

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

---

Geber, Kristina

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:109:027050>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**

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**

Kristina Geber

**POTENCIJAL KOMERCIJALNIH SORTI JABUKA UBRANIH 2021.  
GODINE ZA PROIZVODNJU SOKA 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:** izv. prof. dr.sc. Ante Lončarić  
**Pomoć pri izradi:** Ana-Marija Gotal Skoko, mag. ing. techn. aliment.

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

Kristina Geber, 0113144706

**Sažetak:** Jabuka je namirnica bogata dijetalnim vlaknima, fitokemikalijama, vitaminima, bioaktivnim spojevima i polifenolima. Ima utjecaj na smanjenje kroničnih bolesti, očuvanje zdravlja ploda i smanjenje nepoželjnih patogena zbog svojeg antioksidativnog djelovanja, prilikom snižavanja oksidativnog stresa. Cilj diplomskog rada je usporediti sorte 'Idared', 'Jonagold' i 'Golden Delicious' ubranih u sezoni 2021. godine s produkcijom mikotoksina patulin kojeg proizvodi plijesan *Penicillium expansum*, najčešći patogen u jabukama nakon berbe. Eksperimentalnim istraživanjem određen je udio ukupnih i pojedinačnih polifenola, prirodnih i ukupnih šećera, pH, udio flavonoida, topljiva suha tvar, udio ukupnih kiselina, antioksidacijska aktivnost te udio patulina u soku jabuke. Najviše polifenola određeno je u kaši, odnosno soku sorte 'Jonagold', a prema činjenici da je antioksidacijska aktivnost usko povezana sa sadržajem polifenola, komercijalna sorta 'Jonagold' pokazat će najveću otpornost na mikotoksin patulin. Patulin je identificiran u sorti 'Idared', dok u sortama 'Jonagold' i 'Golden Delicious' nema identificiranog patulina. Dobiveni rezultati doprinose boljem uvidu u otpornost komercijalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *P. expansum*.

**Ključne riječi:** komercijalne sorte jabuka, *Penicillium expansum*, patulin, antioksidacijska aktivnost

**Rad sadrži:** 45 stranica  
17 slika  
6 tablica  
39 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

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

**Datum obrane:** 28. rujna 2022.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer 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:** Food hazards  
**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, associate prof.  
**Technical assistance:** Ana-Marija Gotal Skoko, mag. ing. techn. aliment.

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

Kristina Geber, 0113144706

**Summary:** Apple is a food rich in dietary fiber, phytochemicals, vitamins, bioactive compounds, and polyphenols. It has the effect of reducing chronic diseases, preserving the health of the fruit and reducing unwanted pathogens due to its antioxidant action, while reducing oxidative stress. The aim of the thesis was to compare the varieties 'Idared', 'Jonagold' and 'Golden Delicious' harvested in the season of 2021 with the production of the mycotoxin patulin produced by the mold *Penicillium expansum*, the most common pathogen in apples after harvest. Experimental research determined the content of total and individual polyphenols, natural and total sugars, pH, content of flavonoids, soluble dry matter, content of total acids antioxidant activity and the content of patulin in apple juice. The most polyphenols were determined in the juice of the 'Jonagold' variety, and according to the fact that the antioxidant activity is closely related to the polyphenol content, the commercial variety 'Jonagold' will show the greatest resistance to the mycotoxin patulin. Patulin was identified in the variety 'Idared', while no patulin was identified in the varieties 'Jonagold' and 'Golden Delicious'. The obtained results contribute to a better insight into the resistance of commercial apple varieties to *P. expansum* mold infection.

**Key words:** Conventional apple varieties, *Penicillium expansum*, patulin, antioxidant activity

**Thesis contains:** 45 pages  
17 figures  
6 tables  
39 references

**Original in:** Croatian

### Defence committee:

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

**Defence date:** September 28, 2022

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

**This work was co-financed by the Croatian Science Foundation with the project "The possibility of using traditional varieties of apples for the production of apples and apple juice with a reduced content of patulin" (UIP-2020-02-8461)**

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	4
2.1 Jabuka ( <i>Malus domestica</i> )	5
2.1.1 Komercijalne sorte jabuka	6
2.1.2 Polifenolni spojevi i njihova antioksidacijska aktivnost	8
2.2. Plijesan <i>Penicillium expansum</i>	9
2.2.1. Patulin	11
2.2.2 Biosinteza patulina	12
2.2.3 Čimbenici koji utječu na rast <i>P. expansum</i> i proizvodnju patulina u jabukama	13
2.2.4 Mjere za smanjivanje kontaminacije soka jabuke patulinom	14
2.3 Faze prerade soka od jabuke i njihov učinak na koncentraciju patulina u finalnom proizvodu	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	20
3.1. Zadatak	21
3.2 Materijali i metode	21
3.2.1 'Golden Delicious'	21
3.2.2 'Idared'	22
3.2.3 'Jonagold'	23
3.2.4 Priprema ekstrakta komercijalnih sorti jabuka	24
3.2.5 Određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH testa	24
3.2.6 Određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom ABTS metode	25
3.2.7 Određivanje ukupnih polifenola	25
3.2.8 Određivanje ukupnih flavonoida	26
3.2.9 Određivanje pH vrijednosti	27
3.2.10 Određivanje topljive suhe tvari refraktometrom	28
3.2.11 Određivanje ukupnih kiselina titrimetrijski	28
3.2.12 Određivanje polifenola u uzorku primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	29
3.2.13 Određivanje ukupnih i prirodnih šećera po Luff- Schoorl-u	29
3.2.14 Proizvodnja soka od komercijalnih sorti jabuka	30
3.2.15 Određivanje količine patulina u soku jabuke	31
<b>4. REZULTATI</b>	33
<b>5. RASPRAVA</b>	37
<b>6. ZAKLJUČAK</b>	39
<b>7. LITERATURA</b>	41

## Popis oznaka, kratica i simbola

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

**LC-MS/MS** - Tekućinski kromatograf i maseni spektrofotometar (engl. Liquid Chromatography mass spectrometry)

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

**IARC** - Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer)

**WHO** - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization)

**HACCP** - Hrvatska agencija za hranu (engl. Hazard Analysis and Critical Control Point)

## **1. UVOD**



Jabuka je jedna od namirnica koju je preporučeno uključiti u svakodnevnu prehranu zbog izuzetno velike količine nutrijenata koje sadrži, uključujući dijetalna vlakna i fitokemikalije. Sastav jabuke uključuje: 85 % vode, 11 % ugljikohidrata, 0,6 % masti, 0,3 % proteina, 2 % dijetalnih vlakana i 0,5 % organskih kiselina, od kojih je jabučna kiselina najzastupljenija. Također je važno napomenuti da je jabuka bogata vitaminima i to najviše vitaminom C, te bioaktivnim spojevima (Van der Sluis, 2005). Polifenoli se smatraju jednom od ključnih komponenti za blagotvorni učinak jabuke na zdravlje, kao i ostalog voća i povrća. Neki od pozitivnih učinaka polifenola su: prevencija kardiovaskularnih bolesti, antikancerogena i antivirusna svojstva, regulacija kolesterola itd. Uzimajući u obzir bogatu paletu nutrijenata ove namirnice, istraživanja su pokazala da pomaže u smanjenju kroničnih bolesti (Zhung i sur., 2018). Utjecaj na smanjenje kroničnih bolesti povezan je s velikom količinom antioksidansa koji imaju sposobnost snižavanja oksidativnog stresa, kompleksiranja metalnih iona i modulacije straničnog odgovora. U korist tome ide i prisutnost klorogenske kiseline u jabuci, koja ima veliku učinkovitost u čišćenju slobodnih radikala (Kalinowska i sur., 2014).

Infekcije nakon berbe utječu na dugovječnost sezonskog voća, pa tako i jabuke. Gljivične infekcije odgovorne su za od 25 % do 50 % gubitaka voćnih proizvoda tijekom dugotrajnog skladištenja. *Penicillium expansum* je najčešći patogen u jabukama nakon berbe, što se može nepovoljno odraziti na profitabilnost uzgajivača jabuka, ali i na zdravlje ljudi. Razlog tome je njegova produkcija toksičnog metabolita patulina (Zhung i sur., 2018).

Iako je veliki broj sorti jabuka razvijeno tijekom vremena, samo nekoliko ih se uzgaja za komercijalnu upotrebu. 'Idared', 'Jonagold', 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Granny Smith' i 'Mutsu' jedne su od najpopularnijih komercijalnih sorti jabuka. Istraživanja su pokazala da su tradicionalne sorte jabuka nutritivno bogatije od komercijalnih, ali ne zadovoljavaju standarde izgleda, stoga nisu zastupljene na globalnom tržištu (Lončarić i sur., 2019).

Prema rezultatima ukupne svjetske proizvodnje voća, jabuka je pri samom vrhu, iza banane i grožđa. U Hrvatskoj zauzima 36 % ukupne proizvodnje voća. 'Idared' je u domaćoj proizvodnji najzastupljenija sorta, a potom 'Jonagold' i 'Golden Delicious' (Cerjak i sur., 2011).

Cilj diplomskog rada bio je povezati svojstva jabuka s produkcijom mikotoksina patulina kojeg producira plijesan *Penicillium expansum*, a potom provesti eksperimentalno istraživanje usporedbe triju komercijalnih sorti, 'Jonagold', 'Golden Delicious' i 'Idared'. Rezultati su

prikazani na temelju kemijskih i fizikalnih svojstava istraživanih sorti jabuka (uključujući antioksidacijsku aktivnost (ABTS i DPPH metoda), udio ukupnih i pojedinačnih polifenola, flavonoida, ukupnih i prirodnih šećera, ukupnih kiselina, pH, topljive suhe tvari te udjela patulina u soku jabuke.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1 Jabuka (*Malus domestica*)

Jabuka pripada rodu *Malus*, odnosno porodici *Rosaceae*. **Tablica 1.** prikazuje podjelu jabuke na pet *glavnih* sekcija (*Eumalus*, *Sorbomalus*, *Chloromeles*, *Eriolobus* i *Docynopsis*) i njihove vrste. Stablo jabuke čine korijen, deblo i krošnja. Korijen ima funkciju učvršćivanja voćke u tlu, a krošnja je važna za skladištenje hranjivih tvari (Lončarić, 2014). Nakon agruma i banana, jabuka se svrstava u treće najčešće kultiviranu voćarsku kulturu na svijetu. Godišnje se proizvodi oko 25 milijuna tona jabuka, što je otprilike 4 kg po stanovniku. U Hrvatskoj je proizvodnja jabuka oko 10 kg po stanovniku. Umjerena kontinentalna klima najbolje odgovara za uzgoj ove voćke. Takvu klimu obilježavaju sunčani dani i pro hladne noći. Najpogodnija dnevna temperatura za uzgoj jabuke je 20 do 25 °C, a noćna 8 do 10 °C (Križanić, 2005).

**Tablica 1.** Sekcije roda *Malus* i njihove vrste (Šoškić, 2011)

<i>Latinski naziv</i>	<i>Hrvatski naziv</i>	<i>Porijeklo</i>
<b>1. Sekcija <i>Eumalus</i> Zabel</b>		
<i>Malus sylvestris</i> (L.) Miller	Divlja jabuka	Europa, zapadna Azija
<i>M. pumila</i> Miller	Patuljasta jabuka	Zapadna Azija, istočna Europa
<i>M. prunifolia</i> (Wild.) Borkh.	Šljivolisna jabuka	Sjeveroistočna Azija
<i>M. spectabilis</i> (Ait.) Borkh.	Kineska orijentalna jabuka	Azija (Japan, Kina)
<i>M. baccata</i> (L.) Borkh	Sibirska jabuka	Sibir, Mongolija, Japan, Kina
<i>M. hupehensis</i> (Pamp.) Rehder	Jabuka hupehensis	Kina, Himalajsko područje
<i>M. halliana</i> Koehne	Holova jabuka	Japan, Kina
<b>2. Sekcija <i>Sorbomalus</i> Zabel</b>		
<i>M. floribunda</i> Van Houtte	Floribunda	Japan, Kina
<i>M. sieboldii</i> (Regel) Rehder (= <i>M. Toringo</i> Siebold)	Japanska ukrasna jabuka	Japan, Korea, Kina
<b>3. Sekcija <i>Chloromeles</i> (Decne) Rehder</b>		
<i>M. Coronaria</i> (L.) Miller	Američka divlja jabuka	Sjeverna Amerika
<i>M. loensis</i> (Wood) Britton	Prerijska divlja jabuka	Sjeverna Amerika
<b>4. Sekcija <i>Eriolobus</i> (Ser) Scheider</b>		
<b>5. Sekcija <i>Docyniopsis</i> Schneider</b>		

Utjecaj voća i povrća na ljudsko zdravlje već je dugo poznat. Dokazi koji upućuju na moć jabuke u smanjenju rizika od kroničnih bolesti utemeljeni su na mehanizmima koji uključuju antioksidativne, antiproliferative i protuupalne učinke (Hyson, 2011). Oksidativni stres uzrokovan slobodnim radikalima može prouzročiti oštećenja lipida, proteina i nukleinskih

kiselina u organizmu, te dovesti do različitih bolesti (Kalinowska i sur., 2014). Dokazane bolesti na koje jabuka ima pozitivan učinak su kardiovaskularne bolesti, rak, astma i Alzheimerova bolest, a novija istraživanja čak upućuju na redukciju tjelesne mase i dijabetesa, poboljšanje zdravlja kostiju, zaštitu gastrointestinalnog sustava itd. (Hyson, 2011).




