



Mykotoksyny – zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Część 2. Mykotoksyny zamaskowane – powstawanie, występowanie w żywności i paszach, metody identyfikacji i eliminacji mykotoksyn, prawodawstwo dotyczące mykotoksyn

Mycotoxins - a threat to human and animal health
Part. 2. Masked mycotoxins - formation, occurrence in food and feed, methods of identification and elimination of mycotoxins, legislation on mycotoxins

Wiesław Barabasz^{1,2}, Anna Pikulicka²

¹Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

²Instytut Nauk Technicznych,

Państwowa Wyższa Szkoła Wschodnioeuropejska w Przemyślu

Streszczenie

Mykotoksyny zamaskowane są to związki będące produktem reakcji obronnej roślin na obecność mykotoksyn. Poprzez skomplikowane reakcje enzymatyczne mykotoksyny są przekształcane w związki niewykazujące właściwości toksycznych względem rośliny. Niestety ich obecność w żywności i paszy jest dla zwierząt w podobnym stopniu szkodliwa jak „zwykłych” mykotoksyn. Rośliny rozpoznają mykotoksyny, po czym poddają je procesowi glikozylacji lub sprzęgają z cząsteczką siarki, co skutecznie neutralizuje truciznę. Tak przekształcone mykotoksyny nazwano „zamaskowanymi mykotoksynami”. Są związkami nie szkodzącymi roślinie, w której występują. Jednakże procesy te nie zabezpieczają zwierząt i ludzi przed zatruciami. Zamaskowane mykotoksyny to nowy poważny problem, który pojawił się stosunkowo niedawno, w związku z tym nie są ujęte w obecnie obowiązujących przepisach dotyczących bezpieczeństwa żywności oraz braku wystarczającej ilości danych dotyczących tego,

co dzieje się w organizmie ludzi i zwierząt po spożyciu produktów żywnościowych zawierających tak przekształcone mykotoksyny. Aby chronić się przed szkodliwym działaniem mykotoksyn są stosowane liczne metody ich eliminacji i detoksykacji. Sprzyja temu wiele rozporządzeń, dyrektyw, ustaw, które regulują i kontrolują obrót żywnością i paszami na całym świecie.

Słowa kluczowe

zamaskowane mykotoksyny, glikozylacja mykotoksyn, występowanie w żywności i paszach, metody identyfikacji i eliminacji mykotoksyn

Summary

Mycotoxins, which are masked, are compounds that are a defense reaction of plants for the presence of mycotoxins. Through complex enzymatic reactions, mycotoxins are converted into compounds that do not exhibit toxic properties to the plant. Unfortunately, their presence in food and feed is similarly harmful to animals as „normal” mycotoxins. Plants recognize mycotoxins and then process them by glycosylation or by coupling with the sulfur molecule, which effectively neutralizes the poison. Such transformed mycotoxins are called „masked mycotoxins”. They are compounds that do not harm the plant in which they occur. However, these processes do not protect animals and humans from poisoning. Masked mycotoxins are a new serious problem that has occurred relatively recently and are therefore not covered by current food safety legislation and there is insufficient data on what happens in humans and animals after consuming food containing such transformed mycotoxins. To protect against the harmful effects of mycotoxins, numerous methods of their elimination and detoxification are used. This is favored by many regulations, directives and laws that regulate and control the circulation of food and feed all over the world.

Key words

masked mycotoxins, glucosylation mycotoxins, occurrence in food and feed, methods of identification and elimination

Wprowadzenie

W ostatnim czasie coraz więcej mówi się o tzw. mykotoksynach zamaskowanych, są to związki będące produktem reakcji obronnej rośliny na obecność mykotoksyn [1, 2]. Poprzez skomplikowane reakcje enzyma-

tyczne mykotoksyny są przekształcane w związki niewykazujące właściwości toksycznych względem rośliny. Jest rzeczą ogólnie znaną, że rośliny mogą zmniejszać toksyczność związków fitotoksycznych poprzez ich modyfikację chemiczną. Proces detoksykacji związków toksycznych dla roślin polega na ich koniugacji z substancjami polarnymi takimi jak cukry, aminokwasy i siarczany, a następnie przechowywanie koniugatów w wakuolach komórkowych [3, 4, 5, 6, 7]. Gareis i in. w 1990 r. [8] wykazali, że w badanej przez nich żywności występują mykotoksyny, których nie da się oznaczyć rutynowymi metodami analitycznymi. Te mykotoksyny, a były to glikozydowe połączenia z zearalenonem, nazwano „zamaskowanymi mykotoksynami”. W 2005 r. Berthiller i in. [9] opublikowali obszerną pracę, w której szczegółowo opisano uzyskane dane dotyczące występowania deoksynawenu-3-glukozydu (DON-3G) w próbkach kukurydzy i pszenicy. Od tego czasu badania nad zamaskowanymi mykotoksynami zaczęto prowadzić w licznych laboratoriach na całym świecie. Należy zaznaczyć, że oprócz metabolizmu roślin również procesy technologiczne żywności mają wpływ na pojawianie się mechanizmów maskujących mykotoksyny, w szczególności w produktach zbożowych [10, 11, 12, 13, 14].

Niestety ich obecność w żywności i paszy jest w podobnym stopniu szkodliwa dla zwierząt co „zwykłych” mykotoksyn. Rośliny rozpoznają mykotoksyny, po czym poddają je procesowi glikozylacji, tj. wiązania z cząsteczką glukozy za pomocą enzymu glikozylo-transferazy EC.2.4. lub sprzęgają z cząsteczką siarki za pomocą enzymów przenoszących grupy zawierające siarkę EC.2.8., co skutecznie neutralizuje truciznę.

Tak przekształcone mykotoksyny stają się substancjami, które nie szkodzą roślinie, w której występują! Jednakże procesy te nie zabezpieczają zwierząt i ludzi przed zatruciami. Najczęściej zamaskowanymi mykotoksynami są toksyny wytwarzane przez grzyby z rodzaju *Fusarium*.

Szczegółowe badania wykazały, że po spożyciu pasz, najczęściej zbożowych, zawierających nieaktywne „zamaskowane mykotoksyny” połączenia glikozydowe ulegają strawieniu, na skutek czego toksyna odzyskuje swoją aktywność [4, 15, 16, 17, 18, 19].

