



Kartläggning av mykologiska risker med torkade fikon

Linda Steiner

Självständigt arbete, Magisterprogrammet för livsmedelstillsyn, 15 hp

Institutionen för Livsmedelsvetenskap
Institutionen för Mikrobiologi

Publikation nr 284

Swedish University of Agricultural Sciences
Department of Food Science
Department of Microbiology

Uppsala 2010

Universitet

Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Institutionen för livsmedelsvetenskap och institutionen för mikrobiologi

Författare

Linda Steiner

Titel

Kartläggning av mykologiska risker med torkade fikon

Engelsk titel

Survey of mycological hazards with dried figs

Handledare

Elisabeth Fredlund, PhD mikrobiolog Enheten för mikrobiologi Livsmedelsverket, Uppsala

Ann Gidlund, laboratorieingenjör Enheten för mikrobiologi Livsmedelsverket, Uppsala

Stefan Roos, docent och studierektor för Magisterprogrammet livsmedelstillsyn Institutionen för mikrobiologi Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala

Examinator

Galia Zamaratskaia, forskarassistent Institutionen för livsmedelsvetenskap Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala

Kurstitel

Självständigt arbete inom Magisterprogrammet för livsmedelstillsyn

Kurskod

SLU-40114

Omfattning

15 högskolepoäng (hp)

Nivå

Avancerad

Utgivningsort

Uppsala

Utgivningsår

2010

SAMMANFATTNING

Detta examensarbete innehåller dels en fördjupad sammanställning av den kunskap som finns vad gäller odling, produktion, mykologiska risker och kontroll av torkade fikon, dels resultaten från en kartläggning av mögel och mykotoxiner i 17 fikonprov som inhandlades från butiker i Stockholm-Uppsalaregionen under oktober till december 2009. Examensarbetet genomfördes som en del av en större mykologisk kartläggning av torkad frukt på Livsmedelsverket. Anledningen till att torkade fikon ansågs angeläget att undersöka var att mycket höga halter av aflatoxiner och ochratoxin A påvisats i enskilda fikon i olika studier samt att ett stort antal partier av torkade fikon varje år avvisats vid europeiska gränskontroller på grund av överskridande halter av aflatoxiner. De 17 fikonproven analyserades dels mykologiskt med morfologiska metoder för att undersöka om fikonen innehöll viktiga mykotoxinbildande arter, dels med semi-kvantitativa snabbkit för att undersöka om fikonen innehöll aflatoxiner och ochratoxin A. Den mykologiska kartläggningen visade att fikon på den svenska marknaden kan innehålla mögelgifter, vilket kan innebära en hälsorisk för svenska konsumenter. Ett av de 17 analyserade proven innehöll höga halter av aflatoxiner och fem av proven innehöll mögelarter som kan vara mykotoxinbildande. Att torkade fikon med halter av aflatoxiner som ligger över det tillåtna europeiska gränsvärdet förekommer på den svenska marknaden visar att egenkontrollen hos de livsmedelsföretag som verkar inom produktions-, bearbetnings- och distributionskedjan av torkade fikon är bristfällig och att den offentliga kontrollen av aflatoxiner i fikon inte alltid är tillräcklig.

Nyckelord: Torkade fikon, mögel, aflatoxiner, ochratoxin A, offentlig kontroll.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INTRODUKTION	5
Bakgrund	6
Odling av fikon	6
Produktion av torkade fikon	6
Mögel och mykotoxiner	7
Aflatoxiner	8
Ochratoxin A	9
Andra mykotoxiner i torkade fikon	10
Riktlinjer för säker odling och produktion av torkade fikon	10
Egenkontroll av aflatoxiner i torkade fikon	11
Offentlig kontroll av mykotoxiner i torkade fikon	11
Kartläggning av mögel och mykotoxiner i torkade fikon på den svenska marknaden	12
MATERIAL OCH METODER	12
Provtagning	12
Mätning av vattenaktivitet	13
Mykologisk analys	13
Odlingssubstrat	13
Provberedning och ansättning	14
Avläsning, isolering och identifiering	14
Semi-kvantitativ analys av aflatoxiner och ochratoxin A	15
Analysprincip	15
Utförande	15
RESULTAT OCH DISKUSSION	16
Vattenaktivitet	17
Hygienisk kvalitet	17
Identifierade mögelsvampar	18
Aflatoxiner och ochratoxin A	18
SLUTSATSER	19
TACK	20
REFERENSER	21
BILAGA 1	23

INTRODUKTION

Fikon är en frukt som har odlats och konsumerats i länder kring Medelhavet under mycket lång tid. Idag äts fikonen över hela världen och i Sverige har det blivit en tradition att äta torkade fikoner till jul. Färska och torkade fikoner samt fikonpasta säljs även året om i svenska butiker. Torkade fikoner är mycket söta och kan ätas som de är eller användas i till exempel müsliblandningar och i matbröd. Den höga sockerhalten och den ofta långa lagringstiden gör dock torkade fikoner till ett näringsrikt substrat för vissa typer av mögelsvampar. Mögelsvamparna finns överallt där fikonen odlas och kan tillväxa under lagringen om fikonen inte torkas tillräckligt eller om de återfuktas efter torkningen. Förutom att bryta ned näringsämnen kan vissa mögelsvampar också bilda hälsovådliga mykotoxiner (mögelgifter) i fikonen, såsom aflatoxiner och ochratoxin A.

Livsmedelsverket är en central myndighet i Sverige inom livsmedelsområdet och arbetar aktivt i konsumenternas intresse för säkra livsmedel på den svenska marknaden genom att bland annat bedöma risker i olika livsmedel. Som en del av detta arbete skriver Livsmedelsverket riskprofiler där tillgänglig kunskap om ett livsmedelsproblem sammanställs och sätts in i sitt sammanhang. Under 2008 och 2009 skrevs en riskprofil för mögel och mykotoxiner i livsmedel¹. Riskprofilen innehåller dels en omfattande litteraturgenomgång, dels en uppskattning av konsumenters exponering för vissa mykotoxiner från vissa livsmedel.

Internationellt sett anses torkad frukt vara en viktig källa till såväl aflatoxiner som ochratoxin A och aflatoxiner i frukt utgör sannolikt en betydande del av det totala aflatoxinintaget hos europeiska konsumenter. Genom riskprofilen kunde en stor okunskap om mögel och mykotoxiner i torkad frukt på den svenska marknaden konstateras. Anledningen är att det idag förmodligen inte genomförs någon offentlig kontroll av mögel och mykotoxiner i torkad frukt, annat än för vissa mykotoxiner i en del torkade frukter i samband med import till EU. En slutsats från riskprofilen var därför att en mindre kartläggning av mykologiska risker i torkad frukt på den svenska marknaden borde utföras för att ta fram ett behovsunderlag för beslut om eventuella kontrollprojekt.

Detta examensarbete innehåller dels en fördjupad sammanställning av den kunskap som finns vad gäller odling, produktion, mykologiska risker och kontroll av torkade fikoner, dels resultaten från en kartläggning av mögel och mykotoxiner i 17 fikonprov som inhandlades från butiker i Stockholm-Uppsala-regionen under oktober till december 2009. Syftet med examensarbetet var att bidra till Livsmedelsverkets behovsunderlag för beslut om eventuella kontrollprojekt av torkad frukt samt att kartlägga risker i odlingen och produktionen av torkade fikoner.

Bakgrund

Odling av fikon

Fikon (*Ficus carica* L) växer som buskar eller små träd i subtropiska och milt tempererade klimat. Fikonfrukten utgörs av en fruktställning där blombotten, som är en del av växtens stam, är ihållig och invändigt täckt av enkönade blommor. Fikon som odlas för konsumtion innehåller bara honblommor och delas in i huvudgrupperna smyrnafikon och adriafikon. Främst odlas fikon av smyrnatyp eftersom dessa betraktas som godast. För att nya frukter ska bildas måste smyrnafikonens blommor pollineras av hanblommor. Dessa hanblommor finns i frukterna hos speciella fikonbuskar som kallas getfikon (*Ficus carica* var *caprificus*). För att pollineringen ska äga rum hängs grenar med getfikonfrukter upp bland fikonträden då det är tid för honblommorna att bli befruktade. Tekniken kallas kaprifikation och har tillämpats på fikonodlingar kring Medelhavet under mycket lång tid.

