

Utjecaj načina ekstrakcije na prinos bioaktivnih spojeva iz praha aronije (*Aronia melanocarpa* L.)

Bilić, Daniela Patricia

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:385253>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA PRINOS
BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ PRAHA ARONIJE
(*Aronia melanocarpa*)**

DIPLOMSKI RAD

Daniela Patricia Bilić

Zagreb, srpanj, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Hortikultura-Voćarstvo

**UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA PRINOS
BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ PRAHA ARONIJE
(*Aronia melanocarpa* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Daniela Patricia Bilić

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sandra Voća

Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur

Zagreb, srpanj, 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Daniela Patricia Bilić**, JMBAG 0178079628, rođena dana 12.10.1990. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA PRINOS BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ
PRAHA ARONIJE (*Aronia melanocarpa* L.)**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice **Daniele Patricije Bilić**, JMBAG 0178079628, naslova

**UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA PRINOS BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ
PRAHA ARONIJE (*Aronia melanocarpa* L.)**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|--|---------------------|-------|
| 1. | izv. prof. dr. sc. Sandra Voća | mentor | _____ |
| | doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur | neposredni voditelj | _____ |
| 2. | prof. dr. sc. Nadica Dobričević | član | _____ |
| 3. | izv. prof. dr.sc. Martina Skendrović-Babojelić | član | _____ |

Zahvala

Ovime zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Sandri Voća na smjernicama i pomoći prilikom izrade ovog rada. Veliko hvala na susretljivosti, ustupljenom prostoru, materijalima i korisnim savjetima prilikom izvođenja analiza i pisanju samog rada svim djelatnicima laboratorija Zavoda za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj rada	3
2. Pregled literature.....	4
2.1. Sistematika i morfološke karakteristike aronije	4
2.1.1. Listovi.....	4
2.1.2. Cvjetovi	4
2.1.3. Plodovi	5
2.1.4. Korijenov sustav	5
2.1.5. Razmnožavanje	5
2.2. Ekološki uvjeti.....	6
2.2.1. Klima.....	6
2.2.2. Tlo	6
2.2.3. Reljef	6
2.3. Sadnja	7
2.4. Berba.....	7
2.4.1. Štetnici.....	8
2.5. Skladištenje.....	8
2.6. Prerada	8
2.7. Bioaktivni spojevi.....	9
2.8. Ekstrakcija	9
3. Materijal i metode	11
3.1. Biljni materijal.....	11
3.2. Priprema praha od aronije.....	11
3.3. Priprema uzoraka za klasičnu ekstrakciju	11
3.4. Priprema uzorka za ultrazvučnu ekstrakciju.....	13
3.5. Metode rada	14
3.5.1. Određivanje gustoće otopine	14
3.5.2. Određivanje topljive suhe tvari (TST) vodenih ekstrakata praha aronije	14
3.5.3. Određivanje ukupne kiselosti	14
3.5.4. Određivanje pH-vrijednosti.....	15
3.5.5. Određivanje vitamina C	16
3.5.6. Određivanje ukupnih fenola	17
3.5.7. Određivanje flavonoida	18
3.5.8. Određivanje sadržaja antocijana.....	18
3.5.9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	19
3.6. Statistička obrada podataka	21
4. Rezultati i rasprava	22
4.1. Osnovni kemijski sastav	22
4.2. Bioaktivne komponente	24
4.2.1. Sadržaj vitamina C	25
4.2.2. Sadržaj ukupnih fenola.....	26
4.2.3. Sadržaj ukupnih antocijana	27

4.2.4. Antioksidacijski kapacitet	29
5. Zaključci.....	30
6. Popis literature	31
7. Prilog	37
Životopis	37

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Daniele Patricije Bilić**, naslova UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA PRINOS BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ PRAHA ARONIJE (*Aronia melanocarpa* L.)

UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA PRINOS BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ PRAHA ARONIJE (*Aronia melanocarpa* L.)

Aronija je svoju veliku popularnost stekla zbog izrazito bogatog nutritivnog sadržaja. Pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje posljedica je snažne antioksidacijske aktivnosti polifenolnih spojeva. Proizvodnja sokova i ostalih prerađevina od aronije nalaze široku primjenu u prehrambenoj industriji. Prah aronije bogat je izvor bioaktivnih spojeva te kao dodatak različitim proizvodima povećava njihov antioksidacijski kapacitet. Cilj istraživanja bio je utvrditi razlike između načina ekstrakcije, klasična i ultrazvukom, praha aronije u destiliranoj vodi te mogućnosti upotrebe ultrazvuka visokog intenziteta u ekstrakciji praha aronije. Utvrđeno je kako su vodeni ekstrakti praha aronije imali veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta neovisno o načinu ekstrakcije. Uzorci s dodanim prahom aronije tretirani ultrazvukom visokog intenziteta imali su značajno veći sadržaj svih analiziranih bioaktivnih komponenti. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta značajno je smanjila vrijeme potrebno za ekstrakciju biljnog materijala. Utvrđena je pozitivna povezanost između sadržaja vitamina C, ukupnih fenola i flavonoida te ukupnih antocijana i antioksidacijskog kapaciteta kod uzoraka tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta.