Zamaskowane mykotoksyny nie są ujęte w obecnie obowiązujących przepisach dotyczących bezpieczeństwa żywności z powodu braku wystarczającej ilości danych dotyczących tego, co dzieje się w organizmie ludzi i zwierząt po spożyciu takich produktów. Sytuacja z zamaskowanymi mykotoksynami jest jeszcze bardziej skomplikowana, ponieważ często

rośliny są porażane przez szereg gatunków z rodzaju *Fusarium* równocześnie, a w porażonej próbie może być obecnych kilka różnych mykotoksyn.

Zapobieganie syntezie mykotoksyn przez grzyby – działania prewencyjne i ich eliminacja

Działania prewencyjne w sprawie zapobiegania i ograniczania występowania groźnych toksyn *Fusarium* w zbożach i produktach zbożowych zostały przedstawione m.in. w Rozporządzeniu Komisji UE 1881/2006; Dz.U.L364 z 20 grudnia 2006 r. oraz Zaleceniu Komisji UE 583/2006; Dz.U.L234 z 29 sierpnia 2006 r. [20]. Tworzeniu się mykotoksyn w płodach rolnych można zapobiegać dzięki stosowaniu prawidłowej praktyki rolniczej w warunkach polowych oraz zabiegów poprzedzających przechowywanie plonów oraz w jego trakcie. Jednakże całkowite wyeliminowanie zanieczyszczeń jest niemożliwe. Również nie do uniknięcia jest spożywanie mykotoksyn, ale można ograniczyć ich ilość poprzez:

- wyrzucanie zgniłych i spleśniałych produktów, nawet tych z ledwo widocznymi śladami zepsucia, - planowanie jadłospisu i kupowanie świeżych produktów, które wykorzystamy do przyrządzenia posiłków w najbliższych dniach;
- przechowywanie warzyw i owoców poza lodówką - nie zamykajmy ich w wilgotnych szufladach w lodówce, a zwłaszcza w foliowych woreczkach, gdzie najszybciej dochodzi do rozwoju pleśni,
- unikanie orzeszków ziemnych i pistacji,
- picie tylko prawdziwej kawy, świeżo zmielonej w młynku lub ekspresie.

Takie postępowanie powinno uchronić nas przed odkładaniem się w organizmie znacznych ilości mykotoksyn.

Metody agrotechniczne w czasie okresu wegetacyjnego

W ograniczaniu występowania mykotoksyn metody agrotechniczne są typowo prewencyjne i najbardziej skuteczne, gdy zaczynamy je wprowadzać przed infekcją roślin grzybami pleśniowymi [21, 22]. Zalicza się do nich m.in. płodozmian, nawożenie, termin siewu oraz zabiegi chemiczne. Ważnym czynnikiem coraz częściej pomijanym we współczesnym rolnictwie jest odpowiednie zmianowanie, które szczególnie istotne jest w ograniczeniu porażenia roślin przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Główny rezerwuar zarodników tych grzybów jest w glebie. Ciągła uprawa tej

samej rośliny zwiększa ich koncentracje w glebie. Tym samym zwiększa się poziom infekcji roślin. Widoczne jest to m.in. w uprawie monokultury kukurydzy [23]. Odpowiednie nawożenie, w szczególności azotowe, oraz termin siewu może się przyczynić do obniżenia porażenia roślin przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Niektórzy badacze twierdzą, że stosowanie różnego rodzaju nawozów (mocznika, azotanu amonu, azotanu wapnia) powoduje spadek stopnia zanieczyszczenia ziaren grzybami pleśniowymi. Jednakże nadmiar azotu w glebie powoduje zwiększenie poziomu zainfekowania ziaren [24, 25]. Termin siewu jest bardzo ważny, aby uniknąć pokrycia się czasu kwitnienia np. kukurydzy z datą uwalniania zarodników grzybów pleśniowych. Dlatego wcześniejszy termin siewu kukurydzy w poszczególnych obszarach często powoduje niższy poziom porażenia [26]. Szczególnie ważnym aspektem jest prawidłowa ochrona fungicydowa, herbicydowa oraz insektycydowa roślin. Niestety zarówno chwasty, jak i owady mogą być przyczyną zwiększenia porażenia roślin przez grzyby. Owady biorą czynny udział w zakażeniach fuzaryjnych roślin przez przenoszenie zarodników grzybów, uszkodzanie ziaren oraz tkanek roślin, ułatwiając tym samym wniknięcie czynnika chorobotwórczego do rośliny. Natomiast chwasty mogą być doskonałym schroniskiem dla rozwoju i zimowania grzybów pleśniowych [27]. Podsumowując, należy stwierdzić, że najlepszym sposobem są działania prewencyjne polegające na odpowiednim traktowaniu surowca roślinnego podczas wegetacji, zbioru i magazynowania. Należą do nich:

- wybór odmian/hybryd odpornych na infekcje grzybowe i na szkodniki owadzie,
- minimalizowanie narażenia roślin na stres np. brak wody, zimno,
- uważne stosowanie środków ochrony roślin,
- stosowanie środków owado- i chwastobójczych,
- selekcja siedliska dla tych samych gatunków roślin, przestrzeganie odległości między rzędami roślin,
- terminowe zbiory,
- unikanie uszkodzeń mechanicznych oraz zanieczyszczenia gleby,
- dobre gospodarowanie glebą (orka) w celu usunięcia, zniszczenia lub zakopania zainfekowanych resztek pozostałych po zniwach,
- płodozmian,
- magazynowanie surowców w odpowiednich warunkach temperatury i wilgotności.

Eliminacja mykotoksyn podczas przechowywania

Do zabiegów poprzedzających przechowywanie plonów oraz wykonywanych w jego trakcie w celu zmniejszenia porażenia przez grzyby pleśniowe należą: metody fizyczne (segregowanie, mycie, obłuskiwanie, napromieniowanie), biologiczne i chemiczne. Przetamane ziarna zbóż zwykle zawierają dziesięciokrotnie wyższe wartości fumonizyn niż całe ziarna. Dlatego techniki segregacji (ręczna, mechaniczne, flotacyjne) powodują zmniejszenie zanieczyszczeń ziarniaków, np. przez fumonizyny. Zarówno mycie, jak i obłuskiwanie także w znaczny sposób zmniejsza stężenie mykotoksyn. Mycie może być zastosowane wobec środków spożywczych i pasz przed mieleniem na mokro lub przed wykorzystaniem materiału roślinnego do produkcji etanolu, natomiast obłuskiwanie usuwa zewnętrzną część ziarna, w której jest największa koncentracja mykotoksyny. Kolejną metodą jest napromieniowanie promieniami gamma lub UV. Sposób ten może wyeliminować obecność grzybów pleśniowych, lecz nie powoduje zmniejszenia stężenia mykotoksyn już powstałych [20, 28].

