

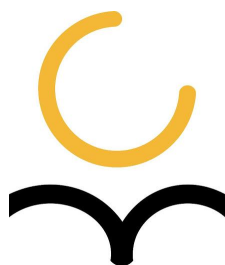


**Znanstvenik u meni
(originalni istraživački rad)**

Autor: Jan Špiclin

Mentor: Tihana Čus Slatković, mag. educ. biol. et chem.

Utjecaj temperature na antioksidacijski kapacitet kod jabuke „bobovec“



Prva gimnazija Varaždin

24. veljače 2021.

Sadržaj

Sažetak	3
Hipoteza i motivacija.....	3
Metodologija	4
Eksperimentalni rezultati	9
Diskusija.....	11
Zaključci	11
Literatura	12

Sažetak

„Jedna jabuka na dan, tjera doktora iz kuće van!“ izreka je koja se ustalila u naše društvo upravo iz razloga jer je jabuka voće koje se iz klimatskih razloga kod nas najviše uzgaja i koristi u prehrani. S obzirom na to, za ovo je istraživanje odabrana upravo jabuka kao predmet istraživanja i to tradicionalna sorta „bobovec“. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kako će temperaturna obrada i prisutnost pesticida utjecati na antioksidacijski kapacitet te koncentraciju ukupnih fenola. Antioksidansi su tvari koje će slobodnom radikalu, tvari koja se oksidira, dati jedan elektron kako bi ona bila stabilna, odnosno kako ne bi oštetila molekulu DNA. Obje zavisne varijable određivane su spektrofotometrom. Spektrofotometar je uređaj koji određuje apsorbanciju monokromatske svjetlosti određene valne duljine, a mehanizam djelovanja se temelji na Lambert Beerovu zakonu. Apsorbancije su preračunavane u vrijednosti koncentracija uvrštavanjem u jednadžbe pravaca baždarnih krivulja. Baždarna krivulja za fenole rađena je pomoću otopina točno poznatih koncentracija galne kiseline, dok je baždarna krivulja za antioksidacijski kapacitet rađena pomoću otopina Troloxa. Dobiveni rezultati upućuju na to da najveći antioksidacijski kapacitet i najvišu koncentraciju ukupnih fenola ima kuhana jabuka, no postoji mogućnost da je kod kuhanja voda isparila pa su zbog toga vrijednosti nešto više nego kod svježe jabuke. Zamrzavanjem jabuke značajno se gube antioksidacijska svojstva i koncentracija ukupnih fenola. Špricanjem jabuka pesticidima, smanjuje se antioksidacijski kapacitet, ali i koncentracija ukupnih fenola. Daljnjim istraživanjima, trebala bi se ispitati koncentracija flavonoida i antioksidacijski kapacitet nekim drugim metodama kao što su ABTS metoda.

Ključne riječi: jabuka „bobovec“, fenoli, antioksidacijski kapacitet, spektrofotometrija

Hipoteza i motivacija

Tema „Utjecaj temperature na antioksidacijski kapacitet kod jabuke „bobovec“ odabrana je zato što je jabuka voće koje ljudi najčešće koriste u svojoj prehrani na vrlo različite načine. Odabrana je tradicionalna sorta jabuke bobovec zato što se takva jabuka često može naći u voćnjacima uz domaćinstva našeg kraja, ali i većim voćnjacima za industrijsku proizvodnju. Istraživat će se utjecaj temperature na antioksidacijski kapacitet i koncentraciju fenolnih spojeva kod domaće neprskane i kupovne prskane jabuke „bobovec“. Bit će mjerena zavisnost od temperature zato što ljudi jabuke koje ne pojeduju dok su svježe, obično stavljaju u zamrzivač na zamrzavanje kako bi ih mogli jesti tijekom cijele godine. Također, jabuke često budu kuhane za kompot, sok, džem i dr. Istraživan je antioksidacijski kapacitet zato što su antioksidansi tvari koje doniraju elektron tvarima koje nazivamo slobodni radikali te im na taj način daju stabilnost jer bi u protivnom slobodni radikali oštetili molekulu DNA u stanici. Na taj način antioksidansi usporavaju starenje, djeluju antikancerogeno te pridonose očuvanju zdravlja (slika 1). Fenoli su organski spojevi koji pripadaju skupini antioksidansa. Istraživačko pitanje kojim se ovo istraživanje bavi glasi: „Kako temperatura utječe na antioksidacijski kapacitet i koncentraciju ukupnih fenola kod kupljene prskane i domaće neprskane jabuke „bobovec“?“

Cilj ovog istraživanja pokazati je koja će jabuka sorte „bobovec“ (prskana ili neprskana) i kako obrađena (zamrznuta, svježa, kuhana) imati najveće antioksidacijsko djelovanje te time biti najpogodnija za konzumaciju.

