

Utjecaj sorte i načina pripreve soka od jabuke na antioksidacijsku aktivnost

Perović, Sandro

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:744424>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sandro Perović

UTJECAJ SORTE I NAČINA PRIPRAVE SOKA OD JABUKE NA
ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Diplomski rad

Rijeka, 2016.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sandro Perović

UTJECAJ SORTE I NAČINA PRIPRAVE SOKA OD JABUKE NA
ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Diplomski rad

Rijeka, 2016.

Diplomski rad izrađen je u Institutu „Ruđer Bošković” u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Srećka Valića kojemu se ovim putem zahvaljujem na suradnji i pomoći tijekom provođenja eksperimenta i pisanja rada. Zahvaljujem se svim članovima Laboratorija za magnetske rezonancije Instituta „Ruđer Bošković” na bezuvjetnoj pomoći tijekom eksperimenta i susretljivosti. Veliko hvala obitelji na bezuvjetnoj podršci tijekom studija.

Sadržaj

1. Uvod i pregled područja istraživanja.....	1
1.1. Uvod.....	1
1.1.1. Idared	2
1.1.2. Granny Smith.....	2
1.1.3. Jonagold	3
1.1.4. Zlatni delišes	3
1.2. Pregled područja istraživanja	4
1.2.1. Antioksidacijska aktivnost jabuke	4
1.2.2. Utjecaj jabuke na zdravlje.....	5
2. Cilj istraživanja.....	5
3. Materijali i metode.....	6
3.1. Materijali	6
3.2. Metode.....	6
3.2.1. Ekstrakcija jabučnog soka.....	6
3.2.2. Elektronska spinska rezonancija	8
3.2.2.1. Teorijske osnove	8
3.2.2.2. Priprema uzoraka	8
3.2.2.3. Mjerenja ESR spektara DPPH radikala	9
4. Rezultati.....	11
4.1. Antioksidacijska aktivnost jabuka različitih sorti	11
4.2. Antioksidacijska aktivnost jabučnog soka pripremljenog s korom.....	17
5. Rasprava	19
5.1. Usporedba antioksidacijske aktivnosti različitih sorti jabuka	19
5.2. Utjecaj sastojaka jabuke na antioksidacijsku aktivnost.....	20
5.3. Utjecaj kore jabuke na antioksidacijsku aktivnost	23
6. Zaključak	24

Sažetak

Jabuke su jedna od najkonzumiranijih vrsta voća. Vrlo su popularne u svijetu pa tako i u Hrvatskoj. Poznat je pozitivan utjecaj jabuka na ljudsko zdravlje u vidu smanjenja oksidativnog stresa, razine kolesterola i triglicerida te razvitka dijabetesa. Jabuke mogu doprinijeti smanjenju bakterija u usnoj šupljini. U radu je uspoređeno antioksidacijsko djelovanje jabučnog soka dobivenog iz četiri sorte: Jonagold, Idared, Zlatni delišes i Granny Smith. Također, analizirano je i uspoređeno antioksidacijsko djelovanje kore jabuke. Korištena je elektronska spinska rezonancija (ESR), spektroskopska tehnika koja omogućuje precizno mjerenje koncentracije slobodnih radikala u uzorku. Praćen je pad intenziteta ESR signala radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) po dodatku male količine jabučnog soka otopini radikala, tijekom 30 minuta. Antioksidacijski učinak pripisan je ukupnim polifenolima, flavonoidima, vitaminu C, klorogeničnoj kiselini te načinu ekstrakcije jabučnog soka. Najjaču antioksidacijsku aktivnost je pokazala sorta Granny Smith, pripravljena s korom dok je najslabiji učinak imala sorta Jonagold čiji je sok ekstrahirano samo iz pulpe.

Ključne riječi: jabuka, antioksidacijsko djelovanje, polifenoli, vitamin C, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil(DPPH), elektronska spinska rezonancija (ESR).

Summary

Apples are one of the most consumed fruits. They are very popular among the world and also in Croatia. It is known that apples have positive influence on human health in the form of reducing oxidative stress, cholesterol level and risk of diabetes. Apples can also contribute to reduce bacteria in the oral cavity. This research compares the antioxidant activity of apple juice obtained from four different species: Jonagold, Idared, Golden Delicious and Granny Smith. Antioxidant activity of apple peels was also analyzed and compared. Electron spin resonance (ESR), the spectroscopic technique that allows precise measurement of a free radical concentration in the sample, was used. The loss of ESR signal of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was measured in function of time passed after adding a small amount of apple juice to radical solution, during 30 minutes. Antioxidant activity is related to the total polyphenols of juice extraction. The highest antioxidant activity showed Granny Smith with peel, while the lowest showed Jonagold species whose juice was obtained just from the pulp.

Keywords: apple, antioxidant activity, polyphenols, vitamin C, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), electron spin resonance (ESR).

1. Uvod i pregled područja istraživanja

1.1. Uvod

Stablo jabuke (*Malus domestica*) je bjelogorično drvo iz porodice ružovki (*Rosaceae*). Stablo je nastalo u središnjoj Aziji gdje se njegov drevni predak, *Malus sieversii*, još i dan danas može naći. Vrsta *Malus domestica* (domaća jabuka) dobivena je križanjem vrsta *M. sylvestris* (divlja jabuka), *M. fusca* (sin. *Malus rivularis*, *Malus roemer*), *M. orientalis*, *M. sieversii* i *M. baccata*[1,2]. Stablo jabuke može biti do 12 m visoko, s razgranatom krošnjom koju izgrađuju jajoliki listovi. U svibnju cvate blijedo ružičastim do bijelim cvjetovima, a plodovi sazrijevaju od srpnja do listopada, ovisno o sorti jabuke.

Jabuka je među najrasprostranjenijim vrstama voća; osvježavajuća, kiselo-slatkog okusa i svojstvene arome. Poznate su brojne sorte (njih oko 10 000), koje se međusobno razlikuju po okusu, slatkoći ili kiselosti, konzistenciji i sočnosti [3]. Prema stručnim procjenama proizvodnja jabuka u Hrvatskoj godišnje iznosi oko 40 000 tona. U domaćoj proizvodnji najzastupljenija sorta je Idared, zatim slijede Jonagold, klonovi i Zlatni delišes. Gledajući prema sortama, najviše se prodaje Idared, zatim slijede Zlatni delišes i Jonagold te potom Granny Smith, Gloster i ostale jesenske sorte. Ljetne sorte jabuka (Gala i Elstar) prodaju se u manjim količinama. Potrošnja jabuke u Hrvatskoj iznosi oko 15 kilograma po stanovniku godišnje od čega oko 80% opada na tržišnu potrošnju. Prodaja jabuka je oko 52 tisuća tona godišnje odnosno oko 370 milijuna kuna godišnje. Jabuka se najviše troši u jesenskim i proljetnim mjesecima [4].

1.1.1. Idared

Idared je američka sorta nastala 1935. godine križanjem sorti Jonathan i Wag(e)ner, a u proizvodnju je uvedena 1942. godine. Viosokoproduktivna je plantažna sorta i neosporno danas najpopularnija jabuka u Hrvatskoj. Vrlo je cijenjena zbog krupnog i lijepog ploda, dobrog okusa i neobično dugog skladištenja plodova. Blago kiselog je okusa i nenametljive arome. Plodovi su nerijetko vrlo veliki, dozrijevaju početkom listopada te su prekriveni crvenilom [5].

1.1.2. Granny Smith

Granny Smith je vjerojatno najprepoznatljivija od svih jabuka i sigurno jedna od najpoznatijih, a također jedan je od najslavnijih izvoznih proizvoda Australije. Otkrivena je u Australiji šezdesetih godina 19. stoljeća kao slučajni sjemenjak na odlagalištu za otpad. Pretpostavlja se da je slučajni hibrid europske divlje i domaće jabuke. Gospođa Maria Ann Smith, koja ju je pronašla, otkrila je da je jabuka višenamjenska, odnosno odlična kako za kuhanje tako i za potrošnju u svježem stanju. Novu je sortu nazvala Granny Smith te je zaslužna za širenje njezine popularnosti. Do šezdesetih godina 20. stoljeća Granny Smith je postala praktički sinonim za jabuku. Ova pomalo neobična jabuka privlači oko svojom bojom trave, dugo se čuva te ima svestranost koju potrošači vole. Kod nas je poznata kao sorta za netipična jabučarska područja poput Dalmacije, Istre i Baranje. Okus je naglašeno kiseo i oštar. Plodovi su vrlo veliki (do 250g), dozrijevaju krajem listopada i početkom studenog te su zelene boje [6]. Ova jabuka jedna je od nekoliko koje imaju visoku antioksidacijsku aktivnost i sadrže najvišu koncentraciju fenola među sortama jabuka [7]. Nekoliko izvora preporučaju Granny Smith kao izvor antioksidansa, flavonoida cijanidina i epikatehina posebice ako se konzumira i kora jabuke [8]. Granny Smith sadrži mali postotak kalorija, a veliki postotak dijetalnih vlakana i kalija, čineći ju tako preporučljivom dijetalnom namirnicom [9].

