> Nakazawa <i>A. caespitosus</i> Raper i Thom <i>A. candidus</i> Link <i>A. flavus</i> Link <i>A. niger</i> van Tieghem <i>A. ochraceus</i> Wilhelm <i>A. protuberus</i> Muntanjola-Cvetković <i>A. restrictus</i> G. Smith <i>A. sydowii</i> (Bain i Sart.), Thom i Church <i>A. terreus</i> Thom <i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi <i>A. wentii</i> Wehmer	35,29
<i>Cladosporium</i>	<i>C. cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	2,94
<i>Eurotium</i>	<i>E. herbariorum</i> (Wiggers) Link	2,94
<i>Mucor</i>	<i>M. racemosus</i> Fres.	2,94
<i>Paecilomyces</i>	<i>P. niveus</i> Stolk i Samson	2,94
<i>Penicillium</i>	<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx <i>P. brevi-compactum</i> Dierckx <i>P. chrysogenum</i> Westling <i>P. claviforme</i> Bain. <i>P. decumbens</i> Thom <i>P. godlewskii</i> Zaleski <i>P. griseofulvum</i> Dierckx <i>P. funiculosum</i> Thom <i>P. implicatum</i> Biourge <i>P. nigricans</i> Bain. i Thom <i>P. rugulosum</i> Thom <i>P. variabile</i> Sopp	35,29
<i>Rhizopus</i>	<i>R. oryzae</i> Went i Prinsen Geerligs <i>R. stolonifer</i> (Ehrenb.) Lind.	5,88
<i>Scopulariopsis</i>	<i>S. brevicaulis</i> (Sall.) Bain.	2,94
<i>Syncephalastrum</i>	<i>S. racemosum</i> Cohn.	2,94
<i>Xeromyces</i>	<i>X. bisporus</i> Fraser	2,94

Tabela 19. Zastupljenost rodova plesni u uzorcima crnog bibera

Rod	Broj kontaminiranih uzoraka	Zastupljenost rodova (%)
<i>Absidia</i>	2	25,0
<i>Aspergillus</i>	8	100
<i>Cladosporium</i>	1	12,5
<i>Eurotium</i>	8	100
<i>Mucor</i>	1	12,5
<i>Paecilomyces</i>	1	12,5
<i>Penicillium</i>	5	62,5
<i>Rhizopus</i>	2	25,0
<i>Scopulariopsis</i>	1	12,5
<i>Syncephalastrum</i>	1	12,5
<i>Xeromyces</i>	1	12,5

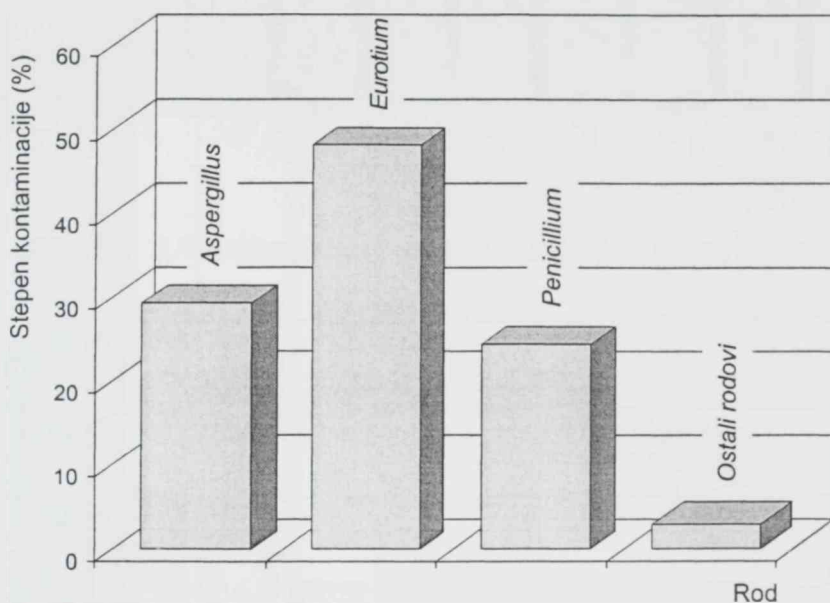
Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da je većina rodova iz začinskih smeša pronađena i na crnom biberu, s tim što su se ovde pojavila dva nova roda, *Cladosporium* i *Xeromyces*.

Cladosporium cladosporioides zajedno sa nekim vrstama roda *Aspergillus*, zatim *Alternaria*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sporotrichum*, oštećuje proizvode koji se skladište pri veoma niskim temperaturama. Sposoban je da raste do -10°C (Frisvad, 1988), razlažući celulozu, pektin i lipide. Hadlok i sar. (1976) i Gill i sar. (1981) uočili su njegovo prisustvo u mesnim proizvodima.

Od podloga korišćenih za ispitivanje mikološke kontaminacije začina (SMA, CY20, MY50G), vrsta roda *Xeromyces*, *X. bisporus* izolovana je samo na podlozi sa saharozom (CY20S), što je u saglasnosti sa konstatacijom Frisvad-a (1988) da ove plesni rastu u prisustvu većih količina ugljenih hidrata i to uglavnom saharoze. Zbog toga ih praktično nije bilo moguće izolovati na uobičajenim podlogama za izolovanje kvasaca i plesni, pa čak i nekim specifičnim. Pitt i Hocking (1985) smatraju da je *X. bisporus* najverovatnije frekventniji u suvoj hrani, nego što se inače citira. U literaturi rod je opisan kao ekstremno kserofilan, sporog rasta, sa posebnim zahtevima u pogledu sadržaja slobodne vode, pa su i to razlozi njegovom retkom

pojavljivanju. *X. bisporus* raste pri veoma niskim a_w vrednostima. Minimalan a_w za njegovu germinaciju iznosi 0,61 (Beuchat i Hocking, 1990), a optimalan 0,85 (Pitt i Hocking, 1985).

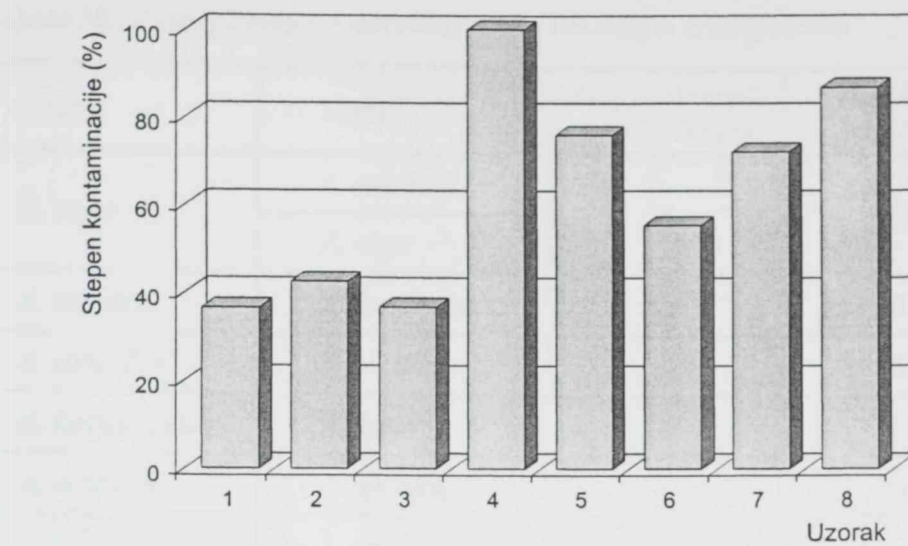
Najčešće izolovane plesni iz crnog bibera bile su iz rodova *Eurotium*, *Aspergillus* i *Penicillium*. *E. herbariorum*, koji se i u ovom slučaju pojavljuje kao jedini kontaminant u okviru istoimenog roda, predstavljao je 47,12% svih mikopopulacija, *Aspergillus* spp. 27,65 i *Penicillium* spp. 23,06% (slika 23).



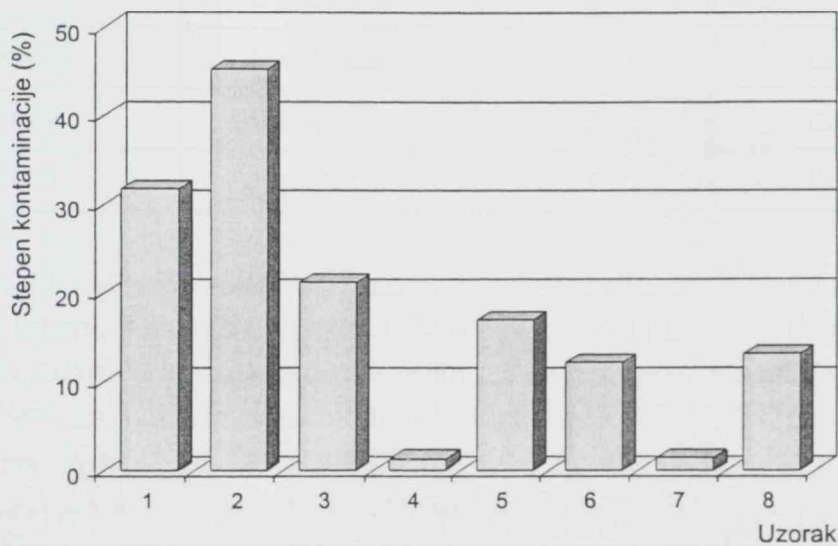
Slika 23. Učestalost pojedinih rodova u mikopopulacijama crnog bibera

Intenzitet kontaminacije uzoraka vrstom *E. herbariorum* bio je izuzetno visok, od 35,06 do skoro 100% (slika 24). Leistner i Eckardt (1981) izveštavaju o *E. herbariorum* kao indikatoru niske a_w vrednosti, odnosno dugog perioda zrenja i potencijalnom uzročniku kvarenja nekih trajnih mesnih proizvoda.

Učestalost *Aspergillus* mikopopulacija bila je znatno niža i kretala se od 0,42 do 44,53% (slika 25). Kod najvećeg broja ispitivanih uzoraka (75,0%) utvrđeno je prisustvo vrsta iz grupe *A. versicolor* (*A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. protuberus*) i grupe *A. flavus-oryzae* (*A. flavus*) (tabela 20). Sojevi *A. versicolor* i *A. flavus* navode se kao uobičajene mikopopulacije začina i mesnih proizvoda. Od 13 ispitivanih sojeva *A. flavus* koje su Garrido i sar. (1992) izolovali iz raznih začina, 4 (30,8%) su bila aflatoksin pozitivna.



Slika 24. Učestalost *E. herbariorum* u uzorcima crnog bibera



Slika 25. Učestalost roda *Aspergillus* u uzorcima crnog bibera

Uloga *A. flavus*, odnosno njegovih toksičnih metabolita, naročito AB1, u formiranju kancerogenih ćelija dobro je poznata, po čemu se ovoj vrsti u toksikologiji hrane pridaje izuzetan značaj (Blinč, 1971; Stefanović, 1971; Penev i sar., 1986; Abarca i sar., 1994; Marsh i sar., 1996). Veliki broj istraživača u svetu smatra da je primarni karcinom jetre posledica konzumiranja hrane kontaminirane aflatoksinom, koji se akumulira u jetri.

Tabela 20. Zastupljenost *Aspergillus* spp. u uzorcima crnog bibera

Grupa	Vrsta	Broj kontaminiranih uzoraka	Zastupljenost vrsta (%)
<i>A. niger</i>	<i>A. awamorii</i>	4	50,0
	<i>A. niger</i>		
<i>A. nidulans</i>	<i>A. caespitosus</i>	1	12,5
<i>A. candidus</i>	<i>A. candidus</i>	2	25,0
<i>A. flavus-oryzae</i>	<i>A. flavus</i>	6	75,0
<i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i>	2	25,0
<i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>	6	75,0
	<i>A. sydowii</i>		
	<i>A. protuberus</i>		
<i>A. glaucus</i>	<i>A. restrictus</i>	1	12,5
<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	1	12,5
<i>A. wentii</i>	<i>A. wentii</i>	1	12,5

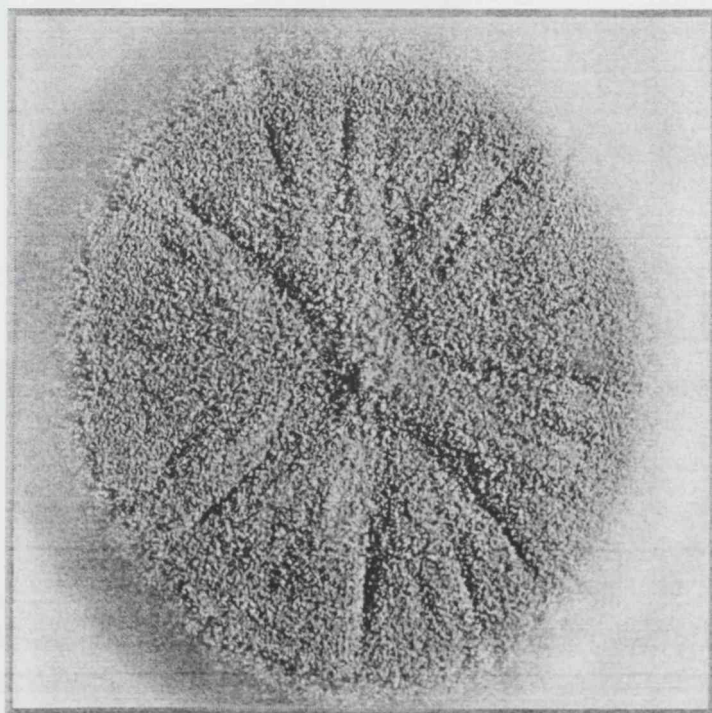
Ito i sar. (1994) registrovali su neznatnu produkciju aflatoksina *A. flavus* u crnom i belom biberu i začinskoj paprici. Baumgart (1981) ističe *A. flavus* kao čestog kontaminanta začina u kojima je detektovan još jedan toksični metabolit, koična kiselina, po načinu delovanja neurotoksin. Abdelgawad i Zohri (1993) skrenuli su pažnju na problem čestog prisustva ove plesni u nekim suvim biljnim proizvodima u Saudijskoj Arabiji. Od 53 izolovane vrste ona je bila dominantna u uzorcima oraha, badema, lešnika, kestena i pistacija, dakle supstratima sa takođe niskim a_w .

A. flavus raste u mnogo širem rasponu relativne vlažnosti vazduha i temperature, dok su najpogodniji uslovi za sintezu aflatoksina relativna vlažnost između 80 i 90% i temperatura oko 30°C. Za sprečavanje sinteze toksina neophodna je relativna vlažnost 65%, a_w niži od 0,85 i temperatura ispod 5°C (Vitez i sar., 1975; Beuchat, 1978). Prema Adebajo i sar. (1994) granična a_w vrednost pri kojoj nema sinteze aflatoksina je 0,80. Začinske biljke mogu biti napadnute ovom vrstom i kontaminirane aflatoksinom pre žetve, ako su mehanički oštećene (ptice, insekti, vremenske nepogode).

Sa znatnom učestalošću konstatovane su i dve vrste iz grupe *A. niger*, *A. niger* i *A. awamorii*, izolovane su iz 50,0% uzoraka crnog bibera. U začinima, celim i usitnjenim (karanfilić, kim, estragon, oraščić i dr.) koje su ispitali Garrido i sar. (1992) *Aspergillus spp.* su bile dominantne, sa *A. niger* i *A. flavus* grupama kao najčešćim.

Manje frekventan, ali ne i manje značajan od *A. flavus* bio je *A. ochraceus* (grupa *A. ochraceus*), koji je nađen kod 25,0% uzoraka. S obzirom da je vrsta poznata po vrlo tolerantnom odnosu prema natrijumhloridu (30% v/v) (Pitt i Hocking, 1985), prisustvo ovog konzervišućeg sredstva u hrani neće sprečiti njen razvoj. Pored OA (Refai i sar., 1996) proizvodi penicilinsku kiselinu i to intenzivnije na nižoj temperaturi i nižoj a_w (22°C; a_w 0,90) (Bacon i sar., 1973). *A. ochraceus* je bila najbrojnija vrsta koju je Misra (1981) izolovao iz skladištenih začina.

Na hranljivim podlogama *A. ochraceus* se prepoznaje po kolonijama koje su okeržute (slika 26), kod većine sojeva sa koncentričnim zonama. Sklerocije su obično prisutne. Naličje je žuto, ili braon. Ne raste na a_w ispod 0,78.

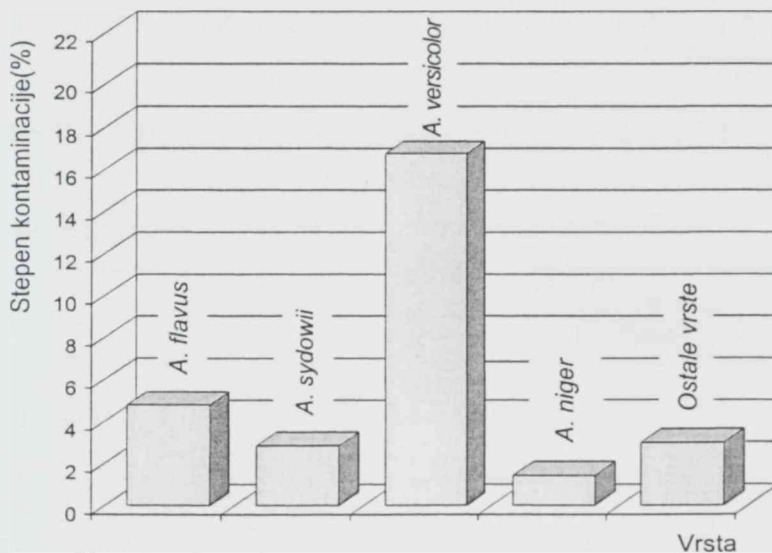


Slika 26. *A. ochraceus*: kolonija na CZ agaru

Plesni iz grupe *A. candidus*, koje su takođe bile zastupljene kod 25,0% uzoraka, ne navode se kao karakteristične mikopopulacije začina.

Zastupljenost vrste *A. restrictus* (grupa *A. glaucus*), koju pored *Eurotium spp.* Beuchat i Hocking (1990) svrstavaju među najčešće napadače zrnevlja, oraha i začina, bila je mala (12,5%), kao i plesni iz ostale tri grupe (*A. nidulans*, *A. terreus* i *A. wentii*). Pri relativnoj vlažnosti od 65% ni najrezistentnija plesan prema niskoj vlazi *A. restrictus* se ne razvija. Ako su ostali uslovi za germinaciju plesni nepovoljni (a_w kao presudni ekološki faktor), uskladišteni biljni materijali sigurni su od štetnih posledica infekcije skladišnim plesnima.

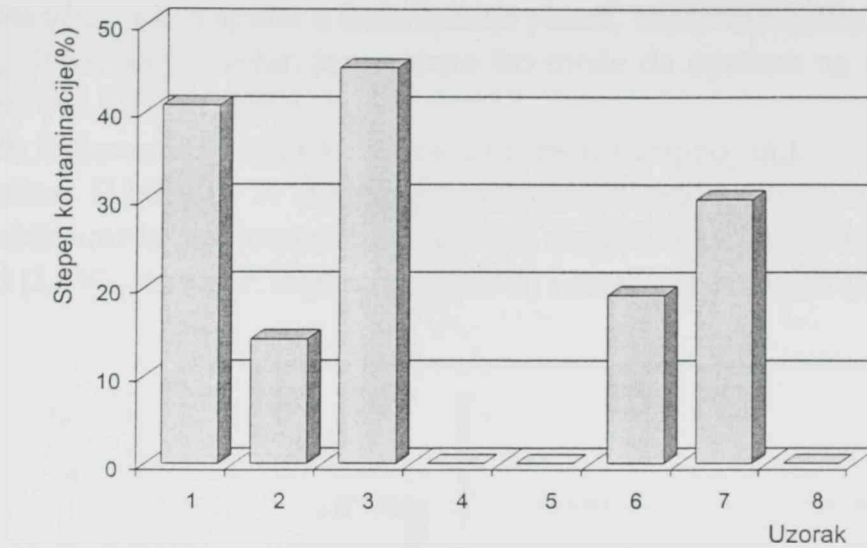
Od 12 determinisanih vrsta roda *Aspergillus* po udelu u ukupnoj mikopopulaciji crnog bibera izdvojile su se *A. versicolor* (16,79%), *A. flavus* (4,54%), *A. sydowii* (2,52%) i *A. niger* (1,22%) (slika 27).



Slika 27. Učestalost *Aspergillus spp.* u mikopopulacijama crnog bibera

Rod *Penicillium* predstavljao je od 13,36 do 45,10% mikopopulacija, s tim da kod tri uzorka njegovo prisustvo nije registrovano (slika 28).

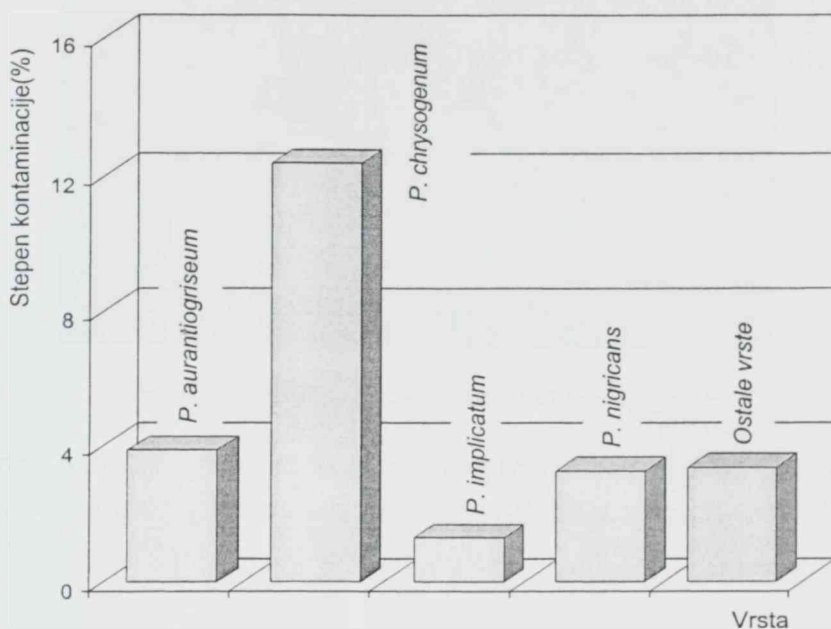
Iz tabele 21 se vidi da su najbrojnije bile vrste iz sekcije *Biverticillata-Symmetrica*, ali su po rasprostranjenju dominirale one koje pripadaju sekciji *Asymmetrica-Velutina* (50,0%), *P. brevi-compactum* i *P. chrysogenum*. Od procentualno manje zastupljenih predstavnika različitih sekcija najznačajnija je pojava *P. aurantiogriseum*, *P. griseofulvum* (*Asymmetrica-Fasciculata*), *P. rugulosum* i *P. variabile* (*Biverticillata-Symmetrica*), koji su sa *P. brevi-compactum* i *P. chrysogenum* predstavljali 50,0% potencijalno toksičnih kontaminenata ovog roda.

Slika 28. Učestalost roda *Penicillium* u uzorcima crnog biberaTabela 21. Zastupljenost *Penicillium* spp. u uzorcima crnog bibera

Sekcija-Subsekcija	Vrsta	Broj kontaminiranih uzoraka	Zastupljenost vrsta (%)
<i>Asymmetrica-Divaricata</i>	<i>P. godlewskii</i>	2	25,0
	<i>P. nigricans</i>		
<i>Asymmetrica-Fasciculata</i>	<i>P. aurantiogriseum</i>	3	37,5
	<i>P. griseofulvum</i>		
<i>Asymmetrica-Lanata</i>	<i>P. claviforme</i>	1	12,5
<i>Asymmetrica-Velutina</i>	<i>P. brevi-compactum</i>	4	50,0
	<i>P. chrysogenum</i>		
<i>Biverticallata-Symmetrica</i>	<i>P. funiculosum</i>	3	37,5
	<i>P. rugulosum</i>		
	<i>P. variabile</i>		
<i>Monoverticillata</i>	<i>P. decumbens</i>	3	37,5
	<i>P. implicatum</i>		

P. funiculosum koji spada u frekventnije plesni, naročito lešnika i cerealija (Pitt i Hocking, 1985) interesantan je po tome što može da opstane na veoma kiselim supstratima pH 1,8 (Pitt, 1991).

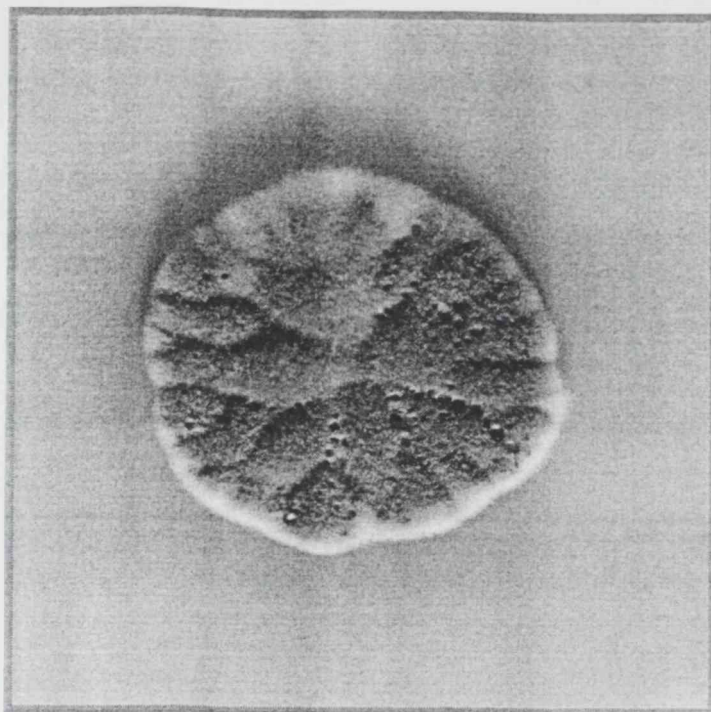
Među izolovanim vrstama najfrekventnije u ukupnoj mikopopulaciji bile su *P. chrysogenum* (12,05%) i *P. aurantiogriseum* (3,67%) (slika 29). *P. nigricans* koji je kod začinskih smeša bio dominantan, u ovom slučaju se pojavio kao treća vrsta po učestalosti (3,03%), zatim *P. implicatum* (1,29%) i ostali predstavnici (3,02%).



Slika 29. Učestalost *Penicillium* spp. u mikopopulacijama crnog bibera

P. chrysogenum i *P. aurantiogriseum* su u svetu najčešće citirane plesni roda *Penicillium* na skladištenim proizvodima (Takatori i sar., 1975; Davis i sar., 1975; Škri-njar, 1985, 1992; Abdelgawad i Zohri, 1993; Bočarov-Stančić, 1996 b). Mislivec i Tuite (1970) su pronašli da *P. aurantiogriseum* (= *P. cyclopium*) može da raste pri 81% relativne vlažnosti, što je nisko za većinu *Penicillium* vrsta.

Što se tiče morfoloških osobina kolonija *P. chrysogenum* (slika 30), one su plavozelene do tamnozeleno, za razliku od *P. aurantiogriseum* plišane, radijalno izbrazdane, sa svetlo žutim do žutobraon eksudatom. Uobičajeno je prisutan i žuti solubilni pigment. Naličje je svetlo žuto, ili braon. Dokazano je da ova plesan može da sintetiše OA, a od drugih toksičnih jedinjenja PR-toksin, rokefortin C, patulin i penicilinsku kiselinu (Smith i sar., 1983; Frisvad, 1988).



Slika 30. *P. chrysogenum*: kolonija na CZ agaru

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem sastava mikopopulacija crnog bibera ustanovljeno je da 52,94% vrsta ima potencijalnu sposobnost izlučivanja toksičnih metabolita.

5.4. MIKOPOPULACIJE MLEVENE ZAČINSKE PAPRIKE

Plesni izolovane iz mlevene začinske paprike svrstane su u 7 rodova i 15 vrsta. U tabeli 22 u kojoj je dat prikaz sastava mikopopulacija vidi se da su dominirali rodovi *Aspergillus* i *Mucor*, koji su bili zastupljeni sa 4 vrste (26,67%), zatim *Penicillium* sa 3 (20,0%), *Alternaria*, *Cladosporium*, *Eurotium* i *Rhizopus* sa 1 vrstom (6,67%). U odnosu na začinske smeše i crni biber, u pogledu rasprostranjenja rodova dobijena je drugačija mikološka slika. Najčešće su se pojavljivale plesni roda *Rhizopus* sa jednom determinisanom vrstom (*R. stolonifer*) otkrivenom kod 87,5% uzoraka (tabela 23). Neznatno manju učestalost u uzorcima ispoljili su rodovi *Eurotium* (75,0%) i *Aspergillus* (62,5%). Rod *Mucor* uočen je kod znatnog broja uzoraka (50,0%), dok su *Penicillium* vrste ređe izolovane (25,0%), kao i *Alternaria* i *Cladosporium* vrste (12,5%). *Rhizopus* i *Mucor* su česti kontaminanti skladištenih proizvoda, ali ne sa tako širokim rasprostranjenjem kakvo imaju rodovi *Aspergillus* i *Penicillium*.

Tabela 22. Mikopopulacije izolovane iz začinske paprike

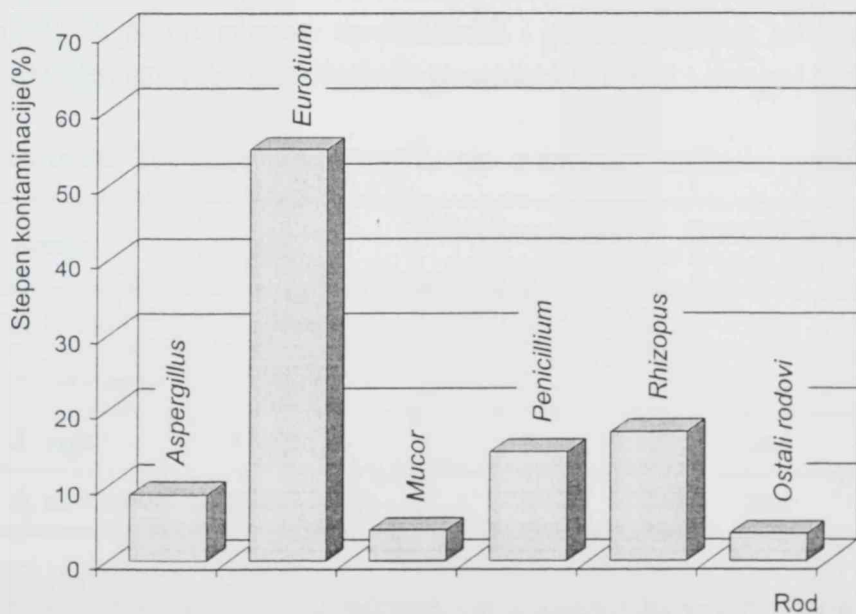
Rod	Vrsta	Zastupljenost vrsta (%)
<i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i> (Fr.) Keissler	6,67
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i> Link <i>A. fumigatus</i> Fress. <i>A. niger</i> van Tieghem <i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	26,67
<i>Cladosporium</i>	<i>C. cladosporoides</i> (Fres.) De Vries	6,67
<i>Eurotium</i>	<i>E. herbariorum</i> (Wiggers) Link	6,67
<i>Mucor</i>	<i>M. circinelloides</i> van Tieghem <i>M. hiemalis</i> Wehmer <i>M. luteus</i> Linnemann <i>M. racemosus</i> Fres.	26,67
<i>Penicillium</i>	<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx <i>P. chrysogenum</i> Westling <i>P. italicum</i> Wehmer	20,00
<i>Rhizopus</i>	<i>R. stolonifer</i> (Ehrenb.) Lind.	6,67

Tabela 23. Zastupljenost rodova plesni u uzorcima začinske paprike

Rod	Broj kontaminiranih uzoraka	Zastupljenost rodova (%)
<i>Alternaria</i>	1	12,5
<i>Aspergillus</i>	5	62,5
<i>Cladosporium</i>	1	12,5
<i>Eurotium</i>	6	75,0
<i>Mucor</i>	4	50,0
<i>Penicillium</i>	2	25,0
<i>Rhizopus</i>	7	87,5

Alternaria vrste u začinima nisu široko rasprostranjene, ni naročito frekventne, što se pokazalo tokom ovih ispitivanja. To su tipične mikopopulacije polja, koje za razmnožavanje zahtevaju minimum 20% vlage supstrata i koje u uslovima skladištenja obično bivaju potisnute od strane kserofilnih plesni, međutim, neke se mogu dugo održati. Jovićević i Milošević (1990) iznose podatak da *A. alternata* (= *A. tenuis*) može preživeti u latentnom stanju čak do sedam godina. Ovu vrstu Misra (1981) je izolovao iz raznih skladištenih začina, a Horvat-Skenderović (1989) iz smeše začina namenjene proizvodnji trajnih kobasica. Češće se pominje kao kontaminant žitarica (Škrinjar i sar., 1996 b) i semena suncokreta (Chulze i sar., 1995). *Alternaria*, *Mucor* i *Cladosporium*, pored nekih vrsta *Aspergillus* i *Penicillium*, značajni su inhalacioni alergeni (Škrinjar, 1980), a navode se i kao potencijalni proizvođači aflatoksina (Blinč, 1971; Stinson i sar., 1982). Alternariol, alterotoksin i tenuazoična kiselina su sekundarni metaboliti *A. alternata*, toksični za čoveka i životinje (Stinson i sar., 1980; Watson, 1984; Robenson i Jalal, 1991). Vinas i sar. (1992) su registrovali sintezu alternariola i alternariol monometil etera u trulim jabukama na 2°C.

Mada su najšire rasprostranjenje imale plesni iz klase *Zygomycetes*, (*Rhizopus*, *Mucor*) u mikopopulacijama začinske paprike dominirao je rod *Eurotium* (slika 31).



Slika 31. Učestalost pojedinih rodova u mikopopulacijama začinske paprike

Ukupno je identifikovano 54,66% sojeva, u odnosu na 16,26 *Rhizopus* i 4,06% *Mucor* izolata. Udeo roda *Aspergillus* bio je manji od roda *Penicillium* (7,81:13,59%), kao i kod rezultata do kojih je došao Hadlok (1969) kod iste vrste začina.

Pojavljivanje rodova i vrsta plesni, kao i njihova učestalost variraju pod uticajem različitih ekoloških faktora, pa su tako plesni roda *Aspergillus* prema Silliker-u i sar. (1980) izolovane u većem broju od *Penicillium* vrsta (37:18%). Veća zastupljenost roda *Penicillium* u začinskoj paprici, prikazana na slici 31, mogla je nastati tek nakon sušenja, naknadno, ili je posledica odstupanja u tehnologiji proizvodnje (neadekvatan režim sušenja i/ili debljina sloja paprike na pokretnoj traci, što smanjuje prodor toplote). S obzirom da se proces sušenja odvija pri relativno visokim temperaturama, u početku do 80°C, kasnije 55 do 60°C, trebalo bi očekivati značajniju redukciju *Penicillium* vrsta koje su manje otporne na toplotu od *Aspergillus*.

Retko zastupljene plesni *Alternaria* i *Cladosporium* predstavljale su 3,62% kontaminenata začinske paprike.

U tabeli 24 prikazani su rezultati zastupljenosti *Aspergillus* vrsta. Od 4 determinisane vrste iz istoimenih grupa, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor* već su uočene kod začinskih smeša i crnog bibera, dok se *A. fumigatus* javio kao kontaminant samo začinske paprike. Zastupljenost pojedinih vrsta kretala se od 12,5 (*A. versicolor*) do 25,0% (ostale vrste), pri čemu su dominirali potencijalni proizvođači aflatoksina (*A. flavus* i *A. niger*). *A. flavus* svojom lipolitičkom i proteolitičkom aktivnošću (Long i sar., 1996) može dovesti i do nepoželjnih promena u mesu i drugoj hrani.

Tabela 24. Zastupljenost *Aspergillus* spp. u uzorcima začinske paprike

Grupa	Vrsta	Broj kontaminiranih uzoraka	Zastupljenost vrsta (%)
<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	2	25,0
<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	2	25,0
<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	2	25,0
<i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>	1	12,5

Pored *A. versicolor* koji po toksičnosti ne zaostaje za prethodnom vrstom i *A. fumigatus* se javlja kao još jedan toksični predstavnik poznat po proizvodnji tremorgenih mikotoksina fumitremorgena B, verikulogena, zatim gliotoksina i drugih sekundarnih metabolita (Frisvad, 1988; Land i sar., 1993)). Raste u veoma širokom rasponu temperature, što ovoj vrsti omogućava veliko rasprostranjenje. Optimalna

temperatura za rast iznosi 40°C (Muntanjola-Cvetković, 1987), a minimalan aktivitet vode 0,82 (Silliker i sar., 1980). Nalazi se na biljkama, semenima, mesnim proizvodima, čak i drvenim otpacima. Klich i Pitt (1988) navode *A. fumigatus* kao uzročnika sistemskih mikoza koje nastaju respiratornom infekcijom (Duraković, 1991). Pri tome je njegovo dejstvo na ćelije tkiva mehaničko, toksično i alergeno. Elektronskom mikroskopijom Tronchin i sar. (1997) su pokazali da su za kolonizaciju tkiva odgovorni laminin receptori koji se pojavljuju na površini konidija pred germinaciju, vezujući se za ekstracelularni matriks laminin proteina.

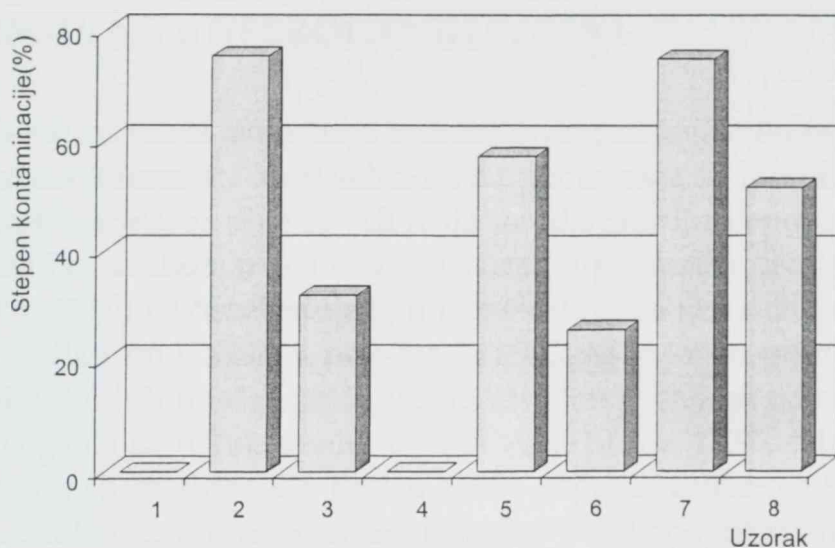
Od predstavnika roda *Penicillium* pojavile su se dve vrste (*P. aurantiogriseum* i *P. italicum*) iz sekcije *Asymmetrica-Fasciculata* i jedna (*P. chrysogenum*) iz sekcije *Asymmetrica-Velutina*. Kao što se iz tabele 25 može videti, one nisu bile široko rasprostranjene, ali je dovoljno i to što je njihovo prisustvo kao kontaminenata registrovano, naročito ako se zna da neki sojevi *P. aurantiogriseum* i *P. chrysogenum* imaju sposobnost stvaranja OA i aflatoksina. Interesantna je pojava *P. italicum* imajući u vidu da se radi o vrsti koja se inače primarno javlja na citrusima izazivajući kvarenje (Müller, 1983; Frazier i Westhoff, 1978; Pitt, 1991). Od toksina koje proizvodi registrovan je deoksibrevianamid E (Frisvad, 1988). S obzirom da se *Penicillium* vrste razmnožavaju pri veoma niskim temperaturama (Bullerman i Olivigni, 1974; Bullerman, 1976; Orth, 1981; Pitt i Hocking, 1985), ove plesni mogu da imaju značajnu ulogu kao uzročnici kvarenja i proizvođači mikotoksina u uslovima skladištenja pri niskim temperaturama.

Tabela 25. Zastupljenost *Penicillium* spp. u uzorcima začinske paprike

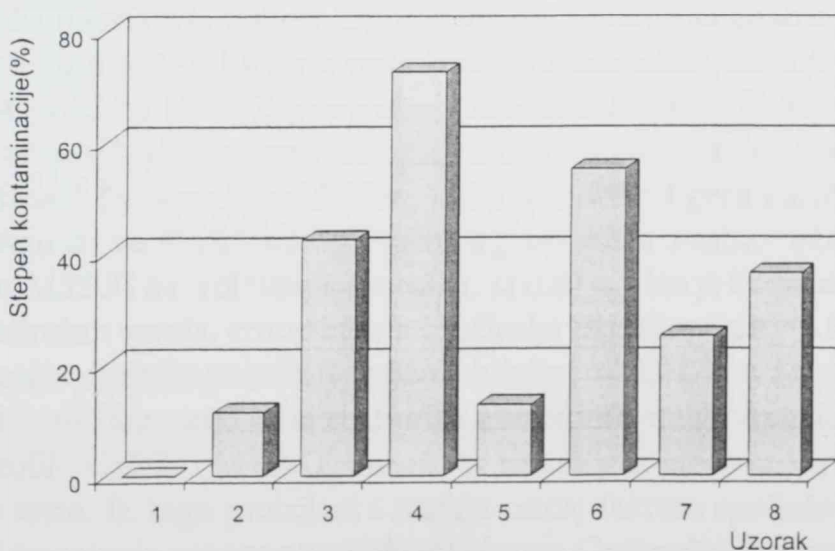
Sekcija-Subsekcija	Vrsta	Broj kontaminiranih uzoraka	Zastupljenost vrsta (%)
<i>Asymmetrica-Fasciculata</i>	<i>P. aurantiogriseum</i>	1	12,5
	<i>P. italicum</i>		
<i>Asymmetrica-Velutina</i>	<i>P. chrysogenum</i>	1	12,5

U mikopopulacijama uzoraka začinske paprike dve vrste bile su konstantno veoma frekventne, *E. herbariorum* sa 24,0 do 75,38% izolovanih sojeva (slika 32) i *R. stolonifer* sa učestalošću koja se kretala od 11,05 do 72,72% (slika 33). U ovom slučaju, dominacija predstavnika iz klase *Zygomycetes* pored *E. herbariorum*, najverovatnije je posledica visoke inicijalne kontaminacije ovim mikroorganizmima sa polja. Naime, *R. stolonifer* (= *R. nigricans*) je veoma frekventna plesan u zemljištu našeg

geografskog područja, gde je začinska paprika i proizvedena. Često se razmnožava na plodovima povrća, jer im za optimalan rast odgovara visok aktivitet vode i dovoljne količine ugljenih hidrata, koji su posle vode najzastupljeniji sastojci. Kod paprike najveći deo čine direktno redukujući šećeri, glukoza i fruktoza, dok saharoze ima veoma malo (Niketić-Aleksić, 1982). Ne razlaže celulozu i lignin (Muntanjola-Cvetković, 1987), za razliku od *E. herbariorum*, ali razlaže pektine. Plesni koje koriste celulozu (*E. herbariorum*, *P. aurantiogriseum*) imaju veliki značaj u fitopatologiji, biodegradaciji biljnog materijala, kao i kvarenju proizvoda biljnog porekla.



Slika 32. Učestalost *E. herbariorum* u uzorcima začinske paprike



Slika 33. Učestalost *R. stolonifer* u uzorcima začinske paprike

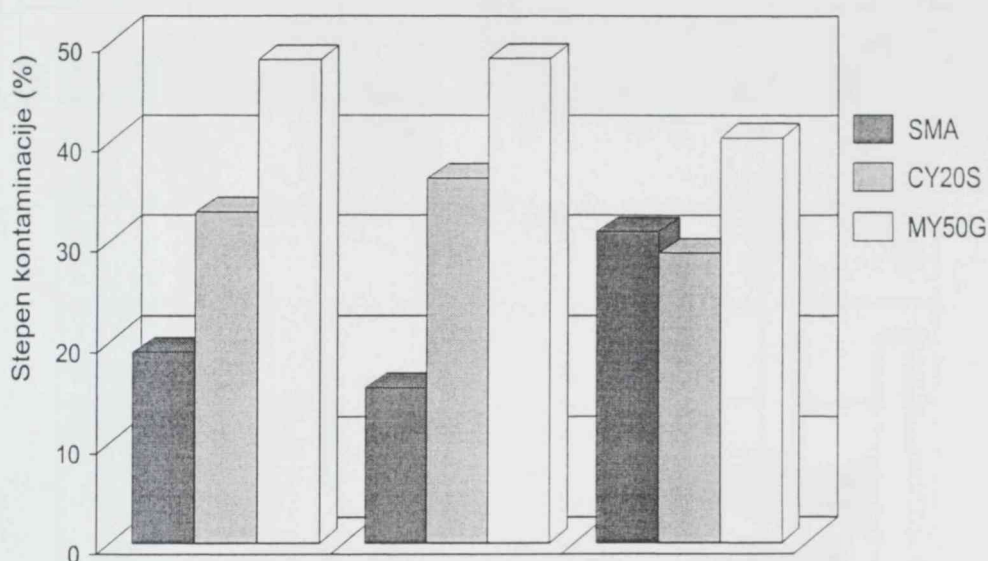
Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima dobijenim u toku ispitivanja začinskih smeša i crnog bibera, može se konstatovati da je *E. herbariorum* bila jedina kserofilna vrsta konstantno široko rasprostranjena i dominantno prisutna u svim uzorcima. Pored ove vrste u izazivanju procesa kvarenja takođe mogu biti umešane *Aspergillus*, *Penicillium* i ostale plesni sa minimalnim a_w za rast nižim od 0,85.

