

Kvalitativna analiza fenolnih spojeva u komini jabuke tekućinskom kromatografijom

Voća, Mihaela

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:544872>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
PRIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

Mihaela Voća

**Kvalitativna analiza fenolnih spojeva u komini jabuke
tekućinskom kromatografijom**

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja **Mihaela Voća**

Predala je izrađen završni rad dana: 3. srpnja 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Martina Miloloža, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Josipa Papac Zjačić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 8. srpnja 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
PRIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

Mihaela Voća

**Kvalitativna analiza fenolnih spojeva u komini jabuke
tekućinskom kromatografijom**

ZAVRŠNI RAD

Mentorica: Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Doc. dr. sc. Martina Miloža

Dr. sc. Josipa Papac Zjačić

Zagreb, 2024.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na stručnoj pomoći i savjetima tijekom pisanja ovog završnog rada.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Jani Šic Žlabur na ustupanju laboratorija i pomoći prilikom izrade završnog rada.

Također zahvaljujem se svojim bližnjima, na potpori tijekom studiranja.

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	1
ABSTRACT	2
1. UVOD	3
2. OPĆI DIO.....	4
2.1. Jabuka.....	4
2.2. Obrada jabuke.....	5
2.3. Ljekovitost ploda jabuke	6
2.4. Jabučna komina	7
2.4.1. Jabučna komina kao organski otpad.....	8
2.4.2. Jabučna komina kao prirodni farmaceutik	10
2.4.3. Jabučna komina u prehrambenoj industriji.....	10
2.4.4. Jabučna komina u biotehnologiji i poljoprivredi.....	11
2.4.5. Jabučna komina u kozmetici	11
2.5. Kemijski sastav jabučne komine	12
2.6. Polifenoli	14
2.7. Klasifikacija polifenola	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. Biljni materijal.....	18
3.2. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom	19
3.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida i neflavonoida	21
3.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	21
3.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	23
3.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	24
3.7. Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva Visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC).....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
5. ZAKLJUČAK	32
6. POPIS SIMBOLA	33
7. LITERATURA.....	34
8. PRILOZI.....	37
ŽIVOTOPIS	40

SAŽETAK

Jabuka je jedna od najrasprostranjenijih voćnih vrsta u svijetu i koristi se za svježju konzumaciju i proizvodnju različitih prerađevina. Prilikom prerade jabuka nastaje značajna količina nusproizvoda poznatog kao jabučna komina, koja ima potencijalnu nutritivnu vrijednost zbog prisutnosti mnogih hranjivih tvari, među kojima su i polifenoli, poznati po svojim antioksidacijskim svojstvima. Upravo zbog svog nutritivnog sastava, jabučna komina nalazi svoju primjenu u brojnim granama industrije, od prehrambene do farmaceutske. Iz tog razloga, cilj ovog rada je utvrđivanje primjene korisnih polifenola jabučne komine u svakodnevici te kvalitativna analiza polifenolnih spojeva u svrhu njezine daljnje uporabe. Istraživanje se provodilo na četiri različite sorte jabuka, a količine hranjivih tvari u jabučnoj komini dokazane su pomoću HPLC analize pojedinačnih fenolnih spojeva, te ukupnih fenolnih, flavonoidnih i neflavonoidnih spojeva. Navedeni rezultati dodatno su potkrijepljeni antioksidacijskim testovima metodama ABTS, FRAP i DPPH. Istraživanje ukazuje na veliki potencijal jabučne komine kao izvora prirodnih polifenola s primjenom u različitim industrijama. Rad pridonosi razumijevanju nutritivne vrijednosti jabučne komine i potencijala njenog korištenja u proizvodnji dodataka prehrani i drugih proizvoda. Rezultati istraživanja mogu poslužiti kao temelj za daljnje studije i komercijalne aplikacije polifenola dobivenih iz jabučne komine.

Ključne riječi: jabuka, komina, uporaba, polifenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost

ABSTRACT

The apple is one of the most widespread fruit species in the world, used both for fresh consumption and for the production of various processed products. The processing of apples produces a significant amount of byproduct known as apple pomace, which has potential nutritional value due to the presence of many nutrients, including polyphenols, known for their antioxidant properties. Due to its nutritional composition, apple pomace is used in numerous industries, from food to pharmaceuticals. For this reason, the aim of this study is to determine the application of the beneficial polyphenols in apple pomace in daily life and to perform a qualitative analysis of the polyphenolic compounds for further use. The study was carried out on four different apple varieties and the amounts of nutrients in apple pomace were determined by HPLC analysis of the individual phenolic compounds as well as the total phenolic, flavonoid and non-flavonoid compounds. These results were also confirmed by antioxidant tests using the ABTS, FRAP and DPPH methods. The study shows the great potential of apple pomace as a source of natural polyphenols with applications in various industries. The study contributes to the understanding of the nutritional value of apple pomace and its potential use in the production of food supplements and other products. The research results can serve as a basis for further studies and commercial applications of polyphenols from apple pomace.

Keywords: apple, pomace, utilisation, polyphenolic compounds, antioxidant activity

1. UVOD

Jabuka je kao voćka široko rasprostranjena diljem svijeta i pronalazi veliku upotrebu za konzumaciju u svježem stanju, ali i prerađena dostupna u obliku različitih proizvoda, poput soka, octa, čipsa od jabuke, džema i slično. Kroz povijest jabuka je uvijek bila značajna biljna vrsta i s gospodarskog i sa zdravstvenog aspekta. Njezina ljekovita svojstva prepoznaju se svakim danom sve više te je sve veća potražnja za svježim plodovima i njezinim proizvodima. S obzirom na široku popularnost i potražnju proizvoda od jabuke, kapaciteti prerade ove voćne vrste značajno su povećani, a s čime se potencijalno generiraju i veće količine otpada koji zaostaje nakon prerade [1]. Organski ostatak jabuke (jabučna komina) nakon prerade klasificira se kao biootpad, a sastoji se najčešće od peteljke, sjemenki, kože ploda i ostataka pulpe. Zbrinjavanje takvog otpada donosi sa sobom velike izazove te se prema aktualnim smjernicama u hijerarhiji gospodarenja otpadom sve više počinju razvijati i primjenjivati prakse koje će posljedično doprinijeti smanjenju količine nastalog biootpada poput mogućnosti uporabe, ponovne upotrebe kao i proizvodnje novih proizvoda dodane vrijednosti [2]. S obzirom da su ljekovita svojstva ploda jabuke široko poznata, postavlja se i značajan interes oko valorizacije sastava nastalog biootpada, tj. jabučne komine. Istraživanja dokazuju kako organski ostatak jabuke sadrži brojne fitokemikalije značajne nutritivne vrijednosti [3,4], a čime se komina kao potencijalni proizvod dodane vrijednosti može istaknuti za brojne pogodnosti, prvenstveno iz zdravstvenog aspekta. Među spomenutim fitokemikalijama kojima jabučna komina obiluje izdvajaju polifenolni spojevi. Polifenoli se prije svega ističu kao značajni antioksidacijski spojevi, korisni su za mnoge zdravstvene primjene, te stoga svoju svrhu pronalaze od farmaceutske, prehrambene do kozmetičke industrije. U navedenim industrijama sve je veća potražnja za prirodnim suplementima te se stoga istraživanja potencijalnih prirodnih izvora polifenola sve više potenciraju [5]. Sukladno tome, ovaj rad dotiče se važnosti uporabe jabučne komine, mogućnostima primjene korisnih polifenola jabučne komine u svakodnevnici te kvalitativnom analizom polifenolnih spojeva u svrhu valorizacije jabučne komine kao potencijalno značajnog izvora prirodnih polifenola.

2. OPĆI DIO

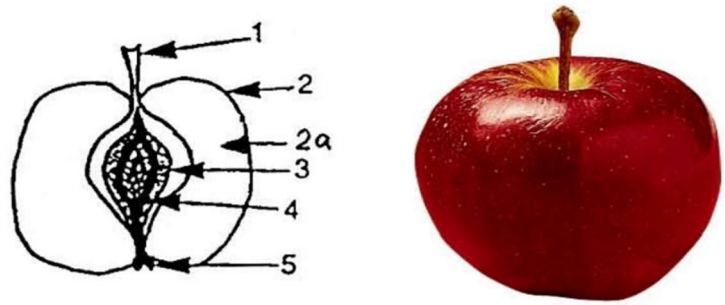
2.1. Jabuka

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) je višegodišnja biljka koja pripada porodici ruža (Tablica 1) [6]. Jedna je od najranijih voćnih vrsta poznata čovjeku i široko je uzgajana u različitim klimatskim podnebljima. Zajedno s narančama, bananama i groždem, jabuke su najčešće konzumirana voćna vrsta na svijetu [4]. Domaća jabuka *Malus domestica* Borkh. podrijetlom je iz centralne Azije te se od tamo proširila diljem svijeta i prilagodila različitim klimama i načinima uzgoja [6].

Tablica 1: Botanička klasifikacija jabuke [6]

Carstvo	Plantae
Divizija	Magnoliophyta
Razred	Magnoliopsida
Red	Rosales
Porodica	Rosaceae
Potporodica	Maloideae
Rod	<i>Malus</i>
Vrsta	<i>M. domestica</i>

Plodovi jabuke razvijaju se nakon oplodnje cvijeta i najčešće kreću zrijeti u ranu jesen. Prosječna masa ploda jabuke je oko 160 g, ali pojedini sortimenti mogu doseći masu i do 600 g. Plodovi se prvenstveno razlikuju ovisno o sortimentu, a prilikom čega se izdvajaju prema obliku, veličini, boji, teksturi, vremenu sazrijevanja, sadržaju nutritivnih tvari itd. Plod jabuke (Slika 1) građen je od peteljke, kore, mesnatog usplođa, sjemene lože, sjemenke i listića čaške [6].



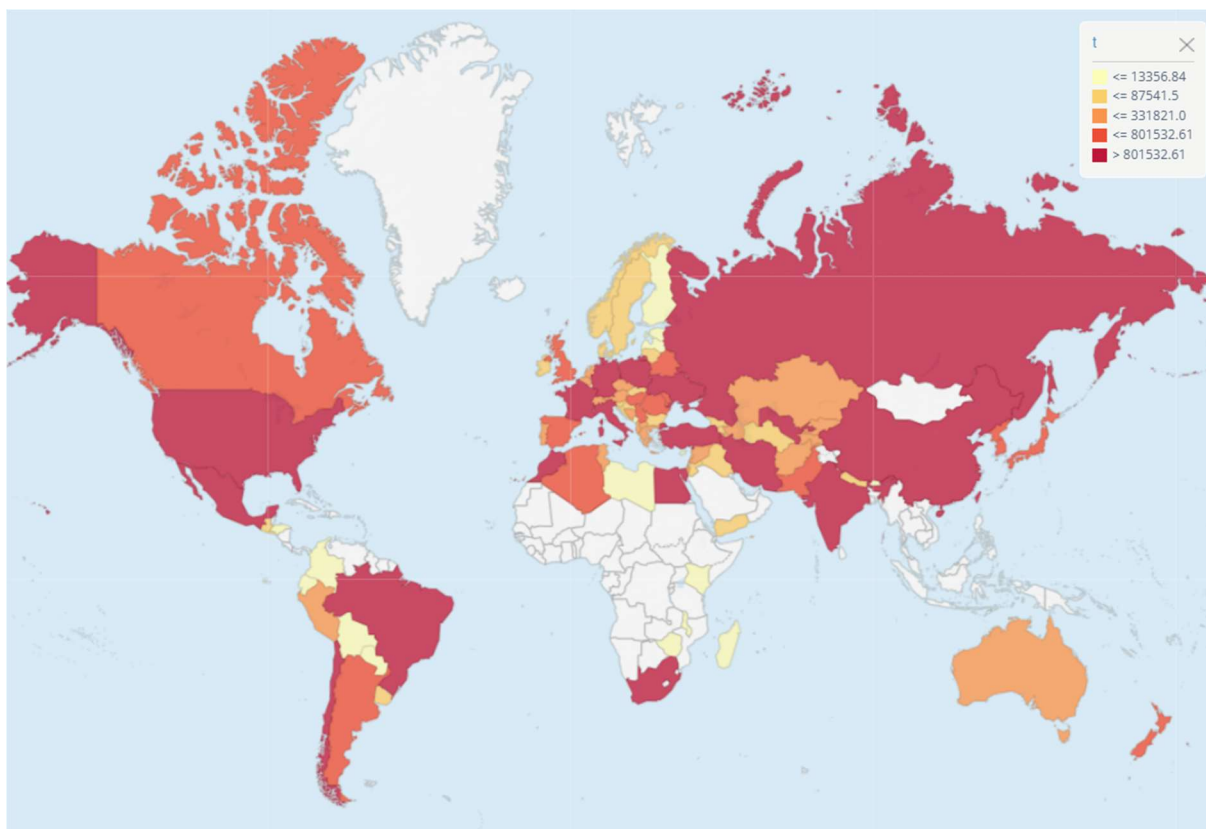
1. peteljka; 2. ljuska - kora; 2a. meso; 3. unutarnje meso; 4. sjeme; 5. čaška

Slika 1. Građa ploda jabuke [7]

Svake godine potražnja za voćem je sve veća i veća zbog svijesti potrošača o važnosti konzumiranja namirnica bogatih nutrijentima važnim za zdravlje. Prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) tijekom dana se preporuča konzumaciju barem 400 g svježeg jestivog voća ili povrća kako bi se poboljšalo generalno zdravlje, prevenirali nedostaci nutrijenata, a i s time i povezan potencijalan razvoj raznih oboljenja. S obzirom na prosječnu težinu ploda jabuke, ali i specifični sastav nutrijenata, konzumacija 2 do 3 ploda jabuke dnevno bila bi dovoljna da se ispuni gore navedena preporuka [8].

