

Primjena HPLC-MS/MS multi-mikotoksinske metode za određivanje mikotoksina koji se pojavljuju u pekmezu

Krpan, Melita

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:787740>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2019.

Melita Krpan
1136/USH

**PRIMJENA HPLC-MS/MS
MULTI-MIKOTOKSINSKE
METODE ZA ODREĐIVANJE
MIKOTOKSINA KOJI SE
POJAVLJUJU U PEKMEZU**

Rad je izrađen u sklopu Erasmus+ programa u Laboratoriju za analitičku kemiju na Institutu za bioanalitiku i agrometabolomiku Centra za agrobiotehnologiju Tulln, Sveučilišta BOKU, Austrija pod mentorstvom dr.sc. Michaela Sulyoka, doc. Sveučilišta BOKU, Austrija te u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Ksenija Markov, red.prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Veliko hvala mentorici prof.dr.sc. Kseniji Markov na stručnoj pomoći, strpljenju, vodstvu i izuzetnoj susretljivosti pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se Michaelu, Brigitte i Arminu što su uvijek bili spremni pomoći uz osmijeh na licu.

Posebne zahvale idu obitelji i prijateljima koji su me podržavali tijekom studiranja i uljepšali mi studentske dane.

Najveće zahvale idu mužu Karlu koji je tijekom cijelog studiranja bio najveća podrška te mu posvećujem ovaj diplomski rad. Hvala ti na strpljivosti, bez tebe ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA HPLC-MS/MS MULTI-MIKOTOKSINSKE METODE ZA ODREĐIVANJE MIKOTOKSINA KOJI SE POJAVLJUJU U PEKMEZU

Melita Krpan, 1136/USH

Sažetak: Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni koji su česti kontaminanti hrane, pa postoji zabrinutost potrošača da li se hrana na kojoj je porasla plijesan može dalje konzumirati nakon uklanjanja pljesnivog dijela ili se treba u potpunosti baciti. Budući da postoji mali broj istraživanja o raspodjeli mikotoksina u pljesnivoj hrani i da se malo znade o mikotoksinima koji se mogu naći u pekmezu, cilj ovog istraživanja bio je odrediti pojavnost plijesni te prisutnost i raspodjelu mikotoksina u uzorcima različitih vrsta pekmeza. Prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela provedena je izolacija i identifikacija plijesni te analiza mikotoksina koji se pojavljuju u pekmezu. Iz 56 od ukupno 58 uzoraka pekmeza izolirana su četiri roda plijesni i to: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* i *Talaromyces* i 17 različitih vrsta plijesni. HPLC-MS/MS multimikotoksinskom analizom je dokazano da pljesnivi uzorci pekmeza mogu sadržavati spektar bioaktivnih sekundarnih metabolita, uključujući mikotoksine, jer je u 171 uzorku pekmeza detektirano 110 sekundarnih metabolita od kojih 23 mikotoksina. Određivanje raspodjele fungalnih metabolita u uzorcima pekmeza pokazalo je da su najveće koncentracije detektiranih mikotoksina dokazane u uzorcima koji su obuhvaćali površinu pekmeza na kojoj je porasla plijesan, a najmanje koncentracije u uzorcima koji su bili na dubini 1 cm ispod mjesta porasle plijesni.

Ključne riječi: mikotoksin, pekmez, HPLC, MS/MS

Rad sadrži: 45 stranica, 5 slika, 13 tablica, 38 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof.dr.sc. Ksenija Markov

Pomoć pri izradi: Doc.dr.sc. Michael Sulyok

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Jadranka Frece
2. Prof.dr.sc. Ksenija Markov
3. Izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič
4. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković (zamjena)

Datum obrane: 26. studenog, 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food technology

APPLICATION OF HPLC-MS/MS MULTI-MYCOTOXIN METHOD FOR DETERMINATION OF MYCOTOXINS OCCURRING IN JAM

Melita Krpan, 1136/USH

Abstract: Mycotoxins are toxic secondary metabolites of fungi that are frequent food contaminants, so there is consumer concern about mouldy food and can it be consumed further after the mold has been removed or should the food be discarded in its entirety. Since there are only a few studies on the distribution of mycotoxins in mouldy food and there is still little knowledge about mycotoxins found in jam, the aim of this study was to determine the occurrence of fungi, as well as the presence and distribution of mycotoxins in different jam types. Both isolation and identification of fungi, as well as the analysis of mycotoxins present in jam samples were performed during the research. Four genera of fungi: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* and *Talaromyces* and 17 different species of fungi were isolated from 56 out of 58 jam samples. HPLC-MS/MS multi-mycotoxin analysis has shown that mouldy jam samples can contain a spectrum of bioactive secondary metabolites, including mycotoxins, since a total of 110 secondary metabolites were detected in 171 jam samples, 23 of which were mycotoxins. Determination of the fungal metabolites distribution in jam samples showed that the highest mycotoxin concentration was found in the samples containing the jam surface, on which the fungi grew, whereas the lowest concentration was found in samples taken 1 cm below it.

Keywords: mycotoxin, jam, HPLC, MS/MS

Thesis contains: 45 pages, 5 figures, 13 tables, 38 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD Ksenija Markov, Full professor

Technical support and assistance: PhD Michael Sulyok, Associate professor

Reviewers:

1. PhD Jadranka Frece, Full professor
2. PhD Ksenija Markov, Full professor
3. PhD Ivana Kmetič, Associate professor
4. PhD Ivana Radojčić Redovniković, Full professor (substitute)

Thesis delivered: 26 November 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MIKOTOKSINI	2
2.1.1. Podjela mikotoksina	2
2.1.2. Uvjeti za rast i razvoj mikotoksina.....	5
2.2. IZVORI MIKOTOKSINA U HRANI.....	5
2.2.1. Mikotoksini na voću.....	6
2.2.2. Zaštita od kontaminacije mikotoksinima	8
2.3. MIKOTOKSIKOZE.....	8
2.4. ANALITIČKE METODE U ODREĐIVANJU MIKOTOKSINA.....	9
2.4.1. Analiza mikotoksina.....	9
2.4.2. Podjela analitičkih metoda	10
2.4.3. Kromatografske metode	11
2.4.4. ELISA.....	11
2.4.5. Brze metode.....	11
2.5. ZAKONSKA REGULATIVA	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Uzorci	14
3.1.2. Hranjive podloge	16
3.1.3. Kemikalije i reagensi.....	17
3.1.4. Kalibracijske otopine mikotoksina.....	17
3.2. METODE	18
3.2.1. Izolacija i identifikacija plijesni	18
3.2.2. Ekstrakcija mikotoksina	20
3.2.2.1. Ekstrakcija mikotoksina iz kultura plijesni	20
3.2.2.2. Ekstrakcija mikotoksina iz uzoraka pekmeza	21
3.3. HPLC-MS/MS MULTITOKSINSKA ANALIZA.....	22
3.3.1. Parametri validacije.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. IDENTIFIKACIJA PLIJESNI	26

4.2. ANALIZA MIKOTOKSINA KOJE SU PRODUCIRALE ČISTE KULTURE PLIJESNI	28
4.3. ANALIZA MIKOTOKSINA U UZORCIMA PEKMEZA	32
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERAURA.....	42

1. UVOD

Mikotoksini (gr. *mykes* – gljiva, *toxicon* – otrov) su sekundarni produkti metabolizma koje plijesni sintetiziraju tijekom rasta na supstratima biljnog i životinjskog podrijetla. Kao takvi nemaju biokemijsku funkciju u rastu i razvoju plijesni, nego služe za njihovu obranu od drugih mikroorganizama (Hussein i Brasel, 2001). Mikotoksini u ljudski organizam ulaze putem hrane, izravnom konzumacijom kontaminiranih namirnica ili neizravno proizvodima proizvedenih od životinja koje su tijekom uzgoja bile izložene mikotoksinima (Pleadin i sur., 2018).

Voće se može kontaminirati toksikotvornim plijesnim prilikom oštećenja površine plodova tijekom rasta i branja voća, pakiranja, transporta i skladištenja voća (Kumar i sur., 2017). Mikotoksini koji se najčešće nalaze na voću i njihovim proizvodima su aflatoksini, okratoksini, patulin i toksini roda plijesni *Alternaria* (Fernández-Cruz i sur., 2010). Aflatoksin se najčešće može naći na voću koje raste na području relativno visoke temperature kao što su smokve, datulje, citrusi, ali i na jabukama, dok se okratoksin A može naći na višnjama, jabukama, breskvama, nektarinama i smokvama. Patulin se može naći na bobičastom voću, breskvama i šljivama, a glavni izvor patulina su kontaminirane jabuke i sok od jabuka. Toksini roda plijesni *Alternaria* se mogu naći u bobičastom voću, jabukama i rajčici (Drusch i Ragab, 2003; Kumar i sur., 2017). Prema Dauthy (1995) pekmez sadrži visok udio šećera, nizak aktivitet vode i nizak raspon pH vrijednosti (pH 3,2 – 3,4) što ga čini povoljnim medijem za rast plijesni.

Zbog zabrinutosti za svoje zdravlje, potrebe za smanjenjem otpada od hrane i ekonomskih razloga, potrošači često postavljaju pitanje da li se hrana na kojoj je porasla plijesan može dalje konzumirati nakon uklanjanja pljesnivog dijela ili se treba u potpunosti baciti (Olsen i sur., 2019). Pregled literature pokazuje da postoji mali broj istraživanja o raspodjeli mikotoksina u plijesnim kontaminiranoj hrani.

Budući da se o mikotoksinima koji se mogu naći u uzorcima pekmeza zna malo, cilj ovog rada bio je istražiti (i) vrstu plijesni koja može kontaminirati pekmez, (ii) pojavnost mikotoksina i (iii) distribuciju mikotoksina u različitim uzorcima pekmeza.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini su definirani kao sekundarni metaboliti plijesni male molekulske mase (Malachová i sur., 2014). Identifikacija i izolacija aflatoksina 1960. godine pokrenula je val znanstvenih istraživanja na mikotoksinima te je do danas otkriveno oko 200 vrsta plijesni koje imaju sposobnost sinteze preko 400 različitih toksičnih sekundarnih metabolita (HAH, 2012). Najčešće ih sintetiziraju plijesni roda *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps* i *Fusarium* (Škrbić i sur., 2017). Najznačajniji mikotoksini s obzirom na toksikološki i ekonomski značaj su aflatoksini, okratoksini, patulin, zearalenon, fumonizini, ergot alkaloidi, deoksinivalenol i njegovi derivati te mikotoksini roda *Alternaria* (Köppen i sur., 2010). Međusobno se razlikuju u strukturi, kemijskim i fizikalnim svojstvima, napadaju različite organe te kao takvi mogu uzrokovati različite vrste toksičnosti. Mikotoksini u malim koncentracijama mogu uzrokovati bolesti i smrt u ljudi i životinja (Malachová i sur., 2014, Köppen i sur., 2010).

2.1.1. Podjela mikotoksina

Zbog svoje stabilnosti, mikotoksini se mogu nalaziti u nekom mediju neovisno o tome da li je prisutna plijesan koja ga sintetizira (Fernández-Cruz i sur., 2010). Također, rast plijesni nije nužno popraćena sintezom mikotoksina (Drusch i Ragab, 2003). Određena plijesan može sintetizirati više vrsta mikotoksina kao što je prikazano u tablici 1, dok tablica 2 prikazuje da se određeni mikotoksin može sintetizirati iz različitih vrsta plijesni.

