

Kemijski sastav i antioksidacijska aktivnost divlje jabuke (*Malus sylvestris* (L.) Mill.)

Šenjug, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:626825>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Dora Šenjug

**KEMIJSKI SASTAV I
ANTIOKSIDACIJSKA
AKTIVNOST DIVLJE JABUKE
(*Malus sylvestris* (L.) Mill.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Nade Vahčić Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć tehničke suradnice Valentine Hohnjec.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

KEMIJSKI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST DIVLJE JABUKE (*Malus sylvestris* (L.) Mill.)

univ. bacc. ing. techn. aliment. Dora Šenjug, 0058211020

Sažetak: Cilj ovog rada bio je odrediti kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost te ukupne fenole divlje jabuke (*Malus sylvestris*). Uzorci korišteni u ovom radu uzeti su s područja Hrvatske te je ukupno analizirano 9 uzoraka. Prosječan udio vode u analiziranim uzorcima divlje jabuke iznosio je 86,40 %, udio šećera 10,88 %, udio proteina 0,43 %, udio pepela 0,57 %, udio masti 0,28 % te udio celuloze 1,45 %. Antioksidacijska aktivnost divlje jabuke određena pomoću DPPH metode kreće se od 72,78 % - 81,67 %, a pomoću FRAP metode kreće se od 0,15 – 4,42 mmol/100g s.t. Udio ukupnih fenola kreće se od 905,73 – 13394,37 mg GAE/kg.

Ključne riječi: divlja jabuka, *Malus sylvestris* L. Mill., kemijski sastav, antioksidacijska aktivnost, ukupni fenoli

Rad sadrži: 45 stranica, 10 slika, 12 tablica, 32 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Nada Vahčić

Pomoć pri izradi: Valentina Hohnjec

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Branka Levaj
2. prof. dr. sc. Nada Vahčić
3. doc. dr. sc. Maja Repajić
4. prof. dr. sc. Ksenija Marković

Datum obrane: 30. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WILD APPLE (*Malus sylvestris* (L.) Mill.)

univ. bacc. ing. techn. aliment. Dora Šenjug, 0058211020

Abstract: The aim of this study was to determine the chemical composition, antioxidant activity and total phenolic compounds of wild apple (*Malus sylvestris*). The samples used in this thesis were excluded from the territory of Croatia and total number of tested samples was 9. The average water content in the analyzed wild apple samples was 86.40 %, sugar content was 10.88 %, protein content was 0.43 %, ash content was 0.57 %, fat content was 0.28 % and cellulose content was 1.45 %. Antioxidant activity of wild apple determined by DPPH method ranges from 72.78 % - 81.67 %, and the activity determined by FRAP method ranges from 0.15 – 4.42 mmol/100g s.t. The total phenolic compounds ranges from 905.73 – 13394.37 mg GAE/kg.

Keywords: wild apple, *Malus sylvestris* L. Mill., chemical composition, antioxidant activity, total phenolic compounds

Thesis contains: 45 pages, 10 figures, 12 tables, 32 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *Nada Vahčić, PhD*

Technical support and assistance: *Valentina Hohnjec*

Reviewers:

1. Branka Levaj, PhD, Full Professor
2. Nada Vahčić, PhD, Full Professor
3. Maja Repajić, PhD, Assistant Professor
4. Ksenija Marković, PhD, Full Professor

Thesis defended: 30th September 2022

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. KARAKTERISTIKE DIVLJE JABUKE	2
2.2. TAKSONOMIJA I HIBRIDIZACIJA	5
2.3. STANIŠTE I PARAMETRI ZA RAST.....	6
2.4. RASPROSTRANJENOST.....	7
2.5. KEMIJSKI SASTAV DIVLJE JABUKE	7
2.6. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST DIVLJE JABUKE	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. MATERIJALI	10
3.2. METODE.....	11
3.2.1. Priprema uzorka.....	11
3.2.2. Priprema uzorka za određivanje ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti	12
3.2.3. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti	13
3.2.4. Metoda za određivanje udjela vode	13
3.2.5. Metoda za određivanje udjela ukupnih proteina Kjeldahlovim postupkom.....	15
3.2.6. Metoda za određivanje udjela reducirajućih šećera	17
3.2.7. Metoda za određivanje udjela mineralnog ostatka	20
3.2.8. Metoda za određivanje udjela masti metodom po Soxhletu.....	21
3.2.9. Metoda za određivanje udjela celuloze Kürschnerovim i Hanakovim postupkom	23
3.2.10. Metoda za određivanje ukupnih fenola	24
3.2.11. Metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	26
3.2.12. Metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	29
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	32
4.1. KEMIJSKI SASTAV DIVLJE JABUKE	33
4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST DIVLJE JABUKE	38
5. ZAKLJUČAK.....	42
6. LITERATURA	43

1. UVOD

Divlja jabuka, vrsta *Malus sylvestris*, je najrasprostranjeniji divlji srodnik stabla jabuke u Europi. Pripada porodici *Rosaceae*, rod *Malus*. Još se može naći i pod nazivima kao što su rakova jabuka ili šumska jabuka.

Plod divlje jabuke ima bogat kemijski sastav, sadrži brojne vitamine i minerale, te se iz tog razloga divljoj jabuci pripisuju brojni pozitivni učinci na zdravlje. Može se konzumirati svježa, smrznuta ili kuhana. Također, od nje se proizvode i alkoholna pića (rakije, likeri, vino), kao i bezalkoholna pića (voćni sokovi i čajevi).

Brojna istraživanja pokazala su kako je divlja jabuka bogata fenolnim spojevima i ima visoku antioksidacijsku aktivnost, stoga osim u prehrambenoj industriji, divlja jabuka ima važnu ulogu i u medicini i kozmetičkoj industriji.

Antioksidacijska aktivnost povezana je sa samim sastavom i udjelom fenolnih spojeva u namirnici. Brojno voće kao što su borovnice, kivi, aronija pa tako i divlja jabuka imaju vrlo kompleksan sastav fenolnih spojeva pa se za određivanje antioksidacijske aktivnosti koristi više metoda kako bi se dobile potrebne informacije. Najčešće korištene metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti su DPPH, FRAP, ORAC, ABTS.

Cilj ovog rada bio je određivanje kemijskog sastava 9 uzoraka divlje jabuke s 4 različite lokacije te određivanje njihove antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom i određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KARAKTERISTIKE DIVLJE JABUKE

Malus sylvestris (L.) Mill. je europska divlja jabuka ili šumska jabuka koja je dio obitelji *Rosaceae* te je jedina autohtona vrsta divlje jabuke koja se može pronaći na području Europe (slika 1) (Reim i sur., 2012). *M. sylvestris* smatra se kao glavni doprinositelj genoma kultivirane jabuke *Malus domestica* (Cornille i sur., 2013).

Drvo divlje jabuke može doseći 10 m u visinu ili više, promjer mu je od 50 pa do 120 cm i može živjeti 80 – 100 godina. Ima vrlo guste i nisko spuštene krošnje, nepravilnog oblika, mnogo pojedinačnih, trnovitih grančica, ispucala sivo-smeđa kora koja u zimskom razdoblju ima karakterističnu tamno sivu boju. Najčešće se može naći na sunčanim i vlažnim mjestima, na rubnim dijelovima šuma, odnosno na područjima gdje nije velika gustoća naseljenosti, uz puteve, živice, poplavnim nizinama, kamenim nasipima (Stoenescu i Cosmulescu, 2022; Stephan i sur., 2003).



Slika 1. Divlja jabuka (Idžojtić, 2013).

Divlja jabuka je vrlo rijetka i autohtona vrsta zbog čega bi se istraživanjima o genetskim raznolikostima populacija trebale uspostaviti politike očuvanja za ovu vrstu. Međutim, do sada je status zaštite ove vrste riješen samo u 4 zemlje: Litvi, Belgiji, Njemačkoj i Češkoj gdje je divlja jabuka klasificirana kao ugrožena vrsta (Stoenescu i Cosmulescu, 2022; Schnitzler i sur., 2014). Opstanak divlje jabuke ugrožen je ljudskim aktivnostima kao što su krčenje šuma i intenzivna poljoprivreda budući da se takvim aktivnostima smanjuju pogodna staništa za rast divlje jabuke (Reim i sur., 2012).

Za oplodnju potreban je oprašivač, a najčešći oprašivači su pčele, muhe te ponekad kornjaši. Pelud jabuke najčešće se širi vektorima i vjetrom, te barijere ne sprječavaju hibridizaciju s *M. domestica*. U ovakvim raštrkanim populacijama izostaju dovoljni partneri za oprašivanje te oplodnja i održavanje genetskog identiteta nije osigurano. Stoga, danas je uobičajena hibridizacija divlje jabuke s kultiviranim sortama zbog čega je vrlo teško razlikovati genetski čistu vrstu *M. sylvestris* od hibrida (Reim i sur., 2012).

Cvatnja kreće početkom travnja i traje do kraja svibnja. Pupoljci su jajoliki, crvenozeleni i goli. Cvjetovi su bijeli do ružičasti, rastu pojedinačno ili skupno po 2-3, promjera 3-4 cm, dvospolni, entomofilni (slika 2). Vjenčić je građen od 5 latica (1,5-2 cm) koje su iznutra bijele, izvana ružičaste, jajastog oblika sa zaobljenim vrhom, gole ili s unutrašnje strane po rubu i na vrhu nešto dlakave. Čašku čini 5 zelenih listića (3-7 cm) koji su usko-trokutasti, oštrošiljasti, dlakavi na unutarnjoj površini a izvana goli. Prašnika (1 cm) ima 15-20 te su raspoređeni u 2 kruga. Plodnica je podrasla, 5-gradna, vratova ima 5 te su srasli i zelenkasti, njuške su glavičaste i zelenkaste. (Stoenescu i Cosmulescu, 2022; Idžojtić, 2013; Stephan i sur., 2003).

Listovi su listopadni, prema rasporedu naizmjenični, 5-8 cm dugački, 4-5 cm široki, s raznim nijansama zelene, a mogu biti ovalni, eliptični nazubljeni, sa zaobljenom bazom ili klinasti te su prekriveni sitnim dlačicama u mladosti koje nestaju starenjem (slika 3). Peteljka je 2-3,5 cm dugačka a može biti pahuljasto dlakava ili gola (Worrell i sur., 2019; Idžojtić, 2009; Stephan i sur., 2003).