Antioksidansi, koji uključuju polifenole, važna su komponenta koja pridonosi zaštiti organizma od oksidativnog stresa i bolesti. Polifenoli imaju slabu apsorpciju u organizmu, ali intenzivno se metaboliziraju. Njihovi metaboliti također mogu imati pozitivne učinke na organizam ljudi. Biodostupnost je količina progutanog spoja koja je dostupna za apsorpciju u crijevima, te ima važan utjecaj na pozitivne učinke polifenola. Stupanjem polifenola u interakciju s nekim drugim komponentama (npr. lipidima, ugljikohidratima i dr.) utječe na njihovu biodostupnost, pa tako primjerice interakcija polifenola s dijetalnim vlaknima može modulirati njihovu biodostupnost u gastrointestinalnom traktu (Jakobek i sur., 2013). Najčešće skupine polifenola u jabuci su fenolne kiseline, od kojih je najzastupljenija klorogenska kiselina, te flavonoidi epikatehin, floretin i kvercetin (Putnik i sur., 2017). Kakvoća jabuke definirana je biokemijskim, fizikalnim i organoleptičkim svojstvima. Bogata je dijetalnim vlaknima, vitaminima, fenolnim spojevima i šećerima, što ju čini jako korisnom za zdravlje. Antioksidacijska aktivnost jabuke iznimno je visoka, zahvaljujući fenolnim spojevima, flavonoidima i fenolnim kiselinama (Radunić i sur., 2011).

### 2.1.1 Komercijalne sorte jabuka

Pogodna klima u Hrvatskoj povoljno utječe na uzgoj jabuka. Tradicionalne sorte su se u prošlosti ekstenzivno uzgajale, do 60-ih godina dvadesetog stoljeća, kad je započeo intenzivan uzgoj voća u Hrvatskoj i upoznavanje s novim, komercijalnim sortama. To je prouzročilo smanjenju interesa za klasičnim sortama jabuka, a komercijalne 'perspektivne' sorte dobile su na popularnosti (Čmelik, 2010). 'Golden Delicious', 'Red Delicious' i 'Granny Smith' sorte su koje dominiraju u kultivaciji jabuka, a povećava se i uzgoj novih komercijalnih sorti poput 'Fuji' i 'Royal Gala'. Ipak, neki autori tvrde da komercijalne sorte jabuka imaju manju količinu polifenola, što može u budućnosti imati negativan utjecaj u ljudskoj prehrani (Jakobek i sur., 2013).

Za razliku od tradicionalnih, komercijalne sorte posjeduju manje udjele polifenolnih spojeva, kao i manju antioksidacijsku aktivnost. Time su ove sorte manje otporne na okolišne faktore, klimatske uvjete i razne biljne bolesti (Lončarić i sur., 2019).

**Tablica 2.** Karakteristike komercijalnih sorti jabuka: 'Jonagold', 'Golden Delicious' i 'Idared' (Arko i Mlinarić, 2007)

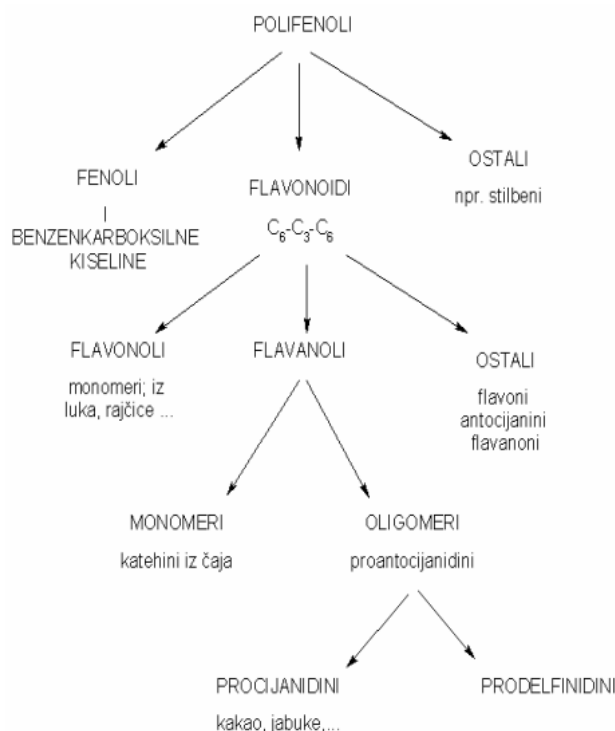
	'Jonagold'	'Golden Delicious'	'Idared'
<b>Okus</b>	Medenosladak kiselasti okus	Blagi medenoslatki okus	Slatko-kiselkasti okus
<b>Sorta</b>	Zimska sorta – dozrijevanje sredinom/krajem rujna	Zimska sorta – dozrijevanje sredinom/krajem rujna	Zimska sorta – dozrijevanje u prvih desetak dana listopada
<b>Plodovi</b>	Veliki do vrlo veliki (180-250 g), okruglastokonusnog oblika	Srednjeveliki do veliki (150-220 g), konusnog oblika	Krupni do vrlo krupni (180 - 250 g), okruglog i malo spljoštenog oblika
<b>Boja</b>	Zelenkastožuta boja, dozrijevanjem postaje žuta, s pokrovnom crvenom bojom	Zelenožuta boja u vrijeme berbe	Žućkasto zelena boja, umjereno ili potpuno prekrivena crvenilom
<b>Izgled</b>			

U **Tablici 2.** vidljive su neke od karakteristika komercijalnih sorti jabuka koje su popularne u Hrvatskoj, a uz to su i sorte čija se otpornost na infekciju s plijesni *Penicillium expansum* te posljedično kontaminaciju njenim sekundarnim metabolitom - mikotoksinom, patulinom istraživala u ovom diplomskom radu. 'Golden Delicious' je na prvom mjestu po proizvodnji, a sadi se najviše u Južnom Tirolu. Nakon njega slijedi 'Gala', pa 'Jonagold'. Sorte razlikujemo po vremenu dozrijevanja, na zimske, ljetne i jesenske (Ivković, 2011). Zimskim sortama još pripadaju 'Granny Smith', 'Fuji' i 'Braeburn', jesenske sorte uključuju 'Gala' i 'Elstar', dok su ljetne sorte 'Summered' i 'Jerseymac' (Arko i Mlinarić, 2007). U proizvodnji su najzastupljenije zimske sorte, jer njihovo vrijeme čuvanja u hladnjačama može biti i do godinu dana, bez da izgube na kvaliteti (Ivković, 2011).

### 2.1.2 Polifenolni spojevi i njihova antioksidacijska aktivnost

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji se sastoje od hidroksilnih skupina povezanih u aromatični prsten. U biljkama se sintetiziraju u relativno niskim koncentracijama u biljnom tkivu gdje se i akumuliraju. Postoje razlike u količini polifenola, kako između voća i povrća, tako i između različitih vrsti i sorti voća. Nadalje, distribucija flavonoida u različitim dijelovima voća također nije jednaka (Van der Sluis, 2005). Istraživanja o polifenolima sve se više provode zbog mnogih potencijalno pozitivnih učinaka na ljudski organizam kao što su antioksidativno djelovanje, smanjenje rizika nastanka dijabetesa i karcinoma itd. (Pandey i Rizvi, 2009). Tradicionalne sorte jabuka bogatije su polifenolima od komercijalnih sorti, stoga ih je nužno očuvati radi bioraznolikosti (Lončarić i sur., 2020).

Trenutno je identificirano više od 8000 polifenolnih spojeva u biljnim vrstama, a svi proizlaze iz zajedničkog međuproizvoda, aminokiseline fenilalanina. Najčešće se javljaju kao konjugirani oblici, s jednim ili više spojeva šećera povezanih hidroksilnim skupinama. Iako je to najčešći oblik spajanja, postoji i izravno spajanje šećera na aromatski ugljik (Pandey i Rizvi, 2009). Polifenoli pripadaju heterogenoj skupini spojeva, a obilježava ih prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova. Imaju različita djelovanja u biljkama, od hormonske regulacije, zaštite od infekcija mikroorganizmima, povećavanju oksidativne aktivnosti. Dokazano je da spojevi iz skupine flavonoida imaju veću antioksidativnu aktivnost od vitamina C i E. Antioksidativna aktivnost polifenola manifestira se u dobroj sposobnosti uklanjanja reaktivnih dušikovih i kisikovih spojeva te smanjenju oksidativnog stresa inhibicijom enzima koji na njega utječu (Berend i Grabarić, 2008). Osnovna podjela polifenola prikazana je na **Slici 1.** te kao što se može primijetiti, izraz flavonoid uključuje i spojeve poput flavanona, antocijana, flavona itd., koji su jako važni s nutritivnog stajališta (Escarpa i Gonzalez, 2001).



**Slika 1.** Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008)

Istraživanja su pokazala da bobičasto voće iz porodice *Rosaceae*, u koje također pripada jabuka, sadrži veće količine polifenolnih spojeva od drugih vrsta voća, povrća i žitarica. Ti rezultati ukazuju na činjenicu da je jabuka zajedno s drugim voćnim vrstama navedenog roda, važan izvor prirodnih antioksidansa (Halvorsen i sur., 2002).

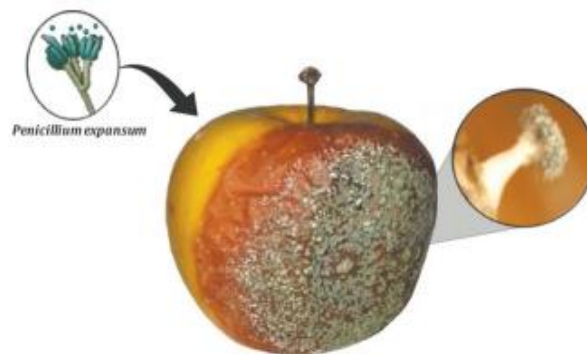
## 2.2. Plijesan *Penicillium expansum*

Zbog svoje široke rasprostranjenosti i sposobnosti proizvodnje velike količine različitih toksina, uključujući citrinin, ohratoksin A, patulin, penitrem A i rubratoksin B, od kojih je najznačajniji patulin, plijesan *P. expansum* je velika prijetnja globalnim industrijama hrane. Vrlo je rasprostranjena u prirodnom okruženju, a najviše u tlu. Jabučasto i koštičavo voće smatraju se pogodnima za razvoj ove plijesni, kao i mahunarke i zrna žitarica (Tannous i sur., 2017). Negativni učinci plijesni mogu prouzročiti niz bolesti kod ljudi i životinja, a oboljenja prouzrokovana plijesnim dijele se na mikozu i mikotoksikozu. Mikoza je posljedica parazitiranja plijesni u domaćinu, a mikotoksikoza nastaje prilikom trovanja sekundarnim metabolitima plijesni – mikotoksinima (Drčelić, 2011). *Penicillium expansum* je prepoznatljiva



po tupim zelenim konidijama elipsastog oblika i glatkog ruba. Ova plijesan raste razmnožava se na niskim temperaturama te je svrstana u skupinu psihrofila. Temperature od  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  ne utječu na njen rast, dok dobro raste pri  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Optimalna temperatura za rast ove plijesni je  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Pitt i Hocking, 2009). Spore plijesni su konstantno prisutne u zraku, bilo u prašini ili na predmetima te će se u povoljnim uvjetima iz njih vrlo brzo moći razviti micelij. Takvi uvjeti uključuju relativnu vlažnost zraka višu od 65 %, nedostatak svjetla, te nepravilno strujanje topline i zraka. Aktivna plijesan je vlažna i sluzava, a neaktivna plijesan je praškasta i suha (Longin, 2015). Fizičke i kemijske promjene hrane mogu biti rezultat porasta plijesni, što se negativno odražava na senzorske i nutritivne karakteristike same namirnice. Uz rod *Penicillium*, najčešće vrste plijesni koje se mogu pronaći u hrani pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Eurotium* i *Emericella*. Sve navedene tijekom rasta imaju sposobnost proizvodnje velikog broja enzima (proteaza, lipaza i karbohidrogenaza). Aktivnost enzima u hrani nakon kontaminacije s plijesni može se nastaviti neovisno od uništenja samog micelija (Silva i sur., 2007). Plijesan *P. expansum* smatra se sveprisutnim, oportunističkim saprofitom koji je glavni uzročnik propadanja jabuka u voćnjacima te nakon berbe (Hamza i sur., 2015).

Drugi naziv za plavu plijesan je zelena ili penicilijska plijesan, koja najčešće izaziva trulež jabuka, što je jasno vidljivo na **Slici 2**. Zaraza započinje invazijom spora na oštećenjima svježih jabuka, stoga je preporučeno od strane FAO-a da se oštećene jabuke uklone prije prerade, kako bi se negativne posljedice svele na minimum. Ukoliko su namirnice zaražene ovom plijesni u kontaktu s nezaraženim namirnicama, one će vrlo lako poprimiti neugodan miris i okus te time prouzročiti velike ekonomske gubitke (Zhong i sur., 2018). Prvi simptomi kvarenja izazivaju vodenaste, mekane lezije na hrani. One su u početku svijetlo smeđe boje, a s vremenom postaju plave (Errampalli, 2014).

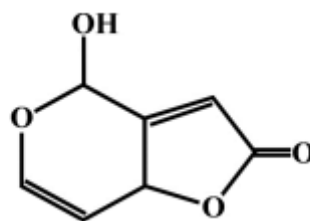


**Slika 2.** Plijesan *Penicillium expansum* porasla na jabuci sorte 'Golden Delicious' (Tannous i sur., 2017)

### 2.2.1. Patulin

Patulin je sekundarni metabolit plijesni *Penicillium*, *Aspergillus* i *Byssochlamys*, a smatra se da je plijesan *P. expansum* glavni proizvođač ovog mikotoksina. Akumulacija patulina nastaje kao posljedica infekcije ploda, koja se očituje truljenjem plodova te u konačnici zeleno-plavim konidioforama i konidijama tijekom čijeg rasta dolazi i do biosinteze patulina. Patulin se nalazi na voću, a uz jabuke pronalazi se i na smokvama, žitaricama, sirevima, povrću te morskim plodovima (Wright, 2015). Mikotoksikoze su bolesti koje nastaju djelovanjem mikotoksina, a mogu biti akutne te kronične. Iako je patulin prvobitno opisan kao antibiotik širokog djelovanja zbog svojih antimikrobnih svojstava, kasnije se ustanovila njegova toksičnost pri istraživanjima na eksperimentalnim životinjama i svrstan je u treću grupu karcinogena od strane IARC-a (Kocić-Tanackov i Dimić, 2013).

Učinci akutne toksičnosti kod ljudi uključuju povraćanje, mučninu i druge gastrointestinalne simptome, kao i teže posljedice poput oštećenja bubrega. Nadalje, kad više vrsta plijesni koegzistira u istom okruženju, učinak njihovih toksina postaje izraženiji jer djelujući sinergistički izazivaju jače negativne posljedice. Stoga, niske razine jedne vrste toksina mogu itekako doprinijeti toksičnom učinku ukoliko se ne nalaze individualno na određenoj namirnici. Sinergistički učinak patulina uočen je u kombinaciji sa aflatoksinima, zearalenonom, trihotetecenima, ohratoksinom i fumonizinom (Silva i sur., 2007).



**Slika 3.** Strukturna formula mikotoksina patulina (Kocić-Tanackov i Dimić, 2013)

Patulin je dobro topljiv u alkoholu, kloroformu i etilacetatu, a netopljiv u vodi. Nestabilan je u polarnim otapalima, vodi i metanolu, a u lužnatim otopinama gubi toksična svojstva (Almenar i sur., 2013).

Otporan je i na niske i na visoke temperature te dobro opstaje u hipotoničnim i kiselim uvjetima, što otežava otkrivanje njegovih ostataka u namirnicama. Do ubrzanog razvoja

patulina dolazi i prilikom prisutnosti atoksigenih patogena, a smanjenje kontaminacije patulinom može se postići dezinfekcijom prostora u kojem se jabuke čuvaju i povećanjem otpornosti namirnice na zarazu s plijesni *P. expansum* (Zhung i sur., 2018).

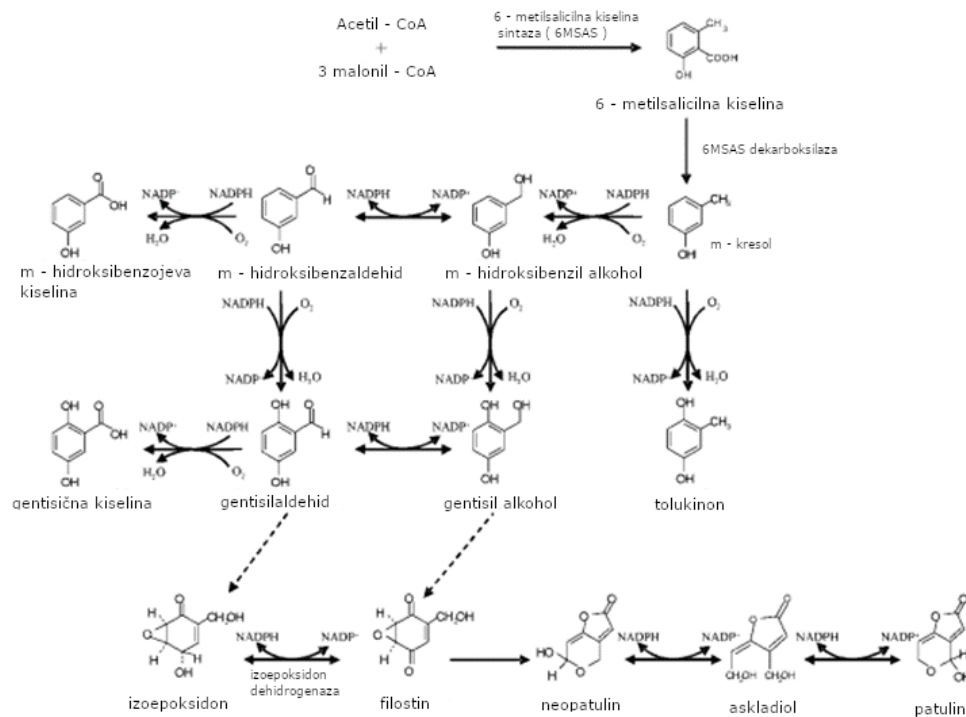
### 2.2.2 Biosinteza patulina

Unatoč činjenici da je patulin jedan od najvažnijih mikotoksina, genetske osnove njegove proizvodnje nisu do kraja istražene. Veliki dio puta biosinteze objašnjen je studijama provedenim na *Penicillium griseofulvum* koja je izolirana s riže i drugih žitarica. Patulin potiče iz poliketida, zajedno s aflatoksinima, fumonizinima i okratoksinima (Tannous i sur., 2014). Čimbenici koji utječu na intenzitet biosinteze patulina su aktivitet vode, pH, temperatura i stanje atmosfere, odnosno udio CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> u atmosferi. Povišena koncentracija CO<sub>2</sub> za vrijeme skladištenja negativno utječe na biosintezu patulina, ali će jako visoke koncentracije prouzročiti određene promjene u jabuci. Te promjene uključuju gubitak organoleptičkih svojstava i smanjenje kvalitete namirnice. Optimalan rast plijesni i biosinteza patulina odvijaju se pri temperaturi od 25 °C (Pitt i Hocking, 2009).

Put biosinteze patulina, prikazan na **Slici 4.**, sastoji se od oko 10 koraka, što su dokazala istraživanja nakon identifikacije različitih mutanata koji blokiraju neke od koraka u biosintezi ovog mikotoksina (Tannous i sur., 2014). Enzimi koji su uključeni u proizvodnju sekundarnih metabolita obično se nalaze u klasterima kromosoma. Postojanje genetskih klastera koji su usko povezani sa sintezom mikotoksina, dokazano je za aflatoksine, fumonizine, trihotecene i alkaloida. Unatoč tome, povezanost genetskih klastera s biosintezom patulina nije objašnjena (Artigot i sur., 2009).

Prvi korak uključuje stvaranje 6-metilsalicilne kiseline (6MSA) kondenzacijom acetil-CoA zajedno s tri jedinice malonil-CoA. Enzim koji je zaslužan za provođenje ovih sinteza je multifunkcionalan, a uključuje acetil i malonil transferazu, ketoacil sintazu, ketoreduktazu i dehidratazu. 6-metilsalicilna kiselina se potom prevodi u m-krezol djelovanjem enzima 6MSA dekarboksilaze, nakon čega se metilna skupina m-krezola oksidira i dolazi do nastanka aldehidne skupine. Getinsaldehid je potom potrebno prevesti u strukturu s dva prstena, posredstvom enzima monooksigenaze ili dioksigenaze. Konačno, identifikacija prekursora izoepoksidona, filostina, neopatulina i askladiola, dovelo je do zaključka da se korak

epoksidacije događa nakon sinteze getinsaldehida. Postoji nekoliko enzimskih aktivnosti koje su povezane s biosintezom patulina, uključujući hidroksilaciju prstena m-hidroksibenzil alkohola u gentisil alkohol, uz djelovanje NADPH i kisika (Puel i sur., 2010). Bolje razumijevanje biosinteze patulina, odnosno mehanizama koji dovode do njegove proizvodnje pomažu definirati strategije koje će uspješno pomoći u smanjenju njegove prisutnosti u proizvodima od jabuka, ali i drugih namirnica (Tannous i sur., 2014).



Slika 4. Put biosinteze patulina (prilagođeno iz Artigot i sur., 2009)

### 2.2.3 Čimbenici koji utječu na rast *P. expansum* i proizvodnju patulina u jabukama

Zbog kompliciranih čimbenika i faktora koji ometaju kontrolu razine patulina u proizvodima od jabuka, visoka razina kontaminacije i danas predstavlja problem. Glavni čimbenici koji utječu na proizvodnju patulina u jabukama i proizvodima od jabuka su osjetljive sorte jabuka, sveukupno opterećenje patogenima i povoljno okruženje za njihov rast i razvoj.

Patulin se u prirodi najčešće nalazi na jabukama i u proizvodima od jabuka, jer su fizikalno-kemijska svojstva ovih proizvoda pogodna za rast plijesni *Penicillium expansum*. Minimalna

razina aktiviteta vode ( $a_w$ ) za klijanje spora ove plijesni i biosinteze patulina je 0,98-0,99. Nadalje, 3,1-4,2 je pH jabuke koji odgovara kolonizaciji plijesni jer mogu rasti pri različitim pH vrijednostima (od 2,5 do 6). Sposobnost zacjeljivanja rana i osjetljivost na proizvodnju plave plijesni te biosintezu patulina, određuje genetska pozadina i uvjeti rasta pojedine namirnice.

*Penicillium expansum* je psihrofil te stoga dobro raste i na temperaturi od  $-3^{\circ}\text{C}$ , čime je kontaminacija ovom plijesni moguća i prilikom skladištenja. Brzina rasta plave plijesni i kapacitet za stvaranje toksina su u pozitivnoj korelaciji (Zhung i sur., 2018). Međutim, jabuke sadrže široki spektar spojeva koji utječu na otpornost plodova na kontaminaciju s *P. expansum* i posljedično nakupljanje patulina. Najvažniji spojevi koji su povezani s akumulacijom patulina su etilen, polifenoli i šećeri. Etilen ima ulogu u reguliranju zrenja i omekšavanju voća, ali isto tako povezan je s otpornošću jabuke na infekciju patogenima. Nadalje, niža razina produkcije etilena smatra se velikim razlogom povećane otpornosti jabuka kasnijih sorti. Određeni polifenoli u jabuci povezani su s otpornošću plodova na kontaminaciju, zbog svojstva uklanjanja slobodnih radikala. Flavonoli i procijanidini B2 iz kore i mesnog dijela ploda uvelike povećavaju otpornost na razvoj plijesni (Pleadin i sur., 2017).

### 2.2.4 Mjere za smanjivanje kontaminacije soka jabuke patulinom

Kontaminacija hrane mikotoksinima ozbiljna je prijetnja ljudskom zdravlju, naročito kod namirnica koje su temelj ljudske prehrane (poput jabuke). Zbog mogućih posljedica na zdravlje ljudi i gospodarskih problema širokog razmjera, razvija se sve veći broj metoda koje će pridonijeti sigurnom uklanjanju mikotoksina i time omogućiti proizvodnju zdravstveno ispravne hrane.

Kontaminacija jabuka i proizvoda od jabuka patulinom globalni je problem, koji još uvijek nema zadovoljavajuće rješenje. Prvi korak do pronalaska sigurnog rješenja je poznavanje faktora i uvjeta koji omogućavaju produkciju patulina. Od 1960-ih godina, kad je patulin klasificiran kao mikotoksin zbog izazivanja akutne toksičnosti kod ljudi, količina patulina u proizvodima od jabuka smatra se mjerilom kvalitete sigurnosti hrane. Maksimalni dnevni unos patulina od strane FAO/WHO iznosi  $0,4 \mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne mase na dan. Nadalje, maksimalno dopuštena razina patulina propisana od strane svjetskih institucija za sigurnost hrane u soku

od jabuke iznos 50 µg/L. Čvrsti proizvodi od jabuka s maksimalno 25 µg/kg i proizvodi za dojenčad te malu djecu s 10 µg/kg, imaju malo strože uvjete.

Najznačajniji postupak za smanjenje razine patulina u proizvodima od jabuka je pravilno sortiranje jabuka prije prerade, odnosno odstranjivanje trulih plodova. Istraživanja su pokazala da je patulin stabilan u kiselkastim sokovima. Pasterizacija nije učinkovita metoda za smanjenje koncentracije patulina u sokovima od jabuka, jer termička obrada utječe samo na umjereno smanjenje razine patulina. Alkoholnom fermentacijom patulin se transformira u manje toksičan askladiol, koji potom dolazi u reakciju s sulfhidrilnim (tiolnim) skupinama bjelancevina, aminokiselina i polipeptida. Kao rezultat navedenih reakcija dolazi do stvaranja unakrsnih veza između i unutar molekula (Pleadin i sur., 2017).

Tijekom berbe, skladištenja i pakiranja važno je da ne dođe do oštećenja plodova. Nakon berbe potrebno je što prije skladištiti plodove na niskoj temperaturi u prethodno dezinficiranom skladištu. Za dezinfekciju skladišta najčešće se koriste klor i natrij-o-fenilfenat. Primjena fungicida u voćnjacima uspješno može smanjiti pojavu plijesni na plodovima, a poznati su fungicidi na bazi boskalida, strobilurina i tiofanat metila (Priručnik za integralnu proizvodnju i zaštitu jabuke, 2003).

Neka istraživanja pokazuju da se za značajno smanjenje patulina u sokovima od jabuka može koristiti centrifugiranje, bentonit filtracija, filtracija filter papirom i enzimski tretman. Istraženo je i da do potpune eliminacije patulina dolazi prilikom postupka fermentacije. Nadalje, dodatkom SO<sub>2</sub>, askorbinske kiseline, tiamina, piridoksina, folne i pantotenske kiseline može se smanjiti koncentracija ovog mikotoksina (Kocić-Tanackov i Dimić, 2013).

### **2.3 Faze prerade soka od jabuke i njihov učinak na koncentraciju patulina u finalnom proizvodu**

Kontaminacija soka jabuke patulinom predstavlja veliki izazov proizvođačima, najviše zbog činjenice da je otporan na većinu procesa prerade. Prije provođenja postupaka za smanjenje razine patulina u soku od jabuke, važno je da su zadovoljeni uvjeti Codex Alimentarius, koji uključuju dobru poljoprivrednu i proizvođačku praksu. Osim navedenog, FAO preporučuje i provođenje analize opasnosti, te HACCP sustav kontrole.

Jabuke je potrebno skladištiti najkasnije 18 sati nakon berbe, prije čega se najčešće zaštićuju antioksidansima i fungicidima kako bi se maksimalno izbjegle fiziološke promjene i nastanak gljivičnih infekcija ploda. Nakon skladištenja, jabuke se prenose u proizvodnu jedinicu, gdje je prvi korak pranje. Plodovi se peru na remenima, raspršivanjem vode pod pritiskom. Ukoliko se na plodovima nalaze prilijepljene prljavštine ili truli dijelovi, oni se mogu odstraniti četkama. Nakon pranja slijedi mljevenje jabuka, čime se postiže smanjenje veličine sirovine. To je važno kako bi se prilikom prešanja postigla maksimalna učinkovitost te u konačnici dobio bistar i pročišćen sok. Prešanje se provodi pomoću okomite, horizontalne ili trakaste preše. U fazi prešanja često se dodaje i askorbinska kiselina, kako proizvod ne bi poprimio smeđu boju. Sljedeći korak je bistrenje postupkom enzimske depektinizacije, prilikom čega dolazi do izdvajanja proteina, fenolnih spojeva i pektinskih komponenti. Prilikom postupka bistrenja mogu se dodati materijali poput aktivnog ugljena, bentonita, pektinske kiseline i slično, kako bi konačni proizvod bio još bistriji. Zadnji korak bistrenja je filtracija, primjerice ultra filtracija koja se najčešće koristi u posljednje vrijeme. Nakon klarifikacije, sok se može pasterizirati i posljedično koncentrirati ili pasterizirati i odmah puniti u boce. Ukoliko se odluči na korak koncentriranja, pasterizacija se mora provesti dva puta. Koncentracija se provodi isparavanjem ili cry-koncentriranjem na 70-71 % Brix. Višestupanjski isparivači korisni su za očuvanje arome u proizvodu. Ovakav sok, s niskim aktivitetom vode i visokom kiselošću, stabilan je na sobnoj temperaturi. Unatoč dobroj stabilnosti soka, prije komercijalizacije sok je potrebno ohladiti ili zamrznuti.

Kako bi se prilikom navedenih procesa proizvodnje maksimalno smanjila razina patulina u konačnom proizvodu, potrebno je provesti određene fizičke, kemijske, mehaničke i biološke mjere.

### *Mjere prije berbe:*

Kako bi kvaliteta proizvoda prije prerade bila zadovoljavajuća, potrebno je provesti mjere prije žetve koje mogu uključivati: uklanjanje trulog voća, primjena fungicida kako bi se reducirao rast plijesni nakon berbe, korištenje gnojiva na bazi fosfora i kalcija čime se smanjuje osjetljivost plodova na trulež, omogućiti adekvatan razmak između stabala kako bi do svakog ploda doprinijela maksimalna količina svjetlosti.

### *Mjere za vrijeme berbe:*

Tijekom berbe nužno je obratiti pozornost na mehanička oštećenja plodova, kako bi se ona maksimalno reducirala. Zdrave plodove jabuka potrebno je odvojiti od trulih i ranjivih, kako ne bi došlo do prijenosa zaraze. To je izuzetno važan korak s obzirom na činjenicu da akumulacija patulina započinje na mjestima mehaničkih oštećenja. Vrijeme berbe ne smije biti za vrijeme suša i kiša, jer je u takvim periodima veća osjetljivost voća.

### *Skladištenje:*

Skladištenje jabuka smatra se kritičnom točkom u preradi soka, a vremensko ograničenje od 48 sati prikladno je za kontrolu akumulacije patulina. Važno je obratiti pozornost da jabuke budu minimalno vrijeme na sobnoj temperaturi prije skladištenja, kao jedan od važnijih preduvjeta za obranu plodova od kontaminacije. *Penicillium expansum* je psihrotrof, te može producirati patulin u jabukama skladištenim na temperaturi od 4 °C do 25 °C. Istraživanja su pokazala da skladištenje na temperaturi od 1°C, kao i skladištenje u kontroliranoj atmosferi (1 % CO<sub>2</sub>, 3 % O<sub>2</sub> i 96 % N<sub>2</sub>; 0,5 °C; vlažnost veća od 90 %) pozitivno utječu na kontrolu zaraze plodova mikotoksinom patulin. Modificirana atmosfera s 88 % CO<sub>2</sub> i 12 % N<sub>2</sub> može smanjiti produkciju patulina za 99,97 %. Skladištenje jabuka u polietilenskom pakiranju na temperaturi od 25 °C može smanjiti produkciju patulina za 99,5 % i rast plijesni za 68 % u odnosu na jabuke koje nisu skladištene u polietilenskom pakiranju.

### *Pranje:*

Općenito, pranje plodova reducira razinu mikotoksina za 80 %. Komplementarni agensi koji bi potencijalno mogli doprinijeti boljem ispiranju toksina s plodova još se istražuju. Jedan od mogućih agensa je elektrolizirana oksidirajuća voda kao alternativa dezinficijensima s klorom. Higijena vodoinstalacija i zraka je važna kako nebi došlo do povećanja proliferacije plijesni.

### *Prešanje, bistrenje i filtracija:*

Istraživanja su pokazala da miješanje s granuliranim aktivnim ugljenom i potom filtriranje preko istog, može pridonijeti redukciji patulina od 98,15 % do 100 % u konačnom proizvodu. Najveća redukcija dokazana je korištenjem 3 g/L aktivnog ugljena i miješanja 5 minuta, čime se također povećava bistroća i prozirnost. Filteri od dijatomejske zemlje mogu reducirati količinu patulina za 99,99 %, te se to ujedno smatra jednom od važnijih kontrolnih točaka.



### *Pasterizacija:*

Zagrijavanjem na temperaturu od 90 °C do 100 °C rezultira značajnom redukcijom patulina, koja se povećava dužim vremenom pasterizacije, naročito u prvih 5 minuta.

### *Koncentriranje:*

Koncentriranjem vakuumskom destilacijom postiže se redukcija patulina za 24 %. Najveća redukcija mikotoksina uočena je koncentriranjem na temperaturi od 70 °C i 80 °C u trajanju od 15 minuta. Uzimajući u obzir činjenicu da je patulin manje hlapiv od vode, može zaostati u koncentriranom soku jer neće ispariti s aromom.

### *Skladištenje gotovog proizvoda:*

Gotovi proizvodi najčešće su skladištenu u hladnim prostorima ili zamrznuti, čime se može očuvati njihova kvaliteta. Dokazano je da će sok od 70 °C Brix, skladišten na 5 °C ili manje, ostati nepromijenjen najmanje 6 mjeseci (De Souza Sant'Ana i sur., 2008).

### **3.EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Zadatak

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

### 3.2 Materijali i metode

Analizirane komercijalne sorte jabuka su 'Golden Delicious', 'Jonagold' i 'Idared'. Uzorci jabuka prikupljeni su od strane OPG Pavičić, koji se nalazi u Petrijevcima.

#### 3.2.1 'Golden Delicious'

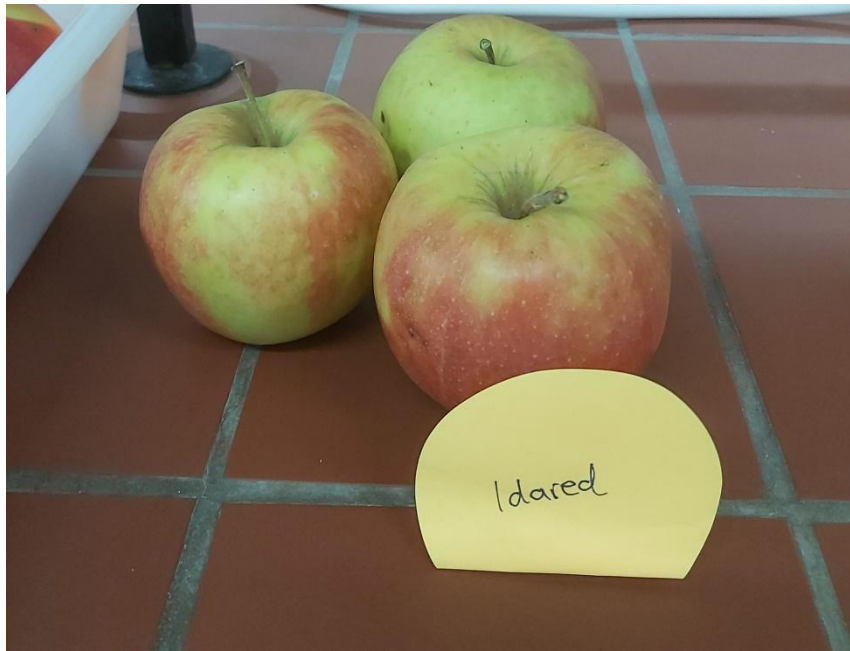
Najraširenija sorta jabuka u svijetu koja pripada rodu *Malus* iz porodice ruža (*Rosaceae*). Prema vremenu sazrijevanja možemo ih podijeliti na: rane (ljetne), srednje rane (jesenske) i kasne (zimске) jabuke. Prema obliku razlikujemo plosnate, okrugle, šiljate, rebraste, bez rebara, te s dubokom ili plitkom čašicom. Još se mogu podijeliti prema boji pa žute, crvene, šarene i obojene kao mramor, te prema svojstvu pokožice na sjajne, glatke, masne i hrapave. Pektin, karotenoidi i kiseline (jabučna, elagična, klorogenična i kofeinska) smatraju se važnijim sastojcima ploda jabuke zbog svojih pozitivnih djelovanja. 'Golden Delicious' je visoko produktivna sorta kojoj je početak berbe krajem prvog dijela rujna. Meso ove sorte ima kiselkasto-slatkasti okus i finu aromu, te je jako sočno (Zavadlav i Majhen, 2019).



Slika 5. Jabuka 'Golden Delicious' (Izvor: autor)

#### 3.2.2 'Idared'

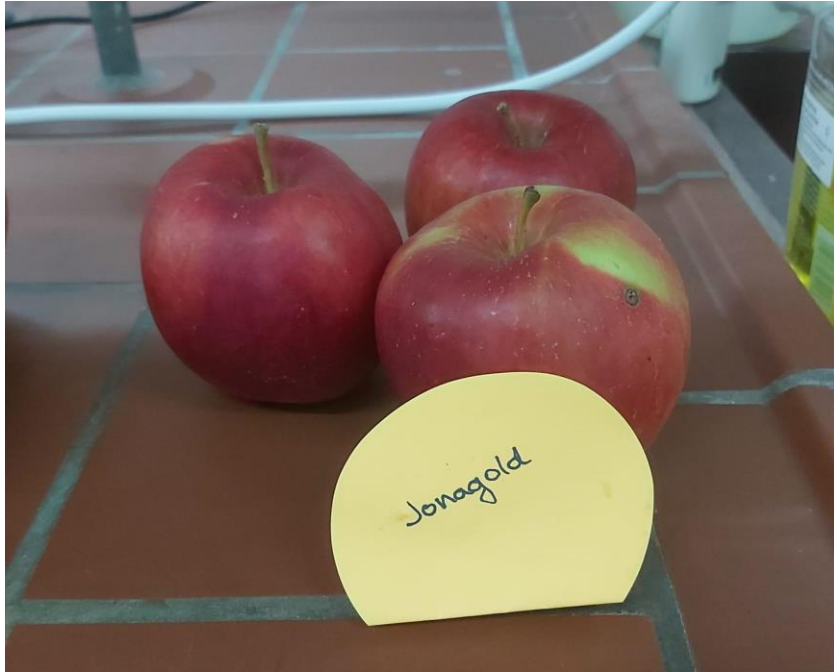
'Idared' je najzastupljenija i najprodavanija sorta u domaćoj proizvodnji. Ova američka sorta nastala je križanjem sorte 'Jonathan' i sorte 'Wagener'. Karakterizira ju crvena boja, a meso je bjelkasto te se nepravilno lomi prilikom ugriza. Okusom je puno kiselija od sorte 'Golden Delicious' zbog visokog udjela kiselina. Plodovi ove sorte su sferni i ujednačeni. Boja zrelog ploda je crvena uz rijetke mrlje, a koža čvrsta, glatka i tanka. 'Idared' se smatra kasnom sortom, kojoj početak berbe započinje krajem rujna. Čvrstoća sorte zimi je slaba, kao i otpornost na sušu. Stablo ove jabuke odlikuje stabilna plodnost i visoki prinos. Težina ploda doseže do 190 g, dok je prosječna težina oko 140 g. Pulpu zrelih jabuka karakterizira kremasta tekstura, a svježje ubrani plodovi su čvrsti i sočni (<https://hr.wow-plants.com/6839804-apple-tree-idared>).



Slika 6. Jabuka 'Idared' (Izvor: autor)

### 3.2.3 'Jonagold'

'Jonagold' je jedna od najnovijih sorti jabuka. Američka sorta nastala križanjem sorti 'Golden Delicious' i 'Jonathan'. Odlikuje se slatko-kiselim okusom, gdje kiselkasti okus potječe od Jonathana, a slatkasti okus od 'Golden Deliciousa'. Zbog svog slatko-kiselog okusa smatra se desertnom jabukom. Meso joj je hrskavo i sočno, zeleno-bijele boje, te vrlo aromatično. Boja dozrijevanjem postaje žuta. Berba ove sorte započinje sredinom/krajem rujna, a plodovi su poprilično veliki (dosežu i do 250 g). Uzgoj sorte 'Jonagold' nije zahtjevan te cvjetovi nisu podložni mrazu. Vrlo je otporna na kraste i plijesan. (Arko i Mlinarić, 2007; <https://hr.garden-idea.net/13080338-the-jonagold-apple-tree-description-cultivation-care-requirements-advice>).



Slika 7. Jabuka 'Jonagold' (Izvor: autor)

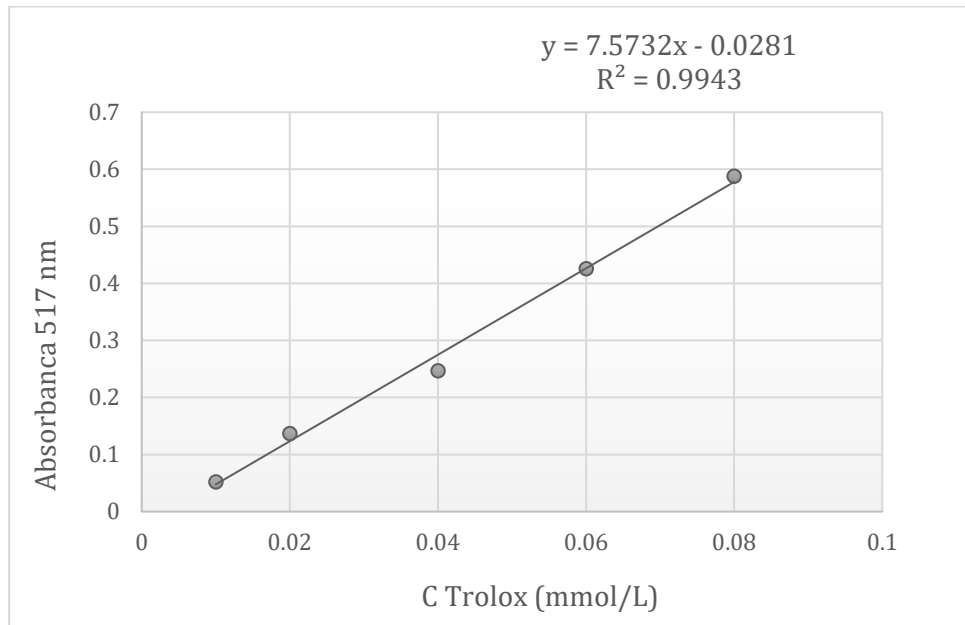
#### 3.2.4 Priprema ekstrakta komercijalnih sorti jabuka

Izvagano je 2 g prethodno usitnjenog i liofiliziranog uzorka jabuke, te je dodano 10 mL otapala za ekstrakciju (80 % MeOH). Uzorci su ekstrahirani pomoću ultrazvučne kupelje u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon primjene ultrazvuka, kako bi odvojili supernatant od taloga, uzorci su centrifugirani pri 10 000 o/m te profiltrirani pomoću PTFE filtera (0,45 $\mu$ m). Nakon filtracije ekstrakti su čuvani u hladnjaku na 4 °C do analize.

#### 3.2.5 Određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH testa

Određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode temelji se na redukciji slobodnih DPPH radikala antioksidansom koji služi kao donor elektrona ili vodika. Redukcijom DPPH\* radikala u molekulu DPPH dovodi do promjene boje otopine od ljubičaste do žute. Promjena boje detektira se primjenom spektrofotometra smanjenjem apsorbancije pri valnoj duljini  $\lambda = 517$  nm. Smanjenjem količine DPPH\* radikala uslijed reakcije s antioksidansima, dovodi do smanjenja apsorbancije tijekom vremena reakcije. Otpipetiralo se 0,2 mL ekstrahiranog uzorka te 3 mL otopine DPPH, zatim se promiješalo i ostavilo stajati 15 minuta. Nakon 15 minuta izmjerena je apsorbancija pri 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan

je etanol. DPPH testom određena je antioksidacijska aktivnost soka i kaše komercijalnih sorti jabuka, a dobiveni rezultati su preračunati iz kalibracijske krivulje troloxa (**Slika 8**).



**Slika 8.** Prikaz kalibracijske krivulje troloxa (Izvor: autor)

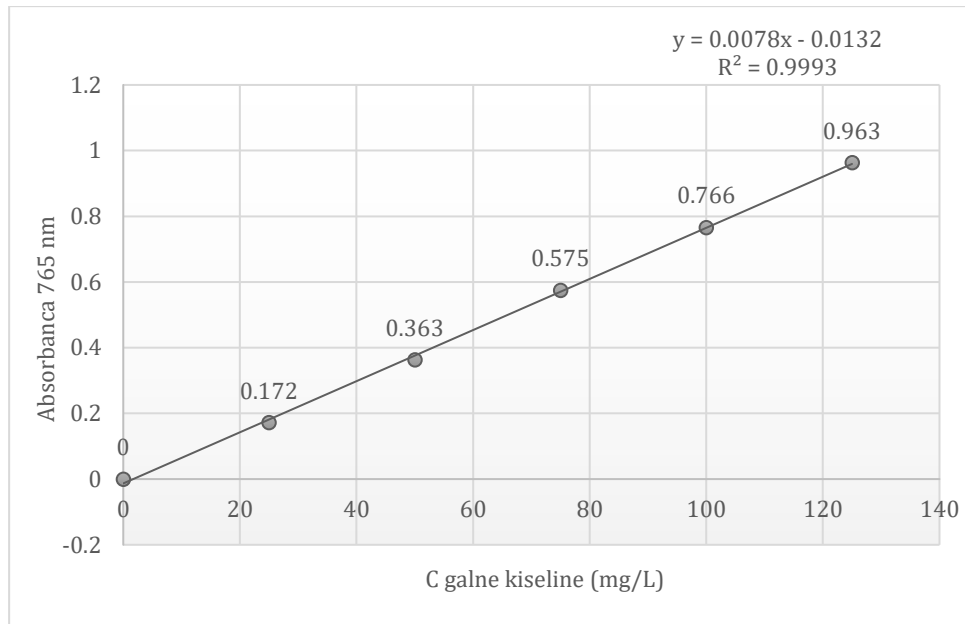
### 3.2.6 Određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom ABTS metode

Određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom ABTS metode prati se raspadanje radikala  $ABTS^{\cdot+}$  koji nastaje oksidacijom 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazilin-6-sulfonat) djelovanjem fenolnih tvari. Otpipetirano je 0,2 mL prethodno ekstrahiranog uzorka te je dodano 3,2 mL otopine ABTS-a, dobro promiješano, te je smjesta ostavljeno stajati 1h i 35 min u mraku. Nakon odvijanja reakcije mjerena je apsorbanca pri 734 nm. ABTS metodom određena je antioksidacijska aktivnost soka i kaše jabuka, te su dobiveni rezultati preračunati iz kalibracijske krivulje troloxa (**Slika 8**).

### 3.2.7 Određivanje ukupnih polifenola

Primjenom Folin- Ciocalteove metode i spektrofotometra određen je udio ukupnih polifenola. U epruvetu otpipetirano je 0,5 mL ekstrakta, 2,5 mL Folin- Ciocalteovog reagensa i 2 mL 7,5 %-tnog natrijevog karbonata, te ostavljeno stajati 2h na tamnom mjestu. Nakon isteka 2h

mjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Na isti način pripravljena je i slijepa proba, gdje je umjesto ekstrakta dodano otapalo za ekstrakciju. Dobiveni rezultati preračunati su iz kalibracijske krivulje galne kiseline i izraženi u mjernoj jedinici mg/L (**Slika 9**).