Hos fikusarter sköter steklar pollineringen och ofta har varje fikusart sin egen stekelart, så även fikon. Fikonstekeln (*Blastophaga psenes* L) är en millimeterstor insekt som lever och förökar sig inuti getfikonens frukter. I samband med att befruktade stekelhonor tar sig ut för att lägga ägg i nya getfikon blir de bestruckna med pollenkorn från getfikonens hanblommor. Fikonsteklarna kan endast lägga ägg i getfikon men tar sig av misstag ibland även in i smyrnafikon. Det är i samband med detta som pollenkorn från hanblommorna stryks av på honblommorna, som därmed pollineras och befruktas².

Produktion av torkade fikon

Till skillnad från färska fikon som plockas fullmogna lämnas fikon som ska ätas torkade oftast kvar på grenarna för att övermogna, torka ut och på egen hand falla till marken^{3,4,5}. Därefter samlas de upp och soltorkas ytterligare, utspridda på låga torkbord. Soltorkningen kan ta upp till en vecka beroende på väderlek. Principen för torkning som konserveringsmetod är att sänka vattenaktiviteten (a_w) till en nivå där mikroorganismer inte längre kan tillväxa. I fikon är det framförallt mögelsvampar som annars kan orsaka skada. Efter torkningen lagras fikonen i förrådshus hos odlaren eller transporteras vidare direkt till produktionsanläggningarna.

På produktionsanläggningarna gasas fikonen först med insektsbekämpningsmedel för att avdöda eventuella skadeinsekter (vid ekologisk odling tillämpas istället chockfrysning, vilket innebär att fikonen fryses ned till -35 till -40°C i 24 timmar⁶)⁷. Vidare klassas, tvättas, torkas, formas och packas fikonen⁴. Samtliga fikon inspekteras också under UV-ljus för att identifiera och sortera bort fikon som innehåller aflatoxiner. Aflatoxiner är mykotoxiner som kan bildas av vissa mögelarter i fikon och som fluorescerar vid en våglängd på 360 nm, vilket ger fikon som innehåller aflatoxiner ett grönligt sken under UV-ljus⁵. Metoden är dock inte tillräckligt känslig för att helt kunna friförklara icke-fluorescerande fikon från aflatoxiner. Om aflatoxiner endast har bildats inuti fikonen syns detta till exempel inte alltid utvändigt, utan först om fikonen

öppnas upp. Låga halter av aflatoxiner ger också ett svagare sken, vilket kan vara svårt för personalen som inspekterar och sorterar fikonen att upptäcka.

Den största exportören av torkade fikon är Turkiet, som år 2007 exporterade ca 40 000 ton till ett värde av ca 107 miljoner US-dollar. Andra stora exportörer är Iran, USA och Afghanistan. År 2007 importerade Sverige ca 1 200 ton torkade fikon till ett värde av ca 5,5 miljoner US-dollar⁸.

Mögel och mykotoxiner

Mögelsvampar är aeroba, heterotrofa mikroorganismer som växer apikalt med smala hyfer. Apikal tillväxt innebär att tillväxten sker i de yttersta hyfspetsarna. Mögelsvampar kan föröka sig både sexuellt och asexuellt. Vid den asexuella förökningen bildas ett överflöd av sporer som sprids överallt i miljön och som vid gynnsamma förhållanden kan utvecklas till nya vegetativa mögelsvampar. Mögelsvamparnas möjlighet att tillväxa i livsmedel beror på en mängd kemiska och fysikaliska faktorer, såsom temperatur, pH-värde, vattenaktivitet, tillgång till syre och frånvaro av hämmande konserveringsmedel⁹. Generellt sett växer bakterier snabbare än mögelsvampar, vilket gör att mögel ofta har svårt att få fäste i livsmedel som är fördelaktiga ur bakteriesynpunkt. Vissa livsmedel lämpar sig dock mindre bra för bakterietillväxt, såsom färsk och torkad frukt. Här hämmas bakterierna av det låga pH-värdet respektive den låga vattenaktiviteten. Mögelsvampar är däremot tåligare mot såväl låga pH-värden som uttorkning och kan därför tillväxa i både färsk och torkad frukt^{9,10}.

Vissa mögelsvampar kan bilda toxiska sekundära metaboliter, så kallade mykotoxiner. Om mykotoxiner bildas i foder eller livsmedel kan de ackumuleras i kroppen hos djur och människor och orsaka skada. Vissa mykotoxiner är till exempel mycket cancerogena medan andra kan vara allergiframkallande, immunförsvarshämmande eller fertilitetsnedsättande. Vissa mykotoxiner kan också vara akut toxiska i höga halter. Förhållandet mellan mögeltillväxt och mykotoxinbildning är mycket komplext och alla mykotoxinproducerande mögelsvampar bildar inte alltid mykotoxiner i livsmedel. Produktionen beror på svampsläkte och art samt fysikaliska och kemiska egenskaper i det specifika livsmedlet. Mögelsvampar kan alltså påvisas i livsmedel utan att livsmedlet innehåller mykotoxiner. Mykotoxiner kan också förekomma i livsmedel trots att mögelsvamparna som producerat dem inte längre kan påvisas. Samtidigt kan en och samma mögelsvamp producera flera olika typer av mykotoxiner och ett visst mykotoxin kan produceras av flera olika mögelsvampar⁹. De vanligaste mykotoxinerna i livsmedel är aflatoxiner, ochratoxin A, patulin och mykotoxiner producerade av olika *Fusarium*arter¹⁰.

Fikon har visat sig vara ett högrisklivsmedel bland torkade frukter genom att utgöra ett lämpligt substrat för framförallt aflatoxin- och ochratoxin-producerande mögelsvampar¹⁰. Utseendet hos torkade fikon gör det också svårt för konsumenter att se om de angripits av mögel då torkningen naturligt ger fikonen ett något missfärgat och skrumpet utseende. Det går heller inte att se på fikonen om de innehåller mykotoxiner.

Aflatoxiner

Gruppen aflatoxiner isolerades och karakteriserades år 1962 i samband med att över 100 000 kalkoner avlidit efter att de utfodrats med mögelkontaminerat jordnötsmjöl¹¹. Idag har ett flertal typer av aflatoxiner isolerats och karakteriserats, varav fyra typer regelbundet påträffas i livsmedel. Dessa kallas B₁, B₂, G₁ och G₂ och bildas av stammar tillhörande *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* samt av mindre vanliga arter, såsom *Aspergillus nomius*¹⁰. *Aspergillus flavus* bildar endast aflatoxiner av B-typ medan *Aspergillus parasiticus* kan bilda aflatoxiner av både B- och G-typ. Aflatoxiner är cancerogena, hepatotoxiska, mutagena och teratogena. Detta gäller i synnerhet aflatoxin B₁ som klassas som ett av världens mest cancerogena naturligt förekommande ämnen. Långvarig exponering för aflatoxiner via livsmedel anses vara en viktig riskfaktor för levercancer hos människor och särskilt hos individer som lider av hepatit B. Människor i tropiska utvecklingsländer är särskilt utsatta och det finns även misstänkta fall av akuta förgiftningar hos människor rapporterade från dessa delar av världen¹¹.

Europeiska konsumenter kan exponeras för aflatoxiner via tropiskt odlade produkter, såsom torkad frukt. På grund av den höga toxiciteten har gränsvärden för aflatoxiner i vissa livsmedel fastställts av den Europeiska kommissionen och som gäller inom alla europeiska medlemsländer. Gränsvärdet för aflatoxiner i torkade fikon är 2,0 µg/kg för aflatoxin B₁ och 4,0 µg/kg för den totala mängden aflatoxiner (summan av B₁, B₂, G₁ och G₂)¹². År 2008 utfärdades 931 RASFF-notifikationer beträffande överskridande halter av mykotoxiner i olika produkter, varav 902 gällde aflatoxiner¹³. Av de 902 RASFF-notifikationerna gällde 86 fall överskridande halter av aflatoxiner i torkade fikon¹⁴.