Metody biologiczne

Metody biologiczne polegają głównie na poszukiwaniu drobnoustrojów, które skutecznie metabolizowałyby mykotoksyny, a zarazem nie produkowałyby żadnych toksycznych metabolitów ubocznych, stanowiących dodatkowe zagrożenie dla zdrowia człowieka i zwierząt oraz na zastosowaniu mikroorganizmów jako dodatków paszowych, które dezaktywują ewentualne mykotoksyny w paszy np. *Eubacterium* wyizolowane z treści żwacza powodowały znaczny spadek toksyczności mykotoksyn, m.in. trichotecenów. Natomiast drożdże wyizolowane z tylnego odcinka jelit termitów powodowały dezaktywację zearalenonu w paszy [20].

Należy zaznaczyć, że wykorzystanie mikroorganizmów lub składników ich komórek do dekontaminacji żywności i pasz budzi duże nadzieje, ale też kontrowersje z punktu widzenia konsumenta. Brak jest unormowań prawnych w tej kwestii, a dane dotyczące trwałości połączenia bakterie-toksyna w przewodzie pokarmowym, a także dane toksykologiczne są wciąż niepełne. Jedyną grupą drobnoustrojów, które obok innych korzystnych cech prozdrowotnych wykazuje zdolność do usuwania toksyn, są probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej. Również drożdże *Saccharomyces cerevisiae* oraz składnik ich ściany komórkowej – glukan – mogą być wykorzystywane w tym celu. W badaniach

naukowych wykazano, że szczepy *Lactobacillus acidophilus* oraz *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* nie tylko zmniejszają ilość aflatoksyny B1 w pożywce, lecz także obniżają mutagenność środowiska. Potwierdzono także zdolność do obniżania zawartości ochratoksyny A w mleku przez bakterie fermentacji mlekowej należące do gatunków *Lactococcus salivarius*, *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* i *Bifidobacterium bifidum*. Czynniki te mogą być używane zarówno jako suplementy diety u ludzi, jak i składniki paszowe w żywieniu zwierząt, a także w trakcie procesów biotechnologicznych [29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41].

Należy zaznaczyć, że aktualnie prowadzone są badania, które koncentrują się głównie na wykorzystaniu potencjalnej zdolności roślin do samodzielnego zwalczania mykotoksyn. Do takich nowych strategii należą m.in.:

- selekcja genetyczna, której celem jest wzmocnienie odporności roślin na infekcję grzybową i w konsekwencji skażenie toksynami,
- produkcja roślin transgenicznych, wykazujących odporność na infekcje grzybowe albo zdolnych do ograniczenia tych infekcji lub produkcji toksyn,
- produkcja nasion zasiedlonych przez endofity – bakterie o zdolności eliminowania toksynotwórczych grzybów,
- uprzednia infekcja roślin szczepami pleśni nietoksynotwórczej: obecność tych szczepów na roślinach zbożowych stanowi konkurencję dla szczepów toksynotwórczych; z tego też względu strategię tę określa się nieraz terminem walka biologiczna.

Metody chemiczne

W metodach chemicznych stosuje się różne związki chemiczne w celu dezaktywacji, absorpcji lub wyparcia mykotoksyn z pasz, np. amoniak, NaOCl, H₂O₂, SO₂. Wymienione metody nie znajdują jednak praktycznego zastosowania głównie ze względu na niebezpieczeństwo tworzenia toksycznych pozostałości lub zmiany wartości odżywczej i cech organoleptycznych oczyszczanych produktów [42]. Istnieją również komercyjnie dostępne dodatki do pasz objętościowych, które skutecznie absorbują toksyny bezpośrednio w paszy lub w przewodzie pokarmowym zwierząt. W konsekwencji toksyny nie wchłaniają się z paszy do krwiobiegu. Do takich adsorbentów można zaliczyć m.in.: glinki, kaolin, zeolity, węgiel

aktywny, glinokrzemiany sodu i magnezu oraz uwodniony glinokrzemian sodowo-wapniowy i bentonit. Jednakże wadą tych środków jest równoczesne wiązanie m.in. witamin oraz mikro- i makroelementów [20, 43]. Należy zaznaczyć, że podczas zabiegów kulinarnych mykotoksyny mogą ulegać licznym przekształceniom i powstające nowe związki nie zawsze są mniej toksyczne niż pierwowzory, ale na pewno nie ulegają całkowitej eliminacji.

Metody inżynierii genetycznej

Obecnie coraz popularniejsze stają się metody inżynierii genetycznej w celu uzyskiwania roślin z opornością na patogeny. Jednakże rośliny takie mogą być uprawiane tylko w krajach, gdzie jest dozwolona uprawa roślin transgenicznych. Naukowcy pracują także nad opracowaniem procesu zapobiegania syntezy mykotoksyn lub wzbudzaniu procesu detoksykacji już w organizmie roślinnym [44]. Wiadomo już, że za tworzenie trichotecenów i zearalenonu odpowiedzialnych jest szereg genów. Istotną rolę w biosyntezie trichotecenów odgrywają geny Tri5, Tri7, a w syntezie zearalenonu – geny PKS4 i PKS13 [45, 46].

Ogromne znaczenie mają techniki pozwalające na wczesne wykrycie obecności patogenu i określenie jego zdolności do tworzenia mykotoksyn. Są to obecnie podstawowe elementy profilaktyki ochrony przed zanieczyszczeniem toksynami produktów spożywczych i paszowych. W celu uniknięcia strat upraw spowodowanych występowaniem patogenów wykorzystuje się różne metody biologii molekularnej. Metody te umożliwiają szybkie zastosowanie środków zaradczych i unikanie skażonej żywności. Opierają się one na analizie struktury DNA, a wyniki z analiz molekularnych nie zależą od stanu fizjologicznego badanego organizmu. Metody te pozwalają na łatwiejszą oraz szybszą ocenę mykotoksyntowczości w porównaniu z tradycyjnymi metodami. Wśród licznych metod molekularnych służących do wykrywania, identyfikacji i klasyfikacji patogenów są stosowane obecnie techniki SCAR, RT-PCR, Real-time PCR. Technika RT-PCR pozwala na stwierdzenie, czy grzyb wykazuje aktywność do produkcji mykotoksyn. Określenie jej jest możliwe poprzez detekcję mRNA dla transkryptu genów zaangażowanych w formowanie metabolitów wtórnych. Jeśli geny biosyntezy mykotoksyn ulegają transkrypcji, wówczas dany metabolit jest wytwarzany [47, 48].