Hipoteze:

1. kupovna jabuka će imati slabije antioksidacijsko djelovanje od domaće jabuke,
2. najjače antioksidacijsko djelovanje će imati jabuke koje su svježe,
3. zamrzavanjem će jabuke izgubiti antioksidacijska svojstva.



Slika 1 Modeli antioksidansa i slobodnih radikala

Metodologija

Istraživanje je podijeljeno u 6 eksperimentalnih skupina (tablica 1).

Tablica 1 Prikaz istraživanja po skupinama

VARIJABLE	eksperimentalne skupine					
	domaća jabuka			kupovna jabuka		
nezavisne varijable	svježa	smrznuta	prokuhana	svježa	smrznuta	prokuhana
oznaka eksperimentalnih skupina	D1	D2	D3	K1	K2	K3
zavisna varijabla - Fenoli						
nezavisne varijable	svježa	smrznuta	prokuhana	svježa	smrznuta	prokuhana
zavisna varijabla – antioksidacijski kapacitet						

Za ovo istraživanje korištene su sljedeće metode:

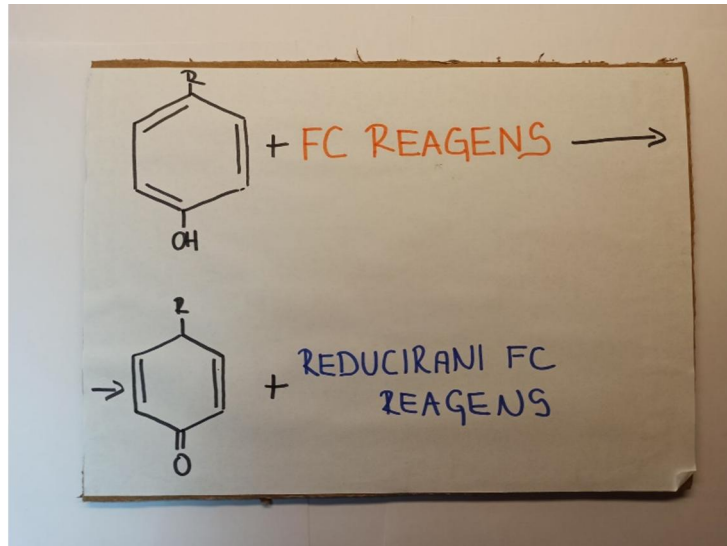
1. Priprema uzoraka jabuke bobovec

Sokovnikom je napravljeno 6 sokova od jabuke (za svaku skupinu jedna). Nakon svake skupine jabuka sokovnik je potrebno oprati kako ne bi došlo do kontaminacije između različitih skupina. Sok svake skupine valja spremiti u posebnu čistu bočicu, a sok skupine D3 i K3 prokuhati 5 minuta do 70 °C zbog pasterizacije.

