

# Potencijal tradicionalnih sorti jabuka ubranih 2021. godine za proizvodnju soka jabuke sa smanjenim udjelom patulina

---

Gavran, Sunčana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:109:302814>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**

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**

Sunčana Gavran

**POTENCIJAL TRADICIONALNIH SORTI JABUKA UBRANIH 2021. GODINE  
ZA PROIZVODNJU SOKA JABUKE SA SMANJENIM UDJELOM  
PATULINA**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za promijenjenu 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 VI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini. 2021./2022. održanoj 31. ožujka 2022.  
**Mentor:** doc. dr. sc. Tihomir Kovač  
**Komentor:** doc. dr. sc. Ante Lončarić  
**Pomoć pri izradi:** Ana-Marija Gotal Skoko, mag. ing. techn. aliment.

### POTENCIJAL TRADICIONALNIH SORTI JABUKA UBRANIH 2021. GODINE ZA PROIZVODNJU SOKA SA JABUKE SMANJENIM UDJELOM PATULINA

Sunčana Gavran, 0113144699

**Sažetak:** Jabuka je voćna vrsta koja zauzima treće mjesto na ljestvici ukupne proizvodnje voća u svijetu budući da je važan izvor polifenolnih spojeva, minerala i vitamina tijekom cijele godine. Tradicionalne sorte jabuka predstavljaju sirovinu bogatu ukupnim polifenolnim spojevima i većom antioksidacijskom aktivnošću u odnosu na komercijalne sorte jabuka. Navedeni spojevi osim niza pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje, doprinose i očuvanju dugotrajnosti i stabilnosti ploda jabuke. Sok jabuke je dobiven prešanjem svježih jabuka i podvrgnut je postupku pasterizacije. Cilj diplomskog rada je ispitivanje skladišne otpornosti tradicionalnih sorti jabuka 'Ilzer Rosenapfel', 'Winter Banane' i 'Kraljevčica' ubranih u sezoni 2021. godine na zarazu s plijesni *Penicillium expansum* i produkciju patulina. Također, određen je udio polifenola, antioksidacijska aktivnost te udio patulina u soku jabuke. Tradicionalna sorta jabuke 'Kraljevčica' pokazala je najveći udio polifenola i u svježem uzorku i u soku jabuke. Patulin nije identificiran ni u jednom uzorku ispitivanih sorti jabuka. Dobiveni rezultati doprinose boljem uvidu u polifenolni profil ispitivanih tradicionalnih sorti, kao i uvid u otpornost tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *P. expansum* te posljedično produkciju patulina.

**Ključne riječi:** tradicionalne sorte jabuka, polifenolni spojevi, *Penicillium expansum*, patulin

**Rad sadrži:** 44 stranice  
13 slika  
4 tablice  
59 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

1.	doc. dr. sc. Antun Jozinović	predsjednik
2.	doc. dr. sc. Tihomir Kovač	član-mentor
3.	doc. dr. sc. Ante Lončarić	član-komentor
4.	doc.dr.sc. Krunoslav Aladić	zamjena člana

**Datum obrane:** 23. svibnja 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of 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:** Technology of alcoholic beverages

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VI. held on March 31, 2022

**Mentor:** Tihomir Kovač, PhD, assistant prof.

**Co-mentor:** Ante Lončarić, PhD, assistant prof.

**Technical assistance:** Ana-Marija Gotal, MSc

### POTENTIAL OF TRADITIONAL APPLE VARIETIES HARVESTED IN 2021 FOR THE PRODUCTION OF APPLE JUICE WITH A REDUCED CONTENT OF PATULIN

Sunčana Gavran, 0113144699

**Summary:** Apple is a fruit species that occupies the third place in the overall world production. They are an important source of polyphenolic compounds, minerals and vitamins all year round. Traditional apple varieties represent a raw material rich in total polyphenolic compounds and greater antioxidant activity compared to the commercial ones. These compounds, in addition to a number of positive effects on human health, also contribute to the preservation of the longevity and stability of the apple fruit. Apple juice is obtained by pressing fresh apples and is pasteurized. The aim of the work was to examine the storage resistance of traditional apple varieties "Ilzer Rosenapfel", "Winter Bananas" and "Kraljevčica" on the infection with *Penicillium expansum* and the production of patulin. Also, the proportion of polyphenols, antioxidant activity and the proportion of patulin in apple juice were determined. The traditional apple variety "Kraljevčica" showed the highest content of polyphenols in both fresh sample and apple juice. Patulin was not identified in any sample of traditional apple varieties. The obtained results contribute to a better insight of the polyphenolic profile of the tested varieties, to the resistance of traditional apple varieties to infection with *P. expansum* and the production of patulin.

**Key words:** traditional apple varieties, polyphenolic compounds, *Penicillium expansum*, patulin

**Thesis contains:** 44 pages  
13 figures  
4 tables  
59 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

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

**Defense date:** May 23, 2022

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

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

## Contents

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. VOĆE JABUKA ( <i>MALUS DOMESTICA</i> ) .....	4
2.1.1. TRADICIONALNE SORTE JABUKA.....	5
2.2. BIOAKTIVNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST .....	7
2.3 PLIJESAN <i>PENICILLIUM EXPANSUM</i> .....	10
2.3.1 BIOSINTEZA MIKOTOKSINA PATULINA.....	12
2.4 PROIZVODNJA SOKA OD JABUKE .....	15
3.EKSPERIMENTALNI DIO .....	17
3.1 Zadatak.....	18
3.2 Materijali i metode .....	18
3.2.1 'Ilzer Rosenapfel' .....	18
3.2.2 'Winter Banane' .....	18
3.2.3 'Kraljevčica' .....	18
3.2.4 Priprema ekstrakta tradicionalnih sorti jabuka.....	19
3.2.5 Određivanje ukupnih polifenola .....	19
3.2.6 Određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH testa .....	20
3.2.7 Određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom ABTS-a .....	21
3.2.8 Određivanje ukupnih flavonoida .....	21
3.2.9 Određivanje pH vrijednosti .....	22
3.2.10 Određivanje topljive suhe tvari refraktometrom.....	23
3.2.11 Određivanje ukupnih kiselina titrimetrijski.....	23
3.2.12 Određivanje ukupnih i prirodnih šećera po Luff-Schoorl-u.....	24
3.2.13 Određivanje polifenola u uzorku primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	25
3.2.14 Proizvodnja soka od tradicionalnih sorti jabuka .....	26
3.2.15 Određivanje količine patulina u soku jabuke .....	26
4. Rezultati .....	28
5. RASPRAVA.....	32
6. ZAKLJUČAK .....	35
7. LITERATURA .....	38

### **Popis oznaka, kartica i simbola**

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

**LC-MS/MS** – Sprega tekućinske kromatografije i tandemске masene spektrometrije (engl. Liquid Chromatography mass spectrometry)

**MA** - modificirana atmosfera (engl. Modified Atmosphere)

**CA** - kontrolirana atmosfera (engl. Controlled Atmosphere)

**FDA** - Uprava za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration)

**EC** - Europska komisija (engl. European Commission)

## 1. UVOD



Povijest jabuke (*Malus Domestica*) seže u daleku prošlost. Jabuka je oduvijek bila simbol zdravlja, plodnosti, ali i grijeha pa se tako jabuka spominje i u Bibliji kao zabranjeno voće. Time je jabuka postala simbol besmrtnosti i znanja, ali i grijeha i seksualnosti (*Malum*, latinski - zlo). S druge strane, smatra se kraljicom te simbolom voća zbog nutritivne vrijednosti, posebice sadržaja vitamina. Najčešće kultivirano stablo koje je još u pretpovijesno doba raslo kao divlje u Europi je stablo jabuke. Porijeklo domaće jabuke su južni Sibir i Azija, a i Grci i Rimljani su uzgajali različite sorte. Središte raznolikosti roda *Malus* čine istočna Turska i Kavkaz gdje je jabuka prvotno uzgajana i odakle se proširila po Europi. Jabuka se oko 300 godina pr.n.e. proširila na Grčku, a u njemačkim zemljama je između 800. i 1600. godine bilo poznato oko 200 vrsta. Nakon toga jabuka se proširila na Sjevernu i Južnu Ameriku, a danas je nalazimo na gotovo svim kontinentima. Danas je poznato više od 7000 različitih sorti jabuka koje se razlikuju po okusu, slatkoći, kiselosti, boji, konzistenciji i sočnosti (Hrvatski centar za poljoprivredni marketing, 2008). Plodovi jabuke su okruglog, ali ponekad i nepravilnog oblika. Ukupna proizvodnja jabuka u 2019. godini u Republici Hrvatskoj je iznosila 69 167 tona, a od toga 68 352 tone su bile intenzivni uzgoj (za tržište) te 815 tona u ekstenzivnim voćnjacima (pretežno za vlastite potrebe). U 2020. godini ukupna proizvodnja iznosila 66 926 tona, a od toga 3609 tona za vlastite potrebe, dok je ostatak količina uzgojena za tržište (Državni zavod za statistiku). Po kemijskom sastavu, većinu ploda jabuke čini voda, potom ugljikohidrati, proteini i masti, a bogata je i mnogim vitaminima i mineralima poput kalija, fosfora, magnezija, natrija, cinka i željeza, vitamina C, vitamina A, E i K kao i vitaminima B skupine (USDA, 2018).

Neke od najčešće uzgajanih komercijalnih sorti jabuka su 'Idared', 'Jonagold', 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Granny Smith' i 'Mutsu'. Sadnjom samo nekoliko sorti jabuka moglo bi ugroziti održavanje biološke raznolikosti, dovesti do svjetskih epidemija određenih štetočina i patogena, te smanjiti samu raznolikost sorti jabuka na europskom tržištu (Lončarić i sur., 2014). U pojedinim voćnjacima uzgajaju se i tradicionalne sorte jabuka koje su vrijedan izvor genetske varijabilnosti usjeva, te pokazuju dobru prilagodljivost okolišu u kojem se uzgajaju. Unatoč tome, tradicionalne sorte nisu zastupljene na globalnom tržištu uglavnom zato jer se po standardima izgleda ne uklapaju u tržište kao komercijalne sorte (Lončarić i sur., 2019; Ceymann i sur., 2012).

Cilj diplomskog rada je odrediti potencijal tradicionalnih sorti jabuka za proizvodnju soka od jabuka na temelju određenog udjela ukupnih polifenola, flavonoida, ukupnih i prirodnih

šećera, topljive suhe tvari, ukupnih kiselina, pH, antioksidacijsku aktivnost primjenom ABTS i DPPH metode, te koncentracije mikotoksina patulina u soku od tradicionalnih sorti jabuka.

## 2. TEORIJSKI DIO

## 2.1. VOĆE JABUKA (*MALUS DOMESTICA*)

Jabuka (*Malus domestica*) je listopadno stablo koje pripada porodici ruža (*Rosaceae*). Ima široku i gustu krošnju, a njeno stablo naraste i do 12 metara. Kora debla je ispucana i tamno siva, a samo deblo je promjera i do 1 metar. Ova vrsta se intenzivno uzgaja i njeguje, a plodovi konzumiraju zbog svojih različitih nutritivnih vrijednosti pa tako i zdravstvenih prednosti. Jabuke zauzimaju glavni udio opskrbe tržišta voćem tijekom cijele godine zbog velike sposobnosti prilagođavanja različitim uvjetima, visoke rodosti, lakog razmnožavanja, kvalitete ploda te trajnosti (Lončarići sur., 2019).

Za položaj uzgoja jabuka u kontinentalnoj Hrvatskoj najpovoljnija se smatra južna strana, zatim jugoistočna, istočna, te jugozapadna strana. Najprikladniji su tereni s blagim nagibom te ako šire područje oko voćnjaka ima veći nagib. Korijen jabuke je zadužen za pričvršćivanje za tlo, opskrbljivanje voćke vodom i hranjivim tvarima. Deblo ima zadaću provoditi i skladištiti hranjive tvari, a krošnja se sastoji od kosturnih grana te ogranaka na kojima se nalaze pupovi, lišće, cvjetovi i plodovi (Pokos-Nemec, 2012). Plod voćke, jabuka, sadrži mesnato usplođe, koru, peteljku, sjemenu ložu, sjemenke i listić čaške. Doseže masu i do 600 g, ali većina plodova je prosječne mase od 150 do 160 g. Razlika među plodovima je u obliku, boji, vremenu sazrijevanja, veličini, nutritivnom sastavu itd. (Luby, 2003). Jabuka se smatra „zdravom namirnicom“, a poput ostalog voća, prisutnost polifenola je jedna od glavnih činjenica koja se povezuje sa pozitivnim učinkom na zdravlje. Polifenoli imaju antikancerogena svojstva, a sudjeluju i u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i raka kao i u regulaciji kolesterola u krvi te ostale pozitivne učinke poput antivirusnih svojstava i inhibicije patogena poput *Helicobacter pylori* i toksičnosti stafilokoka enterotoksina A (Lončarić i sur., 2014; Jakobek i Barron, 2015; Hyson, 2011) zbog čega jabuka i privlači znanstveni interes. U Republici Hrvatskoj jabuka je najčešće konzumirano voće, a prosječna godišnja potrošnja po članu kućanstva u 2019. godini je iznosila 11,5 kg, a u 2020. 11,7 kg (Državni zavod za statistiku, 2021). Jabuka je komercijalno važno voće u Republici Hrvatskoj, a produžetak komercijalnog vijeka i smanjenje gubitaka nakon berbe uglavnom se temelji na načinu skladištenja na niskim temperaturama, samostalno ili u kombinaciji, s modificiranom atmosferom (MA) i kontroliranom atmosferom (CA) koje su prvenstveno usmjerene na smanjenje ukupnog metabolizma i time odgađanje zrenja i starenje (Mditshwa i sur., 2018). Kvaliteta ploda jabuke uključuje veliku skupinu karakteristika. Na kvalitetu ploda jabuke utječe boja, oblik, veličina i odsutnost nedostataka, kao i okus, tekstura, miris, nutritivna vrijednost, slatkoća, kiselost (pridonosi okusu) te rok

trajanja. Na primjer, nakon berbe i prije transporta na tržište ili skladištenje plodovi se kalibriraju, ručno ili uz pomoć uređaja za sortiranje, na temelju težine, veličine ploda, kvalitete i karakteristika boje. Sa nutritivnog aspekta, plodovi jabuke sadrže šećere, kiseline, vitamine, minerale, pektine i vodu (Krpina i sur., 2004). (**Tablica 1.**). Osim svoje nutritivne vrijednosti, također su vrijedan i lako dostupan izvor raznih biološki aktivnih spojeva, posebno već spomenutih polifenola kao što su klorogenska kiselina, katehin, epikatehin, floretin, kvercetin i floridzin, kao i antioksidansa, fenolnih spojeva, fenolne kiseline i dr. (Lo Piccolo i sur., 2019). Jabuke sadrže i vlakna koja su biljna tvar s mnogim dobrobitima za zdravlje ljudi, zaslužni su za smanjenje apsorpcije masti i kolesterola, normalizaciju probave, održavanje zdravlja crijeva i sudjelovanje u kontroli dijabetesa (Duralija i sur., 2021).

**Tablica 1.** Nutritivna vrijednost plodova jabuke na 100 g jestivih dijelova (USDA, 2018)

IU- međunarodna jedinica; DFE- ekvivalent prehrambenih folata; Rae- ekvivalenti aktivnosti retinola

Hranjive tvari	Mjerna jedinica	Količina	Hranjive tvari	Mjerna jedinica	Količina
Voda	g	85,56	Vitamin C (Askorbinska kiselina)	mg	4,6
Energija	kcal	52,0	Tiamin	mg	0,017
Bjelančevine	g	0,26	Riboflavin	mg	0,026
Ugljikohidrati	g	13,81	Niacin	mg	0,091
Dijetalna vlakna	g	2,4	Vitamin B6	mg	0,041
Ukupni šećeri	g	10,39	Folat, DEF	µg	3,0
Kalcij	mg	6,0	Vitamin A RAE	µg	3,0
Željezo	mg	0,12	Vitamin A IU	IU	54,0
Magnezij	mg	5,0	Vitamin E (Alfa Tokoferol)	mg	0,18
Fosfor	mg	11,0	Vitamin K (filokinon)	µg	2,2
Kalij	mg	107,0	Ukupni lipidi (Masti)	g	0,17
Natrij	mg	1,0	Zasićene masne kiseline	g	0,028
Cink	mg	0,04	Mononezasićene masne kiseline	g	0,007

### 2.1.1. TRADICIONALNE SORTE JABUKA

Zbog svog zemljopisnog položaja, Republika Hrvatska ima dugu tradiciju uzgoja voća, a tome pridonose klimatski uvjeti i visoka kvaliteta voćnih kultura, posebice plodova jabuke. U prošlosti je uzgoj tradicionalnih sorti jabuka bio vrlo zastupljen, ali je u posljednje vrijeme došlo do iznimnog propadanja starih autohtonih domaćih voćaka i znatan dio naše voćarske kulture nepovratno nestaje (Lončarić i sur., 2014). Stare sorte jabuka doprinose biološkoj raznolikosti, iako nemaju veliku komercijalnu vrijednost. Tradicionalne sorte moguće je

očuvati sadnjom novih sadnica istih sorti ili obnavljanjem postojećih stabala (Skenderović Babobjelić, 2015).

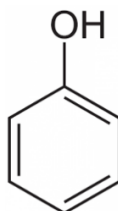
Sve je veća potražnja za funkcionalnom hranom koja potječe iz prošlosti i tradicionalnih biljnih izvora jer su prepoznati kao vrlo vrijedni izvori za promicanje zdravlja. Stare tj. tradicionalne sorte jabuka (*Malus domestica Borkh.*) karakteriziraju dobra morfološka i pomološka svojstva, manja potreba za kemijskim tretiranjem tijekom uzgoja i veći udio biološki aktivnih spojeva s boljom senzorskom prihvatljivošću u odnosu na komercijalne sorte. Stare sorte jabuke prirodna su i kulturna baština Republike Hrvatske, kao i vrijedan izvor genetske raznolikosti. Prilagodile su se lokalnim klimatskim i okolišnim uvjetima uzgoja, a pokazuju dobru otpornost na biotičke i abiotičke faktore stresa te su karakterizirane po različitim morfološkim i pomološkim karakteristikama u odnosu na komercijalne sorte jabuke (Duralija i sur., 2021). Tradicionalne sorte jabuka su se prilagodile na uvjete u kojima rastu većom otpornošću na bolesti koju su tradicionalne sorte razvijale kroz godine, a mnoge od ovih sorti bi se trebalo sačuvati za buduću, a i trenutni uzgoj (Purdešová i sur., 2017). Također, tradicionalne sorte sadrže veći udio polifenola i antioksidacijske aktivnosti u usporedbi sa komercijalnim sortama (Lončarić i sur., 2019.). Osim toga, poznato je da kora jabuke kao i nusproizvodi prerade jabuke sadrže veće količine polifenola i antioksidativni kapacitet od samog mesa jabuke (Jakobek Barron, 2015). Jedinstvenu kvalitetu voća, otpornost na sušu, gene za otpornost na štetočine i bolesti nose mnoge tradicionalne sorte jabuka (Purdešová i sur., 2017). Plod ovih sorti često je komercijalno neprivlačan. Međutim, u zapadnim zemljama dolazi do promjene koncepta prehrane, gdje potrošači osim izgleda proizvoda zahtijevaju i proizvode s dobrim nutritivnim svojstvima koja ih čine korisnima za ljudsko zdravlje (Lončarić i sur., 2020).

Tradicionalne sorte jabuka koje se uzgajaju u lokalnim područjima su u velikoj mjeri neistražene, a posebice s obzirom na fizikalno-kemijska, pomološka svojstva i sastav bioaktivnih tvari. Važno je sačuvati ove sorte zbog sadržaja polifenola kao i različitih pomoloških svojstava kao izvor genetske varijabilnosti, ali i kao faktor biološke raznolikosti teritorijalnog područja na kojemu rastu.

## 2.2. BIOAKTIVNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Biološki aktivni kemijski spojevi koji se nalaze u biljkama se nazivaju i fitokemikalije. Mnogi od njih imaju sposobnost mijenjanja enzimskih i kemijskih reakcija pa stoga utječu i na ljudsko zdravlje. Većina bioaktivnih spojeva se može svrstati u glavne skupine, a to su polifenoli, terpenoidi, glukozinolati i drugi (Shahidi i sur., 2019).

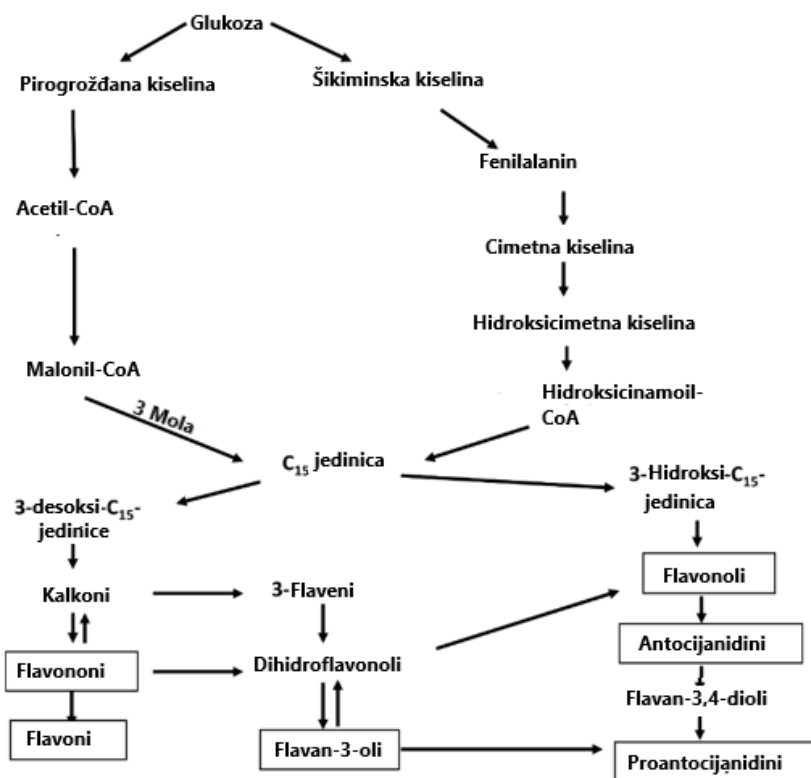
Bioaktivni spojevi koje sadrži jabuka su vlakna, antioksidansi, fenolni spojevi, flavonoidi, fenolne kiseline itd. koji imaju iznimno pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Procjenjuje se da je identificirano više od 5000 bioaktivnih komponenata- fitokemikalija, ali i dalje velik postotak ostaje nepoznat (Duralija i sur., 2021). Velika nutritivna vrijednost jabuke se može pripisati polifenolima koji su sekundarni biljni metaboliti, a u jabukama prevladava četiri skupine ovih spojeva, a to su flavonoli, flavan-3-oli, fenolne kiseline i dihidrohalkoni (Boyer i Liu, 2004; Kschonsek i sur., 2018). Polifenoli nastaju tijekom normalnog razvoja biljke, ali i kao odgovor na stresne uvjete poput infekcije parazitima, ranjavanja, onečišćenja zraka, izloženosti ekstremnim temperaturama kao i UV zračenju. Nalaze se u jestivim i nejestivim dijelovima biljke, a mogu i privlačiti oprašivače, doprinose pigmentaciji biljke te mogu doprinijeti i gorčini, trpkosti, okusu, mirisu i oksidacijskoj stabilnosti hrane. Također, pokazuju i široki raspon fizioloških svojstava kao što su antialergijska, protuupalna, antimikrobna i antioksidativna svojstva (Shahidi i sur., 2019). Opća formula ovih visoko vrijednih spojeva je Ar-OH (Ar- fenil, supstituirani fenil ili neka druga akrilna skupina) te u svojoj strukturi sadrže jednu ili više OH skupinu koje su vezane na benzenski prsten. Ime ove skupine potječe od predstavnika ove skupine koji se naziva fenol (**Slika 1**).



**Slika 1** Kemijska struktura fenola (Vermerris i Nicholson, 2008)

Ovi spojevi se mogu pojavljivati kao polimeri visokih molekularnih masa, ali se uglavnom nalaze u monomernim oblicima. Monomerni polifenoli se mogu apsorbirati direktno iz hrane koja sadrži polifenole, dok je za apsorpciju polifenola iz oblika visokomolekularnih polimera

potrebna prethodna razgradnja u probavnom traktu. Flavonoidi su najbitnija i najveća skupina polifenola, a također važna skupina su i fenolne kiseline (Martens i sur., 2005). Prema Wollgastu i Anklam (2000) polifenoli se dijele na temelju broja C atoma i to na jednostavne fenole i benzokinone (C<sub>6</sub>), fenolne kiseline (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), acetofenone i fenilactene kiseline (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>), hidroksicimetne 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>) (Wollgast i Anklam, 2000). Shematski prikaz biosinteze i povezanosti flavonoida je prikazan na **Slici 2**, a podjela pronađenih fenolnih spojeva u biljkama na flavonoid i neflavonoide na **Slici 3**.



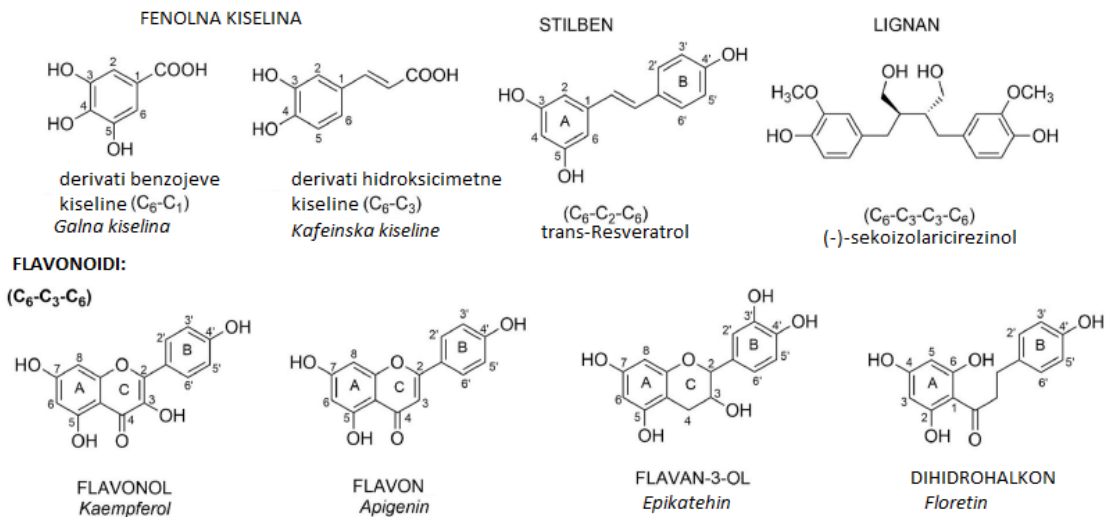
**Slika 2** Shematski prikaz biosinteze i povezanosti flavonoida (Wollgast i Anklam, 2000)

Jabuke su voće koje se široko konzumira u cijelom svijetu, a jedno je od najboljih izvora antioksidansa i fenolnih spojeva, uključujući kvercetin, katehin, florizdin i klorogensku kiselinu. Sadržaj fenolnih spojeva varira između mesa i kore jabuke i pretežno je lokaliziran u kori (54%) (Shahidi i sur., 2019). U kori jabuke se pretežito nalaze dihidrohalkoni, flavan-3-oli i flavanoli,



a meso jabuke je bogato klorogenskom kiselinom i izomerom klorogenske kiseline (Jakobek i sur., 2013).

#### NEFLAVONOIDI:



**Slika 3** Primjeri fenolnih spojeva pronađenih u biljkama i voću grupirani u neflavonoide i flavonoide (Crozier i sur., 2009)

Tijekom proizvodnje voćnih sokova dolazi do gubitka svih polifenolnih spojeva, a do gubitka fenolnih spojeva u sokovima od voća dolazi zbog komercijalnog postupaka proizvodnje. S druge strane dolazi do povećanja udjela kvercetin glikozida, a gubitaka dihidrohalkona i fenolnih kiselina. Do smanjivanja razine polifenola tj. antioksidansa dolazi i prilikom zamrzavanja, mikrovalnog kuhanja, pasterizacije i vrenja pa tako različiti načini kuhanja različito utječu na polifenole (Markowski i Płocharski, 2006). Antioksidacijska aktivnost podrazumijeva rad antioksidansa koji sprječavaju reakcije oksidacije koje mogu katalizirati određeni enzimi kao što su peroksidaze, katalaze, superoksidi dismutaze i proteini, a poznato je i da antioksidacijsku aktivnosti posjeduju vitamini (A, C, i E) i polifenoli. Aktivnost antioksidansa ovisi o mnogim čimbenicima kao što su temperatura, svjetlost, tip supstrata, fizikalno stanje sustava, kao i o brojnim mikrokomponentama koje djeluju kao prooksidansi ili sinergisti, a i o strukturnim svojstvima antioksidanasa (Yanishlieva Maslarova i Heinonen, 2001). Antioksidansi uklanjaju slobodne radikale ili koriste mehanizam koji uklanja slobodne radikale indirektno. Kod uklanjanja slobodnih radikala sastojak se definira kao primarni antioksidans, a u slučaju indirektnog uklanjanja slobodnih radikala, sastojak se definira kao sekundarni antioksidans. Primarni antioksidansi su fenolne tvari, a sekundarni antioksidansi

pokazuju antioksidacijsku aktivnost samo u prisustvu neke druge manje komponente kao što npr. askorbinska kiselina postaje aktivna u prisustvu tokoferola ili nekih drugih primarnih antioksidansa ili limunska kiselina u prisustvu metalnih iona (Gordon, 2001). Oksidativni stres rezultira oksidativnim oštećenjima, staničnom smrću, oštećenjem tkiva i raznim bolestima zbog povećane razine slobodnih radikala (Anderson i sur., 2009). Na temelju literaturnih podataka, a zbog prisutnih antioksidansa poput polifenola, jabuka ima visoku antioksidacijsku aktivnost, nutritivnu vrijednost kao i benefite na ljudsko zdravlje.

### 2.3 PLIJESAN *PENICILLIUM EXPANSUM*

Iako svježe voće i povrće višestruko dobiva na vrijednosti nakon što napusti polja na kojima se uzgaja, bolesti koje se pojavljuju nakon žetve i branja uzrokuju gubitke. Unatoč tome što se koriste moderna skladišta i tehnike, gubitci su veći nego što se općenito vjeruje i procjenjuje se da iznose od 20 do 30 % godišnje (Romanazzi i sur., 2016). Jedna od najpoznatijih i najviše proučavanih plijesni iz roda *Penicillium* je *Penicillium expansum*. Rod *Penicillium* proučava se više od 200 godina, a njegov prvi opis datira iz 1809. godine. Ova mikroskopska gljiva je široko rasprostranjena u prirodi, posebno u tlu i zatvorenim prostorima. Također, *P. expansum* može zaraziti širok spektar poljoprivrednih proizvoda u polju, tijekom žetve, tijekom skladištenja i tijekom prerade (Andersen i sur., 2004; Demirel i sur., 2013). Toksikogena plijesan *P. expansum* može rasti na raznim podlogama, uključujući građevinske materijale koji sadrže celulozu, poput tapeta i suhozida, te vlažnih drvenih blokova, ali najčešće raste na voću poput jabuka i krušaka te koštuničavom voću (Nguyen, 2007). Plijesan *P. expansum* proizvodi veliki niz sekundarnih metabolita s različitim strukturama ako se duže razdoblje nalazi u uvjetima relativno visoke vlage i umjerene temperature tijekom duljeg razdoblja. Na globalnoj razini, patulin je najistraženiji i dobro dokumentirani sekundarni metabolit plijesni u hrani i biljkama (Gutarowska i sur., 2012). Kao posljedica insekata, ptica, ranog mraza, prevelike vrućine, stresa od suše i nepovoljnih vremenskih uvjeta neposredno prije berbe, zaraze jabuke najčešće su uzrokovane oštećenjem plodova, ali i mehaničkim oštećenjima tijekom transporta i rukovanja voćem. Najozbiljniji patogen jabuke nakon berbe, *Penicillium expansum*, može prodrijeti u kožicu ploda dok je još u polju, te nastavlja rasti i proizvoditi patulin tijekom skladištenja (Frisvad i Samson, 2004). *P. expansum* proizvodi destruktivnu trulež koju

karakteriziraju blijedosmeđe, suhe, glatke, kružne mrlje koje su često kružnog i koncentričnog oblika koje se brzo šire po površini ploda, kao i duboko unutar mesa (Pitt i Hocking, 2009). Na površini stare truleži mogu se pojaviti bijele mrlje koje se razvijaju u plavkasto-zelene strukture (**Slika 4**). Kada su uvjeti pravi, spore *P. expansum* prodiru kroz tvrdi ljusku sjemena do mekog vegetativnog tkiva ploda, klijaju i rastu te mogu proizvesti toksine (Tournas i Memon, 2009). Virulencija *P. expansum* ovisi o enzimu poligalakturonazi, koji uzrokuje propadanje tkiva. Kako se lezija širi, raspadnuti dio može se lako odvojiti od okolnog zdravog tkiva, a kako dolazi do sporulacije, bijeli rast na površini lezije postaje blijedoplav. Ova gljiva može uzrokovati "gniježđenje" u posudi za voće širenjem na zdravo voće u blizini, iako se plava plijesan obično javlja na ranama voća. *P. expansum* proizvodi konidije (spore) u izobilju, a koje se lako prenose zrakom (Sommer i sur., 2002).



**Slika 4** *Penicillium expansum* na površini jabuke  
(Izvor: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillium\\_expansum.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillium_expansum.jpg))

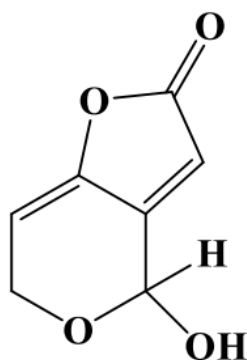
Prirodni mikotoksin patulin proizvode razne gljive koje pripadaju rodu *Aspergillus* putem poliketidnog puta kao i *Byssochlamys*, *Paecilomyces* i *Penicillium*. Patulin najčešće proizvodi plijesan *Penicillium expansum*. Iako je ovaj mikotoksin pronađen u mnogim namirnicama, jabuke su podložnije infekciji *P. expansumom* i pružaju pogodno okruženje za njegovu proizvodnju (Tannous i sur., 2018). Proizvodnja patulina često je povezana s truležima jabuke u prehrambenoj industriji, ali ne i isključivo. Studije na životinjama daju većinu informacija o toksičnosti patulina jer do sada nije bilo dokumentiranih slučajeva akutne toksičnosti kod ljudi.

Pokazalo se da patulin ima visoku akutnu toksičnost; vrijednosti LD50 kretale su se od 10,4 mg/kg tjelesne težine u pasa do 30 mg/kg u mačaka, 7,60 mg/kg u miševa i 5,80 mg/kg u štakora (Hayes i sur., 1979). Učinci akutnog trovanja, kao što su hematemeza, proljev, izrazita slabost, letargija, tahipneja, masivna atelektaza, alveolarna krvarenja i drugi, opisani su kod mnogih različitih vrsta životinja (Tapia i sur., 2006). Genotoksični učinci patulina dokazani su u stanicama hrčka V79 i staničnoj liniji hepatoma HepG2 kao i u stanicama imunološkog sustava, a utvrđeno je da su i embriji štakora i pilića teratogeni kada je dodan patulin. Dokazano je i da patulin ima citotoksične učinke na nekoliko tipova stanica, uključujući ljudske crijevne epitelne stanice, ljudske embrionalne stanice bubrega i hepatocelularne stanice jetre (Wu i sur., 2008; Duraković, 2000).

S obzirom na akutnu i dugotrajnu toksičnost patulina, koncentracija od 0,1 mg/kg tjelesne težine se smatra sigurnom, bez uočenih štetnih učinaka koja je određena od strane Uprave za hranu i lijekove (FDA) i Europske komisije (EC) kako bi se uspostavile maksimalne granice patulina u proizvodima od jabuka (European, 2003; 2006; U.S. FDA, 2005). Codex Alimentarius (2003) i U.S. FDA (2005) postavili su regulatorna ograničenja od 50 dijelova na milijardu za proizvode na bazi jabuke, a Europska komisija (2006) otišla je korak dalje nametnuvši maksimalnu prihvatljivu koncentraciju od 10 dijelova na milijardu u hrani za dojenčad (Agriopoulou i sur., 2020).

### 2.3.1 BIOSINTEZA MIKOTOKSINA PATULINA

Patulin je tokom istraživanja na životinjama pokazao svoju toksičnost i neurotoksičnosti, iako ne postoje jasni dokazi da je patulin kancerogen za ljude. Biosinteza patulina opsežno je proučavana i opisana u kemijskom i molekularnom smislu. Put biosinteze patulina sastoji se od oko 10 koraka kako su pokazale neke biokemijske studije kao i identifikacijom nekoliko mutanta koji su blokirani na različitim koracima u biosintetskom putu patulina. Poput sinteze masnih kiselina, sinteza patulina započinje sintezom poliketida iz acetata, slično sintezi masnih kiselina. 6-metilsalicilna kiselina je prvi stabilni intermedijer, a nakon toga niz oksidacijsko-redukcijskih reakcija omogućuje stvaranje patulina (Puel i sur., 2010). Patulin je, poput drugih mikotoksina kao što su aflatoksin, ohratoksin, fumonizin, poliketidni metabolit. Struktura patulina je prikazana na **Slici 5**, a put biosinteze patulina na **Slici 6**.

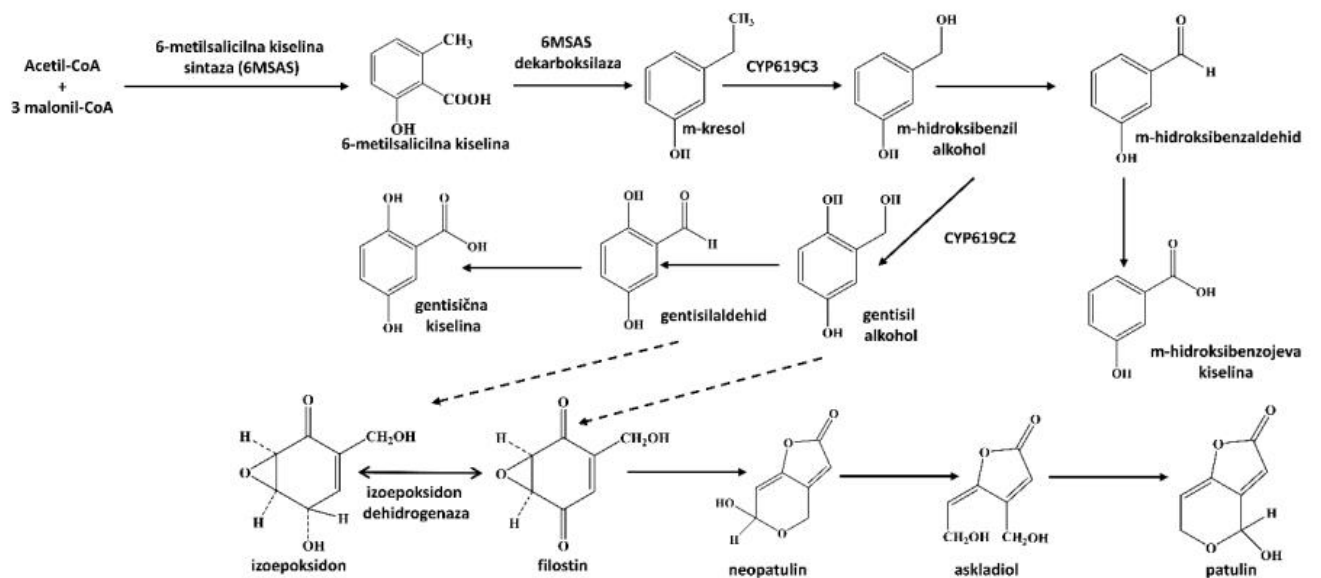


**Slika 5** Struktura patulina (Hrvatska agencija za hranu, 2003)

Trenutno prihvaćen put nastanka patulina je: acetil coA-prekursor → 6-metilsalicilna kiselina → m-krezol → mhidroksibenzil alkohol → gentisil alkohol → gentisaldehyd → izoepoksidon → filostin → neopatulin → askladiol → patulin. Uočeno je da je put patulina karakteriziran s nekoliko enzimskih aktivnosti specifičnih za pretvorbe prekursora u patulin. Prvi gljivični gen pročišćen iz stanica *Penicillium griseofulvum* bila je 6-metilsalicilna sintaza (MSAS), koja je odgovorna za prvi korak u putu patulina, a in vitro je proučavana od strane Lynen i Tada (1961).

Light (1969) je pročistio i karakterizirao 6-metilsalicilnu dekarboksilazu, koja pretvara 6-metilsalicilnu kiselinu u m-krezol tijekom drugog koraka patulinskog puta. Koristeći ekstrakte bez stanica *P. griseofulvum*, identificirane su dvije aktivnosti hidroksilaze koje pretvaraju m-krezol u hidroksilirane derivate: 2,5-dihidroksitoluen (tolukinol) ili m-hidroksibenzil alkohol (Murphy i sur., 1974), a kasnije se pokazalo da navedene dvije aktivnosti hidroksilaze kataliziraju dva različita enzima citokroma P450. Jedan citokrom P450 odgovoran je za pretvaranje m-krezola u m-hidroksibenzil alkohol, a drugi citokrom P450 odgovoran je za pretvaranje mhidroksibenzil alkohola u gentisil alkohol, prema posljednjim studijama. Drugi citokrom P450 modificira m-krezol u tolukinol, nakon čega slijedi reakcija hidroksilacije i nastajanja gentisaldehyda. Iz m-krezola i gentisaldehyda nastaju produkti koji su strukturno slični 6-metilsalicilnoj kiselini, a 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). Otvaranjem prstena, mehanizmom posredovanim monooksigenazom ili dioksigenazom, koju zahtijeva konverzija gentisaldehyda u dvije strukture. Molekularna analiza proizvodnje patulina iz *A. clavatus* (Artigot i sur., 2009) i *P.expansum*, od strane 3 neovisna istraživačka tima (Tannous i sur., 2014; Ballester i sur., 2015; Li i sur., 2015), dovela je do identifikacije

biosintetskog gena DNA od približno 40 kb genskih klastera. PatA-patN je 15 koreguliranih metaboličkih gena koji su različito raspoređeni u obje vrste koje proizvode patulin. Neki geni ovog klastera izolirani su iz vrsta koje proizvode patulin prije pojave sekvenciranja cjelokupnog genoma gljivica. *Idh* gen (patN) koji kodira izoepoksidon dehidrogenazu pronađen je i u *P. griseofulvum* (Fedeshko, 1992) i u *P. expansum* (White i sur., 2006). Iz *P. griseofulvum* izolirano je nekoliko mutanata što je dovelo do identifikacije četiri post-aromska prekursora, a to su askladiola, filostin, neopatulin i izoepoksidon. Nakon ove identifikacije, pretpostavilo se da se nakon sinteze gentisaldehida događa epoksidacija. Zbog postojanja nesuglasica oko toga što je supstrat reakcije epoksidacije, gentizilolni alkohol ili gentisaldehyd, prava priroda epoksidacije je nepoznata. S biosintezom patulina povezano je nekoliko enzimskih aktivnosti, a između ostalih prstenasta hidroksilacija m-hidroksibenzil alkohola u gentizil-alkohol za aktivnost treba NADPH i molekularni kisik. Uključenost citokroma P450 sugerira, na reverzibilan način, inhibiranje ugljičnog monoksida. Djelomično ili potpuno pročišćeni enzimi koji su uključeni u biosintezu patulina su 6-metilsalicilna kiselina sintaza, dekarboksilaza, 6-metilsalicilna kiselina, m-hidroksibenzilalkohol dehidrogenaza, neopatulin sintaza i izoepoksidon dehidrogenaza (Puel i sur., 2010).



Slika 6 Put biosinteze patulina (White i sur., 2005)

U prirodi se patulin češće nalazi u jabukama i proizvodima od jabuke jer su fizikalno-kemijska svojstva plodova jabuke pogodna su za rast *P. expansum*. S aktivnošću vode ( $a_w$ ) na 0,98–0,99, plodovi jabuke zadovoljavaju minimalnu razinu  $a_w$  za klijanje spora *P. expansum* i biosintezu patulina, a koji su u rasponu od 0,83 do 0,85 odnosno 0,99. Raspon pH jabuke (3,1–4,2) također zadovoljava kolonizaciju *P. expansum* i proizvodnju patulina (pH 2,5–6). Osim ova dva čimbenika, različita genetska pozadina i uvjeti rasta oblikuju fizička i kemijska svojstva plodova jabuke, koji u konačnici određuju sposobnost zacjeljivanja rana, kao i osjetljivost na proizvodnju plave plijesni i patulina u divljim ili kultiviranim jabukama (Larous i sur., 2007; Tannous i sur., 2015).

## 2.4 PROIZVODNJA SOKA OD JABUKE

„Voćni sok je proizvod koji može fermentirati, ali je nefermentiran, a proizvodi se od jestivog dijela voća koje je zdravo, svježije ili konzervirano hlađenjem ili smrzavanjem jedne ili više vrsta pomiješanih zajedno, a ima boju, aromu i okus karakterističan za sok od voća od kojega potječe.“ (NN 48/2013). Voće, a u ovom slučaju jabuke za industrijsku preradu moraju biti u fazi tehnološke zrelosti, zdrave i svježije i ne smiju imati strane okuse i mirise, kao ni sadržavati ostatke pesticida iznad maksimalno dozvoljenih količina utvrđenim zakonskim propisima (Nela-Nedić Tiban, 2012). Sok od jabuke je jedno od najčešće konzumiranih pića u svijetu, a proizvodnja ovog pića svakodnevno raste. Tijekom prijema voća i povrća važno je voditi stavku organizacije, odnosno u svakom trenutku imati uvid u podrijetlo sirovine i kvalitetu, kao i provoditi obaveznu kontrolu i uzorkovanje sirovina koje dolaze na preradu (Nela-Nedić Tiban, 2012). Proces proizvodnje soka od jabuka započinje određivanjem termina berbe sirovine.

Jabuke mogu biti u fazi fiziološke i tehnološke zrelosti gdje u fiziološkoj fazi zrelosti dostižu najveću veličinu ploda, a sjemenke postaju posve razvijene. Kada govorimo o tehnološkoj zrelosti, jabuke u toj fazi zrelosti imaju najbolji okus, miris i boju pokožice (Brzica, 1995). Ovaj opis proizvodnje soka od jabuka najviše se odnosi na matični sok koji je definiran kao poluproizvod dobiven tiještenjem sirovog ili smrznutoga potom i konzerviran pasterizacijom, a ima i širu primjenu nego sirovi voćni sokovi i služi za proizvodnju bistrih i mutnih sokova (Nedić Tiban, 2014).

Primarna prerada obuhvaća nekoliko operacija kao što su vaganje, sortiranje, pranje, čišćenje, probiranje itd.. Jabuke nakon dolaska u preradu često moraju određeno vrijeme biti

skladištene, pa se pri zaprimanju jabuka vrši vaganje i sortiranje. Sortiranjem se razvrstava voće u pojedine kategorije prema fizičkim svojstvima, a ona osnovna su veličina, oblik, masa i boja. Može se provoditi ručno i strojno sortiranje. Čišćenje je jedna od osnovnih operacija kojom se žele ukloniti nepoželjne primjese poput lišća, granja, zemlje kamenja itd. kako bi se sirovina pripremila za daljnju preradu, a na taj način smanjuju se ukupni gubitci na sirovini, a povećava i ekonomski učinak prerade. Nakon toga jabuke idu na tiještenje (usitnjavanje, ekstrakcija) koje se provodi u mlinu ili prešama, a samo usitnjavanje podrazumijeva djelovanje mehaničkih sila nastalih zbog sraza, tlačenja, istezanja ili trenja čime se dimenzije sirovina više ili manje smanjuju (Herceg, 2011). Taloženje odnosno bistrenje u tankovima sljedećih 24 je posljednja operacija prije termičke obrade. Termička obrada podrazumijeva postupak pasterizacije koji se provodi na temperaturama do 100 °C, ali ne ispod 70 °C. Kod proizvodnje soka od jabuke, pasterizacija se provodi prije punjenja u ambalažu, a u cilju inhibiranja određenih enzima, uništavanja patogenih mikroorganizama i mikroorganizama kvarenja, a posebice produženja vijeka trajanja proizvoda. Pasterizacija se kod tekućih namirnica može provoditi u pločastim i cijevnim izmjenjivačima topline. Češće se u proizvodnji soka koriste cijevni izmjenjivači topline. Zagrijavanje se provodi vrućom vodom ili zasićenom vodenom parom na temperaturi između 80 i 98 °C u trajanju od nekoliko sekundi. Nakon pasterizacije sok se hladi na temperaturu od 40 °C . Nakon hlađenja, sok se puni u sterilnu ambalažu (Horváth-Kerkai, 2006).

Ovakav sok od jabuke se skladišti u hladnom, suhom i tamnom prostoru na sobnoj temperaturi. Upravo je temperatura glavni čimbenik koji utječe na nepoželjne promjene soka poput promjene, boje, okusa i gubitka sadržaja vitamina. Visina temperature i nastanak i progresija ovih promjena su proporcionalne veličine, pa prema tome što je niža temperatura manje su mogućnosti pojava i napredovanja ovih promjena. Osim temperature, utjecaj na senzorska i nutritivna svojstva tokom skladištenja ima i otopljeni kisik u soku koji je poželjno ukloniti prije toplinske obrade (Horváth-Kerkai, 2006).



### 3.EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1 Zadatak

Cilj ovog rada je bio istraživanjem dostupnih literaturnih izvora napraviti pregled dosadašnjih spoznaja o kontaminaciji jabuka s plijesni *Penicillium expansum*, te slijed biosinteze patulina. Eksperimentalno odrediti udio polifenola, patulina, šećera, antioksidacijske aktivnosti, topljive suhe tvari, suhu tvar, pH te odrediti potencijalne razlike između ispitivanih sorti i u konačnici, odrediti potencijal tradicionalnih sorti jabuka za proizvodnju soka od jabuka.

### 3.2 Materijali i metode

Analizirane tradicionalne sorte jabuka su 'Ilzer Rosenapfel', 'Winter Banane' i 'Kraljevčica' (Slika 7). Uzorci jabuka prikupljeni su s kolekcijskog nasada Sveučilišta u Zagrebu, Agronomskog fakulteta Zavoda za voćarstvo, koji se nalazi na Pokušalištu Šašincev.

#### 3.2.1 'Ilzer Rosenapfel'

Plodovi jabuke 'Ilzer Rosenapfel' su obično spljoštenog, ponekad i pravokutnog ili koničnog oblika, male do srednje veličine. Visina ploda iznosi oko 53 mm, a širina 65 mm. Presjek jabuke je nepravilnog, okruglog oblika. Kora ploda ove sorte je glatka, ružičasta do tamnocrvena, a ponekad i s tamnocrvenim prugama. Okus je skladan, slatko-kiseli, dok je miris karakterističan za sortu.

#### 3.2.2 'Winter Banane'

Sorta Winter Banane daje blijedo žute, ali djelomično i rumene plodove, nepravilnog oblika i promjera oko 7 cm. Bijelo meso je poprilično mekano, iako grube teksture, a okus je umjereno sladak, sočan i aromatičan.

#### 3.2.3 'Kraljevčica'

Kraljevčica je posebna vrsta jabuke koja ima relativno sitne, s jedne strane žuto obojene plodove. Plodovi ove zimske jabuke su profinjenog okusa, a dozrijevaju polovinom rujna u obilnim količinama. U prikladnim uvjetima čuvanja, dugo vremena ostaje svjež.



