

Određivanje patulina u voćnim sokovima iz Hrvatskih tržišta

Jantolek, Karlo

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University North / Sveučilište Sjever**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:595241>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)





Sveučilište Sjever

Završni rad br. 75/PREH/2024

Određivanje patulina u voćnim sokovima iz Hrvatskog tržišta

Karlo Jantolek, 0336057074

Koprivnica, rujan 2024. godine



Sveučilište Sjever

Prehrambena tehnologija

Završni rad br. 75/PREH/2024

Određivanje patulina u voćnim sokovima iz Hrvatskog tržišta

Student

Karlo Jantolek, 0336057074

Mentor

Ivana Dodlek Šarkanj dipl. ing. preh. teh. predavač

Koprivnica, rujan 2024. godine

Prijava završnog rada

Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL Odjel za prehrambenu tehnologiju

STUDIJ preddiplomski stručni studij Prehrambena tehnologija

PRISTUPNIK Karlo Jantolek

MATIČNI BROJ 0336057074

DATUM 04.09.2024.

KOLEGIJ Kontrola kakvoće i sigurnosti hrane

NASLOV RADA Određivanje patulina u voćnim sokovima iz Hrvatskog tržišta

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Determination of patulin in fruit juices from the Croatian market

MENTOR Ivana Dodlek Šarkanj

ZVANJE dipl. ing. preh. teh. predavač

ČLANOVI POVJERENSTVA

- Doc.dr.sc. Dunja Šamec, predsjednica
- Izv.prof.dr.sc. Natalija Uršulin-Trstenjak, članica
- Ivana Dodlek Šarkanj dipl.ing.preh.teh., mentorica
- Izv.prof.dr.sc Krunoslav Hajdek, zamjena člana
-

Zadatak završnog rada

BROJ 75/PREH/2024

OPIS

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti koje proizvode razne plijesni poput Aspergillus, Penicillium i Fusarium. Rastu u raznim okolišnim uvjetima, a najviše im za rast pogoduje umjerena temperatura i visoka vlažnost. Često zaraženo voće plijesnima su jabuke, najčešća plijesan je Penicillium expansum koja proizvodi mikotoksin patulin. Cilj ovog rada je ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testom, inače popularna i učinkovita metoda za detekciju mikotoksina, uključujući patulin. Princip rada metode temelji se na specifičnim antitijelima koja se koriste za detekciju i kvantifikaciju analita, te spektrofotometrijski odrediti koncentracije patulina.

ZADATAK URUČEN 04.09.2024.

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE
SJEVER



Predgovor

Zahvaljujem se mentorici Ivani Dodlek Šarkanj dipl. ing. preh. teh. na strpljenju i pomoći prilikom izrade ovog završnog rada, te svim profesorima koji su učinili studiranje zanimljivijim.

Zahvala ide prijateljima i kolegama, a najviše se zahvaljujem obitelji na podršci i strpljenju tijekom studiranja.

Sažetak

Jabuke su nutritivno bogato voće podložno kvarenju do kojeg često dolazi prilikom lošeg rukovanja. Natučene i gnjile jabuke odlična su podloga za kontaminaciju plijesnima, a plijesan koja najčešće napada jabuke je *Penicillium expansum*, koja proizvodi mikotoksin patulin. Patulin je toksičan za ljude te ima negativne učinke na probavni, imunološki i živčani sustav. S obzirom da je vrlo česti kontaminant u jabukama dopijeva u gotove proizvode, a to su uglavnom sokovi i kašice.

U ovom radu ELISA metodom mjerene su koncentracije patulina u konvencionalnim sokovima od jabuke, kruške i naranče, ekološkim sokovima od jabuke i kruške, cijedenim sokovima od jabuke, kruške i breskve sa korom i bez kore te voćnim kašicama od jabuke i kruške. Nakon što su koncentracije izmjerene pri 450 nm tablicama su prikazane izmjerene koncentracije te je odrađena analiza istih.

Rezultati su pokazali da su konvencionalni sokovi od jabuke najpodložniji kontaminaciji patulinom, nakon čega slijede konvencionalni sokovi od naranče, zatim breskve i kruške. Dva uzorka pokazala su koncentraciju patulina iznad dozvoljene granice, jedan uzorak bio je vrlo blizu gornje granice, a svi ostali uzorci imaju manje značajne koncentracije unutar dozvoljenih granica.

Ključne riječi: Patulin, voćni sokovi, ELISA

Summary

Apples are a nutritionally rich fruit subject to spoilage, which often occurs due to poor handling. Bruised and rotten apples are an excellent base for mold contamination, and the mold that most often contaminates apples is *Penicillium expansum*, which produces the mycotoxin patulin. Patulin is toxic to humans and has negative effects on the digestive, immune and nervous systems. Since it is a very common contaminant in apples, it ends up in finished products, which are mainly juices and porridges.

In this undergraduate thesis, patulin concentrations were measured using the ELISA method in conventional apple, pear and orange juices, organic apple and pear juices, squeezed apple, pear and peach juices with and without peel, and apple and pear fruit purees. After the concentrations were measured at 450 nm, the measured concentrations were shown in the tables and an analysis was made.

The results showed that conventional apple juices are most susceptible to patulin contamination, followed by conventional orange juices, then peaches and pears. Two samples showed a concentration of patulin above the permissible limit, one sample was very close to the upper limit, and all other samples have less significant concentrations within the permissible limits.

Key words: Patulin, fruit juices, ELISA

Popis korištenih kratica

FAO	Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda, <i>eng. Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
TLC	Tankoslojna kromatografija, <i>eng. Thin layer chromatography</i>
PAT	Patulin
ELISA	Enzimski povezani imunosorbentni test, <i>eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ROS	Reaktivne vrste kisika, <i>eng. Reactive oxygen species</i>
NFC	Ne od koncentrata, <i>eng. Not from concentrate</i>
FC	Od koncentrata, <i>eng. From concentrate</i>
TASTE	Kratkotrajni toplinski ubrzani isparivač, <i>eng. Thermally Accelerated Short Time Evaporator</i>
HRP	Hrenova peroksidaza, <i>eng. Horseradish peroxidase</i>
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, <i>eng. High-performance liquid chromatography</i>
GC-MS	Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa, <i>eng. Gas chromatography–mass spectrometry</i>
ppb	Dijelova na milijardu, <i>eng. Parts per billion</i>
HAPIH	Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu

Sadržaj

1.	Uvod	1
2.	Mikotoksini	2
2.1.	Patulin i njegova toksičnost	3
2.2.	Potvrdne metode za određivanje mikotoksina	4
2.3.	Zakonska regulativa	5
2.4.	Proizvodnja sokova od jabuke, kruške i naranče	6
3.	Praktični dio	11
3.1.	Materijali	11
3.2.	Metode	17
3.3.	Određivanje patulina Elisa metodom	19
4.	Rezultati	21
5.	Zaključak	28
6.	Literatura	30
7.	Popis slika	32
8.	Popis tablica	33

1. Uvod

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti koje proizvode razne vrste plijesni [1]. Najčešće su to rodovi *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, rastu u raznim okolišnim uvjetima, a najviše im za rast pogoduje umjerena temperatura i visoka vlažnost [2]. Pronađene su u žitaricama i uljaricama koje imaju važnu ulogu u međunarodnoj trgovini. Proteklih nekoliko desetljeća, razno voće i povrće koje je dio svakodnevne prehrane također je na listi proizvoda koji su izloženi kontaminaciji mikotoksinima [3].

Često zaraženo voće plijesnima su jabuke, a najčešća plijesan je *Penicillium expansum* koja proizvodi mikotoksin patulin. Kontaminacija patulinom primarno se povezuje sa oštećenim i trulim plodovima voća i voćnim sokovima napravljenim od voća loše kvalitete. Uzrokuje smeđu trulež kod jabuke i slične karakteristike degradacije ploda. Patulin je vrlo termostabilan u sokovima od jabuke jer ga u gotovim proizvodima saharoza štiti od degradacije prilikom toplinske obrade, te ga je teško ukloniti postupcima kao što je pasterizacija [1].

Njegova toksičnost dovodi do genotoksičnih, citotoksičnih, imunosupresivnih i neurotoksičnih učinaka, uz mogućnost izazivanja gastrointestinalnih poremećaja poput mučnine i proljeva. Zbog štetnih učinaka, patulin je strogo reguliran, s dozvoljenim maksimalnim razinama u prehrambenim proizvodima, posebno onima namijenjenim djeci [4].

Uredba Komisije (EU) br. 1881/2006, koja je izmijenjena Uredbom (EU) 2023/915, propisuje maksimalno dozvoljene količine patulina u raznim prehrambenim proizvodima. U voćnim sokovima, voćnim nektarima, koncentriranim voćnim sokovima, alkoholnim pićima i fermentiranim proizvodima koji sadrže sok jabuke dozvoljeno je maksimalno 50 µg/kg patulina dok je za čvrste proizvode od jabuka dozvoljeno 25 µg/kg, a svega 10 µg/kg patulina dozvoljeno je u voćnim sokovima i čvrstim proizvodima od jabuka namijenjenim za djecu i dojenčad [5].

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) popularna je i učinkovita metoda za detekciju mikotoksina, uključujući patulin, u različitim vrstama voća i voćnih proizvoda. Princip rada metode temelji se na specifičnim antitijelima koja se koriste za detekciju i kvantifikaciju analita, u ovom slučaju patulina. Postoje različite varijante ELISA metode, no najčešće korištene za detekciju mikotoksina su kompetitivna i sendvič ELISA [6].

