

# Ispitivanje otpornosti tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *Penicillium expansum*

---

Crkvenac, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:109:629901>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-11**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Maja Crkvenac**

**ISPITIVANJE OTPORNOSTI TRADICIONALNIH SORTI JABUKA NA ZARAZU S PLIJESNI  
*PENICILLIUM EXPANSUM***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2019.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za primjenjenu kemiju I toksikologiju  
Katedra za biokemiju  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Biokemija  
**Tema rada:** je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 16. srpnja 2019. godine.  
**Mentor:** dr. sc. Tihomir Kovač  
**Komentor:** doc. dr. sc. Ante Lončarić

### ISPITIVANJE OTPORNOSTI TRADICIONALNIH SORTI JABUKA NA ZARAZU S PLIJESNI *PENICILLIUM EXPANSUM*

Maja Crkvenac, 137-DI

#### Sažetak:

Jabuke pripadaju skupini voća koja je najpodložnija kontaminaciji s plijesni *P. expansum*. Posljedice zaraze se ogledaju u skraćenom roku trajanja i ekonomskim gubicima, a kontaminacija plodova ovom plijesni uzrokuje i akumulaciju mikotoksina patulina u plodovima, čiji utjecaj na zdravlje ljudi još nije potpuno razjašnjen. Trenutno u svijetu ne postoje zadovoljavajuća rješenja za smanjenje koncentracije patulina u jabukama i proizvodima od jabuka. Međutim, u usporedbi s komercijalnim sortama jabuka, tradicionalne sorte posjeduju veće udjele polifenolnih spojeva, važnih čimbenika u obrani biljke od stresnih uvjeta, veću antioksidacijsku aktivnost te genski profil koji ih čini otpornijim na klimatske uvjete, biljne bolesti i ostale oblike abiotskog stresa. Stoga je cilj ovog rada bio istražiti otpornost tradicionalnih sorti jabuka 'Lijepocijetka', 'Bobovac', 'Božičnica' i 'Zlatna zimska parmenka' na zarazu s plijesni *P. expansum* i produkciju patulina te odrediti potencijalne razlike, ovisno o sorti i određenom polifenolnom profilu sorti jabuka. Rezultati pokazuju kako je polifenolni profil vrlo bitan za otpornost tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *P. expansum*. Unatoč sličnim određenim vrijednostima ukupnog sadržaja polifenola te antioksidativne aktivnosti pojedine sorte zabilježene su razlike u porastu plijesni i produkciji patulina. Najmanja producirana koncentracija patulina zabilježena je kod sorte 'Zlatna zimska pramenka' koja je daleko najbogatija katehinom, ali pokazuje i vrlo visok udio ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti. Navedeno upućuje da bi otpornost jabuka mogla biti modulirana sadržajem polifenola, no za uspostavljanje znanstvene tvrdnje potrebno je provesti dodatna istraživanja.

**Ključne riječi:** jabuke, mikotoksini, patulin, *Penicillium expansum*, polifenoli

**Rad sadrži:** 37 stranica  
15 slika  
5 tablica  
31 literaturna referenca

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

1.	doc. dr. sc. Antun Jozinović	predsjednik
2.	dr. sc. Tihomir Kovač	član-mentor
3.	doc. dr. sc. Ante Lončarić	član
4.	izv. prof. dr. sc. Natalija Velić	zamjena člana

**Datum obrane:** 30. rujna 2019.

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 Biochemistry**  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Graduate program:** Food science and Nutrition  
**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X. held July 16, 2019.

**Supervisor:** Tihomir Kovač, PhD  
**Co-supervisor:** Ante Lončarić, PhD, assistant prof.

**EXAMINATION OF TRADITIONAL APPLE VARIETIES ON THE INFECTION WITH *PENICILLIUM EXPANSUM* FUNGI**

*Maja Crkvenac*, 137- DI

**Summary:**

Apples belong to the group of fruits most susceptible to contamination with mold *P. expansum*. The consequences of the infection are reflected in the short-term economic losses, and the contamination of the fruits by this mold causes the accumulation of patulin in the poles, a mycotoxin whose role in causing the disease has not yet been fully elucidated. There are currently no satisfactory solutions in the world to reduce the concentration of patulin in apples and apple products. However, compared to commercial apple varieties, traditional varieties have higher proportions of polyphenolic compounds, important factors in plant protection against stress conditions, higher antioxidant activity, and a gene profile that makes them more resistant to climatic conditions, plant diseases and other forms of abiotic stress. The aim of the study is to examine the resistance of traditional apple varieties to the *P. expansum* colonization and the produced patulin concentrations, to determine potential differences, depending on the variety and the particular polyphenolic profile of the apple variety. Results showed that polyphenolic profile is very important for resistance on colonization by *P. expansum*. Despite to similar measured total polyphenol content values, as well as antioxidative activity there are some differences in *P. expansum* growth and patulin production observed. Apple variety 'Zlatna zimsko pramenka' showed the highest resistance to patulin production, but also contain the highest observed catechine concentration, high total polyphenol content and antioxidative activity. Such results indicate that resistance to *P. expansum* colonization could be modulated by total polyphenol content. However, further research should be carried out for scientific opinion establishing.

**Key words:** apples, mycotoxin, patulin, *Penicillium expansum*, polyphenols

**Thesis contains:** 37 pages  
15 figures  
5 tables  
31 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

1.	Antun Jozinović, PhD, assistant prof.	chair person
2.	Tihomir Kovač, PhD	supervisor
3.	Ante Lončarić, PhD, assistant prof.	co-supervisor
4.	Natalija Velić, PhD, associate prof.	stand-in

**Defense date:** September 30, 2019

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

Zahvaljujem svojem suprugu, djeci i roditeljima na neizmjerenoj podršci, strpljenju i razumijevanju.

Veliko hvala dr. sc. Tihomiru Kovaču na znanju koje mi je prenio te strpljenju koje je imao sa mnom.



# 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>
2.1.1. Veličina ploda tradicionalnih sorata jabuka .....	4
2.1.2. 'Bobovec' .....	5
2.1.3. Božićnica .....	6
2.1.4. Lijepocvjetka / žuta lijepocvetka .....	7
2.1.5. Zlatna zimska pramenka.....	8
<b>2.2. POLIFENOLI .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3. PLIJESNI .....</b>	<b>15</b>
2.3.1. Plijesni roda <i>Penicillium</i> .....	16
2.3.2. <i>Penicillium expansum</i> i kontaminacija jabuka.....	17
2.3.3. Put biosinteze patulina.....	19
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. ZADATAK.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>22</b>
3.2.1. Tradicionalne sorte jabuka korištene u eksperimentu .....	22
3.2.2. Priprema ekstrakata tradicionalnih sorti jabuka.....	22
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola.....	22
3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	23
3.2.5. Određivanje polifenola HPLC metodom .....	23
3.2.6. Priprema inokuluma plijesni <i>P. expansum</i> .....	24
3.2.7. Određivanje otpornosti plodova odabranih sorti jabuka na <i>P. expansum</i> .....	24
3.2.8. Određivanje ostataka pesticide u tradicionalnim sortama jabuka .....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>27</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>33</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>35</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

**AOA** - Antioksidacijska aktivnost (engl. Antioxidative Activity)

**AOC** - Antioksidacijski kapacitet (engl. Antioxidative Capacity)

**DPPH** - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

**FAO** - Organizacija za prehranu i poljoprivredu (engl. Food and Agriculture Organization)

**FAOSTAT** - Organizacija za prehranu i poljoprivredu (engl. Food and Agriculture Organization)

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

**IDH** - izoepoksidon dehidrogenaza

**NADPH** - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

**6MSA** - 6-metilsalicilna kiselina

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



## **1. UVOD**

Kraljica voća – jabuka, poznata je i kao ‘zabranjeno voće’, ‘voće znanja’, a u norveškoj mitologiji se spominje kao ‘voće koje obećava vječnu mladost’. Domaća, odnosno kultivirana jabuka, *Malus domestica Borkh.*, pripada porodici ruža. Prema Knjizi Postanka zmiya je nagovorila Evu da Adamu ponudi jabuku kako bi ga zavela. Adam ju je prihvatio, postao svjestan svoje golotinje, a za kaznu su oboje protjerani iz rajskog vrta. Tako je jabuka (lat. *Malum* = zlo) postala simbol znanja i besmrtnosti, kao i grijeha i seksualnosti.

Stablo jabuke najčešće je kultivirano stablo na svijetu, a kao divlje raslo je u Europi još u pretpovijesno doba. Domaća jabuka podrijetlom je iz južnog Sibira i Azije, a Grci i Rimljani uzgajali su različite sorte. Iz vremena starog Rima potječe uzrečica *ab ovo usque ad mala* = *od jajeta sve do jabuke*, jer je bilo uobičajeno obrok započeti jajetom, a završiti jabukom.

Istočna Turska i Kavkaz čine središte raznolikosti roda *Malus*. Jabuka je tamo prvotno i uzgajana, odakle se proširila po Europi. Aleksandar Veliki jednu je vrstu jabuke pronašao u Maloj Aziji oko 300 p.n.e. i donio ih u Grčku. Karlo Veliki naredio je sadnju jabuka u njemačkim zemljama oko 800. g., a oko 1600. g. već je bilo poznato gotovo 200 sorti jabuke. Engleski kolonizatori su je 1600. g. prenijeli u Sjevernu, a potom i u Južnu Ameriku.

Kroz tisuće godina uzgoja jabuka je dobila svojstva koja poznajemo danas, pa predstavlja najrasprostranjeniju voćnu vrstu na svijetu. Poznato je oko 8000 različitih sorti jabuke koje se međusobno razlikuju po boji, okusu, slatkoći i kiselosti, konzistenciji i sočnosti. (Kratka povijest jabuke, <http://www.volim-jabuke.com/price-o-jabuci/kratka-povijest-jabuke/>, 2019).

Jabuke se uzgajaju već stoljećima što je opisano u ranim legendama, pjesmama i vjerskim knjigama. Postojeće sorte jabuka razvijene su iz *Malus pumila* koja potječe iz jugozapadne Azije (Lončarić i sur., 2014). Od ove sorte - jabuka je razvijena u više različitih sorti, s različitim senzornim i organoleptičkim svojstvima. Danas je jabuka jedan od široko uzgajanih plodova s godišnjom svjetskom proizvodnjom od 83 milijuna tona u 2017. godini (FAOSTAT). Iako su se tijekom vremena razvijale brojne sorte, samo se danas neke od njih uzgajaju konvencionalno. Raspon sorti jabuka na europskom tržištu značajno je smanjen na ne više od 12 sorti. Sadnja samo malog niza sorti jabuka mogla bi ugroziti održavanje biološke raznolikosti i dovesti do svjetskih epidemija određenih štetočina i patogena. Neki od najčešće uzgajanih konvencionalnih sorti jabuka su ‘Idared’, ‘Jonagold’, ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’, ‘Granny Smith’ i ‘Mutsu’ (Lončarić i sur., 2014). Tradicionalne sorte jabuka uglavnom se uzgajaju u pojedinim voćnjacima, uglavnom u rubnim područjima i pokazuju

dobru prilagodljivost lokalnom okolišu i predstavljaju vrijedan izvor za genetsku varijabilnost usjeva. Mnoge tradicionalne sorte jabuka nose gene za otpornost na štetočine i bolesti, otpornost na sušu, zimsku izdržljivost i jedinstvenu kvalitetu voćka (Lončarić i sur., 2014).