‘Ilzer Rosenapfel’

‘Winter Banane’

‘Kraljevčica’

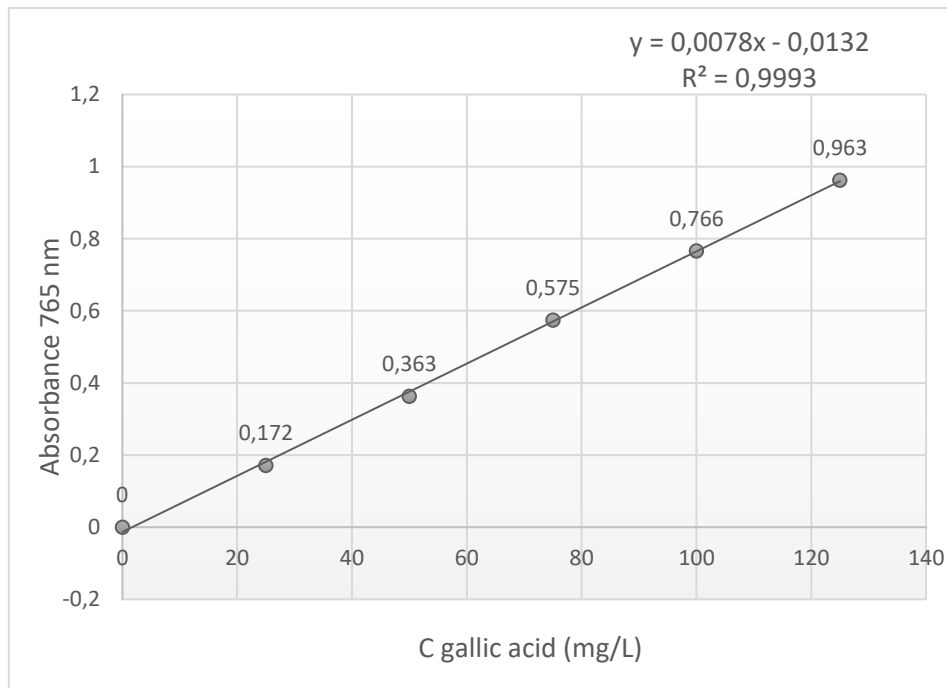
**Slika 7** Prikaz izgleda tradicionalnih sorti jabuka (Izvor: autor)

### 3.2.4 Priprema ekstrakta tradicionalnih sorti jabuka

Izvagano je 0,5 g prethodno usitnjenih liofiliziranog uzoraka jabuke te dodano 2,5 mL otapala za ekstrakciju (80% MeOH + 1% HCl). Uzorci su ekstrahirani pomoću ultrazvučne kupelji u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon primjene ultrazvuka, uzorci su centrifugirani (10 000 o/m) kako bi se odvojio supernatant od taloga, nakon čega je supernatant profiltriran pomoću PTFE filtera (0,45  $\mu$ m). Nakon filtracije uzorci su čuvani u hladnjaku na 4 °C do analize.

### 3.2.5 Određivanje ukupnih polifenola

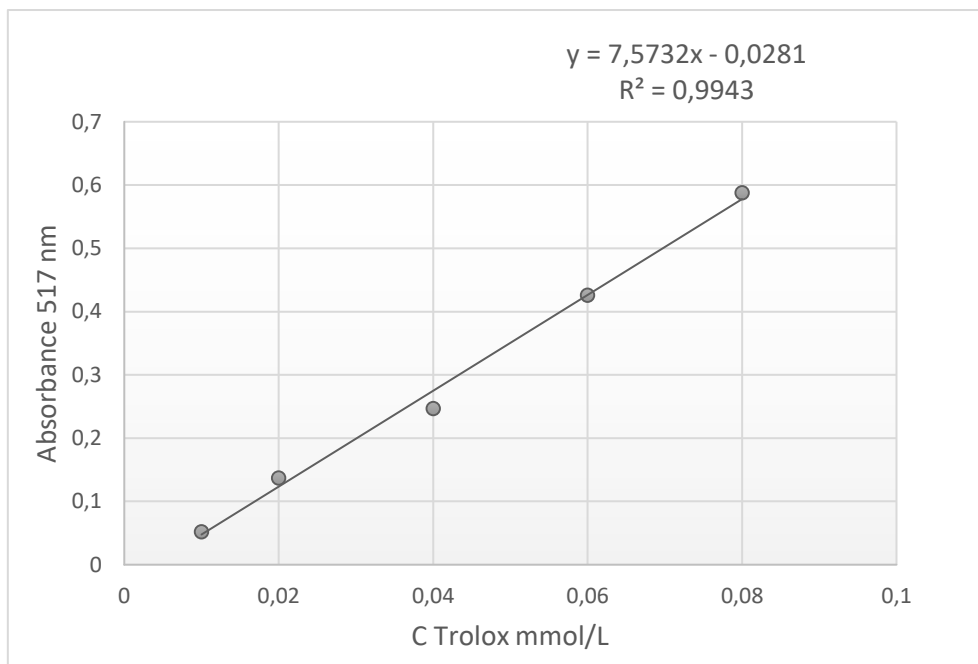
Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijski Folin-Ciocalteovom metodom. U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 0,5 mL ekstrakta, 2,5 mL F.C. reagensa i 2 mL 7,5%-tnog natrijevog karbonata. Sve se dobro promiješalo i ostavilo 2h na tamnom mjestu. Nakon 2h mjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Na isti način pripremljena je i slijepa proba, ali umjesto ekstrakta stavljeno je otapalo za ekstrakciju. Rezultati su preračunati iz kalibracijske krivulje galne kiseline (**Slika 8**).



**Slika 8** Prikaz kalibracijske krivulje galne kiseline (Izvor: autor)

### 3.2.6 Određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH testa

Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom temelji se na redukciji slobodnih DPPH radikala antioksidansom koji služi kao donor vodika ili elektrona. Redukcija DPPH\* radikala u molekulu DPPH dovodi do promjene boje otopine od izrazito ljubičaste do žute, što se detektira spektrofotometrijski smanjenjem apsorbancije pri valnoj duljini  $\lambda = 517$  nm. Do smanjenja apsorbancije tijekom vremena reakcije, dolazi zbog smanjenja količine DPPH\* radikala uslijed reakcije s antioksidansima. Otpipetiralo se 0,2 mL ekstrahiranog uzorka te se dodaje 3 mL otopine DPPH, dobro se promiješalo i ostavilo stajati 15 minuta. Nakon toga izmjerena je apsorbancija pri 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je etanol. Rezultat je preračunat iz kalibracijske krivulje troloxa (**Slika 9**). DPPH testom određena je antioksidacijska aktivnost soka i kaše jabuke.



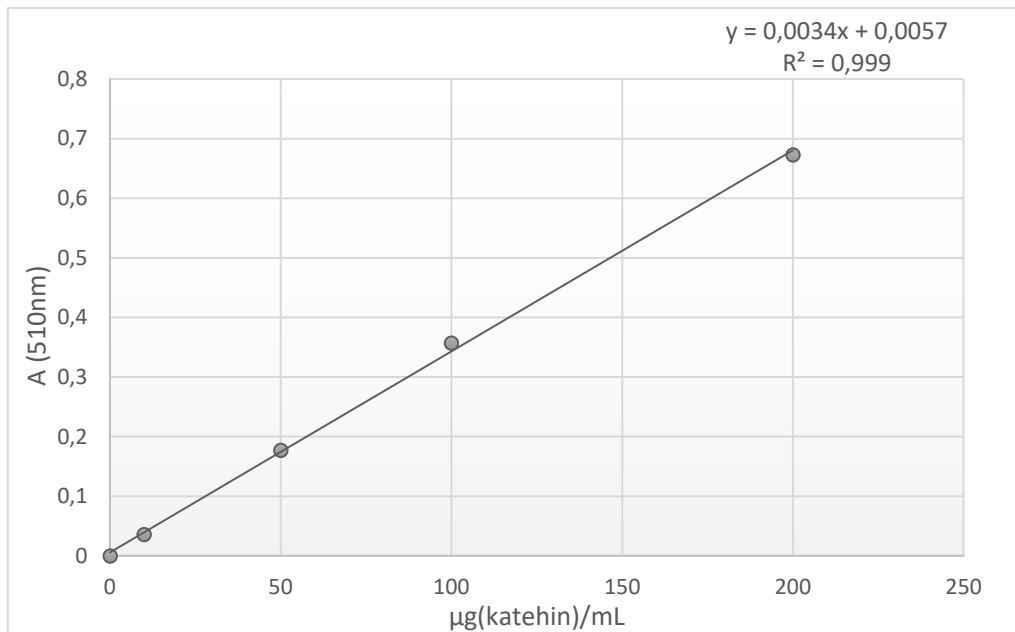
**Slika 9** Prikaz kalibracijske krivulje troloxa (Izvor: autor)

### 3.2.7 Određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom ABTS-a

ABTS metodom prati se raspadanje radikala  $ABTS^{\bullet+}$  koji nastaje oksidacijom 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazilin-6-sulfonat) (ABTS) djelovanjem fenolnih tvari. Otpipetirano je 0,2 mL uzorka te je dodano 3,2 mL otopine ABTS, dobro promiješano, te je smjesa ostavljena stajati 1h i 35 min u mraku da se odvija reakcija. Nakon toga mjerena je apsorbanca pri 734 nm. Rezultati su preračunati iz kalibracijske krivulje troloxa. ABTS metodom određena je antioksidacijska aktivnost soka i kaše jabuke.

### 3.2.8 Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi određivani su metodom temeljenoj na reakciji flavona i flavonola s aluminijevim ionima iz reakcijske smjese pri čemu dolazi do formiranja kelata i obojenja reakcijske smjese u žuto obojenje. Otopina je pripravljena miješanjem 0,5 mL uzorka, 4 mL deionizirane vode i 0,3 mL 5%  $NaNO_2$ . Nakon 5 min dodano je 0,3 mL 10%  $AlCl_3$ , nakon 5 min još 2 mL 1 mol/L  $NaOH$  i 2,4 mL deionizirane vode. Apsorbanca je mjerena na  $\lambda=510$  nm, u odnosu na deioniziranu vodu kao slijepu probu. Rezultati su preračunati iz kalibracijske krivulje katehina (**Slika 10**). Ukupni flavonoidi su određeni u uzorcima soka i kaše jabuka.



**Slika 10** Prikaz kalibracijske krivulje katehina (Izvor: autor)

### 3.2.9 Određivanje pH vrijednosti

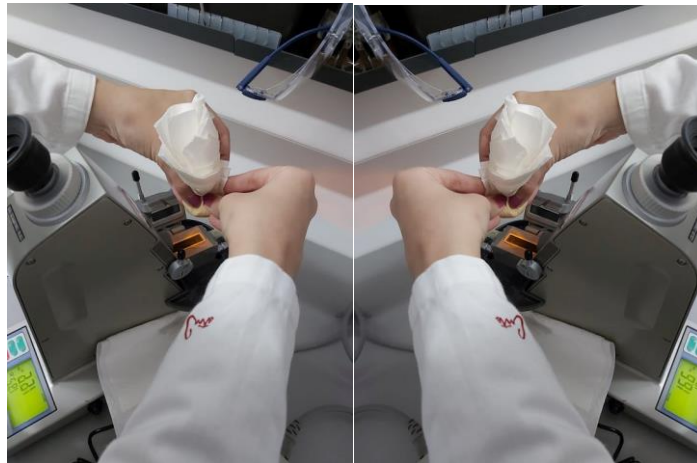
Kiselost jabuka odredili smo mjerenjem pH vrijednost soka i kaše jabuka uz pomoć pH-metra (Slika 11).



**Slika 11** Određivanje pH vrijednosti (Izvor: autor)

### 3.2.10 Određivanje topljive suhe tvari refraktometrom

Topljiva suha tvar je određena refraktometrom (**Slika 12**). Na prizmu refraktometra nanese se nekoliko kapi soka ploda jabuke (sok iz kaše jabuke), spusti se poklopac i svjetlost se usmjeri prema prizmi. Na ljestvici s vrijednostima suhe tvari se očitava vrijednost suhe tvari u % po Brixu. Refraktometrom se mjeri topljiva suha tvar na osnovi loma zrake svjetlosti na granici dviju različitih tvari (zrak/tekućina), a dana je odnosom između brzine prolaza svjetlosti kroz zrak i tekućinu (sok jabuke). Lom svjetla se očitava na skali od 0 do 30% po Brixu.



**Slika 12** Određivanje topljive suhe tvari refraktometrom (Izvor: autor)

### 3.2.11 Određivanje ukupnih kiselina titrimetrijski

U Erlenmayerovu tikvicu s brušenim grlom odvagano je 10 g uzorka s točnošću 0,01 g, doda 100 mL destilirane vode, dobro promiješa i zagrijava na vodenoj kupelji do 80 °C (**Slika 13**). Nakon hlađenja, sadržaj iz tikvice je prenesen u odmjernu tikvicu od 250 mL i tikvica se nadopunila do oznake destiliranom vodom, a zatim se njen sadržaj filtrirao. Zatim je otpipetirano 50 mL filtrata i preneseno u Erlenmayerovu tikvicu. Dodano je 3-4 kapi fenoftaleina i titrirano s 0,1 M natrijevim hidroksidom (NaOH) do promjene boje u trajanju od najmanje 30 sekundi (**Slika 13**). Udio ukupnih kiselina određen je u soku i kaši jabuke.

Ukupne kiseline se računaju prema formuli (1):

$$\text{Ukupne kiseline} = \frac{A \times k \times 100}{Ok} \text{ g / 100 g (1);}$$

A – mL 0,1 M NaOH utrošenih za titraciju, k – 0,0067,  $O_k$  – količina uzorka (g).



**Slika 13** Postupci određivanja ukupnih kiselina (Izvor: autor)

### 3.2.12 Određivanje ukupnih i prirodnih šećera po Luff-Schoorl-u

Izvagano je 7 g usitnjenog uzorka u laboratorijsku čašu, te postupno dodano 70 mL vruće vode uz miješanje (temperatura ne viša od 70 °C). Sadržaj u čaši zagrijemo na vodenoj kupelji do 70 °C tijekom 15-20 minuta. Nakon hlađenja sadržaj je prenesen kvantitativno u tikvicu od 200 mL. Sadržaju u tikvici je dodano 1-2 g kalcijeva karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ) da bi se postigla slabo kisela reakcija i potom je promiješano. Dodano je 5 mL reagensa I i 5 mL reagensa II, promiješano i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake. Kada se gornji sloj počeo izdvajati profiltrira se preko suhog, nabranog filtera papira u suhu tikvicu. Dobiveni filtrat je filtrat F1.

U tikvicu od 300 mL pipetom je odmjereno 25 mL Luffove otopine i dodano otopini šećera koja treba sadržavati nešto manje od 100 mg šećera (10 mL F1) te 15 mL destilirane vode tako da ukupni volumen iznosi 50 mL. Slijepa proba napravljena je sa 25 mL Luffove otopine i 25 mL destilirane vode. Po dodatku staklenih kuglica sadržaj se zagrijavao tako da prokuha za dvije minute i da se umjereno vrenje nastavi 10 minuta. Zagrijavanje je provedeno preko azbestne mrežice uz povratno hladilo. Kada je završeno zagrijavanje, sadržaj se naglo hladio pod mlazom hladne vode, a poslije dvije minute dodano je 3 mL otopine kalijeva jodida (KI). Promiješano je brzo, i pažljivo dodano 20 mL 25% sumporne kiseline ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) i 10 mL otopine kalij



tijocijanata (KCNS). Tikvica se mućka do prestanka šuma. Istaloženi jod se titrira otopinom natrijeva tiosulfata (**Slika 14**) uz dodatak škroba (indikator) dok se ne izgubi plava boja.

Za određivanje ukupnih šećera otpipetirano je 50 mL filtrata F1 u odmjernu tikvicu od 100 mL i dodano je 5 mL HCl-a te se sve dobro promiješa. Zatim se zagrijavalo 10 minuta u vodenoj kupelji pri 70 °C, brzo se hladilo uz stalno miješanje, neutralizirano je s 20% -tnom NaOH (**Slika 14**) uz metiloranž kao indikator. Ohlađeno je na sobnu temperaturu i dopunjeno destiliranom vodom do oznake. Dobiveni filtrat je F2. Postupak dalje ide kao kod određivanja reducirajućih šećera.

Postotak reducirajućih šećera izračunava se prema formuli (2):

$$\% \text{reducirajućih šećera} = \frac{a \times 100}{m} \quad (2);$$

a - mg šećera izračunati iz tablice; m – masa uzorka u mg.



neutralizacija s 20% -tnom NaOH

titracija otopinom natrijeva tiosulfata

**Slika 14** Postupci određivanja ukupnih i prirodnih šećera (Izvor: autor)

### 3.2.13 Određivanje polifenola u uzorku primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Pojedinačno polifenolni spojevi određeni su HPLC analitičkim sustavom (Agilent, 1290 Infinity, Šestar ID: 2475). Odijeljivanje komponenti je izvršeno uz pomoć kolone Inertsil ODS-3V proizvođača GL Science, dimenzije 250 × 4,6 cm, punjena česticama veličine 5 μm. Za pokretnu fazu su korišteni 1 %-tna mravlja kiselina u vodi, čistoće 98-100% kao otapalo A, te 1 %-tna mravlja

kiselina u metanolu kao otapalo B. Volumen injektiranja uzorka iznosio je 10  $\mu$ L, temperatura kolone i detektora podešena je na 50 °C, a protok pokretne faze na 0,8 mL/min. Detekcija pojedinih komponenti izvršena je na 280, 320, 360 ili 520 nm ovisno i komponenti. Kvantifikacija polifenolnih spojeva provela se preko kalibracijske krivulje pojedinačnih standarda.

### 3.2.14 Proizvodnja soka od tradicionalnih sorti jabuka

Tradicionalne sorte jabuka su zasebno izrezane i ubačene u sokovnik (Kuvings, Whole Slow Juicer B6000 Plus) (**Slika 15**), dobiveni sok je prenesen u plastične falkonice od 50 mL i stavljen na 4 °C u hladnjak na čuvanje do analize. Dok je sok potreban za određivanje prirodnih i ukupnih šećera pasteriziran na 80 °C, ohlađen i skladišten u hladnjaku na 4 °C.



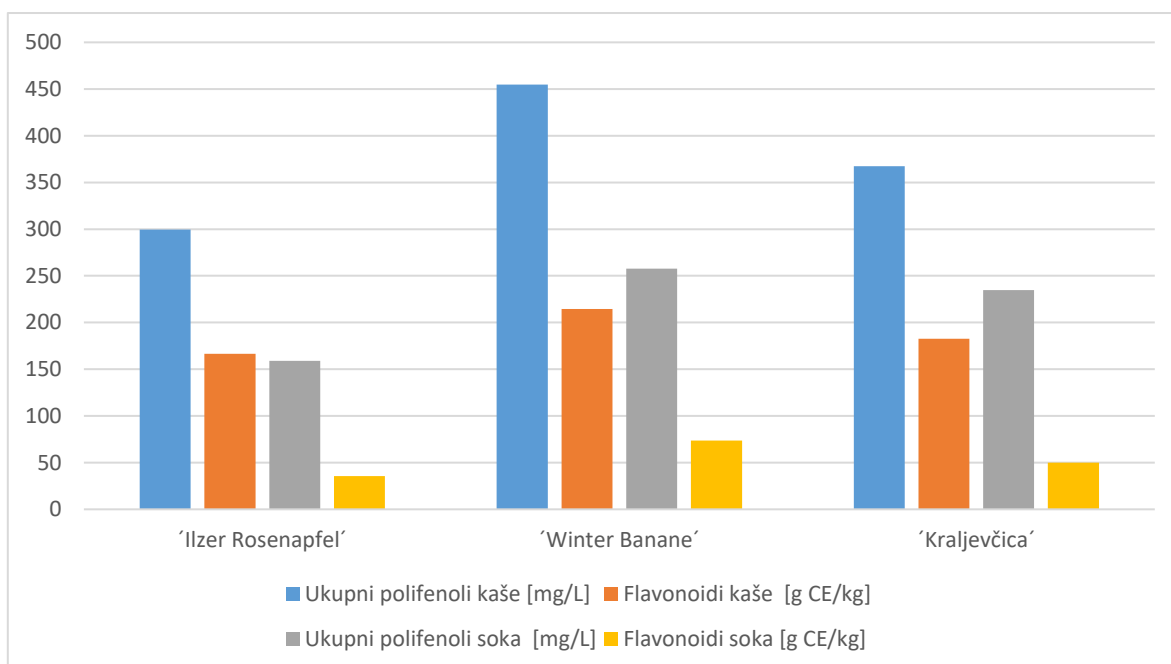
**Slika 15** Postupak proizvodnje soka

### 3.2.15 Određivanje količine patulina u soku jabuke

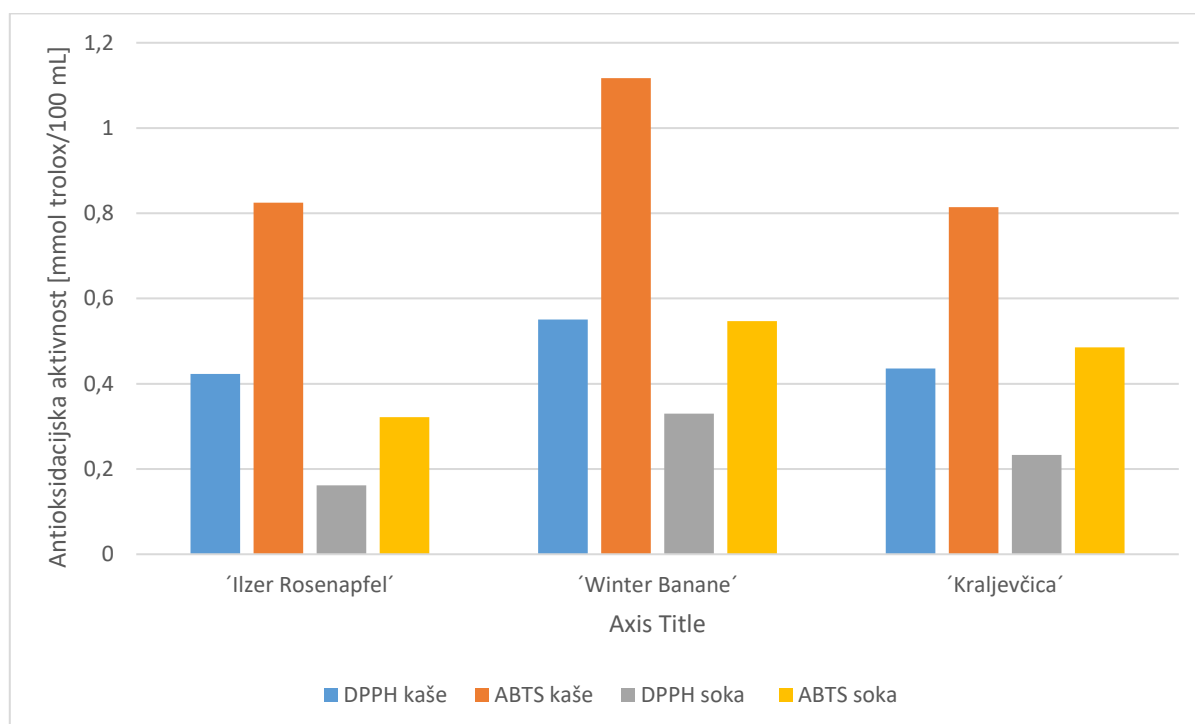
LC-MS/MS analiza korištena je za određivanje producirane koncentracije patulina u soku tradicionalnih sorti jabuka. Izvagano je 1 g uzorka u epruvete te dodano 4 mL ekstrakcijskog otapala (acetonitril/ultračista voda/mravlja kiselina : 79/20/1). Provedena je ekstrakcija u

trajanju od 45 minuta primjenom uređaja Multi RS-60 (Biosan, Riga, Latvia). Nakon ekstrakcije uzorci su podvrgnuti centrifugiranju u trajanju od 15 minuta. Nakon centrifugiranja izdvojeno je 500 µL supernatanta u staklenu vijalu, te dodano 500 µL otapala za razrjeđivanje (acetonitril/ultračista voda/mravlja kiselina : 20/79/1). Sve korištene kemikalije bile su LC-MS čistoće. Pripremljeni uzorci su injektirani u UHPLC-MS/MS sustav (20 µL) a samo razdvajanje patulina provedeno je na uređaju Acquity UPLC H-Class sustav (Waters, MA, SAD) uz Acquity BEH C18 kolonu (2,1 x 100 mm, 1,7 µm) termostatiranu pri 40 °C, uz protok od 0,45 mL/min. 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)). Valjanost podataka provjerena je usporedbom odnosa s kvalitativnim kromatogramom u odnosu na patulin iz standarda patulina.

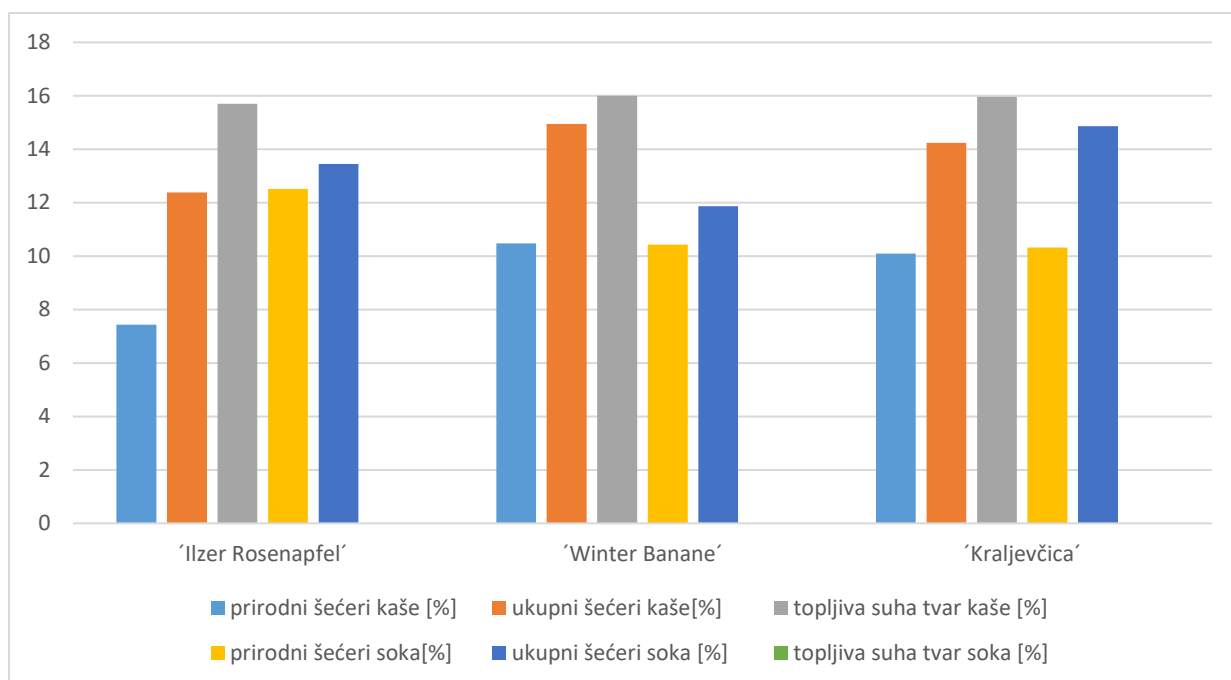
## 4. Rezultati



**Slika 16** Količina polifenola i flavonoida u kaši i soku odabranih sorti jabuka



**Slika 17** Antioksidacijska aktivnost soka i kaše odabranih sorti jabuka [mmol trolox/100 mL]



**Slika 18** Udio šećera i topljive suhe tvari u kaši i soku odabranih sorti jabuka

**Tablica 2** Sadržaj ukupnih kiselina i pH u kaši i soku odabranih sorti jabuka

	'Ilzer Rosenapfel'	'Winter Banane'	'Kraljevčica'
<b>ukupne kiseline kaše [g/100 g]</b>	0,11	0,07	0,15
<b>pH kaše</b>	3,26	3,31	3,09
<b>ukupne kiseline soka [g/100 g]</b>	0,11	0,08	0,17
<b>pH soka</b>	3,26	3,31	3,09

**Tablica 3** Sadržaj patulina u soku odabranih sorti jabuka [µg/kg]

	'Ilzer Rosenapfel'	'Winter Banane'	'Kraljevčica'
<b>patulin [µg/kg]</b>	NI	NI	NI

NI- nije identificirano

**Tablica 4** Sadržaj polifenola u odabranim sortama jabuka ( $\mu\text{g/g}$ )

	‘Ilzer Rosenapfel’	‘Winter Banane’	‘Kraljevčica’
<b>Procijanidin B1</b>	71,67 $\pm$ 10,36	NI	32,0 $\pm$ 8,39
<b>Procijanidin B2</b>	1588,10 $\pm$ 63,18	1306,58 $\pm$ 48,22	1189,08 $\pm$ 17,00
<b>Katehin</b>	91,92 $\pm$ 2,35	42,58 $\pm$ 0,38	78,94 $\pm$ 2,80
<b>Procijanidin A2</b>	1,39 $\pm$ 1,01	1,38 $\pm$ 0,05	4,59 $\pm$ 0,03
<b>Epikatehin</b>	581,50 $\pm$ 16,96	440,80 $\pm$ 13,94	480,36 $\pm$ 25,48
<b>Epigalokatehin</b>	143,37 $\pm$ 15,98	18,24 $\pm$ 3,94	227,17 $\pm$ 19,25
<b>Galna kiselina</b>	NI	0,62 $\pm$ 0,11	1,06 $\pm$ 0,90
<b>Klorogena kiselina</b>	601,23 $\pm$ 4,66	2452,22 $\pm$ 70,76	1292,53 $\pm$ 11,88
<b>Trans- ferulinska kiselina</b>	0,40 $\pm$ 0,01	1,11 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,01
<b>Floridzin</b>	217,96 $\pm$ 1,03	126,84 $\pm$ 3,45	106,58 $\pm$ 1,46
<b>Rutin</b>	129,26 $\pm$ 0,90	369,66 $\pm$ 10,13	19,16 $\pm$ 0,16
<b>Mirecetin</b>	20,74 $\pm$ 0,71	41,91 $\pm$ 1,86	6,80 $\pm$ 0,07
<b>Kvercetin</b>	0,23 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01
<b>Kvercetin-3-<math>\beta</math>-D- glukozid</b>	38,46 $\pm$ 0,25	145,42 $\pm$ 4,91	13,73 $\pm$ 0,22
<b>Pelargonidin-3-glukozid</b>	5,11 $\pm$ 0,14	NI	NI

NI- nije identificirano

**Tablica 5** Sadržaj polifenola u soku odabranih sorti jabuka ( $\mu\text{g/g}$ )

	‘Ilzer Rosenapfel’	‘Winter Banane’	‘Kraljevčica’
<b>Procijanidin B1</b>	135,32 $\pm$ 1,40	10,18 $\pm$ 2,49	238,05 $\pm$ 28,49
<b>Procijanidin B2</b>	59,39 $\pm$ 3,47	26,49 $\pm$ 4,14	120,20 $\pm$ 6,05
<b>Katehin</b>	5,71 $\pm$ 0,93	9,89 $\pm$ 1,55	14,86 $\pm$ 1,49
<b>Procijanidin A2</b>	0,19 $\pm$ 0,02	0,69 $\pm$ 0,24	0,56 $\pm$ 0,11
<b>Epikatehin</b>	6,01 $\pm$ 0,22	10,31 $\pm$ 0,48	13,55 $\pm$ 0,53
<b>Epigalokatehin</b>	7,12 $\pm$ 0,73	8,21 $\pm$ 0,61	34,38 $\pm$ 2,98
<b>Galna kiselina</b>	4,90 $\pm$ 0,16	NI	2,85 $\pm$ 0,42
<b>Klorogena kiselina</b>	123,41 $\pm$ 0,64	353,74 $\pm$ 9,93	244,54 $\pm$ 2,22
<b>Trans- ferulinska kiselina</b>	0,03 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01
<b>Floridzin</b>	7,15 $\pm$ 0,05	10,73 $\pm$ 0,13	2,88 $\pm$ 0,02
<b>Rutin</b>	0,33 $\pm$ 0,01	1,07 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01
<b>Mirecetin</b>	0,06 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00
<b>Kvercetin</b>	NI	0,03 $\pm$ 0,03	NI
<b>Kvercetin-3-<math>\beta</math>-D- glukozid</b>	0,35 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01
<b>Pelargonidin-3-glukozid</b>	NI	NI	NI

NI- nije identificirano

## 5. RASPRAVA



U posljednje vrijeme, organski uzgoj voća i povrća je sve popularniji te se što više pokušava utjecati na svijest potrošača da kupuju i konzumiraju voće i povrće iz ekološkog uzgoja. Tradicionalne sorte se uklapaju u trend ekološkog uzgoja i zdrave prehrane iz razloga što su otpornije na bolesti i štetočine od komercijalnih sorti pa ih samim tim nije potrebno pretjerano prskati. One ne zahtijevaju intenzivnu njegu i vodu koliko zahtijevaju komercijalne sorte, no unatoč svim prednostima, tradicionalne sorte su rijetko dostupne u trgovinama. Također, prijeti im i opasnost od izumiranja što za posljedicu ima gubitak značajne količine genetskog materijala i sve siromašniju raznolikost ponude jabuka na tržištu (Purdešová i sur., 2017).

Cilj ovog diplomskog rada je bio odrediti potencijal tradicionalnih sorti jabuka za proizvodnju soka sa smanjenim udjelom mikotoksina patulina u soku jabuke prema količini polifenola u soku, a koji utječu na otpornost i stabilnost ploda jabuke. Nadalje, odrediti udio ukupnih polifenola, ukupnih i prirodnih šećera, flavonoida, topljive suhe tvari, pH te ukupne kiseline. Nova saznanja u ovom području mogu pomoći u očuvanju tradicionalnih sorti i njihovog genetskog materijala kao i biološke raznolikosti jabuka.

Rezultati pokazuju da se sadržaj polifenola u kaši i soku razlikuje od sorte do sorte kako je prikazano na **Slici 16**, pa je tako najviše polifenola određeno u kaši, odnosno soku tradicionalne sorte 'Winter Banane', potom u sorti 'Kraljevčica', a najmanji sadržaj polifenola je određen u kaši tj. soku sorte 'Ilzer Rozenapfel'. Kako je sadržaj polifenola potencijalno povezan sa antioksidacijskom aktivnosti i otpornosti jabuke, najveću antioksidacijsku aktivnost (**Slika 17**) je pokazala tradicionalna sorta 'Winter Banane', potom 'Kraljevčica' te sorta 'Ilzer Rozenapfel'.

U **Tablici 4.** i **Tablici 5.** prikazan je polifenolni profil tradicionalnih sorti jabuka te polifenolni profil soka dobivenog od istih sorti. Iz navedenih tablica možemo zaključiti da u uzorcima ovih tradicionalnih sorti jabuka prevladavaju sljedeći polifenoli: procijanidin B2, klorogenska kiselina, epikatehin, floridzin, rutin, procijanidin B1 te katehin, dok su u soku ovih sorti najzastupljeniji procijanidin B2, klorogenska kiselina te procijanidin B1.

Za razliku od tradicionalnih sorti, polifenolni profil komercijalnih sorti se najviše sastoji od katehina, klorogenske kiseline, kofeinske kiseline te epikatehina. Tradicionalne sorte imaju visok sadržaj polifenola i visoku antioksidacijsku aktivnost te u usporedbi sa polifenolnim profilom komercijalnih sorta jabuka ('Idared', 'Jonagold', 'Granny Smith'), tradicionalne sorte imaju veći sadržaj polifenola kao i veću antioksidacijsku aktivnost (Akagić i sur., 2019.).

Antioksidacijska aktivnost polifenolnih spojeva u određenoj mjeri može utjecati na reakcije nastajanja slobodnih radikala te posljedično kroz modulaciju oksidativnog statusa plijesni na zarazu jabuka s plijesni *P. expansum* te intenzitet sekundarnog metabolizma. Ovi podaci upućuju na to da bi navedene tradicionalne sorte u svom sastavu mogle imati određene spojeve koji potencijalno utječu na otpornost prema plijesni *P. expansum* i moduliraju produkciju mikotoksina patulina. Sadržaj patulina u kašama, odnosno soku jabuke, je kvantitativno određivan LC-MS/MS tehnikom, a rezultati pokazuju kako ni kod jedne ispitivane sorte nije detektirana prisutnost patulina (**Tablica 3.**). Naime, poznato je kako se koncentracija patulina u soku jabuke reducira pasterizacijom soka, a što je jedan od osnovnih tehnoloških procesa pri preradi jabuka u sok od jabuka.

Na temelju istraživanja i podatka da u soku ovih tradicionalnih sorti nije utvrđena prisutnost patulina, ali i na temelju visokog sadržaja polifenola i visoke antioksidacijske aktivnosti mogli bismo zaključiti kako tradicionalne sorte 'Winter Banane', 'Kraljevčica' i 'Ilzer Rozenapfel' imaju visok potencijal za proizvodnju soka sa smanjenim udjelom patulina, zbog skladišne otpornosti na zarazu s plijesni *P. expansum*.

Organske kiseline se u voću nalaze kao slobodne kiseline i kao sastojci estera. U voću ih prosječno ima 0,1-2,0 %, a u voćnom soku i do 6,0 %. U jabukama prevladava jabučna kiselina. Šećeri se u jabuci nalaze sami ili vezani na druge kemijske strukture i predstavljaju više od 90 % suhe tvari u jabuci te su energetski najvažniji sastojci. U jabuci ih nalazimo u postotku od 6 do 17 %. Najveći udio šećera čine monosaharidi glukoza i fruktoza. Povoljan odnos kiselina i šećera u soku jabuke iznosi 1:10. Organske kiseline i topljivi šećeri pridonose organoleptičkoj prihvatljivosti plodova jabuke (Bart i sur, 2006).

Prema sadržaju ukupnih šećera u kaši i soku (**Slika 18**) ovih sorti tradicionalne, najviše ukupnih šećera sadrži sorta 'Kraljevčica', potom 'Ilzer Rozenapfel' te najmanje ukupnih šećera sadrži sorta 'Kraljevčica', dok se po sadržaju kiselina (**Tablica 2**) ističe tradicionalna sorta 'Kraljevčica' koja ih ima najviše, potom 'Ilzer Rozenapfel' te najmanje kiselina sadrži sorta 'Winter Banane'.

Kod sorte 'Ilzer Rozenapfel' omjer kiselina i šećera iznosi 0,11:13,45, kod sorte 'Winter Banane' 0,08:11,87, a kod sorte 'Kraljevčica' 0,17:14,86 te prema navedenom najbolji omjer kiselina i šećera za proizvodnju soka ima tradicionalna sorta 'Winter Banane'.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja koja su provedena tijekom izrade ovog diplomskog rada, može se zaključiti slijedeće:

1. Tradicionalne sorte 'Winter Banane', 'Kraljevčica' i 'Ilzer Rozenapfel' se međusobno razlikuju prema sadržaju ukupnih polifenola i antioksidacijskoj aktivnosti. Najveći sadržaj polifenola sadrži sorta 'Winter Banane', a najmanji sadržaj polifenola sadrži sorta 'Ilzer Rozenapfel'.
2. Po količini flavonoida ističe se sorta 'Winter Banane', dok najmanje flavonoida sadrži sorta 'Kraljevčica'.
3. Najveću antioksidacijsku aktivnost ima sorta 'Winter Banane', a najmanju ima sorta 'Ilzer Rozenapfel'.
4. U soku i kaši tradicionalnih sorti 'Winter Banane', 'Kraljevčica' i 'Ilzer Rozenapfel' nije utvrđen sadržaj mikotoksina patulina, što upućuje na visoku otpornost ovih tradicionalnih sorti na produkt plijesni *P. expansum*.
5. Prema sadržaju šećera, najviše ukupnih šećera sadrži sorta 'Winter Banane', a najmanje ukupnih šećera sadrži sorta 'Ilzer Rozenapfel'.
6. Prema sadržaju ukupnih kiselina, sorta 'Kraljevčica' ih ima najviše, dok najmanje ukupnih kiselina sadrži sorta 'Winter Banane'.
7. Najniži pH ima sok sorte 'Kraljevčica', dok najviši pH od ispitivanih sorti ima 'Winter Banane'.
8. Najpovoljniji omjer kiselina i šećera za proizvodnju soka od jabuke ima tradicionalna sorta 'Winter Banane', a najnepovoljniji sorta 'Kraljevčica'.
9. U uzorcima ovih tradicionalnih sorti, od polifenolnih grupa, najviše je utvrđeno procijanidina B1, klorogene kiseline, procijanidina B2, epikatehina, katehina te galne kiseline.
10. Tradicionalne sorte imaju veći sadržaj polifenola kao i veću antioksidacijsku aktivnost te sadrže najviše procijanidina B2, klorogenske kiseline, epikatehina, floridzina, rutina, procijanidina B1 te katehin, dok se polifenolni profil komercijalnih sorti najviše sastoji od najviše katehina, klorogenske kiseline, kofeinske kiseline te epikatehina.
11. Na temelju količine polifenola i visoke antioksidacijske aktivnosti, kao i činjenice da u soku ovih sorti nije pronađen sadržaj patulina mogli bismo zaključiti da su ove

tradicionalne sorte pokazale visok potencijal za proizvodnju soka sa smanjenim udjelom patulina.

## 7. LITERATURA

- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. : *Advances in occurrence, importance and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods*. *Foods* 9: 137, **2020**, <https://doi.org/10.3390/foods9020137>
- Asima Akagić, Amila Vranac, Fuad Gaši, Pakeza Drkenda, Nermina Spaho, Sanja Oručević Žuljević, Mirsad Kurtović, Osman Musić, Senad Murtić, Metka Hudina: *Sugars, acids and polyphenols profile of commercial and traditional apple cultivars for processing*. *Acta agriculturae Slovenica*, **2019.**, <http://dx.doi.org/10.14720/aas.2019.113.2.5>
- Andersen, B., Smedsgaard, J., & Frisvad, J. C.: *Penicillium expansum: Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2421–2428, **2004**, <https://doi.org/10.1021/jf035406k>
- Anderson, J.W.; Baird, P.; Davis, R.H., Jr.; Ferreri, S.; Knudtson, M.; Koraym, A.; Waters, V.; Williams, C.L. *Health benefits of dietary fiber*. *Nutr. Rev.* 67: 188–205, **2009**, <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x>
- Boyer, J., Liu, R.H. Apple phytochemicals and their health benefits 3: *Nutrition Journal* 3, 5, **2004**, <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-5>
- Brzica, K., *Jabuka*. Hrvatska tiskara, Zagreb **1995**
- Ceymann, M., Arrigoni, E., Schärer, H., Nising, A.B., Hurrell, R.F.: Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *J. Food Compos. Anal.* 26: 128-135, **2012**, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.12.002>
- Codex Alimentarius Commission: Code of practice for the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. CAC/RCP 50-2003. Food and Agriculture Organization, Geneva, **2003**
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability, and effects on health. *Natural Product Reports* 26: 1001–1043, **2009**, <https://doi.org/10.1042/BIO03206004>
- Demirel, R., Sariozlu, N. Y. and İlhan, S. *Polymerase chain reaction (PCR) identification of terverticillate Penicillium species isolated from agricultural soils in eskışehir province*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56: 980-984, **2013**, <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013005000004>
- Duraković L, Duraković S: *Specijalna mikrobiologija*. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Durieux, Zagreb, **2000**
- Duralija, B.; Putnik, P.; Brdar, D.; Bebek Markovinović, A.; Zavadlav, S.; Pateiro, M.; Domínguez, R.; Lorenzo, J.M.; Bursać Kovačević, D.: The Perspective of Croatian Old Apple Cultivars in Extensive Farming for the Production of Functional Foods. *Foods* 10: 708, **2021**, <https://doi.org/10.3390/foods10040708>

Državni zavod za statistiku ([https://www.dzs.hr/Hrv\\_Eng/publication/2020/SI-1676.pdf](https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2020/SI-1676.pdf))  
24.03.2022.

Državni zavod za statistiku ([https://www.dzs.hr/Hrv\\_Eng/publication/2020/01-01-28\\_01\\_2020.htm](https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2020/01-01-28_01_2020.htm)) 24.03.2022.

J. Bart, M. Pilar Cano, T. Gusek, J. S. Sidhu, N. Sinha: *Handbook of Fruits and Fruit Processing* (Y.H. Hui Ed.) Blackwell, **2006**.

European, C.: Commission regulation (EC) No 1425/2003 of 11 August 2003 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards patulin. *Official Journal of the European Union* 203: 1-3, **2003**

European, C. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* 364: 5-24, **2006**

Fereidoon S., Varatharajan V., Won Young O. and Han P.: Phenolic compounds in agri-food by-products, their bioavailability and health effects, *Journal of Food Bioactives* 5: 57-119, **2019**, <https://doi.org/10.31665/JFB.2019.5178>

Frisvad, C. J. & Samson, A. R.: 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**

Garfagnana (Tuscany, Italy): A potential source for 'nutrafruit' production. *Food Chem.* 294: 518-525 **2019**, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.027

Gordon, M.H.: *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing Ltd, **2001**, <http://dx.doi.org/10.1016/9781855736160.1.5>

Harborne JB, Simonds NW: *Biochemistry of Phenolic Compounds*. Academic Press, London, **1964**, <https://doi.org/10.1021/ja01083a067>

Horváth-Kerkai, E.: *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, Blackwell Publishing, Iowa, USA, **2006**, doi:10.1002/9780470277737

Harvey, J.M.: Reduction of losses in fresh fruits and vegetables. *Annual Review of Phytopathology* 16: 321-341, **1978**, <https://doi.org/10.1146/annurev.py.16.090178.001541>

Hayes, A. W., Phillips, T. D., Williams, W. L. and Ciegler, A.: Acute toxicity of patulin in mice and rats. *Toxicology* 13: 91-100, **1979**, [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(79\)80014-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(79)80014-1)

Herceg, Z. *Procesi u prehrambenoj industriji*. Plejada, Zagreb **2011**, <https://www.plantea.com.hr/jabuka/>



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> (25.03.2022.)

Hrvatski centar za poljoprivredni marketing, 2008  
<http://hcpm.agr.hr/analiza/hrjabuka.htm>, 30.03.2022.

Hyson, D.A.: A Comprehensive Review of Apples and Apple Components and Their Relationship to Human Health, *Advance Nutr.* 2: 408-420, **2011**, <https://doi.org/10.3945/an.111.000513>

Jakobek, L., Barron, A.R.: Acent apple varieties from Croatia as a source of bioactive polyphenolic compound. *Journal of Food Composition and Analysis* 45: 9-15, **2015**, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.007>

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.: *Voćarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, **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, *Antioxidants*, 7: 1-2, **2018**, <https://doi.org/10.3390/antiox7010020>

Kumar A, Sharma D.P, Kumar P, Sharma G, Suprun I.I : Comprehensive insights on Apple (*Malx domestica* Borkh.) bud sport mutations and epigenetic regulations, *Scientia Horticulturae*, 297, **2022**, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110979>

Larous, L., Hendel, N., Abood, J. K., & Ghoul, M.: The growth and production of patulin mycotoxin by *Penicillium expansum* on apple fruits and its control by the use of propionic acid and sodium benzoate. *Arab Journal of Plant Protection* 25: 123–128, **2007**

Light, R. J.: 6-Methylsalicylic acid decarboxylase from *Penicillium patulum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 191: 430-438, **1969**, [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90262-9](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90262-9)

Lončarić A, Matanović K, Ferrer P, Kovač T, Šarkanj B, Skenderović Babojelić M, Lores M: Peel of Traditional Apple Varieties as a Great Source of Bioactive Compounds: Extraction by Micro-Matrix Solid-Phase Dispersion, *Foods* 9: 1, **2020**, doi:10.3390/foods9010080

Lončarić, A., Skenderović Babobjelić, M., Kovač, T., Šarkanj, B.: Polmological properties and polyphenol content of conventional and traditional apple cultivars from Croatia, *Hrana u zdravlju i bolesti* 8: 19-24, **2019**, <https://hrcak.srce.hr/221962>

Lovrić T., Piližota V.: *Konzerviranje i prerada voća i povrća*, Globus, Zagreb, **1994**

Lynen, F. and Tada, M.: Die biochemischen Grundlagen der Polyacetat-Regel. *Angewandte Chemie* 73: 513-519, **1961**, <https://doi.org/10.1002/ange.19610731502>

Markowski J. and Płocharsk W.: Determination of phenolic compounds in apples and processed apple products. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 14:133-142, **2006**, <https://doi.org/10.3390/antiox2030181>

Martens S, Mithöfer A: Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 66:2399-2407, **2005**, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.07.013>

Mditshwa, A.; Fawole, O.A.; Opara, U.L. Recent developments on dynamic controlled atmosphere storage of apples—A review. *Food Packag. Shelf Life* 16: 59–68, **2018**  
doi:10.1016/j.fpsl.2018.01.011.

Murphy, G., Vogel, G., Krippahl, G. and Lynen, F.: Patulin Biosynthesis: The Role of Mixed-Function Oxidases in the Hydroxylation of m-Cresol. *European Journal of Biochemistry* 49: 443-455, **1974**, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03849.x>

Nela Nedić-Tiban: *Poluproizvodi i proizvodi od voća i povrća: Prezentacije iz kolegija, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek*, **2014**

Nguyen, M. T.: Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam: étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Doktorski rad. Institut National Polytechnique de Toulouse, France, **2007**

Pitt, J.I. & Hocking, A.D. : Fungi and food spoilage. New York, NY: *Springer*, **2009**

Puel, O., Galtier, P. and Oswald, I. P.: Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins* 2: 613-31, **2010**, doi: 10.3390/toxins2040613

Purdešová, A.; Dömötörová, M. MSPD as sample preparation method for determination of selected pesticide residues in apples. *Acta Chim. Slovaca* 10: 41–46, **2017**, doi:10.1515/acs-2017-0007.

Romanazzi, G., Sanzani, S. M., Bi, Y., Tian, S., Martínez, P. G., & Alkan, N. : Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122: 82– 94, **2016**, <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.08.003>

Shahidi, F., Vamadevan, V., Oh, W.Y., and Peng, H. : Phenolic compounds in agri-food by-products, their bioavailability and health effects. *J. Food Bioact* 5: 57–119. , **2019**, <https://doi.org/10.31665/JFB.2019.5178>

Skenderović Babobjelić M, Korent T, Šindrak Z, Jeremić T: Polmološka svojstva i kakvoća ploda tradicionalnih sorata jabuka. *Glasnik zaštite bilja* 37: 20-27, **2014**, <https://hrcak.srce.hr/162713>

Sommer, N., Fortlage, R.J., & Edwards, D.C.: *Postharvest technology of horticultural crops* (3rd ed.). Davis, CA: University of California, Agricultural and Natural Resources, **2002**

- Tannous, J.; Keller, N.P.; Atoui, A.; El Khoury, A.; Lteif, R.; Oswald, I.P.; Puel, O. Secondary metabolism in *Penicillium expansum* : Emphasis on recent advances in patulin research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 58: 2082–2098, **2018**, doi:10.1080/10408398.2017.1305945
- Tapia, M. O., Giordano, A. F., Soraci, A. L., Gonzalez, C. A., Denzoin, L. A., Ortega, I. O., Olson, W. and Murphy, M. J.: Toxic effects of patulin on sheep. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 5: 271-276, **2006**, <https://medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2006.271.276>
- Tournas, V. H., & Memon, S. U.: Internal contamination and spoilage of harvested apples by patulin-producing and other toxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology* 133: 206-209, **2009**, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.025
- Vermerris, W., Nicholson, R.: *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, Dordrecht, **2008**. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7_4)
- Wollgast J, Anklam E: Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33: 423-447, **2000**, [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00068-5)
- Wu, T.-S., Liao, Y.-C., Yu, F.-Y., Chang, C.-H. and Liu, B.-H.: Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60). *Toxicology Letters* 183: 105-111, **2008**, doi: 10.1016/j.toxlet.2008.09.018
- Yanishlieva- Maslarova, N.V., Heinone, J.M.: Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. *Antioxidants in food*. 108: 210-263, **2001**, <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600127>