U ovom radu obradit će se tematika mikotoksina patulina i njegove pojavnosti u jabukama i proizvodima od jabuka. ELISA metodom spektrofotometrijski će se pri 450nm odrediti količine patulina u uzorcima konvencionalnih sokova od jabuke, kruške i naranče, ekološki proizvedenim sokovima od jabuke i od kruške, cijedenim sokovima od jabuke, kruške i breskve sa korom i bez kore te voćnim kašama od jabuke i kruške.

2. Mikotoksini

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti mikotvornih plijesni [1]. Proizvode ih različite vrste plijesni, a najčešće iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, nastaju u određenim uvjetima okoliša, a posebno pri visokoj temperaturi i vlažnosti [2]. Proizvode mikotoksine aflatoksin, ohratoksin A, patulin i alternaria toksine. Toksični su za ljude i životinje koji konzumiraju proizvode koji njima mogu biti kontaminirani. Nisu sastavni dio plijesni već ih plijesni proizvode zbog razloga koji nisu još razjašnjeni u potpunosti. Pretpostavka je da možda služe kao insekticidi, možda imaju ulogu da onesposobe obrambene mehanizme biljaka ili pak pomažu plijesni u ostvarivanju bioloških funkcija [1].

Postoje stotine vrsta mikotoksina, neke su poznate i koriste se za proizvodnju antibiotika dok su neke izrazito opasne poput aflatoksina koji mogu biti vrlo kancerogeni [1].

Bolesti izazvane mikotoksinima nazivaju se mikotoksikoze. Mikotoksini za ljude mogu biti karcinogeni, genotoksični i mutageni te uzrokuju akutne i kronične zdravstvene probleme, uključujući:

- hepatotoksičnost (oštećenje jetre),
- nefrotoksičnost (oštećenje bubrega),
- imunosupresija (slabljenje imunološkog sustava)
- kancerogenost (povećanje rizika od raka)
- neurotoksičnost (oštećenje živčanog sustava)
- hormonalni poremećaji [7].

Tablica 2.1 prikazuje najznačajnije mikotoksine i toksikogene gljive koje ih produciraju.

Tablica 2.1 Toksikogene gljive i mikotoksini koje proizvode [8]

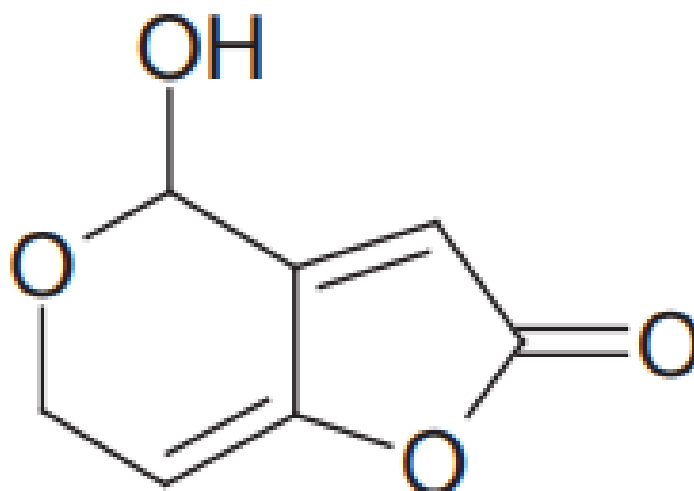
Mikotoksini	Toksikogene gljive
Aflatoksini	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Citrinin	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>Monascus ruber</i> , <i>M. purpureus</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. odoratum</i> , <i>P. radicumicola</i> , <i>P. verrucosum</i>
Deoksinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. pseudograminearum</i>
Fumonizini	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. nygamai</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. anthophilum</i> , <i>F. dlamini</i>

Ohratoksin A	<i>Aspergillus affinis</i> , <i>A. albertensis</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. welwitschiae</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. cretensis</i> , <i>A. flocculosus</i> , <i>A. lacticoffeatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. pseudoelegans</i> , <i>A. roseoglobulosus</i> , <i>A. sclerotioniger</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. steynii</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>Neopetromyces muricatus</i> , <i>Penicillium nordicum</i> , <i>P. verrucosum</i>
Patulin	<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. giganteus</i> , <i>A. longivesica</i> , <i>Paecilomyces fulvus</i> , <i>P. niveus</i> , <i>P. saturatus</i> , <i>Penicillium antarcticum</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P. clavigerum</i> , <i>P. compactum</i> , <i>P. concentricum</i> , <i>P. coprobium</i> , <i>P. dipodomycicola</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. gladioli</i> , <i>P. glandicola</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. marinum</i> , <i>P. novae-zeelandiae</i> , <i>P. paneum</i> , <i>P. psychrosexualis</i> , <i>P. samsonianum</i> , <i>P. sclerotigenum</i> , <i>P. vulpinum</i> , <i>Xylaria longiana</i>
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. crookwellense</i>
Ergot alkaloidi	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i>
T-2 i HT-2 toksin	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. langsethiae</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sambucinum</i>

2.1. Patulin i njegova toksičnost

Patulin (PAT) (4-hidroksi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-on) je mikotoksin kojeg primarno proizvode plijesni rodova *Penicillium* i *Aspergillus*, a ime je dobio po plijesni *Penicillium patulinum* [1]. Njegova struktura prikazana je na slici 2.1. Spada u skupinu spojeva poznatih kao toksični laktoni. Kontaminacija patulinom primarno se povezuje sa oštećenim i trulim plodovima voća i voćnim sokovima napravljenim od voća loše kvalitete [1].

Rodovi plijesni koje proizvode patulin najčešće pronalazimo na jezgričavom i koštuničavom voću kao što su kruške, breskve, grožđe a naročito na jabukama. Nedavna istraživanja pokazala su da se patulin može naći i na povrću, no i dalje se njegova pojavnost najviše povezuje s jabukama [1]. Smeđa trulež jabuke i slične karakteristike degradacije ploda vrlo često ukazuju na moguću kontaminaciju patulinom, također i na ostalom voću sa vidljivim znakovima truleži, raspadanja ili plijesni možemo očekivati prisutnost patulina no posebice na jabukama. Patulin je vrlo stabilan u sokovima od jabuke i grožđa, a u gotovim proizvodima saharoza ga štiti od degradacije prilikom toplinske obrade, odnosno čini ga vrlo termostabilnim te ga je teško ukloniti [1].



Slika 2.1 Strukturna formula patulina [1]

Prva istraživanja toksičnosti patulina pokrenuta su prije više od 60 godina, s ciljem otkrivanja povezanih farmakoloških učinaka. Do danas je provedeno nekoliko biokemijskih i toksikoloških studija PAT-a. Glavni mehanizam povezan s PAT toksičnošću uključuje lako stvaranje kovalentnih spojeva koji sadrže sulfhidrilne spojeve, kao što su glutation, cistein i tioglikolat [4].

Ove reakcije također utječu na aktivnosti enzima koji sadrže tiol u mnogim aktivnim skupinama, kao što je heksokinaza, koja ima važnu ulogu u glikolizi. Redukcija glutaciona izaziva proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u stanicama. Prekomjerne stanične razine ROS-a ne samo da narušavaju dinamičku ravnotežu između prooksidativnih i antioksidativnih procesa ali i remete normalno fiziološko stanje stanice. Osim toga, ROS može uzrokovati sistemsko oksidativno oštećenje reakcijom s bioaktivnim molekulama kao što su nezasićene masne kiseline i nukleinske kiseline, što može dovesti do stanične strukturne i funkcionalne abnormalnosti, izazivajući razne bolesti, a time i ugroziti zdravlje organizma. Stoga su studije PAT toksikologije koncentrirane na put oksidativnog oštećenja [4].

2.2. Potvrđne metode za određivanje mikotoksina

Potvrđne metode za analizu mikotoksina ključne su za precizno identificiranje i kvantificiranje ovih spojeva u prehrambenim proizvodima, posebno nakon preliminarnih testova. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je jedna od najčešće korištenih metoda koja omogućuje separaciju i kvantifikaciju mikotoksina na temelju njihovih kemijskih svojstava, pružajući visoku osjetljivost i specifičnost [9].

Masena spektrometrija (MS), često u kombinaciji s HPLC-om ili plinskom kromatografijom (GC), omogućuje detaljnu analizu mikotoksina kroz identifikaciju na temelju mase i strukture, što je vrlo specifično i osjetljivo [10].

Plinska kromatografija (GC) koristi se za analizu hlapljivih mikotoksina. Ova metoda uključuje derivatizaciju uzorka, separaciju kroz kromatografski stupac te detekciju pomoću masene spektrometrije ili plamen-ionizacijskog detektora [10].

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) koristi specifična antitijela za detekciju mikotoksina, iako se uglavnom koristi kao početna screening metoda. Za potvrdu rezultata ELISA testa često se koriste HPLC ili MS [11].

Tankoslojna kromatografija (TLC) omogućuje separaciju mikotoksina pomoću tankog sloja adsorbenta, ali ima nižu osjetljivost u usporedbi s HPLC-om i MS-om. Iako jednostavna i brza, ova metoda se koristi za manje zahtjevne analize [11].

Svaka od ovih metoda ima specifične prednosti i ograničenja, a često se koriste u kombinaciji kako bi se osigurala točnost i pouzdanost u identificiranju mikotoksina .

2.3. Zakonska regulativa

Europski zakon regulira razine patulina u hrani kako bi zaštitio potrošače od potencijalno štetnih učinaka ovog mikotoksina. Uredba Komisije (EU) br. 1881/2006, koja je izmijenjena Uredbom (EU) 2023/915, propisuje maksimalno dozvoljene količine patulina u raznim prehrambenim proizvodima, a prikazane su u tablici 2.2.