5.5. UTICAJ PODLOGA NA KVANTITATIVNO I KVALITATIVNO ODREĐIVANJE KSEROFILNIH PLESNI

Poređenjem rezultata ispitivanja kvantitativnog sastava mikopopulacija konstatovan je porast intenziteta kontaminacije na podlogama za kserofile kod sve tri grupe ispitivanih začina. Sa slike 34 vidi se da standardna SMA podloga čija je upotreba određena Pravilnikom o metodama analiza i superanaliza životnih namirnica (Sl. list SFRJ br. 25/80) ne obezbeđuje optimalne uslove za rast svih kontaminenata iz začina, za razliku od CY20S, a naročito MY50G na kojoj su postignuti najbolji rezultati. Kod začinskih smeša i crnog bibera utvrđen je znatan porast učešća kserofila na podlogama sa redukovanim a_w uslovima i to sa 18,95, odnosno 15,43% (SMA), na više od 48,0% (MY50G). Kod začinske paprike razlike u intenzitetu kontaminacije nisu toliko izražene, jer su znatan udeo u mikopopulacijama imale plesni manje tolerantne na redukovanu a_w . Procenat izolovanih plesni iznosio je od 30,92 (SMA) do 40,30% (MY50G). Pojava odsustva rasta koja je bila registrovana kod dva uzorka na MY50G (tabela 13) ukazuje da podloge sa znatno ograničenom količinom slobodne vode inhibiraju vrste koje nisu kserofilne, što nije bio slučaj i sa nekim predstavnicima klase *Zygomycetes*, rodovima *Mucor* i *Rhizopus*. O količini slobodne vode neophodne za rast ovih plesni u literaturi se mogu naći različiti podaci. Vrste *Mucor* i *Rhizopus* ispod 0,93 a_w gube sposobnost germinacije. Panasenko (1967) je utvrdio da za *R. stolonifer* granična a_w može biti znatno niža. Pokazalo se da on raste na MY50G za izolovanje kserofila, sa 0,89 a_w , što je konstatovano tokom ispitivanja začinskih smeša, crnog bibera i začinske paprike. Corry (1978) za germinaciju *R. stolonifer* definiše potreban vodeni aktivitet od 0,94, a za *M. racemosus* 0,88.

Razloge različitog ponašanja ovih više mezofilnih mikopopulacija na podlogama za kserofile CY20S i MY50G, trebalo bi tražiti pre svega u karakteru sojeva unutar same vrste. Iz toga proizilazi i različit uticaj faktora spoljašnje sredine na povećanje, ili smanjenje opsega a_w za klijanje spora. Optimalna temperatura i hranljivi sadržaj mogu omogućiti rast i na nižim a_w vrednostima. Takođe, treba imati u

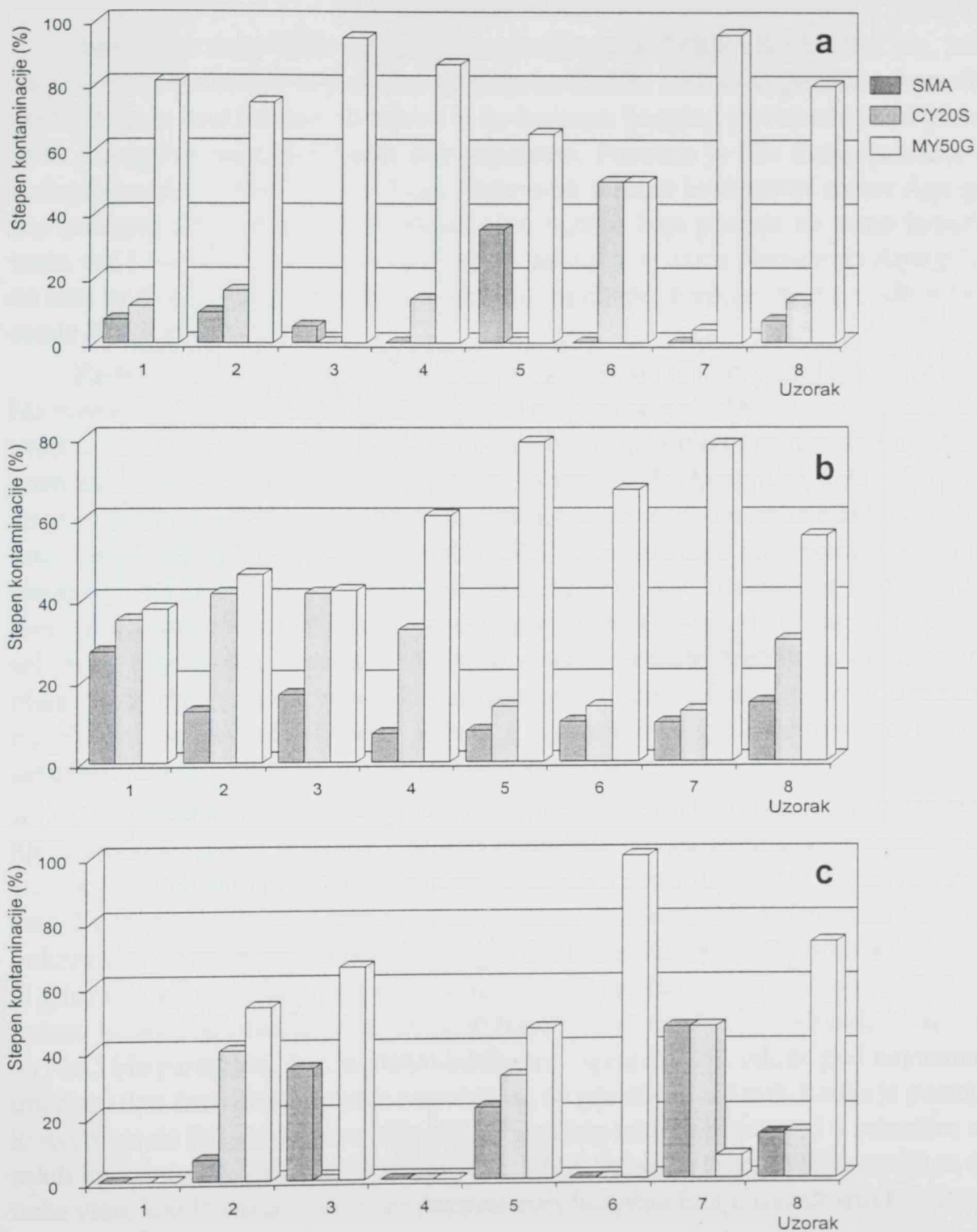
vidu da svi ugljeni hidrati kao osnovni izvori ugljenika i energije za biosintetske procese ćelije nisu podjednako pristupačni. Neke vrste kao *R. oligosporus*, nemaju enzimski sistem koji bi im omogućio hidrolizu saharoze na lako usvojive monosaharidne jedinice. U tom slučaju, takve plesni iako prisutne u hrani nije moguće registrovati. Kod drugih, produkcija enzima saharaze je slaba, što uslovljava kasnije pojavljivanje i znatno sporiji rast.



Slika 34. Efikasnost podloga na izolovanje kserofilnih plesni

Uporedo sa ispitivanjem opšte kontaminacije začina praćeno je i u kojoj meri su primenjene podloge pogodne za kvantitativno i kvalitativno određivanje pojedinih grupa kserofilnih plesni.

Vrsta *E. herbariorum* je predstavljala najveći deo kontaminacione mikopopulacije ispitivanih začina. Kao što se sa slika 35a, 35b i 35c može videti, vezano za njegovu zastupljenost na pojedinim podlogama, javile su se znatne razlike. Broj izolovanih sojeva bio je najmanji na SMA. Na podlogama koje pospešuju rast kserofilnih plesni oni su se pojavili u većem broju, naročito na MY50G, sa visokom učestalošću, u svim uzorcima. Istovremeno, kod nekih uzoraka na SMA i CY20S *E. herbariorum* je bio odsutan, izuzimajući dva uzorka začinske paprike, koji inače nisu bili kontaminirani *Eurotium* mikopopulacijama. Abdelgawad i Zohri (1993) su uočili potpuno odsustvo plesni roda *Eurotium* na Czapek-glukoza agaru, ali su bile izolovane sa visokom učestalošću iz svih uzoraka suvog semena na podlozi sa glicerolom.



Slika 35. Zastupljenost *E. herbariorum* na SMA, CY20S i MY50G (a-zaćinske smeše; b-crni biber; c-zaćinska paprika)

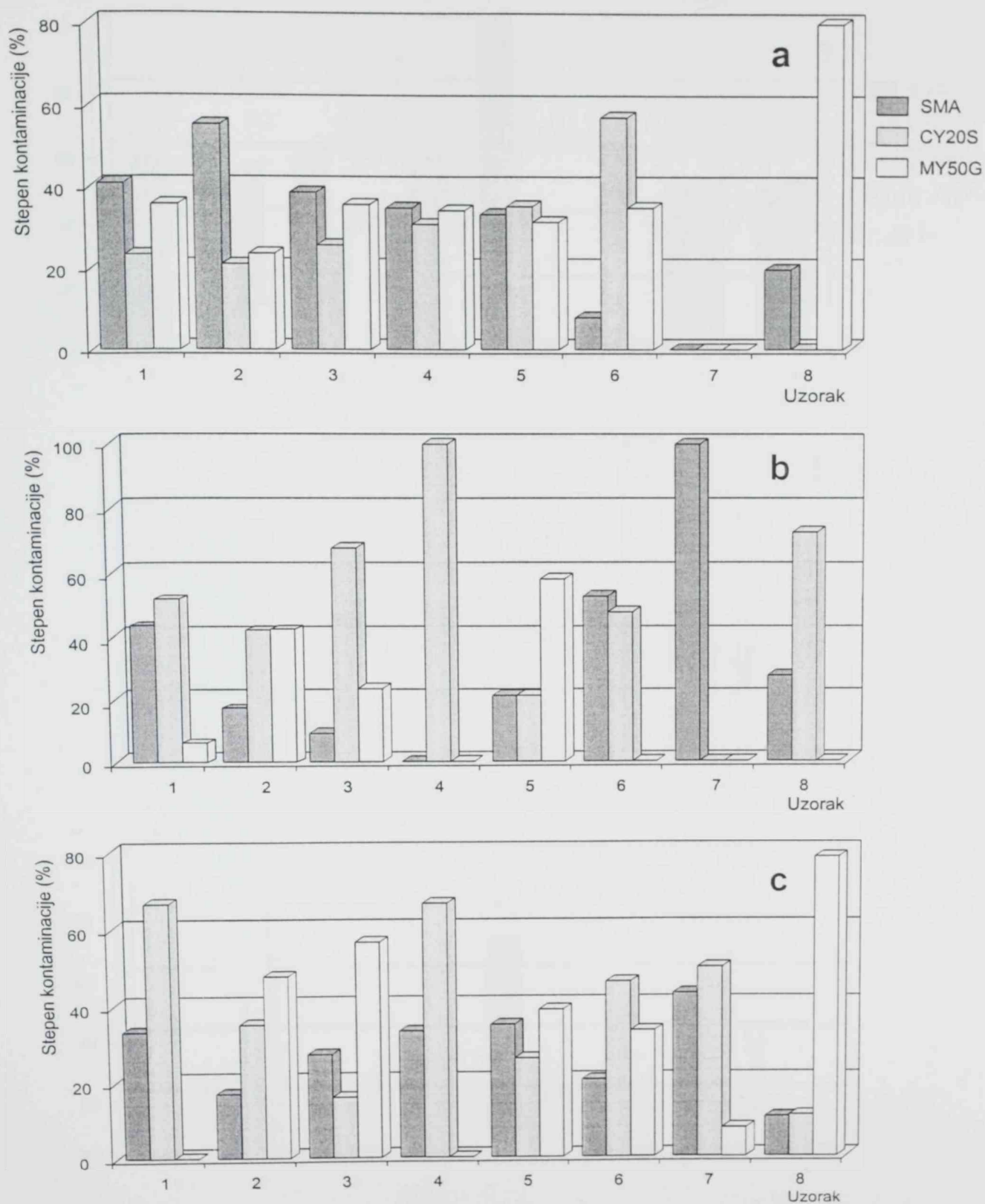
Aspergillus vrste češće su uočene na podlogama CY20S i SMA (slike 36a, 36b, 36c), sa nešto većim procentualnim udelom na CY20S. Dok se sa porastom kserofilnosti podloga broj izolovanih sojeva *E. herbariorum* linearno povećavao, kod plesni roda *Aspergillus* takva korelacija nije zapažena. Prisutno je bilo često variranje u zastupljenosti na istom tipu podloge. Uzimajući u obzir kvalitativni sastav *Aspergillus* mikopopulacija uzoraka i individualne razlike koje postoje ne samo između vrsta, već i sojeva unutar svake vrste, može se objasniti zašto plesni roda *Aspergillus* na istoj podlozi nisu izolovane u konstantno manjem, ili većem broju u odnosu na ostale dve podloge.

Zastupljenost roda *Penicillium* bila je najveća na CY20S (slike 37a, 37b, 37c). Na nižem a_w (MY50G) kolonije ovih plesni ređe su se pojavljivale, što se može dovesti u vezu sa činjenicom da brojne *Penicillium* vrste imaju minimalne a_w vrednosti za rast iznad vrednosti ovog faktora za vrste roda *Aspergillus*, koje bolje podnose kserofilnije uslove. Kod začinske paprike samo su dva uzorka bila kontaminirana *Penicillium* mikopopulacijama (slika 37c). Kserofili mogu biti veoma osetljivi na visoki a_w . Pitt i Hocking (1985) navode da neke vrste kao *Wallemia sebi* i *Aspergillus penicilloides* koje su uobičajene u cerealijama i začинима, usled sporog rasta pri visokim a_w vrednostima, ostaju često ispod praga detekcije. S obzirom da se brojne plesni razlikuju ne samo po svojim potrebama za slobodnom vodom u supstratu, neophodno je pri određivanju njihovog kvantitativnog i kvalitativnog sastava definisati faktore koji mogu uticati na objektivnost rezultata.

Neka razmatranja o potrebi za podlogom koja bi bila univerzalna za izolovanje kserofilnih plesni iz hrane i drugih materijala, mogu se naći u studijama više autora. Pitt i Hocking (1977) na osnovu ispitivanja rasta *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Eurotium chevalieri*, *Chrysosporium fastidum*, *Wallemia sebi* i *Xeromyces bisporus*, pokazali su da univerzalna podloga može biti bazirana na smeši glukoza-fruktoza, ili glicerolu, ali ne i NaCl kao rastvornoj materiji za limitiranje vodenog aktiviteta. Izuzev *W. sebi*, rast ostalih vrsta bio je mnogo brži na smeši ugljenih hidrata, dok je na NaCl bio parcijalno, ili kompletno inhibiran. *Aspergillus spp.* bile su pod najmanjim uticajem tipa rastvorne materije i opsega a_w za germinaciju i rast. Ranije je postojalo uverenje da *W. sebi* zahteva više soli, ali ona isto tako dobro raste i u prisustvu visokih koncentracija glukoze (Beuchat i Pitt, 1990). Wheeler i sar. (1988) utvrdili su da neke vrste kao *Polypeacilum pisce* i *Basipetospora halophila* imaju izrazit afinitet prema NaCl.

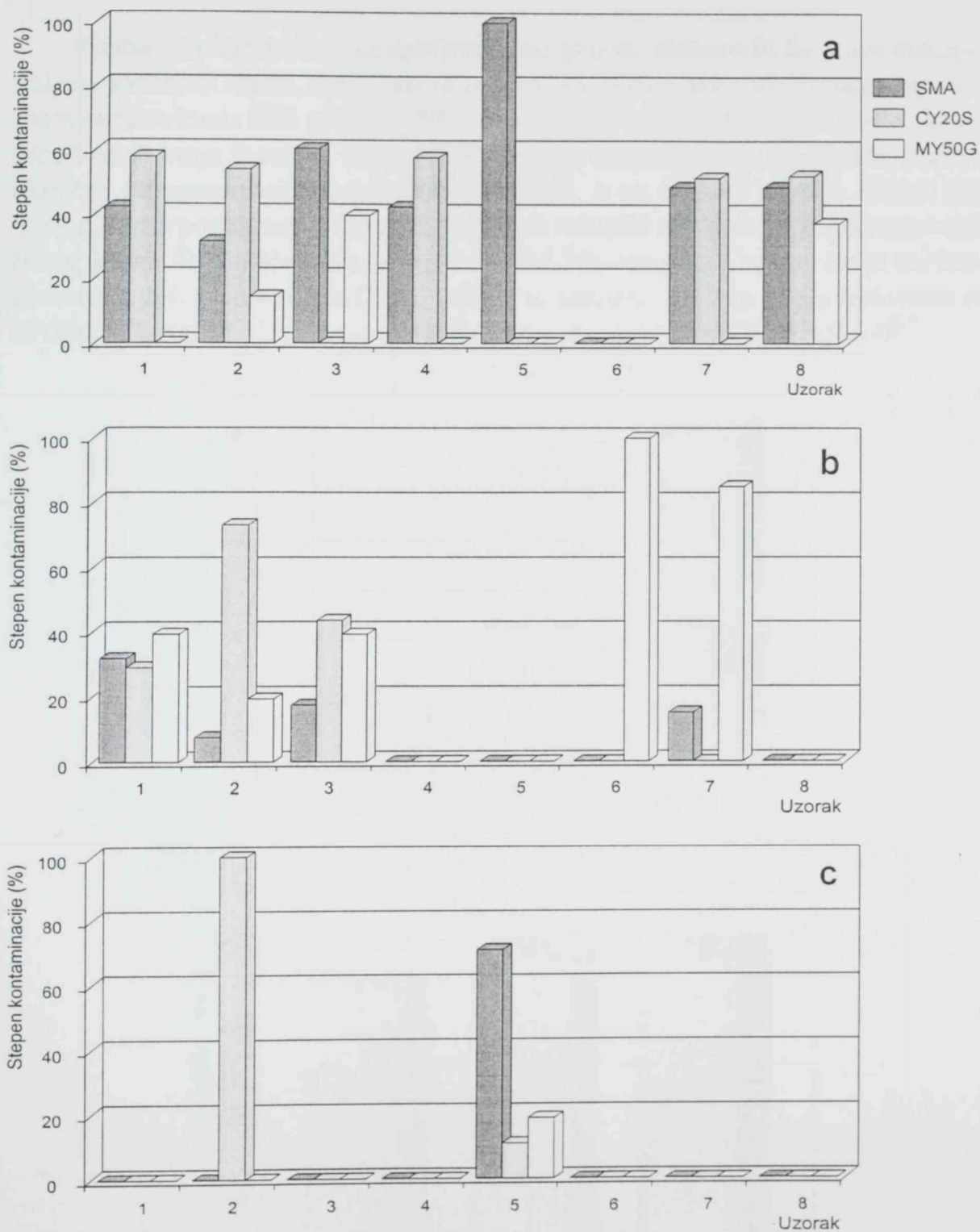
Među kserofilnim plesnima javljaju se brzorastuće i spororastuće forme (Pitt i Hocking, 1985). Brzorastući kserofili, pod optimalnim uslovima, mogu prerasti plesni čiji je rast spor.

5. REZULTATI I DISKUSIJA



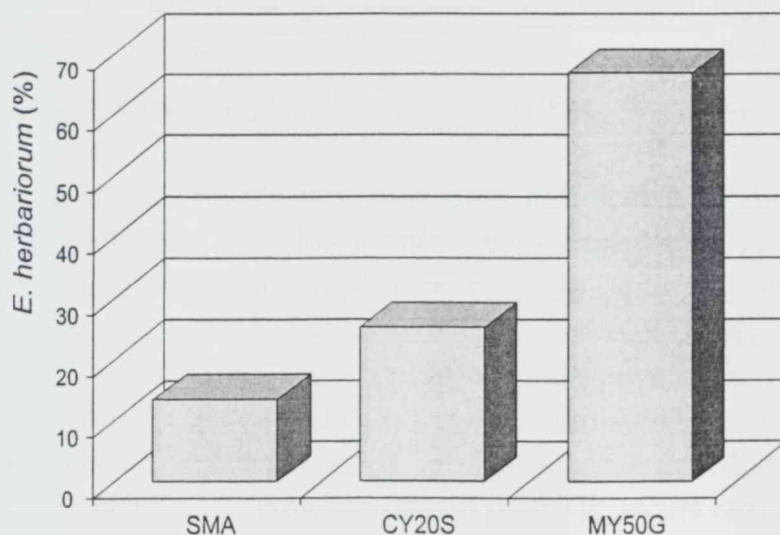
Slika 36. Zastupljenost *Aspergillus* spp. na SMA, CY20S i MY50G (a-zaćinske smeše; b-crni biber; c-zaćinska paprika)

5. REZULTATI I DISKUSIJA

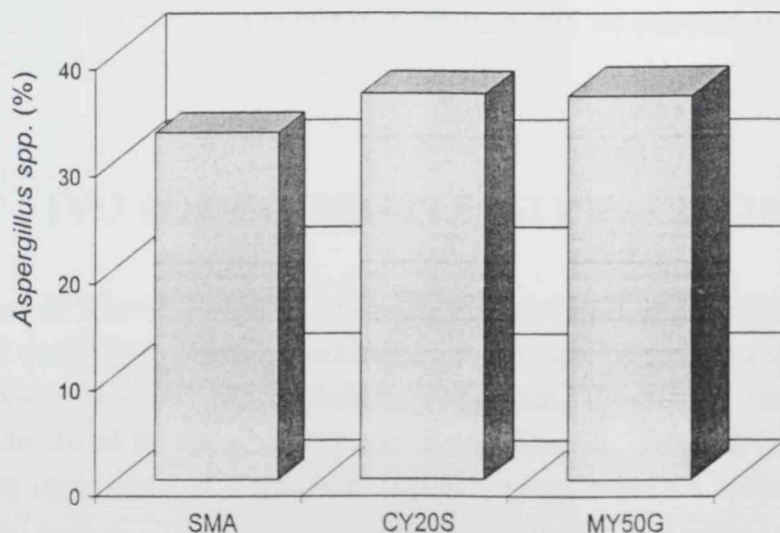


Slika 37. Zastupljenost *Penicillium spp.* na SMA, CY20S i MY50G (a-zaćinske smeše; b-crni biber; c-zaćinska paprika)

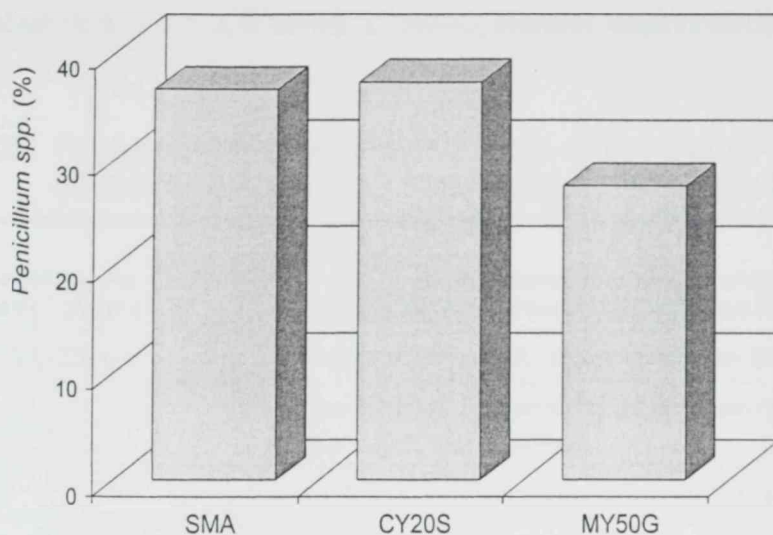
Prema rezultatima koji su dobijeni sumiranjem celokupnih *Eurotium* mikopopulacija začinskih smeša, crnog bibera i začinske paprike (slika 38), podloga koja je u svom sastavu imala 50% glukoze (50G) pokazala se veoma efikasnom za detekciju i određivanje broja *Eurotium* vrsta. Na to ukazuje činjenica da je na CY20S učešće u ukupnoj mikopopulaciji iznosilo svega 23,62%, a na MY50G 64,33%. Porast zastupljenosti na podlogama za kserofile može se tumačiti uticajem a_w , kao i vrste korišćenog šećera. Što se tiče roda *Aspergillus* (slika 39), ove plesni su kao što je već konstatovano, češće uočene na CY20S, ali su u neznatno većem broju izolovane na MY50G. Učestalost plesni roda *Penicillium* bila je najveća na CY20S (slika 40).