Do wykrywania mykotoksyn stosowana jest m.in. chromatografia powinowactwa immunologicznego z detekcją fluorymetryczną. Metoda ta polega na specyficznym wiązaniu znanych przeciwciał z mykotoksynami. Najczęściej znajduje zastosowanie w przemyśle spożywczym. Praktyczne zastosowanie w diagnostyce szczepów toksynotwórczych znajdują także testy immunoenzymatyczne ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), szczególnie w przypadku badania żywności. Testy ELISA wykorzystywane są do ilościowej lub jakościowej analizy poszczególnych mykotoksyn w wybranych produktach spożywczych. Duże znaczenie w wykrywaniu szczepów toksynotwórczych odgrywają metody biologii molekularnej opierające się na analizie struktury kwasów nukleinowych. Techniki te pozwalają na szybką identyfikację szczepów oraz mykotoksyn przez nie produkowanych. Metody te opierają się na reakcji łańcuchowej polimerazy PCR. Największe znaczenie w identyfikacji mykotoksyn mają metody oparte na modyfikacji PCR, głównie odmiany tej techniki RT-PCR i Real-time PCR. RT-PCR (*reverse transcriptase*) to metoda, w której mRNA ulega odwrotnej transkrypcji do cDNA przez amplifikację PCR i pozwala na wykrycie transkryptów genów kodujących wytwarzanie metabolitów grzybów pleśniowych. Jedną z najdokładniejszych metod badań wykrywających mykotoksyny jest Real-Time PCR. Przy użyciu tej techniki można ilościowo badać powstałe produkty PCR po zastosowaniu specyficznych sond DNA wyznakowanych barwnikami interkalującymi DNA. Cytotoksyczność mykotoksyn można określać za pomocą testów, np.: Testu Kultur Komórkowych (MTT). Test ten pozwala na wykrycie w żywności, paszach czy materiałach budowlanych substancji powstających pod wpływem działania mykotoksyn. Test MTT charakteryzuje się wysoką czułością, ponieważ użyte w nim komórki świńskich nerek są wrażliwe na większość mykotoksyn. Działanie testu polega na przemianie soli tetrazoliowych do formazanu (reakcja barwna). Komórki uszkodzone przez mykotoksynę nie przeprowadzają w pełni lub w ogóle tej reakcji, stopień przemiany chemicznej mierzy się fotometrycznie. Na podstawie badań przy wykorzystaniu testu MTT ustalono, że największą cytotoksyczność wykazują toksyny: nivalenol, aflatoksyna, ochratoksyna A oraz detoksyniwalenol.

Prawodawstwo w zakresie maksymalnych dopuszczalnych poziomów wybranych mykotoksyn fuzaryjnych

Najważniejszą organizacją międzynarodową zajmującą się problematyką bezpiecznej żywności jest Komisja Kodeksu Żywnościowego FAO/WHO (Codex Alimentarius Commission FAO/WHO, CAC). Współpracuje ona z wieloma organizacjami, m.in. z Komitetem Kodeksu Żywnościowego FAO/WHO ds. Substancji Dodatkowych i Zanieczyszczeń (Codex Committee on Food Additives, CCFAC) oraz z Połączonym Komitetem Ekspertów FAO/WHO ds. Substancji Dodatkowych i Zanieczyszczeń w Żywności (Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA). JECFA ocenia toksyczność poszczególnych mykotoksyn na podstawie analizy badań na zwierzętach, m.in. określając poziom substancji, przy którym nie stwierdza się szkodliwego działania (NOAEL). NOAEL oraz współczynnik bezpieczeństwa stanowią podstawę do określania tolerowanego dziennego/tygodniowego pobrania TD/WI (*tolerable daily/weekly intake*) dla substancji stosowanych w produkcji żywności oraz wyznaczania tymczasowego tolerowanego dziennego/tygodniowego pobrania t-TD/WI (*temporary tolerable daily/weekly intake*) [49, 50, 51].

W krajach Wspólnoty Europejskiej maksymalne limity i regulacje dla mykotoksyn są wyznaczane przez Komisję Europejską (European Commission, EC), natomiast Naukowy Komitet ds. Żywności (Scientific Committee for Food, SCF) pełni funkcję doradczą w Komisji Europejskiej.

Proponowane wskaźniki TD/WI przedstawione w opiniach Komitetu ds. Żywności Unii Europejskiej dla najważniejszych mykotoksyn kształtują się następująco:

DON: TD/WI = 1 µg/kg masy ciała/dzień,

ZEA: TD/WI = 0,2 µg/kg masy ciała/dzień,

Fumonizyny B1, B2, B3: łącznie lub oddzielnie TD/WI = 2 µg/kg masy ciała/dzień.

Tabela 1. Propozycje maksymalnych poziomów zanieczyszczeń żywności toksynami *Fusarium* w UE (według sprawozdania z posiedzenia Komitetu Ekspertów Komisji Europejskiej, 2004).

Mykotoksyna	Produkt	Najwyższy dopuszczalny poziom, (µg/kg)
Deoksyniwalenol	Zboża nieprzetworzone z wyłączeniem kukurydzy i pszenicy durum	1000
	Nieprzetworzona pszenica durum	150
	Mąka z pszenicy durum, mąka kukurydziana, semolina	750
	Inne produkty zbożowe	500
	Płatki śniadaniowe	300
	Makaron (suchy)	750
	Przetwory zbożowe dla niemowląt i małych dzieci	200
Zearalenon	Zboża nieprzetworzone z wyłączeniem kukurydzy	100
	Mąka z wyłączeniem kukurydzianej: - o wymiale > 80% - o wymiale ≤ 80%	100 50
	Grys, mąka, olej kukurydziany	200
	Inne produkty zbożowe z wyłączeniem kukurydzy	50
	Płatki śniadaniowe i inne produkty kukurydziane	75
	Przetwory zbożowe dla niemowląt i małych dzieci	20
Fumonizyny	Mąka i grys kukurydziany	500
	Płatki śniadaniowe i inne produkty kukurydziane	200
	Przetwory zbożowe dla niemowląt i małych dzieci	150

