

# Otpornosti tradicionalnih hrvatskih sorti jabuka na kontaminaciju s plijesni *Penicillium expansum* i patulinom tijekom skladištenja

---

Vilić, Ružica

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:408762>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-25**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Ružica Vilić

OTPORNOSTI TRADICIONALNIH HRVATSKIH SORTI JABUKA NA  
KONTAMINACIJU S PLIJESNI *PENICILLIUM EXPANSUM* I PATULINOM  
TIJEKOM SKLADIŠTENJA

diplomski rad

Osijek, rujan, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju  
Katedra za ekologiju i toksikologiju  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Opasnosti vezane za hranu  
**Tema rada** je prihvaćena na VII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 29. travnja 2021.  
**Mentor:** dr. sc. Tihomir Kovač  
**Komentor:** doc. dr. sc. Ante Lončarić

**OTPORNOSTI TRADICIONALNIH HRVATSKIH SORTI JABUKA NA KONTAMINACIJU S PLIJESNI *PENICILLIUM EXPANSUM* I PATULINOM TIJEKOM SKLADIŠTENJA**

Ružica Vilić, 0113137094

**Sažetak:** Tradicionalne sorte jabuka predstavljaju visoko vrijednu sirovinu za prehrambenu industriju. Većina tradicionalnih sorti sadrži visoke količine ukupnih polifenolnih spojeva. Ti spojevi imaju snažan utjecaj na stabilnost kao i na mogućnost dugotrajnijeg očuvanja ploda jabuke. Cilj rada bio je ispitati otpornost tradicionalnih sorti jabuka 'Mašanka', 'Petrovnjača', 'Wagner', 'Kleker' i 'Adamovka' na zarazu s plijesni *Penicillium expansum* i produkciju patulina. Također, određen je polifenolni profil ispitivanih sorti prije i nakon skladištenja. Rezultati su pokazali kako sorta 'Mašanka' ima najviši sadržaj ukupnih polifenola u svježem uzorku i nakon tri mjeseca skladištenja. Patulin je identificiran i kvantificiran u 'Petrovnjači' (prije skladištenja), 'Mašanka' i 'Wagner' (nakon skladištenja). Dobiveni rezultati doprinose boljem uvidu na otpornost tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *P. expansum*, ali i polifenolnom profilu ispitivanih sorti.

**Ključne riječi:** Jabuke, tradicionalne sorte, polifenoli, patulin, *Penicillium expansum*,

**Rad sadrži:** 44 stranica  
21 slika  
3 tablica  
38 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |    |                                      |                 |
|----|--------------------------------------|-----------------|
| 1. | Doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i> | predsjednik     |
| 2. | dr. sc. <i>Tihomir Kovač</i>         | član-mentor     |
| 3. | Doc. dr. sc. Ante Lončarić           | član - komentor |
| 4. | Doc. dr. sc. Antun Jozinović         | zamjena člana   |

**Datum obrane:** 28. rujna 2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Applied Chemistry and Ecology  
Subdepartment of ecology and Toxicology  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia  
Graduate program Food Engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Food hazards

**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. VII. held on April 29, 2021.

**Mentor:** Tihomir Kovač, PhD

**Technical assistance:** Ante Lončarić, PhD, assistant prof.

### RESISTENCE OF TRADITIONAL CROATIAN APPLE VARIETIES ON CONTAMINATION WITH *PENICILLIUM EXPANSUM* AND PATULIN DURING STORAGE

Ružica Vilić, 0113137094

**Summary:** Traditional varieties of apples are a highly valuable raw material for the food industry. Most traditional varieties contain high amounts of total polyphenolic compounds. These compounds have a strong effect on the stability as well as on the possibility of long-term preservation of the apple fruit. The aim of this study was to examine the resistance of traditional apple varieties 'Mašanka', 'Petrovnjača', 'Wagner', 'Kleker' and 'Adamovka' to infestation with *P. expansum* and patulin production. Also, the polyphenolic profile of the tested varieties before and after storage was determined. The results showed that the cultivar 'Mašanka' has the highest content of total polyphenols in the fresh sample even after three months of storage. Patulin was identified and quantified in 'Petrovnjača' (before storage), 'Mašanka' and 'Wagner' (after storage). The obtained results contribute to a better insight into the resistance of traditional apple varieties to infestation with the mold *P. expansum*, but also to the polyphenolic profile of the examined varieties.

**Key words:** apples, traditional apple varieties, polyphenols, patulin, *Penicillium expansum*

**Thesis contains:** 44 pages  
21 figures  
3 tables  
38 references

**Original in:** Croatian

Defense committee:

- |   |                        |
|---|------------------------|
| 1. Krunoslav Aladić, PhD, assistant prof. | chair person           |
| 2. Tihomir Kovač, PhD                     | supervisor             |
| 3. Ante Lončarić, PhD, assistant prof.    | Member – co-supervisor |
| 4. Antun Jozinović, PhD, assistant prof.  | stand-in               |

**Defense date:** September 28, 2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

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

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. TRADICIONALNE SORTE JABUKA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2. POLIFENOLI</b> .....	<b>5</b>
2.2.1. FLAVONOIDI.....	6
2.2.2. FENOLNE KISELINE.....	7
2.2.3. POLIFENOLI U JABUKAMA .....	8
<b>2.3. PLIJESNI</b> .....	<b>9</b>
2.3.1. PLIJESNI RODA <i>PENICILLIUM</i> .....	10
2.3.2. <i>PENICILLIUM EXPANSUM</i> .....	11
2.3.3. PATULIN.....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>16</b>
3.2.1. 'Mašanka' .....	16
3.2.2. 'Petrovnjača' .....	17
3.2.3. 'Wagner' .....	17
3.2.4. 'Adamovka' .....	17
3.2.5. 'Kleker' .....	17
3.2.6. Priprema ekstrakta tradicionalnih sorti jabuka .....	18
3.2.7. Određivanje polifenola u uzorcima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) .....	18
3.2.8. Priprema inokuluma plijesni <i>P. expansum</i> .....	19
3.2.9. Određivanje otpornosti odabranih sorti jabuka na <i>P. expansum</i> .....	19
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>21</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>32</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>37</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>39</b>
<b>8. PRILOZI</b> .....	<b>POGREŠKA! KNJIŽNA OZNAKA NIJE DEFINIRANA.</b>

### **Popis oznaka, kratica i simbola**

**PDA** – krumpirov glukozni agar (engl. Potato Dextrose Agar)

**HPLC** – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High-Performance Liquid Chromatography)

**LC-MS/MS** – Tekućinski kromatograf i maseni spektrometar (engl. liquid chromatography-mass spectrometry)

## **1. UVOD**



Voće koje se najviše uzgaja u Hrvatskoj su jabuke. Dugogodišnjim radom stvoren je veliki broj različitih vrsta jabuka (preko 10000) koje se razlikuju u određenim karakteristikama. Osim po boji, okusu, mirisu, obliku, građi, razlikuju se i po fizikalno-kemijskim i nutritivnim svojstvima.

Hrvatska ima drugu tradiciju voćarstva zbog svog zemljopisnog položaja, klimatskih uvjeta i visoke kvalitete voćarskih kultura, posebno plodova jabuke. Jabuke se mogu koristiti za formulaciju funkcionalne hrane bilo u prerađenom obliku ili kao nusproizvod. Trenutno raste potražnja za funkcionalnom hranom dobivenom iz starih tradicionalnih biljnih izvora jer su prepoznati kao vrijedan izvor bioaktivnih sastojaka koji promiču zdravlje. Gledajući nutritivne vrijednosti, plodovi jabuke sadrže šećere, kiseline, vitamine, minerale, pektine i vodu.

S obzirom na to da je Hrvatska zemlja s dugom tradicijom proizvodnje i prerade voća ona zauzima važno mjesto za gospodarstvo, agronomiju i javno zdravstvo. Stare voćne sorte u Hrvatskoj vrijedna su prirodna baština, kojoj se u današnje vrijeme ne pridodaje dovoljno pozornosti za popularizaciju i preradu. Razlog tomu je što su se stare sorte jabuka uglavnom uzgajale lokalno u malim voćnjacima i nisu bile uključene u znanstvene programe uzgoja.

Kvalitetu ploda jabuke određuju vanjske i unutarnje karakteristike. Vanjska kvaliteta ploda određena je bojom, oblikom i veličinom, dok unutarnju kvalitetu određuju okus, tekstura, aroma, hranjiva vrijednost, slatkoća i kiselost.

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji posjeduju različita svojstva s dokazanim pozitivnim učinkom na zdravlje (anitoksidativna, antifungalna, anikancerogena, protuupalna svojstva i dr.). Jabuke su bogate polifenolima iz različitih skupina (fenolne kiseline, antocijanini, flavonoli, proantocijanidini) koje su ujedno i razlog proučavanju jabuka kao izvor vrijednih spojeva. Polifenolni profil tradicionalnih sorti jabuka je oskudno istražen, a ovaj rad će doprinijeti boljem uvidu u identifikaciju i kvantifikaciju pojedinih polifenola.

Cilj diplomskog rada je primjenom znanstvenih metoda te korištenjem dostupne odgovarajuće literature napraviti pregled dosadašnjih spoznaja o kontaminaciji jabuka s plijesni *P. expansum* te slijednoj produkciji patulina tijekom skladištenja jabuka. Nadalje, eksperimentalno je određena otpornost tradicionalnih sorti jabuka na kontaminaciju s plijesni *P. expansum* te producirana koncentracija patulina nakon 3 mjeseca skladištenja jabuka.

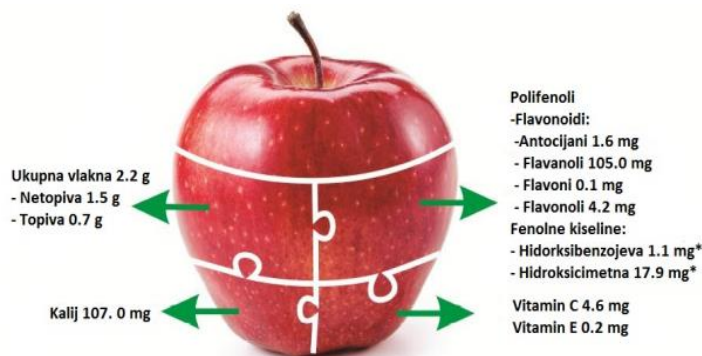
## **2. TEORIJSKI DIO**

### 2.1. TRADICIONALNE SORTE JABUKA

Tradicionalnim voćnim vrstama, poput jabuka, ne pridonosi se dovoljno pažnje s aspekta prerade iako su dragocjeno prirodno bogatstvo (Jemrić, 2016). One predstavljaju visokovrijednu sirovinu za prehrambenu industriju od koje se mogu proizvoditi razni proizvodi, kao što su sokovi, rakija, čips, a može se koristiti i kao dodatak za džemove, marmelade i sl. Osim prehrambene vrijednosti uzgoj tradicionalnih sorti jabuke može pozitivno utjecati na razvoj ruralnih područja, predstavljati prepoznatljiv dio kulturne baštine važne za očuvanje bioraznolikosti, ali one mogu poslužiti i u svrhu oplemenjivanja kao bogat izvor gena za razna poželjna svojstva (Babojelić, 2019).

Tradicionalne sorte jabuka se uglavnom uzgajaju u voćnjacima, gdje pokazuju dobru prilagodljivost lokalnom okruženju. Mnoge takve sorte jabuka nose gene za otpornost na štetnike i bolesti te imaju toleranciju na sušu i jedinstvenu kvalitetu ploda (Lončarić, 2019). Plod jabuke ima gotovo sve što je potrebno ljudskom organizmu: voćne šećere, kiseline, vitamine, minerale, pektine i vodu (Krpina i sur., 2004).

Jabuke su važne zbog svoje nutritivne vrijednosti. Bogate su različitim hranjivim tvarima i imaju značajnu količinu bioaktivnih spojeva, poput polifenola. Mnogo je toga nepoznato o starim tradicionalnim autohtonim sortama te u zadnjih nekoliko godina zbog toga postaju aktivno područje istraživanja. Pokazatelji kvalitete nisu toliko poznati za ove sorte koliko za komercijalne. Govoreći o polifenolima, poznato je da autohtone sorte jabuka imaju iste skupine polifenola kao komercijalne sorte, ali njihove količine nisu utvrđene. Dostupni literaturni podatci upućuju kako stare sorte sadrže više polifenola u usporedbi s komercijalnim ili su u nekim studijama količine bile slične (Jakobek i sur., 2020). Tradicionalne sorte jabuka su iz tog razloga potencijal za proizvodnju funkcionalnih proizvoda s većim iskorištenjem bioaktivnih spojeva (Putnik i sur., 2017). Takvi proizvodi ili aditivi na bazi jabuka (npr. liofilizirane jabuke) povećali bi vrijednost proizvoda, a bili bi zanimljivi za potrošače koji su sve više orijentirani prema hrani koja promovira zdravlje. Sadržaj polifenola, vlakana, vitamina i minerala jabuke prikazan je na **Slici 1**.



