

PREGLEDNI RAD

Metode identifikacije plijesni - primjena na tradicionalnim mesnim proizvodima

Tina Lešić¹, Manuela Zadravec², Ksenija Markov³, Jelka Pleadin^{1*}

Sažetak

Glavni razlog identifikacije vrsta plijesni u hrani njihova je sposobnost produkcije mikotoksina koji imaju toksično djelovanje, bilo da se želi eliminirati rast toksikotvornih vrsta i na taj način osigurati zdravstvenu ispravnost hrane, bilo da se želi detektirati vrsta ili soj plijesni koje nemaju sposobnost produkcije mikotoksina, kako bi se mogle koristiti u druge svrhe, poput proizvodnje fermentirane hrane. U identifikaciji toksikovornih plijesni preporuka je koristiti polifazni pristup, koji uz tradicionalni opis makro- i mikro- morfoloških karakteristika, uključuje i molekularne metode identifikacije analizom karakterističnih genskih markera DNA. Plijesni koje se mogu naći na površini tradicionalnih mesnih proizvoda, koji se termički ne obrađuju, imaju ulogu u senzorskim svojstvima takvih gotovih proizvoda, a pripadaju rodu *Aspergillus* i *Penicillium*. Za identifikaciju *Penicillium* vrsta preporuča se DNA regija β -tubulina, a za *Aspergillus* vrste DNA regija kalmodulina. Za identifikaciju toksikotvornih vrsta s tradicionalnih mesnih proizvoda analizirati se mogu regije uključene u sintezu mikotoksina aflatoksina, sterigmatocistina, okratoksina A, ciklopiazonične kiseline, citrulina i sl. Međutim, za većinu mikotoksina biosintetski putevi nisu potpuno okarakterizirani pa su tako i geni koji kodiraju za enzime uključene u biosintezu ovih sekundarnih metabolita slabije poznati te zahtjevaju daljnja istraživanja u svrhu razvoja metoda za brzu i točniju identifikaciju plijesni. Ovaj rad daje prikaz metoda koje se mogu koristiti u identifikaciji plijesni za različite vrste namirnica te su posebno primjenjive za identifikaciju površinskih plijesni na tradicionalnim mesnim proizvodima.

Ključne riječi: PCR, detekcija gena, kobasice, *Aspergillus*, *Penicillium*, mikotoksini

Uvod

Glavni razlog istraživanja vrsta plijesni u hrani njihova je sposobnost produkcije mikotoksina koji imaju toksično djelovanje, bilo da se želi eliminirati rast toksikotvornih vrsta i na taj način osigurati zdravstvenu ispravnost hrane, bilo da se želi

detektirati vrsta / soj plijesni koje nemaju sposobnost produkcije mikotoksina kako bi se mogle koristiti u druge svrhe, primjerice kao starter kulture u proizvodnji fermentirane hrane (Pleadin i sur., 2018.; Markov i sur., 2022.).

¹ dr. sc. Tina Lešić, viši stručni suradnik; prof. dr. sc. Jelka Pleadin, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju; Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za analitičku kemiju, Savska cesta 143, 10000 Zagreb

² dr. sc. Manuela Zadravec, viši znanstveni suradnik; Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za mikrobiologiju hrane za životinje, Savska cesta 143, 10000 Zagreb

³ prof. dr. sc. Ksenija Markov, redovita profesorica u trajnom zvanju; Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb

* Autor za korespondenciju: pleadin@veinst.hr

Identifikacija plijesni objavljena u istraživanjima iz posljednjih dvadesetak godina većinom se temeljila na primjeni pojedinačnih metoda identifikacije, bilo tradicionalne odnosno isključivo morfološke ili isključivo molekularne identifikacije koristeći ITS (engl. Internal Transcribed Spacer) regiju. U manjem broju istraživanja korištena je kombinacija morfološke i molekularnih podataka. ITS regija se smatrala službenim DNA (engl. deoxyribonucleic acid) markerom za identifikaciju plijesni na razini vrste. Međutim, taksonomija toksikotvornih plijesni je komplicirana, osobito za plijesni roda *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* i *Fusarium*, čija je klasifikacija još u tijeku, a nove vrste se i dalje opisuju (Raja i sur., 2017.). Posljednjih godina je preporučeno u identifikaciji toksikotvornih plijesni koristiti polifazni pristup, koji je predložen u bakteriologiji 1996. godine, a koji uz tradicionalni opis makro- i mikro- morfoloških karakteristika, uključuje i molekularne metode identifikacije analizom karakterističnih genskih markera DNA (Frisvald, 2011.).

Ovaj rad daje pregled tradicionalnih i molekularnih metoda koje se koriste u identifikaciji plijesni u hrani, s posebnim osvrtom na njihovu primjenu za identifikaciju plijesni s površine tradicionalnih mesnih proizvoda.

Tradicionalna metoda identifikacije

U tradicionalnoj identifikaciji plijesni koristi se makromorfologija koja podrazumijeva izgled kolonije na hranjivoj podlozi te mikromorfologija za fenotipske karakteristike, kao što su strukture spora i/ili konidija koje nastaju kao rezultat spolne i nespolne reprodukcije. Tradicionalna metoda identifikacije je bitna kako bi se razumjela evolucija morfoloških karakteristika i rutinski se koristi u istraživanjima taksonomije plijesni do razine roda, međutim, primjena ove metode nije dovoljna i pomoću nje ne može se uvijek sa sigurnošću provesti identifikacija plijesni na razini vrste. Identifikacija plijesni samo na temelju morfologije je izazovna, budući da postoji ograničen broj morfoloških karakteristika koje se mogu upotrijebiti za identifikaciju. Dodatni problemi mogu predstavljati, primjerice, što neki sojevi plijesni ne razvijaju uvijek ni fenotipske karakteristike na temelju kojih ih se može morfološki identificirati (Raja i sur., 2017.). Isto tako, sojevi okarakterizirani u jednom laboratoriju mogu izgledati drukčije kada se uzgoje u drugom laboratoriju zbog npr. razlike u temperaturi, osvjetljenju, vlažnosti ili hranjivim

tvarima, što otežava usporedbu među rezultatima različitih istraživanja (Visagie i sur., 2014.), iako je utjecaj navedenih čimbenika smanjen standardizacijom tehnika pripreme medija, naciepljivanja i inkubacije (Okuda i sur., 2000.).