Jedna od prvih odrednica jabuka je pomološka karakterizacija. Definiranje pomoloških svojstava predstavlja osnovu za budući znanstveno-istraživački rad na standardizaciji autohtonog genetskog bazena i stvaranju novih sorti prilagođenih danim uvjetima s određenom otpornošću i predispozicijom za komercijalnu i ekološku proizvodnju (Lončarić i sur., 2014). Tradicionalne jabuke nisu zastupljene na globalnom tržištu uglavnom zbog toga što obično ne udovoljavaju odrađenim standardima. Međutim, neka ranija istraživanja pokazala su da tradicionalnije sorte sadrže više hranjivih tvari od komercijalnih sorti. Jabuke se općenito smatraju 'zdravom hranom', a polifenolni spojevi su jedni od glavnih spojeva za koje se smatra da imaju pozitivan utjecaj na zdravlje. Polifenolni spojevi imaju nekoliko pozitivnih učinaka na zdravlje ljudi, kao što su antikancerogeni učinak, prevencija kardiovaskularnih bolesti i raka, regulacije metabolizma kolesterola u plazmi i antivirusna svojstva. Studije su pokazale da fitokemijski sastav jabuka jako varira između različitih vrsta jabuka, tijekom sazrijevanja i zrenja, pa čak i unutar različitih dijelova jabuke (Ceymann i sur., 2012). Postoji puno podataka o sadržaju polifenola u jabukama, međutim, oni su često ograničeni na nekoliko sorti. Jedna od sveobuhvatnijih procjena sadržaja polifenola i profila 104 europske sorte jabuka proveli su Ceymann i sur. (2012). Što se tiče tradicionalnih sorti jabuka na Balkanu, postoji nekoliko studija koje se bave sadržajem polifenola i antioksidacijskom aktivnošću (Lončarić i sur., 2014).

Tradicionalne sorte jabuka koje se uzgajaju u lokalnim područjima do sada su u velikoj mjeri neistražene s obzirom na pomološka i fizikalno-kemijska svojstva. Međutim, oni mogu predstavljati važan izvor bioaktivnih spojeva i činiti temelj za daljnji uzgoj. Tradicionalne sorte jabuka su bogate polifenolima i da imaju veliku antioksidacijsku aktivnost, čak i veću od one koja se nalazi u konvencionalnim sortama. Zbog raznolikosti pomoloških svojstava i sadržaja polifenola važno je sačuvati tradicionalne sorte jabuka kao izvor genetske varijabilnosti, kao i faktor biološke raznolikosti područja na kojem rastu (Lončarić i sur., 2014).

Cilj ovog diplomskog rada bio je na osnovi dostupnih literaturnih izvora prikazati dosadašnje spoznaje o zarazi jabuka s plijesni *P. expansum* te slijednoj produkciji mikotoksina patulina. Nadalje, eksperimentalno provesti istraživanje o otpornosti tradicionalnih sorti jabuka na

zarazu s plijesni *P. expansum* i produciranim koncentracijama patulina te odrediti potencijalne razlike, ovisno o sorti i određenom polifenolnom profilu sorte jabuka. Novo znanje o tradicionalnim sortama jabuka može pomoći u diverzifikaciji tržišta jabuka, sprječavajući potencijalni nestanak tih sorti i omogućiti očuvanje biološke raznolikost jabuka.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. TRADICIONALNE SORTE JABUKA

Hrvatska je zemlja s vrlo dugom tradicijom u proizvodnji voća u kojoj autohtone i udomaćene sorte zauzimaju važno mjesto. Tradicija uzgoja voćaka duga je više stoljeća, a voćke su se uzgajale na gotovo svim seoskim gospodarstvima te dijelom i u urbanim sredinama (Čmelik, 2010). Njihova zastupljenost i značaj u prošlosti su bili vrlo veliki, međutim u posljednje vrijeme došlo je do znatnog propadanja starih autohtonih udomaćenih stabala i jedan dio naše baštine nepovratno nestaje. Stara stabla nemaju veliku komercijalnu vrijednost, ali doprinose biološkoj raznolikost. Tradicionalne stare sorte jabuka dragocjeno su bogatstvo i prirodna baština svake zemlje i značajne su iz gospodarskih, agronomskih i zdravstvenih razloga. Očuvanje tih starih sorata je moguće obnavljanjem postojećih stabala ili sadnjom novih sadnica istih sorata (Skenderović Babobjelić, 2015). Jabuka je treća voćna vrsta koja se proizvodi u svijetu, nakon banane i grožđa, a ispred naranče, temelj je voćarske proizvodnje i služi kao osnovica za usporedbu isplativosti uzgoja drugih voćaka (Krpina, 2014). Plodovi jabuka dozrijevaju od najranijeg ljeta sve do zime, čime je omogućeno produženo vrijeme berbe i konzumiranja plodova. Plodovi zimskih sorata jabuka najcjenjeniji su jer dosežu najbolju kakvoću, a i sezona potrošnje im je najveća zimi kada nema velikog izbora drugih vrsta voća. Nadalje, plod jabuke ima gotovo sve što je potrebno ljudskome organizmu: voćne šećere, kiseline, vitamine, minerale, pektine i sasvim čistu vodu (Krpina, 2004). Novija znanstvena istraživanja tradicionalnih sorti jabuka navode da one sadrže znatno više polifenola od komercijalnih sorti (Jakobek i sur., 2015; Lončarić i sur., 2019). Zbog različitosti pomoloških svojstava, kakvoće plodova i otpornosti na nepovoljne abiotske i biotske čimbenike, tradicionalne je sorte važno očuvati kao izvor genetske varijabilnosti te kao čimbenika bioraznolikosti područja u kojem rastu (Skenderović Babobjelić i sur., 2014).

### 2.1.1. Veličina ploda tradicionalnih sorata jabuka

Veličina ploda sortna je osobina koja ovisi o broju plodova na stablu, tehnološkima postupcima i mikroklimatskim uvjetima kao i prirodnim i genetskim svojstvima. Veličina ploda se izražava masom i dimenzijama ploda (Skenderović Babobjelić i sur., 2014). Istraživane tradicionalne sorte jabuka međusobno se razlikuju po pomološkim svojstvima ploda, što se uočava u **Tablici 1**. Prema istraživanju koje su proveli Skenderović Babobjelić i

sur. (2014), sorta 'Lijepocvjetka' imala je najveću masu ploda, dok su značajno manju masu plodova imale sorte 'Citronka' i 'Božićnica', među kojima nije bilo statistički značajne razlike i sorta 'Bobovec' koja je imala najmanju masu ploda. Najveća visina ploda utvrđena je kod plodova sorte 'Lijepocvjetka', dok su nešto manju visinu imale sorte 'Citronka', 'Bobovec', 'Božićnica' i 'Zlatna zimska parmenka'. Sorte 'Božićnica' i 'Lijepocvjetka' imale su značajno najveću širinu plodova, a najmanju širinu ploda imala je sorta 'Bobovec' i sorta 'Zlatna zimska parmenka' koje se međusobno nisu značajno razlikovale.

Također, utvrđeno je da se tradicionalne sorte jabuka značajno razlikuju u broju i masi sjemenki. Tako sorta 'Božićnica' ima značajno najmanji broj sjemenki u plodu dok je najveći broj sjemenki imala sorta 'Zlatna zimska parmenka'. Najmanju je masu sjemenke imala sorta 'Zlatna zimska parmenka', a najveću sorta 'Lijepocvjetka'.

**Tablica 1.** Osnovna pomološka svojstva plodova istraživanih sorata jabuka (preuzeto od: Skenderović i sur., 2014).

Sorta	Masa ploda (g)	Visina ploda (mm)	Širina ploda (mm)	Indeks oblika ploda	Broj sjemenki	Masa sjemenke (mg)
'Bobovec'	103,13±14,79	55,8±2,86	61,08±2,30	0,91±0,033	6,13±1,77	46,70±11,89
'Božićnica'	148,17±23,78	52,45±3,68	75,10±4,19	0,7±0,027	3,77±1,64	56,59±19,00
'Citronka'	165,72±36,77	60,01±6,47	72,07±5,30	0,83±0,040	4,13±1,36	54,36±11,28
'Lijepocvjetka'	199,81±32,69	71,09±6,11	76,73±3,71	0,93±0,052	4,87±2,00	96,09±34,05
"Zlatna zimska pramenka"	123,31±20,85	52,88±3,53	66,1±3,97	0,80±0,033	6,69±2,24	41,90±24,69

### 2.1.2. 'Bobovec'

Podrijetlo ove sorte nije točno poznato, ali vjeruje se da potječe iz Njemačke, uzgajana je još krajem 18. stoljeća. Triploidna je sorta, što znači da je slab oparašivač. Dobro je oparašuju 'Lijepocvjetka', 'Carević', 'Ontario', 'Jonatan', 'Krivopeteljka', 'Mašanka', 'Baumanova' i 'Šampanjska reneta', 'London peping' i 'Zlatna zimska parmenka'. Stablo je srednje bujnog rasta, krošnja srednje jako razgranata, isprva piramidalnog, poslije okruglastog oblika, promjera 8 – 9 m. Sorta je otporna na proljetne niske temperature i jabučnu plijesan. Karakteristika je sorte obilna i izražena izmjenična (alternativna) rodnost. 'Bobovec' dozrijeva u drugoj polovici listopada, najkasnije od svih sorata. Jedna je od osnovnih sorata travnjačkog voćnjaka, a primjerenim skladištenjem plodove možemo upotrebljavati od

siječnja pa sve do lipnja (Priručnik tradicionalnih autohtonih vrsta i sorata voćaka visokostablašica, 2007).

Plodovi su sitni do srednje krupni, veličinom vrlo neujednačeni. Valjkastog su oblika, prema čaški ponešto suženi; također mogu biti okruglasti, ponekad slabo rebrasti. Osnovna zelena boja ploda dozrijevanjem prelazi u bjelkasto zelenožutu. Do 50 % ploda prekriveno je kratkim zrakama lagano crvene boje. Lenticle su svijetle i rijetke. Pokožica je glatka do ponešto hrapava, malo masna i čvrsta. Meso je zelenkastobijelo, grublje, trpkoo, isprva tvrdo i kiselo, poslije (od prosinca nadalje) omekša i postane harmoničnije, ukusno i sočno, bez posebne arome (Priručnik tradicionalnih autohtonih vrsta i sorata voćaka visokostablašica, 2007).

‘Bobovec’ ne spada među najkvalitetnije sorte. Plodovi ostaju na stablu do kasno u jesen, izvanredno su otporni na pritiske, odlično podnose transport i dobro se skladište. Sorta je primjerena za upotrebu u svježem stanju, za skladištenje, kao i za preradu u sok i ocat jer daje puno soka (Priručnik tradicionalnih autohtonih vrsta i sorata voćaka visokostablašica, 2007).



**Slika 1.** Tradicionalna sorta jabuke ‘Bobovec’

### **2.1.3. ‘Božićnica’**

Božićnica je triploidna sorta nepoznatog podrijetla. Jedna je od najčešćih starih sorti sjeverozapadne Hrvatske. Kao oprašivač preporučuju se ‘Zlatna Zimska Parmenka’ i ‘Jonatan’. Bujnog je rasta, razvija okruglastu, poslije plosnatu i rijetko razgranatu krošnju. Sorta je otporna na zimski mraz, a osjetljiva na jabučnu plijesan i rak kore. Traži duboka i lagana tla. Rodnost je izmjenična i obilna. Dozrijeva u prvoj polovici listopada, a



skladištenjem je postojana od studenog do proljeća (Priručnik tradicionalnih autohtonih vrsta i sorata voćaka visokostablašica, 2007).

Plodovi su srednje krupni, prilično neujednačeni, spljoštenog oblika i rebrasti. Pokožica je većim dijelom glatka, tanka i čvrsta, u skladištu postane masna. Osnovna zelena boja prelazi u zelenkastožutu i gotovo je u cijelosti prekrivena smečkastocrvenim dugim zrakama. Peteljka je vrlo kratka i srednje debela. Meso je zelenkastobijelo, sočnog vinski-kiselog okusa bez posebne arome. Pri skladištenju meso gubi na sočnosti i postaje krhko. Plodovi su otporni na pritiske i primjerena prvenstveno za preradu (Priručnik tradicionalnih autohtonih vrsta i sorata voćaka visokostablašica, 2007).