Fikon har visat sig vara särskilt känsliga för infektion av *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* och den höga sockerhalten i fikon tycks också gynna mögelsvamparnas aflatoxinproduktion¹⁰. Fikonen är som känsligast under sin mognads- och övermognadsperiod och kan då infekteras såväl utvändigt på fruktskalet som invändigt via insektsangrepp^{3,10}. Torkstress på grund av vattenbrist vid varmt och torrt väder gör också fikonen känsligare för infektion. *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* tillväxer vid 10-48°C respektive 6-47°C och vid a_w>0,78 respektive a_w>0,82^{4,9}. Aflatoxiner kan bildas vid 15-37°C vid a_w>0,82^{4,15}. Dessa kriterier stämmer väl överens med temperaturen i de regioner där fikon odlas samt med vattenaktiviteten i fullmogna och övermogna, självtorkande fikon som är 0,92-0,98 respektive 0,80-0,89^{4,16}.

Jord och gammalt växtmaterial utgör viktiga kontaminationskällor för spridning av *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* på fikonodlingen. Från dessa källor kan sporer lätt kontaminera fikonen via till exempel insekter eller genom att fikonsträdens grenar hänger ned i marken. Fikonsteklarna kan också föra med sig sporer från getfikon som infekterats av *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus*⁵. När mögelsvamparna väl fått fäste i fikonen kan de tillväxa mycket snabbt och börja producera aflatoxiner, vilket kan fortgå under hela torkningen fram till dess att vattenaktiviteten blir för låg¹⁰. Ett problem vid torkningen är dock att fikon är relativt stora frukter och därför kan torka olika snabbt. I fuktiga delar finns risk för fortsatt mögeltillväxt och mykotoxinproduktion under

lagringen. Detta kan leda till så kallade hot-spots där koncentrationen av aflatoxiner i enstaka fikon kan bli så hög att partiets totala aflatoxin-koncentration överskrider gränsvärdet 4,0 µg/kg^{4,10}. Hot-spots kan också bildas om fikonen återfuktas under lagringen och samtidigt förvaras vid höga temperaturer, vilket gynnar mögelsvamparna. I studier har aflatoxin-koncentrationer upp till 76 000 µg/kg uppmätts i enstaka fikon¹⁷.

Att de mogna fikonen får hänga kvar på grenarna för att övermogna och på egen hand torka ut och falla till marken kan vara en av anledningarna till att aflatoxiner så ofta påträffas i torkade fikon. Dels för att fikonen är som känsligast för infektion av *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* under sin mognads- och övermognadsperiod, dels för att torkningen sannolikt går långsammare jämfört med om fikonen skulle plockas direkt från grenarna och sedan soltorkas på torkbord. Risken för att fikonen skulle kontamineras av mykotoxinbildande mögelsvampar från jorden skulle sannolikt också minskas om de plockades direkt från grenarna.

Att de torkade fikonen tvättas när de anländer till produktionsanläggningarna kan också föranleda att aflatoxiner bildas under lagringen om fikonen inte torkas om på nytt till en tillräckligt låg vattenaktivitet innan de packas. Orsaken till att fikonen tvättas är att de ofta är kontaminerade av jord och annan ytligt smuts när de anländer till produktionsanläggningarna. Fikonen måste också formas (manipuleras) på olika sätt inför packningen, vilket underlättas om de är blöta. Enligt en rapport från Livsmedelsverket från ett symposium om torkade fikon och aflatoxiner i Turkiet 1989 hördes kommentarer från producenterna om att tidsnöd vid packningen och en uppfattning om att konsumenterna ville ha fuktiga och mjuka fikon var orsaker till att fikonen inte alltid återtorkades tillräckligt efter att de tvättats¹⁸.

Ochratoxin A

Ochratoxin A (OTA) isolerades och karakteriserades första gången år 1965 från *Aspergillus ochraceus*. Därefter har även andra OTA-producerande mögelsvampar identifierats, såsom *Penicillium verrucosum* samt stammar av de svarta aspergillerna *Aspergillus niger* och *Aspergillus carbonarius*. Liksom för aflatoxiner finns det flera typer av ochratoxiner, varav OTA är den typ som regelbundet påträffas i livsmedel¹⁰. OTA har påvisats orsaka njurskador hos försöksdjur och misstänks även ge upphov till tumörbildningar i njurar och urinvägar hos människor^{19,20}. The International Agency for Research on Cancer (IARC) klassar OTA som ett möjligt humancancerogent ämne. I djurstudier har OTA även visats ha teratogena, immunförsvarshämmande och hepatotoxiska effekter¹¹. I tropiska produkter bildas ochratoxin A främst av svarta aspergiller medan *Penicillium verrucosum* infekterar grödor i tempererade klimat²¹. Bland annat anses *Penicillium verrucosum*s produktion av OTA i foderspannmål utgöra ett stort djurhälsoproblem inom den skandinaviska grishållningen²².

I fikon produceras OTA främst av vissa stammar av *Aspergillus niger*, av vilka vissa dessutom har påvisats vara resistent mot soltorkning^{20,21}. *Aspergillus niger* växer vid 6-47°C och vid $a_w > 0,77$ och OTA-produktion har påvisats vid 15-30°C och $a_w > 0,83$ ⁴. Liksom för aflatoxinproducerande mögelsvampar gynnas *Aspergillus niger* av det varma klimatet i regionerna där fikonen odlas, skördas

och torkas. Hot-spots med mycket höga OTA-koncentrationer kan också bildas om fikonen lagras varmt och fuktigt²³. Det finns ännu inget europeiskt gränsvärde för OTA i fikon men för russin är gränsvärdet 10,0 µg/kg¹². I studier har OTA-koncentrationer upp till 12 300 µg/kg påvisats i torkade fikon²¹.

Andra mykotoxiner i torkade fikon

Andra mykotoxiner som påvisats i torkade fikon är bland annat patulin, fumonisiner, HT-2-toxin och zearalenon^{17,24}. Fikon verkar således utgöra ett lämpligt substrat även för andra släkten än *Aspergillus*. Mykotoxinet patulin kan bildas i frukt av olika arter av *Penicillium*, *Aspergillus* och *Byssochlamus*¹¹. Patulin är neurotoxiskt, immunförsvarshämmande och eventuellt cancerogent för djur och människor²⁵. Fumonisiner, HT-2-toxin och zearalenon bildas av olika arter av *Fusarium*. Nyligen har stammar av *Aspergillus niger* även påvisats kunna bilda fumonisin B₂²⁶. Fumonisiner har påvisats ha neurotoxiska effekter hos djur och tros även orsaka strupcancer hos människor²⁷. HT-2-toxin tillhör mykotoxingruppen trikotecener och orsakar bland annat kräkningar, inre blödningar och hämrad tillväxt hos djur¹⁸. Zearalenon har i sin tur östrogena och anabola effekter hos djur och människor och kan bland annat orsaka infertilitet^{19,22,28}. Det finns inga gränsvärden för hur höga halter av mykotoxiner, andra än aflatoxiner, som får förekomma i torkade fikon.

Riktlinjer för säker odling och produktion av torkade fikon

Mögelsvampar finns naturligt överallt där fikon odlas och fikon som innehåller aflatoxiner, ochratoxin A och andra mykotoxiner har oftast infekterats av mykotoxinproducerande mögelsvampar redan före skörd¹⁰. Grundförutsättningarna för säker odling och produktion av torkade fikon bygger därför på att begränsa mögelsvamparnas möjlighet att kontaminera och infektera fikonen ute på odlingen, följt av effektiv kontroll genom hela produktionskedjan. För att hjälpa odlare, producenter och nationella myndigheter har "Code of Practice for the Prevention and Reduction of Aflatoxin Contamination in Dried Figs" med riktlinjer för god jordbruksed, god produktionsed och god lagringssed för odling och produktion av torkade fikon tagits fram av Codex Alimentarius-kommissionen tillsammans med FAO och WHO⁵.

Enligt riktlinjerna ska alla steg under odlingen, såsom beskärning av fikonträden, bearbetning av jorden och bekämpning av skadeinsekter, genomföras vid rätt tidpunkt och i preventivt syfte så att fikonen skyddas mot kontamination och infektion av mögelsvampar. Till exempel kan getfikon som tidigare nämnts utgöra en kontaminationskälla om de infekterats av *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* och bör därför plockas ned och avlägsnas från odlingen innan fikonen börjar mogna. Det måste också finnas tillräckligt med grundvatten eller möjlighet till konstbevattning eftersom torkstress annars kan trigga mögeltillväxt och mykotoxinproduktion.