2.2. Obrada jabuke

Od kontinentalnih voćaka, jabuka zauzima prvo mjestu u svijetu u uzgoju. Inače, u sveukupnoj svjetskoj proizvodnji voća zauzima treće mjesto, odmah iza agruma i banana. Svjetskom proizvodnjom trenutno dominira nekoliko sorti jabuka: „Delicious“, „Golden Delicious“, „McIntosh“ i „Jonagold“, „Braeburn“, „Gala“, „Fuji“ i „Granny Smith“ [6]. Kina, Indija, Rusija i SAD dominiraju svijetom u uzgoju jabuka, a uz njih se ističu i Europske države poput Njemačke, Francuske, Italije i Poljske. Jabuke koje se plasiraju na tržište u svježem stanju čine 70 do 75 % ukupne proizvodnje plodova jabuke, dok se ostatak (25 do 30 %) koristi za preradu u proizvode poput soka, vina, džema, sušenih proizvoda. Jabučni sok je najtraženiji proizvod jabuke i zauzima 65 % od ukupne količine prerađenih proizvoda jabuke [4].



Slika 2. Količina proizvodnje ploda jabuke po državama u 2022. godini [9]

2.3. Ljekovitost ploda jabuke

Ljekovitost ploda jabuke poznata je još iz daleke prošlosti, a o čemu najbolje svjedoči narodna uzrečica „Jabuka na dan tjera doktora van!“. U narodnoj medicini koristila se kao lijek, za prevenciju bolesti, podizanje imuniteta i mnoge druge zdravstvene razloge. Ljekovitost jabuke može se pripisati njenim bogatim sadržajem spojeva sa značajnim antioksidacijskim potencijalom (vitamini, posebice vitamin C), polifenolni spojevi (flavonoidi), dijetalna vlakna i polimeri visokih molekularnih masa (Tablica 2). Istraživanja pokazuju kako su upravo polifenolni spojevi nutrijenti koji plod jabuke izdvajaju po značajnim zdravstvenim svojstvima i benefitima te uvelike pomažu organizmu kod brojnih stanja i oboljenja [10]. Polifenolni spojevi jabuke dokazano pomažu u smanjenju rizika od razvijanja karcinoma, srčanih bolesti, astme, dijabetesa tipa II te pomažu plućnim funkcijama i gubitku tjelesne težine. S obzirom na brojna navedena ljekovita svojstva, sve je veći interes za istraživanja polifenolnih spojeva u jabuci kao i boljem razumijevanju njihovog utjecaja na organizam [6].

Tablica 2: Nutritivni sastav ploda jabuke [10]

Komponenta	Količina po 100 g	Preporučena dnevna doza
Energija (kcal)	52	2,6
Voda (g)	85,56	/
Ugljikohidrati (g)	13,81	5,31
Dijetalna vlakna (g)	2,21	/
Šećeri (g)	10,39	11,54
Fruktoza (g)	5,9	/
Glukoza (g)	2,43	/
Proteini (g)	0,26	0,52
Lipidi (g)	0,17	0,24
Vitamin C (mg)	4,6	5,75
Thiamin (mg)	0,017	1,55
Riboflavin (mg)	0,026	1,86
Niacin (mg)	0,091	0,57
Vitamin B6 (mg)	0,041	2,93
Float (g)	3	1,5
Vitamin A (g)	3	0,38
Vitamin E (mg)	0,18	1,5
Vitamin K (g)	2,2	2,93
Kalcij (mg)	6	0,75
Željezo (mg)	0,12	0,86
Magnezij (mg)	5	1,33
Fosfor (mg)	11	2
Kalij (mg)	107	5,35
Natrij (mg)	1	0,04
Cink (mg)	0,04	0,4
Polifenoli (mg)	110,2	/
Flavanoidi (mg)	101,99	/

2.4. Jabučna komina

Jabučna komina izravni je nusproizvod procesa prerade ploda jabuke u sok i to najčešćim postupkom prešanja te na nju opada 20 do 30 % mase ploda jabuke. Najčešće se sastoji od kožice ploda, peteljke, pulpe, sjemene lože i sjemenki, a bogata je i važnim hranjivim tvarima

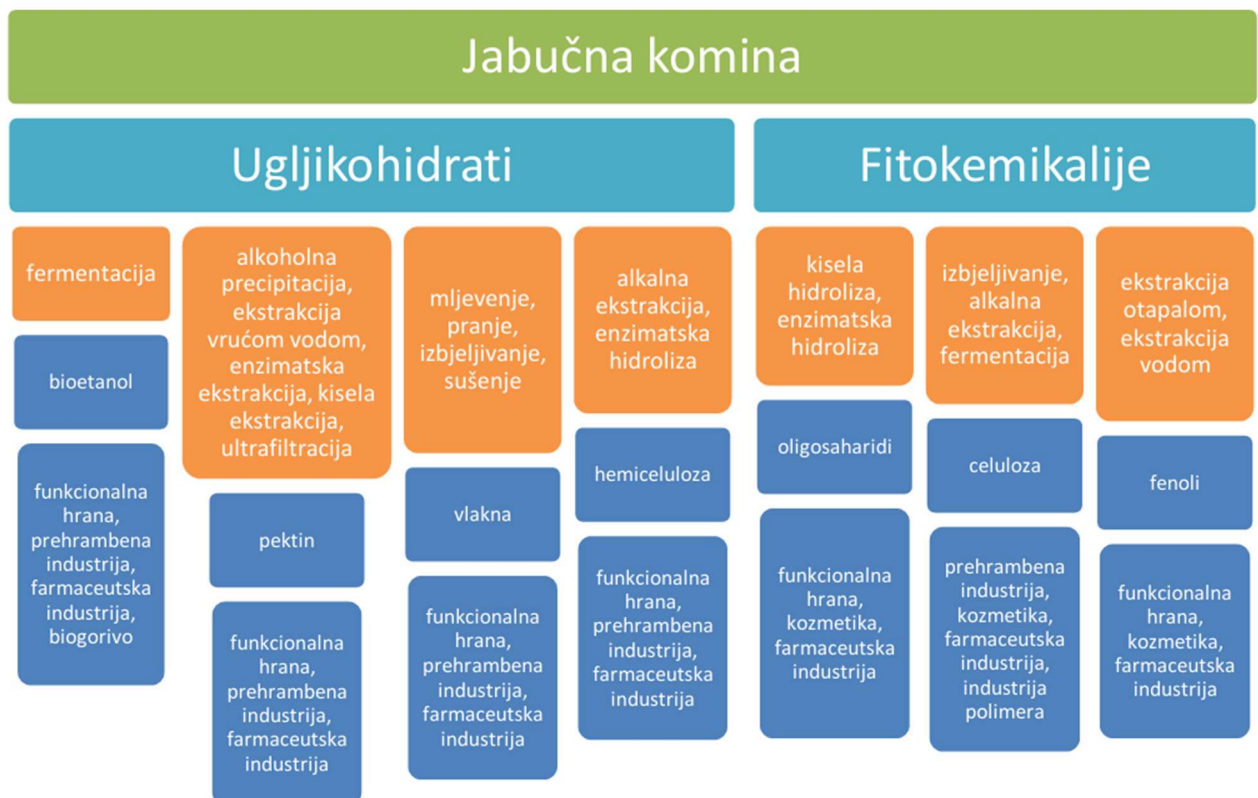
poput ugljikohidrata, polifenola, vlakana i vitamina, a zbog čega je i njezin potencijal daljnjeg korištenja velik. Naime, u plodu jabuke upravo su kožica i pokožica dijelovi koji obiluju polifenolnim spojevima značajnog antioksidacijskog djelovanja, a zbog čega se komina može smatrati i nutritivno vrijednim izvorom [11]. Godišnje se u svijetu proizvede velika količina jabučne komine, dok je istovremeno uporaba ovog nusproizvoda jako niska [4]. Zbog visokog nutritivnog potencijala postoji sve veća potražnja za uporabom komine kako bi se nadoknadio udio bioaktivnih komponenata kojima ostali proizvodi manjkaju. Te nutritivno vrijedne komponente mogu se oporaviti iz jabučne komine ili se izravno koristiti u prehrani, bez ili s minimalnom obradom. Stoga, jabučna komina i njezini proizvodi dodane vrijednosti mogu se dodavati i u prehrambene proizvode kako bi poboljšala njihove nutritivne vrijednosti [4].

2.4.1. Jabučna komina kao organski otpad

Obradom voća i povrća nastaju velike količine organskog otpada pod kojeg spada i jabučna komina. Prema Zakonu o održivom gospodarenju otpadom (NN 84/21), definira kao biološki razgradiv otpad iz vrtova i parkova, hrana i kuhinjski otpad iz kućanstava, restorana, ugostiteljskih i maloprodajnih objekata i slični otpad iz prehrambene industrije. Također, može se svrstati u biorazgradivi otpad kojeg isti zakon definira kao svaki otpad ili dio otpada koji podliježe anaerobnoj ili aerobnoj razgradnji, kao što je otpad iz vrtova, otpad od hrane te papir i karton. [12]. Trenutno, još uvijek najčešći način zbrinjavanja jabučne komine je izravno odlaganje na odlagališta. Pošto je biootpad podložan kvarenju i fermentaciji potrebne su mu daljnje obrade kako bi se smanjile potencijalne neugodnosti kao što su mirisi, najezda nametnika, širenje bolesti i sl. Često su troškovi obrade takvog otpada jako visoki jer uključuju i dodatne troškove poput transporta, skladištenja, odlaganja, itd. [4]. Obradom nusproizvoda može se povećati sama vrijednost proizvoda i smanjiti troškovi manipulacije, ali i generirana količina biootpada. S obzirom na velike količine komine koje se odlažu svakoga dana nužno je reagirati i predložiti bolje načine uporabe ili zbrinjavanja [5].

Problem gospodarenja biootpadom leži u visokoj biorazgradivosti biootpada, količini sadržane vlage i organskih spojeva gdje su mnogi postupci za obradu neadekvatni. Kako bi se ovaj problem riješio na što efikasniji, isplativiji i ekološki prihvatljiviji način provode se brojna istraživanja. Sve se više potiču principi kružne ekonomije kao široko korištenog modela pravilnog gospodarenja biootpadom s najodrživijim razvojem baziranim na ekološkoj ekonomiji. Implementacija praksi kružne bioekonomije u različitim industrijama koje proizvode velike količine biootpada donosi značajne ekonomske i ekološke benefite kako za

poslovanje same industrije tako i općenito za gospodarstvo i okoliš [13]. Veliki problem javlja se sa ekonomskog i logističkog stajališta. Pokretanje ovakvog tipa zbrinjavanja biootpada logističko je i financijsko opterećenje za postrojenja te zahtjeva značajne stupnjeve organizacije kako bi se postigla bioodrživost. Oporaba biootpada može se obavljati u različitim industrijskim postrojenjima od kemijskih, prehrambenih, farmaceutskih, i slično [14]. Oporavljeni ostaci isto tako imaju vrlo široku primjenu te su pogodni za korištenje kao supstrati za fermentacije, enzime u bioprocima, u proizvodnji biogoriva te kao kemijski spojevi u kemijskoj industriji. Također, oporavljeni biootpad može naći velike primjene u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kroz proizvodnju prirodnih sastojaka i prirodnih farmaceutika sa specifičnim funkcionalnim karakteristikama [2]. Komina kao obnovljivi materijal, bogatog sastava različitih spojeva i relativno niske cijene može se koristiti kao dodatak sa funkcionalnim karakteristikama, prirodni sastojak s konzervirajućim funkcijama, prirodni farmaceutik, organsko gnojivo, enzim i mnoge druge karakteristike, koje daju dodanu vrijednost proizvodu, a smanjuju ekološki utjecaj.



Slika 3. Mogućnosti iskorištenja komponenata kemijskog sastava jabučne komine [11]

2.4.2. Jabučna komina kao prirodni farmaceutik

Istraživanja su pokazala kako su prednosti korištenja komine za zdravlje brojne [4]. Fitonutrijenti sadržani u komini jabuke učinkoviti su u smanjenju razine kolesterola u jetri, pospješuju probavu s obzirom da su dobar izvor vlakana, ublažavaju simptome i prevenciju pojavnosti srčanih bolesti, raka debelog crijeva, pretilosti, dijabetesa, astme i plućnih oboljenja. Kako je već navedeno, komina je bogat izvor polifenola koji se mogu koristiti kao funkcionalni dodaci prehrani s obzirom na značajan antioksidacijski potencijal, a dokazano štite od utjecaja starenja, infekcija, visokog tlaka, reguliraju moždane procese, osteoporozi i kardiovaskularne bolesti [15]. Također, istraživanja fenola ekstrahiranih iz komine jabuke pokazuju kako jabučni polifenoli 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 [3]. Temeljem svega navedenog, jabučna komina je podcijenjen nusprodukt prerade ploda jabuka s velikim potencijalnim primjenama u farmaceutskoj industriji. Ekstrakti, odnosno izolirani specifični fitonutrijenti utječu na mnoge farmaceutske supstance prilikom čega ispoljavaju već navedeno značajno antioksidativno, ali i antiupalna, antibakterijska i antivirusna svojstva [16]. Korištenje komine u farmaceutskim proizvodima znatno poboljšava digestiju, enzimsko djelovanje, crijevni mikrobiom te količine kolesterola i triglicerida u krvi. Novija istraživanja pokazuju i pozitivan utjecaj fitonutrijenata komine jabuke na psihološko i kognitivno zdravlje čovjeka [16]. Zbog mnogih benefita korištenje komine jabuke u svrhu farmaceutskih proizvoda treba se dodatno istražiti i naglasiti. Također, kao i sa svim kemijskim spojevima postoje i rizici koje dodatno treba istražiti prilikom upotrebe komine jabuke u proizvodnima dodane vrijednosti [16].

2.4.3. Jabučna komina u prehrambenoj industriji

Zbog visokih količina vlakana, polifenolnih spojeva i drugih nutrijenata jabučna komina pokazuje dobra svojstva kao potencijalni dodatak mnogim prehrambenim proizvodima. Naravno, količina komine dodana u takve proizvode mora se kontrolirati s obzirom na to da usprkos tome što je komina bogata nutrijentima, ona i dalje predstavlja ostatak od proizvodnje, tj. biootpad [4]. Zbog visokog udjela dijetalnih vlakana, polifenola i drugih hranjivih tvari jabučna komina ima veliki potencijal u prehrambenoj industriji. Posebnu primjenu nalazi u pekarskoj industriji. Brašno od jabučne komine bogato je vlaknima te dodatak jabučne komine u pekarske proizvode dokazano pozitivno utječe na dodanu vrijednost takvog proizvoda [11].

Komina se može koristiti i u proizvodima poput kruha, slatkih pekarskih proizvoda (kolači i torte) i hrskavih proizvoda (krekeri i keksi). Kada se koristi kao dodatak pekarskim proizvodima, potrebno je kontrolirati dodanu količinu komine jer može doći do neželjenih posljedica kao što su promjena boje, tvrdoća tijesta, miris voća, itd. Komina jabuke se također može koristiti u mesnoj industriji. Najčešće se kombinira s pilećim mesom te se dobivaju proizvodi poput „nuggetsa“, kobasica, „burgera“ i slično. Istraživanja su pokazala pozitivno djelovanje dodatka komine jabuke u mesne proizvode prvenstveno zato što su dobiveni proizvodi sa smanjenom količinom masti, a povećanim udjelom hranjivih i dijetalnih vlakana. Kao i u ostalim proizvodima potrebno je kontrolirati količinu dodatka komine koja se može dodati mesu kako ne bi došlo do neželjenih posljedica, prvenstveno razdvajanja sastojka. Na ovom području se i dalje provode brojna istraživanja [4]. Jabučna komina se također koristi u mliječnoj industriji prilikom čega se najčešće koristi u svojstvu zgušnjavala. Također već se desetljećima prakticira i kao dodatak alkoholnim proizvodima jer je dobar izvor prirodnih šećera čime i adekvatne sposobnosti fermentacije kao i niskih troškova proizvodnje [11].

2.4.4. Jabučna komina u biotehnologiji i poljoprivredi

Primjena poljoprivredno-industrijskih nusproizvoda u biološkim procesima pruža širok raspon mogućnosti rješavanja problema zagađenja okoliša. Komina je pogodan supstrat jer pridonosi fermentaciji krute tvari tijekom procesa. Provedena su brojna istraživanja koja su koristila razne vrste komine kao supstrat u bioprocima i jabučna se komina uz kominu jagode pokazala najboljom po količini enzima i efikasnosti procesa. Također jabučna komina dobar je supstrat za sintezu biopolimera, te pigmenta koji se kasnije mogu koristiti kao bojila za razne svrhe. Jabučna se komina može koristiti za mnoge poljoprivredne svrhe, a ponajviše kao dodatak hrani za životinje. Također može se koristiti kao biognojivo za uzgoj biljaka i gljiva prilikom čega svojim vrijednostima doprinosi boljem razvoju i nakupljanju nutritivnih spojeva u samoj biljci [11].

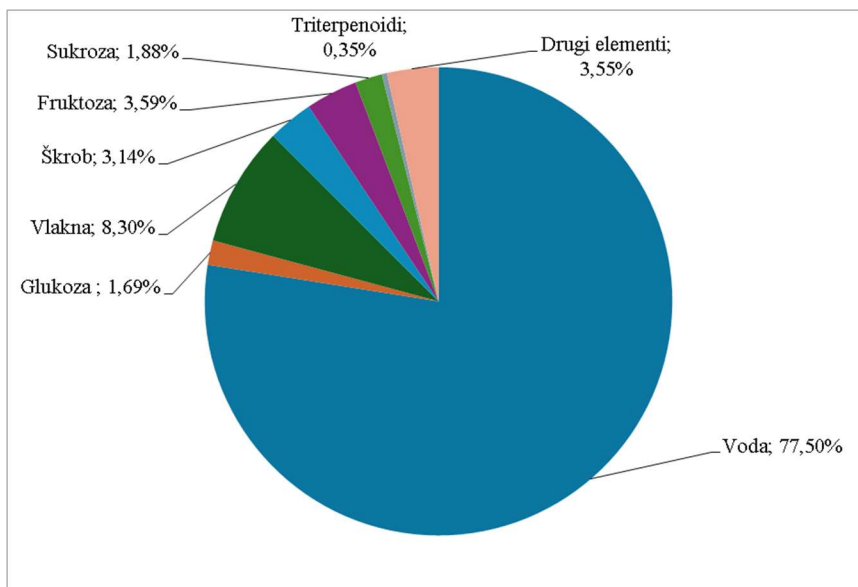
2.4.5. Jabučna komina u kozmetici

Jabučna komina, odnosno izolirani karakteristični spojevi, kao sastojak kozmetičkim proizvodima doprinose antioksidacijskim, antiupalnim i antibakterijskim svojstvima. Popularnija je u korištenju kao dodatak kozmetičkim proizvodima od komina drugih voćnih vrsta prvenstveno zbog visokog sadržaja bioaktivnih komponenti, ali i njene velike dostupnosti i iskoristivosti. Istraživanja pokazuju kako korištenje prirodnih antioksidansa, kao onih iz

jabučne komine, brzo vraća ravnotežu između antioksidansa lica te dobro djeluju prilikom održavanja zdravlja kože [17]. Provedena su *in vitro* testiranja djelovanja fenola jabučne komine na proizvodnju masnih čestica sebuma [17], a koja su pokazala kako fenolne čestice djeluju inhibicijski na stvaranje masti. Rezultati spomenutog istraživanja sugeriraju korištenje fenolnih spojeva iz prirodnih izvora za regulaciju mašćenja kože iz čestica sebuma te čišćenja kože od akni. Tipični proizvodi za rješavanje ovih problema kao retionoli, antibiotici i hormonalne masti mogu uzrokovati neugodne osjećaje peckanja i negativne posljedice za kožu. Suprotno, (*in vitro* i *in vivo*) studije su pokazale korištenje prirodnih fenola u kozmetici i naglasile niz pozitivnih rezultata na oštećenja kože, starenje, psorijazu, alergije, dermatitis pa čak i karcinom, a prilikom čega su se polifenoli iz jabučne komine istaknuli kao spojevi od iznimne važnosti u inhibiciji spomenutih oboljenja. Biljnom organizmu, polifenolni spojevi prvenstveno služe kao mehanizam obrane, kao temeljni spojevi sekundarnog metabolizma, a što se očituje u snažnom antioksidacijskom, antiupalnom, antivirusnom i antibakterijskom djelovanju koji se osim na biljke očituje i na ljudski organizam. S obzirom na sva navedena ključna svojstva i djelovanja, polifenolni spojevi iz jabučne komine mogu se smatrati prirodnim sastojcima visokog potencijala za potrebe kozmetičke industrije [18].

2.5. Kemijski sastav jabučne komine

Jabučna komina dobar je izvor fitokemikalija i sadrži značajan udio ugljikohidrata, vitamina, minerala kao i manje količine proteina (Slika 4 i Tablica 3). Jabučna komina sadrži i visok udio vode, u prosjeku 81 % [11]. Ugljikohidrati zastupljeni u jabučnoj komini uglavnom sadrže prirodne šećere, primarno: glukozu, fruktozu i galaktozu, kao i složenije poput lignoceluloznih prehrambenih vlakana kao što je značajno zastupljena celuloza, hemiceluloza, lignin i dr. Jabučna komina također je bogat izvor pektina koji je uglavnom prisutan kao protopektin, polisaharid topljiv u kiselinama [11], a kojeg prehrambena industrija široko koristi kao prirodno sredstvo za ugušćivanje. Od mineralnih elemenata najzastupljeniji su fosfor, magnezij, kalcij i željezo [1].



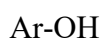
Slika 4. Kemijski sastav jabučne komine [11]

Tablica 3. Nutritivne komponente jabučne komine [1]

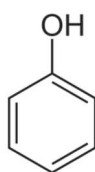
Komponenta	Mjerna jedinica	Količina
Celuloza	g/kg	127,9
Hemiceluloza		7,2 - 43,
Lingin		15,3 - 23,5
Pektin		3,5 14,3
Ugljikohidrati	% (m/m)	48,0 - 83,8
Dijetalna vlakna		4,7 - 51,1
Proteini		2,9 - 5,1
Reducirajući šećeri	% (m/m)	10,8 - 15
Glukoza	% (m/m)	22,7
Fruktoza		23,6
Surkoza		1,8
Arabinoza		14 - 23
Galaktoza		6
Ksilozna		1,1
Minerali		
Natrij	mg/100 g	185,3
Kalij		398,4 - 880,2
Kalcija		55,6 - 92,7
Fosfor		64,9 - 70,4
Magnezij		18,5 - 333,5
Željezo		2,9 - 3,5
Cink		1,4
Bakar		0,1
Mangan		0,4 - 0,8

2.6. Polifenoli

Spojeve iz skupine fenola definira hidroksilna skupina vezana na ugljikov atom benzenskog prstena. Fenoli mogu biti u tekućem stanju s visokim vrelištem ili krutine, a imaju jak karakterističan miris. Fenoli su se prije pripremali iz katrana, a mnogi su se upotrebljavali u ljekovitim napitcima [19]. Njihova opća formula je:



gdje je Ar fenil, supstituirani fenil ili neka druga arilna skupina. Cijela skupina ima naziv predstavniku ove vrste, fenolu (Slika 5).



Slika 5. Fenol

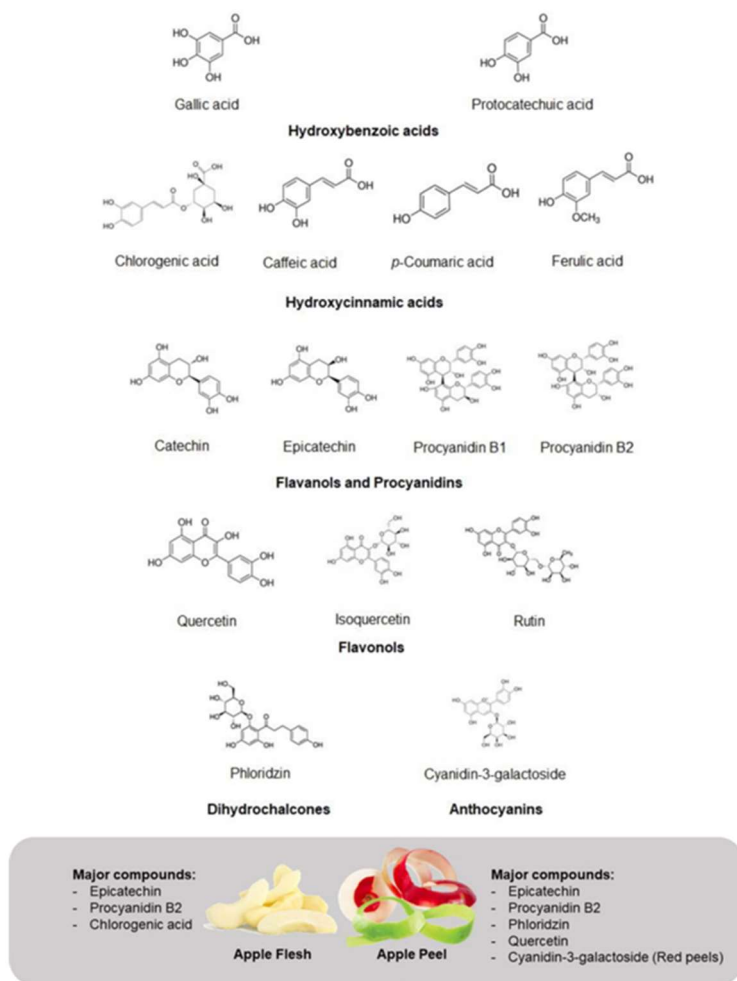
Polifenoli su po mnogočemu slični alkoholima, ali kod njih hidroksilna skupina nije vezana na zasićeni atom ugljika, već izravno na aromatski ugljikovodik. Fenol je slaba kiselina, no znatno jača od alkohola, jer se aromatski prsten veže s kisikom te je veza između vodikovog i kisikovog atoma relativno slaba. Polifenolni spojevi najčešće i najšire su rasprostranjeni u biljkama u preko 9000 različitih spojeva. Pojavljuju se u skoro svim dijelovima biljaka, ali su po udjelu različito rasprostranjeni u različitim dijelovima biljnih organa. Količina i raznolikost polifenola ovisi o vrsti, starosti i genetici biljke, ali i o vanjskim čimbenicima kao što su klima, tlo, način uzgoja, itd. Brojne studije potvrdile su kako se najviše polifenolnih spojeva nalazi u jabuci, crvenom luku, čaju i crnom vinu. Polifenoli su najzastupljeniji sekundarni metaboliti rasprostranjeni u biljnome svijetu. Utvrđeno je da se oko 2 % ukupnog ugljika sintetiziranog u biljkama (što je oko 10^9 t godišnje) konvertira u flavonoide i srodne fenolne spojeve. Iako su u suštini isti, polifenolni spojevi prirodnog porijekla razlikuju se od onih kemijskog, tj. sintetskog porijekla. Biljne (prirodne) polifenole bolje definira njihovo metaboličko porijeklo, dok kemijske polifenole karakterizira njihova kemijska struktura (opisana gore). Prema ovoj definiciji, biljni polifenoli su spojevi koji u biljkama nastaju kombinacijom puta šikiminske kiseline i acilpolimalonatnog puta [6].

2.7. Klasifikacija polifenola

U kemijskom svijetu je poznat velik broj vrsta polifenola. Osnovna podjela je po broju ugljikovih atoma u molekuli. Polifenoli se ovisno o osnovnoj kemijskoj strukturi, dijele na: jednostavne fenole i benzokinone, fenolne kiseline, acetofenone i feniloctene kiseline, hidroksicimetne kiseline, kumarine, izokumarine i kromone, naftokinone, ksantone, stilbene i antrakinone, flavonoide, lignane i neolignane, biflavonoide, lignine, kateholne melanine i kondenzirane tanine. Postoji i alternativna podjela na uobičajene i manje uobičajene polifenole, a prema čemu postoji klasifikacija u tri grupe [6]:

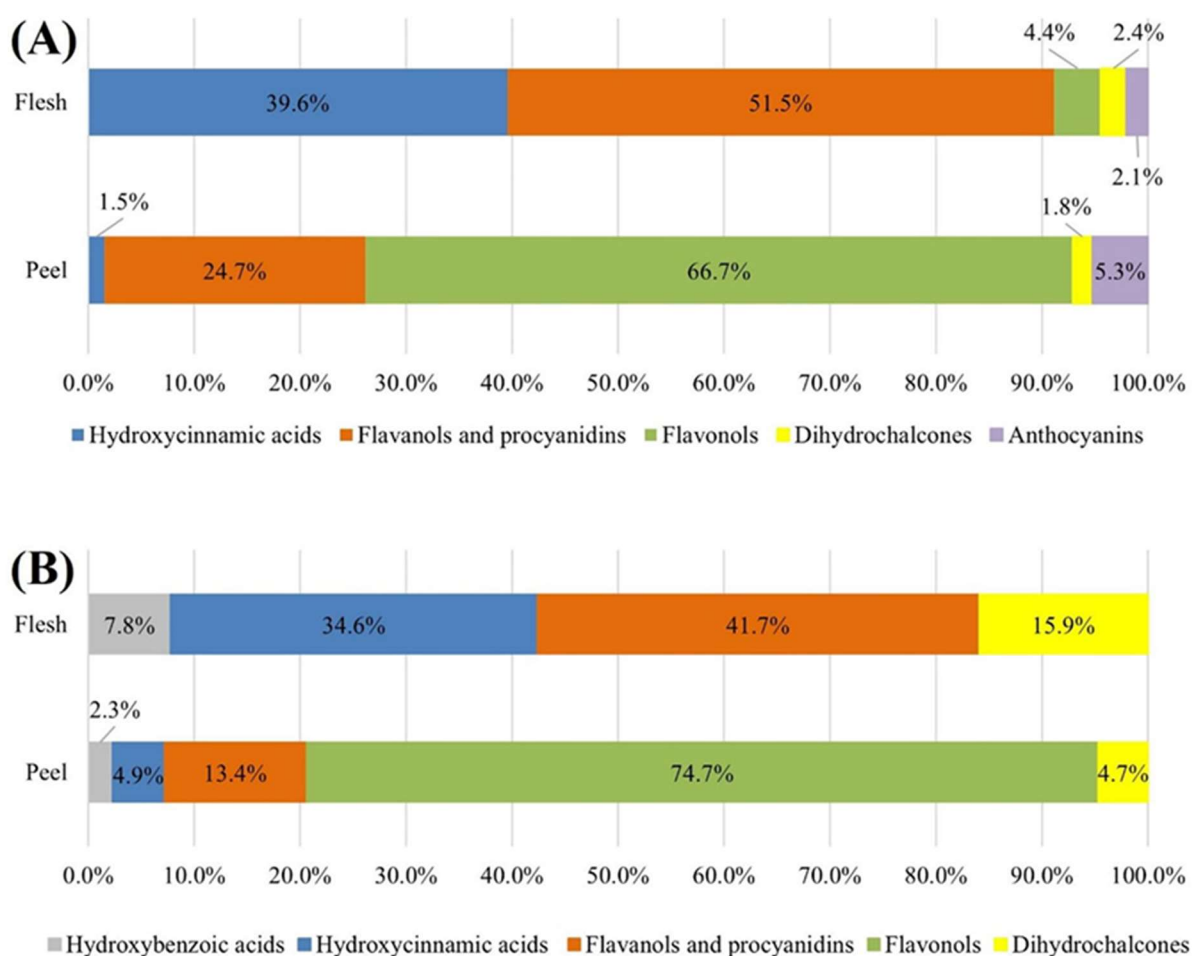
1. široko rasprostranjeni polifenoli, prisutni u svim biljkama ili važni za specifične biljke,
2. slabije rasprostranjeni, određeni broj biljaka u kojima se nalaze,
3. polifenoli kao polimeri

Najvažnije skupine polifenola identificirane u plodu jabuke su hidroksibezoatna kiselina, flavonoidi i njihove oligo i polimerne strukture, flavanoli i druge (Slika 6).



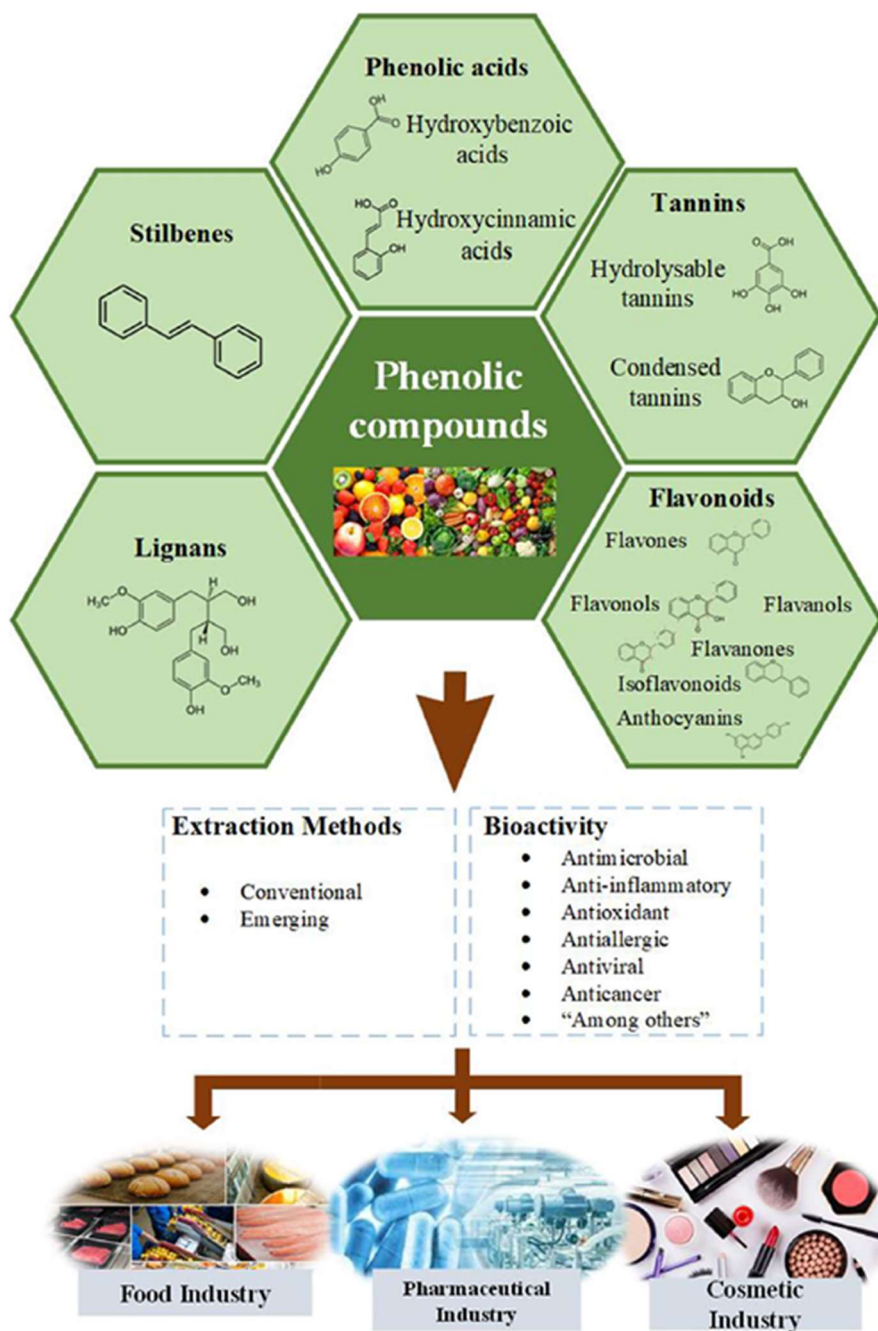
Slika 6. Strukture važnijih fenolnih spojeva pronađenih u jabuci [8]

Studije pokazuju kako fenolni spojevi mogu varirati u plodovima jabukama ovisno o pedoklimatskim uvjetima uzgoja (Slika 7). Također, na količinu i vrstu fenolnih spojeva uvelike može utjecati način uzgoja, genetičke predispozicije, sorte i okolišni uvjeti [20]. Provedena su brojna istraživanja o količini fenola u jabukama širom svijeta. Dokazano je kako jabuke porijeklom iz južne Europe i balkanskog područja imaju visoke hranjive vrijednosti i bogate su fenolnim spojevima. Od ukupnih fenolnih spojeva izoliranih iz sortimenata s navedenih podneblja čak 70 % ploda jabuke činili su flavanoli i procijanidi široko zastupljeni u pulpi i kori jabuke. Fenolne kiseline većinom su prisutne u pulpi jabuke (6-25 %), dok su ostatak čine drugi fenolni spojevi [8].



Slika 7. Usporedba količine fenolnih spojeva u jabukama uzgojenim u Australiji (A) i Njemačkoj (B) [8]

Polifenolni spojevi posjeduju različita funkcionalna svojstva (antimikrobna, antiviralna, antioksidativna, antiupalna i dr.) i stoga su primjenjivi u brojnim industrijama. Njihovo uključivanje u prehrambenu, farmaceutsku, kozmetičku i slične industrije (Slika 8) doprinosi razvoju novih proizvoda kao i poboljšanju kvalitete postojećih proizvoda zamjenjujući sintetske komponente prirodnima. Temeljem svega gore navedenoga i zbog prepoznate važnosti otpada, industrija se sve više okreće oporabi i iskorištenju tih sirovina.

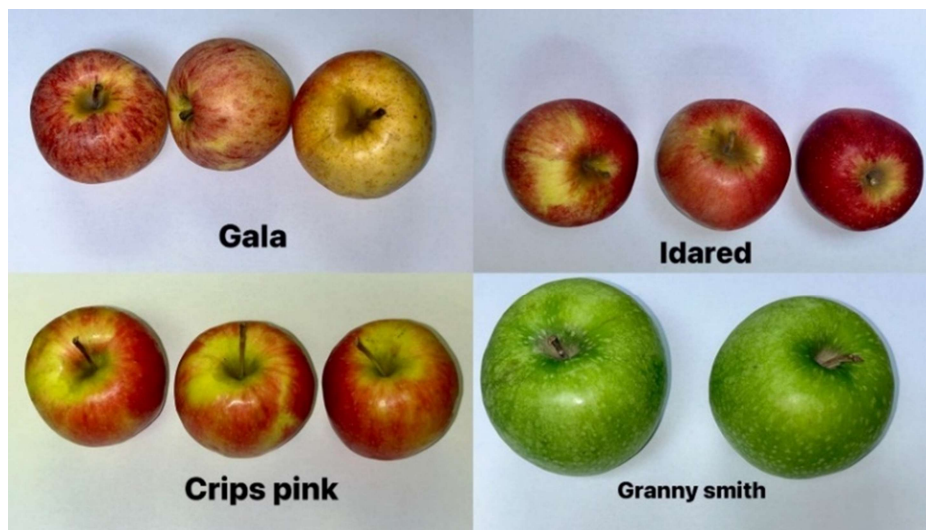


Slika 8. Klasifikacija fenolnih spojeva i njihova potencijalna upotreba [2]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Biljni materijal

U radu analizirane su četiri različite sorte jabuka: „Granny Smith“, „Gala“, „Idared“ i „Cripps Pink“ (Slika 9). Jabuke su nabavljene u trgovačkom lancu. Prilikom prikupljanja odabrani su samo potpuno zdravi plodovi, ujednačene kondicije, bez mehaničkih oštećenja (ozljeda, nagnječenja i slično) i bez vidljivih znakova kvarenja.



Slika 9. Sorte jabuka korištene za potrebe istraživanja

Jabučna je komina pripremljena zasebno od svake od navedenih sorati jabuka. Za potrebe pripreme, plodovi jabuka prvo su oprani, a zatim su narezani na sitnije komade i zajedno sa sjemenkama, korom i peteljkom izdvojen je sok (Slika 10). Sok je izdvojen na centrifugalnom sokovniku (Bullet Express, Engleska), a ostatak zaostao nakon izdvajanja soka predstavljao je jabučnu kominu (Slika 11) koja je korištena za potrebe analize polifenolnih spojeva u ovom istraživanju.



Slika 10. Priprema plodova jabuke za izdvajanje soka i komine



Slika 11 Pripremljene komine po sortama

3.2. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski u etanolnom ekstraktu uzorka mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini od 750 nm. Folin-Ciocalteu metoda zasniva se na obojenoj reakciji koju fenoli razvijaju s Folin-Ciocalteu reagensom. 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 [21].

Aparatura i pribor: tehnička vaga (s točnošću $\pm 0,01$), konusna tikvica, odmjerna tikvica (50 i 100 mL), obični lijevak, filter papir, povratno hladilo, pipete (1, 2, 5, 10 i 25 mL), kivete, spektrofotometar (UV 1900i Shimadzu, Japan).

Kemikalije: etanol (80 %, v/v), Folin-Ciocalteu reagens, zasićena otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Priprema otopine natrijeva karbonata: 200 g anhidrida natrij-karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 100 mL i nakon 24 sata filtrira.

Postupak određivanja:

a) Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca odvaži se 500 mg galne kiseline, otopiti u 80%-tnom 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%-tnim etanolom. Koncentracije 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 minute, 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 sata na sobnoj temperaturi. Nakon što su uzorci odstajali mjeri se apsorbancija otopina na spektrofotometru pri valnoj duljini od 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

b) Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzorka

Na tehničkoj vagi odvaži se 10 g uzorka s točnošću $\pm 0,01$ i homogenizira s 40 mL 80%-tnog etanola. Homogenu smjesu se kuha 10 minuta uz povratno hladilo te se dobiveni ekstrakt filtrira u odmjernu tikvicu od 100 mL preko naboranog filter papira. Zaostali talog zajedno s filter papirom ponovno se prebaci u tikvicu sa šlifom, doda se 50 mL 80%-tnog etanola i uz povratno hladilo se kuha još 10 minuta. Dobiveni ekstrakt se spoji s prethodno dobivenim ekstraktom te se odmjerna tikvica nadopuni do oznake 80%-tnim 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 sata na sobnoj temperaturi. Nakon što su uzorci odstajali izmjeri se apsorbanca otopina pri valnoj duljini od 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

3.3. 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 [21]. Razlika ukupnih fenola i neflavonoida daje količinu flavonoida.

Aparatura i pribor: filter 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 (UV 1900i Shimadzu, Japan)

Kemikalije: klorovodična kiselina, HCl 1:4 (konc. HCl razrijedi se vodom u omjeru 1:4), formaldehid (13 mL 37 %-og formaldehida u 100 mL vode), dušik za propuhivanje uzoraka, zasićena otopina natrijeva karbonata, Folin-Ciocalteu reagens, 80 %-ni 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 filter papira i slijedi isti postupak kao za određivanje ukupnih fenola.

Izračun: 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.

3.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Metoda se temelji na gašenju stabilnog plavo-zelenog radikal-kationa 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-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 [22, 23].

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 $ABTS^+$ otopina (88 μ L 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 do 16 sati pri sobnoj temperaturi. Stajanjem, intenzitet plavo-zelene boje se pojačava.)

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

Priprema uzorka za analizu: Procedura ekstrakcije iz uzorka ista je kao i u protokolu određivanja fenola Folin – Ciocalteu metodom. Odnosno, ABTS metodu najbolje je provesti kada se rade i fenoli te iz pripremljenih fenolnih ekstrakata napraviti i analizu za fenole i za ABTS tako da s poslije rezultati sadržaja fenola i ABTS-a mogu korelirati. 10 g uzorka izvaže se direktno u Erlenmeyerovu tikvicu sa šlifom (300 mL) i doda se 40 mL 80%-tnog etanola te se kuha uz povratno hladilo 10 minuta. Nakon kuhanja sadržaj se profiltrira u istu tikvicu od 100 mL odnosno ekstrakti se spoje, ohlade, nakon čega se odmjerena tikvica od 100 mL

nadopuni 80%-tnim etanolom do oznake. Ako je potrebno ekstrakte treba razrijediti 80%-tnim etanolom (u slučaju prevelike apsorbancije).

Postupak određivanja (spektrofotometrijski): 160 µL uzorka (ekstrakta) pomiješa s 2 mL 1%-tne otopine ABTS⁺ te se nakon 1 min mjeri apsorbancija 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.

Za izradu baždarnog pravca u ABTS metodi koristi se Trolox (Sigma Aldrich, SAD) koji uzrokuje smanjenje boje ABTS⁺ 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⁺ otopine te se mjeri apsorbancija pri 734 nm.

3.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Priprema reagensa: 0,1 mM DPPH u 80%-tnom etanolu: 0,0039 g DPPH u tikvicu od 100 mL, nadopuniti sa 80%-tnim etanolom ili 0,00195 g DPPH u 50 mL 80%-tnog etanola.

Postupak određivanja:

Kontrola: 1900 µL DPPH + 100 µL 80%-tnog etanola i mjeriti apsorbanciju za računanje postotka inhibicije.

Slijepa proba: čisti 80%-tni etanol, tj. otapalo u kojem je rađen ekstrakt.

Uzorci: 3 uzorka po 300 µL ekstrakta i 5700 µL DPPH u kemijsku čašu

Inkubacija 20 minuta u mraku, mjerenje apsorbancije na 517 nm u odnosu na slijepu probu.

Izrada baždarnog pravca: Za potrebe izrade baždarnog pravca kao vanjski standard koristi se svježe pripremljeni Trolox. Potrebno je pripremiti 0,1 mM DPPG u 80%-tnom etanolu: 0,0039 g u tikvicu od 100 mL i nadopuniti do oznake 80%-tnim etanolom ili 0,0195 g u tikvicu od 50 mL i nadopuniti do oznake 80%-tnim etanolom. Također potrebno je pripremiti 1 mM Trolox otopine („stock“): 0,025 g Troloxa u 100 mL 80%-tne otopine etanola. Iz pripremljene otopine Troloxa (1 mM) potrebno je pripremiti etanolna razrjeđenja od 500 do 800 µM/L (tj. 0,05 do 0,8 mM/L) u tikvicama volumena 25 mL. U odmjerne tikvice od 25 mL redom se pipetira određena količina matične otopine Troloxa i nadopunjuje 80%-tnim etanolom prema izračunima u tablici (tablica 4), kako bi se dobila željena razrjeđenja.

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \quad (1)$$

gdje je $c_1 = 1$ mM početna koncentracija Trolox stock otopine, a c_2 - konačna koncentracija Trolox otopine u $V_2 = 25$ mL.

Tablica 4. Tablica izračuna priprema otopine

Oznaka tikvice	Razrjeđenja, tj. konačne koncentracije Troloxa C_2 ($\mu\text{M/L}$)	Trolox V (mL)	80%-tni etanol
1	50	1,25	23,75
2	80	2	23
3	100	2,5	22,5
4	200	5	20
5	300	7,5	17,5
6	500	12,5	12,5
7	800	10	5

Iz svake tikvice s razrjeđenjem u kivete se pipetira razrjeđena otopina Troloxa i DPPH reagens.

Izrada baždarnog pravca: 900 μL DPPH reagensa i 100 μL Trolox razrjeđenja.

Slijepa proba: Čisti 80%-tni etanol, tj. otapalo u koje je rađen ekstrakt.

Inkubacija 20 minuta u mraku, mjerenje apsorbancije na 517 nm u odnosu na slijepu probu.

Rezultati se izražavaju u $\mu\text{molTE/L}$ (ekvivalenti Troloxa).

3.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Priprema reagensa:

- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) 10 mM: Odvagati 0,0312 g TPZT-a u tikvicu od 10 mL i do oznake napuniti 40 mM klorovodičnom kiselinom. 40 mM HCl-a se dobije pipetiranjem 330 μL 37%-tne HCl u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti destiliranom vodom do oznake.
- Željezo (III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM: Odvagati 0,541 g željezo (III) klorida heksahidrata u odmjernu tikvicu od 100 mL i napuniti destiliranom vodom do oznake.

- c) Acetatni pufer 0,3 M: Odvagati 3,1 g natrij – acetata trihidrata u tikvicu od 1 L, otpipetirati 16 mL glacijalne octene kiseline, nadopuniti destiliranom vodom do oznake i provjeriti pH pufera (3,6).
- d) FRAP reagens: u tikvicu ili čašu volumena 59 mL pomiješa se 35 mL acetatnog pufera (0,3 M), 3,5 mL TPTZ reagensa i 3,5 mL željezo (III) klorida heksahidrata (u omjeru 10:1:1).

Postupak određivanja: Prvo se napravi slijepa proba. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran, tj. 80%-tni etanol. Priprema se sa 720 μ L destilirane vode, 240 μ L 80%-tnog etanola i 6240 μ L FRAP reagensa. Termostatira se 5 minuta u vodenoj kupelji na 37°C.

Priprema uzorka: U epruvetu se dodaje 960 μ L destilirane vode, 320 μ L uzorka, 8320 μ L FRAP reagensa. Uzorak se termostatira 5 minuta u vodenoj kupelji na 37°C. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm, u odnosu na slijepu probu. Za potrebe izrade baždarnog pravca koristi se Trolox kao vanjski standard.

Izrada baždarnog pravca: Za izradu baždarnog pravca pripremi se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina). Odvaži se 0,0501 g Troloxa u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 80%-tnim etanolom. Do pripremljene „stock“ Trolox otopine rade se etanolna razrjeđenja konačnih koncentracija: 25, 50, 100, 125, 250, 500, 1000 μ g/mL. U odmjerne tikvice od 10 mL redom se pipetiraju razrjeđenja matične otopine Troloxa i 80%-tnog etanola prema izračunu u tablici (tablica 5)

Tablica 5. Tablica izračuna priprema otopine

Oznaka tikvice	Razrjeđenja, tj. konačne koncentracije Troloxa C ₂ (μ M/L)	Trolox V (mL)	80%-tni etanol
1	25	0,25	9,75
2	50	0,5	9,5
3	100	1	9
4	125	1,25	8,75
5	250	2,5	7,5
6	500	5	5
7	1000	10	0

U epruvete se redom pipetira 960 μ L destilirane vode, 320 μ L otopine standarda iz prethodno pripremljenih tikvica i 8320 FRAP reagensa. Reakcije se pomiješaju na Vorteu i termostatiraju

5 minuta na 37°C. Slijepa proba sadržava sve osim standarda, a umjesto standarda je 80%-tni etanol. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm.

3.7. Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva Visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC)

Za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih fenolnih spojeva iz uzoraka jabučne komine korištena je HPLC kromatografija. HPLC analiza provodila se na uređaju LC Nexera (Shimadzu, Japan) opremljenim sa fotopeptidnim spektrom, fluorescentnim detektorom (RF – 20 Axs), automatskim injektorom i LabSolution Software-om. Na analitičkoj vagi izdvojen je 1 g uzoraka jabučne komine koji se homogenizira se u 10 mL 80 % metanola (HPLC čistoće), te se dalje ekstrahira 30 min u ultrazvučnoj kupelji pri 50 °C. Nakon toga se ekstrakti dvostruko filtriraju, prvo se profiltriraju kroz Whatman filter papir, a zatim kroz Chromafil filtere. Ekstrakti se pune u viala, te se uzorci propuštaju kroz HPLC uređaj [24].

4. REZULTATI I RASPRAVA

Dobiveni rezultati istraživanja obrađeni su i prikazani u tablicama 6, 7 i 8 te slikama 12, 13, 14 i 15. Dobivene prosječne vrijednosti razlikuju se od literaturnih navoda, a razlog tome može biti u različitim pedo-klimatskim uvjetima, kao i različitim uvjetima skladištenja u kojima su se uzorci nalazili neposredno prije istraživanja s obzirom da su nabavljeni u trgovačkom lancu i stoga nije poznato njihovo porijeklo kao ni način ni vrijeme skladištenja.

Prosječne vrijednosti dobivene za ukupne fenole, flavanoide i neflavanoide u uzorcima komine prikazani su Tablici 6 po sortama. Najveću prosječnu vrijednost svih analiziranih polifenolnih spojeva sadrži sorta „Idared“, a slijede ju „Granny Smith“, „Gala“ i „Cripps Pink“. Sorta „Idared“ sadrži otprilike 50 % više ukupnih fenola, flavanoida i neflavanoida od sorte „Cripps Pink“. U ovom istraživanju dobivene su nešto niže vrijednosti od literaturnih navoda, no i dalje su to značajne vrijednosti navedenih spojeva [25, 26, 27].

Tablica 6. Ukupni fenoli, flavanoidi i neflavanoide po sortama izraženi u mg GAE/100 g sv.t.

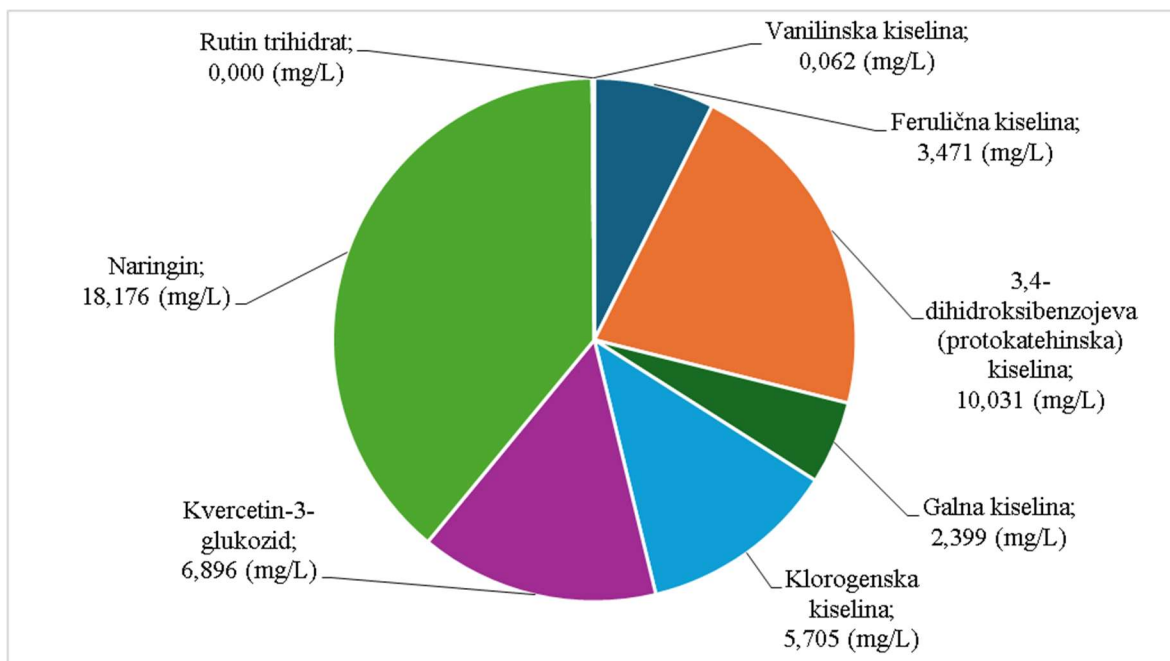
Sorta	FEN	NFLV	FLAV
„Crips Pink“	57,780	27,330	30,326
„Granny smith“	119,978	50,914	69,064
„Idared“	123,140	54,382	68,758
„Gala“	97,213	41,512	55,669

HPLC kromatografijom provodila se kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih fenolnih spojeva u uzorcima jabučne komine. Analizirani su najčešće zastupljeni fenolni spojevi u jabučnoj komini: ferulična kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva (protokatehinska) kiselina, galna kiselina, klorogenska kiselina, kvercetin-3-glukozid, naringin, rutin trihidrat, vanilinska, kafeinska, kumarinska, elaginska, kafeoilimalična i cimetna kiselina te kaemferol i miricetin. U istraživanim sortama nisu detektirani fenolni spojevi: kafeinska, kumarinska, elaginska, kafeoilimalična i cimetna kiselina te kaemferol i miricetin, što je različito u usporedbi sa istraživanjima ostalih istraživača koji su u svojim radovima navedene spojeve detektirali [28] [29]. Ferulične kiseline najviše ima u sorti „Granny Smith“, 3,618 mg/L, a najmanje u sorti „Cripps Pink“, 3,471 mg/L. 3,4-dihidroksibenzojeve (protokatehinske) kiseline najviše ima u sorti „Granny Smith“, 11,500 mg/L, a najmanje u sorti „Gala“, 8,625 mg/L. Galne kiselina ima najviše u sorti „Cripps Pink“, 2,399 mg/L, a najmanje u sorti Gala 2,050 mg/L. Klorogenske kiseline ima najviše u sorti „Cripps Pink“, 5,705 mg/L, a najmanje u sorti „Gala“, 4,668 mg/L.

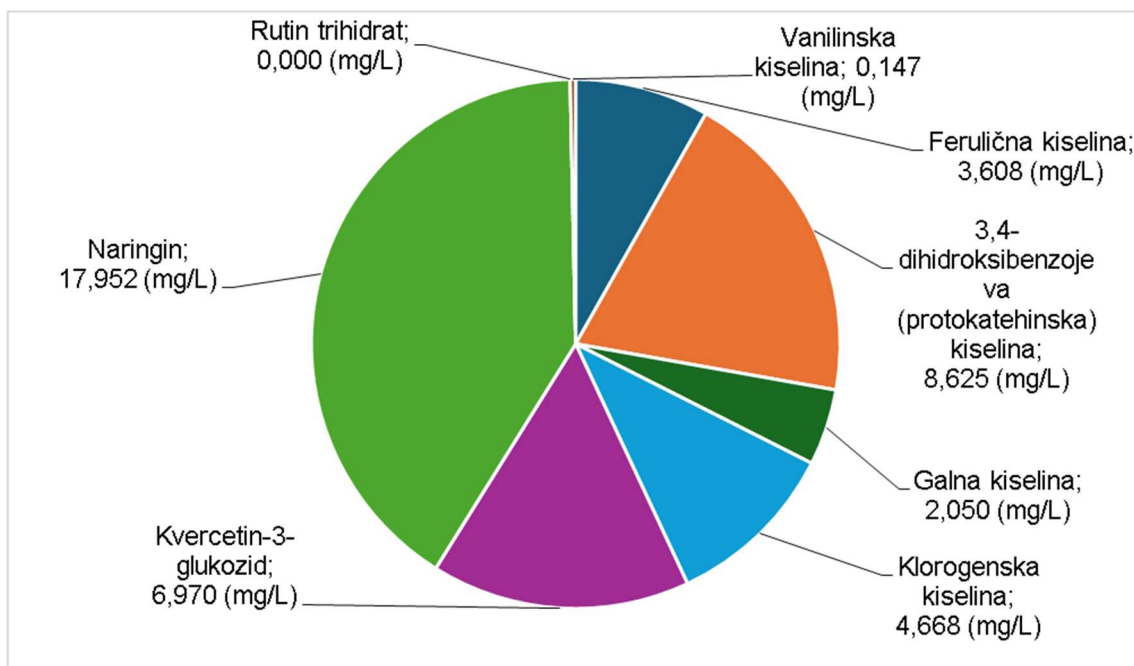
Kvercetin-3-glukozida najviše ima u sorti „Granny Smith“, 7,023 mg/L, a najmanje u sorti „Cripps Pink“, 6,896 mg/L. Naringina ima najviše u sorti „Granny Smith“, 22,333 mg/L, a najmanje u sorti „Gala“, 17,952 mg/L. Kod rutin-trihidrata vide se najveće razlike među sortama. Najviše ima u sorti „Granny Smith“, 7,254 mg/L te nešto manje u sorti „Idared“, 7,208 mg/L. U sortama „Cripps Pink“ i „Gala“ nije detektiran rutin-trihidrat, dok je u istraživanju drugih istraživača detektiran [30]. Kod vanilinske kiseline također su vidljive razlike u količinama. Najveće prosječne vrijednosti posjeduje sorta „Gala“, 0,147 mg/L, dok je najmanju imala sorta „Idared“ 0,035 mg/L. Svi dobiveni podaci prikazani su u tablici 7 te grafički u slikama 12, 13, 14 i 15.

Tablica 7. Količine pojedinih fenolnih spojeva po sortama

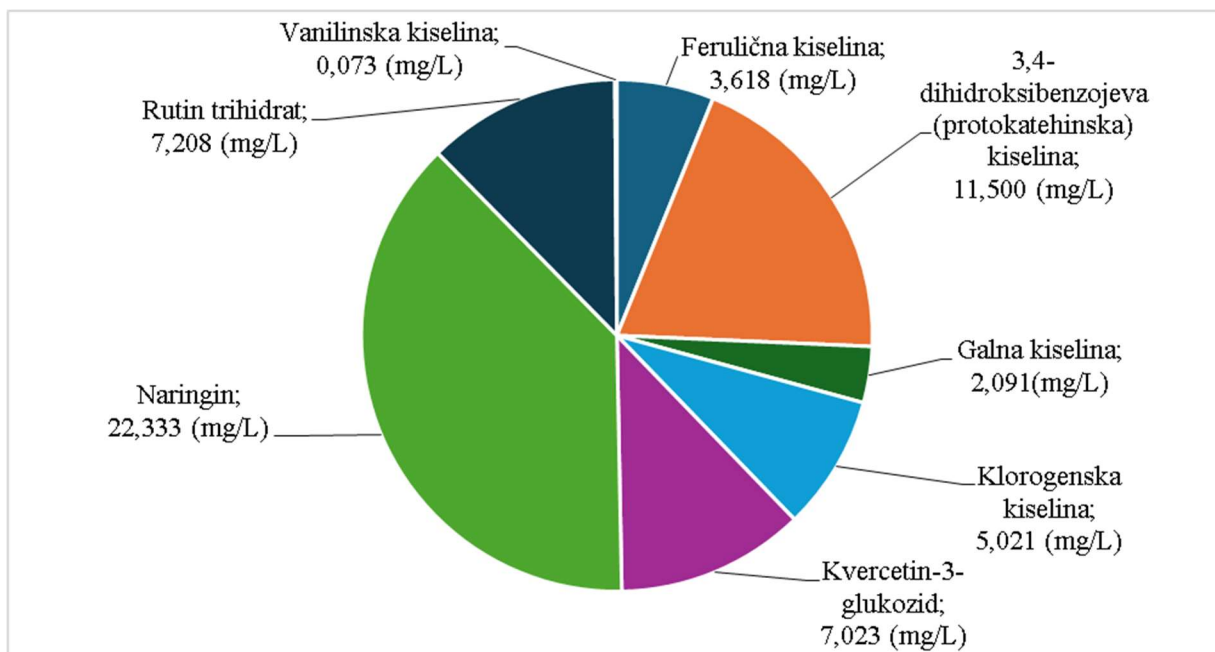
Sorta	Pojedinačni fenolni spojevi (mg/L)			
	Ferulična kiselina	3,4-dihidroksibenzojeva (protokatehinska) kiselina	Galna kiselina	Klorogenska kiselina
„Crips pink“	3,471	10,031	2,399	5,705
„Gala“	3,608	8,625	2,050	4,668
„Granny smith“	3,618	11,500	2,091	5,021
„Idared“	3,598	9,033	2,071	5,444
Sorta	Kvercetin-3-glukozid	Naringin	Rutin trihidrat	Vanilinska kiselina
„Crips pink“	6,896	18,176	0,000	0,062
„Gala“	6,970	17,952	0,000	0,147
„Granny smith“	7,023	22,333	7,208	0,073
„Idared“	6,976	21,799	7,254	0,035



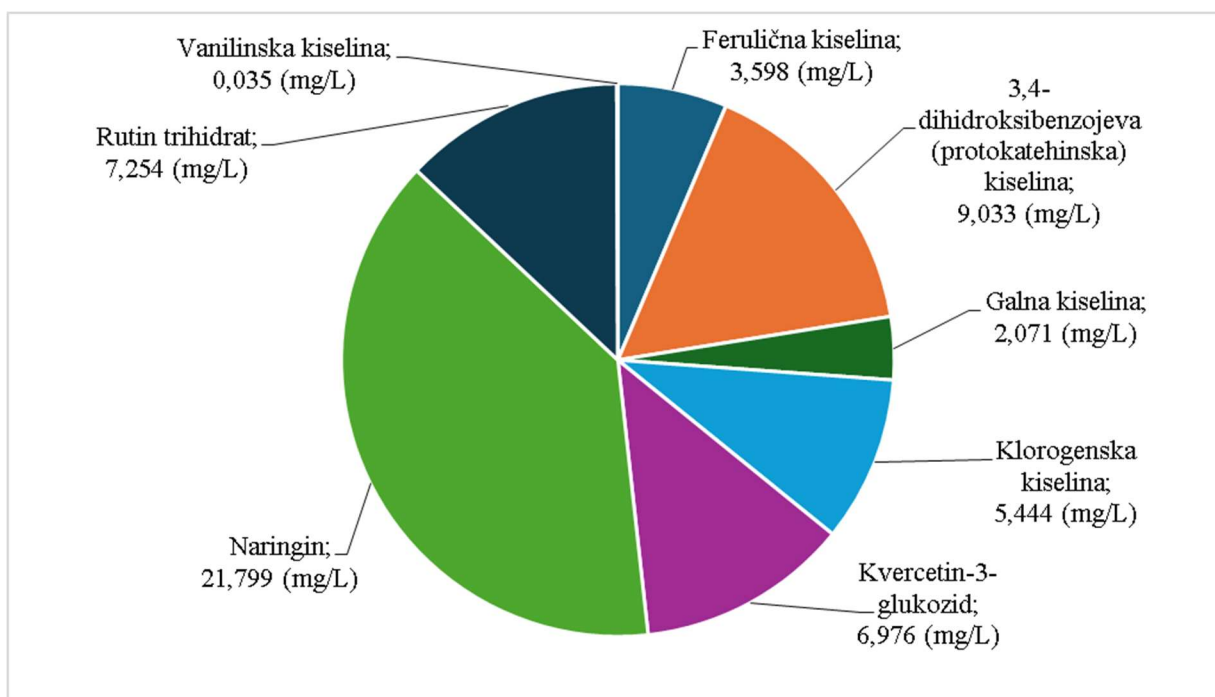
Slika 12. Grafički prikaz pojedinačnih fenolnih spojeva komine sorte „Cripps Pink“