U tablici 2.2 koja prikazuje najveće dopuštene količine patulina prema Uredbi (EU) 2023/915 može se vidjeti da je u voćnim sokovima, voćnim nektarima, koncentriranim voćnim sokovima, alkoholnim pićima i fermentiranim proizvodima koji sadrže sok jabuke dozvoljeno maksimalno 50 µg/kg patulina dok je za čvrste proizvode od jabuka dozvoljeno 25 µg/kg, a svega 10 µg/kg patulina dozvoljeno je u voćnim sokovima i čvrstim proizvodima od jabuka namijenjenim za djecu i dojenčad.

Osnovna načela zakonodavstva EU o kontaminantima u hrani utvrđena su Uredbom Vijeća 315/93/EEC:

- Hrana koja sadrži kontaminant u količini neprihvatljivoj sa stajališta javnog zdravlja, a posebno na toksikološkoj razini, ne smije se stavljati na tržište
- Razine onečišćenja moraju se održavati na najnižim razinama koje se razumno mogu postići slijedeći preporučenu dobru radnu praksu

- Moraju se postaviti maksimalne razine za određene kontaminante kako bi se zaštitilo javno zdravlje [5].

Tablica 2.2 Najveće dopuštene količine patulina prema Uredbi (EU) 2023/915 [5]

Patulin	Najveća dopuštena količina (µg/kg)
Voćni sokovi, voćni sokovi iz koncentrata, koncentrirani voćni sokovi i voćni nektari	50
Alkoholna pića, jabukovača i druga fermentirana pića dobivena od jabuka ili koja sadržavaju sok od jabuka	50
Čvrsti proizvodi od jabuka koji se stavljaju na tržište za krajnjeg potrošača, osim proizvoda iz točaka 1.3.4. i 1.3.5.	25
Sok od jabuka i čvrsti proizvodi od jabuka za dojenčad i malu djecu koji su označeni i stavljaju se na tržište kao takvi	10
Dječja hrana	10

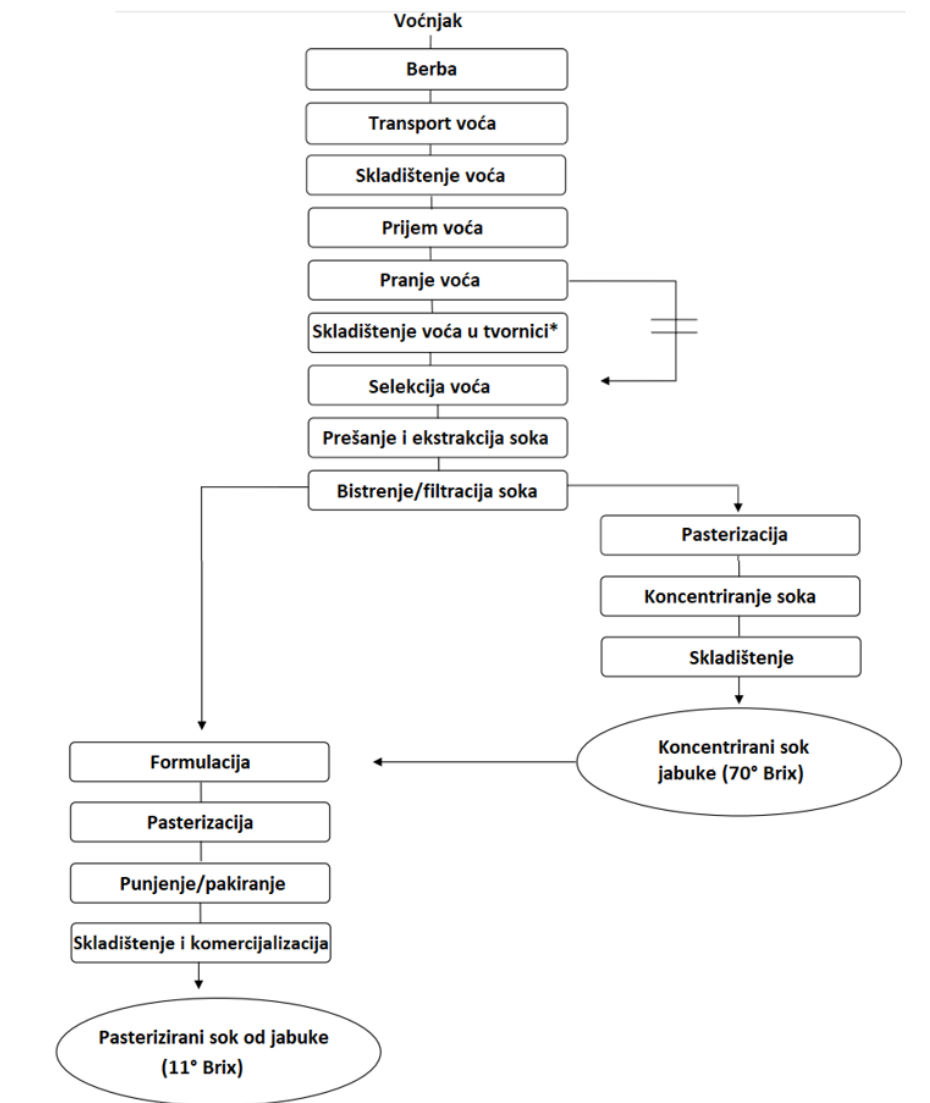
2.4. Proizvodnja sokova od jabuke, kruške i naranče

Jabuka (porodica: *Rosaceae*, rod i vrsta: *Malus domestica*) pripada skupini jezgrastog voća [12]. To je voće koje ima karakterističnu unutarnju jezgru (ili srž) sjemenki okruženu mesnatim dijelom ploda. Osim jabuka, u ovu skupinu spadaju i kruške i dunje. Jabuke su iznimno nutritivno bogato voće, a zbog visokog udjela vode i šećera podložne su kvarenju koje uzrokuju razni mikroorganizmi poput plijesni. Plijesan *Penicilium expansum* prikazana na slici 2.2 često je zaslužna za kvarenje jabuka usred nepravilnog skladištenja i manipulacije gdje dolazi do biosinteze patulina [12].



Slika 2.2 Jabuka zaražena sa plijesni *Penicillium expansum* [7]

Jabuka zbog sadržaja vode, šećera i ostalih komponenata vrlo je pogodna sirovina za proizvodnju sokova. Slika 2.3 prikazuje dijagram toka proizvodnje soka od jabuke [12].



Slika 2.3 Dijagram toka proizvodnje soka od jabuke [12]

Proizvodnja soka od jabuke započinje berbom koja može biti ručna ili strojna. Ubrano voće se u kantama ili sanducima transportira u tvornicu ili se skladišti. Ako se jabuke skladište, poželjno ih je uskladištiti za manje od 18 sati nakon berbe radi očuvanja kvalitete. Prije ulaska u skladište koriste se antioksidansi (kao što je difenilamin) i fungicidi (kao što su benomil i benzilimidazoli) za izbjegavanje fizioloških i gljivičnih problema [12].

Nakon skladištenja, plodovi se transportiraju u tvornicu gdje prvo idu u jedinicu za pranje. Plodovi se peru na trakama uz pomoć raspršivača vode pod pritiskom radi uklanjanja ostataka zemlje i primjesa. U nekim slučajevima, koriste se četke za uklanjanje trulih dijelova i čvrsto priljubljene prljavštine. Ukoliko se plodovi kratko skladište u tvornici prije prerade, to treba trajati što je moguće kraće, ne više od 24 sata nakon uklanjanja iz rashladnih skladišta. U fazi selekcije, oštećeno ili pokvareno voće može se odbaciti ili djelomično koristiti nakon što se uklone oštećeni dijelovi. Prije prešanja, jabuke se melju kako bi se smanjila veličina sirovine i time pospješilo

prešanje odnosno ekstrakcija soka. Tako mljevena masa jabuka služi da bi sok lakše teкао kroz masu te kao pomoćni filter za bistrenje soka [12].

Kod prešanja dodaje se askorbinska kiselina kako bi se izbjeglo enzimsko posmeđivanje. Bistrenje uključuje enzimsku depektinizaciju i doradu, uz uklanjanje spojeva kao što su pektinske tvari, protein i fenolni spojevi koji narušavaju izgled konačnog proizvoda. Enzimski pripravci hidroliziraju pektinske tvari odgovorne za mutnoću soka. Za filtraciju se još mogu koristiti i spojevi kao što su silika sol, aktivni ugljen, pektinska kiselina, polivinilpirolidon ili bentonit koji se miješaju sa sokom kako bi se uklonili suspendirani materijali koji su rezultat aktivnosti enzima [12].

U novije vrijeme ultrafiltracija sve je učestalija metoda filtracije. U nekim industrijskim pogonima filtrirani sok se pasterizira nakon čega slijede koncentracija i skladištenje, dok u drugima, nakon bistrenja sok može biti izravno namijenjen formulaciji soka ili nektara nakon čega slijede pasterizacija i punjenje. Kada je sok koncentriran i uskladišten za upotrebu između berbi, dvaput će se podvrgnuti pasterizaciji, prvi put prije koncentracije i drugi nakon rekonstitucije. Sok se koncentrira isparavanjem, po mogućnosti na 70-71° Brix. Ovo je neophodan proces za očuvanje spojeva arome (koji su osjetljivi na toplinu) ukoliko sok želimo skladištiti duže vrijeme [12].