När fikonen börjat släppa från grenarna bör de samlas in dagligen så att kontaminationsrisken från jorden minimeras. Därefter bör de enligt riktlinjerna torkas så snabbt som möjligt till en vattenaktivitet under 0,65 för att säkerställa att eventuell mögeltillväxt och mykotoxinproduktion avstannar. De

färdigtorkade fikonen bör förvaras vid en temperatur på 5-10°C respektive en luftfuktighet på högst 65 %. Vid hög temperatur och luftfuktighet finns annars risk för återtillväxt av mögel och fortsatt mykotoxinproduktion under lagringen.

Egenkontroll av aflatoxiner i torkade fikon

Torkade fikon som innehåller aflatoxiner kan vara skadliga för hälsan och får därför inte släppas ut på marknaden enligt (EU) nr 178/2002²⁹. Av (EU) nr 852/2002 framgår att det primära ansvaret för livsmedelssäkerhet ligger hos livsmedelsföretagaren, vilket innebär att det är livsmedelsföretagaren som ansvarar för att torkade fikon som innehåller aflatoxiner över gränsvärdet (2,0 µg/kg för aflatoxin B₁ och 4,0 µg/kg för totalmängden aflatoxiner) inte släpps ut på marknaden³⁰. Livsmedelsföretagare som importerar torkade fikon till EU måste således själva kontrollera att gränsvärdet för aflatoxiner inte överskrids, vilket även gäller livsmedelsföretagare senare i detaljhandelsledet som släpper ut torkade fikon på den europeiska marknaden. I praktiken innebär det att livsmedelsföretagare i sin egenkontroll ska kräva att leverantören för varje sändning visar upp provtagnings- och analysresultat som visar att fikonen är fria från aflatoxiner. För att säkerställa att analysresultaten är riktiga bör livsmedelsföretagare även utföra egna analyser regelbundet. Revisioner bör också genomföras hos leverantörerna för att säkerställa att de provtagnings- och analysförfaranden som där tillämpas är tillräckliga.

Offentlig kontroll av mykotoxiner i torkade fikon

För att säkerställa att gränsvärdet för aflatoxiner i torkade fikon inte överskrids genomförs offentlig kontroll av torkade fikon som importeras till EU. Den Europeiska kommissionen har utfärdat ett skyddsbeslut specifikt för import av torkade fikon från Turkiet, vilket framgår av (EU) nr 1152/2009³¹. Skyddsbeslutet innebär restriktioner för import av torkade fikon från Turkiet, som är den största exportören av torkade fikon till EU. I Sverige utförs importkontrollen av Livsmedelsverkets gränskontroll, vilket medför att importen av torkade fikon endast får gå över de orter där det finns en gränskontrollstation för livsmedel. Enligt skyddsbeslutet ska alla sändningar av torkade fikon från Turkiet åtföljas av provtagnings- och analysresultat samt ett hälsointyg med avseende på aflatoxiner. Ungefär 20 % av alla sändningar ska också provtas vid ankomst till gränskontrollstationerna för aflatoxinanalys. Om överskridande gränsvärden påträffas utökas den offentliga kontrollen, vilket innebär att alla leveranser av torkade fikon från Turkiet provtas när de anländer till gränskontrollstationerna och sedan kvarhålls till dess att analysresultat visar att de är fria från aflatoxiner. I samband med att överskridande halter av aflatoxiner påträffas skickar Livsmedelsverket också in en RASFF-notifikation för att varna andra europeiska gränskontroller om faran³².

För torkade fikon som importerats från ett tredje land men som inte omfattas av skyddsbeslutet (alla länder utanför EU utom Turkiet) är det den eller de kommunala nämnder som fullgör uppgifter inom miljö- och hälsoskyddsområdet i den ort där fikonen släpps ut på marknaden som ansvarar för den offentliga kontrollen enligt SFS 2006:812³³. Det innebär i praktiken att kommunernas livsmedelinspektörer ska kontrollera att de livsmedelsföretagare

som släpper ut torkade fikon på marknaden genom sin egenkontroll kan visa att fikonen är säkra.

En försvårande omständighet vid den offentliga kontrollen (och även vid livsmedelsföretagarnas egenkontroll) är att förekomsten av aflatoxiner oftast är koncentrerad till ett fåtal fikon inom ett parti, vilket ställer mycket stora krav på de provtagnings- och analysmetoder som används. För att provet ska bli representativt har provtagningsmetoder och analysmetoder för offentlig kontroll av aflatoxiner i torkade fikon fastställts i (EU) nr 401/2006³⁴. För att ett analysresultat ska anses representativt för ett parti som väger mer än 15 ton ska till exempel 100 enskilda prov tas till en total samlingsvikt på 30 kg. Hur många enskilda prov som ska tas om partiet väger mindre än 15 ton beror på partiets vikt men ska vara minst 10 och högst 100. Vikten för varje enskilt prov ska i regel vara 300 g. Om den offentliga provtagningen utförs på delar av ett större parti är analyssvaret endast representativt för den del av partiet som provtagits.

Kartläggning av mögel och mykotoxiner i torkade fikon på den svenska marknaden

I detta examensarbete undersöktes förekomsten av mögel och mykotoxiner i 17 livsmedelsprov av torkade fikon som en del av Livsmedelsverkets kartläggning av torkad frukt. Fikonen analyserades dels mykologiskt med morfologiska metoder för att undersöka om fikonen innehöll viktiga mykotoxinbildande arter, dels med semi-kvantitativa snabbkit för att undersöka om fikonen innehöll aflatoxiner och ochratoxin A. Den semi-kvantitativa analysen innebär att snabbkiten ger ett positivt analys svar om fikonproven innehåller aflatoxiner eller ochratoxin A över en bestämd detektionsgräns. Anledningen till att torkade fikon ansågs angeläget att undersöka var att mycket höga halter av aflatoxiner och ochratoxin A kunnat påvisas i enskilda fikon i olika studier samt att ett stort antal partier av torkade fikon varje år avvisats vid europeiska gränskontroller på grund av överskridande halter av aflatoxiner. Syftet med kartläggningen var att bidra till Livsmedelsverkets behovsunderlag för beslut om eventuella kontrollprojekt av torkad frukt.

MATERIAL OCH METODER

Provtagning

Totalt inhandlades 17 livsmedelsprov av torkade fikon till Livsmedelsverkets kartläggning av mykologiska risker i torkad frukt. Fikonen inhandlades under oktober till december 2009 från stora butikskedjor samt från mindre butiker med övervägande etniska produkter i Uppsala, Märsta och Stockholm. Totalt inhandlades 400-500 g av varje prov. Om detaljhandelsförpackningen för ett prov vägde mindre än 400 g inhandlades flera förpackningar av provet som sedan slogs ihop till ett enda samlingsprov. Provtagningen utfördes inte enligt (EU) nr 401/2006 eftersom syftet med kartläggningen endast var att ta fram ett behovsunderlag för framtida kontrollprojekt inom området. Resultatet av analyserna kunde således inte komma att ligga till grund för riskhanteringsåtgärder. Om positiva prov påträffades beslutades istället att relevant

tillsynsmyndighet (kommunen där fikonprovet inhandlats) skulle informeras för ny provtagning enligt gällande regelverk. För spårning av eventuellt positiva prover inhandlades endast producentförpackade fikon.

Av de 17 fikonproven som inhandlades kom åtta prov från Turkiet och fyra prov från Iran. Fem av proven hade inget ursprungsland angivet på förpackningen, varav ett prov var packat i Turkiet och ett prov var packat i Italien. Två typer av torkade fikon inhandlades. Dels små och hårt torkade fikon, dels större och mindre torkade fikon motsvarade den typ som traditionellt äts till jul i Sverige. Samtliga prover från Iran samt två av proven från Turkiet hörde till kategorin små och hårt torkade fikon och inhandlades alla från butiker med övervägande etniska produkter. Övriga prov inhandlades från såväl större butikskedjor som butiker med övervägande etniska produkter. Ett prov inhandlades också från en hälsokostbutik.

Om provtagningen hade utförts enligt (EU) nr 401/2006 skulle minst tio enskilda prov till en samlingsvikt på tre kg per prov ha tagits för ett representativt analysresultat för det parti som butiken vid provtagningstillfället hade i lager. En större provmängd skulle medföra en större sannolikhet för att fikon som innehåller aflatoxiner skulle ingå i provet, vilket således skulle kunna påverka analysresultatet.