Plodovi su opori, goli, okruglog do elipsoidnog oblika promjenjive veličine, žuto-zelenkaste boje, duljine ploda između 20 do 35 mm, na vrhu plitko udubljeni do izbočeni, s ostatkom čaške, a na osnovi su plitko udubljeni s tankom stapkom. Dozrijevaju od kolovoza do listopada i kiselog su do gorskog okusa, prerađeni jestivi (Idžojtić, 2013; Reim i sur., 2012). Rezultati istraživanja koje su proveli Stoenescu i Cosmulescu (2022) pokazuju kako se duljina ploda divlje jabuke kreće od 16,64 do 35,47 mm, te su njihovi rezultati slični onima dobivenim u istraživanju Šebek (2013) a rezultati se kreću od 22,12 do 38,19 mm. Drvodelić i sur. (2015) podijelili su divlju jabuku u 3 kategorije prema duljini ploda: mali plodovi prema njihovom istraživanju imaju duljinu oko 20,85 mm, srednje krupni plodovi oko 29,05 mm i veliki plodovi oko 33,16 mm. Prema istraživanju Stoenescu i Cosmulescu (2022) masa divlje jabuke kreće se od 3 do 26 g i njihovi rezultati u korelaciji su s rezultatima dobivenim istraživanjem Drvodelić i sur. (2015). Također, Drvodelić i sur. (2015) podijelili su divlju jabuku i prema masi: mali plodovi (<10 g s prosječnom vrijednošću od 5,78 g), srednje krupni

plodovi (10-20 g s prosječnom vrijednošću od 14,96 g) i krupni plodovi (>20,00 g s prosječnom vrijednošću od 23,54 g). Šebek (2013) navodi u rezultatima svog istraživanja kako se masa divlje jabuke kreće od 8,95 do 33,65 g.



Slika 2. Cvijet divlje jabuke (Idžojić, 2013).



Slika 3. Listovi divlje jabuke (Worrell i sur., 2019).

2.2. TAKSONOMIJA I HIBRIDIZACIJA

Tablica 1. Taksonomija divlje jabuke (Hulina, 2011).

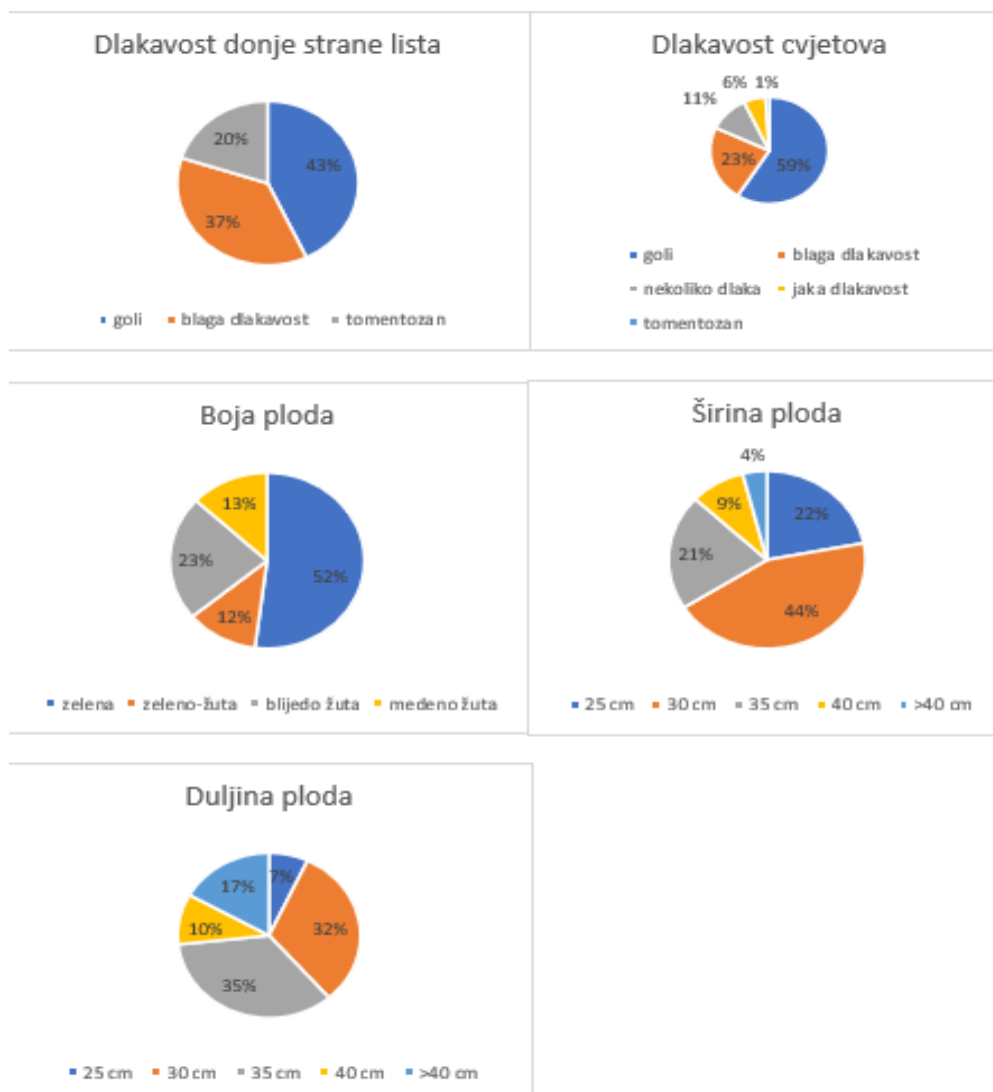
CARSTVO	<i>Plantae</i>
RED	<i>Rosales</i>
PORODICA	<i>Rosaceae</i>
ROD	<i>Malus</i>
VRSTA	<i>Malus sylvestris</i>

Iz tablice 1 vidljiva je taksonomska podjela divlje jabuke. Divlja jabuka vrsta *Malus sylvestris* (L.) Mill, pripada porodici *Rosaceae*, rodu *Malus*. Ime roda *Malus* na latinskom je naziv za jabuku, a ime vrste *sylvestris* dolazi od latinske riječi *silva*, čije je značenje šuma (Hulina, 2011). Najviše je rasprostranjena na području zapadne i srednje Europe, dok se na području istočne i jugoistočne Europe mogu naći druge vrste roda *Malus* kao što su *M. florentina*, *M. trilobata* i *M. orientalis* (Tardio i sur., 2020). *M. sylvestris* smatra se kao jedan od glavnih divljih rođaka kultivirane jabuke *M. domestica* (Cornille i sur., 2013). Međutim, prema brojnim autorima smatra se da je ipak *M. sieversii* (Ldb.) M. Roem glavni predak kultivirane jabuke. *M. sieversii* je vrsta koja dolazi iz srednje Azije, posebno iz šume planine Tian Shan, u Kazahstanu (Tardio i sur., 2020).

Hibridizacija između divlje jabuke i kultivirane jabuke je vrlo česta te je razlikovanje tih dviju vrsti vrlo teško. Međutim, u taksonomiji kao najprikladnije morfološke osobine na temelju kojih se vrsta *M. sylvestris* može razlikovati od *M. domestica* su sljedeće: dlakavost lišća i cvjetova te veličina i boja plodova (Reim i sur., 2012). Tardío i sur. (2020) navode kao bitne morfološke karakteristike za identifikaciju vrste *M. sylvestris*: nedostatak dlakavosti s donje strane lista, manja širina ploda, često ispod 3 cm, nedostatak crvene boje plodova i opori okus. Petrokas i Stanys (2008) spominju u svom radu kao glavne morfološke karakteristike u identifikaciji *M. sylvestris*: blaga dlakavost s donje strane lista u mladosti i nedostatak dlakavosti u jesen, trnje na grančicama, boja i okus.

Reim i sur. (2012) u svom radu prikazali su frekvenciju pojavljivanja glavnih morfoloških osobina vrste *M. sylvestris* (slika 4). Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako je 2/3 analiziranih uzoraka pokazalo odsutnost dlaka s donje strane lista i veličinu ploda manju od 35 mm. Međutim, rezultati su pokazali i kako rezultati samih pojedinačnih osobina nisu

dovoljno učinkoviti za otkrivanje razlike od hibrida, budući da su neke osobine pod utjecajem lokalnih okolišnih uvjeta.



Slika 4. Frekvencija pojavljivanja glavnih morfoloških karakteristika (prema Reim i sur., 2012).

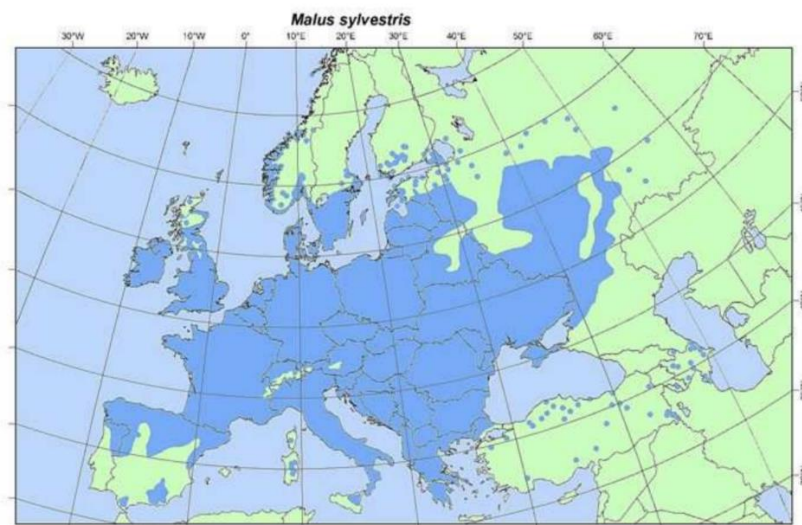
2.3. STANIŠTE I PARAMETRI ZA RAST

Divlja jabuka može se naći na rubovima šuma kao usamljena vrsta, u malim skupinama ili unutar njih, a nalazi se u šumskim staništima od listopadnih (hrast, grba, lipa) do mješovitih (listopadni i crnogorice). Manje je zahtjevna vrsta prema tipu tla, ali ima visoke zahtjeve prema intenzitetu svjetla (Tardio i sur., 2020; Schnitzler i sur., 2014). Iako divlja jabuka uspijeva na većini plodnih tla, preferira dobro drenirano ilovasto tlo, koje zadržava vlagu. S obzirom na visoke zahtjeve za svjetlom i niske konkurentne sposobnosti, divlja jabuka je

prirodno razbacana u praznine unutar šume i na rubu šume, ili raste na izrazito suhim ili vlažnim mjestima na kojima su druge biljke manje konkurentne (Schnitzler i sur., 2014).

2.4. RASPROSTRANJENOST

Genetskim analizama divlje jabuke s različitih geografskih područja, otkrivene su tri glavne populacije (slika 5). Jedna populacija pokriva veliko područje zapadne Europe, od Francuske do Norveške, a druge dvije pokrivaju istočnu Europu. U istočnoj Europi jedna populacija pokriva područje oko Karpata, a druga područje Balkana (Worrell i sur., 2019). Prema Robinsonu i sur. (2001), divlja jabuka je rasprostranjena od južne Skandinavije do Pirinejskog poluotoka te od Volge do Britanskog otočja.



Slika 5. Rasprostranjenost divlje jabuke (Worrell i sur., 2019).