Tablica 1. Odabrane plijesni i njihovi sekundarni metaboliti (Frisvad i sur., 2019; Köppen i sur., 2010; Delaš, 2010; Abdallah i sur., 2017; Pleadin i sur., 2018)

Rod plijesni	Sintetizirani mikotoksini
<i>Aspergillus</i>	Aflatoksini (AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AFM ₁ , AFM ₂), okratoksin A, okratoksin B patulin, citrinin, kojična kiselina, paspalin, paspalinin, tenuazonska kiselina, asperfuran,

	ciklopiazonska kiselina, 3-O-metilsterigmatocistin
<i>Penicillium</i>	okratoksin A, patulin, citrinin
<i>Fusarium</i>	fumonizini (FB ₁ , FB ₂ , FB ₃), T-2 i HT-2 toksin, diacetoksiscirpenol, neosolaniol, nivalenol, deoksinivalenol, 3-acetildeoksinivalenol, 15-acetildeoksinivalenol, zearalenon, fusaproliferin, moniliformin, beauvericin
<i>Alternaria</i>	altenuen, alternariol, alternariol monoetil eter, alteroksin-I, alteroksin-II, altertoksin-III, tenuazonska kiselina

Tablica 2. Odabrani mikotoksini i plijesni odgovorne za njihovu sintezu (Köppen i sur., 2010; Delaš, 2010; HAH, 2012; Pleadin i sur., 2018)

Mikotoksin	Vrsta plijesni odgovorna sintezu
Aflatoksini (AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AFM ₁ , AFM ₂)	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. rambellii</i> , <i>A. ochraceoroseus</i> , <i>Emericella astellata</i> , <i>E. venezuelensis</i> , <i>E. olivicola</i>
Citrinin	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. implicatum</i> , <i>P. fellatanum</i> , <i>P. citreo-viride</i> , <i>P. velutinem</i> , <i>P. canascens</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. janseni</i> , <i>P. steckii</i> , <i>P. spinolosum</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. palitans</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>Aspergillus niveus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. flavipes</i>

Ergot alkaloidi	<i>Claviceps africanana</i> , <i>Claviceps purpurea</i> , <i>Claviceps fusiformis</i> , <i>Claviceps paspali</i> , <i>Neotyphodium coenophialum</i>
Fumonizini (FB ₁ , FB ₂ , FB ₃)	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium anthophilum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. dlamini</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F.</i> <i>proliferatum</i> , <i>F. nygamai</i>
Mikotoksini roda <i>Alternaria</i> (altenuen, alternariol, alternariol monoetil eter, alteroksin-I, alteroksin-II, altertoksin-III, tenuazonska kiselina)	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria dauci</i> , <i>Alternaria cucumerina</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Alternaria citri</i>
Okratoksin A	<i>Aspergillus alutaceus</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A.</i> <i>auricomus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A.</i> <i>carbonarius</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. albertensis</i> , <i>A.</i> <i>citricus</i> , <i>A. flocculosus</i> , <i>A. fonsecaeus</i> , <i>A.</i> <i>lanosus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. ostianus</i> , <i>A.</i> <i>petrakii</i> , <i>A. pseudoelegans</i> , <i>A.</i> <i>roseoglobulosus</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. steynii</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. westerdijakiae</i> , <i>Neopetromyces murictaus</i> , <i>Penicillium</i> <i>viridactum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P.</i> <i>carbonarius</i> , <i>P. variable</i>
Patulin	<i>A. clavatus</i> , <i>A. longivesica</i> , <i>A. terreus</i> , <i>P.</i> <i>expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P.</i> <i>roqueforti</i> , <i>P. variable</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P.</i> <i>claviforme</i> , <i>P. lapidosum</i> , <i>P. melinii</i> , <i>P.</i> <i>rugulosus</i> , <i>P. equinum</i> , <i>Byssochlamys</i> sp.
Trihoteceni tipa A (T-2, HT-2 toksin, diacetoksiscirpenol, neosolaniol)	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F.</i> <i>acuminatum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F.</i> <i>graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F.</i> <i>myrothecium</i> , <i>Cephalosporium</i> sp., <i>Myrothecium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp.,

	<i>Trichothecium</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Stachybotrys</i> sp., <i>Verticimonosporium</i> sp.
Trihoteceni tipa B (nivalenol, deoksinivalenol, 3-acetildeoksinivalenol, 15-acetildeoksinivalenol, fusarenon X)	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. lunulosporum</i>
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. avanaceum</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. oxysporium</i>

2.1.2. Uvjeti za rast i razvoj mikotoksina

Rast plijesni i biosinteza mikotoksina se može pojaviti u bilo kojoj fazi proizvodnje hrane od polja do stola. Uvjeti za rast toksikotvornih plijesni ovise o klimatsko-okolišnim uvjetima kao što su dostupnost nutrijenata, aktivitet vode, pH, temperatura, relativna vlažnost, mikrobna kompeticija, prisutnost insekata i primjena pesticida i fungicida (Freire i Anderson, 2018). Iako Delaš (2010) navodi specifičnije čimbenike za biosintezu mikotoksina (raspon temperature od -5 do 60 °C, sadržaj vode u namirnici 13% i više, aktivitet vode treba biti iznad 0,65, a pH vrijednost između 3 i 9), vidljivo je da se rast plijesni i biosinteza mikotoksina odvijaju pri različitim uvjetima te je stoga teško opisati one okolišne uvjete koji će omogućiti i rast plijesni i sintezu mikotoksina (Freire i Anderson, 2018).

2.2. IZVORI MIKOTOKSINA U HRANI

Izvori mikotoksina u hrani su žitarice, voće, suho voće, orašasto voće, kakao, riža, mahunarke, začini, čajevi, kava, masline i maslinovo ulje. Budući da su mikotoksini stabilni spojevi otporni na visoke temperature, preživljavaju postupke procesiranja hrane te se mogu naći u vinu, pivu, sokovima, proizvodima na bazi voća, kruhu i čokoladi zbog uporabe kontaminiranih sirovina (Delaš, 2010; Freire i Anderson, 2018; Fernández-Cruz i sur., 2010). Također, nalaze se i u hrani za životinje te mogu prijeći u hranu animalnog podrijetla kao što su meso i mesne prerađevine, mlijeko i mliječni proizvodi te jaja (Fernández-Cruz i sur., 2010).

Köppen i sur. (2010) navode da do kontaminacije plijesnima i mikotoksinima može doći u bilo kojoj fazi proizvodnje hrane: prije berbe, između berbe i sušenja i tijekom skladištenja. Tijekom

obrade hrane različitim procesima kao što su kuhanje, pečenje, prženje i pasterizacija većina mikotoksina je kemijski i termički stabilna. Zbog toga je važno izbjegavati uvjete koji dovode do stvaranja mikotoksina u svim faza proizvodnje hrane od polja do stola, što nije uvijek moguće postići. Dokazano je da okolišni stresni uvjeti poput najezde insekata, suše, osjetljivosti kultivara, mehaničkih oštećenja, neprimjerenih temperatura, oborina ili vlage mogu potaknuti proizvodnju mikotoksina (Alshannaq i Yu, 2017; Fernández-Cruz i sur., 2010).

2.2.1. Mikotoksini na voću

Voće sadrži prirodne kiseline kao što su limunska, malična i vinska kiselina koje snizuju pH voća te tako usporavaju bakterijsko kvarenje. Većina bakterija ne može rasti pri pH voća koji je u rasponu od <2,5 do 5,0 dok je za mnoge vrste plijesni ovaj raspon tolerantan, čak i optimalan za rast (Fernández-Cruz i sur., 2010). Drusch i Ragab (2003) navode da se optimalan aktivitet vode potreban za rast plijesni razlikuje od aktiviteta vode pri kojem će plijesan proizvesti maksimalnu količinu mikotoksina. Također, zrenje voća doprinosi kvarenju uzrokovanom plijesnima jer se zrenjem povećava pH vrijednost i udio šećera u voću te tkivo postaje sve mekše. Biosinteza mikotoksina ovisi o raznim kompleksnim interakcijama između unutarnjih i vanjskih faktora kao što su geografsko područje podrijetla voća, vlažnost zraka, temperature, prisutnost patogena na voću, vrsta voća i fiziološke osobine voća.

Plijesni roda *Aspergillus*, *Penicillium* i *Alternaria* su najčešći kontaminanti na voću (Barkai-Golan i Paster, 2008). Tablica 3 prikazuje pojavnost mikotoksina na voću i u voćnim proizvodima (Fernández-Cruz i sur., 2010).

Tablica 3. Pojavnost mikotoksina na voću i u voćnim proizvodima (Fernández-Cruz i sur., 2010)

Voće	Mikotoksin
Naranče	Aflatoksin B ₁
Jabuke	<i>Alternaria</i> toksini Oktratoksin A
Trule jabuke	Aflatoksini Patulin
Groždice	Aflatoksini

Sušene smokve	Aflatoksini Oktratoksin A
Trule mandarine	<i>Alternaria</i> toksini
Breskve	Oktratoksin A
Trešnje	Oktratoksin A Patulin
Jagode	Patulin
Voćni proizvodi	Mikotoksin
Sok od jabuke	Aflatoksin B ₁ i G ₁ Alternariol Patulin
Mošt	Aflatoksin B ₁
Sok od grožđa, crno i bijelo vino	<i>Alternaria</i> toksini Oktratoksin A

Prema Kumar i sur. (2017) skladištenje voća pri odgovarajućoj zrelosti je važan čimbenik u sprječavanju infekcije voća toksikotvornim plijesnima, a time i tvorbi mikotoksina. Pravilnik (2019) propisuje zahtjeve kvalitete kojima u proizvodnji i stavljanju na tržište moraju udovoljavati džem, ekstra džem, žele, ekstra žele, marmelada, žele-marmelada, pekmez i zaslađeni kesten pire. Pekmez je definiran kao proizvod odgovarajuće ugušćene konzistencije proizveden ukuhavanjem voćne pulpe i/ili kaše jedne ili više vrsta voća, sa ili bez dodatka šećera. Također, Pravilnik (2019) propisuje da plodovi voća, koji se koriste za proizvodnju pekmeza, trebaju biti svjež i zdravi, nisu zahvaćeni procesom kvarenja i sadržavaju sve bitne sastojke, dovoljno zreli za upotrebu nakon čišćenja, odstranjivanja oštećenih dijelova, peteljki, koštica i ostalog.

Potrošači neće konzumirati vidno trulo voće, a kako su mikotoksini stabilni tijekom procesiranja, voćni proizvodi i dalje mogu predstavljati izvor mikotoksina i opasnost po zdravlje potrošača (Barkai-Golan i Paster, 2008).

2.2.2. Zaštita od kontaminacije mikotoksinima

Mjere za smanjenje rizika kontaminacije mikotoksinima se mogu podijeliti na kontrolu razvoja plijesni na usjevima te uporabom fizikalnih, kemijskih i bioloških metoda (Delaš, 2010; Pleadin i sur., 2018). Kontrola razvoja plijesni na usjevima podrazumijeva kontrolu okolišnih uvjeta, uzgoj rezistentnih usjeva, kontrola bolesti usjeva, kontrola insekata, osiguranje adekvatne žetve, transporta i skladištenja usjeva pri čemu je ključni korak sušenje usjeva nakon žetve (Delaš i sur., 2010; Karlovsky, 2016; Pleadin i sur., 2018). Fizikalne metode uključuju sortiranje, pranje, mehaničko uklanjanje oštećenih zrna, obradu visokom temperaturom, upotrebu radijacije kao što su UV zrake i X zrake, upotrebu hladne plazme, dodatak tvari koje vežu mikotoksine kao što su kalcijev-aluminosilikat, filosilikat i bentonit, dok se od kemijskih metoda najčešće upotrebljavaju kiseline, lužine, oksidansi i reduktivne tvari (Pleadin i sur., 2018). Neke od bioloških metoda su detoksifikacija enzimima i upotrebu određenih sojeva bakterija mliječne kiseline, bakterija propionske kiseline i bifidobakterija koje smanjuju koncentraciju mikotoksina (Delaš, 2010; Karlovsky, 2016; Markov i sur., 2019). Također, Delaš (2010) navodi da primjena bilo koje od gore navedenih metoda poskupljuje procese proizvodnje i prerade hrane, stoga je važno primijeniti metode prevencije nastanka mikotoksina.

2.3. MIKOTOKSIKOZE

Mikotoksini uzrokuju različite bolesti koje se nazivaju mikotoksikoze. Pojavljuju se u nerazvijenim zemljama, dok u razvijenim zemljama ne predstavljaju veliki problem (Pleadin i sur., 2018). Mikotoksikoze mogu izazivati niz štetnih učinaka na ljude i životinje kao što su karcinogenost, imunotoksičnost, probavne smetnje, neurotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, reproduktivna i razvojna toksičnost (HAH, 2012). Otrovanja mikotoksinima mogu biti akutna i/ili kronična, a simptomi trovanja ovise o starosnoj dobi i spolu, vrsti i koncentraciji mikotoksina, distribuciji u tkivu, odnosno metabolizmu (Delaš, 2010). Mikotoksini često istovremeno djeluju na različite načine i na više ciljnih mjesta u organizmu, što ovisi o vrsti mikotoksina, dozi i vremenu izloženosti (HAH, 2012; Pleadin i sur., 2018). U tablici 4 su prikazane bolesti u ljudi čiji su uzročnici mikotoksini.

