

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Sterigmatocistin –prekursor aflatoksina B₁ u hrani i hrani za životinje

Sterigmatocystin - aflatoxin B₁ precursor in food and feed

Tina Lešić^{1*}, Ivana Kmetič³, Maja Kiš², Ana Vulić¹, Nina Kudumija¹, Manuela Zadravec⁴, Teuta Murati³, Jelka Pleadin¹

¹ Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za analitičku kemiju, Savska cesta 143, 10 000 Zagreb, Hrvatska

² Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Križevci, Laboratorij za mikrobiologiju hrane i hrane za životinje, Zakmardijeva 10, 48260 Križevci, Hrvatska

³ Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Laboratorij za toksikologiju, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

⁴ Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za mikrobiologiju hrane za životinje, Savska cesta 143, 10 000 Zagreb, Hrvatska

*Corresponding author: lesic@veinst.hr

Sažetak

Sterigmatocistin je mikotoksin kojeg sintetiziraju uglavnom plijesni iz roda *Aspergillus* te u manjoj mjeri iz rodova *Emericella*, *Chaetomium*, *Humicola* i *Botryotrichum*. Ovaj mikotoksin je prekursor u biosintezi aflatoksina, njemu slične kemijske strukture, pa su tako i toksični učinci sterigmatocistina slični onima aflatoksina B₁. Sterigmatocistin pokazuje brojne toksične učinke u organizmu, uključujući karcinogeno i mutageno djelovanje, te je i Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer, IARC) sterigmatocistin uključila u skupinu 2B potencijalnih karcinogena za ljude. Podaci o prisutnosti sterigmatocistina u hrani i hrani za životinje su ograničeni, te je od strane Europske agencije za sigurnost hrane (eng. European Food Safety Authority, EFSA), s ciljem procjene rizika izloženosti ljudi ovom mikotoksinu, dana preporuka za prikupljanje podataka o njegovoj pojavnosti uz primjenu visokoosjetljivih analitičkih metoda. Sterigmatocistin je do sada pronađen u hrani za životinje, žitaricama, kruhu, orašastim plodovima, zrnima kave, začинима, pivu te siru. Kako bi se spriječila kontaminacija namirnica te negativni učinci sterigmatocistina na zdravlje ljudi i životinja, jedan od ključnih čimbenika predstavlja prevencija rasta toksikotvornih plijesni.

Ključne riječi: sterigmatocistin, mikotoksin, hrana i hrana za životinje, kontaminacija, toksičnost

Abstract

Sterigmatocystin is a mycotoxin mainly produced by fungi of different *Aspergillus* species and to a lesser extent by others species such as *Emericella*, *Chaetomium*, *Humicola* and *Botryotrichum*. This mycotoxin is a precursor in aflatoxin biosynthetic pathway, with similar chemical structure, so the toxic effects of sterigmatocystin are similar to those of aflatoxin B₁. Sterigmatocystin shows various toxic effects, including carcinogenic and mutagenic effects, thus, the International Agency for Research on Cancer (IARC) included sterigmatocystin in a group 2B carcinogen, representing possible human carcinogens. Data about sterigmatocystin occurrence in food and feed are limited so the European Food Safety Authority (EFSA) recommended collection of more occurrence data by highly sensitive analytical methods to allow assessment of dietary risk exposure. So far sterigmatocystin has been reported to occur in animal feed, grains, bread, nuts, coffee beans, spices, beer and cheese. In order to prevent food contamination and negative effects of sterigmatocystin on human and animal health, one of the key factors represents prevention of growth of toxigenic moulds.

Keywords: sterigmatocystin, mycotoxin, food and feed, contamination, toxicity



Uvod

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni niske molekularne mase, koji se mogu razlikovati s obzirom na vrstu plijesni koja ih proizvodi, kemijsku strukturu, put biosinteze te način djelovanja u organizmu. Glavni izvor mikotoksina u prehrani ljudi su žitarice i proizvodi na bazi žitarica, a pronalaze se i u različitim namirnicama životinjskog podrijetla. Do biosinteze mikotoksina dolazi pod određenim mikroklimatskim uvjetima, ovisno o sadržaju vlage u proizvodu, relativnoj vlažnosti zraka, temperaturi, pH vrijednosti, supstratu, fizičkom oštećenju supstrata i prisutnosti spora plijesni. Toksični učinci mikotoksina na zdravlje ljudi i životinja nazivaju se mikotoksikoze, a pojavljuju se uslijed konzumacije kontaminirane hrane, udisanjem ili unosom putem kože (Pleadin i sur., 2018).

Među mikotoksinima, najveći javnozdravstveni značaj imaju aflatoksin B₁ (AFB₁) te okratoksin A (OTA). Međutim, neke vrste plijesni mogu producirati i druge mikotoksine, među kojima je ciklopiazonična kiselina (CPA), citrinin (CIT) te sterigmatocistin (STC). Njihova pojavnost te utjecaj na ljudsko zdravlje su još nedovoljno istraženi. STC je prvi puta izoliran 1954. godine iz *Aspergillus versicolor*, ali mu je biološka aktivnost otkrivena tek kasnih 60-tih godina prošlog stoljeća (Terao, 1983). STC predstavlja karcinogeni prekursor aflatoksina, s kojim dijeli svoj put biosinteze, te imaju sličnu kemijsku strukturu. Ovi mikotoksini su patogeni hrane i hrane za životinje, a osim štetnog učinka na zdravlje mogu imati i značajan negativan ekonomski utjecaj na agronomiju i prehrambenu industriju (Diaz Nieto i sur., 2018).