Slika 13. Grafički prikaz pojedinačnih fenolnih spojeva komine sorte „Gala“



Slika 14. Grafički prikaz pojedinačnih fenolnih spojeva komine sorte „Granny Smith“



Slika 15. Grafički prikaz pojedinačnih fenolnih spojeva komine sorte „Idared“

Rezultati prosječnih vrijednosti provedenih antioksidacijskih testova prikazani su u Tablici 8. Najveću antioksidacijsku aktivnost u svakom testu imala je sorta jabuke „Idared“, zatim „Granny Smith“, „Gala“ pa sorta „Cripps Pink“. Razlike među sortama „Idared“, „Granny Smith“ i „Gala“ nisu toliko značajne, dok je znatno veća razlika kod sorte „Cripps Pink“ koja je pokazala 53 % manji antioksidacijski kapacitet u usporedbi sa sortom „Idared“. Rezultati antioksidacijskog kapaciteta komina sorti „Granny Smith“ i „Gala“ poklapaju se s prijašnjim istraživanjima dok sorta „Idared“ pokazuje veće vrijednosti [25,27,31]. Rezultati antioksidacijskih testova odgovaraju i potvrđuju rezultate dobivene analizom ukupnih fenolnih, flavanoidnih i neflavanoidnih spojeva.

Tablica 8. Antioksidacijski kapacitet različitih sorti po metodama u $\mu\text{mol TE/L}$

Sorta	ABTS	DPPH	FRAP
„Crips Pink“	1699,643	455,323	464,076
„Granny smith“	2522,633	512,659	1046,641
„Idared“	2530,335	590,691	1140,464
„Gala“	2527,760	572,571	799,533

5. ZAKLJUČAK

Uzorci jabučnih komina pokazuju veliki nutritivni potencijal koji je pogodan za uporabu i ponovno korištenje. Oksidacijski testovi pokazali su dobre antioksidacijske kapacitete svih uzoraka jabučnih komina, što ukazuje na veliku količinu antioksidansa koji se nalaze u jabučnim kominama svih analiziranih sorti. Najveći antioksidacijski kapacitet pokazuje sorta „Idared“, no ni ostale sorte ne zaostaju. Velike količine fenola, flavanoida i neflavanoida ukazuju na velike količine aktivnih i hranjivih tvari. Temeljem dobivenih rezultata, jabučna komina može se smatrati važnom sirovinom te lako može pronaći svoju uporabu u različitim industrijama. Temeljem svih dobivenih podataka može se zaključiti kako jabučna komina, bilo koje sorte, posjeduje veliki potencijal te može pronaći svrhu u brojnim područjima industrije kao i svakodnevnoj upotrebi prije nego što se može smatrati otpadom i kao takvim zbrinjavati.

6. POPIS SIMBOLA

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic) acid

DPPH - 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl

FRAP - ferric reducing antioxidant power

C – koncentracija

V – volumen

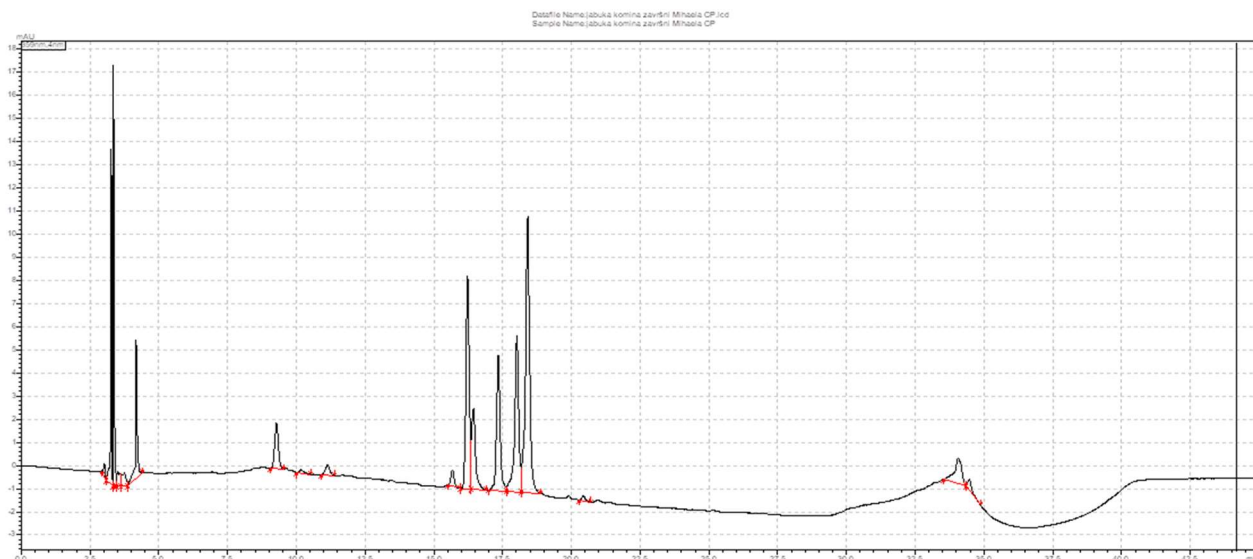
7. LITERATURA

- [1] Manrich, A., 2024. Apple Industry: Wastes and Possibilities. *Int J Agri Res Env Sci*, 5(1), pp.1-10.
- [2] Oliveira, T.C., Caleja, C., Oliveira, M.B.P., Pereira, E., Barros, L., 2023. Reuse of fruits and vegetables biowaste for sustainable development of natural ingredients. *Food Bioscience*, p.102711.
- [3] Perussello, C.A., Zhang, Z., Marzocchella, A., Tiwari, B.K., 2017. Valorization of apple pomace by extraction of valuable compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), pp.776-796.
- [4] Lyu, F., Luiz, S.F., Azeredo, D.R.P., Cruz, A.G., Ajlouni, S. Ranadheera, C.S., 2020. Apple pomace as a functional and healthy ingredient in food products: A review. *Processes*, 8(3), p.319.
- [5] Evcan, E. and Tari, C. 2015. Production of bioethanol from apple pomace by using cocultures: Conversion of agro-industrial waste to value added product. *Energy*, 88, pp.775-782.
- [6] Lončarić, A. 2014. Utjecaj dodatka šećera i praha kore jabuka na udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost kaša od jabuka, Disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
- [7] Gudelj, A., 2016. Praćenje parametara boje i teksture narezane jabuke sorte Cripps pink obrađene antioksidansima i skladištene u kontroliranoj atmosferi, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- [8] Arnold, M., Gramza-Michalowska, A., 2023. Recent Development on the Chemical Composition and Phenolic Extraction Methods of Apple (*Malus domestica*) - A Review. *Food and Bioprocess Technology*, pp.1-42.
- [9] FAOSTAT 2022. Production quantities of Apples, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>, Pristupljeno (22.5.2024.)
- [10] Bator, P., Razik, M., Rozwadowska, P., Ramian, J., Rybak, J., Magiera, B., Magiera, K., Grabowska-Szczurek, M., Grabarczyk, A. and Razik, W., 2024. An apple a day keeps the doctor away?-a review of health benefits of apples. *Journal of Education, Health and Sport*, 55, pp.73-86.
- [11] Božurić, N., 2021. Nutritivni potencijal i sadržaj fitokemikalija organskog ostatka od jabuke, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.

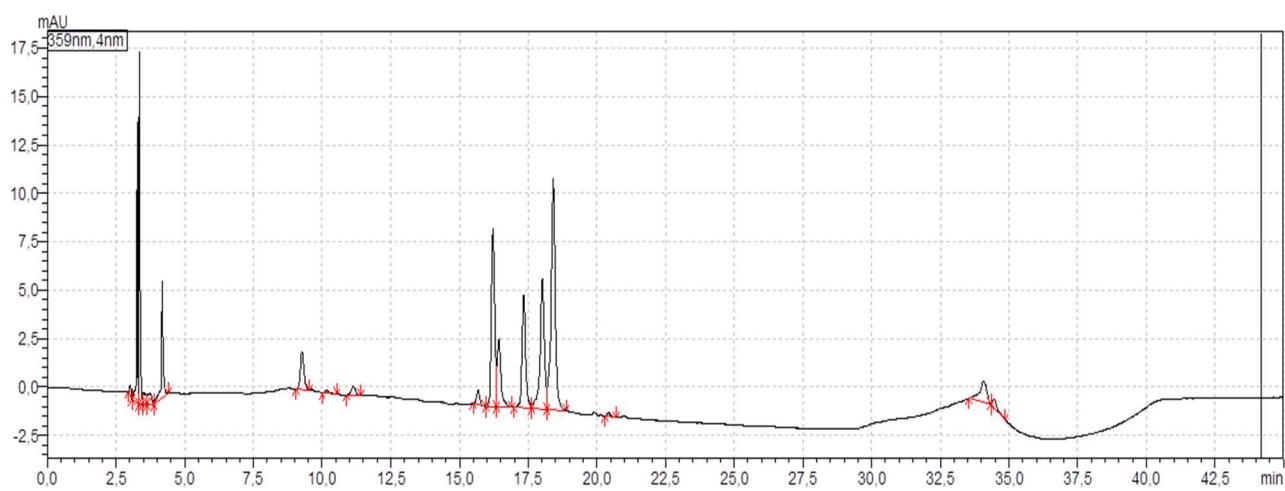
- [12] Zakon o gospodarenju otpadom, Narodne novine 84/21, 142/23 - na snazi od 31.07.2021., https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2021_07_84_1554.html (Pristupljeno 14.5.2024.)
- [13] Zhu, Y., Luan, Y., Zhao, Y., Liu, J., Duan, Z. and Ruan, R., 2023. Current technologies and uses for fruit and vegetable wastes in a sustainable system: A review. *Foods*, 12(10), p.1949.
- [14] Muscat, A., de Olde, E.M., Ripoll-Bosch, R., Van Zanten, H.H.E., Metz, T.A.P., Termeer, C.J.A.M., van Ittersum, M.K., de Boer, I.J.M., 2021. Principles, drivers and opportunities of a circular bioeconomy. *Nat Food* 2: 561–566.
- [15] Skinner, R.C., Gigliotti, J.C., Ku, K.M., Tou, J.C., 2018. A comprehensive analysis of the composition, health benefits, and safety of apple pomace. *Nutrition reviews*, 76(12), pp.893-909.
- [16] Waldbauer, K., McKinnon, R., Kopp, B., 2017. Apple pomace as potential source of natural active compounds. *Planta Medica*, 83(12/13), pp.994-1010.
- [17] Zahra, A., Lim, S.K., Seong, H.A. and Shin, S.J., 2022. Nano-processing of Apple Pomace for Cosmetics Ingredients. *Journal of Korea Technical Association of The Pulp and Paper Industry*. 54(6) pp.68-77.
- [18] Barreira, J.C., Arraibi, A.A., 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 & Technology*, 90, pp.76-87.
- [19] Pine, S. H., Hendrickson, J. B. 1980. *Organic chemistry / Stanley H. Pine*. Fourth edition. New York: McGraw-Hill.
- [20] Oszmiański, J., Wojdyło, A., Kolniak, J., 2011. Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. *Food Chemistry*, 127(2), pp.623-631.
- [21] Ough, C.S., Amerine, M.A. (1988). *Methods for analysis of musts and wines*. J. Wiley & Sons. Washington.
- [22] Miller N. J., Rice-Evans C. A. (1997): Factors Influencing the Antioxidant Activity Determined by the ABTS Radical Cation Assay. *Free Radical Research*, 26(3): 195-199.
- [23] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (9/10); pp. 1231-1237.
- [24] Dujmović, M., Opačić, N., Radman, S., Fabek Uher, S., Čoga, L., Petek, M., Voća, S., Šić Žlabur, J., 2023. How to Increase the Nutritional Quality of Stinging Nettle Through Controlled Plant Nutrition. *Food technology and biotechnology*, 61(4), pp.451-464.