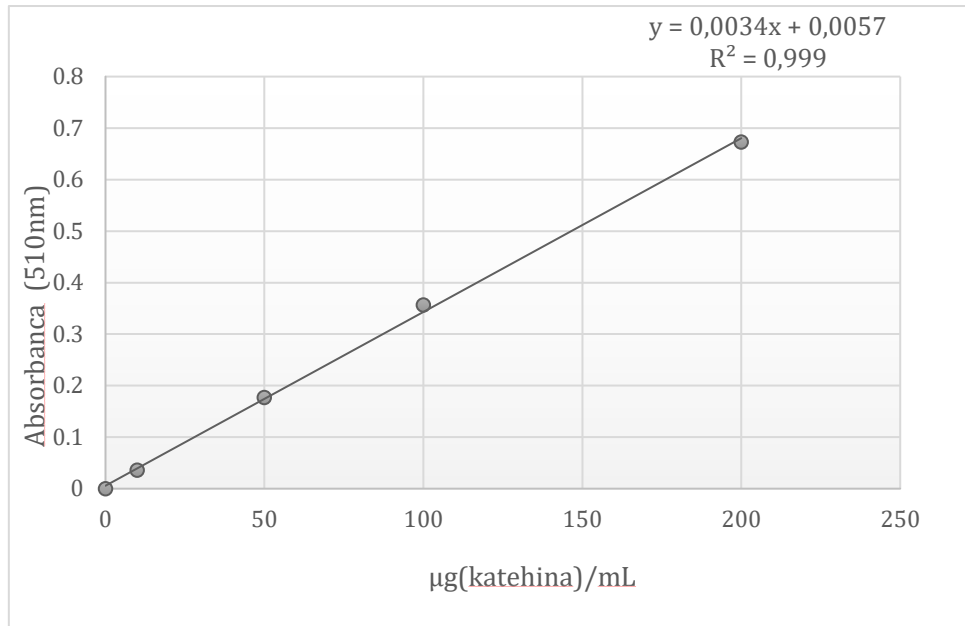


**Slika 9.** Prikaz kalibracijske krivulje galne kiseline (Izvor: autor)

### 3.2.8 Određivanje ukupnih flavonoida

Metodom temeljenoj na reakciji flavona i flavonola s aluminijskim ionima iz reakcijske smjese pri čemu dolazi do formiranja kelata i obojenja reakcijske smjese u žuto obojenje određeni su ukupni flavonoidi. Otpipetirano je 0,5 mL uzorka, dodano je 4 mL deionizirane vode i 0,3 mL 5 %  $\text{NaNO}_2$ . Nakon 5 min u otopinu dodano je 0,3 mL 10 %  $\text{AlCl}_3$ , nakon 5 min još 2 mL 1 mol/L  $\text{NaOH}$  i 2,4 mL deionizirane vode. Za slijepu probu umjesto uzorka korištena je deionizirana voda, te je apsorbancija mjerena na  $\lambda=510$  nm. Dobiveni rezultati preračunati su iz kalibracijske krivulje katehina (**Slika 10**).





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

### 3.2.9 Određivanje pH vrijednosti

Kiselost soka i kaše jabuke odredili smo mjerenjem pH vrijednosti uz pomoć pH-metra.



Slika 11. Određivanje pH vrijednosti (Izvor: autor)

### 3.2.10 Određivanje topljive suhe tvari refraktometrom

Na prizmu refraktometra nanese nekoliko kapi soka ploda i kaše jabuke, te se svjetlost usmjeri prema prizmi. 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 tekućinu (sok jabuke) i zrak. Vrijednost topljive suhe tvari se očitava u % po Brixu. Lom svjetlosti se očitava na skali od 0 % do 30 % po Brixu.



Slika 12. Određivanje topljive suhe tvari (Izvor: autor)

### 3.2.11 Određivanje ukupnih kiselina titrimetrijski

Odvagano je 10 g uzorka u Erlenmayerovu tikvicu s brušenim grlom s točnošću 0,01 g, zatim 100 mL destilirane vode, te zagrijano na vodenoj kupelji do 80 °C. Nakon hlađenja, sadržaj tikvice je prenesen u odmjernu tikvicu od 250 mL koja je nadopunjena do oznake destiliranom vodom, zatim se njen sadržaj filtrira. Otpipetirano je 50 mL filtrata i preneseno u Erlenmayerovu tikvicu. Dodano je 3 kapi fenoftaleina i titrirano s 0,1 M NaOH do promjene boje u trajanju od najmanje 30 s. Udio ukupnih kiselina određen je u soku i kaši komercijalnih sorti jabuka.

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

Primjenom HPLC analitičkog sustava (Agilent, 1290 Infinity, Šestar ID 2475) određeni su pojedinačni polifenolni spojevi. Odjeljivanje komponenti izvršeno je uz pomoću 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 kiseline u metanolu kao otapalo B. Volumen injektiranja uzorka iznosio je 10 µL, 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 o komponenti. Kvantifikacija pojedinačnih polifenolnih spojeva provedena je preko kalibracijske krivulje pojedinačnih standarda.

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

7 g uzorka izvagano je u laboratorijsku čašu, te postupno dodano 70 mL vruće vode (temperatura ne viša od 70 °C) uz miješanje. Sadržaj u čaši zagrijavamo na vodenoj kupelji do 70 °C tijekom 20 min. Nakon hlađenja sadržaj je prenesen kvantitativno u tikvicu od 200 mL, te je dodano 1-2 g CaCO<sub>3</sub> kako bi postili slabo kiselu reakciju. Dodano je 5 mL reagensa I i 5 mL reagensa II, promiješano i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake. Nakon izdvajanja gornjeg sloja profiltrira se sadržaj tikvice preko suhog, nabranog filtrat papira u suhu tikvicu. Dobiveni filtrat je filtrat F1. Pipetom je odmjereno 25 mL Luffove otopine u tikvicu od 300 mL i dodano otopini šećera koja treba sadržavati nešto manje od 100 mg šećera (10 mL F1), te 15 mL destilirane vode kako bi ukupni volumen iznosio 50 mL. Slijepa proba sadrži 25 mL Luffove otopine i 25 mL destilirane vode. Po dodatku staklenih kuglica sadržaj se zagrijavao na način da prokuha za dvije minute, te da se umjereno vrenje nastavi 10 min. Zagrijavanje je provedeno preko azbestne mrežice uz povratno hladilo. Po završetku zagrijavanja, sadržaj tikvice se naglo hladi 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 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i 10 mL otopine kalij tijocijanata (KCNS). Tikvica se mućka do prestanka šuma, te istaloženi jod se titrira otopinom natrijevog tiosulfata uz dodatak škroba kao indikatora do gubitka plave boje.

Otpipetirano je 50 mL filtrata F1 u odmjernu tikvicu od 100 mL za određivanje ukupnih šećera te je dodano 5 mL HCl-a . Sadržaj tikvice je zagrijavan 10 minuta na vodenoj kupelji pri 70 °C, nakon zagrijavanja brzo hlađen uz stalno miješanje, te neutraliziran s 20 %-tnom NaOH uz metiloranž kao indikator. Nakon što je sadržaj tikvice ohlađen na sobnu temperaturu, tikvica je nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Dobiveni filtrat je filtrat F2. Daljnji postupak identičan je kao kod određivanja reducirajućih šećera. Postotak reducirajućih šećera izračunava se preko formule:  $\% \text{ reducirajućih šećera} = \frac{a \times 100}{m}$  ; a= mg šećera izračunat iz tablice; m= masa uzorka u mg.



**Slika 13.** Postupak filtracije kod proizvodnje filtrata F1 (Izvor: autor)

#### 3.2.14 Proizvodnja soka od komercijalnih sorti jabuka

Komercijalne sorte jabuka su zasebno izrezane i ubačene u sokovnik s pužnom prešom (Kuvings, Whole Slow Juicer B6000 Plus) (**Slika 14.**), dobiveni sok prenesen je u plastične falkonice od 50 mL i stavljen na 4 °C u hladnjak na čuvanje do analize. Dok s druge strane potreban sok za određivanje prirodnih i ukupnih šećera pasteriziran je na 80 °C, ohlađen i skladišten u hladnjaku na 4 °C.



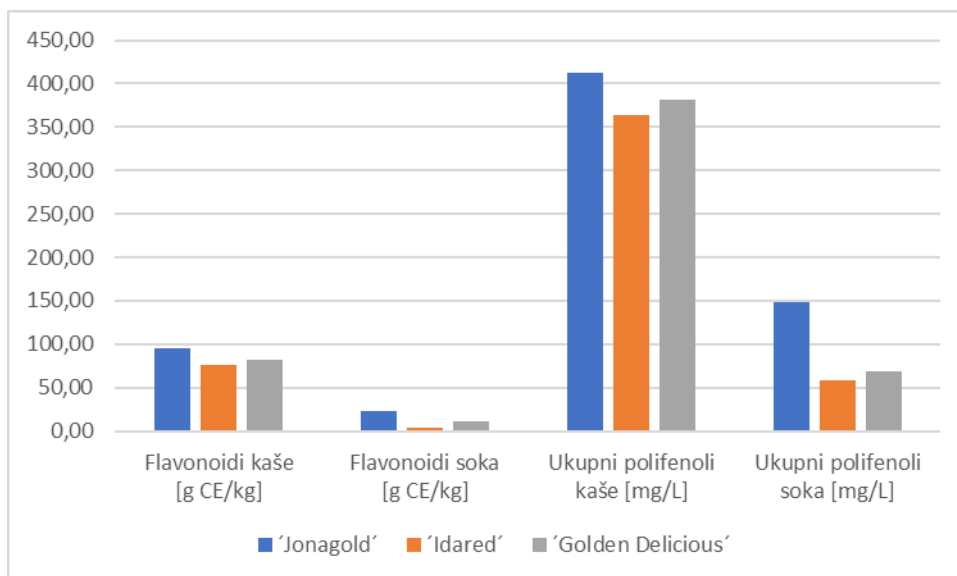
**Slika 14.** Postupak proizvodnje soka od komercijalnih sorti jabuka (Izvor: autor)

### 3.2.15 Određivanje količine patulina u soku jabuke

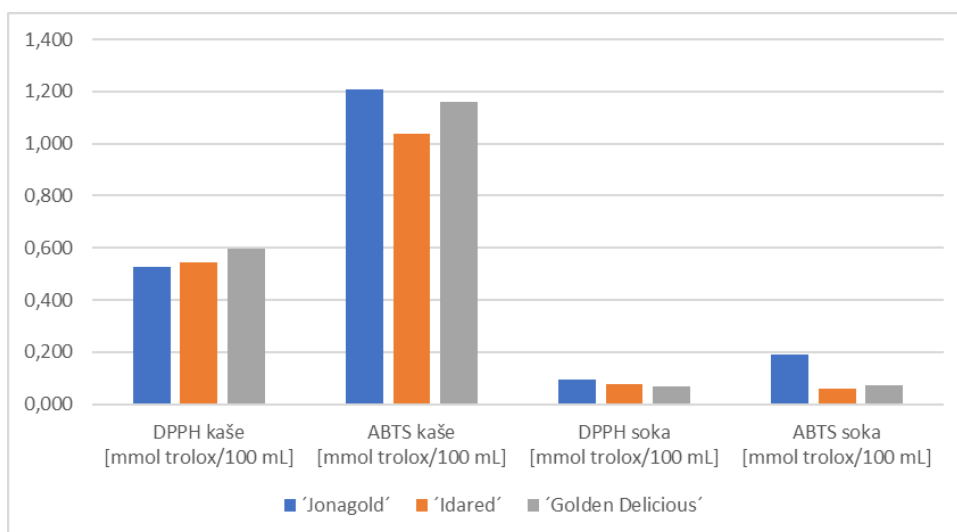
Određivanje producirane koncentracije patulina u soku komercijalnih sorti jabuka provedeno je LC-MS/MS analizom. Izvagano je 1 g uzorka u epruvetu te je dodano 4 mL ekstrakcijskog otapala. Primjenom uređaja Multi RS-60 (Biosan, Riga, Latvija) tijekom 45 minuta provedena je ekstrakcija. Nakon ekstrakcije uzorci su podvrgnuti centrifugiranju u trajanju od 15 minuta. Nakon centrifugiranja izdvojeno je 500  $\mu$ L supernatanta u staklenu vijalu, te dodano 500  $\mu$ L DS-a. Korištene kemikalije bile su LC-MS čistoće. Pripremljeni uzorci (20  $\mu$ L) su injektirani u UHPLC-MS/MS sustav, 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  $\mu$ m) termostatoranu pri 40 °C, uz protok od 0,45 mL/min. Kvantifikacija i detekcija 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.