Mätning av vattenaktivitet

Fikonens vattenaktivitet analyserades i en vattenaktivitetsmätare (Aqua Lab). Totalt analyserades tre fikon från varje prov enligt instruktion från Aqua Lab.

Mykologisk analys

Fikonens hygieniska status och förekomst av viktiga mykotoxinbildande mögelarter analyserades enligt Livsmedelsverkets kvalitetssäkrade metoder för identifiering av mögel och jäst i livsmedel (SLV MI-m019.10) och identifiering av *Aspergillus flavus/Aspergillus parasiticus* (SLV MI-m022.8). Metoderna refererar till den Nordiska metodikommittén för livsmedel (NMKL), metod nr 98 om bestämning av mögel och jäst i livsmedel och foder samt metod nr 177 om bestämning av *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* i livsmedel och foder.

Odlingssubstrat

Nedanstående odlingssubstrat användes:

- DG-18 (Dikloran-18 %-glycerol-agar)
- DRBC (Dikloran rosbengal-agar)
- AFPA (*Aspergillus flavus/parasiticus*-agar)
- MEA (Maltextrakt-agar)
- SNA (Synthetischer Nährstoffarmer agar)

DG-18 och DRBC är odlingssubstrat som används för analys av mögel och jäst i livsmedel. DG-18 har en lägre vattenaktivitet än DRBC för att efterlikna tillväxtmiljön i torra livsmedel och genom att använda både DG-18 och DRBC

kan mögelsvampar som har olika krav på sin tillväxtmiljö påvisas. För att jäst- och mögelarter som växer långsamt inte ska konkurreras ut av snabbväxande arter innehåller DG-18 och DRBC dikloran som begränsar den radiella tillväxten av snabbväxande svampar, som till exempel arter av *Fusarium*.

AFPA är ett selektivt odlingssubstrat för identifiering av *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus*, vilka utvecklar en typisk gul-orange bottenfärg på detta substrat. MEA i sin tur är ett näringsrikt odlingssubstrat som används för att renodla de mögelsvampar som ska studeras morfologiskt under lupp och i mikroskop. Till skillnad från DG-18 och DRBC innehåller MEA inga ämnen som begränsar mögelsvamparnas tillväxt, vilket ger mögelsvamparna möjlighet att utvecklas fullt ut. SNA är ett näringsfattigt odlingssubstrat som endast används för att renodla misstänkta arter av *Fusarium*, vars morfologi annars kan vara svår att studera.

Provberedning och ansättning

400-500 g av varje fikonprov vägdes upp och späddes med 160-200 ml peptonvatten. Proven homogeniserades därefter i en mixer (Reisch knivkvarn GRINDOMIX GM 200). Från varje homogeniserat prov vägdes 56 g upp till den mykologiska analysen i en stomacherpåse. Provmaterial till toxinanalyserna vägdes också upp och frystes in. 344 ml peptonvatten tillsattes till varje stomacherpåse, varefter proven homogeniserades på nytt i en stomacher (Colworth STOMACHER 400). Spädningsgraden i stomacherpåsen var nu 10^{-1} . 1 ml filtrat från varje stomacherat prov seriespäddes med 9 ml peptonvatten så att provrör med spädningsgrad 10^{-2} och 10^{-3} erhöles. 100 µl från 10^{-1} -, 10^{-2} - och 10^{-3} -spädningarna spreds därefter på odlingsmedierna. För en detektionsgräns under 100 cfu (kolonibildande enheter) per gram prov ingöts även 1 ml 10^{-1} -spädning från varje prov i smält AFPA-, DRBC- och DG-18-agar. Därefter inkuberades AFPA-plattor i 48 h vid 30°C och DRBC- och DG-18-plattorna i 5 dygn vid 25°C.

Avläsning, isolering och identifiering

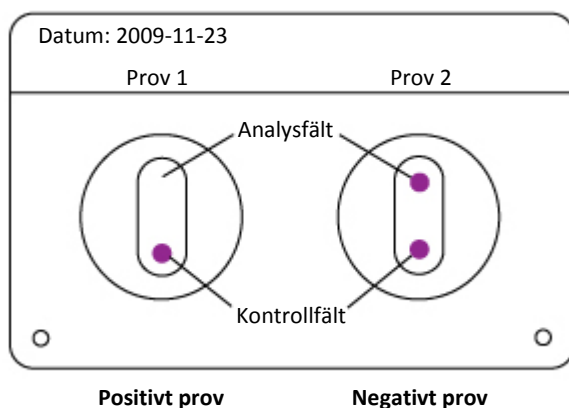
Efter avslutad inkubering avlästes AFPA-, DRBC- och DG-18-plattorna visuellt. Mögel- och jästkolonier räknades från DRBC- och DG-18-plattorna och ett medelvärde för cfu per gram fikonprov beräknades för att ge en bild av fikonens hygieniska kvalitet. För identifiering av viktiga mykotoxinbildande mögelarter renodlades utvalda kolonier på MEA- och SNA-plattor och inkuberades i 7 dygn vid 25°C. Misstänka kolonier av *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* renodlades på nya AFPA-plattor och inkuberades i 48 h vid 30°C. Efter avslutad inkubering identifierades misstänkta kolonier av *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* genom utseende på AFPA-plattorna samt genom studie av mögelsvamparnas morfologi under lupp och i mikroskop med hjälp av identifieringsnyckeln i "Introduction to Food- and Airborne Fungi"³⁵. Andra isolerade mögelsvampar än *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* identifierades endast till släkte eftersom det är mycket svårt att särskilja olika mögelarter från varandra med enbart morfologiska metoder. Isolat inom grupper svarta *Aspergillus* och *Fusarium* sparades för vidare identifiering på Livsmedelsverkets mikrobiologiska enhet.

Semi-kvantitativ analys av aflatoxiner och ochratoxin A

För analys av aflatoxiner och ochratoxin A i fikonproven användes de antikroppsbaseade snabbkiten Aflacard® respektive Ochracard® från R-biopharm.

Analysprincip

Kiten är utformade som plastkort med brunnar där monoklonala antikroppar är fästa till ett membran. I Aflacard® är antikropparna specifikt riktade mot aflatoxiner och i Ochracard® är antikropparna specifikt riktade mot ochratoxin A. Om provet innehåller aflatoxiner respektive ochratoxin A fångas toxinpartiklarna upp av antikropparna. För att synliggöra en sådan bindning tillsätts sedan ett enzymkonjugat samt ett enzymsubstrat. Om provet inte innehåller toxinpartiklar fångas istället konjugatet upp av antikropparna, vilket sedan omvandlar substratet till en lila färg på membranet. Om provet innehåller toxinpartiklar fångas däremot inget konjugat upp och efter tillsats av enzymsubstratet förblir membranet därför ofärgat. All färgutveckling på membranets analysfält indikerar således ett negativt prov. En skiss över snabbkitens utformning ses i figur 1.



Figur 1: Skiss över utformningen av snabbkiten Aflacard® och Ochracard® från R-biopharm.

Utförande

Fikonproverna späddes, extraherades, eluerades och analyserades enligt instruktion, se bilaga 1. Tre standardiserade prover analyserades också för kontroll av metodens tillförlitlighet. Detektionsgränser för aflatoxiner bestämdes till 4,0 µg/kg och detektionsgränsen för ochratoxin A bestämdes till 5,0 µg/kg. Eventuellt positiva fikonprov verifierades med HPLC av Livsmedelsverkets kemiska enhet 2. Två av fikonproven analyserades inte för ochratoxin A på grund av att snabbkiten tog slut.

RESULTAT OCH DISKUSSION

En sammanställning av resultatet från vattenaktivitetsanalysen, den mykologiska analysen och de semi-kvantitativa analyserna av aflatoxiner och ochratoxin A för de 17 fikonproven ses i tabell 1. Resultaten kan endast anses representativa för de analyserade proven, inte för partierna som proverna tagits ifrån eftersom provtagningen inte utfördes enligt (EU) nr 401/2006.

Tabell 1: Sammanställning av resultat.