2.5. KEMIJSKI SASTAV DIVLJE JABUKE

Podaci o sastavu hrane kao što su podaci o kemijskom sastavu, mineralima ili vitaminima, ključni su za mnoga polja uključujući medicinu, politiku prehrane, javno zdravstvo, obrazovanje, ili za prehrambenu industriju. Takvi podaci koriste se na razne načine uključujući nacionalne programe za procjenu stanja uhranjenosti stanovništva, razvoj terapijske i institucionalne dijetete, te za označavanje prehrambene vrijednosti hrane (Smanalieva i sur., 2020). Plodovi divlje jabuke imaju značajnu medicinsku vrijednost kao i hranjivu vrijednost pa se od ovih plodova proizvode likeri, džemovi, kompoti, ocat, rakije, vino, voćna pića i čajevi (Yu i sur., 2021).

Divlja jabuka bogata je pektinom pa je prikladna namirnica za proizvodnju želea i džemova. Također, zbog visokog udjela pektina, ima dobra laksativna svojstva pa se može koristiti za

sprječavanje zatvora, ali i u kozmetičkoj industriji zbog toga što pektin pomaže u zacjeljivanju rana i smanjuje upalne procese (Mustafa i sur., 2018). S obzirom na visok udio šećera, od ploda divlje jabuke proizvode se i razna alkoholna pića. Jabukovača je piće koje se najviše proizvodi u Španjolskoj, proizvodnja vina od divlje jabuke karakteristična je za Estoniju i Irsku dok je proizvodnja rakije karakteristična za područje Balkana (Tardao i sur., 2020).

Kemijski sastav divlje jabuke:

- 80 % vode
- 12,2 % šećera
- 3,2 % vlakna
- 1,3 % pektina
- 1,0 % pepela
- 0,2 % proteina
- 0,18 % masti (Aziz i sur., 2013).

Divlja jabuka bogata je i u sastavu vitamina i minerala:

- 8,1 mg/100 g vitamin C
- 0,92 mg/100 g vitamin A
- 19,8 mg/100 g kalcij
- 213 mg/100 g kalij
- 2,8 mg/100 g natrij
- 4,0 mg/100 g željezo
- 7,8 mg/100 g magnezij (Aziz i sur., 2013)

Prema istraživanju koje su proveli Aziz i sur. (2013) koncentracija vitamina C u divljoj jabuci je visoka te iznosi 8,1 mg/100 g, što je skoro dvostruko više od koncentracije vitamina C u kultiviranoj jabuci. Preporučena dnevna doza (RDA) vitamina C je 90 mg. To znači da jedna do dvije jabuke zadovoljavaju tjelesne potrebe za ovim vitaminom (Aziz i sur., 2013). Vitamin C se smatra jednim od najraširenijih antioksidativnih komponenti voća i povrća te ima značajne kemopreventivne učinke protiv oksidacijskog oštećenja (Lee i sur., 2003). Također, divlja jabuka je bogata mineralima: kalijem, magnezijem, kalcijem, natrijem i željezom (Yu i sur., 2021).

2.6. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST DIVLJE JABUKE

Nekoliko epidemioloških studija pokazalo je obrnutu korelaciju između visokog unosa voća i povrća i učestalosti pojave nezaraznih kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, rak, pretilost, dijabetes i druge. Pretpostavlja se da su ovi korisni učinci konzumacije voća i povrća posljedica prisutnosti različitih antioksidansa koji štite stanične sustave od oksidacijskih oštećenja te u konačnici smanjuju učestalost pojave nezaraznih kroničnih bolesti (de la Rosa i sur., 2019). Oksidacijska oštećenja izazivaju slobodni radikal, nestabilne visoko reaktivne molekule koje imaju nesparene elektrone. Slobodni radikali općenito napadaju najbliže stabilne molekule, „kradući“ njihove elektrone, kako bi postigli stabilnost te tako uništavaju stanične strukture. Antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale, donirajući im svoj elektron, a pri tome oni sami ne postaju radikali budući da su stabilni u oba oblika (Kaur i Kapoor, 2001).

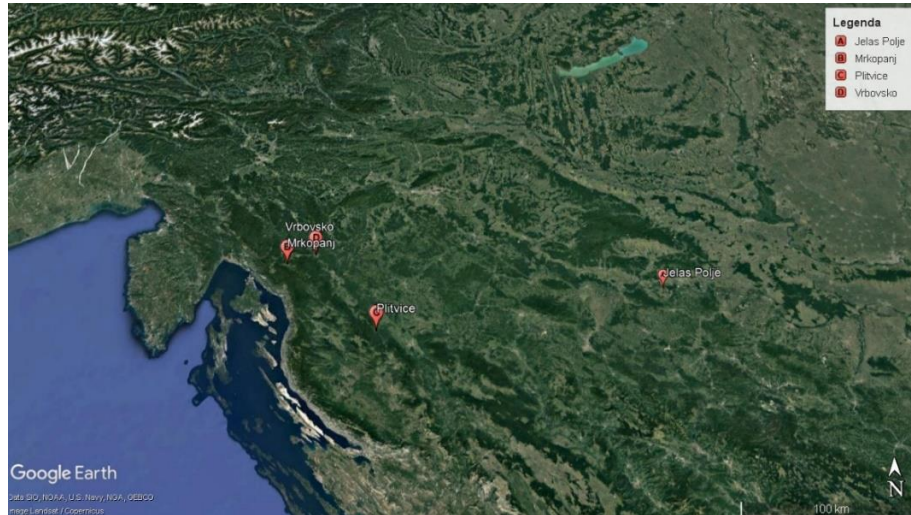
Nekoliko studija pokazalo je kako je kultivirana jabuka, *M. domestica*, bogata bioaktivnim spojevima i ima brojne farmakološke funkcije, dok su slični podaci o divljoj jabuci, *M. sylvestris*, malobrojni jer je njihova populacija vrlo rijetka (Schnitzler i sur., 2014). Iako divlja jabuka nije toliko popularna kao kultivirana jabuka, zbog svog gorkog i kiselog okusa te zbog toga što je manje ekonomski značajna, smatra se da je i ona vrlo bogata bioaktivnim komponentama i antioksidansima (Mihailović i sur., 2018). Neka istraživanja su pokazala kako starije sorte jabuka posjeduju višu razinu fenolnih spojeva i antioksidacijsko djelovanje od većine kultiviranih jabuka (Iacopini i sur., 2010). Slično istraživanje provedeno u Hrvatskoj, koje je uključivalo nekoliko starijih sorti jabuka i nekoliko sorata divlje jabuke, pokazalo je da divlja jabuka sadrži mnogo više flavonola i sadržaja fenolne kiseline u mesu u usporedbi s drugim sortama jabuka (Jakobek i Barron, 2016).

Najvažniji fenolni spojevi u jabukama su kvercetin, katehin i epikatehin, koji su odgovorni za oporost i gorčinu. Klorogenska kiselina (CGA) i *p*-kumarinska kiselina također su vrlo važne u jabukama kao i floridizin (Mihailović i sur., 2018). Oni predstavljaju najvažnije prirodne antioksidanse divlje jabuke, dok lupeol i tokoferol najvažnije lipofilne antioksidanse (Radenkovs i sur., 2020). Svaki od ovih fenolnih spojeva može imati posebne zdravstvene prednosti kao što su prevencija raka, bolesti srca i krvožilnog sustava, astme, Alzheimerove bolesti, dijabetesa, prevencija pretilosti, zdravlje kostiju, plućni funkcija i zaštitu probavnog sustava (Mustafa i sur., 2018). Također, divlja jabuka često se koristi kao ukrasna biljka zbog raznolikosti boja njihovog lišća, cvjetova i plodova, koje posjeduju zbog prisustva različitih spojeva antocijana (Yu i sur., 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za istraživanje su korišteni uzorci divlje jabuke (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). Iz tablice 2 vidljive su lokacije analiziranih uzoraka i njihove oznake a ukupno je analizirano 9 uzoraka s 4 različite lokacije (slika 6).



Slika 6. Lokacije analiziranih uzoraka (vlastiti izvor).

Tablica 2. Lokacije analiziranih uzoraka i njihove oznake (vlastiti izvor).

OZNAKA UZORKA	LOKACIJA
PL1	PLITVICE
PL2	
PL4	
PL5	
PL7	
JP1	JELAS POLJE
JP2	
MR1	MRKOPALJ
VR2	VRBOVSKO

Na svih 9 uzoraka provedene su analize:

- Određivanje kemijskog sastava (vode, proteina, šećera, pepela, masti, celuloze)
- Određivanje ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom

3.2. METODE

3.2.1. Priprema uzorka

Oprema:

- polietilenske vrećice s patentnim zatvaračem
- štapni mikser
- laboratorijska čaša
- laboratorijska špatula
- plastične, sterilne posudice

Postupak: Svi uzorci divlje jabuke nakon berbe pakirani su u polietilenske vrećice s patentnim zatvaračem te zamrznuti. Uzorci su odmrznuti neposredno prije provođenja pripreme pri sobnoj temperaturi. Nakon odmrzavanja svaki pojedinačni uzorak je usitnjen i homogeniziran štapnim mikserom u čistim laboratorijskim čašama. Homogenizirani uzorci su zatim preneseni pomoću špatule u plastične, zatvorene i sterilne posudice. Uzorci su u posudicama skladišteni u zamrzivaču za vrijeme trajanja eksperimentalnog dijela.



Slika 7. Uzorci (vlastiti izvor).

3.2.2. Priprema uzorka za određivanje ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti

Reagensi:

- otopina MeOH/ 2 % HCl

Oprema:

- okrugla tikvica s ravnim dnom
- magnetna miješalica
- odmjerna tikvica (50 mL)
- analitička vaga tip 2615 (Tehtnica, Železniki)
- Buchnerov lijevak
- odsisna boca
- sisaljka uz vodeni mlaz
- filter papir
- propipeta
- pipeta (25 mL)
- stakleni štapić
- laboratorijska čaša
- pinceta

Postupak: Uzorke u plastičnim, zatvorenim, sterilnim posudicama potrebno je odmrznuti pri sobnoj temperaturi i zatim od svakog uzorka izvagati oko 6 g u okruglu tikvicu s ravnim dnom. U tikvicu se zatim pomoću menzure dodaje 20 mL otapala za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl) te se tikvica potom začepi, omota aluminijskom folijom i stavi na magnetnu miješalicu 60 min. Nakon 60 min otopina se filtrira pod vakuumom, a dobiveni ekstrakt se prelije u odmjernu tikvicu od 50 mL. Ostatak ekstrakta iz vakuum boce se ispere s malom količinom otapala za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl) i također prenese u odmjernu tikvicu. Talog na filter papiru iz Buchnerovog lijevka prenese se pomoću pincete natrag u okruglu tikvicu s ravnim dnom te se zatim dodaje 20 mL otapala za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl) i tikvica se vraća na magnetnu miješalicu još 60 min. Nakon 60 min ponavlja se postupak filtracije. Odmjerna tikvica se na kraju nadopuni do oznake otapalom za ekstrakciju.

Ekstrakt se između analiza čuva pri + 4 °C.

