

Analyse rapport ORAC Europe BV

*Paraaf
onderzoeker*

Naam opdrachtgever:

Hak Agrofeed
t.a.v. Dhr. B. Hak
Leemansstraat 2
4251 LD Werkendam

Aantal aangeleverde
monsters:

63 monsters

EW

Aankomstdatum monster(s):

Donderdag, 11 juni 2009

EW

Toestand van monster
bij aanlevering:

OK: *beschadigd:* *anders:* (zie opmerkingen)

Monster-opslag:

Monsters werden direct na aankomst in
het donker en bij 4°C opgeslagen.

EW

Opmerkingen:

Monsters werden aangeleverd als
individueel verpakte komkommers.
Kommommers waren verdeeld over 3
gelabelde groepen.

EW

**Monster informatie
verstrekt door
opdrachtgever:**

De aangeleverde komkommers waren verdeeld in drie groepen: een controle groep (n=21), een met *Immutines* behandelde groep (3 mL/m²/week, blauw label, n=21) en een met *Immutines* behandelde groep (4 mL/m²/week, rood label, n=21). De controle groep bestond uit onbehandelde komkommers.

Controle komkommers werden genummerd C-1 t/m C-21. *Immutines*-behandelde komkommers (blauw, 3 mL/m²) werden genummerd B-1 t/m B-21 en *Immutines*-behandelde komkommers (rood, 4 mL/m²) werden genummerd R-1 t/m R-21.

Alle komkommers werden gekweekt in de kwekerij van A.W. Vahl te IJsselmuiden. Kweekomstandigheden zijn vergelijkbaar met die zoals vermeld in de bijlage van het ORAC Europe rapport van 23 september 2008.

**ORAC Europe
monster voorbereiding:**

Er werden 3 groepen van 21 komkommers aangeleverd (zie hierboven).

Alle komkommers werden vooraf individueel gewogen (zie bijlage 1, pagina 8).

Elke groep van 21 komkommers (controle, blauw en rood) werd onderverdeeld in 3 groepen van 7 komkommers. Deze groepen werden gelabeld C1, C2, C3 (voor de controle groep), B1, B2, B3 (voor de 3 mL/m²/week, blauw) en R1, R2, R3 (voor de 4 mL/m²/week, rood).

Van elke individuele komkommer uit deze groepen van 7 werd precies uit het midden van elke komkommer een stuk gesneden van exact 100 gram.

Deze 7 stukken komkommer werden per groep samengevoegd en gebruikmakend van een speciale laboratorium maler werden deze stukken grondig vermalen.

Dit levert dus per groep een homogenaat van 7x 100 gram komkommer op.

In totaal zijn zo dus 9 groepen gevormd (3 groepen binnen de controle groep, 3 groepen binnen de blauwe groep en 3 groepen binnen de rode groep).

Vervolg op pagina 3

**ORAC Europe
monster voorbereiding:**

vervolg van pagina 2:

De verkregen homogenaten werden grondig gemengd. Van elk homogenaat werd 5 gram afgewogen in een glazen reageerbuis. Om de hydrofiele inhoudstoffen uit deze homogenaten te extraheren werd aan elke buis 20 mL van een mengsel van aceton, water en azijnzuur (140:59:1, v/v) toegevoegd. Dit mengsel (afgekort als AWA) wordt standaard gebruikt om hydrofiele inhoudsstoffen uit ondermeer voedselmonsters te extraheren.

Na toevoegen van 20 mL AWA werden de afgesloten reageerbuisen 15 minuten lang in een ultrasoon bad geplaatst. Hierna werden alle buizen gedurende 1 minuut grondig gemengd op een zgn. vortex, waarna de buizen opnieuw voor 15 minuten in een ultrasoon bad werden geplaatst.

Na nog een laatste keer goed mengen, werden de buizen in een centrifuge gedurende 15 minuten afgedraaid (800 x g).

De supernatanten van elke buis werden zorgvuldig afgepipetteerd en in bruin-glazen flesjes opgeslagen in het donker bij 4°C, tot het moment van testen in de hydrofiele ORAC test.