Za identifikaciju plijesni potrebno je pravilno izolirati čiste kulture s određene namirnice. Čiste kulture se potom naciepljuju na izabrane standardne hranjive podloge u tri točke na kojima se određuju makroskopska svojstva poraslih kolonija poput: boje površine i poledine porasle kolonije, promjera, oblika i teksture kolonije, boje podloge, stupnja rasta, prisutnosti eksudata te porast pri različitim temperaturama (npr. 4 °C i 37 °C) (Samson i sur., 2019.). Pri opisu kolonija plijesni koristi se specifična terminologija, uz upotrebu atlasa Domsch i sur. (2007.) i Samson i sur. (2019.) te mogu se koristiti za morfološku identifikaciju do razine roda. *Penicillium* i *Aspergillus* izolati uglavnom se naciepljuju na hranjive podloge kao što su Czapekov agar (engl. Czapek Yeast Extract Agar, CYA), maltozni agar (engl. Malt Extract Agar, MEA), kreatinin saharozni agar (engl. Creatine Sucrose Agar, CREA) te zobeni agar (engl. Oat Meal Agar, OAT) (Frisvald, 2011.; Samson i sur., 2019.). *Penicillium* izolati mogu se morfološki identificirati do razine vrste uz pomoć Pitt (1979.), Frisvald i Samson (2004.), Pitt i Hocking (2009.), Samson i sur. (2019.). *Aspergillus* izolati se mogu identificirati do razine vrste morfološki uz primjenu Raper i Fennell (1965.), Samson i Varga (2007.), Pitt i Hocking (2009.) te Samson i sur. (2019.). Za promatranje mikromorfoloških značajki plijesni najčešće se izrađuju mikroskopski preparati u laktofenolnom modrilu. Prilikom promatranja mikroskopskih preparata važno je uočiti oblik, boju i dimenzije stijenki, vezikula i metula (u slučaju da su prisutne), fialida te konidija.

Tradicionalna metoda identifikacije plijesni zahtijeva puno vremena te dobro poznavanje taksonomije plijesni. Čak i u slučaju velikog iskustva i stručnosti, identifikacija je uobičajeno teška za rodove plijesni poput *Penicillium* i *Aspergillus* koji sadrže velik broj blisko vezanih vrsta. Stoga je u sklopu polifaznog pristupa identifikacije plijesni, izolate potrebno potvrditi ili dodatno identificirati do razine vrste uz primjenu molekularnih metoda koje omogućavaju precizniju identifikaciju vrsta (Hofstetter i sur., 2019.).

Molekularne metode identifikacije

Identifikacija na temelju DNA sekvenci danas

se može smatrati standardom u identifikaciji vrsta plijesni. Ona podrazumijeva tzv. DNA barcoding gdje se nepoznata sekvenca uspoređuje sa bazom podataka sekvenci te se vrsta identificira na temelju sličnosti sekvenci, a može podrazumijevati i DNA taksonomiju gdje se nepoznata vrsta pokušava identificirati stavljajući je u evolucijski okvir sa drugim homolognim sekvencama iz baze kako bi se procijenio filogenetski odnos (Raja i sur., 2017.).

Pojam sekvenciranja DNA podrazumijeva određivanje slijeda nukleotidnih baza, adenina (A), gvanina (G), citozina (C) i timina (T) DNA fragmenata. Da bi se dobila DNA sekvenca, prethodno je potrebno genomsku DNA ekstrahirati iz stanica plijesni te nakon toga lokus od interesa umnožiti lančanom reakcijom polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR). PCR produkti se po potrebi provjeravaju elektroforezom i pročišćavaju te potom sekvenciraju kako bi se dobile DNA sekvence koje se uspoređuju sa drugim poznatim sekvencama istog lokusa u bazama podataka. Odabir lokusa odnosno genskog markera ili ciljane sekvence specifične za toksikotvorne plijesni predstavlja ključan korak prije početka analize. U identifikaciji vrsta plijesni mogu se koristiti različiti lokusi, ali dobar genski marker treba imati dovoljnu varijabilnost kako bi omogućio identifikaciju vrsta, ali sa niskom razinom varijacije unutar vrste te baze podataka s kojima se može usporediti (Samson i sur., 2019.).

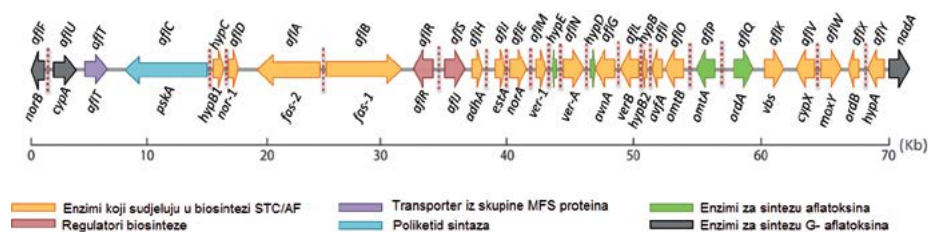
PCR metode su u širokoj upotrebi posljednjih desetljeća za najšire rasprostranjenje toksikotvorne kontaminante koji pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*, a također i *Alternaria*, *Claviceps*, *Monascus* i dr. PCR strategija promatra se u sklopu dva glavna komplementarna pristupa: ciljajući konzervirane funkcionalne gene ili regije od taksonomskog interesa ili se usmjeravajući na gene koji sudjeluju u proizvodnji mikotoksina (Munaut i

Van Hove, 2011.; Kolawole i sur., 2018.).