Prov	Ursprung	a _w (-) ^a	cfu mögel (g ⁻¹) ^b	cfu jäst (g ⁻¹) ^c	Identifierade mögelsvampar	Aflatoxiner (>4,0 µg/kg)	Ochratoxin A (>5,0 µg/kg)
1	Italien ^d	0,78	0	0	-	-	-
2	Okänt	0,69	0	5,0·10 ⁵	-	-	-
3	Turkiet	0,66	0	0	-	-	-
4	Turkiet ^d	0,61	0	2,7·10 ⁵	-	-	-
5	Iran	0,58	0	0	-	-	-
6	Turkiet	0,57	0	8,6·10 ⁵	-	Positiv	-
7	Iran	0,39	1,8·10 ⁴	0	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> Svart <i>Aspergillus</i>	-	-
8	Turkiet	0,73	0	0	-	-	-
9	Turkiet	0,64	0	3,0·10 ¹	-	-	-
10	Okänt	0,64	0	0	-	-	-
11	Iran	0,39	8,6·10 ³	0	<i>Aspergillus parasiticus</i> Svart <i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i> spp	-	-
12	Iran	0,39	1,4·10 ⁴	0	<i>Aspergillus flavus</i> Svart <i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i> spp	-	-
13	Turkiet	0,70	0	5,7·10 ⁵	-	-	-
14	Turkiet	0,71	2,4·10 ²	8,4·10 ⁴	<i>Fusarium</i> spp	-	-
15	Okänt	0,68	3,0·10 ¹	0	<i>Fusarium</i> spp	-	-
16	Turkiet	0,71	0	5,0·10 ³	-	-	Ej analyserat
17	Turkiet	0,69	0	0	-	-	Ej analyserat

^a Medelvärde för varje fikonprov beräknat från tre vattenaktivitetsanalyser per prov (rekommenderar gränsvärde = a_w<0,65).

^b Medelvärde av cfu mögel per gram fikonprov beräknat från DG-18- och DRBC-plattorna.

^c Medelvärde av cfu jäst per gram fikonprov beräknat från DG-18- och DRBC-plattorna.

^d Förpackat i det angivna landet.

Av de 17 fikonproven påvisades mögelsvampar i fem prov och jästsvampar i sju prov. Endast ett prov innehöll både mögel och jäst. Av de fem proven som innehöll mögelsvampar påträffades *Fusarium* spp i fyra prov, svarta aspergiller i tre prov, *Aspergillus flavus* i två prov och *Aspergillus parasiticus* i två prov. I sex av proven kunde varken mögel eller jäst detekteras. Aflatoxiner över detektionsgränsen 4,0 µg/kg påträffade endast i ett prov. Verifieringen med HPLC visade att totalhalten aflatoxiner i detta prov var 134,4 µg/kg

(128,3 µg/kg aflatoxin B₁ och 6,1 µg/kg aflatoxin B₂). Ochratoxin A över detektionsgränsen 5,0 µg/kg påträffades inte i något av de 15 prov som analyserades.

Vattenaktivitet

Tre av de 17 fikonproven hade en mycket låg vattenaktivitet (0,39). Gemensamt för dessa prov var att de hörde till kategorin små och hårt torkade fikon och kom från Iran. Det var också dessa tre prov som innehöll mest mögel (från $8,6 \cdot 10^3$ till $1,8 \cdot 10^4$ cfu per gram fikonprov). Dock innehöll inget av de tre proven aflatoxiner eller ochratoxin A över detektionsgränserna. Nio av de 17 fikonproven hade en vattenaktivitet över 0,65 (det gränsvärde som rekommenderas för torkade fikon av Codex Alimentarius-kommissionen⁵). Dock innehöll inget av dessa prov höga halter av mögel (som högst $2,4 \cdot 10^2$ cfu per gram fikonprov) och inte heller aflatoxiner eller ochratoxin A över detektionsgränserna. Det prov som innehöll aflatoxiner hade en relativt låg vattenaktivitet (0,57), vilket kan tyda på att aflatoxinerna redan hade bildats i fikonen innan de hade torkats färdigt.

Det är oklart varför de tre proven som hade lägst vattenaktivitet också var de prov som innehöll mest mögel. En möjlig förklaring kan vara att de iranska fikonen hade hanterats annorlunda på något sätt jämfört med de turkiska. Efter torkningen tvättas till exempel turkiska fikon och torkas om på nytt på produktionsanläggningarna innan de packas. Det är möjligt att denna behandling avlägsnar en del av de mögelsvampar som kontaminerar fikonen utvändigt. Om de iranska fikonen genomgår någon liknande behandling har inte framgått av den kartläggning som gjordes av odlingen och produktionen av torkade fikon i detta examensarbete.

Hygienisk kvalitet

Den totala halten mögel kan endast ge en grov bild av fikonens hygieniska kvalitet. Hänsyn måste tas till vilka mögelarter som ingår i totalhalten och det är först när den normala halten och sammansättningen av mögel samt betydelsen av detta för fikonen är känd som totalhalten kan användas för att bedöma den hygieniska kvaliteten. Något sådant referensmaterial finns inte för torkade fikon. Det finns heller inget lagstadgat mikrobiologiskt gränsvärde för mögel i livsmedel och endast få undersökningar har gjorts på livsmedel för att undersöka betydelsen av en viss mögelhalt i relation till mykotoxinmängd.

Av de 17 fikonproven påvisades mögelsvampar endast i fem prov. Tre av dessa kom från Iran och två kom från Turkiet, varav de iranska proven som tidigare nämnts innehöll mest mögel (upp till $1,8 \cdot 10^4$ cfu per gram fikonprov). Dessa halter skulle dock kunna motsvara den förväntade normalfloran av mögel i torkade fikon, som odlas i en miljö där mögel förekommer naturligt och vars produktion inte innefattar något steg som helt kan förväntas eliminera förekomsten av kontaminerande mögelsvampar. Det är endast genom korrekt torkning och lagring som mögelhalterna kan förväntas minska med tiden. Inget av de fem proven innehöll aflatoxiner eller ochratoxin A över detektionsgränserna.

I tolv av de 17 fikonproven kunde mögelsvampar inte detekteras. Till dessa tolv prov hörde även det prov som innehöll aflatoxiner, vilket tyder på att åtminstone detta prov innehållit aflatoxinproducerande mögelsvampar i något steg före eller efter skörd, men att dessa sedan avdödats på något sätt. Sju av de tolv proven som var fria från mögel, inklusive det prov som innehöll aflatoxiner, innehöll jäst. Detta kan tyda på att jäst eventuellt kan konkurrera ut mögel. Fikonen kan eventuellt också ha behandlats på något sätt som avdödat mögelsvamparna men möjliggjort för jästsvampar att etablerat sig under lagringen. Förutom tvättning kan till exempel den chockfrysning som tillämpas i samband med avdödningen av skadeinsekter i ekologiskt odlade fikon möjligtvis även verka reducerande på totalhalten mögel i fikonen.

Identifierade mögelsvampar

Fusarium spp dominerade i fyra av de fem proven som innehöll mögel. Att fusariumarter kan tillväxa i fikon är känt eftersom bland annat zearalenon, fumonisiner och HT-2-toxin tidigare har påträffats i torkade fikon. Att *Fusarium* skulle vara det dominerande mögelsläktet var dock oväntat. Bland tropiska frukter är det främst bananer som tidigare förknippats med *Fusarium*. Resultatet kan tyda på att torkade fikon på den svenska marknaden kan innehålla fusariumtoxiner.

Förutom fusariumarter dominerade även arter av svarta aspergiller i tre av proven, varav vissa arter, såsom stammar av *Aspergillus niger*, kan vara ochratoxinbildande. Isolat sparades därför för vidare identifiering på Livsmedelsverkets mikrobiologiska enhet. Dock påträffades inte ochratoxin A i något av de tre proven, vilket kan tyda på att fikonen torkats och lagrats korrekt så att de kontaminerande mögelsvamparna inte haft möjlighet att tillväxa eller att producera mykotoxiner. Samtliga prov som innehöll svarta aspergiller hörde till kategorin små och hårt torkade fikon från Iran. Sannolikt torkar de små fikonen mycket snabbt vilket minskar risken för mykotoxinproduktion.

Aspergillus flavus och *Aspergillus parasiticus* påträffades endast i låga halter i tre av de fem proven som innehöll mögel. Det var också samma prover som innehöll svarta aspergiller. Liksom för ochratoxin A innehöll inget av dessa prov heller aflatoxiner över detektionsgränsen. Med samma resonemang som för ochratoxinbildande mögelarter kan detta tyda på att fikonen torkats och lagrats korrekt så att *Aspergillus flavus* och *Aspergillus parasiticus* inte fått möjlighet att tillväxa eller att producera aflatoxiner i fikonen.