1.1.3. Jonagold

Jonagold je američka sorta nastala četrdesetih godina prošlog stoljeća, i kao što ime kaže, dobivena je križanjem Zlatnog delišesa i Jonathana. U proizvodnju je uvedena 1968. godine i od tada je postala vrlo popularna, posebno u Europi. Jonagold objedinjuje najbolje od dviju sorti u jednu. Plodovi dozrijevaju sredinom do kraja rujna te su žute boje s pokrovnom crvenom [10].

1.1.4. Zlatni delišes

Ovu je sortu otkrio Paul Stark 1914. godine na brežuljcima Zapadne Virginije. Kožica ploda je nježna i tanka, meso je čvrsto, hrskavo i sočno. Okus je blag i sladak. Odlična je desertna jabuka. Plodovi su srednje veliki do veliki, sazrijevaju od sredine do kraja mjeseca rujna i zelenožute su boje [11].



Idared



Zlatni Delišes



Jonagold



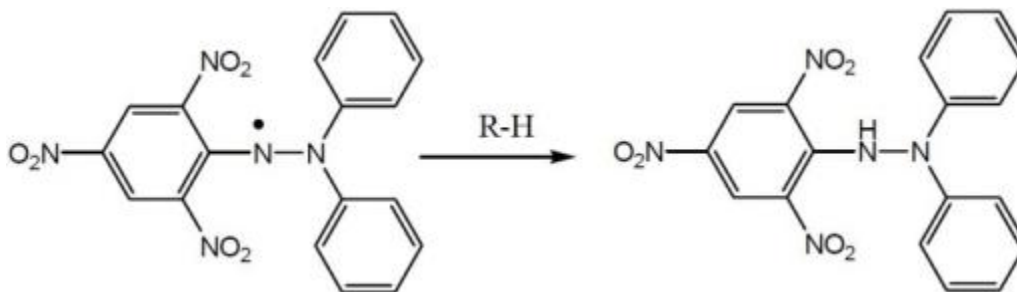
Granny Smith

Slika 1. Plodovi četiri analizirane sorte jabuka.

1.2. Pregled područja istraživanja

1.2.1. Antioksidacijska aktivnost jabuke

Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti jabuke mogu se koristiti mnoge metode. Neke od njih su: TRAP (eng. total radical-trapping antioxidant parameter), HORAC (eng. hydroxyl radical averting capacity), SOD (eng. superoxide radical scavenging activity), FRAP (eng. ferric reducing-antioxidant power). Jedna od najčešćih *in vitro* korištenih metoda je metoda pomoću 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) reagensa. Molekula DPPH je karakterizirana kao stabilni slobodni radikal temeljem delokalizacije nesparenog elektrona, tako da molekula ne dimerizira, što bi bio slučaj kod većine drugih slobodnih radikala. Delokalizacija elektrona također dovodi do ljubičaste boje, uzrokovane apsorpcijom u etanolu pri 517 nm. Kada se otopina DPPH pomiješa sa supstratom koji može donirati atom vodika dolazi do redukcije DPPH molekula i gubitka ljubičaste boje. Ova metoda je brza, jednostavna i jeftina u odnosu na druge [12].



Slika 2. Redukcija DPPH radikala.

1.2.2. Utjecaj jabuke na zdravlje

Nekoliko istraživanja ostavljaju otvorenu mogućnost pozitivnog djelovanja jabuke na ljudsko zdravlje u vidu smanjenja rizika oboljenja od kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti i tumorska oboljenja. Za postizanje ovakvog efekta vjeruje se da su odgovorne tvari poput fenola, flavonoida i karotenoida [13,14]. Jabuke su široko konzumirano voće i bogati izvor fitokemikalija. Stoga razne epidemiološke studije povezuju konzumaciju jabuka s reduciranim rizikom od raka, kardiovaskularnih bolesti, astme i dijabetesa. U laboratorijima (*in vitro* uvjetima) jabuke pokazuju vrlo visoku antioksidacijsku aktivnost, inhibiraju proliferaciju tumorskih stanica, smanjuju oksidaciju lipida te razinu kolesterola i triglicerida. Mnoge tvari od fitokemikalija, poput kvercetina, katehina, florizina i klorogenične kiseline su vrlo snažni antioksidansi [14]. Provedbom opsežne epidemiološke studije, koja je pratila više od 120000 ljudi kroz 14 godina, utvrđeno je da su najmanji rizik od kardiovaskularnih oboljenja imale osobe koje su učestalo konzumirale voće koje sadrži vitamin C, poput jabuka [15]. Jabuka može doprinijeti smanjenju bakterija u usnoj šupljini. Zbog svoje kiselosti potiče salivaciju koja pozitivno utječe na inhibiciju razmnožavanja bakterija [16].

2. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja u ovom radu je međusobno usporediti antioksidacijsko djelovanje četiri vrste jabuka i utvrditi utjecaj korena ukupnu antioksidacijsku aktivnost jabuke.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Istraživanje je provedeno na jabukama kupljenim u supermarketimatrgovačkog lanca Plodine. Korištene su četiri vrste jabuka: Jonagold, Idared, Zlatni delišes i Granny Smith. Prilikom ekstrakcije jabučnog soka korišten je centrifugalni sokovnik, model "W-JE392" (slika 3). Kao slobodni radikal za praćenje koristio se DPPH proizvođača "Sigma" koji je otopljen u etanolu (Kemika, Zagreb). Koncentracija standardne otopine DPPH u etanolu bila je 0,15 mmol/L. Sorte jabuka koje su korištene u ovom radu i njihove oznake prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Sorte ispitivanih jabuka i njihove oznake.

	Bez kore	S korom + pulpa uz koru
JABUKA	OZNAKA	OZNAKA
Idared	ID	ID(K)
Granny Smith	GS	GS(K)
Jonagold	JG	JG(K)
Zlatni Delišes	ZD	ZD(K)

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija jabučnog soka

U radu su ispitivana antioksidacijska svojstva svježe pripremljenih sokova od jabuka. Ekstrakcija se odvijala na dva načina: prvi način koji je obuhvaćao sve četiri sorte jabuka bez kore te drugi način s dvije vrste jabukas korom. Ispitivane jabuke su prije postupka procesiranja

pripremljene na način koji se najčešće koristi u svakodnevnoj konzumaciji. Odstranjena im je kora i koštice su zatim narezane na kriške, od površine do sredine jabuke. Nakon toga su kriške stavljene u centrifugalni sokovnik, slika 3, pomoću kojega se ekstrahirao jabučni sok. Filtracija nije bila potrebna jer su uzorci bili dovoljno bistri.

Drugim načinom ekstrakcije obuhvaćene su dvije sorte jabuka i to one koje su pripremom na prvi način pokazale najslabiji i najjači antioksidacijski učinak. Kod pripreme soka drugim načinom, pažljivo su uzeti dijelovi ploda uz samu površinu jabuke, tako da se dobije što više soka iz kore i pulpe koja se nalazi neposredno ispod kore.



Slika 3. Sokovnik Perfect Housewares Industrial W-JE392 korišten za pripremu soka.

3.2.2. Elektronska spinska rezonancija

3.2.2.1. Teorijske osnove

Elektronska spinska rezonancija (ESR), poznata još i pod starijim nazivom elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) je spektroskopska metoda kojom se detektira apsorpcija energije mikrovalnog zračenja kada se paramagnetski sistem nalazi u vanjskom magnetskom polju. Ova se spektroskopska tehnika temelji na međudjelovanju spinskog magnetskog momenta nesparenog elektrona s vanjskim magnetskim poljem. Nespareni elektron posjeduje magnetski moment koji je povezan s njegovim spinom. Rješavanjem vremenski neovisne Schrödingerove jednadžbe dobiva se energija međudjelovanja spina elektrona s vanjskim magnetskim poljem. Osnovna zamisao ESR spektroskopije jest da se paramagnetskom sistemu dovede energija promjenjivog magnetskog polja koja je upravo jednaka razlici energijskih razina elektrona koji su u magnetskom polju, klasično gledano, orijentirani paralelno odnosno antiparalelno. Energija koja se dovodi paramagnetskom sistemu u ESR spektroskopiji je energija elektromagnetskog zračenja mikrovalnog područja jer je prikladna frekvencija ovoga zračenja takva da vrijedi uvjet rezonancije ($\Delta E = h\nu$) [17].