PCR detekcija pomoću konzerviranih gena

Upotreba molekularnih podataka za identifikaciju plijesni započela je prije više od dva desetljeća sa istraživanjem White i sur. (1990.) koje opisuje početnice nuklearnog ribosomskog operona plijesni. ITS regija podrazumijeva slijed nukleotida ponavljajućih slijedova nekodirajuće DNA smještenih između male i velike podjedinice ribosomske RNA (rRNA). Sastoji se od dva segmenta ITS1 i ITS2 podijeljena sa 5.8S rDNA. Postoji velik broj istraživanja u kojima je sekvenciran ovaj lokus te posljedično i veliki broj referentnih sekvenci koje su prisutne u bazama podataka, iako one mogu biti i netočne. Također, ograničavajući faktor primjene ove regije je loša rezolucija za identifikaciju vrsta nekih rodova plijesni sa velikim brojem vrsta poput *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Trichoderma*. ITS regija se stoga pokazala kao pomoć u identifikaciji, ali ne i dovoljno informativnom za točnu identifikaciju vrsta unutar ovih rodova plijesni zbog nedostatne varijabilnosti. ITS regija svakako može biti dobra početna točka u identifikaciji potpuno nepoznatog izolata plijesni (Raja i sur., 2017.; Samson i sur., 2019.).

Od gena koji kodiraju za proteine najčešće korišteni su elongacijski faktor 1-alpha (TEF1 α), kalmodulin (CaM, engl. CALcium ModuLated proteIN), β -tubulin (BenA, tub2) (slika 2), aktin (Act) te druga najveća podjedinica RNA polimeraze (RPB2). Ovi geni imaju veću varijabilnost među vrstama u odnosu na ITS regiju i često sadrže introne koji su visoko varijabilni, što ih čini dobrim odabirom za identifikaciju vrsta. Odabir gena ovisi o samom organizmu odnosno rodu plijesni pa se tako za identifikaciju *Penicillium* vrste preporuča regija β -tubulina, a za *Aspergillus* vrste regija kalmodulina ili obje (Samson i sur., 2019.).

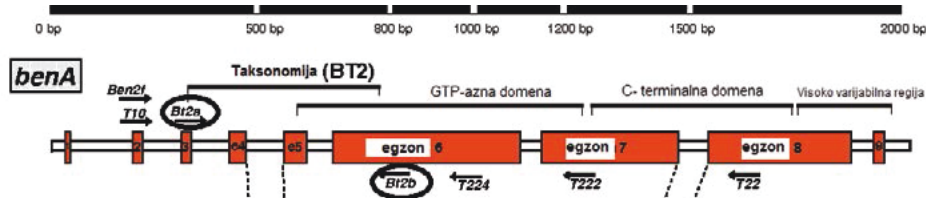


Slika 2. Shematski prikaz klastera gena za biosintezu aflatoksina/sterigmatocistina uključujući stariju i noviju nomenklaturu (modificirano prema Caceres i sur., 2020.)

Figure 2 Sheme of gene cluster for aflatoxin/sterigmatocystin biosynthesis including old and new nomenclature (modified according to Caceres i sur., 2020.)

α - i β -tubulin su dvije podjedinice od 55 kDa koje su u ekvimolarnim količinama sastavni dio mikrotubula, glavnih elemenata citoskeleta pronađenih u svim eukariotskim stanicama te imaju ključnu ulogu u nekoliko vitalnih staničnih mehanizama kao što je segregacija kromosoma u mitozu, unutarstanični transport, cilijarno i flagelarno vezivanje te

strukturna potpora citoskeleta. Geni koji kodiraju za α - i β -tubulin imaju određene evolucijske razlike u sekvencama između rodova i vrsta pa se mogu koristiti u svrhu taksonomije (Munaut i Van Hove, 2011.). Na slici 1. je prikaz *benA* regije β -tubulina kod vrste *A. aculeatus*.



Slika 1. Prikaz *benA* regije β -tubulina kod vrste *A. aculeatus* te položaj početnica Bt2a i Bt2b (modificirano prema Hubka i Kolarik, 2012.)

Figure 1 Diagram of *benA* region in *A. aculeatus* and locus of primers Bt2a and Bt2b (modified according to Hubka i Kolarik, 2012.)

Kalmodulin je protein koji veže kalcij te je eksprimiran u svim eukariotskim stanicama gdje sudjeluje u signalnim putevima koji reguliraju mnoge neophodne procese kao što su rast, proliferacija i kretanje. Kalmodulin je 17 kDa protein s četiri mjesta vezivanja za Ca^{2+} . Pripada skupini obitelji "EF šaka" proteina. "EF šaka" nastaje iz slijeda uzvojnica-petlja-uzvojnica te je mjesto vezivanja Ca^{2+} iona u mnogim proteinima koji su osjetljivi na promjene koncentracije kalcija. Protein je relativno malen, a evolucijski visoko konzerviran što gen koji kodira za ovaj protein čini dobrim izborom za taksonomske i filogenetske studije, odnosno, PCR testove (Chin i Means, 2000.).

PCR detekcija pomoću gena uključenih u biosintezu mikotoksina

Za potrebu brze identifikacije toksikotvornih plijesni koje kontaminiraju hranu istraživanja su usmjerena na razvoj osjetljivih i specifičnih metoda detekcije uz pomoć PCR umnožavanja jednog ili više gena koji kodiraju za enzime ili regulatorne faktore uključene u biosintezu mikotoksina. Međutim, za većinu mikotoksina biosintetski putevi nisu potpuno okarakterizirani pa su tako i geni koji kodiraju za enzime uključene u biosintezu ovih sekundarnih metabolita slabije poznati (Munaut i van Hove, 2011.).

Iako je OTA jedan od značajnijih mikotoksina, njegov put biosinteze nije još potpuno razjašnjen.