Slika 1. Prikaz sastava jabuke na 100 g ploda (Bondonno i sur., 2017)

## 2.2. POLIFENOLI

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koje karakterizira velik i raznolik niz jedinstvenih bioaktivnih svojstava. Zbog njihovih blagotvornih učinaka na biljke i ljude predmet su mnogih istraživanja. Ovi spojevi su odgovorni za organoleptička i hranjiva svojstva hrane biljnog podrijetla (Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Široko su rasprostranjeni u prirodi i značajno prisutni u ljudskoj prehrani, osobito u voću, povrću, crnom vinu, čokoladi i čaju (Čović i sur., 2009).

Polifenoli mogu sudjelovati u interakcijama između biljke i njenog biološkog okoliša, ali nisu bitni za rast, razvoj ili reprodukciju (Khadem i sur., 2010). Pojavljuju se i dokazi o njihovoj ulozi u prevenciji različitih bolesti poput raka, kardiovaskularnih bolesti te dijabetesa tipa II. Osim toga, imaju antioksidativno, antifungalno, protuupalno djelovanje i dr. Učinci polifenola na zdravlje ovise o količini koja je konzumirana i njihovoj bioraspoloživosti, odnosno stvarnim količinama koje su adsorbirane (Manach, 2004). Interakcije koje se događaju u hrani kao što je stvaranje nekovalentnih veza između polifenola i prehrambenih vlakana mogu doprinijeti boljoj biodostupnosti i bioraspoloživosti polifenola. Prehrambena vlakna u ovim slučajevima služe kao „nosači“ visokovrijednih polifenolnih spojeva kroz probavni sustav (Jakobek, 2015).

Ovisno o broju fenolnih prstenova koje sadrže te na temelju strukturnih elemenata koji te prstenove međusobno vežu polifenoli se dijele u više skupina (Pandey i sur., 2009). Dvije osnovne skupine su flavonoidni i ne-flavonoidni polifenoli (Khadem i sur., 2010). Nadalje, na

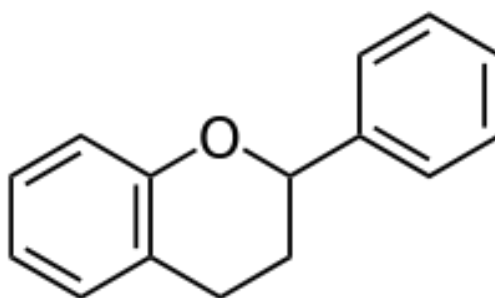
osnovu kemijskih struktura oni se dijele na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Pandey i sur., 2009).

Skladištenje namirnica može utjecati na sadržaj polifenola, odnosno može doći do razgradnje tih spojeva jer su podložni oksidaciji. Reakcijama oksidacije može doći do nastajanja jedne ili više polimernih molekula, što dovodi do raznih promjena u kvaliteti i organoleptičkim svojstvima koje nekada mogu biti poželjne (crni čaj) ili nepoželjne (smeđa boja narezanog voća). Priprema hrane također može utjecati na količinu prisutnih polifenola u namirnici. S obzirom na to da se polifenoli u najvećim koncentracijama nalaze u vanjskim dijelovima voća i povrća, iako ih ima i u unutrašnjim dijelovima u manjoj količini, guljenjem voća i povrća njihov udio je značajno smanjuje u finalnom proizvodu. Termičkom pripremom hrane također dolazi do znatnog gubitka polifenola (Manach i sur., 2004).

### 2.2.1. FLAVONOIDI

Flavonoidi su široko rasprostranjena skupina polifenolnih spojeva, a poznati su po antibakterijskim, sedativnim, antioksidacijskom, antimutagenim, antialergijskim i drugim sličnim svojstvima. Flavonoidi imaju antioksidativno djelovanje na više načina, a najznačajnije je njihovo djelovanje kao hvatači slobodnih radikala (Kazazić, 2004).

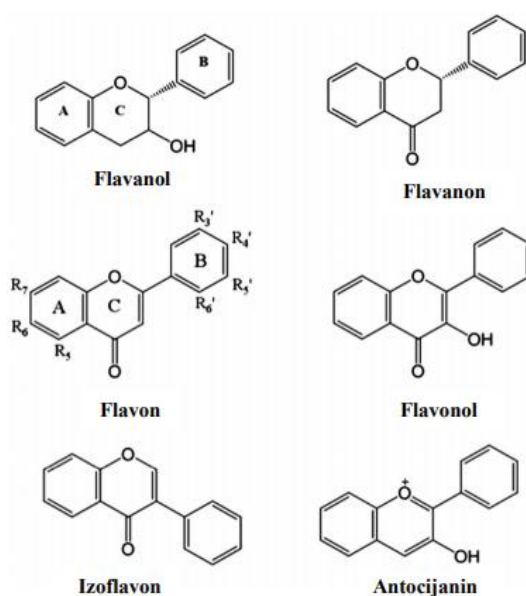
Osnovnu strukturu čini difenilpropanski kostur, tj. dva benzenska prstena povezana piranskim prstenom koji sadrži kisik (Kazazić, 2004). Navedena struktura je prikazana na **Slici 2**.



**Slika 2.** Osnovna struktura flavonoida (Kumar i sur., 2013)

Ovi spojevi podijeljeni su na nekoliko podgrupa: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, izoflavoni, flavani, flavanoli, procijanidini halkoni, dihidrohalkoni, flavan-3,4-dioli i antocijanini. Rasprostranjeni su u prirodi najčešće u obliku glikozida, a gotovo većina

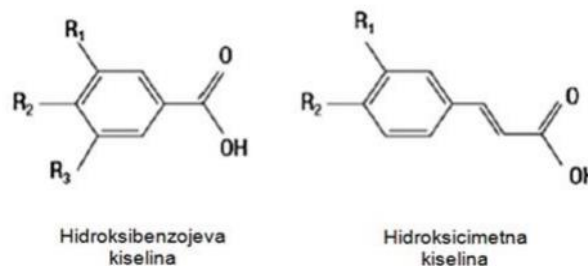
flavonoida biljaka nalazi se u obliku glikozida. Glikozidi su povezani različitim molekulama šećera. Osim šećera, supstitucijske skupine koje se nalaze na osnovnoj jezgri su metoksi i hidroksilna skupina. Navedena strukturna varijabilnost, doprinosi velikoj raznolikost tih spojeva. (Jakobek, 2007). Podjela flavonoida i njihova kemijska struktura prikazana je na **Slici 3.**



**Slika 3.** Kemijske strukture podskupina flavonoida (Bordenave i sur., 2014)

### 2.2.2. FENOLNE KISELINE

Fenolne kiseline imaju značajno prisustvo u hrani naročito u voću. Sekundarni su metaboliti biljaka, a stvaraju se kao odgovor na okolišne uvjete kao što su svijetlo i temperatura (Shaidi i sur., 2016). Nakon flavonoida, najveću važnost i rasprostranjenost biljnih polifenola čine upravo fenolne kiseline. Strukturu ovih kiselina čini benzenski prsten koji je povezan karboksilnom skupinom (Lafay i sur., 2008). Na osnovu njihove strukture fenolne kiseline se dijele na hidroksibenzojeve kiseline (derivati benzojeve kiseline) i hidroksicimetne kiseline (derivati cimetne kiseline) (Khadem i sur., 2010). Kemijske strukture ovih kiselina prikazane su na **Slici 4.**



**Slika 4.** Kemijska struktura hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Ignat i sur., 2011)

Hidroksibenzojeve kiseline koje su najzastupljenije u biljkama su: galna, protokatehinska, vanilinska, gentistinska, siringinska i elaginska kiselina. One mogu nastati izravno iz međuprodukata puta šikiminske kiseline, ali u biljkama najčešće nastaju degradacijom derivata cimetne kiseline (Russell i sur., 1999).

Najzastupljenije hidroksicimetne kiseline su: kumarinska, klorogenska, ferulična i kafeinska kiselina. Osim u procesiranoj hrani, rijetko ih se nalazi u slobodnom obliku, a u vezanom obliku su: esteri šikiminske, vinske i kafeinske kiseline (Shaidi i sur., 2016; Manach i sur., 2004).

### 2.2.3. POLIFENOLI U JABUKAMA

Jabuke su važan izvor polifenola u ljudskoj prehrani, te su pokazale mnoge potencijalno korisne učinke na ljudsko zdravlje. Stare, tradicionalne sorte jabuka uzgajane u prošlosti također bi mogle biti vrijedne sorte, ali za sada se malo zna o njihovim polifenolnim spojevima (Jakobek i sur., 2020). Najveća koncentracija slobodnih fenola nalazi se u jabukama u usporedbi s drugim voćem, te se iz tog razloga ovi spojevi mogu asimilirati u većim količinama (Boyer i sur., 2004).

Polifenoli jabuka posebno su proučavani zbog njihovih blagotvornih učinaka u ublažavanju plućne arterijske hipertenzije inducirane hipoksijom, te zbog njihovog terapijskog potencijala za pretilost i srodnih metaboličkih poremećaja. Tradicionalne, stare sorte jabuka mogu se istaknuti među ostalim sortama jabuka koje su dostupne na tržištu. Primjerice, neki ljudi mogu razvit netoleranciju prema komercijalnim sortama jabukama, te se u tim slučajevima tradicionalne sorte jabuka primijeniti u prehrani. Ovakve činjenice naglašavaju važnost očuvanja i primjene tradicionalnih sorti jabuka u prehrani (Jakobek i sur., 2020).

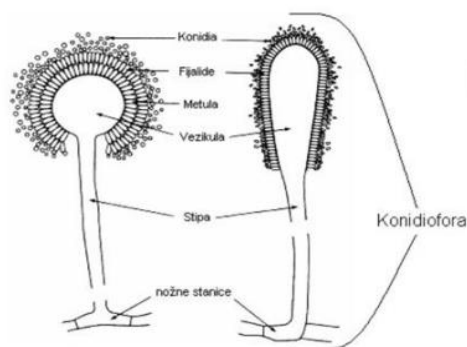
Polifenoli koji se najčešće u većim količinama nalaze u jabukama su: klorogenska kiselina, katehin, epikatehin, floretin, kvercetin i floridzin. Fenolni spojevi u plodu jabuke nisu ravnomjerno raspoređeni, tj. određene komponente fenolnih spojeva prisutne su u određenim dijelovima ploda, dok ih je vrlo malo ili ih uopće nema u preostalim dijelovima. Iz tog razloga mnogi istraživači predlažu da se kora jabuke ili jezgra jabuke koristi kao nusproizvod ili otpad za naknadnu ekstrakciju fenolnih spojeva (Duralija i sur., 2021).

### 2.3. PLIJESNI

Plijesni su velika skupina gljiva kod kojih je tijelo građeno od gustog sustava cjevastih stanica bez klorofila, obično bezbojnih (Duraković i sur., 2001). Nitaste su građe, a niti, odnosno hife promjera su od 2 do 10  $\mu\text{m}$  i rastu kao isprepletana masa - micelij (Duraković 1996).

Jedna od podjela plijesni bazira se na tome jesu li im hife septirane, odnosno pregrađene ili nisu. Septirane hife su poprečno pregrađene nitima koje nazivamo septa, koje hife pregrađuju u pojedinačne stanične dijelove. Spomenuti septumi sadrže pore koje omogućuju strujanje citoplazme i brojne stanične organele. Kod neseptiranih hifa nema fizičke granice prema kojoj bi se unutar hife razlikovale pojedinačne stanice. S obzirom da ne sadrže klorofil same ne mogu proizvoditi hranu putem svjetlosti (Duraković, 1996).

Micelij se prikazuje kao prašnjava prevlaka koja može biti i paučinasta te se rasprostire po podlozi. Razlikuje se bazalni micelij, koji služi za crpljenje hranjivih tvari iz okoline, odnosno zračni micelij, koji se diže u zrak i koji je reproduktivan. Neke hife zračnog micelija tvore posebne ogranke na kojima nastaju spore. Micelij tvori tijelo plijesni koje se još naziva i talus (Karaklašević, 1980). Građa plijesni prikazana je na **Slici 5**.



**Slika 5.** Osnovna građa plijesni (Karaklašević, 1980)



Plijesni su većinom mezofili, odnosno rastu pri sobnoj temperaturi. Optimalna temperatura za rast i razvoj plijesni je između 25 i 30 °C, a nekolicina njih raste i na višim temperaturama od 35 do 37 °C (Filtenborg i sur., 2004). Čest su uzrok kvarenja raznih prehrambenih proizvoda koji se skladište, ali i samih sirovina. Uzrokuju promjene kao što su razgradnja organskih spojeva, pigmentata, gubitak klijavosti zrna, zagrijavanje, pljesniv miris, što sve zajedno umanjuje kakvoću sirovog i gotovog proizvoda. Većina gljiva, odnosno plijesni, raste pri niskim pH-vrijednostima, od 5,0 do 6,0 i podnose velike koncentracije šećera (Duraković i sur., 2003).