- [25] Mitić, S.S., Stojanović, B.T., Stojković, M.B., Mitić, M.N., Pavlović, J.L., 2013. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of different apple cultivars. *Bulg. Chem. Commun*, 45, pp.326-331.
- [26] Imeh, U. Khokhar, S., 2002. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(22), pp.6301-6306.
- [27] 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), p.85.
- [28] Bai, X., Zhang, H., Ren, S., 2013. Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol-enriched extracts from industrial apple pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(10), pp.2502-2506.
- [29] Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F., 2004. Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(21), pp.6532-6538.
- [30] Łata, B., Trampczynska, A., Paczesna, J., 2009. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae*, 121(2), pp.176-181.
- [31] Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., Sroka, P. 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), pp. 39-50

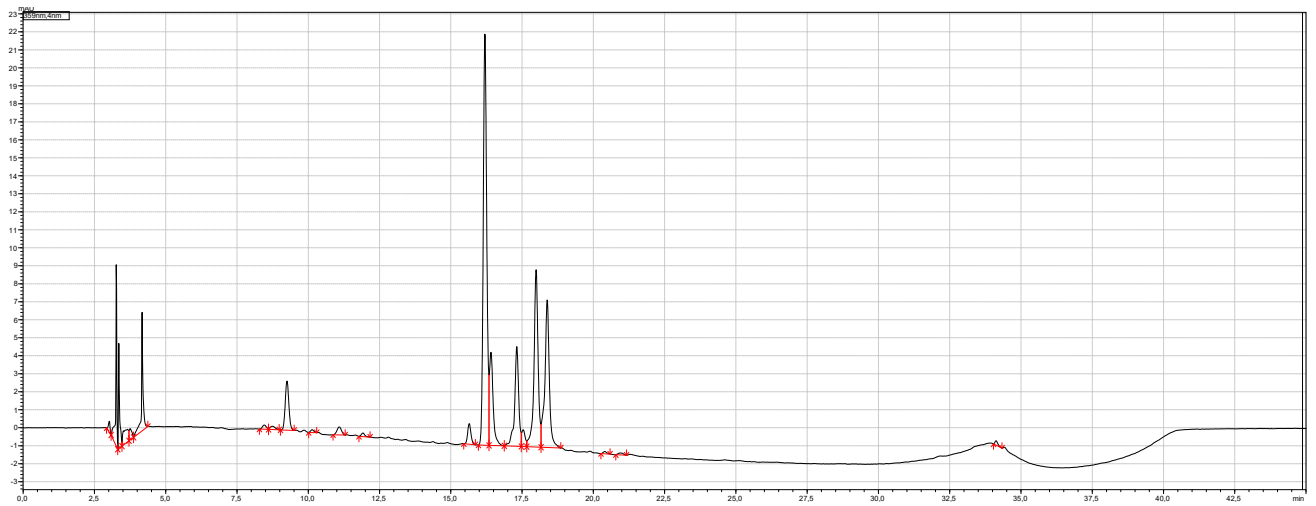
8. PRILOZI



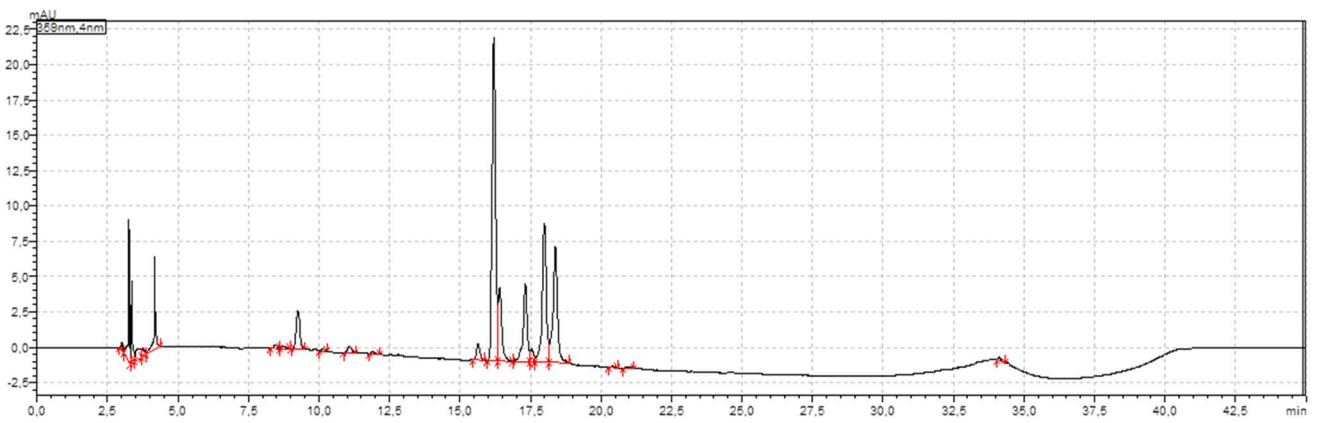
Slika 16. Kromatogram sorte „Crips pink“



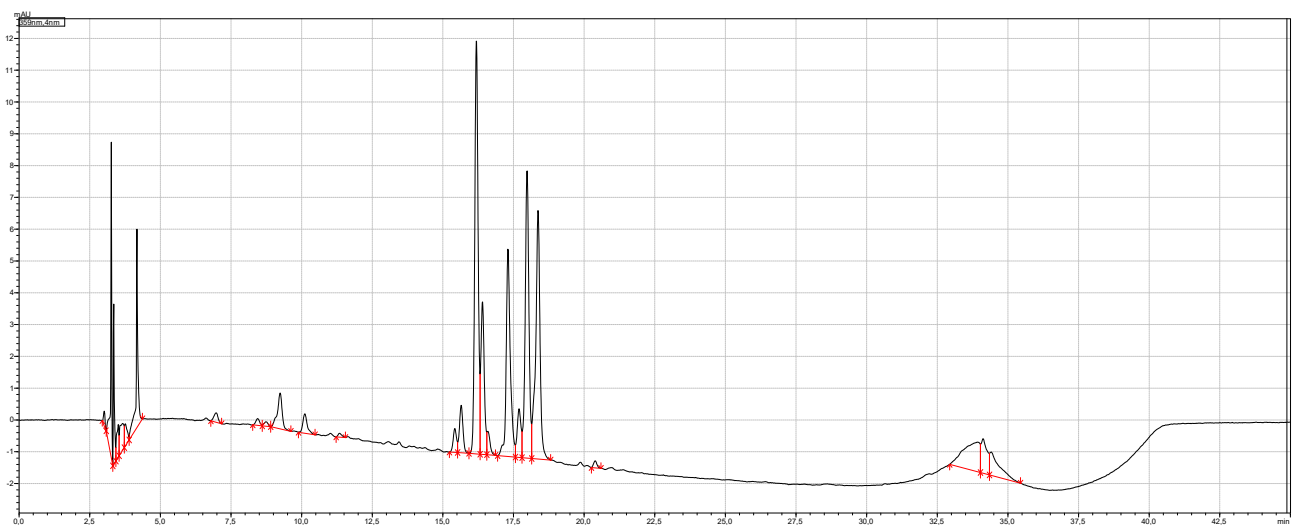
Slika 17. Uvećani pikovi sorte „Crips pink“



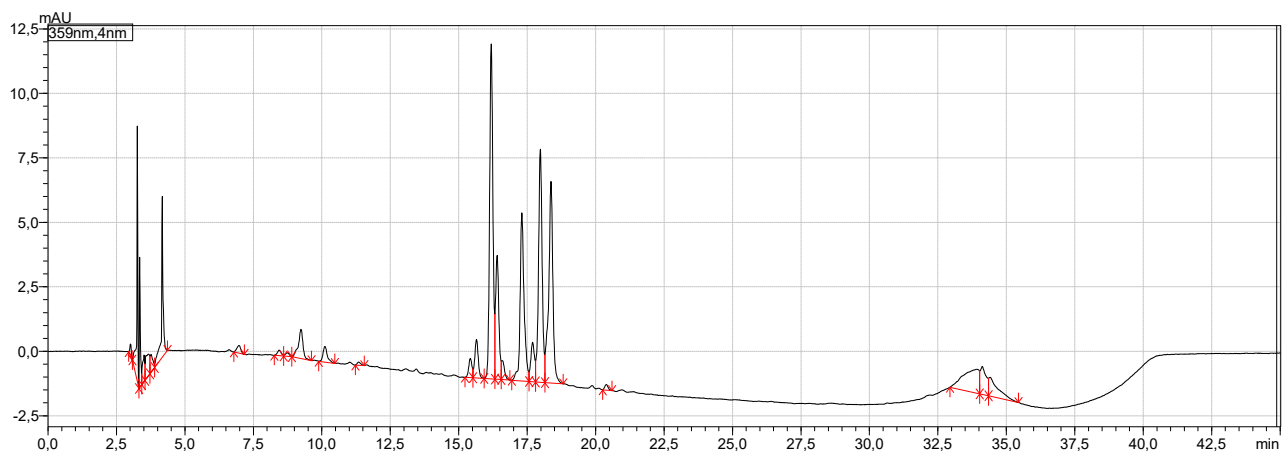
Slika 18. Kromatogram sorte „Gala“



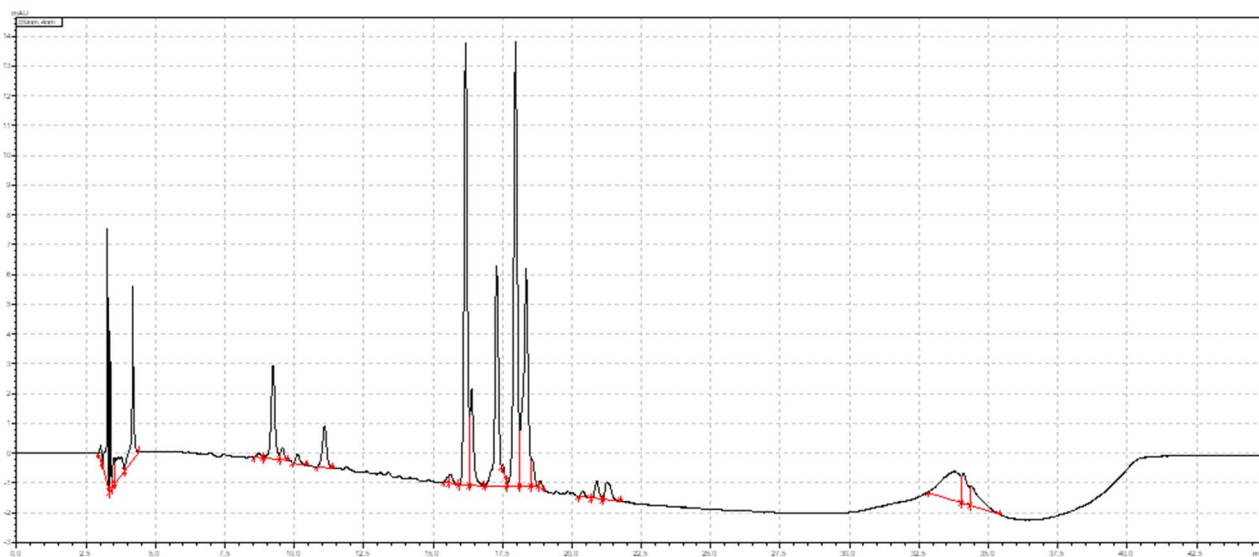
Slika 19. Uvećani pikovi sorte „Gala“



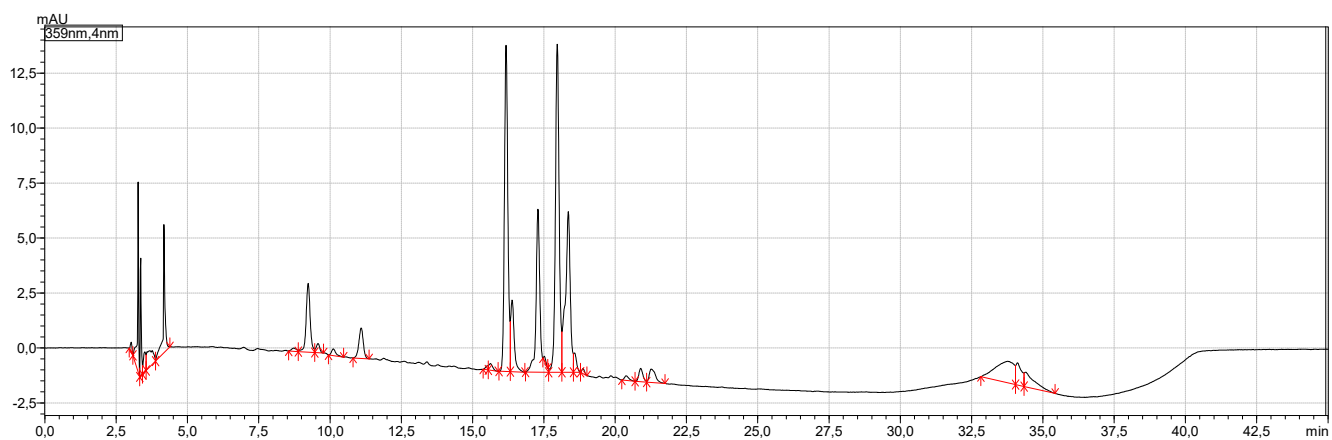
Slika 20. Kromatogram sorte „Granny smith“



Slika 21. Uvećani pikovi sorte „Granny smith“



Slika 22. Kromatogram sorte „Idared“



Slika 23. Uvećani pikovi sorte „Idared“

ŽIVOTOPIS

Mihaela Voća [REDACTED] Svoje srednjoškolsko obrazovanje ostvaruje završenom zagrebačkom Sedmom gimnazijom po općem programu. Služi se sa dva strana jezika, njemačkim i engleskim. Studiranje na Sveučilištu u Zagrebu započela je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije upisavši prijediplomski smjer Primijenjena kemija.

Volontersko iskustvo stječe kao član međunarodne organizacije Board of European Students of Technology (BEST), te predsjedničkom pozicijom zagrebačke podružnice, BEST Zagreb.