

# Određivanje patulina u jabukama UHPLC-MS/MS metodom

---

Kukec, Valerija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:917865>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-04**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)





**Sveučilište  
Sjever**

**Završni rad br. 30/PREH/2022**

**Određivanje patulina u jabukama UHPLC-MS/MS  
metodom**

**Kukec Valerija, 0336038925**

Koprivnica, srpanj 2022. godine





# Sveučilište Sjever

**Odjel za Prehrambenu tehnologiju**

**Završni rad br. 30/PREH/2022**

## **Određivanje patulina u jabukama UHPLC-MS/MS metodom**

### **Student**

Kukec Valerija, 0336038925

### **Mentor**

izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj

Koprivnica, srpanj 2022. godine



# Prijava završnog rada

## Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL Odjel za prehrambenu tehnologiju

STUDIJ preddiplomski stručni studij Prehrambena tehnologija

PRISTUPNIK Kukec Valerija

MATIČNI BROJ

DATUM 01.09.2022.

KOLEGIJ Prehrambena mikrobiologija

NASLOV RADA Određivanje patulina u jabukama UHPLC-MS/MS metodom

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Determination of patulin in apples by UHPLC-MS/MS method

MENTOR dr.sc. Bojan Šarkanj

ZVANJE izv. prof.

ČLANOVI POVJERENSTVA

1. izv. prof. dr. sc. Natalija Uršulin-Trstenjak - predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Dodlek Šarkanj - član
3. izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj - mentor
4. dr.sc. Marija Kovač, pred.- zamjenski član
- 5.

## Zadatak završnog rada

BROJ 30/PREH/2022

OPIS

U završnom radu ispitat će se pojavnost i koncentracije patulina u komercijalnim i tradicionalnim vrstama jabuke pomoću validirane UHLC-MS/MS metode. Nakon mjerenja napraviti će se statistička analiza da se usporedi postoji li statistički značajna razlika u distribuciji patulina između ta dva tipa jabuka.

ZADATAK URUČEN 1.9.2022.

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE  
SIEVER



## **Predgovor**

Jabuke su voće koje je najčešće kultivirano u Europi, a poznato je više od 7000 sorti. Razlikujemo tradicionalne i komercijalne sorte jabuka, a svaka od njih razlikuje se po okusu, slatkoći, boji i kemijskom sastavu. Obzirom da su jabuke nutritivno vrlo bogate i imaju visok sadržaj vode, sklone su kvarenju koje je uglavnom posljedica infekcije neke plijesni. *Penicillium expansum* najčešći patogen u jabukama koji proizvodi mikotoksin patulin.

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Mogućnost iskorištavanja tradicionalnih sorti jabuka za proizvodnju jabuka i soka od jabuka sa smanjenim udjelom patulina“ (UIP-2020-02-8461).

## Sažetak

Jabuke su često nazivane kraljicom voća zbog svog nutritivnog sastava. Dominiraju vitaminima, mineralima te polifenolima. Imaju visok sadržaj vode zbog čega, usred nepravilnog rukovanja prilikom branja i tijekom skladištenja, često podlegnu infekciji sa plijesni *Penicillium expansum*. Ova plijesan osim što uništava tkivo jabuke, proizvodi patulin koji toksično djeluje na stanice biljaka i životinja. Biosinteza patulina ovisi o mnogo uvjeta, temperaturi, pH, aktivitetu vode itd. Postoje mnoge metode za određivanje mikotoksina, no za detekciju patulina najboljima su se pokazale analitičke kromatografske metode. Cilj ovog rada bio je odrediti koncentraciju patulina u tradicionalnim i komercijalnim sortama jabuka nakon berbe. Koncentracija patulina mjerena je pomoću validirane UHPLC-MS/MS metode.

Ključne riječi: Jabuke, patulin, LC-MS/MS

## Summary

Apples are often called the queen of fruits because of their nutritional composition. They dominate with vitamins, minerals and polyphenols. They have a high water content, due to which, due to improper handling during picking and storage, they often succumb to infection with the mold *Penicillium expansum*. Besides destroying the apple tissue, this mold produces patulin, which has a toxic effect on plant and animal cells. The biosynthesis of patulin depends on many factors, temperature, pH, water activity, etc. There are many methods for determining mycotoxins, but analytical chromatographic methods have proven to be the best for patulin detection. The aim of this work was to determine the concentration of patulin in traditional and commercial apple varieties after harvest. Patulin concentration was measured using a validated UHPLC-MS/MS method.

Key words: Apples, patulin, LC-MS/MS



## Popis korištenih kratica

<b>aw</b>	Aktivitet vode, <i>eng. acitivity of water</i>
<b>CoA</b>	Koenzim A
<b>Cps</b>	Broj po sekundi, <i>eng. counts per second</i>
<b>DAD</b>	Detektor s nizom dioda
<b>DEF</b>	Ekvivalent prehrambenih folata
<b>DNA</b>	Deoksiribonukleinska kiselina
<b>Dw</b>	Suha masa, <i>eng. dry weight</i>
<b>HPLC</b>	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, <i>eng. High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>IARC</b>	Međunarodna agencija za istraživanje raka, <i>eng. International Agency for Research of Cancer</i>
<b>IU</b>	Međunarodna jedinica
<b>LD50</b>	Letalna doza, doza toksične supstance koja ubija 50% testne populacije
<b>LOD</b>	Granica detekcije, <i>eng. Limit Of Detection</i>
<b>MS</b>	Masena spektrometrija
<b>6MSA</b>	6-metilsalicilna kiselina
<b>RNA</b>	Ribonukleinska kiselina
<b>TLC</b>	Tankoslojna kromatografija, <i>eng. Thin Layer Chromatography</i>
<b>UHPLC</b>	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti, <i>eng. Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>
<b>UHPLC/MS-MS</b>	Tekućinska kromatografija ultravisoke učinkovitosti – tandem masena spektrometrija
<b>UPLC</b>	Tekućinska kromatografija ultravisoke učinkovitosti
<b>UV</b>	Ultraljubičasto zračenje

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Voće jabuka <i>Malus domestica</i> .....	3
2.1.1. Bioaktivni spojevi.....	5
2.2. <i>Penicillium expansum</i> .....	7
2.2.1. Patulin.....	8
2.2.1.1. Toksičnost patulina.....	9
2.2.1.2. Biosinteza patulina .....	11
2.2.1.3. Utjecaj temperature .....	13
2.2.1.4. Utjecaj aktiviteta vode .....	14
2.2.1.5. Utjecaj pH.....	14
2.2.2. Preventivne mjere za suzbijanje patulina .....	15
2.3. Patulin u proizvodima od jabuka.....	16
2.3.1. Metode određivanja patulina .....	18
2.4. UHPLC-MS/MS .....	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	22
3.1. Materijali i metode .....	22
3.1.1. Kemikalije: .....	22
3.1.2. Biljni materijali – jabuke.....	22
3.1.3 Priprema uzoraka za određivanje patulina .....	22
3.1.4. Određivanje patulina UHPLC-MS/MS metodom .....	22
3.1.5. Statistička analiza .....	23
4. Rezultati.....	24
4.1. Analiza patulina u uzorcima jabuka .....	24

5. Zaključak .....	28
6. Literatura .....	29
7. Popis slika i tablica.....	31

# 1. Uvod

Jabuke su najčešće kultivirano voće u Europi. Plodovi jabuke su okrugli, jezgričavi, uglavnom veći od 5 centimetara, koji mogu biti zelene, žute ili crvenkaste boje, a prosječna masa im je od 150 do 160 g. Poznato je više od 7000 različitih sorti jabuka koje se razlikuju po okusu, slatkoći, kiselosti, boji, konzistenciji i sočnosti. Jabuka je često nazivana kraljicom voća zbog svog bogatog nutritivnog sastava, za koji su najzaslužniji polifenoli. Od vitamina sadrži vitamin A, B1, B2, B6, vitamin C i E, a od minerala kalij, kalcij, željezo i cink. U sastavu jabuka, najviši udio čini voda, nakon koje slijede ugljikohidrati, proteini, masti te vitamini. Razlikujemo tradicionalne i konvencionalne sorte jabuka. Glavni predstavnici konvencionalnih sorta jabuka su „Idared“, „Jonagold“, „Zlatni Deliše“, „Crveni Deliše“, „Granny Smith“ i „Mutsu“. U tradicionalne sorte spadaju „Amovka“, „Srčika“, „Petrovnjača“, „Adamovka“ i druge.

Jabuke su sklone različitim bolestima nakon berbe i tijekom skladištenja. Zbog velikog sadržaja vode, ali i šećera, plodovi jabuka uslijed dugog i/ili nepravilnog skladištenja često znaju biti napadnuti raznim mikroorganizmima, poput plijesni. Najčešći patogen koji uzrokuje kvarenje jabuke je plijesan *Penicilium expansum*, koja uzrokuje propadanje tkiva jabuke. *Penicilium expansum* proizvodi brojne sekundarne metabolite, a najznačajniji od njih je patulin. Patulin je relativno ne kompleksni lakton, uglavnom proizveden od rodova *Penicilium*, *Aspergillus*, *Paecylomyces* i *Bysoclamys* [1]. Preživljava pasterizaciju, vrlo je termostabilan pa ga nije moguće u potpunosti ukloniti prilikom fermentacije tijekom proizvodnje cidera. Ovaj mikotoksin ima snažan afinitet za sulfhidrilne skupine koje inhibiraju mnoge enzime sisavaca te je stoga iznimno toksičan za biljne i životinjske stanice. Posjeduje inhibitorni učinak za nekoliko biokemijskih parametara, poput aktivnosti ATP-aze i alkalne fosfataze. Put biosinteze patulina sastoji se od 10 koraka, a prvi korak je stvaranje 6-metil salicilne kiseline (6MSA) kondenzacijom jedne acetyl-CoA i tri malonil-CoA jedinice. Biosinteza patulina ovisi o brojnim faktorima, poput temperature, aktiviteta vode, pH i količine hranjivog dušika. Obzirom na toksičnost patulina, zakonskom regulativom određena je njegova maksimalna dopuštena koncentracija u određenim prehrambenim proizvodima.

Kako bi se spriječila kontaminacija prehrambenih proizvoda patulinom i smanjivala njegova koncentracija u njima, potrebno je provoditi preventivne mjere za suzbijanje patulina. One uključuju pravilno provođenje berbe plodova voća i pranje voća vodom pod visokim pritiskom te uklanjanje pokvarenog voća prije skladištenja, kako bismo moguću kontaminaciju sveli na

što manji nivo. Sa voćem se treba pravilno, sigurno i ne pregrubo rukovati kako ne bi uzrokovali mehanička oštećenja ploda koja dovode do bržeg kvarenja i kontaminacije sa plijesni.

Na sadržaj patulina u proizvodima od jabuka ponajprije utječe sorta jabuke i kvaliteta plodova koji se koriste za preradu. Prisutnost čimbenika koji smanjuju stabilnost patulina i analitičke metode koje se koriste za detekciju patulina igraju veliku ulogu u konačnim rezultatima koji ukazuju na sadržaj patulina prisutnog u određenom uzorku.

Danas postoje brojne osjetljive, točne analitičke metode koje se temelje na kromatografskim ili imunokemijskim tehnikama za detekciju mikotoksina u poljoprivrednim i prehrambenim proizvodima. Analitičke metode zahtijevaju: uzorkovanje, ekstrakciju mikotoksina iz matrice odgovarajućim ekstrakcijskim otapalom, čišćenje kako bi se eliminirale nečistoće iz ekstrakta i određivanje toksina odabranom metodom. Za analizu patulina u hrani najpogodnijima su se pokazale kromatografske analitičke metode: tankoslojna kromatografija (*eng. Thin Layer Chromatography, TLC*), plinska kromatografija (*eng. Gas Chromatography, GC*), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*eng. High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) i tekućinska kromatografija/tandem masena spektrometrija (*eng. Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS*).

Sustav tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti- tandem masena spektrometrija (UHPLC/MS-MS) vrsta je kromatografije kod koje se komponente odjeljuju na temelju omjera mase i naboja.

Cilj ovog rada bio je odrediti sadržaj patulina u komercijalnim i tradicionalnim sortama jabuka pomoću UHPLC-MS/MS metode te utvrditi postoji li značajna razlika pojavnosti patulina u komercijalnim i tradicionalnim sortama jabuka.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Voće jabuka *Malus domestica*

Najčešće kultivirano stablo koje je od pretpovijesnog doba raslo kao divlje u Europi je stablo jabuke. Prvotno je uzgajana u istočnoj Turskoj i na Kavkazu, odakle se proširila prema Europi. Jabuka je listopadno stablo koje spada u porodicu ruža (*Rosaceae*). Može narasti do 12 metara visine tvoreći gustu, razgranatu krošnju. Deblo može biti promjera do 1 metar, a kora mu je tamnosiva i ispucana te se može ljuštiti u tankim ili širokim ljuskama. Njeni plodovi su okrugli, jezgričavi, uglavnom veći od 5 centimetara, koji mogu biti zelene, žute ili crvenkaste boje. Plod sadrži desetak sjemenki koje su jajasto izdužene, duge oko 7 mm. Plod može dosegnuti masu i do 800 g, no prosječna težina plodova kreće se od 150 do 160 g. Međusobno se razlikuju po obliku, boji, vremenu sazrijevanja, nutritivnom sastavu itd. Dozrijeva ljeti ili u ranu jesen, a cvate u svibnju i lipnju, kada se otvaraju njeni crvenkasti pupoljci. U vrijeme cvatnje, stabla jabuka su prepuna raskošnog cvata. Njihove cvjetove oprašuju pčele, a kako bi urod bio uspješan dovoljno je da samo 5% oplodjenih cvjetova urodi plodom. Botanički, jabuka ne spada u voće, nego u tzv. „nepravi plod“. Ne razvija se iz oplodjene plodnice, nego od cvjetišta koje je zadebljalo oko plodnice i okružilo je te tako stvorilo plod [1].

