

Zakonski (ne)regularni mikotoksini

Milly, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University North / Sveučilište Sjever**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:103575>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)





**Sveučilište
Sjever**

Završni rad br. 62/PREH/2023

Zakonski (ne)regulirani mikotoksini

Katarina Milly, 0113145147

Koprivnica, rujan 2023. godine



Sveučilište Sjever

Odjel za Prehrambenu tehnologiju

Završni rad br. 62/PREH/2023

Zakonski (ne)regulirani mikotoksini

Student

Katarina Milly, 0113145147

Mentor

dr.sc. Marija Kovač Tomas, pred.

Komentor

izv.prof.dr.sc. Bojan Šarkanj

Koprivnica, rujan 2023. godine

Prijava završnog rada

Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL	Odjel za prehrambenu tehnologiju		
STUDIJ	Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija		
PRISTUPNIK	Katarina Mily	MATIČNI BROJ	0113145147
DATUM	13.09.2023.	KOLEGIJ	Kontrola kakvoće i sigurnosti hrane
NASLOV RADA	Zakonski (ne)regulirani mikotoksini		

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Regulated and emerging mycotoxins

MENTOR	dr.sc. Marija Kovač Tomas	OPREMA	pred.
ČLANOVI POVJERENSTVA	1. izv.prof. dr. sc. Krunoslav Hajdek, predsjednik		
	2. dr.sc. Marija Kovač Tomas, pred., mentorica		
	3. izv.prof.dr.sc. Bojan Šarkanj, komentor		
	4. prof. dr. sc. Božo Smoljan, član		
	5. Ivana Dodlek Šarkanj, pred, zamjena člana		

Zadatak završnog rada

BROJ	62/PREH/2023
OPIS	

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti nekih vrsta filamentoznih plijesni te neizbježni prirodni kontaminanti hrane. Zadatak ovog završnog rada je pojašniti termine zakonski reguliranih i nereguliranih mikotoksina, odnosno zakonodavni okvir za pitanje sigurnosti hrane vezan za mikotoksine unutar Republike Hrvatske i Europske unije, opisati karakteristike i toksikološka djelovanja odabranih mikotoksina te vezu njihove pojavnosti i klimatskih uvjeta, navesti neke od metoda sprječavanja i kontrole kontaminacije, kao i najznačajnije metode/tehnike analitičkog određivanja.

ZADATAK ISPUŠEN

13/9/2023.

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE
SJEVER



Sažetak

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni, najčešće rodova *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Claviceps*, a bolesti koje uzrokuju nazivaju se mikotoksikoze. Koncentracija mikotoksina u hrani na razini Europske unije regulira se Uredbom Komisije (EU) 2023/915 o najvećim dopuštenim količinama kontaminanata u hrani, a mikotoksini koji se uređuju tom Uredbom su aflatoksini, okratoksin A, patulin, deoksinivalenol, zearalenon, fumonizini, citrinin te sklerocij i alkaloidi glavice raži. Osim nekolicine mikotoksina koji su zakonski regulirani, otkriveni su i brojni drugi mikotoksini, primjerice sterigmatocistin, emodin, eniatini, beuvericin i moniliformin, no zbog nedovoljne istraženosti njihove najveće dozvoljene količine nisu propisane te su oni zakonski neregulirani. Općenito, da bi se spriječio nastanak mikotoksina potrebna je prevencija i to kroz implementaciju principa dobre poljoprivredne prakse te sustava poput HACCP-a u proizvodnji hrane, a ako se oni i pojave u uzgoju, u određenoj mjeri moguća je njihova dekontaminacija. Ipak, borba protiv mikotoksina je sve teža jer sve veće klimatske promjene stvaraju idealne uvjete za njihov nastanak, stoga je potrebna njihova stroga kontrola kroz laboratorijska ispitivanja. Danas su za određivanje mikotoksina najpoželjnije metode bazirane na korištenju spregnute tehnike tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LC-MS), uz jednostavnu pripremu uzoraka kao što je razrijedi i mjeri princip.

Ključne riječi: sekundarni metaboliti plijesni, zakonski regulirani i neregulirani mikotoksini, HACCP sustav, klimatske promjene, LC-MS

Summary

Mycotoxins are secondary fungal metabolites, usually produced by *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* and *Claviceps* genera, causing diseases known as mycotoxicosis. Mycotoxin concentration in certain foodstuff within the European Union is regulated by Commission Regulation (EU) 2023/915 on maximum levels of certain contaminants in food, and the regulated mycotoxins are aflatoxins, ochratoxin A, patulin, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, citrinin and sclerotia and alkaloids of rye head. Except for the mentioned ones, there are many more discovered mycotoxins, such as sterigmatocystin, emodin, enniatins, beauvericin and moniliformin, however due to insufficient research, their maximum levels are still not regulated by law. In general, to prevent food contamination by mycotoxins, implementation of Good Agricultural Practice principles and control systems such as HACCP in food raw materials growth and processing are required, but even if mycotoxins occur, at the certain extent their decontamination is possible. Nevertheless, the fight against mycotoxins grows larger by the increasing climate changes that are creating ideal growth conditions for mycotoxigenic fungi and consequently mycotoxin synthesis, demanding strong control through laboratory testing. Nowadays, the most desirable methods for mycotoxin detection are based on the use of liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), with simple sample preparation such as dilute and shoot principle.

Key words: secondary fungal metabolites, regulated and emerging mycotoxins, HACCP, climate changes, LC-MS

Popis korištenih kratica

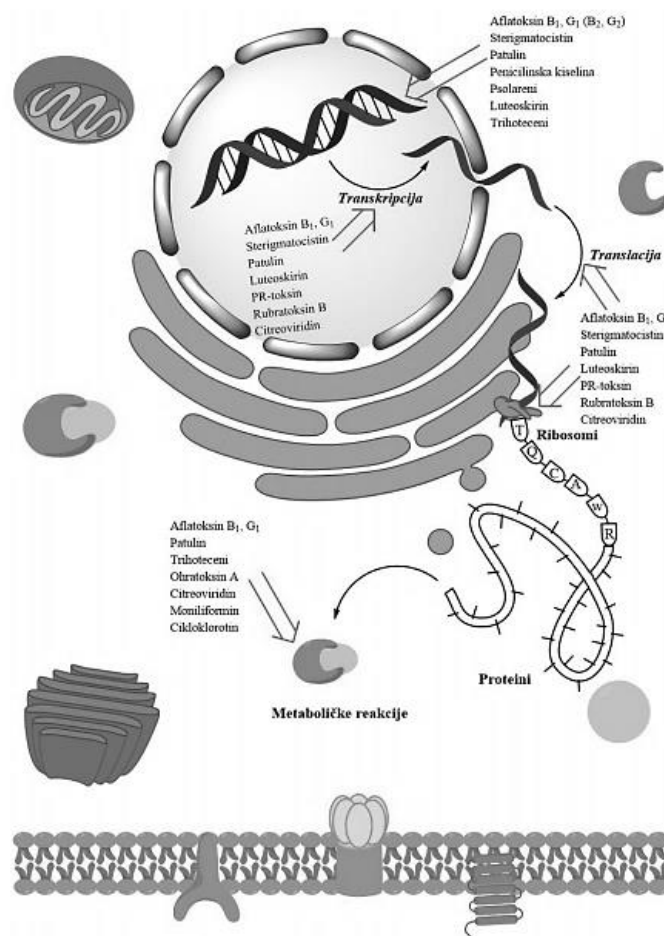
DNK	deoksiribonuleinska kiselina
HACCP	Sustav analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točki, eng. <i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>
RASFF	Sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje, eng. <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
AFB1	aflatoksin B1
AFB1	aflatoksin B2
AFG1	aflatoksin G1
AFG1	aflatoksin G2
AFM1	aflatoksin M1
AFM1	aflatoksin M2
IARC	Međunarodna organizacija za istraživanje raka, eng. <i>International Agency for Cancer Research</i>
OTA	okratoksin A
ZEN	zearalenon
FB1	fumonizin B1
FB2	fumonizin B2
DON	deoksinivalenol
CIT-H1	citinin H1
CIT-H2	citinin H2
STE	sterigmatocistin
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane, eng. <i>The European Food Safety Authority</i>
EMO	emodin
ENN	eniatini
BEA	beauvericin
MON	moniliformin
FAO	Organizacija za prehranu i poljoprivredu, eng. <i>Food and Agriculture Organization</i>
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija, eng. <i>World Health Organization</i>
GAP	Standard dobre poljoprivredne prakse, eng. <i>Good Agricultural Practice</i>
EU	Europska unija
SPE	ekstrakcija na čvrstoj bazi, eng. <i>Solid-Phase Extraction</i>
IAC	imunoafinitetne kolone, eng. <i>Immunoaffinity Columns</i>
TLC	tankoslojna kromatografija, eng. <i>Thin-layer Chromatography</i>
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, eng. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
GC	plinska kromatografija, eng. <i>Gas Chromatography</i>
LC	tekućinska kromatografija, eng. <i>Liquid Chromatography</i>
MS	spektrometrija masa, eng. <i>Mass Spectrometry</i>
ELISA	enzimsko imunokemijska metoda, eng. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
LC-MS	spregnuti sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, eng. <i>Liquid Chromatography-Mass spectrometry</i>

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Zakonski regulirani mikotoksini	3
2.1.	Aflatoksini.....	3
2.2.	Okratoksin A	4
2.3.	Patulin.....	5
2.4.	Zearalenon.....	5
2.5.	Fumonizini	6
2.6.	Deoksinivalenol.....	7
2.7.	Citrinin	8
2.8.	Sklerociji i alkaloidi glavice raži (ergot alaloidi).....	9
3.	Zakonski neregulirani mikotoksini	11
3.1.	Sterigmatocistin.....	11
3.2.	Emodin	12
3.3.	Eniatini	12
3.4.	Beauvericin.....	13
3.5.	Moniliformin	14
4.	Pojavnost, sprječavanje i kontrola kontaminacije.....	16
4.1.	HACCP.....	17
4.2.	GAP.....	17
4.3.	Fizička dekontaminacija.....	18
4.4.	Kemijska dekontaminacija	18
4.5.	Biološka dekontaminacija	19
5.	Metode analize	20
6.	Zaključak.....	22
7.	Literatura.....	23

1. Uvod

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni, najčešće rodova *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Claviceps*, niske molekularne mase koji se značajno razlikuju po strukturi [1]. Sintetiziraju se tijekom rasta plijesni na supstratima biljnog ili životinjskog podrijetla te imaju toksičan učinak na zdravlje ljudi i životinja uzrokujući bolesti zvane mikotoksikoze [2]. Iako su svi mikotoksini produkti plijesni, svi produkti plijesni nisu nužno toksični i klasificirani kao mikotoksini [1]. Neki od učinaka mikotoksina na organizam su oksidacijski stres, oštećenje DNK, apoptoza, blokada staničnog ciklusa, nekroza, peroksidacija lipida, imunosupresija, inhibicija sinteze bjelančevina. Jedan od primjera primarnog mehanizma djelovanja mikotoksina je modifikacija DNK predloška, narušavanje transkripcijskog procesa ili inhibiranje procesa prevođenja u sintezi proteina (Slika 1), a moguća je i izravna reakcija mikotoksina s enzimskom proteinom ili koenzimom. Te reakcije organizma na mikotoksine mogu dovesti do sekundarnih učinaka u smislu modificiranih enzimskih aktivnosti, te samim time i do promjene metaboličke aktivnosti i regulacije u organizmu [2].



Slika 1. Modifikacija DNK, izvor: preuzeto iz [2]

Danas je poznato više stotina različitih mikotoksina od kojih je tek nekolicina detaljnije istražena. Primarno su detektirani u žitaricama, a njihova rasprostranjenost ovisi o brojim fizikalnim, kemijskim i biološkim čimbenicima. Fizikalni čimbenici su okolišni parametri kao što su temperatura, vlažnost, svjetlost, prozračnost ili infestacija insektima. Povišenjem temperature i stupnja vlažnosti ubrzava se pojavnost mikotoksikogenih plijesni i produkcija mikotoksina na poljoprivrednim površinama i u skladišnim proizvodima. U kemijske čimbenike ubrajaju se utjecaj gnojiva, insekticida i fungicida na usjeve na polju ili skladišta. Biološki čimbenik koji utječe na rasprostranjenost mikotoksina je kompeticija s mikroflorom okoline, npr. baterijama ili drugim plijesnima [2].

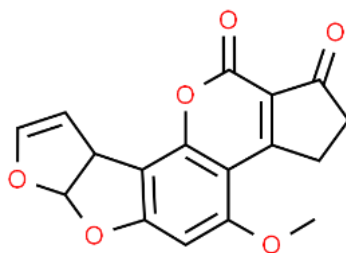
U Republici Hrvatskoj koncentracije mikotoksina u pojedinim sirovinama i proizvodima reguliraju se Zakonom o kontaminantima (NN 39/2013), odnosno Uredbom Komisije (EU) 2023/915 o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. Zakonom o kontaminantima (NN 39/2013) se utvrđuju nadležna tijela, zadaće nadležnih tijela, službene kontrole i načini postupanja te izvještavanja nadležnih tijela i Europske komisije kao i obveze službenih laboratorija i subjekata u poslovanju s hranom, za provedbu EU uredbi vezanih za kontaminante u hrani [3]. Uredba Komisije (EU) 2023/915, među ostalim, u Prilogu I propisuje najveće dopuštene količine kontaminanata u hrani koja se stavlja na tržište [4]. Ovim propisima mikotoksini su navedeni kao kontaminanti koje treba nadzirati i regulirati, uz primjerice implementaciju HACCP-a, prihvaćanje RASFF-a te kontrolama koje provode određena nadležna tijela i laboratoriji, a kako bi se osigurala maksimalna sigurnost u proizvodnji hrane.

2. Zakonski regulirani mikotoksini

Mikotoksini čije su količine u hrani regulirane spomenutom Uredbom Komisije (EU) 2023/915 na razini Europske unije, a samim time i u Republici Hrvatskoj, su aflatoksini (B1, B2, G1, G2 i M1), okratoksin A, patulin, deoksinivalenol, zearalenon, fumonizini (B1 i B2), citrinin te sklorecij i alkaloidi glavice raži (ergot alkaloidi) [4].

2.1. Aflatoksini

Aflatoksini su toksični spojevi koji se u prirodi pojavljuju kao sekundarni metaboliti plijesni *Aspergillus* spp. Najčešći proizvođači su *A. flavus* i *A. parasiticus*, no mogu ih proizvoditi i *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomus* te *A. pseudotamari*. Najznačajniji aflatoksini su aflatoksin B1, B2, G1 i G2 koji su svoju oznaku dobili po boji koju daju pod UV svjetlom. Aflatoksin M1 i M2 su metabolički produkti aflatoksina B1 i B2 koji se najčešće mogu pronaći u mlijeku životinja hranjenih krmivima kontaminiranim aflatoksinima B1 i B2. Topljivi su u lipidima te u krvotok, na mjestu izlaganja, ulaze kroz gastrointestinalni i dišni trakt. Do kontaminacije ljudi aflatoksinima uglavnom dolazi preko proizvoda od životinja kontaminiranih tokom hranjenja (AM1). Sama hrana, odnosno sirovine (žitarice) se kontaminiraju najčešće za vrijeme skladištenja, no može doći i do kontaminacije usjeva na polju. Konzumacija velike količine aflatoksina može dovesti do jakog trovanja, pa čak i smrti kod ljudi i životinja. Primarna meta infekcije su jetra, dok su tragovi aflatoksina detektirani i u bubrezima, plućima, srcu te mozgu. AB1 (Slika 2) je najopasniji mikotoksin s dokazanim slučajevima mutacija i raka jetre kod mnogih životinja [1]. Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je klasificirala AB1 u grupu 1, kao kancerogen za ljude [5].

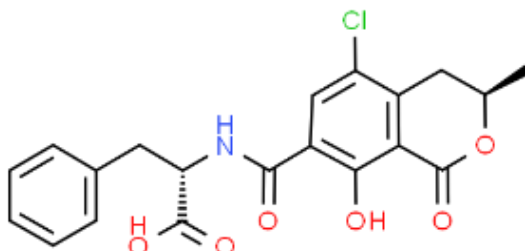


Slika 2. Struktura aflatoksina B1, izvor: <http://www.chemspider.com/>

Aflatoksini su termalno stabilni spojevi koji se ne raspadaju kada su tretirani toplinom kod pripreme hrane, a ta termalna stabilnost uvjetovana je sa pH i vlažnosti smjese u kojoj se spoj nalazi. Iz tog je razloga prženje predloženo kao alternativa kod pripreme hrane sa prisustvom aflatoksina. Fermentacijski procesi, pasterizacija i kuhanje ne utječu na stabilnost AM1 u siru i mliječnim proizvodima. Aflatoksini se mogu uništiti kiselom ili alkalnom hidrolizom ili djelovanjem oksidativnih sredstava [1].

2.2. Okratoksin A

Okratoksinini, uključujući okratoksin A (Slika 3), okratoksin B i okratoksin C, su mala skupina mikotoksina koje proizvode *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. Okratoksin B i C se u prirodi rijetko pojavljuju te se ne smatraju štetnim za ljude [1].



Slika 3. Struktura okratoksina A, izvor: <http://www.chemspider.com/>

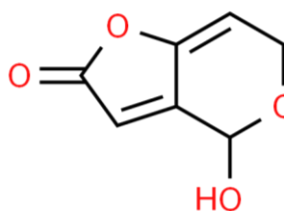
Okratoksin A (OTA) se smatra najtoksičnijim pripadnikom grupe te se njega u prirodi nalazi najviše. Ima malu molekulska masu te je sekundarni metabolit plijesni roda *Penicillium*, najčešće *P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. olson*, *P. brevicompactum*, *P. crustose*, *P. chrysogenum* i *P. oxalicum*, te plijesni roda *Aspergillus* poput *A. ochraceus*, *A. steynii*, *A. carbonarius*, *A. alliaceus* i *A. westerdijkiae*. OTA se može detektirati kod velike količine sirovih i prerađenih sirovina za proizvodnju hrane. Najčešće su to žitarice, kava, kakao, razni orašasti plodovi, vino, sušeno voće, meso i mesni proizvodi, jaja, mlijeko i razni začini, a pronađena je i kod zrna kave u svim koracima procesa prerade, od berbe do konzumacije. U Europi se OTA najčešće pronalazi u vinu i žitaricama. Budući da se OTA može razgraditi raznim tehnikama prerade, sirovine često prije prerade sadrže veću količinu OTA nego nakon prerade [1].

OTA najčešće napada bubrege, nefrotoksičan je kod svih životinja. Ima velik afinitet za krvne albumine i proteine tako da tijekom konzumacije OTA ti proteini služe za akumulaciju toksina u organima. Ta akumulacija u koncu rezultira kontaminiranim sirovinama poput jaja i mlijeka. Smatra se da uzrokuje poteškoće u razvoju fetusa, supresorom imuniteta te da uzrokuje oštećenja na DNK genotoksičnošću [1]. IARC je OTA-u svrstala u grupu 2B, kao mogući karcinogen za ljude [5].

OTA je relativno termalno stabilna molekula, a ta stabilnost ovisi o pH, temperaturi, vlažnosti, vremenu tretiranja te prisutnosti antioksidansa u smjesi. Kod žitarica se već u procesima prerade, čišćenja, mljevenja, fermentiranja ili sušenja uklanja velika količina OTA-e jer da se u njima najčešće uklanja ljuska žitarice u kojoj se nalazi većina toksina i plijesni koje ih proizvode [1].

2.3. Patulin

Patulin (Slika 4) je poliketid i sekundarni metabolit plijesni roda *Aspergillus*, *Bysochlamys*, *Penicillium*, *Eupenicillium* i *Peacylomyces*. U početku je bio opisan kao aktivan antimikrobni spoj zbog svoje jake antimikrobne aktivnosti protiv gram pozitivnih i gram negativnim bakterija poput *Mycobacterium tuberculosis*. Veći broj istraživanja rezultiralo je potvrdom toksičnosti, imunotoksičnosti i mutagenosti patulina, pa je odlučeno, uzevši u obzir da je antimikrobni utjecaj patulina toksičan za ljude i životinje, zabraniti njegovu upotreba u proizvodnji antibiotika [1].



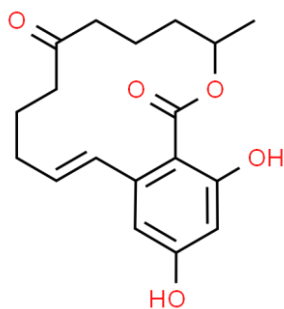
Slika 4. Struktura patulina, izvor: <http://www.chemspider.com/>

Patulin je najčešće detektiran u jabukama i proizvodima od jabuka, no njegova pojavnost je zabilježena i u drugom voću. Isto tako, pronađen je i kod određenih žitarica, poput pšenice, ječma, kukuruza, riže, zobi, kikirikija i mahunarki. Neočekivana prisutnost patulina bila je kod dječje hrane, mlijeka, sira, morskih plodova, mesa te povrća. Njegova toksičnost istražena je na životinjama, no postoji jako malo podataka o njegovoj kroničnoj toksičnosti. Zna se da najviše utječe na bubrege, jetru, imunološki te probavni sustav [1]. IARC je kategorizirala patulin u grupu 3 kancerogena, što označava da nije kancerogen za ljude [5].

Patulin je relativno termički stabilan spoj, što znači da se teško može uništiti pasterizacijom, a to označava velik problem u proizvodnji različitih proizvoda od jabuka. Zbog topivosti molekule u vodi, pranje sirovine pod visokim tlakom je dalo pozitivne rezultate u istraživanjima, kao i obrada soka od jabuke visokim hidrostatskim tlakom, tretiranje sumpornim dioksidom te pročišćivanje i filtriranje granuliranim aktivnim ugljenom [1].

2.4. Zearalenon

Zearalenon (Slika 5) je toksični produkt plijesni *Fusarium* spp. poput *F. graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. verticillioides*, *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti* te *F. semitectum*. Zearalenon djeluje kao estrogen te uzrokuje poteškoće u reproduktivnim sustavima domaćih životinja (najviše ovce i svinje) i hiper-estrogenski sindrom kod ljudi ovisno o količini (koncentraciji) i vremenu izloženosti [1].



Slika 5. Struktura zearalenona, izvor: <http://www.chemspider.com/>

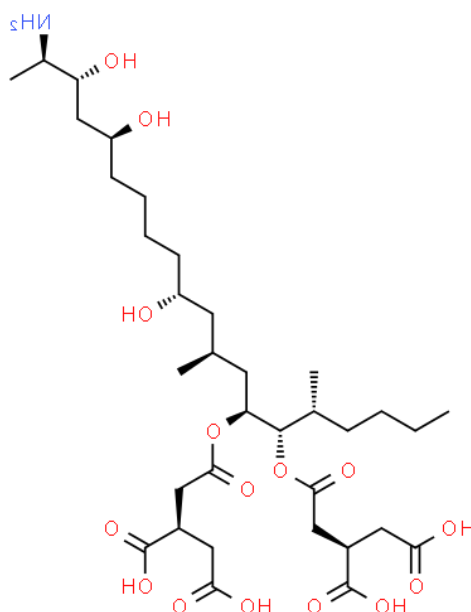
Zearalenon se u svijetu najčešće detektira kod žitarica poput kukuruza, ječma, pšenice i riže, no moguća je i detekcija kod određenih mahunarki. Zanimljivo je kako je velika koncentracija zearaleona bila pronađena i kod indijskih banana. Kod hranidbe stoke zearalenon se iz žitarica izlučuje u mlijeko i kontaminira ga. Najčešće se u procesiranom mesu ne detektira jer uvjeti rasta plijesni i nastanka toksina nisu povoljni, no u slučaju kada se zearalenon nađe u peradi, kontaminira i meso i jaja i to samo kada je u pitanju bila hranidba duže vrijeme sa hranom koja sadrži velike koncentracije zearalenona [1].

Zearalenon je glavna prijetnja za zdravlje ljudi i životinja sa svojim estrogenskim učincima. Izloženost hrani kontaminiranoj zearalenonom pokazala se štetnom za ljudski reproduktivni sustav uzrokujući promjene na reproduktivnim organima, a u ekstremnim slučajevima dolazi i do pojave raka vrata maternice u žena. Za fetus čovjeka opasnost se javlja u obliku apoptoze, jake embrijske toksičnosti i oksidacijskog stresa na embriotske matične stanice [1]. IARC je zearalenon kategorizirala u grupa 3 kancerogena, što daje do znanja da se on ne smatra kancerogenim za ljude [5].

Zearalenon je termalno stabilan, te se razgradnja detektira uglavnom tek na temperaturama od 200°C, dok je kod kukuruza dovoljna obrada sirovine na temperaturama 110-140°C da bi se koncentracija zearalenona smanjila za čak 50%. No, još se provode mnoga istraživanja da bi se pronašao najefektivniji način procesiranja hrane da bi se maksimalno smanjila koncentracija zearalenona [1].

2.5. Fumonizini

Fumonizini su sekundarni metaboliti plijesni *Fusarium* spp., u većini slučajeva *F. proliferatum* i *F. verticillioides*, no mogu ga producirati i *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. anthophilum* i *F. dlamini*. Identificirano je više od 15 vrsta analoga fumonizina koji se dijele u 5 kategorija, A, B, C, P i H, s obzirom na njihovu kemijsku strukturu. Fumonizini su polarni spojevi koji u svojoj strukturi sadrže metil- i amino- skupine. Najbrojniji su fumonizini grupe B (FB1, FB2, FB3 i FB4), od kojih je najvažniji i najtoksičniji FB1 (Slika 6) [1].



Slika 6. Struktura fumonizina B1, izvor: <http://www.chemspider.com/>

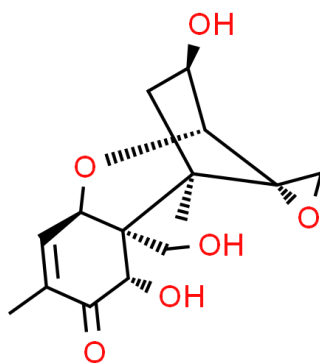
Fumonizini se najčešće pronalaze u žitaricama, ponajviše kukuruzu, ali i kod riže, pšenice, ječma i zobi. FB1 je čak detektiran i kod češnjaka, šparoga, piva, suhih šljiva i mlijeka [1].

Izloženost FB1 uzrokuje akutne i kronične simptome toksičnosti kod kontaminiranih životinja. Organi koje fumonizini napadaju su jetra, bubrezi i crijeva, no sam utjecaj ovisi o vrsti fumonizina. Kod životinja, izvor fumonizina je često pljesnivo krmivo koje je često, uz mnoge bolesti, i uzrok smrti. Kronična toksičnost FB1 se pokazala kancerogenom kod ljudi i životinja [1]. IARC je fumonizine kategorizirala u grupu 2B, što označava da su mogući kancerogeni za čovjeka [5].

Fumonizini su relativno termalno stabilni spojevi koji se razgrađuju na temperaturama 150-200°C tijekom procesa pripreme hrane, poput prženja i pečenja. Kod proizvodnje u industriji do razgradnje dolazi i pomoću miješanja sa drugim tvarima koje utječu na samu strukturu te time neutraliziraju fumonizine. Fermentacija i zagrijavanje u proizvodnji piva ne utječe na koncentraciju FB1 [1].

2.6. Deoksinivalenol

Deoksinivalenol (Slika 7) je sekundarni metabolit plijesni *Fusarium* spp., najčešće *F. graminearum*. Poznat je pod imenom vomitoksin jer nakon konzumacije putuje do mozga i daje mu signale da tijelo treba povratiti. Najčešće se detektira kod žitarica i njihovih proizvoda. Termički je on stabilna, polarna molekula koja u svojoj strukturi ima tri hidroksilne skupine (-OH) te je dobro topiva u vodi [6].



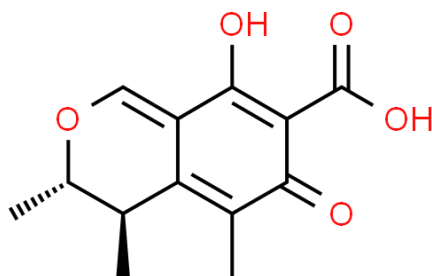
Slika 7. Struktura deoksinivalenola, izvor: <http://www.chemspider.com/>

DON se najčešće pronalazi kod žitarica (zob, ječam, pšenica, kukuruz) i njihovih proizvoda (brašno, piva, tjestenina). Ukoliko je koncentracija DON-a u hrani za životinje velika, dokazano je njegova akumulacija u jetri i bubrežima, pa se u tim slučajevima detektira i u proizvodima od životinja kao što su meso, jaja i mlijeko. Kod ljudi, DON uzrokuje mučninu, vrtoglavicu, glavobolje i vrućicu kod ljudi [6]. IARC kategorizira deoksinivalenol kao kancerogen grupe 3 što znači da se on ne smatra kancerogenim za ljude [5].

Stabilan pri temperaturama i od 350°C, no u slučaju kada se primjerice tjestenina kuha u vodi može doći do smanjenja njegove koncentracije. Prerade poput pečenja i prženja nisu se pokazale efektivnim u smanjenju koncentracije DON-a u hrani [6].

2.7. Citrinin

Citrinin (Slika 8) je mikotoksin kojeg proizvode plijesni *Penicillium* spp. (*P. citrinum*, *P. verrucosum* i *P. expansum*), *Aspergillus* spp. (*A. carneus*, *A. niveus* i *A. terreus*) i *Monascus* spp. (*M. ruber*). On je „kruti“ otrov koji mijenja neka svoja fizikalna svojstva obzirom na pH okoline. Pri pH 4,6 on se nalazi u obliku žutih „iglica“, no pri pH 9,9 njegova boja se mijenja u crvenu [7].



Slika 8. Struktura citrinina, izvor: <http://www.chemspider.com/>

Citrinin je najčešće detektiran u povrću, no detekcija je moguća i kod raznih žitarica (kukuruz, pšenica, riža, ječam, zob), voćnih sokova, orašastih plodova (bademi, kikiriki, lješnjak, pistacija) uljarica i začina. Također, pronađen je i u siru, a tada nastaje u procesu zrenja i to je u slučaju samo kontaminacije sa *M. ruber* [7].

Citrinin najčešće nastaje kada skladištenje žitarica nije pravilno, odnosno uz višak vlage u skladištu zbog nepravilne priprema sirovine prije skladištenja. Temperatura koja je najpovoljnija za produkciju citrinina je 12-37°C. Za ljudsko zdravlje citrinin je opasan jer uzrokuje oksidativni stres te usporava enzimske antioksidativne odgovore organizma na opasnosti. Razna istraživanja pokazala su da je i nefrotoksičan i hepatotoksičan kod ljudi. Najčešće se detektira uz OTA-u, no u tom slučaju, ova dva mikotoksina međusobno pojačavaju svoju toksičnost i štetan učinak po ljudsko zdravlje [7]. IARC kategorizira citrinin kao u grupu 3, što znači da se ne smatra kancerogenim za ljude [5].

Citrinin se razgrađuje, tali, na temperaturama između 175-179°C. U hladnoj vodi nije topiv, dok se u toploj vodi djelomično otapa. Moguće ga je otopiti i u polarnim otapalima poput etanola, metanola i acetonitrila. Kada se nalazi u suhim uvjetima njegova struktura počinje se razgrađivati na temperaturama višim od 175°C, dok u vlažnim uvjetima te promjene počinju već na temperaturama višim od 100°C. Koncentracija CIT-a može se smanjiti tretiranjem sirovine toplinom. Citrinin se razgrađuje na dva kompleksa: CIT-H1 i CIT-H2. CIT-H1 je toksičniji od CIT za ljude, dok je CIT-H2 manje toksičan. Moguća je razgradnja i pomoću kiselih i lužnatih otopina. Neke od novih tehnologija u prehrambenoj industriji pokazale su se efektivnim u borbi protiv citrinina, poput tretiranja visokim hidrostatskim tlakom [7].

2.8. Sklerociji i alkaloidi gljivice raži (ergot alaloidi)

Ergot alkaloidi su mikotoksini koje u najvećem broju proizvode plijesni rodova *Claviceps* (*C. purpurea*, *C. fusiformis*, *C. africana*), ali i *Epichloe*, *Neotyphodium*, *Blansia*, *Penicillium* te *Aspergillus*. Prema strukturi dijele se na tri grupe: klavine, amine lizerginske kiseline i peptide (ergopeptide). Poznato je više od 80 različitih ergot alkaloida, a na količinu i vrstu nastalih ergota značajno utječu vrsta plijesni, biljke domaćini, uvjeti rasta i geografska lokacija [8].

Sklerociji (Slika 9) su čvrste mase micelija gljiva koje služe za rezervu hrane i čuvanje kolonija u ekstremnim uvjetima. Ergoti se najčešće detektiraju kod proizvoda od raži i često su popraćeni drugim mikotoksinima. Istraživanja su pokazala da se termičkom obradom kontaminiranih proizvoda ergot alkaloidi ne razgrađuju, dok se čišćenjem i preradom žitarica uklanja čak 80% sklerocija [8].



Slika 9: Ergot sklerocij na raži (crna, zadebljana zrna), izvor: <https://veterinarska-stanica-journal.hr/article/ergot-sclerotia-and-ergot-alkaloids-occurrence-in-wheat-and-rye-grains-produced-in-croatia/>

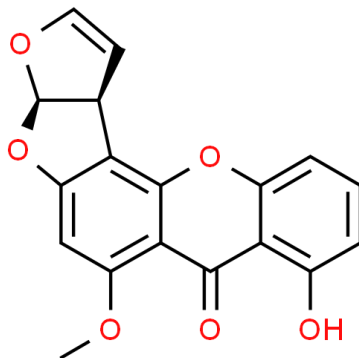
Bolesti koje nastaju konzumacijom plijesni koje sintetiziraju ergot alkaloide nazivaju se ergotizmi. Halucinacije su najčešći simptomi trovanja ergotima. Kod životinja, nakon unosa velike koncentracije ergota, može doći do oboljenja pojedinih ekstremiteta, što posljedično čini životinju neupotrebljivom za proizvodnju u prehrambenoj industriji. Uz toksičnost, ergoti su pokazali i neka svojstva koja mogu biti povoljna za ljudsko zdravlje, primjerice antioksidativna i antimikrobna svojstva [8].

3. Zakonski neregulirani mikotoksini

Zakonski neregulirani mikotoksini (eng. *emerging mycotoxins*) su mikotoksini koji se rutinski ne određuju, niti su njihove najveće dozvoljene količine propisane, budući da nisu dovoljno istraženi da bi se znala njihova pojavnost i dovoljno poznavali učinci na zdravlje. Ove mikotoksine najčešće proizvode plijesni rodova *Aspergillus*, *Fusarium* i *Alternaria*, ali i druge [9].

3.1. Sterigmatocistin

Sterigmatocistin (Slika 10) je toksični prekursor aflatoksina. Proizvode ga *Aspergillus* spp. (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nidulans*, *A. versicolor*), *Bipolaris* spp., *Emericella* spp., *Chaetomium* spp., *Botryotrichum* spp., *Humicola* spp. te *Penicillium luteum*. Strukturno je najbliži AB1, a novija istraživanja pokazuju da STE na organizam djeluje kao AB1 samo sa manjim toksičnim učinkom [9].

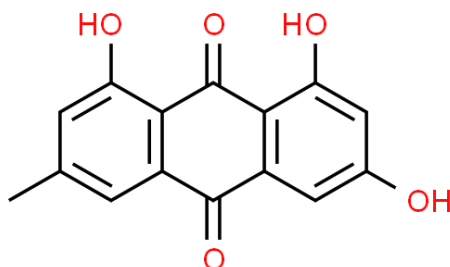


Slika 10. Struktura sterigmatocistina, izvor: <http://www.chemspider.com/>

Neka istraživanja su pokazala da sterigmatocistin ima genotoksična i citotoksična svojstva na stanice, te da može uzrokovati oštećenja na samoj DNK i mutacije kontaminiranog organizma. EFSA je 2015. godine počela intenzivnije provoditi istraživanja o prisutnosti STE u hrani. Preliminarnim istraživanjima STE je u najvećoj koncentraciji detektiran kod riže, kukuruza, kikirikija te nekih proizvoda od žitarica koji su bili predviđeni za ljudsku konzumaciju [9]. IARC je kategorizirala sterigmatocistin kao kancerogen grupe 2B, što govori da je on mogući kancerogen za ljude [5]. S obzirom da se sva *in vitro* istraživanja provode sa velikim koncentracijama STE da bi se dobili jasni rezultati, postoji potreba za provođenjem *in vivo* istraživanja sa malim koncentracijama STE da bi se jasno vidjeli rezultati kronične toksičnosti i izloženosti sterigmatocistina na ljudski organizam [9].

3.2. Emodin

Emodin (Slika 11) je narančasto-crven kristalni spoj koji proizvode *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. i *Talaromyces* spp. Isto tako detektiran je i kao aktivan sastojak biljka mahunarke (*Cassia* spp.), dvornikovke (*Rheum*, *Rumex* i *Polygonum* spp.) i pasjakovke (*Rhamnus* i *Ventilago* spp.). U tradicionalnoj kineskoj medicini, emodin se ekstrahira iz rizoma *Rheum palmatum* L. te se koristi u terapeutske svrhe [9].



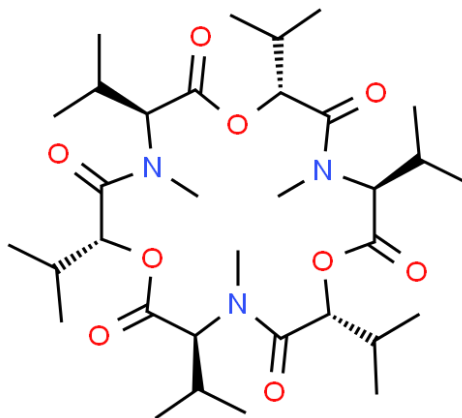
Slika 11. Struktura emodina, izvor: <http://www.chemspider.com/>

Neka *in vitro* istraživanja pokazuju da emodin može inhibirati rast kancerogenih stanica, te da u određenim slučajevima inhibira virus hepatitisa B i oralni herpes. Isto tako, detektirana su jaka antibakterijska svojstva protiv *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*. Određena istraživanja naznačuju da ima jaka antiosteoporotska i antialergijska svojstva. *In vivo* istraživanja o toksičnosti i terapeutskim svojstvima se većinom provode na miševima i štakorima. Neka od tih istraživanja bave se traženjem lijeka za posljedice dijabetesa na ljudski organizam [9].

Emodin je u svijetu više poznat i upotrebljavan kao antrakinon (organska molekula koja se koristi za pigmente) nego kao metabolit plijesni. Iz tog razloga postoji jako malo podataka o njegovoj prisutnosti u hrani [9].

3.3. Eniatini

Eniatini su ciklični heksadepsipeptidi koje proizvode plijesni *Fusarium* spp. (*F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. poae* i *F. tricinctum*). Do sada je otkriveno nekoliko desetaka različitih vrsta eniatina, a u hrani su najčešće detektirani ENN A, A1, B, i B1 (Slika 12). Eniatini se najčešće pronalaze u žitaricama i njihovim proizvodima te hrani za životinje [9].