Slika 38. Zastupljenost *E. herbariorum* na SMA, CY20S i MY50G



Slika 39. Zastupljenost *Aspergillus spp.* na SMA, CY20S i MY50G



Slika 40. Zastupljenost *Penicillium spp.* na SMA, CY20S i MY50G

Na osnovu dobijenih rezultata tokom ovih mikoloških ispitivanja, može se zaključiti da je za izolovanje i određivanje što realnijeg stepena kontaminacije dehidriranih proizvoda plesnima, neophodno uključiti podloge prilagođene specifičnim zahtevima kserofila. Fiziološke osobine vrsta i ekološki faktori s druge strane, određuju učestalost pojedinih vrsta u ukupnoj mikopopulaciji.

Kserofilne populacije mogu biti ispod granice detekcije kada se kod analiziranja suvih proizvoda, ili proizvoda sa visokim osmotskim pritiskom koriste opšte podloge, koje imaju visoki a_w . Većina kserofilnih plesni iz začina razvijala se na standardnoj SMA podlozi, ali im je optimalni aktivitet vode za rast niži, što je rezultovalo njihovim pojavljivanjem u većem broju na podlogama za kserofile, naročito na MY50G. To znači da SMA ne može biti primenjena za određivanje broja i vrsta plesni iz svih tipova hrane.

5.6. PRISUSTVO TOKSIGENIH PLESNI U ZAČINIMA

Od ukupno 45 identifikovanih vrsta plesni kontaminiranih ispitivanih začina, 55,5% proizvodi različite toksične metabolite sa kancerogenim, mutagenim, teratogenim, hepatotoksičnim i/ili nefrotoksičnim efektom. Prisutni u visokim koncentracijama dovode do akutnih alimentarnih intoksikacija. U tabeli 26 prikazane su toksigene plesni izolovane iz začinskih smeša, crnog bibera i začinske paprike i

njihovi najznačajniji toksini, a u tabeli 27 zastupljenost najfrekventnijih toksigenih vrsta.

Tabela 26. Toksogene plesni izolovane iz začina i njihovi toksini
(Fassatiova, 1984; Frisvad, 1988; Škrinjar, 1990; Singh, 1991)

Vrsta	Toksin
<i>Alternaria alternata</i>	alternarioli, alterotoksin, tenuazoična kiselina
<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoksini, aflatrem, ciklopiazonična kiselina
<i>A. fumigatus</i>	fumigaklavin, fumitoksini, fumitremorgen, gliotoksin, verukulogen
<i>A. niger</i>	malformini, oksalna kiselina, aflatoksini
<i>A. sydowii</i>	strigmatocistin
<i>A. terreus</i>	citreo viridin, citrinin, patulin
<i>A. versicolor</i>	sterigmatocistin
<i>A. candidus</i>	ksantoascin
<i>A. ochraceus</i>	ohratoksini, penicilinska kiselina
<i>A. wentii</i>	ventilanton
<i>Emericella nidulans</i>	sterigmatocistin, nidulotoksin
<i>Eurotium herbariorum</i>	sterigmatocistin
<i>Paecilomyces variotii</i>	patulin
<i>P. niveus</i>	patulin
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	penicilinska kiselina, ohratoksin A, patulin, ciklopiazonična kiselina, penitrem A
<i>P. brevi-compactum</i>	mikofenolna kiselina
<i>P. claviforme</i>	patulin, citrinin
<i>P. griseofulvum</i>	patulin, ciklopiazonična kiselina, grizeofulvin
<i>P. implicatum</i>	citrinin
<i>P. italicum</i>	deoksibrevianamid E
<i>P. rugulosum</i>	rugulozin, patulin
<i>P. variable</i>	rugulozin, ohratoksin A
<i>Rhizopus oryzae</i>	izofumigaklavin A
<i>R. stolonifer</i>	toksični ciklični peptid

Aflatoksigene plesni, *A. flavus* kao primarni proizvođač aflatoksina, uzročnik aflatoksikoza kod eksperimentalnih životinja (Penev i sar., 1986) i *A. niger*, uočene su kod 62,5 uzoraka začina (tabela 27).

Tabela 27. Zastupljenost plesni producenata aflatoksina, ohratoksina i sterigmatocistina u začinima

Začini	Broj uzoraka	Zastupljenost plesni (%)		
		Aflatoksigene	Ohratoksigene	Proizvođači sterigmatocistina
Začinske smeše	24	62,5	41,67	91,67
Crni biber				
Začinska paprika				

Potencijalni producenti ohratoksina A, koji ispoljava slične toksične efekte kao i aflatoksini (Rutqvist i sar., 1978), takođe su bili značajno zastupljeni. Prisustvo vrsta *A. ochraceus*, *P. aurantiogriseum*, *P. notatum* i *P. variable* utvrđeno je kod nešto manjeg broja uzoraka (41,67%).

Sterigmatocistin vrste su bile dominantno prisutne (91,67%), pre svih *E. herbariorum* i predstavnici grupe *A. versicolor* (*A. versicolor* i *A. sydowii*) i *E. nidulans*. Najveći udeo u mikopopulacijama začina koje su ispitivali Škrinjar i Boldocky (1994) imali su upravo proizvođači sterigmatocistina, a bili su po broju vrsta najčešće nađene plesni u proizvodima od mesa, kako su saopštili Hadlok i sar. (1976). Može se zaključiti da je njihova visoka učestalost vezana za nisku vlažnost supstrata.

Treba imati u vidu da se plesni mogu razvijati pod mikroaerofilnim uslovima, neke čak i pod anaerobnim kao *Mucor*, *Rhizopus*, *Paecilomyces*, *A. flavus* (Epstein i sar., 1970; Silliker i sar., 1980), pa se rast micelijuma može uočiti neposredno ispod omotača kobasičarskih proizvoda, kao i na mestima gde je došlo do oštećenja. S druge strane, idealne uslove za razvoj i sintezu toksina toksigene plesni imaju na onim proizvodima koji se oblažu začinima.

5.7. PRISUSTVO TOKSIČNIH METABOLITA PLESNI U ZAČINIMA

Istraživanja su pokazala da u ispitivanim začinima postoje toksični metaboliti plesni (tabela 28).

Tabela 28. Mikotoksini u začinskim smešama, crnom biberu i začinskoj papriki

Začini	Aflatoksin B1 ($\mu\text{g/kg}$)	Ohratoksin A ($\mu\text{g/kg}$)	Zearalenon ($\mu\text{g/kg}$)
<u>Mešavine začina za:</u>			
- mortadelu	-	-	-
- mesni narezak	-	-	-
- srpsku ljutu kobasicu	-	-	-
- tirolsku salamu	-	-	-
- viršlu I	-	-	-
- viršlu II	-	32,00	-
- alpsku salamu	-	tragovi	-
- šunkaricu	-	-	-
<u>Crni biber u zrnu</u>			
- uzorak 1	-	-	288,00
- uzorak 2	-	-	192,00
- uzorak 3	-	-	-
- uzorak 4	-	-	192,00
- uzorak 5	-	-	-
- uzorak 6	-	-	-
- uzorak 7	-	-	-
- uzorak 8	-	-	-
<u>Mlevena začinska paprika</u>			
- uzorak 1	-	-	-
- uzorak 2	-	-	-
- uzorak 3	-	-	-
- uzorak 4	-	-	-
- uzorak 5	-	-	-
- uzorak 6	-	-	-
- uzorak 7	-	-	-
- uzorak 8	-	-	-

AB1 nije konstatovan ni u jednom uzorku začinskih smeša, crnog bibera i začinske paprike (tabela 28), iako je utvrđeno prisustvo aflatoksigenih plesni kod 62,5% uzoraka (tabela 27). Osim pretpostavke da se radilo o sojevima koji nisu genetički sposobni da sintetišu aflatoksine, treba imati u vidu mogući uticaj biotičkog faktora, da neke plesni inhibiraju formiranje toksina.

Paster (1986) je proučavao efekat interakcije između dve *Aspergillus* vrste i jedne iz roda *Fusarium* na rast i sintezu mikotoksina. U poređenju sa 20 µg/ml OA *A. ochraceus* i 5 µg/ml T-2 toksina *F. tricinctum* u monokulturi, kada su ove plesni rasle sa *A. flavus*, proizvedena je samo trećina OA (5 µg/ml) i polovina T-2 toksina (2,5 µg/ml). Kada je *A. ochraceus* rastao sa *F. tricinctum*, nije bilo smanjenja T-2. Detektovane količine AB1 *A. flavus* u monokulturi i u bilo kojoj od kombinacija bile su identične (15 µg/ml). Rast meren kao suva masa micelije bio je sličan u obe sredine (kompetitivnoj i nekompetitivnoj). Sojevi nekih *Fusarium* spp. (*F. solani*, *F. sporotrichioides* i *F. tricinctum*) proizvodili su mnogo manje količine trihotecena kada su gajeni u mešanoj kulturi (Ueno i sar., 1975). Bakterije kojima su začini često kontaminirani u visokom broju, za vreme vegetacije, ili u uslovima neadekvatnog skladištenja, svojim brzim razmnožavanjem takođe usporavaju rast i fiziološku aktivnost plesni.

Na istu pojavu česte kontaminacije aflatoksigenim plesnima, ali ne i aflatoksinom, zapaženu kod bibera i ranije i sumnju da ovaj začini nije dovoljno dobar substrat za produkciju aflatoksina, osvrnuli su se u svojoj studiji Seenappa i Kempton (1980). Da bi to proverili, oni su zrna crnog bibera inokulisali sa *A. parasiticus* i ustanovili da je došlo do sinteze sva četiri aflatoksina. AB1 do nivoa od 60 µg/kg, sa tragovima AB2, AG1 i AG2.

El-Kady i sar. (1995) ispitivali su pojavljivanje mikotoksina u začinima u Egiptu. Tom prilikom od 120 uzoraka začinskih ekstrakata prisustvo aflatoksina (8 do 35 µg/kg) konstatovano je kod 16 uzoraka crnog bibera, anisa, kima, majorana, divlje mirodjije i pimenta. Sterigmatocistin (10 do 23 µg/kg) je utvrđen kod 10 uzoraka crvene paprike, kima i majorana i citrinin (8 do 12 µg/kg) kod dva uzorka kima. OA i zearalenona nije bilo.

Soj *A. flavus* izolovan iz crnog bibera tokom 7 dana u tečnoj podlozi sa kikirikijem (6% mlevenog kikirikija u vodi, w/v) proizveo je 900 µg/g AB2 (Schroeder i Carlton, 1973). Doze od 100, 50 i 25 µg/dan (1,5 dan) bile su letalne za pekinške pačice.

Aflatoksini bi mogli da predstavljaju veliki problem za začine, mesne i slične proizvode, s obzirom da je ustanovljena sinteza AB1 pri a_w 0,85 (Trucsess i sar., 1988; Adebajo i sar., 1994), čak i 0,82 i temperaturi 10°C (Northolt i sar., 1979). *A. flavus*

kojeg su Finoli i sar. (1995) izolovali iz začina i gajili na čiliju, formirao je aflatoksin samo na 28°C i relativnoj vlažnosti 85%, dok je na 20°C i sobnoj relativnoj vlažnosti konstatovan samo micelarni rast.

Mac Donald i Castle (1996) su pokazali da se nivo aflatoksina u začinskom sosu ne smanjuje kuvanjem, niti izlaganjem mikrotalasima. Upotrebom hrane koja sadrži ove toksine, posledice po zdravlje ljudi mogu biti nesagledive, pogotovu što je kod eksperimentalnih životinja dokazano njihovo kumulativno dejstvo.

Od 40 uzoraka raznih začina koje su analizirali Finoli i Ferrari (1994), 30 je sadržavalo aflatoksine. Najveća koncentracija bila je 234,3 µg/kg AB1 u Kajenskoj paprici. Svi uzorci hrane napravljeni sa ovom paprikom sadržavali su aflatoksine, sa najvećom koncentracijom AB1 od 5,5 µg/kg u italijanskoj pasti.

Od 41,67% uzoraka kontaminiranih proizvođačima ohratoksina (tabela 27), OA je pronađen kod dva uzorka začinskih smeša i to u začinskoj smeši za alpsku salamu u trgovima i u jednom uzorku začinske smeše za viršlu (viršla II) u koncentraciji od 32,00 µg/kg (tabela 28). Prema našim zakonskim propisima nivo toksina od 32,00 µg/kg odstupa od maksimalno dozvoljenog limita za OA (10 µg/kg) ("Sl. list SRJ" br. 5, 1992).

Dok je OA u začinskoj smeši za alpsku salamu povezan sa prisustvom *P. aurantiogriseum*, iz uzorka začinske smeše za viršlu nisu izolovane *Aspergillus*, ili *Penicillium* vrste koje bi bile odgovorne za njegovu proizvodnju.

Ominski i sar. (1994) smatraju da je OA u potpunosti toksin skladišta, međutim, skladišne vrste, njegovi potencijalni proizvođači, nisu konstatovane u pomenutom uzorku. Nameće se zaključak da je pojava mikotoksina vezana za ohratoksigene plesni, koje su se u nekoj od začinskih komponenata razvijale pre žetve, ili neposredno nakon nje, a očigledno nisu tipično kserofilne.

Pored negativnog uticaja na rast pilića, funkciju bubrega, delovanje OA očituje se i na imunološki sistem. Prisutan u hrani može dovesti do oštećenja imunokompetentnih organa, vrlo sličnih onima koje izazivaju patogene bakterije i virusi. Mazija i sar. (1982) su dokazali da OA primenjen kratkotrajno i u maloj količini ne izaziva imunosupresivni efekat kod pilića, ali nepovoljno deluje na količinu pasivno stečenih serumneutralizacijskih antitela za virus zaraznog bronhitisa koji su se nakon vakcinacije brzo izlučivali iz organizma. Pilići lišeni pasivne odbrane u prvim nedeljama života tako postaju manje otporni prema uzročniku ove bolesti.

Pored primarno nefrotoksičnog efekta Rupić i sar. (1978) su utvrdili da 5,0 ppm OA izaziva imunosupresivni efekat, dovodeći do smanjenja sadržaja imunoproteina jetre (alfa, beta i gama globulina) u krvnoj plazmi pilića. Istovremeno, količina od 0,5 ppm tokom 56 dana dovela je do povećanja sadržaja ukupnih proteina.

Histološkim analizama Pepeljnjak i Čuljak (1986) su u tkivima bubrega i jetre svinja ustanovili histopatološke promene. U određenom broju takvih uzoraka i krvi, oni su našli rezidue OA, upozoravajući da slične patološke manifestacije bubrežnih oboljenja i jetre kod ljudi mogu biti izazvane prisustvom ovog toksina.

Tokom perioda od aprila 1983. do jula 1984.godine u klanici u Poljskoj registrovana su 122 slučaja sa makroskopskim promenama bubrega kod svinja, tipičnim za mikotoksičnu nefropatiju, s tim što su 52 uzorka bila pozitivna na OA (Golinski i sar., 1985). Od 388 uzoraka seruma, 148 sadržavalo je rezidue ovog toksina od 1 do 520 µg/ml.

Od septembra 1988. do aprila 1989. god. Majerus i sar. (1989) analizirali su 85 uzoraka svinjske krvi iz Trina u Nemačkoj na pojavljivanje OA. Pozitivno je bilo 52% uzorka, sa detektovanim količinama od 0,1 do 17,6 µg/kg. Na osnovu dobijenih mesečnih vrednosti zaključeno je da postoji sezonska zavisnost između koncentracija ohratoksina u serumu i stanja hranjiva.

Poslednjih godina sve češće se diskutuje o primeni adsorbenata za redukciju mikotoksina. Rezultati istraživanja Creppy i sar. (1996) ukazuju na neke od protivotrova koji bi mogli biti efikasni u sprečavanju celularnih oštećenja indukovanih OA. Od strukturalnih analoga i / ili jedinjenja koja imaju visoku moć vezivanja za proteine plazme (A19-aspartam, piroksikam, enzimi SOD-superoksiddizmutaza, katalaza, vitamini, absorbujuće smole-holestiramin, itd.), A19 strukturalni analog OA, po ovim autorima bio bi najpogodniji, a i nema toksične kontraindikacije. Davan pacovima (25 mg/kg telesne težine) u kombinaciji sa OA (289 µg/kg telesne težine) dva dana, A19 je za nekoliko nedelja znatno smanjio nefrotoksičnost i genotoksičnost pomenutog toksina, sprečavajući njegovo vezivanje za proteine plazme. Eksperimenti sa aktivnim ugljem (1; 5 i 10%) u hrani rezultovali su značajnom redukcijom OA u krvi i tkivima svinja unosom samo 5 i 10% koncentracija (Bauer, 1994).

Citogeni efekti hronične ingestije OA (1 µg/kg telesne težine dnevno) kod belih miševa (abnormalnost u mitotičkim i mejotičkim hromozomima, smanjeni broj spermatozoida), značajno su ublaženi dodavanjem vitamina C u koncentracijama ekvivalentnim humanim terapijskim dozama (10 mg/kg telesne težine dnevno) (Bose i Sinha, 1994).

Količine OA koje su Patel i sar. (1996) detektovali u čiliju bile su 1,6 do 50,4 µg/kg, kariju 1,8 do 23,9 µg/kg i đumbiru 2,1 do 7,5 µg/kg. Od ispitivanih mikotoksina (aflatoksin, ohratoksin i zearalenon), Škrinjar i Horvat-Skenderović (1989) su u hloroformskom ekstraktu 5 uzoraka čajne kobasice, od ukupno 31, ustanovile prisustvo OA u koncentraciji od 40,00 µg/kg.

Plesni roda *Fusarium*, koje proizvode zearalenon, tokom mikoloških ispitivanja nisu uočene, ali su mikotoksikološke analize kontaminacije začina ovim mikotoksinom rađene iz dva razloga. Osnovni je taj što *Fusarium* vrste proizvode zearalenon obično pre žetve, a drugi je zakonska regulativa o obaveznoj kontroli na prisustvo zearalenona u ljudskoj hrani, kojom su za sada obuhvaćene samo žitarice.

Zearalenon je utvrđen u 3 uzorka crnog bibera i to u visokim koncentracijama od 192,00 do 288,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Šanse za duže održavanje *Fusarium* vrsta na sušenim proizvodima znatno su ograničene, jer su rast i sinteza mikotoksina vezani za visoku vlažnost supstrata (20% i više) (Bočarov-Stančić, 1996 b) i visoku relativnu vlažnost vazduha, dok raspon temperature može biti mnogo širi. Zbog toga, za razliku od kserofilnih plesni, one su dominantne mikopopulacije na biljkama u vreme vegetacije, ili neposredno posle (Bočarov-Stančić, 1996 a). Na sušenim proizvodima manje su frekventne, relativno brzo gube vitalnost, tako da njihovo nepojavljivanje u začinicima nije bilo neočekivano. Patel i sar. (1996) registrovali su zearalenon u čiliju (4,5 do 15,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i kariju (1,2 do 10,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Brojni članovi roda *Fusarium* pored zearalenona proizvode trihotecene (deoksinivalenol-DON, diacetoksisciprenol-DAS, T-2 toksin, HT-2 toksin, verukarin, itd.), koji se u poslednje vreme sve više proučavaju, zatim zearalenol, moniliformin, fumonizin, fuzaričnu kiselinu, isto tako značajne fuzariotoksine (Ueno i sar., 1975; Muntanjola-Cvetković i sar., 1982; Jacobsen i sar., 1993; Jimenez i sar., 1997). Minimalna a_w potrebna za sintezu toksičnog metabolita fumonizina od strane vrsta *F. moniliforme* i *F. proliferatum* koju su utvrdili Marin i sar. (1995) iznosila je 0,925, pri temperaturama 25 i 30°C. Optimalna proizvodnja zabeležena je pri a_w 0,968. Sojevi ovih vrsta koje su Jimenez i sar. (1997) gajili na kukuruznom supstratu proizvodili su zearalenon u koncentraciji od 5 do 470 $\mu\text{g}/\text{g}$, pored ostalih fuzariotoksina.

Prema izveštajima kod nas i u svetu, zearalenon je jedan od najrasprostranjenijih mikotoksina, naročito u žitaricama, njihovim prerađevinama i stočnoj hrani (Hlubna, 1982; Pepeljnjak i Balzer, 1982; Kordić i sar., 1986; Gleissenthal i sar., 1989; Sugiura i sar., 1993; Bočarov-Stančić, 1996 b).

Poznato je da intoksikacija zearalenonom dovodi do pojave hiperestrogenizma i distrofičnih promena na jetri. S obzirom na ulogu koju jetra ima u sintezi proteina krvne plazme, Lončarević i sar. (1982) su kod prasadi pregledom krvi ustanovili poremećaje u njenoj funkciji. Prasad su poticala od krmača koje su dve nedelje pred partus hranjene kontaminiranom hranom. Funkcionalni poremećaj jetre ogledao se kroz znatan pad koncentracije ukupnih proteina, porast alfa-glo-

bulina i aminokiselina. Pad koloidno-osmotskog pritiska proteina krvnog seruma doveo je do prelaska vode iz krvi u tkiva i pojave edema na reproduktivnim organima i mamarnim kompleksima.