Istraživanja o pojavnosti, toksičnosti i metodama redukcije su značajno manje zastupljena za sterigmatocistin u odnosu na druge mikotoksine. Ovaj rad sažima različite aspekte vezane uz sterigmatocistin, od fizikalno kemijskih svojstava, mehanizma djelovanja, toksičnih učinaka i pojavnosti u hrani i hrani za životinje, do metoda detekcije i kvantifikacije te prevencije pojavnosti i redukcije ovog mikotoksina.

Struktura i fizikalno kemijska svojstva

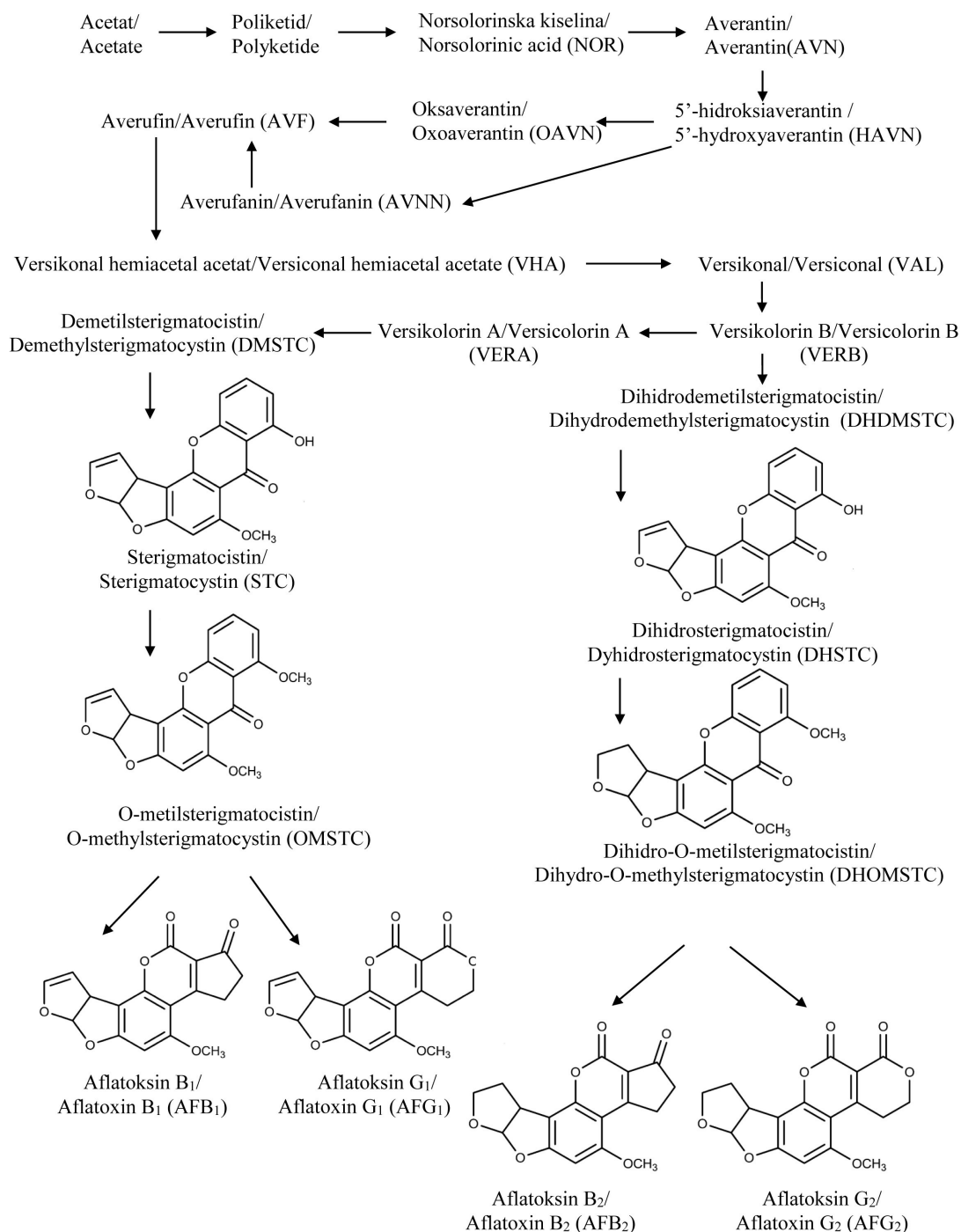
Sterigmatocistin, prema IUPAC-u: (3aR,12cS)-3a,12c-dihidro-8-hidroksi-6-metoksi-7H-furo[3',2':4,5] furo[2,3-c] ksanton-7 (C₁₈H₁₂O₆), je poliketidni mikotoksin molekulske mase 324,28 g/mol. Ovaj mikotoksin strukturno je povezan s AFB₁. STC pripada u furofuransku skupinu metabolita plijesni, koja uključuje aflatoksine i sterigmatocistine pri čemu AFB₁ sadrži kumarin, a STC ksantonski prsten fuzioniran s dihidrodifuranskim prstenom (Van der Watt, 1974). Policiklička aromatska molekula STC ima hidroksilnu i metoksi skupinu kao supstituente.

STC je topljiv u kloroformu, benzenu, metanolu, etanolu i acetonitrilu te drugim organskim otapalima, dok je slabije topljiv u vodenim otopinama. Kristalizira u obliku svjetlo žutih iglica. Temperatura tališta mu je 246 °C, a UV apsorpcijski maksimum pri 245 i 325 nm. STC je okarakteriziran slabom fluorescencijom. Metanol ili etanol u kiselom mediju produciraju dihidroetoksisterigmatocistin (Davis, 1981; Versilovskis i De Saeger, 2010).

Biosinteza, apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija

STC uglavnom sintetiziraju plijesni iz roda *Aspergillus*, primjerice *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nidulans* te *A. versicolor* koja se smatra glavnim proizvođačem, a od ostalih rodova *Emericella*, *Chaetomium*, *Humicola*, *Bipolaris*, *Botryotrichum* i *Podospora* (Davis, 1981; Rank i sur., 2011). *A. versicolor* je kserofilna plijesan s minimalnom a_w vrijednošću za rast od 0,75, a maksimalnom 0,95. Raste u temperaturnom rasponu od 4 - 40 °C s optimalnom temperaturom rasta pri 30 °C, dok je optimalni temperaturni raspon za tvorbu toksina STC između 23 i 29 °C (Versilovskis i De Saeger, 2010). Jedan od glavnih eksternih čimbenika u kontroli biosinteze STC kod *A. nidulans* je pH vrijednost, pri čemu se proizvodnja STC povećava u lužnatom pH (Delgado-Virgen i Guzman de Peña, 2009).

STC dijeli svoj put biosinteze s aflatoksinom (Slika 1). Izravan prekursor AFB₁ i aflatoksina G₁ (AFG₁) je *O*-metilsterigmatocistin kojeg vrste *A. nidulans* i *A. versicolor* ne mogu sintetizirati iz STC. Posljedično, supstrati obrasli ovim plijesima mogu sadržavati veće količine STC koji nije metaboliziran do aflatoksina. S druge strane, supstrati koje kontaminiraju *A. flavus* i *A. parasiticus* imaju niske razine STC jer je većina prevedena u aflatoksine (Yu i sur., 2004). Biosinteza aflatoksina i STC započinje formiranjem norsolorinske kiseline, prvog stabilnog metabolita, iz acetyl-CoA (Ac-CoA) i malonil-CoA (Ma-CoA) uz djelovanje enzimskog kompleksa norsolorinska kiselina sintaza. Norsolorinska kiselina (NOR) se zatim nizom reakcija transformira u versikolorin B (VERB). VERB je međuprodukt za sintezu aflatoksina B₂ (AFB₂) i G₂ (AFG₂), dok međuprodukt za biosintezu AFB₁ i AFG₁ nastaje dehidrogenacijom VERB u versikolorin A (VERA). Konverzijom VERA i VERB djelovanjem kompleksa demetilsterigmatocistin sintaza nastaju dimetilsterigmatocistin (DMST) i dihidrodemetilsterigmatocistin (DHDMST). Metilacijom slobodnih hidroksilnih skupina DMST i DHDMST djelovanjem enzima *O*-metiltransferaze I i II nastaju sterigmatocistin (STC) i dihidrosterigmatocistin (DHST), odnosno *O*-metilsterigmatocistin (OMST) i dihidro-*O*-metilsterigmatocistin (DHOMST). OMST se prevodi u AFB₁ i AFG₁, a DHOMST u AFB₂ i AFG₂ (Cleveland i sur., 2009; Yabe i Nakajima, 2004).



Slika 1. Put biosinteze sterigmatocistina i aflatoksina

Figure 1. Biosynthetic pathway of sterigmatocystin and aflatoxins

Dosadašnja istraživanja pretpostavljaju ograničenu apsorpciju STC nakon oralne primjene. Nakon oralnog tretmana štakora sa ³H-STC, radioaktivnost je zabilježena uglavnom u jetri, želucu, bubrezima, dvanaesniku i plućima (Wang i sur., 1991). Podaci o biotransformaciji sterigmatocistina su nedostadni. Poznato je da se STC metabolizira u jetri i plućima uz pomoć citokrom P450 enzima u različite hidrokسيمetabolite i njihove reaktivne ekso-epokside koji tvore DNA adukte. Metabolizam faze I sterigmatocistina podrazumijeva nastajanje reaktivnih epoksida posredstvom citokroma P450 kao i reakcije mono- i dihidrosilacije. Metabolizam faze II podrazumijeva nastajanje gluku-

ronida STC te monohidroksi-STC, kao i sulfat konjugata monohidroksi-STC i glutation konjugata monoooksigeniranog STC (EFSA, 2013). Ekskrecija konjugiranog STC i njegovih hidrosiliranih metabolita odvija se putem žuči i urina. Istraživanje Walkow i sur. (1985) pokazalo je da se većina STC dana štakorima oralno izlučila putem fecesa (64-92 %), a manji dio urinom (oko 10 %). U istraživanju na majmunima, 50-80 % oralno unesenog STC je izlučeno putem fecesa unutar 48 h (Steyn i Thiel, 1976).



Toksični učinci u organizmu

Toksičnost STC strukturno je uvjetovana i ovisi o nezasićenoj $\Delta^{1,2}$ -furobenzofuran skupini te položaju metoksi- i hidroksi-skupina na ksantonskom prstenu (Engelbrecht i Altenkirk, 1972). Toksični učinci STC slični su onima AFB₁ te se u literaturi također navode potencijalna karcinogena, mutagena i teratogena svojstva ovog spoja.

STC je ipak manje akutno toksičan nego AFB₁, i to 10 puta ili više (Butler, 1964; Davis, 1981). Akutna toksičnost varira i ovisi o čimbenicima kao što su način primjene i vrsta životinja. Toksičnost sterigmatocistina za pojedine pokusne životinje, izražena kao LD₅₀ vrijednost, kreće se u rasponu od 32 mg/kg tjelesne mase u majmuna do 800 mg/kg u miševa (Tablica 1) (Purchase i Van der Watt, 1969; Davis, 1981). LD₅₀ za pet

dana stare pileće embrije je 14,9 µg/jajetu (Terao, 1983). Ciljni organi akutnih toksičnih učinaka su jetra i bubrezi, na kojima su uočeni degradacija hijalina, nekroza i hemoragija (Purchase i Van der Watt, 1969). U istraživanju Purchase i Van der Watt (1970) s ponovljenim intragastričnim dozama STC (20 mg/kg svaka dva tjedna tijekom dvanaest mjeseci) provedenom na majmunima, nakon četiri do šest mjeseci tretman je uzorkovao kronični hepatitis. Nastavak tretmana uzrokovao je agresivni hepatitis i nekrozu stanica hepatocita te progresivnu fibrozu.

Tablica 1. Akutna toksičnost sterigmatocistina i aflatoxina B₁ (Purchase and Van der Watt, 1969; Davis, 1981)

Table 1. Acute toxicity of sterigmatocystin and aflatoxin B₁ (Purchase and Van der Watt, 1969; Davis, 1981)

Vrsta životinje/ Animal species	LD ₅₀ (mg/kg)			
	Sterigmatocistin/Sterigmatocystin		Aflatoxin B ₁ /Aflatoxin B ₁	
	Intraperitonealno/ Intraperitoneal	Peroralno/ Peroral	Intraperitonealno/ Intraperitoneal	Peroralno/ Peroral
Štakori/Rats	60-75	120-166	7,2-17,9	7,2-16
Miševi/Mouses	800	-	9,0	-
Majmuni/Monkeys	-	32	-	2,2-7,8

Mutagenost STC uspoređivana je s AFB₁, pri čemu postoje određene kvantitativne razlike (McCann i sur., 1975; Mori i sur., 1986). Jedan od mehanizama kojim STC ispoljava mutagenost podrazumijeva nastajanje reaktivne epoksi skupine koja se kovalentno veže na DNA molekulu stvarajući STC-N⁷-gvanin adukt (Essigmann i sur., 1979). Drugi mehanizam podrazumijeva hidroksilaciju aromatskog prstena, formirajući katehol koji zatim reagira s DNA. Pretpostavlja se da je put nastajanja katehola češći zbog njegovog pronalaska u mikrosomima jetri kod ljudi i štakora u većoj mjeri u odnosu na epoksid (Pfeiffer i sur., 2014). Stanice sisavaca *in vitro* izložene STC-u pokazuju inhibiciju mitoze, zastoj u staničnom ciklusu u G2 fazi te apoptozu (Engelbrecht i Altenkirk, 1972; Terao i sur., 1975; Diaz Nieto i sur., 2018; Versilovskis i De Saeger, 2010). STC inducira kromosomske aberacije i izmjenu sestrinskih kromatida te povećava nastanak reaktivnih kisikovih radikala i lipidnu peroksidaciju u eksperimentalnim životinjama *in vivo* (Ueda i sur., 1984; EFSA, 2013).

Karcinogenost STC je uočena nakon oralne, intragastrične, intraperitonealne i dermalne izloženosti različitih analiziranih vrsta životinja. Nakon oralne izloženosti, primjećene su premaligne te maligne lezije kao što su hepatocelularni karcinom, hemangiosarkom u jetri, angiosarkom u masnom tkivu te plućni adenomi (Purchase i Van der Watt, 1970; Terao i sur., 1975; Diaz Nieto i sur., 2018). Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) svrstala je STC u skupinu 2B potencijalnih karcinogena za ljude (IARC, 2002). Iz dostupnih podataka o hemangiosarkomu u jetri muških štakora, EFSA je za STC izračunala referentnu dozu (*benchmark* doza, BMD) BMDL₁₀ od 0,16 mg/kg/dan, odnosno dozu koja dovodi do 10 % odgovora u populaciji (EFSA, 2013).

Pojavnost u hrani i hrani za životinje

Toksikotvorne STC-producirajuće plijesni pronađene su u raznolikoj hrani. Primjerice, *A. versicolor* izolirana je iz najčešćih vrsta žitarica (pšenica, ječam, riža), brašna, kruha, zrna kave, groždanog soka, mesa te sira (Van der Watt, 1974; Davis, 1981). Kontaminacija plijesnima roda *Aspergillus* predstavlja zdravstveni rizik zbog moguće produkcije STC, te drugih mikotoksina kao što su AFB te OTA. Podaci o pojavnosti STC u hrani te hrani za životinje su ograničeni. Dokazana je njegova pojavnost u hrani za životinje, žitaricama, kruhu, orašastim plodovima, zrnima kave, začinima, pivu te siru (Versilovskis i De Saeger, 2010; EFSA, 2013) (Tablica 2).

Tablica 2. *Pojavnost sterigmatocistina u hrani i hrani za životinje*
Table 2. *Occurrence of sterigmatocystin in food and feed*

Vrsta hrane/Food	Utvrđene koncentracije/Determined concentrations ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Referenca/Reference
Žitarice i proizvodi od žitarica/Grains and grain-based products	0,12 – 157	Jarvis, 1982; Versilovskis i Mikelsona, 2008a; Versilovskis i sur., 2008b; Pande i sur., 1990; Bertuzzi i sur., 2017
Začini/Spices	10 - 142	Saxena i Mehrotra, 1989; El-Kady i sur., 1995
Pivo/Beer	4 - 7,8	Versilovskis i sur., 2008c
Sir/Cheese	0,52 - 63	Bartos i Matyas, 1982; Versilovskis i sur., 2009; Abd Alla i sur., 1996
Orašasti plodovi/Nuts	12,2 – 16,8	Youssef i sur., 2008
Kava/Coffee beans	11 - 1200	De Palo i sur., 1977; Bokhari i Aly, 2009
Hrana za životinje/Feed	8 – 7750	EFSA, 2013; Vesonder i Horn 1985; Monbaliu i sur., 2010

