

U Osijeku, listopad 2014.

Znanstveno izvješće Hrvatske agencije za hranu vezano uz nalaz patulina u odabranim prehranbenim proizvodima

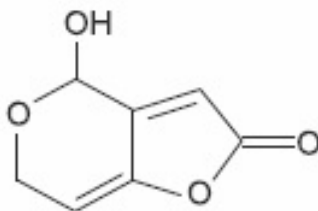
Patulin

Patulin je mikotoksin kojeg proizvode određene vrste plijesni, kao što su *Penicillium*, *Aspergillus* i *Byssoschlamys*, a koje mogu rasti na različitim namirnicama uključujući voće, žitarice i sir (FDA, 2001). Kemijski, patulin je poliketid lakton, relativno mala molekula ($C_7H_6O_4$) koja je topiva u vodi (Lawley, 2013). Može se izolirati u obliku bezbojnih do bijelih kristala. Točka tališta mu je na oko $110^{\circ}C$, a sublimira u visokom vakuumu na 70 do $100^{\circ}C$. Osim u vodi, topiv je i u metanolu, etanolu, acetonu i etil ili amil acetatu, a manje je topiv u dietil eteru i benzenu. Stabilan je u kiselim otopinama, ali se može razgraditi kuhanjem u sumpornoj kiselini (H_2SO_4) u trajanju od 6 sati. Kada se SO_2 koristi kao konzervans u voćnim sokovima ili drugoj hrani, patulin se razgrađuje (Kos i Krska, n.d.).

Birkinshaw i sur. (1943) su prvi uspješno izolirali patulin iz plijesni *Penicillium griseofulvum* i *Penicillium expansum* u nadi da će pronaći nove metabolite plijesni koji će imati antibiotska svojstva. Iz tog razloga je patulin prvotno bio klinički testiran kao antibiotik, ali je interes za njegova antibiotska svojstva ubrzo nestao, nakon otkrića o njegovoj toksičnosti za ljude i životinje (Puel i sur., 2010).

Patulin je pronađen u mnogim namirnicama uključujući: sok od jabuke, jabuke i kruške zahvaćene smeđom truleži, grožđe, brašno i slad u hrani za životinje. Međutim, s obzirom na prirodu same namirnice, tehnološki proces obrade ili načine konzumacije mnogih namirnica, patulin ne predstavlja sigurnosni problem. Na primjer, truli dijelovi većine voća i žitarica obično se odstranjuju prije konzumacije. U namirnicama kao što je sir, visoke koncentracije cisteina reagiraju s patulinom i tako ga inaktiviraju. Isto tako, zabilježeno je da se patulin uništava fermentacijom i stoga nije pronađen niti u voćnim alkoholnim pićima niti u octu napravljenom od voćnih sokova, ali je u jabučnom vinu (cideru) u koje se dodaje nefermentirani sok od jabuka. Termička obrada utječe na umjereno smanjenje razina patulina te stoga patulin, koji se nađe u soku od jabuka, preživljava procese pasterizacije (FDA,

2001). Iznimka od ovih pravila su jabuke i sok od jabuka, koji su, kao takvi, najvažniji izvor kontaminiranih namirnica patulinom u ljudskoj prehrani, a posebno sokovi koji se proizvode prešanjem svježih jabuka. Ostali voćni sokovi također mogu biti potencijalni izvor patulina ako su pomiješani sa sokom od jabuka (Kos i Krska, n. d.).



Slika 1 Strukturna formula patulina

Biosinteza patulina

Najveći proizvođač patulina je plijesan *Penicillium expansum* koja je odgovorna za čestu bolest koja se pojavljuje na jabukama nakon berbe (gnjiljenje, truljenje), odnosno tijekom skladištenja. Intenzitet biosinteze patulina ovisi o sljedećim okolišnim i endogenim čimbenicima:

- a_w – vrijednost
- temperatura
- pH
- stanje atmosfere (%-tni udio O_2 i CO_2)

Dakle, povećana koncentracija CO_2 tijekom skladištenja može utjecati na biosintezu patulina, no visoke koncentracije dovode do nekih promjena u jabuci poput smanjenja kakvoće, gubitka okusa i promjena na kori. Utjecaj nižeg udjela O_2 (pri $25^\circ C$) rezultira određenom promjenom koncentracije patulina, ali i fiziološkim promjenama na plodu jabuke.