Aflatoxiner och ochratoxin A

Den semikvantitativa analysen av fikonen visade att ett av de 17 proven innehöll aflatoxiner över detektionsgränsen 4,0 µg/kg. Verifiering av analysresultatet med HPLC visade att provet innehöll 134,4 µg/kg aflatoxiner, vilket innebär att det europeiska gränsvärdet för aflatoxiner i torkade fikon i detta prov hade överskridits med över 130 µg/kg. Även om analysresultat inte kan anses representativt för det parti som provet tagits ifrån så visar resultatet ändå att torkade fikon på den svenska marknaden kan innehålla mycket höga halter av aflatoxiner.

Tack vare att endast detaljhandelsförpackade prover inhandlats kunde det aktuella provet spåras tillbaka till det svenska livsmedelsföretag som hade släppt ut fikonen på marknaden. Livsmedelsverkets tillsynsavdelning tog kontakt med såväl livsmedelsföretaget som den kommun där livsmedelsföretaget var registrerat och begärde att en ny provtagning skulle genomföras och att proverna skulle skickas in till ett ackrediterat laboratorium för analys av aflatoxiner. En sådan provtagning och analys genomfördes omgående och resultatet visade att det parti som denna gång provtagits inte innehöll aflatoxiner över det tillåtna gränsvärdet. Resultatet visar att förekomsten av aflatoxiner ofta är koncentrerade till ett fåtal fikon inom ett parti. Aflatoxinerna som påträffades i det prov som analyserades i denna kartläggning kom sannolikt endast från ett eller ett par fikon som innehöll mycket höga halter av aflatoxiner.

Ochratoxin A över detektionsgränsen 5,0 µg/kg påträffades inte i något av de 15 prov som analyserades. I de två prov som inte analyserades kunde förekomst av ochratoxin A inte uteslutas. Detta trots att inget av proven var kontaminerat av mögel. Anledningen är att proven mycket väl kan ha varit kontaminerade av ochratoxinproducerande mögelsvampar i ett tidigare skede men att dessa sedan avdödats på något sätt.

SLUTSATSER

Den mykologiska kartläggningen visade att fikon på den svenska marknaden kan innehålla mykotoxiner, vilket kan innebära en hälsorisk för svenska konsumenter. Ett av de 17 analyserade proven innehöll höga halter av aflatoxiner och fem av proven innehöll mögelarter som kan vara mykotoxinbildande. Att torkade fikon med aflatoxiner över det tillåtna europeiska gränsvärdet förekommer på den svenska marknaden visar att livsmedelsföretagarnas egenkontroll är bristfällig och den offentliga kontrollen av aflatoxiner i fikon inte alltid är tillräcklig. Med avseende på att det heller inte finns någon kontroll av andra mykologiska risker i torkade fikon är en slutsats från detta examensarbete att det finns ett behov av att fortsätta att samla in kunskap, till exempel genom att utföra ett kontrollprojekt inom området.

Slutsatser om de analysmetoder som användes är att mätning av vattenaktiviteten inte säger något om hur höga halter av mögel som kan förväntas i torkade fikon men att vattenaktivitet är ett användbart mått för att indikera i vilket steg av produktionen som mykotoxiner kan ha bildats. Vidare ger den mykologiska analysen ingen bra överensstämmelse mellan halten mögel och halten mykotoxiner i torkade fikon eftersom mögeltillväxt inte kunde påvisas i det prov som innehöll aflatoxiner. Dessutom är det mycket svårt att med enbart morfologiska metoder särskilja mögelarter från varandra.

En sammanfattning av de främsta riskerna i odlingen och produktionen av torkade fikon är att fikonen kan infekteras av mykotoxinbildande mögelsvampar ute på odlingen, att mykotoxiner kan bildas i fikonen om de inte torkas tillräckligt snabbt till en tillräckligt låg vattenaktivitet efter skörd och att mykotoxiner kan bildas under lagringen om fikonen återfuktas efter torkningen.

TACK

Jag vill tacka mina handledare Elisabeth Fredlund och Ann Gidlund på Livsmedelsverkets mikrobiologiska enhet för all inspiration och alla kloka tips. Tack också Monica Olsen för alla intressanta reflektioner. Det har varit jätteroligt att få arbeta tillsammans med er! Jag tycker om möjligt ännu bättre om mögel efter dessa veckor på Livsmedelsverket. Jag vill även tacka min handledare Stefan Roos på SLU för alla klarsynta kommentarer och det stora engagemanget under min utbildning. Tack också Sara Herza och Åsa Lindeblad på Saltå Kvarn samt Rune Söderberg från Risenta för att ni bidragit till min kartläggning av odlingen och produktionen av torkade fikon. Och vad hade jag gjort utan dig Kenny? Tack för all korrekturläsning och för att du alltid håller hoppet uppe!

REFERENSER

- ¹ Riskprofil – Mögel och mykotoxiner i livsmedel, Livsmedelsverkets rapportserie, Rapport 4 (2009).
- ² Engstrand, L. och Widén, M. 2002. *Fruktar från främmande länder*. Stockholm: Formas. sid: 248-249. ISBN: 91-540-5894-5.
- ³ Doster, M. A. et al. 1996. *Aspergillus* Species and Mycotoxins in Figs from California Orchards. *Plant Disease*. 80(5): 484-489.
- ⁴ Özay, G. och Alperden, I. 1991. Aflatoxin and ochratoxin – a contamination of dried figs. *Mycotoxin Research* 7: 85-91.
- ⁵ Code of Practice for the Prevention and Reduction of Aflatoxin Contamination in Dried Figs. *CAC/RCP 65-2008*.
- ⁶ Muntlig kontakt, Åsa Lindeblad och Sara Herza, Saltå Kvarn.
- ⁷ Skriftlig kontakt, Rune Söderberg, Risenta.
- ⁸ FAOSTAT, webbaserad statistisk databas, tillgänglig: <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx> (2010-01-18).
- ⁹ Pitt, J. och Hocking, A. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Second edition. London: Blackie Academic and Professional. ISBN: 0412554607.
- ¹⁰ Drusch, S. och Ragab, W. 2003. Mycotoxins in fruit, fruit juices, and dried fruits. *Journal of Food Protection*. 66(8): 1514-1527.
- ¹¹ Bennet, J. och Klinch, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(3): 497-516.
- ¹² Bilaga 2, avsnitt 2, Kommissionens förordning (EU) nr 1881/2006 av den 19 december 2006 om fastställande av gränsvärden för vissa främmande ämnen i livsmedel.
- ¹³ The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), *Annual Report 2008*. European Commission.
- ¹⁴ RASFF portable database, tillgänglig: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/rasff_portal_database_en.htm (2010-01-18).
- ¹⁵ Boutrie, E., INC, The Official Voice of the International Nut and Dried Fruit Council Foundation for the World Nut and Dried Fruit Trade, *The Cracker*, 2009, 3: 43-52.
- ¹⁶ Özay, G. et al. (1995). Influence of harvesting and drying techniques on microflora and mycotoxin contamination of figs. *Nahrung*. 2: 156-165.
- ¹⁷ Trucksess, M. och Scott, P. 2008. Mycotoxins in botanicals and dried fruits – A review. *Food Additives and Contaminants*. 25(2): 181-192.
- ¹⁸ Åkerstrand, K. och Möller, T. 1989. Kvalitetskontroll av torkade fikon. *Vår föda*. 41(7-8): 308-317.
- ¹⁹ Livsmedelsverkets vägledning till livsmedelsprovtagning i offentlig kontroll och mikrobiologisk bedömning av livsmedelsprov (2007).
- ²⁰ Iamanaka, B. et al. 2005. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants*. 22(12): 1258-1263.