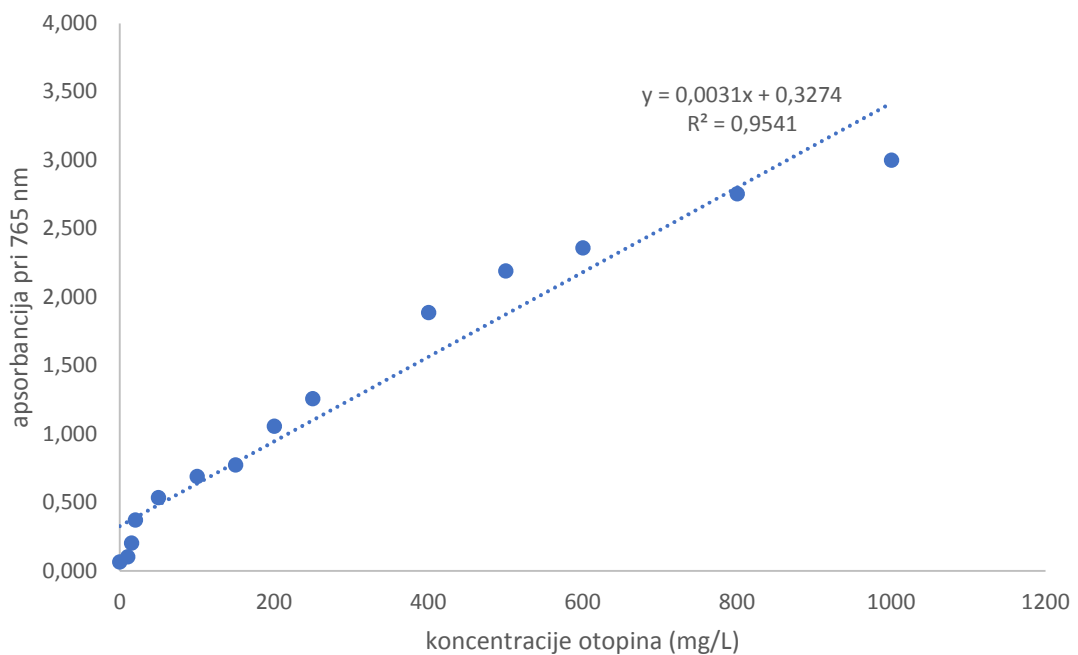
2. Određivanje ukupnih fenola

Za određivanje ukupnih fenola korišten je Folin-Ciocalteu reagens. Najprije su koncentri soka od jabuke razrijeđeni destiliranom vodom u omjeru koncentrat : destilirana voda = 0,015 : 1. Sve to rađeno je u Falcon epruvetama kako bi se dobivena smjesa mogla vorteksirati. Nakon toga bilo je potrebno u uzorke pipetirati još 20 %-tnu otopinu natrijeva karbonata (natrijev karbonat : FC reagens = 1 : 1). Smjesa se nakon toga ponovno vorteksirala i stavila u vodenu kupelj na 45 °C u vremenu od 60 minuta. FC reagens se reducira i promjeni boju iz žute u plavu (slika 2). Poslije 60 minuta, sadržaj se prebacio u kivete za spektrofotometriju te su se očitale po 3 apsorbancije za svaki uzorak na valnoj duljini od 765 nm. Uređaj se kalibrirao

destiliranom vodom. Baždarna krivulja izrađena je pomoću mjerenja apsorbancija otopina galne kiseline poznatih koncentracija u rasponu od 5 – 1000 mg/L (slika 3).



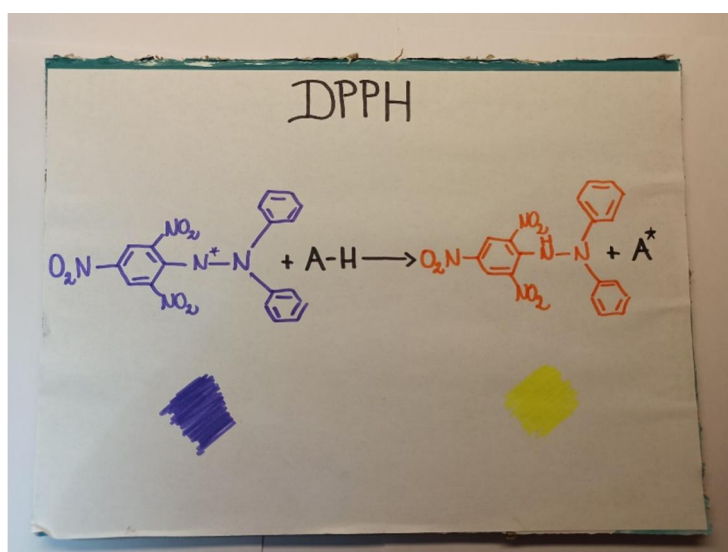
Slika 2 Reakcija FC reagensa i fenolnih spojeva