Obecnie na poziomie państw Unii Europejskiej nie ustanowiono limitów dla toksyn *Fusarium*. Na posiedzeniu Ekspertów Komisji Europejskiej w sprawie rolniczych zanieczyszczeń w dniu 17 lutego 2004 r., po analizie danych o występowaniu toksyn fuzaryjnych w żywności i oszacowa-

niu narażenia na pobieranie tej grupy mykotoksyn przez mieszkańców UE, przyjęto propozycje maksymalnych poziomów zanieczyszczeń niektórych produktów deoksyniwaleolem, zearalenonem i fumonizynami (tabela 2). Dla deksyniwaleolu rekomenduje się limity od 200 µg/kg (przetwory zbożowe dla niemowląt i małych dzieci) do 1500 µg/kg (nieprzetworzona pszenica durum), dla zearalenonu od 20 µg/kg (przetwory zbożowe dla niemowląt i małych dzieci) do 200 µg/kg (grys, mąka, olej kukurydziany), natomiast dla fumonizyn od 150 do 500 µg/kg. W Stanach Zjednoczonych, gdzie fumonizyny stwierdzane są bardzo często w wysokich stężeniach i stanowią poważne zagrożenie dla ludzi i zwierząt, FDA (Food and Drug Administration) ustalił maksymalne poziomy dla sumy fumonizyn (FB1+FB2+FB3) od 2000 do 4000 µg/kg w żywności i od 5000 do 100000 µg/kg w paszach dla zwierząt. Prace nad uregulowaniami prawnymi dotyczącymi bezpiecznych dopuszczalnych poziomów zanieczyszczenia mykotoksynami w żywności są w państwach UE nadal kontynuowane. Również w Polsce obowiązuje Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. dotyczące szkodliwych czynników biologicznych w środowisku pracy, w którym zwrócono uwagę na grzyby toksynotwórcze.

Tabela 2. Wdrożone rozporządzenia dotyczące zawartości mykotoksyn w niektórych surowcach i produktach spożywczych

Wyszczególnienie	Mykotoksyna	Produkt	Stężenie w µg/kg
Rozporządzenie 72, Dz. Ustaw nr 9/2001	Patulina	Sok jabłkowy	30
	Aflatoksyny: B1	Produkty: Ziarno zbóż i produkty	2
	B1 + B2 + G1 + G2 M1	Ziarno zbóż i produkty Mleko surowe i spożywcze	4 0,05
Rozporządzenie Komisji Europejskiej (WE), Nr 856/2005 z 6 lipca 2005 r.	DON	Ziarno kukurydzy	Od lipca 2007 < 1750
	Zearalenon	Produkty: - mąka i otręby - ciastka i snacki	Od lipca 2007 < 200 < 50
	Fumonizyna	Produkty: - ziarno - mąka i kasze - produkty spożywcze	Od grudnia 2007 < 2000 < 1000 < 400

Metody identyfikacji i oznaczania mykotoksyn

Niezwykle ważnym elementem w działaniach mających na celu zapewnienie bezpieczeństwa żywności są odpowiednie metody analityczne. Podstawową rolę we współczesnej analizie mykotoksyn odgrywają metody fizykochemiczne, do których należą:

- wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (HPLC) z detekcją fluorymetryczną,
- chromatografia gazowa (GC) często połączona ze spektrometrią mas (GC-MS),
- chromatografia cienkowarstwowa (TLC) w UV stosowana zarówno w skryningu, jak i w oznaczeniach ilościowych.

Ponadto stosowane są również metody immunoenzymatyczne:

- testy immunoenzymatyczne ELISA,
- kolumny powinowactwa immunologicznego stosowane do oczyszczania ekstraktów lub do oznaczeń ilościowych z detekcją fluorymetryczną.

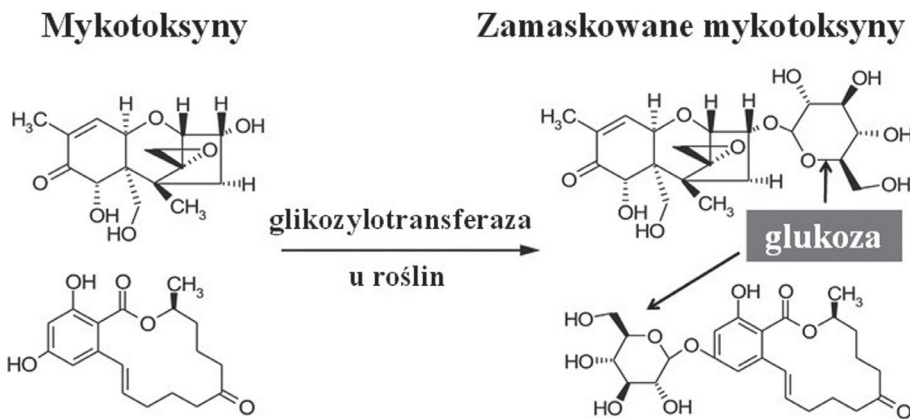
Metody immunologiczne stosowane w analizie mykotoksyn są metodami kompetencyjnymi. Najbardziej znaną jest immunoenzymatyczna metoda ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Główną zaletą metod immunologicznych jest ich specyficzność, dzięki której możliwe jest wyeliminowanie większości zanieczyszczeń zewnętrznych występujących w ekstrakcie, przez co uzyskuje się niskie granice wykrywalności, szybkość oznaczeń oraz małe zużycie rozpuszczalników.

W obecnym czasie przywiązuje się coraz większą uwagę do produkcji bezpiecznej żywności. Opinie i raporty światowych ekspertów wskazują, że problem zanieczyszczenia zbóż toksynami fuzaryjnymi jest niezwykle ważny z przyczyn zdrowotnych i ekonomicznych. Niestety, stosowanie dobrej praktyki rolniczej i dobrej praktyki produkcyjnej nie daje możliwości całkowitej eliminacji tych związków z żywności i pasz, dlatego też niezbędne jest wprowadzenie systemów ich monitorowania. Wymaga to zastosowania odpowiednich metod analitycznych, które dałyby pewność zarówno organom kontroli urzędowej, jak i producentom oraz dostawcom żywności o jej bezpieczeństwie.