Kod tri od četiri krda goveda u zapadnoj Kanadi Ribble i sar. (1993) zabeležili su pojavu epidemije sindroma urodjene stenozne kičme kod teladi 1987. god. (od 29 do 100%) i tri godine kasnije smrtnost krava (25%), koje su bile gravidne. Telad su imala paralizu zadnjeg dela tela, neka od njih i skraćene prednje udove sa deformacijama i kupolastu glavu. Krave su napadnute alopecijom (ćelavošću). Uzrok ovim bolestima bila je mikotoksikoza, mada najodgovorniji mikotoksini nisu bili izolovani. Na sve četiri farme pre plastenja slama je bila natopljena kišom i pre baliranja nedovoljno prosušena. U balama su u znatnoj količini pronađene plesni rodova *Penicillium* i *Fusarium*.

5.8. BIOSINTEZA OHRATOKSINA A

Neke od potencijalno ohratoksigenih *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta izolovanih iz začina testirano je na sposobnost sinteze OA (tabele 29 i 30).

Od 5 sojeva *A. ochraceus* (tabela 29), vrste koja je primarni proizvođač OA, 4 soja su nakon rasta u tečnoj YES podlozi sintetisala ovaj mikotoksin u količini od 20,00 (B-104) do 340,00 $\mu\text{g/l}$ (B-102). Kod svih kultura registrovano je opadanje pH vrednosti podloge u odnosu na inicijalnu (6,7). Na kraju eksperimenta koji je trajao 14 dana izmerene pH vrednosti kretale su se od 5,0 (B-89) do 6,0 (B-105). Razlike u masi micelijuma bile su neznatne. Ukupan sadržaj suve materije kretao se od 2,4 (B-104) do 2,8 g (B-105). Nije utvrđena korelacija između pH, mase suvog micelijuma i količine proizvedenog toksina. *Paecilomyces spp.*, izolati koje su testirali Hacking i Rosser (1981), proizvodili su mikotoksin patulin (0,5 do 140 $\mu\text{g/ml}$) nezavisno od pH.

Od *Penicillium* vrsta sposobnost sinteze OA ispitana je kod *P. aurantiogriseum* (5 sojeva), *P. chrysogenum* (6 sojeva) i *P. variable* (1 soj). Kao što se iz tabele 30 može videti ni jedan od sojeva nije bio ohratoksin pozitivan, mada su testirane vrste u literaturi opisane kao potencijalno ohratoksigene.

Nakon 14 dana kultivacije pH vrednost kod *P. aurantiogriseum* varirala je od 2,5 (B-112) do 5,8 (B-145). Razlike u aciditetu podloge inokulisane sa *P. chrysogenum* bile su manje izražene. Najniža izmerena vrednost pH iznosila je 4,3 (B-143), a najviša 5,5 (B-144).

Tabela 29. Sinteza OA *Aspergillus ochraceus* u tečnoj YES podlozi

Oznaka	pH	Suva materija (g/100 ml)	OA ($\mu\text{g/l}$)
B-89	5,0	2,7	–
B-102	5,4	2,6	340,00
B-103	5,8	2,7	32,00
B-104	5,7	2,4	20,00
B-105	6,0	2,8	260,00

Tabela 30. Sinteza ohratoksina A *Penicillium spp.* u tečnoj YES podlozi

Vrsta plesni	Soj	pH	Suva materija (g/100 ml)	Ohratoksin A ($\mu\text{g/l}$)
<i>P. aurantiogriseum</i>	B-111	3,0	2,8	–
<i>P. aurantiogriseum</i>	B-112	2,5	3,3	–
<i>P. aurantiogriseum</i>	B-119	4,2	3,6	–
<i>P. aurantiogriseum</i>	S-121	3,8	2,7	–
<i>P. aurantiogriseum</i>	B-145	5,8	1,4	–
<i>P. chrysogenum</i>	B-107	5,0	1,9	–
<i>P. chrysogenum</i>	B-120	4,8	3,3	–
<i>P. chrysogenum</i>	B-122	4,4	3,1	–
<i>P. chrysogenum</i>	B-123	5,4	2,7	–
<i>P. chrysogenum</i>	B-143	4,3	2,5	–
<i>P. chrysogenum</i>	B-144	5,5	1,7	–
<i>P. variable</i>	B-106	5,0	3,4	–

Najveći i najmanji sadržaj suve materije registrovan kod *P. aurantiogriseum* kretao se od 3,6 (B-119) do 1,4 g (B-145). Slični rezultati dobijeni su sa različitim sojevima *P. chrysogenum*, 1,7 (B-144) i 3,3 g (B-120). *P. aurantiogriseum* bio je veoma

zapažena vrsta u sirovinama za proizvodnju čajne kobasice ispitivanim od strane Škrinjar i sar. (1992) i proizvođač OA (38% sojeva) (40,00 do 65,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) na sterilnim pšeničnim zrnima.

Broj ohratoksin pozitivnih izolata *A. ochraceus*, nivoi sintetisanog OA i njegov nalaz u dva uzorka crnog bibera, podaci su koji dovoljno govore o njihovoj potencijalnoj opasnosti po zdravlje ljudi. Osim u slučajevima akutnih trovanja, kod hroničnih bubrežnih oboljenja obično se ne rade analize na OA, jer nema specifičnih kliničkih manifestacija koje bi ukazivale na njegovo prisustvo. Međutim, zbog česte kontaminacije hrane ovim toksičnim jedinjenjem i od strane brojnih mikologa u svetu dokazane nefrotoksičnosti na eksperimentalnim životinjama, prevladava mišljenje da je uloga OA u hroničnim bubrežnim oboljenjima ljudi veća nego što se to misli.

Dipaolo i sar. (1994) opisali su slučaj akutnog pada bubrežne funkcije, indukovane OA *A. ochraceus*, kod supružnika nakon 8 sati rada u ambaru koji je prethodno nekoliko meseci bio zatvoren. Renalna biopsija žene pokazala je lezije akutne tubularne nekroze. Ovo što se desilo navelo je autore da se osvrnu na misterioznu smrt arheologa posle otvaranja egipatskih grobnica, koja je bila sumnjiva, ali nikad dokazana, da bi možda bila izazvana inhalacijom mikotoksina. Stoga, kod radnika koji rade u skladištima začina postoji povećan rizik od mikotoksikoza.

Izlaganjem grupe svinja niskim dozama OA (0,1 ppm) u hrani tokom 90 dana, Lusky i sar. (1993) utvrdili su u bubrezima 0,02% ovog toksina od ukupno absorbovane koncentracije, ali bez histopatoloških promena.

Utvrđeno je da OA prolazi kroz placentu deponujući se u mišićima, plućima i jetri, što može biti jedan od razloga pojave prenatalnih i postnatalnih gubitaka prasad nepoznate etiologije (Rajić i sar., 1986).

Škrinjar (1984) je ispitivala ohratoksigenost sojeva *A. ochraceus* pri čemu je kod 29% ispoljena sposobnost sinteze OA i to u visokim koncentracijama (1280,00 do 5800,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Od 2 soja *A. ochraceus* i 6 sojeva *P. viridicatum* Escher i sar. (1973) su pojavu OA registrovali samo kod *A. ochraceus* (oba soja). Nakon 21 dan rasta na šunki, znatna količina ovog mikotoksina (260,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) utvrđena je u površinskom sloju dubine do 0,5 cm, da bi u sloju do 1,0 cm bili detektovani samo tragovi.

Yamazaki (1971) prema Wells-u i sar. (1975) identifikovao je još jedan toksični metabolit *A. ochraceus*, emodin. Ovaj narandžastocrveni toksin sa tačkom topljenja između 225 i 257°C pronađen je takođe kod *A. wentii*, koji je izolovan tokom ovih ispitivanja iz začina, zatim nekih *Penicillium* i *Cladosporium* vrsta. Letalna doza (LD₅₀) davana oralno jednodnevnim petlicima iznosila je 3,7 mg/kg (Wells i sar., 1975).

5.9. BIOSINTEZA STERIGMATOCISTINA

Imajući u vidu činjenicu da su potencijalni proizvođači sterigmatocistina (ST) imali najveće rasprostranjenje u začinima i najveći udeo u izolovanim mikopopulacijama interesantno je bilo posmatrati koliki je broj od testiranih izolata zaista bio toksigen, tim pre što se radi o mikotoksinu, po strukturi i toksičnim efektima veoma sličnom AB1. Ispitivanja su pokazala da je 90% od ukupno 10 sojeva *A. versicolor* produkovalo ST, prilikom kultivisanja u tečnoj podlozi sa kvašćevim ekstraktom (YES) (tabela 31). Izuzetno visoka koncentracija toksina detektovana je kod *A. versicolor* B-155 (1600,00 µg/l) i B-74 (1400,00 µg/l).

U odnosu na inicijalni pH (6,7) ne može se govoriti o nekim izrazitim promenama u pravcu povećanja aciditeta, ili alkaliteta sredine tokom rasta sojeva *A. versicolor*. Takođe, kao i u slučaju proizvođača OA (*A. ochraceus*) nije bilo značajnijih razlika u masi micelijuma između sojeva u odnosu na koncentracije ST.

Dobijeni rezultati ukazuju na učestalu pojavu ST pozitivnih sojeva *A. versicolor* i slažu se sa podacima koje su objavili Mislivec i sar. (1975). Od 30 testiranih izolata samo je 1 bio negativan, dok je od 60 izolata *A. ochraceus* samo 5 proizvodilo detektabilni OA. Visok toksični potencijal kod sojeva ove vrste (10 od 16 testiranih) potvrdili su i Halls i Ayres (1973). Škrinjar i Ač (1992) su ustanovile ST (40,00 do 1420,00 µg/kg) kod 7 od 9 izolata izdvojenih iz nekih proizvoda od mesa (čajna kobasica, dimljena šunka i slanina) i smeše začina.

Testiranjem *E. herbariorum*, kao što se iz tabele 32 može videti, od 10 sojeva upola manji broj (50%) ispoljio je sposobnost sinteze ST. Za razliku od *A. versicolor* nivoi toksina kretali su se do 400,00 µg/l (S-23 i B-58). Kod soja P-163 pored sjajno žute fluorescentne mrlje ST na hromatogramu pod dugotalasnim UV svetlom uočena je plava fluorescentna mrlja. Zbog sumnje da bi ona po boji i položaju mogla odgovarati aflatoksinu, nakon ponovljenog ogleda i provere HPLC metodom, u ekstrahovanim uzorcima potvrđeno je prisustvo AB1 u koncentraciji 1,26 µg/kg. U dostupnoj literaturi podaci o detekciji aflatoksina kod vrsta roda *Eurotium* nađeni su samo u jednoj publikaciji autora El-Kady i sar. (1994). Od 95 izolata AB1 i AG1 proizveo je samo 1 soj *E. repens* (*E. herbariorum*), *E. chevalieri* i *E. rubrum*. Kod jednog soja *E. repens* bio je detektovan i OA.

Tabela 31. Sinteza sterigmatocistina *Aspergillus versicolor* u tečnoj YES podlozi

Soj	pH	Suva materija (g/100 ml)	Sterigmatocistin ($\mu\text{g/l}$)
S-6	6,7	3,3	200,00
S-11	6,6	3,2	400,00
B-47	6,3	4,3	200,00
B-69	5,9	3,8	-
B-74	6,6	2,6	1400,00
B-109	6,6	2,8	100,00
B-115	7,4	2,0	100,00
B-141	6,8	2,3	100,00
B-153	7,0	2,4	300,00
B-155	6,3	3,4	1600,00

Tabela 32. Sinteza sterigmatocistina *Eurotium herbariorum* u tečnoj YES podlozi

Soj	pH	Suva materija (g/100 ml)	Sterigmatocistin ($\mu\text{g/l}$)
S-22	4,9	4,6	200,00
S-23	4,6	3,9	400,00
S-36	6,4	3,4	-
S-53	6,6	3,8	100,00
B-58	4,9	4,0	400,00
B-147	5,8	4,1	-
B-148	4,9	3,5	-
B-150	4,8	3,8	-
P-162	4,9	3,6	-
P-163	4,8	3,7	150,00

Može se zaključiti da je *E. herbariorum* bio fiziološki aktivniji, jer je aciditet podloge bio niži, a najviše je opao kod soja S-23 (pH 4,6). Ukupan sadržaj suve materije iznosio je od 3,4 (S-36) do 4,6 g (S-22). pH, masa micelijuma i proizvodnja ST određeni nakon 14 dana inkubiranja, nisu pokazivali razliku između mase micelijuma i finalnog pH između toksigenih i netoksigenih sojeva.

5.10. UTICAJ TEMPERATURE NA INAKTIVACIJU KONIDIJA *A. VERSICOLOR* I SINTEZU STERIGMATOCISTINA

Mnoge *Aspergillus* vrste adaptirane su na rast pri znatno višim temperaturama od vrsta roda *Penicillium*, zbog čega su naročito zastupljene u tropskim i subtropskim klimatskim zonama. S toga se može očekivati i veća otpornost njihovih konidija i askospora pri toplotnoj obradi mesnih proizvoda tokom tehnološkog procesa.

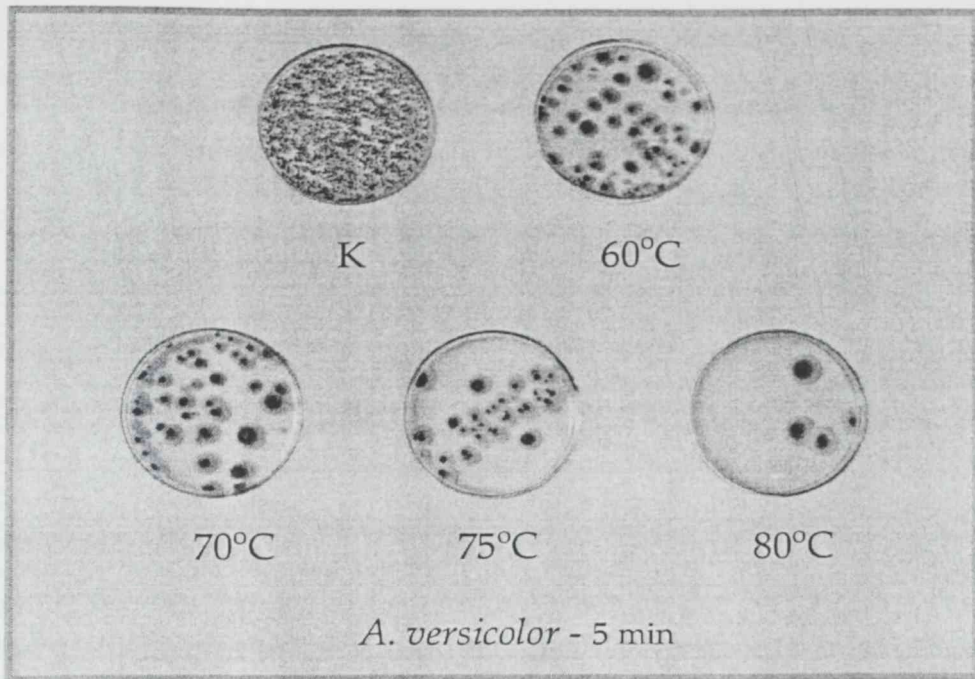
Efekat visokih temperatura na plesni još uvek nije dovoljno ispitan. Za mnoge od njih nema podataka koliki je prag toplotne izdržljivosti, odnosno u kojoj mери su termotolerantne ili termorezistentne.

Za testiranje je odabran soj *A. versicolor* B-155 kod kog je bila utvrđena sposobnost sinteze ST (1600,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Na slikama 41 i 42 po izraslim kolonijama na hranljivoj podlozi vidi se da su konidije *A. versicolor* preživele termički tretman na 60, 70, 75 i 80°C, tokom 5 i 10 minuta.

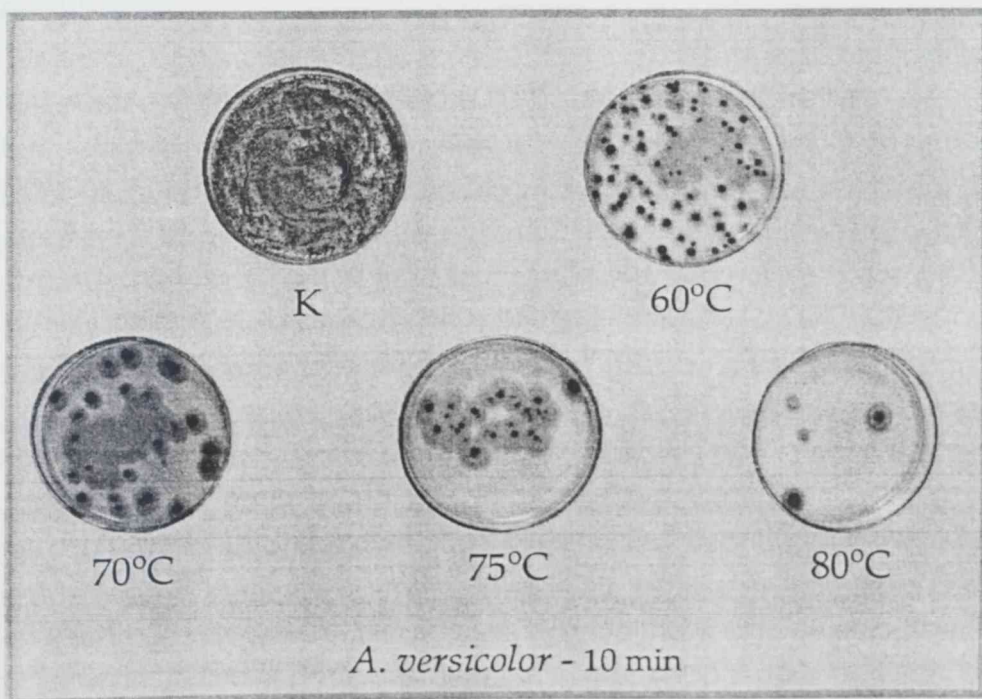
U odnosu na inicijalni broj konidija ($3,8 \times 10^6/\text{ml}$), pri kraćem vremenu izlaganja temperaturi od 60°C broj živih iznosio je $1,4 \times 10^4$ (tabela 33). Na 70 i 75°C kultura se ponašala slično, dok je na 80°C došlo do značajne, ali ne i potpune destrukcije, što se pokazalo i nakon produženog dejstva ovih temperatura. Broj konidija koje su germinirale kretao se od $2,5 \times 10^3$ (60°C) do 25 (80°C).

Prema Northolt i Soentoro (1988), većina plesni je osetljiva na temperature pasterizacije (70 do 80°C), što se na osnovu dobijenih rezultata ne bi moglo reći za *A. versicolor*. Žakula (1980) navodi da značajan broj plesni vlažna toplota od 60°C uništava za 5 do 10 minuta.

Pojava rasta nakon delovanja visokih temperatura (80°C) ukazuje na toplotnu otpornost *A. versicolor* i na mogućnost da pod istim, ili sličnim uslovima, konidije ove vrste u mesnom nadevu prežive zagrevanje u još većem broju, imajući u vidu da u toku barenja polutrajnih kobasica temperatura u unutrašnjosti retko prelazi 70°C.



Slika 41. Rast *A. versicolor* nakon termičkog tretmana od 5 min



Slika 42. Rast *A. versicolor* nakon termičkog tretmana od 10 min

Tabela 33. Broj konidija *Aspergillus versicolor* nakon termičkog tretmana

Temperatura (°C)	Vreme	
	5 min	10 min
Kontrola	$3,8 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$
60	$1,4 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$
70	$7,3 \times 10^2$	$3,3 \times 10^3$
75	$5,2 \times 10^2$	$3,5 \times 10^3$
80	23	25

Plesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* ističu se kao prilično otporne tako da je za njihovo uništavanje potrebna temperatura 90°C u trajanju od 10 minuta (Bem i Adamič, 1991). Nakon pasterizacije i skladištenja 30 dana na oko 28°C, kod 40% voćnih nigerijskih sokova Obeta i Ogwuanyii (1995) konstatovali su prisustvo *P. variotii*, *A. tamarisii*, *A. flavus* i *A. ochraceus*.

Splittstoesser i sar. (1971) su testirali više predstavnika roda *Aspergillus*, čiji je broj preživelih spora nakon termičkog tretmana na 60 i 80°C među vrstama znatno varirao. Najveću otpornost ispoljila je vrsta *A. fisheri*, čiji je broj preživelih spora u grožđanom soku zagrevanom 60 min na 80°C, bio reda veličine 10^5 .

Tokom eksperimenta uočena je veza između temperature, pojave rasta i sporulacije kolonija *A. versicolor*. Dok se rast kod kontrolnog uzorka pojavio u toku prva 24 časa, oporavak konidija tretiranih uzoraka trajao je duže, naročito na najvišim temperaturama. Nakon šoka kolonije su postale vidljive nakon 3 dana (75°C/5 odnosno 10 min i 80°C /5 min) i 4 dana od inokulacije (80°C).

Proteini i lipidi u substratu mogu značajno uticati na toplotnu otpornost spora plesni (konidije, askospore), zbog ispoljavanja zaštitnog efekta, o čemu govore Doyle i Marth (1975), kao i Bem i Adamič (1991). Lacey (1989) je utvrdio rast *A. candidus* nakon testiranja na 50°C, 10 minuta. S obzirom da su mesni proizvodi substrat bogat proteinima i lipidima, kod nekih kobasica, kao što su barene i polutrajne, sa visokim a_w (0,96 do 0,98), mora se obratiti pažnja na primenu adekvatnog toplotnog režima. Preživljavanje konidija *A. niger* zapaženo je sa porastom a_w vrednosti, dok je vrsta *Talaromyces flavus* (klasa *Ascomycetes* poznata po termorezistentnim rodovima) ispoljila svoju termorezistentnost na višim pH vrednostima (Baggerman i Samson, 1988).

S obzirom da se pokazalo da je *A. versicolor* kao mezofilna vrsta (sa maksimumom za rast 39°C, pri a_w 0,87) (Pitt i Hocking, 1985) istovremeno i tolerantna prema temperaturama koje se primenjuju kao postupak konzervisanja u industriji mesa, treba imati u vidu još neke njene ekološke karakteristike. Donja granica rasta je 4 do 5°C (Saez, 1975), što je temperatura skladištenja proizvoda od mesa. Ukoliko konidije prežive temperature pasterizacije, postoji šansa za germinaciju *A. versicolor* u uslovima skladištenja. Kontaminacija unutrašnjosti kobasica termotolerantnim i termorezistentnim plesnima bi mogla biti ozbiljan problem, jer do kvarenja kobasica može doći i ako su faze pre termičke obrade imale propusta. Mogu nastati šupljine, pogodne kao prostor za rast plesni čije spore nisu uništene termičkim tretmanom.