S plijesnima se susrećemo svakodnevno jer one rastu na kruhu, voću, povrću, siru, itd. Neke vrste uzrokuju infektivne bolesti kod ljudi i životinja, razgrađuju hranu, dok neke pak sintetiziraju toksične spojeve - mikotoksine. Pri određenim koncentracijama mikotoksini uzrokuju trovanje, a moguće i smrt kod ljudi i životinja. Plijesni prisutne u hrane najčešće pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Rhizopus* i *Eurotium* (Filtenborg i sur., 2004).

### 2.3.1. PLIJESNI RODA *PENICILLIUM*

*Penicillium* je rod koji ima oko 200 priznatih vrsta, od kojih se oko 50 vrsta uobičajeno pojavljuje u prirodi, a samo je mali broj prirodno izoliran iz namirnica. Ovaj rod (tri vrste roda *Penicillium*: *P. candidum*, *P. expansum* i *P. glaucum*.) je prvi opisao John H. F. Link (1767.-1851.), mikrobiolog i profesor botanike u Rostocku 1809. godine. Glavno obilježje roda *Penicillium* je proizvodnja metličastih konidiospora, gustih četkastih nakupina koje proizvode aseksualne spore, a mogu biti jednostavne ili razgranate. Tijekom rasta na hrani predstavnici ovoga roda su plave do zeleno-plave boje, a mogu biti i krem, crne, sivoplave. Neke vrste uzrokuju zeleno pljesnivo truljenje limuna i plavo pljesnivo truljenje jabuka, breskvi krušaka, ali i agruma te koštunjicavog voća. Pripadnici ovog roda imaju sposobnost prilagodbe i razvoja u gotovo svim okruženjima i širokom rasponu aktiviteta vode, temperature i pH (Duraković i sur., 2001; Pleadin i sur., 2018; Errampalli, 2014).

Unutar roda *Penicillium* postoji četiri podroda: *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Biverticillium* i *Penicillium*. Najraširenije i najpoznatije mikotoksikogene vrste koje se najčešće mogu pronaći u kontaminiranoj hrani potječu iz podroda *Penicillium*, a mikotoksini iz ovoga roda oštećuju jetru i bubrege (Duraković, 2000).

### 2.3.2. *PENICILLIUM EXPANSUM*

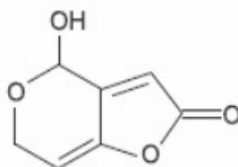
Iz roda *Penicillium* najstarija opisana vrsta naziva se *Penicillium expansum*, te je u tijeku prošlog stoljeća opisivana kao glavni uzročnik kvarenja koštunjicavog voća. *P. expansum* je sveprisutan stanovnik tla i pronalazi se na truloj vegetaciji koja se nalazi na tlu. Najčešće, spore plijesni dospijevaju na hranu putem vode, odnosno sustavom za navodnjavanje, a rjeđe zrakom. Ova plijesan jedino preko fizičkih oštećenja može uzrokovat kvarenje hrane jer ne može prodrijeti zdravu i netaknutu epidermu voća. Pojava kvarenja je najčešća tijekom skladištenja voća zbog vremena skladištenja i količine voća koja se nalazi u skladištu (Pitt i Hocking, 1985 ; Errampalli, 2014).

*P. expansum* većinom se izolira iz voća koje je trulo, najčešće su to jabuke, ali može se izolirati i iz drugog voća kao što su: kruške jagode, rajčice, mango itd. Konidije su elipsaste, glatkog ruba, te je tekstura kolonije flukozna sa slabim fascikulama. Glavna svojstva po kojima se prepoznaje *P. expansum* su tupe zelene konidije. *P. expansum* je psihrofil što znači da je sposobnost za rast i razmnožavanje moguća i na niskim temperaturama. Niske temperature koje su zabilježene, a nisu utjecale na rast su od -3 do -6 °C, a raste jako dobro i na 0 °C. Optimalna temperatura rasta za ovu vrstu iznosi 25 °C (Pitt i Hocking, 2009; Frisvad i Samson, 2004).

S obzirom da su većina vrsta pripadnika roda *Penicillium* uzročnici kvarenja voća i povrća, dokazano je da pri kvarenju proizvode mikotoksine. Mikotoksini su toksični spojevi, koji imaju malu molekularnu masu, a sintetiziraju ih određene vrste plijesni (Bennett, 2003). *P. expansum* je plijesan koja je odgovorna za „kvarenje plavom plijesni“, a naziva se još i „mekano kvarenje“. Prvi simptomi kvarenja su mekane, vodenaste lezije na hrani koje su u početku svijetlo smeđe boje, ali s vremenom postaju plave boje. Hrana koja je zaražena ovom plijesni većinom ima zemljast i užegao okus (Errampalli, 2014). Mnogi rodovi plijesni sadrže vrste koje mogu producirati mikotoksine, ali većinu njih produciraju rodovi *Penicillium*, *Aspergillus* i *Fusarium*, a tri najvažnija mikotoksina koja mogu proizvesti plijesni roda *Penicillium* su: ohratoksin A, patulin i citrinin (Cabañes i sur., 2010).

### 2.3.3. PATULIN

Najpoznatiji producent patulina je plijesan *P. expansum* (Tannous i sur., 2018). Patulin je jedna od najmanjih molekula među mikotoksinima. Nije stabilan spoj, ali mu se stabilnost povećava pri niskim pH vrijednostima, npr. u voćnim sokovima i jabučnome octu. Prvotno se upotrebljavao kao antibiotik, ali nakon saznanja o toksičnosti patulina uvršten je u mikotoksine (Duraković, 2000). **Slika 6.** prikazuje strukturnu formulu patulina.



**Slika 6.** Strukturna formula patulina (HAH, 2014)

Intenzitet biosinteze patulina ovisi o sljedećim okolišnim i nekim drugim čimbenicima:

- aktiviteta vode
- temperatura
- pH
- stanje atmosfere (%-tni udio O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>).

Iz navedenog se može zaključiti da povišena koncentracija ugljik dioksida tijekom skladištenja može utjecati na biosintezu patulina, no visoke koncentracije dovode do određenih promjena u jabuci kao npr. smanjenje kvalitete, gubitak okusa i organoleptičkih promjena. Niži udio O<sub>2</sub> dovodi do određene promjene koncentracije patulina, ali i fiziološkim promjenama na plodu jabuke. Pri temperaturi od 25 °C zabilježen je optimalan porast i biosinteza patulina. Niže temperature neće zaustaviti sintezu patulina nego ju zbog sporijeg rasta plijesni odgađaju (HAH, 2014).

Patulin je molekula koja nije topljiva u vodi i organskim otapalima, ali je u alkoholu, etilacetatu i kloroformu. Nije stabilan u polarnim otapalima kao što su voda i metanol, a toksičnost gubi u lužnatim otopinama (Almenar i sur., 2013). Patulin može izazvati mutagenetičke, neurotoksične i teratogene učinke na životinjama, a konzumiranjem, njegova izloženost kod ljudi može rezultirati ozbiljnim toksičnim učincima. Patulin se nalazi u najvećoj koncentraciji u

jabukama, više nego u bilo kojem drugom voću, što znači da jabuke doprinose najvećoj količini patulina u ljudskoj prehrani. Jabuke se obično čuvaju u hladnjači u modificiranoj ili kontroliranoj atmosferi pri temperaturi od -1 do 3 °C. U navedenim uvjetima se smanjuje rast *P.expansum*, a samim time i proizvodnja patulina (Barkai-Golan, 2017).



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### 3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada je bio istraživanjem dostupnih literaturnih izvora napraviti pregled dosadašnjih spoznaja o kontaminaciji jabuka s plijesni *P. expansum* te slijednoj produkciji patulina tijekom skladištenja jabuka. Nadalje, provesti istraživanje o otpornosti tradicionalnih sorti jabuka na kontaminaciju s plijesni *P. expansum* te utvrditi producirane koncentracije patulina u ovisnosti o vremenu skladištenja jabuka (0 i 3 mjeseca) te odrediti potencijalne razlike između ispitivanih sorti.

#### 3.2. MATERIJALI I METODE

Analizirane tradicionalne sorte jabuka su 'Petrovnjača', 'Wagner', 'Kleker', 'Mašanka' i 'Adamovka'. Uzorci jabuka prikupljeni su sa kolekcijskog nasada Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta Zavoda za voćarstvo koji se nalazi na Pokušalištu Šašincev.

##### 3.2.1. 'Mašanka'

Podrijetlo sorte je iz Štajarske, odakle se zatim proširila u Češku. Imaju dva para kromosoma-diploidne su, a samim tim i dobar oprašivač. Oprašuje je polen neke druge vrste, a kompatibilni oprašivači su: 'Zlatna zimska pramenka', 'Jonatan', 'Ontario', 'Šampanjska reneta' i dr. (Vrbanac i sur., 2007).

Šteta uzrokovana proljetnim mrazom ne utječe na ovu sortu jer cvate kasno. Otporna je i na jabučnu plijesan, ali poprilično osjetljiva na „krastavost jabuke“, odnosno, fuzikladij, stoga sorta zahtjeva posebnu njegu (Vrbanac i sur., 2007).

Rodno drvo jabuke dozrijeva u listopadu, rodnost je obilna, postojanost ploda dugotrajna, najčešće od siječnja do svibnja. Svojstva karakteristična za ovu sortu je zelenkasto žuta boja ploda sa malim brojem svijetlosmeđih izraženih lenticela. Pokožica je glatka i masna, vrlo kratka zadebljana pri vrhu peteljka, dok je mesnati dio ploda sitno zrnaste strukture, sočne konzistencije sa ugodno kiselkastim okusom. Pripadaju stolnoj sorti jabuka, dakle, najčešće se konzumiraju sirove, a u slučaju prerade za proizvodnju voćnog octa, soka te sušenog voća. (Vrbanac i sur., 2007).

#### 3.2.2. 'Petrovnjača'

Stara sorta jabuke koja je vrlo rijetka. Stablo je niskog rasta, otporno na bolesti. Plodovi sorte 'Petrovnjača' su srednje krupni. Poprečnim presjekom dobijemo veliki promjer, zbog toga što navedena sorta ima spljošten oblik ploda. Plodovi su simetrični, pravilno razvijeni i spljošteni. Na sorti su slabo izražena rebra, najčešće su odsutna. Boja varira od zeleno-žute do žute, s rumenim šarama svijetlog intenziteta ispod maška, ovisno o fazi zrelosti. U potpunoj fazi zrelosti sorta je slamasto žute boje. Uz peteljku je područje ploda zahvaćeno smeđe-crvenim nijansama. Peteljka je kratka do srednje dužine. Mesnati dio sorte Petrovnjača je bijele boje, prhko je u fazi potpune zrelosti i kiselkastog okusa. (Ademič i sur., 1963; Zanić, 2020).

#### 3.2.3. 'Wagner'

Plodovi sorte 'Wagner' variraju što se tiče veličine od male do srednje krupne veličine. Oblik je koničan, sa rijetko izraženim rebrima i izraženom čaškom. Plod djeluje duguljasto. Boje sorte 'Wagner' u ovisnosti o zrelosti variraju od blijedo zelene do blago žute boje. Dopunska boja može prekriti i do trećine ploda u obliku crvenih pruga. Oko peteljke smeđe crvena površina je malog do srednjeg intenziteta. Na plodu se nalaze i svjetlo smeđe lenticule u malom broju. Peteljka je tanka, srednje duga. Mesnati dio ploda sorte Wagner je sočno, mekano, ugodno kiselog okusa, blago žute boje. (Ademič i sur., 1963; Zanić, 2020).

#### 3.2.4. 'Adamovka'

'Adamovka' je stara sorta jabuke, a osim toga i vrlo rijetko zastupljena, Srednje je krupan plod. Ovisno o sazrijevanju boja ima raspon od zelene do žute. Mesnati dio ploda je kiselog okusa, sa prhkim mesom, a kožica je tvrda. Stablo je otporno na bolesti, Vrijeme dozrijevanja sorte je tijekom srpnja. (Stare hrvatske voćke, <http://www.stare-hrvatske-vocke.com/jabuke/404-jabuka-petrovaca-bijela.html/>, 2021).

#### 3.2.5. 'Kleker'

Plodovi sorte 'Kleker' su srednje veličine, srednjeg promjera, spljošteno okruglastog oblika. Rebra su slabo izražena kao i čaška koja može biti i odsutna. Boja sorte ovisno o zrelosti je između svijetlozelene do voštano žute. Oko peteljke je rijetko prisutna smeđe-crvena



površina, ukoliko je ima, u neznačajnim je količinama. Svijetlo smeđe lenticеле su prisutne u vrlo malom broju. Udubljenje peteljke je duboko, a sama peteljka do srednje dužine. Može biti i tanka i debela. Baza čaške je plitka i široka. Mesnati dio sorte 'Kleker' bijele do blago žute boje, srednje čvrstoće. (Ademić i sur.1963; Zanić, 2020).