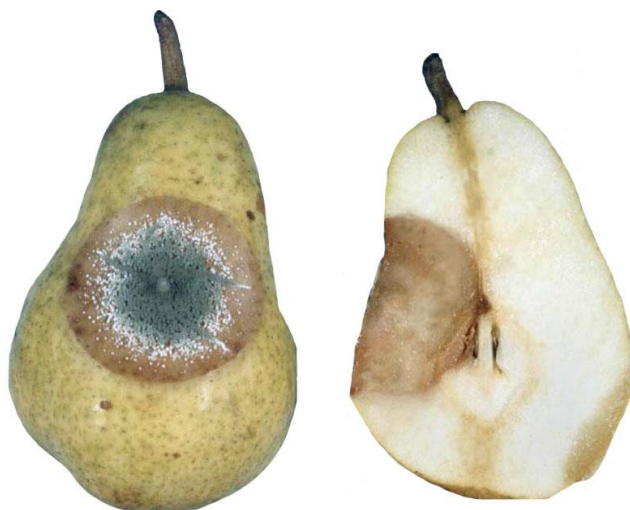
Proces formulacije koristi se za proizvodnju nektara, bilo da se koristi svježe iscijeđeni sok ili koncentrirani sok. Formulacija je u ovom slučaju mješavina soka, vode, šećera i antioksidansa poput askorbinske kiseline i sredstava za zakiseljavanje kao što je limunska kiselina. Nakon formulacije sok se pasterizira na temperaturama između 90 °C i 98 °C nekoliko sekundi. Nakon pasterizacije sok se hladi i spreman je za punjenje u tetrapake, staklene ili plastične boce. Sok u ambalaži zatim se skladišti i komercijalizira [12].

Kruška (*Pyrus sp.*) je vrsta jezgričavog voća iz porodice Rosaceae, koja se uzgaja u mnogim dijelovima svijeta zbog svojih ukusnih i hranjivih plodova. Specifičnog je oblika koji je sužen pri vrhu i širi pri dnu, a ovisno o sorti veličina može varirati od malih do velikih plodova različite boje od zelene ili žute do crvenkaste ili smeđe. Mezokarp kruške može biti čvrst i hrskav ili pak mekan i sočan [13].

Sadrže značajnu količinu prehrambenih vlakana. Sadrže nešto više šećera od jabuka i oko 85% vode što ih čini vrlo pogodnom sirovinom za proizvodnju soka. Zbog mekane strukture i podložnosti kvarenju kruške su često na meti plijesni roda *Penicillium expansum* prikazane na slici 2.4 zbog čega dolazi do biosinteze patulina koji doprinosi gotove proizvode od kruške [13].

Sok od kruške proizvodi se na isti način kao i sok od jabuke, no prilikom određenih procesa može biti manjih razlika u proizvodnji. Kruške su često mekše i zrelije u usporedbi s jabukama,

što može zahtijevati prilagodbe u procesu mljevenja i prešanja kako bi se spriječilo prekomjerno stvaranje pulpe [13].



Slika 2.4 Kruška zaražena sa plijesni *Penicillium expansum* (Izvor: popis slika)

Naranča (*Citrus sinensis*) vrsta je voća koje pripada porodici *Rutaceae*. Jedno je to od najpopularnijih voća na svijetu, zbog sočnog mesa, nutritivnih vrijednosti i osvježavajućeg okusa [14].

U usporedbi s jabukama naranče imaju nižu pH vrijednost odnosno kiselije su, što je nepogodno okruženje za rast plijesni koje proizvode patulin. Jabuke pružaju neutralniji pH koji odgovara plijesnima zaslužnim za proizvodnju patulina. Naranče imaju debelu, zaštitnu koru koja pruža fizičku barijeru protiv plijesni, dok su jabuke sklonije površinskim oštećenjima koja omogućuju plijesni da prodru i koloniziraju plod. Zbog navedenih razloga sok od naranče ima niži rizik od kontaminacije patulinom nego sok od jabuke. U soku od naranče patulin je nestabilan [14].

Sam proces proizvodnje soka od naranče razlikuje se od proizvodnje soka od jabuke i kruške zbog razlika u strukturi ploda. Proizvodnja soka uključuje pranje i sortiranje voća, ekstrakciju soka dvjema metodama (metalne čaše ili rotirajući rezači), uklanjanje pulpe i sjemenki te filtraciju. Sok može biti NFC (ne od koncentrata) ili FC (od koncentrata). Sok koji nije od koncentrata (NFC) sok se pasteurizira i skladišti smrznut ili ohlađen. Sok od koncentrata (FC) sok se koncentrira do 60–65°Brix koristeći kratkotrajni toplinski ubrzani isparivač (TASTE) ili inovativne membranske tehnologije. Koncentrirani sok se može zamrznuti ili rekonstituirati prije pakiranja, a aseptično pakiranje osigurava duži rok trajanja [15].

3. Praktični dio

Cilj zadatka je bio određivanje patulina uz pomoć Gold Standard Diagnostic ELISA 96 test seta. To je set sa svim potrebnim kemikalijama za pripremu uzoraka i mikrotitarskom pločicom obloženom antitijelima za patulin. Set je namijenjen za određivanje koncentracije patulina u sokovima i proizvodima od jabuka, jabučnom cideru, soku od naranče i sličnim proizvodima. Set je skladišten na temperaturi 2-8 °C i upotrebljen unutar roka valjanosti. Također prije upotrebe sve komponente su ostavljene izvan hladnjaka kako bi postigle sobnu temperaturu (20-25 °C).

3.1. Materijali

1. Uzorci sokova:

U ovom radu ispitano je ukupno 86 uzoraka sokova od četiri vrste voća, od čega tri uzorka čine voćne kaše. Vrste voća od kojih su ispitani sokovi su jabuka, kruška, naranča i breskva. 84 uzorka su konvencionalni uzorci koji su kupljeni u lokalnim trgovinama dok su 2 uzorka iz ekološke proizvodnje poduzeća Prešaona voća i povrća "Preško", Turčišće 106e. Prikupljeni uzorci sortirani su prema vrsti voća a zatim je svaka vrsta voćnog soka sustavno poredana od 100% udjela voća u soku do 0% uz nekoliko iznimaka.



Slika 3.1 Uzorci sokova poredani prema postotku udjela voća (autor: Karlo Jantolek)

Tablica 3.1 prikazuje uzorke sokova od jabuke a označeni su oznakama od 1A do 33A te je pored svakog uzorka napisan postotak udjela voća. Dva uzorka nisu isključivo od jabuke, a to su uzorak 20A koji sadrži 20% udjela kruške te uzorak 33A koji sadrži 30% udjela kruške.

Tablica 3.1 Uzorci konvencionalnih sokova od jabuke (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Postotak (%) voća	Naziv uzorka	Postotak (%) voća
1A	0	18A	50
2A	100	18A	50
3A	100	20A	30 + (20% kruška)
4A	100	21A	51
5A	100	22A	50
6A	100	23A	50
7A	100	24A	50
8A	100	25A	50
9A	100	26A	50
10A	100	27A	50
11A	100	28A	50
12A	100	28A	50
13A	100	30A	50
14A	100	31A	50
15A	100	32A	5
16A	100	33A	70 + (30% kruška)
17A	95,8		

Tablica 3.2 Uzorci konvencionalnih sokova od kruške (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Postotak (%) voća
1B	50
2B	50
3B	25
4B	/

U tablici 3.3 uzorci su nazvani oznakama od 1C do 22C. 50% uzoraka sokova od naranče je sa 100% udjelom voća, odnosno njih jedanaest dok je uzoraka sa 50% udjela voća šest. Ostali uzorci imaju 25% ili manje udjela voća uz naznaku da uzorak 18C ima i 5% soka od mrkve.

Tablica 3.3 Uzorci konvencionalnih sokova od naranče (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Postotak (%) voća
1C	100
2C	100
3C	100
4C	100
5C	100
6C	100
7C	100
8C	100
9C	100
10C	100
11C	100
12C	50
13C	50
14C	50
15C	50
16C	50
17C	50
18C	25 + (5% mrkva)
19C	25
20C	11
21C	6
22C	6

Dva uzorka u ovoj analizi su ekološke proizvodnje, a to su sok od jabuke i sok od kruške te su oba soka od 100% udjela voća. U tablici 3.4 su pod oznakama 1D za sok od jabuke i 2D za sok od kruške.

Tablica 3.4 Uzorci ekoloških sokova od jabuke i kruške (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Vrsta voća	Postotak (%) voća
1D	Jabuka	100
2D	Kruška	100

Uz konvencionalne i ekološke uzorke napravljeni su i uzorci cijedenih sokova od jabuke kako bi se vidjelo ima li odstupanja u kontaminaciji patulinom u odnosu na konvencionalne uzorke. Devet uzoraka oznaka 1E-9E prvo su oguljeni a zatim je od njih napravljen sok, a prikazuje ih tablica 3.5. Sorte jabuka koje su korištene za izradu soka su Fajif, Idared, Jona Gold, Granny Smith, Granny Smith K., Zlatni Delišeš, Crveni delišeš, Pink lady i Golden Delicious.

Tablica 3.5 Uzorci cijedenih sokova od jabuke bez kore (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Sorta jabuke
1E	Fajif
2E	Idared
3E	Jona Gold
4E	Granny Smith
5E	Granny Smith K.
6E	Zlatni delišeš
7E	Crveni delišeš
8E	Pink Lady
9E	Golden Delicious

Tablica 3.6 prikazuje uzorke cijedenih sokova sorata jabuka kao i prethodna tablica no ovog puta je sok pripremljen sa korom jabuke odnosno jabuke prije cijedenja soka nisu oguljene kako bi se vidjela potencijalna razlika u kontaminaciji patulinom između oguljenih i neoguljenih jabuka. Uzorcima su dodijeljene oznake od 1F do 9F. Svi sokovi su od 100% voća bez ikakvih dodataka .