Mada se mnogo govori o antimikrobnim komponentama u mesnom nadevu, ponekad one ne ispoljavaju dejstvo koje se od njih očekuje. Tako Bem i Adamić (1991) navode da začini i prirodni inhibitori u mesu (imunoproteini, lakteni, lizocini, kanalbumin, ovomukoid, ovoidin) nisu dovoljno stabilni, da zbog toga imaju ograničenu praktičnu vrednost i da koncentracije soli koje se koriste u preradi nisu dovoljne da spreče stvaranje mikotoksina. Dimljenjem dolazi do gubitka vode, međutim, za kserofilne plesni nizak a_w ne predstavlja ograničavajući faktor rasta, kao ni produkti dima koji nastaju tokom sagorevanja drveta.

Pojavu kontaminacije omotača dimljenih kobasica sporama plesni *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicilium*, *Stachybotrys* i *Verticillium* Horvat-Skenderović (1989) objašnjava dimljenjem na pokretnim ložištima gde je veoma teško obezbediti ravnomernu koncentraciju dima u svim delovima pušnice. Todorović i sar. (1979) su još ranije ustanovili da postupak dimljenja nema fungistatsko delovanje.

Kiselost mesnih proizvoda (pH) nije dovoljan faktor da spreči razmnožavanje plesni kada se zna da one podnose kiselu sredinu. Opseg tolerancije veoma je širok i iznosi od oko 2,0 do 9,0 (Pitt i Hocking, 1985). Na početku zrenja pH kobasica sa 6,9 snižava se na 5,5 i niže, zbog razgradnje glikogena i stvaranja mlečne kiseline (Žakula, 1980).

U tabeli 34 prikazani su rezultati efekta temperature na rast *A. versicolor* u YES medijumu i produkciju ST. Temperaturni tretmani kroz stepen redukcije broja konidija, odrazili su se i na količinu suve materije. Rast kulture po celoj površini kod kontrolnog uzorka bio je vidljiv petog dana. Kod tretmana na dve najniže temperature površinski rast se pojavio dva dana kasnije, a nakon zagrevanja suspenzije na 75°C 5 min, osmog dana. Kod uzorka tretiranog na 80°C 5 min kultura nije uspeła da za 14 dana sintetiše ST koji bi se mogao detektovati. Ni jedna od primenje-

nih temperatura nije sprečila sintezu ST kod desetominutnog zagrevanja, ali je to uticalo na visinu koncentracije proizvedenog ST (100,00 $\mu\text{g/l}$ na 60°C) (40,00 $\mu\text{g/l}$ na 80°C).

Tabela 34. Sinteza ST *Aspergillus versicolor* nakon termičkog tretmana

Temperatura (°C)	Vreme					
	5 min			10 min		
	pH	SM* (g/100 ml)	ST ($\mu\text{g/l}$)	pH	SM* (g/100 ml)	ST ($\mu\text{g/l}$)
Kontrola	5,4	5,05	360,00	6,5	4,72	280,00
60	5,5	3,52	200,00	6,2	2,97	100,00
70	5,6	2,67	140,00	6,2	3,00	80,00
75	5,9	1,43	100,00	6,2	2,84	50,00
80	6,0	0,67	-	6,3	1,14	40,00

* SM – suva materija

Kasnije pojavljivanje rasta sa povećanjem temperatura proisteklo je iz različitog vremena potrebnog za oporavak konidija od šoka, od kojih su neke sigurno bile reverzibilno oštećene. Ukoliko su efekti temperatura nedovoljni da prouzrokuju smrt, konidije će određeno vreme mirovati, sve dok se ne steknu uslovi koji će pokrenuti njihovo razmnožavanje, što se dešava u gotovim proizvodima. Može se pretpostaviti da je pitanje vremena kada će kulture koje su preživele visoke temperature dostići kontrolni uzorak po rastu i fiziološkoj aktivnosti.

Temperaturni efekat na soj *A. versicolor* ispoljio se preko promene u fiziologiji, koja je rezultovala slabijim porastom pH vrednosti substrata, sa 5,4 kod kontrole, na 6,0 kod kulture poreklom iz konidija tretiranih 5 min na 80°C. U drugom slučaju pH vrednost koja je opala sa 6,5 na 6,2 (60°C), dalje se nije bitno menjala.

Uočena je korelacija između temperature, mase micelijuma i pH vrednosti, što se, mada tako ne izgleda, za ST ne može sa sigurnošću tvrditi, jer prethodni eksperimenti nisu pokazali značajnu vezu između količine suve materije, pH i koncentracije toksina koja bi bila signifikantna. Najpre bi se moglo reći da su narušena fiziološka aktivnost i kasniji oporavak, a ne broj konidija, imali za posledicu smanjenje proizvodnje ST. Karunaratne i Bullerman (1990) testirali su različite inicijalne nivoe inokuluma da bi utvrdili kakav je efekat broja konidija na sintezu af-

latoksina. Veća količina mikotoksina dobijena je sa kulturom *A. flavus* porekla od 10^3 konidija/ml, nego sa kulturama poreklom od viših inicijalnih nivoa inokuluma. Nakon zagrevanja na 70°C 10 min (tabela 33) broj konidija *A. versicolor* bio je nešto veći u odnosu na 60°C , a količina ST nakon 14 dana kultivisanja u tečnoj YES podlozi manja (tabela 34).

Samson (1997) navodi kao ozbiljan problem u higijeni namirnica termorezistentne *Ascomycetes*, koje se citiraju kao česti uzročnici kvarenja još od 1930-te godine, pri čemu naredni koraci u napretku mikologije hrane, svakako treba da budu usmereni ka proučavanju ove specifične grupe plesni, zbog velikih ekonomskih i zdravstvenih šteta koje mogu naneti ljudskoj populaciji.

Samson (1989) citira Liewen i Marth-a (1985) i Tsai i Bullerman-a (1988), koji su utvrdili da i među vrstama roda *Penicillium* ima sojeva koji su termotolerantni (*P. roqueforti*, *P. cyclopium*, *P. viridicatum*, *P. chrustosum*).

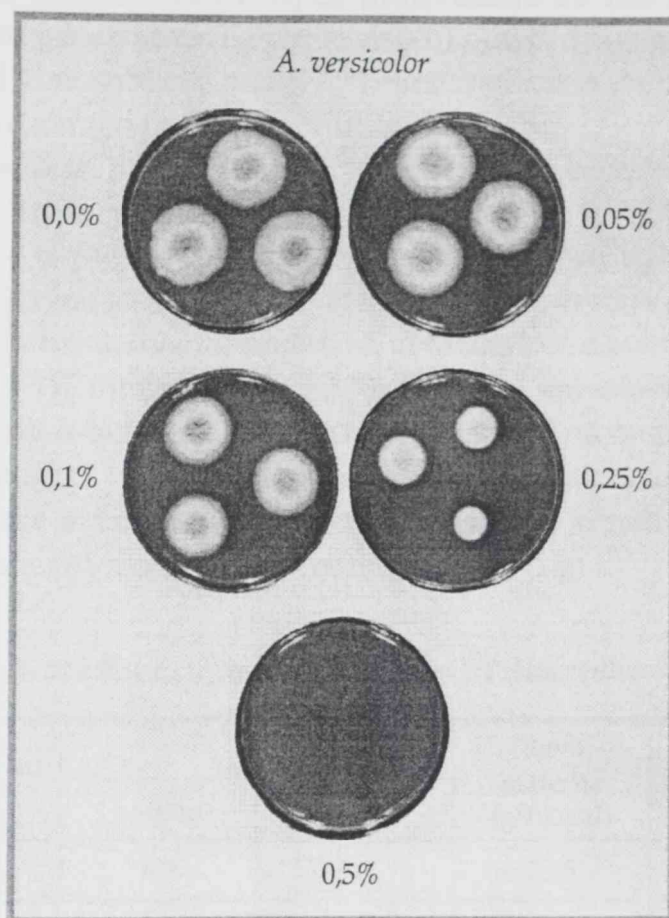
5.11. UTICAJ KALIJUM SORBATA NA RAST *A. VERSICOLOR* I SINTEZU STERIGMATOCISTINA

Kalijum sorbat je čest konzervans u prehrambenoj industriji, zbog veoma dobre rastvorljivosti u vodi, rastvoru kuhinjske soli i šećera. Kao so sorbinske kiseline koristi se i za površinsku zaštitu proizvoda, prvenstveno od kvasaca i plesni. Njegovo fungistatičko-fungicidno dejstvo (0,0; 0,05; 0,1; 0,25 i 0,5%) ispitano na kulturi *A. versicolor* pri temperaturi inkubiranja 25°C , prikazano je na slici 43.

Kao što se vidi, plesan nije izrasla samo na podlozi koja je sadržavala 0,5% kalijum sorbata, dok su pri nižim koncentracijama uočavaju razlike u veličini kolonija i sporulaciji. Kolonije *A. versicolor* koje nisu bile pod uticajem ovog jedinjenja za 7 dana dostigle su dijametar od 2,7 cm (tabela 35). Bela micelija uočena je nakon prvog dana inkubiranja, a sporulacija blede sivkastozelene boje petog dana, da bi sedmog dostigla normalan intenzitet.

Sa povećanjem količine kalijum sorbata zapaža se smanjenje dijametra kolonija od 2,3 (0,05%), na 1,2 cm (0,25%).

Dodatkom kalijum sorbata u koncentracijama od 0,05 i 0,1% rast se pojavio prvog, odnosno drugog dana, a sporulacija šestog dana. Sa 0,25% rast se pojavio trećeg dana. Sedmog dana inkubiranja uočena je jedva vidljiva sporulacija.



Slika 43. Uticaj različitih koncentracija kalijum sorbata na rast *A. versicolor*

Tabela 35. Uticaj kalijum sorbata na rast *Aspergillus versicolor*

Kalijum sorbat (%)	Dijametar kolonija (cm)	Intenzitet sporulacije
Kontrola	2,7	++++
0,05	2,3	+++
0,10	2,0	++
0,25	1,2	+
0,50	-	-

U tečnoj YES podlozi korišćenju za proizvodnju ST rast kulture u uslovima bez kalijum sorbata uočen je prvog dana, sa 0,1 i 0,25% drugog, dok je petog dana rast zapažen i kod koncentracije od 0,5%. Tokom narednih dana sporulacija slabog intenziteta javila se samo na podlozi kontrolnog uzorka.

Inhibitorski efekat na sintezu ST pomoću *A. versicolor* pojačavao se sa povećanjem koncentracije kalijum sorbata. Kao što se iz tabele 36 vidi, sinteza mikotoksina bila je u potpunosti onemogućena u podlozi sa 0,25 i 0,5% kalijum sorbata. U odnosu na inicijalne pH vrednosti, koje su se kretale od 6,7 (kontrola) do 6,8 (0,5% kalijum sorbata), dvanaestog dana veća kiselost izmerena je u podlogama sa dodatkom 0,05 i 1% inhibitora (5,4 i 5,7). Kod dve najveće koncentracije, 0,25 i 0,5% kalijum sorbata usled izrazito nepovoljnog uticaja na metabolizam uočava se tendencija pomeranja pH u suprotnom smeru. Na osnovu rezultata dobijenih merenjem količine suve materije jedino se u podlozi koja je sadržavala 0,5% kalijum sorbata uočava značajnija redukcija micelnog rasta (1,41 g).

Tabela 36. Uticaj kalijum sorbata na aktivnost ST *Aspergillus versicolor*

Kalijum sorbat (%)	pH		Suva materija (g/100 ml)	ST ($\mu\text{g/l}$)
	početni	14 dana		
Kontrola	6,7	5,5	2,26	600,00
0,05	6,7	5,4	1,72	250,00
0,10	6,7	5,7	2,43	200,00
0,25	6,8	6,8	2,77	-
0,50	6,8	7,6	1,44	-

Pokazalo se da je primenom 0,5% kalijum sorbata inhibirana sinteza ST, dok negativni uticaj na germinaciju konidija testiranog *A. versicolor* nije bio isti na čvrstoj i na tečnoj podlozi. To znači da efikasnost kalijum sorbata ne zavisi samo od koncentracije, nego i od nekih drugih faktora, kao što su nutritivni sastav, a_w , temperatura, pH, zatim broj i vrste plesni, vezano za sredinu u kojoj se ispituje njegovo dejstvo.

Ispitivanja koja je Petrović (1993) izvela sa *P. aurantiogriseum* koristeći kalijum sorbat od 0,1 do 1,5% pokazala su da pri koncentracijama iznad 0,25% i na temperaturi inkubiranja od 25°C nije bilo rasta kulture na čvrstoj podlozi. Na 30°C rast

je primećen i pri koncentraciji od 0,5%, ali su kolonije bile atipične, dok se u tečnoj YES podlozi *P. aurantiogriseum* nije pojavio.

Količina kalijum sorbata od 0,2% pri pH 5,5 sprečava razvoj vrste *A. parasiticus*, a pri pH 4,5 dovoljno ga je dodati i u manjoj količini. Za potpuno inhibiranje *A. niger* potrebno je 1000, a za *Penicillium* vrste 400 do 600 ppm kalijum sorbata (Bem i Adamič, 1991).

Leistner i sar. (1975) smatraju da se potapanjem fermentisanih kobasica u 20% rastvor kalijum sorbata pre skladištenja i transporta može sprečiti pojava plesni, a da istovremeno ostatak dnevnog unosa sorbinske kiseline do 3% nije štetan. Prema nalazima Todorović i Škrinjar (1978) u pogonskim uslovima identični rezultati dobijeni su tretiranjem kobasica sa nešto nižom koncentracijom kalijum sorbata (15%).

Škrinjar i sar. (1995) ispitivali su inhibitorni uticaj propionske kiseline i utvrdili da 0,25 i 0,5% ovog konzervansa onemogućava rast *P. urantiogriseum*. Benzojeva kiselina i natrijum benzoat, dodati u količini od 1 g/100 ml u čvrstu hranljivu podlogu, redukovali su micelarni rast i formiranje ohratoksina od strane *A. ochraceus* (El-Shayeb, 1994).

U odnosu na količinu ST (1600 µg/l) kada je proizvodni soj *A. versicolor* prvi put testiran, svaka naredna provera pre novog eksperimenta imala je za rezultat opadanje biosintetske sposobnosti. Rezultati dobijeni kod kontrolnog uzorka za kalijum sorbat (600,00 µg/l) i kontrolnih uzoraka za termičke tretmane (360,00 i 280,00 µg/l) potvrđuju da relativno brzo nakon izolacije, van prirodnih substrata dolazi do promena u fiziološkim osobinama plesni. Kada su Schroeder i Carlton (1973) iz začina izolovali *A. flavus*, soj je prvobitno proizvodio 900 µg/g AB2. Pri ponovnom uzgajanju proizvodnja aflatoksina rapidno je smanjena na 200 µg/g. Kod *Fusarium spp.* Bočarov-Stančić (1996 b) uočila je identičnu pojavu.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata mikoloških i mikotoksikoloških istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Svi uzorci začinskih smeša, crnog bibera i začinske paprike bili su kontaminirani plesnima. Ukupan broj plesni u začinskim smešama kretao se od 5×10^2 do $8,0 \times 10^3$, crnom biberu od 65 do $5,9 \times 10^3$, začinskoj paprici od 10 do $1,1 \times 10^4$ kolonija/g. Procenat kontaminacije bio je najveći kod začinskih smeša (46,13%), zatim crnog bibera (28,95%) i začinske paprike (24,92%).
- Iz začinskih smeša i crnog bibera najčešće su izolovane plesni iz roda *Eurotium*, zatim vrste iz roda *Aspergillus* i *Penicillium*. Plesni iz roda *Eurotium* pripadale su vrsti *Eurotium herbariorum*. Najzastupljenije vrste roda *Aspergillus* kod začinskih smeša i crnog bibera su *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus sydowii* i *Aspergillus flavus*. Najčešće izolovane vrste iz roda *Penicillium* kod začinskih smeša su *Penicillium nigricans* i *Penicillium aurantiogriseum*, a kod crnog bibera *Penicillium chrysogenum* i *Penicillium aurantiogriseum*. U začinskoj paprici dominirali su rodovi *Eurotium* i *Rhizopus*. Najučestalija vrsta iz roda *Eurotium* je *Eurotium herbariorum*, a iz roda *Rhizopus* vrsta *Rhizopus stolonifer*.
- Mikrobiološke podloge koje se koriste za mikološka ispitivanja trebalo bi da odgovaraju osobinama supstrata koji se analizira, kao i osobinama plesni koje se očekuju kao kontaminanti. Podloga MY50G se pokazala veoma dobrom za kvantitativno i kvalitativno određivanje *Eurotium* vrsta. Za većinu vrsta iz roda *As-*

pergillus podloga CY20S i MY50G podjednako su primenljive. Za većinu vrsta iz roda *Penicillium* prednost se može dati podlogama SMA i CY20S.

- U ispitivanim začinima su preovlađivali potencijalni proizvođači različitih toksičnih metabolita. Od najznačajnijih mikotoksina prisustvo aflatoksina B1 nije konstatovano ni u jednom od ispitivanih začina, ohratoksin A utvrđen je kod dva uzorka začinskih smeša, dok su tri uzorka crnog bibera bila kontaminirana zearalenonom.
- Sinteza ohratoksina A utvrđena je kod četiri od pet sojeva *Aspergillus ochraceus*, a ni jedna vrsta iz roda *Penicillium* nije sintetisala ovaj toksin. Većina sojeva *Aspergillus versicolor* 90% i 50% sojeva *Eurotium herbariorum* sintetisali su sterigmatocistin. U istraživanjima nije utvrđena veza između pH, mase micelijuma plesni i količine mikotoksina.
- *Aspergillus versicolor* se pokazao prilično tolerantnim na visoke temperature preživlevši toplotni tretman do 80°C, pri čemu nije bilo značajnih razlika u broju preživelih konidija između vremenskih tretmana od 5 i 10 min. Tokom eksperimenta uočena je veza između temperature, pojave rasta i sporulacije. Kao posledica dejstva temperature dolazi do smanjenja proizvodnje sterigmatocistina.
- Efikasnost nekog sredstva u suzbijanju rasta plesni i proizvodnje mikotoksina ne zavisi samo od primenjene koncentracije i prirodne otpornosti vrsta već i od drugih faktora koji su u interakciji (nutritivni sastav, pH, temperatura, itd). Koncentracija kalijum sorbata od 0,5% u potpunosti je inhibirala rast *Aspergillus versicolor* na CZ agaru, ali ne i u YES podlozi. Pod uticajem 0,25 i 0,5% kalijum sorbata u toku rasta kulture u tečnoj YES podlozi nije detektovan sterigmatocistin.
- Imajući u vidu da se najčešće ne može govoriti o 100% sterilnosti hrane uslovi pod kojima će se ona nalaziti nakon izlaska iz proizvodnje, sve do momenta konzumiranja, mogu pogodovati razmnožavanju plesni.
- Poboljšanjem uslova proizvodnje začina, skladištenja, transporta i stalnom kontrolom usmerenom u pravcu otkrivanja i eliminisanja kancerogenih agenasa biološkog porekla, pre nego što započne tehnološki proces prerade hrane, može se smanjiti rizik od higijenske neispravnosti i efikasnije zaštititi zdravlje ljudi.

7. LITERATURA

1. Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G., Cabanes, F. J. (1994). Mycoflora and Aflatoxin-Producing Strains in Animal Mixed Feeds. *J. Food Protection* 57, 3, 256–258
2. Abdelgawad, K.M., Zohri, A.A. (1993). Fungal Flora and Mycotoxins of six Kinds of Nut Seeds for Human Consumption in Saudi Arabia. *Mycopathologia*. 124, 1, 55–64
3. Adebajo, L. O., Bamgbelu, O. A., Olowu, R. A. (1994). Mould Contamination and the Influence of Water Activity and Temperature on Mycotoxin Production by 2 *Aspergilli* in Melon Seed. *Nahrung-Food* 38, 2, 209–217
4. Adegoke, G. O., Skura, B. J. (1994). Nutritional Profile and Antimicrobial Spectrum of the Spice *Aframomum danielli* K Schum. *Plant Foods for Human Nutrition* 45, 2, 175-182
5. Aganović, N., Beganović, A. H., Hadžihalilović, F., Foršek, Z. (1982). Prilog poznavanju vrsta funga u nekim polutrajnim kobasicama i suhomesnatim proizvodima. *Tehnologija mesa* 5, 130–132
6. Anderson, M. S., Dutton, M. F., Harding, K. (1979). Production and Degradation of Patulin by *Paecilomyces* Species a Common Contaminant of Silage. *J. Sci. Food Agric.* 30, 229–232
7. Babić, Lj., Ožegović, L., Marković, Ž., Adilović. Uticaj zearalenona na histološke promene u prostati štakora. III Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjga LXXXIX, Sarajevo, 61–69, (1989)
8. Bacon, C. W., Sweeney, J. G., Robbins, J. D., Burdick, D. (1973). Production of Penicillic Acid and Ochratoxin A on Poultry Feed by *Aspergillus ochraceus*: Temperature and Moisture Requirements. *Appl. Microbiol.* 26, 2, 155–160
9. Baggerman, W. I., Samson, R. A. (1988). Heat Resistance of Fungal Spores. In: Introduction to Food-Borne Fungi (Samson, R. A., van Reenen-Hoekstra, eds.). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn-Delft, The Netherlands

10. Balzer, I., Bogdanović, C., Pepeljnjak, S. (1978). Rapid Thin Layer Chromatographic Method for Determining Aflatoxin B₁, Ochratoxin A and Zearalenone in Corn. J. Assoc. of Anal. Chem. 61, 584–585
11. Banina, A. (1986). Mutageno delovanje aflatoksina B₁ na sojeve *Streptococcus lactis*. II Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LXXX, Sarajevo, 167–173, (1986)
12. Bauer, J. (1994). Methods of Mycotoxins in Feedstuffs. Monatshefte für Veterinarmedizin 49, 4, 175–181
13. Baumgart, Y. (1981). Lebensmittel-Mikrobiologie. Ein Leitfadens für Technologen. Laboratorium der Fachhochschule Lippe, Lemgo
14. Bem, Z., Adamič, J. (1991). Mikrobiologija mesa i proizvoda od mesa. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad
15. Beuchat, L. R. (1978). Food and Beverage Mycology. AVI Publishing Company Inc, Westport, Connecticut, USA
16. Beuchat, L. R., Hocking, D. A. (1990). Some Considerations when Analyzing Foods for the Presence of Xerophilic Fungi. J. Food Protection, Vol. 53, 11, 984–989
17. Beuchat, L. R., Pitt, J. I. (1990). Influence of Solute, pH and Incubation Temperature on Recovery of Heat-Stressed *Wallemia sebi* Conidia. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2545v2550
18. Bilaj, T.I., Zaharčenko, V.A. (1987). Opređelitelj termofilnih gribov. Naumkova dumka, Akademija nauk Ukrainskoj SSR, Kiev
19. Blinc, M. (1971). *Aspergillus flavus* i aflatoksini. Hrana i ishrana XII, 9–19, 461–466
20. Bočarov-Stančić, A. (1996 a). Učestalost *Fusarium spp.* i njihovih mikotoksina u pšeničnom zrnju. Žito-Hleb '96. Monografija. Proizvodnja i prerada žita i brašna, 131–140
21. Bočarov-Stančić, A. (1996 b). Uticaj ekoloških i drugih faktora na rasprostranjenje plesni i mikotoksina u žitaricama i mogućnost njihove dekontaminacije. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet Novi Sad
22. Bohm, J., Sayed, A. (1994). Investigations on Toxic Effects of Sterigmatocystin in Sheep. Wiener Tierärztliche Monatsschrift 81, 3, 60–64
23. Bose, S., Sinha, S. P. (1994). Modulation of Ochratoxin-Produced Genotoxicity in Mice by Vitamin C. Food and Chemical Toxicology 32, 69, 533–537
24. Breag, G. R., Coward, L. D. G., Nabney, J., Robinson, F. V. (1972). Artificial Drying of Jamaican Pimento. Proc. Conf. of Spices. Prod. Inst., London, 149–157