Za uzgoj jabuke u kontinentalnoj Hrvatskoj najpovoljnijom se smatra južna strana, a najmanje povoljna jugozapadna strana [2]. Što se tiče terena, najprikladniji je onaj s blagim nagibom. Stabla jabuka vole ilovasta tla bogata humusom. Koriijen jabuke je, kao i kod ostalih biljaka, zadužen za pričvršćenje biljke za tlo te opskrbu hranjivim tvarima i vodom, dok je deblo zaduženo za provođenje i skladištenje istih. Za uspješan uzgoj jabuke važna je jednakomjerna vlažnost tla te što veća vlažnost u zraku. Obzirom da je jabuka stranooplodna potrebno ju je posaditi u bizini najmanje dvije različite sorte, nikako samostalno [2].

Jabuka je biljka duge povijesti koja se oduvijek smatrala simbolom zdravlja, plodnosti, ali i grijeha, pošto se u Bibliji prikazivala kao zabranjeno voće. U narodu je često nazivana i kraljicom voća zbog svog bogatog nutritivnog sastava. Od vitamina sadrži vitamine A, B1, B2, B6, vitamin C i E, a od mineralnih tvari dominiraju kalij, kalcij, željezo i cink u sastavu. Također, sadrži dijetalna vlakna, antioksidanse, polifenole i organske kiseline. Kemijski sastav jabuke pokazuje da najveći dio ploda čini čista voda. Nakon nje slijede ugljikohidrati, a ima i neznatno proteina te masti, dok su vitamini, iako u niskim koncentracijama značajni u njenom kemijskom sastavu (Tablica 1). Jabuke su voće bogato vodom te ih je stoga potrebno pravilno

skladištiti kako bi očuvali njihovu kvalitetu i trajnost te spriječili moguće mikrobiološko kvarenje. Potrebno je održavati nisku temperaturu u skladišnom prostoru, a moguće ih je skladištiti u kontroliranoj ili modificiranoj atmosferi [2].

Tablica 1. Prikaz nutritivne vrijednosti plodova jabuka na 100 g jestivih dijelova (izvor podataka: USDA, 2016.,)

<b>HRANJIVE TVARI</b>	<b>MJERNA JEDINICA</b>	<b>KOLIČINA</b>	<b>HRANJIVE TVARI</b>	<b>MJERNA JEDINICA</b>	<b>KOLIČINA</b>
<b>Voda</b>	g	85,56	Askorbinska kiselina	mg	4,6
<b>Energija</b>	kcal	52,00	Tiamin	mg	0,017
<b>Bjelančevine</b>	g	0,26	Riboflavin	mg	0,026
<b>Ugljikohidrati</b>	g	13,81	Niacin	mg	0,091
<b>Dijetalna vlakna</b>	g	2,4	Vitamin B6	mg	0,041
<b>Ukupni šećeri</b>	g	10,39	Folat , DEF*	µg	3,0
<b>Kalcij</b>	mg	6,0	Vitamin A RAE*	µg	3,0
<b>Željezo</b>	mg	0,12	Vitamin A IU*	IU	54,00
<b>Magnezij</b>	mg	5,0	Vitamin E	mg	0,18
<b>Fosfor</b>	mg	11,0	Vitamin K	µg	2,2
<b>Kalij</b>	mg	107,00	Ukupni lipidi	g	0,17
<b>Natrij</b>	mg	1,0	Zasićene masne kiseline	g	0,28
<b>Cink</b>	mg	0,04	Monozasićene masne kiseline	g	0,007

\*DEF- ekvivalent prehrambenih folata; \*RAE- ekvivalenti aktivnosti retinola \*IU- međunarodna jedinica

Jabuke su voće rasprostranjeno po cijelom svijetu, pa tako razlikujemo preko 7000 različitih sorti. Sorte jabuka koje danas poznajemo potječu od vrste *Malus pumila* koja je podrijetlom iz jugozapadne Azije. Količina različitih sorti jabuka koja se može naći na europskom tržištu reducirana je na do 12 različitih sorti iz razloga što bi sadnja samo i malog broja sorti mogla ugroziti biološku raznolikost te dovesti do pojave raznih epidemija. . Razlikujemo tradicionalne

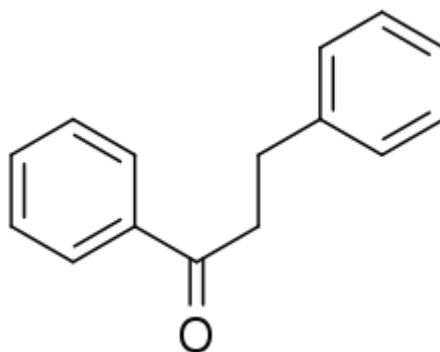
i konvencionalne sorte jabuka. Neke od najpoznatijih konvencionalnih sorti su „Idared“, „Jonagold“, „Zlatni Deliše“, „Crveni Deliše“, „Granny Smith“ i „Mutsu“. U tradicionalne sorte ubrajamo: „Amovku“, „Srčiku“, „Petrovnjaču“, „Adamovku“ i druge. Tradicionalne sorte jabuka pokazuju dobru prilagodljivost lokalnoj sredini te su vrijedan izvor za genetičku varijabilnost roda, a neke od njih otporne su na štetnike i sušu. . Većina sorti otporna je na zimu i dominira jedinstvenom kvalitetom plodova. Konvencionalne jabuke dominiraju tržištem zbog svojih pomoloških karakteristika koje ih svrstavaju u prvoklasne jabuke. S druge strane, tradicionalne jabuke svojom težinom, oblikom i izgledom ne udovoljavaju tržišnim standardima zbog čega nisu zastupljene na globalnim tržištima.

### **2.1.1. Bioaktivni spojevi**

Bioaktivni spojevi, kojih je do sada identificirano preko 5000, važne su molekule koje sudjeluju u brojnim enzimskim i kemijskim reakcijama. Esencijalni ili bioaktivni spojevi u jabukama uključuju makronutrijente, vitamine, minerale, flavanole, hidroksicimetnu kiselinu, flavonole i druge. Nutrijenti, poput makronutrijenata (npr. saharoza), organske kiseline (npr. jabučna kiselina), vitamini i minerali, nisu isključivo zaduženi za opskrbu organizma energijom, već sudjeluju u brojnim metaboličkim procesima, u rastu organizma i jačanju imunološkog sustava. Primjerice, jabučna kiselina pomaže jetri kod probave u tijelu čovjeka. S druge strane, mnogi bioaktivni spojevi imaju veliku ulogu u senzornim karakteristikama ploda. Tako koncentracija i raspodjela šećera, uglavnom fruktoze i saharoze, u kombinaciji s organskim kiselinama utječe na okus voća i privlačnost arome. Nadalje, u plodu jabuke također nalazimo i vlakna, koja su zastupljena 2 do 3%, od kojih više od polovice čine netopiva vlakna. Pektin, pripadnik skupini topivih vlakna, dobro je poznat po svojim dijetalnim svojstvima i mogućnosti formiranja gela u kiselim uvjetima. Od vitamina, u jabukama dominiraju vitamin A, vitamini B1, B2, B6 i vitamin C i E. Vitamini C i E doprinose ukupnom antioksidacijskom potencijalu donirajući pojedinačne vodikove ekvivalente slobodnim radikalima kako bi oni postali stabilni i detoksicirali se. Sadržaj vitamina u jabukama može biti uvjetovan raznim faktorima, poput klimatskih uvjeta prije berbe, zrelosti, metode branja te načina postupanja sa plodovima nakon branja. Od minerala prisutnih u jabukama najznačajniji su fosfor i kalcij. Kalcij, osim što utječe na zdravlje kostiju, pomaže u stvaranju čvrstoće voća i štiti stanice ploda od infekcije. Uz kalcij i fosfor, u jabukama je prisutan i cink, mineral u tragovima koji je kofaktor u brojnim metaboličkim procesima kataliziranim enzimima, a također utječe na normalan rasti i razvoj te rad imunološkog sustava.



Uz sve navedene bioaktivne spojevi, oni zbog kojih jabuke imaju veliku nutritivnu vrijednost su dakako polifenoli. Oni spadaju u sekundarne biljne metabolite, koji prvenstveno imaju ulogu zaštititi biljku od patogena i UV-zračenja. Razlikujemo monomere, molekule koje se direktno apsorbiraju iz hrane, i polimere, koji se prvotno razgrađuju u probavnom traktu. Polifenoli su poznati po antikancerogenim svojstvima te prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Također, dokazan je inhibitorni učinak polifenola na *Helicobacter pylori* te toksičnosti stafilokoka enterotoksina A [3]. Do danas je poznato nešto više od 8000 polifenolnih struktura, od kojih su u jabukama zabilježeni flavanoli, hidroksicimetna kiselina, flavonoli, dihidrohalkoni i antocijani. Monomerni flavonoli (npr. katehin i epikatehin) i oligomerni proantocijanidini (npr. procijanidini A i B) su flavonoidni polifenoli sa C6-C3-C6 strukturom i imaju hidroksiliran heterociklički prsten [4]. Što se tiče fenolnih kiselina, one su u jabukama prisutne u obliku hidroksicimetne kiseline i nisko zastupljene hidroksibenzojeve kiseline (npr. gentizinska i siringična kiselina). Nadalje, dihidrohalkoni u svojoj strukturi sadrže C6-C3-C6 okosnicu bicikličkog flavonoida, no bez heterocikličkog C- prstena i  $\alpha$ - $\beta$  dvostruke veze (Slika 1).



Slika 1 Strukturna formula hidrohalkona

Struktura antocijana sastoji se od jezgre antocijanidina vezane na nekoliko glikozidnih jedinica na C3, C5 ili C7 atomima. Antocijani pripadaju derivatima 2-fenilbenzopirilijevih soli s mnogo vezanih hidroksil i metoksi skupina. Obzirom na navedeni biokemijski sastav, možemo reći kako su jabuke bogat izvor antioksidansa i fenolnih spojeva. Valja napomenuti kako se sadržaj navedenih spojeva razlikuje u kori i mesu jabuke. Tako su, primjerice, klorogenska kiselina i njeni izomeri prisutni u mesu, a flavan-3-oli i flavanoli u kori jabuke [5].

## 2.2. *Penicillium expansum*

Obzirom na bogat nutritivni sastav i sadržaj polifenola, jabuke su jedno od najpopularnijih vrsta voća kojeg se godišnje proizvede preko 70 milijuna tona na svjetskoj

razini [6]. Kao i drugo voće i povrće, jabuke su sklone različitim bolestima nakon berbe i tijekom skladištenja. Zbog velikog sadržaja vode, ali i šećera, plodovi jabuka uslijed dugog i/ili nepravilnog skladištenja često znaju biti napadnute raznim mikroorganizmima. Najčešći patogen koji uzrokuje kvarenje jabuke je plijesan *Penicilium expansum*. Ova plijesan može inficirati pokožicu ploda jabuke dok je on još u voćnjaku te tako nastavlja rasti i proizvoditi svoje sekundarne metabolite tijekom skladištenja. Zaraze jabuka ovom plijesni najčešće su uzrokovane oštećenjem plodova te mehaničkim oštećenjima prilikom transporta i rukovanja voćem. Zarazi pridonose i insekti, ptice, rani mraz, prevelike vrućine te nepovoljni vremenski uvjeti neposredno prije berbe plodova. *Penicilium expansum* uzrokuje propadanje tkiva jabuke koje je okarakterizirano mekom, vodenastom truleži svijetlosmeđe boje praćeno pojavom plavozelenih konidija na površini ploda koja se razvija u uznapredovalim stadijima ove bolesti (Slika 2.) [7].



