Nutritivni potencijal i sadržaj fitokemikalija organskog ostatka od jabuke

Božurić, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:586637

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

NUTRITIVNI POTENCIJAL I SADRŽAJ FITOKEMIKALIJA ORGANSKOG OSTATKA OD JABUKE

DIPLOMSKI RAD

Nina Božurić

Zagreb, rujan 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Obnovljivi izvori energije u poljoprivredi

NUTRITIVNI POTENCIJAL I SADRŽAJ FITOKEMIKALIJA ORGANSKOG OSTATKA OD JABUKE

DIPLOMSKI RAD

Nina Božurić

Mentor:

doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur

Zagreb, rujan 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Nina Božurić**, JMBAG 0178106334, rođena 20.02.1995. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

NUTRITIVNI POTENCIJAL I SADRŽAJ FITOKEMIKALIJA ORGANSKOG OSTATKA OD JABUKE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

_____

Potpis studenta / studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice Nine Božurić, JMBAG 0178106334, naslova

NUTRITIVNI POTENCIJAL I SADRŽAJ FITOKEMIKALIJA ORGANSKOG OSTATKA OD JABUKE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur mentor _____
2. prof. dr. sc. Sandra Voća član _____
3. doc. dr. sc. Nikola Bilandžija član _____

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Cilj istraživanja 1

2. Pregled literature 2

2.1. Kemijski sastav jabučne komine 2

2.2. Zakonski okvir za gospodarenje biootpadom 4

2.3. Sigurnosni standard proizvodnje proizvoda od jabuke 6

2.4. Pet ključeva sigurnosti hrane 9

2.5. Mogućnosti iskorištenja organskog ostatka 10

2.6. Jabučna komina u ljudskoj prehrani 11

2.7. Jabučna komina u biotehnologiji 14

2.8. Jabučna komina u poljoprivredi 16

2.9. Energetska oporaba jabučne komine 17

3. Materijali i metode 19

3.1. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem na 105 °C 23

3.2. Određivanje topljive suhe tvari 24

3.3. Određivanje pH 24

3.4. Određivanje ukupne kiselosti 24

3.5. Određivanje antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom 25

3.6. Određivanje boje CIELAB metodom 26

3.7. Određivanje vitamina C 27

3.8. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom 28

3.9. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida i neflavonoida 29

3.10. Određivanje klorofila a, klorofila b i ukupnih klorofila 30

3.11. Statistička obrada podataka 32

4. Rezultati i rasprava istraživanja 33
5. Zaključak.....39
6. Popis literature 40
Životopis.....47

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Nine Božurić**, naslova

NUTRITIVNI POTENCIJAL I SADRŽAJ FITOKEMIKALIJA ORGANSKOG OSTATKA OD JABUKE

Jabučna komina je organski ostatak nastao prešanjem jabuka u svrhu proizvodnje jabučnog soka, a koji se nakon prerade klasificira kao biootpad i kao takav adekvatno zbrinjava. Zbog dobrobiti koje jabučni sok ima na ljudsko zdravlje, iz godine u godinu raste potražnja, a time i proizvodnja jabučnog soka. Posljedično, povećava se i količina jabučne komine koju je potrebno zbrinuti na odlagalištu otpada. Osim već postojećih metoda zbrinjavanja organskog ostatka poput anaerobne digestije i kompostiranja nameće se i potreba dodatnog iskorištavanja iste, a prvenstveno zbog značajne nutritivne vrijednosti jabučne komine. Stoga je i cilj ovog diplomskog rada bio utvrditi sadržaj bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet organskog ostatka nakon prerade jabuke u sok i temeljem dobivenih rezultata procijeniti nutritivnu kvalitetu jabučne komine i mogućnosti njenog daljnjeg korištenja. U sklopu ovog istraživanja analizirane su jabučne komine sakupljene iz dva različita pogona za proizvodnju soka (Proizvodnja Jurišić d.o.o. i Fragaria d.o.o.), a koje se temeljno razlikuju u sortama jabuka korištenim za proizvodnju soka. Temeljem dobivenih rezultata osnovnih fizikalno-kemijskih svojstava, može se zaključiti kako obje analizirane jabučne komine imaju zadovoljavajući nutritivni sastav (visok sadržaj ukupne suhe i topljive suhe tvari). Obje komine značajno se razlikuju i u sastavu pojedinih bioaktivnih spojeva, prilikom čega je zabilježeno kako uzorak iz pogona Proizvodnja Jurišić d.o.o. ima veći sadržaj ukupnih klorofila i karotenoida (0,042 mg/g; 0,013 mg/g), veći sadržaj fenola, flavonoida i neflavonoida (139,36 mg GAE/100 g svježe tvari; 76,59 mg CTH/100 g svježe tvari; 62,77 mg GAE/100 g svježe tvari), a time i očekivano veći antioksidacijski kapacitet (2541 µmol TE/L). Uzorak jabučne komine iz pogona Fragaria d.o.o. imao je pak veći sadržaj vitamina C (7,73 mg/100 g svježe tvari). Temeljem svega navedenog, može se zaključiti kako su analizirani uzorci jabučne komine vrijedan izvor nutritivno značajnih spojeva te time predstavljaju i potencijalnu sirovinu za daljnju oporabu, bilo u prehrambene svrhe, farmaceutsku industriju ili kao hrana za životinje.

Ključne riječi: jabučna komina, biootpad, oporaba, ukupni fenoli, antioksidacijski kapacitet

Summary

Of the master's thesis – student **Nina Božurić,** entitled

NUTRITIVE POTENTIAL AND PHYTOCHEMICAL CONTENT OF APPLE ORGANIC RESIDUE

NUTRITIVE POTENTIAL AND PHYTOCHEMICAL CONTENT OF APPLE ORGANIC RESIDUE

Apple pomace is an organic residue made by pressing apples to make apple juice. It is classified as bio-waste and must be properly disposed of as such. Every year the demand increases and so does the production of apple juice due to the benefits that apple juice has on human health. Consequently, the amount of apple pomace that needs to be disposed of also increases every year. Considering the nutritional value of apple pomace, there is a need to re-evaluate other uses than the already known bio-waste disposal methods such as anaerobic digestion and composting. Therefore, the aim of this study was to determine the bioactive compound content and antioxidant capacity of the organic residues after processing the apple into apple juice. In this study, two apple pomace samples were collected from two different apple juice production plants (Proizvodnja Jurišić d.o.o. and Fragaria d.o.o.). The samples differ fundamentally in apple varieties used for apple juice production. Based on the obtained results, the main conclusion is that both apple pomace samples have satisfactory nutrient composition (high content of total solids and soluble solids). The two apple pomace samples differ significantly in the composition of bioactive compounds. It is noted that the sample from the production plant Proizvodnja Jurišić d.o.o. has higher chlorophyll and carotenoid content (0.04 mg/g; 0.01 mg/g), higher content of phenols, flavonoids and non-flavonoids (139.36 mg GAE /100 g FW; 76.59 mg CTH/100 g FW; 62.77 mg GAE/100 g FW) and higher antioxidant capacity (2541 µmol TE /L). However, the sample from Fragaria d.o.o. contained more vitamin C (7.73 mg/100 g FW). Based on the above, it is clear that the analyzed apple pomace samples are a rich source of nutritionally valuable compounds and as such can be considered as raw material for further processing in the food industry, pharmaceutical industry or as animal feed..

Keywords: apple pomace, bio-waste, re-usage, total phenolic compounds, antioxidative capacity

1. Uvod

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) je jedna od najranije poznatih voćnih vrsta koje su kultivirane u umjerenom klimatskom pojasu (Musacchi i Serra, 2018.). Prema FAOSTAT-u, 2019. godine u svijetu je proizvedeno 87.236.221 t jabuka (FAOSTAT, 2021.a). Godinu prije, proizvedeno je 1.391.614 t jabučnog soka i 1.251.833 t koncentriranog soka od jabuke. Proizvodnja soka od jabuke, u usporedbi s prijašnjim godinama, ima trend rasta (FAOSTAT, 2021.b). Procjenjuje se da u svijetu godišnje kao nusproizvod prerade jabuke nastane oko 4 milijuna t organskog ostatka u vidu jabučne komine (Lyu i sur., 2020.).

Jabučna komina izravni je nusproizvod procesa prešanja jabuka i na nju opada 20-30% mase ploda jabuke. Najčešće se sastoji od kožice ploda, peteljke, pulpe, sjemene lože i sjemenki, a bogata je i važnim hranjivim tvarima poput ugljikohidrata, fenola, vlakana i vitamina, a zbog čega je i njezin potencijal daljnjeg korištenja velik. Naime, u plodu jabuke upravo su kožica i pokožica dijelovi koji obiluju sadržajem polifenolnih spojeva značajnog antioksidacijskog djelovanja, a zbog čega se komina može smatrati i nutritivno vrijednim izvorom (Kalinowska i sur., 2020.). Jabučna komina je, zbog svog sastava (visok udio ugljikohidrata), izrazito podložna fermentaciji te ukoliko nije adekvatno zbrinuta predstavlja značajnu opasnost za zagađenje okoliša (Skinner i sur., 2018.). Također, hrpe jabučne komine, izvan ili u blizini pogona za preradu voća, ne samo da krše norme kontrole zagađenja, već mogu dovesti i do rizika po ljudsko zdravlje (Bhushan i sur., 2008.). Veliki dio organskog ostatka u svijetu ne bude iskorišten već se zbrinjava na odlagalištu otpada, odnosno definira kao otpad. Jabučna komina se u Republici Hrvatskoj zbirno klasificira pod šifrom 02 03 kao oblik biootpada (NN 90/15), a samo 14% biootpada u RH prosljeđuje se na oporabu kompostiranjem ili anaerobnom digestijom, dok ostatak završi na odlagalištima otpada (Puntarić i sur., 2020.).

Naime, nusproizvodi iz poljoprivredne i prehrambene proizvodnje zbrinjavaju se često s velikim troškovima i utjecajem na okoliš, a što je dovelo do potrebe za procjenom njihove vrijednosti i pronalaskom potencijalnih načina njihova ponovnog korištenja u proizvodnji (O'Shea i sur., 2012.). Osim u smanjenju negativnog utjecaja na okoliš, oporaba jabučne komine mogla bi donijeti i financijsku korist proizvođaču koji se odluči na oporabu stvaranjem proizvoda dodane vrijednosti. Model cirkularne ekonomije može se implementirati u poljoprivredni i prehrambeni sektor recikliranjem nastalih nusproizvoda, čime se stvara dodana vrijednost uz korištenje manjih količina resursa i generiranje manjih količina otpada (Fernandes i sur., 2019a.).

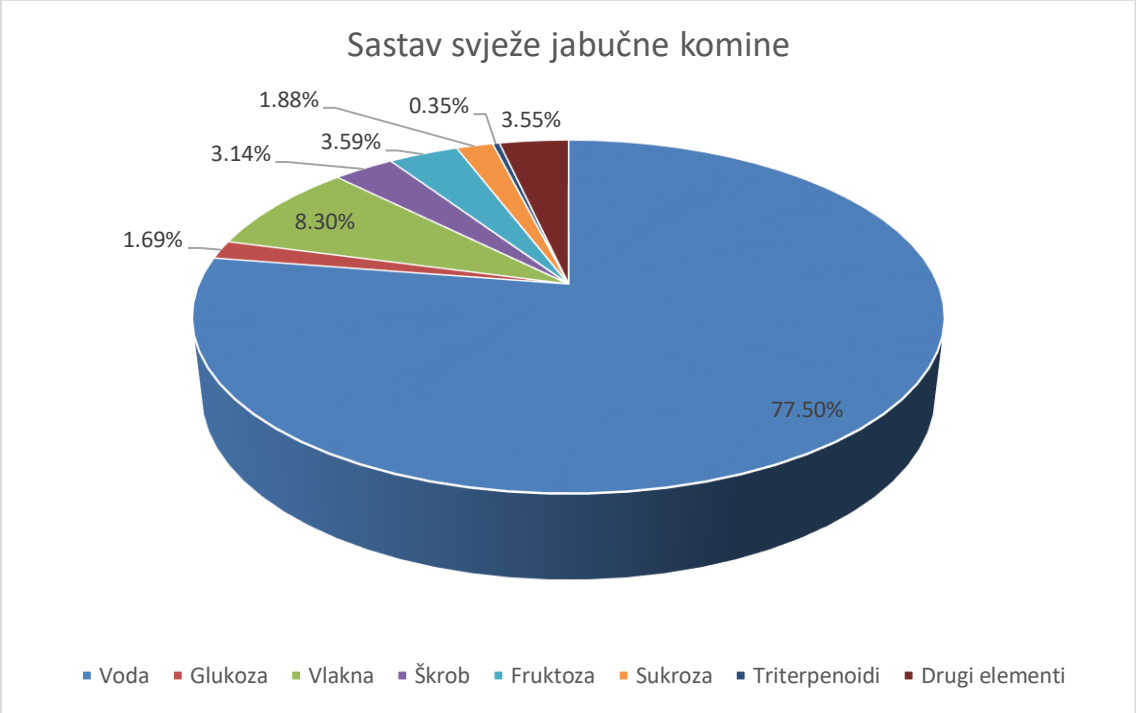
1.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je utvrditi sadržaj bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet organskog ostatka nakon prerade jabuke u sok, te procijeniti nutritivnu kvalitetu jabučne komine i mogućnosti njenog daljnjeg korištenja.

2. Pregled literature

2.1. Kemijski sastav jabučne komine

Jabučna komina dobar je izvor fitokemikalija i sadrži značajan udio ugljikohidrata, kao i manje količine proteina, vitamina i minerala (Skinner i sur., 2018.). Industrijska jabučna komina sadrži veliki udio vode, u prosjeku 81% (Fernandes i sur., 2019a.). Vrlo često, za potrebe daljnjeg iskorištenja ili oporabe, jabučna komina se suši, a čime se olakšava skladištenje i otežava mikrobiološka kontaminacija (Perussello i sur., 2017.). U grafikonu 2.1. prikazan je okvirni sastav svježe jabučne komine.



Grafikon 2.1. Sastav svježe jabučne komine.
Izvor: Waldbauer i sur., 2017.

Ugljikohidrati jabučne komine uglavnom se sastoje od vlakana koja uključuju celulozu (127,9 g/kg suhe tvari), hemicelulozu (7,2-43,6 g/kg suhe tvari) i lignin (15,3-23,5 g/kg suhe tvari) (Dhillon i sur., 2013.). Jabučna komina također je bogat izvor pektina koji je uglavnom prisutan kao protopektin, polisaharid topljiv u kiselinama. Prema Skinneru i sur. (2018.), u suhoj tvari jabučne komine nalazi se između 10 i 15% pektina. Od slobodnih šećera prevladavaju fruktoza i glukoza, s manjim udjelom arabinoze i galaktoze (Fernandes i sur., 2019b.). U suhoj tvari, jabučna komina sadrži svega 1,2 – 6,91 g/100 g proteina (Antonić i sur., 2020.) i 1,1-3,6% masti. U sjemenkama jabuke najzastupljenije su pak masne kiseline i to linolna i oleinska kiselina (Bhushan i sur., 2008.).