**Slika 2.** Tradicionalna sorta jabuka 'Božićnica'

#### **2.1.4. 'Lijepocvjetka' / 'Žuta lijepocvetka'**

Diploidna sorta 'Lijepocvjetka' potječe iz 1790. iz američke savezne države New Jersey. Dobro je oprašuju: 'Jonatan', 'Ananas reneta', 'Baumanova reneta', 'London peping' i 'Ontario'. Bujnog je rasta u mladosti, poslije raste srednje bujno. Krošnja je razgranata, grane su dugačke, tanke i ovješene. Osjetljiva je na proljetni mraz, fuzikladij, krvavu uš i rak kore. Za uzgoj 'Lijepocvjetke' pogodni su topliji položaji te bogata i manje vlažna tla. Plodovi nisu skloni opadanju. Za sortu je karakteristična obilna, redovita i srednje kasna rodnost (rodi u 5. do 6. godini). Dozrijeva krajem rujna, uporabna je od sredine listopada do ožujka (Priručnik tradicionalnih autohtonih vrsta i sorata voćaka visokostablašica, 2007).

Plodovi su srednje krupni do krupni, veličinom prilično neujednačeni. Oblikom su duguljastokupasti, nepravilni. Pokožica je bijelo-žute boje, na osunčanoj strani ponešto crvenkasta, s jako izraženim smeđim točkicama. Peteljka je srednje duga i srednje debela. Meso je sočno, aromatično, krhko i vrlo užitnog, odličnog okusa koji podsjeća na bananu (Priručnik tradicionalnih autohtonih vrsta i sorata voćaka visokostablašica, 2007).



**Slika 3.** Tradicionalna sorta jabuka 'Lijepocvjetka'

### **2.1.5. 'Zlatna zimska pramenka'**

'Zlatna zimska pramenka' je stara engleska sorta, u Francuskoj poznata još od 1700. Diploidna je sorta i dobar oprašivač. Dobro je oprašuju: 'Ontario', 'Krivopeteljka', 'Lijepocvjetka', 'Jonatan', 'Ananas reneta', 'Šampanjska reneta', 'Mašanka', 'London peping' i 'Bjeličnik'. Drvo je srednje bujnog rasta, a bujnost se sa starosti stabla smanjuje. Rast je prilično uspravan. Pogoduje joj teže, dovoljno vlažno tlo, zahtijeva dobru njegu i redovitu gnojidbu. Zbog lijepog i snažnog rasta, upotrebljava se kao podloga u rasadnicima. Sorta je osjetljiva na jabučni fuzikladij, lisne uši, rak kore i gorku pjegavost ploda. Slabost je sorte izražena alternativna rodnost koju je moguće spriječiti pravodobnim i temeljitim prorjeđivanjem cvjetova i plodova te temeljitom njegom. Plod dozrijeva u prvoj polovici rujna. Pravilnim skladištenjem postojan je i do ožujka. Slabo podnosi hladnjače. Najprimjerenija temperatura skladištenja je 6 °C (Priručnik tradicionalnih autohtonih vrsta i sorata voćaka visokostablašica, 2007).

Plodovi su srednje sitni, duguljasto-okruglog i pravilnog oblika. Suha i glatka pokožica isprva je osnovne zeleno-žute boje, koja u skladištu postane zlatno-žuta. Pokrovna je boja narančasta s kratkim tamnonarančastim do crvenim zrakama. Peteljka je kratka do srednje duga, srednje debela i vrlo dlakava. Meso je u punoj zrelosti kremasto, sočno, čvrsto, poslije krhko, odličnog slatkog okusa ugodne arome. Ovo je jesenska, vrlo kvalitetna stolna sorta. Koristi se prvenstveno u svježem stanju (Priručnik tradicionalnih autohtonih vrsta i sorata voćaka visokostablašica, 2007).



**Slika 4.** Tradicionalna sorta jabuka 'Zlatna zimsko pramenka'

## 2.2. POLIFENOLI

Polifenoli su spojevi koji u svojoj strukturi imaju jednu ili više-OH skupinu koje su vezane direktno na benzenski prsten (Vermeris i Nicholson, 2006). Njihova opća formula je: Ar-OH, gdje je Ar fenil, supstituirani fenil ili neka druga arilna skupina. Cijela skupina ima naziv po osnovnom predstavniku ove vrste, fenolu (Stričević i Sever, 2001). Polifenoli su po mnogočemu slični alkoholima, ali kod njih hidroksilna skupina nije vezana na zasićeni atom ugljika, već direktno na aromatski ugljikovodika (Vermeris i Nicholson, 2006). Fenol je slaba kiselina, no znatno jača od alkohola, jer se aromatski prsten uže veže s kisikom te je veza između vodikovog i kisikovog atoma relativno slaba.

Polifenolne tvari čine jednu od najbrojnijih i široko rasprostranjenih skupina spojeva u biljkama, kojoj pripada više od 9000 različitih spojeva (Martens i sur., 2005). Oni su proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka. Neki polifenoli kao što su jednostavni fenoli, benzokinoni, kumarini, kromoni, naftokinoni, ksantoni, fenolne kiseline (hidroksicimetne, hidroksibenzojeve), stilbeni ili flavonoidi su jednostavne molekule, no u polifenole se ubrajaju i neke puno kompleksnije molekule s velikom molekularnom masom kao što su npr. tanini ili lignini (Robards i Antolovich, 1997).

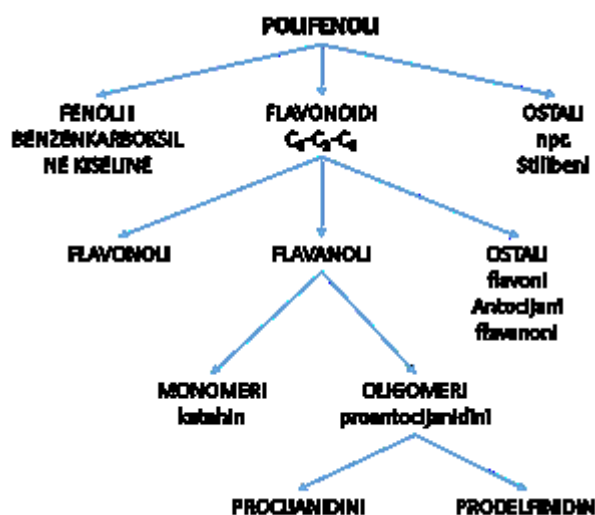
Najvažnija i najveća skupina polifenola su flavonoidi (Käkhönen i sur., 2003). Pojavljuju se u skoro svim dijelovima biljaka, ali su po udjelu različito rasprostranjeni u različitim dijelovima biljnih organa. Ovu raznovrsnost uglavnom kontroliraju geni biljke, ali na nju imaju utjecaj i drugi čimbenici kao što su stadij zrelosti biljke, klima i način uzgoja (Robards i Antolovich, 1997). Na temelju brojnih studija utvrđeno je da su neki od glavnih nutritivnih izvora

flavonoida jabuke, crveni luk, čaj te crno vino. U biljkama su široko rasprostranjene i dominantne tri podgrupe flavonoida. To su flavonoli, antocijani i flavan-3-oli (flavanoli). Osim flavonoida, važna skupina biljnih polifenola su i fenolne kiseline, posebno derivati cimetine i benzojeve kiseline (Robards i Antolovich, 1997).

### 2.2.1.1 Klasifikacija polifenola

Polifenoli obuhvaćaju vrlo veliku i raznoliku skupinu kemijskih spojeva čija je podjela moguća na više načina. Najznačajnija podjela sigurno je ona koju su predstavili Harborne i Simonds (1964), a zasniva se na broju C atoma u molekuli. Polifenoli ovisno o osnovnoj kemijskoj strukturi, prema navedenoj podjeli, se dijele na: jednostavne fenole i benzokinone (C<sub>6</sub>), fenolne kiseline (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), acetofenone i feniloctene kiseline (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>), hidroksicimetine kiseline, kumarine, izokumarine i kromone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), naftokinone (C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub>), ksantone (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>C<sub>6</sub>), stilbene i antrakinone (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), flavonoide (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), lignane i neolignane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, biflavonoide (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, lignine (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub>, kateholne melanine (C<sub>6</sub>)<sub>n</sub>, i kondenzirane tanine (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>n</sub>. Swain i Bate-Smith su 1962. godine predstavili alternativnu podjelu polifenolnih spojeva na uobičajene i manje uobičajene, a Riberean Gayon je 1972. godine predstavio podjelu u tri grupe :

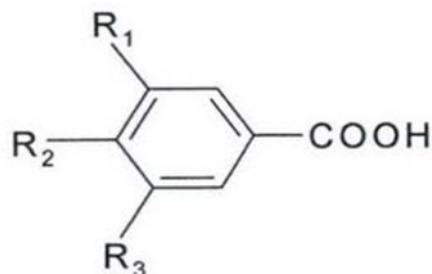
1. široko rasprostranjeni polifenoli, prisutni u svim biljkama ili važni za specifične biljke,
2. slabije rasprostranjeni, određeni broj biljaka u kojima se nalaze,
3. polifenoli kao polimerni (Vermeris i Nicholson, 2006).



**Slika 5.** Podjela polifenolnih spojeva na temelju njihove kemijske strukture (pripremljeno prema Manach i sur., 2004; Ramassamy, 2006).

### 2.2.1.1.1 Fenolne kiseline

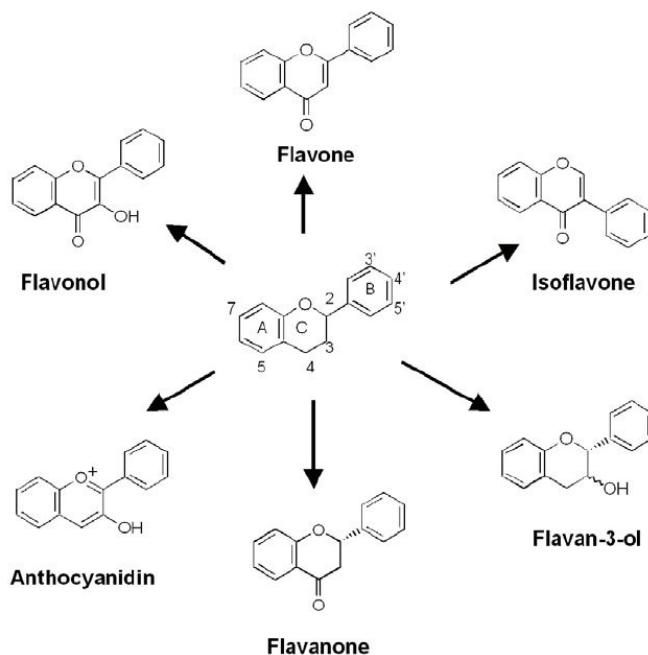
Fenolne kiseline se mogu podijeliti na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Manach, 2004). To su polifenolne komponente male molekularne mase. Osnovna struktura fenolnih kiselina prikazana je na **Slici 6**. (Bravo, 1998).



**Slika 6.** Osnovna struktura fenolnih kiselina (Bravo, 1998)

### 2.2.1.1.2 Flavonoidi

Struktura flavonoida temelji se na flavonoidnoj jezgri. Samu strukturu flavonoida čine dva aromatska prstena A i B te oksigenirani heterociklički prsten C. U prirodi se flavonoidi nalaze najčešće u obliku glikozida, tj. povezani su s molekulama šećera, što doprinosi većoj raznolikosti i broju tih spojeva (Bravo, 1998). Na **Slici 7**. prikazana je osnovna struktura flavonoida.



**Slika 7.** Osnovna struktura flavonoida (Bravo, 1998)

U skupinu flavonoida ubrajaju se flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini te flavanoli (Bravo, 1998). Flavonoli su najviše zastupljeni od svih flavonoida u hrani. Izoflavonoidi su flavonoidi čija je struktura slična strukturi estrogena. Iako nisu steroidi, na 7 i 4' poziciji imaju hidroksilne skupine što ih čini fitoestrogenima (Manach i sur., 2004). Antocijanini su biljni pigmenti topljivi u vodi. Daju plavu, purpurnu i crvenu boju cvijeću, voću i povrću.