Klaster gena za biosintezu OTA koji uključuje gen koji kodira za alkalni serin proteazu (ASP), OTA neribosomsku peptid sintazu (NRPS) te jedan dio gena koji kodira za OTA poliketid sintazu (PKS) identificirani su kod vrste *P. nordicum* (Geisen i sur., 2006.). Pronađeno je da je PKS gen kod *A. ochraceus* eksprimiran zajedno sa 2 gena za P450 monooksigenaze, što upućuje na njihovu uključenost zajedno sa PKS u biosintezu OTA (O'Callaghan i sur., 2006.). Geisen i sur. (2004.) koristili su degenerativne početnice kako bi detektirali i okarakterizirali dio gena OTA PKS kod *P. nordicum*. Pokazalo se da ova metoda PCR-a u stvarnom vremenu sa početnicama koje generiraju fragment od 500 pb OTA PKS omogućava specifičnu detekciju te praćenje produkcije OTA kod *P. nordicum*, ali daje negativne rezultate s drugim *Penicillium* i *Aspergillus* vrstama koje su potencijalni OTA producenti, kao što su *P. verrucosum*, *A. carbonarius*, *A. niger* te *A. ochraceus*. Dao i sur. (2005.) su dizajnirali dva seta specifičnih početnica DNA sekvence PKS gena iz *A. ochraceus* koji umnaža specifičnu regiju bilo iz OTA (*A. carbonarius*, *A. melleus*, *A. ochraceus* i *P. verrucosum*) ili CIT (*P. citrinum*, *M. ruber*) producenata. U istraživanju Storari i sur. (2012.), OTA nije detektiran u niti jednom ekstraktu *A. tubingensis*, ali je jednostavno određen kod *A. niger*, dok su u istraživanju Luque i sur. (2013.) detektirani geni i produkcija OTA 2 izolata *A. tubingensis*. Istraživanje Luque i sur. (2013.) sa početnicama F10T i R10T (otanpsPN), detektiralo je OTA gen u različitim vrsta-

ma producentima: *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tubingensis*, *A. westerdijkiae*, *P. nordicum* i *P. verrucosum*.

Istraživanje Touhami (2018.) pokazalo je kako inaktivacija pksCT gena koji kodira za CIT poliketid sintazu uključenu u biositezu CIT kod *P. verrucosum*, *P. expansum* te *P. citrinum* dovodi do transformacije sojeva u CIT neproducirajuće.

Sinteza aflatoksina temelji se na kompleksnom biosintetskom putu koji uključuje najmanje 25 strukturnih te 2 regulatorna gena. Put biosinteze sterigmatocistina dijeli homologne gene izuzev zadnjeg koraka pretvorbe sterigmatocistina u aflatoksine (Yu i sur., 2004.). Klaster gena za biosintezu aflatoksina i sterigmatocistina prikazan je na slici 2. Koristeći početnice dizajnirane na aflD (nor-1), aflM (ver-1) te aflP (omtA) genima, razvijen je tripleks PCR koji daje uzorak od tri vrpce kod aflatoksin producirajućih sojeva *A. flavus* i *A. parasiticus* te također i sterigmatocistin-producirajuće plijesni *A. versicolor* (Geisen, 1996.). Općenito se pretpostavlja da 40 do 50 % izolata *A. flavus* ima sposobnost produkcije AFB1 (Geisen, 1996.). Slično su i kod kvadrupleks PCR-a sa 4 seta početnica za aflD (nor-1), aflM (ver-1), aflP (omtA) te aflR gene Criseo i sur. (2001.) pokazali kako aflatoksikogeni sojevi daju četverostruki uzorak. U oba istraživanja, ne-aflatoksikogeni sojevi su dali različite rezultate sa jednom, dvije, tri ili čak i četiri vrpce, tako da se nisu mogli razlikovati od producirajućih sojeva, te je zaključeno da je potrebno razviti tehnike kojima bi bila omogućeno potpuno razlikovanje producirajućih i ne-producirajućih sojeva. Yang i sur. (2004.) su opisali uspješnu primjenu multipleks PCR za detekciju potencijanih aflatoksin-producirajućih vrsta koristeći početnice za 3 biosintetska gena *aflI* (*avfA*), *aflM* (*ver-1*) i *aflP* (*omtA*) uz ITS regiju kao pozitivnu kontrolu. Četiri DNA

fragmenta su umnožena kod svih aflatoksikotvornih *A. flavus* i *A. parasiticus* sojeva. Istraživanje je također pokazalo kako niti jedan od ne-aflatoksikotvornih sojeva *A. flavus* i *A. oryzae* nije imao sve fragmente, upućujući na to da su različiti tipovi mutacija doveli do inaktivacije afla- biosintetskog puta. Nedostatak signala za neki od ispitanih gena upućuje na deleciju tog gena ili u slučaju kada soj pokazuje sve 3 vrpce za 3 gena, a nema sposobnost produkcije, pretpostavlja se druga vrsta mutacije, možda u regulatornim genima (Munaut i Van Hove, 2011.).

Utvrđeno je i da se uz klaster gena za sintezu aflatoksina kod vrsta *A. flavus* i *A. oryzae* nalazi i klaster gena za sintezu CPA. U tom klasteru karakterizirana su tri gena: *maoA* koji kodira za monoamin sintazu, *dmaT* koji kodira za dimetilaliltriptofan sintazu i *pks-nrps* koji kodira za hibrid poliketid sintazu-neribosomsku peptid sintazu (Chang i sur., 2009.). PCR metoda u stvarnom vremenu koja umnaža *dmaT* gen pokazala se efikasnom u određivanju plijesni koje mogu producirati CPA u hrani (Rodriguez i sur., 2012.). Rodriguez i sur. (2012.) su ovom metodom detektirali gen u vrsta *A. flavus*, *P. camemberti*, *P. commune* te *P. griseofulvum*.

Baze podataka – sekvenci

Dobivena sekvencija specifičnog izolata plijesni se uspoređuje sa drugim sekvencama u javnim bazama podataka, od kojih su one najpoznatije navedene u tablici 1. Od navedenih jedino GenBank sadrži podatke sa regijama β -tubulina i kalmodulina, dok se ostale baze uglavnom temelje na ITS regiji. Pristup na kojem se temelji interpretacija sličnosti sekvence je pomoću tzv. "percent identity score". Točna identifikacija plijesni na temelju DNA sekvenci ovisi o količini podataka odnosno sekvenci u bazama podataka. Općenito, postoje dva tipa

Tablica 1. Popis baza podataka za identifikaciju vrsta plijesni (Raja i sur., 2017.; Samson i sur., 2019.)