Plod jabuke sadrži i preko 60 različitih fenolnih spojeva. Naime, općenito četiri glavne skupine fenola zastupljene su u plodu jabuke: hidroksicimetne kiseline (primjer

klorogenska kiselina), derivati dihidrokalkona (primjerice florizin), flavan-3-oli (katehin kao monomer ili procijanidin kao oligomer) i flavonoli (kvercetin i kvercetin glikozidi) (Franquin-Trinquier i sur., 2014.). U jabučnoj komini najzastupljeniji fenolni spojevi su flavonoidi, a potom slijede flavanoli, flavononi, dihidrokalkoni i antocijani, a najčešće identificirane fenolne kiseline su hidroksicimetna i njeni derivati te hidroksibenzojeva kiselina (Reis i sur., 2012.). S obzirom na karakterističan i značajan sadržaj različitih polifenolnih spojeva, jabučna komina ispoljava i vrlo visok antioksidacijski kapacitet. Prema autorima Candrawinata i sur. (2015.), antioksidacijski kapacitet jabučne komine određen prema ABTS metodi iznosio je 2133,79-2282,83 µg TE/g komine. No, osim polifenola visokom antioksidacijskom kapacitetu jabučne komine doprinose i druge fitokemikalije, posebice vitamini C i E. Prema Pieszki i sur. (2015.), jabučna komina sadrži 22,4 mg/100 g suhe tvari vitamina E, što ukazuje na značajne vrijednosti spomenutog vitamina i nakon odvajanja soka. Jabučna komina smatra se dobrim izvorom minerala, a mineralni sastav jabučne komine prikazan je u tablici 2.1.

Tablica 2.1. Mineralni sastav jabučne komine

Element	mg/100 g svježe tvari
Natrij	185,3
Kalij	639,3
Kalcij	74,1
Fosfor	67,6
Magnezij	176,0
Željezo	3,2
Cink	1,4

(Bhushan i sur., 2008.; Skinner i sur., 2018.)

2.2. Zakonski okvir za gospodarenje biootpadom

Jabučna komina se smatra biootpadom, a biootpad je, po Zakonu o održivom gospodarenju otpadom (NN 94/13), biološki razgradiv otpad iz vrtova i parkova, hrana i kuhinjski otpad iz kućanstava, restorana, ugostiteljskih i maloprodajnih objekata te otpad istih karakteristika iz proizvodnje prehrambenih proizvoda. Trošak gospodarenja otpadom snosi proizvođač otpada, odnosno fizička ili pravna osoba zbog čije je aktivnosti nastao otpad.

Principi gospodarenja otpadom bazirani su na primarnom cilju sprječavanja nastanka otpada, ali kada to nije moguće, primjenjuje se red prvenstva gospodarenja otpadom (od najpoželjnije opcije do najmanje poželjne opcije):

1. priprema za ponovnu uporabu,
2. recikliranje,
3. drugi postupci oporabe (primjerice energetska oporaba) i
4. zbrinjavanje.

Svi drugi postupci zbrinjavanja otpada imaju prednost pred odlaganjem. Obavljanje djelatnosti gospodarenja otpadom mora se provoditi na način da se spriječi rizik po ljudsko zdravlje te negativan utjecaj na okoliš i bioraznolikost. Tako je zabranjeno odlaganje otpada u okoliš, kao i spaljivanje otpada u okolišu (NN, 94/13).

Prije zbrinjavanja otpada, posjednik ili proizvođač otpada mora kategorizirati otpad koji je potrebno zbrinuti prema Katalogu otpada (NN 90/15), ali se ova obveza ne odnosi na miješani komunalni otpad. Posjednik tvari ili predmeta koji je nastao kao rezultat nekog proizvodnog procesa čiji primarni cilj nije proizvodnja spomenute tvari ili predmeta (primjerice jabučna komina), može s istim postupati kao s nusproizvodom, a ne kao s otpadom ukoliko dobije potvrdu od ministarstva gospodarstva i održivog razvoja da je nusproizvod upisan u Očevidnik nusproizvoda (Slika 2.1.). Ministarstvo na zahtjev posjednika može izdati potvrdu o upisu nusproizvoda u Očevidnik ukoliko se utvrdi:

1. da je osigurana daljnja uporaba tvari ili predmeta,
2. da se tvar ili predmet može upotrijebiti izravno bez dodatne obrade (osim ukoliko su u pitanju uobičajeni industrijski postupci),
3. da tvar ili predmet nastaje kao sastavni dio nekog proizvodnog postupka ili
4. da je daljnja uporaba tvari ili predmeta dopuštena, tj. da tvar ili predmet ispunjava sve zahtjeve u pogledu proizvoda, zaštite okoliša i zdravlja ljudi.

Otpad gubi status otpada ukoliko se provede postupak oporabe ili recikliranja te ako se zadovolji neki od sljedećih uvjeta:

1. tvar ili predmet se koristi u posebne svrhe,
2. za tvar ili predmet postoji tržište ili potražnja,
3. tvar ili predmet ispunjava kriterije za korištenje u posebne svrhe ili
4. uporaba tvari ili predmeta neće dovesti do štetnih učinaka po okoliš ili ljudsko zdravlje.

NUS-42	OLIKOM, turistička agencija, društvo s ograničenom odgovornošću, za trgovinu i posredovanje u trgovini, Makarska	Komina masline	30.10.2016.
NUS-43	HEINEKEN HRVATSKA društvo s ograničenom odgovornošću za proizvodnju i promet piva, Karlovac	Pivski trop	5.2.2022.
NUS-44	TDR društvo sa ograničenom odgovornošću za proizvodnju duhanskih proizvoda, Rovinj	Duhanska prašina	29.11.2020.
NUS-45	CARLSBERG CROATIA društvo s ograničenom odgovornošću, Koprivnica	Termolizirani pivski kvasac	21.5.2021.
NUS-46	CARLSBERG CROATIA društvo s ograničenom odgovornošću, Koprivnica	Pivski trop	21.5.2021.
NUS-47	Marina, poljoprivredna zadruga, Marina	Komina masline	2.12.2021.

Slika 2.1. Izvadak iz Očevidnika nusproizvoda.

Izvor: http://ogo.mzoip.hr/Ocevidnici/PopisPDF/7 (pristupljeno 15.4.2021.).

Proizvođač otpada dužan je predati otpad osobi s registriranom djelatnošću gospodarenja otpadom, predati joj prateći list te je odgovoran za točnost podataka o otpadu navedenih u pratećem listu. Podaci o postupanju otpadom čuvaju se najmanje 5 godina. Proizvođaču otpada je dopušteno skladištenje vlastitog proizvodnog otpada u trajanju do 1 godine od njegova nastanka. Otpad se skladišti odvojeno po svojstvu, vrsti i agregatnom stanju. Skladište u kojem se obavlja proces skladištenja otpada mora sadržavati spremnike za skladištenje koji moraju biti od materijala otpornog na djelovanje uskladištenog otpada, izrađeni na način da je omogućeno punjenje, pražnjenje, odzračivanje, uzimanje uzoraka i nepropusno zatvaranje, te označeni čitljivom oznakom koja sadrži podatke o posjedniku otpada, ključni broj i naziv otpada te oznaku odgovarajućeg opasnog svojstva otpada, ukoliko ga isti i sadrži. Podna površina mora biti lako periva i otporna na djelovanje otpada, a prostor skladišta mora biti opremljen ventilacijom (NN 117/2017).

Osoba koja je ovlaštena gospodariti biootpadom i jedinica lokalne samouprave dužni su osigurati odvojeno prikupljanje biootpada s ciljem kompostiranja, anaerobne digestije ili energetske oporabe. Obrada biootpada mora se obavljati na način kojim se zadovoljava visoka razina zaštite okoliša (NN 94/13).

Zaključno, unutar zakonskog okvira jabučna komina može se promatrati kao biootpad i nad njom se može provesti kompostiranje, anaerobna digestija ili energetska oporaba, ili se može promatrati kao nusproizvod koji može postati sirovina za novi proizvodni proces.

2.3. Sigurnosni standard proizvodnje proizvoda od jabuke

HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) je sustav koji služi kao pomagalo proizvođačima prehrambenih proizvoda za prepoznavanje, procjenu i kontrolu opasnosti koje se mogu javiti kod određenog prehrambenog proizvoda ili cijele linije (Hrvatska agencija za hranu, 2021a). Primarno, stvoren kao program sigurnosti hrane za astronaute, ubrzo je postao opće prihvaćen standard za proizvođače prehrambenih proizvoda širom svijeta te je potvrđen od strane komisije Codex Alimentarius i Nacionalnog savjetodavnog vijeća o mikrobiološkim kriterijima za hranu SAD-a (NACMCF). HACCP sustav ne obuhvaća u istoj mjeri proizvođače hrane, trgovce hranom i subjekte koji poslužuju hranu, već svaki od navedenih mora posjedovati HACCP standard u onoj mjeri koja se od njih očekuje. HACCP se bazira na 7 glavnih principa:

- Analiza opasnosti (biološke opasnosti uzrokovane djelovanjem štetnih mikroorganizama, kemijske opasnosti uzrokovane različitim toksinima i fizikalne opasnosti uzrokovane različitim fizikalnim česticama koje su nepoželjne u prehrambenim proizvodima),
- Određivanje kritičnih kontrolnih točki (točke pri kojima se moguća opasnost kontrolira ili eliminira, npr. pasterizacija),
- Uspostavljanje zaštitnih mjera s kritičnim granicama za svaku kontrolnu točku (npr. minimalna temperatura i trajanje pasterizacije kako bi se uklonila biološka opasnost i osigurala sigurnost prehrambenog proizvoda),
- Uspostavljanje postupaka praćenja kritičnih kontrolnih točaka (određivanje metoda nekog procesa i uspostavljanje osobe odgovorne za nadzor tog procesa),
- Uspostavljanje korektivnih radnji koje trebaju biti poduzete kada praćenje pokaže da kritične točke nisu adekvatno osigurane (npr. ponovna pasterizacija ukoliko se ispostavilo da je prethodna pasterizacija trajala prekratko),
- Uspostavljanje postupaka kojima se potvrđuje da sustav ispravno funkcionira (npr. ispitivanje rada nekog uređaja),
- Uspostavljanje učinkovitog vođenja evidencije prema dokumentima HACCP sustava (uspostava zapisa o opasnosti, metode za kontrolu opasnosti, praćenje sigurnosnih zahtjeva).

Svi navedeni principi utemeljeni su na pouzdanim znanstvenim činjenicama, primjerice na temelju objavljenih recentnih studija. U tablici 2.2 prikazan je primjer analize potencijalnih opasnosti u proizvodnji pasteriziranog soka od jabuke.

Tablica 2.2. Analiza potencijalnih opasnosti u proizvodnji pasteriziranog soka od jabuke.

Faza proizvodnog procesa	Potencijalne opasnosti koje se mogu javiti	Jesu li potencijalne opasnosti značajne za sigurnost hrane?	Razlog	Kontrolne mjere koje se provode kako bi se spriječila opasnost	Je li ovaj korak kritična kontrolna točka?
Prijem jabuke	Biološke – patogeni koji se nalaze na jabukama	Da	Zabilježeni slučajevi kontaminacije	Pasterizacija	Ne
	Kemijske – 1. Pesticidi	Ne	Rijetka pojava rezidua pesticida, zbog čega javno zdravlje nije značajno ugroženo		Ne
	2. Patulin (mikotoksin)	Da	Moguć nepovoljan utjecaj na zdravlje	Pri berbi isključiti voće koje je palo na tlo i odrezati sve dijelove ploda koji su počeli truliti	Da
	Fizikalne – nema ih				
Skladištenje jabuka pri niskim temperaturama	Biološke – rast patogena	Ne	Rast nije vjerojatan zbog temperature i pH vrijednosti jabuka		
	Kemijske – Patulin	Da	Koncentracija patulina može porasti pri hladnom skladištenju	Izbaciti ili odrezati oštećene dijelove ploda	Ne
	Fizikalne – Nema ih				
Pranje jabuka	Biološke – kontaminacija patogenima iz vode	Ne	Slaba vjerojatnost zbog higijenske ispravnosti vode		
	Kemijske i fizikalne – nema ih				
Izbacivanje oštećenih plodova	Kemijske – patulin	Da	Smanjena koncentracija patulina zbog izbacivanja oštećenih plodova	Izbaciti ili odrezati oštećene dijelove plodova	Da
	Biološke i fizikalne – nema ih				

Mljevenje plodova	Biološke i kemijske – nema ih				
	Fizikalne – čestice metala	Da	Zamor materijala (stare i oštećene oštrice mogu uzrokovati kontaminacije)	Provođenje redovitog servisa nad uređajem koji melje plodove	Ne
Filtriranje soka kroz metalni filter	Biološke i kemijske – nema ih				
	Fizikalne – metalne čestice	Da	Mogućnost oštećenja filtera	Redovita zamjena filtera	Da
Pumpanje soka u tankove za privremeno čuvanje soka	Biološke i fizikalne – nema ih				
	Kemijske – sredstva za dezinfekciju tankova	Ne	Slaba vjerojatnost zbog postojećih standarda za čišćenje i dezinfekciju, koncentracije rezidua ne mogu izazvati negativan utjecaj na ljudsko zdravlje		
Pasterizacija i hlađenje	Biološke – različiti patogeni	Da	Mikrobiološka kontaminacija	Pasterizacija	Da
	Kemijske i fizikalne – nema ih				
Punjenje i pakiranje	Nema ih				
Skladištenje	Nema ih				
Otprema	Nema ih				

Izvor: FDA (Food and Drug Administration). https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-juice-hazard-analysis-critical-control-point-hazards-and-controls-guidance-first (pristupljeno 17.4.2021.).

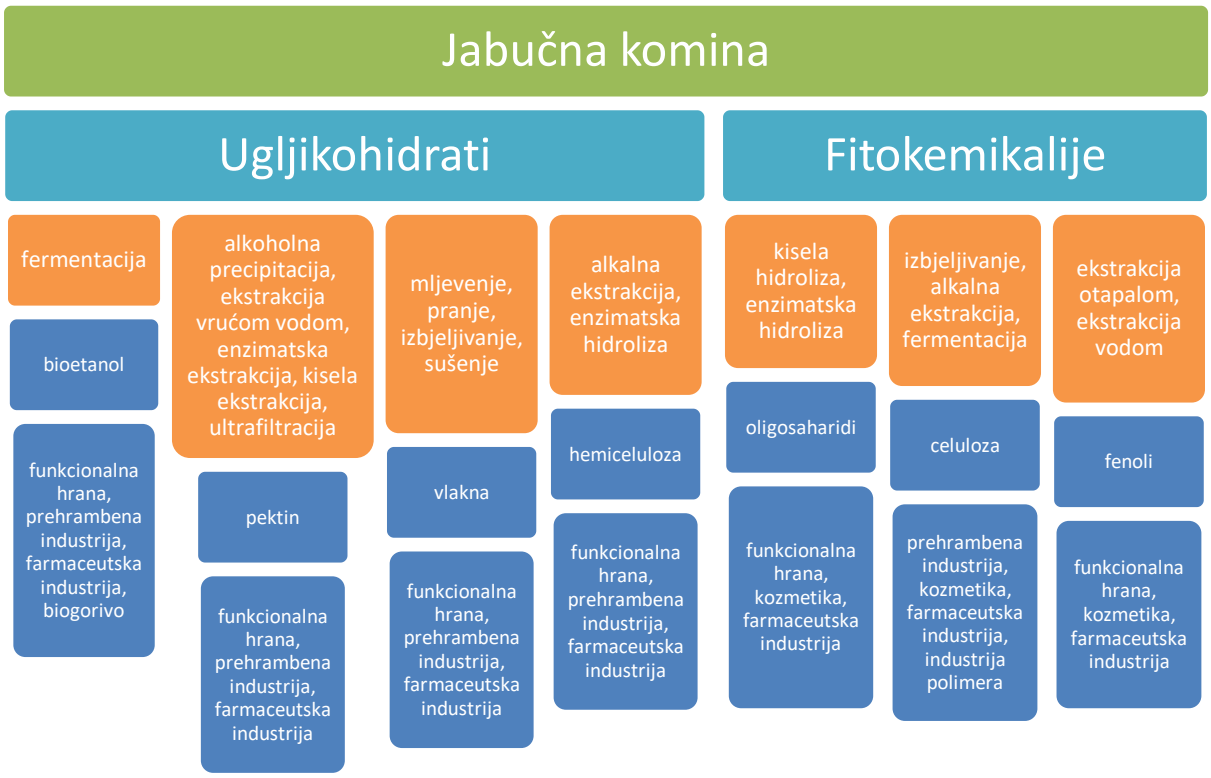
2.4. Pet ključeva sigurnosti hrane

Bolesti prenosive hranom i danas predstavljaju značajan zdravstveni problem u zemljama u razvoju, kao i u razvijenim zemljama. Više od 200 poznatih bolesti prenosi se putem hrane, a većinu adekvatna priprema hrane može spriječiti (Mead i sur., 1999.). Zbog navedenog je svjetska zdravstvena organizacija (WHO) 1989. razvila 10 zlatnih pravila za sigurnu pripremu hrane, iz kojih je 2001. nastalo jednostavnijih 5 ključeva sigurnosti hrane. Oba skupa smjernica su imali isti cilj, educirati ljude širom svijeta o pravilnom načinu pripreme hrane kako bi se spriječio prijenos bolesti (WHO, 2006.).