Tablica 3.6 Uzorci cijedenih sokova od jabuke sa korom (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Sorta jabuke
1F	Fajif
2F	Idared
3F	Jona Gold

4F	Granny Smith
5F	Granny Smith K.
6F	Zlatni delišes
7F	Crveni delišes
8F	Pink Lady
9F	Golden Delicious

Osim jabuke, cijedeni sokovi napravljeni su i od kruške i breskve. Za breskvu je sorta nepoznata, a sorta kruške koja je korištena je Williams. Sokovi su iscijedeni sa voćem sa i bez kore da bi se uočile potencijalne razlike. Uz obične i cijedene sokove napravljena su tri uzorka od voćnih kaša i to od jedne kaše od jabuke te jedne od 50% jabuke i od 50% kruške i jedne od kruške. Jedan uzorak voćne kaše je od 100% voća i to je uzorak od jabuke (5G), uzorak 6G je od 50% jabuke i 50% kruške, dok za uzorak 7G postotak udjela voća nije poznat. Uzorci cijedenih sokova od kruške i breskve sa korom i bez kore i kaša od jabuke i kruške prikazani su u tablici 3.7.

Tablica 3.7 Uzorci cijedenih sokova od kruške i breskve sa korom i bez kore i kaša od jabuke i kruške (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Vrsta voća	Sorta	Sa korom	Kaša	Postotak (%) voća
1G	Breskva	/	Ne	/	100
2G	Breskva	/	Da	/	100
3G	Kruška	Williams	Ne	/	100
4G	Kruška	Williams	Da	/	100
5G	Jabuka	/	/	Da	100
6G	Jabuka + Kruška	/	/	Da	50+50
7G	Kruška	/	/	Da	/

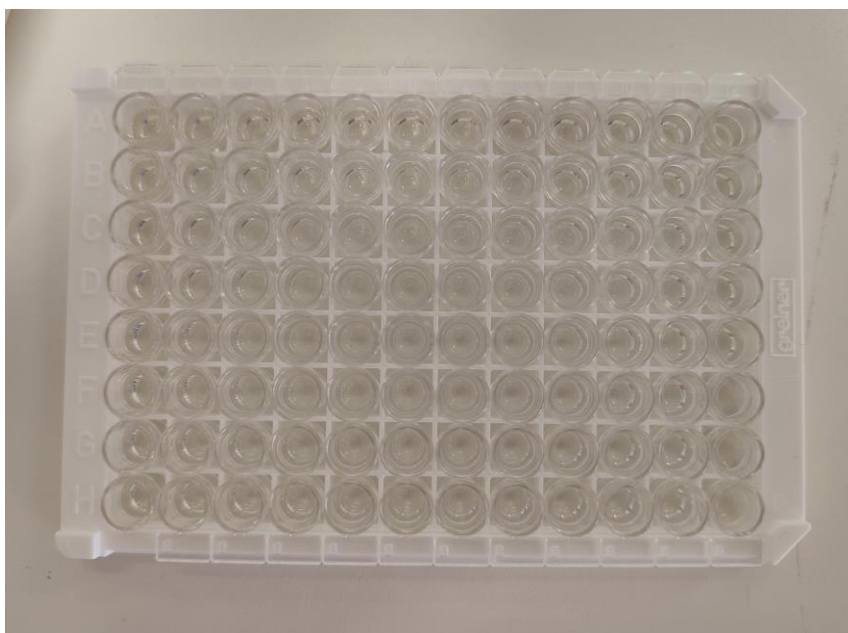
2. Pribor potreban za provođenje (nije uključen u set):

- Mikropipete s plastičnim vrhovima (10-200 i 200-1000 μ L)
- Višekanalna pipeta s plastičnim vrhovima
- Jednokratne pipete: 2,0 mL
- Čitač mikrotitarske ploče s valnom duljinom 450 nm

- Tajmer
- Velike boce (500 mL ili veće)
- Parafilm ili pokrov za mikroploče
- Plastične mikro centrifugalne epruvete od 15 mL i 2 mL
- Destilirana voda
- Termo blok (45°C)
- Vortex mikser/rotator
- Mikrocentrifuga sposobna za 8 100 x g ili 10 000 rpm
- Analitička vaga s dvije decimalne (opseg vaganja $\pm 0,05$ grama)

3. Kemikalije:

- Mikrotitarska pločica obložena anti-patulin antitijelima
- Patulin standardi (6): 0, 0.03, 0.08, 0.15, 0.30 i 0.90 ppb te kontrolni uzorak (1) 0,10 ppb $\pm 0,02$ ppb
- 10 razrjeđivača uzoraka, 30 mL
- Patulin HRP otopina konjugata, 12 mL
- Derivatizacijski reagens
- Razrjeđivač derivatizacijskog reagensa, 1.1 mL
- Koncentrat otopine za ispiranje (5x), 100 mL
- Otopina boje (supstrat), 13,5 mL
- Stop otopina, 13,5 mL



Slika 3.2 Mikrotitarska pločica obložena anti-patulin antitijelima (autor: Karlo Jantolek)

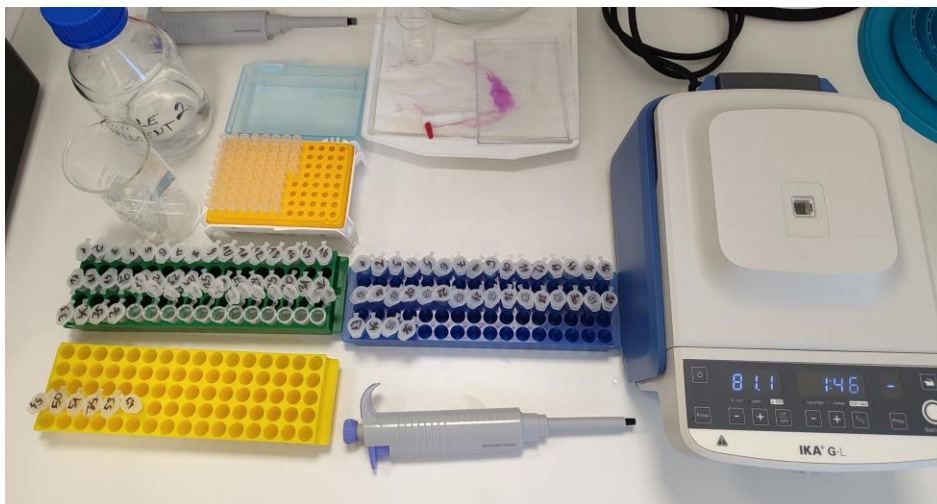
3.2. Metode

Priprema uzoraka počinje sustavnim raspoređivanjem sokova prema željenom redoslijedu radi kasnije lakše analize rezultata. U ovom slučaju uzorci su poredani prema postotku udjela voća od najvećeg do najmanjeg, a redoslijed voćnih sokova je bio prvo konvencionalni sokovi od jabuke, zatim ekološki sokovi od jabuke i kruške, konvencionalni sokovi od kruške, konvencionalni sokovi od naranče te na kraju cijedeni sokovi od jabuke, od kruške te od breskve i voćne kaše.

Nakon što su sokovi raspoređeni, od svakog je mikro pipetom uzeto 0.5 mL uzorka i preneseno u mikro centrifugalnu epruvetu (u daljnjem tekstu epica) i označeno oznakom kombinacije brojeva i slova radi daljnje identifikacije uzorka.

Nakon izuzetih uzoraka sokova pripremljeni su razrjeđivač uzorka i otopina pufera za ispiranje. 1x razrjeđivač uzorka pripremljen je tako što je u 270 mL destilirane vode dodano 30 mL 10x razrjeđivača uzorka i dobro je promiješano. 1x otopina pufera za ispiranje pripremljena je miješanjem 400 mL destilirane vode i 100mL 5x otopine pufera. U sljedećem koraku 0.5 mL razrjeđivača reagensa za derivatizaciju je pomiješano sa reagensom za derivatizaciju te je vorteksirano na vorteks miješalici 30-ak sekundi.

Nakon navedenih koraka sve potrebne otopine su spremne i počinje se sa pripremom uzoraka. U svaki standard dodano je 1 mL 1x razrjeđivača uzorka kako bi došlo do rekonstitucije. Svaki standard temeljito je vorteksiran. U falcon epruvete dodano je 4.5 mL 1x razrjeđivača uzorka i 0.5 mL uzorka soka koje smo pripremili u prvom koraku te je temeljito vorteksiran. U epicu je zatim dodano 1.5 mL razrijeđenog uzorka soka i stavljeno na centrifugu 5 minuta pri 8000g. U označenu epicu dodano je 960 μ L 1x razrjeđivača uzorka i 40 μ L supernatanta kojeg smo dobili nakon centrifugiranja. Epica je zatim temeljito vorteksirana. U svaki uzorak i standard zatim je dodano po 10 μ L derivatizacijskog reagensa te je svaki uzorak vorteksiran.



Slika 3.3 Centrifugiranje i dodatak 960 μ L 1x razrjeđivača uzorka i 40 μ L supernatanta

(autor: Karlo Jantolek)

Standardi i uzorci potom idu na inkubaciju u termoblok 45 minuta pri 45 °C. Nakon inkubacije standardi i uzorci hladili su se na sobnoj temperaturi najmanje 10 minuta. 100 µL derivatiziranog standarda, kontrolne otopine i uzorka dodano je u jažice prema zadanom redoslijedu. Jažice su prekrivene plastičnim poklopcem i stavljene su na inkubaciju 60 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sadržaj jažica je bačen u sudoper. Jažice su potom tri puta isprane sa 1x otopinom pufera za ispiranje. U svaku jažicu je prilikom ispiranja elektronskom multikanalnom pipetom dodano 250 µL otopine pufera za ispiranje. Preostali pufer uklonjen je tapkanjem pločice sa jažicama po papirnatom ubrusu.