Analiza *Roumy* sira pokazala je prisutnost STC u rasponu koncentracije od 10 – 63 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Zrenjem sira (preko šest mjeseci) inhibirala se proizvodnja STC (Abd Alla i sur., 1996). Analiza sira s tržišta Latvije i Belgije pokazala je kontaminaciju STC-om u dva od 21-og analiziranog uzorka u koncentracijama 0,52 i 1,23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Versilovskis i sur., 2009). Prvi podatak o STC u začinima odnosio se na začine iz Indije, gdje je STC detektiran u crnom papru (105 - 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) te komoraču (142 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Saxena i Mehrotra, 1989). U deset uzoraka različitih začina iz Egipta, STC je određen u koncentracijama od 18 do 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (El-Kady i sur., 1995). Analiza žitarica visoko osjetljivom LC-MS/MS metodom pokazala je da je u 26 % od ukupno 215 analiziranih uzoraka STC detektiran u rasponu koncentracija od 0,7 do 83 $\mu\text{g}/\text{kg}$, pri čemu je najveća koncentracija određena u ječmu i pšenici (Versilovskis i sur., 2008b). U provedenim istraživanjima uočena je i supojavnost AFB₁ i STC (Versilovskis i sur., 2008c; Yogendrarajah i sur., 2014).

Ranije korištene metode za određivanje STC većinom su imale relativno visoki limit detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) ili oni nisu bili navedeni te se stoga negativni rezultati trebaju samo djelomično uzeti u obzir (EFSA, 2013). Analizom rezultata od strane Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) koji su uključivali 600-tinjak uzoraka hrane i hrane za životinje, vrijednosti STC u hrani bili su < LOD ili < LOQ primjenjenih analitičkih metoda, dok je u hrani za životinje detektiran u malom broju uzoraka u rasponu koncentracija od 8 do 28 $\mu\text{g}/\text{kg}$. EFSA Panel zaključio je da su podaci o pojavnosti STC limitirani da bi se mogla procijeniti izloženost ljudi i životinja ovom mikotoksinu te da je potrebno prikupiti više podataka o prisutnosti STC u hrani i hrani za životinje visokoosjetljivim metodama s LOQ manjim od 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EFSA, 2013).

Literaturni podaci pokazuju da unosu mikotoksina u organizam potro-

šača pridonose i meso i mesni proizvodi (Bailly i Guerre, 2009; Markov i sur., 2013; Pleadin i sur., 2015a; Pleadin i sur., 2019). Prisutnost mikotoksina u mesu i mesnim proizvodima može biti posljedica kontaminirane stočne hrane (ukupna prenesena količina tj. „carry over“) ili začina koji se koriste u njihovoj proizvodnji. Provedena istraživanja pokazala su značajan prijenos OTA iz kontaminirane hrane za životinje u mesne proizvode, posebice one koje sadrže iznutrice (Pleadin i sur., 2013; Perši i sur., 2014). Isto tako, mesne proizvode kao što su tradicionalni mesni proizvodi tijekom procesa zrenja obrastaju plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium* (Pleadin i sur., 2019), koje mogu producirati mikotoksine, te tada govorimo o izravnoj kontaminaciji. OTA je utvrđen u koncentracijama od 1,23 do 9,95 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u različitim mesnim proizvodima s hrvatskog tržišta (Markov i sur., 2013; Pleadin i sur., 2015a), a AFB₁ je određen u koncentracijama do 4,49 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Frece i sur., 2010; Pleadin i sur., 2015a). Pojavnost STC u mesu i mesnim proizvodima nije dovoljno istražena, a budući da neka istraživanja pokazuju prisutnost STC u začinima te stočnoj hrani, kako je prethodno navedeno, svakako postoji i mogućnost takve neizravne kontaminacije mesa i proizvoda od mesa. Ujedno, budući da STC kao prekursor AFB₁ i sekundarni metabolit plijesni rodova *Aspergillus* i drugih, može i izravno kontaminirati različite vrste hrane, nužna je provedba daljnjih istraživanja u ovom području.

Analitičke metode

Detekcija STC provodi se imunokemijskim ili kromatografskim metodama. Od imunokemijskih metoda koristi se imunoenzimska kompetitivna ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) s LOD od 12 do 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u različitoj analiziranoj hrani te hrani za životinje



(Versilovskis i De Saeger, 2010). ELISA je jednostavna, brza i ekonomski povoljna metoda, ali njen nedostatak je moguća križna reaktivnost strukturno sličnih spojeva. Oplatowska- Stachowiak i sur. (2018) razvili su direktnu kompetitivnu ELISA metodu za detekciju STC u riži, pšenici i kukuruzu s LOD od 1,1- 1,3 µg/kg, a križna reaktivnost s aflatoksinima B₁, B₂, G₁, G₂ i M₁ bila je manja od 1 %. Pozitivne rezultate potrebno je potvrditi primjenom potvrđnih metoda, npr. tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) u kombinaciji s masenom spektrometrijom (Pleadin i sur., 2015b).

U literaturi se za određivanje STC najviše spominje tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*, TLC) s fluorescentnom detekcijom (engl. *fluorescence detector*, FLD) s limitima detekcije u rasponu od 2 - 140 µg/kg, što ne predstavlja visokoosjetljivu analitičku metodu za određivanje ovog mikotoksina. STC slabo fluorescira pod UV svjetlom te se stoga koriste određene metode za pospješivanje njegove fluorescencije, kao što je, primjerice, sprejanje s aluminijskim kloridom (Versilovskis i De Saeger, 2010). Nedostatak TLC metoda je ujedno i nedovoljna selektivnost te se stoga ova metoda danas uglavnom koristi kao kvalitativna orijentacijska metoda.

U današnje vrijeme najznačajnija je primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s UV ili FLD detektorom, a sve češće u kombinaciji s masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). LC-MS/MS je moderna metoda visoke osjetljivosti za precizno kvantitativno određivanje analita. Limiti detekcije variraju ovisno o vrsti matriksa (Versilovskis i De Saeger, 2010). HPLC metode primjenjene su na ekstraktima različite hrane, hrane za životinje te česticama prašine s LOD od 0,3 do 100 µg/kg (EFSA, 2013). Versilovskis i sur. (2009) razvili su LC-MS/MS metodu za određivanje STC u siru s limitom detekcije 0,03 µg/kg. Li i sur. (2018) razvili su UHPLC-MS/MS metodu za detekciju 17 mikotoksina, pri čemu je LOD za STC iznosio 1 µg/kg, a Manizan i sur. (2018) za 77 mikotoksina s LOD za STC od 0,62 µg/kg.

Prevenција i redukcija

Kontaminacija mikotoksinima moguća je tijekom svih faza proizvodnje te čuvanja hrane i hrane za životinje. Kako bi se spriječila njihova pojavnost u hrani, ključni čimbenik predstavlja kontrola i prevencija rasta toksikotvornih plijesni. Štetne učinke mikotoksina moguće je izbjeći spriječavanjem onečišćenja sirovina, odstranjivanjem onečišćenog materijala i smanjenjem količine mikotoksina u hrani. Postoje različite fizikalne, biološke i kemijske metode za smanjenje prisutnosti i količine mikotoksina u hrani čija učinkovitost ovisi o svojstvima hrane, kao i samog mikotoksina. Dokazano je da se smanjenje količine mikotoksina može postići uz primjenu fizikalnih metoda kao što su čišćenje, ljuštenje, mljevenje, kuhanje, prženje i gama zračenje (Domijan i sur., 2015; Markov i sur., 2015; Pleadin i sur., 2018).

Neka istraživanja pokazuju kako procesiranje hrane može dovesti do smanjenja koncentracije STC. Primjerice, proces mljevenja smeđe riže te prženje zrna kave na 200 °C kroz 15-20 min uklanja i do 70 % STC (Takahashi i sur., 1984; Bokhari i Aly, 2009). Tijekom procesa zrenja sira, 80 % STC iz kontaminiranog mlijeka nalazi se u grušu zbog njegove slabe topljivosti u vodenom mediju (Abd Alla i sur., 1996). Prilikom pečenja kruha napravljenog od brašna kontaminiranog STC-om, pri 200-220 °C STC je pokazao stabilnost i nije došlo do njegove značajne redukcije (Versilovskis i Bartkevics, 2012). Istraživanje Kocić-Tanackov i sur. (2012) ispitalo je utjecaj ekstrakta origana na smanjenje biosinteze STC s *A. versicolor*, pri čemu se ekstrakt pokazao kao potencijalni konzervans hrane u spriječavanju nastanka onečišćenja plijesnima te produkcije STC.

Da bi se spriječili štetni učinci na zdravlje ljudi i životinja potrebno je poduzeti sve preventivne radnje u cilju spriječavanja kontaminacije

mikotoksinima koje se razlikuju ovisno o tome da li se radi o žitaricama, mesu i mesnim proizvodima, orašastim plodovima ili nekoj drugoj vrsti sirovina ili finalnih proizvoda. Stoga su potrebna daljnja istraživanja o detekciji STC, kako bi se mogle provoditi sustavne kontrole pojavnosti, kao i o stabilnosti STC i metodama njegove redukcije. Najveće dopuštene količine STC u Europskoj uniji, kako za hranu tako i za hranu za životinje, još nisu definirane zakonodavstvom, što upućuje na nužnost daljnjih istraživanja u ovom području te uspostavu zakonodavstva za različite kategorije hrane biljnog i životinjskog podrijetla. Neke zemlje (Češka i Slovačka) su nacionalnim zakonodavstvom propisale najveće dopuštene količine STC za rižu, povrće, meso i mlijeko od 5 µg/kg, te 20 µg/kg za ostalu hranu, ali ovo zakonodavstvo su odbacile kada su postale članice Europske unije (Diaz Nieto i sur., 2018).

Zaključci

S obzirom na toksičnost sterigmatocistina i nedovoljnu istraženost njegove pojavnosti u hrani te hrani za životinje, potrebno je prikupljanje podataka o njegovoj prisutnosti u različitim vrstama namirnica, uz razvoj visokoosjetljivih analitičkih metoda za njegovu detekciju. Istraživanja treba usmjeriti i na meso i mesne proizvode zbog slabe istraženosti STC u ovoj kategoriji hrane, koja se navodi kao jedan od primarnih izvora kontaminacije potrošača mikotoksinima među namirnicama animalnog podrijetla. U daljnjim istraživanjima pojavnost STC potrebno je povezati sa čimbenicima koji utječu na njegovu produkciju, ispitati „carry over“ STC od hrane za životinje do finalnih proizvoda životinjskog podrijetla te istražiti supojavnost i potencijalne sinergističke učinke s ostalim mikotoksinima u organizmu.

Zahvala

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Mikotoksini u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima: molekularna identifikacija plijesni producenata i procjena izloženosti potrošača“ (IP-2018-01-9017).

Literatura

- Abd Alla E.A., Metwally M.M., Mehriz A.M., Abu Sree Y.H. (1996) Sterigmatocystin: incidence, fate and production by *Aspergillus versicolor* in Ras cheese. *Nahrung*, 40 310-313.
- Bailly J.D., Guerre P. (2009) Mycotoxins in meat and processed meat products. U: Toldra F. (ed): *Safety of meat and processed meat*, str. 83-124. Springer, New York, USA.
- Bartos J., Matyas Z. (1982) Study of cheeses for the presence of sterigmatocystin. *Veterinarni Medicina (Praha)*, 27 747-752.
- Bertuzzi T., Romani M., Rastelli S., Mulazzi A., Pietri A. (2017) Sterigmatocystin occurrence in paddy and processed rice produced in Italy in the years 2014–2015 and Distribution in Milled Rice Fractions. *Toxins*, 9 86-96.
- Bokhari F., Aly M. (2009) Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia. *Advances in Biological Research*, 3 71-78.
- Butler J. (1964) Acute Toxicity of Aflatoxin B1 in Rats. *British Journal of Cancer*, 18 756-762.
- Cleveland T.E., Yu J., Fedorova N., Bhatnagar D., Payne G.A., Nierman W.C., Bennett J. W. (2009) Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 27 151-157.

- Davis N.D. (1981) Sterigmatocystin and other Mycotoxins Produced by *Aspergillus* Species. *Journal of Food Protection*, 44 (9) 711-714.
- De Palo D., Gabucci G., Valussi B. (1977) Study of the possible presence of aflatoxin, sterigmatocystin and ochratoxin in green coffee. U: Proceedings of the 8^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café. Paris, Francuska
- Delgado-Virgen F., Guzman de Peña D. (2009) Mechanism of sterigmatocystin biosynthesis regulation by pH in *Aspergillus nidulans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40 933-942.
- Diaz Nieto H.C., Granero A.C., Zon M.A., Fernandez H. (2018) Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food and chemical toxicology*, 118 460-470.
- Domijan A.M., Pleadin J., Mihaljević B., Vahčić N., Frece J., Markov K. (2015) Reduction of ochratoxin A in dry-cured meat products using gamma irradiation. *Food Additives and Contaminants Part A*, 7 1185-1191.
- El-Kady I.A., El-Maraghy S.S, Eman Mostafa M. (1995) Natural occurrence of mycotoxins in different spices in Egypt. *Folia Microbiologica (Praha)*, 40 297-300.
- Engelbrecht J.C., Altenkirk B. (1972) Comparison of some biological effects of sterigmatocystin and aflatoxin analogues on primary cell cultures. *Journal of the National Cancer Institute*, 48 1647-1655.
- Essigmann J.M., Barker L.J., Fowler K.W., Francisco M.A., Reinhold V.N., Wogan, G.N. (1979) Sterigmatocystin–DNA interactions: identification of a major adduct formed after metabolic activation *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 76 179–183.
- European Food Safety Authority - EFSA (2013) Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA Journal*, 11 (6) 3254.
- Frece J., Markov K., Kovačević D. (2010) Determination of indigenous microbial populations, mycotoxins and characterization of potential starter cultures in Slavonian kulen. *Meso*, 12 92-99.
- International Agency for Research on Cancer – IARC (2002) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Press, Lyon.
- Jarvis B. (1982) The occurrence of mycotoxins in UK foods. *Food Technology in Australia*, 34 508-514.
- Kocić-Tanackov S., Dimić G., Tanackov I., Pejin D., Mojović L., Pejin J. (2012) The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspergillus spp.* and on sterigmatocystin biosynthesis. *LWT - Food Science and Technology*, 49 14-20.
- Li X., Liu B., Wang F., Ma X., Li Z., Guo D., Wang Y., Wan F., Deng L., Zhang S. (2018) Determination of Sixteen Mycotoxins in Maize by Ultra-high Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Letters*, 51 702-716.
- Manizan A.L., Oplatońska-Stachowiak M., Piro-Metayer I., Campbell K., Koffi- Nevry R., Elliott C., Akaki D., Montet D., Brabet C. (2018) Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Côte d’Ivoire by UHPLC-MS/MS. *Food Control*, 87 22-30.
- Markov K., Pleadin J., Bevardi M., Vahčić N., Sokolić-Mihalek D., Frece J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B₁, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food control*, 34 312-317.
- Markov K., Mihaljević B., Domijan A.M., Pleadin J., Delaš F., Frece J. (2015) Inactivation of aflatoxigenic fungi and the reduction of aflatoxin B₁ *in vitro* and *in situ* using gamma irradiation. *Food control*, 54 79-85.
- McCann J., Choi E., Yamasaki E., Ames, B.N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72 5135-5139.
- Monbaliu S., Van Poucke C., Detavernier C., Dumoulin F., Van De Velde M., Schoeters E., Van Dyck S., Averkieva O., Van Peteghem C., De Saeger S. (2010) Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 66-71.
- Mori H., Sugie S., Yoshimi N., Kitamura J., Niwa M., Hamasaki T., Kawai K. (1986) Genotoxic effects of a variety of sterigmatocystin-related compounds in the hepatocyte/DNA-repair test and the Salmonella microsome assay. *Mutation Research*, 173 217-222.
- Oplatońska-Stachowiak M., Reiring C., Sajic N., Haasnoot W., Brabet C., Campbell K., Elliott C.T., Salden M. (2018) Development and in-house validation of a rapid and simple to use ELISA for the detection and measurement of the mycotoxin Sterigmatocystin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410 3017-3023.
- Pande N., Saxena J., Pandey H. (1990) Natural occurrence of mycotoxins in some cereals. *Mycoses*, 33 126-128.
- Perši N., Pleadin J., Kovačević D., Scortichini G., Milone S. (2014). Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. *Meat science*, 96, 203-210.
- Pfeiffer E., Fleck S.C., Metzler M. (2014) Catechol formation: a novel pathway in the metabolism of sterigmatocystin and 11-methoxysterigmatocystin. *Chemical Research in Toxicology*, 27 2093-2099.
- Pleadin J., Perši, N., Kovačević, D., Vahčić, N., Scortichini, G., Milone, S. (2013) Ochratoxin A in traditional dry-cured meat products produced from subchronic-exposed pigs. *Food additives and contaminants: Part A*, 30 1827-1836.



- Pleadin J., Malenica Staver M., Vahčić N., Kovačević D., Milone S., Saftić L., Scortichini G. (2015a). Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. *Food Control*, 52, 71-77.
- Pleadin J., Kudumija N., Frece J., Petrović D., Markov K. (2015b) Citrinin u hrani i hrani za životinje. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 11 84-90.
- Pleadin J., Vasilj V., Petrović D. (2018) *Mikotoksini- pojavnost, prevencija i redukcija*. Sveučilište u Mostaru, Mostar.
- Pleadin J., Vulić A., Perković I., Kudumija N., Lešić. T., Kiš M., Zdravec M., Mitak M. (2019) Mikotoksini- aflatoksini i okratoksini – prijetnja sigurnosti tradicionalnih mesnih proizvoda. *Meso* 2, 186-197.
- Purchase I.F.H., Van der Watt J.J. (1969) Acute toxicity of sterigmatocystin to rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 7 135–139.
- Purchase I.F.H., Van der Watt J.J. (1970) Carcinogenicity of sterigmatocystin. *Food and Cosmetics Toxicology*, 8 289–295.
- Rank C., Nielsen K.F., Larsen T.O., Varga J., Samson R.A., Frisvad J.C. (2011) Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology*, 115 406-420.
- Saxena J., Mehrotra B. (1989) Screening of spices commonly marketed in India for natural occurrence of mycotoxins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2 286-292.
- Steyn M., Thiel P.G. (1976) Biliary excretion of sterigmatocystin by vervet monkeys. *Biochemical Pharmacology*, 25 265-266.
- Takahashi H., Yasaki H., Nanayama U., Manabe M., Matsuura S. (1984) Distribution of sterigmatocystin and fungal mycelium in individual brown rice kernels naturally infected by *Aspergillus versicolor*. *Cereal Chemistry*, 61 48-52.
- Terao K., Takano M., Yamazaki M. (1975) The effects of O-acetylsterigmatocystin and related compounds on rat liver and cultured chicken embryonal liver cells. *Chemico-Biological Interactions*, 11 507-522.
- Terao K. (1983) Sterigmatocystin- a Masked Potent Carcinogenic Mycotoxin. *Toxin Reviews*, 2 77-110.
- Ueda N., Fujie K., Gotoh-Mimura K., Chattopadhyay S.C., Sugiyama T. (1984) Acute cytogenetic effect of sterigmatocystin on rat bone-marrow cells in vivo. *Mutation Research*, 139 203-206.
- Van der Watt, J.J. (1974) Sterigmatocystin. U: Purchase I.F.H. (ed): *Mycotoxins*, str. 370-382. Elsevier Scientific Pub.Co., New York, USA.
- Versilovskis A., Mikelsons V. (2008a) Sterigmatocystin presence in different Latvian bread samples. U: Proceedings of the 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology. Jelgava, Latvia.
- Versilovskis A., Bartkevics V., Mikelsons V. (2008b) Sterigmatocystin presence in typical Latvian grains. *Food Chemistry*, 109 243-248.
- Versilovskis A., De Saeger S., Mikelsons V. (2008c) Determination of sterigmatocystin in beer by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *World Mycotoxin Journal* 1, 161-166.
- Versilovskis A., Van Peteghem C., De Saeger S. (2009) Determination of sterigmatocystin in cheese by high-performance liquid chromatography-tandemmass spectrometry. *Food Additives and Contaminants Part A*, 26 127-133.
- Versilovskis A., De Saeger S. (2010) Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods- an overview. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54 136-147.
- Versilovskis A., Bartkevics V. (2012) Stability of sterigmatocystin during the bread making process and its occurrence in bread from the Latvian market. *Mycotoxin Research*, 28 123-129.
- Vesonder R.F., Horn B.W. (1985) Sterigmatocystin in dairy cattle feed contaminated with *Aspergillus versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49 234-235.
- Walkow J., Sullivan G., Maness D., Yakatan G.J. (1985) Sex and age differences in the distribution of 14C-sterigmatocystin in immature and mature rats: a multiple dose study. *Journal of the American College of Toxicology*, 4 45-51.
- Wang D.S., Sun H.L., Xiao F.Y., Ji X.H., Liang Y.X., Han F.G. (1991) Distribution and excretion of 3H-sterigmatocystin in rats. *IARC Scientific Publications*, 424-426.
- Yabe K., Nakajima H. (2004) Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 745-755.
- Yogendrarajah P., Deschuyffeleer N., Jacxsens L., Sneyers P. J., Maene P., De Saeger S., Devlieghere F., De Meulenaer B. (2014) Mycological quality and mycotoxin contamination of Sri Lankan peppers (*Piper nigrum L.*) and subsequent exposure assessment. *Food Control*, 41 219-230
- Youssef M.S., El-Maghraby O.M.O., Ibrahim Y.M. (2008) Mycobiota and mycotoxins of Egyptian peanut (*Arachis hypogaea L.*) seeds. *International Journal of Botany*, 4 349-360.
- Yu J., Chang P.K., Ehrlich K.C., Cary J.W., Bhatnagar D., Cleveland T.E., Payne G.A., Linz J.E., Woloshuk C.P., Bennett J.W. (2004) Clustered pathway genes in aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 1253-1262.