#### **2.2.1.2 Antioksidacijska (antiradikalna) aktivnost polifenola**

Polifenoli posjeduju mnoga potencijalno pozitivna svojstva poput antibakterijskog, antialergijskog, antimutagenog, protuupalnog te antikancerogenog djelovanja. Antiradikalna tj. antioksidacijska aktivnost proizlazi iz sposobnosti sparivanja elektrona slobodnih radikala. Također, polifenoli pokazuju sposobnost kelatnog vezanja iona prijelaznih metala ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004).

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala koji bi inače uzrokovali oksidaciju pojedinih spojeva. Oni inhibiraju ili odgađaju oksidaciju supstrata kada su prisutni u koncentraciji manjoj od njega, neutraliziraju slobodne radikale tako što im daju svoj elektron. Antioksidansi djeluju kao reducirajuće sredstvo. Imaju sposobnost stabilizirati ili deaktivirati slobodne radikale tako što doniraju elektron, a zbog svoje stabilnosti ne mogu postati slobodni radikali. Da bi bili prepoznati kao antioksidansi, polifenolni spojevi moraju ispunjavati sljedeća dva uvjeta:

Antioksidans (polifenol) treba biti prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji, ali u dovoljnoj da bitno uspori ili spriječi reakciju oksidacije. Nastali radikal iz polifenola mora biti dovoljno stabilan da ne potakne lančanu reakciju.

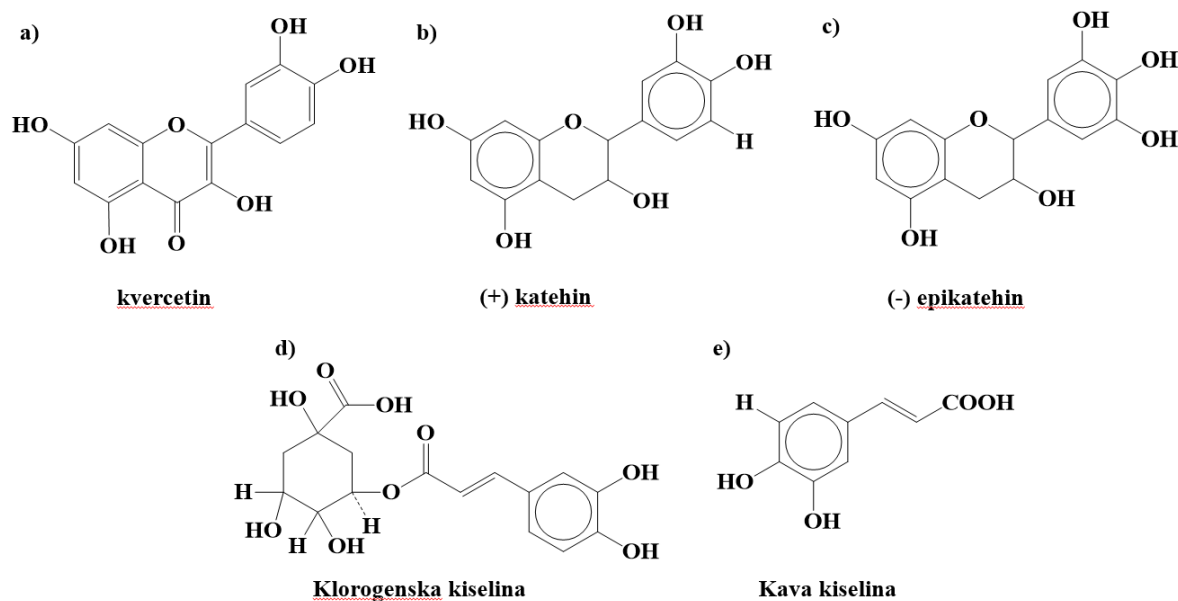
Slobodni radikali sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u elektronskim orbitalama bi to ih vrlo reaktivnima. Slobodni radikali mogu nastati u reakcijama oksidacije. Oni i udruge reaktivne vrste kisika ubrajaju superoksidni ( $\text{O}_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\text{OH}^-$ ), hidroperoksidni radikal ( $\text{HO}_2^-$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i lipidni peroksidni radikal (Kazazić, 2004). Oksidativni stres može nastati ako izostane antioksidacijska zaštita protiv slobodnih radikala. Slobodni radikali, reaktivne vrste kisika te oksidativni stres zajedno uz neke druge faktore, sudjeluju u razvoju mnogih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes te različiti upalni procesi. Polifenoli i drugi antioksidansi posjeduju mogućnost da hvatanjem slobodnih

radikala te drugim antioksidacijskim aktivnostima, smanjuju rizik od nastajanja već spomenutih bolesti (Kazazić, 2004).

### **2.2.1.3 Polifenoli u jabukama**

Jabuke (*Malus domestica*) imaju sve veći znanstveni interes jer su mnoga istraživanja pokazala korisne učinke na ljudsko zdravlje. Jabuke su raznim antioksidacijskim sastojcima povezane sa smanjenim rizikom od degenerativnih i kardiovaskularnih bolesti za koje se smatra da su uzrokovane oksidativnim stresom, posebno slobodnim radikalima i reaktivnim vrstama kisika (ROS). Antioksidanti su postali još veći fokus istraživanja zbog povećane izloženosti ROS-u. Polifenoli su najzastupljeniji antioksidanti u prehrani ljudi i najveći dio antioksidansa u jabukama, a ne nužni hranjivi sastojci poput vitamina C. Jabuke su jedan od najvažnijih voćnih izvora dijetalnih polifenolnih spojeva zapadnjačke prehrane zbog činjenice da se široko konzumiraju i dostupne su tijekom cijele godine. U Njemačkoj su najpopularnija vrsta voća s godišnjom potrošnjom od 25,9 kg po osobi (Kschonsek i sur., 2018).

Polifenoli predstavljaju skupinu sekundarnih metabolita s aromatskim prstenima koji nose jedan ili više hidroksilnih ostataka. Veliki broj konjugiranih dvostrukih veza i hidroksilnih skupina odgovoran je za njihovo antioksidacijsko djelovanje (AOA). U jabukama se nalazi nekoliko glavnih skupina polifenolnih spojeva: flavanoli (katehin, epikatehin i procijanidini), fenolne kiseline (uglavnom klorogena kiselina), dihidrokalikoni (floretnski glikozidi), flavonoli (kvercetin glikozidi) i antocijanini (cijanidin) (**Slika 8.**). Različita istraživanja govore da na polifenolni oblik i sadržaj, kao i antioksidacijski kapacitet (AOC) u jabukama utječu različite varijable, kao što su kultivar, tkivne zone, vrijeme berbe, zemljopisni položaj i uvjeti skladištenja (Kschonsek i sur., 2018).



**Slika 8.** Strukturna nekih polifenola iz jabuka: a) kvrcetin, b) (+) katehin, c) (-) epikatehin, d) klorogenska kiselina, e) kava kiselina.

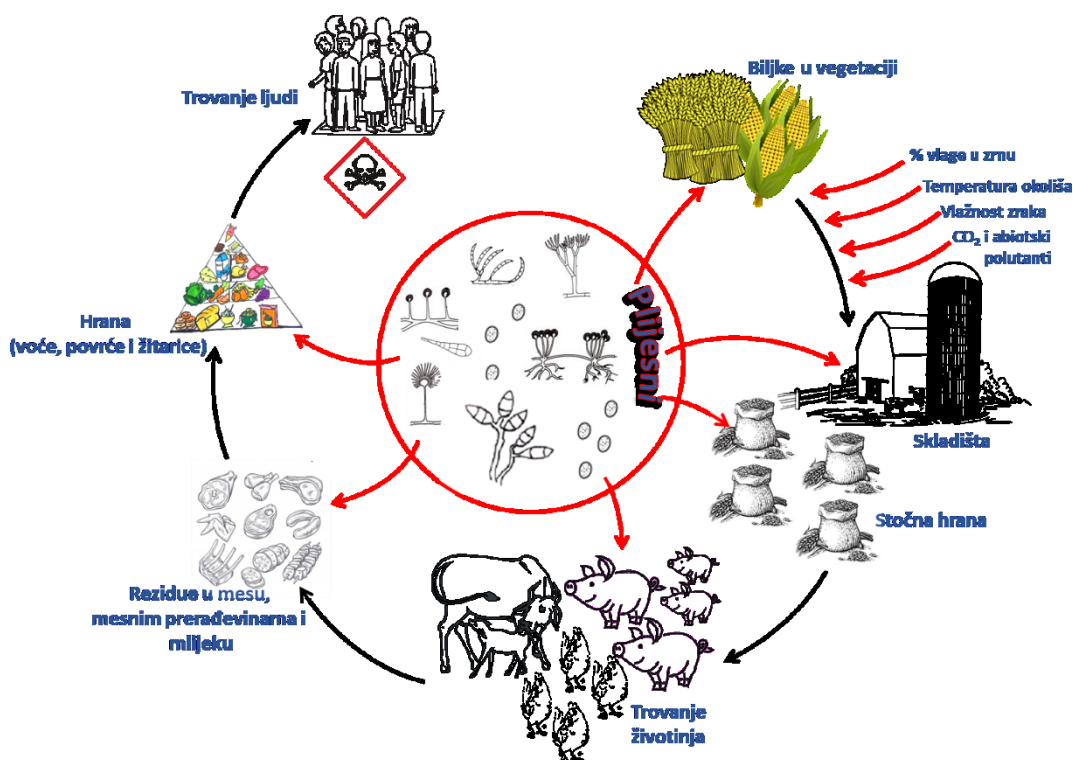
Posljednjih desetljeća nove su sorte jabuka, poput 'Braeburn', 'Elstar', 'Golden Delicious', 'Granny Smith' i 'Jonagold', sve popularniji među potrošačima, što je rezultiralo postupnim smanjenjem uzgoja starih sorti. Za nove sorte se kaže da imaju niži sadržaj polifenola. Sadržaj polifenolnih spojeva novih kultivara smanjen je uzgojem zbog adstringentnog ukusa i brzog enzimskog posmeđivanja. Stoga pretpostavljamo da je sadržaj polifenola, a samim tim i AOC starih sorti jabuka, veći u usporedbi s novim kultivarima. Usporedba sadržaja polifenola, kao i pojava i raspodjela glavnih klasa polifenola jedva se bilježi za stare i nove sorte jabuka. Postoji samo jedno istraživanje koje razlikuje stare i nove sorte jabuka. Jabuke daju mješavinu bioaktivnih spojeva, ali ukupni fenolni ili ukupni flavonoidni sadržaj često ne utječe izravno na AOC. Postoje neke studije koje su istraživale polifenolni sadržaj sorti jabuka, koristeći spektrofotometrijske testove ili HPLC analizu. Međutim, ograničeni su podaci o relativnom doprinosu svakog polifenolnog spoja u AOC jer je broj korištenih standarda ograničen, posebno s obzirom na procijanidine i kvrcetin glikozide (Kschonsek i sur. 2018).



### 2.3. PLIJESNI

Plijesni su mikroskopski, filamentozni pripadnici carstva gljiva (*Eumycetes*) – *Micromycetes*. Građene su od razgranatih ili nerazgranatih višestaničnih niti – hifa. Forma mreže hifa je micelij. S obzirom na čitav niz korisnih djelovanja plijesni koji je dobro poznat u raznim granama industrije, a posebice zbog biosinteze antibiotika, općenito se smatralo da su plijesni korisne ili bar neškodljive. Međutim, plijesni su česti patogeni na biljkama i insektima, ali i uzročnici mnogih bolesti u ljudi i životinja (**Slika 9.**). Patogene plijesni mogu prouzročiti dvije vrste oboljenja – mikozu i mikotoksikozu. Kada plijesni parazitiraju na domaćinu (npr. životinji), tada kažemo da se radi o mikozi; mikotoksikoza je trovanje organizma ili organskih sustava (npr. dišni sustav, probavni sustav, mokraćni sustav, koža, itd.) sekundarnim metabolitima plijesni - tvarima male molekulske mase (< 400) koji se nazivaju mikotoksinima. Najpoznatiji rodovi, unutar kojih se nalaze potencijalno toksikogene vrste plijesni su: *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. Najčešća biološka i kemijska istraživanja bazirala su se na mikotoksinima: aflatoksin, ohratoksin, trihotecen, zearalenon te citrinin, ergotamin, fumonizin i patulin (Drčelić, 2011).

Mikotoksine se s obzirom na mjesto njihovog nepovoljnog djelovanja može podijeliti na – hepatotoksine, nefrotoksine, imunosupresivne toksine, neurotoksine, citotoksine, fotosenzibilne toksine, estrogene toksine, respiratorne toksine i čimbenike odbijanja i povraćanja hrane. Podjela može biti zasnovana na njihovoj kemijskoj ili biokemijskoj strukturi. Stanični biolozi ih svrstavaju u generičke grupe – teratogeni, mutageni, kancerogeni i alergeni mikotoksini. Međutim, niti jedna od navedenih klasifikacija nije zadovoljavajuća u potpunosti. Bolesti u ljudi izazvane mikotoksikozama stvaraju mnogo zdravstvenih i gospodarskih problema. Najveću štetu od mikotoksina trpe zemlje koje su stjecajem okolnosti orijentirane i primorane na monokulturnu proizvodnju (nerazvijene i zemlje u razvoju) uz primitivna tehnološka rješenja (Drčelić, 2011). Istodobno, da bi proizvođači tih zemalja mogli prodavati svoje proizvode u razvijene zemlje koje štite zakonskim propisima o dopuštenim koncentracijama mikotoksina i sirovinama u hrani, nastaju dodatni troškovi, zbog kojih više ne mogu biti konkurentni na svjetskom tržištu.



Slika 9. Put kontaminacije mikotoksinima u hranidbenome lancu

### 2.3.1. Plijesni roda *Penicillium*

Jedan od najpoznatijih rodova plijesni je rod *Penicillium*, zahvaljujući otkriću Sir Alexandera Fleminga iz 1928. godine, kada je proučavajući bakteriju *Staphylococcus aureus*, otkrio kako na nju plijesan *Penicillium notatum* ima antibakterijsko djelovanje. Aktivnu supstancu iz plijesni je nazvao penicilin. Otkriveno je kako je penicilin antibiotik, a i danas se uvelike upotrebljava u medicinske svrhe. Rod plijesni *Penicillium* obuhvaća oko 223 vrste (Drčelić, 2011). Plijesni ovog roda značajne su u prehrambenoj industriji. Tako primjerice, sazrijevanje nekih vrsta sira završava se koncentriranjem i kontroliranjem enzimske aktivnosti plijesni *P. roqueforti* (Drčelić, 2011).

Nepravilnim skladištenjem prehrambenih proizvoda, dolazi do kontaminacije ovom plijesni. Tako, *P. digitatum* najčešće kontaminira citrusno voće, dok *P. expansum* kontaminira jabuke (Slika 10.). *P. digitatum* producira etilen, ubrzavajući sazrijevanje i truljenje voća i povrća. Neke od mikotoksikogenih vrsta su *P. viridicatum*, *P. commune*, *P. cyclopium*, *P. purpurogenum*, *P. verrucosum* i *P. citrinum*, a djeluju nefrotoksično, hepatotoksično, teratogeno i fetotoksično. *P. citreonigrum* i *P. ochrosalmoneum* uzrokuju Shoshkin-Kakke bolest, odnosno akutni kardijalni beri-beri (Drčelić, 2011).



**Slika 10.** Plijesan *Penicillium expansum* porasla na PDA mikrobiološkoj podlozi

### **2.3.2. *Penicillium expansum* i kontaminacija jabuka**

Zelenu ili penicilijsku plijesan uzrokuju saprofitske plijesni iz roda *Penicillium*. Ova bolest koja se pojavljuje na jabukama se još naziva i plava plijesan. Tipični znakovi bolesti su trulež plodova, koja obično zahvati cijeli plod. Na površini napadnutih plodova razvijaju se karakteristične pljesnive nakupine gljivice zeleno-plave boje koje predstavljaju konidiofore s konidijama. Također, za ovu je bolest svojstven neugodan miris, inače karakterističan za sve *Penicillium* vrste. Posebnih zaštitnih mjera protiv zelene plijesni nema, osim primjene fungicida (Bolesti jabuke prilikom skladištenja, 2019, <http://www.agroportal.hr/vocarstvo/15329>).

Na zaraženim plodovima se nakuplja patulini i u korelaciji je sa simptomima plave plijesni. Pojava plave plijesni obično započinje invazijom spora *P. expansum* na oštećenja na svježim jabukama nastalima uslijed djelovanja insekata ili tijekom neopreznog branja i rukovanja plodovima jabuka. Kako se za proizvodnju soka ili jabukovače obično upotrebljavaju jabuke srednje ili niže kvalitete, FAO snažno preporučuje uklanjanje trulih ili oštećenih jabuka prije prešanja kako bi se smanjila pojava patulina u proizvodima od jabuka. Međutim, čak i kada se zaraženi i truli plodovi uklone, patulin se može pojaviti u finalnom proizvodu uslijed upotrebe plodova kod kojih je zaražena sredina ploda, a što nije lako uočljivo jer je do zaraze i kolonizacije *P. expansumom* došlo u otvorenoj cijevi čašice cvijeta jabuke tijekom cvatnje. Jednom kada se proizvede patulin, uobičajena pasterizacija samo djelomično smanjuje koncentraciju patulina u soku. U takvim je slučajevima od velike važnosti razvoj strategija za učinkovitu kontrolu kontaminacije patulinom u proizvodima od jabuka (Zhong i sur., 2018).

S obzirom na veliku potrošnju proizvoda od jabuka kod novorođenčadi i male djece, prisutnost patulina u proizvodima na bazi jabuka izaziva zabrinutost za sigurnost hrane. Nadalje, konvencionalna kontrola plave plijesni propada zbog potencijalnih rizika takvih kemikalija po ljudsko zdravlje. U pogledu plave plijesni i patulina, studije iz prošlog desetljeća pregledale su sojeve koji stvaraju patulin i njihove gene biosinteze. Uzimajući u obzir da se patulin često otkriva u proizvodima od jabuka, razmatrani su čimbenici koji utječu na proizvodnju patulina u plodovima jabuka, uobičajene prakse za kontrolu nakon žetve i sudbina patulina tijekom prerade soka. Zapravo, ozbiljnost plave plijesni izravno je povezana s količinom proizvedenog patulina u jabukama, a kasnije to čini *P. expansum* agresivnijim tijekom dugog uskladištenja (Zhong i sur., 2018).

Zelena plijesan kod jabuke je oboljenje koje uzrokuje gljiva *Penicillium expansum* i često je prisutna na uskladištenim plodovima. Pored direktnih šteta na plodovima, postoje i indirektne koje nastaju kada nezaraženi plodovi poprimaju karakterističan „pljesniv” miris i ukus od zaraženih plodova. Također, patogen ne nanosi samo štete u proizvodnji jabuke za svježju potrošnju nego i prerađivačkoj industriji, jer stvara mikotoksin patulin koji umanjuje kvalitetu soka. Ako se patulin nađe u džemovima to znači da je za pripremu tih proizvoda korišteno voće kontaminirano plijesnima koje su stvorile patulin i izluče ga u voće. Mikotoksin se prenosi u proizvod, jer je termički stabilan i teško se razgrađuje na visokim temperaturama (Priručnik za integralnu proizvodnju i zaštitu jabuke, 2003).

Spore *Penicillium expansum* prisutne su svuda i mogu dugo da se održe u nepovoljnim uvjetima. Oprema za branje, gajbice, linije za pakovanje plodova i skladišta su obično kontaminirani sporama patogena.

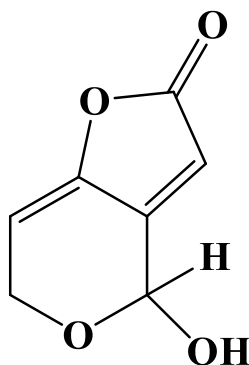
Primarna mjesta su povrede koje nastaju tokom branja i pakovanja plodova. Patogen može doprijeti preko lenticele i to se uglavnom javlja kod prezrelih plodova ili plodova koji su bili izloženi stresu (prekomjerno navodnjavanje u sušnom periodu) (Priručnik za integralnu proizvodnju i zaštitu jabuke, 2003).

Najvažnije je spriječiti oštećenje plodova tijekom berbe i pakovanja. Veoma je važno da nakon berbe što prije unijeti plodove u prohladna skladišta. Obavezno uraditi dezinfekciju skladišta i za ovu namjenu u svijetu se najčešće koristi klor (100 ppm) ili natrij-*o*-fenilfenat u koncentraciji od 0,3 % do 0,5 %. Primjena fungicida prije berbe na bazi strobilurina, boskalida, tiofanat metila uz poštovanje karence može smanjiti pojavu zelene plijesni na plodovima jabuke (Priručnik za integralnu proizvodnju i zaštitu jabuke, 2003).

Kontaminacija voća i prerađevina od voća nije samo rizična po zdravlje, već dovodi i do ekonomskih gubitaka. Mikotoksini su odgovorni za milione dolara gubitaka godišnje zbog razvoja bolesti kod ljudi i životinja i odbačenih kontaminiranih proizvoda (Priručnik za integralnu proizvodnju i zaštitu jabuke, 2003).

### 2.3.3. Put biosinteze patulina

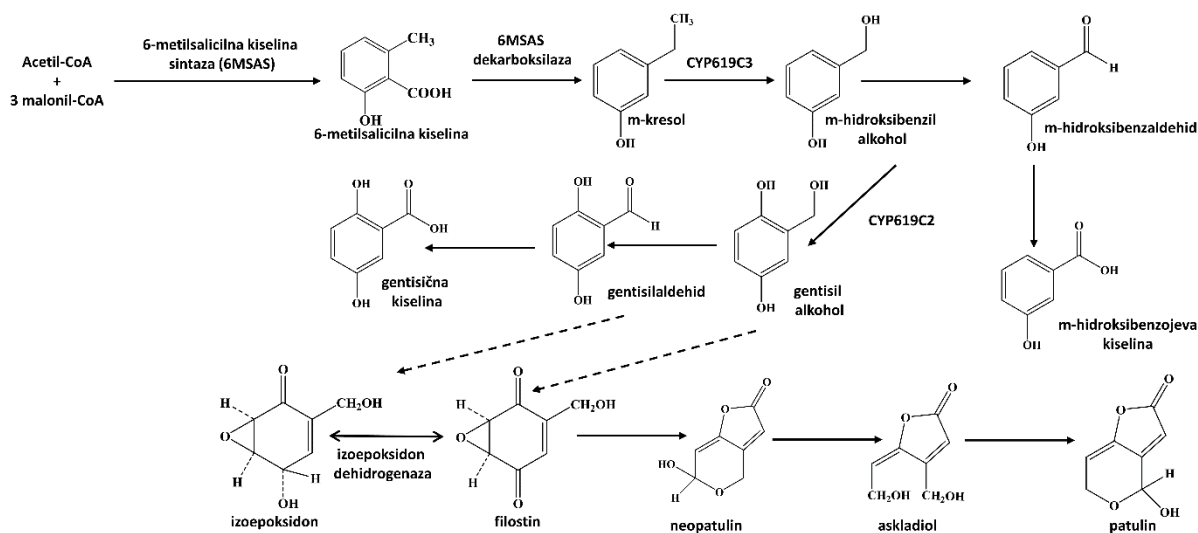
Ne postoje jasni dokazi da je patulin kancerogen, međutim, kod životinja je izazvao imunotoksične učinke i neurotoksičnost. Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. The International Agency for Research on Cancer, IARC) je zaključila da nije moguće procijeniti kancerogenost patulina kod ljudi i da postoje neadekvatni dokazi kod eksperimentalnih životinja. Patulin je procijenjen od strane Zajedničkog FAO/WHO stručnog odbora za prehrambene aditive (engl. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) 1990. i ponovno procijenjen 1995. godine. Ova zadnja procjena uzela je u obzir činjenicu da je većina patulina, koju su štakori konzumirali, izlučena unutar 48 sati, a 98 % unutar 7 dana. Studija o zajedničkim učincima patulina na reprodukciju, dugoročnu toksičnost i kancerogenost, ukazala je na bezopasni unos od 43  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne mase (Smjernice za prevenciju i smanjenje kontaminacije patulinom u sokovima od jabuke i sastojcima sokova od jabuke u drugima proizvodima, 2003).



Slika 11. Struktura patulina

Patulin je poliketidni metabolit, kao i nekoliko drugi mikotoksina, npr. aflatoksin, fumonizini i ohratoksin, iako je ovaj posljednji toksin hibridni spoj poliketidne aminokiseline. Proučavanje njegove biosinteze povijesno je važno iz dva razloga. Prvo, acetatirana hipoteza temeljila se na ugrađivanju radioaktivno obilježenog acetata u 6-metilsalicilnu kiselinu (6MSA) i dovela do prepoznavanja velike klase prirodnih proizvoda poliketida. Drugi razlog je

taj što je enzim koji je uključen u prvi korak biosinteze patulina bio prvi poliketid sintaza koji je proučavan i okarakteriziran in vitro. Biosintetski put patulina sastoji se od oko 10 koraka kako je sugerirano u nekoliko biokemijskih studija i identifikacijom nekoliko mutanta koji su blokirani na različitim koracima u biosintetskom putu patulina (Puel i sur., 2010).



Slika 12. Put biosinteze patulina

Prvi korak u proizvodnji patulina je stvaranje 6MSA kondenzacijom jednog acetil-CoA i tri malonil-CoA jedinice. Tu pretvorbu provodi multifunkcionalni enzim koji ima nekoliko enzimskih aktivnosti: acetil i malonil transferaza, ketoacil sintaza, ketoreduktaza i dehidrataza. Ovaj enzim također ima funkciju proteina nosača acila i sastoji se od četiri identična polipeptidna lanca (Puel i sur., 2010). Produkti dobiveni iz *m*-krezola i gentisaldehyda strukturno su slični 6-metilsalicilnoj kiselini. 6MSA se modificira u *m*-krezol pomoću 6MSA dekarboksilaze, zatim se metilna skupina *m*-krezola oksidira u obliku aldehidne skupine. Nakon ovog koraka slijedi reakcija hidroksilacije koja dovodi do stvaranja gentisaldehyda (Puel i sur., 2010). Konverzija gentisaldehyda u dvije strukture prstena zahtijeva otvaranje prstena mehanizmom posredovanim bilo monooksigenazom ili dioksigenazom. Izolacija nekoliko mutanata *P. griseofulvum* dovela je do identifikacije četiri post-aromska prekursora: izoeopksidon, filostin, neopatulin i askladiola. Otkrića ovih spojeva dovela su i do hipoteze da se nakon sinteze gentisaldehyda događa korak epoksidacije (Puel i sur., 2010). Priroda epoksidacije ostala je predmet nagađanja budući da postoji spor o tome je li supstrat reakcije epoksidacije gentizilolni alkohol ili gentisaldehyd. Poznato je nekoliko enzimskih aktivnosti povezanih s biosintezom patulina. Među njima,

prstenasta hidroksilacija *m*-hidroksibenzil alkohola u gentizil-alkohol zahtijeva NADPH i molekularni kisik za aktivnost. Inhibiranje ugljičnog monoksida na reverzibilan način sugerira uključenost citokroma P450. Pet enzima koji su uključeni u biosintezu patulina djelomično su ili potpuno pročišćeni: 6-metilsalicilna kiselina sintaza, 6-metilsalicilna kiselina dekarboksilaza, *m*-hidroksibenzil alkohol dehidrogenaza, izoepoksidon dehidrogenaza (IDH) i neopatulin sintaza (Puel i sur., 2010).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati otpornost tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *P. expansum*. Cilj diplomskog rada bio je na osnovi dostupnih literaturnih izvora prikazati dosadašnje spoznaje o zarazi jabuka s plijesni *P. expansum* te slijednoj produkciji mikotoksina patulina. Nadalje, experimentalno provesti istraživanje o otpornosti tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *P. expansum* i produciranim koncentracijama patulina te odrediti potencijalne razlike, ovisno o sorti i određenom polifenolnom profilu sorti jabuka 'Lijepocijetka', 'Bobovac', 'Božičnica' i 'Zlatna zimska parmenka'.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. Tradicionalne sorte jabuka korištene u eksperimentu

Tradicionalne sorte jabuka, 'Lijepocijetka', 'Bobovac', 'Božičnica' i 'Zlatna zimska parmenka' ustupljene su od strane OPG Horvatić (Cvetkovac, Hrvatska).

#### 3.2.2. Priprema ekstrakata tradicionalnih sorti jabuka

Ekstrakcija uzoraka tradicionalnih sorti jabuka provedena je u ultrazvučnoj kupelji tijekom 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Jedan gram usitnjenih jabuka je ekstrahiran u 10 mL ekstrakcijskog otapala (80 % MeOH + 1 % HCl). Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani pri 10000 o/min i profiltrirani kroz filtere za špricu (0,45 µm). Tako pripremljeni uzorci čuvani su u hlanjaku (4 °C) do analize. Pripremljeni ekstrakti su korišteni za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenola.

#### 3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola

Određivanje ukupnih polifenola provodi se u alkoholnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Pinelo i sur., 2005).

Postupak: U staklenu epruvetu otpipetira se redom 600 µL ekstrakta, 3 mL Folin-Ciocalteu reagensa (1:10) te nakon nekoliko minuta 2,4 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci inkubiraju u 2 sata u tami. Nakon toga apsorbancija se mjeri na spektrofotometru (Jenway 6300, Bibby Scientific, UK) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju

(1 %-tna mravlja kiselina u 80 %-tnom metanolu). Koncentracija ukupnih fenola preračuna se prema kalibracijskom pravcu izrađenom s galnom kiselinom (GA), rezultati se iskazuju u mg GA/100 g (Lončarić, 2014).

### 3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Uklanjanje DPPH radikala praćeno je spektrofotometrijski pri 515 nm koje se očituje u sniženju apsorbancije uslijed smanjenja količine antioksidansa ili reakcije s radikalima u reakcijskoj smjesi (Brand-Williams i sur., 1995). U epruvetu se doda 0,2 mL uzorka, 2 mL metanola i 1 mL otopine DPPH, dobro promiješa na vorteks mješalici te inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi. Rezultat se preračuna iz kalibracijskog pravca troloxa. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.

### 3.2.5. Određivanje polifenola HPLC metodom

Analize flavonola, flavanola i fenolnih kiselina izvedene su na HPLC analitičkom sustavu (Varian, USA) koji se sastoji od ProStar 230 pumpe, ProStar 310 UV-Vis detektora i ProStar 330 PDA detektora. Separacija polifenolnih spojeva izvedena je na OmniSpher C18 koloni (unutrašnjeg promjera 250 x 4,6 mm, promjera čestica 5  $\mu$ m, Varian, USA) koja je zaštićena pretkolumnom (ChromSep 1 cm x 3 mm, Varian, USA). Podaci su prikupljeni i obrađeni na IBM kompjuterskom sustavu s instaliranim programom Star Chromatography Workstation (verzija 5.52).

Flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline razdvojeni su reverzno-faznom HPLC metodom primjenom 0,1 % fosforne kiseline kao mobilne faze A te 100 %-nog metanola kao mobilne faze B. Uvjeti analize prikazani su u **Tablici 2**. Period re-ekvilibracije između pojedinih analiza bio je 10 minuta. Spektar je sniman u području valnih duljina od 190 do 600 nm. Procijanidin B2, (+)-katehin i (-)-epikatehin, floretin i floridzin detektirani su na valnoj duljini 280 nm, klorogenska i kava kiselina pri 320 nm, a kvercetin i rutin pri 360 nm.

**Tablica 2.** Uvjeti za analizu flavonola, flavanola i fenolnih kiselina HPLC metodom

Vrijeme (min)	A = 0,1 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	B = 100 % metanol
0	95	5
30	20	80
33	20	80
35	95	5
Protok	0,8 mL/min	
Temperatura	20 °C	
V (injektiranja)	20 $\mu$ l	

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

Inokulum plijesni *P. expansum* CBS 325.48 pripremljen je uzgojem kulture plijesni na kosom PDA (krumpirovom glukoznom agaru (engl. Potato Dextrose Agar)) tijekom sedmodnevne inkubacije. Porasla kultura upotrebljena je za pripremu suspenzije spora gustoće  $2,5 \cdot 10^6$ , a koja je dalje primijenjena pri određivanju otpornosti plodova odabranih sorti jabuka na zarazu *P. expansum*.

### 3.2.7. Određivanje otpornosti plodova odabranih sorti jabuka na *P. expansum*

Plodovi jabuka su narezani na ploške debljine 1 cm te su sterilizirani u Petrijevim zdjelicama. Disk kulture plijesni je prenesen u središte ploške jabuke te je praćen porast plijesni do dostizanja maksimalnog promjera od 9 cm pri 37 °C. Nakon isteka vremena inkubacije izuzeti uzorci su homogenizirani u laboratorijskom blenderu te uskladišteni pri -80 °C do pripreme uzoraka za analizu produciranih koncentracija patulina. Kontrolni uzorci su pripremljeni na isti način no nisu inokulirani kulturom plijesni.

Producirane koncentracije patulina određene su LC-MS/MS metodom nakon pripreme uzoraka zaraženih jabuka primjenom MycoSep<sup>®</sup>228 AflaPat Push-through format (Romer Labs<sup>®</sup>, Tulln, Austrija) prema uputama proizvođača. Ukratko, 5 g homogeniziranog uzorka je nadliveno sa 20 mL smjese 84:16 acetonitril: voda (v/v). Ekstrakcija je provedena primjenom uređaja Multi RS-60 (Biosan, Riga, Latvija) tijekom 45 min. Nakon ekstrakcije 8 mL ekstrakta je preneseno u staklenu epruvetu i propušteno kroz kolonu, filtrirano kroz najlonski filter promjera pora 0,22 µm (Najlon, Labex Ltd., Mađarska) te preneseno u vialu.

U svrhu provjere iskorištenja metode (engl. recovery), kontrolni uzorak obogaćen je otopinom standarda patulina u koncentraciji 10 ng mL<sup>-1</sup> i pripremljen na isti način kako je gore opisano. Sve upotrijebljene kemikalije su bile 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 u **Tablici 3**, 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-). 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), potvrdni ion: 153 > 81 (m/z)).

**Tablica 3.** Gradijent pokretne faze

Vrijeme (min)	B %	C %
0	100	0
1,8	100	0
2,3	10	90
3	10	90
3,01	100	0
6	100	0

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 ng kg<sup>-1</sup>.

### 3.2.8. Određivanje ostataka pesticide u tradicionalnim sortama jabuka

Prikupljeni uzorci jabuka su usitnjeni i homogenizirani sjeckalicom. 10 g uzorka je ekstrahirano s 40 mL smjese otapala acetonitril/ultračista voda (84/16 v/v), a ekstrakt razrijeđen acetonitrirom u omjeru 1:4 te protisnut kroz MycoSep® 228 AflaPat Multifunctional kolonu (Romer Labs, Austrija) i profiltriran kroz filter veličine pora 0,22 µm. Određivanje ostataka pesticida provedeno je upotrebom UHPLC-MS/MS instrumenta Acquity H-class-Xevo TQD (Waters, SAD) sa sučeljem za elektrosprejnu ionizaciju i trostrukim kvadrupolnim analizatorom masa. Kromatografsko razdvajanje analita izvršeno je pri protoku 0,5 mL/min na Ultra Acqueous C18 koloni dimenzija 100 x 2,1 mm i veličinom čestica 3 µm (Restek, SAD) temperiranoj na 50 °C uz eluiranje pomoću ultračiste vode (eluent A) i metanola (eluent B), pri čemu su oba eluenta sadržavala 4 mM amonijeva formijata i 0,1 % mravlje kiseline. Volumen injektiranog ekstrakta je bio 10 µL, a korišteni gradijent je naveden u **Tablici 4**. MS/MS detekcija je provedena korištenjem tzv. MRM načina rada spektrometra masa (engl. Multiple Reaction Monitoring, praćenje višestrukih reakcija). Spojevi su snimani u pozitivnom i negativnom ionizacijskom načinu, pri čemu su kao ioni prekursori korišteni većinom [M+H]<sup>+</sup> i [M-H]<sup>-</sup> molekularni ioni. MS/MS parametri korišteni za MRM analizu iznose kako slijedi: napon ESI igle za raspšivanje (engl. capillary) 3,5 kV, temperatura izvora 150 °C, temperatura raspršivanja 350 °C, protok plina za raspršivanje (eng. cone gas) 50 L/h i protok plina za isušivanje (engl. desolvation gas) 650 L/h (oba dušik). Kao kolizijski plin korišten je argon pri tlaku od 3,7 x 10<sup>-3</sup> mbar u kolizijskoj ćeliji.

Za prikupljanje podataka mjerenja te procesiranje rezultata korišteni su programski paketi MassLynx i TargetLynx (v. 4.1, Waters, SAD).

**Tablica 4.** Korišteni gradijent eluiranja analita (ostaci pesticida)

Vrijeme min	A %	B %
0	90	10
1,5	90	10
4,0	40	60
8,0	30	70
11,0	0	100
12,0	0	100
12,1	90	10
15,0	90	10

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Plodovi tradicionalnih sorata jabuka danas se rijetko mogu kupiti u trgovinama. S obzirom na to da su stare sorte otpornije na bolesti i štetnike, one ne zahtijevaju velik broj prskanja i ne traže intenzivnu njegu pa se lakše mogu prilagoditi organskom uzgoju. U posljednje je vrijeme sve popularniji organski uzgoj voća, s naglaskom na tradicionalne sorte. Stoga je važno utjecati na svijest potrošača da biraju i konzumiraju plodove iz organskog uzgoja, koji se, unatoč ponekad neobičnim pomoloških svojstvima, odlikuju dobrom kakvoćom. S obzirom na to, kao i na mnoge prednosti uzgoja tradicionalnih sorata, važno ih je očuvati jer se zbog odumiranja starih stabala pojedinih sorata gubi značajan izvor genetskog materijala i osiromašuje asortiman plodova jabuka na tržištu.

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada je upravo bio ispitati otpornost tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *P. expansum* te slijednu produkciju mikotoksina patulina. Nadalje, ispitivan je utjecaj polifenolnih spojeva koji mogu utjecati na stabilnost i očuvanje ploda jabuke. Novo znanje o tradicionalnim sortama jabuka može pomoći u diverzifikaciji tržišta jabuka, sprječavajući potencijalni nestanak ispitivanih tradicionalnih sorti i omogućiti očuvanje biološke raznolikost jabuka.

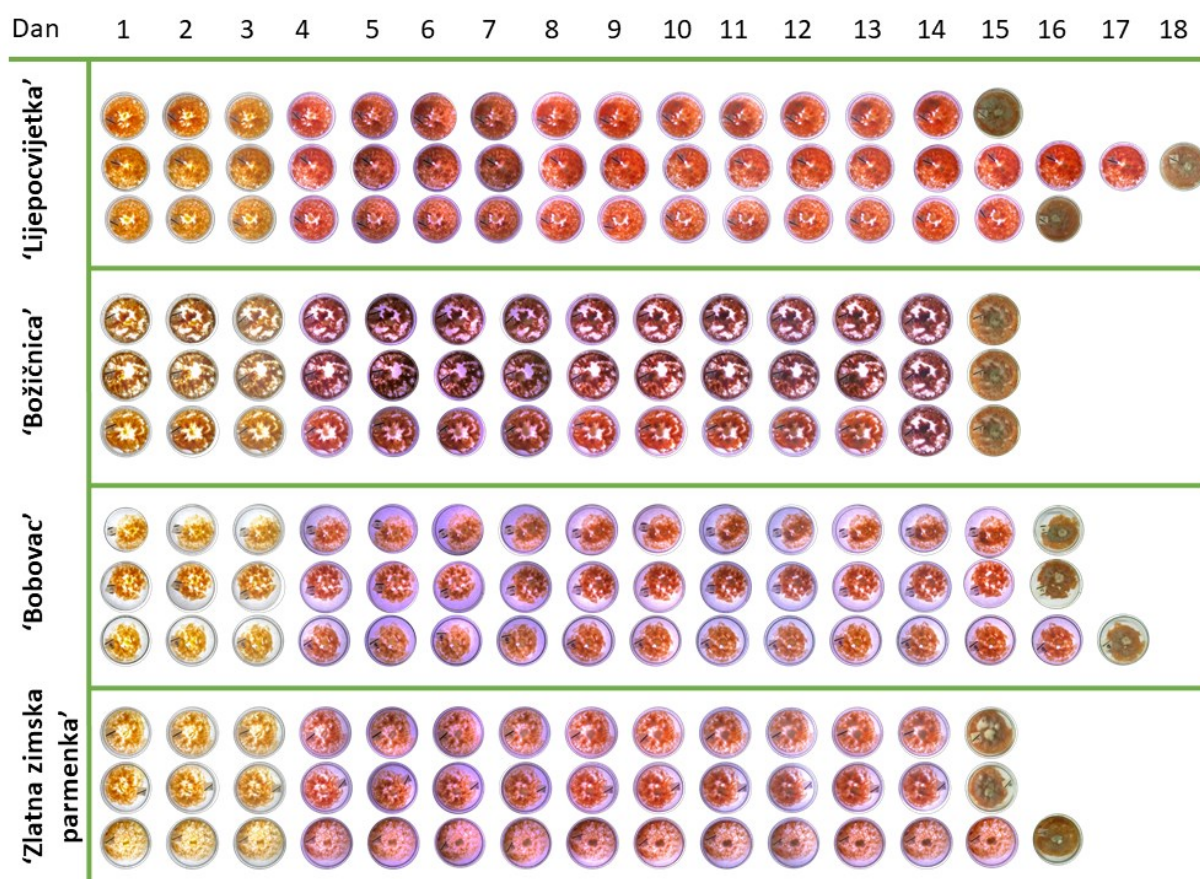
U **Tablici 5.** prikazan je rezultat određivanja sadržaja ukupnih polifenola (TPC) i antioksidacijske aktivnosti (AA) ispitivanih tradicionalnih sorti jabuka.

**Tablica 5.** Udio ukupnih polifenola (TPC) i antioksidacijske aktivnosti (AA) ispitivanih tradicionalnih sorti jabuka

Sorta	TPC (mg GA/100 g FW)	AA (mmol trolox /100 mL)
'Lijepocvjetka'	260,17 ± 0,00	402,37 ± 2,75
'Bobovec'	289,83 ± 3,67	368,01 ± 6,17
'Zlatna Zimska Parmenka'	387,29 ± 6,36	391,97 ± 1,51
'Božićnica'	402,12 ± 1,83	407,70 ± 8,08

Rezultati ukazuju kako se tradicionalne sorte jabuka međusobno razlikuju u sadržaju ukupnih polifenola i antioksidacijskoj aktivnosti. Pri tome je najveći sadržaj ukupnih polifenola zabilježen kod sorte 'Božićnica' 402,12 mg GA/100g FW, a najmanji sadržaj ukupnih polifenola kod sorte 'Lijepocvjetka' 260,17 mgGA/100g FW.

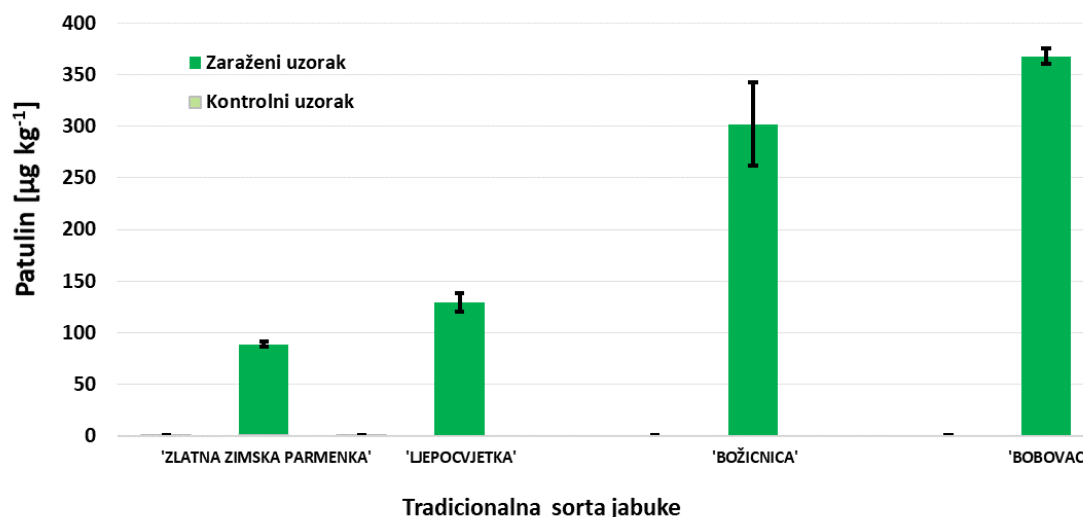
Nadalje, najveću antioksidacijsku aktivnost pokazala je sorta 'Božićnica' 407,70 mmol trolox/100 mL, a najmanju sorta 'Bobovec'.



**Slika 13.** Tradicionalne sorte jabuka u vremenu od inokulacije do potpune zaraze s plijesni *P.expansum*

Na **Slici 13.** prikazani su uzorci tradicionalnih sorti jabuka zaraženi s plijesni *P. expansum*. Promatran je vremenski period potreban da uzorak jabuke bude u potpunosti zaražen s plijesni. Na osnovu prikazanog se može zaključiti da je na zarazu s plijesni *P. expansum* najveću otpornost pokazala 'Lijepocvijetka'. Međutim, ova fotografska analiza porasta plijesni ne može kvantitativno odrediti najotporniju tradicionalnu sortu jabuka na zarazu s plijesni *P. expansum* te je na istim uzorcima provedena LC-MS/MS analiza sadržaja patulina. Na **Slici 14.** prikazan je sadržaj patulina u odabranim sortama jabuka nakon zaraze s plijesni *P. expansum*. Vidljivo je kako je značajno najveća koncentracija patulina producirala plijesan porasla na jabuci sorte 'Bobovac' ( $370 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), dok je najmanja producirana koncentracija patulina zabilježena kod plijesni porasle na sorti 'Zlatna Zimska Pramenka' ( $95 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

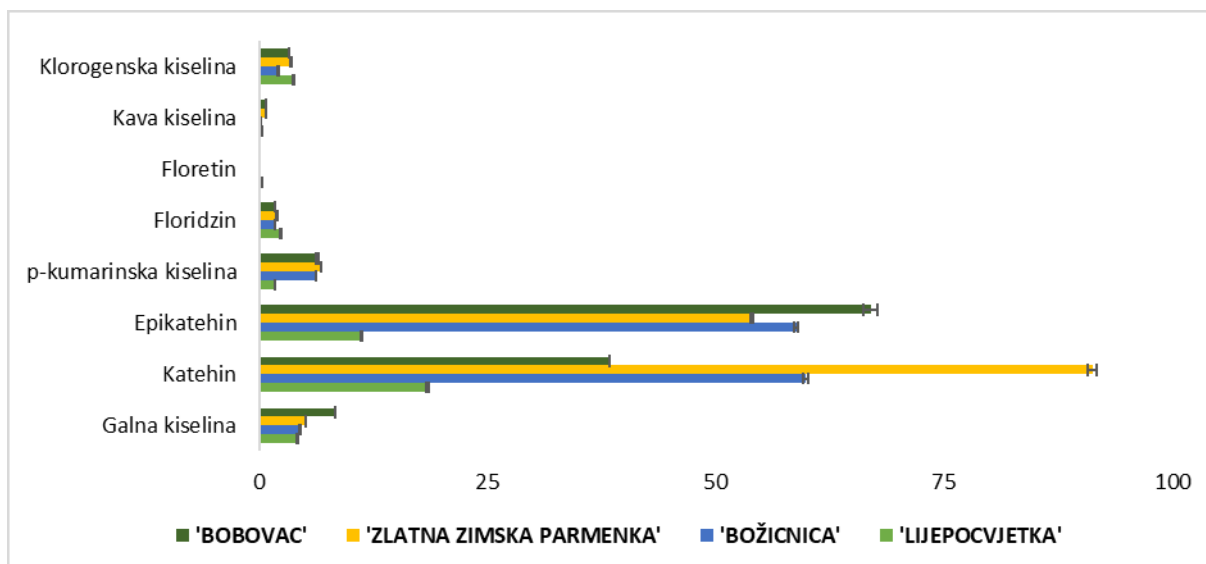




**Slika 14.** Sadržaj patulina u odabranim tradicionalnim sortama jabuka nakon zaraze s plijesni *P. expansum*

Budući da na opisane rezultate mogu utjecati i pojedini pesticidi, odnosno modulirati porast plijesni na pojedinoj sorti, pripremljeni uzorci ispitivanih tradicionalnih sorti jabuka su analizirani i na sadržaj pesticida koji se uobičajeno pojavljuju u uzorcima komercijalnih sorti jabuka. Rezultati su pokazali kako ispitivani plodovi nisu sadržavali pesticide, odnosno kako je sadržaj azoksistrobina ispod limita detekcije uređaja. Azoksistrobin je fungicid širokog spektra koji je odobren za upotrebu na razini EU. Ima nisku topljivost u vodi, nehlapljiv je, može biti postojan u tlu, a može biti i postojan u vodenim sustavima. Ima malu toksičnost za sisavce, umjereno je otrovan za ptice, većinu vodenih vrsta, medonosnih pčela i zemljanih glista (<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/54.htm>, 2019). Najvjerojatnije je da je prisutnost askostrobina samo rezultat tretiranja poljoprivrednih kultura s obližnjih poljoprivrednih zemljišta te da je ovaj pesticid zabilježen u tako niskim koncentracijama jer jabuke nisu njime tretirane već je do njih slučajno dospio zrakom.

Gore opisani i prikazani rezultati određivanja sadržaja patulina te sam porast plijesni na uzorcima tradicionalnih sorti jabuka upućuju kako bi jabuke u svom sastavu mogle prirodno imati određene spojeve koji utječu na porast plijesni i produkciju patulina, a to se može ogledati i u određenoj antioksidativnoj aktivnosti pojedine ispitivane sorte (**Tablica 5.**).



**Slika 15.** Polifenolni profil istraživanih tradicionalnih sorti jabuka

Na **Slici 15.** prikazani su rezultati određivanja pojedinačnih polifenolnih spojeva u uzorcima tradicionalnih sorti jabuka. Iz rezultata se može uočiti da su u uzorcima tradicionalnih sorti jabuka najzastupljenije su polifenolne grupe flavanoli ((+)-katehin i (-) epikatehin), galna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, klorogenska kiselina, dihidrohalkoni (florelin i floridzin) i kava kiselina.

Na osnovu prikazanog polifenolnog profila (**Slika 15.**) se može zaključiti kako je on vrlo bitan za otpornost tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *P. expansum*. Naime, unatoč sličnim određenim vrijednostima ukupnog sadržaja polifenola te antioksidativne aktivnosti pojednine sorte (**Tablica 5.**), vidljive su razlike u porastu plijesni (**Slika 13.**) i produkciji patulina (**Slika 14.**). Najmanja producirana koncentracija patulina zabilježena je kod sorte 'Zlatna zimska pramenka' koja je daleko najbogatija po pitanju sadržaja katehina (**Slika 15.**), ali pokazuje i vrlo visok udio ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti. Navedeno upućuje da bi otpornost jabuka mogla biti modulirana sadržajem polifenola, no za uspostavljanje znanstvene tvrdnje potrebno je provesti dodatna istraživanja.

## **5. ZAKLJUČCI**

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

1. Tradicionalne sorte jabuka međusobno se razlikuju u sadržaju ukupnih polifenola i antioksidacijskoj aktivnosti. Pri tome je najveći sadržaj ukupnih polifenola zabilježen kod sorte 'Božićnica', a najmanji sadržaj ukupnih polifenola kod sorte 'Lijepocvjetka';
2. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazala je sorta 'Božićnica' 407,70 mmol trolox/100 mL, a najmanju sorta 'Bobovec';
3. Na osnovi vremenskog perioda potrebnog da uzorak jabuke bude u potpunosti zaražen s plijesni se može zaključiti da je na zarazu s plijesni *P. expansum* najveću otpornost pokazala sorta 'Lijepocvjetka';
4. Značajno najveća koncentracija patulina producirala je plijesan porasla na jabuci sorte 'Bobovac' (370  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), dok je najmanja producirana koncentracija patulina zabilježena kod plijesni porasle na sorti 'Zlatna Zimska Pramenka' (95  $\mu\text{g kg}^{-1}$ );
5. Rezultati su pokazali kako ispitivani plodovi nisu sadržavali pesticide, odnosno kako je sadržaj jedinog zabilježenog pesticida, fungicida širokog spektra djelovanja - azoksistrobina, ispod limita detekcije uređaja;
6. U uzorcima tradicionalnih sorti jabuka najzastupljenije su polifenolne grupe flavanoli ((+)-katehin i (-) epikatehin), galna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, klorogenska kiselina, dihidrohalkoni (florelin i floridzin) i kava kiselina te
7. Polifenolni profil je vrlo bitan za otpornost tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *P. expansum*. Unatoč sličnim određenim vrijednostima ukupnog sadržaja polifenola te antioksidativne aktivnosti pojednane sorte zabilježene su razlike u porastu plijesni i produkciji patulina. Najmanja producirana koncentracija patulina zabilježena je kod sorte 'Zlatna zimska pramenka' koja je daleko najbogatija katehinom, ali pokazuje i vrlo visok udio ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti. Navedeno upućuje da bi otpornost jabuka mogla biti modulirana sadržajem polifenola, no za uspostavljanje znanstvene tvrdnje potrebno je provesti dodatna istraživanja.

## **6. LITERATURA**

---

Adamić F, Bohutinski O, Dimitrovski T, Gavrilović M, Jovančević R, Stanković D, Vitolović V:  
Jabuka – Jugoslovenska pomologija, Zadružna knjiga, 1963.

Agroportal: Bolesti jabuke prilikom skladištenja.  
<https://www.agroportal.hr/vocarstvo/15329> [29.7.2019.]

Bravo L : Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance.  
Nutrition Reviews 56: 317-337, 1998.

Čmelik Z: Klasični (ekstenzivni) voćnjaci u Hrvatskoj. Pomologia Croatica: glasilo Hrvatskog  
agronomskog društva: 1330-6626, 3-4; 55-66, 2010.

Drčelić M: Plijesni i toksini, 3-9, 2011.

Hrvatska agencija za hranu (HAH): Smjernice za prevenciju i smanjenje kontaminacije  
patulinom u sokovima od jabuke i sastojcima sokova od jabuke u drugima  
proizvodima, 1-4, <https://www.hah.hr/pdf/smjernice-patulin.pdf>, [30.7.2019.]

Jakobek L: Ancient apple varieties from Croatia as a source of a bioactive polyphenolic  
compounds. Journal of Food Composition and Analysis 45, 2015.

Jemrić T, Fruk G, Čiček D, Skenderović Babobjelić M, Šindrak Z: Preliminary results on fruit  
quality of 8 Croatian local apple cultivars. Agriculturae Conspectus Scientificus 77, 4:  
223-226, 2014.

Kähkönen P, Heinämäki J, Ollinen V, Heinonen M: Berry anthocyanins: Isolation,  
identification and antioxidant activities. Journal of Science of Food and Agriculture 89:  
1403-1411, 2003.

Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i  
toksikologiju 55, 279-290, 2004.

Kratka povijest jabuke: <http://www.volim-jabuke.com/price-o-jabuci/kratka-povijest-jabuke/>  
[29.7.2019.]

- Krpina I, Vrbanek J, Asić A, Ljubičić M, Ivković F, Ćosić T, Štambuk S, Kovačević I, Perica S, Nikolac N, Zeman I, Zrinščak V, Cvrlje M, Janković-Čoko D: Voćarstvo, Nakladni zavod Globus, 2004.
- Kschonsek J, Wolfram T, Stöckl A, Böhm V: Polyphenolic Compounds Analysis of Old and New Apple Cultivars and Contribution of Polyphenolic Profile to the In Vitro Antioxidant Capacity, 1-2, 2018.
- Lattanzio V, Kroon PA, Quideau S, Treutter D: Plant phenolics-Secondary metabolites with diverse functions. U Recent advances in polyphenol research (Volume 1). Daayf F, Lattanzio V (ur), Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2008.
- Lončarić A: Utjecaj dodataka šećera i praha kore jabuke na udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost kaša jabuka. Disertacija. Prehrambeno- tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Lončarić A, Skenderović Babobjelić M, Kovač T, Šarkanj B: Polmological properties and polyphenol content of conventional and traditional apple cultivars from Croatia, 1-4, 2014.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition 79:727-747, 2004.
- Martens S, Mithöfer A: Flavones and flavone synthases. Phitochemistry, 66:2399-2407, 2005.
- Obradović A, Radivojević D, Vajgand D, Rekanović E: Priručnik za integralnu proizvodnju i zaštitu jabuke. Institut za primjenu nauke u poljoprivredi, 81-83, 2013.
- Ožegović L, Pepeljnjak S: Mikotoksikoze, 154, Školska knjiga, Zagreb, 1995.
- Puel O, Galtier P, Oswald I: Byosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. Toxins 613-631, 2010.
- Robards K, Antolovich M: Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. Analyst 122:11R34R, 1997

- Shao X, Bao N, He, K, HO, CT,Y,CS, Saugs S: Apple polyphenols, phlorentin and phlorizdin: new trapping agents of recetive dicarbonyl species. *Chemical Research in Toxicology* 21:2042-2050, 2008.
- Skenderović Babobjelić M, Korent T,Šindrak Z, Jeremić T: Polmološka svojstva i kakvoća ploda tradicionalnih sorata jabuka, 22, 2014.
- Skenderović Babobjelić M, Bogdanović S, Šic Žlabur J: Značaj očuvanja i morfološke karakteristike tradicionalnih sorti jabuka u Republici Hrvatskoj. Zbornik sažetaka 4. simpozija s međunarodnim sudjelovanjem Kopački rit jučer, danas, sutra, 2015.
- Stričević D, Sever B: *Organska kemija*. Profil International, Zagreb, 2001.
- Vermerris W, Nicholson R: *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, Dordrecht, 2006.
- Vrbanac K, Jakopec L, Ilijaš I, Malovec K: Priručnik tradicionalnih i autohtonih vrsta i sorata voćaka stablašica, 21,23,26,36,44, Zagreb, 2007.
- Vujević B: Polmološke značajke plodova starih sorata s područja Bjelovarsko- bilogorske županije, 1-2. Diplomski rad. Agronomski fakultet Zagreb, 2016.
- Zhong L, Carere J, Lu Z, Zhou T: *Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies*, 2018.