Nakon što je pufer uklonjen u jažice je dodano 100 µL HRP otopine konjugata pomoću multikanalne pipete. Pločica s jažicama je pokrivena plastičnim poklopcem te je brzim kružnim pokretima promiješan sadržaj jažica nakon čega je sve stavljeno na inkubaciju 30 minuta pri sobnoj temperaturi.

Poslije inkubacije sadržaj jažica ponovno je bačen u sudoper. Svaka jažica isprana je tri puta s multikanalnom pipetom koristeći razrijeđenu 1x otopinu pufera za ispiranje. Korišteno je 250 µL pufera za ispiranje za svaku jažicu i svaki korak ispiranja. Preostali pufer u jažicama uklonjen je tapkanjem po papirnatom ubrusu.

U sljedećem koraku 100 µL otopine supstrata/boje dodano je u svaku jažicu uzastopno korištenjem multikanalne pipete. Pločica s jažicama pokrivena je poklopcem i brzim kružnim pokretima promiješan je sadržaj jažica. Pločica je potom stavljena na inkubaciju 20 minuta pri sobnoj temperaturi.



Slika 3.4 Promjena boje nakon dodatka supstrata (autor: Karlo Jantolek)

Nakon inkubacije u jažice je dodano po 100 μ L stop otopine korištenjem multikanalne pipete istim redosljedom kao što je dodana otopina boje.

Zadnji korak uključio je očitavanje apsorbancije na 450 nm pomoću ELISA čitača mikrotitarskih pločica. Dobiveni rezultati su potom obrađeni.

3.3. Određivanje patulina Elisa metodom

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) popularna je i učinkovita metoda za detekciju mikotoksina, uključujući patulin, u različitim vrstama voća i voćnih proizvoda. Princip ELISA metode temelji se na specifičnim antitijelima koja se koriste za detekciju i kvantifikaciju analita. Postoje različite varijante ELISA metode, no najčešće korištene za detekciju mikotoksina su kompetitivna i sendvič ELISA [6].

Kompetitivna ELISA funkcionira na način da se patulin iz uzorka i označeni patulin (najčešće konjugiran s enzimom) natječu za vezivanje na ograničen broj specifičnih antitijela koja su imobilizirana na ploči. Ako uzorak sadrži visok nivo patulina, veća količina slobodnog patulina vezat će se za antitijela, smanjujući mogućnost vezivanja enzimom označenog patulina. Nakon inkubacije, ploča se pere kako bi se uklonili nevezani reagensi, a zatim se dodaje supstrat koji enzim razgrađuje, stvarajući obojeni produkt. Intenzitet boje je obrnuto proporcionalan koncentraciji patulina u uzorku. Absorbancija (intenzitet boje) se mjeri na spektrofotometru, a rezultati se interpretiraju pomoću standardne krivulje [16].

Sendvič ELISA koristi dva različita antitijela koja se vežu za različite epitope na patulinu, formirajući "sendvič" oko molekula patulina. Uzorak se inkubira s antitijelima imobiliziranim na ploči, nakon čega se dodaje drugo, enzimom konjugirano antitijelo. Nakon pranja i dodavanja supstrata, mjeri se intenzitet boje, koji je proporcionalan koncentraciji patulina u uzorku [17].

Identifikacija i kvantifikacija patulina u uzorcima voća pomoću ELISA metode temelji se na specifičnosti antitijela koja prepoznaju patulin. Nakon vezivanja patulina za antitijela i obavljanja reakcije, rezultat se očitava pomoću spektrofotometra na određenoj valnoj duljini, obično između 450 i 630 nm, ovisno o korištenom enzimskom konjugatu i supstratu [17].

Ključni faktori za uspješnost analize uključuju specifičnost antitijela, pripremu uzorka, standardnu krivulju, enzimske reakcije i supstrat te precizno mjerenje apsorbancije. Kvalitetna antitijela s visokim afinitetom za patulin ključna su za točnost analize. Pravilna priprema uzorka, koja uključuje ekstrakciju i pročišćavanje, nužna je kako bi se izbjegle interferencije i osigurala točnost mjerenja. Standardna krivulja koristi se za točnu kvantifikaciju patulina, dok je kontrola uvjeta reakcije bitna za optimalnu aktivnost enzima [6].

Prednosti ELISA metode za analizu patulina uključuju visoku osjetljivost, specifičnost, brzinu i učinkovitost te jednostavnost upotrebe u usporedbi s drugim analitičkim metodama poput HPLC-a (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) ili GC-MS-a (plinska kromatografija-masena spektrometrija). ELISA metoda posebno je korisna u rutinskim analizama kvalitete hrane i istraživanjima koja se bave kontaminacijom voća mikotoksinima kao što je patulin [6].

4. Rezultati

Tablica 4.1 prikazuje količine patulina izmjerene u konvencionalnim uzorcima sokova od jabuke. Analiza koncentracije patulina u konvencionalnim sokovima od jabuke pokazuje varijabilnost u razinama ovog mikotoksina, s vrijednostima od 0,00 ppb do čak 56,92 ppb. Prema europskom zakonodavstvu, konkretno Uredbi (EZ) br. 915/2023, maksimalno dopuštena razina patulina u voćnim sokovima iznosi 50 ppb. Ovaj limit je premašen u dva uzorka: 10A (51,64 ppb) i 18A (56,92 ppb), što ukazuje na potencijalno zdravstveni rizik za potrošače, budući da ove razine prelaze sigurnosni prag

U izvješću Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (HAPIH) o procjeni rizika vezanom uz patulin, istaknuto je da visoke razine patulina mogu nastati zbog loših uvjeta skladištenja ili prerade jabuka, posebno onih koje su pljesnive ili oštećene. HAPIH naglašava važnost praćenja i kontroliranja patulina u prehrambenim proizvodima kako bi se osigurala sigurnost potrošača. S obzirom na to, rezultati analize ukazuju na potrebu za pojačanim nadzorom i kontrolom unutar proizvodnog lanca kako bi se osigurala sigurnost potrošača i spriječila kontaminacija sokova patulinom.

Osim uzoraka 10A i 18A, nekoliko drugih također sadrži značajne količine patulina, iako unutar zakonski dopuštenih granica. Na primjer, uzorak 8A sadrži 48,71 ppb, uzorak 13A ima 16,43 ppb, dok uzorak 14A sadrži 15,85 ppb. Ovi rezultati su posebno važni jer, iako ne prelaze zakonsku granicu, ipak ukazuju na prisutnost patulina u količinama koje nisu zanemarive. Ostali uzorci, poput 5A (9,39 ppb), 17A (11,15 ppb), i 24A (17,02 ppb), također pokazuju značajnu prisutnost patulina

S druge strane, pozitivno je što mnogi uzorci, kao što su 1A, 4A, 6A, 7A, i 9A, ne sadrže patulin, što potvrđuje da je moguće proizvesti sigurne sokove od jabuke kada se slijede odgovarajući standardi i prakse. Međutim, zbog velikih varijacija među uzorcima, potrebno je kontinuirano pratiti situaciju kako bi se spriječilo da proizvodi s visokim razinama patulina dospiju na tržište.

Tablica 4.1 Koncentracija patulina u konvencionalnim uzorcima sokova od jabuke (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Postotak (%) voća	Koncentracija patulina (ppb)
1A	0	0,00
2A	100	2,35
3A	100	11,74

4A	100	0,00
5A	100	9,39
6A	100	0,00
7A	100	0,00
8A	100	48,71
9A	100	0,00
10A	100	51,64
11A	100	0,00
12A	100	0,00
13A	100	16,43
14A	100	15,85
15A	100	0,00
16A	100	0,00
17A	95,8	11,15
18A	50	21,71
18A	50	56,92
20A	30 + (20% kruška)	5,87
21A	51	0,00
22A	50	0,00
23A	50	13,50
24A	50	17,02
25A	50	0,00
26A	50	48,71
27A	50	11,74
28A	50	32,86
28A	50	0,00
30A	50	0,00
31A	50	0,00
32A	5	0,00
33A	70 + (30% kruška)	0,00

Analiza koncentracije patulina u konvencionalnim sokovima od kruške pokazuje da niti jedan od analiziranih uzoraka ne sadrži patulin. Svi uzorci, bez obzira na postotak voća ili prisutnost

drugih sastojaka, imaju koncentraciju patulina od 0,00 ppb. Ovi rezultati su u skladu s propisima Europske unije, posebno Uredbom (EZ) br. 915/2023, koja propisuje maksimalnu dopuštenu razinu patulina u voćnim sokovima, uključujući krušku, od 50 ppb. Budući da su svi uzorci unutar zakonski dozvoljenih granica, ovi proizvodi zadovoljavaju zahtjeve sigurnosti hrane.. Rezultati mjerenja prikazani su u tablici 4.2.

Tablica 4.2 Koncentracija patulina u konvencionalnim uzorcima sokova od kruške (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Postotak (%) voća	Koncentracija patulina (ppb)
1B	50	0,00
2B	50	0,00
3B	25	0,00
4B	/	0,00

Analiza koncentracije patulina u konvencionalnim sokovima od naranče pokazuje značajne varijacije u prisutnosti ovog mikotoksina među uzorcima. Većina uzoraka, bez obzira na postotak voća, ne sadrži patulin (0,00 ppb), što je u skladu s Uredbom (EZ) br. 915/2023, koja propisuje maksimalno dopuštenu razinu patulina od 50 ppb u voćnim sokovima. Ovi rezultati ukazuju na adekvatnu kontrolu kvalitete i postupaka u proizvodnji kod većine proizvođača.