Prvi ključ sigurnosti hrane odnosi se na higijenu. Prije rukovanja hranom, za vrijeme pripreme i nakon obavljanja nužde potrebno je temeljito oprati ruke. Potrebno je održavanje higijene svih prostorija i opreme koja se koristi pri pripremi hrane. Također je potrebna zaštita prostora i hrane od nametnika i drugih životinja. Drugi ključ sigurnosti hrane odnosi se na odvajanje sirovih namirnica od termički obrađene hrane. To se prvenstveno odnosi na sirovine animalnog podrijetla, posebice meso, ribu i plodove mora te korištenje različitog posuđa i različitog pribora za različite stupnjeve termički obrađene hrane kako bi se spriječila unakrsna kontaminacija. Treći ključ sigurnosti hrane odnosi se na kuhanje odnosno potpunu termičku obradu hrane. Smatra se da je za tekuću hranu poput juha, variva i sokova dovoljna temperatura od 70 °C za inaktivaciju štetnih organizama, dok je za meso, jaja, ribu i plodove mora potrebna viša temperatura. Četvrti ključ sigurnosti hrane odnosi se na hlađenje odnosno čuvanje hrane na sigurnim temperaturama. Ovaj ključ baziran je na činjenici da se većina štetnih mikroorganizama razvija na temperaturi iznad 5 °C, a najčešće na sobnoj temperaturi, zbog čega hranu treba podgrijati prije konzumacije, a do tada e čuvati na temperaturi nižoj od 5 °C. Posljednji ključ sigurnosti hrane odnosi se na korištenje higijenski ispravnih sirovina i vode pri pripremi hrane. Poželjno je korištenje namirnica koje su prethodno termički obrađene poput pasteriziranih proizvoda. Također, ne preporuča se korištenje proizvoda kojima je istekao rok trajanja. Svim ovim mjerama postiže se sprječavanje prijenosa uzročnika bolesti na prehrambeni proizvod, što čini hranu sigurnom za konzumaciju (Hrvatska agencija za hranu, 2021b).

2.5. Mogućnosti iskorištenja organskog ostatka

Predtretmani su nužno potrebni za preradu organskog ostatka voća i povrća u potencijalnu sirovinu, a služe postizanju mikrobiološke stabilnosti uz minimiziranje gubitka bioaktivnih komponenti (O'Shea i sur., 2012.). Najzahvalniji predtretmani uključuju različite oblike sušenja i liofilizacije, nakon čega najčešće slijedi mljevenje i zamrzavanje na -20 °C (Femenia i sur., 1997.). u grafikonu 2.2. prikazane su mogućnosti iskorištenja organskog ostatka od jabuke i tretmani koji se koriste za dobivanje sirovina.



Grafikon 2.2. Mogućnosti iskorištenja jabučne komine, tretmani koji se koriste i mogućnosti korištenja novonastalih sirovina.
(Perrusello i sur., 2017.)

2.6. Jabučna komina u ljudskoj prehrani

U tablici 2.3. prikazane su glavne bioaktivne komponente jabučne komine i njihov utjecaj na zdravlje.

Tablica 2.3. Glavne bioaktivne komponente jabučne komine.

Spojevi	Koncentracija (mg/kg suhe tvari)	Glavne komponente	Utjecaj na zdravlje
Ugljikohidrati	Nije dostupno	Pektin i oligosaharidi pektina	Prehrambena vlakna, prebiotici, snižavanje kolesterola
Fenolne kiseline	523-1542	Klorogenska kiselina, kofeinska kiselina, ferulinska kiselina, p-kumarinska kiselina, sinapinska kiselina	Antioksidacijski, antimikrobni, protuupalni, antikancerogeni utjecaj, povoljan utjecaj na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti
Flavonoidi	2153-3734	Isorhamnetin, kempferol, kvercetin, ramnetin, glikokonjugati, procijanidin B2, epikatehin	
Antocijani	50-130	Cijanidin-3-O-galaktozid	
Dihidrokalkoni	688-2535	Florizin, floretein	Smanjenje rizika od dijabetesa, potencijal za tretiranje pretilosti, pozitivan utjecaj na kvalitetu kostiju, pozitivan utjecaj na blastogenezu
Triterpenoidi	Nije dostupno	Ursolična kiselina, oleanolična kiselina	Antimikrobno i protuupalno djelovanje

(Barreira i sur., 2019.; Lyu i sur., 2020.; Othman i sur., 2020.)

Unatoč maloj količini amigdalina u sjemenkama, jabučna komina je sigurna za ljudsku prehranu (Skinner i sur., 2018.). Prednosti korištenja jabučne komine u prehrani su brojne. Ona, po Bobeku i sur. (1998.) može smanjiti koncentraciju kolesterola u jetri. Dobar je izvor vlakana (Slika 2.2.) koja se smatraju izuzetno važnima za normalnu funkciju probavnog sustava (Figuerola i sur., 2005.). Prehrana bogata vlaknima povezana je s prevencijom i smanjenjem simptoma srčanih bolesti, raka debelog crijeva, pretilosti, dijabetesa, astme i plućnih oboljenja (Boyer i Liu, 2004.).



Slika 2.2. Dodatak prehrani na bazi vlakana ekstrahiranih iz jabuke.
Izvor: https://www.nutriofit.hr/proizvod/jabucna-vlakna-200g/

Također je i dobar izvor polifenola koji se mogu koristiti kao funkcionalni dodaci prehrani i prirodni antioksidansi (Schieber i sur., 2003.). Polifenoli imaju značajan utjecaj na senzorske karakteristike jabuke (gorčinu, okus, boju i miris) te na oksidativnu stabilnost hrane budući da se ponašaju kao reducensi, štiteći stanice od slobodnih radikala. Upravo zbog toga, fenoli dokazano štite od utjecaja starenja, infekcija, visokog tlaka, reguliraju moždane procese, osteoporozu i kardiovaskularne bolesti (Perussello i sur., 2017.). McCan i sur. (2007.) istraživali su utjecaj fenola ekstrahiranih iz jabučne komine, te su ustanovili da jabučni fenoli učinkovito štite od oštećenja DNK i mutacija, poboljšavaju crijevnu barijeru, štite od raka debelog crijeva i drugih vrsta karcinoma. Posebno blagotvoran učinak na dijabetes ima fenolni spoj florizin koji dokazano smanjuje udio glukoze u serumu krvi kod miševa i ljudi (Makarova i sur., 2015.).

Zbog visokog udjela dijetalnih vlakana, fenola i drugih hranjivih tvari jabučna komina ima veliki potencijal u prehrambenoj industriji. Brašno od jabučne komine bogato je vlaknima i sadrži 14,2% vlakana, u odnosu na samo 0,47% vlakana pšeničnog brašna (Carson i sur., 1994.). Dodatak jabučne komine pekarskim proizvodima u obliku brašna povećao je udio vlakana u finalnom proizvodu i pozitivno djelovao na zdravlje potrošača (Gómez i Martinez, 2018.). No s druge strane, autori Jung i sur. (2015.) navode kako previsoki udio jabučnog brašna može negativno utjecati na senzorska svojstva finalnog proizvoda. Provedeno je istraživanje u kojem je cilj bio ispitati u kojem udjelu brašno jabučne komine ne utječe negativno na senzorska svojstva niti na kvalitetu tijesta te je ustanovljeno da je optimalan udio za kvalitetu tijesta i kakvoću senzorskih svojstava 5% (Masoodi i Chanhan, 1998.). U izradi *sangak* kruha, tradicionalnog iranskog kruha, dokazano je kako dodatak jabučne komine od svega 3% značajno smanjuje tvrdoću kore kruha bez negativnog utjecaja

na senzorska svojstva (Jannati i sur., 2018.). Isto tako autori Lauková i sur. (2016.) utvrđuju kako se pri supstituciji pšeničnog sa najviše 15% jabučnog brašna može očekivati smanjenje volumena i poroznosti biskvita za 11-25%. Pri izradi kolača, dodatak jabučne komine u pravilu poboljšava organoleptička svojstva. Ačkar i sur. (2018.) proveli su istraživanje u kojem su grickalicama na bazi kukuruza dodali jabučnu kominu u svrhu ispitivanja promjene organoleptičkih svojstava (vanjski izgled, okus i tekstura pri žvakanju). Povećanjem udjela jabučne komine, a smanjenjem udjela kukuruza, utvrđene su negativne razlike u okusu i teksturi konačnog proizvoda.

Pektin izoliran iz jabučne komine pokazao se kao dobra alternativa za zgušnjavanje prehrambenih proizvoda. Wang i sur. (2019.) proveli su istraživanje korištenja jabučne komine kao prirodnog stabilizatora i sredstva za zgušnjavanje jogurta pri čemu su različiti udjeli komine kombinirani s obranim mlijekom i fermentirani i mješavinom bakterija mliječne kiseline pri 42 °C. Prema dobivenim rezultatima utvrđeno je kako dodatak od 1% jabučne komine dovodi do povišenja pH- vrijednosti i kraćeg vremena želiranja proizvoda. Osim navedenog, jogurti su očuvali originalnu konzistenciju tijekom perioda čuvanja od 28 dana. Osim jogurta, pektin bi se mogao koristiti kao sredstvo za zgušnjavanje u proizvodnji džemova, želea, slatkiša, ostalih fermentiranih mliječnih proizvoda, pića i smrznute hrane (Holst i sur., 2006.). Izuzev prehrambene industrije, ekstrahirani pektin ima veliku vrijednost i u kozmetičkoj industriji, također kao sredstvo za zgušnjavanje. Također se koristi i u farmaceutskoj industriji kao nosač aktivne tvari u lijekovima (Vityazev i sur., 2017.). Potrebno je spomenuti i florizin, fenolni spoj prisutan u jabučnoj komini, a čija enzimska oksidacija za posljedicu ima žućkasto obojenje koje bi se moglo koristiti u prehrambenoj industriji kao bojilo (Schieber i sur., 2003.).

Korištenje jabučne komine u svrhu proizvodnje alkoholnih pića prakticira se desetljećima zbog udjela šećera u komini i niskih troškova proizvodnje (Hang i sur., 1981.), a za efikasnu proizvodnju alkoholnih pića, komina može fermentirati sama ili u kombinaciji s melasom. Fermentirana jabučna komina može se koristiti i kao prirodna aroma jabuke u napitcima maceriranjem i vodenom infuzijom (Huc-Mathis i sur., 2019.).

2.7. Jabučna komina u biotehnologiji

Primjena poljoprivredno-industrijskih nusproizvoda u biološkim procesima pruža širok raspon mogućnosti rješavanja problema zagađenja okoliša. Jabučna komina pogodan je mikrobiološki supstrat, pri čemu se prednost daje fermentaciji krute tvari nad fermentacijom natopljenog materijala u vodi (Vendruscollo i sur., 2008.). U tablici 5.2. prikazani su mikroorganizmi koji mogu učinkovito koristiti jabučnu kominu kao supstrat.

Tablica 5.2. Najčešći mikroorganizmi koji koriste jabučnu kominu kao supstrat.

Primjena	Mikroorganizam	Referenca
Sinteza enzima		
β-glukozidaza	*Aspergillus foetidus*	Hang i Woodams (1994a)
Lignocelulolitički enzimi	*Candida utilis*	Villas-Bôas i sur. (2002)
Pektin metilesteraza	*Aspergillus niger*	Joshi i sur. (2006)
Pektinaze	*Polyporus squamosus*	Pericin i sur. (1999)
Pektolitički enzimi	*Aspergillus niger*	Berovic i Ostroversnik (1997)
Poligalaktouronaza	*Aspergillus niger*	Hang i Woodams (1994b)
Poligalaktouronaza	*Lentinus edodes*	Zheng i Shetty (2000)
Sinteza aromatskih komponenti		
Aromatske komponente	*Rhizopus oryzae*	Christen i sur. (2000)
Aromatske komponente	*Kluyveromyces marxianus*	Medeiros i sur. (2000)
Voćna aroma	*Ceratocystis finebriata*	Bramorski i sur. (1998)
Fenolni spojevi	*Trichoderma viride, T. harzianum i T. pseudokonigii*	Zheng i Shetty (2000)
Sinteza heteropolisaharida		
Hitozan	*Gongronella butleri*	Streit i sur. (2004)
Ksantan	*Xanthomonas campestris*	Stredansky i Conti (1999)
Sinteza ostalih spojeva		
Limunska kiselina	*Aspergillus niger*	Shojaosadati i Babaeipour (2002)
γ-linolenska kiselina	*Thamnidium elegans, Mortierella isabelina, Cunninghamella elegans i Cunninghamella echinulata*	Stredansky i sur. (2000)

(Vendruscollo i sur., 2008.)

Pet sojeva *Aspergillus niger* kultivirani su na jabučnoj komini u svrhu sinteze enzima poligalakturonaze. Najveća enzimatska aktivnost javila se nakon 72 sata na temperaturi od 30 °C, dok je optimum sintetizirane poligalakturonaze bio na 40 °C i pH

4,5 (Hang i Woodams, 1994b). Zheng i Shetty (2000) usporedili su različite supstrate za sintezu poligalakturonaze pomoću mikroorganizma *Lentinus edodes*: jabučna komina, komina brusnice te komina jagode, pri čemu se komina jagode pokazala najboljim supstratom, a nakon nje po količini enzima smjestila se jabučna komina. Optimum, na ovaj način sintetiziranog enzima, bio je pri pH 5,0 i 50 °C. Svi autori koji su se dotakli ove tematike zaključili su da je za proizvodnju pektolitičkih enzima potrebna velika koncentracija inokuluma. Također, koncentracija CO_2 mora biti niska, a udio vlage manji od 50%. Najbolji rezultati sinteze enzima javljali su se pri udjelu vlage od 38% i temperaturi oko 35 °C. Hang i Woodams (1995.) istražili su potencijal korištenja jabučne komine kao supstrata za proizvodnju beta-fruktofuranozidaze koristeći 3 vrste *Aspergillus*. Najbolje rezultate dala je vrsta *Aspergillus foetidus* (2700 U/kg jabučne komine), dok su vrste *Aspergillus niger* i *Aspergillus oryzae* sintetizirale 1660 i 100 U/kg jabučne komine. Joshi i sur. (2006.) su ustanovili kako je sinteza pektin metilesteraze koristeći *Aspergillus niger* na supstratu jabučne komine puno veća kada je udio vlage manji (aktivnost je 2,3 puta veća u fermentaciji krute tvari nego u fermentaciji vodom natopljenog materijala). Jabučna komina također može poslužiti za sintezu hlapljivih spojeva koji daju aromu, za što su Christen i sur. (2000.) koristili sojeve *Rhizopus*. Detektirani mirisi imaju blagu alkoholnu notu.

Jabučna komina se može koristiti i kao supstrat za sintezu biopolimera. Streit i sur. (2004.) su ustanovili kako gljivica *Gongronella butleri* daje najveće prinose u sintezi hitozana, neprobavljivog polisaharida koji dokazano snižava razinu kolesterola u krvi. Jabučna komina može se koristiti i kao supstrat za sintezu pigmenata koji se u industriji koriste kao bojila, primjerice sintezu karotenoida uz pomoć *Chromobacter sp.* koja se pokazala izuzetno učinkovitom (46,6 mg/100 g medija) (Attri i Joshi, 2006.).

2.8. Jabučna komina u poljoprivredi

Zbog niskog udjela proteina i visokog udjela ugljikohidrata, jabučna komina može se koristiti i kao dodatak za hranidbu životinja. Jabučna komina bi se mogla i obogaćivati dušikom ako se koristi kao supstrat za rast mikroorganizama koji se brzo razmnožavaju i koriste kao izvor proteina, a što bi se onda moglo koristiti i kao alternativa u ljudskoj i životinjskoj prehrani, posebice u dijelovima svijeta gdje mlijeko i meso, tradicionalni životinjski izvori proteina, nisu široko dostupni (Albuquerque i sur., 2006.). Osim za povećanje udjela proteina, jabučna komina se također uz pomoć mikroorganizama može obogatiti i mineralima, što su dokazali Joshi i Sandhu (1996.) fermentacijom 3 tipa kvaščevih gljivica: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* i *Torula utilis*. Uklanjanjem etanola nakon fermentacije, jabučna komina bila je obogaćena sirovim proteinom, masnim kiselinama, vitaminom C, ali i kalijem, cinkom, manganom i željezom.

Istraživanje autora Abdollahzadeh i sur. (2010.) pokazalo je da mješavina jabučne komine i komine rajčice u udjelu do 30% (omjer 1:1) pozitivno utječe na proizvodnju mlijeka, unos suhe tvari, učinkovitost hranidbe i apsorpciju hranjivih tvari u mliječnih krava Holstein pasmine. Alarcon-Rojo i sur. (2019.) su dokazali kako se fermentirana jabučna komina u hranidbi ovaca može dodati u udjelu od 11% bez negativnog utjecaja na pH, vodni kapacitet i gubitke tekućine. Dapače, oksidacija lipida u mesu i samog mesa ovaca hranjenih fermentiranom jabučnom kominom je bila niža nego u ovaca koje nisu bile hranjene na taj način. Jabučna komina također se može i silirati, a Ülger i sur. (2018.) su utvrdili da je nutritivna vrijednost silirane jabučne komine kao potencijalnog krmiva za domaće životinje usporediva sa nutritivnim vrijednostima silirane pulpe šećerne repe, pulpe bundeve i silirane biljke kukuruza. Dodatkom samo 5% fermentirane jabučne komine obogaćene proteinima koje je sintetizirala gljivica *Phanerochaete chrysosporium* u obrok svinja, povećala se učinkovitost konverzije hranjivih tvari s naglaskom na proteine u odnosu na kontrolnu skupinu za u prosjeku 5-10% (Ajila i sur., 2015.).

Jabučna komina bi se također mogla koristiti kao supstrat u proizvodnji gljiva zbog udjela lignina i drugih ugljikohidrata te dušika i drugih hranjivih tvari koje su nužne za rast i razvoj gljiva. U istraživanju koje su proveli Worrall i Yang (1992.) su se koristili supstrati jabučne komine, piljevine te jabučne komine u kombinaciji sa piljevinom za uzgoj shiitake gljiva te dvije vrste *Pleurotus*, pri čemu je bolji prinos zabilježen u korištenju same jabučne komine kao supstrata od same piljevine, a najbolji prinos zabilježen je u kombiniranom supstratu. Bhushan i Joshi (2006.) su koristili jabučnu kominu kao supstrat za proizvodnju pekarskog kvasca (*S. cerevisiae*) te su dokazali kako je sposobnost dizanja tijesta ista kao i kod komercijalnog kvasca koji se najčešće proizvodi na supstratu od melase.

2.9. Energetska oporaba jabučne komine

Da bi se izvor goriva smatrao potencijalnim kandidatom za komercijalizaciju, mora zadovoljavati neke preduvjete. Prije svega, alternativni izvor goriva mora reducirati stakleničke plinove, umanjiti potrošnju energije, usporiti globalno zatopljenje skladištenjem CO_2 i pružiti učinkovito iskorištenje energije. Fermentacija celulozne biomase u bioetanol pokazala se jako perspektivnom, zbog čega je privukla pažnju posljednjih godina. Zbog svojeg sastava (bogata ugljikohidratima, vlaknima, mineralima i fermentativnim šećerima), jabučna komina je izvrstan supstrat za kulture mikroorganizama. Kulture koje su provodile fermentaciju u istraživanju koje su proveli Evcan i Tari (2015.) su *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus sojae* i *Saccharomyces cerevisiae*. Utvrđeno je da je uzorak jabučne komine na početku ispitivanja imao 6,25% šećera, od kojih je najzastupljenija bila arabinoza. Prisutnost fermentabilnih šećera, niskog udjela proteina i visokog udjela vode jabučnu kominu čini odličnim supstratom za proizvodnju bioproizvoda dodane vrijednosti. Najveći prinos bioetanola postignut je pri inokulaciji *T. harzianum* i *A. sojae* na početku, te inokulacijom *S. cerevisiae* 24 sata kasnije. Udjeli inokulata od 6% za *A. sojae* i *T. harzianum* te 4% za *S. cerevisiae* dali su maksimalnu koncentraciju etanola od 8,748 g/L u 5 dana fermentacije (Evcan i Tari, 2015.).

Kako bi se jabučna komina uspješno koristila u alkoholnoj ili ABE (aceton-butanol-etanol) fermentaciji, potrebno je obaviti predtretman hidrolize kojim se postiže oslobađanje šećera zadržanih u celulozi i hemicelulozi. Međutim, taj predtretman može osloboditi i komponente toksične za mikroorganizme koji provode fermentaciju. U istraživanju koje su proveli Molinuevo-Salces i sur. (2020.) jabučna komina prvo je podvrgnuta fermentaciji s ciljem sinteze etanola, nakon čega se fermentirani ostatak koristio kao supstrat za anaerobnu digestiju u kombinaciji sa svinjskom gnojovkom, što je rezultiralo dobivanjem dva tipa biogoriva iz jabučne komine, etanola i, naknadno, bioplina. Mikroorganizmi koji su provodili fermentaciju u etanol su *Klyveromyces lactis*, *Klyveromyces marxianus*, *Lachancea thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* i *Zymomonas mobilis*. Sinteza bioetanola pokazala se uspješnom za većinu mikroorganizama i kretala se između 25,7 i 51,1 g/L, izuzev *S. stipitis* i *Z. mobilis* koje su sintetizirale 0,00 – 7,8 g/L. Dokazano je da je alkoholna fermentacija pojačala produkciju metana, koja je iznosila 596 mL CH_4/g hlapljivih komponenti. Također, pH vrijednost krutog supstrata je iznosila između 7,0 i 7,8 zbog čega se jabučna komina smatra kvalitetnim supstratom za proizvodnju bioplina (Molinuevo-Salces i sur., 2020.). Moguća je fermentacija i jabučne komine koja nije prošla predtretman hidrolize, što su dokazali Magyar i sur. (2016.), pri čemu je prinos etanola iznosio 38,8 g/L. Mikroorganizmi koji su fermentirali jabučnu kominu su mikroorganizmi vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Jin i sur. (2019.) ipak su dokazali da je učinkovitost ABE fermentacije veća ukoliko se komina podvrgne predtretmanima hidrolizom. Koristeći mikroorganizam *Clostridium beijernickii* na tekućim supstratima šećera iz jabučne komine ekstrahiranim različitim metodama, ustanovljeno je da je najveći prinos acetona, butanola i etanola na supstratu kombinacije šećera topljivih u vodi i šećera hidroliziranih lužinom (262,2 g ABE/kg suhe jabučne komine). Hijosa-

Valsero i sur. (2017.) su uspoređivali učinak različitih predtretmana na kvalitetu supstrata jabučne komine pri proizvodnji butanola. Uspoređeno je 5 predtretmana: autohidroliza (predtretman vrućom vodom ili parom), upotreba kiseline, lužine, organska otapala te surfaktanta PEG 6000, te je ustanovljeno da je predtretman surfaktantom PEG 6000 ekstrahirao najviše šećera uz najmanje inhibitora mikroorganizma *Clostridium beijerinckii*. Također, korištenje predtretmana surfaktantom donijelo je najveće prinose butanola (9,11 g/L).

3. Materijali i metode

Analizirana su dva uzorka prikupljene jabučne komine s dva različita izvora. Prvi uzorak jabučne komine prikupljen je u pogonu Proizvodnja Jurišić d.o.o. (uzorak K1) koji se nalazi u selu Paukovec u blizini Donje Zeline. Primarno se navedeni pogon bavi proizvodnjom soka od jabuke uvedenog u kategoriji proizvoda pod nazivom „Zeleni Jura“ (Slika 3.1.). Spomenuti sok izrađuje se od dviju sorti jabuka 'Granny Smith' i 'Golden delicious', a što je važno za informaciju koje sorte sadrži i jabučna komina koja je sakupljena iz navedenog pogona. Iz razgovora s voditeljem pogona za preradu jabuka dobivena je i informacija o randmanu soka iz navedenih sorti prilikom proizvodnje postupkom prešanja, a koji iznosi oko 70%. Također, upravitelj pogona ukratko je objasnio i postupak proizvodnje soka, a koji uključuje prihvat sirovine uz poštivanje svih propisanih higijenskih i zdravstvenih standarda (pranje plodova, izdvajanje neadekvatnih plodova i sl.); zatim prešanje (Slika 3.2.), prilikom čega u prešu za proizvodnju soka ulaze cijeli plodovi jabuka tako da se organski ostatak (Slika 3.3.) sastoji od peteljke, sjemenki, pulpe i kožice ploda (Slika 3.4.); nakon čega slijedi pasterizacija soka i punjenje u sterilnu staklenu ambalažu, te hlađenje. Organski ostatak iz pogona zbrinjava tvrtka Zelinske komunalije d.o.o. i to oporabom kompostiranjem.



Slika 3.1. Ambalaža soka „Zeleni Jura“.
Izvor: https://m-living.vecernji.hr/media/img/cb/fc/ab90dd1ed9a4d81d6f69.jpeg (pristupljeno 15.6.2021.).



Slika 3.2. Pogon za preradu jabuka (preša) Proizvodnja Jurišić d.o.o.



Slika 3.3. Odstranjivanje organskog ostatka iz preše nakon proizvodnje soka Proizvodnja Jurišić d.o.o.



Slika 3.4. Prikupljeni uzorak organskog ostatka iz pogona Proizvodnja Jurišić d.o.o.

Drugi uzorak prikupljen je u pogonu tvrtke Fragaria d.o.o. (uzorak K2) koji se nalazi u Mičevcu, nedaleko od Velike Gorice. Primarno se navedeni pogon tvrtke bavi proizvodnjom soka od jabuke uvedenog u kategoriji proizvoda pod nazivom „Ivković 100% jabučni sok od svježe tiještenih jabuka“ (Slika 3.5.). Spomenuti sok izrađuje se od mješavine nekoliko sorti jabuka, i to: 'Gala', 'Cripps Pink', 'Idared' i u najmanjem udjelu 'Granny Smith'. Randman dobivenog soka prilikom proizvodnje kreće se između 55 i 60%. Također, postupak proizvodnje soka sastoji se od prihvata sirovine uz poštivanje svih propisanih higijenskih i zdravstvenih standarda (pranje plodova, izdvajanje neadekvatnih plodova i sl.); prešanja, prilikom čega u prešu za proizvodnju soka ulaze cijeli plodovi jabuka tako da se organski ostatak sastoji od peteljke, sjemenki, pulpe i kožice ploda (Slika 3.6.). Jabučna komina se nakon proizvodnje soka zbrinjava preko lovačkog društva iz Gorskog kotara koje posjeduje dozvolu za zbrinjavanje biootpada.



Slika 3.5. Ambalaža soka „Ivković 100% jabučni sok od svježe tiještenih jabuka“. Izvor: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.konzum.hr%2Fweb%2Fproducts%2Fivkovic-sok-jabuka-5l-bib-mutni&psig=AOvVaw0FbghahBIeTWg_1Jm2qfiF&ust=1623848154872000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCICf9PjXmfECFQAAAAAdAAAAABAO (pristupljeno 15.6.2021.).



Slika 3.4. Prikupljeni uzorak organskog ostatka iz pogona Fragaria d.o.o.

Uzorci su netom nakon prikupljanja čuvani do analiza na temperaturi od 4°C. Analize su započele sljedeći dan od prikupljanja, a provedene su u laboratoriju Zavoda za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport.

3.1. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem na 105 °C

Kemijski sastav se najjednostavnije određuje kao ukupni dio suhe tvari. Ukupna suha tvar pokazatelj je kvalitete namirnice. Namirnice s većom hranjivom vrijednošću imaju veliki postotak ukupne suhe tvari (Katalinić, 2006.). Ovisno o sastavu proizvoda, za određivanje ukupne suhe tvari primjenjuju se tri postupka sušenja: sušenje na 105 °C, sušenje u vakuumu i destilacija. U ovom radu korištena je metoda sušenja pri 105 °C (AOAC, 1995.). Ovim se postupkom određuje ostatak uzorka nakon sušenja na 105 °C do konstantne mase.

Aparatura i pribor:

- laboratorijski sušionik
- eksikator
- staklene posudice
- analitička vaga
- stakleni štapić odgovarajuće duljine ovisno o veličini posudice
- kvarcni pijesak

Postupak određivanja:

U osušenu i izvaganu staklenu posudicu s poklopcem stavi se oko 5 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić (Slika 4.1.1.). Ovako pripremljeni pomoćni materijal se potom osuši u laboratorijskom sušioniku pod određenim uvjetima sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja poklopac se stavi na posudicu, posudica se izvadi iz sušionika i ohladi u eksikatoru, a zatim se važe s točnošću 0,0002 g.

U ohlađenu i izvaganu posudicu s pijeskom stavi se oko 2,5 g pripremljenog uzorka, koji se dobro izmiješa staklenim štapićem i sve zajedno izvaže s točnošću 0,0002 g. Staklena posudica u kojoj se nalazi pijesak i ispitivana količina uzorka stavi se u laboratorijski sušionik zagrijan na 105 °C±0,5 °C u kojem se zagrijava jedan sat sa skinutim poklopcem. Nakon hlađenja i vaganja, sušenje se nastavlja sve dok razlika nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g. Iznova se važe s točnošću ± 0,0002 g.

Formula:

$$suha\ tvar\ (\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Gdje je:

m_0 (g) - masa posudice i pomoćnog materijala (kvarcni pijesak, stakleni štapić, poklopac),

m_1 (g) - masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja,

m_2 (g) - masa posudice nakon sušenja.

3.2. Određivanje topljive suhe tvari

Prije mjerenja uzorka, refraktometar je kalibriran destiliranom vodom na sobnoj temperaturi. Nakon toga, uzorak je postavljen na donju prizmu refraktometra koja je poklopljena prozirnim poklopcem i usmjerena prema izvoru svjetlosti. Količina topljive suhe tvari izražena se u °Brix i jednostavno je očitana na refraktometru. Sadržaj topljive suhe tvari (%) određen je digitalnim refraktometrom „'Refracto 30 PX' PX“ (Mettler-Toledo, Švicarska).

3.3. Određivanje pH

Mjerenje pH vrijednosti vrši se na pH-metru uranjanjem kombinirane elektrode u homogenizirani uzorak i očitavanjem vrijednosti.

Aparatura i pribor:

- čaša volumena 25 mL,
- magnet za miješanje,
- magnetska miješalica,
- pH-metar,
- analitička vaga

Priprema uzoraka:

Uzorci se najprije profiltriraju kako bi se uklonile balastne tvari, a zatim slijedi postupak određivanja pH-vrijednosti.

Postupak određivanja:

Prije mjerenja pH-metar je potrebno baždariti puferskom otopinom poznate pH vrijednosti kod sobne temperature. pH vrijednost određuje se uranjanjem elektrode u ispitivani uzorak.

3.4. Određivanje ukupne kiselosti

Metoda se temelji na potenciometrijskoj titraciji otopinom natrijevog hidroksida. Primjenjuje se za određivanje ukupne kiselosti u voću i povrću i proizvodima od voća i povrća (AOAC, 1995).

Aparatura i pribor:

- graduirana pipeta, volumena 25 i 100 mL,
- odmjerna tikvica, volumena 250 mL,
- analitička vaga,
- potenciometar sa staklenom elektrodom,
- automatska bireta,
- filtar papir.

Reagensi:

- otopina natrijevog hidroskida c = 0,1 mol/L,
- puferna otopina poznatog pH.

Priprema uzoraka:

Uzorak se homogenizira i odvagne se 20 g, te se prenese u odmjernu tikvicu volumena
200 mL, tikvica se dopuni do oznake destiliranom vodom i njezin se sadržaj dobro promućka i profiltrira. pH-metar se baždari pomoću stadardne puferne otopine. Ovisno o očekivanoj kiselosti otpipetira se 20 mL pripremljenog uzorka i prenese u čašu u koju se prethodno stavi magnet koji će pospješiti miješanje sadržaja. Miješalica se pusti u rad, a zatim iz birete dodaje otopina natrijevog hidroksida dok se ne postigne pH vrijednost u rasponu od 7,90-8,01.

Račun:

$$\text{Ukupna kiselost (\%)} = \frac{\text{VxFxG}}{\text{D}} \text{ x 100}$$

Gdje je:
V (mL) - volumen otopine NaOH utrošene pri titraciji,
F* - faktor otopine NaOH c = 0,1 mol/L,
G (g/mL) - faktor najzastupljenije kiseline u uzorku (prema tablici 3),
D (g) - masa uzorka u 25 mL razrijeđenog homogeniziranog uzorka.

* Određivanje faktora otopine natrijevog hidroksida:
Za pripremu otopine natrijevog hidroksida c= 0,1 mol/L koristi se volumetrijski standard natrijevog hidroksida 0,1 mol/L čiji je faktor jednako 1 (F=1,0000).

3.5. Određivanje antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom

Metoda se temelji na gašenju stabilnog plavo-zelenog radikal-kationa 2,2′-azinobis (3etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS·+ radikal-kationa) koji se oblikuje bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a čiji je karakterističan adsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 734 nm. U prisutnosti antioksidansa ABTS·+ kation se reducira u ABTS, a reakcija se očituje obezbojenjem plavo-zelene otopine. Udio uklonjenih ABTS radikala koji „gase“ različiti antioksidansi mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiseline) pri istim uvjetima (Miller i sur., 1997; Re i sur., 1999.).

Priprema reagensa:

1. dan:

• 140 mL otopina kalijeva persulfata, $K_2S_2O_8$ (0,1892 g $K_2S_2O_8$ izvaže se i otopi u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL)

• 7 mL ABTS otopina (Sigma Aldrich, SAD) (0,0192 g ABTS reagensa otopi se u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL)

• stabilna $ABTS^{\cdot+}$ otopina (88 µL 140 mL otopine $K_2S_2O_8$ prenese se u tikvicu u kojoj se nalazi 5 mL otopine ABTS-a. Sadržaj tikvice se dobro promiješa, zatvori, obloži aluminijskom folijom i ostavi stajati 12-16 sati pri sobnoj temperaturi. Stajanjem, intenzitet plavo-zelene boje se pojačava.)

2. dan:

Na dan provođenja svih analiza priprema se 1%-tna otopina $ABTS^{\cdot+}$ (1 mL $ABTS^{\cdot+}$ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 96%-im etanolom do oznake). Nakon toga mjeri se apsorbanca 1%-ne otopine $ABTS^{\cdot+}$ pri 734 nm koja mora iznositi 0,70 ± 0,02. Ako apsorbanca otopine ne iznosi 0,734 onda ju je potrebno namjestiti, odnosno ako je apsorbanca premala, u tikvicu od 100 mL pripremljene 1%-ne otopine $ABTS^{\cdot+}$ treba dodati još par kapi stabilne $ABTS^{\cdot+}$ otopine, a ako je apsorbanca prevelika onda otopinu treba razrijediti, odnosno, u tikvicu (100 mL) dodati još 96%-tnog etanola. Isti dan kada se pripremi 1%-tna stabilna otopina $ABTS^{\cdot+}$ s podešenom apsorbancom na 0,70 ± 0,02 treba napraviti i sve analize uzoraka (i baždarni pravac ako je to potrebno) jer je $ABTS^{\cdot+}$ otopina nestabilna i nepostojana već unutar 24 sata.

Postupak određivanja (spektrofotometrijski):

160 µL uzorka (ekstrakta) pomiješa s 2 mL 1%-tne otopine $ABTS^{\cdot+}$ te se nakon 1 min mjeri apsorbanca pri 734 nm. Za slijepu probu se koristi 96%-tni etanol. Konačne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka izračunavaju se iz jednadžbe baždarnog pravca otopine Troloxa izražene kao µmolTE L-1. Za izradu baždarnog pravca u ABTS metodi koristi se Trolox (Sigma Aldrich, SAD) koji uzrokuje smanjenje boje $ABTS^{\cdot+}$ otopine. Točke određene za izradu baždarnog pravca su sljedeće: 0, 100, 200, 400, 1000, 2000 i 2500 µmol L-1. Prvo se pripremi „stock“ otopina i to tako da se u odmjernu tikvicu od 25 mL izvaže 0,0156 Trolox-a, a tikvica se 80%-tnim etanolom nadopuni do oznake. Iz „stock“ otopine pripremaju se ostala razrjeđenja. Nakon pripreme navedenih koncentracija otpipetira se 160 µL pojedine razrijeđene otopine Trolox-a i doda 2 mL 1%-tne $ABTS^{\cdot+}$ otopine, te se mjeri apsorbanca pri 734 nm.

3.6. Određivanje boje CIELAB metodom

Intenzitet boje utvrđivao se pomoću ColorTec PCM+ kolorimetra, odnosno CIELAB metodom. Ovom metodom se energija iz uzorka pomoću filtera pretvara u psihofizikalno funkciju, odnosno boju. Kolorimetar je fotolektrični tristimulusni uređaj što znači da se boje na njemu opisuju pomoću tri brojčane vrijednosti: L^*, a^* i b^*.

Vrijednost L^* označava intenzitet svjetla ili tame. Ako je vrijednost $L^* = 0$ tada nema refleksije što upućuje na prisutnost crne boje, a ako je $L^* = 100$ tada se radi o

bijeloj boji i refleksija je najveća. Vrijednost a^* označava intenzitet crvene ili zelene boje, stoga negativne vrijednosti ($-a^*$) ukazuju na prisutnost zelene boje, a pozitivne vrijednosti ($+a^*$) ukazuju na prisutnost crvene boje. Vrijednost b^* označava intenzitet žute ili plave boje, stoga negativne vrijednosti ($-b^*$) ukazuju na prisutnost plave boje, a pozitivne vrijednosti ($+b^*$) ukazuju na prisutnost žute boje.

3.7. Određivanje vitamina C

Princip određivanja:

2,6-diklorfenolindofenol oksidira L-askorbinsku kiselinu u dehidroaskorbinsku kiselinu, dok boja reagensa ne prijeđe u bezbojnu leukobazu, pa služi istovremeno i kao indikator ove redoks reakcije. Ova se metoda primjenjuje za određivanje askorbinske kiseline u proizvodima od voća i povrća (AOAC, 2002.).

Aparatura i pribor:

- tehnička vaga
- odmjerna tikvica volumena 100 mL
- čaša volumena 100 mL
- lijevak
- filtar papir
- Erlenmeyerova tikvica
- bireta

Kemikalije:

- oksalna kiselina (2%)
- 2,6-diklorfenolindofenol (svježe pripremljen)

Postupak određivanja:

Na odmjernu tikvicu od 100 mL postavlja se običan lijevak te se preko njega u tikvicu izvaže 10 g uzorka na tehničkoj vagi (s točnošću ±0,01). Takav uzorak kvantitativno se prenosi u tikvicu pomoću 2%-tne otopine oksalne kiseline. Tikvica se zatim dopunjuje do oznake otopinom oksalne kiseline (2%).

Račun:

Sadržaj iz odmjerne tikvice se profiltrira, a dobiveni filtrat dalje se koristi za određivanje askorbinske kiseline. Otpipetira se 10 mL filtrata u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 50 mL i titrira otopinom 2,6-diklorfenolindolfenola do pojave ružičaste boje koja mora biti postojana barem pet sekundi. Iz volumena 2,6-136 diklorfenolindofenola utrošenog za titraciju filtrata, izračuna se količina L-askorbinske kiseline (vitamina C) u uzorku, koja se izražava u mg/100g svježe mase.

$$Vitamin\ C\ (mg/100g\ svježe\ tvari) = \frac{V\ \times F}{D} \times 100$$

gdje je:
V - mL utrošenog 2,6-diklorindofenola pri titraciji
F* - faktor otopine 2,6-diklorindofenola
D - masa uzorka u filtratu u gramima

Određivanje faktora otopine 2,6-diklorfenolindolfenola:
Za određivanje faktora otopine 2,6-diklorfenolindofenola potrebno je napraviti otopinu askorbinske kiseline koja se titrira otopinom 2,6-diklorfenolindofenola. Prema očitanom volumenu potrebnog 2,6-diklorfenolindofenola izračunava se faktor te otopine. U odmjernu tikvicu od 50 mL na analitičkoj vagi odvagne se ±0,0100 g askorbinske kiseline, a tikvica nadopuni do oznake 2%-tnom otopinom oksalne kiseline. U Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL otpipetira se 5 mL 2%-tne otopine oksalne kiseline i 5 mL pripremljene otopine askorbinske kiseline te se titrira otopinom 2,6-diklorfenolindofenola do pojave ružičaste boje koja mora biti postojana. Iz podatka utrošenog volumena otopine 2,6-diklorfenolindofenola potrebnog za titraciju određene mase askorbinske kiseline izračuna se faktor (F) otopine 2,6-diklorfenolindofenola.

3.8. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu metoda zasniva se na obojenoj reakciji koju fenoli razvijaju s Folin-Ciocalteu reagensom (Slika 4.3.1.). Naime, Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdene kiseline, koje se pri oksidaciji fenolnih spojeva iz uzorka reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavog obojenja. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektorfotoemtrijski pri valnoj duljini od 750 nm (Ough i Amerine, 1988.).

Aparatura i pribor:
- tehnička vaga (s točnošću ±0,01)
- konusna tikvica
- odmjerna tikvica (50 i 100 mL)
- obični lijevak
- filtar papir
- povratno hladilo
- pipete (1, 2, 5, 10 i 25 mL)
- kivete
- spektrofotometar

Kemikalije:
- etanol (80%)

- Folin-Ciocalteu reagens
- zasićena otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Postupak određivanja:

a) Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca odvaže se 500 mg galne kiseline, otopiti u 80%-om etanolu i nadopuni se u odmjernoj tikvici od 100 mL do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline pripreme se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL, tako da se otpipetira redom 0, 1, 2, 3, 5 i 10 mL standarda (stock otopina) u svaku tikvicu, a potom tikvica nadopuni do oznake 80%-im etanolom. Koncetracije galne kiseline u tikvicama iznose 0, 50 ,100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 0,5 mL uzorka u odmjerne tikvice od 50 mL. Potom se u tikvice redom doda: 30 mL destilirane vode i 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog u omjeru 1:2 destiliranom vodom), potom se takvu otopinu ostavi stajati 3 min, a potom se doda 7,5 mL otopine zasićenog natrijeva karbonata. Sadržaj tikvica se dobro promućka i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Uzorci se ostave stajati 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon što su uzorci odstajali mjeri se apsorbanca otopina na spektrofotometru pri valnoj duljini od 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

b) Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzorka voća ili povrća

Na tehničkoj vagi odvaže se 10 g uzroka s točnošću ±0,01 i homogenizira s 40 mL 80%- tnog etanola. Homogenu smjesu se kuha 10 min uz povratno hladilo te se dobiveni ekstrakt filtrira u odmjernu tikvicu od 100 mL preko naboranog filtar papira. Zaostali talog zajedno s filtar papirom ponovno se prebaci u tikvicu sa šlifom, doda se 50 mL 80%-tnog etanola i uz povratno hladilo se kuha još 10 min. Dobiveni ekstrakt se spoji s prethodno dobivenim ekstraktom te se odmjerna tikvica nadopuni do oznake 80%-im etanolom. U odmjernu tikvicu od 50 mL se otpipetira 0,5 mL ekstrakta i redom doda: 30 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog u omjeru 1:2 destiliranom vodom) i 7,5 mL otopine zasićenog natrijeva karbonata. Sadržaj tikvice se dobro promućka i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Uzorci se ostave stajati 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon što su uzorci odstajali izmjeri se apsorbanca otopina pri valnoj duljini od 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

3.9. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida i neflavonoida

Za taloženje flavonoidnih fenolnih spojeva preporuča se upotreba formaldehida. Formaldehid reagira s C-6 ili C-8 pozicijom na 5,7-dihidroksiflavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojevima također na C-6 ili C-8 poziciji. Pri tome nastaju kondenzirane molekule koje se uklone filtriranjem. Ostatak neflavonoidnih fenola određuje se po metodi za ukupne fenole (Ough i Amerine, 1988.). Razlika ukupnih fenola i neflavonoida daje količinu flavonoida.

Aparatura i pribor:

- filtar papir
- stakleni lijevci
- Erlenmeyerova tikvica sa šlifom i čepom volumena 25 mL
- pipete volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- analitička vaga
- staklene kivete
- spektrofotometar (Schimadzu UV 1650 PC)

Kemikalije:

- klorovodična kiselina, HCl 1:4 (konc. HCl razrijedi se vodom u omjeru 1:4)
- formaldehid (13 mL 37%-tnog formaldehida u 100 mL vode)
- dušik za propuhivanje uzoraka
- zasićena otopina natrijeva karbonata
- Folin-Ciocalteu reagens
- 80%-tni etanol

Priprema uzoraka: ekstrakt ukupnih fenola koristi se i za određivanje flavonoida i neflavonoida.

Postupak određivanja: otpipetira se 10 mL ekstrakta u tikvicu od 25 mL i doda 5 mL otopine HCl (1:4) te 5 mL formaldehida. Smjesa se propuše dušikom, zatvori i ostavi stajati 24 sata na sobnoj temperaturi u mraku. Sljedeći dan se profiltrira preko filtar papira i slijedi isti postupak kao za određivanje ukupnih fenola.

Račun: koncentracija neflavonoida izračunava se na isti način kao i koncentracija ukupnih fenola uzimajući u obzir i dodatna razrjeđenja. Iz razlike količine ukupnih fenola i neflavonoida odredi se količina ukupnih flavonoida.

3.10. Određivanje klorofila a, klorofila b i ukupnih klorofila

Osnovna uloga klorofila je apsorpcija svjetlosne energije koja se zatim u procesu fotosinteze pretvara u kemijsku energiju. Optičke osobine pigmentnih spojeva zasnivaju se na kemijskoj strukturi njihovih molekula. Apsorpcija vidljivog dijela spektra ovisi o prisustvu sustava konjugiranih dvostrukih veza u njihovim molekulama. Modrozeleni klorofil a i žutozeleni klorofil b apsorbiraju vidljivi dio spektra i imaju maksimume apsorpcije u crvenom (600-700 nm) i plavom (400-500 nm) dijelu spektra. Poznato je nekoliko validiranih metoda za određivanje klorofila u biljnim uzorcima. Klorofilni pigmenti određeni su spektrofotometrijski metodom po Holmu (1954.) i Wettsteinu (1957.). Cilj ove metode je određivanje koncentracije kloroplastnih

pigmenata (klorofil-a, klorofil-b i ukupnih klorofila a i b) u acetonskom ekstraktu biljnog materijala te preračunavanje koncentracije na mg/g svježe tvari.

Aparatura i pribor:

- vaga
- tarionik i tučak
- Büchnerov lijevak
- Erlenmeyerova tikvica (300 mL)
- vakum pumpa na vodeni mlaz
- odmjerna tikvica od 25 mL
- spektrofotometar (Shimadzu UV 1650 PC)

Kemikalije:

- aceton (p.a.)
- magnezijev karbonat ($MgCO_3$)

Priprema uzorka:

Uzorak mase 0,2 g svježih listova odvaže se u staklenu kivetu, doda se malo praha magnezijeva karbonata zbog neutralizacije kiselosti i ukupni volumen od 10 mL acetona u tri obroka. Uzorci su homogenizirani te profiltrirani preko običnog filtar papira. Filtrat koji sadrži sloj klorofila prebaci se u odmjernu tikvicu od 25 mL i nadopuni acetonom do oznake.

Postupak određivanja:

Očitanje klorofila provodi se na spektrofotometru pri valnim duljinama 662, 644 i 440 nm, a aceton se koristi za slijepu probu.

Račun:

Dobivene vrijednosti apsorbancije se uvrštavaju u Holm – Wettstein-ovu jednadžbu za izračunavanje koncentracije pigmenata u mg/dm³:

klorofil a = 9,784 × A662 − 0,990 × A644[mg/dm³],

klorofil b = 21,426 × A644 − 4,65 × A662[mg/dm³] ,

klorofil a + b = 5,134 × A662 + 20,436 × A644[mg/dm³],

karotenoidi = 4,695 × A440 – 0,268 ×(klorofil a+b) [mg/dm³].

Formula za izračunavanje koncentracije pigmenata u mg/g svježe tvari:

$$c\ (mg/g) = \frac{c_1 \times V}{m}$$

Gdje je:

c – masena koncentracija pigmenata izražena u mg/g svježe tvari

c1 – masena koncentracija pigmenata izražena u mg/dm³

V – volumen filtrata

m – masa uzorka izražena u mg.

3.11. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja statistički su obrađeni u programskom sustavu SAS, verzija 9.4 (SAS/STAT, 2010). Sve laboratorijske analize određivanja osnovnih kemijskih parametara, sadržaja bioaktivnih spojeva kao i antioksidacijskog kapaciteta provedene su u tri ponavljanja. Rezultati su podvrgnuti jednosmjernoj analizi varijance (ANOVA). Srednje su vrijednosti uspoređene t-testom (LSD) i smatraju se značajno različitim pri $p \leq 0,0001$. U tablicama uz rezultate prikazani su eksponenti različitih slova koja označavaju grupe uzoraka. Također, uz rezultate i eksponente u tablicama izražena je i standardna devijacija (±s) kojom je prikazano prosječno odstupanje rezultata od srednje vrijednosti za pojedini kemijski parametar.

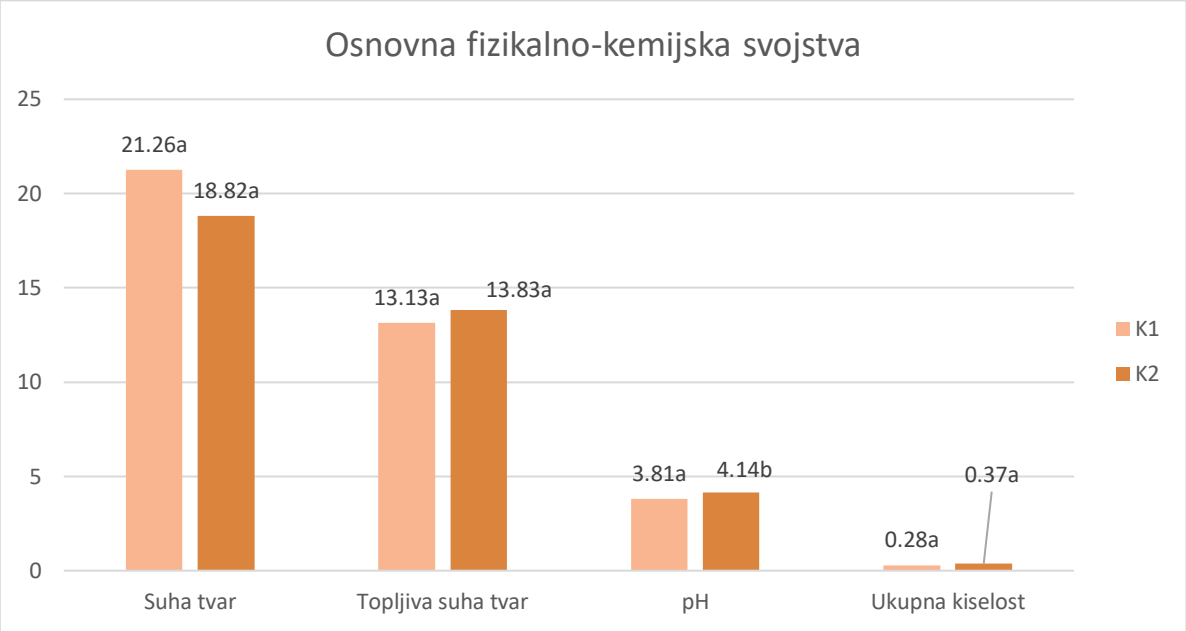
4. Rezultati i rasprava istraživanja

U Grafikonu 4.1. prikazani su rezultati fizikalno-kemijskih svojstava analiziranih uzoraka jabučne komine. Prema provedenoj statističkoj analizi, uzorci jabučnih komina K1 i K2 međusobno se signifikantno razlikuju jedino u sadržaju ukupnih kiselina, dok između ostalih analiziranih fizikalno-kemijskih svojstava nisu utvrđene značajne razlike. Nešto veći sadržaj suhe tvari utvrđen je u uzorku jabučne komine K1, odnosno komine prikupljene iz pogona Proizvodnja Jurišić d.o.o., a iznosio je 21,26%, u usporedbi s uzorkom komine K2 (iz pogona Fragaria d.o.o.) u kojem je utvrđen nešto niži sadržaj ukupne suhe tvari (18,82%). Navedene razlike u sadržaju ukupne suhe tvari mogu se povezati s randmanom, odnosno iskoristivosti dobivanja soka prilikom prerade jabuka, a prilikom čega je utvrđeno kako je u pogonu Proizvodnja Jurišić d.o.o. randman za dobivanje soka nešto veći, a time i manji sadržaj vode, odnosno veći sadržaj ukupne suhe tvari u komini. Takav uzorak s većim sadržajem suhe tvari može se smatrati i nutritivno kvalitetnijim s obzirom na činjenicu kako u suhoj tvari zaostaju i vrijedne fitokemikalije poput vitamina, minerala, polifenola i ostalih (Katalinić, 2006.). Također, važno je naglasiti kako će i jabučna komina s manjim sadržajem vode biti i povoljnija za daljnje postupke oporabe, iskorištavanja za dobivanje novih proizvoda, a prvenstveno zato jer manjim sadržajem vode sirovina nije tako podložna kvarenju (razvoju mikroorganizama), olakšana je manipulacija njome, a ponajviše ukoliko se primjenjuju postupci predtretmana komine poput sušenja, a prilikom čega će i sušenje trajati kraće.

Također, uzorci se po sadržaju topljive suhe tvari značajno ne razlikuju, a ona prosječno iznosi 13,48%. Usporedbom rezultata topljive suhe tvari zabilježenim u uzorcima komine s drugim literaturnim navodima, može se utvrditi kako se dobivene vrijednosti poklapaju s onima iz drugi istraživanja, a koja su se primarno odnosila na određivanje topljive suhe tvari u pojeidnim sortama jabuka zastupljenim u kominama istraživanim u sklopu ovog rada (Šic Žlabur i sur., 2013.; Dan i sur., 2015.; Michailidis i sur., 2021.).

Uzorak iz pogona Proizvodnja Jurišić d.o.o. imao je nižu pH vrijednost (3,81) od uzorka iz pogona Fragaria d.o.o. (4,14), a koji su prema provedenoj statističkoj analizi značajno različiti. Pregledom ostalih istraživanja, od svih sorti zastupljenih u uzorcima komina, najnižu pH vrijednost ima sorta 'Granny Smith' koja u prosjeku iznosi 3,2, a budući da je spomenuta sorta u većem udjelu zastupljena u uzorku komine K1 razumljivo je da uzorak K1 ima nižu pH vrijednost u usporedbi s uzorkom K2 (Šic Žlabur i sur., 2013.; Mezey i Serralegri, 2017.).

Uzorak jabučne komine K2, iz pogona Fragaria d.o.o., imao je višu vrijednost sadržaja ukupnih kiselina (0,37%) u odnosu na uzorak komine K1 (0,28%) , a statističkom analizom utvrđeno je kako se oni značajno ne razlikuju. Dobiveni rezultati su očekivani s obzirom na to kako sorte zastupljene u komini K2 (za potrebe proizvodnje soka) sadržavaju veći udio onih s izraženim sadržajem kiselina poput 'Cripps Pink' i ' Granny Smith' (Ghafir i sur., 2009.; Šic Žlabur i sur., 2013.; Eisenstecken i sur., 2015.).



Različita slova prikazuju značajne statističke razlike između srednjih vrijednosti pri p≤0,0001.

Grafikon 4.1. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva uzoraka jabučne komine

Kromatski parametri, odnosno parametri boje analiziranih uzoraka jabučne komine prikazani su u tablici 4.1. L* i a* vrijednosti statistički se značajno ne razlikuju između uzoraka komine. Vrijednosti boje b značajno se statistički razlikuju, s time da uzorak komine K1 ima veću vrijednost žute boje u odnosu na uzorak K2, što je očekivano s obzirom na to kako je to objenje karakteristično za sorte 'Granny Smith' i 'Golden Delicious', koje su značajno zastupljene u uzorku komine K1 (Drogoudi i sur., 2007.). Vrijednosti C i h° (Chroma i hue) također se statistički značajno razlikuju, što se može objasniti različitošću boja sorti obuhvaćenih u oba uzorka (sorta 'Grany Smith' je zelena i svjetlija, 'Golden Delicious' je žućkasta, 'Cripps Pink' i 'Idared' su crvenkaste sorte, a 'Gala' je svjetla, prošarana). Također, navedene sorte razlikuju se i u boji pulpe (Henríquez i sur., 2010.).

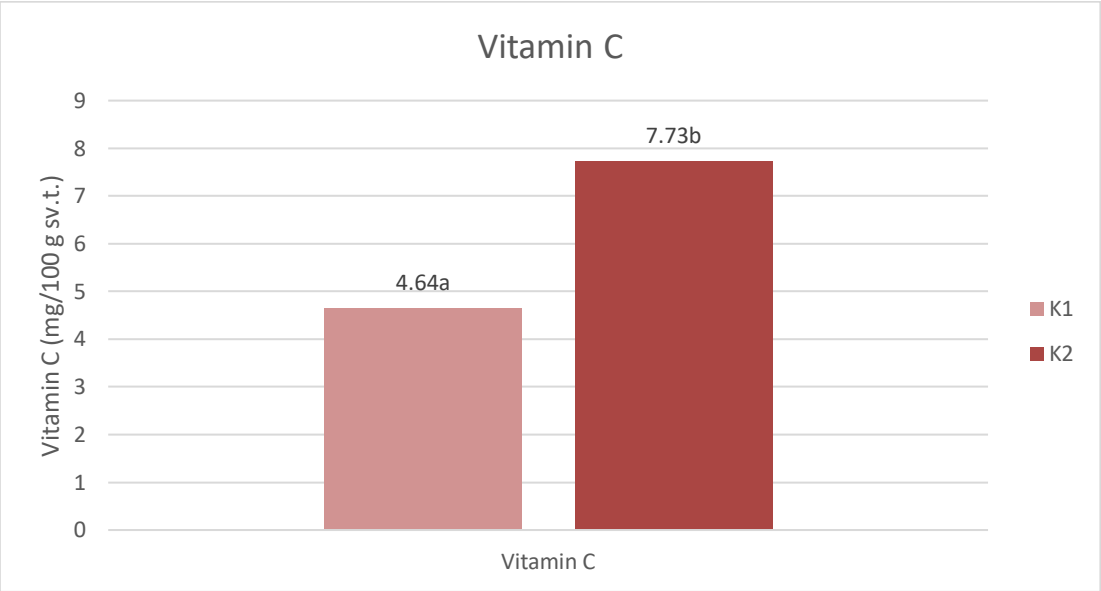
Tablica 4.1. Kromatski parametri uzoraka jabučne komine.

UZORAK	L*	a*	b*	C	h°
	p≤0,3364	p≤0,0368	p≤0,0017	p≤0,0095	p≤0,0020
K1	40,73^{a}±3,19	10,77^{a}±1,06	26,35^{a}±0,78	28,47^{a}±0,99	67,78^{a}±1,78
K2	38,62^{a}±0,99	12,67^{a}±0,09	21,98b±0,64	25,37^{b}±0,59	60,03^{b}±0,59

Različita slova prikazuju značajne statističke razlike između srednjih vrijednosti pri p≤0,0001.

U grafikonu 4.2. prikazane su vrijednosti sadržaja vitamina C u istraživanim uzorcima komine. Prema provedenoj statističkoj analizi, uzorci komine značajno se razlikuju (p≤0,0001) u sadržaju vitamina C. Veće vrijednosti vitamina C imao je uzorak komine K2 (7,72 mg/100 g svježe tvari) i to čak oko 66% više vrijednosti od onih utvrđenih u uzorku komine K1 (4,64 mg/100 g svježe tvari). Veće vrijednosti vitamina

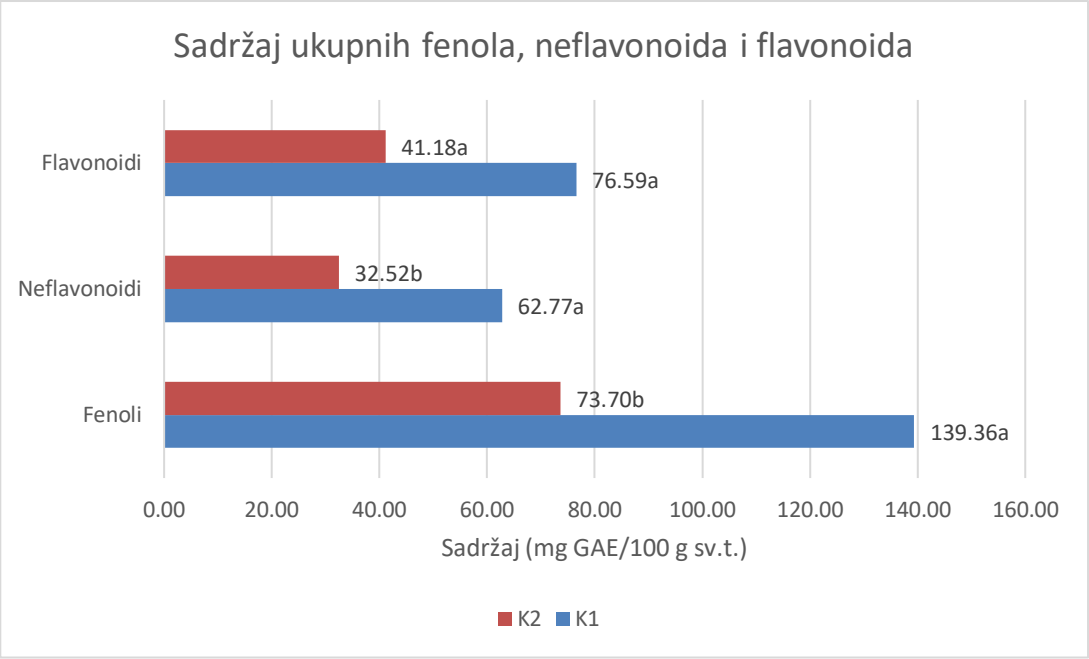
C u uzorku komine K2 mogu se objasniti činjenicom da je vitamin C topljiv u vodi, a upravo je u uzorku komine K2 utvrđen veći udio vode. Izuzev toga, sorte 'Granny Smith' i 'Golden delicious' općenito imaju manji sadržaj vitamina C od sorti 'Idared' i 'Cripps Pink', a koje su zastupljene u uzorku K2 (Nour i sur., 2010; Šic Žlabur i sur., 2013.).



Različita slova prikazuju značajne statističke razlike između srednjih vrijednosti pri p≤0,0001.

Grafikon 4.2. Sadržaj vitamina C u uzorcima jabučne komine

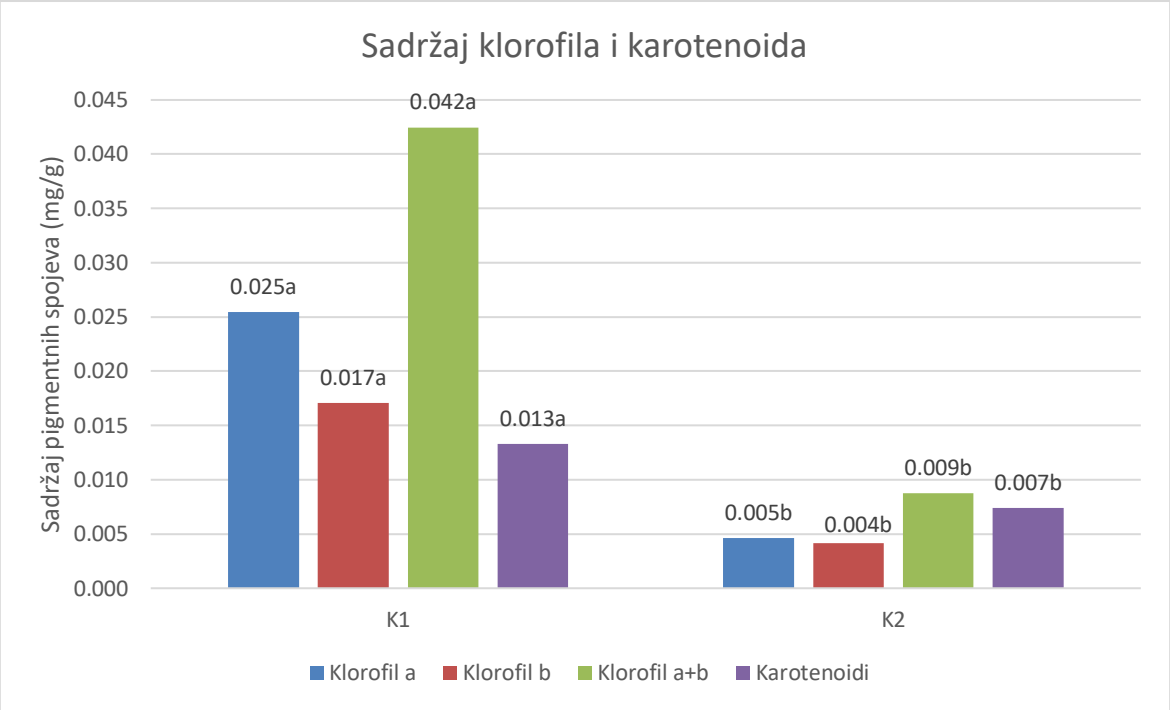
Sadržaj ukupnih fenola, neflavonoida i flavonoida analiziranih uzoraka jabučne komine prikazani su u grafikonu 4.3. Prema provedenoj statističkoj analizi, oba uzorka komine značajno se razlikuju u sadržaju ukupnih fenola i neflavonoida, dok u sadržaju ukupnih flavonoida nisu utvrđene značajne razlike. Viši sadržaj svih analiziranih polifenolnih spojeva utvrđen je za uzorak komine K1 u usporedbi s uzrokom komine K2. Primjerice, uzorak K1 ima čak 89% više ukupnih fenola, 93% više neflavonoida i 86% više flavonoida u odnosu na uzorak K2. Sortno gledano, dobiveni rezultati sadržaja pojedinih polifenolnih spojeva odgovaraju drugim istraživanjima. Naime, sorte 'Granny Smith' i 'Golden Delicious' ističu se visokim sadržajem polifenola (Łata i sur., 2009.). Također, važno je spomenuti kako oba uzorka jabučne komine imaju visok sadržaj polifenola, a čemu je glavni razlog taj što je većina polifenolnih spojeva jabuke zastupljena kori, a koja je sastavni dio oba uzoraka komine (Michailidis i sur., 2021.).



Različita slova prikazuju značajne statističke razlike između srednjih vrijednosti pri p≤0,0001.

Grafikon 4.3. Sadržaj fenola, neflavonoida i flavonoida u uzorcima jabučne komine

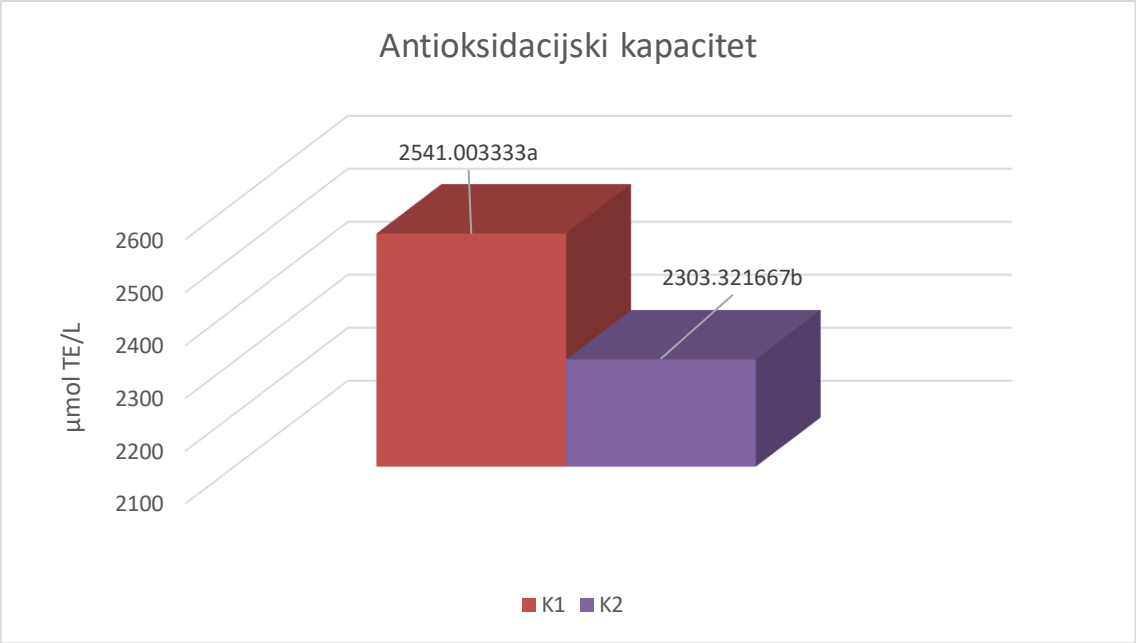
Analizirani pigmenti spojevi: klorofil a, klorofil b, ukupni klorofili i ukupni karotenoidi uzoraka jabučne komine prikazani su u grafikonu 4.4. Veće vrijednosti ukupnih klorofila i karotenoida zabilježeni su u uzorku komine K1, pri čemu je najveća razlika zabilježena u vrijednostima karotenoida koje su čak za 55% veće u odnosu na vrijednosti karotenoida u uzorku komine K2. S obzirom na boju kore ploda jabuka sorti 'Granny Smith' (zelena) i 'Golden Delicious' (zeleno-žućkasta), a koje su zastupljenije u uzorku komine K1 rezultati većeg sadržaja ukupnih klorofila u tom uzorku su i očekivani. Također, prema ostalim literaturnim navodima, sorte 'Cripps Pink' i 'Gala' (zastupljene u uzorku K2) ističu se višim sadržajem ukupnih karotenoidima u odnosu na sorte 'Granny Smith' i 'Golden Delicious', (Delgado-Pelayo i sur., 2014.).



Različita slova prikazuju značajne statističke razlike između srednjih vrijednosti pri p≤0,0001.

Grafikon 4.4. Sadržaj klorofila i karotenoida u uzorcima jabučne komine.

Dobivene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta značajno se statistički razlikuju između uzoraka jabučne komine (grafikon 4.5.) Naime, utvrđene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u oba uzorka komine iznimno su visoke, a otprilike 10% veća vrijednost zabilježena je u uzorku komine K1 u usporedbi s uzorkom K2. Budući da vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta značajno ovise o sadržaju bioaktivnih spojeva, posebice fenola (očekivano je kako su u uzorku komine K1, a koji je imao i veći sadržaj ukupnih fenola, utvrđene i veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Uz to, sorte 'Granny Smith' i 'Golden Delicious' prema drugim literaturnim navodima imaju veći antioksidacijski kapacitet u uspredbi sa sortama 'Idared' i 'Gala' (Duda-Chodak i sur., 2010; Mitić i sur., 2013.).



Različita slova prikazuju značajne statističke razlike između srednjih vrijednosti pri p≤0,0001.

Grafikon 4.5. Antioksidacijski kapacitet uzoraka jabučne komine

5. Zaključak

Uzorak jabučne komine iz pogona Proizvodnja Jurišić d.o.o. (K1) može se smatrati nutritivno kvalitetnijim od uzorka iz pogona Fragaria d.o.o. (K2). Naime, uzorak komine K1 ima veći sadržaj suhe tvari, niži pH, veće vrijednosti ukupnih klorofila i karotenoida, veći sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida kao i veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na uzorak K2. S druge strane, uzorak komine K2 ima veći sadržaj ukupnih kiselina, topljive suhe tvari i vitamina C.

Temeljem dobivenih rezultata, odnosno visokih utvrđenih vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava i sadržaja pojedinih fitokemikalija, oba uzorka jabučne komine mogu se smatrati važnom sirovinom, a koja bi lako pronašla ulogu nusproizvoda u različitim industrijama. Različiti spojevi koji su utvrđeni u analiziranim uzorcima jabučne komine, poput vitamina C ili fenolnih spojeva, mogu se ekstrahirati i koristiti u farmaceutskoj, prehrambenoj ili kozmetičkoj industriji. Također, jabučna komina može se podlijeći predtretmanima poput sušenja i koristiti kao brašno u prehrambenoj industriji. Ne smije se zanemariti niti činjenica da se iz jabučne komine fermentacijom mogu dobiti i različita alkoholna pića, a s obzirom kako su u oba uzorka komine utvrđene visoke vrijednosti topljive suhe tvari. Također, temeljem utvrđenog povoljnog nutritivnog sastava (visok sadržaj vitamina i ostalih fitokemikalija) analizirani uzorci jabučne komine mogu se smatrati potencijalnim dodatkom u hranidbi životinja.

I na kraju, temeljem svega, može se zaključiti kako je jabučna komina vrijedan nusproizvod koji se prije svega može koristiti u brojne svrhe oporabe, a tek onda klasificirati kao otpad i takav zbrinjavati.

6. Popis literature

1. Abdollahzadeh F., Pirmohammadi R., Fatehi F. i Bernousi I. (2010): Effect of feeding ensiled mixed tomato and apple pomace on performance of holstein dairy cows. Slovak Journal of Animal Science, 43(1): 31-35.
2. Ačkar Đ., Jozinović A., Babić J., Miličević B. Panak Balentić J. i Šubarić D. (2018): Resolving the problem of Poor Expansion in Corn Extrudates Enriched with Food Industry By-Products. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 47: 517-524.
3. Ajila C. M., Sarma S. J., Brar S. K., Godbout S., Cote M., Guay F., Verma M. i Valéro J. R. (2015): Fermented Apple Pomace as a Feed Additive to Enhance Growth Performance of Growing Pigs and Its Effects on Emissions. Agriculture, 5: 313-329.
4. Alarcon-Rojo A. D., Lucero V., Carillo-Lopez L. i Janacua H. (2019): Use of apple pomace in animal feed as an antioxidant of meat. South African Journal of Animal Science, 49(1):131-139.
5. Albuquerque P. M., Koch F., Trossini T. G., Esposito E. i Ninow J. L. (2006): Production of Rhizopus oligosporus protein by solid state fermentation of apple pomace. Brazilian Archives of Biology and Technology, 49: 91-100.
6. Antonić B., Jancikova S., Dordevic D. i Tremlova B. (2020): Apple pomace as food fortification ingredient: A systematic review and meta-analysis. Journal of Science, 85(10): 2977-2985.
7. Attri D. i Joshi V. K. (2006): Optimization of apple pomace based medium and fermentation conditions for pigment production by *Chromobacter sp*. Journal of Food Science and Technology, 43: 484-487.
8. Barreira J. C., Arraibi A. A. i Ferreira I. C. (2019): Bioactive and functional compounds in apple pomace from juice and cider manufacturing: Potential use in dermal formulations. Trends in Food Science and Technology, 90: 76-87.
9. Berovic M. i Ostroversnik H. (1997): Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. Journal of Biotechnology, 53: 47-53.
10. Bhushan S. i Joshi V. K. (2006): Baker's yeast production under fed batch culture from apple pomace. Journal of Scientific and Industrial Research, 65: 72-76.
11. Bhushan S., Kalia K., Sharma M., Singh B. i Ahuja P. S. (2008): Processing of Apple Pomace for Bioactive Molecules. Critical Reviews in Biotechnology, 28: 285-296. Doi: 10.1080/07388550802368895.
12. Bobek P., Ozdín L. i Hromadová M. (1998): The effect of dried tomato, grape and apple pomace on the cholesterol metabolism and antioxidative enzymatic system in rats with hypercholesterolemia. Nahrung, 42: 317-320.
13. Boyer J. i Liu R. H. (2004): Apple phytochemicals and their health benefits. Nutrition Journal, 3: 1-15.
14. Bramorski A., Soccol C. R., Christen P. i Revah S. (1998): Fruit aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agroindustrial wastes. Revista de Microbiologia, 28: 208-212.