Valjanost podataka provjerena je usporedbom odnosa s kvalitativnim kromatogramom u odnosu na patulin iz standarda patulina.

## **4. REZULTATI**

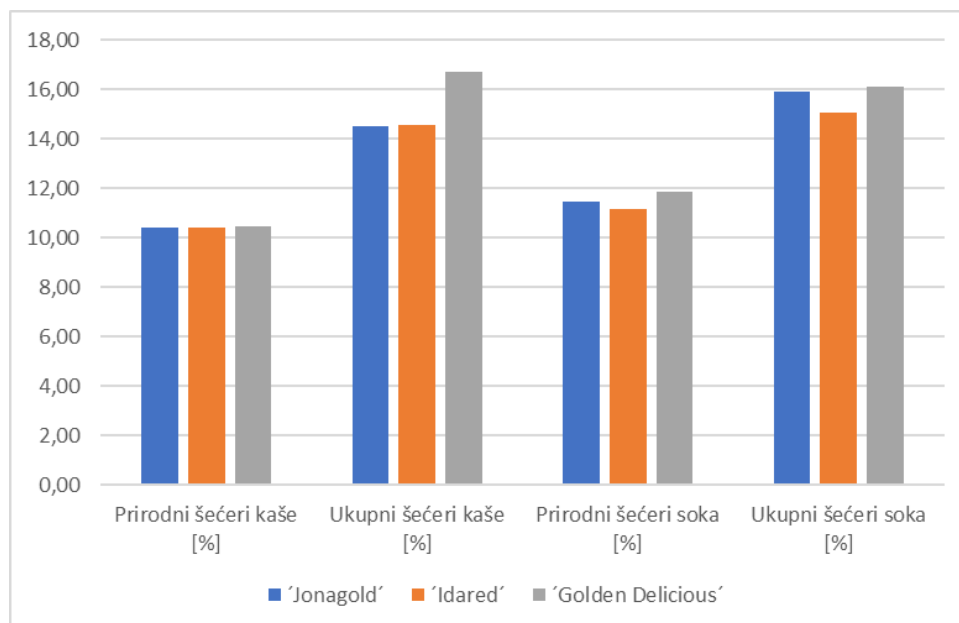


**Slika 15.** Količina flavonoida i polifenola u kaši i soku odabranih sorti jabuka



**Slika 16.** Antioksidacijska aktivnost soka i kaše odabranih sorti jabuka [mmol trolox/100 mL]





**Slika 17.** Udio prirodnih i ukupnih šećera u kaši i soku odabranih sorti jabuka

**Tablica 3.** Sadržaj polifenolnih spojeva u odabranim sortama jabuka ( $\mu\text{g/g}$ )

	'Jonagold'	'Idared'	'Golden Delicious'
Procijanidin B1	221,54 $\pm$ 1,41	NI	NI
Procijanidin B2	1596,95 $\pm$ 29,43	921,68 $\pm$ 10,75	1019,72 $\pm$ 3,21
Katehin	68,39 $\pm$ 0,37	16,72 $\pm$ 0,65	16,40 $\pm$ 0,39
Procijanidin A2	2,27 $\pm$ 0,59	1,15 $\pm$ 0,36	0,63 $\pm$ 0,02
Epikatehin	385,23 $\pm$ 9,70	281,90 $\pm$ 2,03	330,54 $\pm$ 0,17
Epigalokatehin	7,96 $\pm$ 0,75	40,87 $\pm$ 7,12	17,12 $\pm$ 6,06
Galna kiselina	13,93 $\pm$ 3,01	NI	16,62 $\pm$ 0,31
Klorogena kiselina	1616,92 $\pm$ 11,89	973,13 $\pm$ 19,42	1058,42 $\pm$ 2,14
Trans- ferulinska kiselina	0,38 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,01
Floridzin	126,92 $\pm$ 1,26	83,90 $\pm$ 0,05	180,63 $\pm$ 1,03
Rutin	40,09 $\pm$ 0,16	67,57 $\pm$ 0,23	64,07 $\pm$ 0,32
Mirecetin	17,55 $\pm$ 0,10	40,90 $\pm$ 0,10	37,11 $\pm$ 0,22
Kvercetin	0,17 $\pm$ 0,02	1,21 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,03
Kvercetin-3- $\beta$ -D- glukozid	14,73 $\pm$ 0,20	20,01 $\pm$ 0,15	24,27 $\pm$ 0,18
Pelargonidin-3-glukozid	12,06 $\pm$ 0,12	NI	NI

NI- nije identificirano

**Tablica 4.** Sadržaj polifenolnih spojeva u soku odabranih sorti jabuka ( $\mu\text{g/g}$ )

	‘Jonagold’	‘Idared’	‘Golden Delicious’
Procijanidin B1	NI	$28,67 \pm 0,51$	$2,93 \pm 0,06$
Procijanidin B2	NI	$1,46 \pm 0,06$	NI
Katehin	$0,13 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,02$
Procijanidin A2	$3,00 \pm 0,06$	$1,62 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,03$
Epikatehin	$2,10 \pm 0,03$	$2,10 \pm 0,03$	$2,14 \pm 0,08$
Epigalokatehin	$0,31 \pm 0,00$	NI	NI
Galna kiselina	$0,27 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,00$
Klorogena kiselina	$3,01 \pm 0,08$	$59,04 \pm 0,08$	$29,10 \pm 0,21$
Trans- ferulinska kiselina	$94,52 \pm 0,22$	$0,14 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$
Floridzin	$6,26 \pm 0,06$	$0,81 \pm 0,00$	$0,41 \pm 0,01$
Rutin	$0,20 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,00$	NI
Mirecetin	$0,43 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$
Kvercetin	NI	NI	NI
Kvercetin-3- $\beta$ -D- glukozid	$4,28 \pm 0,55$	NI	NI
Pelargonidin-3-glukozid	NI	NI	NI

NI- nije identificirano

**Tablica 5.** Sadržaj ukupnih kiselina i pH u kaši i sok odabranih sorti jabuka

	‘Jonagold’	‘Idared’	‘Golden Delicious’
Ukupne kiseline kaše	0,1	0,06	0,05
pH kaše	3,4	3,68	3,86
Ukupne kiseline soka	0,11	0,07	0,06
pH soka	3,11	3,64	3,62

**Tablica 6.** Sadržaj patulina u soku odabranih sorti jabuka [ $\mu\text{g/kg}$ ]

	‘Jonagold’	‘Idared’	‘Golden Delicious’
Patulin [ $\mu\text{g/kg}$ ]	NI	10,93	NI

NI- nije identificirano

## **5. RASPRAVA**

Komercijalne sorte jabuka sve se više uzgajaju i lako su dostupne za konzumaciju. Za razliku od tradicionalnih, ove sorte su manje otporne na okolišne faktore i razne bolesti, a jedan od razloga je i manji udio polifenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost. Nestajanje tradicionalnih sorti jabuka, te proporcionalni razvitak komercijalnih, može u budućnosti imati negativni utjecaj na bioraznolikost i ljudsku prehranu. Takav utjecaj pospješuje činjenica da su manje bogate polifenolima i antioksidansima, kao jednim od sastavnih komponenti zdrave namirnice.

Cilj ovog diplomskog rada bio je eksperimentalno odrediti potencijal komercijalnih sorti jabuka za proizvodnju soka sa smanjenim udjelom mikotoksina patulina na temelju sadržaja polifenola u soku koji utječu na otpornost i stabilnost ploda jabuke. Za ispitivanje razlika u odabranim sortama jabuka, 'Jonagold', 'Idared' i 'Golden Delicious', koristile su se sljedeće metode: određivanje ukupnih i prirodnih šećera, flavonoida, topljive suhe tvari, ukupnih i pojedinačnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti, pH te ukupne kiseline.

Rezultati prikazuju da je najviše polifenola određeno u kaši, odnosno soku sorte 'Jonagold', a tome su proporcionalni i rezultati količine flavonoida, zatim u soku sorte 'Golden Delicious', a najmanji sadržaj polifenola određen je u sorti 'Idared', što je jasno vidljivo na **Slici 15**. Antioksidacijska aktivnost usko je povezana sa sadržajem polifenola, te što je veća antioksidacijska aktivnost pojedine sorte jabuke, veća je i otpornost na plijesan, a posljedično i na kontaminaciju patulina. Sukladno toj činjenici, komercijalna sorta 'Jonagold' pokazat će najveću otpornost na plijesan, zbog svoje sposobnosti uklanjanja reaktivnih dušikovih i kisikovih spojeva, te smanjenju oksidativnog stresa inhibicijom enzima.

U **Tablici 3.** i **Tablici 4.** prikazan je polifenolni profil komercijalnih sorti jabuka te polifenolni profil soka dobivenog od istih sorti. U rezultatima možemo uočiti da u uzorcima navedenih sorti prevladavaju slijedeći polifenoli: procijanidin B2, procijanidin B1, klorogenska kiselina te floridzin, dok su u soku navedenih sorti najzastupljeniji trans-ferulinska kiselina, floridzin te klorogenska kiselina. Za razliku od komercijalnih sorti, polifenolni profil tradicionalnih sorti se najviše sastoji od epikatehina, procijanidin B1, procijanidin B2, katehin te klorogenske kiseline. Tradicionalne sorte pokazale su više vrijednosti ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti, što ukazuje na veći potencijal tradicionalnih sorti jabuka za proizvodnju soka sa smanjenim udjelom patulina od komercijalnih sorti (Lončarić i sur., 2019).

Organske kiseline u voću nalaze kao slobodne kiseline i kao sastojci estera. U voću ih prosječno ima od 0,1 do 2,0 %, a u voćnom soku i do 6,0 %. Većina plijesni raste pri niskim pH-vrijednostima (pH 5,0 - 6,0) i podnose velike koncentracije šećera (Duraković i sur., 2003). Veći ukupni sadržaj kiseline u soku dovodi do smanjenja pH vrijednosti soka, što rezultira većom stabilnosti plijesni. Najviši pH i najniži sadržaj ukupnih kiselina soka sadrži sorta 'Golden Delicious', a najniži pH sadrži sorta 'Jonagold'.. Najzastupljenija organska kiselina u jabukama je jabučna kiselina. Šećere u jabukama pronalazimo u vezanom obliku na druge kemijske strukture ili samostalne, te predstavljaju više od 90 % suhe tvari u jabuci. Najveći udio šećera jabuke čine monosaharidi glukoza i fruktoza. Topljivi šećeri i organske kiseline pridonose organoleptičkoj kvaliteti plodova jabuka. Povoljan odnos kiselina i šećera u soku jabuke iznosi 1:10 (Bart i sur., 2006). Rezultati količine prirodnih i ukupnih šećera u kaši, odnosno soku navedenih sorti prikazani na **Slici 17**. prikazuju da sorta 'Golden Delicious' ima najveći postotak ukupnih šećera, a sorta 'Idared' najmanji. Najviše prirodnih šećera zastupljeno je također u sorti 'Golden Delicious'. Omjer ukupnih kiselina i šećera kaše iznosi 0,1:14,49 za sortu 'Jonagold', 0,06:14,56 za sortu 'Idared', te 0,05:16,69 za sortu 'Golden Delicious'. Prema navedenim podacima, sorta 'Golden Delicious' je najprikladnija za proizvodnju soka od jabuke.

Mikotoksin patulin je kvantitativno određen LC-MS/MS analizom sadržaja kaše i soka te dobiveni rezultati pokazuju kako je kod sorte 'Idared' prisutan patulin u količini od 10,93 µg/kg, dok ni u jednoj drugoj sorti patulin nije detektiran (**Tablica 6**).

Na temelju dobivenih podataka možemo zaključiti kako komercijalne sorte 'Jonagold' i 'Golden Delicious' imaju veći potencijal za proizvodnju soka sa smanjenim udjelom patulina od sorte 'Idared'. To potvrđuju i rezultati niže količine ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti soka sorte 'Idared', prikazani na **Slici 15**. i **Slici 16**.