Međutim, neki uzorci pokazuju prisutnost patulina u značajnim koncentracijama. Uzorak 3C, s 100% voća, sadrži 27,58 ppb patulina, dok uzorak 10C sadrži 4,11 ppb. Iako su ove vrijednosti ispod maksimalno dopuštene granice, patulin je prisutan u količinama koje nisu zanemarive. Uzorak 20C, s niskim postotkom voća (11%), također sadrži 27,58 ppb, a uzorak 21C, s 6% voća, ima 15,26 ppb patulina.

HAPIH-ovo izvješće o procjeni rizika od patulina upozorava da se kontaminacija ovim mikotoksinom može dogoditi zbog loših uvjeta skladištenja ili prerade plodova koji su pljesnivi ili oštećeni. Prisustvo patulina u uzorcima s visokim i niskim postotkom voća sugerira da razina patulina ne ovisi samo o postotku voća, već i o drugim faktorima u proizvodnom procesu, kao što su kvaliteta sirovina i uvjeti skladištenja, pa možemo zaključiti da kod uzoraka 3C, 10C, 20C i 21C kvaliteta sirovine i uvjeti skladištenja nisu bili adekvatni.

Rezultati pokazuju da je većina uzoraka sigurna za konzumaciju, no određeni uzorci s prisutnošću patulina, iako ispod zakonskog limita, zahtijevaju pažljivije praćenje i strožu kontrolu

u proizvodnom lancu kako bi se smanjio rizik od kontaminacije. Rezultati mjerenja prikazani su u tablici 4.3.

Tablica 4.3 Koncentracija patulina u konvencionalnim uzorcima sokova od naranče (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Postotak (%) voća	Koncentracija patulina (ppb)
1C	100	0,00
2C	100	0,00
3C	100	27,58
4C	100	0,00
5C	100	0,00
6C	100	0,00
7C	100	0,00
8C	100	0,00
9C	100	0,00
10C	100	4,11
11C	100	0,00
12C	50	0,00
13C	50	0,00
14C	50	0,00
15C	50	0,00
16C	50	0,00
17C	50	0,00
18C	25 + (5% mrkva)	0,00
19C	25	0,00
20C	11	27,58
21C	6	15,26
22C	6	0,00

Analiza količine patulina u ekološki proizvedenim sokovima od jabuke i kruške pokazuje da u oba uzorka nije zabilježena prisutnost patulina, s koncentracijom od 0,00 ppb što je prikazano u tablici 4.4, a u skladu je sa maksimalno dozvoljenim granicom patulina od 50 ppb. Ovi rezultati sugeriraju da ekološki proizvedeni sokovi od jabuke i kruške iz ovih uzoraka nemaju

kontaminaciju patulinom, što je pokazatelj visoke kvalitete i uspješne primjene ekoloških standarda u proizvodnji. To može biti rezultat strožih kontrola u ekološkoj poljoprivredi, kao i pažljivijeg odabira voća, što dodatno osigurava sigurnost i kvalitetu ovih proizvoda.

Tablica 4.4 Koncentracija patulina u ekološkim uzorcima sokova od jabuke i kruške (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Vrsta voća	Postotak (%) voća	Koncentracija patulina (ppb)
1D	Jabuka	100	0,00
2D	Kruška	100	0,00

Rezultati analize patulina u cijedenim sokovima od jabuke bez kore pokazuju apsolutnu odsutnost ovog mikotoksina u svim ispitivanim uzorcima. Bez obzira na sortu jabuke, uključujući popularne sorte kao što su Granny Smith, Zlatni delišes i Pink Lady, koncentracija patulina iznosi 0,00 ppb u svakom uzorku što je vidljivo u tablici 4.5, te su svi uzorci u skladu sa trenutnim zakonodavnim okvirom. Ovi rezultati sugeriraju da cijedenje jabuka bez kore učinkovito uklanja mogućnost kontaminacije patulinom, osiguravajući visoku kvalitetu soka. To dodatno potvrđuje da je proces obrade, koji uključuje uklanjanje kore, uspješan u smanjenju rizika od prisutnosti patulina u finalnom proizvodu.

Tablica 4.5 Koncentracija patulina u cijedenim uzorcima sokova od jabuke bez kore (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Sorta jabuke	Koncentracija patulina (ppb)
1E	Fajif	0,00
2E	Idared	0,00
3E	Jona Gold	0,00
4E	Granny Smith	0,00
5E	Granny Smith K.	0,00
6E	Zlatni delišes	0,00
7E	Crveni delišes	0,00
8E	Pink Lady	0,00
9E	Golden Delicious	0,00

Analiza patulina u cijedenim sokovima od jabuke s korom pokazuje da je u većini ispitivanih uzoraka koncentracija patulina 0,000 ppb, što znači da patulin nije prisutan. Međutim, jedan uzorak, sorte Pink Lady, sadrži 17,02 ppb patulina što je prikazano u tablici 4.6. Ovaj rezultat ukazuje na to da iako cijedenje jabuka s korom uglavnom ne dovodi do prisutnosti patulina, u nekim slučajevima može doći do kontaminacije, ovisno o sorti, kvaliteti i načinu skladištenja jabuke. Ipak, zabilježena koncentracija patulina je ispod zakonski dopuštene granice, što znači da su ovi proizvodi i dalje sigurni za konzumaciju.

Tablica 4.6 Koncentracija patulina u cijedenim uzorcima sokova od jabuke sa korom (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Sorta jabuke	Koncentracija patulina (ppb)
1F	Fajif	0,00
2F	Idared	0,00
3F	Jona Gold	0,00
4F	Granny Smith	0,00
5F	Granny Smith K.	0,00
6F	Zlatni delišes	0,00
7F	Crveni delišes	0,00
8F	Pink Lady	17,02
9F	Golden Delicious	0,00

Analiza koncentracije patulina u cijedenim uzorcima sokova od kruške i breskve, kao i voćnim kašicama, pokazuje značajne razlike u prisutnosti ovog mikotoksina. U uzorku breskve bez kore (1G) detektirano je 9,98 ppb patulina, dok u uzorku iste vrste voća s korom (2G) nije utvrđena prisutnost patulina (0,00 ppb). Ovi rezultati sugeriraju da uklanjanje kore može smanjiti rizik od prisutnosti patulina, no nije uvijek odlučujuće, što potvrđuju i HAPIH-ova izvješća o procjeni rizika, koja naglašavaju važnost cjelokupne kvalitete voća i uvjeta obrade.

U uzorcima kruške sorte "Williams", s korom i bez kore (3G i 4G), kao i voćnim kašicama od jabuke (5G) i kruške (7G), nisu otkriveni tragovi patulina (0,00 ppb). Ovi rezultati su u skladu s propisima Europske unije, prema kojima maksimalno dopuštena koncentracija patulina u voćnim sokovima iznosi 50 ppb. To potvrđuje da su ovi proizvodi sigurni za konzumaciju i da je kvaliteta sirovine adekvatna.

Međutim, uzorak voćne kašice koja kombinira jabuku i krušku (6G) pokazao je koncentraciju patulina od 12,32 ppb, što, iako ispod zakonski dozvoljene granice, ipak ukazuje na prisutnost kontaminacije. Ovaj rezultat ukazuje na potrebu za dodatnim nadzorom i kontrolom kvalitete u proizvodnom procesu, posebno kada se koriste mješavine različitih vrsta voća, jer svaki dodatni faktor može povećati rizik od kontaminacije. Rezultati mjerenja patulina u raznim vrstama sokova i kašica prikazani su u tablici 4.7.

Tablica 4.7 Koncentracija patulina u cijedenim uzorcima sokova od kruške i breskve i voćnim kašicama (autor: Karlo Jantolek)

Naziv uzorka	Vrsta voća	Sorta	Sa korom	Kaša	Postotak (%) voća	Koncentracija patulina (ppb)
1G	Breskva	/	Ne	/	100	9,98
2G	Breskva	/	Da	/	100	0,00
3G	Kruška	Williams	Ne	/	100	0,00
4G	Kruška	Williams	Da	/	100	0,00
5G	Jabuka	/	/	Da	100	0,00
6G	Jabuka + Kruška	/	/	Da	50+50	12,32
7G	Kruška	/	/	Da	/	0,00

5. Zaključak

Zbog kontaminacije jabuka s plijesni *Penicillium expansum* dolazi do biosinteze patulina, što rezultira njegovim prisustvom u proizvodima od jabuka, najčešće u soku i kašicama. Jabuke su podložne kontaminaciji plijesnima do čega dolazi prilikom lošeg rukovanja gdje nagnječeni plod čini odličnu podlogu za rast.

Od 86 analiziranih uzoraka 33 su uzorka soka od jabuke konvencionalne proizvodnje te je u 49% uzoraka detektiran patulin, od čega je u dva uzorka detektirana koncentracija iznad maksimalno dozvoljene zakonske granice od 50 ppb propisane Uredbom Komisije (EU) br. 915/2023. Dva uzorka pokazala su koncentraciju od 48,71 ppb što je vrlo blizu maksimalno dozvoljene granice, dok ostali uzorci imaju niže koncentracije. U uzorcima sokova od kruške patulin nije detektiran, u sokovima naranče 18% uzoraka pokazalo je prisutnost patulina, od čega dva uzorka sadrže koncentraciju od 27,58 ppb što je unutar propisane granice ali nije zanemarivo. Ekološki sokovi od jabuke i kruške nisu pokazali prisutnost patulina. U cijedenim sokovima od jabuke prisutnost patulina pokazao je jedan uzorak od njih 18 sa koncentracijom od 17,02 ppb, dok je u cijedenim sokovima od breskve i kruške prisutnost zabilježena samo u uzorku soka od breskve bez kore (9,98 ppb) što je unutar dozvoljene granice. U uzorcima voćnih kašica patulin je detektiran u kašici jabuke i kruške s koncentracijom od 12,32 ppb što je također unutar granica, dok u preostale dvije nije detektiran.