Drooggewicht bepaling:

Aan 3 vooraf exact ingewogen glazen rondbodem kolven van 500 mL, werd van de homogenaten van elke groep komkommers (C:controle, B:3 mL/m²/week en R: 4 mL/m²/week) een exact afgewogen hoeveelheid homogenaat toegevoegd.

Vervolgens werd het exacte gewicht van elke kolf met inhoud bepaald.

De afgewogen hoeveelheid homogenaat in de kolven werd vooraf bevroren door de kolven in een bad van vloeibare stikstof te roteren. Daarna werden de kolven aan een vriesdroogapparaat gehangen, waar de monsters gedurende 36 uur gevriesdroogd werden. Na afloop werden de kolven met inhoud opnieuw exact ingewogen en met behulp van de vooraf bepaalde gewichten kon het drooggewicht van elk monster bepaald worden (zie pag. 7).

Datum monster voorbereiding:

Maandag 15 juni 2009

EW

Gewenste test:

- Hydrofiele ORAC assay
- Drooggewicht bepaling

EW

Test datum:

Dinsdag 16 & woensdag 17 juni 2009

EW

Verantwoordelijke
onderzoeker:

Dr. E. van den Worm



EW

Datum eindrapportage:

Vrijdag, 03 juli 2009

EW

Opmerkingen:

- geen opmerkingen -

EW

Korte beschrijving van de uitgevoerde test(en):

De door Hak Agrofeed aangeleverde monsters werden getest op hun antioxidant capaciteit in de hydrofiele ORAC test (**Oxygen Radical Absorbance Capacity**). Bij deze gestandaardiseerde en gevalideerde test wordt gebruik gemaakt van fluoresceïn als een fluorescente probe en van AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride) als een fysiologisch relevante bron van peroxy radicalen. Het fluorescentie profiel werd in de tijd gevolgd met behulp van een geautomatiseerde fluorescentie reader (*Thermo Fluoroskan Ascent*). Fluorescentie werd gedurende een uur elke minuut gemeten en de gehele meting vond plaats bij 37°C. Bij de metingen werd gebruik gemaakt van een excitatie golflengte van 485 nm en een emissie golflengte van 538 nm.

In de ORAC test wordt Trolox (een wateroplosbare vorm van vitamine E) gebruikt als een interne standaard. Daarom worden resultaten van de ORAC test (de gevonden ORAC waarden) uitgedrukt in μmol Trolox equivalenten (TE) **per 100 g van het testmonster**. Dit is een standaard manier van het uitdrukken van ORAC waarden.

Direct voorafgaand aan de meting werden alle monsters opgelost en doorverdund in vers geprepareerde natriumfosfaat buffer (75mM, pH = 7.4).

Direct voorafgaand aan de ORAC meting werden alle gebruikte reagentia vers bereid. De AAPH oplossing werd in het donker en op ijs bewaard tot gebruik in de ORAC test. Alle andere te gebruiken oplossingen werden in het donker bij 37°C bewaard.

De uiteindelijke ORAC waarden werden berekend uit de verkregen experimentele data door gebruik te maken van de zgn. 'area under the curve' (AUC) methode. De netto AUC werd berekend door de AUC van de blanco af te trekken van de AUC van het geteste monster. De uiteindelijke ORAC waarde (uitgedrukt in Trolox equivalenten) werd berekend door extrapolatie van de verkregen Trolox calibratie curve ($\text{AUC}_{\text{Trolox}}$ vs. $[\text{Trolox}]$).

ORAC waarden werden uitgedrukt als gemiddelde waarde (gem.) \pm standaard deviatie (S.D.).

Opmerkingen:

Bij alle verdunningsstappen en voor het uiteindelijke uitpipetteren in de meetplaat, werden alle monsteroplossingen grondig gemengd door alle reageerbuizen op een vortex te plaatsen.