3.2.3. Priprema otopina za određivanje ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti

Reagensi:

- 37 %-tna klorovodična kiselina (HCl)
- metanol

Oprema:

- odmjerna tikvica (50 mL, 1000 mL)
- propipeta
- pipeta (5 mL)

Postupak: - Otopina 2 % HCl: U odmjernoj tikvici od 50 mL razrijedi se 2,7 mL 37 % HCl-a s destiliranom vodom.

- Otapalo za ekstrakciju MeOH/2 % HCl (95:5): U odmjernu tikvicu od 1000 mL dodaje se 50 mL 2 % HCl te se tikvica do oznake nadopunjuje metanolom.

3.2.4. Metoda za određivanje udjela vode

Princip: Ovim fizikalnim postupkom određuje se udjel vode indirektno, pri čemu se mjeri ostatak koji zaostaje nakon sušenja, a iz razlike u masi prije i nakon sušenja namirnice izračunava se udjel vode (AOAC 925,03:2000).

Oprema:

- aluminijska posudica s poklopcem
- stakleni štapić
- eksikator
- analitička vaga tip 2615 (Tehtnica, Železniki)
- zračna sušnica tip ST – 01/02 (Instrumentaria, Zagreb)

Postupak: Aluminijske posudice s poklopcem i s dodatkom kvarcnog pijeska i staklenog štapića, za što bolju homogenizaciju uzorka, prethodno se označe i zatim suše u sušioniku pri temperaturi 105 °C. Nakon toga se ohlade u eksikatoru i izvažu. 2 g prethodno odmrznutog i homogeniziranog uzorka, odvaže se u označenu aluminijsku posudicu s poklopcem poznate mase te izmiješa s kvarcnim pijeskom. Nepokrivene aluminijske posudice s uzorkom i

poklopac suše se 5 h u sušioniku pri 105 °C, nakon čega se hlade u eksikatoru do sobne temperature i zatim važu.

Račun:

$$\% \text{ vode} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad [1]$$

gdje je:

m_1 – masa prazne aluminijske zdjelice (g)

m_2 – masa aluminijske zdjelice s uzorkom prije sušenja (g)

m_3 – masa aluminijske zdjelice s uzorkom nakon sušenja (g)

3.2.5. Metoda za određivanje udjela ukupnih proteina Kjeldahlovim postupkom

Princip: Zagrijavanjem uzorka sa sumpornom kiselinom uz dodatak Kjeldahl-ovih tableta (K_2SO_4 i $CuSO_4$), koje djeluju kao katalizatori te povisuju vrelište kiseline, dolazi do razaranja organske tvari iz uzorka. Dolazi do oslobađanja proteinskog i neproteinskog dušika koji zaostaje u obliku amonijevih soli (amonijev sulfat). Dodatkom natrijeva hidroksida, iz amonijeva sulfata oslobađa se amonijak koji se predestilira u bornu kiselinu, a nastali amonijev borat titrira se klorovodičnom kiselinom (AOAC 992,15:2000).

Reagensi:

- 95 %-tna sumporna kiselina (H_2SO_4)
- Kjeldahlove tablete (K_2SO_4 i $CuSO_4$)
- 40 %-tni natrijev hidroksid ($NaOH$)
- 4 %-tna borna kiselina (H_3BO_3)
- klorovodična kiselina (HCl)
- 30 % vodikov peroksid (H_2O_2)

Oprema:

- analitička vaga tip 2615 (Tehtnica, Železniki)
- kivetu za Kjeltet sustav (500mL)
- blok za spaljivanje Kjeldahl Tecator DS-6 1007 (Foss, Hillerod, Danska)
- destilacijska jedinica Kjeltet sustava (Floss Kjeltet 8100)
- pipeta (25 mL)
- bireta (50 mL)
- Erlenmeyerova tikvica (250 mL)

Postupak:

Spaljivanje: 3 g izvaganog homogeniziranog uzorka se prebaci pomoću aluminijske folije i pincete u kivetu od 500 mL. Zatim, u kivetu se dodaje 1 Kjeldahlova tableta, 15 mL koncentrirane sumporne kiseline i 5 mL 30 % vodikovog peroksida. Nakon toga kivetu je potrebno dobro protresti kako bi došlo do reakcije vodikovog peroksida i sumporne kiseline. Kivete se stavljaju u blok za spaljivanje te se prvo provodi lagano zagrijavanje pri nižoj temperaturi, dok se reakcija u kivetu ne smiri. Zatim se spaljivanje provodi pri višoj

temperaturi do pojave bistre zelene tekućine bez neizgorenih crnih komadića uzorka. Nakon što se sadržaj u kiveti ohladi, slijedi postupak destilacije.

Destilacija: Destilacija se provodi u sustavu Floss Kjeltex 8100. Na odgovarajuće postolje uređaja stavlja se Erlenmeyerova tikvica s 25 mL prethodno otpipetirane borne kiseline, tako da je destilacijska cjevčica uronjena u bornu kiselinu. Također, kiveta sa sadržajem koji analiziramo stavlja se u uređaj. Uređaj se postavlja na program koji traje 5 min i koji automatski dodaje 80 mL vode i 50 mL NaOH u kivetu. Sadržaj tikvice po završetku destilacije mijenja boju iz ružičaste u zelenu, čime se dokazuje prisutnost amonijaka. Sadržaj tikvice se nakon destilacije titrira s 0,1 M HCl do pojave ružičaste boje.

Račun:

$$\% \text{ ukupnog } N = \frac{(T-B) \times N \times 14,007 \times 100}{m} \quad [2]$$

$$\% \text{ proteina} = \% N \times 6,25 \quad [3]$$

Gdje je:

T – volumen HCl utrošen za titraciju uzorka (mL)

B – volumen HCl utrošen za titraciju slijepe probe (mL)

m – masa uzorka (mg)

N – molalitet kiseline

6,25 – faktor za preračunavanje postotka dušika u proteine

3.2.6. Metoda za određivanje udjela reducirajućih šećera

Princip: Direktno reducirajući šećeri (prirodni invert) određuju se na osnovu njihovih reducirajućih svojstava. Oni pod određenim uvjetima reduciraju bakrov sulfat (CuSO_4) odnosno Fehlingovu otopinu u bakrov (I) oksid (Cu_2O) koji se u tom obliku onda može odrediti gravimetrijski ili titrimetrijski. Nereducirajući šećeri se prvo moraju hidrolizirati na reducirajuće šećere pomoću kiseline ili karakterističnih enzima, a zatim se određuju pomoću Fehlingove otopine i daju podatak o ukupnoj količini šećera u uzorku (ukupni invert) (AOAC 925,35:2000).

Reagensi:

- zasićena otopina neutralnog olovo acetata
- kalijev oksalat
- 20 %-tna kloridna kiselina (HCl)
- 30 %-tni natrij hidroksid (NaOH)
- fenolftalein
- otopina Fehling I
- otopina Fehling II

Oprema:

- tehnička vaga tip 1111 (Tehtnica, Železniki)
- laboratorijska čaša (250 mL)
- stakleni štapić
- plamenik
- azbestna mrežica
- odmjerna tikvica (100 mL, 250 mL)
- pipeta (2 mL, 10 mL)
- menzura (25 mL)
- filter papir
- stakleni lijevak
- laboratorijska špatula
- satno stakalce
- porculanski filter (poroznosti B4-1P1)

- vodena kupelj (itron 16, INKO)
- odsisna boca
- sisaljka uz vodeni mlaz
- zračna sušnica tip ST – 01/02 (Instrumentaria, Zagreb)
- eksikator
- analitička vaga tip 2615 (Tehtnica, Železniki)

Postupak: U laboratorijsku čašu od 250 mL odvaži se 10 g homogeniziranog uzorka i zatim doda 10 mL destilirane vode kako bi se uzorak razrijedio. Sadržaj laboratorijske čaše se zatim zagrijava na plameniku uz miješanje pomoću staklenog štapića do homogenosti. Homogenizirani uzorak kvantitativno se prebaci preko staklenog štapića u odmjernu tikvicu od 250 ml i ohladi u mlazu hladne vode. Nakon što se sadržaj ohladi u tikvicu se otpipetira 2 mL neutralnog olovovog acetata, promiješa i tikvica se dopuni do oznake destiliranom vodom. Zatim se provodi filtracija sadržaja tikvice uz odbacivanje prvih par mL filtrata, u filtrat se doda suhi kalijev oksalat da bi se istaložio višak olova, te se ponovno provodi filtracija uz odbacivanje prvih par mL filtrata. U odmjernu tikvicu od 100 mL doda se 25 mL filtrata, 10 mL 20 % - tne HCl i 20 mL vode, sadržaj se promiješa i stavi 10 min u vodenu kupelj na 60 °C. Nakon 10 min tikvica se izvadi iz kupelji i ohladi. Potom se provodi neutralizacija sadržaja tikvice, dodatkom 20 % - tnog NaOH uz indikator i tikvica se dopuni do oznake. Nakon toga se provodi određivanje šećera gravimetrijskim postupkom. U Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL doda se 25 mL pripremljenih otopina Fehling I i Fehling II, 25 mL filtrata i 25 mL vode. Sadržaj tikvice, pokriven satnim stakalcem, potom se zagrijava na plameniku preko azbestne mrežice tako da zavrije unutar 4 min i nakon toga vrije još 2 min. Vrući sadržaj tikvice se zatim filtrira kroz prethodno osušen, ohlađen i izvagan porculanski filter, a talog se ispire vrućom destiliranom vodom. Talog se zatim suši u zračnoj sušnici 30 min pri 105 °C, hladi potom u eksikatoru i važe. Iz Hammondovih tablica očita se udjel invertnog šećera ekvivalentan izvavanoj masi Cu₂O.

Račun:

$$\% \text{ šećera} = \frac{a \times 100}{b \times 100} \quad [4]$$

gdje je:

a – očitani udjel šećera iz Hammondovih tablica (mg)

b – masa uzorka u alikvotnom dijelu filtrata uzetom u konačni postupak (g)

3.2.7. Metoda za određivanje udjela mineralnog ostatka

Princip: Uzorak se karbonizira na plameniku, a zatim se mineralizira u Mufolnoj peći do dobivanja svjetlo sivog pepela, odnosno pepela konstantne mase (AOAC 923,03:2000).

Reagensi:

- destilirana voda

Oprema:

- porculanska zdjelica
- plamenik
- azbestna mrežica
- eksikator
- analitička vaga tip 2615 (Tehtnica, Železniki)
- Mufolna peć tip Heraeus KR-170 (W.C. Heraeus GmbH, Hanau)
- sušnica tip ST-01/02 (Instrumentaria, Zagreb)

Postupak: 3 g homogeniziranog uzorka odvaže se u prethodno izarenu, ohlađenu i izvaganu porculansku zdjelicu i potom se u zdjelici karbonizira na plameniku. Zatim se prenese u Mufolnu peć gdje se mineralizira do svjetlo sivog pepela pri 580 °C. U slučaju da je pepeo tamne boje potrebno ga je malo navlažiti vodom kako bi se otopile soli te se zatim suši u sušnici i zatim nastavi postupak mineralizacije. Nakon spaljivanja porculanske zdjelice se hlade u eksikatoru i važu.