Table 1 List of database for mould species identification (Raja i sur., 2017.; Samson i sur., 2019.)

Ime baze podataka / Name of database	URL
Barcode of Life Database, BOLD	http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine
CBS-KNAW	http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICSSequences.aspx
Fusarium-ID	http://isolate.fusariumdb.org
Fungal barcoding	http://www.fungalbarcoding.org
RefSeq Target Loci (RTL)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/
ISHAM, The international society for Human and Animal Mycology	http://its.mycologylab.org
GenBank	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/

rezultata, ili je sekvenca 100 % identična jednoj ili više sekvenci iz baze ili to nije. Ako postoji manje od 100 % podudaranosti, nekoliko je načina za tumačenje rezultata (Samson i sur., 2019.). Prema Geiseru i sur. (2004.), rezultati se tada mogu interpretirati na slijedeći način: i) sekvenca od upita može biti alel poznate vrste - u tom će slučaju usporedba sekvenci dati također podatke blisko vezanih vrsta; ii) sekvenca predstavlja poznatu vrstu, ali nema podataka o sekvenciranom lokusu ove vrste u javnim bazama podataka; iii) sekvenca od upita predstavlja novu vrstu te iv) sekvenca od upita odgovara vrsti koja je trenutno slabo opisana.

Primjena na tradicionalnim mesnim proizvodima

U hrvatske tradicionalne trajne mesne proizvode ubrajaju se različite vrste fermentiranih kobasica poput kulena te suhomesnati proizvodi poput pršuta, pancete, vratine i sl. (MP, 2018.). Dosadašnja su istraživanja pokazala da plijesni s površine TMP dominantno čine rodovi *Penicillium* i *Aspergillus*, a utvrđeno je da pokazuju uglavnom pozitivno djelovanje na kvalitetu proizvoda doprinoseći razvoju njihovog specifičnog mirisa i okusa (Zadravec i

sur., 2019.; Zadravec i sur., 2020.; Lešić i sur., 2020.). Međutim, plijesni mogu producirati toksične spojeve, mikotoksine, te na taj način kontaminirati proizvod. Točna identifikacija plijesni nužna je kako bi se spriječilo kvarenje proizvoda ili razvoj nepoželjnih senzornih svojstava obrastanjem nepoželjnih vrsta, kao i proizvodnja toksičnih mikotoksina od strane toksikotvornih plijesni.

Ranija istraživanja plijesni na mesnim proizvodima koristila su većinom ili samo morfološku identifikaciju (Comi i lacumin, 2013.) ili ITS regiju koja je potencijalno mogla dovesti i do pogrešne identifikacije vrsta (Sonjak i sur., 2011.; Alapont i sur., 2014.; Pleadin i sur., 2017.; Vila i sur., 2019.; Zadravec i sur., 2020.; Abd El-Tawab i sur., 2020.). U novije vrijeme u istraživanjima identifikacija se provodi za *Penicillium* vrste detekcijom regije β -tubulina, a za *Aspergillus* vrste regija kalmodulina (Lešić i sur., 2021.; Zadravec i sur., 2023.). S obzirom da je potencijal produkcije mikotoksina od najvećeg interesa u istraživanju plijesni na mesnim proizvodima, kako bi se odredili neproducirajući sojevi koji bi se mogli koristiti kao starter kulture, te da bi se spriječila kontaminacija i osigurala njihova zdravstvena ispravnost,

Tablica 2. Početnice za detekciju gena korištenih u identifikaciji plijesni (prema Samson i sur., 2019.; Zadravec i sur., 2023.)

Table 2 Primers employed in the detection of genes used in mould identification (according to Samson i sur., 2019.; Zadravec i sur., 2023.)

Vrsta gena / Gene type	Gen / Gene	Početnice (5'-3') / Primers (5'-3')
Konzervirani funkcionalni geni/ Conserved functional genes	ITS	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS4 GCATATCAATAAGCGGAGGA
	<i>BenA</i>	Bt2a GGTAACCAATCGGTGCTGTTTC Bt2b ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
	<i>CaM</i>	Cmd5 CCGAGTACAAGGARGCCTTC Cmd6 CCGATRGAGGTCATRACGTGG
Geni uključeni u biosintezu mikotoksina/ Genes employed in mycotoxin biosynthesis	<i>nor-1</i> (AFB/STC)	nor1 ACCGCTACGCCGCACTCTCGGCAC nor2 GTTGGCCGCCAGCTTCGACACTCCG
	<i>ver-1</i> (AFB/STC)	ver1 GCCGCAGGCCGCGGAGAAAGTGGT ver2 GGGGATATACTCCCGCACACAGCC
	<i>Omt-A</i> (AFB/STC)	omt1 GTGGACGGACCTAGTCCGACATCAC omt2 GTCGGCGCCACGCACTGGGTTGGGG
	<i>Otapks</i> (OTA)	AoLC35-12L GCCAGACCATCGACTGCATGCTC AoLC35-12R CGACTGGCGTTCCAGTACCATGAGCC
	<i>otanpsPN</i> (OTA)	F10T GCCCAACGACAACCGCT R10T GCCATCTCCAACTCAAGCGTC
	<i>pksCT</i> (CIT)	pksCT-F ATGTGATTACGAGGACAAC pksCT-R CCTGTTCCGTGTGCCTCAAC
	<i>dmaT</i> (CPA)	dmaTF TTCAGCTCGTGAACCTTCT dmaTR GGGTCACAAAGATCGCAAGAT

novije metode teže identifikaciji vrsta plijesni detekcijom gena uključenih u biosintezu mikotoksina. Na mesnim proizvodima dosad su provedena istraživanja uz detekciju gena za produkciju AFB1/STC *nor-1*, *ver-1* i *omtA*, *OTA otapks* i *otanpsPN*, *CIT pksCT*, *CPA dmaT* (Rodriguez i sur., 2012., Zadravec i sur., 2020; Zadravec i sur., 2023.) (tablica 2). Od potencijalno toksikotvornih vrsta plijesni dosad su na hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima izolirane vrste poput: *A. creber*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. nordicum*, *A. ochraceus* i *P. verrucosum*, (Pleadin i sur., 2017.; Zadravec i sur., 2020.; Lešić i sur., 2021.; Zadravec i sur., 2023.)