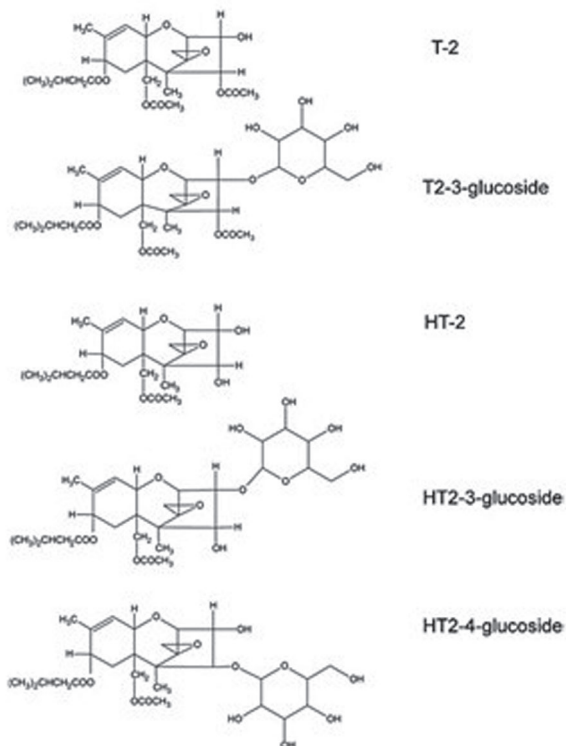
Podsumowanie

Problem zamaskowanych mykotoksyn pojawił się stosunkowo niedawno – z chwilą opracowania nowych metod ich identyfikacji w materiale bio-

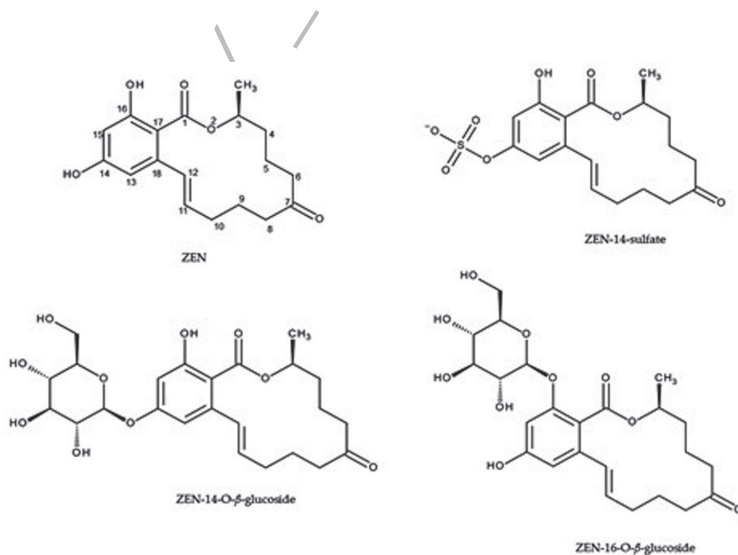
logicznym. Powstają w różnych środowiskach, a ich występowaniu sprzyja wilgotność i wiele innych czynników powszechnie obecnych w naszym otoczeniu. Zamaskowane mykotoksyny, które uległy procesowi glikolizacji, nie są wykrywane tradycyjnymi metodami i nie podlegają żadnym normom, a razem z żywnością przedostają się do organizmu ludzi i zwierząt, gdzie po odłączeniu cząsteczki glukozy stają się „normalnymi” mykotoksynami i zaczynają działać toksycznie. Związki te odznaczają się wielokierunkowymi działaniami na organizmy żywe i powodują liczne choroby, a nawet są przyczyną śmierci ludzi i zwierząt. Aby chronić się przed szkodliwym działaniem mykotoksyn stosuje się liczne metody ich eliminacji i detoksykacji. Sprzyja temu wiele rozporządzeń, dyrektyw, ustaw, które regulują i kontrolują obrót żywnością i paszami na całym świecie.



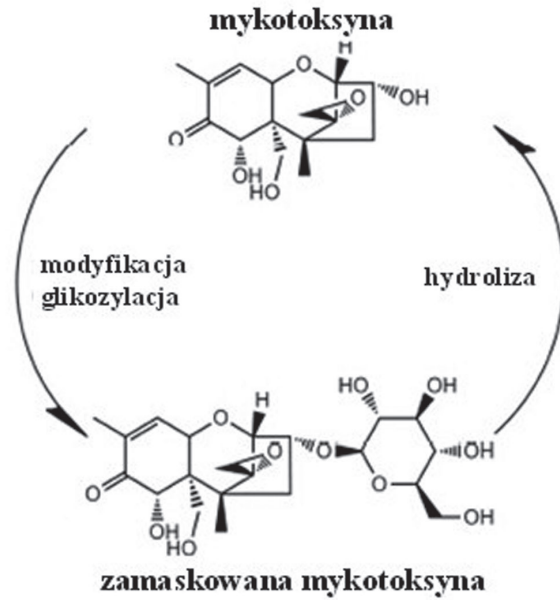
Rycina 1. Mechanizm powstawania zamaskowanych mykotoksyn np. 3-glukozodeoksyniwalenolu w wyniku glikozylacji deoksyniwalenolu



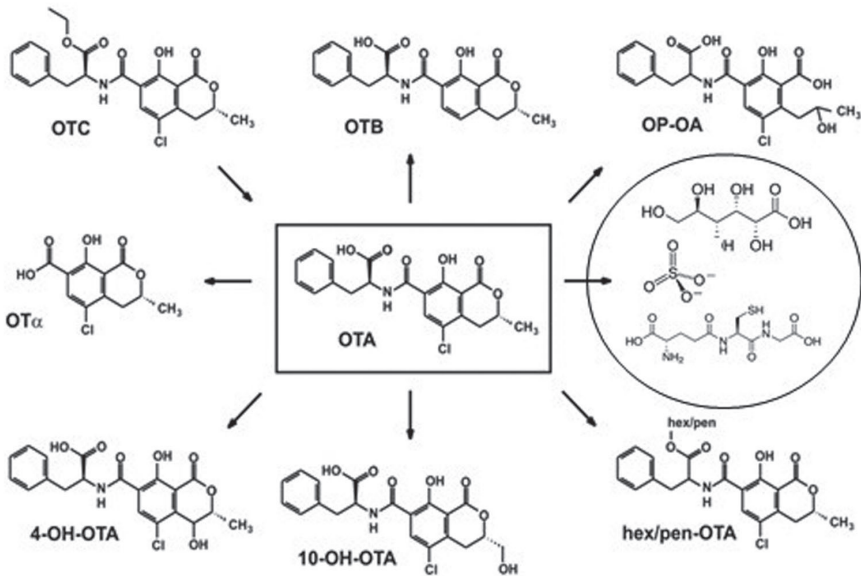
Rycina 2. Zamaskowne mykotosyny powstałe w wyniku przyłączenia cząsteczki glukozy