Račun:

$$\% \text{ pepela} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \quad [5]$$

gdje je:

m_1 – masa prazne porculanske zdjelice (g)

m_2 – masa porculanske zdjelice i uzorka prije spaljivanja (g)

m_3 – masa porculanske zdjelice i pepela (g)

3.2.8. Metoda za određivanje udjela masti metodom po Soxhletu

Princip: Postupak se bazira na višekratnoj kontinuiranoj ekstrakciji masti organskim otapalom u posebno načinjenoj Soxhletovoj aparaturi (AOAC 989,05:2000).

Reagensi:

- medicinski benzin

Oprema:

- analitička vaga tip 2615 (Tehtnica, Železniki)
- papirnata čahura
- Soxhletova aparatura
- pješčana kupelj 1304 (Inko, Zagreb)
- zračna sušnica tip ST - 01/02 (Instrumentaria, Zagreb)
- eksikator
- staklene kuglice
- okrugla tikvica s ravnim dnom
- stakleni lijevak
- porculanska zdjelica
- laboratorijska špatula

Postupak: 15 g homogeniziranog uzorka izvaže se u porculansku zdjelicu i suši u sušioniku do konstantne mase. Nakon sušenja uzorak se špatulom poskida sa zdjelica i prenese u odmašćenu, izvaganu, papirnatu čahuru i potom opet važe. Čahura s uzorkom se zatim suši u zračnoj sušnici 1 h pri 105 °C, nakon čega se pokrije odmašćenom suhom vatom i stavi u srednji dio Soxhletove aparature koji se zatim spoji s hladilom i tikvicom. Tikvicu je, također, s nekoliko staklenih kuglica potrebno prethodno osušiti u zračnoj sušnici 1 h pri 105 °C, ohladiti i izvagati. Kroz hladilo se zatim uz pomoć lijevka lijeva otapala toliko da se ekstraktor napuni i pomoću kapilarne cjevčice isprazni u tikvicu. Nakon toga se doda još toliko otapala da se ekstraktor napuni do pola, a ukupni volumen otapala ne smije prijeći $\frac{3}{4}$ volumena tikvice. Zatim se kroz hladilo pušta mlaz vode i započinje zagrijavanje. Ekstrakcija se provodi 5 h, a prekida se u trenutku kada se otapalo iz ekstraktora prelije u tikvicu, a čahura u ekstraktoru ostane bez otapala. Aparatura uređaja se tada rastavlja i čahura s

uzorkom se vadi, potom se uređaj opet sastavlja kako bi se otapalo prodestiliralo iz tikvice u prazan ekstraktor. Tikvica s ekstraktom se suši 1 h pri 105 °C te zatim hladi i važe.

Račun:

$$\% \text{ masti} = \frac{b-a}{m} \times 100 \quad [6]$$

Gdje je :

a – masa prazne tikvice (g)

b – masa tikvice i ekstrahirane masti (g)

m - masa uzorka (g)

3.2.9. Metoda za određivanje udjela celuloze Kürschnerovim i Hanakovim postupkom

Princip: Namirnica se razara smjesom dušične i octene kiseline. Dušična kiselina oksidira i nitrira sve tvari u namirnici osim celuloze, a razgradni produkti otapaju se u octenoj kiselini (AOAC 973,18:2000).

Reagensi:

- 80 %-tna octena kiselina (CH₃COOH)
- koncentrirana dušična kiselina (HNO₃)

Oprema:

- analitička vaga tip 2615 (Tehtnica, Železniki)
- zračna sušnica tip ST - 01/02 (Instrumentaria, Zagreb)
- okrugla tikvica s ravnim dnom
- pipeta (5 mL, 25 mL)
- plamenik
- azbestna mrežica
- zračno hladilo
- stakleni filter lončić (poroznost 1-G-3)
- sisaljka uz vodeni mlaz
- odsisna boca

Postupak: 1 g homogeniziranog uzorka izvaže se u okruglu tikvicu s ravnim dnom te se zatim u nju otpipetira 25 mL 80 %-tne octene kiseline i 2,5 mL koncentrirane dušične kiseline. Tikvica se spoji na povratno zračno hladilo i sadržaj tikvice se kuha 30 min. Potom se još vrući sadržaj tikvice filtrira kroz prethodno osušen, ohlađen i izvagan stakleni filter uz slabi vakuum, kako se ne bi začepile pore filtera. Potom se filter prvo ispere s vrućim reagensom (25 mL octene kiseline + 2,5 mL dušične kiseline), a zatim s vrućom vodom. Potom se suši pri 100-110 °C, hladi i zatim važe.

Račun:

$$\% \text{ sirove celuloze} = \frac{a \times 100}{m} \quad [7]$$

Gdje je:

a – masa sirove celuloze (g), m – masa uzorka uzetog za analizu (g)

3.2.10. Metoda za određivanje ukupnih fenola

Princip: Ukupni fenoli određuju se pomoću Folin-Ciocalteu reagensa koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, a pri oksidaciji fenolnih sastojaka ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Mjeri se nastali intenzitet plavog obojenja pri valnoj duljini 750 nm.

Reagensi:

- otopina Folin – Ciocalteu reagens – otopinu pripremiti na dan analize tako što se 1 mL Folin – Ciocalteu reagensa razrijedi s 2 mL destilirane vode
- zasićena otopina natrijeva karbonata (Na_2CO_3) ($\gamma = 200 \text{ mg/mL}$) – u odmjernu tikvicu od 50 mL otopiti 10 g anhidrida natrijeva karbonata u 40 mL vruće destilirane vode, ohladiti i nadopuniti do oznake destiliranom vodom. Pustiti otopinu da odstoji 24 h i zatim ju profiltrirati
- standardna otopina galne kiseline ($\gamma = 5 \text{ mg/mL}$) – u odmjernu tikvicu od 50 mL otopiti 250 mg galne kiseline u metanolu

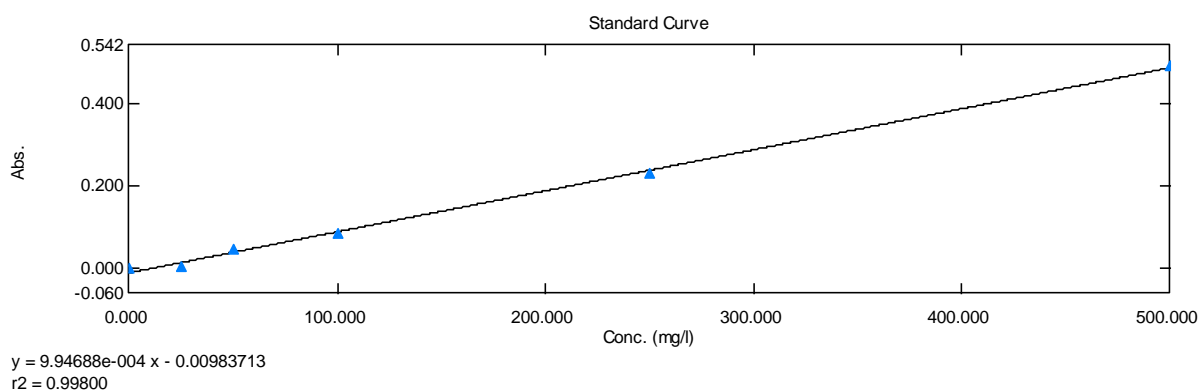
Oprema:

- odmjerna tikvica (10 mL, 50 mL, 100 mL)
- mikropipeta (100 μL , 1000 μL)
- epruvete
- mješalica (tip VV3 S40)
- vodena kupelj (itron 16, INKO)
- spektrofotometar (UV-1280 Shimadzu)
- analitička vaga tip 2615 (Tehtnica, Železniki)
- laboratorijska čaša
- laboratorijska špatula
- gumeni čepovi za epruvete
- stalak za epruvete
- stakleni lijevak

Priprema uzorka: Uzorci se prvo razrijede otapalom za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl). U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetira se 1 mL ekstrakta i do oznake se nadopuni otapalom za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl).

Postupak određivanja: U epruvete se otpipetira 40 μL razrijeđenog ekstrakta, 3160 μL destilirane vode i 200 μL otopine Folin – Ciocalteu reagensa. Epruveta sa slijepom probom pripremi se na isti način kao uzorci, ali se umjesto uzorka doda ista količina otapala za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl). Sadržaj epruveta se promiješa na mješalici, epruvete se začepi te potom ostave da odstoje 3 min. Nakon 3 min u epruvetu se otpipetira 600 μL zasićene otopine Na_2CO_3 , sadržaj se ponovno promiješa na mješalici i zatim stavi na inkubaciju u vodenu kupelj pri 40 °C 30 min. Nakon inkubacije mjeri se apsorbancija pri 765 nm.

Izrada baždarnog pravca: U odmjernim tikvicama od 100 mL naprave se razrjeđenja pripremljene standardne otopine galne kiseline ($\gamma = 5 \text{ mg/mL}$), u koncentracijama galne kiseline koje iznose: 0, 25, 50, 100, 150, 250, 500 mg/L. Razrjeđenja se pripreme tako što se u odmjerne tikvice od 100 mL redom otpipetira: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 i 10,0 mL standardne otopine galne kiseline te se zatim tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. Iz svake tikvice otpipetira se u epruvete 40 μL sadržaja i ostatak postupka se ponovi prema propisu za određivanje ukupnih fenola u uzorcima. Baždarni pravac se nacrtava pomoću računala tako da se na apscisu nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu apsorbancije izmjerene pri 765 nm (slika 8).



Slika 8. Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenola (vlastiti izvor).

Račun:

$$y = 9,94688e-004x - 0,00983713$$

$$r^2 = 0,99800$$

Gdje je:

y – apsorbancija uzorka pri 765 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg/L)

r^2 – koeficijent determinacije

3.2.11. Metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Princip: Metoda se temelji na korištenju stabilnog DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil) radikala koji postiže apsorpcijski maksimum pri 517 nm zbog nesporenog elektrona te je ljubičaste boje. Dokaz sparivanja nesporenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa očituje se promjenom ljubičaste boje u žutu, a promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona.

Reagensi:

- otopina DPPH ($c = 0,5 \text{ mM}$) – otopinu pripremiti na dan analize tako što se u odmjernu tikvicu od 100 mL otopi 0,02 g DPPH radikala u metanolu
- standardna otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilktoman-2-karbonska kiselina),
 $c = 0,02 \text{ M}$ – u odmjernu tikvicu od 100 mL otopi se 0,5 g Troloxa u metanolu.