Ključne riječi: prah aronije, antioksidacijski kapacitet, ultrazvuk visokog intenziteta, klasična ekstrakcija, nutritivni sastav

Summary

Of the master's thesis - student **Daniela Patricia Bilić**, entitled IMPACTS OF EXTRACTION ON THE PRESS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THE ARONIUM POWDER (*Aronia melanocarpa* L.)

IMPACTS OF EXTRACTION ON THE PRESS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THE ARONIUM POWDER (*Aronia melanocarpa* L.)

Aronia gained its great popularity because of extremely rich nutritional content. The positive impact on human health is a result of the strong antioxidant activity of polyphenolic compounds. Production of juices and other products from chokeberry are widely used in the food industry. Chokeberry powder is a rich source of bioactive compounds and its addition to a variety of products increases their antioxidant capacity. Also, the aim of the research was to determine the differences between the extraction techniques, classical and ultrasound, of chokeberry powder in distilled water. To determine the possibility of using high intensity ultrasound in extraction of chokeberry powder. The water extracts of chokeberry powder had higher antioxidant capacity irrespective of the extraction technique. The samples with added chokeberry powder treated with high intensity ultrasound had significantly higher content of all analyzed bioactive compounds. The application of high intensity ultrasound significantly reduced extraction time of the plant material. The positive correlation between vitamin C content, total phenols and flavonoids content, anthocyanins content and antioxidant capacity was determined in samples with added chokeberry powder treated with high intensity ultrasound.

Key words: chokeberry powder, antioxidant capacity, high intensity ultrasound, classic extraction, nutritional composition

1. Uvod

Listopadni grm crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa* L.) spada u porodicu ruža (Rosaceae), podrijetlom je s istoka Sjeverne Amerike te istoka Kanade, a danas se uzgaja i u istočnoj Europi (Jeppsson, 2000; Benvenuti i sur., 2004; Kulling i Rawel, 2008). Aronija je svoju veliku popularnost stekla prvenstveno zbog izrazito bogatog nutritivnog sadržaja i često nosi naziv „super voće“. Svježi plodovi aronije (Slika 1) bogatog su nutritivnog sadržaja te pokazuju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Pojam „super voće“ upotrebljava se za voćne vrste koje su karakteristične po vrlo značajnom sadržaju biološki aktivnih komponenti izražene antioksidacijske aktivnosti (Huang i sur., 2012). Prema ORAC skali (engl. Oxygen Radical Scavenging Capacity) crnoplodna aronija posjeduje najvišu vrijednost antioksidacijske aktivnosti među jagodastim i drugim voćnim vrstama (Kulling i Rawel, 2008; Ciocoiu i sur., 2013; Horszwald i sur., 2013).



Slika 1. Plodovi crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa* L.)
(Fotografija: Daniela Patricia Bilić, 2016)

Od bioaktivnih komponenti aronija posjeduje visoki sadržaj flavonoida (Slimestad i sur., 2005) i to najviše antocijana (Kulling i Rawel, 2008) i proantocijanida (Oszmiański i Wojdyło, 2005), fenolnih kiselina (Slimestad i Solheim, 2002) kao i visok sadržaj vitamina C (Benvenuti i sur., 2004). Navedene bioaktivne komponente, osobito polifenolni spojevi, pokazuju značajan učinak na ljudsko zdravlje prvenstveno u prevenciji razvoja karcinoma i kardiovaskularnih bolesti (Carocho i Ferreira, 2013). Takav pozitivan učinak posljedica je snažne antioksidacijske aktivnosti polifenolnih spojeva koja se očituje kroz nekoliko mehanizama: (a) uklanjanje slobodnih radikala (antioksidacijski učinak); (b) zaštita i regeneracija drugih antioksidansa (npr. vitamina E); (c) kelatna svojstva (Buyukokuroglu i sur., 2001; Garcia-Salas i sur., 2010).

Tamnocrvena boja plodova aronije posljedica je prisutnosti pigmenta antocijana, a upravo zbog karakterističnog obojenja aronija svoju primjenu pronalazi i kao prirodno bojilo. Najčešće se prerađuje u prah, sirup, žele, sok, liker, voćno vino ili u dodatak za mješavine vodenih pripravaka. Proizvodnja sokova i ostalih prerađevina od aronije ograničena je zbog njenog jedinstvenog oštrog, kiselog, trpkog okusa i mirisa nedozrelog voća koji je mnogima vrlo neugodan. Međutim, razblaživanje tog okusa moguće je miješanjem s drugim voćnim sokovima poput jabučnog soka ili ribiza (Kulling i Rawel, 2008). Trpki okus svježih plodova kao i proizvoda od aronije posljedica je prisutnosti spoja amigdalina, za koji je dokazano pozitivno djelovanje na zaustavljanje rasta zloćudnih tumorskih stanica (Oszmiański i Wojdyło, 2005; Jakobek i sur., 2007; Kulling i Rawel, 2008; Szajdek i Borowska, 2008; Šnebergrová i sur., 2014).