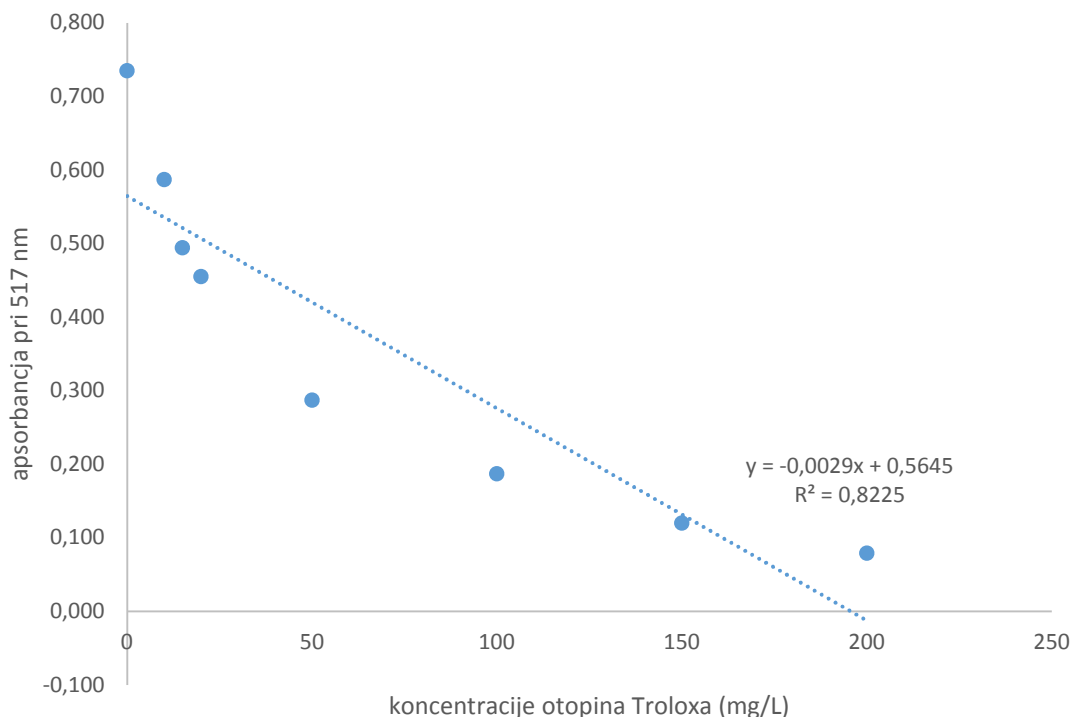
Slika 3 Baždarna krivulja za fenole (ovisnost apsorbancije pri 765 nm o koncentracijama otopine galne kiseline)

3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti Brand-Williams metodom pomoću stabilnog slobodnog radikala DPPH

U Falcon epruvetu otpipetirano je redom 150 μL ekstrakta jabuke i 2,85 mL 0,1 mmol/L otopine DPPH. Sadržaj je vorteksiran i ostavljen stajati 70 minuta u mraku na sobnoj temperaturi nakon čega je mjerena apsorbancija na 517 nm uz smjesu otopina 50 %-tnog i 96 %-tnog etanola kao slijepe probe. Slobodni radikal DPPH se reducira i promjeni boju iz ljubičaste u žutu (slika 4). Kao negativna kontrola korištena je smjesa 0,1 mmol/L otopine DPPH i otopina 50 %-tnog etanola, a kao pozitivna kontrola korištena je smjesa 0,1 mmol/L otopina DPPH i otopina 30 %-tne askorbinske kiseline. Baždarna krivulja napravljena je pomoću otopina Troloxa u 96%-tnom etanolu u rasponu koncentracija 0,25-2,0 mmol/L (slika 5).



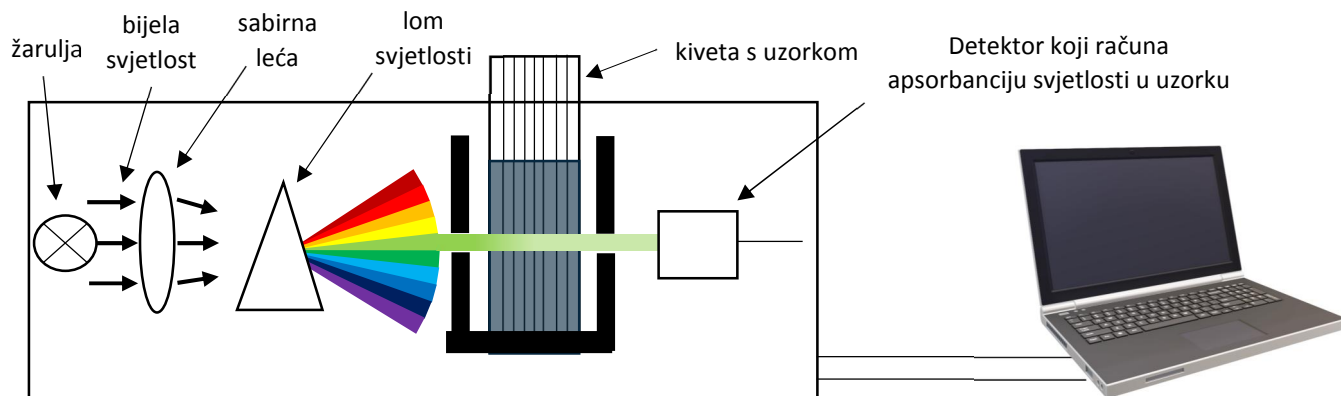
Slika 4 Redukcija slobodnog radikala DPPH