Oprema:

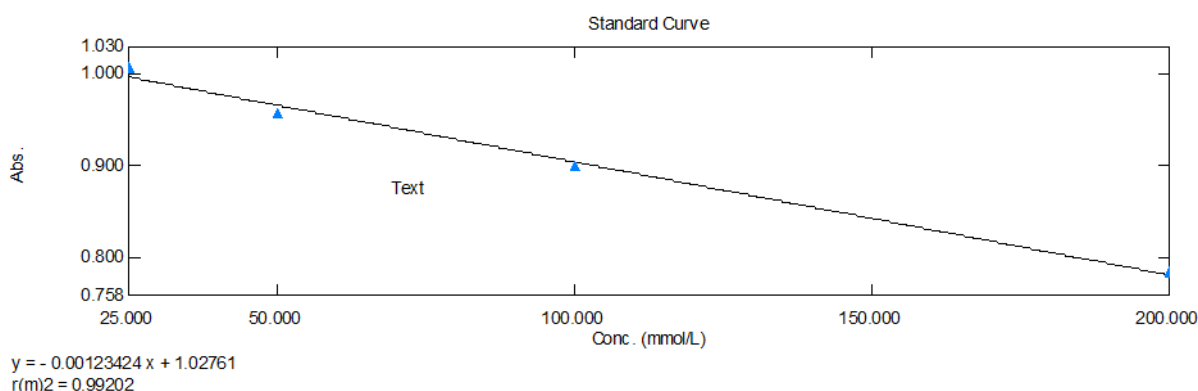
- odmjerna tikvica (10 mL, 50 mL, 100 mL)
- mikropipeta (1000 μL)
- epruvete
- mješalica (tip VV3 S40)
- spektrofotometar (UV-1280 Shimadzu)
- analitička vaga tip 2615 (Tehtnica, Železniki)
- gumeni čepovi za epruvete

- laboratorijska čaša
- stakleni lijevak
- stalak za epruvete

Priprema uzorka: Uzorci se prvo razrijede otapalom za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl). U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetira se 0,5 mL ekstrakta i do oznake se nadopuni otapalom za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl).

Postupak određivanja: U epruvete se otpipetira 2 mL razrijeđenog ekstrakta, 2 mL metanola te 1 mL 0,5 mM otopine DPPH. U epruvetu s kontrolnim uzorkom otpipetira se 4 mL metanola i 1 mL 0,5 mM otopine DPPH. Sadržaj epruveta se promiješa na mješalici, epruvete se začepe te potom ostave da odstoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi. Nakon 20 min mjeri se apsorbancija uzoraka pri 517 nm.

Izrada baždarnog pravca: U odmjernim tikvicama od 50 mL pripreme se razrjeđenja 0, 02 M standardne otopine Troloxa u koncentracijama 0, 25, 50, 100, 200 μ M. U epruvete se iz svake tikvice otpipetira 200 μ L razrijeđene otopine Troloxa, 3,8 mL metanola i 1 mL 0,5 mM otopine DPPH. Epruvete se potom ostave da odstoje 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi i nakon 20 min se mjeri apsorbancija pri 517 nm uz metanol kao slijepu probu. Baždarni pravac se nacrtava pomoću računala tako da se na apscisu nanese koncentracije otopine Troloxa (mM), a na ordinatu apsorbancije izmjerene pri 517 nm (slika 9).



Slika 9. Kalibracijska krivulja za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom (vlastiti izvor).

Račun:

$$S = 100 - [(A_1/A_0 \times 100)] \quad [8]$$

S – antioksidacijska aktivnost (%)

A₀ – apsorbancija uzorka

A₁ – apsorbancija kontrolnog uzorka

3.2.12. Metoda ta određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Princip: Metoda se bazira na redukciji žutu obojenog kompleksa željezo-2,4,6,- tripiridil- s- triazin (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt, a reakcija se odvija pri nižem pH (pH = 3,6). Odnosno, temelji se na sposobnosti ekstrakta da reducira Fe^{3+} ione u Fe^{2+} ione u otopini TPTZ pri nižem pH, te se redukcija prati mjerenjem apsorbancije pri 595 nm.

Reagensi:

- 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline (HCl) – u odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 330 μL 12 M HCl i dopuni destiliranom vodom do oznake.
- 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6 – u odmjernoj tikvici od 50 mL otopi se 0,155 g natrijevog acetata u 0,8 mL ledene octene kiseline te se tikvica do oznake dopuni destiliranom vodom. Mora se čuvati pri + 4 °C.
- 20 mM otopina željezova-(III)-klorida (FeCl_3) – otopina se priprema svježa na dan analize tako što se u odmjernoj tikvici od 10 mL otopi 0,0541 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ u destiliranoj vodi koja se dopuni do oznake.
- 10 mM otopina 2,4,6,- tripiridil- s- triazin (TPTZ) – otopina se priprema svježa na dan analize tako što se u odmjernoj tikvici od 10 mL otopi 0,0312 g TPTZ s 40 mM HCl te se s istom kiselinom i nadopuni do oznake. Čuva se u vodenoj kupelji pri 37 °C.
- 20 mM otopina $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – u odmjernu tikvicu od 100 mL izvaže se 0,55604 g željezo sulfata i tikvica se do oznake napuni destiliranom vodom.
- FRAP reagens – priprema se neposredno prije upotrebe tako što se pomiješa 50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL FeCl_3 . Između analiza se čuva u vodenoj kupelji pri 37 °C.

Oprema:

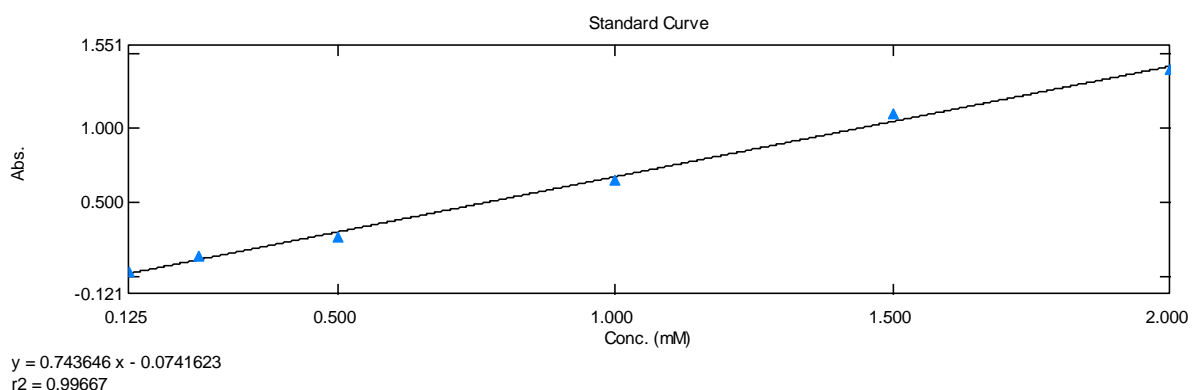
- odmjerna tikvica (50 mL, 100 mL)
- mikropipeta (100 μL , 1000 μL)
- epruvete
- mješalica (tip VV3 S40)
- spektrofotometar (UV-1280 Shimadzu)
- analitička vaga tip 2615 (Tehtnica, Železniki)
- gumeni čepovi za epruvete
- laboratorijska čaša

- stakleni lijevak
- stalak za epruvete
- vodena kupelj (itron 16, INKO)

Priprema uzorka: Uzorci se prvo razrijede otapalom za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl). U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetira se 0,5 mL ekstrakta i do oznake se nadopuni otapalom za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl).

Postupak određivanja: U epruvete se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka te 2080 μL FRAP reagensa. U epruvetu sa slijepom probom umjesto uzorka stavlja se otapalo za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl). Sadržaj epruveta se promiješa na mješalici, epruvete se začepi i stave u vodenu kupelj pri 37 °C 5 min. Nakon 5 min mjeri se apsorbancija pri 595 nm.

Izrada baždarnog pravca: U odmjernim tikvicama od 100 mL pripreme se standardne otopine $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ u koncentracijama: 0,125; 0,250; 0,500; 1000; 1500 i 2,000 mM. U epruvete se umjesto uzorka otpipetira 80 μL pripremljenje standardne otopine a ostatak postupka je isti kao za uzorak. Baždarni pravac se nacrtava pomoću računala tako da se na apscisu nanese koncentracije standardne otopine $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (mM), a na ordinatu apsorbancije izmjerene pri 595 nm (slika 10).



Slika 10. Kalibracijska krivulja za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom (vlastiti izvor).

Račun:

$$y = 0,743646x - 0,0741623$$

$$r^2 = 0,99667$$

Gdje je:

y – apsorbancija uzorka pri 595 nm

x - koncentracije standardne otopine $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (mM)

r^2 – koeficijent determinacije

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja analizirano je 9 uzoraka divlje jabuke s 4 različite lokacije. Određen je kemijski sastav ploda divlje jabuke, antioksidacijska aktivnost pomoću dviju metoda: DPPH i FRAP metode te udio ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa.

U tablici 3 prikazani su rezultati kemijskog sastava ploda divlje jabuke s različitih lokacija i deskriptivna statistička analiza rezultata.

Rezultati za kemijski sastav su prikazani u obliku udjela (%).

U tablicama 4, 5, 6, 7, 8 i 9 prikazana je analiza varijance podataka kemijskog sastava u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

U tablici 10 prikazani su rezultati ispitivanja antioksidacijske aktivnosti ploda divlje jabuke pomoću DPPH i FRAP metoda, udjela ukupnih fenola te deskriptivna statistička analiza rezultata.

Rezultati za antioksidacijsku aktivnost određivanu DPPH metodom prikazani su kao % inhibicije DPPH radikala, za antioksidacijsku aktivnost određivanu FRAP metodom prikazani su u mmol/100 g suhe tvari (s.t.) a rezultati za ukupne fenole prikazani su u mg GAE/kg.

U tablici 11 prikazana je analiza varijance podataka o udjelu ukupnih fenola u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

U tablici 12 prikazana je analiza varijance podataka o antioksidacijskoj aktivnosti određenoj DPPH metodom u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke, a u tablici 13 prikazana je analiza varijance podataka o antioksidacijskoj aktivnosti određenoj FRAP metodom u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

4.1. KEMIJSKI SASTAV DIVLJE JABUKE

Tablica 3. Rezultati određivanja kemijskog sastava divlje jabuke te deskriptivne statističke analize.

LOKALITET	OZNAKA UZORAKA	VODA [%]	PROTEINI [%]	ŠEĆERI [%]	PEPEO [%]	MAST [%]	CELULOZA [%]
PLITVICE	PL 1	86,04	0,31	11,26	0,71	0,25	1,43
	PL 2	86,1	0,54	10,56	1,1	0,28	1,42
	PL 4	86,85	0,54	10,17	0,78	0,29	1,37
	PL 5	87,64	0,54	9,29	0,59	0,32	1,62
	PL 7	86,03	0,34	11,52	0,43	0,26	1,42
JELAS POLJE	JP 1	84,62	0,5	12,46	0,29	0,28	1,85
	JP 2	86,41	0,37	11,95	0,22	0,2	0,85
MRKOPALJ	MR 1	87,05	0,3	10,24	0,54	0,34	1,53
VRBOVSKO	VR 2	86,88	0,4	10,47	0,43	0,27	1,55
PROSJEK		86,40	0,43	10,88	0,57	0,28	1,45
RASPON		3,02	0,24	3,17	0,88	0,14	1,00
STAND. DEVIJACIJA		0,86	0,10	0,99	0,27	0,04	0,27
KOEf. VARIJABILNOSTI		1	24	9	48	15	18

Iz tablice 3 vidljivo je da voda čini najveći udio u sastavu divlje jabuke. Najveći udio vode zabilježen je u uzorku PL5 s lokacije „Plitvice“ te iznosi 87,64 %, dok je najmanji udio vode zabilježen u uzorku JP1 s lokacije „Jelas polje“ te iznosi 84,62 %. Prosječan udio vode, u uzorcima prikupljenim na svim lokacijama, iznosi 86,40 %.