Tablica 4. Bolesti koje su povezane s trovanjem mikotoksinima (Pleadin i sur., 2018)

Sustav	Zdravstveni problemi	Mikotoksini
Krvožilni sustav	Smanjena elastičnost žila, unutarnja krvarenja	Aflatoksini, Safratoksini, Roridini
Probavni sustav	Proljev, povraćanje, krvarenje iz crijeva, oštećenje jetre, fibroza, nekroza, anoreksija	Aflatoksini, T-2 toksin, Deoksinivalenol
Dišni sustav	Poteškoće s disanjem, krvarenje iz pluća	Trihoteceni
Živčani sustav	Drhtavica, nekoordinirani pokreti, depresija, glavobolja	Trihoteceni, Termogeni
Koža	Osip, osjet vrućine, fotosenzitivnost	Trihoteceni
Mokraćni sustav	Oštećenje bubrega	Okratoksin, Citrinin
Reproduktivni sustav	Sterilnost, promjene u reproduktivnim ciklusima	T-2 toksin, Zearalenon
Imunosustav	Promjene ili potpuno uništenje	Mnogi mikotoksini

2.4. ANALITIČKE METODE U ODREĐIVANJU MIKOTOKSINA

2.4.1. Analiza mikotoksina

U svrhu zaštite zdravlja potrošača i smanjenja ekonomskih gubitaka, kontrola mikotoksina u hrani i hrani za životinje postala je vodeći cilj za proizvođače, zakonodavna tijela i znanstvenike širom svijeta. Međutim, raznolikost kemijskih struktura onemogućava korištenje samo jedne tehnike za analizu mikotoksina, te je stoga razvijen i validiran velik broj analitičkih metoda. Analiza mikotoksina u hrani i hrani za životinje je proces koji se sastoji od uzorkovanja, pripreme uzoraka, ekstrakcije mikotoksina iz matriksa, identifikacije i kvantifikacije mikotoksina (Köppen i sur., 2010). Ključan korak u analizi mikotoksina u hrani je postupak uzorkovanja koji doprinosi pouzdanosti metode. Zbog neravnomjerne raspodjele mikotoksina u hrani, izazov je dobiti reprezentativni uzorak stoga treba pažljivo provesti plan uzorkovanja. Europska Unija opisuje metode uzorkovanja Uredbom Komisije (EU) br. 401/2006 (Alshannaq i Yu, 2017). Tijekom postupka ekstrakcije, prisutnost srodnih tvari može uzrokovati probleme kao što je maskiranje analitičkog signala za ciljani analit što dovodi do povećanja limita detekcije. Neki od postupaka ekstrakcije mikotoksina iz uzorka su tekućinsko-tekućinska

ekstrakcija, kruto-fazna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim tekućinama, gel kromatografija i imunoafinitetno pročišćavanje (Köppen i sur., 2010; Pleadin i sur., 2018).

2.4.2. Podjela analitičkih metoda

Analitičke metode koje se koriste u određivanju mikotoksina se mogu podijeliti na kromatografske metode, imunoenzimske metode i brze testove. Tablica 5 prikazuje prednosti i nedostatke nekih analitičkih metoda koje se koriste u određivanju mikotoksina (Lattanzio i sur., 2009; Pleadin i sur., 2018).

Tablica 5. Prednosti i nedostaci analitičkih metoda koje se koriste u određivanju mikotoksina (Lattanzio i sur., 2009; Pleadin i sur., 2018)

Metoda	Prednosti	Nedostaci
GC	<ul style="list-style-type: none"> -simultano određivanje više mikotoksina -dobra osjetljivost metode -potvrдна metoda (MS detektor) -mogućnost automatizacije (autosampler) 	<ul style="list-style-type: none"> -potrebna derivatizacija -skupa oprema -<i>carry-over</i> efekt - varijacije u reproducibilnosti i ponovljivosti
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> -dobra osjetljivost, selektivnost i ponovljivost metode -mogućnost automatizacije (autosampler) -kratko vrijeme trajanje analize 	<ul style="list-style-type: none"> -skupa oprema -mogućnost potrebe derivatizacije -potrebno znanje stručnjaka
LC/MS	<ul style="list-style-type: none"> -simultano određivanje više mikotoksina -dobra senzitivnost metode -potvrдна metoda (MS detektor) -mogućnost automatizacije (autosampler) 	<ul style="list-style-type: none"> -vrlo skupa oprema -potrebno znanje stručnjaka
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> -dobra senzitivnost metode -pogodna kao <i>screening</i> metoda -simultano određivanje više mikotoksina -jeftina oprema -dostupnost službenih metoda 	<ul style="list-style-type: none"> -<i>cross</i>-reaktivnost sa srodnim mikotoksinima -mogućnost interferencija u matriksu -mogućnost lažnih pozitivnih/negativnih rezultata

		-potrebna potvrдна metoda
Brzi testovi	-brze i jednostavne metode -jeftina oprema -pogodne kao <i>screening</i> metode	-mogućnost lažnih pozitivnih/negativnih rezultata -nedostatak validiranih metoda - <i>cross</i> -reaktivnost sa srodnim mikotoksinima

2.4.3. Kromatografske metode

Kromatografske metode su najčešće korištene metode u određivanju mikotoksina iz hrane i hrane za životinje kao što su tankoslojna tekućinska kromatografija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u kombinaciji s UV detektorom, detektorom s nizom dioda i masenim spektrometrom, plinska kromatografija u kombinaciji s plameno-ionizacijskim detektorom, elektron-hvatajućim detektorom i masenim spektrometrom (Alshannaq i Yu, 2017; Pleadin i sur., 2018).

2.4.4. ELISA

ELISA (eng. Enzyme-linked immunosorbent assay) je najpoznatija imunoenzimska metoda određivanja mikotoksina. Koristi se u obliku velikog broja komercijalno dostupnih set kitova za detekciju i kvantifikaciju glavnih mikotoksina kao što su aflatoksini, okratoksini, zearalenon, deoksinivalenol, fumonizini, T-2 toksin. ELISA tehnika je brza, specifična i jednostavna metoda određivanja mikotoksina u hrani. S druge strane, set kit može detektirati samo jedan mikotoksin te je predviđen za jednokratnu upotrebu (Alshannaq i Yu, 2017; Pleadin i sur., 2018).

2.4.5. Brze metode

Zadnjih godina postoji interes za upotrebom tehnika koje uključuju brze testne trake koje na licu mjesta detektiraju kontaminante kao što su patogeni koji se prenose hranom, ostaci veterinarskih lijekova, pesticidi, alergeni i mikotoksini. Imunokromatografski test se bazira

upravo na takvim tehnikama i osmišljen je za uporabu izvan laboratorija, odnosno na mjestu inspekcije. Također, uporabom ovog testa očekuje se brže dobivanje rezultata, bilo pomoću jednostavnih prijenosnih uređaja ili bez upotrebe instrumenta (Alshannaq i Yu, 2017).

2.5. ZAKONSKA REGULATIVA

Mnoga međunarodna tijela poput Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA), američke Agencije za hranu i lijekove (FDA), Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO) posvećuju posebnu pozornost u pogledu kontaminacije hrane i hrane za životinje mikotoksinima, dovodeći propise koji strogo reguliraju najveće dopuštene količine mikotoksina koji se mogu naći u hrani i hrani za životinje. Trenutno je oko 100 zemalja diljem svijeta u svojim propisima reguliralo jasne granice najveće dopuštene količine mikotoksina u hrani i hrani za životinje. Kontaminacija hrane i hrane za životinje mikotoksinima je globalni problem čak i uz pravilno provođenje Dobre poljoprivredne i Dobre proizvođačke prakse. Njihovu zabrinutost o sigurnosti hrane u prehrambenom lancu potvrđuje i podatak Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO) koja procjenjuje da je oko 25% poljoprivrednih usjeva u svijetu više ili manje kontaminirano mikotoksinima (Alshannaq i Yu, 2017). Međutim, čak ni Dobra poljoprivredna praksa, pravilni uvjeti skladištenja i prerade hrane ne mogu u potpunosti spriječiti kontaminaciju hrane i hrane za životinje mikotoksinima (Galvano i sur., 2005).

Zakonom o kontaminantima (NN 39/2013, 114/18) utvrđuju se nadležna tijela i njihove zadaće, službene kontrole, načini postupanja i izvještavanja nadležnih tijela i Europske komisije te obaveze službenih laboratorija i subjekata u poslovanju s hranom za provedbu Uredbi navedenih u Zakonu. Uredbom Komisije (EZ) br. 1881/2006 o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata propisane su najveće dopuštene količine aflatoksina, okratoksina, patulina, deoksinivalenola, zearalenona, fumonizina, T-2 i HT-2 toksina u određenoj hrani.

Za sušeno voće, osim suhih smokava, i prerađene voćne proizvode namijenjene za izravnu prehranu ljudi ili kao sastojak hrane najveća dopuštena količina aflatoksina B₁ iznosi 2,0 µg kg⁻¹, a suma aflatoksina B₁, B₂, G₁ i G₂ iznosi 4,0 µg kg⁻¹. Za jabučne proizvode u krutom stanju, uključujući jabučni kompot i jabučni pire, za izravnu prehranu ljudi, najveća dopuštena količina patulina iznosi 25 µg kg⁻¹. Za jabučni sok i jabučne proizvode u krutom stanju, uključujući

jabučni kompot i jabučni pire, za dojenčad i malu djecu, najveća dopuštena količina patulina iznosi $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Prema Uredbi Komisije (EU) br. 401/2006 utvrđene su metode uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razine mikotoksina u hrani.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za potrebe izvedbe eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada prikupljeno je 58 uzoraka pekmeza od kojih je, u većinskom udjelu voća, 16 pekmeza od marelice, 11 od maline, 9 od jagode, 3 od šljive, 4 od borovnice, 3 od kupine, 2 od višnje, 1 od šipka, 1 od ananasa, 1 od plodova bazge, 1 od naranče, 1 od kruške, 1 od više vrsta voća i 4 uzorka pekmeza nepoznatog sastava voća. Uzorci pekmeza su pakirani u staklene teglice i prikupljeni na području Austrije. Svaki uzorak je određeno vrijeme bio korišten od strane potrošača te se na površini uzorka jasno vidjela porast plijesni. Karakteristike uzoraka pekmeza prikazane su u tablici 6.

Nakon zaprimanja uzoraka pekmeza, provedena je izolacija i identifikacija plijesni, te su isti uskladišteni na temperaturi od -20 °C do trenutka uzorkovanja.

Tablica 6: Prikaz okusa, sastojaka i obilježja uzoraka pekmeza

Redni broj	Oznaka uzorka	okus	% voća	% šećera	pektin	Bio proizvod
1	1	Jagoda	70	35	da	da
2	2	Malina	70	35	da	da
3	3	Marelica	92	nepoznato	ne	ne
4	5	Borovnica	70	36	da	da
5	6	Malina	70	35	da	da
6	7	Marelica	85	21	da	ne
7	9	Više vrsta voća	70	40	da	ne
8	10	Kupina	70	39	da	ne
9	11	Malina	60	39	da	ne
10	16	Jagoda	50	nepoznato	da	ne
11	17	Jagoda	55	50	da	da
12	18	Borovnica	70	43	da	ne

13	19	Šipak	60	42	da	ne
14	22	nepoznato	nepoznato	nepoznato	nepoznato	ne
15	23	Višnja	80	38	da	ne
16	24	nepoznato	nepoznato	nepoznato	nepoznato	ne
17	25	Ananas	70	37	da	ne
18	26	nepoznato	nepoznato	nepoznato	nepoznato	ne
19	27	Kupina	70	39	da	ne
20	28	Marelica	70	43	da	ne
21	29	Jagoda	70	35	da	da
22	30	Jagoda	70	42	da	ne
23	32	Marelica	75	40	da	ne
24	33	Marelica	70	50	da	ne
25	34	Borovnica	75	40	da	ne
26	35	Malina	65	45	da	ne
27	36	Šljiva	88	21	ne	ne
28	37	Malina	55	53	da	ne
29	38	Borovnica	60	39	da	ne
30	39	Malina	70	39	da	ne
31	40	Jagoda	60	40	da	ne
32	42	Malina	60	39	da	ne
33	43	Malina	70	39	da	ne
34	44	Marelica	72	34	da	ne
35	45	Marelica	70	41	da	ne
36	47	nepoznato	nepoznato	nepoznato	nepoznato	ne
37	48	Marelica	70	41	da	ne
38	50	Jagoda	70	41	da	ne
39	51	Višnja	70	43	da	ne
40	52	Marelica	70	41	da	ne

41	53	Marelica	70	41	da	ne
42	55	Malina	70	41	da	ne
43	56	Malina	70	39	da	ne
44	57	Šljiva	85	21	nepoznato	ne
45	60	Marelica	70	43	da	ne
46	61	Marelica	55	53	da	ne
47	63	Kupina	70	40	da	ne
48	64	Marelica	55	53	da	ne
49	65	Plodovi bazge	85	22	da	ne
50	66	Malina	70	39	da	ne
51	68	Jagoda	70	40	da	ne
52	69	Marelica	70	41	da	ne
53	70	Jagoda	70	38	da	ne
54	71	Jagoda	60	40	da	ne
55	72	Marelica	70	41	da	ne
56	73	Naranča	70	42	da	ne
57	74	Kruška	nepoznato	nepoznato	nepoznato	da
58	75	Šljiva	88	21	ne	ne

3.1.2. Hranjive podloge

Za izolaciju i identifikaciju plijesni iz uzoraka pekmeza korišteni su DG 18 agar (Dikloran Glicerol agar) (Biomark Laboratories Pune, India) i MEA agar (Malt ekstrakt agar) (Biomark Laboratories Pune, India).

Za produkciju mikotoksina iz čistih kultura plijesni korišten je YES agar (Yeast ekstrakt agar) (Biomark Laboratories Pune, India).

3.1.3. Kemikalije i reagensi

Acetonitril i metanol (HPLC čistoće) te amonijev acetat i ledena octena kiselina (MS čistoće) su kupljeni od Sigma-Aldrich (Beč, Austrija). Purelab Ultra sistem (ELGA LabWater, Celle, Njemačka) je korišten za daljnje pročišćavanje vode dobivene reverznom osmozom.

3.1.4. Kalibracijske otopine mikotoksina

Pojedinačne otopine standarda i fungalnih toksina dobivene su kao poklon od različitih istraživačkih skupina ili iz sljedećih komercijalnih izvora: Romer Labs® Inc. (Tulln, Austrija), Sigma – Aldrich (Beč, Austrija), Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Njemačka), Axxora Europe (Lausanne, Švicarska) i LGC Promochem GmbH (Wesel, Njemačka). Radne otopine svakog analita pripravljene su otapanjem krute tvari u acetonitrilu (poželjno), acetonitril/voda 1: 1 (v/v), metanolu, metanolu/vodi 1: 1 (v/v) ili vodi prema Malachová i sur., 2014. Zbog lakšeg rukovanja, trideset i četiri kombinirane radne otopine pripravljene su miješanjem radnih otopina odgovarajućih analita i pohranjene na -20 °C.

Konačna radna otopina (mastermix) je svježe pripremljena prije izvođenja analize/eksperimenata miješanjem kombiniranih radnih otopina. Priprema treba biti što brža te se mora izbjegavati izloženost svjetlu zbog nekih fotosenzibilnih mikotoksina. Za postizanje željene koncentracije otopina standarda (STD 1-1000) mastermix se razrjeđuje s otopinom u kojoj se nalaze otapalo za razrjeđivanje (DS) i ekstrakcijskog otapalo (ES) u omjer 1:1 kako je prikazano u tablici 7.

Tablica 7: Priprema kalibracijskih otopina standarda

	STD1	STD100	DS:ES (1:1)
STD 3	300 µL	-	700 µL
STD10	100 µL	-	900 µL
STD30	30 µL	-	970 µL
STD100	20 µL	-	1980 µL
STD300	-	300 µL	700 µL
STD1000	-	100 µL	900 µL
Slijepa proba 1	-	-	1000 µL
Slijepa proba 2	-	-	1000 µL

DS (dilution solvent) - otapalo za razrjeđivanje

ES (extraction solvent) - otapalo za ekstrakciju

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija i identifikacija plijesni

Plijesan je direktno nanesa s površine pekmeza na hranjive podloge te inkubirana 7 dana na 25 ± 2 °C u mraku. Fenotipska identifikacija plijesni provedena je prema Samsonu i sur. (2010), dok je specifična identifikacija roda *Penicillium* provedena prema taksonomskoj studiji Samson i Frisvad (2004).

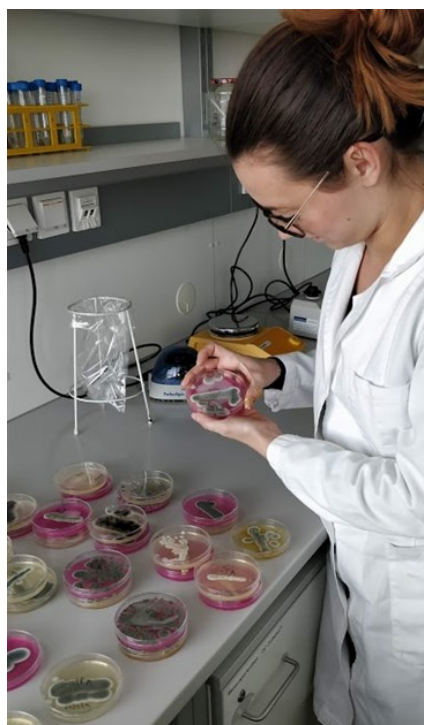
Na slikama 1-3 je prikazan postupak izolacije i identifikacije plijesni poraslih na uzorcima pekmeza.



Slika 1. Prikaz postupka izolacije plijesni s površine uzoraka pekmeza (vlastita fotografija)



Slika 2. Prikaz izoliranih plijesni poraslih na hranjivim podlogama nakon 7 dana inkubacije (vlastita fotografija)



Slika 3. Prikaz postupka identifikacije plijesni poraslih na hranjivim podlogama nakon 7 dana inkubacije (vlastita fotografija)

3.2.2. Ekstrakcija mikotoksina

3.2.2.1. Ekstrakcija mikotoksina iz kultura plijesni

Nakon izolacije i identifikacije čistih kultura plijesni, plijesni su nacijepljene na YES podlogu za sintezu mikotoksina. Plijesni su inkubirane 14 dana na 25 ± 2 °C u mraku i iz uzoraka plijesni je provedena ekstrakcija mikotoksina.

Ekstrakcija mikotoksina je provedena i modificirana prema Smedsgaard (1997). Izvagano je 1 g kulture plijesni u polipropilensku tubu od 15 mL, dodano 5 mL ekstrakcijskog otapala (acetonitril/voda/octena kiselina, 79:20:1) te je smjesa izmiješana na Vortex miješalici tri puta po 30 sekundi. Uz pomoć Pasteurove pipete i pamučne vate, filtrirano je otprilike 2 mL smjese u plastičnu epruvetu od 2 mL s čepom. Nakon filtracije, 1 mL smjese je kvantitativno prenesen u novu plastičnu epruvetu od 2 mL s čepom gdje se kao takav čuvao na temperaturi hladnjaka do početka HPLC-MS/MS (tekućinska kromatografija visokog učinka-spektrometrija) analize. Dio opisanog postupka je prikazan na slici 4.



Slika 4. Prikaz ekstrakcije mikotoksina iz čistih kultura plijesni (vlastita fotografija)

20 μ L filtriranog uzorka smjese preneseno je u HPLC vialu i razrijeđeno u omjeru 1:50 s otapalom za razrjeđivanje (acetonitril/voda/octena kiselina, 20:79:1). Nakon miješanja smjese

na Vortex miješalici, 5 μ L razrijeđenog ekstrakta je injektirano u HPLC-MS/MS sustav bez prethodnog pročišćavanja.

3.2.2.2. Ekstrakcija mikotoksina iz uzoraka pekmeza

Priprema uzorka provedena je tako što su od svakog uzorka pekmeza iz staklene teglice uzeta tri poduzorka. Poduzorak M1 označava površinu pekmeza gdje je porasla plijesan, poduzorak M2 označava površinu uzorka pekmeza koji je 1 cm udaljen od mjesta porasle plijesni dok poduzorak M3 označava uzorak pekmeza koji je uzet na dubini 1 cm ispod mjesta porasle plijesni. Uzorci MA, MB i MC označavaju različitu vrstu plijesni poraslih na površini pekmeza iste teglice pekmeza i ekvivalent su poduzorku M1. Slika 5 prikazuje primjer uzorkovanja pekmeza.



Slika 5. Prikaz pekmeza broj 47 prije (lijevo) i poslije (desno) uzorkovanja (vlastita fotografija)

Od ukupno 58 prikupljenih uzoraka pekmeza dobiven je 171 poduzorak za multi-mikotoksinsku analizu. Svaki poduzorak je kvantitativno prenesen u polipropilenske tube za centrifugiranje prema Sulyok i sur. (2010). U tube je dodan volumen ekstrakcijskog otapala (acetonitril/voda/octena kiselina, 79:20:1) koji je bio veći od mase izvaganog poduzorka za otprilike pet puta. Smjesa je miješana 30 sekundi na Vortex miješalici te je ekstrakcija nastavljena na GFL 3017 rotacijskoj tresilici (GFL, Burgwedel, Njemačka) na 180 okretaja min^{-1} u vodoravnom položaju 90 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije, tube su nekoliko minuta stavljene u usporavan položaj kako bi se formirao talog.

Nakon formiranja taloga 500 μL sirovog ekstrakta je preneseno u HPLC vialu i razrijeđeno u omjeru 1:1 s otapalom za razrjeđivanje (acetonitril/voda/octena kiselina, 20:79:1). Nakon miješanja smjese na Vortex miješalici, 5 μL razrijeđenog ekstrakta je injektirano u HPLC-MS/MS sustav bez prethodnog pročišćavanja.

3.3. HPLC-MS/MS MULTI-MIKOTOKSINSKA ANALIZA

Mjerenje koncentracije mikotoksina provedeno je prema validiranoj metodi (Malachová i sur., 2014). Za izvođenje analize upotrijebljen je QTRAP 5500 MS/MS sustav (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) opremljen s TurboV ionskim raspršivačem kao ionskim izvorom (ESI) i UHPLC sustavom serije 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Kromatografsko razdvajanje provedeno je pri 25 °C na Gemini[®] C₁₈-koloni (Phenomenex, Torrance, CA, US) opremljenom s odgovarajućom zaštitnom pretkolonom. Gradijentno eluiranje provedeno je pomoću dvije mobilne faze. Objе mobilne faze sadržavale su 5 mM amonijevog acetata i sastojale su se od smjese metanola/vode/octene kiseline u omjeru 10:89:1 (v/v/v; eluens A) i u omjeru 97:2:1 (v/v/v; eluens B). Tijekom 2 minute eluens A je bio 100 %, nakon čega je postotak eluensa B linearno povećan 50 % unutar 3 min. Daljnje linearno povećanje eluensa B do 100% unutar 9 minuta bilo je praćeno zadržavanjem od 4 min na 100% eluensa B. Sljedeće 2,5 minute kolona je vraćena u ravnotežu dovodeći 100 % eluensa A. Brzina protoka bila je 1000 L min⁻¹.

Analiti su kvantificirani u pozitivnom i negativnom sMRM modu. Kvalitativna i kvantitativna obrada podataka izrađena je pomoću softvera Analyst version 1.6.2, odnosno MultiQuant 3.0.3 softvera.

3.3.1. Parametri validacije

Obogaćivanje (spiking)

Obogaćivanje uzoraka je provedeno kako bi se utvrdilo prividno iskorištenje ciljanih metabolita. Izvagano je 0,25 g sedam nekontaminiranih uzorka pekmeza (ribizl, naranča-đumbir, jagoda, dva uzorka od marelice, malina, crna bazga), obogaćeno sa 100 μL mastermiksa, dobro izmiješano te uskladišteno na sobnu temperaturu na tamnom mjestu u svrhu uravnoteženja metabolita i matriksa. Sljedeći dan dodan je 1 mL ekstrakcijskog otapala i smjesa je stavljena na rotirajuću tresilicu na 180 okretaja min⁻¹ u horizontalnom položaju 90 minuta.

Nakon toga, 300 μL ekstrakta je razrijeđeno s 300 μL otapala za razrjeđivanje, vorteksirano 30 sekundi i injektirano u HPLC-MS/MS bez prethodnog pročišćavanja. Prilikom validacije određivani su validacijski parametri linearnost, limit detekcije i iskorištenje.

Linearnost

Nakon izvršene kalibracije dobiveni rezultati prikazani su grafički kako bi se mogla izračunati linearnost. Za svaki mikotoksin i sekundarni metabolit prikazana je ovisnost površine dobivenog pika nakon MRM (Multiple Reaction Monitoring) analize i koncentracije mikotoksina, te su dobivene krivulje linearizirane, odnosno korigirane linearnom regresijom. Na temelju odstupanja krivulje od pravca linearne regresije određena je linearnost metode. Općeprihvaćeni kriterij linearnosti je koeficijent determinacije (R^2) veći od 0,99.

Limit detekcije

Za određivanje limita detekcije (LOD) korištene su kalibracijske krivulje temeljem kojih su određene vrijednosti omjera signala i šuma (S/N) za svaki mikotoksin i sekundarni metabolit te je LOD izračunat pomoću formule (1):

$$LOD \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right) = \frac{C_{MIN}}{S/N} \times 3 \quad (1)$$

gdje je: C_{MIN} – srednja vrijednost najniže koncentracije obogaćenog uzorka (ng mL^{-1}),

S/N – srednja vrijednost omjera signala i šuma kod C_{MIN}

Limit kvantifikacije

Za određivanje limita kvantifikacije (LOQ) korištene su kalibracijske krivulje temeljem kojih su određene vrijednosti signala i šuma (S/N) za svaki mikotoksin i sekundarni metabolit te je LOQ izračunat pomoću formule (2):

$$LOQ \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right) = \frac{C_{MIN}}{S/N} \times 10 \quad (2)$$

gdje je: C_{MIN} – srednja vrijednost najniže koncentracije obogaćenog uzorka (ng mL^{-1}),

S/N – srednja vrijednost omjera signala i šuma kod C_{MIN}

Iskorištenje

Iskorištenje je izračunato prema sljedećoj formuli (3):

$$\text{Iskorištenje (\%)} = \frac{(x_2 - x_1)}{x_{ADD}} \times 100 \quad (3)$$

gdje je: x_1 – izmjerena vrijednost koncentracije uzorka bez dodatka mastermixa

x_2 – izmjerena vrijednost koncentracije obogaćenog uzorka,

x_{ADD} – koncentracija standarda dodanog obogaćenom uzorku.

U tablici 8 su prikazani parametri validacije detektiranih analita u uzorku.

Tablica 8. Parametri validacije

Parametar	Spiked ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Iskorištenje (%)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Agroklavin	20,24	98,36	0,11	0,37
Andrastin A	60,24	132,54	0,22	0,73
Andrastin B	60,32	142,39	0,87	2,91
Andrastin C	n.s.	100	n.s.	n.s.
Andrastin D	n.s.	100	n.s.	n.s.
Andrastin Derivat	n.s.	100	n.s.	n.s.
Aurasperon B	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Aurasperon C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Citrinin	159,78	168,90	0,30	1,01
Comunesin B	26,80	124,24	0,38	1,25
Dehidrokurvularin	80,48	105,35	0,96	3,21
Emodin	53,36	125,92	0,06	0,19
Eniatin A1	0,12	128,60	0,06	0,20
Eniatin B	1,12	130,49	0,01	0,02
Eniatin B1	3,12	130,49	0,05	0,18
Festuklavin	20,24	98,72	0,03	0,09
Fonsecin	n.s.	100	n.s.	n.s.
Fumigaklavin	330,00	116,52	0,12	0,41

Kojična kiselina	1930,67	155,10	20,35	67,84
Malformin A	48,32	93,34	0,10	0,33
Mikofenolna kiselina	149,20	126,75	1,16	3,88
Paspalin	n.s.	100	n.s.	n.s.
Paksillin	258,64	125,40	3,69	12,29
Penitrem A	194,20	158,90	0,45	1,51
Rokefortin C	144,64	119,90	0,35	1,25
Rokefortin D	68,64	86,36	0,48	1,62
Sekalonična kiselina D	282,08	143,90	1,56	5,22
Sekalonična kiselina F	n.s.	100	n.s.	n.s.
Sterigmatocistin	53,28	127,40	0,06	0,19
T-2 toksin	101,28	125,70	0,41	1,37
Teritrem B	68,16	122,80	1,01	3,35
Triprostatin B	n.s.	100	n.s.	n.s.
Versikolorin A	1,44	146,01	0,09	0,30
Versikolorin C	241,44	133,57	0,13	0,45
Violaceol I	n.s.	100	n.s.	n.s.
Violaceol II	n.s.	100	n.s.	n.s.
Viridikatin	113,60	136,08	0,15	0,49
Viridikatol	79,12	127,70	3,17	10,58

n.d. – nije detektirano

n.s. – nema standarda

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada je multimikotoksinska analiza pekmeza kojom se želi odgovoriti na pitanja da li su mikotoksini prisutni u pekmezu i u kojoj koncentraciji. Da li je, zbog sigurnosti i zabrinutosti za zdravlje potrošača, dovoljno ukloniti samo dio površine gdje je vidljiv porast plijesni i 1 cm ispod površine porasta plijesni te iz toga izvesti zaključak da je ostatak pekmeza siguran za konzumaciju.

Prije same multimikotoksinske analize, na svim uzorcima pekmeza provedena je identifikacija poraslih plijesni kako bi se utvrdilo koja vrsta plijesni može rasti na mediju kao što je pekmez i koje mikotoksine pritom producira. Također, zbog mogućnosti uspoređivanja rezultata, određena je i koncentracija mikotoksina koju plijesan može producirati u za to idealnim laboratorijskim uvjetima.

4.1. IDENTIFIKACIJA PLIJESNI

Duraković i suradnici (2002) navode da voćni koncentрати, ukuhano voće, sirupi i džemovi svoju otpornost prema mikrobiološkom kvarenju duguju niskim vrijednostima aktiviteta vode (0,82 - 0,94) koji se postiže dodatkom dostatne količine šećera u takve proizvode. Također, ti proizvodi se zagrijavaju na temperature od 60 do 82 °C koje uništavaju većinu kserotolerantnih gljiva. Neki rodovi plijesni tvore termorezistentne askospore te se kao takvi mogu pronaći u toplinski obrađenim voćnim proizvodima. Najčešće su to plijesni *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischer* i *Talaromyces flavus* (nespolni stadij *Penicillium vermiculatum* i spolni stadij *Penicillium dangeardii*). Najčešći simptomi kvarenja toplinski obrađenih voćnih proizvoda su vidljiv porast plijesni i neugodan miris. Dauthy (1995) u svojem radu navodi da će plijesni, zbog visokog udjela vlage u pekmezu, uzrokovati njegovo kvarenje nakon što se pekmez otvori i neko vrijeme drži na zraku. U suprotnom, tijekom skladištenja pekmeza neće doći do mikrobiološkog kvarenja. Nadalje, Rawat (2015) navodi da rod *Penicillium* uzrokuje truljenje plodova voća što dovodi do velikih gubitaka usjeva. Neke vrste roda *Penicillium* mogu izazvati mikrobiološko kvarenje hrane koja se skladišti pri niskim temperaturama i prerađene hrane kao što je pekmez.

Rezultati identifikacije plijesni poraslih na uzorcima pekmeza i postotak pojavnosti određene vrste plijesni u pekmezu prikazani su u tablici 9.

Tablica 9: Vrsta plijesni izolirana iz određenog uzorka pekmeza

Izolirane plijesni	Okus i oznaka uzorka	Pojavnost plijesni %
<i>Aspergillus glaucus</i>	Šipak (19), jagoda (50), marelica (72)	5,17
<i>Aspergillus niger</i>	Jagoda (1), malina (2, 6, 56), kupina (10), plodovi bazge (65)	10,34
<i>Aspergillus sydowii</i>	Marelica (28 B)	1,72
<i>Aspergillus versicolor</i>	Višnja-kruška (23), Marelica-jalapeños (33), višnja (51), jagoda (70), naranča-đumbir (73)	8,62
<i>Aspergillus</i> sp.	Malina (66)	1,72
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Marelica (28 A, 28 C)	3,44
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Marelica (7, 44, 64, 69), jagoda (17), borovnica (38), malina (39, 42, 43), šljiva (57)	17,24
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Borovnica-kupina (34), marelica (52), marelica s chillijem (60)	5,17
<i>Penicillium crustosum</i>	Marelica (3, 48, 53), malina (11), jagoda (16, 30), borovnica (18), marelica-mango (32), malina-smokva-limun (35), marelica s chillijem (45), nepoznato (22, 24, 26, 47)	24,14
<i>Penicillium digitatum</i>	Borovnica (5)	1,72
<i>Penicillium discolour</i>	Malina (37)	1,72
<i>Penicillium expansum</i>	Jagoda (29, 40, 68), šljiva (36)	6,89
<i>Penicillium glaucoalbidum</i>	Više vrsta voća (9)	1,72
<i>Penicillium olsonii</i>	Ananas-kokos (25)	1,72
<i>Penicillium solitum</i>	Jagoda (71), šljiva (75)	3,44
<i>Talaromyces</i> sp.	Kupina (27)	1,72
<i>Penicillium</i> sp.	Marelica (61), Kupina-limeta-smreka (63)	3,44

Iz 56 od ukupno 58 uzoraka pekmeza izolirana su četiri roda plijesni i to: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* i *Talaromyces* i 17 različitih vrsta. Identificirano je pet vrsta roda *Aspergillus*, deset *Penicillium* vrsta i po jedna vrsta roda *Cladosporium* i *Talaromyces*. Najčešća vrsta plijesni je *Penicillium crustosum* koja je identificirana u 24,14 % uzoraka, zatim *Penicillium brevicompactum* u 17,24 % uzoraka i *Aspergillus niger* u 10,34 % uzoraka. Plijesan *Aspergillus versicolor* identificirana je u 8,62 % uzoraka, *Penicillium expansum* u 6,89 % uzoraka, *Aspergillus glaucus* i *Penicillium chrysogenum* u 5,17 % uzoraka dok su ostale plijesni identificirane u jednom ili dva uzorka pekmeza (tablica 9).

4.2. ANALIZA MIKOTOKSINA KOJE SU PRODUCIRALE ČISTE KULTURE

PLIJESNI

Kako bi se ustvrdilo da li plijesni izolirane iz uzoraka pekmeza produciraju mikotoksine, čiste kulture plijesni naciepljene su na YES podlogu, stavljene na inkubaciju 14 dana 25 ± 2 °C u mraku, a zatim je iz uzoraka plijesni provedena ekstrakcija mikotoksina.

Pomoću HPLC-MS/MS analize iz uzoraka plijesni detektirano je ukupno 93 sekundarna metabolita od čega je 20 mikotoksina koje su najčešće producirale čiste kulture plijesni: andrastin A, B, C i D, aurasperon B i C, citrinin, fonsecin, malformin A, mikofenolna kiselina, paspalin, penitrem A, rokefortin C i D, sterigmatocistin, triprostatin B, versikolorin A i C i violakeol I i II.

Dio rezultata istraživanja je prikazan u tablici 10, a dobivene koncentracije metabolita izražene su u $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tablica 10: Mikotoksini i raspon koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) mikotoksina dokazanih u uzorcima čistih kultura plijesni

Plijesan	Mikotoksini	Raspon koncentracije ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
<i>A. glaucus</i>	Andrastin A Citrinin Fonsecin* Malformin A Mikofenolna kiselina Rokefortin C Sterigmatocistin Triprostatin B	$4,1 \times 10^{-1} - 2,2 \times 10^2$ < LOD - $1,5 \times 10^3$ $5,6 \times 10^6 - 3,6 \times 10^9$ < LOD - $1,8 \times 10^4$ $9,5 \times 10^1 - 2,0 \times 10^2$ < LOD - $1,7 \times 10^2$ < LOD - $2,2 \times 10^1$ $2,1 \times 10^6 - 2,8 \times 10^6$
<i>A. niger</i>	Andrastin A, B, C* i D* Aurasperon B* i C* Citrinin Fonsecin* Malformin A Mikofenolna kiselina Violakeol I i II	$7,7 \times 10^1 - 5,8 \times 10^5$ $3,2 \times 10^8 - 2,3 \times 10^{10}$ < LOD - $1,4 \times 10^3$ $2,8 \times 10^{10} - 3,8 \times 10^{10}$ $1,4 \times 10^5 - 1,7 \times 10^5$ < LOD - $1,2 \times 10^3$ $2,9 \times 10^2 - 2,2 \times 10^6$
<i>A. versicolor</i>	Citrinin Fonsecin* Mikofenolna kiselina Rokefortin C Sterigmatocistin Triprostatin B Verzikolorin A i C Violakeol I i II	$8,6 \times 10^1 - 7,8 \times 10^3$ $1,6 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ $9,3 \times 10^1 - 1,1 \times 10^4$ $1,7 \times 10^2 - 1,5 \times 10^3$ $1,8 \times 10^2 - 8,8 \times 10^4$ $6,1 \times 10^5 - 1,7 \times 10^8$ < LOD - $1,5 \times 10^4$ $1,2 \times 10^6 - 7,8 \times 10^7$
<i>A. sydowii</i>	Citrinin Violakeol I i II	< LOD - $6,7 \times 10^2$ $1,2 \times 10^5 - 2,3 \times 10^6$
<i>Aspergillus</i> sp.	Aurasperon C* Fonsecin* Mikofenolna kiselina	< LOD - $1,8 \times 10^7$ < LOD - $3,2 \times 10^7$ < LOD - $4,7 \times 10^4$

	Triprostatin B	< LOD - $7,2 \times 10^6$
<i>P. crustosum</i>	Andrastin A Aurasperon C* Citrinin Fonsecin* Mikofenolna kiselina Paspalin* Penitrem A Rokefortin C i D Sterigmatocistin Violakeol I i II	< LOD - $1,8 \times 10^3$ $3,3 \times 10^6$ - $6,5 \times 10^6$ < LOD - $9,4 \times 10^4$ < LOD - $4,1 \times 10^8$ < LOD - $9,9 \times 10^2$ < LOD - $1,0 \times 10^8$ < LOD - $6,9 \times 10^2$ $7,3 \times 10^1$ - $2,2 \times 10^5$ < LOD - $5,5 \times 10^1$ < LOD - $4,4 \times 10^5$
<i>P. digitatum</i>	Aurasperon C* Fonsecin* Rokefortin C	< LOD - $1,7 \times 10^6$ < LOD - $4,6 \times 10^6$ < LOD - $6,0 \times 10^2$
<i>P. brevicompactum</i>	Andrastin A, B, C*, D* Citrinin Fonsecin* Mikofenolna kiselina Rokefortin C i D Triprostatin B Violakeol I i II	$2,7 \times 10^2$ - $1,2 \times 10^9$ $1,7 \times 10^2$ - $2,0 \times 10^4$ < LOD - $3,8 \times 10^7$ $8,5 \times 10^5$ - $1,6 \times 10^6$ < LOD - $1,0 \times 10^3$ $2,6 \times 10^7$ - $2,2 \times 10^8$ $9,9 \times 10^1$ - $7,0 \times 10^5$
<i>P. glaucoalbidum</i>	Andrastin A, C* i D* Aurasperon C* Citrinin Fonsecin* Mikofenolna kiselina	$5,1 \times 10^4$ - $2,8 \times 10^7$ < LOD - $1,4 \times 10^6$ < LOD - $1,7 \times 10^2$ < LOD - $8,5 \times 10^6$ < LOD - $8,2 \times 10^2$
<i>P. olsonii</i>	Andrastin A Citrinin Fonsecin* Rokefortin C i D Sterigmatocistin Verzikolorin C	< LOD - $2,2 \times 10^2$ < LOD - $4,1 \times 10^3$ < LOD - $1,1 \times 10^6$ $4,9 \times 10^2$ - $7,8 \times 10^2$ < LOD - $1,2 \times 10^1$ < LOD - 1,7

	Violakeol I i II	$2,4 \times 10^3 - 3,4 \times 10^4$
<i>P. expansum</i>	Andrastin A, B, C*, D*	$5,2 \times 10^4 - 6,6 \times 10^9$
	Aurasperon C	< LOD - $3,0 \times 10^6$
	Citrinin	$5,1 \times 10^5 - 7,4 \times 10^6$
	Fonsecin*	$9,1 \times 10^5 - 1,3 \times 10^7$
	Mikofenolna kiselina	$1,0 \times 10^2 - 9,3 \times 10^2$
	Rokefortin C i D	$2,2 \times 10^4 - 7,9 \times 10^5$
	Sterigmatocistin	< LOD - $7,9 \times 10^5$
	Violakeol I i II	$4,6 \times 10^3 - 6,7 \times 10^4$
<i>P. chrysogenum</i>	Andrastin A, B, C*, D*	$2,1 \times 10^5 - 8,0 \times 10^9$
	Citrinin	$3,0 \times 10^3 - 4,8 \times 10^4$
	Fonsecin*	< LOD - $2,0 \times 10^6$
	Rokefortin C i D	$3,6 \times 10^4 - 3,2 \times 10^6$
	Sterigmatocistin	$1,2 \times 10^1 - 1,8 \times 10^1$
	Violakeol I i II	$8,5 \times 10^3 - 1,3 \times 10^6$
<i>P. discolor</i>	Andrastin A	< LOD - $2,5 \times 10^2$
	Citrinin	< LOD - $7,4 \times 10^4$
	Rokefortin C	< LOD - $8,9 \times 10^2$
<i>P. solitum</i>	Fonsecin*	< LOD - $1,3 \times 10^6$
	Mikofenolna kiselina	$2,4 \times 10^2 - 6,7 \times 10^2$
	Rokefortin C	< LOD - $4,7 \times 10^1$
	Sterigmatocistin	$1,8 \times 10^1 - 1,4 \times 10^2$
	Verzikolorin C	< LOD - $1,1 \times 10^2$
<i>Penicillium</i> sp.	Fonsecin*	< LOD - $4,7 \times 10^6$
	Mikofenolna kiselina	$1,9 \times 10^{-1} - 7,9 \times 10^3$
	Paspalin*	< LOD - $3,1 \times 10^7$
	Penitrem A	< LOD - $1,9 \times 10^2$
	Rokefortin C i D	$6,9 \times 10^2 - 1,2 \times 10^5$
	Sterigmatocistin	< LOD - $2,6 \times 10^1$
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	Citrinin	$1,9 \times 10^3 - 2,1 \times 10^3$
	Rokefortin C	< LOD - $4,4 \times 10^1$
	Violakeol I i II	$8,0 \times 10^2 - 2,8 \times 10^4$

<i>Talaromyces</i> sp.	Andrastin A i B	$9,2 \times 10^2 - 3,3 \times 10^3$
	Citrinin	< LOD - $6,5 \times 10^4$
	Fonsecin*	< LOD - $1,2 \times 10^6$
	Rokefortin D	< LOD - $1,8 \times 10^2$

< LOD – limit detekcije (tablica 8)

* - nema standarda za ovaj analit

Rezultati ovog dijela istraživanja (tablica 10) pokazali su da najveći broj čistih kultura plijesni može sintetizirati mikotoksin citrinin i to 68,96 % uzoraka. Najveći detektirani raspon koncentracije citrinina ($5,1 \times 10^5 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $7,4 \times 10^6 \mu\text{g kg}^{-1}$) je sintetizirala plijesan *P. expansum*. Pleadin i sur. (2018) te Duraković i Duraković (2003) navode da citrinin sintetiziraju plijesni iz roda *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. viridicatum*, *P. expansum*) i neke vrste iz rodova *Aspergillus* što je i potvrđeno u ovom radu (tablica 10): citrinin je detektiran kao metabolit plijesni *Penicillium brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. glaucoalbidum*, *P. olsonii*, *P. chrysogenum*, *P. discolor*, plijesni iz roda *Talaromyces*, *Cladosporium cladosporioides* i iz sve 4 identificirane vrste roda *Aspergillus*.

Duraković i Duraković (2003) navode da rokefortin C sintetiziraju plijesni iz roda *Penicillium roqueforti*, *Penicillium chrysogenum* i *Penicillium crustosum* što je i u ovom radu potvrđeno (tablica 10).

Rokefortin C je detektiran u 63, 79 % uzoraka. Najveći raspon koncentracija rokefortina C i D $3,6 \times 10^4 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $3,2 \times 10^6 \mu\text{g kg}^{-1}$) je sintetizirala plijesan *Penicillium chrysogenum* (tablica 10). Mikotoksini andrastin A i fonsecin su detektirani u 62,07 % uzoraka, a mikofenolna kiselina u 58,62 % uzoraka. Verzikolorin C je detektiran u najmanjem broju uzoraka, u samo 10,34 % uzoraka. Najveći raspon koncentracija verzikolorina A i C (< LOD – $1,5 \times 10^4 \mu\text{g kg}^{-1}$) je sintetizirala plijesan *Aspergillus versicolor* (tablica 10).

4.3. ANALIZA MIKOTOKSINA U UZORCIMA PEKMEZA

Pomoću HPLC-MS/MS analize u 171 uzorku pekmeza koji su obuhvaćali površinu pekmeza gdje je porasla plijesan (M1), površinu pekmeza 1 cm udaljenu od porasle plijesni (M2) i 1 cm u dubinu ispod porasle plijesni, detektirano je 110 sekundarnih metabolita od kojih su 23

mikotoksina: andrastin A, B, C i D, aurasperon B i C, festuklavin, fonsecin, fumigaklavin, komunesin B, malformin A, mikofenolna kiselina, paspalin, penitrem A, rokefortin C i D, sterigmatocistin, T-2 toksin, triprostatin B, versikolorin A i C, violakeol I i violakeol II.

U samo jednom uzorku detektirani su citrinin, dehidrokurvularin, eniantin A1, eniantin B i eniantin B1.

Dio rezultata istraživanja su prikazani u tablicama 11-13, a dobivene koncentracije metabolita izražene su u $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tablica 11: Mikotoksini i raspon koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) mikotoksina u uzorcima uzetim s površine pekmeza gdje je porasla plijesan (M1)

Oznaka i okus pekmeza	Mikotoksini	Raspon koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Jagoda (1, 16, 17, 29, 30, 40, 50, 68, 70, 71)	Andrastin A, B, C* i D*	$1,65 \times 10^1 - 5,90 \times 10^8$
	Citrinin	$< \text{LOD} - 2,44 \times 10^1$
	Komunesin B	$< \text{LOD} - 9,70 \times 10^3$
	Festuklavin	$3,37 - 7,12 \times 10^2$
	Fumigaklavin	$< \text{LOD} - 7,46 \times 10^3$
	Mikofenolna kiselina	$< \text{LOD} - 2,61 \times 10^3$
	Rokefortin A i C	$4,74 \times 10^1 - 2,13 \times 10^3$
Sterigmatocistin	$< \text{LOD} - 4,58 \times 10^1$	
Malina (2, 6, 11, 35, 37, 39, 42, 43, 55 MA i MB, 56, 66)	Andrastin A, B, C* i D*	$6,31 \times 10^1 - 4,70 \times 10^7$
	Aurasperon B i C	$7,14 \times 10^4 - 1,72 \times 10^6$
	Fonsecin*	$4,10 \times 10^5 - 2,20 \times 10^7$
	Malformin A	$2,82 \times 10^3 - 1,49 \times 10^4$
	Mikofenolna kiselina	$1,49 \times 10^4 - 5,22 \times 10^4$
	Penitrem A	$< \text{LOD} - 4,01 \times 10^1$
	Rokefortin C	$4,07 - 1,08 \times 10^3$
	T-2 toksin	6,16 - 8,31
	Triprostatin B*	$4,05 \times 10^5 - 6,48 \times 10^6$
	Versikolorin A i C	$4,58 - 3,44 \times 10^1$
Violakeol I i II	$3,75 \times 10^1 - 3,91 \times 10^4$	

Marelica (3, 7, 28 MA, MB i MC, 32, 33, 44, 45, 48, 52, 53, 60, 61, 64, 69, 72)	Andrastin A, B, C* i D* Fonsecin* Mikofenolna kiselina Paspalin* Penitrem A Rokefortin C i D Violakeol I i II	$1,63 \times 10^2 - 3,46 \times 10^7$ $7,63 \times 10^5 - 1,26 \times 10^7$ $1,79 \times 10^4 - 5,28 \times 10^4$ $1,40 \times 10^6 - 6,96 \times 10^6$ $9,32 - 5,20 \times 10^1$ $1,05 - 1,17 \times 10^3$ $1,23 \times 10^1 - 9,54 \times 10^3$
Borovnica (5, 18, 34, 38)	Andrastin A, B, C* i D* Mikofenolna kiselina	$9,05 - 7,10 \times 10^6$ < LOD – $3,41 \times 10^4$
Kupina (10, 27, 63)	Aurasperon B i C Fonsecin* Malformin A Rokefortin C	$1,20 \times 10^5 - 9,79 \times 10^5$ < LOD - $1,21 \times 10^7$ < LOD - $1,40 \times 10^4$ < LOD - $4,16 \times 10^1$
Šljiva (36, 57, 75)	Andrastin A, B i C* Mikofenolna kiselina Rokefortin C	$1,56 \times 10^2 - 3,92 \times 10^8$ < LOD – $5,88 \times 10^1$ $4,98 \times 10^1 - 3,78 \times 10^2$
Višnja (23, 51)	T-2 toksin	< LOD - $3,56 \times 10^{-1}$
Šipak (19)	Fonsecin*	< LOD - $1,16 \times 10^7$
Naranča-đumbir (73)	Fonsecin* Sterigmatocistin Triprostatin B* Violakeol I i II	< LOD - $6,45 \times 10^5$ < LOD - 3,76 < LOD - $1,15 \times 10^7$ $2,49 \times 10^2 - 1,53 \times 10^4$
Kruška (74)	Mikofenolna kiselina Violakeol I	< LOD - $2,00 \times 10^4$ < LOD - $5,09 \times 10^1$
Plodovi bazge (65)	Malformin A	< LOD - $1,46 \times 10^3$
Nepoznato (22, 24, 26, 47)	Andrastin A, B i C* Komunesin B Festuklavin Fumigaklavin Penitrem A Rokefortin C	$1,01 - 4,22 \times 10^7$ $5,28 \times 10^1 - 1,49 \times 10^2$ $2,59 \times 10^{-1} - 1,17 \times 10^2$ $9,88 - 3,30 \times 10^3$ < LOD - 6,21 < LOD - $1,26 \times 10^2$

< LOD – limit detekcije (tablica 8)

* - nema standarda za ovaj analit

Tablica 12: Mikotoksini i raspon koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) mikotoksina u uzorcima uzetim s površine pekmeza 1 cm od mjesta porasle plijesni (M2)

Oznaka i okus pekmeza	Mikotoksini	Raspon koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Jagoda (1, 16, 17, 29, 30, 40, 50, 68, 70, 71)	Andrastin A, B, C* i D* Komunesin B Mikofenolna kiselina Festuklavin Fumiglaklavin Rokefortin C	$3,98 \times 10^1 - 3,95 \times 10^6$ $5,46 \times 10^1 - 5,67 \times 10^1$ < LOD – $2,10 \times 10^2$ < LOD - 3,23 < LOD - $2,08 \times 10^2$ $1,73 - 3,52 \times 10^1$
Malina (2, 6, 11, 35, 37, 39, 42, 43, 56, 66)	Andrastin A, B, C* i D* Fonsecin* Malformin A Mikofenolna kiselina T-2 toksin	$3,44 \times 10^1 - 3,70 \times 10^5$ < LOD - $1,08 \times 10^5$ $4,30 \times 10^2 - 2,35 \times 10^3$ $3,02 \times 10^3 - 7,91 \times 10^3$ 8,26 - 8,75
Marelica (3, 7, 32, 33, 44, 45, 48, 52, 53, 60, 61, 64, 69, 72)	Andrastin A, B, C* i D* Mikofenolna kiselina Rokefortin C Violakeol I i II	$1,88 - 7,42 \times 10^5$ $3,39 \times 10^2 - 3,58 \times 10^3$ $1,78 - 1,39 \times 10^1$ < LOD - $1,43 \times 10^2$
Borovnica (5, 18, 34, 38)	Andrastin A i D* Mikofenolna kiselina	$2,94 \times 10^1 - 6,93 \times 10^5$ < LOD – $7,03 \times 10^3$
Kupina (10, 27, 63)	Andrastin B Fonsecin* Malformin A Rokefortin C	< LOD - 2,64 < LOD - $5,07 \times 10^4$ < LOD - $1,08 \times 10^3$ < LOD - $5,80 \times 10^1$
Šljiva (36, 75)	Andrastin A, B i C* Mikofenolna kiselina Rokefortin C	$2,82 \times 10^1 - 2,1 \times 10^6$ < LOD – $2,51 \times 10^1$ < LOD - 3,17
Šipak (19)	Fonsecin*	< LOD - $7,19 \times 10^6$

Naranča-đumbir (73)	Triprostatin B*	< LOD - 1,80x10 ⁵
	Violakeol I i II	8,78 - 1,55x10 ³
Kruška (74)	Mikofenolna kiselina	< LOD - 3,01x10 ³
Plodovi bazge (65)	Malformin A	< LOD - 6,39x10 ²
Nepoznato (22, 24, 26, 47)	Andrastin A, B i C*	2,37x10 ¹ - 2,90x10 ⁷
	Komunesin B	< LOD - 1,49x10 ¹
	Festuklavin	2,20 - 2,06x10 ¹
	Fumigaklavin	1,39 x10 ² - 4,79x10 ²
	Penitrem A	< LOD - 2,35
	Rokefortin C	< LOD - 1,94x10 ¹

< LOD – limit detekcije (tablica 8)

*- nema standarda za ovaj analit

Tablica 13: Mikotoksini i raspon koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) mikotoksina u uzorcima pekmeza uzetim na dubini 1 cm ispod mjesta porasle plijesni (M3)

Oznaka i okus pekmeza	Mikotoksini	Raspon koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Jagoda (1, 16, 17, 29, 30, 40, 50, 68, 70, 71)	Andrastin A, B, C* i D*	6,16x10 ¹ - 2,57x10 ⁶
	Komunesin B	3,92x10 ¹ - 5,25x10 ¹
	Festuklavin	< LOD - 2,75
	Fumigaklavin	< LOD - 2,05x10 ²
	Mikofenolna kiselina	< LOD – 3,21x10 ²
	Rokefortin C	9,02 - 1,67x10 ¹
Malina (2, 6, 11, 35, 37, 39, 42, 43, 56, 66)	Andrastin A, B, C* i D*	1,54 - 5,29x10 ⁵
	Fonsecin*	< LOD - 6,30x10 ⁴
	Malformin A	9,01x10 ¹ - 1,16x10 ³
	Mikofenolna kiselina	2,72x10 ³ - 5,82x10 ³
	T-2 toksin	9,22 - 1,06x10 ¹
Marelica (3, 7, 32, 33, 44, 45, 48, 52,	Andrastin A, B, C* i D*	2,07 - 6,17x10 ⁵
	Fonsecin*	5,54x10 ⁴ - 1,40x10 ⁵

53, 60, 61, 64, 69, 72)	Mikofenolna kiselina Rokefortin C Violakeol I i II	$4,50 \times 10^2 - 5,40 \times 10^3$ $1,43 \times 10^1 - 3,87 \times 10^1$ $2,01 - 2,86 \times 10^2$
Borovnica (5, 18, 34, 38)	Andrastin A, C* i D* Mikofenolna kiselina	$9,45 \times 10^1 - 1,48 \times 10^6$ < LOD – $6,99 \times 10^3$
Kupina (10, 27, 63)	Andrastin B Fonsecin* Malformin A Rokefortin C	< LOD - 2,80 < LOD - $5,85 \times 10^4$ < LOD - $1,66 \times 10^3$ < LOD - $5,07 \times 10^{-1}$
Šljiva (36, 75)	Andrastin A, B i C* Mikofenolna kiselina Rokefortin C	$6,47 \times 10^1 - 8,94 \times 10^6$ < LOD – $5,28 \times 10^1$ < LOD - 8,85
Šipak (19)	Fonsecin*	< LOD - $8,14 \times 10^5$
Naranča-đumbir (73)	Triprostatin B* Violakeol I i II	< LOD - $3,63 \times 10^5$ $1,31 \times 10^1 - 2,12 \times 10^3$
Kruška (74)	Mikofenolna kiselina	< LOD - $1,06 \times 10^4$
Plodovi bazge (65)	Malformin A	< LOD - $4,51 \times 10^2$
Nepoznato (22, 24, 26, 47)	Andrastin A, B i C* Komunesin B Festuklavin Fumigaklavin Rokefortin C	$1,33 \times 10^1 - 1,18 \times 10^6$ < LOD - 7,58 $1,72 \times 10^{-1} - 9,79$ $1,00 \times 10^1 - 5,07 \times 10^2$ < LOD - 3,85

< LOD – limit detekcije (tablica 8)

*- nema standarda za ovaj analit

U najvećem broju uzoraka detektiran je andrastin A i to u 26,32 % uzorka. Andrastin B je detektiran u 22,22 % uzoraka i rokefortin C u 21,64 % uzoraka.

Najveći raspon koncentracija rokefortina A i C izmjeren je u uzorku pekmeza od jagode koji je uzet s površine gdje je porasla plijesan (M1) (tablica 11) i iznosi $4,74 \times 10^1 \mu\text{g kg}^{-1} - 2,13 \times 10^3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Identificirana plijesan je *P. expansum* (tablica 9 i tablica 11). Olesn i sur. (2019) su nacijepeljivali uzorke pekmeza od jabuke čistim kulturama plijesni *P. crustosum* i *P. roqueforti*

te su mjerili koncentracije rokefortina C od površine do 2 cm u dubinu pekmeza. Kod uzorka koji je bio nacijepjen s plijesni *P. crustosum* izmjerena koncentracija rokefortina C iznosi $1,25 \times 10^4 \mu\text{g kg}^{-1}$, dok kod uzorka nacijepjenog s *P. roqueforti* iznosi $8,51 \times 10^3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Izmjerene koncentracije rokefortina C su puno više od izmjerenih koncentracija rokefortina A i C u ovome radu (tablica 11).

Najveći raspon koncentracija T-2 toksina izmjeren je u uzorku pekmeza od maline koji je uzet s površine gdje je porasla plijesan (M1) i iznosi $6,16 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $8,31 \mu\text{g kg}^{-1}$ (tablica 11). Škrbić i sur. (2017) su detektirali sličan raspon koncentracije T-2 toksina u tri uzorka pekmeza od smokve kao u ovom radu. Detektirali su T-2 toksin u rasponu koncentracija $3,82 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $4,92 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Mikotoksin citrinin je detektiran samo u jednom uzorku pekmeza od jagode (uzorak 41) koji je uzet s površine gdje je porasla plijesan (M1) (tablica 11). Izmjereni raspon koncentracije citrinina iznosi $< \text{LOD} - 2,44 \times 10^1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Citrinin nije detektiran u uzorcima uzetim s površine pekmeza 1 cm od mjesta porasle plijesni (M2) (tablica 12) i uzetim na dubini 1 cm pekmeza ispod mjesta porasle plijesni (M3) (tablica 13) što govori da rastom plijesni citrinin ne migrira u ostale dijelove pekmeza. Identificirana plijesan tog uzorka je *Penicillium expansum* (tablica 9) što je u suglasju s Pleadin i sur. (2018) te Duraković i Duraković (2003) koji navode da citrinin sintetiziraju plijesni iz roda *Penicillium expansum*.

Mikotoksin sterigmatocistin je detektiran u samo 3 uzorka. Najveći raspon koncentracije sterigmatocistina iznosi $< \text{LOD} - 4,58 \times 10^1 \mu\text{g kg}^{-1}$ i detektiran je u uzorku pekmeza od jagode (uzorak 70) koji je uzet s površine pekmeza gdje je porasla plijesan (M1) (tablica 11). Identificirana plijesan navedenog uzorka je *Aspergillus versicolor* (tablica 9) što je u suglasju s Duraković i Duraković (2003) i izvješćem EFSA-e (2013) koji navode da plijesan *Aspergillus versicolor* može sintetizirati mikotoksin sterigmatocistin.

Najveći raspon koncentracije penitrema A iznosi $9,32 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $5,2 \times 10^1 \mu\text{g kg}^{-1}$ i detektiran je u uzorku pekmeza od marelice koji je uzet s površine (M1) (tablica 11) gdje je porasla plijesan *Penicillium crustosum* (tablica 9). Olsen i sur. (2019) su izmjerili $7,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ penitrema A u uzorku pekmeza od jabuke u koji su nacijepili plijesan *Penicillium crustosum*. Također, Olsen i sur. (2017) navode da je, u pekmezu od borovnica u koji je nacijepjena plijesan *P. crustosum*, koncentracija penitrema A bila ispod limita detekcije i limita kvantifikacije. Penitrem A je

detektiran i u uzorku pekmeza od maline i uzorku pekmeza nepoznatog sastava te je svakom pekmezu identificirana plijesan *P. crustosum* (tablica 9 i tablica 11).

Festuklavin je u ovom istraživanju detektiran u 4 uzorka pekmeza i to u uzorcima: 22 M1-M3, 26 M1-M3, 30M1-M3 i 68M1 u kojima je identificirana plijesan roda *Penicillium* (tablica 9, tablice 11-13). Najveći raspon koncentracija festuklavina je izmjeren u uzorcima pekmeza od jagode (tablica 11) i iznosi $3,37 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $7,12 \times 10^2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Olsen i sur. (2019) navode da su detektirali festuklavin u uzorku pekmeza od jabuke, koji je prethodno nacijepljen s plijesni *Penicillium roqueforti*, u koncentraciji od $1,57 \times 10^3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Raspon koncentracija festuklavina u ovome radu je 10 do 100 puta manja od koncentracije koju su izmjerili Olsen i sur. (2019) zato što je u ovom radu mjerena koncentracija mikotoksina u prirodno kontaminiranim pekmezima (tablice 11-13).

Mikotoksin fumigaklavin je detektiran samo u 3 uzorka pekmeza (jedan pekmez od jagode i dva pekmeza nepoznatog sastava) (tablice 11-13) u kojima je identificirana plijesan *Penicillium crustosum* (tablica 9). Najveći raspon koncentracije fumigaklavina je izmjeren u uzorku uzetog s površine pekmeza od jagode gdje je porasla plijesan (M1) (tablica 11) i iznosi $< \text{LOD} - 7,46 \times 10^3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Olsen i sur. (2019) su izmjerili koncentraciju fumigaklavina u uzorku pekmeza od jabuke koji je nacijepljen s plijesni *Penicillium roqueforti* te iznosi $2,02 \times 10^3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Rezultati ovog istraživanja pokazuju četiri puta veću koncentraciju fumigaklavina od one izmjerene u radu Olsen i sur. (2019) zbog različite vrste identificirane plijesni (tablica 11).

Mikofenolna kiselina je detektirana u uzorcima pekmeza od jagode, maline, marelice, borovnice, šljive i kruške, a najčešće identificirana plijesan roda *Penicillium*, bila je *P. brevicompactum* (tablica 9). U navedenim uzorcima pekmeza, mikofenolna kiselina je detektirana u sva tri uzorka (M1, M2 i M3) s najvećom koncentracijom u uzorku M1 koji je uzet s površine gdje je porasla plijesan (tablice 11-13). Raspon koncentracije mikofenolne kiseline u uzorku M1 pekmeza od marelice iznosi $1,79 \times 10^4 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $5,28 \times 10^4 \mu\text{g kg}^{-1}$ što je sto puta veće od koncentracije mikofenolne kiseline u uzorcima pekmeza koje su izmjerili Sulyok i sur. (2007) koja iznosi $8,50 \times 10^2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Duraković i Duraković (2003) navode da mikofenolnu kiselinu najčešće sintetiziraju plijesni roda *Penicillium* što je u ovom radu potvrđeno (tablica 9, tablice 11-13).

Mikotoksini aurasperon B i aurasperon C detektirani su samo u uzorcima uzetih s površine pekmeza (M1) te rastom plijesni ne migriraju u ostale dijelove pekmeza (tablica 11). Sva tri uzorka pekmeza su napravljena od bobičastog voća.

Škrbić i sur. (2017) su detektirali aflatoksin B₁, aflatoksin B₂, okratoksin i T-2 toksin u 10 uzoraka pekmeza, dok je u 3 od 10 uzoraka pekmeza koncentracija okratoksina A bila veća od zakonom propisane najveće dopuštene koncentracije u hrani. Funes i Resnik (2009) su detektirali patulin u 6 od 26 uzoraka pekmeza od jabuke i u jednom od šest uzoraka pekmeza od kruške, dok su Juan i sur. (2017) detektirali samo aflatoksin G₁ u jednom od ukupno dvadeset uzorka pekmeza. Također, Nair i sur. (2015) su istraživali mikotoksine u pekmezu te su u 50 % analiziranih uzoraka pekmeza detektirali aflatoksin B₁ u rasponu koncentracije 1,52 μg kg⁻¹ – 1,82x10² μg kg⁻¹.

S druge strane, u nekim istraživanjima su detektirani mikotoksini u pekmezu u koje su autori radova prethodno inokulirali toksikotvorne plijesni. Tako su Ostry i sur. (2004) detektirali aflatoksin B₁ i aflatoksin G₁ nakon 7 dana inkubacije uzoraka pekmeza od marelice s plijesni *Aspergillus flavus*. Olsen i sur. (2019) su proširili istraživanje tako što su nacijepili uzorke pekmeza od jabuke s plijesnima *Penicillium crustosum*, *Penicillium roqueforti* i *Penicillium verrucosum* te su mjerili koncentracije odabranih mikotoksina (penitrema A, rokefortina C, ciklopenola, andrastina A, festuklavina, fumigaklavina i mikofenolne kiseline) nakon 14 dana inkubacije na 15 °C u 3 različita uzorka. Prvi uzorak je označavao udaljenost 0-2 cm, drugi uzorak 2-4 cm, a treći uzorak 4-6 cm ispod površine na kojoj je porasla plijesan. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju da se koncentracija mikotoksina smanjuje kako se udaljava od mjesta porasle plijesni što je u suglasju s ovim istraživanjem u kojem je također dokazano da se koncentracija mikotoksina smanjuje kako se udaljava od mjesta porasle plijesni.

5. ZAKLJUČCI

Iz rezultata istraživanja pojavnosti plijesni, prisutnosti i raspodjeli mikotoksina u uzorcima pekmeza može se zaključiti:

1. Najčešće izolirane plijesni iz uzoraka pekmeza pripadaju rodu *Aspergillus* i *Penicillium*.
2. Iz čistih kultura plijesni u laboratorijskim uvjetima HPLC-MS/MS multimikotoksinskom analizom detektirano je ukupno 93 sekundarna metabolita od kojih su najčešće dokazani andrastin (58,8%), citrinin (68,9%), fonsecin (82,3%), rokefortin (76,4%) i sterigmatocistin (47,1%).
3. HPLC-MS/MS multimikotoksinskom analizom je dokazano da pljesnivi uzorci pekmeza mogu sadržavati spektar bioaktivnih sekundarnih metabolita, uključujući mikotoksine, jer je u 171 uzorku pekmeza detektirano 110 sekundarnih metabolita od kojih 23 mikotoksina.
4. Najveće koncentracije detektiranih mikotoksina dokazane su u uzorcima koji su obuhvaćali površinu pekmeza na kojoj je porasla plijesan (M1), a najmanje koncentracije u uzorcima koji su bili na dubini 1 cm ispod mjesta porasle plijesni (M3).
5. Određivanje raspodjele fungalnih metabolita na različitim udaljenostima od kolonije plijesni porasle na površini pekmeza pokazalo je da su mikotoksini raspoređeni po uzorku pekmeza, ali s udaljenošću od plijesni koncentracija mikotoksina opada.

6. LITERATURA

- Abdallah, M.F., Girgin, G., Baydar, T., Krska, R., Sulyok, M. (2017) Occurrence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in animal feed and maize samples from Egypt using LC-MS/MS. *J. Sci. Food Agric.* **97**, 4419-4428.
- Alshannaq, A., Yu, J.-H. (2017) Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mxcotoxins in Food. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **14**, 632-652.
- Barkai-Golan, R., Paster, N. (2008) Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. *World Mycotoxin J.* **1(2)**, 147-159.
- Dauthy, M. E. (1995) Fruit sugar preserves technology; jams, jellies, marmalade, fruit paste. U: Fruit and vegetable processing, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, Rome, Italy
- Delaš, F. (2010) Mikrobni toksini. U: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, (Hengl, B., ured.), Hrvatska agencija za hranu, Osijek, str. 31-49.
- Drusch, S., Ragab, W. (2003) Mycotoxins in fruits, fruit juices and dried fruits. *J. Food Prot.* **66**, 1514-1527.
- Duraković, S., Delaš, F., Stilinović, B., Duraković, L. (2002) Mikrobiologija biljnih proizvoda. U: Moderna mikrobiologija namirnica, Kugler, Zagreb, str. 169-212.
- Duraković, S., Duraković, L. (2003) Mikologija u biotehnologiji, Kugler, Zagreb
- European Food Safety Authority (EFSA) (2013) Scientific Opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed, *EFSA Journal*, **11(6)**, 3254, Parma, Italy, <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3254>>. Pristupljeno 10. listopada 2019.
- Fernández-Cruz, M.L., Mansilla, M.L., Tadeo, J.L. (2010) Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research* **1**, 113-122.
- Funes, G. J., Resnik, S. L. (2009) Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. *Food Control* **20**, 277-280.

Freire, L., Anderson, S.S. (2018) Modified mycotoxins: An update review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food and Chemical Toxicology* **111**, 189-205.

Frisvad, J.C., Hubka, V., Ezekiel, C.N., Hong, S.-B., Nováková, A., Chen, A.J., Arzanlou, M., Larsen, T.O., Sklenár, F., Mahakarachanakul, W., Samson, R.A., Houbaken, J. (2019) Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud. Mycol.* **93**, 1-63.

Galvano, F., Ritieni, A., Piva, G., Pietri, A. (2005) Mycotoxins in the human food chain. U: Mycotoxins Blue Book (Diaz DE, ured.), Nottingham University Press, str. 187-224.

Hrvatska agencija za hranu (HAH) (2012) Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje, Osijek, Hrvatska, <https://www.hah.hr/pregled-upisnika/?preuzmi_misljenje=27>. Pristupljeno 11. ožujka 2018.

Hussein, H. S., Brasel, J. M. (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167**, 101-134.

Juan, C., Manes, J., Font, G., Juan-García, A. (2017) Determination of mycotoxins in fruit berry by-products using QuEChERS extraction method. *LWT-Food Sci Technol.* **86**, 344-351.

Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I. P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T., Dussort, P. (2016) Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxins Res* **32**, 179-205.

Kumar, D., Barad, S., Sionov, E., Keller, N. P., Prusky, D. B. (2017) Does the Host Contribute to Modulation of Mycotoxin Production by Fruit Pathogens?. *Toxins* **9**, 280-293.

Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., Nehls, I. (2010) Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1595-1612.

Lattanzio, V. M. T., Pascale, M., Visconti, A. (2009) Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *Trends in Analytical Chemistry* **28**(6), 758-768.

Malachová, A., Sulyok, M., Beltrán, E., Berthiller, F., Krska, R. (2014) Optimisation and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering

295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J. Chromatogr. A* **1362**, 145–156.

Markov, K., Frece, J., Pleadin, J., Bevardi, M., Barišić, L., Gajdoš Kljusurić, J., Vulić, A., Jakopović, Ž., Mrvčić, J. (2019) *Gluconobacter oxydans* – potential biological agent for binding or biotransformation of mycotoxins. *World Mycotoxin J.* **12(2)**, 153-161.

Nair, R., Ghadevaru, S., Manimehali, N., Athmaselvi, K. A. (2015) Survey of Mycotoxin Levels in Ready-to-Eat Fruit Jam. *Journal of Ready to Eat Food* **2**, 1-5.

Olsen, M., Lindqvist, R., Bakeeva, A., Leong, S.L., Sulyok, M. (2019) Distribution of mycotoxins produced by *Penicillium* spp. inoculated in apple jam and crème fraiche during chilled storage. *International Journal of Food Microbiology* **292**, 13-20.

Olsen, M., Gidlund, A., Sulyok, M. (2017) Experimental mould growth and mycotoxin diffusion in different food items. *World Mycotoxin Journal* **10**, 153-161.

Ostry, V., Skarkova, J., Ruprich, J. (2004) Experimental contamination of foodstuffs with the spores of toxigenic micromycetes and the production of mycotoxins. *Mycotoxin Research* **20**, 31-35.

Pleadin, J., Vasilj, V., Petrović, D. (2018) Mikotoksini – Pojavnost, prevencija i redukcija, Sveučilište u Mostaru, Mostar.

Pravilnik o voćnim džemovima, želeima, marmeladama, pekmezu te zaslađenom kesten pireu (2019) *Narodne novine* **84**, Zagreb.

Rawat, S. (2015) Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research* **5**, 47-56.

Samson, R.A., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. (2010) *Food and Indoor Fungi*. CBS Laboratory Manual Series, vol. 2, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.

Samson, R.A., Frisvad, J.C. (2004) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology* **49**, 260.

Smedsgaard, J. (1997) Micro-scale extraction procedure for standardizes screening of fungal metabolite production in cultures. *J. Chromatogr. A* **760**, 264-270.

Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R. (2010) Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chem.* **119**, 408-416.

Škrbić, B., Antić, I., Cvejanov, J. (2017) Determination of mycotoxins in biscuits, dried fruits and fruits jams: an assessment of human exposure. *Food Addit. Contam. A* **34**, 1012-1025.

Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. O utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani. *Službeni list Europske Unije*, L 070/12.

Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani. *Službeni list Europske unije*, L 364/5.

Zakon o kontaminantima (2013) *Narodne novine* **39** (NN 39/13, 114/18)

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ime i prezime studenta