#### **3.2.6. Priprema ekstrakta tradicionalnih sorti jabuka**

Uzorci tradicionalnih sorti jabuka ekstrahirani su pomoću ultrazvučne kupelji u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Za potrebe ekstrakcije, odvagan je jedan gram prethodno usitnjenih jabuka te dodano 10 mL otapala za ekstrakciju (80% MeOH + 1% HCl). Nakon primjene ultrazvuka, uzorci su centrifugirani (10 000 o/min) kako bi se odvojio supernatant od taloga, a nakon toga je supernatant profiltriran pomoću PTFE filtera (0,45 µm). Uzorci su čuvani u hladnjaku na 4°C do analize.

#### **3.2.7. Određivanje polifenola u uzorcima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)**

Polifenoli iz ekstrakata su detektirani upotrebom HPLC-a, Jasco LC Net II, opremljenim autosamplerom AS-4150, pumpom PU-4180 i PDA detektorom MD-4010. Eksperimenti su izvedeni na koloni C18 Kinetex (150 mm × 4,6 mm, 2,6 µm; Phenomenex, Torrance, CA, SAD). Mobilna faza se sastojala od A (voda koja sadrži 1% mravlje kiseline) i B (metanol koji sadrži 1 % mravlje kiseline). Gradijentni program je bio od 95 % A do 80 % u 10 min, od 80 % do 70 % u 5 min, od 70% do 50% u 5 min, od 50% do 0% u 5 min, a izokratski 10 minuta i brzinom protoka od 1ml/min. 5 µL uzorka ubrizgano je u duplikatu na kolonu temperiranu na 50 °C. UV-Vis apsorpcijski spektar standarda, kao i uzoraka, zabilježeni su u rasponu od 190 do 600 nm, a polifenoli su detektirani na 280, 320 i 360 nm. Oni su identificirani usporedbom njihovih retencijskih vremena i UV-VIS spektra s onim iz čistog standarda. Pomoću vanjske standardne kalibracije izvršena je kvantifikacija. Količina polifenola se izražava u µg/kg.

#### 3.2.8. Priprema inokuluma plijesni *P. expansum*

Plijesni *P. expansum* su nacijepljene na PDA agar (potato dextrose agar) i inkubirane 14 dana na 29°C. Porasla kultura primijenjena je pri određivanju otpornosti sorti jabuka na zarazu *P. expansum*.

#### 3.2.9. Određivanje otpornosti odabranih sorti jabuka na *P. expansum*

Jabuke su rezane na ploške debljine 1 cm te sterilizirane u Petrijevim zdjelicama. Središte ploške jabuke nacijepljeno je diskom kulture plijesni starosti 10 dana te je praćen porast do dostizanja maksimalnog promjera kolonije plijesni od 9 cm pri temperaturi od 29°C. Nakon isteka vremena inkubacije uzorci su uskladišteni na temperaturi od -80°C. Kontrolni uzorci pripremljeni su na isti način samo bez inokulacije.

LC-MS/MS analiza korištena je za određivanje producirane koncentracije patulina. Uzorci jabuka pripremljeni su primjenom MycoSep 228 AlfaPat Push-through format kolona za pročišćavanje (Romer Labs, Tulln, Austrija) pri čemu su poštovane upute proizvođača. Za potrebe analize, 2,5 g prethodno homogeniziranog uzorka u laboratorijskom mlinu pomiješano je sa 10 mL smjese 84:16 acetonitril:voda (v/v). Primjenom uređaja Multi RS-60 (Biosan, Riga, Latvija) provedena je 45 minutna ekstrakcija. 4 mL ekstrakata je propušteno kroz kolonu u staklenoj epruveti, zatim filtrirano kroz najlonski filter promjera pora 0,22 µm (Najlon, Labex Ltd., Mađarska) te preneseno u vialu s čepom. Kontrolni uzorak obogaćen je otopinom standarda patulina u koncentraciji 10 ng mL<sup>-1</sup> u svrhu provjere iskorištenja metode (engl. recovery). Priprema kontrolnog uzorka odvijala se na isti način kako je gore opisano. Sve korištene kemikalije bile su LC-MS čistoće. Bez daljnjeg pročišćavanja pripremljeni uzorci su injektirani u UHPLC-MS/MS sustav (20 µL), dok je razdvajanje patulina provedeno na uređaju Acquity UPLC H-Class sustav (Waters, MA, SAD) uz Acquity BEH C18 kolonu (2,1 x 100 mm, 1,7 µm) (Waters, SAD) termostatiranu pri 40 °C, u gradijentu pokretne faze kao što je navedeno, uz protok od 0,45 mL min<sup>-1</sup>. Detekcija i kvantifikacija je provedena Xevo TQD spektrometrom masa (Waters, MA, SAD), a ionizacija je pomoću elektrosprejnog izvora u negativnom modu (ESI<sup>-</sup>). Odvajanje iona je provedeno uz MRM (engl. multiple reaction monitoring) akviziciju te su praćene dvije individualne tranzicije iona patulina (kvantifikacijski ion: 153 > 109 (m/z), potvrđni ion: 153 > 81 (m/z)) Nakon integriranja kvantitativnih kromatograma, valjanost

podataka provjerena je usporedbom odnosa s kvalitativnim kromatogramom u odnosu na patulin iz standarda patulina. Po preračunavanju su sve vrijednosti patulina izražene u  $\text{ng kg}^{-1}$ .

## **4. REZULTATI**

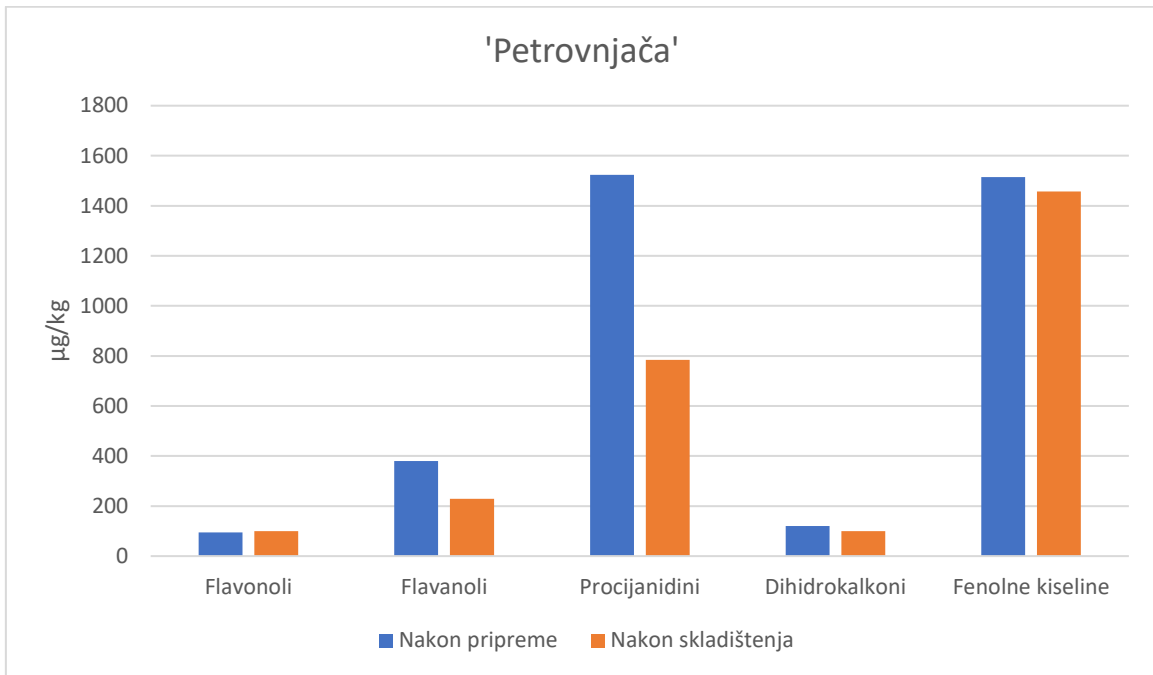
**Tablica 1.** Sadržaj polifenola u odabranim sortama jabuka nakon pripreme uzoraka ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

	Nakon pripreme				
	'Petrovnjača'	'Wagner'	'Kleker'	'Mašanka'	'Adamovka'
Flavonoli					
Mircetin	35,25 ± 0,82	27,78 ± 0,16	26,94 ± 0,46	47,32 ± 1,22	21,47 ± 0,26
Kvercetin-3- $\beta$ -D-glukozid	19,93 ± 0,12	26,9 ± 0,07	22,29 ± 0,94	35,58 ± 0,09	19,57 ± 0,52
Kvercetin-3-rutinozid	23,83 ± 0,57	30,01 ± 0,85	28,06 ± 0,82	46,66 ± 0,7	21,67 ± 1,66
Kvercetin	15,56 ± 0,35	25,16 ± 0,12	31,57 ± 0,54	47,36 ± 14,57	17,95 ± 0,4
Ukupno	94,57	109,85	108,86	176,92	80,66
Flavanoli					
Katehin	28,3 ± 0,26	202,84 ± 5,22	231,37 ± 3,56	268,71 ± 2,27	204,07 ± 2,51
Epikatehin	170,61 ± 2,17	66,71 ± 0,59	143,86 ± 1,3	163,49 ± 1,57	313,54 ± 1,3
Galokatehin galat	180,74 ± 1,95	NI	252,64 ± 3,82	58,21 ± 0,88	NI
Ukupno	379,65	269,55	627,87	490,41	517,61
Procijanidini					
Procijanidin A2	27,53 ± 0,75	18,3 ± 0,37	117,33 ± 3,23	45,93 ± 13,33	43,53 ± 1,39
Procijanidin B1	116,3 ± 2,98	53,23 ± 0,13	187,12 ± 6,05	91,45 ± 2,12	84,76 ± 0,95
Procijanidin B2	156,11 ± 2,46	79,57 ± 0,94	257,79 ± 14,59	380,13 ± 6,77	124,62 ± 2,4
Derivat procijanidina 1	56,07 ± 1,59	59,09 ± 1,15	62,65 ± 0,65	59,54 ± 2,55	88,88 ± 2,78
Derivat procijanidina 2	1167,89 ± 9,45	103,43 ± 0,98	744,35 ± 18,58	880,59 ± 15,63	194,63 ± 7,33
Ukupno	1523,9	313,62	1369,24	1457,64	536,42
Dihidroalkoni					
Floridzin	101,58 ± 1,25	155,11 ± 1,61	121,58 ± 2,02	311,97 ± 1,09	49,26 ± 1,07
Floretin	18,22 ± 0,55	30,14 ± 0,09	20,06 ± 1,29	40,36 ± 1,64	11,93 ± 0,29
Ukupno	119,8	185,25	141,64	352,33	61,19
Fenolne kiseline					
4-hidroksicimetna kiselina	48,64 ± 1,01	7,45 ± 0,14	32,7 ± 0,48	14,97 ± 0,61	64,58 ± 0,4
2,6-dimetoksibenzojeva kiselina	37,38 ± 0,75	25,69 ± 0,31	25,36 ± 0,77	11,7 ± 0,42	36,83 ± 0,72
Klorogenska kiselina	1429,22 ± 16,03	639 ± 1,71	1131,27 ± 16,58	1657,98 ± 14,01	900,28 ± 7,24
Ukupno	1515,24	672,14	1189,33	1684,65	1001,69

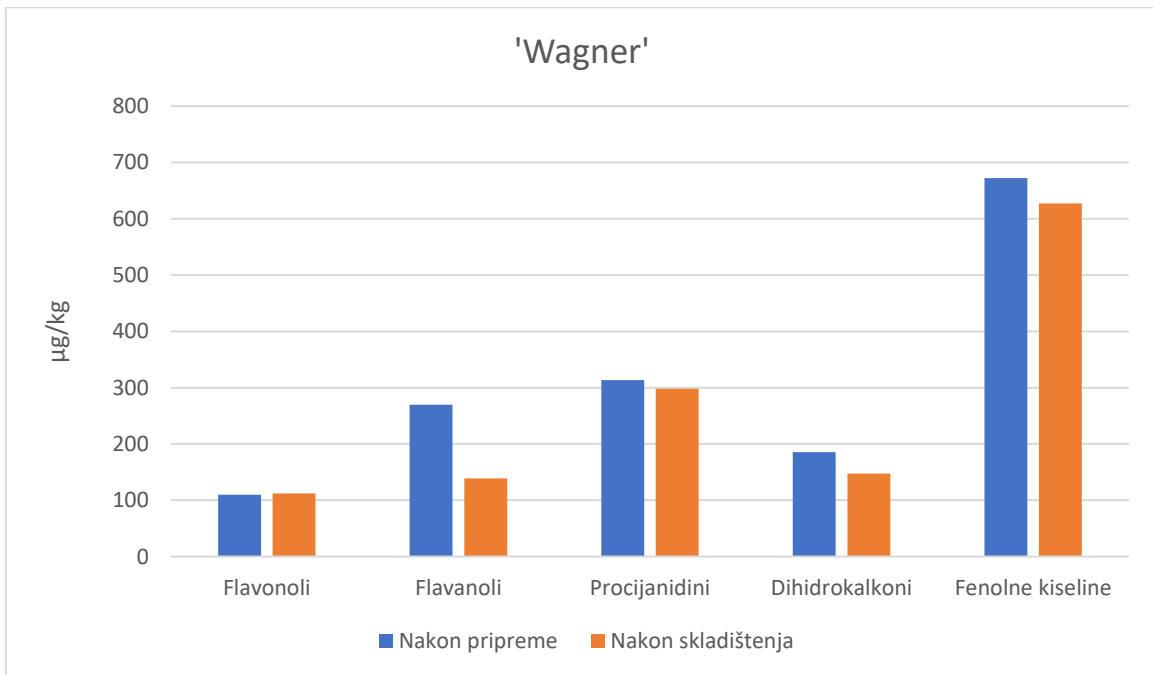
NI – nije identificirano

Tablica 2 Sadržaj polifenola u odabranim sortama jabuka nakon skladištenja od 3 mjeseca ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