Zatim, značajan udio u sastavu zauzimaju šećeri. Najveći udio šećera zabilježen je u uzorku JP1 s lokacije „Jelas polje“ te iznosi 12,46 %, dok je najmanji udio šećera zabilježen u uzorku PL5 s lokacije „Plitvice“ te iznosi 9,29 %. Prosječan udio šećera, u uzorcima prikupljenim na svim lokacijama, iznosi 10,88 %.

Najveći udio celuloze zabilježen je u uzorku JP1 s lokacije „Jelas polje“ te iznosi 1,85 %, dok je najmanji udio celuloze zabilježen u uzorku JP2 s iste lokacije te iznosi 0,85 %. Prosječan udio celuloze, u uzorcima prikupljenim na svim lokacijama, iznosi 1,45 %.

Najveći udio pepela zabilježen je u uzorku PL2 s lokacije „Plitvice“ te iznosi 1,1 %, dok je najmanji udio pepela zabilježen u uzorku JP2 s lokacije „Jelas polje“ te iznosi 0,22 %. Prosječan udio pepela, u uzorcima prikupljenim na svim lokacijama, iznosi 0,57 %.

Najveći udio proteina zabilježen je u uzorcima PL2, PL4 i PL5 s lokacije „Plitvice“ te iznosi 0,54 %, dok je najmanji udio proteina zabilježen u uzorku MR1 s lokacije „Mrkopalj“ te iznosi 0,30 %. Prosječan udio proteina, u uzorcima prikupljenim na svim lokacijama, iznosi 0,43 %.

Najmanji udio u sastavu divlje jabuke zauzimaju masti. Najveći udio masti zabilježen je u uzorku MR1 s lokacije „Mrkopalj“ te iznosi 0,34 %, dok je najmanji udio masti zabilježen u uzorku JP2 s lokacije „Jelas polje“ te iznosi 0,20 %. Prosječan udio masti, u uzorcima prikupljenim na svim lokacijama, iznosi 0,28 %.

Na temelju deskriptivne statističke analize kemijskog sastava može se zaključiti kako najveći raspon varijacije ima udio vode, 3,02 %, a najmanji raspon ima udio masti, 0,14 %. Također, vidljivo je kako najmanje odstupanje od prosjeka, prema koeficijentu varijabilnosti ima udio vode, 1 %, a najveće odstupanje od prosjeka ima udio pepela, 48 %, zatim udio proteina 24 %, udio celuloze 18 %, udio masti 15 % i udio šećera 9 %.

Ljubojević i sur. (2019) u svom radu analizirali su divlje jabuke s područja BIH te prema njihovim podacima udio vode u uzorcima kreće se od 76,69 % - 88,37 %, udio šećera kreće se od 9,53 % - 12,34 %, a udio pepela kreće se od 1,63 % - 2,77 %. Rezultati za udio vode i udio šećera ovoga istraživanja podudaraju se s podacima dobivenim u istraživanju Ljubojević i sur. (2019), dok su podaci za udio pepela nešto veći od rezultata dobivenih u ovom istraživanju. Aziz i sur. (2013) su analizirali divlju jabuku s područja Pakistana te prema njihovom istraživanju udio vode u divljoj jabuci je 80 %, udio šećera 12,2 %, udio pepela 1,0 %. Podaci ovog istraživanja također se podudaraju i s podacima dobivenim u istraživanju Aziz i sur. (2013).

Tablica 4. Analiza varijance podataka o udjelu vode u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

ANOVA VODA						
IZVOR VARIJACIJE	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
IZMEĐU LOKALITETA	2,306426	3	0,768809	1,064381	0,442334	5,409451
UNUTAR LOKALITETA	3,61153	5	0,722306			
UKUPNO	5,917956	8				

Legenda:

SS – suma kvadrata odstupanja

df – stupnjevi slobode

MS – varijanca

F – Fischerov kvocijent

p-value – p-vrijednost

F crit – kritični F kvocijent

Iz tablice 4 vidljivo je da vrijednost p iznosi 0,442334, budući da je izrečena vrijednost $p > 0,05$, može se zaključiti da između uzoraka s različitih lokacija nema statistički značajne razlike u udjelu vode.

Tablica 5. Analiza varijance podataka o udjelu proteina u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

ANOVA PROTEINI						
IZVOR VARIJACIJE	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
IZMEĐU LOKALITETA	0,02063	3	0,006877	0,534152	0,67873	5,409451
UNUTAR LOKALITETA	0,06437	5	0,012874			
UKUPNO	0,085	8				

Iz tablice 5 vidljivo je da vrijednost p iznosi 0,67873, budući da je izrečena vrijednost $p > 0,05$, može se zaključiti da između uzoraka s različitih lokacija nema statistički značajne razlike u udjelu proteina.

Tablica 6. Analiza varijance podataka o udjelu šećera u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

ANOVA ŠEĆERI						
IZVOR VARIJACIJE	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
IZMEĐU LOKALITETA	4,60095	3	1,53365	2,319039	0,19253	5,409451
UNUTAR LOKALITETA	3,30665	5	0,66133			
UKUPNO	7,9076	8				

Iz tablice 6 vidljivo je da vrijednost p iznosi 0,19253, budući da je izrečena vrijednost $p > 0,05$, može se zaključiti da između uzoraka s različitih lokacija nema statistički značajne razlike u udjelu šećera.

Tablica 7. Analiza varijance podataka o udjelu pepela u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

ANOVA PEPEO						
IZVOR VARIJACIJE	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
IZMEĐU LOKALITETA	0,334292	3	0,111431	2,215059	0,204476	5,409451
UNUTAR LOKALITETA	0,25153	5	0,050306			
UKUPNO	0,585822	8				

Iz tablice 7 vidljivo je da vrijednost p iznosi 0,204476, budući da je izrečena vrijednost $p > 0,05$, može se zaključiti da između uzoraka s različitih lokacija nema statistički značajne razlike u udjelu pepela.

Tablica 8. Analiza varijance podataka o udjelu masti u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

ANOVA MASTI						
IZVOR VARIJACIJE	<i>SS</i>	<i>Df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
IZMEĐU LOKALITETA	0,0068	3	0,002267	1,827957	0,259099	5,409451
UNUTAR LOKALITETA	0,0062	5	0,00124			
UKUPNO	0,013	8				

Iz tablice 8 vidljivo je da vrijednost p iznosi 0,259099, budući da je izrečena vrijednost $p > 0,05$, može se zaključiti da između uzoraka s različitih lokacija nema statistički značajne razlike u udjelu masti.

Tablica 9. Analiza varijance podataka o udjelu celuloze u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

ANOVA CELULOZA						
IZVOR VARIJACIJE	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
IZMEĐU LOKALITETA	0,036409	3	0,012136	0,1129	0,948806	5,409451
UNUTAR LOKALITETA	0,53748	5	0,107496			
UKUPNO	0,573889	8				

Iz tablice 9 vidljivo je da vrijednost p iznosi 0,948806, budući da je izrečena vrijednost $p > 0,05$, može se zaključiti da između uzoraka s različitih lokacija nema statistički značajne razlike u udjelu celuloze.

4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST DIVLJE JABUKE

Tablica 10. Rezultati ispitivanja antioksidacijske aktivnosti određivane DPPH i FRAP metodama, udjela ukupnih fenola te deskriptivne statističke analize.

LOKACIJA	OZNAKA UZORKA	UKUPNI FENOLI (mgGAE/kg)	DPPH (S,%)	FRAP (mmol/100g s.t.)
PLITVICE	PL1	6063,87	78,89	1,47
	PL2	2141,01	75,28	0,43
	PL4	6891,65	77,78	4,42
	PL5	-	75,56	0,30
	PL7	2461,83	76,94	0,35
JELAS POLJE	JP1	13394,37	81,67	3,18
	JP2	6929,61	78,89	1,77
MRKOPALJ	MR1	905,73	72,78	0,15
VRBOVSKO	VR2	2206,77	76,11	0,60
SREDNJA VRIJEDNOST		5124,35	77,10	1,41
RASPON		12488,64	8,89	4,27
STAND. DEVIJACIJA		4104,99	2,58	1,49

Tablica 10 prikazuje rezultate udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti analiziranih uzoraka. Najveća vrijednost udjela ukupnih fenola određena je u uzorku JP1 s lokacije „Jelas polje“ (13394,37 mg GAE/kg). Također, uzorak JP1 s lokacije „Jelas polje“ ima i najveću antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom (81,67 %). Najveću antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom pokazuje uzorak PL4 s lokacije „Plitvice“ (4,42 mmol/100 g s.t.). Najmanja vrijednost udjela ukupnih fenola određena je u uzorku MR1 s lokacije „Mrkopalj“ (905 mg GAE/kg). Također, uzorak MR1 s lokacije „Mrkopalj“ ima i najmanju antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom (72,78 %) te FRAP metodom (0,15 mmol/100 g s.t.).

Iz tablice 10 vidljivo je kako srednja vrijednost udjela ukupnih fenola iznosi 4646,16 mg GAE/kg. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom iznosi 77,10 %. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom iznosi 1,41 mmol/100 g s.t.

Mustafa i sur. (2018) istraživali su antioksidacijsku aktivnost divlje jabuke s područja Kosova te prema njihovom istraživanju antioksidacijska aktivnost divlje jabuke određivana DPPH metodom, odnosno % inhibicije DPPH radikala iznosi $53,6 \pm 9,7$ %. Antioksidacijska aktivnost određivana FRAP metodom iznosi $518,7 \pm 42,9$ mg TE/g s.t. te udio ukupnih fenola u divljoj jabuci kreće se od $63,5 \pm 6,7$ mg CA/100 g s.t. Prema rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, antioksidacijska aktivnost divlje jabuke određivana DPPH metodom, odnosno % inhibicije DPPH radikala oko 30 % je veći od rezultata dobivenih u istraživanju Mustafa i sur. (2018), a antioksidacijska aktivnost određivana FRAP metodom razlikuje se od njihovih rezultata zbog iskazivanja rezultata u drugačijoj mjernoj jedinici, kao i podaci za udio ukupnih fenola koji su iskazani kao mg CA/100 g s.t. a u ovom istraživanju iskazali smo kao mg GAE/100 g s.t. Antioksidacijska aktivnost divlje jabuke određivana DPPH metodom prema istraživanju Yu i sur. (2021) pokazala se 10 puta većom od vrijednosti dobivenih kod drugog uobičajenog voća poznatog po svom visokom antioksidacijsko kapacitetu, kao što je kivi. Također, vrijednost antioksidacijske aktivnosti divlje jabuke pokazala se većom i od brusnice (507 mg GAE/100 g), borovnice (274,48 – 694,60 mg GAE/100 g) i crnog ribizla (434,43 mg GAE/100 g) (Fang i sur., 2018).