Zaključak

Točna identifikacija vrsta plijesni u hrani je važna za sigurnost hrane, za slučaj kvarenja hrane ili određivanja karakteristika vezanih uz određenu vrstu, kao što je potencijal za produkciju toksičnih mikotoksina. Pogrešna identifikacija vrsta na tradicionalnim mesnim proizvodima tijekom njihove proizvodnje rezultirala bi kasnijim prepoznavanjem nepoželjnih vrsta koje bi se inače mogle pravovremeno sprije-

čiti primjenom tehnoloških mjera u proizvodnji. Za identifikaciju toksikotvornih vrsta s tradicionalnih mesnih proizvoda analizirati se mogu regije uključene u sintezu mikotoksina aflatoksina, sterigmatocistina, okratoksina A, ciklopiazonične kiseline, citrinina i sl. Međutim, za većinu mikotoksina biosintetski putevi nisu potpuno okarakterizirani pa su tako i geni koji kodiraju za enzime uključene u biosintezu ovih sekundarnih metabolita slabije poznati te zahtjevaju daljnja istraživanja u svrhu razvoja metoda za njihovu brzu i točniju identifikaciju.

Zahvala

Ovaj rad je proizašao iz doktorske disertacije dr. sc. Tine Lešić naslova „Razvoj multimikotoksinske LC-MS/MS metode i molekularna identifikacija plijesni producenata citrinina, ciklopiazonične kiseline i sterigmatocistina u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima“, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Mikotoksini u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima: molekularna identifikacija plijesni producenata i procjena izloženosti potrošača“ (IP-2018-01-9017).

Literatura

- [1] Abd El-Tawab, A.A., El-Diasty, E.M., Khater, D.F., Al-baaly, Y.M. (2020): Mycological identification of some fungi isolated from meat products and spices with molecular identification of some penicillium isolates. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 8,2, 124-129.
- [2] Alapont, C., López-Mendoza, M.C., Gil J.V., Martínez-Culebras, P.V. (2014): Mycobiota and toxigenic *Penicillium* species on two Spanish dry-cured ham manufacturing plants. *Food Addit. Contam. A* 31, 93-104.
- [3] Caceres, I., Al Khoury, A., El Khoury, R., Lorber, S.P., Oswald, I., El Khoury, A., Atoui, A., Puel, O., Bailly, J.D. (2020): Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review. *Toxins* 12, 150.
- [4] Chang, P.K., Ehrlich K.C., Fujii I. (2009): Cyclopiazonic Acid Biosynthesis of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Toxins* 1, 74-99.
- [5] Chin, D., Means, A.R. (2000): Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10, 322-328.
- [6] Comi, G., Iacumin, L. (2013): Ecology of moulds during the pre-ripening and ripening of San Daniele dry cured ham. *Food Research Int.* 54, 1113-1119.
- [7] Criseo, G., Bagnara, A., Bisignano, G. (2001): Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 291-295.
- [8] Dao, H.P., Mathieu, F., Lebrhi A. (2005): Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 61-70.
- [9] Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. (2007): *Compendium of Soil Fungi*, IHW-Verlag, Eching.
- [10] Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2004): Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of the food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* 49, 1-173.
- [11] Frisvald, J.C. (2011): Rationale for a polyphasic approach in the identification of mycotoxigenic fungi. U: *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed* (De Saeger, S., ured.), Woodhead Publishing limited, Cambridge, str. 280-296.
- [12] Geisen, R. (1996): Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Systematic Appl. Microbiol.* 19, 388-392.
- [13] Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A., Färber, P.F. (2004): Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic Appl. Microbiol.* 27, 501-507.
- [14] Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Karolewicz, A. (2006): A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. *Mycotoxin Res.* 22, 134-141.
- [15] Geiser, D., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T., Zhang, N., Kuldau, G. O'Donnell, K.

- (2004): Fusarium-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying Fusarium. *Eur. J. Plant. Pathol.* 110, 473–479.
- [16] Hubka, V., Kolarik, M. (2012): β -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persooni* 29, 1-10.
- [17] Hofstetter, V., Buyck, B., Eyssartier, G., Schnee, S., Gindro, K. (2019): The unbearable lightness of sequenced-based identification. *Fungal diversity* 96, 243-284.
- [18] Kolawole, O., Meneely, J., Petchkongkaew, A., Elliott, C. (2021): A review of mycotoxin biosynthetic pathways: associated genes and their expressions under the influence of climatic factors. *Fungal Biol. Rev.* 37, 8–26.
- [19] Lešić, T., Vahčić, N., Kos, I., Zdravec, M., Sinčić Pulić, B., Bogdanović, T., Petričević, S., Listeš, E., Škrivanko, M., Pleadin, J. (2020): Characterization of Traditional Croatian Household- Produced Dry- Fermented Sausages. *Foods* 9, 990.
- [20] Lešić, T., Zdravec, M., Zdolec, N., Vulić, A., Perković, I., Škrivanko, M., Kudumija, N., Jakopović, Ž., Pleadin, J. (2021): Mycobiota and Mycotoxin Contamination of Traditional and Industrial Dry-Fermented Sausage Kulen. *Toxins* 13, 1-13.
- [21] Luque, M.I., Cordoba, J.J., Rodriguez, A., Nunez, F., Andrade, M.J. (2013): Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products. *Food Control* 29, 270-278.
- [22] Markov, K., Pleadin, J., Jakopović, Ž., Zdravec, M., Frece, J. (2022): Plijesni – odabrane značajke, izolacija i identifikacija. Markov, K. (ur.), Hrvatski veterinarski institut, Zagreb.
- [23] MP (2018): Pravilnik o mesnim proizvodima, <https://narodnenovine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2018_07_62_1292.htm>. Pristupljeno 20. siječnja 2020.
- [24] Munaut, F., Van Hove, F. (2011): Molecular identification of mycotoxigenic fungi in food and feed. U: Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed (De Saeger, S., ured.), Woodhead Publishing limited, Cambridge, str. 298-329.
- [25] O'Callaghan, J., Stapleton, P.C., Dobson A.D.W. (2006): Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics Biol.* 43, 213–221.
- [26] Okuda, T., Klich, M.A., Seifert, K.A., Ando, K. (2000): Media and incubation effect on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. U: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification (Samson R.A., Pitt J.I., ured.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, str. 83-99.
- [27] Pitt, J.I. (1979): The genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*, Academic Press, London.
- [28] Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009): *Fungi and Food Spoilage*, 3. izd., Springer, New York.
- [29] Pleadin, J., Zdravec, M., Brnić, D., Perković, I., Škrivanko, M., Kovačević, D. (2017): Moulds and mycotoxins detected in the regional speciality fermented sausage 'slavonski kulen' during a 1-year production period. *Food Addit. Contam. A* 34, 282-290.
- [30] Pleadin, J., Vasilj, V., Petrović, D. (2018): Mikotoksini – Pojavnost, prevencija i redukcija, Sveučilište u Mostaru, Mostar.
- [31] Raja, A.H., Miller, A.N., Pearce, C.J., Oberlies, N.H. (2017): Fungal identification using molecular tools. a primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod.* 80, 756-770.
- [32] Raper, K.B., Fennell, D.I. (1965): The Genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins, Baltimore.
- [33] Rodríguez, A., María L. Werning, Mar Rodríguez, Elena Bermúdez, Juan J. Córdoba (2012): Quantitative real-time PCR method with internal amplification control to quantify cyclopiazonic acid producing molds in foods. *Food Microbiol.* 32, 397-405.
- [34] Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. Andersen, B. (2019): *Food and Indoor Fungi*, 2. izd., Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht
- [35] Samson, R.A., Varga, J. (2007): *Aspergillus* systematics in the genomic era. *Stud. Mycol.* 59, 1–206.
- [36] Sonjak, S., Ličen, M., Frisvald, J.C., Gunde-Cimerman, N. (2011): The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. *Food Microbiol.* 28, 373-376.
- [37] Storari, M., Bigler, L., Gessler, C., Broggin, G.A.L. (2012): Assessment of the ochratoxin A production ability of *Aspergillus tubingensis*. *Food Addit. Contam. A* 29, 1450-1454.
- [38] Touhami, N. (2018): Doktorska disertacija. Karlsruhe institut za tehnologiju.
- [39] Vila, G., Segura, J.A., Ludemann, V., Pose, G.N. (2019): Surface mycobiota of home-made dry cured sausages from the main producing regions of Argentina and morphological and biochemical characterization of *Penicillium nalgiovense* populations. *Int. J. Food Microbiol.* 309, 108312.
- [40] Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A. (2014): Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 78, 343-371.
- [41] White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): **Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics**. U: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. White, T.J., ured.), Academic Press, San Diego, str. 315-322.
- [42] Yang, Z.Y., Shim, W.B., Kim, J.H., Park, S.J., Kang, S.J., Nam, B.S., Chung D.H. (2004): Detection of aflatoxin-producing molds in Korean fermented foods and grains by multiplex PCR. *J. Food Protect.* 67, 2622–2626.
- [43] 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1253-1262.
- [44] Zdravec, M., Markov, K., Frece, J., Perković, I., Jakopović, Ž., Lešić, T., Mitak, M., Pleadin, J. (2019): Toxicogenic fungi and the occurrence of mycotoxins in traditional meat products. *CJFSC* 11, 272-282.
- [45] Zdravec, M., Vahčić, N., Brnić, D., Markov, K., Frece, J., Beck, R., Lešić, T., Pleadin, J. (2020): A study of surface moulds and mycotoxins in Croatian traditional dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 317, 108459.
- [46] Zdravec, M., Lešić, T., Brnić, D., Pleadin, J., Kraak, B., Jakopović, Ž., Perković, I., Vahčić, N., Jaki Tkalec, V., Houbraken, J. (2023): Regional distribution and diversity of *Aspergillus* and *Penicillium* species on Croatian traditional meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 406, 1-11.

Mould identification methods - application to traditional meat products

Abstract

The main reason for the identification of mould species in food is their ability to produce mycotoxins that have a toxic effect, whether to eliminate the growth of toxic species and thereby ensure the food safety, or to detect a mould species / strain that does not have the ability to produce mycotoxins in order to be used for other purposes such as the production of fermented food. In the identification of toxigenic moulds, recommendation is to use a polyphase approach, including traditional description of macro- and micro-morphological characteristics and molecular methods of identification by analysing characteristic DNA genetic markers. Moulds that can be found on the surface of traditional meat products that are not thermally processed play a role in the sensory properties of such finished products, and belong to the genus *Aspergillus* and *Penicillium*. The β -tubulin region is recommended for the identification of *Penicillium* species, and the calmodulin region for *Aspergillus* species. For the identification of toxigenic species from traditional meat products the regions involved in the synthesis of the mycotoxins aflatoxins, sterigmatocystin, ochratoxin A, cyclopiazonic acid and citrinin can be analyzed. However, for most mycotoxins their biosynthetic pathways have not been fully characterized, so the genes that encode for the enzymes involved in the biosynthesis of these secondary metabolites are less known and require further research in order to obtain methods for quick and more accurate identification of moulds.