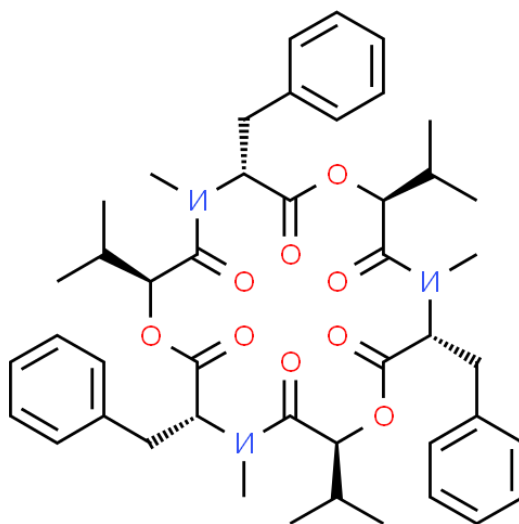


Slika 12. Struktura eniatina B1, izvor: <http://www.chemspider.com/>

Sama toksičnost eniatina je povezana s njihovim ionofornim svojstvom (sposobnost reverzibilnog vezanja iona), čime se izravno utječe na transport mono- i divalentnih K^+ i Ca^{2+} iona kroz membranu. Neka od istraživanja pokazala su povezanost u načinu na koji ENNB1 i T-2 toksično djeluju na gastrointestinalni sustav. Mali broj *in vivo* istraživanja koja su provedena daju rezultate da ENN nisu toksični ili imaju jako malu toksičnost za organizam. S obzirom da podaci o kroničnoj izloženosti ljudskog organizma eniatinima nisu dostupni, EFSA još nije odredila koncentracije koje bi bile štetne za ljudsko zdravlje [9].

3.4. Beauvericin

Beauvericin (Slika 13) je ciklični heksapeptid kojeg proizvode *Fusarium* spp. (*F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides* i *F. oxysporum*), a najčešće se detektira kod neprerađenih žitarica i hrane za životinje. Kod *in vitro* istraživanja rezultati indiciraju da beauvericin uzrokuje oksidativni stres te da djeluje kao inhibitor enzima kod bubrega. Dok se BEA pokazao toksičan u *in vitro* uvjetima, tijekom *in vivo* istraživanja na peradi i gmazovima beauvericin se nije pokazao toksičnim. Primijećeno je da se beauvericin akumulira u tkivima bogatim mastima (npr. kod jaja je detektiran u žumanjku) [9].

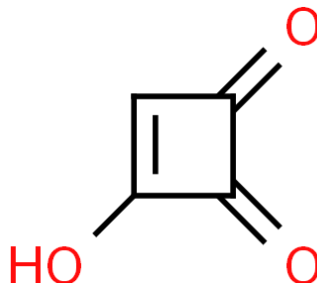


Slika 13. Struktura beauvericina, izvor: <http://www.chemspider.com/>

S obzirom na rezultate dostupnih istraživanja, EFSA beauvericin još nije definirala štetnim za ljudsko zdravlje. Postoje neka *in vivo* istraživanja koja su pokazala da beauvericin utječe negativno na imunološki sustav, no potrebno je dodatno istražiti da bi se uvela kontrola koncentracije BEA u hrani. Podaci o kroničnoj izloženosti još nisu dostupni, pa posljedice dugotrajne izloženosti organizma beauvericinu nisu poznate [9].

3.5. Moniliformin

Moniliformin (Slika 14) je mala molekula koja je lako topiva u vodi. Proizvode je plijesni *Fusarium* spp. (*F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. fujikuroi*, *F. nygamai*, *F. pseudonygamai*, *F. temperatum* i *F. thapsinum*), a nedavno je dokazano da ga proizvodi i *Penicillium melanoconidium*. Moniliformin je jedna od najkiselijih organskih molekula te se u prirodi najčešće nalazi u obliku natrijevih ili kalijevih soli, a najčešće se pronalazi u žitaricama [9].



Slika 14. Struktura moniliformina, izvor: <http://www.chemspider.com/>

Dostupna istraživanja MON-a daju različite rezultate, a neki od njih su mogućnost moniliformina da inhibira piruvat dehidrogenaze (u *in vitro* uvjetima), inhibicija enzima koji sadrže tiamin (uzrok tome se navodi strukturna sličnost MON-a i piruvat dehidrogenaze), fitotoksičnost kod kukuruza i pšenice, najčešće nekroza, utjecaj na rast biljke i promjene na samoj strukturi biljke. Neka od *in vitro* istraživanja dokazuju toksičnost MON-a na životinjske stanice, a zanimljivo je da neka *in vivo* istraživanja rezultiraju jakom toksičnošću moniliformina, ponajviše kod peradi gdje dolazi do napada na sam srčani organ [9].

IARC je kategorizirala moniliformin kao kancerogen grupe 2B, što znači da je mogući kancerogen za ljude [5]. Isto tako, EFSA ističe važnost kontrole hrane za životinje, pogotovo peradi, s obzirom na rezultate provedenih istraživanja [9].

4. Pojavnost, sprječavanje i kontrola kontaminacije

Promjenom klime na globalnoj razini (npr. povišenje temperature zraka, povećanje količine padalina odnosno dulji vremenski periodi bez padalina) dolazi do poremećaja u samom ekosustavu. Te promjene u klimi, ponajviše povećanje vlage i povišenje temperatura, povoljne su za rast raznih mikroorganizama uključujući i plijesni koje u sve većoj mjeri proizvode i sve više mikotoksina. Istraživanja na prerađenim i neprerađenim sirovinama, ponajviše žitaricama, pokazuju povećanje koncentracija i vrsta mikotoksina u sirovinama koje se uzgajaju za prehranu ljudi pri čemu dolazi do kontaminacije žitarica sa sve više vrsta mikotoksina, i reguliranih i nereguliranih, te samim time uništenja hrane i hrane za životinje, uslijed ekstremnih klimatskih promjena [10].

Prema studiji koju su proveli Eskola i sur. (2020.), pojavnost mikotoksina veća je od često citiranih 25% koje je procijenio FAO te ona iznosi i do 80%, što se pripisuje sve većoj osjetljivosti metoda mjerenja koncentracije mikotoksina, ali i utjecaju klimatskih promjena. Da bi se mogla odrediti prava opasnost mikotoksina za ljudsko zdravlje, potrebna su još mnoga istraživanja njihove pojavnosti i supojavnosti, u raznim geografskim područjima te u različitim vremenskim periodima [11].

Do sličnog zaključka došli su i Kovalsky i sur. (2016), čije je istraživanje reguliranih i nereguliranih mikotoksina u poljoprivrednim sirovinama ukazalo na značajnu pojavnost *Fusarium* mikotoksina (poglavito DON-a i ZEN-a), do gotovo 90%, pri čemu je dokazana i česta supojavnost reguliranih mikotoksina s nereguliranimi. Također, zamijećena je i važnost utjecaja vremenskih uvjeta na pojedinim mikrolokacijama unutar iste regije, kao i korištenih kultivara, na pojavnost mikotoksina [12].

S obzirom na ta saznanja, preporučaju se češća laboratorijska ispitivanja mikotoksina u sirovinama, ne samo prije žetve, nego i tokom i nakon skladištenja, budući da su ekstremne klimatske promjene sve češće i sve veće [10], a kako bi se spriječila inicijalna kontaminacija mikotoksinima potrebno je, tijekom uzgoja hrane, poštovati smjernice dane od strane organizacija zaduženih za očuvanje kvalitete hrane i očuvanje ljudskog zdravlja (npr. FAO, WHO, EFSA). Neke od smjernica bave se sprječavanjem nastanka mikotoksina, dok se druge bave kontrolom i sprječavanjem povećanja koncentracije mikotoksina ako je došlo njihovog nastanka. Neke od tih smjernica su odnose se na HACCP sustav ili GAP principe, te razne metode dekontaminacije (fizičke, kemijske i biološke) [1].

4.1. HACCP

HACCP je sustav analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka, a bazira se na sedam načela kojima je svrha sprječavanje kontaminacije hrane fizičkim, kemijskim i biološkim opasnostima. Uredbom (EZ) br. 852/2004 o higijeni hrane zakonski je propisano obavezno uvođenje HACCP sustava kod svih subjekata u poslovanju s hranom. Ova Uredba (i sam HACCP sustav) primjenjuje se na sve faze proizvodnje, prerade i distribucije hrane, kao i na uvoz i izvoz hrane [13].

Prema Uredbi (EZ) br. 852/2004, načela HACCP sustava su:

1. Utvrđivanje svih opasnosti koje se moraju spriječiti, ukloniti ili smanjiti na prihvatljivu razinu;
2. Utvrđivanje kritičnih kontrolnih točaka na razini ili razinama na kojim je kontrola bitna za sprečavanje ili uklanjanje opasnosti ili za njezino smanjivanje na prihvatljivu razinu;
3. Određivanje kritičnih granica na kritičnim kontrolnim točkama koje razdvajaju prihvatljivo od neprihvatljivog radi sprečavanja, uklanjanja ili smanjivanja uočenih opasnosti;
4. Određivanje i provedba učinkovitih postupaka nadgledanja kritičnih kontrolnih točaka;
5. Određivanje mjera za uklanjanje nedostataka koje se poduzimaju ako sustav nadgledanja upozori da kritična kontrolna točka nije pod kontrolom;
6. Određivanje postupaka koji se redovito poduzimaju kako bi se provjerila učinkovitost mjera navedenih u načelima 1-5; te
7. Uspostava i vođenje dokumentacija i evidencija primjerenih vrsti i veličini poduzeća u poslovanju s hranom, a koje će dokazivati učinkovitu primjenu mjera navedenih u načelima 1-6.

HACCP sustavom moguća je detekcija mikotoksina u hrani, te se samim time u velikoj mjeri sprečavanje opasnosti po ljudsko zdravlje koje bi mogle nastati uslijed kontaminacije [13].

4.2. GAP

GAP je zbirka principa koji se trebaju implementirati u procese uzgoja, pripreme za skladištenje i skladištenja da bi se osigurala sigurnost prehrambenih proizvoda i hrane, uzimajući u obzir ekonomsku, socijalnu i ekološku održivost [14]. Neki od principa odnose se na pripremu tla prije sadnje, uklanjanje otpada od usjeva (ljuske, korijenje, stabljike), sastavljanje sustava gnojidbe i navodnjavanja bitno kod perioda suša i održavanje plodoreda. Potrebno je paziti da se koriste sorte koje su otporne na bolesti uzrokovane plijesnima i insektima te da se berba odvija u pravo vrijeme (da je usjev zreo). Prije samog skladištenja sirovina potrebno je dodatno sušenje (ako je sirovina sadrži previše vode), a kako ne bi došlo do rasta plijesni tijekom skladištenja.

Tijekom skladištenja, potrebno je kontrolirati temperaturu, vlažnost i protok zraka u skladištu da bi se spriječio naknadna sinteza mikotoksina. Kod većine mikotoksina, to znači da bi temperatura trebala biti oko 20°C te aktivitet vode ispod 0,7, te se treba regulirati količina O₂ i CO₂ u zraku [1].

4.3. Fizička dekontaminacija

Fizička dekontaminacija se odnosi na tretiranje hrane pomoću metoda koje ne koriste neke druge tvari već uzrokuju fizičke promjene na hrani. Tim metodama se uklanjaju mikotoksini iz usjeva prije obrade [1].

U slučaju aflatoksina i OTA-e kontaminacija je vidljiva već golim okom (npr. boja zrna i sl.) pa je moguće njihovo uklanjanje već prilikom žetve. Isto tako, prije skladištenja preporučljivo je uklanjanje ovojnice ili ljuske sirovina (žitarice, orašasti plodovi), pošto se u njoj nalazi najviše kontaminanata. Kod fumonizina moguća je dekontaminacija na više načina poput pirolize, radijacije i mljevenja. Patulin je u velikoj mjeri moguće ukloniti sortiranjem voća prije procesa proizvodnje, a moguće je uklanjanje iz voćnih sokova pomoću filtracije, fermentacije i pasterizacije, zagrijavanja, primjene UV svjetlosti te visokog hidrostatskog tlaka. Uklanjanje zearalenona iz hrane/sirovina moguće je gravitacijskim odvajanjem, mljevenjem te toplinskom obradom [1]. DON je moguće ukloniti u procesu sortiranja, pranja, drobljenja, radijacije te toplinsko obradom. Isto tako preporuča se uklanjanje vanjske ljuske žitarica [15]. U slučaju uklanjanja citrinina pozitivne rezultate pokazalo je tretiranje sirovina plavim svjetlom [7]. Ergot alkaloidi uklanjaju se toplinskom obradom, sortiranjem, pranjem i mljevenjem [8].

4.4. Kemijska dekontaminacija

Kod kemijske dekontaminacije koriste se kemikalije koje služe za uklanjanje mikotoksina, no one ne smiju tijekom uklanjanja proizvoditi toksične nusprodukte. Dakle, koriste se kemikalije koje utječu samo na kontaminant, a ne i sirovinu [1].

Kod aflatoksina kemijska dekontaminacija nije zakonski odobrena jer agensi koji su potrebni da bi se aflatoksin uništio imaju toksične nusprodukte. OTA-u je moguće uništiti pomoću amonijaka i ozona. Kod fumonizina efektivno je korištenje lužina kod dekontaminacije, poput amonijaka, sumporovog dioksida i natrijevog hidroksida. Kod patulina preporuča se korištenje askorbinske kiseline, kalijevog permanganata (korištenje prije prerade, tijekom pranja), amonijaka te sumporovog dioksida. U slučaju zearalenona koriste se amonijak, klorovodična kiselina, octena kiselina, vodikov peroksid i formaldehid [1]. Kod dekontaminacije u slučaju DON-a koriste se

oksidacijski agenti i jake kiseline i baze, te u sve više slučajeva natrijev metabidisulfat [16]. Kod uklanjanja citrinina koristi se limunska kiselina [7].

4.5. Biološka dekontaminacija

Biološka dekontaminacija je metoda kod koje se koriste drugi organizmi za uklanjanje kontaminanata. Kod upotrebe mikroorganizama za uklanjanje mikotoksina potrebno je znati točno koji organizmi su potrebni da se hrana ne bi dodatno kontaminirala drugim štetnim kontaminantima [1].

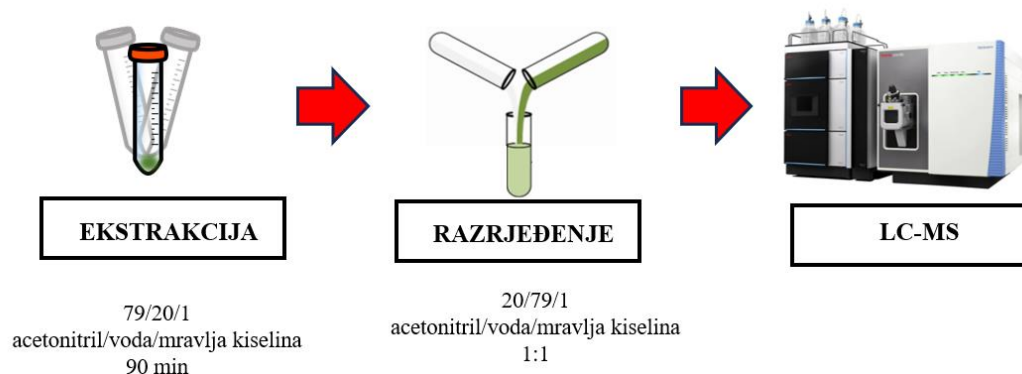
Kod aflatoksina korisnima su se pokazali *Bacillus subtilis*, neke *Pseudomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Ralstonia* spp. i *Lactobacillus* spp. OTA-u je moguće uništiti korištenjem određenih enzima. Tretiranjem sjemena sa *Microbacterium oleovorans* i *Bacillus amyloloquefaciens* smanjuje se stvaranje FB1 i FB2 kod kukuruza. Isto tako, korištenjem nekih bakterija rodova *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. i *Arhrobacter* spp. smanjuje se pojavnost plijesni *Fusarium verticillioides* te samim time i nastanak fumonizina. Kod borbe protiv patulina koriste se *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis*, *Enterococcus faecium*, *Sporobolomyces* spp., *Kodomae ohmeri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Byssochlamys nivea* i određeni enzimi. U slučaju zearalenona koriste se *Sccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus plamntarum* [1]. Kod kontaminacije DON-om preporučeno je koristiti *Bacillus subtilis* i *B. licheniformis*, neke *Nocardia* spp. te *Devosia insulae* [16].

5. Metode analize

Detekcija mikotoksina složen je proces u kojem je potrebno pravilno uzorkovanje, homogenizacija, priprema uzorka te detekcija i kvantifikacija analitičkim metodama. U pripremu uzorka ubraja se ekstrakcija spoja iz matrice uzorka, pročišćavanje i koncentriranje dobivenog ekstrakta. Uklanjanje komponenti matrice uzorka glavni cilj kod pripreme uzorka, a izbor metode ovisi o vrsti i koncentraciji mikotoksina koji se želi odrediti, kao i tehnici detekcije. Ekstrakcija se provodi iz usitnjenog uzorka sa smjesom otapala. Pročišćavanje se provodi kroz različite metode kao što je SPE, ekstrakcija na čvrstoj fazi, koja se uz pročišćavanje može koristiti i za koncentriranje. U određivanju pojedinih grupa mikotoksina najznačajnije su multifunkcionalne SPE kolone, kod kojih komponente matriksa zaostaju na čvrstoj fazi dok spojevi od interesa prelaze u supernatant. Najspecifičnije pročišćavanje dobiva se pomoću IAC kolona, kod kojih su u koloni imobilizirana antitijela specifična za određeni mikotoksin [17].

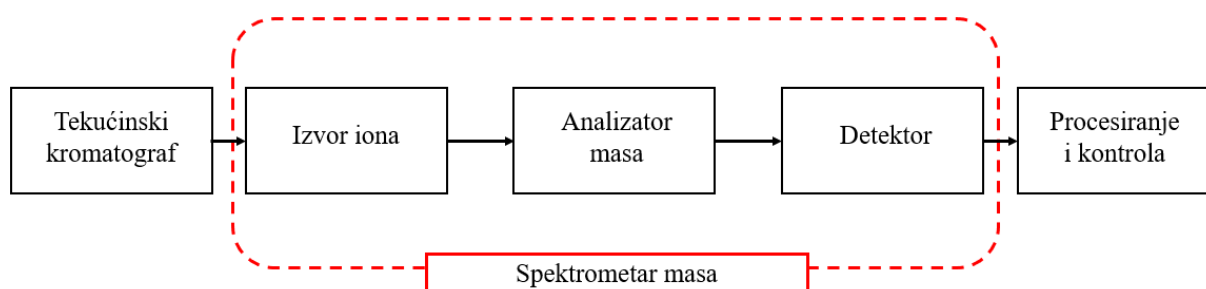
Tehnika koja se najčešće koristi za određivanje mikotoksina u hrani je kromatografija. Najstarija kromatografska tehnika koja se koristila za brzi pregled određenih mikotoksina vizualnom procjenom je tankoslojna kromatografija (TLC). Da bi se pojednostavila i ubrzala detekcija mikotoksina došlo je do razvoja kromatografskih metoda baziranih na upotrebi tekućinske kromatografije (HPLC) u sprezi s različitim detektorima, u posljednje vrijeme najčešće spektrometrom masa (MS). GC se danas rijetko koristi u detekciji mikotoksina jer uglavnom zahtjeva derivatizaciju. Kod određivanja mikotoksina moguće je koristiti i imunološke metode. Najčešće korištena je kompetitivna ELISA zbog svoje visoke specifičnosti, jednostavne primjene i niske cijene [17].

Kako je ranije navedeno, obzirom na sve češću supojavnost mikotoksina u poljoprivrednim proizvodima, postoji potreba za multimikotoksinskim metodama koje istovremeno određuju velik broj spojeva sa minimalnim pristupom i bez posebnih tehnika pročišćavanja, poput razrijedi i mjeri principa. Razrijedi i mjeri princip (Slika 15) bazira se na jednostavnoj ekstrakciji spoja iz uzoraka prikladnim otapalom te razrjeđenju ekstrakta. Problem ovog pristupa je što se, uz željene spojeve, čuvaju i komponenta uzorka koje u konačnici mogu negativno utjecati na izvedbene značajke metode [18].