Stojiljković i sur. (2016) istraživali su antioksidacijsku aktivnost te udio ukupnih fenola na uzorcima divlje jabuke s područja Srbije. Rezultati koje su oni dobili za udio ukupnih fenola su: 172,91–1556,99 mg GAE/100 g s.t. Rezultati za antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom, odnosno postotak inhibicije kreće se od 8,12 – 78,43 %, a antioksidacijska

aktivnost određena FRAP metodom kreće se od 2,13 – 7,65 mM Fe²⁺/100 g s.t. Radenkovs i sur. (2020) istraživali su divlju jabuku s područja Latvije a prema njihovim rezultatima udio ukupnih fenola kreće se od 680 – 4,90 x 10³ mg GAE/ 100 g s.t., a antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom kreće se 52 - 339 mmol TE/100 g s.t.

Tablica 11. Analiza varijance podataka o udjelu ukupnih fenola u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

ANOVA UKUPNI FENOLI						
IZVOR VARIJACIJE	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
IZMEĐU LOKALITETA	85498295	3	28499432	2,912701	0,139858	5,409451
UNUTAR LOKALITETA	48922687	5	9784537			
UKUPNO	1,34E+08	8				

Iz tablice 11 vidljivo je da vrijednost p iznosi 0,139858, budući da je izrečena vrijednost p>0,05, može se zaključiti da između uzoraka s različitih lokacija nema statistički značajne razlike u udjelu ukupnih fenola.

Tablica 12. Analiza varijance podataka antioksidacijske aktivnosti određivane DPPH metodom u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

ANOVA DPPH						
IZVOR VARIJACIJE	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
IZMEĐU LOKALITETA	40,07887517	3	13,35962506	5,128576444	0,055093751	5,409451318
UNUTAR LOKALITETA	13,02469136	5	2,604938272			
UKUPNO	53,10356653	8				

Iz tablice 12 vidljivo je da vrijednost p iznosi 0,055093751, budući da je izrečena vrijednost $p > 0,05$, može se zaključiti da između uzoraka s različitih lokacija ne postoji statistički značajna razlika u antioksidacijskoj aktivnosti određenoj DPPH metodom.

Tablica 13. Analiza varijance podataka antioksidacijske aktivnosti određivane FRAP metodom u svim istraživanim uzorcima divlje jabuke.

ANOVA FRAP						
IZVOR VARIJACIJE	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
IZMEĐU LOKALITETA	4,539671	3	1,513224	0,565176	0,661319	5,409451
UNUTAR LOKALITETA	13,38718	5	2,677436			
UKUPNO	17,92685	8				

Iz tablice 13 vidljivo je da vrijednost p iznosi 0,661319, budući da je izrečena vrijednost $p < 0,05$, može se zaključiti da između uzoraka s različitih lokacija ne postoji statistički značajna razlika u antioksidacijskoj aktivnosti određenoj FRAP metodom.

5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Udio vode u uzorcima kretao se od 84,62 % - 87,64 %, udio šećera od 9,29 % - 12,46 %, udio pepela od 0,22 % - 1,1 %, udio proteina od 0,3 % - 0,54 %, udio masti u uzorcima kretao se od 0,2 % - 0,34 %, udio celuloze u uzorcima kretao se od 0,85 % - 1,85 %.
2. Na temelju provedene statističke analize može se zaključiti kako nema statistički značajne razlike u kemijskom sastavu uzoraka s različitih lokacija.
3. Nisu uočene veće razlike od rezultata dobivenih u drugim znanstvenim radovima.
4. Antioksidacijska aktivnost određivana DPPH metodom kreće se od 72,78 % - 81,67 %, antioksidacijska aktivnost određivana FRAP metodom kreće se od 0,15 – 4,42 mmol/100 g s.t.
5. Udio ukupnih fenola kreće se od 905,73 – 13394,37 mg GAE/kg.
6. Na temelju provedene statističke analize može se zaključiti kako nema statistički značajne razlike u udjelu ukupnih fenola i antioksidacijskoj aktivnosti uzoraka.
7. Antioksidacijska aktivnost divlje jabuke određivana DPPH i FRAP metodom te udio ukupnih fenola slični su s rezultatima drugih znanstvenih radova iako je rezultate teško usporediti budući da se rezultati razlikuju u iskazanim mjernim jedinicama te su neki rezultati izraženi na s.t. a neki na svježi uzorak.

6. LITERATURA

AOAC 925,03:2000, Fruits and fruit products – Moisture in fruits and fruit products

AOAC 989,05:2000, Fruits and fruit products – Total fat in fruits and fruit products

AOAC 973,18:2000, Fruits and fruit products – Cellulose in fruits and fruit products

AOAC 925,35:2000, Fruits and fruit products – Sucrose in fruits and fruit products

AOAC 992,15:2000, Fruits and fruit products – Crude proteins in fruits and fruit products

AOAC 923,03:2000, Fruits and fruit products – Ash content in fruits and fruit products

Cornille A, Giraud T, Bellard C, Tellier A, Le Cam B, Smulders MJM, Kleinschmit J, Roldan-Ruiz I, Gladieux P (2013) Postglacial recolonization history of the European crabapple (*Malus sylvestris* Mill.), a wild contributor to the domesticated apple. *Mol Ecol* **22**, 2249–2263. <https://doi.org/10.1111/mec.12231>

de la Rosa AL, Moreno-Escamilla OJ, Rodrigo-García J, Alvarez-Parrilla E (2019) Phenolic Compounds. U: Yahia ME, Carrillo-Lopez A (ured.) Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables Woodhead Publishing, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 253-271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>

Drvodelić D, Jemrić T, Oršanić M, Paulić V (2015) Fruits size of wild apple (*Malus sylvestris* L. Mill.): Impact on morphological and physiological properties of seeds. *Šumarski list* **139**, 145-152. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:858374>

Fang L, Meng W, Min W (2018) Phenolic compounds and antioxidant activities of flowers, leaves and fruits of five crabapple cultivars (*Malus* Mill. species). *Sci Horti* **235**, 460-467. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.051>

Hulina N (2011) Više biljke stablašice. Sistematika i gospodarsko značenje. Golden Marketing-Tehnička knjiga. Zagreb.

Iacopini P, Camangi F, Stefani A, Sebastiani L (2010) Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of *Malus domestica* Borkh. in a peroxy-nitrite-induced oxidative process. *J Food Compost Anal* **23**, 518-524. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.05.004>

Idžojić M (2013) Dendrologija – cvijet, češer, plod, sjeme. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet. Zagreb.

- Idžojić M (2009) Dendrologija – list. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet. Zagreb.
- Jakobek L i Barron RA (2016) Ancient apple varieties from Croatia as a source of bioactive polyphenolic compounds. *J Food Compost Anal* **45**, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.007>
- Kaur C i Kapoor HC (2001) Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *Int J Food Sci* **36**, 703–725. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.00513.x>
- Li N, Shi J, Wang K (2014) Profile and antioxidant activity of phenolic extracts from crab apples (*Malus Wild Species*). *J Agric Food Chem* **62**, 574–581. <https://doi.org/10.1021/jf404542d>
- Ljubojević S, Vučić G, Vasilišin L, Lakić-Karalić N, Velimir A, Samelak I (2019) Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of crabapples. *Maso International* **01**, 51-56. http://www.maso-international.cz/download/51_56_012019.pdf.
- Mihailović NR, Mihailović VB, Kreft S, Ćirić AR, Joksović LjG, Đurđević PT (2018) Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). *J Food Compost Anal* **67**, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.11.007>
- Mustafa B, Nebija D, Hajdari A (2018) Evaluation of essential oil composition, total phenolics, total flavonoids and antioxidant activity of *Malus sylvestris* (L.) Mill. fruits. *Research* **23**, 71-85.
- Petrokas R i Stanys V (2008) Leaf peroxidase isozyme polymorphism of wild apple. *Agron. Res.* **6**, 531-541.
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agr Food Chem* **53**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Radenkovs V, Pūssa T, Juhnevica-Radenkova K, Kvišis J, Salar FJ, Moreno DA, Drudze I (2020) Wild apple (*Malus* spp.) by-products as a source of phenolic compounds and vitamin C for food applications. *Food Biosci* **38**, 100744. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100744>
- Reim S, Proft A, Heinz S, Höfer M (2012) Diversity of the European indigenous wild apple *Malus sylvestris* (L.) Mill. in the East Ore Mountains (Osterzgebirge), Germany: I. Morphological characterization. *Genet Resour Crop Evol* **59**, 1101–1114. DOI: 10.1007/s10722-011-9746-x

Schnitzler A, Arnold C, Comille A, Bachmann O, Schnitzler C (2014) Wild European Apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) Population Dynamics: Insight from Genetics and Ecology in the Rhine Valley. Priorities for a Future Conservation Programme. *PLoS One* **9**, e96596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096596>

Stephan RB, Wagner I, Kleinschmit J (2003) Euforgen Technical Guidelines for genetic conservation and use for wild apple and pear (*Malus sylvestris* and *Pyrus pyraeaster*). <https://www.euforgen.org/publications/publication/imalus-sylvestrisi-and-ipyrus-pyraeasteri-technical-guidelines-for-genetic-conservation-an/>. Pristupljeno 13.9.2022.

Stoenescu AM i Cosmulescu SN (2022) Some morphological characteristics of fruits and leaves of *Malus sylvestris* (L.) Mill. genotypes from southern Oltenia. *Pak J Bot* **54**, 491-496. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2022-2\(44\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2022-2(44))

Stojiljković D, Arsić I, Tadić V (2016) Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. *Ind Crops Prod* **80**, 165–176. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.11.023

Šebek G (2013) Morphological characteristics of fruits of selected types of wild apples (*Malus silvestris* L.) in the area of Bijelo Polje. *Poljoprivreda i šumarstvo* **59**, 167-173.

Tardío J, Arnal A, Lázaro A (2020) Ethnobotany of the crab apple tree (*Malus sylvestris* L. Mill., Rosaceae) in Spain. *Genet Resour Crop Evol* **68**, 795-808.

Worrell R, Ruhsam M, Renny J, Jessop W, Findlay G (2019) The Ecology and Genetics of Scotland's Native Wild Apple: *Malus sylvestris*. *Scottish forestry* **73**, 33-41.

Yu C, Wang M, Liu F, Wang M (2021) Nutrient compositions and functional constituents of 12 crabapple cultivars (*Malus* Mill. species): Aptitudes for fresh consumption and processing. *J Food Process Preserv* **45**, e15341. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15341>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Dora Šenjug, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Dora Šenjug, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis