

PROFESSIONAL PAPER

Prisutnost aflatoksina i okratoksina A u proizvodima na bazi kakaovca

Ksenija Markov^{1*}, Darja Sokolić², Iva Čanak¹, Željko Jakopović¹, Jadranka Frece¹¹Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska²Hrvatska agencija za hranu, I.Gundulića 36 b, Osijek, Hrvatska

*Corresponding author: kmarko@pbf.hr

Sažetak

Tamna čokolada i napitci na bazi kakaovca prepoznati su kao sastavni dijelovi zdrave prehrane stoga je njihova konzumacija u porastu. Iako Uredba komisije (EZ) 1881/2006, sa svim izmjenama i dopunama (105/2010, 165/2010, 594/2012 i 1058/2012) ne spominje najveće dopuštene količine (NDK) aflatoksina (AF) i okratoksina A (OTA) u kakovcu i proizvodima na bazi kakaovca, ipak preporuča postavljanje dopuštenih količina za OTA od 1 µg/kg za čokoladu, čokoladu u prahu i tekuću čokoladu, te 2 µg/kg za sjeme kakaovca, kakao masu, kakaov kolač i kakaov prah. Stoga su u ovom radu provedene analize određivanja ukupnih AF i OTA u uzorcima tamne čokolade, koji su sadržavali od 32 do 99% kakaovca bez ikakvih nadjeva i dodataka (orašastih plodova, suhog voća i dr.), kakao praha s 20% kakaovca i napitcima na bazi kakao praha koji su sadržavali 15% kakaovca. Upotrebom imunoenzimske ELISA metode (Enzyme-linked immunosorbent assay) proveden je „screening“ tržišta, kojim je dokazana prisutnost mikotoksina u čokoladama, kakao prahu i napitcima na bazi kakao praha u koncentracijama od 0,1 do 1,72 µg/kg za ukupne AF i od 0,1 do 4,24 µg/kg za OTA.

Ključne riječi: čokolada, aflatoksini, okratoksin A, ELISA

Abstract

Dark chocolate and cocoa based beverages have been identified as integral parts of a healthy diet therefore their consumption is increasing. Although Commission Regulation (EC) 1881/2006, with all its amendments (105/2010, 165/2010, 594/2012 and 1058/2012) does not mention the maximum levels (ML) of aflatoxin (AF) and ochratoxin A (OTA) in cocoa and cocoa based products, it recommends setting the maximum levels for OTA of 1 µg/kg of chocolate, chocolate powder and liquid chocolate, and 2 µg/kg of cocoa seeds, cocoa mass, cocoa cake and cocoa powder. Therefore, in this paper, the analysis for determination of total AF and OTA was carried out in samples of dark chocolate, containing 32-99% cocoa without any filling and additions (nuts, dried fruits, etc.) cocoa powder with 20% of cocoa and cocoa powder-based beverages containing 15% of cocoa. By using immunoenzymatic ELISA method (Enzyme-linked immunosorbent assay) „screening“ of the market was conducted, in which mycotoxins in chocolate, cocoa powder and cocoa powder-based beverages have been detected in concentrations from 0.1 to 1.72 µg/kg for total AF and 0.1 to 4.24 µg/kg for OTA.

Key words: chocolate, aflatoxins, ochratoxin A, ELISA

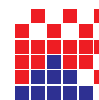
UVOD

Kakaovac se još od davnina smatra dragocjenom namirnicom. Znanstvena istraživanja pokazala su da sjeme kakaovca sa svojim aktivnim tvarima ima pozitivan učinak na naše zdravlje. Sjemenke se posebnim postupcima sušenja i prženja prerađuju – melju, nakon čega nastaje kakaov prah koji je najbolji sastojak čokolade, čija se vrsta najčešće određuje upravo po udjelu kakaovca.

Tako primjerice bijela čokolada uopće ne sadrži kakao iz sjemenke kakaovca nego samo kakaov maslac, mliječna mora imati najmanje 25% kakaovca, dok crne najčešće imaju 72% i više udjela kakaovca. Osim za proizvodnju čokolade, kakaov prah se koristi za pripremu napitaka, te raznih drugih slastica.

Plijesni mogu kontaminirati kakaovac u mnogim stadijima prerade, a tijekom sušenja na suncu najčešće dolazi do razvoja mikotoksikogenih vrsta plijesni i produkcije mikotoksina Aflatoksina (AF) i okratoksina A (OTA) (Wood, 2001) što uz lošu praksu prilikom manipulacije zrna može imati snažan utjecaj na kvalitetu istoga.

Industrijskom obradom zrna kakaovca prolaze i fazu prženja koja je nužna za sintezu spojeva potrebnih za formiranje potpune arome čokolade (Copetti i sur., 2014) tijekom koje dolazi do smanjenja prisutnosti različitih kontaminanata u sirovini, ali ne i smanjenja AF i OTA koji i nakon termičke obrade namirnica zadržavaju određenu stabilnost (Boudra i sur., 1995; Ferraz i sur., 2010; Manda i sur., 2009). Među najznačajnijim mikotoksинима, kojima se u zadnja tri desetljeća posvećuje velika pozornost, su aflatoksini. Intenzivnije proučavanje utjecaja mikotoksina na ljudsko zdravlje počelo je nakon što je dokazano da



razgradnjom AF u jetri nastaju izrazito karcinogeni metaboliti. Aflatoksine najčešće proizvode plijesni *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus*, a među najvažnijim AF u smislu toksičnosti i pojavljivanja je aflatoksin B1 (AFB1) koji predstavlja najsnažniji hepatokarcinogen poznat u sisavaca (Pleadin i sur. 2014.). Od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC) klasificiran je kao karcinogen s toksičnim i mutagenim svojstvima i svrstan u karcinogene 1. skupine (IARC, 2002). Poseban značaj se pridaje i nefrotoksičnom mikotoksinu, OTA, zbog njegove moguće uloge u nastanku balkanske endemske nefropatije (BEN), a proizvode ga plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium*. Prema IARC-u OTA je mikotoksin s mogućim karcinogenim djelovanjem u ljudi i svrstan u grupu 2B (IARC, 1993).

Zbog različitosti u kemijskoj strukturi, velik je raspon toksičnih učinaka koje izazivaju mikotoksini. Posebno su opasni zbog svoje visoke toksičnosti, već i u malim količinama, te u većini slučajeva zbog odsutnosti bilo kakvog senzorskog upozorenja pri konzumaciji kontaminirane hrane. U posljednjih 10 godina sve je veći broj izvješća o prisutnosti AF i OTA u kakau i čokoladi (Raters and Matissek 2000; Kumagai i sur., 2008; Tabata i sur., 2008; Copetti i sur., 2012). Dosadašnja istraživanja pokazuju da je učestalost mikotoksina u kakao prahu i raznim vrstama čokolade različita. Prisutnost OTA u kakao zrnu, kakao maslacu i kakao prahu iznosi i do 100 %, s maksimalnim vrijednostima od 5,13 µg/kg u kakao prahu i do 14,8 µg/kg u zrnu. U čokoladama dokazana je prisutnost ukupnih AF i to najviše u tamnoj gorkoj čokoladi u koncentraciji od 1,8 µg/kg, a OTA od 0,94 µg/kg (Copetti i sur., 2014).

Stoga je cilj ovog rada bio provjeriti prisutnost ukupnih AF i OTA u tamnoj čokoladi s različitim %-tkom kaka, kakao prahu i instant napitcima na bazi kakao praha koji se mogu naći na tržištu Republike Hrvatske.

Materijali i metode rada

Uzorci

Istraživanje je provedeno na ukupno 120 uzoraka tamnih čokolada (n=115), kakao praha (n=3) i instant napitka na bazi kakao praha (n=2) nasumično sakupljenih na tržištu Republike Hrvatske. Od svakog proizvoda čokolada uzeto je po 5 različitih šarži, a kakao praha i napitka po 3 odnosno 2 različite šarže, te su analizirane svaka šarža posebno.

Uzorci su do provedbe analiza bili pohranjeni na 4 °C.

Određivanje mikotoksina ELISA metodom

Za analizu mikotoksina pripremljena je reprezentativna količina uzoraka čokolade koja je prije usitnjavanja smrznuta, usitnjena kuhinjskim nožem, a zatim fino usitnjena upotrebom mlinca za kavu (Bosch MKM 6000, München, Njemačka) i do analize pohranjena pri temperaturi od -20°C.

Aflatoksini: 5 g fino usitnjene čokolade, kakao praha i instant napitka odvagano je u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL i ekstrahirano s 25 mL 50%-tne vodene otopine metanola (v/v) tijekom 30 minuta na tresilici pri sobnoj temperaturi, a sadržaj je potom profiltriran kroz Whatman filter papir br.1.

Ochratoxin A: 25g fino usitnjene čokolade, kakao praha i instant napitka odvagano je u Erlenmeyer tikvicu od 250 mL, a ekstrakcija OTA provedena je dodatkom 100 mL 50 %-tne vo-

dene otopine metanola (v/v) tijekom 15 min na tresilici. Sadržaj tikvice je potom profiltriran kroz Whatman filter papir br.1.

Dobiveni ekstrakti upotrijebljeni su za određivanje koncentracije mikotoksina ELISA metodom. Postupak određivanja koncentracije proveden je u cijelosti prema nuputcima proizvođača kompetitivnog ELISA kita Ridascreen® Total Aflatoxin i Ochratoxin A (R-Biopharm, Njemačka), koji sadržavaju mikrotitracijsku ploču sa 96 jažica te sve reagense i standardne otopine potrebne za provedbu analiza.

Nakon provedbe svih koraka ELISA testa provedeno je spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan, Sunrise). Na osnovi optičke gustoće standarda načinjena je baždarna krivulja iz koje je izračunata koncentracija AF i OTA u uzorcima. Sve analize su provedene u dvostrukom pokusu.

Validacija metode provedena je prema Markov i sur. (2013).

Statistička analiza

U ovom radu načinjena je deskriptivna statistička obrada, a prikazane su srednje vrijednost koncentracije ukupnih AF i OTA u µg/kg uzorka, minimalne (min) i maksimalne (max) vrijednosti koncentracije mikotoksina te standardne devijacije (SD).

Rezultati i rasprava

Uredbom EU 1881/2006, sa svim izmjenama i dopunama (105/2010, 165/2010, 594/2012 i 1058/2012), koja regulira kontaminante u hrani, ne navodi se regulativa na prisutnost mikotoksina u čokoladi, a također učestalost uzorkovanja i kontrole čokolade nije nigdje ni ničim propisana, pa je sva odgovornost na subjektu u poslovanju s hranom (npr. proizvođaču). Međutim, navedenom uredbom razmatrano je da se ipak postave dopuštene količine za OTA od 1 µg/kg za čokoladu, čokoladu u prahu i tekuću čokoladu, te 2 µg/kg za sjeme kakaovca, kakao masu, kakaov kolač i kakaov prah.

Kakao i njegovi nusproizvodi dugo vremena nisu bili razlog za zabrinutost zbog kontaminacije mikotoksinima, međutim prisutnost mikotoksina u čokoladi postaje veliki problem vezan uz činjenicu da je ovaj proizvod prisutan i u prehrani djece.

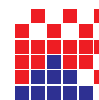
S obzirom na saznanja o opasnostima porijeklom iz hrane, ovim analizama je proveden „screening“ tržišta, kojim je dokazana prisutnost mikotoksina u tamnim čokoladama bez ikakvih nadjeva i dodataka (razna punjenja, lješnjaci, groždice, kikiri-ki), kakao prahu i napitcima na bazi kakao praha (tablica 1).

Tablica 1. *Prisutnost AF i OTA u čokoladama, kakao prahu i napitcima na bazi kakao praha*
Table 1. *Presence of AF and OTA in chocolate, cocoa powder and cocoa powder-based drinks*

Red. br./No.	Zemlja podrijetla / Country of origin	Udio kaka/ share of cocoa	n	Raspon/Range (µg/kg)/	
				AF-ukupni/total AF	OTA
1.	Švicarska	50 % zartbitter	5	0,49-1,05	0,21-0,68
2.	Švicarska	52% tamna čok.	5	0,48-0,88	0,20-0,65
3.	Švicarska	70% intensiv	5	0,65-1,10	0,47-1,01
4.	Švicarska	85% mild čok.	5	0,69-1,19	0,68-1,76
5.	Švicarska	85% tamna čok.	5	0,88-1,15	0,79-2,63
6.	Švicarska	90% mild čok.	5	0,87-1,47	0,75-3,19
7.	Švicarska	99%	5	0,79-1,72	0,91-4,24
8.	Švicarska	85% tamna čok.	5	0,63-1,31	0,52-2,68
9.	Švicarska	78% tamna čok.	5	0,54-1,07	0,49-1,28
10.	Belgija	85%	5	0,67-1,26	0,61-2,12
11.	Belgija	72%	5	0,61-1,12	0,54-1,17
12.	Švicarska	70%	5	0,74-1,18	0,31-0,97
13.	Njemačka	70%	5	0,80-1,34	0,40-0,98
14.	Njemačka	85%	5	0,72-1,39	0,65-1,77
15.	Švicarska	52%	5	0,23-0,56	0,34-0,71
16.	Hrvatska	43% za kuhanje	5	0,22-0,51	0,27-0,59
17.	Hrvatska	72%	5	0,68-1,07	0,38-0,92
18.	Njemačka	43%	5	0,21-0,53	0,2-0,59
19.	Hrvatska	48% za kuhanje	5	0,29-0,62	0,22-0,67
20.	Hrvatska	72% (tamna)	5	0,36-1,05	0,51-1,85
21.	Hrvatska	70% za kuhanje	5	0,31-1,00	0,47-1,18
22.	Hrvatska	48% za kuhanje	5	0,17-0,52	0,27-0,51
23.	Hrvatska	20% (kakao)	3	0,10-0,43	0,21-0,34
24.	Hrvatska	15% čoko drink	2	0,11-0,38	0,10-0,39
25.	Njemačka	32%	5	0,21-0,49	0,29-0,47

Zadnjih desetak godina sve je više izvješća o visokoj pojavnosti mikotoksina u čokoladi i proizvodima na bazi kakaovca diljem svijeta, s naglaskom na OTA dok su literaturni podaci za AF vrlo šturi, jer se prisutnost ukupnih AF u čokoladi za sada provodi u čokoladama koje sadrže orašasto voće (lješnjaci, bademi, orasi i dr.) ili kikiriki, te eventualno u mliječnoj čokoladi i to aflatoxin M1 (AFM1).

U tablicama 2 i 3 prikazani su rezultati broja kontaminiranih uzoraka u odnosu na AF i OTA, te podaci deskriptivne statističke obrade.



Tablica 2. Usporedba koncentracije ukupnih AF u proizvodima na bazi kakaovca s različitim udjelom kakaia
Table 2. Comparison of total AF concentration in cocoa based products with different amounts of cocoa

% - kakaia/ cocoa %	Broj uzoraka/ Number of sam- ples (n)	Pozitivni uzorci/Positive samples n %	Koncentracija AF/AF concentration (µg/kg)		
			Srednja vrijednost±SD / Middle value±SD	Min	Max
85-99%	35	30/35 86	1,05±0,37	0,63	1,72
70-78%	40	32/40 80	0,85±0,34	0,31	1,34
32-52%	40	24/40 60	0,48±0,23	0,17	1,05
15-20%	5	5/5 100	0,29±0,14	0,1	0,43
UKUPNO/ TOTAL	120	91/120 76			

Tablica 3. Usporedba koncentracije OTA u proizvodima na bazi kakaovca s različitim udjelom kakaia
Table 3. Comparison of OTA concentration in cocoa based products with different amounts of cocoa

% - kakaia/ cocoa %	Broj uzoraka/ Number of sam- ples (n)	Pozitivni uzorci/Positive samples n %	Koncentracija OTA/OTA concentration (µg/kg)		
			Srednja vrijednost±SD / Middle value±SD	Min	Max
85-99%	35	32/35 91	1,66±1,04	0,52	4,24
70-78%	40	36/40 90	0,81±0,41	0,31	1,85
32-52%	40	32/40 80	0,44±0,22	0,20	0,71
15-20%	5	5/5 100	0,30±0,11	0,10	0,39
UKUPNO/ TOTAL	120	105/120 88			

Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablicama 2 i 3 vidljivo je da su mikotoksini dokazani u 88% analiziranih uzoraka, od čega su AF dokazani u 76%, a OTA je dokazan u svim pozitivnim uzorcima. U ostalim uzorcima čokolade AF i OTA nisu bili dokazani.

Koncentracije AF u 86% uzoraka čokolade koja je sadržavala od 85-99% kakaia bile su u rasponu od 0,63 do 1,72 µg/kg, u uzorcima sa 70-78% kakaia od 0,31 do 1,34 µg/kg, a u uzorcima do 58% kakaia raspon koncentracije je bio od 0,1 do 1,05 µg/kg. Najviša razina ukupnih AF (1,72 µg/kg) određena je u uzorku tamne čokolade s 99% kakaia (tablica 2). Uspoređujući rezultate dobivene ovim istraživanjem s rezultatima iz literature može se zaključiti da su u suglasju. Kumagai i sur. (2008) su u 22 od 42 uzorka gorke čokolade dokazali prisutnost AF u koncentraciji od 0,18 do 0,60 µg/kg, dok su Copetti i sur. (2012) dokazali 1,70 µg/kg AF u uzorcima gorke čokolade i 0,11-1,65 µg/kg AF u tamnoj čokoladi.

Zadnjih desetak godina sve je više izvješća o visokoj pojavnosti OTA u čokoladi i proizvodima na bazi kakaovca di-

ljem svijeta. Istraživanja o unosu OTA dovela su do zaključka da kakaio predstavlja oko 5% (Miraglia i Brera, 2002), a čokolada oko 6% (Codex Alimentarius, 2012) ukupne izloženosti ljudi OTA u Europi.

Iz dobivenih rezultata (tablice 2 i 3) vidljivo je da je više pozitivnih uzoraka kontaminirano s OTA nego s AF, što se može objasniti time da najveći dio OTA prisutan u zrnu kakaia dolazi iz ljuske zrna, a povezan je s oštećenjima mahune, klimatskim uvjetima tijekom berbe i neprikladnim uvjetima uskladištenja/obrade (Amezqueta et al. 2005).

U uzorcima čokolada koje su sadržavale od 70-99% kakaia OTA je dokazan u oko 90% uzoraka s rasponom koncentracija od 0,31- 4,24 µg/kg, a u 80% uzoraka čokolade sa 32 - 52 % kakaia koncentracije su bile od 0,20 do 0,71 µg/kg. U uzorku čokolade s 99% kakaia dokazana je i najviša koncentracija OTA od 4,24 µg/kg.

U uzorcima kakaio praha i napitcima na bazi kakaio praha i AF i OTA su dokazani u svim uzorcima (100%).

Dobiveni rezultati prisutnosti OTA u analiziranim uzorcima u suglasju su s rezultatima iz literature koji navode da je

OTA dokazan u 92 – 100% analiziranih proizvoda u rasponu koncentracija od 0,17 to 2,41 $\mu\text{g}/\text{kg}$, od čega u 60 – 100% tamnih čokolada (Copetti i sur., 2012.; Gilmour i Lindblom, 2008.; Miraglia i Brera, 2002.).

Uspoređujući rezultate dokazanih maksimalnih vrijednosti za AF i OTA, vidljivo je da su u čokoladama s visokim udjelom kakaa (70-99%) određene više koncentracije OTA (1,85 i 4,24 $\mu\text{g}/\text{kg}$) u odnosu na AF (1,34 i 1,72 $\mu\text{g}/\text{kg}$), dok su u čokoladama do 52% kakaa, u kakao prahu i napitcima na bazi kakao praha određene više koncentracije AF u odnosu na OTA (tablice 2 i 3).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da prema zemlji podrijetla najviše prosječne vrijednosti AF i OTA nalazimo u čokoladama iz Švicarske (1,03 i 1,41 $\mu\text{g}/\text{kg}$), dok su najmanje prosječne vrijednosti dokazane u proizvodima iz Hrvatske (0,74 i 0,89 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Belgijske čokolade prosječno sadrže 0,91 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AF i 1,11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTA, dok Njemačke čokolade u odnosu na Belgijske sadrže više AF (1,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Prema Codex Standard for Chocolate (Codex alimentarius, 2003) tamne čokolade trebaju sadržavati ne manje od 14% kakao mase i minimalno 35% kakao praha. U posljednjih nekoliko godina porasla je potrošnja čokolade s visokim %-tkom kakaa jer se smatra da kakao ima pozitivan učinak na zdravlje u ljudi, međutim s druge strane takvi proizvodi predstavljaju potencijalnu opasnost jer mogu sadržavati veliku količinu AF i OTA. Stoga je potrebno kontinuirano praćenje pojavnosti AF i OTA u čokoladi, ali i istraživanja s ciljem smanjenja nakupljanja ovih toksina u sirovini za izradu čokolade.

Prema našim saznanjima ovo je prvi puta da je izvješteno o prisutnosti AF i OTA u čokoladi na tržištu Republike Hrvatske.

Zaključak

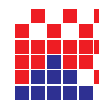
Temeljem provedenih analiza određivanja prisutnosti ukupnih AF i OTA vidljivo je da su u uzorcima čokolada s različitim % kakaa (od 32 do 99%) bez ikakvih nadjeva i dodataka (razna punjenja, lješnjaci, grožđice, kikiriki), u uzorcima kakao praha (20% kakaa) i napitcima na bazi kakao praha (15% kakaa) prisutni mikotoksini. Da bi dobiveni rezultati mogli poslužiti za procjenu doprinosa za ukupnu izloženost mikotoksinima porijeklom iz hrane, potrebno je načiniti daljnja istraživanja i na uzorcima čokolade koje sadrže dodatke koji dodatno mogu doprinijeti povećanju sadržaja mikotoksina, kao što su orašasti plodovi i sušeno voće.

Zahvala

Autori se zahvaljuju Hrvatskoj agenciji za hranu za financijsku potporu dodijeljenu za ova istraživanja.

Reference

- Amézqueta S, González-Peñas E, Murillo M, López de Cerain A. (2005) Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: effect of shelling. *Food Addit Contam A*. 22 590–596.
- Boudra H., Le Bars P., Le Bars J. (1995) Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 1156–1158
- Codex Alimentarius. (2003) Codex standard for chocolate and chocolate products. CODEX STAN 87e1981, Rev. 1 e 2003.
- Codex Alimentarius Commission. (2012) Discussion paper on ochratoxin A in cocoa. Joint FAO/WHO Food Standards Program, FAO, Rome. Dostupno na: ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf6/cf06_15e.pdf. Pristupljeno: 24.11.2015.
- Copetti M.V., Iamanaka B.T., Pereira J.L., Lemes D.P., Nakano F., Taniwaki M.H. (2012) Co-occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control* 26 36–41.
- Copetti M.V., Iamanaka B.T., Pitt J.I., Taniwaki M.H., (2014) Fungi and mycotoxins in cocoa. From farm to chocolate *International Journal of Food Microbiology*, 178 13–20.
- European Commission (2010) Commission Regulation (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. *Off J Eur Union* 35:7–8
- Ferraz M.M., Farah A., Iamanaka B., Perrone D., Copetti M.V., Marques V.X. (2010) Kinetics of ochratoxin destruction during coffee roasting. *Food Control*, 21 872–877
- Gilmour, M., i Lindblom, M. (2008) Management of ochratoxin A in the cocoa supply chain: a summary of work by the CAOBISCO/ECA/FCC working group on ochratoxin A. U: J. F. Leslie, R. Bandyopadhyay, & A. Visconti (ed.): *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade*, str. 231-243. Wallingford: CABI.
- IARC - International Agency for Research on Cancer, Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans, Vol. 56, IARC Press, Lyon (1993)
- IARC- International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene (Vol. 82, pp. 301–366). Lyon: IARC Press. (2002)
- Kumagai, S., Nakajima, M., Tabata, S. E., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., (2008) Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail food and intake of these mycotoxins in Japan. *Food Additives and Contaminants*, 25 (9) 1101-1106.
- Manda P., Dano D.S., Kouadio J.H., Diakite A., Sangare-Tigori B., Ezoulin M.J.M. (2009) Impact of industrial treatments on ochratoxin A content in artificially contaminated cocoa beans. *Food Additives and Contaminants*, 26 (7) 1081–1088
- Markov K., Pleadin J., Bevardi M., Vahčić N., Sokolić-Mihalak D., Frece J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*, 34 312-317



Miraglia, M., Brera, C. (2002) Reports on tasks for scientific cooperation, task 3.2.7. Dostupno na: http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf. Pristupljeno 14.12.2015.

Pleadin J., Frece J., Markov K. (2014) Aflatoksini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 9 (3-4) 75-82

Raters M., Matissek R., (2000) Vorkommen der mykotoxine aflatoxin B1, B2, G1, G2 und ochratoxin A in kakao und kakaoprodukten. Projekt Nr. 9 der Stiftung der Deutschen Kakao- und Schokoladenwirtschaft, Hamburg

Tabata S., Iida K., Kimura K., Iwasaki Y., Nakazato M., Kamata K., Hirokado M. (2008) Investigation of ochratoxin A, B and citrinin contamination in various commercial foods [in Japanese]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 49 111–115

Wood G.A.R. (2001) From harvest to store, Wood G.A.R., Lass R.A. (ed.): *Cocoa*, Longman Scientific and Technical, New York, str. 444–504