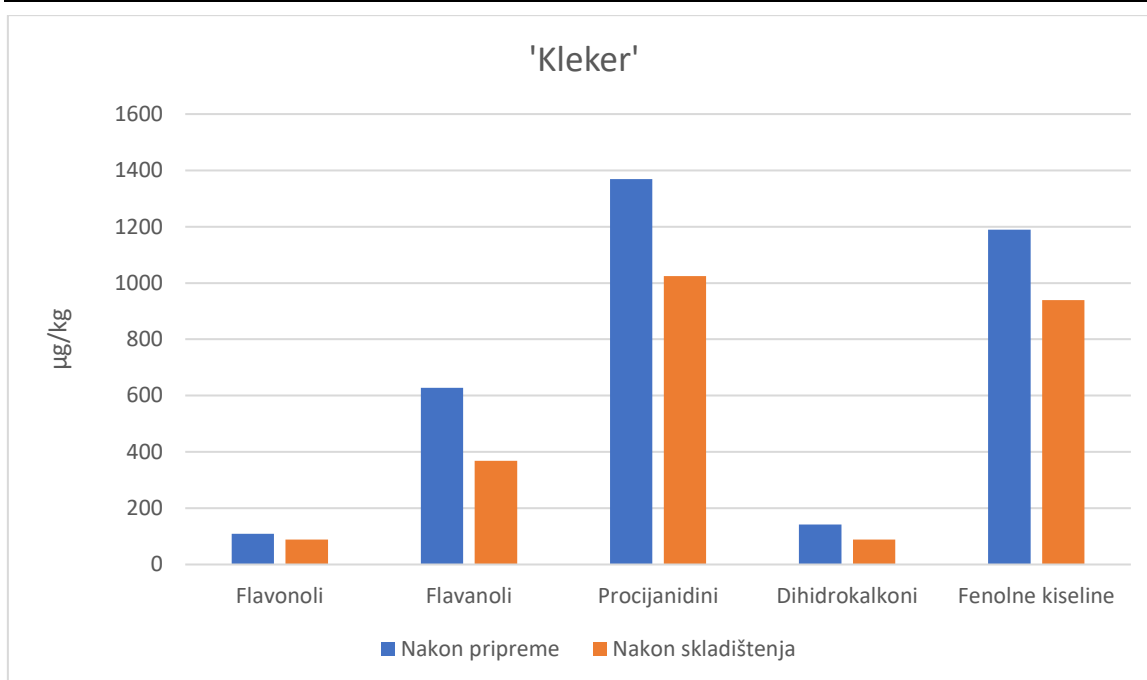
	Nakon skladištenja				
	'Petrovnjača'	'Wagner'	'Kleker'	'Mašanka'	'Adamovka'
Flavonoli					
Mircetin	28,00 $\pm$ 0,93	24,57 $\pm$ 0,29	32,37 $\pm$ 0,91	47,94 $\pm$ 1,37	25,95 $\pm$ 1,9
Kvercetin-3- $\beta$ -D-glukozid	23,59 $\pm$ 0,3	29,1 $\pm$ 0,42	13,96 $\pm$ 0,31	33,12 $\pm$ 0,15	25,17 $\pm$ 0,96
Kvercetin-3-rutinozid	32,09 $\pm$ 0,32	34,52 $\pm$ 0,3	19,37 $\pm$ 0,56	40,99 $\pm$ 1,67	26,16 $\pm$ 1,58
Kvercetin	16,43 $\pm$ 0,4	23,88 $\pm$ 0,3	23,16 $\pm$ 0,84	65,89 $\pm$ 0,8	20,75 $\pm$ 0,15
Ukupno	100,11	112,07	88,86	187,94	98,03
Flavanoli					
Katehin	22,94 $\pm$ 0,48	33,55 $\pm$ 2,43	43,62 $\pm$ 3,44	52,85 $\pm$ 3,22	33,36 $\pm$ 1,19
Epikatehin	159,56 $\pm$ 3,02	58,7 $\pm$ 0,59	136,01 $\pm$ 3,78	154,09 $\pm$ 1,99	295,29 $\pm$ 6,62
Galokatehin galat	47,02 $\pm$ 0,4	46,54 $\pm$ 0,16	188,2 $\pm$ 5,53	47,1 $\pm$ 0,02	46,99 $\pm$ 0,08
Ukupno	229,52	138,79	367,83	254,04	375,64
Procijanidini					
Procijanidin A2	27,63 $\pm$ 1,57	20,78 $\pm$ 0,42	87,19 $\pm$ 0,52	49,18 $\pm$ 0,82	33,21 $\pm$ 1,61
Procijanidin B1	128,92 $\pm$ 3,44	69,49 $\pm$ 0,51	182,34 $\pm$ 6,02	95,32 $\pm$ 3,11	85,14 $\pm$ 0,82
Procijanidin B2	71,07 $\pm$ 1,32	44,23 $\pm$ 1,66	251,34 $\pm$ 1,49	235,76 $\pm$ 3,79	109,2 $\pm$ 8,26
Derivat procijanidina 1	57,9 $\pm$ 0,95	63,6 $\pm$ 0,33	56,17 $\pm$ 0,17	52,96 $\pm$ 0,37	51,67 $\pm$ 1,07
Derivat procijanidina 2	498,84 $\pm$ 259,29	100,07 $\pm$ 0,34	447,97 $\pm$ 5,61	839,95 $\pm$ 4,02	195,26 $\pm$ 2,68
Ukupno	784,36	298,17	1025,01	1273,17	474,48
Dihidroalkoni					
Floridzin	79,76 $\pm$ 3,61	125,33 $\pm$ 1,78	75,15 $\pm$ 0,39	264,78 $\pm$ 5,67	77,27 $\pm$ 2,66
Floretin	20,36 $\pm$ 0,7	22,15 $\pm$ 0,38	13,32 $\pm$ 0,32	43,38 $\pm$ 0,77	35,8 $\pm$ 0,42
Ukupno	100,12	147,48	88,47	308,16	113,07
Fenolne kiseline					
4-hidroksicimetna kiselina	46,6 $\pm$ 2,79	4,39 $\pm$ 0,26	23,56 $\pm$ 1,75	21,6 $\pm$ 0,31	53,8 $\pm$ 1,02
2,6-dimetoksibenzojeva kiselina	19,22 $\pm$ 1,32	7,23 $\pm$ 0,44	11,85 $\pm$ 0,36	8,64 $\pm$ 0,29	31,12 $\pm$ 0,81
Klorogenska kiselina	1390,91 $\pm$ 12,48	615,35 $\pm$ 1,96	904,34 $\pm$ 5,53	1210,59 $\pm$ 27,74	421,94 $\pm$ 6,86
Ukupno	1456,73	626,97	939,75	1240,83	506,86



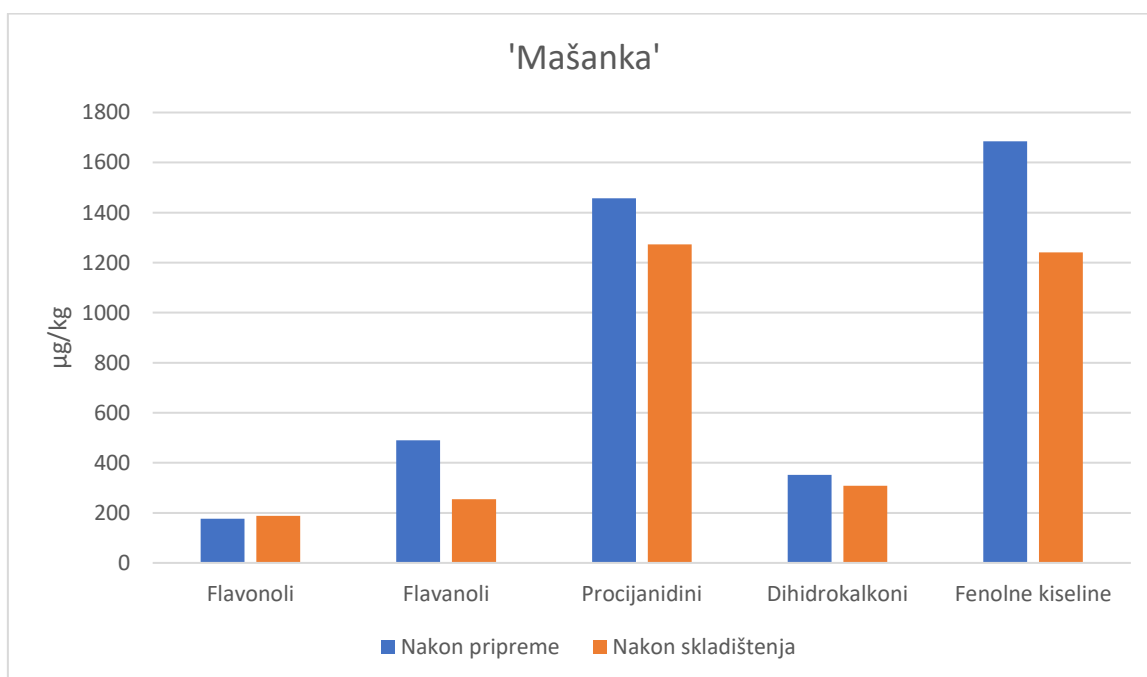
**Slika 7.** Količina polifenola po skupinama u sorti 'Petrovnjača' prije i nakon skladištenja



**Slika 8.** Količina polifenola po skupinama u sorti 'Wagner' prije i nakon skladištenja

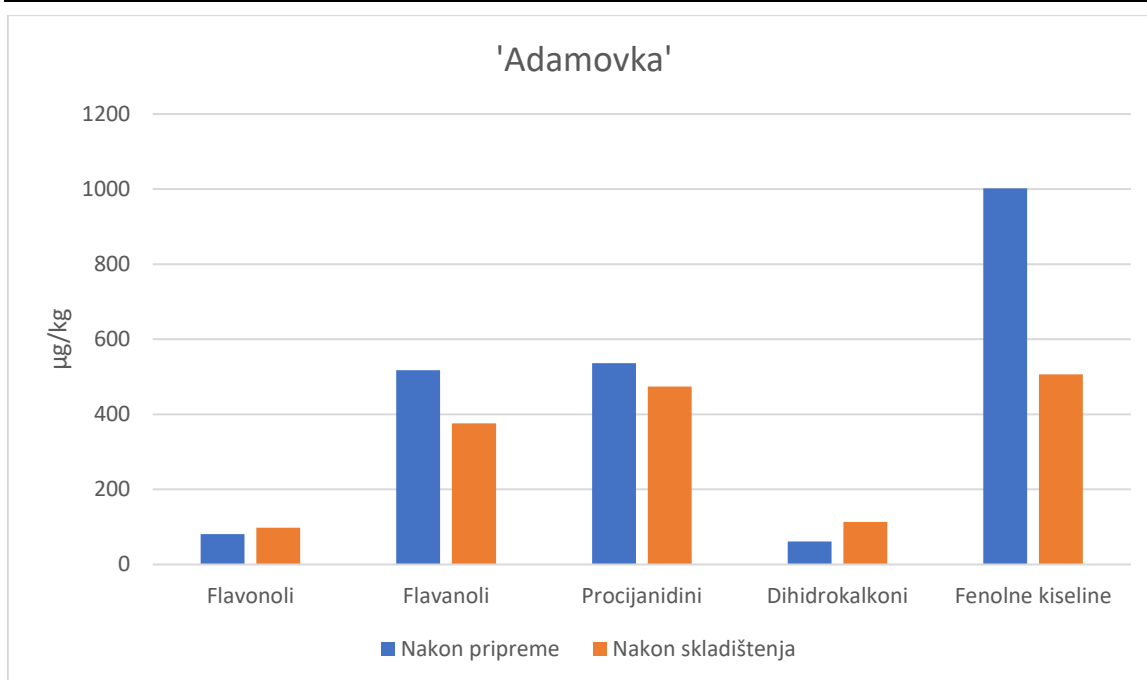


**Slika 9.** Količina polifenola po skupinama u sorti 'Kleker' prije i nakon skladištenja



**Slika 10.** Količina polifenola po skupinama u sorti 'Mašanka' prije i nakon skladištenja



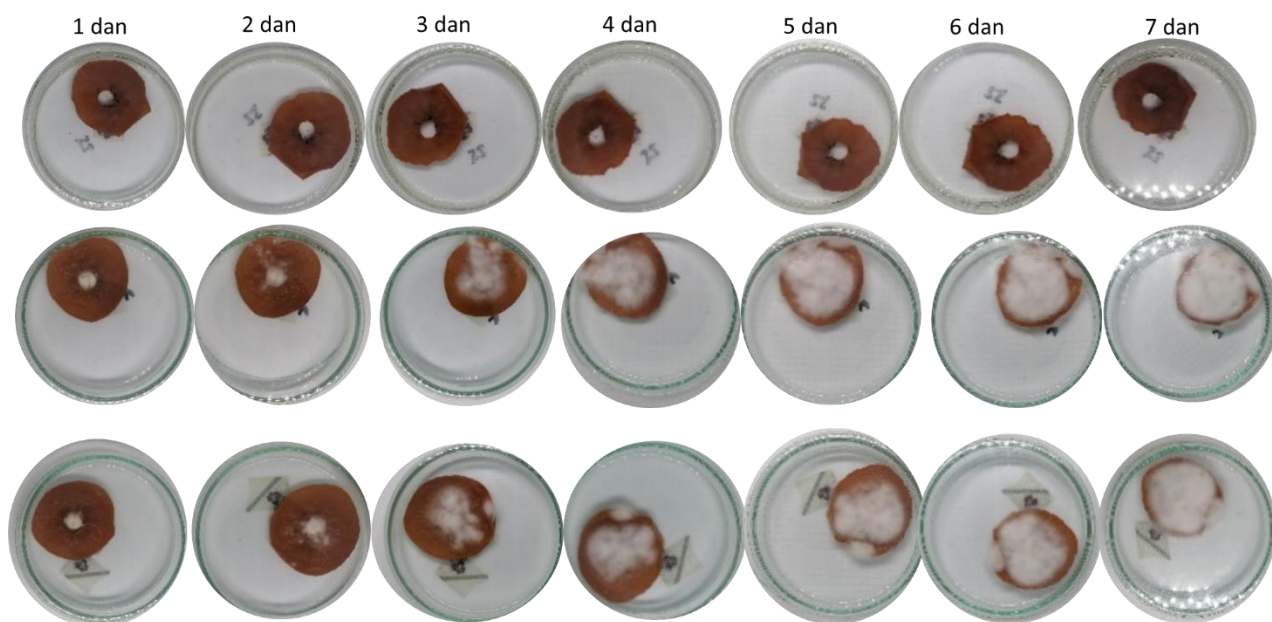


**Slika 11.** Količina polifenola po skupinama u sorti 'Adamovka' prije i nakon skladištenja

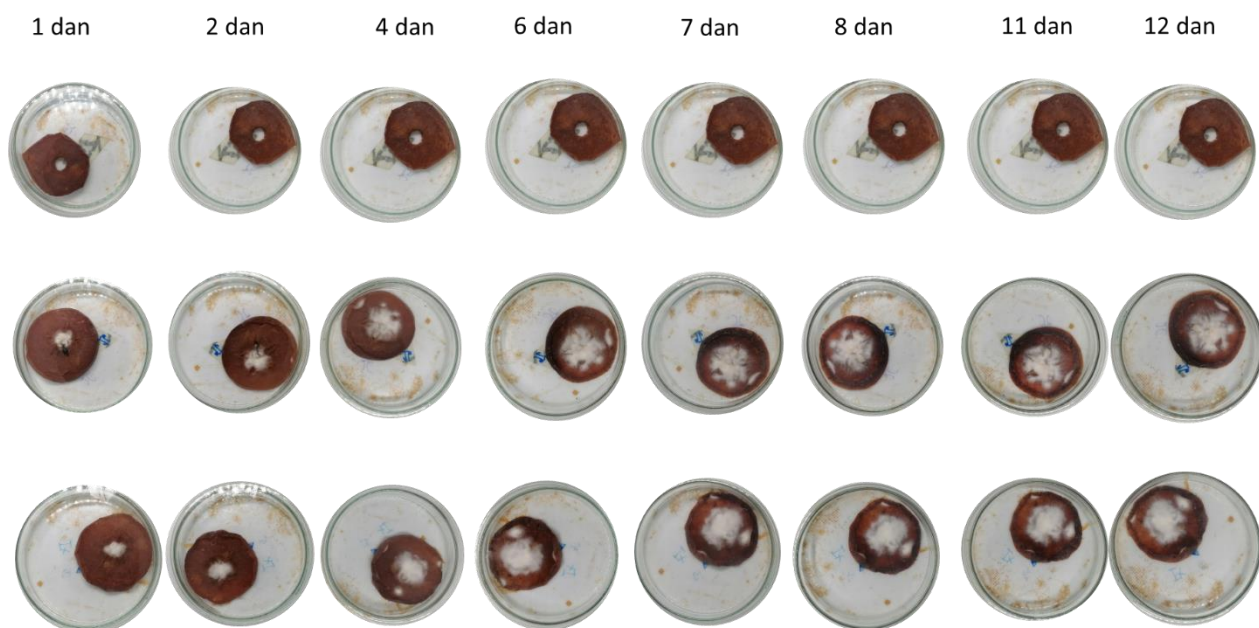
**Tablica 3.** Sadržaj patulina u odabranim sortama jabuka nakon branja i nakon skladištenja tijekom 3 mjeseca (µg/kg)

Petrovnjača	'Wagner'	'Kleker'	'Mašanka'	'Adamovka'
Nakon branja				
23,5 ± 0,28	NI	NI	NI	NI
Nakon skladištenja				
NI	4,7 ± 0,99	NI	49,9 ± 3,39	NI

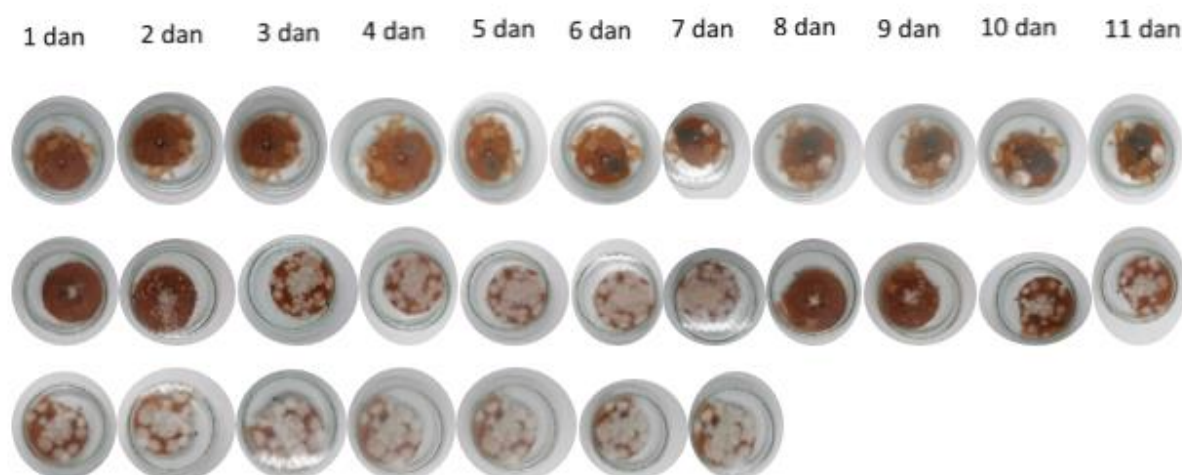
NI – nije identificiran



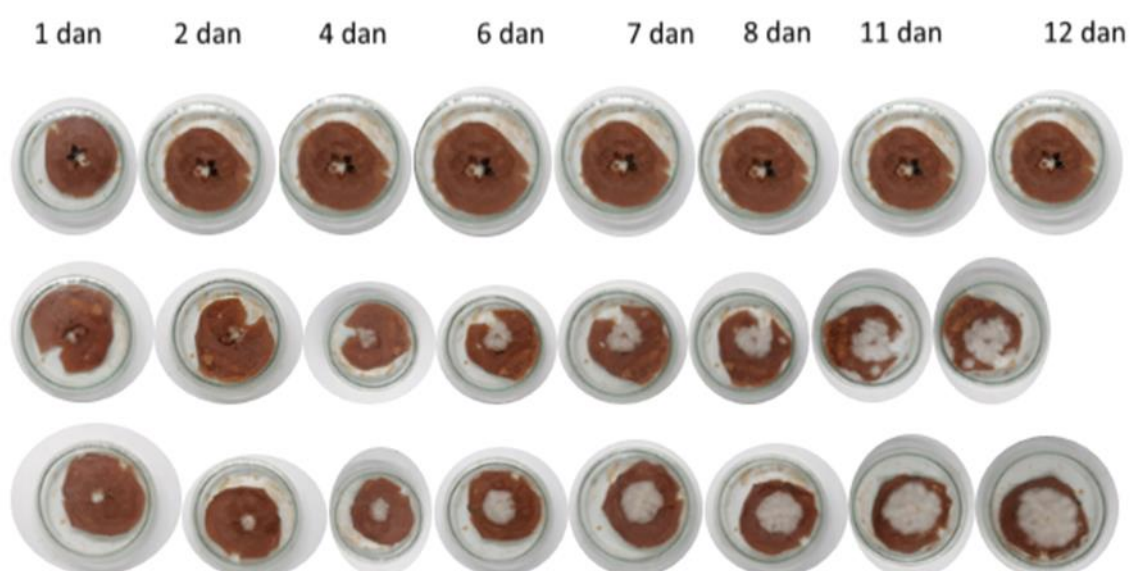
Slika 12. Razvoj plijesni *P.expansum* na jabuci sorte 'Mašanka'



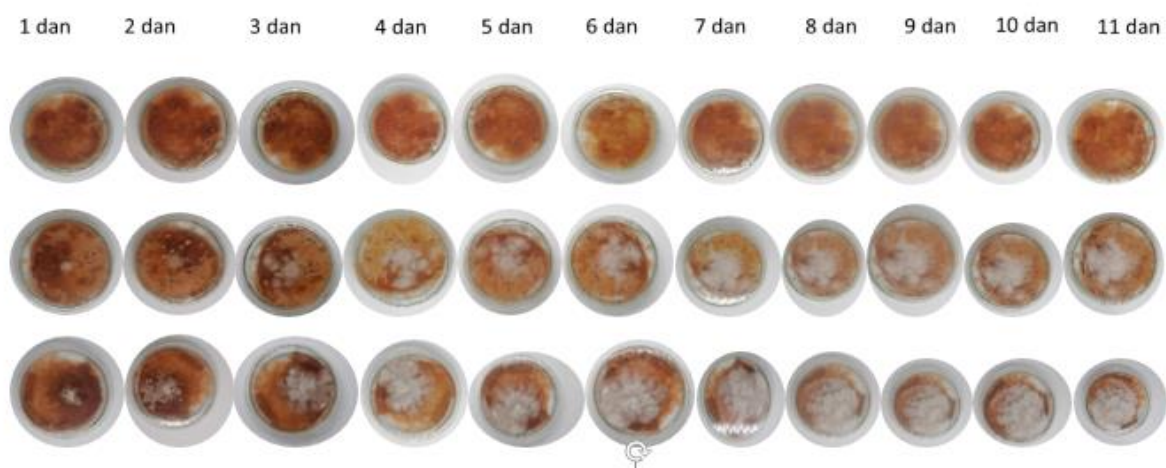
Slika 13. Razvoj plijesni *P.expansum* na jabuci sorte 'Mašanka' (nakon skladištenja)