Sljedeći parametar koji utječe na biosintezu je temperatura. Ovisno o soju plijesni, njezin optimalan porast i biosinteza patulina zabilježena je pri $25^\circ C$. Niže temperature ne zaustavljaju njegovu sintezu, već ju zbog sporijeg rasta plijesni, odgađaju. Isto tako, niske pH vrijednosti potiču sintezu patulina (Vasić – Rački, 2010).

Utjecaj patulina na zdravlje ljudi

Po pitanju **metabolizma** patulina, u studijama na štakorima, uočeno je da se većina primjenjene doze izlučila iz organizma putem fecesa i urina unutar 48 sati. Manje od 2% se izlučilo u obliku ugljičnog dioksida te nisu bili uočeni drugi metaboliti. Oko 2% od dane doze je ostalo u organizmu i nakon 7 dana i to većinom u eritrocitima (Wouters i Speijers, 1996).

Patulin ima snažan afinitet prema sulfhidrilnim skupinama, što objašnjava njegovo inhibirajuće djelovanje na mnoge enzime. Spojevi patulina s cisteinom pokazali su manju toksičnost od nepromijenjenog oblika u studijama o akutnoj toksičnosti, teratogenosti i mutagenosti (Wouters i Speijers, 1996).

Većina informacija o toksičnosti patulina je dobivena iz studija na životinjama, odnosno postoji vrlo ograničena količina podataka (eksperimentalnih ili epidemioloških) o akutnoj ili kroničnoj toksičnosti na ljudima (Lawley, 2013).

U studijama o **akutnoj toksičnosti** patulina na glodavcima, oralna doza LD₅₀ se kretala od 29 do 55 mg/kg t.m. Perad se pokazala otpornijom s oralnom dozom LD₅₀ na 170 mg/kg t.m. Kada se primjeni intravenozno, intraperitonealno ili supkutano, patulin je 3 do 6 puta toksičniji. Simptomi toksičnosti su: uznemirenost, u nekim slučajevima grčevi, otežano disanje, plućna zagušenja, oticanje i ulceracija, krvarenje i rastezanje gastrointestinalnog trakta (Puel i sur., 2010).

Kada se primjenjuje **subakutno** i **subkronično**, patulin najčešće uzrokuje poremećaje u gastrointestinalnom traktu s pojavom ulceracija, rastezanja i krvarenja, a pri visokim dozama i promjene u funkciji bubrega (**Tablica 1**).

Tablica 1 Pregled subakutnih i subkroničnih studija koje opisuju djelovanje patulina (Puel i sur., 2010)

Vrsta	Doza	Trajanje	Uočeni učinci
Miševi	24-36 mg/kg t.m. svaki dan ili svaki drugi dan	14 dana	crijevni poremećaji
Štakori	28-41 mg/kg t.m. svaki dan ili svaki drugi dan	14 dana	crijevni poremećaji
Štakori	25-295 mg/l u vodi za piće	28 dana	Smanjena tjelesna težina, snižen Cl kreatinin, čir na želudcu pri visokim dozama
Štakori	0,1 mg/kg t.m. svaki dan	30 dana	Sniženi lipidi, sniženi trigliceridi, povećan kolesterol, inhibicija crijevne ATP-aze
Štakori	6-150 mg/L u vodi za piće	13 dana	Smanjeni unos hrane, smanjena tjelesna težina pri visokim dozama
Štakori	0,1 mg/kg t.m. svaki dan	60 i 90 dana	Povišene razine testosterona i LH-a, promjene u morfologiji testisa i tiroidne žlijezde
Štakori	0,1 mg/kg t.m. svaki dan	60 i 90 dana	Smanjen broj spermija i promjene u njihovoj morfologiji
Hrčci	16 mg/kg t.m. svaki dan ili svaki drugi dan	14 dana	Crijevni poremećaji
Kokoši	100 µg svaki drugi dan	30 dana	Crijevni poremećaji, promjene u funkciji bubrega, inhibicija crijevnih i bubrežnih ATP-aza
Majmuni	5; 50; 500 µg/kg t.m. te 5 mg/kg t.m. svaki dan	30 dana; 45 dana	Nema toksičnosti, odbijanje hrane (pri visokoj dozi), promjene u funkciji bubrega (srednja doza)