Zaključno, najveću prisutnost patulina možemo očekivati u sokovima i kašicama od jabuke na što upućuje i teorija, dok ćemo ga nešto rjeđe pronaći u sokovima od kruške, naranče i breskve. Većina uzoraka u kojima je detektiran patulin, sadržavali su koncentracije unutar propisanih zakonskih granica što upućuje na dobre proizvodne prakse i redovite kontrole ovog mikotoksina.

—
H I B O N
A L I S T R A I N O

Sveučilište Sjever

—
V A K C



—
M M I

S V E U Č I L I Š T E
S I E V E R
—

IZJAVA O AUTORSTVU

Završni/diplomski/specijalistički rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članaka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, Karlo Jantolek (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog/specijalističkog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom Odrativanje patuljica u voćnim sokovima iz Hrvatskog tržišta (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:
(upisati ime i prezime)

Karlo Jantolek

(vlastoručni potpis)

Sukladno članku 58., 59. i 61. Zakona o visokom obrazovanju i znanstvenoj djelatnosti završne/diplomske/specijalističke radove sveučilišta su dužna objaviti u roku od 30 dana od dana obrane na nacionalnom repozitoriju odnosno repozitoriju visokog učilišta.

Sukladno članku 111. Zakona o autorskom pravu i srodnim pravima student se ne može protiviti da se njegov završni rad stvoren na bilo kojem studiju na visokom učilištu učini dostupnim javnosti na odgovarajućoj javnoj mrežnoj bazi sveučilišne knjižnice, knjižnice sastavnice sveučilišta, knjižnice veleučilišta ili visoke škole i/ili na javnoj mrežnoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice, sukladno zakonu kojim se uređuje umjetnička djelatnost i visoko obrazovanje.

6. Literatura

- [1] R. Krska, J. L. Richard, R. Schaumacher, A. B. Slate i T. B. Whitaker, Guide to Mycotoxins, Leicestershire: Romer Labs, 2012.
- [2] B. Beretta, A. Gaiaschi, C. L. Galli i P. Restani, »Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation,« *Food Additives & Contaminants*, pp. 399-406, 2000.
- [3] I. Saleh i I. Goktepe, »The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin,« *Food and Chemical Toxicology*, pp. 301-311, 2019.
- [4] C. Wei, L. Yu, N. Qiao, J. Zhao, H. Zhang, F. T. Qixiao Zhai i W. Chen, »Progress in the distribution, toxicity, control, and detoxification of patulin,« *Toxicon*, pp. 83-93, Rujan 2020.
- [5] »EUR-Lex,« 25 Travanj 2023. [Mrežno]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915>. [Pokušaj pristupa 2 kolovoz 2024].
- [6] J. R. Crowther, The ELISA Guidebook, Totowa: Human Press Inc., 2001.
- [7] O. Puel, P. Galtier i I. P. Oswald, »Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin,« *Toxins*, pp. 613-631, 2010.
- [8] M. Palfi, N. Knežević, K. Vrandečić i J. Čosić, »Hrčak,« 2020. [Mrežno]. Available: <https://hrcak.srce.hr/file/349566>. [Pokušaj pristupa 2 Kolovoz 2024].
- [9] A. Rahmani, S. Jinap i F. Soleimany, »Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins,« *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp. 202-251, Lipanj 2009.
- [10] S. Tabata, K. Iida, J. Suzuki, K. Kimura, A. Ibe i K. Saito, »A Quantification and Confirmation Method of Patulin in Apple Juice by GC/MS,« *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, pp. 245-249, Listopad 2004.
- [11] R. Krska, P. Schubert-Ullrich, A. Molinelli, M. Sulyok, S. MacDonald i C. Crews, »Mycotoxin analysis: An update,« *Food Additives & Contaminants: Part A*, pp. 152-163, 20 Veljača 2008.

- [12] A. d. S. Sant'Ana, A. Rosenthal i P. R. d. Massaguer, »The fate of patulin in apple juice processing,« *Food Research International*, pp. 441-453, 2008.
- [13] D. F. Wessel, E. Coelho i M. A. Coimbra, »Pear Juice,« u *Handbook of Functional Beverages and Human Health*, Boca Raton, CRC PRes, 2016, pp. 475-488.
- [14] A. Marino, A. Nostro i C. Fiorentino, »Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in orange fruit and juice,« *International Journal of Food Microbiology*, pp. 185-189, Lipanj 2009.
- [15] G. Galaverna i C. Dall'Asta, »Production Processes of Orange Juice and Effects on Antioxidant Components,« u *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, Parma, University of Parma, 2014, pp. 203-213.
- [16] Y. Xiong, Y. Leng, X. Li, X. Huang i Y. Xiong, »Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples,« *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 2-15, Svibanj 2020.
- [17] H. Kuang, W. Wang, L. Xu, W. Ma, L. Liu, L. Wang i C. Xu, »Monoclonal Antibody-Based Sandwich ELISA for the Detection of Staphylococcal Enterotoxin A,« *International Journal of Environmental Research and Public Health*, pp. 1598-1608, Travanj 2013.
- [18] N. Paster i R. Barkai-Golan, *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, London: Elsevier Science, 2011.

7. Popis slika

Slika 2.1 Strukturna formula patulina [1]	4
Slika 2.2 Jabuka zaražena sa plijesni <i>Penicillium expansum</i> [8]	7
Slika 2.3 Dijagram toka proizvodnje soka od jabuke [12].....	8
Slika 2.4 Kruška zaražena sa plijesni <i>Penicillium expansum</i> Izvor: https://postharvest.ucdavis.edu/produce-facts-sheets/pear-bartlett	10
Slika 3.1 Uzorci sokova poredani prema postotku udjela voća (autor: Karlo Jantolek)	11
Slika 3.2 Mikrotitarska pločica obložena anti-patulin antitijelima (autor: Karlo Jantolek)	16
Slika 3.3 Centrifugiranje i dodatak 960 μ L 1x razrjeđivača uzorka i 40 μ L supernatanta (autor: Karlo Jantolek).....	17
Slika 3.4 Promjena boje nakon dodatka supstrata (autor: Karlo Jantolek)	18

8. Popis tablica

Tablica 2.1 Toksikogene gljive i mikotoksini koje proizvode [4]	2
Tablica 2.2 Najveće dopuštene količine patulina prema Uredbi (EU) 2023/915 [6]	6
Tablica 3.1 Uzorci konvencionalnih sokova od jabuke (autor: Karlo Jantolek)	12
Tablica 3.2 Uzorci konvencionalnih sokova od kruške (autor: Karlo Jantolek)	12
Tablica 3.3 Uzorci konvencionalnih sokova od naranče (autor: Karlo Jantolek)	13
Tablica 3.4 Uzorci ekoloških sokova od jabuke i kruške (autor: Karlo Jantolek)	14
Tablica 3.5 Uzorci cijedenih sokova od jabuke bez kore (autor: Karlo Jantolek)	14
Tablica 3.6 Uzorci cijedenih sokova od jabuke sa korom (autor: Karlo Jantolek)	14
Tablica 3.7 Uzorci cijedenih sokova od kruške i breskve sa korom i bez kore i kaša od jabuke i kruške (autor: Karlo Jantolek)	15
Tablica 4.1 Koncentracija patulina u konvencionalnim uzorcima sokova od jabuke (autor: Karlo Jantolek)	21
Tablica 4.2 Koncentracija patulina u konvencionalnim uzorcima sokova od kruške (autor: Karlo Jantolek)	23
Tablica 4.3 Koncentracija patulina u konvencionalnim uzorcima sokova od naranče (autor: Karlo Jantolek)	24
Tablica 4.4 Koncentracija patulina u ekološkim uzorcima sokova od jabuke i kruške (autor: Karlo Jantolek)	25
Tablica 4.5 Koncentracija patulina u cijedenim uzorcima sokova od jabuke bez kore (autor: Karlo Jantolek)	25
Tablica 4.6 Koncentracija patulina u cijedenim uzorcima sokova od jabuke sa korom (autor: Karlo Jantolek)	26
Tablica 4.7 Koncentracija patulina u cijedenim uzorcima sokova od kruške i breskve i voćnim kašicama (autor: Karlo Jantolek)	27

Prilozi

Završni rad - Karlo Jantolek.docx

ORIGINALITY REPORT

7 %	7 %	2 %	4 %
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	hrcak.srce.hr Internet Source	2 %
2	eur-lex.europa.eu Internet Source	1 %
3	repozitorij.unin.hr Internet Source	<1 %
4	urn.nsk.hr Internet Source	<1 %
5	zir.nsk.hr Internet Source	<1 %
6	repozitorij.unizg.hr Internet Source	<1 %
7	Submitted to University of Southern Queensland Student Paper	<1 %
8	dr.nsk.hr Internet Source	<1 %
9	www.fsa.gov.ba Internet Source	<1 %

10	Submitted to University North Student Paper	<1 %
11	Submitted to University of Banja Luka Student Paper	<1 %
12	abakus.inonu.edu.tr Internet Source	<1 %
13	Submitted to Zdravstveno veleučilište u Zagrebu / University of Applied Health Sciences Student Paper	<1 %
14	Submitted to Sveučilište Sjever- University North Student Paper	<1 %
15	www.researchgate.net Internet Source	<1 %
16	www.unirepository.svkri.uniri.hr Internet Source	<1 %
17	Submitted to University of Osijek - Faculty of Food Technology Student Paper	<1 %
18	happinessishomemade95.blogspot.com Internet Source	<1 %
19	repozitorij.svkst.unist.hr Internet Source	<1 %
20	www.ambalaza.hr	
	Internet Source	<1 %
21	www.cris.uns.ac.rs Internet Source	<1 %