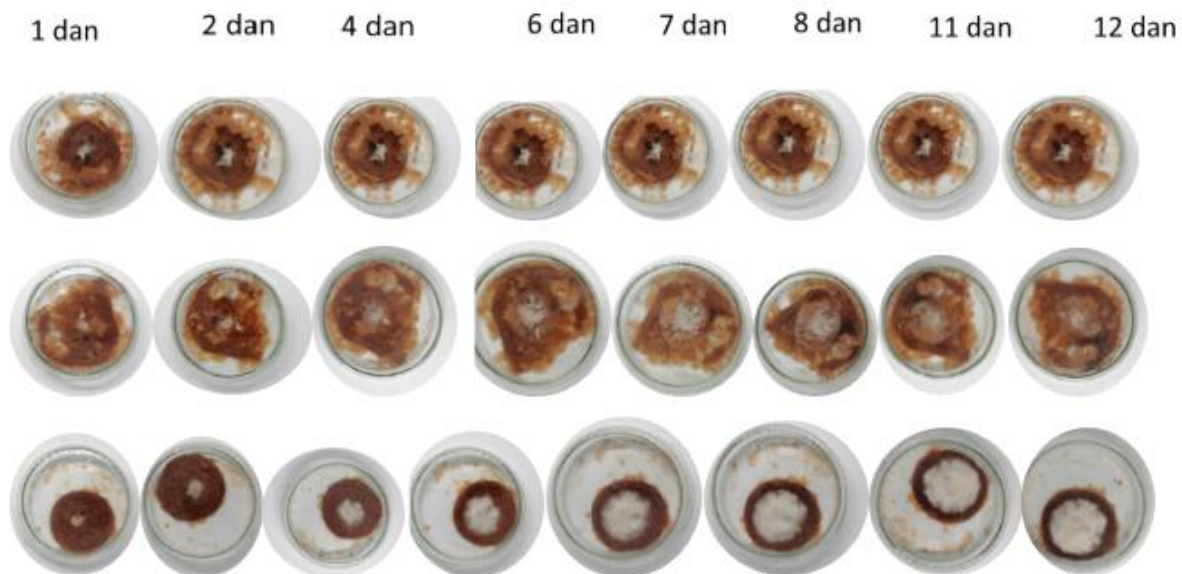
Slika 14. Razvoj plijesni *P.expansum* na jabuci sorte 'Petrovnjača'



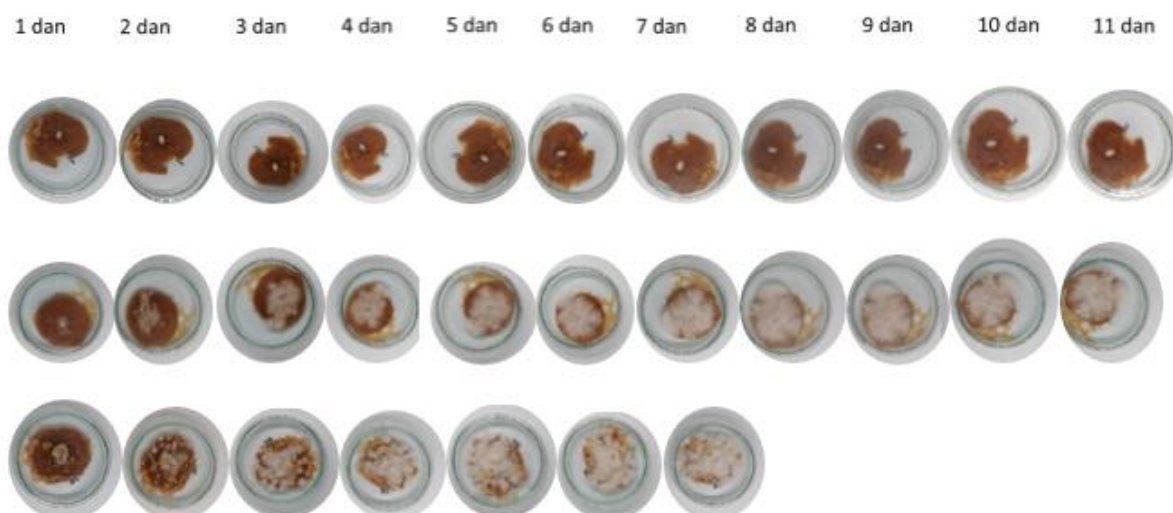
Slika 15. Razvoj plijesni *P.expansum* na jabuci sorte 'Petrovnjača' (nakon skladištenja)



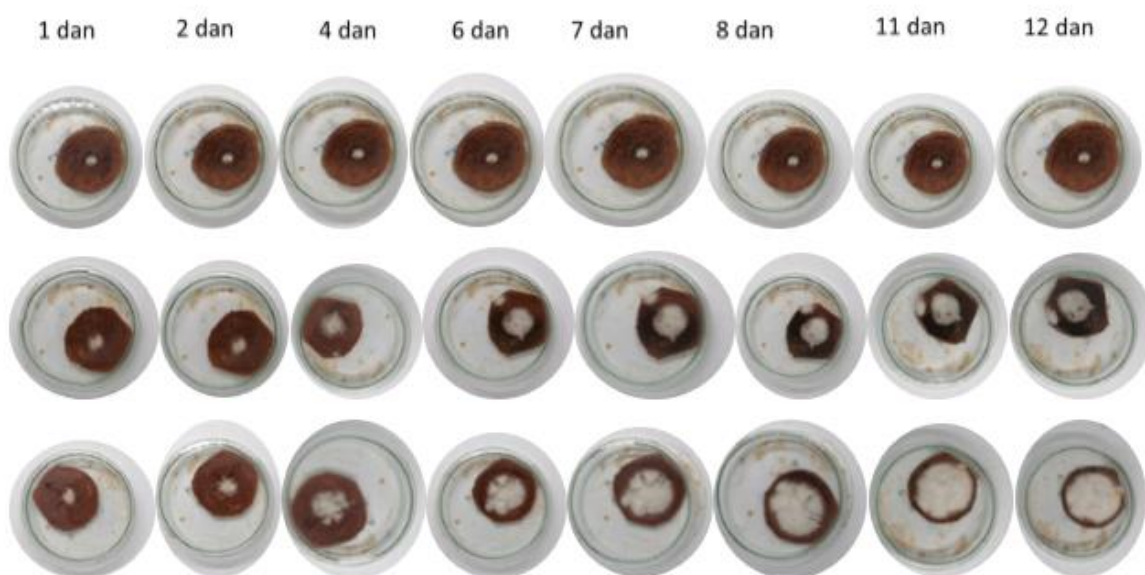
Slika 16. Razvoj plijesni *P.expansum* na jabuci sorte 'Wagner'



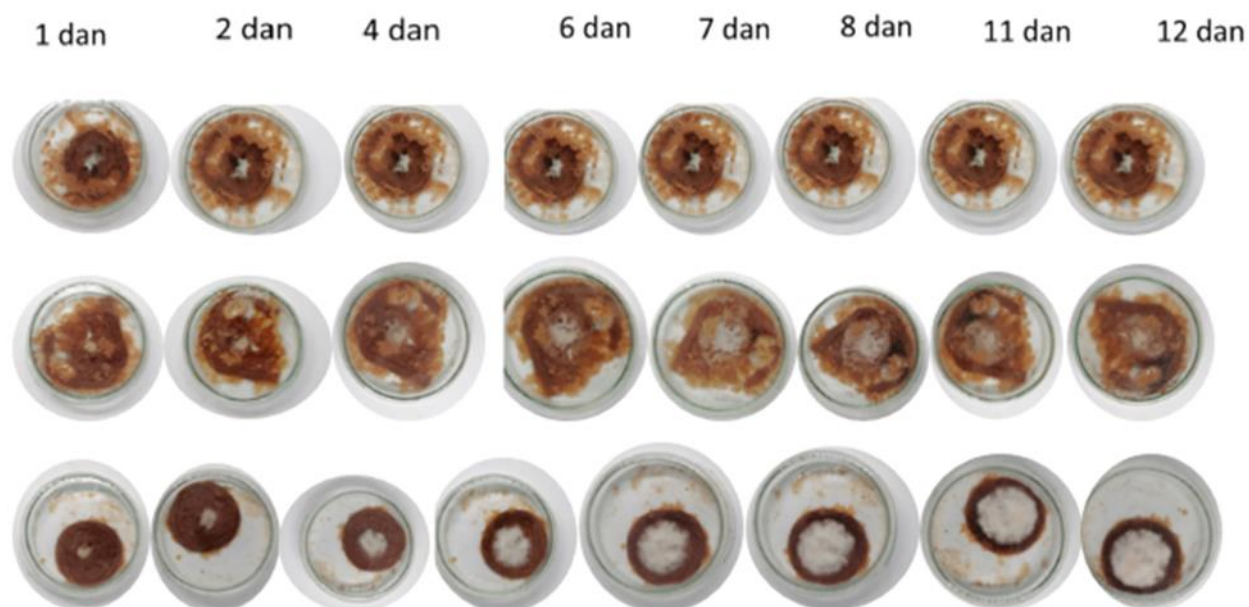
Slika 17. Razvoj plijesni *P.expansum* na jabuci sorte 'Wagner' (nakon skladištenja)



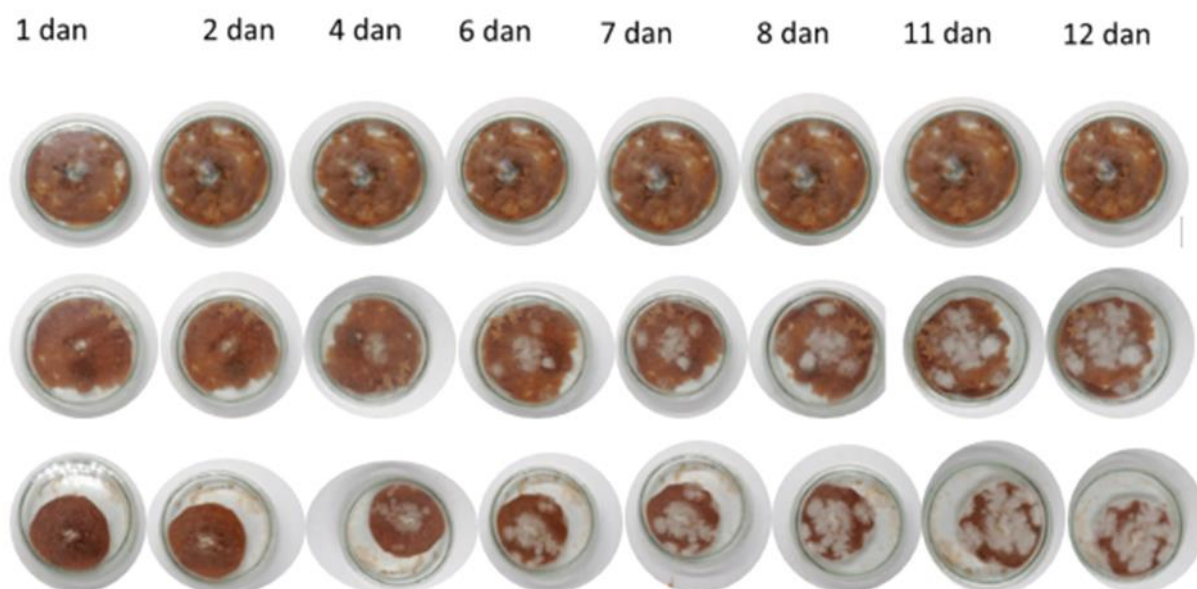
Slika 18. Razvoj plijesni *P.expansum* na jabuci sorte 'Adamovka'



Slika 19. Razvoj plijesni *P.expansum* na jabuci sorte 'Adamovka' (nakon skladištenja)



Slika 20. Razvoj plijesni *P.expansum* na jabuci sorte 'Kleker'



Slika 21. Razvoj plijesni *P.expansum* na jabuci sorte 'Kleker' (nakon skladištenja)

## **5. RASPRAVA**

Tradicionalne sorte jabuka predstavljaju visoko vrijednu sirovinu za prehrambenu industriju. U današnje vrijeme su sve više popularizirane na tržištu, prvenstveno zbog nutritivnog sastava i organoleptičkih svojstava. Analizom nutritivnog sastava potvrdilo se da većina tradicionalnih sorata sadrži visoke količine ukupnih fenola, flavonoida, te ostalih spojeva koji pružaju pozitivan učinak za zdravlje ljudskog organizma. S obzirom da ne zahtijevaju posebnu vrstu njege lako se mogu prilagoditi organskom uzgoju. Potencijal tradicionalnih sorti jabuka u razvoju funkcionalnih proizvoda je veliki i odlikuje mogućom visokom kakvoćom proizvoda. Osim toga, podiže se svijest potrošača o visokoj kvaliteti tradicionalnih sorti koje mogu biti temelj za poticaje ekološke proizvodnje. Tradicionalne sorte jabuka sadrže veću količinu polifenola od komercijalnih. Dokazano je da fenolni spojevi imaju značajna antioksidativna i antimikrobna djelovanja te bi konzumacija tradicionalnih sorti zbog toga mogla imati blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje. Također, istraživanja pokazuju da su te sorte i manji alergene u odnosu na komercijalne vrste (Jakobek i sur., 2020).

Cilj diplomskog rada bio je provesti istraživanje te ispitati otpornosti tih sorti (5 odabranih sorti) na kontaminaciju s plijesni *P. expansum* te utvrditi produciranu koncentraciju patulina. Osim toga ispitan je i sadržaj ukupnih polifenola ispitivanih sorti jabuka (nakon branja i nakon skladištenja od 3 mjeseca), koji imaju veliki utjecaj na stabilnost kao i na mogućnost dugotrajnijeg očuvanja ploda jabuke.

U **Tablici 1.** prikazan je sadržaj polifenola u odabranim sortama jabuka nakon pripreme uzoraka odnosno u svježim uzorcima. Rezultati su pokazali da se ispitivane sorte jabuka uvelike razlikuju u sadržaju i količini polifenola. Prema skupinama polifenola identificirani i kvantificirani su: flavonoli, flavanoli, procijandini, dihidrokalkoni i fenolne kiseline.