15. Candrawinata V. I., Golding J. B., Roach P. D. i Stathopoulos C. E. (2015): Optimisation of the phenolic content and antioxidant activity of apple pomace aqueous extracts. CyTA – Journal of Food, 13(2): 293-299.
16. Carson K., Collins J. i Penfield M. (1994): Unrefined, dried apple pomace as a potential food ingredient. Journal of Food Science, 59: 1213-1215.
17. Christen P., Bramorski A., Revah S. i Soccol C. R. (2000): Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agroindustrial solid wastes. Bioresource Technology, 71: 211-215.
18. Dan C., Şerban C., Sestras A. F., Militaru M., Morariu P. i Sestras R. E. (2015): Consumer Perception Concerning Apple Fruit Quality, Depending on Cultivars and Hedonic Scale of Evaluation – a Case Study. Notulae Scientia Biologicae, 7(1): 140-149.
19. Delgado-Pelayo R., Gallardo-Guerrero L. i Hornero-Méndez D. (2014): Chlorophyll and carotenoid pigment sin the peel and flesh of commercial apple fruit varieties. Food Research International, 65: 272-281.
20. Dhillon G. S., Kaur S. i Brar S. K. (2013): Perspective of Apple Processing wastes as Low-Cost Substrates for Bioproduction of High Value Product: A Review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 27: 789-805.
21. Drogoudi P. D., Michailidis Z. i Pantelidis G. (2007): Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. Scientia Horticulturae, 155: 149-153.
22. Duda-Chodak A., Tarko T., Satora P., Sroka P. i Tuszyński T. (2010): The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(2): 39-50.
23. Eisenstecken D., Panarese A., Robatscher P., Huck C. W., Zanella A. i Oberhuber M. (2015): A Near Infrared Spectroscopy (NIRS) and Chemometric Approach to Improve Apple Fruit Quality Management: A Case Study on the Cultivars “Cripps Pink” and “Braeburn”. Molecules, 20: 13603-13619.
24. Evcan E. i Tari C. (2015): Production of bioethanol from apple pomace by using cocultures: Conversion of agro-industrial waste to value added product. Energy, 88: 775-782.
25. Ghafir S. A. M., Gadalla S. O., Murajei B. N. i El-Nady M. F. (2009): Physiological and anatomical comparison between four different apple cultivars under cold-storage conditions. African Journal of Plant Science, 3(6): 133-138.
26. FAOSTAT (2021a). Production quantities of Apples. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC (pristupljeno 21.3.2021.).
27. FAOSTAT (2021b). Quantities of processed crops. http://www.fao.org/faostat/en/#data/SD (pristupljeno 31.3.2021.).
28. Femenia A., Lefebvre A. C., Thebaudin J. Y., Robertson J. A. i Bourgeois C. M. (1997): Physical and sensory properties of model foods supplemented with cauliflower fiber. Journal of Food Science, 62(4): 635-639.
29. Fernandes P. A. R., Silva A. M. S., Evtugnin D. V., Nunes F. M., Wessel D. F., Cardoso S. M. i Coimbra M. A. (2019b): The hydrophobic polysaccharides of apple pomace. Carbohydrate Polymers, 223:115132.

30. Fernandes P.A.R., Ferreira S.S., Bastos R., Ferreira I., Cruz M.T., Pinto A., Coelho E., Passos C.P., Coimbra M.A., Cardoso S.M. i Wessel D.F. (2019a): Apple pomace extract as a sustainable food ingredient. Antioxidants, 8, 189. doi:10.3390/antiox8060189.
31. Figuerola F., Hurtado M. L., Estévez A. M., Chifelle I. i Asenjo F. (2005): Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fiber sources for food enrichment. Food Chemistry, 91: 395-401.
32. Franquin-Trinquier S., Maury C., Baron A., Le Meurlay D. i Mehinagic E. (2014): Optimization of the extraction of apple monomeric phenolics based on response surface methodology: comparison of pressurized liquid–solid extraction and manual-liquid extraction. Journal of Food Composition and Analysis, 34(1): 56–67.
33. Gómez M. i Martinez M. M. (2018): Fruit and Vegetable By-Products as Novel Ingredients to Improve the Nutritional Quality of Baked Goods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58: 2119-2135.
34. Hang Y. D. i Woodams E. E. (1994a): Apple pomace: a potential substrate for production of β-glucosidase by *Aspergillus foetidus*. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 27: 587-589.
35. Hang Y. D. i Woodams E. E. (1994b): Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 27: 194-196.
36. Hang Y. D. i Woodams E. E. (1995): β-fructofuranosidase production by Aspergillus species from apple pomace. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 28: 340-342.
37. Hang Y. D., Lee C. Y., Woodams E. E. i Cooley H. J. (1981): Production of Alcohol from Apple Pomace. Applied and Enviromental Microbiology, 42:1128-1129.
38. Henríquez C., Almonacid S., Chiffelle I., Valenzuela T., Araya M., Cabezas L., Simpson R. i Speisky H. (2010): Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. Chilean Journal of Agricultural Research, 70(4): 523-536.
39. Hijosa- Valsero M., Paniagua-García A. I. i Díez-Antolínez R. (2017): Biobutanol production from apple pomace: importance of pretreatment methods on the fermntability of lignocellulosic agro-food wastes. Applied Microbiology and Biotechnology, 101: 8041-8052.
40. Holm, G. (1954). Chlorophyll mutations in barley. Acta Agriculturae Scandinavica, 4: 457-471.
41. Holst P. S., KjØniksen A., Bu H., Saude S. A. i Nyström B. (2006): Rheological properties of pH-induced association and gelation of pectin. Polymer Bulletin, 56: 239-246.
42. Huc-Mathis D., Journet C., Fayolle N. i Bosc V. (2019): Emulsifying properties of Food By-Products: Valorizing Apple Pomace and Oat Bran. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 568: 84-91.
43. Jannati N., Hojjatoleslamy M., Hosseini E., Mozafari H. R. i Siavoshi M. (2018): Effect of Apple Pomace Powder on Rheological Properties of Dough and Sangak Bread Texture. Carpathian Journal of Food Science and Technology, 10: 77-84.

44. Jin Q., Qureshi N., Wang H. i Huang H. (2019): Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation of soluble and hydrolyzed sugars in apple pomace by *Clostridium beijerinckii* P260. Fuel, 244: 536-544.
45. Joshi V. K. i Sandhu D. K. (1996): Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid state fermentation of apple pomace. Bioresource Technology, 56: 251-255.
46. Joshi V. K., Parmar M. i Rana N. S. (2006): Pectin esterase production from apple pomace in solid-state and submerged fermentations. Food Technology and Biotechnology, 44: 253-256.
47. Jung J., Cavender G. i Zhao Y. (2015): Impingement Drying for Preparing Dried Apple Pomace Flour and Its Fortification in Bakery and Meat Products. Journal of Food Science and Technology, 52: 5568-5578.
48. Kalinowska M., Gryko K., Wróblewska A. M., Jabłońska-Trypuć A. i Karpowicz D. (2020): Phenolic content, chemical composition and anti-/pro-oxidant activity of Gold Milenium and Papierowka apple peel extracts. Scientific Reports, 10: 14951.
49. Katalinić V. (2006): Kemija mediteranskog voća i tehnologija prerade. Skripta, 1. dio. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. Sveučilište u Splitu.
50. Łata B., Trampczynska A. i Paczesna J. (2009): Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. Scientia Horticulturae, 121: 176-181.
51. Lauková M., Kohajdová Z. i Karovičová J. (2016): Effect of Hydrated Apple Powder on Dough Rheology and Cookies Quality. Potravinarstvo, 10(1): 506-511.
52. Lyu F., Luiz S.F., Perdomo Azeredo D.R., Cruz A.G., Ajlouni S., Senaka Ranadheera C. (2020): Apple Pomace as a Functional and Healthy Ingredient in Food Products: A Review. Processes, 8, 319.
53. Magyar M., da Costa Sousa L., Jin M., Sarks C. i Balan V. (2016): Conversion of apple pomace waste to ethanol at industrial relevant conditions. Applied Microbiology and Biotechnology, 100: 7349-7358.
54. Makarova E., Górnas P., Konrade I., Tirzite D., Cirule H., Gulbe A., Pugajeva I., Seglina D. i Dambrova M. (2015): Acute anti-hyperglycaemic effects of an unripe apple preparation containing phlorizin in healthy volunteers: a preliminary study. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95 (3): 560-568.
55. Masoodi F. A. i Chanhan G. S. (1998): Use of Apple Pomace as a Source of Dietary Fiber in Wheat Bread. Journal of Food Processing and Preservation, 22: 255-263.
56. McCan M. J., Gill C. I. R., O'Brien G., Rao J. R., McRoberts W. C., Hughes P., McEntee R. i Rowland I. R. (2007): Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis *in vitro*. Food and Chemical Toxicology, 45: 1224-1230.
57. Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L. F., Bresee J. S., Shapiro C., Griffin P. M. i Tauxe R. V. (1999): Food-Related Illness and Death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5(5): 607-625.
58. Medeiros A. B. P., Pandley A., Freitas R. J. S., Christen P. i Soccol C. R. (2000): Optimisation of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus*

in solid state fermentation using factorial design and responce surface methodology. Biochemical Engineering Journal, 6: 33-39.
59. Mezey J. i Serralegri D. (2017): Selected Qualitative and Quantitative Parameters Comparison of Apples from Bio- and Conventional Production. Acta Scientific Nutritional Health, 1(3): 23-29.
60. Michailidis M., Karagiannis E., Nasiopoulou E., Skodra C., Molassiotis A., Tanou G.(2021): Peach, Apple and Pear Fruit Quality: To Peel or Not to Peel? Horticulturae,7(4): 85.
61. Miller N. J. i Rice-Evans C. A. (1997): Factors Influencing the Antioxidant Activity Determined by the ABTS Radical Cation Assay. Free Radical Research, 26(3): 195-199.
62. Mitić S. S., Stojanović B. T., Stojković M. B., Mitić M. N. i Pavlović J. Lj. (2013): Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of different apple cultivars. Bulgarian Chemical Communications, 45(3): 326-331.
63. Molinuevo-Salces B., Riaño B., Hijosa-Valsero M., González-García I., Paniagua-García A. I., Hernández D., Garita-Cambronero J., Díez-Antolínez R., García-González M. C. (2020): Valorization of apple pomaces for biofuel production: A biorefinery approach. Biomass and Bioenergy, 142: 105785.
64. Musacchi S. i Serra S. (2018): Apple fruit quality: Overview on Pre-Harvest factors. Scientia Horticulturae, 234: 409-430.
65. Narodne novine (2015). Pravilnik o katalogu otpada. NN 90/15. Narodne novine d.d. Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_08_90_1757.html (pristupljeno 6.3.2021.).
66. Narodne novine (2017). Pravilnik o gospodarenju otpadom. NN 117/2017. Narodne novine d.d. Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2017_11_117_2708.html (pristupljeno 17.6.2021.).
67. Nour V., Trandafir I. i Ionica M. E. (2010): Compositional Characteristics of Fruits of several Apple (*Malus domestica* Borkh.) Cultivars. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38(3): 228-233.
68. O'Shea N., Arendt E. K. i Gallagher E. (2012): Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. Innovative Food Science and E,erging Technologies, 16: 1-10.
69. Othman S. B., Joudu I. i Bhat R. (2020): Bioactives from Agri-Food Wastes: Present Insights and Future Challenges. Molecules, 25(3): 510.
70. Ough, C.S., Amerine, M.A. (1988). Methods for analysis of musts and wines. J. Wiley & Sons. Washington.
71. Pericin D. M., Antov M. G. i Popov S. D. (1999): Simultaneous production of biomass and pectinases by *Polyporus squamosus*. Acta periodica Technologica, 29: 183-189.
72. Perussello C. A., Zhang Z., Marzocchella A. i Tiwari B. K. (2017): Valorization of Apple Pomace by Extraction of Valuable Compounds. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16: 776-796.

73. Pet ključeva sigurnosti hrane. Hrvatska agencija za hranu. (2021b) hah.hr/arhiva/5_kljuceva.php (pristupljeno 17.4.2021.).
74. Pieszka M., Gogol P., Petras M. i Pieszka M. (2015): Valuable compounds of dried pomaces of chokeberry, black currant, strawberry, apple and carrot as a source of natural oxidants and nutraceuticals in the animal diet. Annals of Animal Science, 15: 475-491.
75. Puntarić E., Kušević – Vukšić M., Kufrin J., Marić T. i Požgaj Đ. (2020). Izvješće o komunalnom otpadu za 2019. godinu. Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja, Zagreb. http://www.haop.hr/sites/default/files/uploads/inline-files/OTP_Izvje%C5%A1%C4%87e%20o%20komunalnom%20otpadu%20za%202019_5.pdf (pristupljeno 6.3.2021.).
76. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. i Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine, 26 (9/10); 1231-1237.
77. Reis S. F., Rai D. K. i Abu-Ghannam N. (2012): Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. Food Chemistry Journal, 135(3): 1991–1998.
78. Schieber A., Hilt P., Streker P., Endreb H. U., Rentschler C. i Carle R. (2003): A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 4: 99-107.
79. Shojaosadati S. A. i Babaeiopur V. (2002): Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. Process Biochemistry, 37: 909-914.
80. Skinner R.C., Gigliotti J.C., Ku K. i Tou J.C. (2018): A comprehensive analysis of the composition, health benefits, and safety of apple pomace. Nutrition Reviews, 0(0): 1-17.
81. Stredansky M. i Conti E. (1999): Xanthan production by solid state fermentation. Process Biochemistry, 34: 581-587.
82. Stredansky M., Conti E., Stredanska S. i Zanetti F. (2000): γ-Linolenic acid production with Thamnidium elegans by solid state fermentation on apple pomace. Bioresource Technology, 73: 41-45.
83. Streit F., Koch F., Trossini T. G., Laranjeira M. C. M. i Ninow J. L. (2004): An alternative process for the production of an additive for the food industry: chitosan. U: International Conference Engineering and Food – ICEF 9 – Montpellier, Francuska.
84. Sustavi kvalitete i sigurnosti hrane – HACCP. Hrvatska agencija za hranu. (2021a) hah.hr/arhiva/haccp.php (pristupljeno 18.4.2021.).
85. Šic Žlabur J., Voća S., Dobričević N., Pliestić S., Galić A. i Novak B. (2013): Nutritional Composition of Different Varieties of Apple Purees Sweetened with Green and White Stevia Powder. Agriculturae Conspectus Scientificus, 78(1): 57-63.
86. Ülger I., Kaliber M., Avasan T. i Kücük O. (2018): Chemical composition, organic matter digestibility and energy content of apple pomace silage and its combination

with corn plant, sugar beet pulp and pumpkin pulp. South African Journal of Animal Science, 48(3): 497-503.
87. Vendruscollo F., Esposito E., Albuquerque P. M., Streit F. i Ninow J. L. (2008): Apple pomace: A versatile substrate for biotechnological applications. Biotechnology, 28: 1-12.
88. Villas-Bôas S. G., Esposito E. i Mendonça M. M. (2002): Novel lignocellulolytic ability of *Candida utilis* during solid state cultivation on apple pomace. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18: 541-545.
89. Vityazev F. V., Fedyuneva M. I., Golovchenko V. V., Patova O. A., Ipatova E. U., Durnev E. A., Martinson E. A. i Litvinets S. G. (2017): Pectin-silica gels as matrices for controled drug release in gastrointestinal tract. Carbohydrate Polymers, 157: 9-20.
90. Waldbauer K., Kopp B. i McKinnon R. (2017): Apple pomace as potential source of natural active compounds. Planta Medica, 83: 994-1010.
91. Wang X., Kristo E. i La Pointe G. (2019): The effect of Apple Pomace on the Texture, Rheology and Microstructure of Set Type Yogurt. Food Hydrocolloids, 91: 83-91.
92. Wettstein, D. (1957). Chlorophyll letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. Experimental Cell Research,12:427–434.
93. World Health Organization – WHO (2006). Five Keys to Safer Food Manual. https://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys.pdf (pristupljeno 17.6.2021.).
94. Worrall J. J. i Yang C. S. (1992): Shiitake and Oyster Mushroom Production on Apple Pomace and Sawdust. HortScience, 27: 1131-1133.
95. Zakon o održivom gospodarenju otpadom. NN 94/13. narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_94_2123.html (pristupljeno 15.4.2021.).
96. Zheng Z. i Shetty K. (2000): Enchancement of pea (*Pisum sativum*) seedling vigour and associated phenolic content by extracts of apple pomace fermented with *Trichoderma spp*. Process Biochemistry, 36: 79-84.

Životopis

Nina Božurić rođena je 20. veljače 1995. godine u Zagrebu. U lipnju 2013. godine maturirala je u Ekonomskoj školi Velika Gorica sa odličnim uspjehom, a 2015. upisuje preddiplomski studij Ekološke poljoprivrede na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U rujnu 2019. godine stiče titulu sveučilišne prvostupnice ekološke poljoprivrede, nakon čega upisuje diplomski studij Obnovljivi izvori energije u poljoprivredi. U rujnu 2021. godine obranom diplomskog rada stječe titulu magistre inženjerke agronomije.