-
- ²¹ Karbancıoğlu-Güler, F. och Heperkan, D. 2008. Natural occurrence of ochratoxin A in dried figs. *Analytica Chimica Acta*. 617: 32-36.
- ²² Pitt, J. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*. 56(1): 184-192.
- ²³ Richard, J. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *International Journal of Food Microbiology*. 119: 3-10.
- ²⁴ Şenyuva, H, och Gilbert, J. 2008. Identification of Fumonisin B₂, HT-2 Toxin, Patulin, and Zearalenon in Dried Figs by Liquid Chromatography, Time-of-Flight Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Food Protection*. 71(7): 1500-1504.
- ²⁵ Karaca, H. och Nas, S. 2006. Aflatoxins, patulin and ergosterol contents of dried figs in Turkey. *Food Additives and Contaminants*. 23(5): 502-508.
- ²⁶ Frisvad, J. et al. 2007. Fumonisin B₂ Production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 9727-9732.
- ²⁷ Riley, R. et al. 1996. Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and cancerogenicity of fumonisins. *Nat Toxins*. 4: 3-15.
- ²⁸ Peraica, M. et al. 1999. Toxic effects of mykotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*. 77(9): 754-766.
- ²⁹ Artikel 14.1, Europaparlamentets och rådets förordning (EU) nr 178/2002 av den 28 januari 2002 om allmänna principer och krav för livsmedelstiftning, om inrättande av Europeiska myndigheten för livsmedelssäkerhet och om förfaranden i frågor som gäller livsmedelssäkerhet.
- ³⁰ Artikel 1.1.a, Europaparlamentets och rådets förordning (EU) nr 852/2004 av den 29 april 2004 om livsmedelshygien.
- ³¹ Artikel 1.e, Kommissionens förordning (EU) nr 1152/2009 av den 27 november 2009 om införande av särskilda villkor för import av vissa livsmedel från vissa tredjeländer på grund av risken för kontaminering med aflatoxiner och om upphävande av beslut 2006/504/EU.
- ³² Muntlig kontakt, Anders Jansson, Livsmedelsverkets tillsynsavdelning.
- ³³ 4 §, Förordning om offentlig kontroll av livsmedel som importerats från ett tredje land, SFS 2006:812.
- ³⁴ Bilaga 1.D, Kommissionens förordning (EU) nr 401/2006 av den 23 februari 2006 om provtagnings- och analysmetoder för offentlig kontroll av halten av mykotoxiner i livsmedel.
- ³⁵ Samson et al. 2000. *Introduktion to Food- and Airborne Fungi*. Wageningen: Ponsen & Looyen. ISBN: 90-70351-42-0.

BILAGA 1

Aflacard® R-Biopharm

Läs först igenom den mer detaljerade beskrivningen som följer med snabbkitet.

1. Tillsätt 2 ml "conjugate diluent buffer" (rosa märkning) till konjugatet (röd märkning). Märk burken med datum. Detta måste göras minst 30 minuter före användning. Konjugatet är stabilt i 4 månader (2-8°C).
2. Blanda 50 g¹ finfördelat prov med 250 ml metanol (80:20; HPLC grade) till homogen blandning (Omnimix, Livsmedelsverket kemiska enhet 2).
3. Minst 10 ml filtreras genom ett Whatman-filterpapper (No. 113 eller 4) till ett provrör.
4. För en detektiongräns på 4ppb: Blanda 5 ml filtrat och 1 ml metanol (80:20) och blanda genom invertering flera gånger.
5. 1 ml av det utspädda filtratet sätts till en vial med 3 ml "sample dilution buffer".
6. Column clean up: filtratet droppas genom reningskolonnen (från kitet) och samlas i en "filtrate collection tube". Tryck för att få provet genom kolonnen. Om lösningen som kommer ut är grumlig ska den passera igenom samma kolonn igen (med mindre tryck).
7. Provet är nu redo för att appliceras på Aflacard® total.
8. Aflacard® total: Två prov kan appliceras på varje kort. OBS! Lufthålen får inte täckas under hela analys tiden!
9. Ta fram det antal kort och reagenser som behövs.
10. Låt stå i rumstemperatur i 30 minuter.
11. Kontrollera att de två "portarna" där provet skall appliceras har två ljusblå prickar var.
12. Tillsätt 750 µl renat och spätt filtrat i en av portarna och låt det passera igenom kortet. Det ska inte ta mer än 5 minuter.
13. Applicera 100 µl konjugat på samma port och låt det passera igenom.
14. Applicera 100 µl tvättbuffert (grön märkning) på samma port och låt det passera igenom. Torka runt porten med ett rent papper.
15. Applicera 100 µl substrat (blå märkning) på samma port och ta tid 5 minuter med timer. Efter 5 minuter tillsätts 100 µl stopplösning (gul märkning).
16. Kontrollpricken skall utveckla en tydlig lila färg. Provpricken behöver inte vara lika intensiv.
17. Läs resultatet. Negativt prov (<4ppb): Provprick och kontrollprick har en tydlig lila färg. Positivt prov (>4ppb): Ingen synlig färg i provpricken.

Ochracard® R-Biopharm

Läs först igenom den mer detaljerade beskrivningen som följer med snabbkitet.

1. 0.01 M PBS buffert: Ta en PBS tablett och tillsätt 100 ml dH₂O. Blanda. När tablett är helt löst kan PBS-bufferten användas.
2. Ta fram reagenser och låt stå i rumstemperatur ca 30 minuter.
3. Blanda 50 g¹ finfördelat prov med 100 ml metanol (100 %) till homogen blandning (Omnimix, Livsmedelsverket kemiska enhet 2).
4. Tillsätt 100 ml 1% natrumbikarbonat och blanda igen.
5. Filtrera provet genom ett Whatman-filterpapper (No. 113 eller 4).
6. Tillsätt 12 ml filtrat och 12 ml PBS buffert till ett "filtrate-dilution tube".
7. Ta bort det övre locket på kolonnen och sätt fast glasröret med den röda adaptorn. Placera en slask under kolonnen. Applicera 20 ml på kolonnen, 10 ml i taget. Ta bort det undre locket och tryck med hjälp av sprutan provet genom kolonnen. Flöde hastigheten skall vara ca 1 droppe per sekund.
8. Tryck luft genom kolonnen.
9. Tvätta med 5 ml PBS.
10. Placera provuppsamlingsröret direkt under kolonnen.
11. Eluera provet genom att droppvis tillsätta 1 ml metanol till kolonnen (glasröret behöver inte torka först). "Backflushing med metanol" rekommenderas tre gånger för att denaturera antikropparna och frigöra ochratoxinet (dra sprutan upp och ner).
12. Efter eluering, tillsätt 2 ml "sample diluent buffer" och eluera till samma rör för att ge 3 ml total provvolym.
13. Låt luft passera igenom för att säkerställa att hela provet samlats.
14. Förslut röret och blanda. Provet är nu redo för att appliceras på Ochracard®.
15. Ochracard®: Två prov kan appliceras på varje kort. OBS! Lufthålen får inte täckas under hela analys tiden!
16. Ta fram det antal kort och reagenser som behövs.
17. Låt stå i rumstemperatur i 30 minuter.
18. Kontrollera att de två "portarna" där provet skall appliceras har två ljusblå prickar var.
19. Tillsätt 500 µl renat och spätt filtrat i en av portarna och låt det passera igenom kortet. Det ska inte ta mer än 5 minuter.
20. Applicera 100 µl konjugat på samma port (röd märkning) och låt det passera igenom.
21. Applicera 100 µl tvättbuffert (grön märkning) på samma port och låt det passera igenom. Torka runt porten med ett rent papper.
22. Applicera 100 µl substrat (blå märkning) på samma port och ta tid 5 minuter med timer. Efter 5 minuter tillsätts 100 µl stopplösning (gul märkning).
23. Kontrollpricken skall utveckla en tydlig lila färg. Provpricken behöver inte vara lika intensiv.
24. Läs resultatet. Negativt prov (<5ppb): Provprick och kontrollprick har en tydlig lila färg. Positivt prov (>5ppb): Ingen synlig färg i provpricken.

¹ Här ska kompenseras för spädningen som gjordes under provberedningen:

$$\begin{aligned} 500 \text{ g prov} + 200 \text{ ml vatten} &= 700 \text{ g prov} \\ 700/500 &= 1,4 \\ 50 \text{ g prov} \times 1,4 &= 70 \text{ g prov} \end{aligned}$$

I denna serie publiceras examensarbeten samt större enskilda arbeten (motsvarande 15-30 hp) vid Institutionen för Livsmedelsvetenskap, Sveriges lantbruksuniversitet.

DISTRIBUTION:

Sveriges lantbruksuniversitet
Institutionen för Livsmedelsvetenskap
Box 7051
750 07 Uppsala
Tel. 018-67 20 06