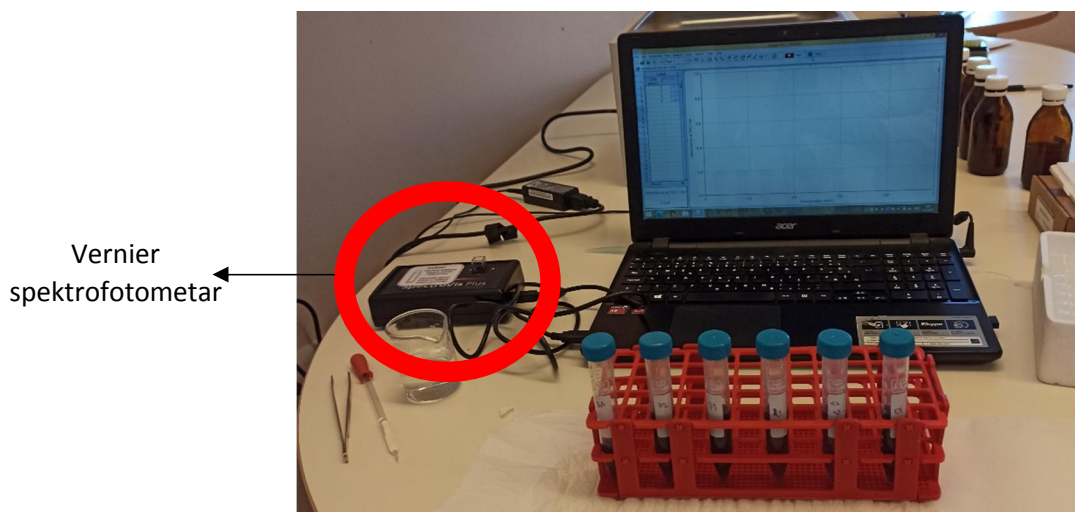
Slika 5 Baždarna krivulja za DPPH test (ovisnost apsorbancije pri 517 nm o koncentracijama otopine Troloxa)

4. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je metoda kojom se dobiva vrijednost apsorbirane monokromatske svjetlosti određene valne duljine u uzorku. Uređaj za spektrofotometriju naziva se spektrofotometar (slika 6). U ovome istraživanju korišten je spektrofotometar tvrtke Vernier (slika 7).



Slika 6 Shematski prikaz spektrofotometra



Slika 7 Spektrofotometrija pomoću Vernier spektrofotometra

Spektrofotometar radi na sljedećem principu:

1. žarulja pušta bijelu svjetlost
2. bijela svjetlost se u sabirnoj leći usmjerava k prizmi na kojoj se lomi
3. svjetlost određene valne duljine prolazi kroz uzorak
4. dio puštene svjetlosti apsorbira se u uzorku, a dio prolazi kroz nj
5. detektor prepoznaje svjetlost koja je prošla kroz uzorak (transmitacija) te tu vrijednost preračuna u apsorbanciju

Cijeli postupak u spektrofotometru vrlo je složen proces Lambert Beerova zakona koji govori da apsorbancija ovisi o debljini sloja otopine i eksponencijalno o množinskoj koncentraciji otopine. U praksi, taj proces je vrlo jednostavan zato što se kiveta s otopinom stavi u spektrofotometar, a na računalo se pojavi brojka koja označava apsorbanciju.