Od flavonola određeni su u svim uzorcima: kvercetin, kvercetin-3- $\beta$ -D-glukozid, mircetin i kvercetin-3-rutinozid. Ukupna količina flavonola prije skladištenja kretala se u rasponu od 80,66 do 176,92  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Najvišu količinu flavonola imala je sorta 'Mašanka' (176,92  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), a najnižu 'Adamovka' (80,66  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Od flavanola identificirani su katehin, epikatehin i galokatehin galat. Koncentracija flavanola u uzorcima kretala se u rasponu od 269,55  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 627,35  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Sorta sa najvišom količinom flavanola bila je 'Kleker' (367,83  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), dok je 'Wagner' sorta (138,79  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) imala najnižu količinu.

Od procijanidina u navedenim sortama jabuka identificirani su procijanidin A2, procijanidin B1, procijanidin B2, derivat procijanidina 1 i derivat procijanidina 2. Količine procijanidina



kretale su se u rasponu od 313,62 µg/kg do 1523,9 µg/kg. Sorta 'Wagner' imala je najnižu količinu (313,12 µg/kg) ispitivanih procijanidina, a 'Petrovnjača' najvišu (1523,9 µg/kg).

Od dihidrokalkona identificirani su floretin i floridizin. Raspon u uzorcima prije skladištenja se kretao od 61,19 µg/kg ('Adamovka') do 352,33 µg/kg ('Mašanka'). Identificirane fenolne kiseline u odabranim sortama su klorogenska kiselina, 4-hidroksicimetna kiselina i 2,6-dimetoksibenzojeva kiselina. Najniža količina zabilježena je kod sorte 'Wagner' (672,14 µg/kg), a sorta 'Mašanka' ima najvišu količinu ukupnih fenolnih kiselina (1684,65 µg/kg).

Prema polifenolnom profilu, iz rezultata se može izvesti zaključak da su dihidroklalkoni zastupljeni u najmanjoj količini u odabranim ispitivanim sortama. Najveći ukupni sadržaj polifenola u uzorcima prije skladištenja imala je sorta 'Mašanka', a sorta 'Wagner' imala je najmanju količinu ukupnih polifenola.

U **Tablici 2.** prikazan je sadržaj polifenola nakon skladištenja od tri mjeseca, a rezultati pokazuju da se količina polifenola ovisno o sorti jabuke i vrsti polifenolnog spoja smanjila ili u rijetkim slučajevima povećala za malu razliku u vrijednosti od početne količine. Nakon tromjesečnog skladištenja najviša količina flavonola bila je zastupljena u sorti 'Mašanka' (187,94 µg/kg), a najmanje u sorti 'Adamovka' (98,03 µg/kg). Najviša količina flavanola bila je u sorti 'Kleker' (367,83 µg/kg), a najmanja u sorti 'Wagner' (138,79 µg/kg). Procijanidini su također i nakon skladištenja identificirani u svim sortama s najvišim količinama u sorti 'Mašanka' (1273,17 µg/kg), dok je najmanja količina nakon tromjesečnog skladištenja bila kod sorte 'Wagner' (298,17 µg/kg). Najviše količine ukupnih dihidrokalkona kvantificirane su kod sorte 'Mašanka' (308,16 µg/kg), a u najmanjoj količini kod sorte 'Kleker' (88,47 µg/kg). Fenolne kiseline su u najvećoj koncentraciji bile prisutne kod sorte 'Petrovnjača' (1456,73 µg/kg), a sorta 'Adamovka' (506,86 µg/kg) imala je najmanju vrijednost ukupnih fenolnih kiselina. Sadržaj ukupnih polifenola nakon skladištenja pratio je trend kao i u uzorcima prije skladištenja, odnosno sorta 'Mašanka' sa najvišom, a 'Wagner' sa najnižom količinom.

Na osnovu prikazanih grafova (**Slika 7.-11.**) možemo vidjeti razliku u količini polifenola nakon pripreme uzorka i skladištenja od tri mjeseca. Kod sorti 'Petrovnjača' i 'Adamovka' specifično je da su se flavonoli (kod 'Petrovnjače') i dihidrokalkoni (kod 'Adamovke') povećali u jako maloj količini nakon skladištenja što može biti posljedica različitih oksidacijskih procesa. Ostale ispitivane skupine polifenola, kod ovih sorti bilježile su pad u svojim količinama nakon

tromjesečnog skladištenja. Također, sve ostale sorte ispitivanih jabuka imaju nakon tromjesečnog skladištenja blagi pad ukupnih količina polifenola.

Na osnovu (**Slika. 12.-21.**) možemo vidjeti prikaz navedenih tradicionalnih sorti kontaminiranih s plijesni *P. expansum* nakon pripreme uzorka i nakon tromjesečnog skladištenja te kontrolne uzorke (nekontaminirane). Sorte jabuka su promatrane svakodnevno dok nisu u potpunosti zaražene s plijesni. *P. expansum* se najsporije razvijao na sorti 'Petrovnjača' što znači da je ona najotpornija na zarazu plijesni, ali to ne znači da će imati najmanju količinu produciranog patulina.

Fotografskom analizom se ne može precizno odrediti najotpornija sorta na zarazu s plijesni te je na istim uzorcima provedena LC-MS/MS analiza sadržaja patulina.

**Tablica 3.** pokazuje sadržaj patulina u odabranim sortama jabuka nakon branja i nakon skladištenja tijekom 3 mjeseca. Na sorti 'Petrovnjača' patulin je identificiran i kvantificiran prije skladištenja u količini od 23,5 µg/kg. Nakon tromjesečnog skladištenja patulin nije identificiran u 'Petrovnjači' kao ni u sortama 'Kleker' i 'Adamovka'. U sortama jabuka 'Wagner' i 'Mašanka' detektiran je patulin i to u količinama 4,7 µg/kg ('Wagner') i 49,9 µg/kg ('Mašanka'). Neke studije su pokazale da koncentracija floridzina ima snažno antifugalno djelovanje protiv različitih mikotoksina. U našem slučaju najvišu koncentraciju floridzina ima sorta Mašanka koja nakon skladištenja ima i najvišu koncentraciju patulina. U sorti Wagner u kojoj je također detektiran patulin nakon tromjesečnog skladištenja detektirana je i viša koncentracija floridzina u odnosu na ostale ispitivane sorte. Najniža identificirana količina dihidrokalkona, odnosno floridzina bila je u sorti Kleker u kojoj patulin nije identificiran nakon tromjesečnog skladištenja.



## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Ispitivane tradicionalne sorte jabuka razlikovale su se u količini ukupnih polifenola, a prema skupinama polifenola identificirani i kvantificirani su flavonoli, flavanoli, procijanidini, dihidrokalkoni te fenolne kiseline.
2. Analiza polifenola u uzorcima jabuka prije skladištenja pokazala je kako sorta 'Mašanka' ima najveći sadržaj ukupnih polifenola.
3. Nakon tromjesečnog skladištenja trend je ostao isti te je sorta 'Mašanka' imala najveći sadržaj ukupnih polifenola.
4. Patulin je identificiran u sorti 'Petrovnjača' prije skladištenja, ali ne i nakon skladištenja.
5. Najveća koncentracija patulina nakon skladištenja tijekom 3 mjeseca određena je u jabuci sorte 'Mašanka' (49,9 µg/kg) dok su niže vrijednosti bile zastupljene u sorti 'Wagner' (4,7 µg/kg).
6. Ostale ispitivane sorte jabuka ('Adamovka' i 'Kleker') nisu pokazale prisutnost patulina.
7. Dobiveni rezultati doprinose boljem uvidu na otpornost tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *P. expansum* te posljedično patulinom, a i polifenolnom profilu odabranih tradicionalnih sorti.

## **7. LITERATURA**

- 
- Adamič F., Bohutinski O., Dimitrovski T., Gavrilović M., Jovančević R., Stanković D., Vitolić V. (1963). Jugoslavenska pomologija – jabuka. Zadruga knjiga, Beograd, Štamparija Proleter-Bečej.
- Almenar VS, Girona AJR, Sillué SM: Other moulds and mycotoxins. Guide to Foodborne Pathogens Second Edition, University of Lleida, Lleida Španjolska 2013.
- Bennett JW, Klich M: Mycotoxins. Clinical microbiology reviews 6:497-516, 2003.
- Bondonno N. P., Bondonno C. P., Ward N. C., Hodgson J. M., Croft K. D. (2017) The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. Trends in Food Science & Technology 69 (Part B): 243 - 256.
- Bordenave N., Hamaker B.R., Ferruzzi G.M. (2014) Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods. Food Funct.; 5, 18-34.
- Boyer J., Liu R.H., 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. Nutr. J. 3(5): 1-15.
- Cabañes FJ, Bragulat MR, Castellá G: Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. Toxins 2: 1111-1120, 2010.
- Čović D, Bojić M, Medić-Šarić M: Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. Farmaceutski glasnik. 65, 693-704, 2009.
- Duraković L, Duraković S: Specijalna mikrobiologija. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Durieux, Zagreb, 2000
- Duraković S, Duraković L: Mikologija u biotehnologiji. Kugler, Zagreb, 2003.
- Duraković S, Duraković L: Mikrobiologija namirnica, osnove i dostignuća. Kugler, Zagreb, 2001
- Duraković S: Primijenjena mikrobiologija. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
- Errampalli D: In *Penicillium expansum* (Blue Mold). Postharvest Decay, Elsevier Nizozemska, Amsterdam, 2014.
- Filtborg O, Frisvad JC, Samson AR: Specific association of fungal to foods and influence of physical environmental factors. U Introduction to food-boorne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn-Delft, 2004.
- Frisvad CJ, Samson AR: *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. U Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. Studies in Mycology 49:1-174, 2004.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 126, 1821-1835.

Jakobek L., Ištuk J., Buljeta I., Voća S., Žlabur Šic J., Babojelić Skendrović M. (2020) Traditional, indigenous apple varieties, a fruit with potential for beneficial effects: Their quality traits and bioactive polyphenol contents. *Foods* 9(1) Article Number: 52.

Jakobek L: Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry.* 175, 556–567., 2015

Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. *Prehrambeno\_tehnološki fakultet Osijek.*, 2007.

Jemrić T. (2016) Autohtone sorte i populacije voćaka kao nacionalno bogatstvo Republike Hrvatske. U: *Hrvatska prirodna bogatstva*, Neidhardt, V., ur., Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti Zagreb, str. 203-210.

Karakašević B: *Mikrobiologija i parazitologija*. Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb, 1980

Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida, *Arh Hig Rada Toksikol*, 55: 279-290, 2004.

Krpina I., Vrbanek J., Asić A., Ljubičić M., Ivković F., Čosić T., Štambuk S., Kovačević I., Perica S., Nikolac N., Zeman I., Zrinščak V., Cvrlje M., Janković-Čoko D. (2004) *Voćarstvo*. Nakladni zavod Globus. Zagreb.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*. 2013 Dec 29;2013:162750.

Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev*, 2008, 7, 301-311.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L.: Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79, 727-747, 2004.

Pandey, KB, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2: 270-278, 2009.

Pitt JI, Hocking DA: *Fungi and food spoilage*. Springer, New York, 2009.

Pitt JI, Hocking AD: *Fungi and food spoilage*. Academic Press, Sydney, 1985.

Pleadin J, Vasilj V, Petrović D: *Mikotoksini; pojavnost, prevencija i redukcija*. Sveučilište u Mostaru, Mostar, 2018.

Putnik P., Bursać Kovačević D., Herceg K., Pavkov I., Levaj B. (2017) Effects of modified atmosphere, anti-browning treatments and ultrasound on the polyphenolic stability,



antioxidant capacity and microbial growth in fresh-cut apples. *Journal of Food Process Engineering* 40(5): e12539.

Russell WR, Burkitt MJ, Provan GJ, Chesson A. Structure specific functionality of plant cell wall hydroxycinnamates. *J Sci Food Agric*, 1999, 79, 408-410.

Shahidi F, Yeo J : Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules*, 21: 1216, 2016.

Shahriar Khadem, Robin J.Marles: Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy – and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules* 15(11) 7985-8005, 2010.

Shahriar Khadem, Robin J.Marles: Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy – and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules* 15(11) 7985-8005, 2010.

Stare hrvatske voćke: <http://www.stare-hrvatske-vocke.com/jabuke/404-jabuka-petrovaca-bijela.html/> [22.09.2021].

Tannous, J, Keller N, Atoui A, El Khoury A, Lteif R, Oswald I, Puel O: Secondary Metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on Recent Advances in Patulin Research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58:2082–2098, 2018.

Vrbanac K, Jakopec L, Ilijaš I, Malovec K: Priručnik tradicionalnih i autohtonih vrsta i sorata voćaka stablašica, 38, Zagreb, 2007.

Zanić, D. (2020) Diplomski rad. Pomološka svojstva jesensko zimskih sorata jabuke uzgajanih na pokušalištu Šašinovec. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.)