Keywords: PCR, gene detection, sausages, *Aspergillus*, *Penicillium*, mycotoxins

Methoden zur Identifizierung von Schimmelpilzen - Anwendung bei traditionellen Fleischprodukten

Zusammenfassung

Der Hauptgrund für die Identifizierung von Schimmelpilzarten in Lebensmitteln ist ihre Fähigkeit, Mykotoxine zu produzieren, die eine toxische Wirkung haben, sei es, um das Wachstum toxischer Arten zu eliminieren und dadurch die Lebensmittelsicherheit zu gewährleisten, oder um eine Schimmelpilzart/einen Schimmelpilzstamm zu erkennen, die/der nicht in der Lage ist, Mykotoxine zu produzieren, damit sie/er für andere Zwecke wie die Herstellung fermentierter Lebensmittel verwendet werden kann. Bei der Identifizierung toxigener Schimmelpilze wird ein mehrstufiger Ansatz empfohlen, der die traditionelle Beschreibung makro- und mikromorphologischer Merkmale und molekulare Identifizierungsmethoden durch die Analyse charakteristischer genetischer DNA-Marker umfasst. Schimmelpilze, die auf der Oberfläche traditioneller, nicht thermisch verarbeiteter Fleischerzeugnisse zu finden sind, spielen eine Rolle für die sensorischen Eigenschaften solcher Fertigerzeugnisse und gehören zu den Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*. Für die Identifizierung von *Penicillium*-Arten wird die β -Tubulin-Region empfohlen, für *Aspergillus*-Arten die Calmodulin-Region. Zur Identifizierung toxigener Arten aus herkömmlichen Fleischprodukten können die an der Synthese der Mykotoxine Aflatoxine, Sterigmatocystin, Ochratoxin A, Cyclopiazonsäure und Citrinin beteiligten Regionen analysiert werden. Für die meisten Mykotoxine sind die Biosynthesewege jedoch noch nicht vollständig charakterisiert, so dass die Gene, die für die Enzyme kodieren, die an der Biosynthese dieser Sekundärmetaboliten beteiligt sind, weniger bekannt sind und weitere Forschung erfordern, um Methoden für eine schnelle und genauere Identifizierung von Schimmelpilzen zu erhalten.

Schlüsselwörter: PCR, Gennachweis, Wurstwaren, *Aspergillus*, *Penicillium*, Mykotoxine

Métodos de identificación de moho - aplicación en productos cárnicos tradicionales

Resumen

La razón principal para la identificación de especies de moho en alimentos es su capacidad para producir micotoxinas que tienen un efecto tóxico, ya sea para eliminar el crecimiento de especies tóxicas y así garantizar la seguridad alimentaria, o para detectar una especie o cepa de moho que no tiene la capacidad de producir micotoxinas con el fin de ser utilizada para otros fines, como la producción de alimentos fermentados. En la identificación de mohos toxigénicos, se recomienda utilizar un enfoque polifásico, que incluya la descripción tradicional de características macro y micro morfológicas y métodos moleculares de identificación mediante el análisis de marcadores genéticos de ADN característicos. Los mohos que pueden encontrarse en la superficie de productos cárnicos tradicionales que no son procesados térmicamente juegan un papel en las propiedades sensoriales de dichos productos terminados, y pertenecen al género *Aspergillus* y *Penicillium*. Se recomienda la región del β -tubulina para la identificación de especies de *Penicillium* y la región de la calmodulina para especies de *Aspergillus*. Para la identificación de especies toxigénicas de productos cárnicos tradicionales, pueden analizarse las regiones involucradas en la síntesis de las micotoxinas aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina A, ácido ciclopiazónico y citrinina. Sin embargo, para la mayoría de las micotoxinas, sus vías biosintéticas no han sido completamente caracterizadas, por lo que los genes que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de estos metabolitos secundarios son menos conocidos y requieren más investigación para obtener métodos de identificación rápidos y más precisos de mohos.

Palabras claves: PCR, detección de genes, embutidos, *Aspergillus*, *Penicillium*, micotoxinas

Metodi di identificazione delle muffe – applicazione ai prodotti tradizionali a base di carne

Riassunto

Il motivo principale per l'identificazione delle specie di muffe negli alimenti è la loro capacità di produrre micotossine che hanno un effetto tossico, sia che si tratti di eliminare la crescita di specie tossigene e, quindi, garantire la sicurezza alimentare, sia di rilevare una specie o un ceppo di muffe che non hanno la capacità di produrre micotossine e che potrebbero essere utilizzate per altri scopi, come la produzione di alimenti fermentati. Nell'identificazione delle muffe tossigene si raccomanda di utilizzare un approccio polifase che, oltre alla tradizionale descrizione delle caratteristiche macro e micro morfologiche, comprende anche metodi molecolari di identificazione mediante l'analisi dei marcatori genetici caratteristici del DNA. Le muffe rinvenibili sulla superficie dei prodotti tradizionali a base di carne non trattati termicamente svolgono un ruolo nelle proprietà sensoriali di tali prodotti finiti e appartengono ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*. Per l'identificazione della specie *Penicillium* si consiglia di analizzare la regione del DNA della tubulina β mentre, per l'identificazione della specie *Aspergillus*, la regione cromosomica da analizzare è quella della calmodulina. Per l'identificazione delle specie tossigene proprie dei prodotti tradizionali a base di carne, possono essere analizzate le regioni coinvolte nella sintesi delle micotossine aflatoxina, sterigmatocistina, ocratoxina A, acido ciclopiazónico, citrinina, ecc. Tuttavia, per la maggior parte delle micotossine, le vie biosintetiche non sono state caratterizzate appieno, e quindi i geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella biosintesi di questi metaboliti secondari sono meno conosciuti e richiedono ulteriori ricerche al fine di sviluppare metodi rapidi e più accurati per la identificazione delle muffe. Questo studio offre una panoramica dei metodi utilizzabili per l'identificazione di muffe per diversi tipi di alimenti e sono applicabili, in particolare, per l'identificazione di quelle muffe superficiali che si sviluppano sui prodotti tradizionali a base di carne.

Parole chiave: PCR, rilevazione genica, salsicce, *Aspergillus*, *Penicillium*, micotossine