25. Bullerman, L. B. (1974). Inhibition of Aflatoxin Production by Cinnamon. *J. Food Sci.* 39, 1163–1165
26. Bullerman, L. B. (1976). Examination of Swiss Cheese for Incidence of Mycotoxin Producing Molds. *J. Food Sci.* 41, 26–28
27. Bullerman, L. B. (1981). Public Health Significance of Molds and Mycotoxins. Fermented Dairy Products. *J. of Dairy Sci.* 64, 12, 2439–2452
28. Bullerman, L. B. (1985). Interactive of Temperature and pH on Mycotoxin Production. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 18, 197–200
29. Bullerman L. B., Olivigni, F. J. (1974). Mycotoxin Producing-Potential of Molds Isolated from Cheddar Cheese. *J. Food Sci.* 39, 174, 1166–1168
30. Bullerman, L. B., Lieu, F. Y., Seier, S. A. (1977). Inhibition of Growth and Aflatoxin Production by Cinnamon and Clove Oils, Cinnamic Aldehyde and Eugenol. *J. Food Sci.* 42, 4, 1107–1109
31. Canas, P., Aranda, M. (1996). Decontamination and Inhibition of Patulin-Induced Cytotoxicity. *Environmental Toxicology and Water Quality* 11, 3, 249–253
32. Chaco, S., Jayalekshmy, A., Gopalakrishnan, M., Narayanan, C. S. (1996). Roasting Studies on Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Flavour and Fragrance J.* 11, 5, 305–310
33. Christensen, C. M., Fpanse, H. A., Nelson, G. H., Bates, F., Mirocha, C. J. (1967). Microflora of Black and Red Pepper. *Appl. Microbiol.* 15, 3, 622–626
34. Chulze, S. N., Torres, A. M., Dalcero, A. M., Etcheverr, M. G., Ramirez, M. L., Farnochi, M. C. (1995). *Alternaria* Mycotoxins in Sunflower: Incidence and Distribution of the Toxins in Oil and Meal. *J. Food Protection* 58, 10, 1133–1135
35. Corindarajan, V. S. (1977). Pepper-Chemistry, Technology and Quality Chromation. *CRG Critical Rev.* 6, 115–218
36. Corry, J. E. L. (1978). Relationship of Water Activity of Fungal Growth. In: *Food and Beverage Mycology* (Beuchat, L. R. ed.). AVI publishing Company Inc., Westport, Connecticut, USA
37. Creppy, E. E., Baudrimont, I., Belmadani, A., Betbeder, A. M. (1996). Aspartame *A. restrictus* a Preventive Agent of Chronic Toxic Effects of Ochratoxin A in Experimental Animals. *J. Toxicol.-Toxin Reviews* 15, 3, 207–221
38. Cuppers, H. G. A. M., Oomes, S., Brul, S. (1997). A Model for the Combined Effects of Temperature and Salt Concentration on Growth Rate of Food Spoilage Molds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 10, 3764–3769

39. Cvetnić, Z., Pepeljnjak, S. (1990). Ochratoxigenicity of *Aspergillus ochraceus* Strains from Nephropathic and Non-nephropathic Areas in Yugoslavia. *Mycopathol.* 110, 93–99
40. Davis, N. D., Wagener, R. E., Dalby, D. K., Morgan-Jones, G., Diener, V. L. (1975). Toxigenic Fungi in Food. *Appl. Microbiol.* 30, 1, 159–161
41. Davis, N. D., Diener, U. L. (1978). Mycotoxins. In: Food and Beverage Mycology (Beuchat, L. R., ed.). AVI Publishing Comp. Inc, Westport, Connecticut, USA
42. De Boer, E. (1988). Food Preservatives. In: Introduction to Food-Borne Fungi (Samson, E., van Reenen-Hoekstra, E. S., eds.). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn-Delft, The Netherlands
43. Dipaolo, N., Guarnieri, A., Garosi, G., Sacchi, G., Mangiarotti, A. M., Dipaolo, M. (1994). Inhaled Mycotoxins Lead to Acute-Renal-Failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* 9, S4, 116–120
44. Đuričić, E., Opačić, J. Efekti mikotoksina na hromosome ćelija koštane srži kod miševa. Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga X, Sarajevo, 123–131, (1982)
45. Doyle, M. P., Marth, E. H. (1975). Thermal Inactivation of Conidia from *Aspergillus parasiticus*. I. Effects of Moist Heat, Age of Conidia and Sporulation Medium. *J. Milk and Food Technol.* 38, 11, 678–682
46. Duraković, S. (1991). Prehrambena mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb
47. Duraković, S., Galić, J., Pajnović, P. (1989). Toksični i kancerogeni metaboliti gljiva u namirnicama i krmivima. *Hrana i ishrana* 2, 71–100
48. van Egmond, H. P. (1982). Sterigmatocystin. In: Environmental Carcinogens-Selected Methods of Analysis (Egan H., Stoloff, L., Castegnaro, M., Scott, P. M., O'Neill, I. K., Bartsch, H., eds.), Vol. V Mycotoxins IARC Scientific Publications
49. van Egmond, H. P. (1989). Mycotoxins in Dairy Products. Elsevier Applied Science London and New York
50. van Egmond, H. P. (1991). Methods for Determining Ochratoxin A and Other Nephrotoxic Micotoxins. In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours (Castegnaro, M., Pleština, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I. N., Bartsch, H., eds.). Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC), 57–70
51. van Egmond, H. P., Deyll, W. E., Paulsch, W. E. (1982). Analytical Method 1-Thin-Layer Chromatographic Determination of Sterigmatocystin in Grains. In: Environmental Carcinogens-Selected Method of Analysis (Egan, H., Stoloff, L., Castegnaro, M., Scott, P. M., O'Neill, I. K., Bartsch, H., eds.), Vol. V Mycotoxins IARC Scientific Publication

52. van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A., Wouters, R. B. M. (1991). Naturally Occuring Toxicants in Foodstuffs. 1. Mycotoxins. *Microbiologie et Hygiene Alimentaire* 3, 7, 40–43
53. El-Kady, I., El-Maraghy, S., Abdel-Naser, Z. (1994). Mycotoxin Producing Potential of Some Isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* Groups from Meat Products. *Microbiological Research* 149, 3, 297–307
54. El-Kady, I. A., El-Maraghy, S. M., Mostafa, M. E. (1995). Natural Occurrence of Mycotoxins in Different Spices in Egypt. *Folia Microbiologica* 40, 3, 297–300
55. Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew & Surrey, England
56. El-Shayeb, N. M. A. (1994). Control of Growth and Ochratoxin Production of *Aspergillus ochraceus* by Some Additives. *Indian J. Microbiol.* 34, 1, 59–63
57. Epstein, E., Steinberg, M. P., Nelson, A. I., Wei, L. S. (1970). Aflatoxin Production Affected by Environmental Conditions. *J. Food Sci.* 35, 389–391
58. Escher, F. E., Koehler, P. E., Ayres, J. C. (1973). Production of Ochratoxins A and B on Country Cured Ham. *Appl. Microbiol.* 26,1, 27–30
59. Fan, J. J., Chen, J. H. (1999). Inhibition of Aflatoxin-Producing Fungi by Welsh Onion Extracts. *J. Food Protection* 62, 4, 414–417
60. Fassatiava, O. (1986). *Moulds and Filamentous Fungi in Technical Microbiology*. Department of Cryptogamic Botany. Charles University, Prague
61. Fiedler, H. (1973). Schimmelpilzdiagnostik und Mykotoxin Nachweis an Fleischprodukten. *Archiv für Lebensmittel Hygiene* 8, 180–184
62. Finoli, C., Ferrari, M. (1994). Aflatoxins in Spices and Herbs. *Industrie Alimentari* 33, 328, 732–736, 740
63. Finoli, C., Galli, A., Vecchio, A., Villani, A. (1995). Aflatoxin-Producing Strain of *Aspergillus flavus* from Spices. *Industrie Alimentari* 34, 342, 1147–1151
64. Foulter, S. G., Trivedi, A. B., Kitabatake, N. (1994). Detoxification of Citrinin and Ochratoxin-A by Hydrogen Peroxide. *J. Assoc. Off Anal Chem.* 77, 631–637
65. Frazier, W. C., Westhoff, D. C. (1978). *Food Microbiology*. Mc Graw-Hill Book Company, New York
66. Frisvad, J. C. (1988). Fungal Species and Their Specific Production of Mycotoxins. In: *Introduction to Food-Borne Fungi* (Samson, R. A., van Reen-Hoekstra, E. S., eds.). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn-Delft, The Netherlands

67. Fuch, R., Habazin-Novak, V., Radić, B., Peraica, M., Pleština, R. Distribucija ohratoksina A u životinja. II Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LXXX, Sarajevo, 89–92, (1986)
68. Galić, J., Pajnović, P. (1989). Toksični i karcinogeni metaboliti gljiva u namirnicama i krmivima. *Hrana i ishrana* 2, 71–100
69. Garrido, D., Jodral, M., Pozo, R. (1992). Mold Flora and Aflatoxin-Producing Strains of *Aspergillus flavus* in Spices and Herbs. *J. Food Protection* 55, 6, 451–452
70. Gill, C. O., Lowry, P. D., Di Menna, M. E. (1981). A Note on the Identities of Organisms Causing Bleck Spot Spoilage of Meat. *J. Appl. Bacteriol.* 51, 183–187
71. van Gleissenthal, L. J., Dietrich, J., Mätlbauer, E., Schuster, M., Süb, A., Terplan, G. (1989). A survey on the Occurrence of *Fusarium* Mycotoxins in Bavarian Cereals from 1987 Harvest. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 188, 521–526
72. Golinski, P., Hult, H., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Chelkowski, J., Szebiotko, K. (1985). Spontaneous Occurrence of Ochratoxin A Residues in Porcine Kidney and Serum Samples in Poland. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 4, 1014–1015
73. Goto, T. (1990). Mycotoxins: Current Situation. *Food Reviews International* 6, 2, 265–290
74. Gqaleni, N., Smith, J. E., Lacey, J., Gettinby, G. (1997). Effect of Temperature, Water Activity and Incubation Time on Production of Aflatoxin and Cyclopiazonic Acid by an Isolate of *Aspergillus flavus* in Surface Agar Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3, 1048–1053
75. Hacking, A., Rosser, W. R. (1981). Patulin Production by *Paecilomyces* Species from Silage in the United Kingdom. *J. Sci. Food Agric.* 32, 620–623
76. Hadlok, R. (1969). Schimmelpilzkontamination von Fleischerzeugnissen durch Naturbelassene Gewürze. *Fleischw.* 49, 1601–1609
77. Hadlok, R., Toure, B. (1973). Mykologische und Bacteriologische Untersuchungen Entkeimter Gewürze. *Archiv für Lebensmittel Hygiene* 1, 20–25
78. Hadlok, R., Schipper, M. A. A. (1974). Schimmelpilze und Fleisch. Reihe Mucorales. *Fleisch.* 54, 1796–1800
79. Hadlok, R., Samson, R.A., Stolk, A. C., Schipper, M. A. A. (1976). Schimmelpilze und Fleisch: Kontaminationsflora. *Fleischw.* 3, 372–376
80. Halls, N. A., Ayres, J. C. (1973). Potential Production of Sterigmatocystin on Country-Cured Ham. *Appl. Microbiol.* 26, 4, 636–637

81. Hasan, H. A. H., Mahmoud, A. L. E. (1993). Inhibitory Effect of Spice Oils on Lipase and Mycotoxin Production. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 148, 8, 543–548
82. Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S., Kurata, H. (1980). Inhibitory Effects of Spices on Growth and Toxin Production of Toxigenic Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 4, 818–822
83. Hlubna, D. Istraživanja aflatoksina, zearalenona i ohratoksina A na žitaricama i grahu u području endemske nefropatije u Semberiji. Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LX, Sarajevo, 81–85, (1982)
84. Hocking, A. D. (1981). Improved Media for Enumeration of Fungi from Foods. *SCIRO Food Research Q.* 41, 7–11
85. Horie, Y. (1971). Fungi in Spices. *J. Food Hygienic Soc. Japan* 12, 6, 516–519
86. Horie, Y., Yamazaki, M., Miyaki, K., Udagawa, S. (1971). On the Fungal Contents of Spices. *Shokhin Eiseigaku Zasshi* 12, 516–519
87. Horvat-Skenderović, T. (1989). Uticaj ekoloških i drugih faktora na rast mikopopulacija i stvaranje mikotoksina u supstratima od mesa. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
88. Hult, K., Hökby, E., Hägglund, U., Gatenbeck, S., Rutqvist, L., Sellyey, G. (1979). Ochratoxin A in Pig Blood. Method of Analysis and Use as a Tool for Feed Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 5, 772–776
89. Hwang, C. A., Draughon, F. A. (1994). Degradation of Ochratoxin-A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Food Protection* 57, 5, 410–414
90. Ito, H., Chen, H., Bunnak, J. (1994). Aflatoxin Production by Microorganisms of the *Aspergillus flavus* Group in Spices and the Effect of Irradiation. *J. Sci. Food Agric.* 65, 2, 141–142
91. Ivanović, M. (1992). Mikoze biljaka. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nauka, Beograd
92. Jacobsen, B. J., Bowen, K. L., Sheby, R. A., Diener, U. L. (1993). Mycotoxins and Mycotoxicoses. Auburn University, Alabama, ANR-767, 1–15
93. Jimenez, M., Huerta, T., Mateo, R. (1997). Mycotoxin Production by *Fusarium* Species Isolated from Bananas. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2, 364–369
94. Jovičević, B., Milošević, M. (1990). Bolesti semena. Dnevnik, Novi Sad
95. Karakašević, B., Agolli, B., Banič, S., Berger-Jekić, D., Brudnjak, Z. (1989). Mikrobiologija i parazitologija. Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb

96. Karunaratne, A., Bullerman, L. B. (1990). Interactive Effect of Spore Load and Temperature on Aflatoxin Production. *J. Food Protection* 53, 3, 227–229
97. Katušin-Ražem, B., Antolilć, M., Ražem, D., Dvornik, I., Briski, B., Vrabec, A. (1983). Mikrobiološka dekontaminacija začina jonizujućim zračenjem. *Tehnologija mesa* 4, 115–119
98. Keller, N. P., Kantz, N. J., Adams, T. H. (1994). *Aspergillus nidulans* VerA Is Required for Production of the Mycotoxin Sterigmatocystin. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 5, 1444–1450
99. Keller, N. P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T. D. Burow, G. B. (1997). pH Regulation of Sterigmatocystin and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus spp.* *Phytopathology* 87, 6, 643–648
100. Kiermeier, F., Kraus, P. V. (1980). Zum wahrscheinlichen Vorkommen von Sterigmatocystin in Milch und das Verhalten in Käse. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 170, 421–424
101. Klich, M. A., Pitt, J. I. (1988). A Laboratory Guide *Aspergillus* Species and their Teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, Sidney, Australia
102. Kordić, B., Panin, M., Kandić, S., Lončarević, A., Muntanjola-Cvetković, M. (1986). Rezultati višegodišnjeg mikrobiološkog i mikotoksikološkog istraživanja stočne hrane u SR Srbiji. II Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LXXX, Sarajevo, 17–28, (1986)
103. Kovács, F., Vanyi, A. (1993). Circulation of Certain Heavy Metals, Nitrates and Mycotoxins in the Food-Chain. *Magyar Allatorvosok Lapja* 48, 4, 197–201
104. Krispien, K. (1978). Versuche zur Ermittlung der Oberflächenwasseraktivität (a_w -wert) von Schlachttierkörpern und Fleisch und zur Beeinflussung der a_w und pH. Werte der Fleischoberfläche. *Diss Vet. Med. Berlin*
105. Krivobok, S., Siegle-Murandi, F., Steiman, R., Creppy, E. E. (1995). Fungal Flora and Ochratoxin A Production in Various Food and Feed in France. *System. Appl. Microbiol.* 18, 3, 455–459
106. Krogh, P., Hald, B., Gjertsen, P., Myken, F. (1974). Fate of Ochratoxin A and Citrinin During Malting and Brewing Experiments. *Appl. Microbiol.* 28, 31–34
107. Kurata, H., Udagawa, S., Ichinoe, M., Kawasaci, Y., Takada, M., Tazawa, M., Kozumi, A., Tanabe, H. (1968). Studies on the Population of Toxigenic Fungi in Foodstuffs, III., Mycoflora of Milled Rice Harvested in 1965. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 9, 23–28
108. Lacey, J. (1989). Pre and Postharvest Ecology of Fungi Causing Spoilage of Foods and Other Stored Products. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 18, 11–25

109. Land, C. J., Lundstrom, H., Werner, S. (1993). Production of Tremorgenic Mycotoxins by Isolates of *Aspergillus fumigatus* from Sawmills in Sweden. *Mycopathol.* 124, 2, 87–93
110. Langseth, W., Stenwig, H., Sogn, L., Mo, E. (1993). Growth of Moulds and Production of Mycotoxins in Wheat During Drying and Storage. *Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science* 43, 1, 32–37
111. Leistner, L., Ayres, J. C. (1968). Molds and Meats. *Fleischw.* 1, 62–65
112. Leistner, L., Maing, I. Y., Bergmann, E. (1975). Verhinderung von Unerwünschtem Schimmelpilzwachstum auf Rohwurst Durch Kaliumsorbat. *Fleischw.* 4, 559–561
113. Leistner, L., Eckardt, C. (1981). Schimmelpilze und Mykotoxine in Fleisch und Fleischerzeugnissen. In: *Mykotoxine in Lebensmitteln* (Reis, J. ed.). Fischer, Stuttgart
114. Lescano, G., Narvaiz, P., Kairiyama, E. (1991). Sterilization of Spices and Vegetable Seasoning by Gamma-Radiation. *Acta Alimentaria* 20, 3-4, 233–242
115. Lončarević, A., Jovanović, J., Šamanc, H., Stankov, Z. (1982). Uticaj zearalenona (F-2) mikotoksina na proteinemiju, frakcije belančevina, aminokiselinski azot i koloidno-osmotski pritisak belančevina krvnog seruma prasadi. Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LX, Sarajevo, 87–100, (1982)
116. Long, K., Ghazai, H. M., Ariff, A., Ampon, K., Bucke, C. (1996). Mycelium-Bound Lipase from a Locally Isolated Strain of *Aspergillus flavus* Link: Pattern and Factors Involved in its Production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 67, 2, 157–163
117. Luca, C. de., Passi, S., Fabbri, A. A., Fanelli, C. (1995). Ergosterol Oxidation may be Considered a Signal for Fungal Growth and Aflatoxin Production in *Aspergillus parasiticus*. *Food Additives and Contaminants* 12, 3, 445–450
118. Lund, F., Filtenborg, O., Frisvad, J. C. (1995). Associated Mycoflora of Cheese. *Food Microbiol.* 12, 2, 173–180
119. Lusky, K., Tesch, D., Gobel, R. (1993). Influence of the Mycotoxin Ochratoxin A on Animal Health and Formation of Residues in Pigs and Different Types of Sausages Derived from These Animals. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 44, 6, 131–134
120. Maaroufi, K., Achour, A., Zakhama, A., Ellouz, F., Elmay, M., Creppy, E. E., Bacha, H. (1996). Human Nephropathy Related to Ochratoxin A in Tunisia. *J. Toxicol.-Toxin Reviews* 15, 3, 223–237
121. Mabrouk, S. S., El-Shayeb, N. M. A. (1980). Inhibition of Aflatoxin Formation by Some Spices. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 171, 5, 344–347
122. Majerus, P., Otteneder, H., Hower, C. (1989). Beitrag zum Vorkommen von Ochratoxin A in Schweineblutserum. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 85, 10, 307–313

123. Marin, S., Sanchis, V., Vinas, I., Canela, R., Magan, N. (1995). Effect of Water Activity and Temperature on Growth and Fumonisin B1 and B2 Production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on Maize Grain. *Letters in Appl. Microbiol.* 21, 5, 298–301
124. Marković, V., Vračar, Lj. (1998). Proizvodnja i prerada paprike. Feljton, Novi Sad
125. Marsh, S. K., Mayers, D. J., Starh, H. M. (1996). Effects of Phosphate Solutions on Aflatoxin Production in a Synthetic Medium and Frankfurters. *J. Food Protection* 59, 6, 626–630
126. Mazija, H., Nemanić, A., Bidjin. Istraživanje imunosupresivnog delovanja ohratoksina A u peradi. Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LX, Sarajevo, 133–140, (1982)
127. Mc Donald, S., Castle, L. (1996). A UK Retail Survey of Aflatoxin in Herbs and Spices and Their Sate During Cooking. *Food Aditives and Contaminants* 13, 1, 121–128
128. Mei-Chin, Y., Wen-Shen, C. (1998). Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by Some Herbs and Spices. *J. Food Protection* 61, 1, 123–125
129. Mills, J. T., Seifert, K. A., Frisvad, J. C., Abramson, D. (1995). Nephrotoxicogenic *Penicillium* Species Occuring on Farm-Stored Cereal-Grains in Western Canada. *Mycopathologia.* 130, 1, 23–28
130. Mislivec, P.B., Tuite, J. (1970). Temperature and Relative Humidity Requirements of Species of *Penicillium* Isolated from Dent Corn Kernels. *Mycologia* 62, 75–88
131. Mislivec, P.B., Dieter, C.T., Bruce, V.R. (1975). Mycotoxin-Producing Potential of Mold flora of Dried Beans. *Appl. Microbiol.* 29, 4, 522–526
132. Misra, N. (1981). Influence of Temperature and Relative Humidity on Fungal Flora of Some Spices in Storage. *Z. Lebensmittel. Unters. Forsch.* 172, 30–31
133. Moleyar, V., Narasimham, P. (1986). Antifungal Activity of Some Essential Oil Components. *Food Microbiol.* 3, 331–336
134. Müller, G. (1983). Mikrobiologie Pflanzlicher Lebensmittel. VEB Fachbuchverlag, Leipzig
135. Munk, M. (1979). Utjecaj aflatoksina na vitamine A i E, te OTC u krmivima. *Hrana i ishrana* XX, 5-6, 215–224
136. Muntanjola-Cvetković, M. (1987). Opšta mikologija. Književne novine, Beograd
137. Muntanjola-Cvetković, M., Borisavljević, J., Kordić, B. Vrste *Fusarium* kod kukuruza i njegovih preradjevina u Jugoslaviji. Simpozijum o mikotoksinima . Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LX, Sarajevo, 29–45, (1982)