Rycina 3. Zamaskowane formy zearalenonu

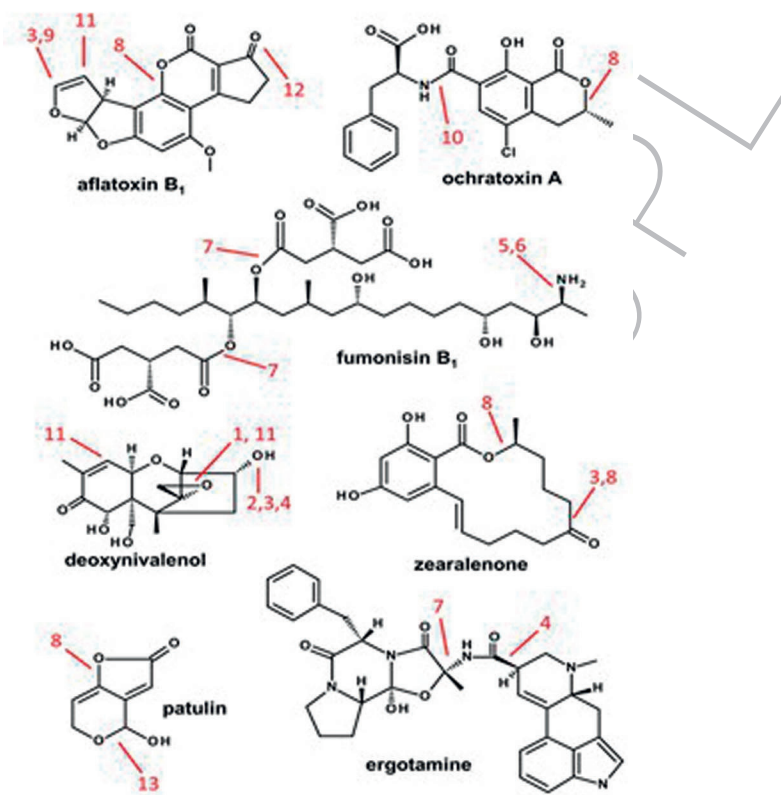


Rycina 4. Etapy tworzenia i degradacji zamaskowanych mykotoksyn



Rycina 5. Powstawanie zamaskowanych ochratoksyn

– koniugacja z siarczanem, glutationem i kwasem glukoronowym



Rycina 6. Struktury chemiczne głównych mykotoksyn i ich modyfikacja w przetwórstwie żywności.

1. Deepoksydacja,
2. Acetylowanie,
3. Utlenianie,
4. Epimeryzacja,
5. deaminacji,
6. Glukozyzacji,
7. Hydrolizy,
8. Odcięcia laktonu (hydroliza),
9. Hydroksylacji,
10. Odcięcia peptydu,
11. Sulfonowania,
12. Redukcji,
13. Odcięcie eteru

Piśmiennictwo

1. Berthiller F, Lemmens M, Werner U, Krska R, Hauser MT, Adam G, Schuhmacher R. Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone in plants, *Mycotox. Res.* 2007, 23, 68–72.
2. Engelhardt G, Ruhland M, Wallnöfer PR. Metabolism of mycotoxins in plants, *Adv. Food Sci.* 1999, 21, 71–78.
3. Berthiller F, Corradini R, Dall'Asta C, Marchelli R, Sulyok M, Krska R, Adam G, Schuhmacher R. Occurrence of deoxynivalenol and its 3- β -D-glucoside in wheat and maize, *Food Addit. Contamin., A.* 2009, 26, 507–511.
4. Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, Saeger SD, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J. Masked mycotoxins: A review, *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, 57, 165–186.
5. Li FQ, Wang W, Ma JJ, Yu CC, Lin XH, Yan WX. Natural occurrence of masked deoxynivalenol in Chinese wheat and wheat-based products during 2008-2011. *World Mycotoxin Journal.* 2012, 5, 221-230.
6. Saeger S, van Egmond HP. Masked mycotoxins, *World Mycotoxin Journal.* 2012, 5, 203–206.
7. Schneweis I, Meyer K, Engelhardt G, Bauer J. Occurrence of zearalenone-4- β -D-glucopyranoside in wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2002, 50, 1736-1738.
8. Gareis M, Bauer J, Thiem J, Plank G, Grabley S, Gedek B. Cleavage of zearalenone-glycoside, a 'masked' mycotoxin, during digestion in swine. *Journal of Veterinary Medicine Series B.* 1990, 37, 236-240.
9. Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R, Lemmens M, Adam G, Krska R. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005, 53, 3421-3425.

10. Berthiller F, Krska R, Domig KJ, Kneifel W, Juge N, Schumacher R, Adam G, Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glycoside during digestion. *Toxicology Letters*. 2011, 206, 264-267.
11. De Nijs M, Van den Top HJ, Portier L, Oegema G, Kramer E, Van Egmond HP, Hoogenboom LAP. Digestibility and absorption of deoxynivalenol-3- β -glucoside in in vitro models. *World Mycotoxin Journal*. 2012, 5, 319-324.
12. Malachová A, Varga E, Schwartz H, Krska R, Berthiller F. Development, validation and application of an LC-MS/MS method for determination of deoxynivalenol and its conjugates in different types of beer. *World Mycotoxin Journal*. 2010, 52 61-270.
13. Nakagawa H, Sakamoto S, Sago Y, Kushiro M, Nagashima H. The use of LC-Orbitrap MS for the detection of Fusarium masked mycotoxins: the case of type A. *World Mycotoxin Journal*. 2012, 5, 271-280.
14. Nakagawa H, Sakamoto S, Sago Y, Kushiro M, Nagashima H. Detection of masked mycotoxins derived from type A trichothecenes in corn by high-resolution LC-Orbitrap mass spectrometer, *Food Addit. Contam., A*. 2013, 30, 1407-1414.
15. Dall'Erta A, Cirilini M, Dall'Asta M, Del Rio D, Galaverna G, Dall'Asta C. Masked mycotoxins are efficiently hydrolyzed by human colonic microbiota releasing their aglycones, *Chem. Res. Toxicol.* 2013, 26, 305-312.
16. Fruhmann P, Warth B, Hametner C, Berthiller F, Horkel E, Adam G, Sulyok M, Krska R, Frohlich J. Synthesis of deoxynivalenol-3- β -D-O-glucuronide for its use as biomarker for dietary deoxynivalenol exposure. *World Mycotoxin Journal*. 2012, 5, 127-132.
17. Nagl V, Schwartz H, Krska R, Moll WD, Knasmüller S, Ritzmann M, Adam G, Berthiller F. Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glycoside in rats, *Toxicol. Lett.* 2012, 213, 367-373.