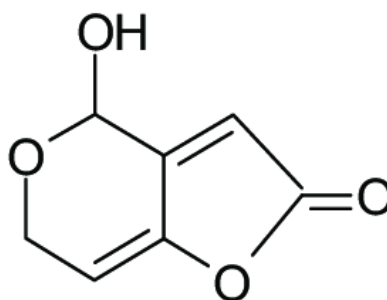
Slika 2 Jabuka zaražena sa plijesni *Penicillium expansum* [7]

Većina nekrotrofnih gljivičnih patogena koristi arsenal od enzima koji degradiraju staničnu stjenku kako bi pomoću njega kolonizirali svoje domaćine. Iako su ti enzimi često suvišni, kod *Penicilium expansum* upravo su poligalakturonaze identificirane kao važni enzimi o kojima ovisi virulencija ove plijesni. Rezultati *in vitro* studija [7] pokazali su kako pektin kao izvor ugljika dovodi do maksimalne aktivnosti poligalakturonaze te je utvrđeno da postoji inverzna korelacija između izlučivanja poligalakturonaza i rasta plijesni. Poznato je kako brojni biljni patogeni mijenjaju pH domaćina što ima za posljedicu pojačanu virulenciju. Tako *Penicilium expansum* mijenja pH u jabuci na način da ga snižava, odnosno zakiseljuje tkivo proizvodeći glukonsku, fumarnu i limunsku kiselinu. Proces proizvodnje navedenih kiselina posredovan je konzerviranim transkripcijskim faktorom, PacC, koji je uključen u pH regulaciju kod mnogih gljiva [7]. U alkalnim uvjetima *pacC* je pojačano reugliran s maksimalnom ekspresijom pri pH

9, a cijepa se kako bi postao aktivan pri pH 5. Bitan je za rast, virulentnost i konidizaciju. LaeA je također jedan od faktora virulencije i regulator je sekundarnog metabolizma. U istraživanju iz 2016. [7] znanstveno je dokazano kako je LaeA pozitivan regulator patulina jer su izmjerene smanjene količine mikotoksina u uzorcima jabuka koji su bili nacijepljeni sojevima sa ovim regulatorom. Nadalje, CreA (element odgovoran za ugljik) još je jedan u nizu od visoko očuvanih transkripcijskih faktora te je jedan od glavnih čimbenika virulencije kod *P. expansum*. Ovaj faktor regulira represiju katabolita ugljika u filamentoznim gljivama. Genom *P. expansum* također sadrži i LysM proteine, koji služe za zaštitu plijesni od enzima domaćina i sprječavanje aktivacije imuniteta pokrenutog uzorkom na način da uklanjaju fragmente hitina čime se onemogućava prepoznavanje infekcije od strane domaćina.

### 2.2.1. Patulin

*Penicilium expansum* proizvodi brojne sekundarne metabolite, od kojih se mnogi smatraju mikotoksinima. Neki od njih su kateglobuzin, citrinin, komunezin, patulin i drugi. Patulin je relativno nekompleksni lakton, uglavnom proizveden od rodova *Penicilium*, *Aspergillus*, *Paecylomyces* i *Bysoclamys* [8]. Stabilan je u vodenom mediju na temperaturama između 105 i 125°C u pH rasponu od 3,5 do 5,5 dok se spontanoj razgradnji podvrgava pri alkalnijem pH. Oko 50% patulina razgrađuje se unutar 1 h pri temperaturi od 100°C u vodenom mediju pri pH 6, dok sulfiti pospješuju njegovu razgradnju nakon izlaganja na pH 7 već pri 25°C tijekom 3 sata dodavanjem 50 ppm sumporovog dioksida [9]. Može se izolirati u obliku bezbojnih do bijelih kristala. Točka tališta mu je na oko 110°C, a sublimira u visokom vakuumu na 70 do 80°C.



Slika 3 Strukturna formula patulina

Problematičan je za prerađene voćne proizvode jer preživljava pasterizaciju, vrlo je termostabilan spoj pa ga nije moguće u potpunosti ukloniti prilikom fermentacije tijekom proizvodnje *cidera*. Ovaj  $\beta$ -nezasićeni heterociklički lakton prvotno je bio proučavan i procijenjen kao potencijalni antibiotik, no daljnje studije i analize definirale su ga kao

mikotoksin zbog dokazanih hepatoksičnih, genotoksičnih i imunotoksičnih karakteristika. Iz patulin-producirajućih sojeva, *P. patulum* i *P. urticae* izoliran je gen koji kodira 6-metilsalicilna kiselina sintazu i poliketid sintazu koja sudjeluje u biosintezi patulina. Patulin ima snažan afinitet za sulfhidrilne skupine koje inhibiraju mnoge enzime sisavaca. Sulfhidrilne skupine, glavne matrice u kojima se patulin nalazi u voću, posebice glutaciona, reagiraju s patulinom što dovodi do njegove inaktivacije. S druge strane, to dovodi i do smanjenja koncentracije glutaciona, što za posljedicu ima promjenu stanične redoks homeostaze te voće tako postaje osjetljivije i izloženije oksidaciji [9].

#### **2.2.1.1. Toksičnost patulina**

Kao što je i prethodno navedeno, patulin je iznimno toksičan za biljne i životinjske stanice jer može reagirati sa terminalnim sulfhidrilnim grupama proteina i polipeptida prisutnih u hrani. Lee i Rosenthaler u svojem su istraživanju (1986.g.) utvrdili kako patulin ima mogućnost inhibicije sinteze proteina i RNA te da stvara trajne prekide u jednostrukim i dvostrukim lancima DNA *Escherichie coli* [10]. Posjeduje inhibitorni učinak za nekoliko biokemijskih parametara, poput aktivnosti ATP-aze, alkalne fosfataze, aldolaze i heksokinaze. U istraživanjima vezanim uz akutnu toksičnost patulina, Mckinley i suradnici (1982.g.) utvrdili su da se oralni LD50 patulina u glodavaca kreće između 29 i 55 mg/kg tjelesne težine, a ukoliko se primjenjuje intravenozno, intraperitonealno ili supkutano, patulin je čak 3-5 puta toksičniji, zbog preskakanja efekta prvog prolaza u metabolizmu jetre [10]. U slučaju akutne izloženosti patulinu, može doći do gastrointestinalnih problema koji uključuju mučninu, povraćanje, čireve, crijevno krvarenje te rane na dvanaesniku. Štoviše, kako se crijevna barijera sastoji od sluzi i mikrobiote, kronična izloženost mikotoksinu može dovesti do značajnih promjena u sastavu crijevne mikroflore, što ostavlja negativne posljedice na zdravlje domaćina. Osim uz gastrointestinalne, ovaj toksin je povezan i uz štetne neurološke i imunološke učinke, a dovodi do oštećenja brojnih organa, poput jetre i bubrega. Što se tiče genotoksičnosti, testovi provedeni na stanicama sisavaca dali su pozitivne rezultate, no oni na bakterijama bili su negativni. Ipak, neke studije pokazale su da patulin slabi sintezu DNA pa je Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) zaključila na temelju dostupnih i provedenih studija da je patulin i genotoksičan. Nadalje, patulin je svrstan u grupu 3 prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC), što ga klasificira kao nekancerogenog za ljude [10].

## **Zakonska regulativa**

Patulin spada u mikotoksine čija koncentracija u hrani je zakonski regulirana u mnogim zemljama. Na području Europske Unije, patulin je zakonski reguliran Slijedećim uredbama:

- Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. , ovom Uredbom utvrđuje se najveća dopuštena količina određenih kontaminanata u hrani
- Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006. od 23. veljače 2006., ovom Uredbom utvrđuju se metode uzorkovanja i analiza za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani

Uredbom 1881/2006 propisane su najveće dopuštene koncentracije patulina u određenim prehrambenim proizvodima. Tablica 2. prikazuje neke od prehrambenih proizvoda i propisanu koncentraciju patulina u njima.

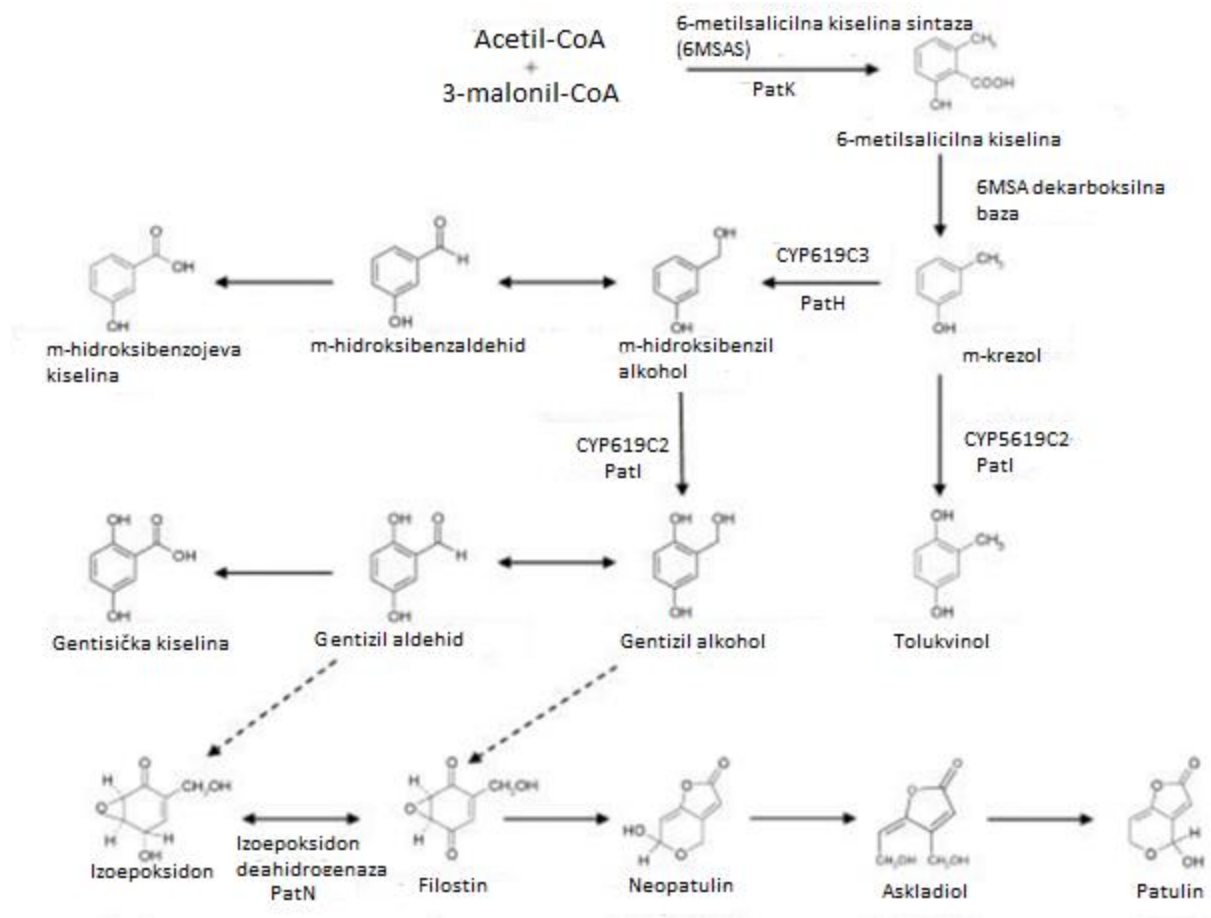
*Tablica 2 Najveće dopuštene koncentracije patulina u navedenim prehrambenim proizvodima [2]*

<b>Patulin</b>	<b>Najveće dopuštene količine (µg/kg)</b>
Voćni sokovi, rekonstituirani voćni sokovi i voćni nektar	50
Alkoholna pića, jabukovača i druga fermentirana pića dobivena od jabuka ili koja sadrže jabučni sok	50
Jabučni proizvodi u krutom stanju, uključujući jabučni kompot i jabučni pire, za izravnu prehranu ljudi	25
Jabučni sok i jabučni proizvodi u krutom stanju, uključujući jabučni kompot i jabučni pire, za dojenčad i malu djecu, označeni i stavljeni na tržište kao takvi	10,0
Dječja hrana, osim prerađene hrane na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu	10,0

### **2.2.1.2. Biosinteza patulina**

Patulin pripada skupini poliketidnih metabolita, poput nekih drugih poznatih mikotoksina (npr. aflatoksini, ohratoksini). Studije istraživanja biosinteze patulina važne su za područje biokemije iz više razloga. Prvo, istraživanje biosinteze patulina znanstvenika Bircha dovelo je do otkrića poliketida, a drugi od razloga je što je prvi proučavani enzim u *in vitro*

uvijetima isti enzim koji je uključen u prvi korak biosinteze patulina [10]. Put biosinteze patulina sastoji se od 10 koraka koji su prikazani na slici 4.



Slika 4 Shema puta biosinteze patulina [10]

Dakle, prvi korak u sintezi proteina je stvaranje 6-metil salicilne kiseline (6MSA) kondenzacijom jedne acetil-CoA i tri malonil-CoA jedinice. U ovom procesu sudjeluje jedan multifunkcionalni enzim koji ima ulogu acetil i malonil transferaze, ketoacil sintaze, ketoreduktaze i dehidrataze. Dokazano je kako se radioaktivna 6MSA može konvertirati u patulin, a kasnije studije koje su koristile radioaktivne  $^{14}\text{C}$  i  $^3\text{H}$  izotope te  $^{13}\text{C}$  i  $^2\text{H}$  stabilne izotope pokazale su da se 6MSA tada ekstenzivno modificira u patulin. Prvo se 6MSA modificira u m-krezol pomoću enzima 6MSA- dekarboksilaze. Nakon što se metilna skupina m-krezola modificira u aldehidnu, slijedi hidroksilacija, tj. stvaranje gentisaldehyda. Kako bi došlo do mehanizma nastanka strukture patulina, gentisaldehydu su potrebni jedni od dvaju enzima, monooksigenaza ili dioksigenaza. Izoepoksidon, neopatulin, filostin i askladiol su post-aromatski prekursori identificirani iz nekoliko mutanata *P.griseofulvuma* koji bi mogli biti dokaz da nakon sinteze gentisaldehyda slijedi epoksidacija. Prava priroda epoksidacije je nepoznata jer postoje nesuglasice oko toga što je supstrat reakcije, gentizilolni alkohol ili

gentisaldehyd. Mnogo enzima uključeno je u biosintezu patulina, a njih 5 je djelomično ili potpuno pročišćeno: 6MSA-sintaza, 6MSA-dekarboksilaza, m-hidroksibenzil alkohol dehidrogenaza, izoepoksidon dehidrogenaza (IDH) i neopatulin sintaza [10].

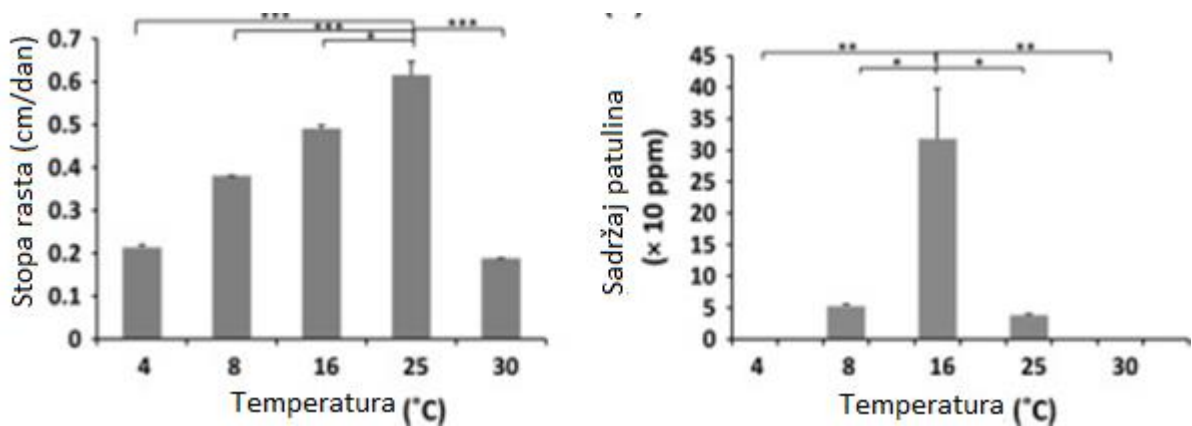
Kod filamentoznih gljiva, geni koji kodiraju enzime uključene u sintezu sekundarnih metabolita uglavnom se nalaze zajedno u skupinama na kromosomima [10]. Prvi otkriveni gen vezan uz biosintezu patulina bio je 6MSA- sintaza, izloiran iz plijesni *P.griseofulvum*. S druge strane, iz plijesni *A.clavatus* izolirani su geni koji kodiraju enzime citokroma P450, a uključeni su u dva koraka puta biosinteze patulina. Dakle, prvi citokrom P450 pretvara m-krezol u m-hidroksibenzil alkohol, a drugi katalizira hidroksilaciju m-hidroksibenzilnog alkohola u gentizilni alkohol. Iz iste plijesni, *A.clavatus*, nedavno je identificirana skupina od 15 enzima koji sudjeluju u biosintezi patulina. Geni koji su identificirani kodiraju enzime potrebne za biosintezu toksina te specifične regulatorne faktore i transportere. U ovoj skupini identificana su tri transportna gena: ABC (vrpca za vezanje ATP-a) transporter, MFS transporter i jedan acetatni transporter. Od gena za enzime, pronađeni su: karboksil esteraza (PatB), Zn- ovisna alkohol dehidrogenaza (PatD), glukoza-metanol-kolin oksidoreduktaza (GMC PatE) i drugi [10].

### ***Regulacija biosinteze patulina***

U mediju kulture razina hranjivog dušika je parametar koji određuje kada će doći do ekspresije puta biosinteze patulina. Neke studije pokazale su da povećane koncentracije hranjivog dušika u mediju kulture i/ili smanjenje veličine inokuluma utječe na vrijeme proizvodnje enzima m-hidroksibenzil alkohol dehidrogenaze od strane plijesni *P.griseofulvum*. Također, resuspenzija micelija u 4% otopini glukoze bez dušika odmah inducira enzime i proizvodnju patulina. S druge strane, ne postoji represija metabolita ugljika na biosintezu patulina. Iako je glukoza optimalan izvor ugljikohidrata, još uvijek nije poznato inducira li izvor ugljika izravno proizvodnju patulina ili modulira njegovu biosintezu. Jedan od prijelaznih metala, mangan, bitan je faktor u biosintezi patulina kod plijesni *P.griseofulvum*. Ima znatan učinak na ekspresiju gena *idh*, no ograničen učinak na gen 6MSA sintaza što dovodi do nakupljanja 6-metilsalicilne kiseline te vrlo male proizvodnje patulina. Možemo zaključiti kako djelotvornost biosinteze patulina ovisi o brojnim faktorima.

### 2.2.1.3. Utjecaj temperature

Optimalna temperatura za rast plijesni *Penicillium expansum* je oko 25°C, no ona može rasti i razmnožavati se pri nižim temperaturama zbog čega hladno skladištenje jabuka ne sprječava kvarenje već ga samo usporava. U jednom provedenom istraživanju [11] kod analize temperature koja je bila provedena u rasponu od 4°C do 30°C, soj plijesni *P. expansum* je pokazao različitu kolonijalnu morfologiju pri različitim temperatura. Test su provodili na pet različitih temperaturnih režima: 4°C, 8°C, 16°C, 25°C i 30°C, te je ustanovljeno kako porastom temperature dolazi do povećanja rasta plijesni. S druge strane, proizvodnja patulina također ovisi o temperaturi te je u većini provedenih istraživanja ustanovljeno kako je najveća koncentracija patulina postignuta oko 16°C, dok porastom temperature na 25°C i 30°C dolazi do smanjenje proizvodnje patulina. Tannous i sur. (2015.g.) [11] u svojem su istraživanju mjereći i bilježeći temperature rasta patulina dobili histogram u obliku zvona. Rezultati pokazuju kako temperatura igra ulogu u proizvodnji patulina, no ne na presudan način. Također, prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako su temperaturni rasponi za nastanak patulina različiti od onih za rast plijesni (Slika 5). Dakle, visoke razine patulina proizvode se pri nižim temperaturama, pri kojima je smanjen rast plijesni.



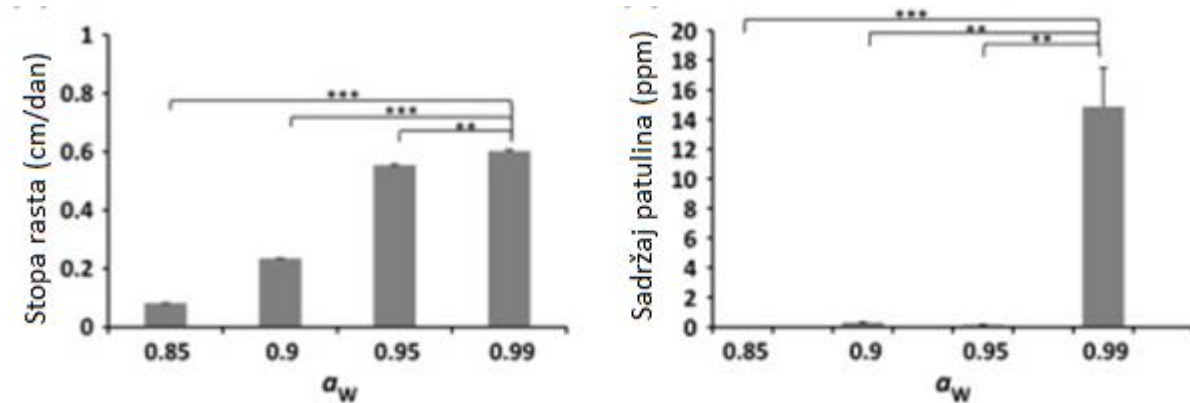
Slika 5 Histogram rasta plijesni *Penicillium expansum* i patulina u ovisnosti o temperaturi [11]

### 2.2.1.4. Utjecaj aktiviteta vode

Općenito, aktivitet svježeg voća je u rasponu od 0,97 do 0,99. Patulin uglavnom raste na višem aw te se njegova proizvodnja značajno povećava pri aktivitetu vode od 0,99 dok pri aktivitetu nižem od 0,85 nema proizvodnje patulina. S druge strane, minimalni aw za *Penicillium expansum* pri kojem ova plijesan pokazuje klijavost je 0,83 i 0,85, a najveća proizvodnja micelija zabilježena je pri aw od 0,95. Značajno povećanje proizvodnje patulina



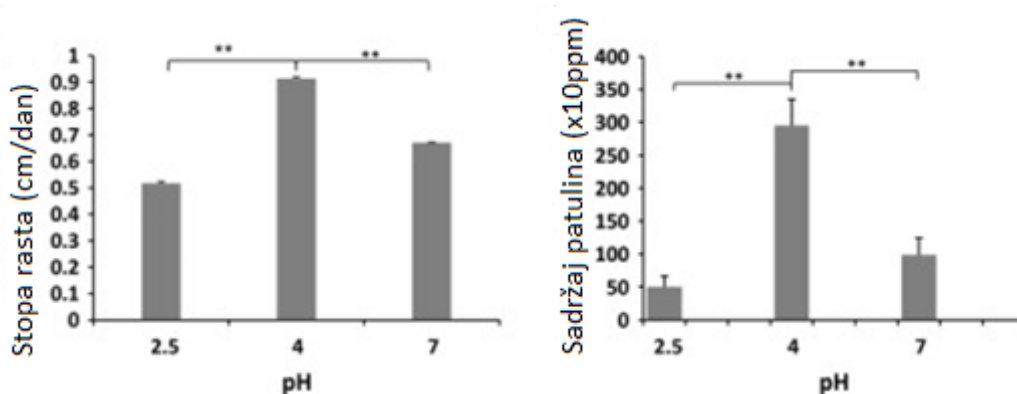
od strane *P. expansum* uočeno je pri aktivitetu vode od 0,99 [11] što dokazuje kako je minimalni  $a_w$  koji omogućuje proizvodnju patulina od strane ove plijesni 0,95. Slika 6. prikazuje histograme rasta *Penicillium expansum* i patulina u ovisnosti o aktivitetu vode.



Slika 6 Histograme rasta plijesni *Penicillium expansum* i patulina u ovisnosti o aktivitetu vode [11]

### 2.2.1.5. Utjecaj pH

Tijekom rasta plijesni *P. expansum* smanjuje se pH vrijednost medija do koje dolazi zbog proizvodnje organskih kiselina (glukonske kiseline) koje snižavaju pH do vrijednosti u kojima je patulin stabilniji [11]. Patulin je najstabilniji u rasponu od pH 2,5 do 5,5, a pri pH 4 plijesan *P. expansum* ga najviše proizvodi, dok se pri pH 2,5 najslabije proizvodi na glukoznoj agar podlozi. Do ovih spoznaja došlo se kroz brojna provedena istraživanja. Tannous i suradnici [11] su u svojem istraživanju (2015.g.) potvrdili tezu kako pH medija značajno utječe na sposobnost plijesni *P. expansum* da proizvodi patulin. Mjerili su koncentraciju patulina pri trima različitim pH vrijednostima: 2,5, 4 i 7 (Slika 7). Rezultati ovog istraživanja usporedivi su sa rezultatima dobivenim u prijašnjim istraživanjima te potvrđuju njihovu tezu. Još 1986.g. Damoglou i Campbell [11] uočili su kako je pH raspon 2,8-3,2 rezultirao manjom produkcijom patulina nego pri pH rasponu 3,4-3,8. Isto tako, Morales i sur. (2008.) uočili su povećanje proizvodnje patulina podizanjem pH s 2,5 na 3,5 dok su pratili nakupljanje patulina u sokovima od jabuke i kruške pri različitim pH vrijednostima [11].



Slika 7 Histogram rasta plijesni *Penicillium expansum* i patulina u ovisnosti o pH [11]

### 2.2.2. Preventivne mjere za suzbijanje patulina

*Penicillium expansum* je plijesan koja može rasti u više uvjeta. Ukoliko su plodovi jabuka oštećeni ili dugo stoje, to pogoduje rastu plijesni. Upravo zato bitno je da preveniramo takve slučajeve sa plodovima, kako ne bi došlo do proizvodnje patulina. Kako bi sačuvali kvalitetu i izgled ploda jabuke, bitno je da se pravilno provodi njihova berba. Sa voćem se treba pravilno, sigurno i ne pregrubo rukovati kako ne bi uzrokovali mehanička oštećenja ploda koja dovode do bržeg kvarenja i kontaminacije sa plijesni. Isto tako, preporuča se pranje voća vodom pod visokim pritiskom te uklanjanje pokvarenog voća prije skladištenja, kako bismo moguću kontaminaciju sveli na što manju vjerojatnost. Fungicidi se također mogu koristiti kako bi se spriječila kontaminacija, poput egzogenih tretmana kalijevim fosfidom ili kombinacijom natrijeva hipoklorita, vodikovog peroksida i bakrenog sulfata. Još jedan spoj koji je pokazao antifungalno (i generalno antimikrobno) djelovanje je klorov dioksid ( $\text{ClO}_2$ ), jedan od najučinkovitijih biocida protiv mikrobnih patogena. Djeluje tako da zaustavlja sintezu proteina u staničnoj stijenci mikroorganizma i na taj način ubija mikroorganizme. S druge strane, kao prirodni antifungalni agens za ograničavanje proizvodnje patulina može se koristiti propolis. Propolis je smolasta tvar koja se sastoji od više od 200 različitih spojeva, dok su flavonoidi i derivati aromatskih kiselina najzaslužniji za antivirusnu aktivnost propolisa. Naime, flavonoidi djeluju na način da inhibiraju specifične enzime mikroorganizama. Nadalje, ultraljubičasto zračenje također može biti učinkovito u inhibiciji rasta plijesni te smanjenju razine patulina u kontaminiranim uzorcima. Ultraljubičasto zračenje djeluje na način da modificira genetsku DNA mikroorganizma uslijed čega gubi sposobnost reprodukcije. Mana ove vrste zračenja je što ono ne funkcioniše kod svježeg soka od jabuke zbog mnogo suspendiranih čestica koje apsorbiraju UV-svjetlost prije nego što dođe do patulina. Razni spojevi, poput amonijaka,

vitamina B, ozona, piridoksin hidroklorida, daju pozitivne rezultate u dekontaminaciji, no samo se neki od njih mogu koristiti kao dekontaminanti obzirom da je većina otrovna za ljude te kao takva ne smije biti korištena za prehrambene proizvode. Kako bi se smanjila koncentracija patulina u soku od jabuke, isprobane su razne metode, dodatak limunske kiseline, kombinacija natrijeva bikarbonata i limunske kiseline, prašak za pecivo i već spomenuto UV-zračenje. Iako UV-zračenje i natrijev bikarbonat pokazuju najbolje rezultate u redukciji patulina, negativno utječu na sensoriku soka od jabuke. Međutim, ova se situacija može ispraviti dodatkom limunske kiseline koja dovodi do reverzibilne reakcije. U detoksifikaciji patulina, uspješnim se pokazao i kvasac *Sacharomyces cerevisiae*, mikroorganizam koji se koristi za proces fermentacije i pripremu hrane. Također, kvasci poput *Rhodotorula kratochvilovae* i *Rodotorula mucilaginosa* pozitivno djeluju na zaštitu uskladištenih jabuka od zaraze plijesni *Penicillium expansum* te smanjuju kontaminaciju patulinom. Osim spomenutih plijesni, testirane su i neke vrste bakterija na sposobnost adsorpcije patulina iz kontaminiranih uzoraka soka. Među sedam testiranih sojeva, bakterija *Alicyclobacillus acidocaldarius* pokazala je najbolje rezultate postigavši adsorpciju do 12,6 µg/g iz uzorka soka od jabuke [9].

### **2.3. Patulin u proizvodima od jabuka**

Na koncentraciju patulina zabilježenu u proizvodima od jabuka ponajprije utječe sorta jabuke i kvaliteta plodova koji se koriste za preradu. Također, prisutnost čimbenika koji smanjuju stabilnost patulina te analitičke metode koje se koriste za detekciju patulina igraju veliku ulogu u konačnim rezultatima koji ukazuju na količinu patulina prisutnog u određenom uzorku. Provedeno je mnogo istraživanja diljem svijeta na raznim proizvodima od jabuka, i u mnogima od njih zabilježena je 100-postotna incidencija patulinom. Tako su primjerice u Francuskoj zabilježili koncentraciju patulina u sokovima od jabuke i koncentratima u razinama do 610 mg/kg [8], a u talijanskim voćnim sokovima pronađena je koncentracija do 60 ng/mL u svakom od pet ispitivanih uzoraka soka od jabuke [8]. U provedenim istraživanjima i mjerenjima u Turskoj, Kardenzim i Eksi (1997) [8]. također su zabilježili 100-postotnu incidenciju patulina, i to na razinama do 75 mg/L. Valja napomenuti kako rezultati o koncentracijama patulina variraju iz godine u godine, ovisno o vrsti sorte i kvaliteti plodova korištenih određene godine. S druge strane, u mnogim je uzorcima utvrđena i niska koncentracija patulina, odnosno ona razina ispod preporučenih granica. Tako su razine patulina od 10-170 mg/L zabilježene u uzorcima soka od španjolske jabuke [8], a brazilski znanstvenici Iha i Sabino u svojem istraživanju provedenom 2006. nisu zabilježili prisutnost patulina ni u jednom

uzorku soka od jabuke, od ukupno 14 testiranih uzoraka [8]. Nadalje, provedeno je i nekoliko istraživanja u kojima se određivala prisutnost i koncentracija patulina u voćnoj hrani za dojenčad i djecu. Istraživanja Browna i Shepharda (1999.) u Južnoj Africi pokazala su da 23% sokova od jabuke i 29% proizvoda od jabuke za dojenčad sadrži patulin u koncentraciji od 10-45, odnosno 5-20 ppb [8].

U Hrvatskoj je proveden monitoring patulina u uzorcima sokova od jabuke koje ja Hrvatska agencija za hranu (HAH) prikupila unutar razdoblja od tri godine (2014.-2016.). Ukupno je uzorkovano 122 uzorka, od čega je u 5 uzoraka uočena nesukladnost, a u 26 uzoraka patulin je kvantificiran uz prosječne količine od 6,61, 8,57 i 10,54  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . U prvoj godini mjerenja, 2013., u samo 4 uzorka se mjerila koncentracija patulina, a 2015. broj uzoraka povećan je na 60 radi preciznije i adekvatnije procjene rizika. Tada je detektirano 12 ili 20% pozitivnih uzoraka i 1 ili 1,66% nesukladnih uzoraka. 2016.godine zabilježen je još veći broj pozitivnih uzoraka (13 ili 22,4%). Iste godine zabilježena je i najveća izmjerena koncentracija patulina u soku, u iznosu od 154  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , što je preko tri puta više od najveće dopuštene koncentracije [12].

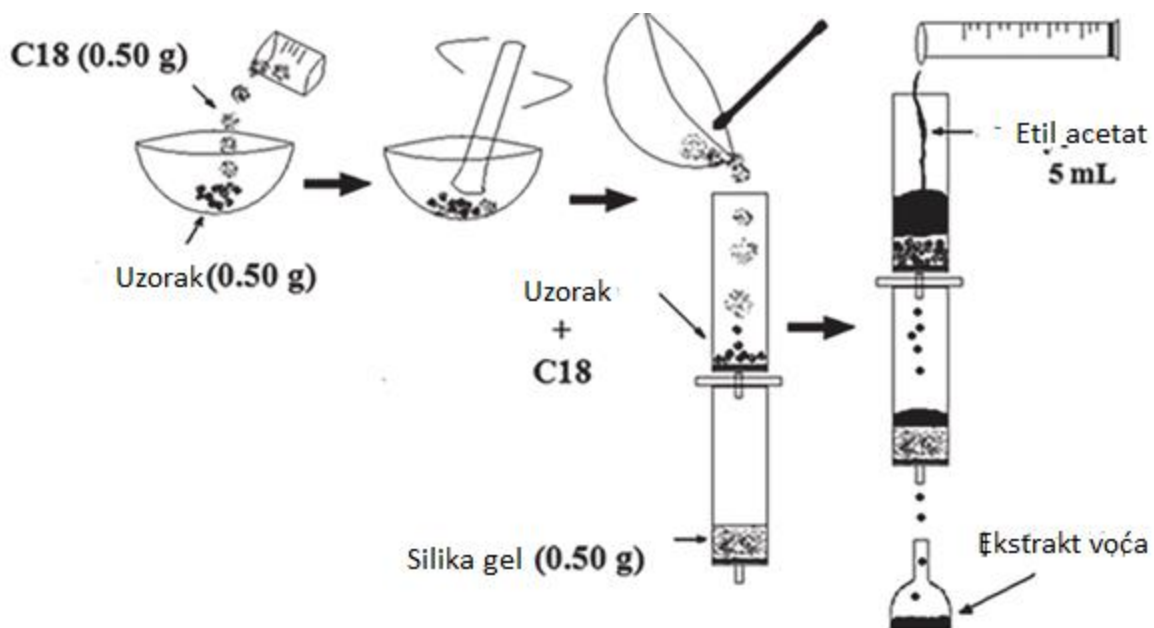
Mnogo istraživanja provedeno je na uspoređivanju prisutnosti patulina u proizvodima od jabuka dobivenih od konvencionalno i ekološko proizvedenih jabuka. Razlog tome je što se ova dva načina uzgoja jabuka uvelike razlikuju, pogotovo u primjeni raznih kemijskih sredstva zaštite biljke i plodova, koji su zabranjeni u ekološkoj proizvodnji. Tako su u Italiji u jednom istraživačkom radu [13] izmjerene puno više razine patulina u jabukama iz organskog uzgoja u vrijednosti od 28,4  $\text{mg}/\text{kg}$ , za razliku od konvencionalno uzgojenih jabuka u kojima je izmjerena koncentracija od 3,03  $\text{mg}/\text{kg}$ . Obzirom da je procijenjeni dnevni unos patulina 0,38, odnosno 0,57  $\text{ng}$  po kilogramu tjelesne mase, uvedene su strože kontrole jabuka proizvedenih u ekološkim uvjetima, prije njihove prerade. Međutim, u nekim istraživanjima nisu utvrđene značajne razlike prisutnosti patulina između konvencionalnih i ekoloških proizvoda od jabuke. Tako, primjerice, znanstvenici nisu pronašli značajne razlike u spomenutim uzorcima kada su ocjenjivali izloženost mlade djece patulinu kozumacijom različitih vrsta soka od jabuke u Belgiji [13].

### **2.3.1. Metode određivanja patulina**

Danas postoje brojne osjetljive, točne analitičke metode koje se temelje na kromatografskim ili imunokemijskim tehnikama za detekciju mikotoksina u poljoprivrednim i prehrambenim proizvodima. Općenito, analitičke metode za određivanje mikotoksina

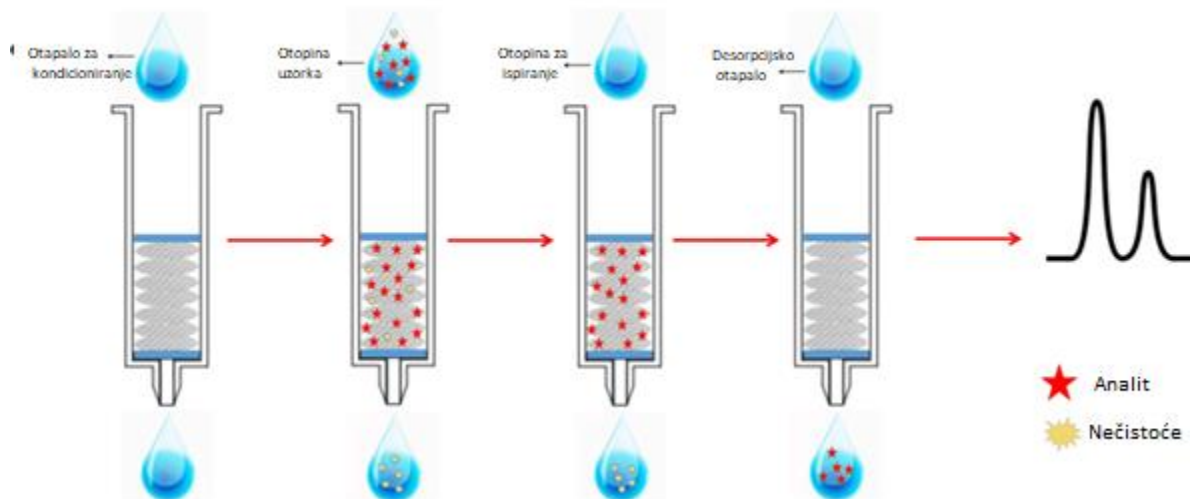
zahtijevaju slijedeće korake: uzorkovanje, ekstrakcija mikotoksina iz matrice odgovarajućim ekstrakcijskim otapalom, čišćenje kako bi se eliminirale nečistoće iz ekstrakta i određivanje toksina odabranom metodom. Za uzorkovanje je bitan odabir pravilne metode i reprezentivnog uzorka, obzirom da mikotoksini nisu jednako raspoređeni u proizvodu.

Ekstrakcija mikotoksina obično se provodi mućkanjem ili miješanjem mljevenih čvrstih matrica sa smjesama vode ili drugih manje polarnih otapala, poput metanola ili acetonitrila. Pročišćavanje ekstrakta bitan je korak u analizi patulina u tragovima ukoliko se za njegovo određivanje koriste kromatografske metode. Disperzija čvrste faze matriksa (*eng. Matrix solid-phase dispersion, MSPD*) pogodna je metoda za ekstrakciju patulina iz jabuka (Slika 7.). Na početku se mala količina jabuka izmiješa u C-18 čvrstom silika podupiraču. Nakon toga slijedi ispiranje s heksanom te ekstrakcija patulina ispiranjem s diklormetanom. Kada otapala ispare, ekstrakt se otopi u otopini pufera octene kiseline te se analizira tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.



Slika 8 Shema disperzije matrice čvrste faze (MSPD)[20]

Ukoliko je patulin prisutan u tragovima u jabuci, ekstrakcija na čvrstoj fazi ili SPE (*eng. solid phase extraction*) jedna je od najprihvatljivijih metoda za pripremu matrice uzorka (Slika 8.). Ova metoda se zasniva na kromatografiji: otapanje ili suspendiranje tvari u tekućinu te ispiranje kroz čvrstu fazu. Na koloni zaostaju nečistoće ili se ispiru s kolone nakon čega se eluira čisti ekstrakt s nje. Čvrste faze koje se mogu koristiti u ovoj metodi su silikagel, silikati, C18, adsorbensi, antitijela.



Slika 9 Prikaz koraka kod SPE metode[21]

Za analizu patulina u hrani najpogodnijima su se pokazale kromatografske analitičke metode, a u njih spadaju : tankoslojna kromatografija (eng. *Thin Layer Chromatography, TLC*), plinska kromatografija (eng. *Gas Chromatography, GC*), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) i tekućinska kromatografija/masena spektrometrija (eng. *Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry, LC/MS*).

TLC je jednostavna, isplativa tehnika koja se često koristi kao test za provjeru mikotoksina kada nisu potrebne niske granice detekcije [13]. Ova metoda za analizu mikotoksina koristi kolonu od silikagela, a za detekciju patulina koristi se reakcija s 3-metil-2-hidrazon benzotiazolinonom i s klorovodičnom kiselinom. Prednosti ove metode je što simultano može provoditi analizu više uzoraka za više mikotoksina, dok je njena mana to što se ne može koristiti za osjetljivija i precizna mjerenja [13].

Metode plinske kromatografije temelje se na detekciji plamenom ionizacijom (eng. *Flame Ionization Detection, FID*), detekciji s hvatanjem elektrona (eng. *Electron-Capture Detection, ECD*) i MS detekciji. Kod ovih je metoda potrebno preliminarno čišćenje ekstrakta pomoću ugljen-alumina, silika gela ili MycoSep kolona. Također je potrebna i derivatizacija pročišćenog ekstrakta prije kolone sa specifičnim reagensima kako bi se povećala hlapljivost i osjetljivost mikotoksina. U ovoj su metodi potrebna poboljšanja u točnosti i preciznosti mjerenja, jer je u nekim istraživanjima dolazilo do nelinearnih kalibracijskih krivulja te velikih varijacija u ponovljivosti [13].

Službena metoda za određivanje patulina u različitim matricama kao što je voće i njegovi derivati temelji se na analizi tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) u kombinaciji s UV ili detektorom s nizom dioda (DAD) [14]. Primjenjiva je za toplinski nestabilne i nehlapljive uzorke. Glavni dijelovi potrebni za provedbu metode su: kolona koja je punjena stacionarnom fazom, pumpa koja pomiče mobilnu fazu kroz kolonu i detektor koji bilježi vrijeme zadržavanja analita. Metoda se provodi na način da se nakon čišćenja ekstrakt ispire dok se ne osuši. Suhom uzorku dodaje se 1 mL vode a pH se podesi na 4. Nakon toga otopina se eluira kroz HPLC kolonu za analizu [15]. Detektor može biti UV detektor (postavljen na 275 nm) ili DAD. Detekciju na valnoj duljini od 275 nm karakterizira niska selektivnost zbog interferencije fenolnih spojeva koji su također prisutni u analiziranom uzorku. Tu se ističe 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF) koji nastaje tijekom toplinske obrade hrane, a zajedno s patulinom pokazuje snažnu UV apsorpciju i slično vrijeme zadržavanja u nekoliko kromatografskih uvjeta. Prednosti HPLC metoda su visoka točnost, preciznost, ponovljivost, granica detekcije i kvantifikacije te brzina.

Za potvrdu mikotoksina u određenom uzorku primjenjuje se tekućinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrometrijom (LC/MS). Ova tehnika najbolja je za simultano probiranje, identifikaciju i mjerenje velikog broja analita, a među ostalim i mikotoksina. Za analizu patulina kao mobilna faza koriste se voda i metanol ili voda i acetonitril uz dodatak octene kiseline ili amonijevog acetata [9].

## **2.4. UHPLC-MS/MS**

Tekućinska kromatografija ultravisoke učinkovitosti (UHPLC) obuhvaća odvajanje tekućinskom kromatografijom pri čemu implementirane kolone zatvaraju čestice manje od 2,5–5  $\mu\text{m}$  koja se obično koristi u tekućinskoj kromatografiji visoke učinkovitosti (HPLC) [16]. UHPLC radi po istom načelu kao i HPLC, a odvajanje pomoću kolone koja sadrži manje čestice povećava učinkovitost metode [16]. Primjena UHPLC-a ima brojne prednosti zbog korištenja kraćih kolona i superiorne brzine protoka za povećanu brzinu s velikom rezolucijom i osjetljivošću. UHPLC metoda bolja je u odnosu na HPLC i zbog manje potrošnje otapala i kraćeg vremena potrebnog za analizu. Uzrok manjeg vremena za analizu je upotreba čestica manjih od 2 mm te protok do 5 mL/min. Korištenje manje veličine čestica dovodi do bolje rezolucije vrhova, koji su oštriji i viši. Sustav tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti – tandem spektrometrija mase (LC-MS/MS) predstavlja vrstu kromatografije koja

omogućuje odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju bez potrebe za dugotrajnim obradama uzorka. Omogućuje odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja nabijenih čestica. Odjeljivanje iona prema njihovom naboju i masi omogućuje maseni spektrofotometar koji se najčešće sastoji od izvora iona za konstruiranje iona u plinovitoj fazi i analizatora mase. Na računalu se informacije dobivene iz analizatora i detektora u pretvaraju maseni spektar. Neka od svojstva detektora su brza vremenska analiza, nizak šum, visoka učinkovitost prikupljanja. MS/MS detektori odlikuju se svojom većom osjetljivošću za otkrivanje vrlo male količine mikotoksina, visokom vremenskom rezolucijom te visokom selektivnosti za detektiranje molekula razdvojenih u smjesi. UHPLC-MS/MS metodom moguća je kvalitativna i kvantitativna analiza. Što se kvalitativne analize tiče moguće je snimanje spektra uzorka, određivanje molekulske mase spoja, određivanje prekursora određenog fragmenta. S druge strane, kod kvantitativne analize moguće je izraditi kalibracijsku krivulju koristeći standardne otopine analita i interni standard te pomoću nje odrediti koncentraciju u uzorcima [17].



## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. Materijali i metode**

#### **3.1.1. Kemikalije:**

- folin - Ciocalteu reagens (Kemika d.d.),
- metanol,
- ultračista voda,
- mravlja kiselina (Merck),
- patulin, HPLC standard (Romer Labs)

#### **3.1.2. Biljni materijali – jabuke**

Konvencionalne sorte jabuka, „Zlatni Delišes“, „Jonagold“ i „Idared“, kupljeni su s domaćeg tržišta od OPG-a Pavičić, Petrijevc, Osijek, Hrvatska. Tradicionalne sorte jabuka, „Petrovnjača“, „Adamovka“, „Amovka“ i „Srčika“, prikupljene su od OPG-a Horvatić, Cvetkovic 48, 312 Rasinja, Hrvatska. Voćnjak jabuka nalazi se u području umjereno tople klime gdje prevladava pseudoglej tip tla koji je glinasto-ilovaste teksture, slabo kiselog do neutralnog pH. Sorte su cijepljene na podloge divlje jabuke, a stabla su posađena na razmaku oko 6 metara između redova i 5 metara unutar redova. Sve sorte jabuka koje su bile korištene za analizu potvrđene su od strane pomologa.

#### **3.1.3 Priprema uzoraka za određivanje patulina**

Patulin je u uzorcima određen razrijedi i mjeri metodom. Odvagano je točno 5,00 g samljevenog osušenog uzorka jabuke te je napravljena ekstrakcija pomoću 20 mL otopine acetonitrila:vode:octene kiseline u omjerima 79:20:1 (v:v:v). Ekstrakcija je provedena na orbitalnoj tresilici GFL 3017 pri 180 obrtaja u minuti tijekom 90 min. Nakon ekstrakcije, 500 µL ekstrakta se odvojilo u viala te se dodalo 500 µL otopine za razrjeđenje sastava acetonitril:voda:octena kiselina = 20:79:1.

#### **3.1.4. Određivanje patulina UHPLC-MS/MS metodom**

UHPLC/MS-MS korištena je kao potvrдна analitička metoda za određivanje patulina, detalji metode koja je korištena opisani su kod Sulyok i sur (2020) [18]. Za izvođenje kromatografskog odvajanja pomoću kolone Gemini C18 kolone 150 x 4,6 mm, veličina čestica

5  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex), održavane na 40 °C, korišten je Agilent 1290 UPLC sustav (Waters). Gradijentno eluiranje provedeno je s 10 % otopinom metanola (eluens A) i 97 % otopinom metanola (eluens B), a oba sadrže 5mM amonijevog acetata. Brzina protoka je konstantna, a iznosi 1 mL/min. UPLC sustav bio je spojen sa Sciex Qtrap 5500 tandem masenim spektrometrom (Sciex) koji je opremljen sa elektrosprej ionizacijskim sučeljem koje radi na principu negativne ionizacije.

Kvantifikacija je bila izvedena eksternom kalibracijskom krivuljom otapala koja pokriva raspon koncentracije patulina između 0,6 i 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , uz primjenu koraka razrjeđivanja uzoraka s koncentracijom patulina iznad navedenih granica. Koncentracija patulina izražena je kao  $\mu\text{g}/\text{kg}$  suhe tvari.

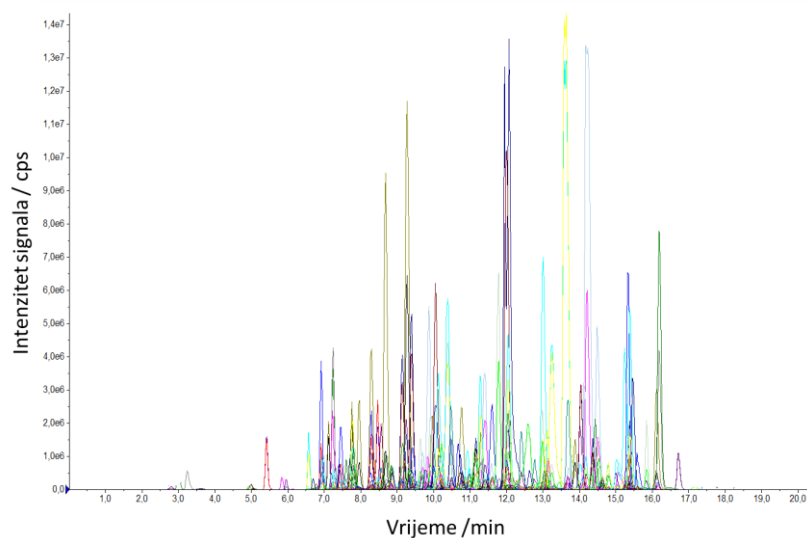
### **3.1.5. Statistička analiza**

Za statističku analizu korišteni su programi Excel, te Statistica, a korišteni su sljedeći testovi: za provjeru distribucije podataka korišten je Shapiro-Wilksov W test, za homogenost varijance korišten je Levenov test. Budući da nije bilo normalne distribucije podataka korišteni su neparametrijski testovi za daljnju obradu podataka. Za usporedbu između konvecionalnih i tradicionalnih sorata korišten je Mann-Whitney U test, a za usporedbu razlika između pojedinih vrsta jabuka korišten je Kruskal-Wallis ANOVA test. Kod statističke analize svi rezultati koji su bili <LOD korištena je vrijednost od  $\frac{1}{2}$  LOD vrijednosti (0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), dok je za obradu svih rezultata <LOQ vrijednosti korištena vrijednost od  $\frac{1}{2}$  LOQ vrijednosti (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

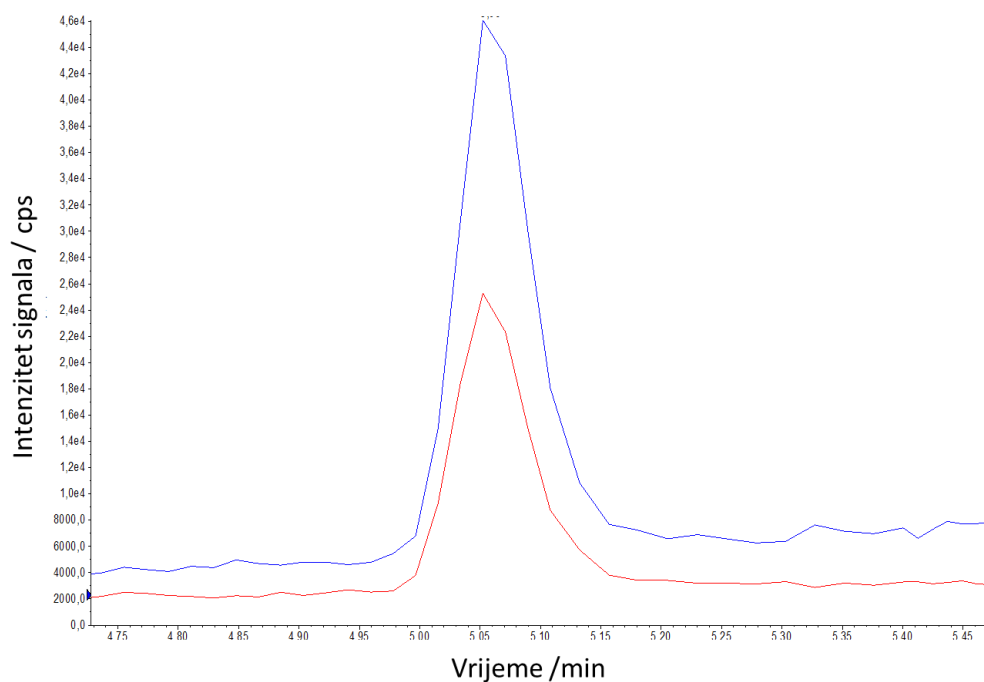
## 4. Rezultati

### 4.1. Analiza patulina u uzorcima jabuka

U ovom je radu ispitivan pojavnost patulina u hrvatskim tradicionalnim i komercijalnim sortama jabuka. Sadržaj patulina određen je UHPLC/MS-MS metodom. Na slici 9. prikazan je piktogram sa svim mikotoksinima koji su bili prisutni u uzorcima, budući da je mjerenje bilo odrađeno multimikotoksinskom metodom, dok je na slici 10. prikazan patulin, koji je bio cilj ovog završnog rada. Od svake sorte napravljena su tri ekstrakta te je svakome od njih izmjerena koncentracija. Rezultati u tablici 3. prikazani su tako da je svakoj sorti posebno izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija za dobivene rezultate. Rezultati su kao takvi prikazani u tablici 3., a koncentracija patulina prikazana je u  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nakon korekcije iskorištenja ekstrakcije koje je iznosilo 86%.



Slika 10. Piktogram svih mikotoksina detektiranih u uzorcima



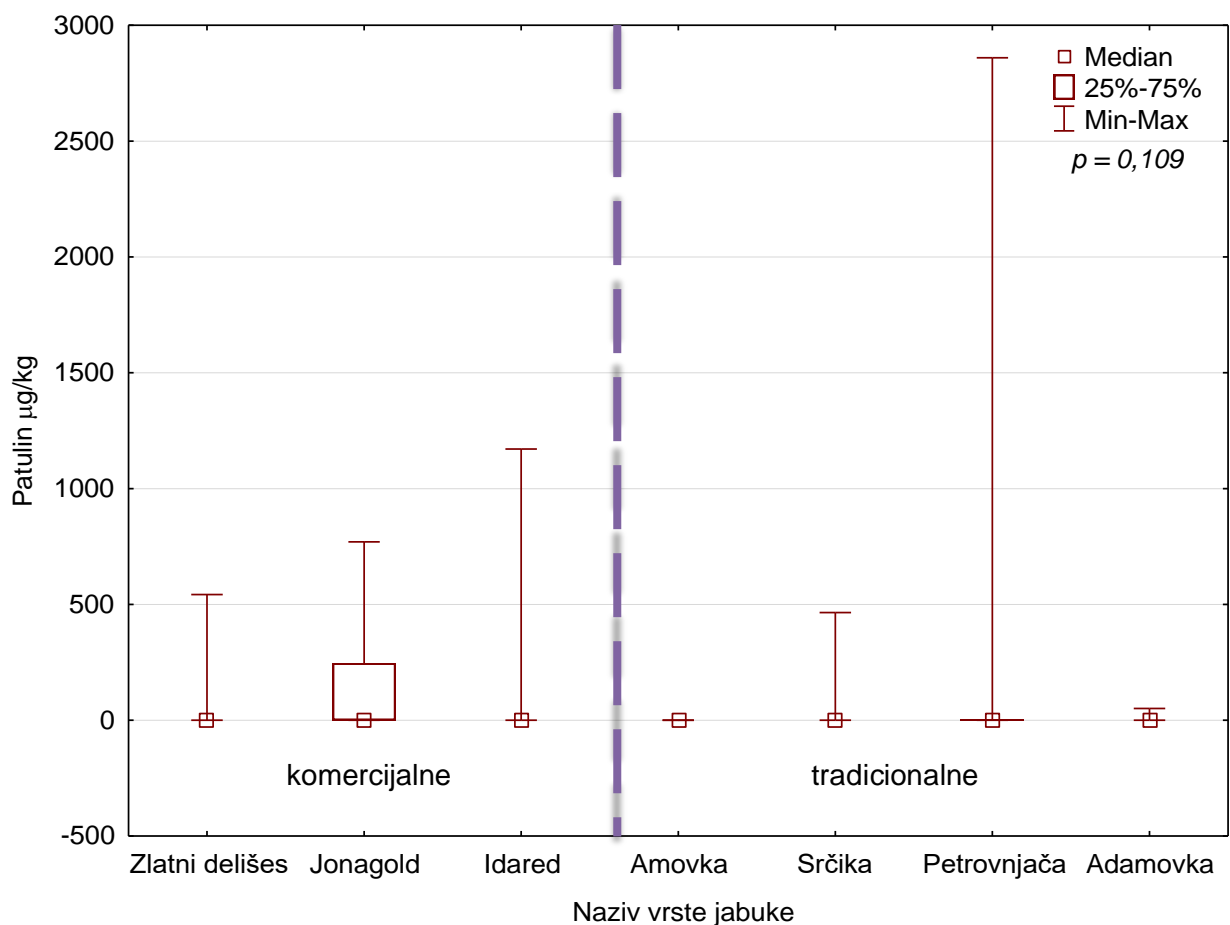
Slika 11. Piktogram patulina, tranzicije 153→109 (plava linija); 153→81 (crvena linija)

Tablica 3 Sadržaj patulina ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) u tradicionalnim i komercijalnim sortama jabuka, te deskriptivna statistička analiza (autor tablice: Valerija Kukec)

tip jabuka	jabuka						
	vrsta jabuke	srednja vrijednost	median	minimum	maksimum	varijanca	standardna devijacija
komercijalne	Zlatni delišes	72,63	0,30	0,30	542,45	30663	175.11
	Jonagold	161,57	0,30	0,30	769,90	70799	266.08
	Idared	179,37	0,30	0,30	1171,00	176585	420.22
tradicionalne	Amovka	0,30	0,30	0,30	0,30	0.00	0.00
	Srčika	68,73	0,30	0,30	464,60	26066	161.45
	Petrovnjača	457,59	0,30	0,30	2859,50	1139433	1067.44
	Adamovka	4,51	0,30	0,30	50,81	213	14.58

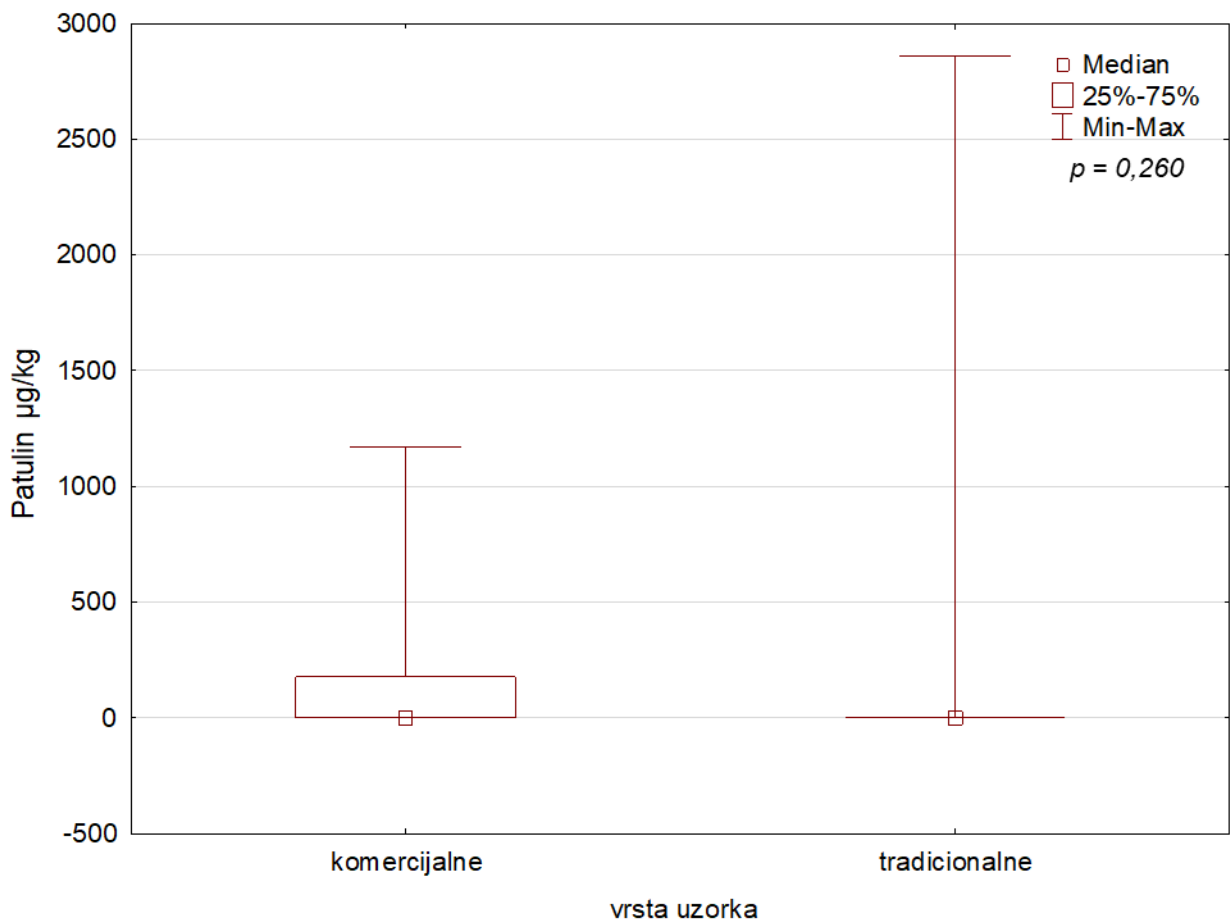
Kod komercijalnih sorti najviša srednja vrijednost sadržaja patulina dobivena je kod sorte *Idared* te iznosi 179,37  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Gotal Skoko i sur. (2022.g.) [19] u svom istraživanju najviši sadržaj patulina komercijalnih sorti izmjerili su kod sorte *Fuji* (3427,75  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) te kod sorte *Idared* (2750,90  $\mu\text{g}/\text{g}$ ). S druge strane, kod tradicionalnih sorti najvišu srednju vrijednost imala je *Petrovnjača*, i to visokih 457,59  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Gotal Skoko i sur. [19] su također izmjerili najviši

sadržaj patulina tradicionalnih sorti kod sorte *Petrovnjača* (23500,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Nadalje, najnižu srednju vrijednost kod komercijalnih sorti jabuka imala je sorta *Zlatni Delišeš* (72,63), dok je kod tradicionalnih sorti *Adamovka* imala nisku srednju vrijednost od 4,51  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Prema podacima prikaznim u tablicama, možemo zaključiti kako su više vrijednosti sadržaja patulina izmjerene kod komercijalnih sorti u odnosu na tradicionalne koje imaju niže srednje vrijednosti, izuzev *Petrovnjače*. Ukupna srednja vrijednost sadržaja patulina komercijalnih sorti iznosi 137,58  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a tradicionalnih sorti 177,62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , dok je bez petrovnjače ona iznosila 24,51  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Valja naglasiti i kako u uzorcima tradicionalne sorte *Srčika* patulin nije bio detektiran, odnosno sadržaj patulina bio je ispod limita detekcije. Ako se osvrnemo na minimalne vrijednosti sadržaja patulina, možemo vidjeti kako su one ispod limita detekcije. S druge strane, maksimalne vrijednosti sadržaja patulina variraju i razlikuju se ovisno o sorti. Tako je najviša maksimalna vrijednost sadržaja patulina tradicionalnih sorti izmjerena kod *Petrovnjače* (2859,50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), a maksimalna vrijednost sadržaja patulina komercijalnih sorti izmjerena kod sorte *Idared* (1171,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).



Slika 12. Kutijasti dijagram pojavnosti patulina u ispitivanim vrstama jabuka

Slika 12. prikazuje kutijasti dijagram pojavnosti patulina u ispitivanim vrstama jabuka. Kutijastim dijagramom prikazani su odnosi minimalnih i maksimalnih vrijednosti sadržaja patulina, donjeg i gornjeg kvartila te medijana. Ovdje su se uspoređivali uzorci sa Kruskal-Wallis ANOVA testom, te je zaključeno kako nema statistički značajne razlike u distribuciji podataka između ispitivanih vrsta jabuka ( $p = 0,109$ ).



Slika 13. Kutijasti dijagram pojavnosti patulina u komercijalnim i tradicionalnim vrstama jabuka

Na slici 13. prikazan je kutijasti dijagram pojavnosti patulina u komercijalnim i tradicionalnim vrstama jabuka. Na dijagramu možemo vidjeti kako su komercijalne vrste jabuka imali isti medijan, ali višu interkvartilnu vrijednost te nižu maksimalnu izmjerenu vrijednost. To nam govori da su uglavnom nešto viši rezultati u komercijalnim vrstama, ali da se najviše vrijednosti mogu očekivati u tradicionalnim vrstama. Usporedbom s Mann-Whitney U testom pokazalo se da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih uzoraka ( $p=0,260$ ).