Sumirani prikaz metoda (tablica 2):

Tablica 2 Popis varijabli i način na koji će se one mjeriti, odnosno kontrolirati

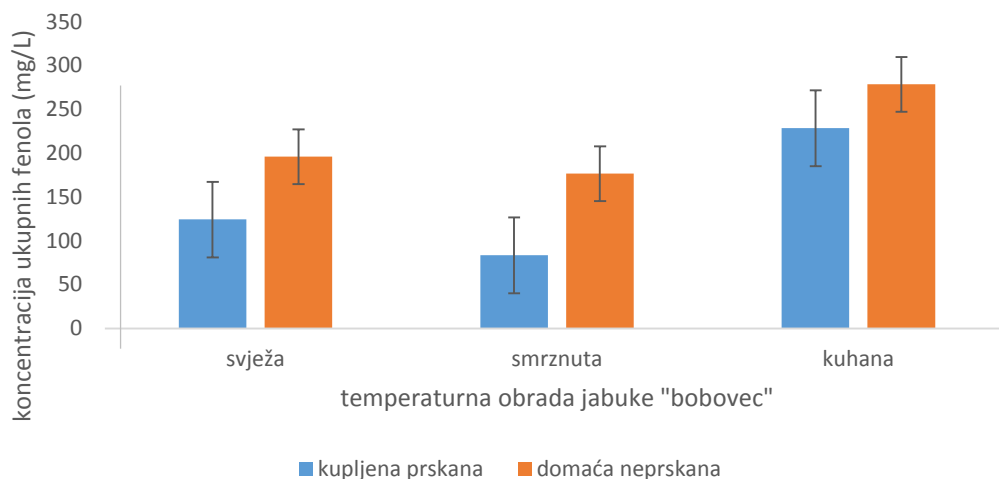
Tip varijable	Ime varijable	Način određivanja, mjerenja i kontroliranja varijabli te razlozi njihovog odabira
Nezavisne varijable	Jabuke	U istraživanju su bile korištene domaće neprskane jabuke i kupovne prskane jabuke tradicionalne sorte bobovec.
	Temperatura	<ol style="list-style-type: none"> 3 neprskane i 3 prskane jabuke bile su smrznute u zamrzivaču na temperaturi od -18 °C na 48 sati nakon čega su bile iscijeđene 3 neprskane i 3 prskane jabuke bile su ostavljene na sobnoj temperaturi nakon čega su bile iscijeđene 3 neprskane i 3 prskane jabuke najprije su bile iscijeđene kako se iz njih dobio sok koji se kasnije prokuhao do 70 °C (pasterizacija).
Zavisne varijable	Određivanje koncentracije ukupnih fenola	spektrofotometrijski (Folin-Ciocalteu reagens)
	Određivanje antioksidacijske aktivnosti	spektrofotometrijski (DPPH)
Kontrolne varijable	Plod od interesa	Sve neprskane jabuke korištene u istraživanju ubrane su u istome voćnjaku, skladištene su na jednak način te su približno jednakih masa.
		Sve prskane jabuke korištene u istraživanju kupljene su u istome voćnjaku te su tretirane istim kemikalijama i istim brojem prskanja.
		Kupljene jabuke su prskane s: <ol style="list-style-type: none"> Dithane DG (Indofil industrie) Syllit 400 SC (Arysta life science) Chorus 25 WG (Novartis) Confidor (Byaer Crop Science) Actara 25 WG (Syngenta Crop protections)
	Vrijeme	Sve jabuke skupina D2 i K2 su bile u zamrzivaču 48 sati, a D3 i K3 kuhane 5 minuta.
	Čistoća laboratorijskog pribora	Sokovnik je bio očišćen nakon cijedenja svake skupine jabuka kako ne bi došlo do kontaminacije između skupina. Isto tako čišćen je sav laboratorijski pribor zbog moguće kontaminacije.

Statističke metode

U ovome istraživanju korištene su sljedeće deskriptivne statističke metode: standardna devijacija Anova i Tukey test. Standardna devijacija matematička je metoda koja govori o pouzdanosti rezultata i njihovoj raspršenosti oko aritmetičke sredine (preciznost i točnost mjerenja). Ona prati Gaussovu krivulju. Ako je standardna devijacija mala to znači da su mjerenja jako grupirana jedna oko drugoga – preciznost mjerenja i metode je velika. Anova test je utvrdio postoji li ili ne značajna razlika između testiranih grupa (tj. koja je vjerojatnost da se takav ili bolji rezultat dogodi čisto slučajno). Ako ima značajne razlike, provodi se daljnja analiza (Tukey test) kako bi se utvrdilo između kojih grupa zapravo postoji razlika (uz preduvjete, $\alpha < 0,05$ → znači da je vjerojatnost da se takav ili bolji rezultat pojavi manja od 5 %).

Ekperimentalni rezultati

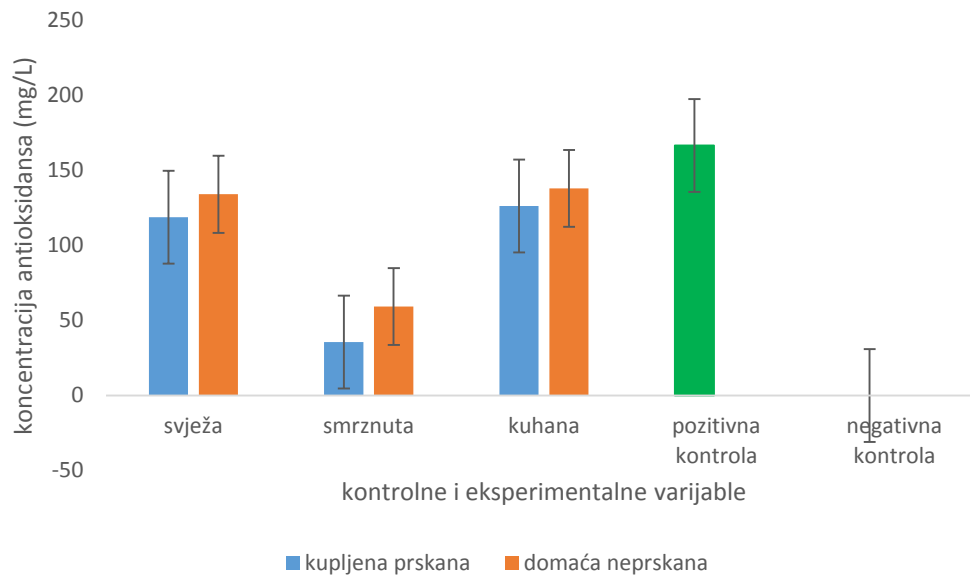
1. Koncentracija ukupnih fenola



Slika 8 Koncentracija fenola u prskanoj i neprskanoj jabuci "bobovec"

Različita temperaturna konzerviranja jabuke te prisutnost pesticida pokazali su različite vrijednosti koncentracija ukupnih fenola. Na slici 8 vidljiv je pad koncentracija fenola kupljenih prskanih jabuka s obzirom na domaće neprskane jabuke u svim skupinama. Također, vidljiv je pad koncentracija ukupnih fenola smrznute jabuke s obzirom na kuhanu i svježju jabuku. Najveća koncentracija ukupnih fenola učitana je kod domaće neprskane kuhane jabuke, a slijedi joj kupljena prskana jabuka. Između eksperimentalnih skupina postoji statistički značajna razlika (F vrijednost=3,05; F crit=9,55; p vrijednost=0,019). Dodatnom analizom (Tukey test) utvrđeno je da postoje značajne razlike između svježe domaće i kupljene smrznute jabuke (p vrijednost = 0).

2. Antioksidacijski kapacitet



Slika 9 Antioksidacijski kapacitet kod različito konzerviranih jabuka "bobovec"

Ukupni antioksidacijski kapacitet očitao za različite skupine pokazuje velike razlike između pojedinih skupina (slika 9). U ovome su mjerenju napravljene i kontrolne skupine s kojima se mogu uspoređivati dobiveni rezultati eksperimentalnih skupina. Pozitivna kontrolna skupina jest ona čije tvar će u potpunosti reagirati s reagensom i dati željenu promjenu, a negativna ona koja neće dati promjenu. Iz istog je razloga za pozitivnu kontrolnu skupinu korištena 30 %-tna otopina askorbinske kiseline koja je glavni antioksidans u ljudskom tijelu, a za negativnu kontrolnu skupinu destilirana voda. Ako rezultate uspoređujemo s kontrolnim skupinama, vidimo da su sve skupine „bliže“ pozitivnoj kontrolnoj skupini što ukazuje na visok udio antioksidansa u jabuci neovisno o njezinu načinu konzerviranja i prisutnosti pesticida. Najviše koncentracije ponovno pokazuje kuhana jabuka, a najmanje smrznuta. U svim skupinama vrijednosti koncentracija kupljene prskane jabuke niže su, nego kod domaće neprskane jabuke. Kuhana i svježa domaća jabuka imaju vrijednosti gotovo jednake pozitivnoj kontroli što ukazuje na to da je jabuka „bobovec“ gotovo isto jaki antioksidans kao i 30 %-tni vitamin C. Anova testom je pokazano da između eksperimentalnih skupina postoji statistički značajna razlika (F vrijednost=26,93; F crit=9,28; p vrijednost=0,011). Dodatnom analizom (Tukey test) utvrđeno je da postoje značajne razlike između svježe domaće i kupljene smrznute jabuke te između kuhane domaće i smrznute kupljene jabuke (p vrijednost < 0,05).