18. Nagl V, Woechtl B, Schwartz-Zimmermann HE, Hennig-Pauka I, Moll WD, Adam G, Berthiller F. Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in pigs, *Toxicol. Lett.*, 2014, 229, 190–197
19. Veršilovskis A, Geys J, Huybrechts B, Goossens E, De Saeger S, Callebaut A. Simultaneous determination of masked forms of deoxynivalenol and zearalenone after oral dosing in rats by LC-MS/MS. *World Mycotoxin Journal*. 2012, 5, 303-318.
20. Piotrowska M. Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania mikotoksyn z żywności i pasz. *Postępy Mikrobiologii*. 2012, 51, 2, 109–119.
21. Oldenburg E, Bramm A., Valenta H. Influence of nitrogen fertilization on deoxynivalenol contamination of winter wheat - Experimental field trials and evaluation of analytical methods. *Mycotoxin Research*. 2007, 23, 7-12.
22. Schaafsma AW, Tamburic-Ilinic L, Miller JD, Hooker DC. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Can. J. Plant. Pathol.* 2001, 23, 279-285.
23. Zielińska K, Stecka K, Suterska A, Miecznikowski A. Wpływ ekologicznej technologii kiszzenia runi łąkowej na hamowanie rozwoju pleśni wytwarzających mikotoksyny. *Problemy Inżynierii Rolniczej*. 2007, 1, 55, 61–70.
24. Kapturowska AU, Zielińska KJ, Stecka K, Kupryś MP. Ocena skażenia pasz ochratoksyną A i metody ich dekontaminacji. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*. 2010, 55, 156–163.
25. Korbas M, Horoszkiewicz-Janka J. Znaczenie i możliwości ograniczenia szkodliwości metabolitów pochodzenia grzybowego. *Postępy w Ochronie Roślin*. 2007, 47, 2, 141–148.
26. Yoshiki O, Aoki Y, Tani N, Umabayashi K, Kitada Y, Dohi Y. Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography . mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1998, 815, 59-65.

27. Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glössl J, Luschnig C, Adam G. Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 47905–47914.
28. Chełkowski J. Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy [online] <http://www.cropnet.pl/dbases/mycotoxins.pdf.pl>. 2010.
29. El-Nezami H, Kankaanpää P, Salminen S, Ahokas J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology.* 1998, 36, 321–326.
30. Gourama H, Bullerman LB. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *Journal Food Protection.* 1995, 58, 1249–1256.
31. Gourama H, Bullerman LB. Anti-aflatoxic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *International Journal of Food Microbiology.* 1997, 34, 131–143.
32. Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpää PE, Salminen S, Ahokas JT. Surface winding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* 2001, 67, 7, 3086–3091.
33. Hwang CA, Draughan F. Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoeticus*. *Journal of Food Protection.* 1994, 57, 410–414.
34. Magalla SE, Hafez AH. Detoxification of aflatoxin B1 acidogenous yoghurt. *Mycopathologia.* 1982, 77, 89–91.
35. Ogunbanwo ST, Enitan AM, Emeya P, Okanlawon BM. Influence of lactic acid bacteria on fungal growth and aflatoxin production in ogi, an indigenous fermented food. *Advances In Food Science.* 2005, 27, 4, 189–184.

36. Peltonen K, El-Nezami H, Haskard C, Ahokas J, Salminen S. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. 2001, 84, 10, 2152–2156.
37. Piotrowska M, Żakowska Z. The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Progress in Biotechnology, Food Biotechnology*. 2000, 17, 307–310.
38. Suterska AM, Zielińska KJ, Grzybowski RA, Stecka KM, Miecznikowski AH, Kupryś MP. Wpływ wybranych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* na ograniczenie skażenia pleśniami i ochratoksyną A kiszzonek z runi łąkowej. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*. 2009, 53, 4, 125–130.
39. Varga J, Péteri Z, Tábori K, Téren J, Vágvölgyi C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, 99, 321–328.
40. Wiseman DW, Marth EH. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*. *Mycopathologia*. 1981, 73, 49–56.
41. Zielińska KJ, Fabiszewska AU, Wróbel B. Występowanie aflatoksyny w paszach i metody ich dekontaminacji. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*. 2013, 58, 4, 254–260.
42. Suman M, Manzitti A, Catellani D. A design of approach to studying deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside evolution throughout industrial production of whole grain crackers exploiting LC-MS/MS techniques. *World Mycotoxin Journal*. 2002, 5, 241–249.
43. Huwig A, Freimund S, Kappeli O, Dutler H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*. 2001, 122, 2, 179–188.
44. Desmarchelier A, Seefelder W. Survey of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in cereal-based products by liquid chromatogra-

phy electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *World Mycotoxin Journal*. 2011, 4, 29-35.

45. Goryacheva IY, De Saeger S. Immunochemical detection of masked mycotoxins: a short review. *World Mycotoxin Journal*. 2012, 5, 281-287.

46. Wolny-Koładka K. Grzyby z rodzaju *Fusarium* – występowanie, charakterystyka i znaczenie w środowisku. *Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych*. 2014, 63, 4, 623-633.

47. Warth B, Fruhmann P, Wiesenberger G, Kluger B, Sarkanj B, Lemmens M, Hametner C, Fröhlich J, Adam GR, Krska R, Schuhmacher R. Deoxynivalenol-sulfates: identification and quantification of novel conjugated (masked) mycotoxins in wheat, *Anal. Bioanal. Chem*. 2015, 407, 1033-1039.

48. Zielinski W, Rajcy A. Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne Warszawa 2000, 436-500.

49. CAST Mycotoxins: economic and health risks. Task force Report 116, 91. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa 1989.

50. CAST Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task force report. No 139. Ames, Iowa, USA. ISSN 0194-4088 2003.

51. Scientific Committee on Food, European Commission, Opinion of Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON), SCF/CS/CNTM/MYC/19 Final 09/12/99, 2 December, 1999.

Address for correspondence / Adres do korespondencji

Wiesław Barabasz
Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
e-mail: rrbaraba@cyf-kr.edu.pl
tel. 12 662 40 96

CC-BY-SA 3.0 PL