## 5. Zaključak

Iz rezultata određivanja sadržaja patulina u komercijalnim i tradicionalnim sortama jabuka može se zaključiti:

1. Najveća srednja vrijednost sadržaja patulina u komercijalnim sortama zabilježena je kod sorte *Idared*, a u tradicionalnim sortama kod sorte *Petrovnjača*.
2. Najniža srednja vrijednost sadržaja patulina u komercijalnim sortama zabilježena je kod sorte *Zlatni Delišes*, a u tradicionalnim sortama kod sorte *Adamovka*.
3. U uzorcima tradicionalne sorte *Adamovka* patulin nije bio detektiran, odnosno sadržaj patulina bio je ispod limita detekcije.
4. Uspoređujući uzorke svih vrsta jabuka sa Keuskal-Wallis ANOVA testom zaključujemo kako nema statistički značajne razlike u distribuciji podataka između ispitivanih vrsta jabuka ( $p=0,109$ ).
5. Komercijalne vrste jabuka imale su isti medijan, ali višu interkvartalnu vrijednost te nižu maksimalnu izmjerenu vrijednost.
6. Iako su rezultati u prosjeku bili nešto viši kod komercijalnih sorti, najviša vrijednost izmjerena je u tradicionalnim sortama.
7. Usporedbom uzoraka s Mann-Whitney U testom pokazalo se da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih uzoraka ( $p=0,260$ )

## 6. Literatura

1. [https://www.dr.hauschka.com/bs\\_BA/riznica-znanja/znanje-o-ljekovitim-biljkama/Jabuka/](https://www.dr.hauschka.com/bs_BA/riznica-znanja/znanje-o-ljekovitim-biljkama/Jabuka/) dostupno 15.7.2022.
2. S. Gavran: Potencijal komercijalnih sorti jabuka ubranih 2021. godine za proizvodnju soka jabuke sa smanjenim udjelom patulina, Diplomski rad, PTFOS, Osijek, 2022.
3. A. Lončarić, M. Skendrović Babojelić, T. Kovač, B. Šarkanj: Pomological properties and polyphenol content of conventional and traditional apple cultivars from Croatia, *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, br. 8, 2019. str. 19-24
4. A. Oyenih, Z. Belay, A. Mdisthwa i O. Caleb: "An apple a day keeps the doctor away": The potentials of apple bioactive constituents for chronic disease prevention, *J Food Sci.*, lipanj 2022. str. 2291-2309
5. L. Jakobek, R. Garcia-Villalba, F.A. Tomas-Barberan: Polyphenolic characterisation of old apple varieties from Southeastern European region, *J. Food Compos. Anal.*, br. 31., 2013., str. 199
6. <https://www.hapih.hr/svjetski-dan-jabuka-20-listopada-2020/>
7. L. Dianiris, N. P. Keller, W. M. Jurick: *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit, *Molecular Plant Pathology*, 21(11), 2020, str. 1391-1404
8. R. Barkai-Golan i N. Paster: *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*: Elsevier, London, UK 2008.
9. I. Notardonato, S. Gianfagna, R. Castoria, G. Ianiri, F. De Curtis, M.V. i Russo, A. Pasquale: "Critical review of the analytical methods for determining the mycotoxin patulin in food matrices" *Reviews in Analytical Chemistry*, br. 1, ožujak 2021, str. 144-160
10. O. Puel, P. Galtier i I.P. Oswald: Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin, *Toxins*, br. 2, travanj 2010. str. 613-631
11. J. Tannous, A. Atoui, A. El Khoury, Z. Francis, I.P. Oswald, O. Puel i R. Lteif.: A study on the psychochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: effects of temperature, pH, and water activity, *Food Sci Nutr.*, br. 4, srpanj 2016. str. 611-622



12. Hrvatska agencija za hranu (HAH): Znanstveno mišljenje o patulinu u sokovima od jabuka, Zagreb, 2017.
13. J. Leslie, R. Bandyopadhyay i A. Visconti: Mycotoxins Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade, CABI, USA, 2008., str. 171-176
14. Hrvatska agencija za hranu (HAH): Smjernice za prevenciju i smanjenje kontaminacije patulinom u sokovima od jabuke i sastojcima sokova od jabuke u drugim proizvodima, 1-4 <https://www.hapih.hr/wp-content/uploads/2019/04/Smjernice-patulin.pdf> dostupno: 20.7.2022.
15. A. Gotal Skoko, R. Vilić, M. Kovač, A. Nevistić, B. Šarkanj, M. Lores, M. Celeiro, M. Skendrović Babojelić, T. Kovač i A. Lončarić: Occurrence of Patulin and Polyphenol Profile of Croatian Traditional and Conventional Apple Cultivars during Storage, *Foods*, 11(13), 2022, str: 1912.
16. R.H. Rathod, S.R. Chaudhari, A.S. Patil, A.A. Shirkhedkar: Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations, *Futur J Pharm Sci* 5, br. 6, 2019.
17. <https://www.irb.hr/Gospodarstvo/Usluge-i-ekspertize/Vezani-sustav-tekucinska-kromatografija-visokog-ucinka-spektrometrija-mase-hplc-ms-ms> dostupno 29.7.2022.
18. M. Sulyok, D. Stadler, D. Steiner, R. Krska: Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: Challenges and solutions, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(11), 2020., str. 2607–2620.
19. A. Gotal Skoko, R. Vilić, M. Kovač, A. Nevistić, B. Šarkanj, M. Lores, M. Celeiro, M. Skendrović Babojelić, T. Kovač i A. Lončarić: Occurrence of Patulin and Polyphenol Profile of Croatian Traditional and Conventional Apple Cultivars during Storage, *Foods*, 11(13), 2022., str. 1912
20. S. de Sousa Freitas, F. A. T. Serafim i F. M. Lancas: Determination of Target Pesticide Residues in Tropical Fruits Employing Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) Extraction Followed by High Resolution Gas Chromatography, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 29(5), 2018

21. A. Amiri, M. Baghayeri, F. Karimabadi i F. Ghaemi: Graphene oxide/polydimethylsiloxane-coated stainless steel mesh for use in extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, Springer, *Microchimica Acta* 187(4), 2020.

## 7. Popis slika i tablica

Slika 1 Strukturna formula hidrohalkona .....	6
Slika 2 Jabuka zaražena sa plijesni <i>Penicillium expansum</i> [7] .....	7
Slika 3 Strukturna formula patulina .....	8
Slika 4 Shema puta biosinteez patulina [10] .....	11
Slika 5 Histogram rasta plijesni <i>Penicillium expansum</i> i patulina u ovisnosti o temperaturi [11] .....	13
Slika 6 Histogrami rasta plijesni <i>Penicillium expansum</i> i patulina u ovisnosti o aktivitetu vode [11] .....	14
Slika 7 Histogram rasta plijesni <i>Penicillium expansum</i> i patulina u ovisnosti o pH [11].....	15
Slika 8 Shema disperzije matrixa krute faze (MSPD) , izvor: S. de Sousa Freitas, F. A. T. Serafim i F. M. Lancas: Determination of Target Pesticide Residues in Tropical Fruits Employing Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) Extraction Followed by High Resolution Gas Chromatography, Journal of the Brazilian Chemical Society 29(5), 2018. ....	18
Slika 9 Prikaz koraka kod SPE metode, izvor: A. Amiri, M. Baghayeri, F. Karimabadi i F. Ghaemi: Graphene oxide/polydimethylsiloxane-coated stainless steel mesh for use in extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, Springer, Microchimica Acta 187(4), 2020.....	19
Slika 10 Piktogram svih mikotoksina detektiranih u uzorcima.....	24
Slika 11 Piktogram patulina .....	25
Slika 12 Kutijasti dijagram pojavnosti patulina u ispitivanim vrstama jabuka.....	26
Slika 13. Kutijasti dijagram pojavnosti patulina u komercijalnim i tradicionalnim vrstama jabuka .....	27
Tablica 1 Prikaz nutritivne vrijednosti plodova jabuka na 100 g jestivih dijelova (izvor podataka: USDA, 2016..) .....	4
Tablica 2 Najveće dopuštene koncentracije patulina u navedenim prehrambenim proizvodima [2] .....	10
Tablica 3 Sadržaj patulina ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) u tradicionalnim i komercijalnim sortama jabuka, te deskriptivna statistička analiza (autor tablice: Valerija Kukec).....	25



**IZJAVA O AUTORSTVU  
I  
SUGLASNOST ZA JAVNU OBJAVU**

Završni/diplomski 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, VALERIJA KUKEC (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom Određivanje patuljica u jabukama HPLC-MS/MS (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:  
(upisati ime i prezime)

V. Kukec

(vlastoručni potpis)

Sukladno Zakonu o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju završne/diplomske radove sveučilišta su dužna trajno objaviti na javnoj internetskoj bazi sveučilišne knjižnice u sastavu sveučilišta te kopirati u javnu internetsku bazu završnih/diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice. Završni radovi istovrsnih umjetničkih studija koji se realiziraju kroz umjetnička ostvarenja objavljuju se na odgovarajući način.

Ja, VALERIJA KUKEC (ime i prezime) neopozivo izjavljujem da sam suglasan/na s javnom objavom završnog/diplomskog (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom Određivanje patuljica u jabukama HPLC-MS/MS (upisati naslov) čiji sam autor/ica.

Student/ica:  
(upisati ime i prezime)

V. Kukec

(vlastoručni potpis)

**8.3%**PlagScan by Turnitin Results of plagiarism analysis from 2022-09-17 09:40 UTC  
ZAVRŠNI RAD\_Kukec Valerija.docx

Date: 2022-09-17 09:32 UTC

\* All sources 52 | Internet sources 38 | Own documents 2 | Organization archive 2 | Plagiarism Prevention Pool 10

<input checked="" type="checkbox"/>	[0]	<a href="#">repositorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos:2372/datastream/PDF/download</a>	2.3%	14 matches	1 documents with identical matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[2]	<a href="#">repositorij.kemija.unios.hr/islandora/object/kemos:281/datastream/PDF/download</a>	2.4%	22 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[3]	<a href="#">1.library.net/document/z32dm7mq-validation-hplc-method-determination-patulin-food-products-slavonia.html</a>	2.1%	19 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[4]	<a href="#">eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=celex:32006R1881</a>	1.1%	5 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[5]	<a href="#">narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_12_146_3162.html</a>	1.1%	5 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[6]	<a href="#">www.cris.uns.ac.rs/DownloadFileServlet/Disertacija152386853061460.pdf?controlNumber=(BISIS)107244&amp;fileName=152386853061460</a>	0.7%	13 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[7]	<a href="#">repositorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos:1898/datastream/PDF/view</a>	0.9%	9 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[8]	<a href="#">docplayer.rs/225148874-Ispitivanje-otpornosti-tradicionalnih-sorti-jabuka-na-zarazu-s-plijesni-penicillium-expansum.html</a>	0.6%	6 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[9]	<a href="#">www.semanticscholar.org/paper/POMOLOGICAL-PROPERTIES-AND-POLYPHENOL-CONTENT-OF-Lončarić-Babojelić/7ee7189908c6</a>	0.5%	3 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[10]	<a href="#">www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4930504/#:~:text=expansum grows best at temperatures,lag time for six P.</a>	0.2%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[11]	<a href="#">www.hah.hr/pdf/smjernice-patulin.pdf</a>	0.2%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[12]	<a href="#">pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35502671/</a>	0.1%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[13]	<a href="#">pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32969130/</a>	0.2%	1 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[14]	<a href="#">www.semanticscholar.org/paper/Penicillium-expansum:-biology,-omics,-and-tools-for-Luciano-Rosario-Keller/80f0abb918b27327a0bfc6c</a>	0.2%	1 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[15]	<a href="#">repositorij.fkit.unizg.hr/islandora/object/fkit:751/datastream/PDF/download</a>	0.2%	3 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[16]	<a href="#">www.degruyter.com/document/doi/10.1515/revac-2021-0131/html?lang=en</a>	0.1%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[17]	<a href="#">www.x-mol.com/paper/1391200055086174208?recommendPaper=394424</a>	0.1%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[18]	<a href="#">www.researchgate.net/publication/360365145_An_apple_a_day_keeps_the_doctor_away_The_potentials_of_apple_bioactive_constitue</a>	0.1%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[19]	<a href="#">www.researchgate.net/publication/287196196_A_study_on_the_physicochemical_parameters_for_Penicillium_expansum_growth_and_j</a>	0.2%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[20]	<a href="#">repositorij.kemija.unios.hr/islandora/object/kemos:404/datastream/PDF/download</a>	0.3%	3 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[21]	<a href="#">www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00610/full</a>	0.2%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[22]	<a href="#">www.semanticscholar.org/paper/"An-apple-a-day-keeps-the-doctor-away":-The-of-for-Oyenihi-Belay/a156933c56e82621019e7bbebf6ff1</a>	0.1%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[23]	<a href="#">agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2021046557</a>	0.2%	2 matches	
<input checked="" type="checkbox"/>	[24]	<a href="#">www.dr.hauschka.com/bs_BA/riznica-znanja/znanje-o-ljekovitim-biljkama/Jabuka/</a>	0.2%	1 matches	
		<a href="#">narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_08_84_2616.html</a>			

- ✓ [25] [\[0.1%\] 2 matches](#)

---

- ✓ [26] [0.2% 2 matches](#)

---

- ✓ [27] [0.2% 2 matches](#)

---

- ✓ [28] [0.2% 2 matches](#)

---

- ✓ [29] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [30] [0.2% 1 matches](#)  
1 documents with identical matches

---

- ✓ [32] [0.2% 2 matches](#)  
1 documents with identical matches

---

- ✓ [34] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [35] [0.2% 2 matches](#)

---

- ✓ [36] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [37] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [38] [0.1% 2 matches](#)

---

- ✓ [39] [0.1% 2 matches](#)  
1 documents with identical matches

---

- ✓ [41] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [42] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [43] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [44] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [45] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [46] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [47] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [48] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [49] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [50] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [51] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [52] [0.1% 1 matches](#)

---

- ✓ [53] [0.1% 1 matches](#)

---

- ... [chrome-effect.ru/hr/drwall/kak-ochistit-vozduh-v-kvartire-ot-zapahov-kak-bvstro-ochistit/](#)

[54]  1 matches

---

[55]   1 matches

---

**44 pages, 8795 words**

**PlagLevel: 8.3% selected / 8.5% overall**

70 matches from 56 sources, of which 41 are online sources.

**Settings**

Data policy: *Compare with web sources, Check against my documents, Check against my documents in the organization repository, Check against organization repository, Check against the Plagiarism Prevention Pool*

Sensitivity: *Medium*

Bibliography: *Consider text*

Citation detection: *Reduce PlagLevel*

Whitelist: --