138. Niketić-Aleksić, G. (1982). Tehnologija voća i povrća. Dragan Srnić, Šabac
139. Northolt, M. D., van Egmond, H. H., Paulisch, W. E. (1979). Ochratoxin A Production by Some Fungal Species in Relation to Water Activity and Temperature. *J. Food Protection* 42, 6, 485–490
140. Northolt, M. D., van Egmond, H. P., Soentoro, P., Deijll, E. (1980). Fungal Growth and the Presence of Sterigmatocystin in Hard Cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63, 115–119
141. Northolt, M. D., Soentoro, P. S. S. (1988). Fungal Growth on Foodstuffs Related to Mycotoxin Contamination. In: *Introduction to Food-Borne Fungi* (Samson, R. A., van Reenen-Hoekstra, S. eds.). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn-Delft, The Netherlands
142. Obeta, J. A. N., Ogwuanyii, J. O. (1995). Heat-Resistant Fungi in Nigerian Heat-Process Fruit Juices. *Int. J. Food Sci. Technol.* 30, 5, 587–590
143. Oluški, V. (1988). Tehnologija gotovih jela. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad
144. Ominski, K. H., Marquardt, R. R., Sinha, R. N., Abramson, D. (1994). Ecological Aspects of Growth and Mycotoxin Production by Storage Fungi. In: *Mycotoxins in Grain* (Miller, J. D., Trenholm, H. L., eds.). Eagan Press, St Paul, MN
145. Orth, R. (1981). Mykotoxine von Pilzen der Käseherstellung. In: *Mykotoxine in Lebensmitteln* (Reiss, J. ed). Fischer, Stuttgart
146. Palumbo, S. A., Rivenburgh, A. I., Smith, J. C., Kissinger, J. C. (1975). Identification of *Bacillus subtilis* from Sausage Products and Spices. *J. Appl. Bacteriol.* 38, 99–105
147. Panasenko, V. T. (1967). Ecology of Microfungi. *Botan. Rev.* 33, 189–215
148. Pantović, D., Adamović, V. M. (1974). Kontaminacija hrane aflatoksinima i drugim mikotoksinima, *Hrana i ishrana* 1-2, 84–93
149. Paster, N. The Effect of Fungal Interactions on Production of Mycotoxins. Abstract Book. XIV International Congress of Microbiology, Manchester, England, 156, (1986)
150. Patel, S., Hazel, C. M., Winterton, A. G. M., Mortby, E. (1996). Survey of Ethnic Foods for Mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 13, 7, 833–841
151. Penev, G., Penev-Koteva, Lj., Stojanović, D., Spasić, P. Morfološki aspekti eksperimentalne aspergiloze i aflatoksikoze. II Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LXXX, Sarajevo, 175–184, (1986)
152. Pepeljnjak, S., Balzer, I. Pregled mikoloških i mikotoksikoloških istraživanja sa nefropatičnog područja Hrvatske. Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LX, Sarajevo, 75–80, (1982)

153. Pepeljnjak, S., Čuljak, K. Nalaz rezidua ohratoksina A u organima svinja na širem anefropatičnom području SR Hrvatske. II Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LXXX, Sarajevo, 71–76, (1986)
154. Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M. (1985). Ochratoxin A of Cereals in Area of High Incidence of Balkan Endemic Nephropathy in Bulgaria. *Food Additives and Contaminants* 2, 4, 267–270
155. Petrović, A. (1993). Mogućnost inhibicije rasta *Penicillium aurantiogriseum* i sinteze ohratoksina A pod uticajem kalijum sorbata i propionske kiseline. Diplomski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad
156. Pfeiffer, W. (1975). Wie Würzt Man Hoherhitzte Konserven. *Die Fleisherei* 9, 25–27
157. Pidopličko, N. M., Miljko, A. A. (1971). Atlas mukoraljnih gribov. Izdateljstvo "Naukova dumka", Kiev
158. Pitt, J. I. (1975). Xerophilic Fungi and the Spoilage of Foods of Plant Origin. In: *Water Relations of Foods* (Duckworth, R. B., ed.), Academic Press, London
159. Pitt, J. I. (1991). *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*. SCIRO Food Research Laboratory, North Ryde, N. S. W., Australia
160. Pitt, J. I., Hocking, A. D. (1977). Influence of Solute and Hydrogen Ion Concentration on the Water Relations of some Xerophilic Fungi. *J. Gen. Microbiol.* 101, 35–40
161. Pitt, J. I., Hocking, A. D. (1985). *Fungi and Food Spoilage*. CSIRO Division of Food Research, Academic Press, Sidney
162. Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama. "Sl. list SRJ" br. 5, 1992
163. Pravilnik o metodama mikrobioloških analiza i superanaliza životnih namirnica, "Sl. list SFRJ" br. 25, 1980
164. Rajić, I., Mašić, Z., Knežević, N., Obradović, V., Jezdić, R., Matic, G. Intrauterina kontaminacija prasadi ohratoksinom A i njegovo izlučivanje kolostrumom i mlekom krmača. II Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LXXX, Sarajevo, 83–88, (1986)
165. Ramzin, S. K. (1973). Kontaminacija hrane i mere zaštite. *Hrana i ishrana* XIV, 7–8, 313–vv325
166. Raper, K. B., Fennell, D. I. (1965). *The Genus Aspergillus*. Williams & Wilkins Co., Baltimore
167. Rašeta, J. (1981). *Higijena mesa*. Naučna knjiga, Beograd

168. Rede, R., Đajić, R., Svrzić, G. Uticaj prirodnih začina i njihovih ekstrakata i uslova čuvanja na promene masnog tkiva u sušenim-fermentisanim kobasicama. NODA 90, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Zbornik, 139–151, (1990)
169. Refai, M. K., Aziz, N. H., Ekfar, F., Hassan, A. A. (1996). Detection of Ochratoxin Produced by *Aspergillus ochraceus* in Feedstuffs and its Control by Gamma-Radiation. Appl. Radiation and Isotopes 47, 7, 617–621
170. Reise, K. H., Reuter, H., Mügenburg, A. (1973). Würzung von Rohwurst mit Gewürzessenzen. Fleischw. 9, 1178–1182
171. Ribble, C. S., Janzen, E. D., Doige, C. E. (1993). Congenital Spinal Stenosis and Dam Mortality Associated with Feeding Moldy Cereal Straw. Canadian Veterinary Journal Revue Veterinaire Canadienne 34, 4, 221–225
172. Richard, J. L., Tiffany, L. H., Pier, A. C. (1969). Toxigenic Fungi Associated with Stored Corn. Mycopath. Mycol. Appl. 38, 313–326
173. Richard, J. L., Thurston, J. R. (1975). Effect of Aflatoxin on Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* Spores by Rabbit Alveolar Macrophages. Appl. Microbiol. 30, 1, 44–47
174. Robenson, D. J., Jalal, M. A. F. (1991). Tenuazoic Acid Produced by *A. candidus* and *Aternaria alternata* Isolate From *Beta vulgaris*. J. Inorgan. Biochem. 44, 109–116
175. Robin, Y., Chiou, Y. (1997). Estimation of Fungal Infection of Peanut Kernels by Determination of Free Glutamic Acid Content. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3, 1083–1087
176. Rosengarten, F. (1973). The Book of Spices. Piramyd Publ., Moonachie, New Jersey
177. Rupić, V., Liker, B., Mužić, S., Bogdanić, Č., Balzer, I. (1978). Uticaj ohratoksina A na masti i bjelančevine krvne plazme u pilića. Arh. hig. rada 29, 139–145
178. Rutqvist, I., Björklund, N. E., Hult, K., Hökby, E., Carlsson, B. (1978). Ochratoxin A as the Cause of Spontaneous Nephropathy in Fattening Pigs. Appl. Environ. Microbiol. 36, 6, 920–925
179. Saez, H. (1975). La Thermotolerance des *Aspergillus*. Rev. de l'Inst. Pasteur Lyon 8, 35–51
180. Samson, R. A. (1989). Filamentous Fungi in Food in Feed. J. Appl. Bacteriol. 6, 180, 27–35
181. Samson, R. A. Advances in Food and Feed Mycology. Proc. of the World Congress on Food Hygiene, The Hague, The Netherlands, 248, (1997)
182. Samson, R. A., Stolk, A. C., Hadlok, R. (1976). Revision of the Subsection *Fasciculata* of *Penicillium* and Some Allied Species. Studies in Mycology No. II. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn Delft, The Netherlands
183. Samson, R. A., van Reenen-Hoekstra, E. S. (1988). Introduction to Food-Borne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn-Delft, The Netherlands

184. Savić, I., Danon, J. (1982). Začini u preradi mesa, Veterinarski fakultet, Beograd
185. Savić, I., Bem, Z. (1983). Primena začina u industriji mesa. Tehnologija mesa 4, 98–105
186. Savić, I., Milosavljević, Ž. M. (1983). Higijena i tehnologija mesa. Privredni pregled, Beograd
187. Scheuer, R. (1995). Studies on Formation of Verrucosidin on Rohwürst (Untersuchungen zur Bildung von Verrucosidinauf Rohwürst), Kulmbach 34, 127, 66–70
188. Schroeder, H. W., Carlton, W. W. (1973). Notes Accumulation of Only Aflatoxin B2 by Strain of *Aspergillus flavus*. Appl. Microbiol. 25, 1, 146–148
189. Scudamore, K. A. (1993). Mycotoxins in Stored Products-Myth or Menace. International Biodeterioration & Biodegradation 32, 1-3, 191–203
190. Seenappa, M., Kempton, A. G. (1980). *Aspergillus* Growth and Aflatoxin Production on Black Pepper. Mycopathol. 70, 3, 135–137
191. Selim, M. I., Pependorf, W., Ibrahim, M. S., El-Sharkawy, S., El-Syeda, K. (1996). Aflatoxin B1 in Common Egyptian Foods. J. Off. Anal. Chem. 79, 5, 1124–1129
192. Shelef, L. A., Naglik, O. A., Bogen, D. W. (1980). Sensitivity of Some Common Food-Borne Bacteria to the Spices Sage, Rosemary, and Allspice. J. Food Sci. 45, 1042–1044
193. Silliker, J. H., Elliott, R. P., Bairol-Barker, A. C., Bryan, F. L., Christian, J. H. B., Clark, D. S., Olson, J. C., Roberts, Jr T. A. (1980). Microbial Ecology of Foods. Vol. II, Academic Press, New York, London
194. Simon, P. (1996). Ochratoxin and Kidney-Disease in the Human Source. J. Toxicol.-Toxin Reviews 15, 3, 239–249
195. Singh, K., Frisvad, J. C., Thrane, V., Mathur, S. B. (1991). An Illustrated Manual on Identification of some Seed-Borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their Mycotoxins. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Hellerup, Denmark
196. Sirknik, M., Gorišek, M. (1983). Mikroflora mešavina začina. Tehnologija mesa 4, 106–109
197. Sirknik, M., Jamšek, M. (1983). Možnost sterilizacije začimb in mešanic začimb. Tehnologija mesa 4, 110–114
198. Smith, J. E., Berry, D. R., Kristiansen, B. (1983). The Filamentous Fungi. Edward Arnold, London
199. Smith, E. E., Kubena, L. F., Braithwaite, C. E., Harvey, R. B., Phillips, T. D., Reine, A. H. (1992). Toxicological Evaluation of Aflatoxin and Cyclopiazonic Acid in Broiler Chickens. Poultry Sci. 71, 7, 1136–1144

200. Splittstoesser, D. F., Kuss, F. R., Harisson, W., Prest, D. B. (1971). Incidence of Heat-Resistant Molds in Eastern Orchards and Vineyards. *Appl. Microbiol.* 22, 2, 335–337
201. Stefanović, M. (1971). Mikotoksikoze kao poseldica kontaminacije žita, hleba i peciva plesnima. *Hrana i ishrana* 1-2, 37–39
202. Stefanović, M., Vidgaj, F., Antonović, S. (1973). Plesni, kvasnice i alimentarni mikotoksini u humanoj patologiji. *Hrana i ishrana* 7-8, 355–358
203. Stinson, E. E., Bills, D. D., Osman, S. F., Siciliano, J., Ceponis, M. J., Heisler, E. G. (1980). Mycotoxin Production by *Alternaria* Species Grown on Apples, Tomatoes and Blueberries. *J. Agric. Food Chem.* 28, 960–963
204. Stinson, E. E., Osman, S. F., Pfeiffer, P. E. (1982). Structure of Alvertoxin I, a Mycotoxin from *Alternaria*. *J. Org. Chem.* 47, 21, 4110–4113
205. Stojšić, M. (1998). Zanatska prerada mesa, obrada creva i bolesti zoonoze. Beograd, Dragan Srnić, Šabac
206. Sugiura, Y., Fukasaku, K., Tanaka, T., Matsui, T., Ueno, Y. (1993). *Fusarium poe* and *Fusarium crookwellense*, Fungi Responsible for Natural Occurrence of Nivalenol in Hokkaido. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 10, 982–986
207. Surekha, M., Reddy, S. M. (1991). Effect of Spices on Penitrem B Production by *Penicillium aurantiogriseum*. *National Academy Science Letters-India* 39, 1, 7–9
208. Surkiewicz, B. F., Johnston, R. W., Carosella, J. M. (1976). Bacteriological Survey of Frankfurters Produced at Establishments Under Federal Inspection. *J. Milk Food Technol.* 39, 7–9
209. Sušić, M., Sekulić, I., Arc, L. Uticaj izbora začina na kvalitet i održivost sirovih kobasica. *NODA '90.*, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Zbornik, 129–138, (1990)
210. Škrinjar, M. (1980). Mikološka aerozagađenja u nekim mestima SAP Vojvodine sa osvrtom na alergijska oboljenja. *Arhiv bioloških nauka* 32, 1–4, 45–53
211. Škrinjar, M. (1983). Prikaz nekih *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta potencijalnih kontaminata ljudske hrane. *Prehrambeno-tehnološka revija* 21, 1–2, 35–40
212. Škrinjar, M. (1984). Mikopopulacije i mikotoksini sira tipa Edamer. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
213. Škrinjar, M. (1985). *Penicillium verrucosum* Dierckx var. *cyclopium* (Westling) Samson, Stolk & Hadlok: rasprostranjenje u edamskom siru, sposobnost stvaranja ohratoksina A i toksičnost. *Prehrambeno-tehnološka revija* 23, 1–2, 35–38
214. Škrinjar, M. (1986). Rast plesni u edamskom siru za vreme zrenja. *Prehrambeno-tehnološka i biotehnološka revija* 24, 4, 163–167

215. Škrinjar, M. (1990). Stvaranje aflatoksina B1 pomoću plesni iz grupe *Aspergillus flavus-oryzae* i *A. niger*. Prehrambeno tehnološka i biotehnološka revija 28, 1, 29–31
216. Škrinjar, M. (1992). Rasprostranjenje ohratoksigenih plesni i ohratoksina A u mesu i proizvodima. Tehnologija mesa 1, 2–6
217. Škrinjar, M., Horvat-Skenderović, T. (1989). Kontaminacija trajne kobasice plesnima, aflatoksinima, ohratoksinima i zearalenonom. Tehnologija mesa 2, 53–59
218. Škrinjar, M., Ač, M. (1992). Stvaranje strigmatocistina pomoću plesni *Aspergillus versicolor* izolovanih iz trajnih proizvoda od mesa i smeše začina. Tehnologija mesa 6, 311–313
219. Škrinjar, M., Boldocky, K. (1994). Neka iskustva u ispitivanju mikološkog i mikotoksikološkog kvaliteta ustnjenog mesa za proizvodnju trajne kobasice. Tehnologija mesa 4–5, 166–168
220. Škrinjar, M., Vujičić, I., Stubblefield R., Jurčić, V., Stojanović, E., Mašić, Z. Zastupljenost aflatoksina B1 u stočnoj hrani u Vojvodini. III Simpozijum o mikotoksinima. Akademija nauka i umjetnosti BiH. Knjiga LXXXIX, Sarajevo, 119–129, (1989)
221. Škrinjar, M., Stubblefield, R. D., Vujičić, I. F. (1992). Ochratoxigenic Moulds and Ochratoxin A in Forages and Grain Feeds. Acta Veterinaria Hungarica 40, 3, 185–190
222. Škrinjar, M., Danev, M., Dimić, G. (1995). Interactive Effect of Propionic Acid and Temperature on the Growth and Ochratoxin A Production by *Penicillium aurantio-griseum*. Folia Microbiologia 40, 3, 253–256
223. Škrinjar, M., Govedarica, M., Dimić, G., Jarak, M., Milošević, N. (1996 a). Mikrobiologija voća i proizvoda od voća. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad
224. Škrinjar, M., Šarić, M., Dimić, G., Matković, K. (1996 b). Prisustvo gljiva i nekih mikotoksina u pšenici. Žito-Hleb '96. Monografija, 121–130
225. Šutić, M. (1995). Mycotoxins in Food. Mikrobiologija 32, 1, 97–110
226. Šutić, M., Stojanović, M. (1973). Aflatoksini u životnim namirnicama. Hrana i ishrana 1–2, 84–92
227. Šutić, M., Banina, A., Mitić, S., Svilar, N., Pokorni, N. (1986). Aflatoksini B1 i M1 u hranivima i mleku i njihov uticaj na bakterije mlečne kiseline. Savez veterinarara i veterinarskih tehničara Jugoslavije, Zbornik, 230–237
228. Tabata, S., Kamimura, H., Ibe, A., Nashimoto, H., Tamura, Y. (1994). Degradation of Aflatoxins by Food Additives. J. Food Protection 57, 42–47

-
229. Takatori, K., Takahashi, K., Suzuki, T., Udagawa, S., Kurata, H. (1975). Mycological Examination of Salami Sausages in Retail Markets and the Potential Production of Penicillic Acid of their Isolates. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 16, 307–312
230. Takatori, K., Watanaabe, K., Udagawa, S., Kurata, H. (1977). Studies on the Contamination of Fungi and Mycotoxins in Spices. I. Mycoflora of imported Spices and Inhibitory Effects on the Spices on the Growth of some Fungi. *Proc. Jap. Assoc. Mycotoxicol.* 1, 36–38
231. Tansey, M. R., Appleton, J. A. (1975). Inhibition of Fungal Growth by Garlic Extract. *Mycologia.* 67, 409–413
232. Thiessen, F., Scheide, J. (1970). Das Hitzeverhalten von Naturgewürzen und Gewürzessenzen. *Fleischw.* 3, 317–322
233. Thorne, S: (1975). Studies of the Invasion of Carrot Root Parenchyma by *Rhizopus stolonifer* Lind. *J. Sci. Food Agric.* 26, 933–940
234. Thyagaraja, N., Nosoho, A. (1996). Effect of Spice Extract on Fungal Inhibition. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 29, 3, 286–288
235. Todorović, M., Škrinjar, M. (1978). Inhibitorni uticaj kalijum sorbatana razmnožavanje nekih vrsta gljiva izolovanih sa omotača kobasica. Tehnološki fakultet Novi Sad, Zbornik radova 9, 197–208
236. Todorović, M., Oluški, A., Škrinjar, M. (1979). Prilog poznavanju inhibitornog delovanja kalijum sorbata i preparata dima (proizvođač Etol-Celje) na neke vrste plesni izolovane sa površine kobasica. *Tehnologija mesa* 9, 249–251
237. Todorović, M., Josimović, Lj., Gantar, M. Uticaj jonizujućeg zračenja na mikrofloru začina. Kongres mikrobiologa Jugoslavije, Poreč. Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja, 143, (1985)
238. Tronchin, G., Esnault, K., Renier, G., Filmon, R., Chabasse, D., Bouchara, J.P. (1997). Expression and Identification of a Laminin-Binding Protein in *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Infection and Immunity* 65, 1, 9–15
239. Trucksess, M. W., Stoloff, L., Mislivec, P.B. (1988). Effect of Temperature, Water Activity and Other Toxicogenic Mould Species Growth of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Production on Corn, Pinto Beans and Soybeans. *J. Food Protection* 51, 301–363
240. Ueno, Y., Sawano, M., Ishii, K. (1975). Production of Trichothecene Mycotoxins by *Fusarium* Species in Shake Culture. *Appl. Microbiol.* 30, 1, 4–9
241. Ueno, Y. (1987). Mycotoxins. In: *Toxicological Aspects of Food* (Miller, K., ed.). Elsevier Applied Science LTD, England
-

242. Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Teren, J., Kozakiewicz, Z. (1996). Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62,12, 4461–4464
243. Varma, S. K., Verma, R. A. B. (1987). Aflatoxin B1 Production in Orange (*Citrus reticulata*) Juice by Isolates of *Aspergillus flavus* Link. *Mycopathologia* 97, 101–104
244. Vesely, D., Vesela, D., Jelinek, R. (1995). *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx Produces Chaetoglobosin-A Toxic to Embryonic Chickens. *Mycopathologia*. 132, 1, 31–33
245. Vinas, I., Bonet, J., Sanchis, V. (1992). Incidence and Mycotoxin Production by *Alternaria tenuis* in Decayed Apples. *Letters in Appl. Microbiol.* 14, 6, 284–287
246. Vitez, Lj., Blinc, M., Burica, O., Krašovec, B. (1975). Aflatoksini i praćenje aflatoksina u prehrambenim materijalima. *Hrana i ishrana* 7–8, 321–328
247. Watson, D. H. (1984). An Assessment of Food Contamination by Toxic Products of *Alternaria*. *J. Food Protection* 47, 485–488
248. Weidenborner, M., Kunz, B. (1994). Contamination of Different Muesli Components by Fungi. *Mycological Research* 98,5, 583–586
249. Wells, J. M., Cole, R. J., Kirksey, J. W. (1975). Emodin a Toxic Metabolite of *Aspergillus wentii* Isolated from Weevil-Damaged Chestnuts. *Appl. Microbiol.* 30, 1, 26–28
250. Wheeler, K. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I. (1988). Influence of Temperature on the Water Retentions of *Polypaecilum pisce* and *Basipetospora*, Two Halophilic Fungi. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2555–2560
251. Wilson, D. M., King, J. K. (1995). Production of Aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in Pure and Mixed Cultures of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Food Additives and Contaminants* 12, 3, 521–525
252. Žakula, R. (1980). *Mikrobiologija hrane*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad
253. Žakula, R., Škrinjar, M., Epifanić, D. (1982). Nalaz plesni u industrijski proizvedenom testu. *Žito-hleb* 9, 25–31