## **6. ZAKLJUČAK**

Provedbom eksperimentalnog dijela rada i usporedbom dobivenih rezultata, možemo zaključiti sljedeće:

1. Sadržaj flavonoida i ukupnih polifenola u soku odabranih sorti najveći je kod sorte 'Jonagold', a najmanji kod sorte 'Golden Delicious'.
2. Antioksidacijska aktivnost soka odabranih sorti jabuka najviša je kod sorte 'Jonagold', te će ova sorta pokazati najveću otpornost na mikotoksin patulin.
3. Od polifenolnih spojeva odabranih sorti jabuka najviše su zastupljeni procijanidin B1, klorogenska kiselina i trans-ferulinska kiselina. Komercijalne sorte jabuka sadrže manji udio polifenola od tradicionalnih sorti.
4. Najviše prirodnih i ukupnih šećera određeno je u soku sorte 'Golden Delicious'
5. pH soka odabranih sorti jabuka najviši je za sortu 'Idared', a najmanji za sortu 'Jonagold'.
6. Od polifenolnih spojeva određenih u soku odabranih sorti jabuka najviše su zastupljeni procijanidin B1 i klorogenska kiselina u sorti 'Idared'. U manje zastupljene polifenolne spojeve ubrajamo: procijanidin B2, katehin, epigalokatehin, galnu kiselinu, rutin, mirecetin, kvercetin i pelargonidin-3-glukozid.
7. Na temelju niskih udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti te prisutnog patulina u količini od 10,93  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u soku sorte 'Idared', može se zaključiti da komercijalna sorta 'Idared' nema visok potencijal za proizvodnju soka sa smanjenim udjelom patulina, dok sorte 'Jonagold' i 'Golden Delicious' imaju jer u njihovom soku nije pronađen sadržaj patulina.

## **7. LITERATURA**



Almenar VS, Girona AJR, Sillué SM: Other moulds and mycotoxins. Guide to Foodborne Pathogens Second Edition, University of Lleida, Lleida Španjolska, 2013.

Arko B; Mlinarić J: Karakteristike sorata jabuke u intenzivnom uzgoju. Glasnik zaštite bilja 30(5): 25-31, 2007. <https://hrcak.srce.hr/file/241822>

Artigot MP, Loiseau N, Laffitte J, Mas-Reguieg L, Tadriss S, Oswald IP, Puel O: Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*. *Microbiology (Reading)* 155(Pt 5): 1738–1747, 2009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2889413/>

Berend, S, Grabarić, Z: Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 59: 205-212, 2008. <https://hrcak.srce.hr/file/42114>

Cerjak M, Vrhovec R: Vojvodić M, Mesić Ž: Analiza hrvatskog tržišta jabuka. U 46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture, 311-314. Faculty of Agriculture, Zagreb, 2011. [https://www.researchgate.net/profile/Marija-Cerjak/publication/266864145\\_Analiza\\_hrvatskog\\_trzista\\_jabuka/links/5457627d0cf2cf5164808800/Analiza-hrvatskog-trzista-jabuka.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Marija-Cerjak/publication/266864145_Analiza_hrvatskog_trzista_jabuka/links/5457627d0cf2cf5164808800/Analiza-hrvatskog-trzista-jabuka.pdf)

Čmelik Z: Klasični (ekstenzivni) voćnjaci u Hrvatskoj. *Pomologia croatica* 16: 3-4, 2010.

De Souza Sant'Ana, A, Rosenthal, A, de Massaguer PR: The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Research International*, 41(5): 441-453, 2008. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996908000586>

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

Errampalli D: In *Penicillium expansum* (Blue Mold). *Postharvest Decay*, Elsevier Nizozemska, Amsterdam, 2014.

Escarpa A, Gonzalez MC. An overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31(2): 57-139, 2010. [https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/20014091076695?casa\\_token=vtjppq5Lo90AAAAA:EFmWriOziAG0knVJurIY50IWjqevlxmX1Thn98B-C1d1FJ4fJ8AdXaPmkTsaewk\\_cS3y3npz4wG8imE](https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/20014091076695?casa_token=vtjppq5Lo90AAAAA:EFmWriOziAG0knVJurIY50IWjqevlxmX1Thn98B-C1d1FJ4fJ8AdXaPmkTsaewk_cS3y3npz4wG8imE)

Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold A, Haffner K, Bangerød H, Andersen LF, Moskaug JØ, Jacobs DR, Blomhoff R: A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutr* 132: 461-471, 2002.

Hamza LF, Kamal SA, Hameed IH: Determination of metabolites products by *Penicillium expansum* and evaluating antimicrobial activity. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* 7(9): 194-220, 2015. <https://academicjournals.org/journal/JPP/article-full-text-pdf/CD6E70E55521.pdf>

Hyson DA: A Comprehensive Review of Apples and Apple Components and Their Relationship to Human Health. *American Society for Nutrition Adv. Nutr.* 2: 408–420, 2011. <https://academic.oup.com/advances/article-pdf/2/5/408/23735102/408.pdf>

Ivković F: Sortiment jabuka u proizvodnji u EU i Hrvatskoj i koje sorte saditi. *Glasnik zaštite bilja* 5: 16-19, 2011. <https://hrcak.srce.hr/file/240506>

Jakobek L, García-Villalba R, Tomás-Barberán FA: Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. *Journal of Food Composition and Analysis* 31(2): 199-211, 2013. [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157513000781?casa\\_token=f4vHnrRAwbMAAAAA:5yYXtpgrAclOv-7\\_Bo5a0E8azeIDi5HPnyFq6WzzYwXxQdgM1rZH4atfxFsqLdInvyxKYNN4xAU](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157513000781?casa_token=f4vHnrRAwbMAAAAA:5yYXtpgrAclOv-7_Bo5a0E8azeIDi5HPnyFq6WzzYwXxQdgM1rZH4atfxFsqLdInvyxKYNN4xAU)

Kalinowska M, Bielawska A, Lewandowska-Siwkiewicz H, Priebe W, Lewandowski W: Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry* 84: 169-188, 2014. [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942814002873?casa\\_token=nqFNP1ubjYIAAAAA:o6f9EUKLD\\_Vx56jo6WZYJYQ2aUNNfiGHALKmWatRErs0jmVJwbR-rcZH8t3Yql4-A\\_HFptgm#bib31](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942814002873?casa_token=nqFNP1ubjYIAAAAA:o6f9EUKLD_Vx56jo6WZYJYQ2aUNNfiGHALKmWatRErs0jmVJwbR-rcZH8t3Yql4-A_HFptgm#bib31)

Kocić-Tanackov SD, Dimić GR: Gljive i mikotoksini – kontaminanti hrane. *Hem. Ind.* 67(4): 639–653. Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija, 2013. [http://www.ache.org.rs/HI/2013/No4/HEMIND\\_Vol67\\_No4\\_p639-653\\_Jul-Aug\\_2013.pdf](http://www.ache.org.rs/HI/2013/No4/HEMIND_Vol67_No4_p639-653_Jul-Aug_2013.pdf)

Križanić J: Domaće, domorodne, jabuke Podravine. U Podravski zbornik, str. 309-320. Muzej grada Koprivnice, Koprivnica, 2005. <https://hrcak.srce.hr/file/332815>

Lončarić A, Skendović Babojelić S, Kovač T, Šarkanj B: Pomological properties and polyphenol content of conventional and traditional apple cultivars from Croatia. *Hrana u zdravlju i bolesti* 8(1): 19-24, 2019. <https://hrcak.srce.hr/file/323962>

Lončarić A: Utjecaj dodatka šećera i praha kore jabuka na udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost kaša od jabuka. Disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014. <https://dr.nsk.hr/islandora/object/ptfos:656/datastream/PDF/download>

Longin A: Sistematika plijesni – potencijalnih štetočina na papiru. *Vjesnik bibliotekara Hrvatske* 58(3-4): 135-161, 2015. <https://hrcak.srce.hr/file/230922>

Obradović A, Radivojević D, Vajgand D, Rekanović E: Priručnik za integralnu proizvodnju i zaštitu jabuke. Institut za primjenu nauke u poljoprivredi, 81-83, 2013.

Pandey KB, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2: 270-278, 2009. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2009/897484/>

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

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

Pleadin J, Frece J, Markov K: Utjecaj postupaka prerade na transformaciju i smanjenje koncentracije mikotoksina u određenim skupinama hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 12(1-2): 4-13, 2017. <https://hrcak.srce.hr/file/278886>

Puel O, Galtier P, Oswald I: Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins* 613-631, 2010. <https://www.mdpi.com/2072-6651/2/4/613/pdf>

Putnik P, Bursać Kovačević D, Herceg K, Pavkov I, Zorić Z, Levaj B: Effects of modified atmosphere, anti-browning treatments and ultrasound on the polyphenolic stability, antioxidant capacity and microbial growth in fresh-cut apples. *Journal of Food Process Engineering*, 2017.

[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jfpe.12539?casa\\_token=3AobiGK8i8IAAAA A:tQ-OIUUdMHZescenssO6MXlx62KXuwtLla88dPruxPq4jV-VOhfw5KSs1DglfdmK1rMYOOEfZUxLQn2J](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jfpe.12539?casa_token=3AobiGK8i8IAAAA A:tQ-OIUUdMHZescenssO6MXlx62KXuwtLla88dPruxPq4jV-VOhfw5KSs1DglfdmK1rMYOOEfZUxLQn2J)

Radunić M, Klepo T, Strikić F, Lukić D, Maretić M: Karakteristike sorata jabuka (*Malus x domestica* Borkh.) uzgajanih na području Žrnovnice. *Pomologia Croatica* 17: 11-18, 2011. <https://hrcak.srce.hr/file/114936>

Silva SJND, Schuch PZ, Bernardi CR, Vainstein MH, Jablonski A, Bender RJ: Patulin in food: state-of-the-art and analytical trends. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29(2): 406-413, 2007. <https://www.scielo.br/pdf/rbf/v29n2/41.pdf>

Stablo jabuke Idared. <https://hr.wow-plants.com/6839804-apple-tree-idared> [15.06.2022].

Stablo jabuke Jonagold - opis, uzgoj, njega, zahtjevi, savjeti. <https://hr.garden-idea.net/13080338-the-jonagold-apple-tree-description-cultivation-care-requirements-advice> [15.06.2022].

Šoškić MM: Jabuka. Partenon, Beograd, 2011.

Tannous J, El Khoury R, Pascale Snini S, Lippi Y, El Khoury A, Atoui A, Lteif R, P. Oswald I, Puel O: Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 189: 51-60, 2014.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160514003717?via%3Dihub>

Tannous J, Keller N, El Khoury A, Lteif R, Oswald IP, Puel O, Atoui A: Secondary Metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on Recent Advances in Patulin Research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58(12): 2082-2098, 2017. [https://www.researchgate.net/profile/Ali-](https://www.researchgate.net/profile/Ali-Atoui/publication/315717389_Secondary_Metabolism_in_Penicillium_expansum_Emphasis_on_Recent_Advances_in_Patulin_Research/links/5f3f8364a6fdcccc43df38a6/Secondary-Metabolism-in-Penicillium-expansum-Emphasis-on-Recent-Advances-in-Patulin-Research.pdf)

[Atoui/publication/315717389\\_Secondary\\_Metabolism\\_in\\_Penicillium\\_expansum\\_Emphasis\\_on\\_Recent\\_Advances\\_in\\_Patulin\\_Research/links/5f3f8364a6fdcccc43df38a6/Secondary-Metabolism-in-Penicillium-expansum-Emphasis-on-Recent-Advances-in-Patulin-Research.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ali-Atoui/publication/315717389_Secondary_Metabolism_in_Penicillium_expansum_Emphasis_on_Recent_Advances_in_Patulin_Research/links/5f3f8364a6fdcccc43df38a6/Secondary-Metabolism-in-Penicillium-expansum-Emphasis-on-Recent-Advances-in-Patulin-Research.pdf)

Van der Sluis AA: A Chain Analysis of the Production of 'Healthy' Apple Juice. The Case of Polyphenolic Antioxidants. PhD Thesis. Wageningen University, The Netherlands, 2005. <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/121723>

Wright SA: Patulin in food. *Current Opinion in Food Science* 5: 105-109, 2015.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799315001289>

Zavladav, S, Majhen, L: PRAĆENJE FIZIKALNIH SVOJSTVA JABUKE „ZLATNI DELIŠES “TIJEKOM VREMENA SKLADIŠTENJA NA RAZLIČITIM REŽIMIMA. Zbornik radova Veleučilišta u Šibeniku: 173-183, 2019.

Zhung L, Carere J, Lu Z, Lu F, Zhou T: Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies. *Toxins* 10(11): 475, 2018.  
<https://www.mdpi.com/2072-6651/10/11/475/htm#B2-toxins-10-00475>