3.2.2.2. Priprema uzoraka

Uzorci za ESR mjerenja pripremani su na slijedeći način:

1. Pripremljena je otopina DPPH radikala u etanolu koncentracije 0,15 mmol/L.
2. Snimljena je slijepa proba otopine radikala s udjelom vode od 2,0 %.
3. Otopini radikala dodan je određeni volumen jabučnog soka tako da je udio soka u uzorku iznosio 2,0 %. Ukupni volumen otopine radikala i soka iznosio je 5,000 mL.
4. Zabilježeno je vrijeme kad je otopini radikala dodan ekstrakt jabučnog soka ($t = 0$).
5. Otopina radikala s dodanim ekstraktom jabuke je promiješana 3 sekunde na električnoj vortex mješalici, a potom je dio otopine stavljen u kapilaru te je kapilara s donje strane

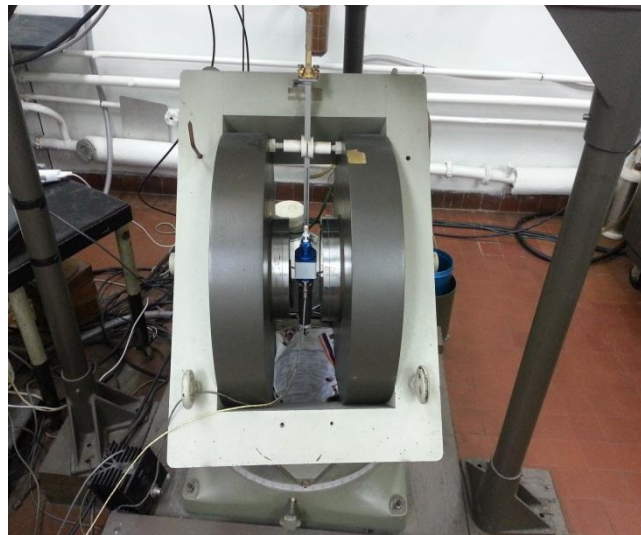
začepljena glinom, nakon čega je stavljena u kvarcnu ESR cjevčicu. Cjevčica zajedno s uzorkom u kapilari smještena je u šupljinu ESR spektrometra, tj. u magnetsko polje.

- ESR spektri su snimani tijekom 30 minuta i to prvih 5 minuta svakih 30 sekundi, u periodu od 5. do 10. minute svakih 60 sekundi, a u periodu od 10. do 20. minute u svake dvije minute. Po jedan ESR spektar snimljen je u 25. i 30. minuti.

3.2.2.3. Mjerenja ESR spektara DPPH radikala

Mjerenja su provedena u Institutu „Ruđer Bošković“ u Zagrebu u Laboratoriju za magnetske rezonancije na Varian E-109 ESR spektrometru koji je dodatno opremljen mikrovalnim mostom Bruker ER 041 XG i osobnim računalom s EW (EPRWare) programskom podrškom koja služi za akumuliranje i obradu spektara te uređajem za regulaciju i kontrolu temperature Bruker ER 4111 VT. Obzirom da su sva mjerenja u ovom radu provedena na sobnoj temperaturi, temperaturna jedinica nije bila korištena.

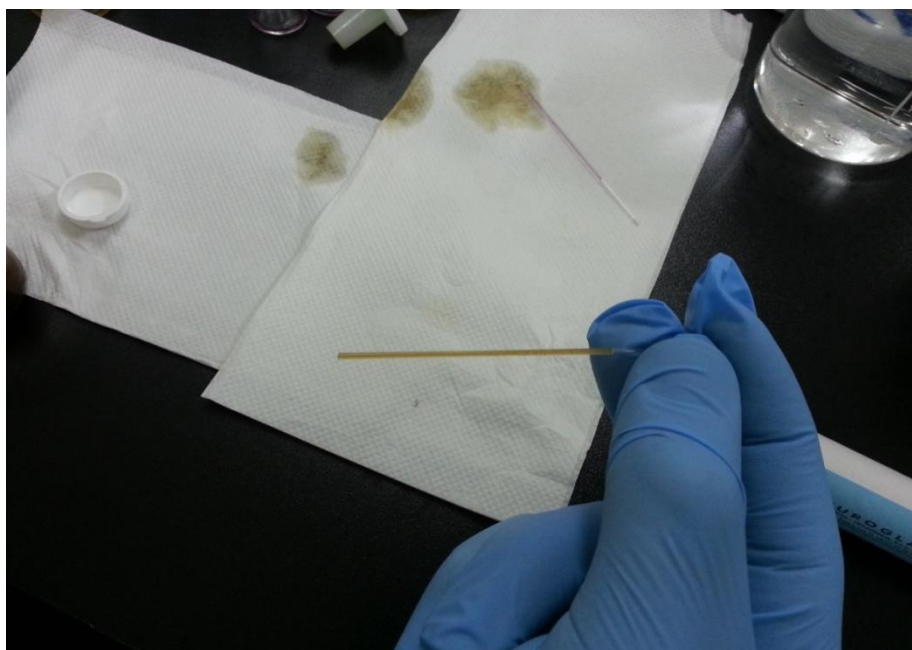
Vanjsko magnetsko polje jačine 0,3 T postiže se pomoću klasičnog elektromagneta uz vodeno hlađenje, prikazanog na slici 4.



Slika 4. Magnetsko polje ESR spektrometra u Laboratoriju za magnetske rezonancije.

ESR spektri snimani su pri centralnom polju od 331 mT (3310 G), uz magnetski posmak od 10 mT (100 G), snagu mikrovalnog polja od 10 mW, amplitudu modulacije 0,1 mT (1 G) i pojačanjem 2500 te vremenom posmaka magnetskog polja od 20 s. Za akumuliranje i obradu spektra korišten je EW (EPRWare) Scientific Software Service program, a rezultati su prikazani pomoću grafova izrađenih u programu SigmaPlot.

Pad intenziteta ESR signala praćen je u funkciji vremena proteklog od trenutka dodavanja ekstrakta jabučnog soka, usporedbom vrijednosti dvostrukih integrala spektara detektiranih u obliku prve derivacije apsorpcijskih linija. Vrijednosti koje se dobiju dvostrukim integriranjem proporcionalne su broju DPPH radikala u otopini. Spektar slijepe probe snimljen je neposredno prije mjerenja svakog uzorka kako bi se osigurala vjerodostojnost rezultata. Kao početni intenzitet ESR signala, I_0 , uzeta je vrijednost dvostrukog integrala slijepe probe izmjerena neposredno prije početka mjerenja za svaki uzorak. Intenziteti signala dobiveni nakon vremena t proteklog od kontakta otopine radikala s uzorkom jabučnog soka, I_t , normirani su na početnu vrijednost signala I_0 i izraženi u postocima.



Slika 5. Kapilara s uzorkom neposredno prije stavljanja u ESR cjevčicu.

4. Rezultati

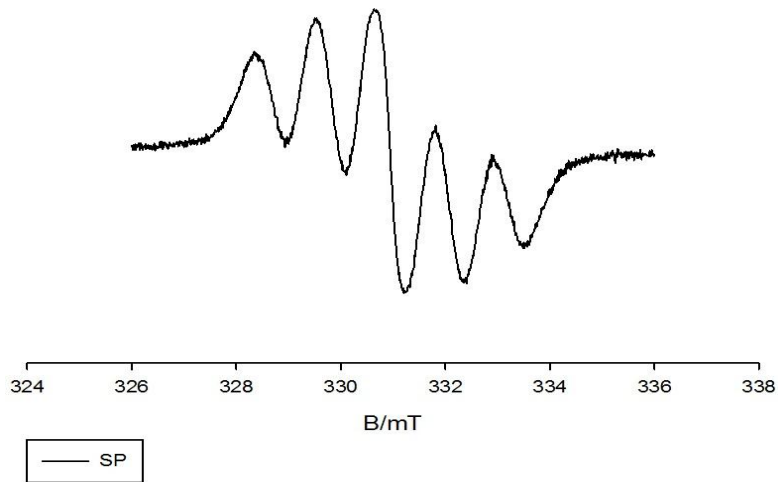
4.1. Antioksidacijska aktivnost jabuka različitih sorti

Na slici 6 prikazan je ESR spektar slijepe probe. Spektar se sastoji od pet dobro definiranih uskih apsorpcijskih linija detektiranih u obliku prve derivacije signala. Kao što je već ranije spomenuto, intenzitet signala koji se dobije dvostrukim integriranjem prve derivacije apsorpcijske linije proporcionalan je koncentraciji radikala u uzorku. Stoga normirane vrijednosti intenziteta I/I_0 , mjerene u funkciji vremena proteklog od dodatka ekstrakta jabučnog soka otopini radikala, predstavljaju izravnu mjeru sposobnosti ekstrakta soka u gašenju slobodnih radikala.

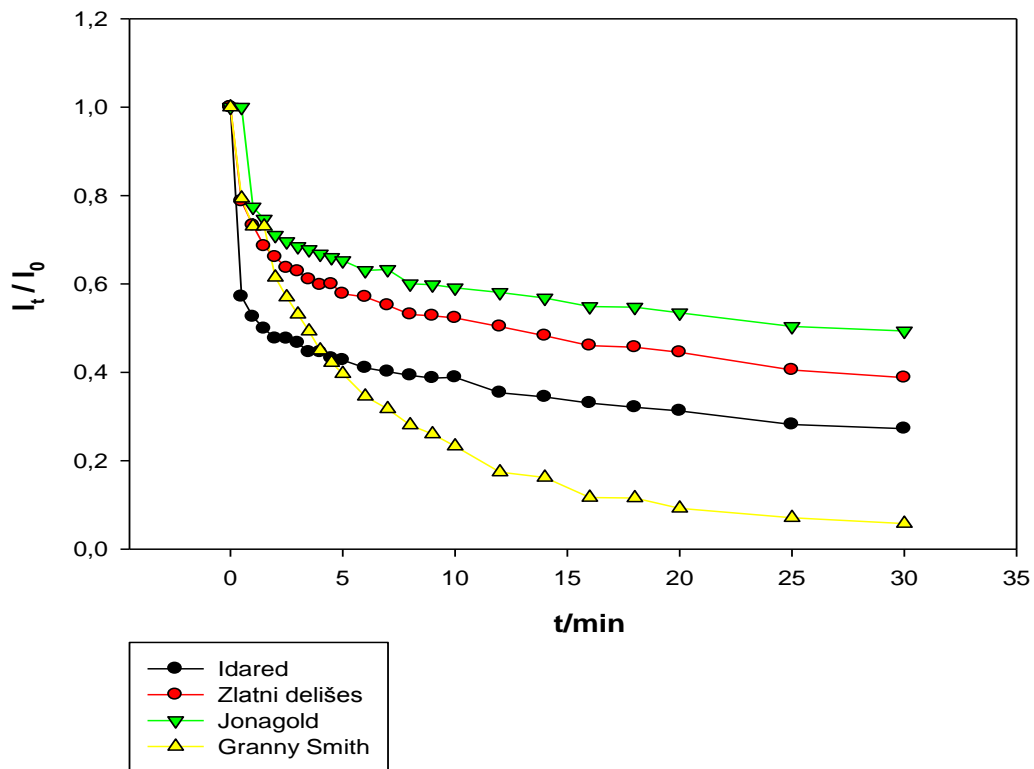
Na slici 7 grafički je prikazan pad intenziteta ESR signala DPPH kroz period od 30 minuta od dodatka ekstrakta jabučnog soka za sva četiri ispitivana uzorka. Kod sva četiri uzorka uočava se pad signala u funkciji vremena. Kod svih uzoraka uočava se iznimno nagli pad signala tijekom prve minute (prva točka mjerenja). To je naročito izraženo za uzorak ID sa samo 52,56 % zaostalog početnog signala, dok uzorci GSs 79,36 % i ZD s 67,36 % pokazuju najmanji pad u prvoj minuti. Taj prvi nagli pad signala može se praktički smatrati linearnom vremenskom funkcijom, dok se nakon toga pad signala u funkciji vremena smanjuje, a njegova se vremenska ovisnost može smatrati eksponencijalnom funkcijom.

Usporedbom antioksidacijske aktivnosti ispitivanih uzoraka za različita vremena dobivaju se različiti rezultati (krivulje na slici 7 se sijeku). Tako na primjer uzorak Granny Smith, koji u početku pokazuje najslabiju aktivnost, već nakon pete minute izražava najjača antioksidacijska svojstva.

Krajnje točke mjerenja bitno se razlikuju od uzorka do uzorka. Za uzorak JG (Jonagold), pad signala je najslabije izražen, tako da nakon vremena od 30 minuta ovaj uzorak pokazuje približno 49 % intenziteta početnog signala. Slijedi ga uzorak ZD (Zlatni delišes) koji nakon 30 minuta zadržava približno 42 % početnog intenziteta, dok uzorak ID zadržava 27 % signala. Daleko najveću antioksidacijsku aktivnost nakon 30 minuta pokazuje uzorak GS sa svega 5 %.



Slika 6. ESR spektar slijepe probe (otopine DPPH u etanolu).



Slika 7. Ovisnost relativnog intenziteta ESR signala DPPH, I_t/I_0 , o vremenu t za pojedine uzorke jabuka.

Na temelju podataka iz tablice 2, slično kao iz slike 7, može se također zaključiti da najjače antioksidacijsko djelovanje u početku ima sok iz uzoraka ID (Idared) čiji se intenzitet signala smanjio za 47,44 % nakon prve minute. Slijedi ju uzorak ZD (Zlatni delišes) s 32,64 %, zatim JG (Jonagold) s 22,60 %, te na kraju GS (Granny Smith) čiji se intenzitet nakon prve minute smanjio za 20,64 %. Nakon treće minute poredak uzoraka s obzirom na gubitak intenziteta bio je slijedeći: ID, GS, ZD, JG, a nakon tridesete minute smanjenje intenziteta signala bilo je najveće za jabuku Granny Smith. Slijedili su ju uzorci Idared i Zlatni delišes, dok je najslabiji antioksidacijski učinak imala jabuka Jonagold.

Tablica 2. Relativni udjeli gubitka intenziteta ESR signala DPPH u uzorcima ID, GS, JG, ZD, JG(K) i GS(K) u vremenu t_1 , t_2 i t_3 .

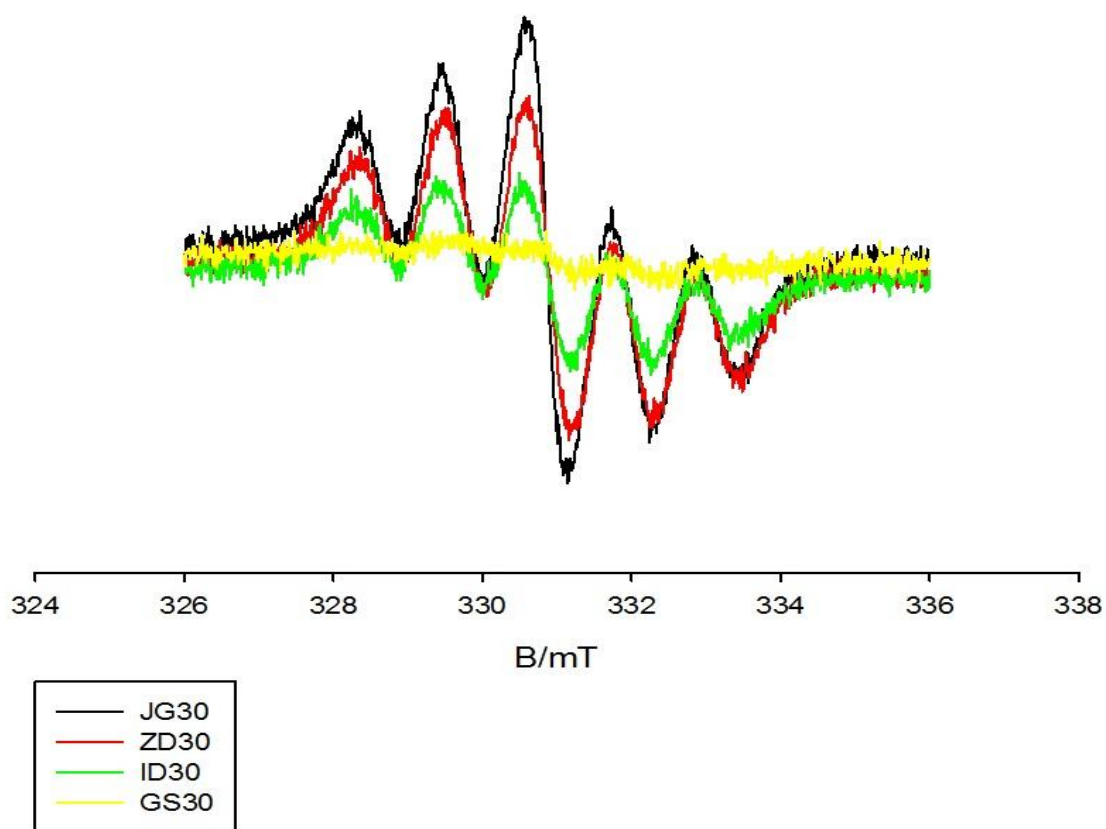
Jabuka	Oznaka	t_1 / min	$1 - I_t/I_0$	t_2 / min	$1 - I_t/I_0$	t_3 / min	$1 - I_t/I_0$
Idared	ID	1,05	47,44	3,00	53,35	30,00	72,74
Granny Smith	GS	0,44	20,64	3,00	46,89	30,00	94,23
Jonagold	JG	1,15	22,60	3,02	31,54	30,00	50,65
Zlatni Delišes	ZD	1,11	32,64	3,00	40,07	30,00	57,64
Jonagold	JG(K)*	0,50	38,41	3,06	57,96	30,00	84,48
Granny Smith	GS(K)*	0,50	38,50	3,00	66,04	30,00	100,00

*(K)označava da je uzorak pripremljen cijedenjem soka iz kore i pulpe koja se nalazi neposredno ispod kore.

Uspoređujući uzorke s korom i pulpom uz koru i uzorke bez kore, može se vidjeti dodatno smanjenje signala od 15,81 % nakon prve minute za jabuku Jonagold. Nakon treće minute signal se smanjio za dodatnih 26,42 % u odnosu na oguljenu jabuku, a nakon tridesete minute intenzitet signala smanjio se za ukupnih 84,48 %. Jabuka koja je imala najjači antioksidacijski učinak, Granny Smith također je pokazala jaču antioksidacijsku moć sa

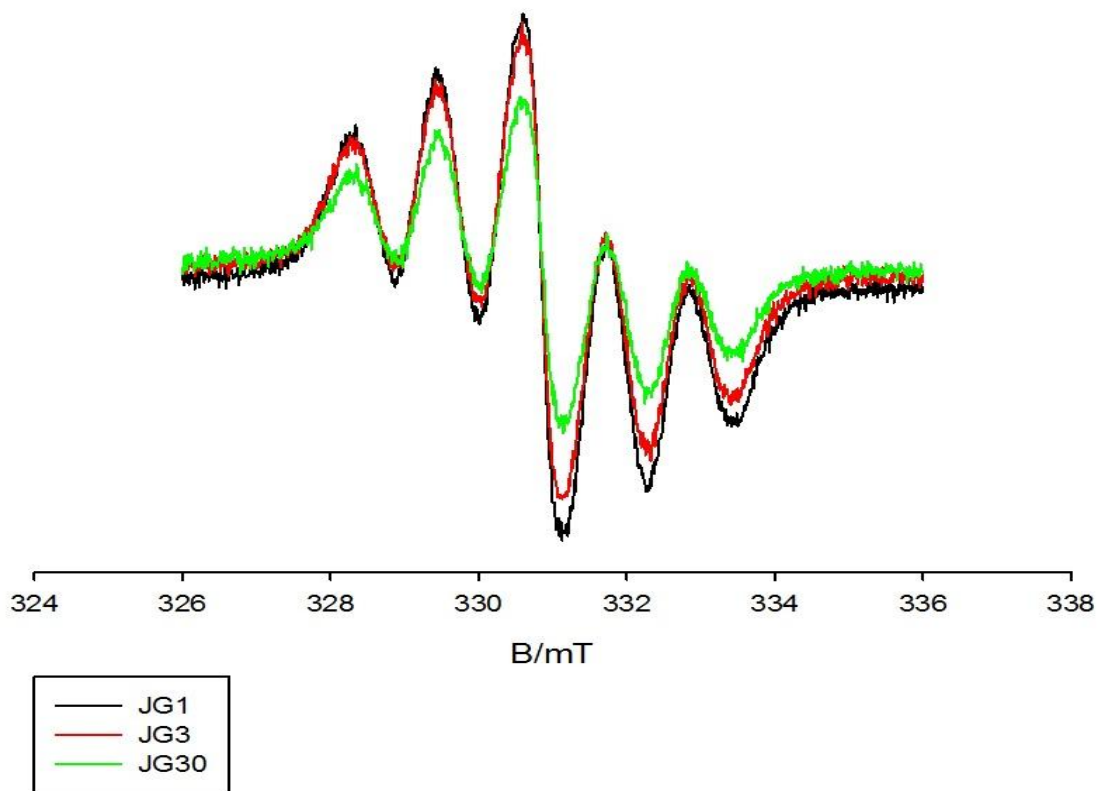
korom, smanjivši intenzitet signala u prvoj minuti za 17,86 % u odnosu na oguljeni uzorak GS, u trećoj minuti za dodatnih 19,15 % da bi se signal nakon šesnaest minuta potpuno izgubio (slika 12).

Slika 8 prikazuje ESR spektre DPPH radikala svih uzoraka jabuka bez kore snimljenih nakon 30 minuta. Lako se uočava da su intenziteti signala u pojedinim uzorcima u skladu s računskim rezultatima prikazanim u tablici 2.



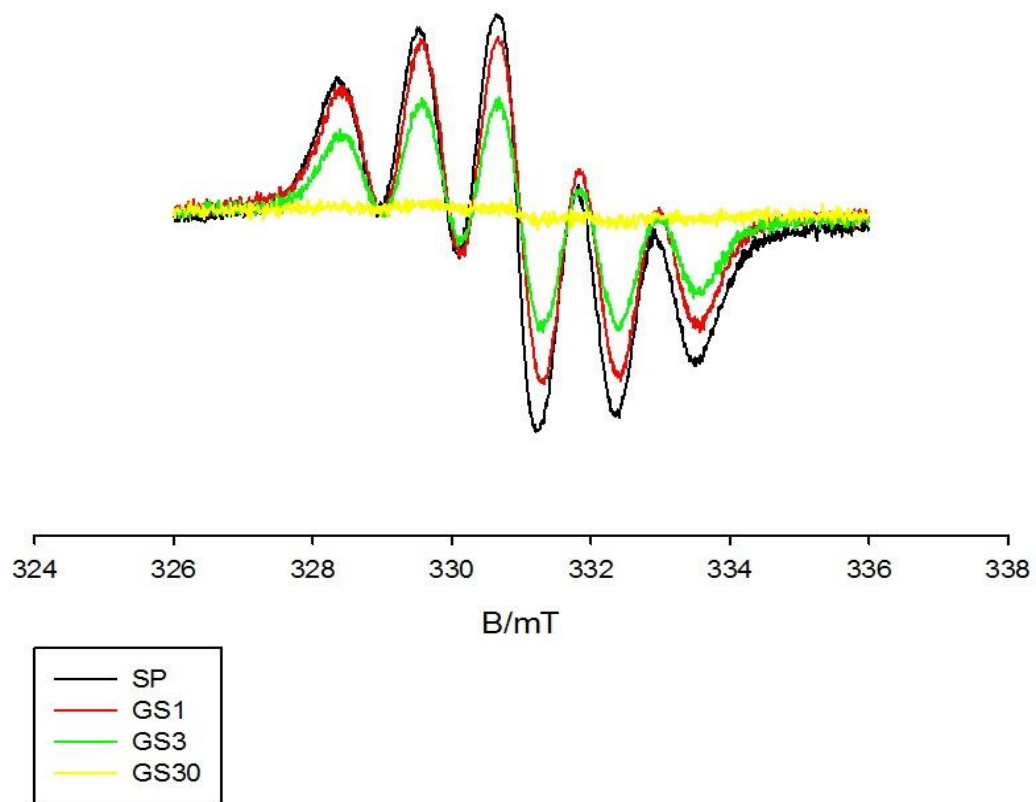
Slika 8. ESR spektri DPPH radikala snimljeni 30 minuta nakon dodatka ekstrakta jabučnog soka za uzorke JD, ZD, ID i GS.

Kao što je već spomenuto, uzorak JG pokazao je najmanji pad intenziteta signala. Nakon prve minute od dodatka ekstrakta soka otopini radikala, dvostruki integral signala je iznosio 77,40 % vrijednosti početnog signala I_0 . Gašenje radikala odvijalo se sporije u odnosu na ostale uzorke te je kroz 30 minuta reakcije ostalo 49,35 % slobodnih radikala (slika 9).



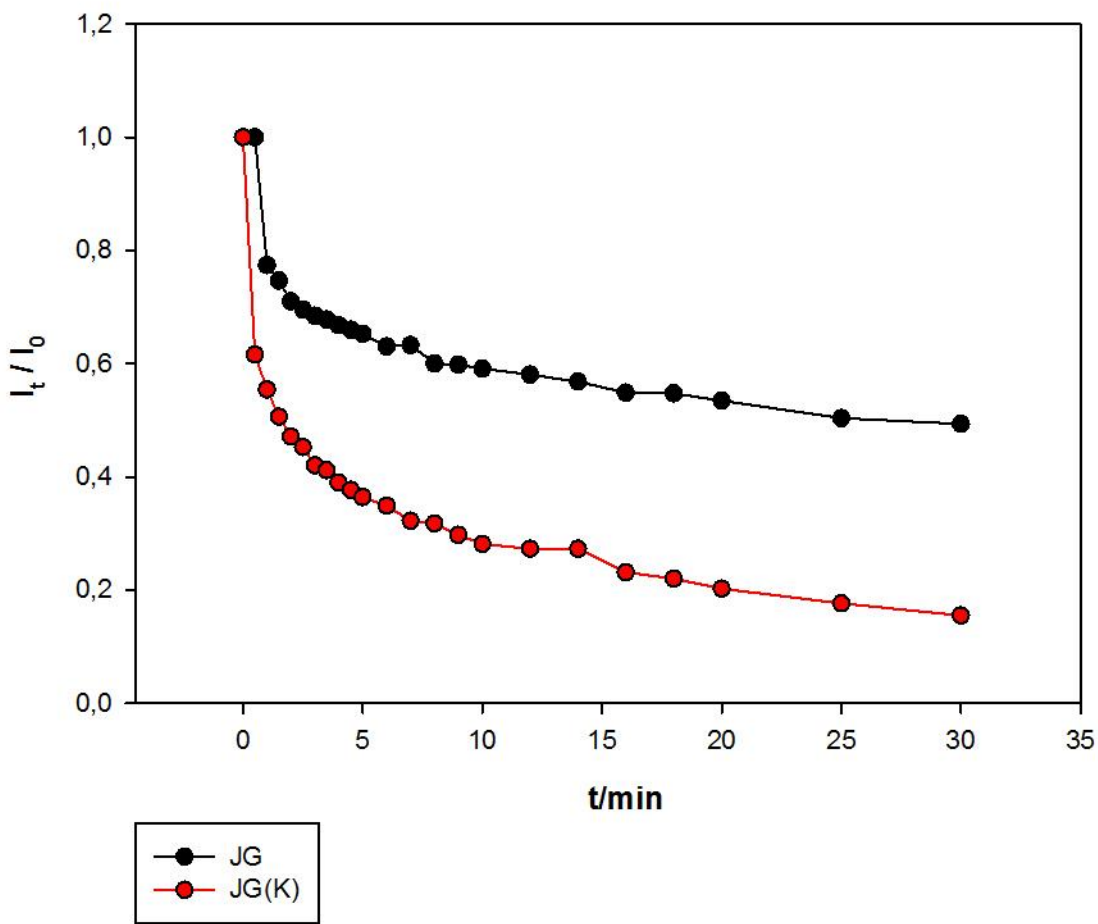
Slika 9. ESR spektri DPPH radikala nakon dodatka ekstrakta jabučnog soka JG: JG1 ($t_1 = 1$ min), JG3 ($t_2 = 3$ min) i JG30 ($t_3 = 30$ min).

Najjači pad intenziteta signala pokazuje uzorak GS čiji je ekstrakt jabučnog soka u prvoj minuti zapravo imao najslabiji pad intenziteta na 79,36 %. Međutim, već u trećoj minuti intenzitet je pao na 53,11 %, a 30 minuta nakon dodatka ekstrakta kave iznosio je svega 5,77 % (slika 10).



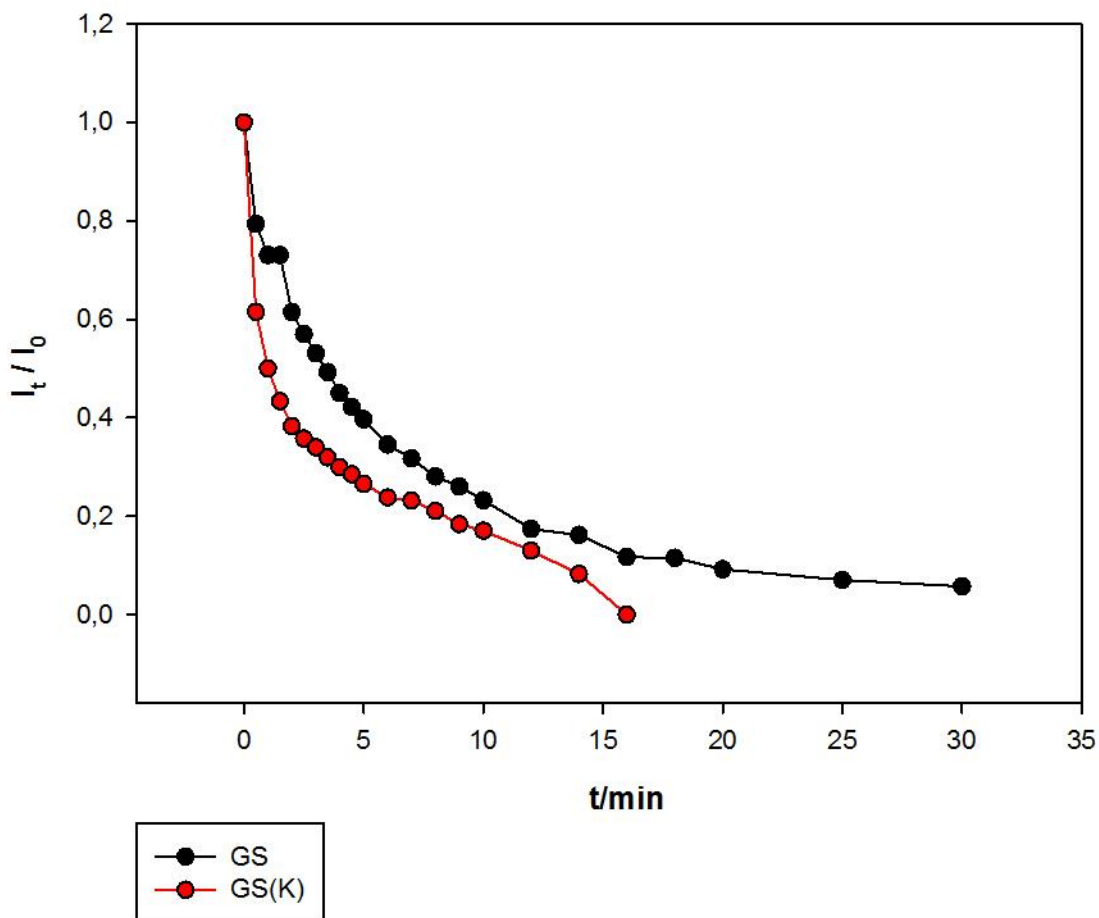
Slika 10. ESR spektri DPPH radikala nakon dodatka ekstrakta jabučnog soka GS: GS1 ($t_1 = 1$ min), GS3 ($t_2 = 3$ min) i GS30 ($t_3 = 30$ min). Spektar SP je spektar slijepe probe.

4.2. Antioksidacijska aktivnost jabučnog soka pripravljenog s korom



Slika 11. Usporedba pada intenziteta signala ESR signala ekstrakta soka Jonagold sorte pripravljenog s korom i bez kore.

Usporedbom ova dva uzorka može se jasno vidjeti kako uzorak Jonagold jabuke s korom ima znatno veću antioksidacijsku aktivnost nego pulpa istovrsne jabuke. Nakon tri minute od dodatka jabučnog soka otopini radikala, uzorak JG(K) imao je približno 42 % intenziteta početnog signala, za razliku od uzorka JG koji bilježi približno 68 %. Jasna razlika se vidi i nakraju reakcije kada intenzitet signala JG(K) uzorka pada na svega 15 %, dok intenzitet uzorka JG ostaje na 49 % .



Slika 12. Usporedba pada intenziteta signala ESR signala ekstrakta soka Granny Smith sorte pripremljenog s korom i bez kore.

Pulpa Granny Smith jabuke je sama po sebi već bilježila značajnu antioksidacijsku aktivnost. Iz ove usporedbe može se zamijetiti čak još veća sposobnost gašenja slobodnih radikala uzorka s korom GS(K). Uzorak Granny Smith jabuke s korom je skratio gotovo na polovicu vrijeme potrebno za gašenje istog postotka radikala u otopini.

5. Rasprava

U diplomskom radu ispitivana je antioksidacijska aktivnost soka pripremljenog od četiri sorte jabuka čije su oznake i karakteristike navedene u tablici 1. Posebno je ispitivana razlika između sokova pripremljenih od pulpe sa sokovima dobivenim cijedenjem kore i pulpe neposredno uz koru. Prethodnim variranjem koncentracije radikala u otopini i ekstrakta jabučnog soka, pokazalo se da koncentracija ekstrakta u otopini radikala od 2 % daje optimalne, lako usporedive rezultate u vremenskom intervalu od 30 minuta za koncentraciju DPPH radikala od 0,15 mmol/L.

5.1. Usporedba antioksidacijske aktivnosti različitih sorti jabuka

Kao što je vidljivo na slikama u prethodnom poglavlju, dodatkom jabučnoga soka otopini radikala dolazi do gubitka ESR signala. Pad intenziteta signala izravno je povezan s antioksidacijskom aktivnošću uzoraka ekstrakta jabučnog soka.

U prvim trenucima, odmah po dodatku jabučnoga soka otopini radikala, opažen je izuzetno nagli pad signala, slike 7 i 11. Jednim dijelom, tome zasigurno doprinosi način pripreme uzoraka za ESR mjerenja. Posebno se to odnosi na vrlo kratko miješanje uzorka odmah po dodatku soka, čime se postiže znatno veća brzina čestica, a time i njihova kinetička energija, što doprinosi većem broju uspješnih sudara, te većoj brzini kemijske reakcije preko nesparenog elektrona. Prema neobjavljenim rezultatima, prvi gubitak signala je to veći što je vrijeme miješanja uzorka odmah po dodatku antioksidansa otopini radikala dulje. Treba također napomenuti da su, iako relativno male, koncentracije radikala i soka na početku reakcije najveće što također ima pozitivan utjecaj na brzinu kemijske reakcije.

Nakon prve minute opaža se značajno usporavanje reakcije preko slobodnoga elektrona, slike 7 i 11. Molekule DPPH i antioksidansa su relativno velike i trome, a učinak početnoga miješanja je sada iščeznuo. Njihova su gibanja znatno sporija, kinetička energija niža, a broj uspješnih sudara je smanjen. U ovom se području može primijetiti kako ESR signal (izračunate

vrijednosti dvostrukih integrala spektara normirane na početnu vrijednost) kod svih ispitivanih uzoraka eksponencijalno trne s vremenom [18].

Ovakvi rezultati ukazuju na to da je mehanizam reakcije DPPH radikala i antioksidansa iz soka jabuke složen, pri čemu se može pretpostaviti da je prvi dio linearna padajuća funkcija vremena, dok se drugi dio može opisati eksponencijalnom funkcijom. Slično ponašanje primijećeno je i kod antioksidacijskog djelovanja maslinovog ulja [19].

Najjaču antioksidacijsku aktivnost među uzorcima mjerenim u ovom radu imao je uzorak GS, slijedili su uzorci ID i ZD, a najslabiju sposobnost gašenja slobodnih radikala pokazao je uzorak JG. Na temelju podataka iz literature, antioksidacijsko djelovanje soka jabuke pripisuje se uglavnom fenolnim komponentama koje se u njemu nalaze. Nađena je pozitivna korelacija između ukupnog sadržaja fenolnih komponenti i antioksidacijske aktivnosti. Stoga su sorte jabuka s većim udjelom fenola sklone jačoj antioksidacijskoj aktivnosti [20,21,22]. Osim fenolnih spojeva, jabuke sadrže i epikatehin te procijanidin B2 koji također znatno doprinose antioksidacijskom djelovanju [23]. Uz navedene spojeve, treba još spomenuti da jabuka sadrži i izvjesnu količinu vitamina C, koji je također poznat po svojim antioksidacijskim svojstvima [24]. Koliki je doprinos svake od navedenih antioksidacijskih komponenti u ukupnom antioksidacijskom djelovanju soka od jabuke ovisi prvenstveno o njihovom udjelu.

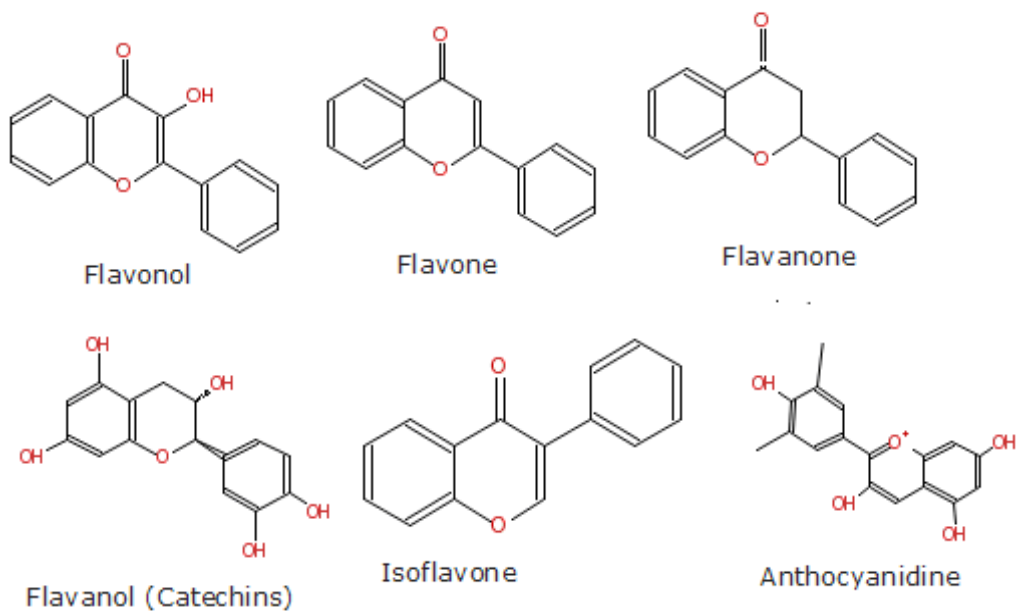
5.2. Utjecaj sastojaka jabuke na antioksidacijsku aktivnost

Najjaču aktivnost, kao što je i prije spomenuto, pokazao je uzorak Granny Smith (GS), dok je aktivnost uzorka Idared (ID) bila nešto slabija. Može se pretpostaviti da su ova dva uzorka pokazala ovakvu aktivnost upravo zbog esencijalnih sastojaka poput polifenola čija je ukupna koncentracija veća nego u uzorcima ZD i JG [2,23]. Na temelju istraživanja provedenih u nekoliko različitih studija pokazalo se da sorta Granny Smith sadrži visoki udio ukupnih polifenola i procijanidina [25,26,27]. Od četiri analizirane sorte jabuka u ovom radu, Granny Smith sadrži i najveću koncentraciju ukupnih flavonoida, koji su također poznati kao antioksidansi.

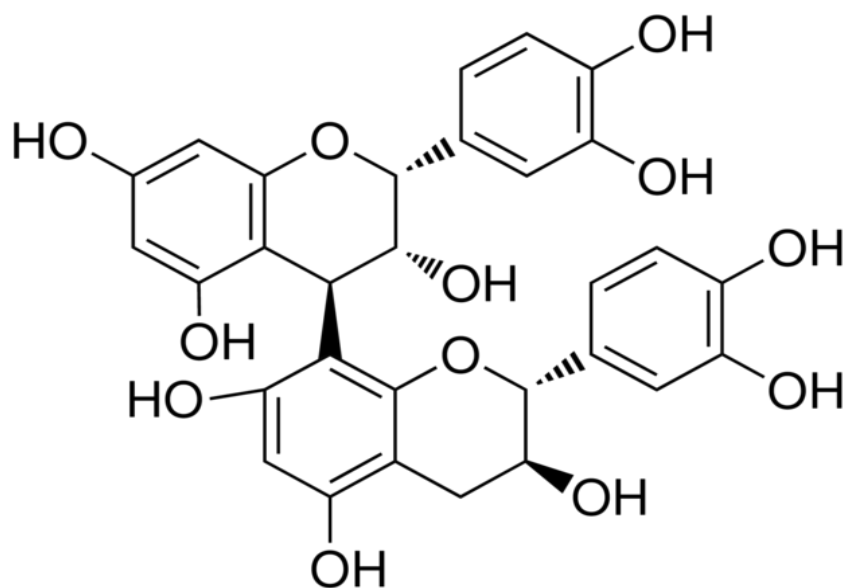
Prema literaturnim podacima sorta Zlatni delišes (ZD) također je posjeduje visok udio flavonoida, dok sorta Jonagold (JG) ima najmanji udio fenola i flavonoida [2]. Budući da je u ovom eksperimentu uzorak JG imao najslabiju antioksidacijsku moć može se pretpostaviti da jetakvom rezultatu razlog upravo nedostatak ovakvih esencijalnih antioksidansa, za koje se smatra da su glavni nositelji antioksidacijske aktivnosti [28,25]. Istraživanja provedena u Poljskoj i u Sjedinjenim Američkim Državama također potvrđuju veći udio polifenola u sorti Zlatni delišes nego u Jonagold, što je u skladu s najslabijim antioksidacijskim učinkom JG uzorka [29].

S druge strane, Van der Sluis i sur. analizirali su Jonagold i Zlatni delišes te su utvrdili da Jonagold ima veću koncentraciju kvercetina, katehina i klorogenične kiseline [30], međutim daljnja istraživanja ističu kako postoje mnogi faktori koji mogu utjecati na profil fitokemikalija jabuka. Dozrijevanje jabuka može utjecati na njihov sastav pa su tako Jonagold jabuke imale najveću koncentraciju kvercetina, katehina i klorogenične kiseline rano u sezoni, dok su se koncentracije tih istih tvari smanjile tijekom sazrijevanja i dozrijevanja [31].

Bitan faktor je i vitamin C koji je potvrđeni antioksidans [24]. Istraživanjem na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu, od četiri sorte koje su analizirane i u ovom diplomskom radu, uvrđen je najveći udio vitamina C u sorti Granny Smith [32]. Sukladno s time, može se pretpostaviti da je vitamin C također jedan od čimbenika koji ovu sortu čini jačim antioksidansom od ostalih analiziranih u ovom radu.



Slika 13. Strukture glavnih vrsta flavonoida.



Slika 14. Struktura procijanidina B2.

5.3. Utjecaj kore jabuke na antioksidacijsku aktivnost

Vrlo važnu ulogu u antioksidacijskoj sposobnosti ekstrakta soka jabuke ima sama kora jabuke. Razna istraživanja ukazuju na vrlo visoki sadržaj fenola kao antioksidansa u kori jabuke [28,33,34]. Poznato je da odstranjivanje kore jabuke dovodi do smanjenja ukupnih fenola i askorbinske kiseline (vitamina C) za 25 % [35]. Zbog doprinosa polifenola antioksidacijskoj aktivnosti kore može se pretpostaviti kako bi uklanjanje kore moglo dovesti do značajnog gubitka antioksidansa [36].

Uzorci soka ekstrahiranih s korom GS(K) i JG(K) pokazali su značajan porast antioksidacijske moći u odnosu na uzorke GS i JG kod kojih je prije ekstrakcije soka kora bila odstranjena. Drogoundi i sur. u kori jabuke nalaze 1,2 do 3,3 puta veće koncentracije ukupnih polifenola nego u pulpi što dovodi do 1,5 do čak 9,2 puta veće antioksidacijske aktivnosti [28]. Nadalje, u studiji provedenoj u 2015. godini koja je uključivala Jonagold i Granny Smith sortu, vidljivo je kako su fenolne komponente znatno više zastupljene u kori nego u pulpi istovrsne jabuke [37]. Može se pretpostaviti da su uzorci s korom u ovom radu pokazali jaču sposobnost gašenja slobodnih radikala upravo zbog takvih varijacija u koncentraciji esencijalnih tvari u pojedinim dijelovima jabuke. Također, što se tiče vitamina C, njegov najveći udio među ove četiri sorte jabuke (GS, ID, ZD i JG) nađen je upravo u kori [34].

6. Zaključak

Slobodni radikali su atomi, molekule ili ioni koji imaju nespareni elektron što ih čini vrlo reaktivnim i nepoželjnim česticama u našem organizmu. Eliminacija oksidativnog stresa pozitivno utječe na ljudsko zdravlje. U ovom istraživanju prećen je utjecaj sorte i načina pripreve jabučnog soka na njegovu antioksidacijsku aktivnost. Najpogodnijim radikalom za praćenje pokazao se DPPH, a temeljna metoda u mjerenju antioksidacijske moći jabuka bila je elektronska spinska rezonancija (ESR) zbog izrazite osjetljivosti i preciznosti te vrlo niskog praga detekcije.

Sorta i način pripreve utječu na antioksidacijsku moć ponajviše zbog esencijalnih tvari čiji sastav ovisi o sorti. Najjači antioksidacijski učinak imala je sorta Granny Smith čiji je ekstrakt jabučnog soka pripremljen s korom. Jaki učinak neutralizacije slobodnih radikala pripisuje se većim udjelom polifenola i drugih antioksidansa u sorti Granny Smith ali i u kori same jabuke. Najslabiji rezultat pokazala je sorta Jonagold čiji je ekstrakt soka dobiven isključivo iz pulpe jabuke. Takav učinak uzrokovan je nedostatkom ukupnih fenola i flavonoida ali i načinom pripreve jabučnog soka kojim je odstranjivanjem kore uklonjen i velik udio antioksidansa.

Sastav jabuka ovisi o sorti jabuke, načinu pripreve, nadmorskoj visini, geografskom položaju i klimi na kojoj se uzgajaju. Vrlo važan parametar u praćenju promjene sastava jabuka je i skladištenje. Bez tih ključnih informacija nemoguće je napraviti vrlo precizno istraživanje. Za potpunije razumijevanje dobivenih rezultata bila bi potrebna i neka od preciznih analitičkih analiza sastava jabuka, poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) koja bi omogućila dobivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava jabuke ali ta istraživanja nisu mogla biti provedena u okviru ovoga rada zbog vremenske ograničenosti.

Literatura

1. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Jabuka>, 05.05.2016.
2. <https://en.wikipedia.org/wiki/Apple>, 05.05.2016.
3. <http://www.podravka.hr/namirnica/46/jabuka/>, 07.05.2016.
4. hpcm.agr.hr/docs/hrjabuka.pdf, 07.05.2016.
5. <http://www.volim-jabuke.com/sorte/idared/>
6. <http://www.volim-jabuke.com/sorte/granny-smith/>
7. Lee, C.Y. N.L. Smith, *New York Fruit Quarterly* **8** (2).
8. <http://www.irishhealth.com/article.html?id=15976> 11.05.2016.
9. <http://healthyeating.sfgate.com/health-benefits-granny-smith-apples-3334.html>, 11.05.2016.
10. <http://www.volim-jabuke.com/sorte/jonagold/>
11. <http://www.volim-jabuke.com/sorte/golden-delicious/>
12. Md. Nur Alam i sur., *Saudi Pharmaceutical Journal***21** (2013) 143.
13. S. Ferenczi i sur., *International Journal of Engineering***12**(2014):91-94
14. Jeanelle Boyer, Rui Hai Liu *Nutrition Journal***3** (2014) 5.
15. Joshipura K. i sur., *Annals of Internal Medicine***134**(2001) 1106-1114.
16. <http://www.happylivearte.com/2014/11/apple-fruit-nutritios-Diet-flavonoids-fructose-cholesterol.html>, 12.05.2016.
17. E.Bešić, Spektroskopija elektronske paramagnetske rezonancije, Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, Zagreb,2010.
18. S. Valić, neobjavljeni rezultati.
19. O.Koprivnjak i sur., *Food Chemistry***111** (2008) 121-126.
20. J. Boyer, R.H. Liu, *New York Fruit Quarterly***11** (2003-2004) 11-15.
21. S.S.Mitići sur., *Bulgarian Chemical Communications***45** (2013) 326-331.
22. M.Kalinowska i sur., *Plant Physiology and Biochemistry***84** (2014) 169-188.
23. <https://www.sciencedaily.com/releases/2005/05/050523234141.htm>, 18.05.2016.
24. S.J.Padayatty i sur., *Journal of the American College of Nutrition***22**(2003) 18-35.

25. S.Saxena i sur., *Journal of Food Science***81** (2016) 508-518.
26. L.Montero i sur., *Journal of Chromatography A***1313** (2013) 275-283.
27. J.Hammerstone i sur., *Journal of Nutrition***130** (2000) 2086-2092.
28. P. D. Drogoudi i sur.,*Scientia Horticulturae***115**(2008) 149-153.
29. A.Duda-Chodak i sur., *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research***18**(2010) 39-50.
30. A.A.van der Sluis i sur.,*Journal of Agricultural anf Food Chemistry***50** (2002) 7211-7219.
31. M.Awad i sur.,*Scientia Horticulturae***90** (2001) 69-83.
32. V.Bačić, Distribucija vitamina C u plodovima četiri sorte jabuka, završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb 2014.
33. K.Wolfe i sur., *Journal of Agricultural anf Food Chemistry* **51**(2013) 609-614.
34. B.Lata i sur., *Scientia Horticulturae* **121** (2009) 176-181.
35. C.Kevers i sur., *Journal of Agricultural anf Food Chemistry* **59** (2011) 165-171.
36. F.G.K.Vieira i sur., *Scientia Horticulturae***128** (2011) 261-266.
37. D.De Paepe i sur., *Metabolomics***11** (2015) 739-752.

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Sandro Perović
Datum i mjesto rođenja: 14. veljače 1993., Rijeka
Adresa: Braće Honović 1, 51415 Lovran
E-mail: sandro.perovic93@gmail.com

ŠKOLOVANJE

- 2014.- Diplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo, Medicinski fakultet
 Sveučilišta u Rijeci
 Diplomski rad:
 mentor: prof. dr. sc. Srećko Valić
- 2011.- 2014. Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo, Medicinski fakultet
 Sveučilišta u Rijeci
 Završni rad: “Utjecaj sorte i sastava kave na njenu antioksidacijsku aktivnost”,
 mentor: prof. dr. sc. Srećko Valić
- 2007.-2011. Prva riječka hrvatska gimnazija, opći smjer
- 1999.-2007. Osnovna škola Viktora Cara Emina - Lovran