Slika 15. Razrijedi i mjeri princip, izvor: prilagođeno iz [18]

Pazeći na sve te elemente, metode bazirane na spregnutoj LC-MS tehnici određivanja postale su vodeće u detekciji mikotoksina. LC-MS (Slika 16) omogućuje veću selektivnost i osjetljivost te pouzdanost u detekciji željenih spojeva, pri čemu se u rutinskim analizama kontaminanata uglavnom koristi trostruki kvadrupolni (QqQ) analizator masa, a za tzv. *non-target* analize i određivanje (dokazivanje) novih, do sada nepoznatih spojeva, analizatori masa visoke razlučivosti i točnosti mjerenja mase [17].



Slika 16. Blok shema spregnutog sustava LC-MS, izvor: prilagođeno iz [17]

6. Zaključak

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji predstavljaju prijetnju za ljudsko zdravlje, stoga se razine određenih mikotoksina u hrani zakonski reguliraju. U Republici Hrvatskoj poštuju se propisi koji su doneseni na razini EU, u prvom redu Uredba Komisije (EU) 2023/915 o najvećoj dopuštenoj količini određenih kontaminanata u hrani čija se provedba osigurava Zakonom o kontaminantima (NN 39/2013).

Dok se trenutno regulira samo nekolicina otkrivenih mikotoksina (aflatoksini, okratoksin A, patulin, zearalenon, fumonizini, deoksinivalenol, citrinin, skolerij i alkaloidi glavice raži), poznato ih je više stotina različitih. Najopasniji je aflatoksin B1 kojeg je IARC klasificirala kao kancerogen za ljude. Zakonski neregulirani mikotoksini, kao što su sterigmatocistin, emodin, eniatini, beauvericin, moniliformin i drugi, još nisu dovoljno istraženi da bi se mogla točno definirati njihova opasnost po ljudsko zdravlje. No, sve više istraživanja se provodi da bi se točno moglo odrediti koje „nove“ mikotoksine je potrebno zakonski regulirati.

Jedan od glavnih alata u borbi protiv nastanka mikotoksina je uspostava HACCP sustava. Uz HACCP, bitno je i poštivanje standarda dobre poljoprivredne prakse kojima je opisano kako spriječiti nastanak mikotoksina već pri uzgoju usjeva. Njihovo uvođenje i provedba sve su važniji u posljednje vrijeme, uzevši u obzir utjecaj posljedica klimatskih promjena na pojavnost kontaminanata i posljedično sigurnost hrane. Jednom kada dođe do kontaminacije hrane mikotoksinima moguća je njena dekontaminacija, fizička, kemijska ili biološka, ali samo uz za to odobrene metode.

Prema tome, postoji potreba za većim brojem kontrola u proizvodnji hrane, a da bi se mikotoksini analitički odredili nužno je slijediti složen proces koji se sastoji od pravilnog uzorkovanja, homogenizacije i pripreme uzorka te detekcije i kvantifikacije analita. Kako bi se ubrzao proces pripreme uzorka razvijen je jednostavan „razrijedi i mjeri“ princip, dok se za instrumentalno određivanje mikotoksina najčešće koristi tekućinska kromatografija u sprezi sa spektrometrijom masa, i to radi svoje selektivnosti i pouzdanosti u detekciji željenih spojeva.

7. Literatura

- [1] Marrez, D. A.; Ayesh, Ahmed M. Mycotoxins: The threat to food safety, *Egyptian Journal of Chemistry*, 2022, Vol.65, No.1, pp.353-372
- [2] Pledin, J.; Lešić, T.; Kmetič, I.; Markov, K.; Zadravec, M.; Frece, J.; Kiš M.; Šarkanj, B. Toxic effects of mycotoxins: Mechanism of action and mycotoxicosis. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 2020, vol.15(1-2)
- [3] Hrvatski sabor: Zakon o kontaminantima, Narodne novine 039/2013, 2013
- [4] Uredba Komisije (EU) 2023/915 o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani i o ostavljanju izvan snage Uredbu (EZ) br.1881/2006. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX%3A02023R0915-20230810&qid=1693736379071> (pristupljeno, 20.08.2023.)
- [5] IARC: IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications> (pristupljeno, 20.08.2023)
- [6] Sobrova, P.; Adam, V.; Vasatkova, A.; Beklova, M.; Zeman, L.; Kizek, R. Deoxynivalenol and its toxicity, *Interdisc Toxicology*, 2010, Vol. 3(3): 94-99
- [7] Kamle, M.; Mahato, D.K.; Gupta, A.; Pandhi, S.; Sharma, N.; Sharma, B.; Mishra, S.; Arora, S.; Selvakumar, R.; Saurabh, V.; et.al. Citrinin Mycotoxin Contamination in Food nad Feed: Impact6 on Agriculture, Human Health, and Detection and Management Strategies, *Toxins*, 2022, 14, 85.
- [8] Agriopoulou, S. Ergot Alkaloids Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Characteristics, Toxicity, Prevalence, and Control Strategies, *Agronomy*, 2021, 11, 951.
- [9] Gruber-Dorninger, C.; Novak, B.; Nagl, V.; Berthiller, F. Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2017, 65, 7052-7070
- [10] Gruber-Dorninger, C.; Jenkins, T.; Schatzmayr, G. Global Mycotoxin Occurance in Feed: A Ten-Year Survey, *Toxins*, 2019, 11, 375
- [11] Eskola, M.; Kos, G.; Elliott, C.T.; Hajšlova, H.; Mayar, S.; Krska, R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Vlicity of the widely cited 'FAO estimate' 25%, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60:16, 2773-2789
- [12] Kovalsky, P.; Kos, G., Nährer, K.; Schwab, C.; Jenkins, T.; Schatzmayr, G.; Sulyok, M.; Krska, R. Co-Occurrence of Regulated, Masked and Emerging Mycotoxins and

- Secondary Metabolite sin Finished Feed and Maize- A Extensive Survey, *Toxins*, 2016, 8, 363
- [13] Uredba (EZ) br. 852/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o higijeni hrane, <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2004/852/oj> (pristupljeno, 20.08.2023.)
- [14] FAO: Good Agricultural Practice <https://www.fao.org/home/en> (pristupljeno, 20.08.2023.)
- [15] Ekwomadu, T.I.; Akinola, S.A.; Mwanzu, M. *Fusarium* Mycotoxins, Their Meatbolites (Free, Emerging, and Masked), Food Safety Concerns, and Health Impacts, *International Journal of Enviornmental Research and Public Health*, 2021, 18, 11741.
- [16] Li, Y.; Gao, H.; Wang, R.; Xu, Q. Deoxynivalenol in food and feed: Recent advances in decontamination strategies, *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14:1141378
- [17] Kovač, M. Razvoj LC-MS/MS metode za određivanje reguliranih mikotoksina te njihova supojavnost u uzorcima hrvatskih žitarica. Doktorska disertacija, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2020. <https://dabar.srce.hr/islandora/object/ptfos:1986> (pristupljeno 27.08.2023.)
- [18] Kovač, M. Kromatografske metode analize. Predavanja iz kolegija Kontrola kakvoće i sigurnosti hrane, Odjel za prehrambenu tehnologiju, Sveučilište Sjever, 2021. https://moodle.srce.hr/2021-2022/pluginfile.php/5934774/mod_resource/content/1/4.%20Kromatografske-metode-analize_KKiSH_26-10-2021.pdf?fbclid=IwAR0kIbu3Pqo0Cn3WY3-txkk-3eVbqfHFXwI4zkesZZcgB2eO_oLPmTade6E (pristupljeno 27.08.2023.)

Popis slika

Slika 1. Modifikacija DNK, izvor: preuzeto iz [2]	1
Slika 2. Struktura aflatoksina B1, izvor: http://www.chemspider.com/	3
Slika 3. Struktura okratoksina A, izvor: http://www.chemspider.com/	4
Slika 4. Struktura patulina, izvor: http://www.chemspider.com/	5
Slika 5. Struktura zearalenona, izvor: http://www.chemspider.com/	6
Slika 6. Struktura fumonizina B1, izvor: http://www.chemspider.com/	7
Slika 7. Struktura deoksinivalenola, izvor: http://www.chemspider.com/	8
Slika 8. Struktura citrinina, izvor: http://www.chemspider.com/	8
Slika 9: Ergot sklerocij na raži (crna, zadebljana zrna), izvor: https://veterinarska-stanica-journal.hr/article/ergot-sclerotia-and-ergot-alkaloids-occurrence-in-wheat-and-rye-grains-produced-in-croatia/	10
Slika 10. Struktura sterigmatocistina, izvor: http://www.chemspider.com/	11
Slika 11. Struktura emodina, izvor: http://www.chemspider.com/	12
Slika 12. Struktura eniatina B1, izvor: http://www.chemspider.com/	13
Slika 13. Struktura beauvericina, izvor: http://www.chemspider.com/	14
Slika 14. Struktura moniliformina, izvor: http://www.chemspider.com/	14
Slika 15. Razrijedi i mjeri princip, izvor: prilagođeno iz [18]	21
Slika 16. Blok shema spregnutog sustava LC-MS, izvor: prilagođeno iz [17]	21

Sveučilište Sjever

MARK
ALIBRAING



SVEUČILIŠTE
SJEVER

IZJAVA O AUTORSTVU

Završni/diplomski rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članaka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, KATARINA HILLY (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom ZAKONSKI (NE) REGULIRANI MIKOTOKSINI (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:
(upisati ime i prezime)

Katarina Hilly
(vlastoručni potpis)

Sukladno čl. 83. Zakonu o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju završne/diplomske radove sveučilišta su dužna trajno objaviti na javnoj internetskoj bazi sveučilišne knjižnice u sastavu sveučilišta te kopirati u javnu internetsku bazu završnih/diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice. Završni radovi istovrsnih umjetničkih studija koji se realiziraju kroz umjetnička ostvarenja objavljuju se na odgovarajući način.

Sukladno čl. 111. Zakona o autorskom pravu i srodnim pravima student se ne može protiviti da se njegov završni rad stvoren na bilo kojem studiju na visokom učilištu učini dostupnim javnosti na odgovarajućoj javnoj mrežnoj bazi sveučilišne knjižnice, knjižnice sastavnice sveučilišta, knjižnice veleučilišta ili visoke škole i/ili na javnoj mrežnoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice, sukladno zakonu kojim se uređuje znanstvena i umjetnička djelatnost i visoko obrazovanje.

8.4%

Date: 2023-09-19 01:39 UTC

★ All sources 56 | 📍 Internet sources 43 | 📁 Organization archive 10 | 🛡️ Plagiarism Prevention Pool 2

- ✓ [1] eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32004R0852
2.1% 11 matches
- ✓ [2] eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:02004R0852-20090420&from=SL
2.1% 10 matches
- ✓ [3] eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/HTML/?uri=OJ.C:2016:278:FULL
2.0% 13 matches
- ✓ [4] zir.nsk.hr/islandora/object/agr:787/datastream/PDF/download
2.0% 11 matches
- ✓ [5] narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_06_68_1307.html
1.6% 9 matches
- ✓ [6] hrcak.srce.hr/file/349566
1.4% 9 matches
- ✓ [7] zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:3845/datastream/PDF/view
1.4% 7 matches
- ✓ [8] zir.nsk.hr/islandora/object/medri:6587/datastream/PDF/view
1.3% 9 matches
- ✓ [9] repositorij.unin.hr/islandora/object/unin:5295/datastream/PDF/download
1.1% 10 matches
1 document with identical matches
- ✓ [11] hrcak.srce.hr/file/356935
1.1% 8 matches
- ✓ [12] www.zakon.hr/z/575/Zakon-o-kontaminantima
1.0% 5 matches
- ✓ [13] zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:3977/datastream/PDF/view
0.6% 6 matches
- ✓ [14] core.ac.uk/download/pdf/197860367.pdf
0.7% 6 matches
- ✓ [15] zir.nsk.hr/islandora/object/unin:5961/datastream/PDF/download
0.7% 7 matches
- ✓ [16] veterina.com.hr/?p=21123
0.6% 5 matches
- ✓ [17] www.mdpi.com/2073-4395/11/5/931
0.6% 7 matches
- ✓ [18] zir.nsk.hr/islandora/object/pharma:14/preview
0.6% 7 matches
- ✓ [19] zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:3074/datastream/PDF/view
0.5% 6 matches
1 document with identical matches
- ✓ [21] core.ac.uk/download/pdf/53873368.pdf
0.6% 7 matches
- ✓ [22] hrcak.srce.hr/file/200993
0.5% 5 matches
- ✓ [23] hrcak.srce.hr/file/301863
0.5% 5 matches
- ✓ [24] www.hah.hr/upisnik_z_m.php?preuzmi_misljenje=27
0.5% 5 matches
- ✓ [25] "Određivanje alergena badema i lješnjaka u uzorcima čokolade ELISA metodom_B52.docx" dated 2022-07-13
0.5% 4 matches
- ✓ [26] core.ac.uk/download/pdf/198076053.pdf
0.5% 4 matches

- [27] [eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017XC0523\(03\)&from=DE](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017XC0523(03)&from=DE)
0.4% 4 matches
 1 documents with identical matches
- [29] zpio.unios.hr/wp-content/uploads/2020/07/jasenska.petric.pdf
0.4% 6 matches
- [30] "doktorat Jasenska.docx" dated 2020-01-19
0.4% 5 matches
- [31] zir.nsk.hr/islandora/object/unin:5375/datastream/PDF/view
0.4% 4 matches
- [32] www.proquest.com/scholarly-journals/t-2-i-ht-toksini-u-hrani-za-zivotinje-pojavnost/docview/2129932135/se-2
0.3% 4 matches
- [33] "Analiza mikotoksina-1.docx" dated 2020-03-15
0.3% 2 matches
- [34] "1_22.12.2021_NOVO_ZADNJA VERZIJA_Znanstveno- istraživačka strategija 2021_2027 _glavna - lektorirano - konačno (00.docx" dated 2021-07-09
0.2% 2 matches
- [35] "ZAVRŠNI RAD BOROVNICA (Anisa Ali).docx" dated 2021-07-09
0.2% 3 matches
 2 documents with identical matches
- [38] zir.nsk.hr/islandora/object/pmf:507/datastream/PDF/view
0.4% 3 matches
- [39] narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_12_146_3162.html
0.2% 2 matches
- [40] hrcak.srce.hr/file/278886
0.2% 2 matches
- [41] library.co/document/zlj25p6y-utjecaj-postupaka-transformaciju-smanjenje-koncentracije-mikotoksina-određenim-skupinama.html
0.2% 2 matches
- [42] eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0519&from=SK
0.2% 2 matches
- [43] www.eurofins.hr/hrana/odredivanje-mikotoksina/
0.2% 2 matches
- [44] "Fizikalno - kemijska i tehnološka usporedba kefir i jogurta (10) (1).docx" dated 2021-07-12
0.1% 2 matches
 1 documents with identical matches
- [46] www.mdpi.com/2304-8158/10/1/14
0.1% 2 matches
- [47] zir.nsk.hr/islandora/object/unin:5315/datastream/PDF/view
0.1% 2 matches
 2 documents with identical matches
- [50] hrcak.srce.hr/file/317786
0.1% 1 matches
- [51] www.iusinfo.hr/zakonodavstvo/pravilnik-o-najvecim-dopustenim-kolicinama-odredenih-kontaminata-u-hrani-3
0.1% 1 matches
- [52] fsa.gov.ba/hr/objavljen-pravilnik-o-izmjenama-i-dopunama-pravilnika-o-maksimalno-dozvoljenim-kolicinama-odredenih-kontaminata-u-hrani-3
0.1% 1 matches
- [53] "Kinetika enzima katalaze - završni rad_BS.docx" dated 2022-09-05
0.1% 1 matches
- [54] "završni ispravljani.docx" dated 2022-09-02
0.1% 1 matches
- [55] "Završni rad - Jelena Smojević.docx" dated 2022-07-28
0.1% 1 matches
- [56] from a PlagScan document dated 2022-06-15 15:23
0.1% 1 matches
- [57] "Balaić Patricia Seminarski rad - Brze metode za detekciju mikroorganizama.docx" dated 2022-04-21
0.1% 1 matches
 1 documents with identical matches
- [58] from a PlagScan document dated 2022-06-11 16:26
0.1% 1 matches

- [27] [eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017XC0523\(03\)&from=DE](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017XC0523(03)&from=DE)
0.4% 4 matches
 1 documents with identical matches
- [29] zpio.unios.hr/wp-content/uploads/2020/07/jasenska.petric.pdf
0.4% 6 matches
- [30] ["doktorat Jasenska.docx" dated 2020-01-19](#)
0.4% 5 matches
- [31] zir.nsk.hr/islandora/object/unin:5375/datastream/PDF/view
0.4% 4 matches
- [32] www.proquest.com/scholarly-journals/t-2-i-ht-toksini-u-hrani-za-zivotinje-pojavnost/docview/2129932135/se-2
0.3% 4 matches
- [33] ["Analiza mikotoksina-1.docx" dated 2020-03-15](#)
0.3% 2 matches
- [34] ["1_22.12.2021_NOVO_ZADNJA VERZIJA_Znanstveno- istraživačka strategija 2021_2027 _glavna - lektorirano - konačno \(00.docx" dated 2021-07-09](#)
0.2% 2 matches
- [35] ["ZAVRŠNI RAD BOROVNICA \(Anisa Ali\).docx" dated 2021-07-09](#)
0.2% 3 matches
 2 documents with identical matches
- [38] zir.nsk.hr/islandora/object/pmf:507/datastream/PDF/view
0.4% 3 matches
- [39] narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_12_146_3162.html
0.2% 2 matches
- [40] hrcak.srce.hr/file/278886
0.2% 2 matches
- [41] library.co/document/zlj25p6y-utjecaj-postupaka-transformaciju-smanjenje-koncentracije-mikotoksina-određenim-skupinama.html
0.2% 2 matches
- [42] eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0519&from=SK
0.2% 2 matches
- [43] www.eurofins.hr/hrana/odredivanje-mikotoksina/
0.2% 2 matches
- [44] ["Fizikalno - kemijska i tehnološka usporedba kefir i jogurta \(10\) \(1\).docx" dated 2021-07-12](#)
0.1% 2 matches
 1 documents with identical matches
- [46] www.mdpi.com/2304-8158/10/1/14
0.1% 2 matches
- [47] zir.nsk.hr/islandora/object/unin:5315/datastream/PDF/view
0.1% 2 matches
 2 documents with identical matches
- [50] hrcak.srce.hr/file/317786
0.1% 1 matches
- [51] www.iusinfo.hr/zakonodavstvo/pravilnik-o-najvecim-dopustenim-kolicinama-odredenih-kontaminata-u-hrani-3
0.1% 1 matches
- [52] fsa.gov.ba/hr/objavljen-pravilnik-o-izmjenama-i-dopunama-pravilnika-o-maksimalno-dozvoljenim-kolicinama-odredenih-kontaminata-u-hrani
0.1% 1 matches
- [53] ["Kinetika enzima katalaze - završni rad_BS.docx" dated 2022-09-05](#)
0.1% 1 matches
- [54] ["završni ispravljani.docx" dated 2022-09-02](#)
0.1% 1 matches
- [55] ["Završni rad - Jelena Smojević.docx" dated 2022-07-28](#)
0.1% 1 matches
- [56] [from a PlagScan document dated 2022-06-15 15:23](#)
0.1% 1 matches
- [57] ["Balaić Patricia Seminarski rad - Brze metode za detekciju mikroorganizama.docx" dated 2022-04-21](#)
0.1% 1 matches
 1 documents with identical matches
- [58] [from a PlagScan document dated 2022-06-11 16:26](#)
0.1% 1 matches