Diskusija

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem uglavnom se poklapaju s početnim hipotezama. Koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta veća je u svim skupinama kod domaće jabuke, a manja kod kupovne. Najmanje vrijednosti kao što je i očekivano ima smrznuta jabuka. Kuhana jabuka ima najviše vrijednosti što je rezultat nepravilne pripreme uzorka. Prilikom pasterizacije soka dio vode je ispario pa je sok kuhane jabuke bio koncentriraniji od soka svježeg i smrznute jabuke. Pretpostavlja se da su vrijednosti ukupnih fenola, ali i antioksidacijskog kapaciteta kod kuhanih jabuka zapravo niže nego kod svježih, što bi se možda i dokazalo da je priprema uzorka takve jabuke bila pravilna. Za buduća istraživanja trebalo bi sok pasterizirati na način da se posuda u kojoj se sok kuha začepi tako da voda iz njega ne može ispariti. Također, uz provedene testove, za preciznije rezultate bilo bi dobro napraviti i ABTS test, FRAP metodu odrediti koncentraciju flavonoida i alkaloida.

Zaključci

Na temelju dobivenih rezultata donose se sljedeći zaključci:

- najveću koncentraciju fenolnih spojeva, ali i najveći antioksidacijski kapacitet ima domaća neprskana kuhana jabuka, a najmanju koncentraciju fenola i najmanji antioksidacijski kapacitet kupovna prskana smrznuta jabuka što upućuje na to da se smrzavanjem gube antioksidacijska svojstva jabuke „bobovec“
- vrijednosti fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta u svim su skupinama viši kod domaće neprskane, nego u kupovne prskane jabuke; tretiranje jabuke „bobovec“ pesticidima smanjuje antioksidacijska svojstva iste
- uzorak svježeg i kuhane domaće jabuke ima gotovo jednak antioksidacijski kapacitet kao i 30 %-tni vitamin C što upućuje na to da je poželjno uključiti domaću neprskanu jabuku „bobovec“ u svakodnevnu prehranu

ZAHVALA

Najiskrenije se zahvaljujem mentorici, prof. Tihani Čus Slatković, na trudu, vremenu, strpljenju, savjetima, dugosatnim ostajanjima u školskom laboratoriju i na Zoomu za vrijeme školskih praznika te na potpori koju mi je pružila u osmišljavanju teme i provođenju ovog istraživanja.

Veliko hvala i profesorici Martini Vidović na poticaju za prijavu na natjecanje, savjetima prilikom provođenja istraživanja te na tehničkoj potpori pri radu u laboratoriju.

Hvala svim profesorima zbog kojih sam zavolio znanost, te Prvoj gimnaziji Varaždin koja mi je omogućila odraditi istraživanje koje iziskuje zahtjevnu laboratorijsku opremu.

Literatura

1. Bahun V. 2017. Bioaktivni potencijal samoniklih jestivih gljiva Hrvatske. Repozitorij Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Zagreb.
2. Crkvenac M. 2019. Ispitivanje otpornosti tradicionalnih sorti jabuka na zarazu s plijesni *Penicillium expansum*. Repozitorij Prehrambeno-tehnološkog fakulteta, Osijek.
3. Henríquez C. i sur. 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: 523-536.
4. Sochor J. i sur. 2010. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules* 15: 8618-8640.

Prilozi:



Slika 10 QR kod poveznica na galeriju fotografija snimljenih tijekom izvođenja istraživanja u školskom laboratoriju