TEST RESULTATEN (I):

Monsters	ORAC waarde ($\mu\text{mol TE} / 100 \text{ g.}$)*	
Controle komkommers (C)	90.0 \pm 1.0 (gem. \pm S.D.)	(n = 4)
<i>Immutines</i> -behandelde komkommers (3 mL/m ² /week, B)	123.3 \pm 15.8 (gem. \pm S.D.)	(n = 4)
<i>Immutines</i> -behandelde komkommers (4 mL/m ² /week, R)	116.7 \pm 8.66 (gem. \pm S.D.)	(n = 4)

* Zoals eerder vermeld, zijn alle ORAC waarden uitgedrukt in $\mu\text{mol TE}$ per 100 g monster. Indien gewenst kunnen deze ORAC waarden eventueel doorgerekend worden tot $\mu\text{mol TE}$ per komkommer of $\mu\text{mol TE}$ per standaard portie.

NB: 1 $\mu\text{mol Trolox Equivalenten (TE)}$ komt overeen met 250 $\mu\text{g Trolox}$

	Antioxidant capaciteit (% van controle)	Toename in antioxidant capaciteit (relatief t.o.v controle)
Controle komkommers (C)	100	-
<i>Immutines</i> -behandelde komkommers (3 mL/m ² /week, B)	137 \pm 17.6	37.0 %
<i>Immutines</i> -behandelde komkommers (4 mL/m ² /week, R)	129.7 \pm 9.6	29.7 %

TEST RESULTATEN (II):

Drooggewicht bepaling:

Komkommers:	Lege kolf	Kolf + homogenaat (voor vriesdrogen)	Kolf + homogenaat (na vriesdrogen)	Percentage drooggewicht
Controle	158.06 g.	267.42 g.	162.51 g.	4.07% (100%)
Blauw (3 mL/m²/ week, B)	163.54 g.	269.39 g.	168.03 g.	4.24% (+ 4.2%)
Rood (4 mL/m²/ week, R)	155.62 g.	265.66 g.	160.42 g.	4.36% (+7.1%)

Eindverantwoordelijke:

Dr. E. van den Worm
(CEO, ORAC Europe BV)

(e-mail: E.vandenworm@uu.nl)



-
- **ORAC Europe BV** • PO BOX 80082 • 3508 TB Utrecht • The Netherlands •
 - Rabobank: 12 77 66 456, Utrecht • IBAN: NL41RABO 0127 7664 56 •
 - BIC: RABONL2u • KvK 30222065 • VAT nr. NL8174.77.615.B01 •
 - Tel: 00 31(0)302535933 • Fax:00 31(0) 302536941 •
 - e-mail: info@orac-europe.com •
 - www.orac-europe.com •

Bijlage 1: gewichten van de individuele komkommers per groep (in gram):

Controle groep (n=21)

C1 (n=7): 367.95; 369.53; 429.11; 447.51; 394.08; 467.07; 396.31
Gemiddelde gewicht: 410.22 gram

C2 (n=7): 451.65; 320.72; 362.69; 437.18; 363.45; 449.18; 409.36
Gemiddelde gewicht: 399.18 gram

C3 (n=7): 383.34; 340.26; 319.05; 478.27; 337.69; 320.22; 366.26
Gemiddelde gewicht: 363.58 gram

Immutines behandelde groep (3 mL/m²/week, blauw) (n=21)

B1 (n=7): 300.21; 431.18; 433.50; 359.12; 390.75; 296.02; 421.78
Gemiddelde gewicht: 376.08 gram

B2 (n=7): 412.92; 384.11; 366.53; 333.28; 329.31; 412.13; 453.59
Gemiddelde gewicht: 384.54 gram

B3 (n=7): 466.26; 415.46; 389.46; 338.01; 344.12; 419.12; 424.18
Gemiddelde gewicht: 399.52 gram

Immutines behandelde groep (4 mL/m²/week, rood) (n=21)

R1 (n=7): 482.83; 389.68; 476.49; 407.34; 321.40; 468.17; 447.24
Gemiddelde gewicht: 427.59 gram

R2 (n=7): 474.91; 520.91; 485.62; 525.33; 392.43; 497.13; 551.91
Gemiddelde gewicht: 492.61 gram

R3 (n=7): 438.54; 351.02; 417.64; 407.88; 385.92; 466.60; 483.36
Gemiddelde gewicht: 421.57 gram