Iako postoje različiti podaci o **genotoksičnosti** patulina, većina testova provedenih na stanicama sisavaca je bila pozitivna, dok su testovi na bakterijama bili negativni. Osim toga, neke studije pokazuju da patulin slabi sintezu DNA. Ovi genotoksični učinci mogu se odnositi na njegovu sposobnost da reagira sa sulhidrilnim skupinama te da izaziva oksidativna oštećenja. Kakogod, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, *engl. World Health Organization*), zaključila je temeljem dostupnih podataka da je patulin genotoksičan (Puel i sur., 2010).

Nekoliko studija dugoročne toksičnosti patulina je pokazalo nepostojanje tumora kod štakora koji su bili oralno izloženi patulinu u dozama od 0.1 do 2.5 mg/kg t.m./dan u trajanju od 74 do 104 tjedna. Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC, *engl. International Agency for Research on Cancer*), patulin je svrstan u grupu 3 kao „nije klasificiran kao kancerogen za ljude“ (Puel i sur., 2010). U studijama na štakorima, koje su ispitivale **embriotoksičnost i teratogenost**, patulin je pri dozama od 1,5 mg/kg t.m./dan uzrokovao smanjenje tjelesne težine kod potomaka, a pri dozi od 2 mg/kg t.m. pobačaj svih embrija. Kod miševa, ista oralna doza je uzrokovala smrt potomaka s krvarenjima mozga, pluća i kože. Kada se patulin ubrizgavao u kokošja jaja, pokazivao je embriotoksične učinke pri dozama od 2,35 do 68,7 µg/jaje i teratogenost pri dozama od 1 do 2 µg/jaje.

Kao što je slučaj i kod drugih mikotoksina, patulin može promijeniti **imunološki** odgovor domaćina. Mnogobrojne *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale da patulin ima antibiotsko djelovanje. Međutim, razine pri kojima je uočeno takvo djelovanje su veće od NOEL vrijednosti za akutnu, reproduktivnu, kroničnu toksičnost i kancerogenost (Puel i sur., 2010; Wouters i Speijers, 1996).

Zajednički stručni odbor FAO/WHO za prehrambene aditive (JECFA, *engl. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) je prvotno 1990. god. na svom 35. zasjedanju uspostavila PTWI za patulin od 7 µg/kg t.m. (JECFA, 1990). Ova odluka se temeljila na 109 – tjednoj studiji hranjenjem koju su proveli Becci i sur. (1981). U njoj su koristili doze od 0; 0,1; 0,5 i 1,5 mg/kg t.m. koje su se primjenjivale na oba spola štakora, 3 puta tjedno. Patulin je pri visokim dozama uzrokovao značajno povećanje smrtnosti štakora oba spola (u odnosu na kontrolnu grupu). Nisu zabilježeni štetni učinci (NOAEL, *engl. No Observed Adverse Effect Level*) u grupi koja je primala najnižu dozu od 0,1 mg/kg t.m./tri puta tjedno.

Naknadno je JECFA, na svom 44. zasjedanju 1995. donijela PMTDI (JECFA, 1995). Na temelju iste studije (Becci i sur., 1981), pošto je patulin bio primjenjivan samo 3 puta tjedno (a ne nakuplja se u tijelu), izračunat je NOEL na 43 µg/kg t.m./dan. Korištenjem faktora nesigurnosti od 100, uspostavljen je **PMTDI od 0,4 µg/kg/ t.m.** Znanstveni odbor za hranu Europske unije (SCF, *engl. Scientific Committee on Food*), tijekom svog plenarnog zasjedanja 2000. god., potvrdio je ovaj PMTDI te isti vrijedi i danas (SCF, 2000).

Zakonska regulativa

Patulin se ubraja u kratku listu mikotoksina (aflatoksin, ohratoksin A, zearalenon, fumonizin i trihoteceni) čija razina u hrani je zakonski regulirana u mnogim zemljama diljem svijeta pa tako i europskim koje su među prvima postavila granice u njegovim razinama. Na području Europske unije, patulin je zakonski reguliran sljedećim pravnim aktima:

- Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani
- Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani
- Commission Recommendation of 11 August 2003 on the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages (2003/598/EC)

Uredbom 1881/2006 uspostavljene su najveće dopuštene količine za patulin u određenim prehrambenim proizvodima. **Tablica 2** prikazuje isječak iz tablice koja se nalazi u Prilogu Uredbe 1881/2006, Odjeljak 2.: *Mikotoksini*, a koja propisuje najveće dopuštene količine za patulin.

Tablica 2 Najveće dopuštene količine za patulin u određenim prehrambenim proizvodima (1881/2006/EZ)

2.3.	Patulin	Najveće dopuštene količine (µg/kg)
2.3.1.	Voćni sokovi, rekonstituirani koncentrirani voćni sokovi i voćni nektari ¹⁴	50
2.3.2.	Alkoholna pića ¹⁵ , jabukovača i druga fermentirana pića dobivena od jabuka ili koja sadrže jabučni sok	50
2.3.3.	Jabučni proizvodi u krutom stanju, uključujući jabučni kompot i jabučni pire, za izravnu prehranu ljudi, osim hrane navedene u točkama 2.3.4. i 2.3.5.	25
2.3.4.	Jabučni sok i jabučni proizvodi u krutom stanju, uključujući jabučni kompot i jabučni pire, za dojenčad i malu djecu ¹⁶ , označeni i stavljeni na tržište kao takvi ⁴	10,0
2.3.5.	Dječja hrana, osim prerađene hrane na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu ^{3 4}	10,0

³ Hrana navedena u ovoj kategoriji kako je definirana u Direktivi Komisije 96/5/EZ od 16. veljače 1996. o prerađenoj hrani na bazi žitarica i hrani za dojenčad i malu djecu (SL L 49, 28.2.1996., str. 17.), kako je zadnje izmijenjena Direktivom 2003/13/EZ (SL L 41, 14.2.2003., str. 33.).

⁴ Najveća dopuštena količina odnosi se na proizvode spremne za uporabu (koji se kao takvi stavljaju na tržište ili nakon pripreme prema uputama proizvođača).

¹⁴ Hrana navedena u ovoj kategoriji kako je definirana u Direktivi Vijeća 2001/112/EZ od 20. prosinca 2001. o voćnim sokovima i određenim sličnim proizvodima namijenjenim prehrani ljudi (SL L 10, 12.1.2002., str. 58.).

¹⁵ Hrana navedena u ovoj kategoriji kako je definirana u Uredbi Vijeća (EEZ) br. 1576/89 od 29. svibnja 1989. o utvrđivanju općih pravila za definiranje, opis i prezentiranje jakih alkoholnih pića (SL L 160, 12.6.1989., str. 1.), kako je zadnje izmijenjena Protokolom o uvjetima i aranžmanima pristupanja Republike Bugarske i Rumunjske Europskoj uniji.

¹⁶ Dojenčad i mala djeca kako su definirana u Direktivi 91/321/EEZ i Direktivi 96/5/EZ.

Uredba 401/2006 točno propisuje metode uzorkovanja za pojedine prehrambene proizvode te kriterije učinkovitosti primjenjivane laboratorijske metode.

Preporuka 2003/598/EC donosi čitav niz preventivnih mjera koje se trebaju poduzeti radi smanjenja kontaminacije patulinom soka od jabuke i ostalih napitaka koji sadrže sok od jabuke. I Codex Alimentarius je 2003. god. donio preporuku s nizom sličnih preventivnih mjera (Codex Alimentarius, 2003).

U Republici Hrvatskoj (RH), patulin je zakonski reguliran Zakonom o kontaminantima (2013), koji sadrži odredbe koje su u skladu s Uredbama 1881/2006/EZ i 401/2006/EZ.

Procjena rizika

Hrvatska agencija za hranu (HAH), kao službeno tijelo za procjenu rizika u hrani za RH, zaprimila je podatke za 2013. god. o ispitivanjima određenih prehrambenih namirnica na količine patulina. Ispitivanja su bila provedena na inicijativu Ministarstva zdravlja, u suradnji sa Zavodom za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ iz Zagreba.

Analizirano je ukupno 12 uzoraka tokom ljeta i jeseni 2013. god. U 11 uzoraka pronađene razine patulina su bile ispod granica kvantifikacije, dok je samo 1 uzorak sadržavao patulin u količinama većim od zakonski propisanih najvećih dopuštenih količina (**Tablica 5**).

Prema podacima o prehrambenim navikama za RH s kojima raspolaže HAH, a s obzirom na dostavljene analitičke podatke, napravljena je procjena rizika. U obzir je uzet najgori mogući scenarij gdje se pretpostavlja da će svaki proizvod kojeg neka osoba konzumira, sadržavati maksimalno utvrđenu količinu patulina, koja iznosi 59 µg/kg proizvoda. Prehrambene navike se odnose na osobe starosti od 18 do 64 godine te s prosječnom tjelesnom masom od 70 kg.

Tablica 3 Izračun izloženosti patulinu prosječnog konzumenta soka od jabuka

Prosječna konzumacija soka od jabuke [g/dan]	221,57
Izloženost [µg] patulinu prosječnog konzumenta, ako konzumira sok koji sadrži 59 µg patulina/kg proizvoda	13,07
Postotak [%] PMTDI-a	47

Tablica 4 Izračun izloženosti patulinu konzumenta soka od jabuka na 90-oj percentili

Konzumacija soka od jabuka na 90-oj percentili	337,5
Izloženost [µg] patulinu konzumenta na 90-oj percentili, ako konzumira sok koji sadrži 59 µg patulina/kg proizvoda	19,91
Postotak [%] PMTDI-a	71

Tablica 5 Analitički rezultati ispitivanja koncentracija patulina u hrani

Parametar pretrage	Zemlja podrijetla	Mjesto uzorkovanja	Period	Najveće dopuštene količine prema Zakonu (2013) [$\mu\text{g}/\text{kg}$ proizvoda]	Pronađene koncentracije patulina [$\mu\text{g}/\text{kg}$ proizvoda]	Opis proizvoda
Patulin	Njemačka	Velika Gorica	srpanj	50	< 5	Osvježavajuće bezalkoholno piće s kašom od breskve
Patulin	Hrvatska	Velika Gorica	srpanj	50	< 5	Jabuka sok
Patulin	Hrvatska	Veliko Vukovlje	lipanj	50	< 5	Matični sok
Patulin	Hrvatska	Kozarevac	lipanj	50	59	Čisti prirodni sok od jabuke
Patulin	Hrvatska	Virovitica	svibanj	50	< 5	Nektar od jabuke
Patulin	Hrvatska	Bjelovar	studeni	50	< 5	Naranča sirup za priremu osvježavajućeg bezalkoholnog napitka
Patulin	Hrvatska	Varaždin	studeni	50	< 5	Kašasti nektar breskva, marelica, jabuka
Patulin	Austrija	Poreč	rujan	50	< 5	Sok od jabuka
Patulin	Hrvatska	Varaždin	studeni	50	< 5	Nektar od jabuka
Patulin	Mađarska	Poreč	rujan	10	< 5	Prva jabuka za dojenče
Patulin	Mađarska	Poreč	rujan	10	< 5	Prva jabuka za dojenče
Patulin	Austrija	Poreč	rujan	50	< 5	Sok od jabuka

Kao što je vidljivo iz **Tablica 3** i **4**, izloženost patulinu konzumenata soka od jabuke iznosi 47% PMTDI-a za prosječne konzumente te 71% PMTDI-a za visoke konzumente (na 90-oj percentili). Iz ovog izračuna se može zaključiti da rizika od konzumacije uzorka koji sadrži patulin u koncentraciji od 59 µg/kg proizvoda, nema. U prilog ovome zaključku ide i činjenica da patulin prvenstveno ima kronično štetno djelovanje pri nižim koncentracijama.

Preporuke

Iako stvarnog rizika po konzumente soka od jabuke nema (s obzirom na analitičke rezultate 12 uzoraka), jedan uzorak je prema nalazu nesukladan jer premašuje najveće dopuštene količine patulina propisane Zakonom (2013). Kako je analiziran relativno mali broj uzoraka, nužno je analize proširiti na više uzoraka te kontinuirano pratiti kretanja koncentracija patulina u prehrambenim proizvodima, odnosno proizvodima koji sadrže sok od jabuka.

Proizvođači su i dalje pozvani koristiti sve preventivne mjere koje su predložene u Preporuci 2003/598/EC, kao i u Codex Alimentariusu (Codex Alimentarius, 2003), a koje se tiču smanjenja koncentracija patulina, kako u sirovini, tako i u konačnom proizvodu.

Literatura

Becci PJ, Hess FG, Johnson WD, Gallo MA, Babish JG, Dailey RE, Parent RA (1981): Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. *Journal of Applied Toxicology*, 1(5):256-261.

Birkinshaw JH, Michael SE, Bracken A, Raistrick H (1943): Patulin in the common cold collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier. II. Biochemistry and Chemistry. *Lancet*, 245, 625.

Codex Alimentarius (2003): *Code of Practice for the Prevention and Reduction of Patulin Contamination in Apple Juice and Apple Juice Ingredients in Other Beverages*. Codex Alimentarius, CAC/RCP 50-2003.

Commission Recommendation of 11 August 2003 on the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages (2003/598/EC). Official Journal of the European Union, L203/54.

FDA, U.S. Food and Drug Administration (2001): *Patulin in Apple Juice, Apple Juice Concentrates and Apple Juice Products*. Dostupno na:

<http://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/NaturalToxins/ucm212520.htm>

(26.09.2014.).

JECFA, The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1990): *Evaluation of certain food additives and contaminants*. WHO Technical Report Series, No.789,1990, and corrigenda

JECFA, The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1995): *Evaluations of certain food additives and contaminants*. WHO Technical Report Series, No.859,1995

Kos G, Krska R (n.d.): *Patulin*. ENAM, dostupno na:

<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=26> (30.09.2014.).

Lawley R (2013): *Patulin*. Food Safety Watch, dostupno na:

<http://www.foodsafetywatch.org/factsheets/patulin/> (29.09.2014.).

Puel O, Galtier P, Oswald IP (2010): Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins*, 2, 613-631; doi:10.3390/toxins2040613.

SCF, Scientific Committee on Food (2000): *Minute Statement on Patulin Expressed by the Scientific Committee on Food during the plenary meeting on 8 March 2000*.

Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani. Official Journal of the European Union, L364/5.

Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani. Official Journal of the European Union, L70/12.

Vasić – Rački Đ, Galić K, Delaš F, Klapac T, Kipčić D, Katalenić M, Dimitrov N, Šarkanj B (2010): *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek.

Wouters MFA, Speijers GJA (1996): *Patulin*. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva.

Zakon o kontaminantima (2013). Narodne novine, br. 39/13.