Nakon procesa cijedenja i odvajanja soka dobiva se pulpa koja se zatim suši i usitnjava u prah (Slika 2). Takav prah, kao dodatak, svoju primjenu pronalazi u širokom spektru različitih prehrambenih proizvoda (Tolić i sur., 2015).



Slika 2. Prah aronije
(Fotografija: Daniela Patricia Bilić, 2016)

Ekstrakcija je definirana kao postupak izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese prikladnim otapalom, a u kojem je pojedina tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka neke smjese (Gertenbach, 2001). Klasične metode ekstrakcije različitih kemijskih spojeva temelje se na pravilnom izboru otapala, najčešće alkoholne otopine i ostalih organskih otapala poput acetona i heksana, korištenju visokih temperatura i agitaciji (Vinatoru, 2001). Opisane tehnike zahtijevaju znatno duže vrijeme ekstrakcije, velike količine uzorka i organskog otapala što između ostalog značajno poskupljuje cijeli proces (Ramos i sur., 2002). Zbog navedenog, u posljednje vrijeme populariziraju se i različite neinvazivne tehnike ekstrakcije bioaktivnih spojeva čija je zajednička karakteristika smanjena upotreba štetnih organskih otapala te kraće vrijeme izdvajanja. Jedna od takvih tehnika je upotreba ultrazvuka. U procesima prehrambene tehnologije i biotehnologije koristi se ultrazvuk visokog intenziteta kojeg karakterizira upotreba zvučnih valova visokog intenziteta (obično u rasponu od 10-1000 W/cm²) i frekvencija između 18 i 100 kHz (Knorr i sur., 2004; Brnčić, 2006; Bosiljkov i sur., 2010). Glavni mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta je prijelazna kavitacija.

Kavitacija je proces formiranja mjehurića plina u tekućem mediju uslijed djelovanja ultrazvučnog polja (Suslick i sur., 2011).

1.1. Cilj rada

Cilj rada je utvrditi razlike u kemijskom sastavu i sadržaju bioaktivnih spojeva između vodenih ekstrakata u kojima je prah aronije ekstrahiran konvencionalno i ultrazvukom visokog intenziteta.

2. Pregled literature

2.1. Sistematika i morfološke karakteristike aronije

Poznate su tri vrste aronije, crnoplodna (*Aronia melanocarpa*), crvenoplodna (*Aronia arbutifolia*) i ljubičastoplodna aronije (*Aronia prunifolia*) (Melkić, 2014).

Listopadni grm aronije (Tablica 1) podrijetlom je s istoka Sjeverne Amerike i Kanade, a danas se uzgaja i u istočnoj Europi (Jeppsson, 2000; Benvenuti i sur., 2004; Kulling i Rawel, 2008). Najčešće je visine oko 1,5 – 2 m i širine 1 – 1,5 m, a rijetko do 3 m visine i 2,5 m širine. Relativno brzo se rasprostire korijenovim izdancima i formira skupina grmova. Rezidbom se oblikuje kao manje drvo ili kao ukrasni grm bujnog rasta (Melkić, 2014).

Tablica 1. Sistematika aronije

CARSTVO	<i>Plantae</i>
GRANA	<i>Eudicotyledonae</i>
RED	<i>Rosales</i>
PORODICA	<i>Rosaceae</i>
POTPORODICA	<i>Maloideae</i>
ROD	<i>Aronia</i>
VRSTA	<i>Aronia melanocarpa</i>

2.1.1. Listovi

Listovi aronije su eliptični ili duguljasti do duguljasto-izduženi, zaoštrenih ili zaobljenih vrhova, dugi 2,5 – 7 cm, više-manje glatki. Rubovi listova su lagano nazubljeni, jednostavni, naizmjenični s peteljkaama dužine 0,60 cm ili manje. Listovi izbijaju u travnju, sjajne svijetlozelene su boje. U jesen su dekorativne grimizne do vinsko-crvene i boje marelice (Melkić, 2014).

2.1.2. Cvjetovi

Jedna od glavnih prepoznatljivosti aronije su bijeli cvjetovi koji su skupljeni u grozdove. Prvi cvjetovi pojavljuju se u trećoj godini. Cvjetovi su mali, približno 12 mm, a sastoje se od pet latica i pet lapova. Grozdovi se najčešće sastoje od 10 do 30 cvjetova na vrhovima mladica. U klimatskim područjima kontinentalne Hrvatske cvate krajem travnja, a cvatnja traje desetak dana. Cvjetove uglavnom oprašuju pčele, ali je moguće i oprašivanje vjetrom. Aronija spada u samooplodne voćne vrste (Melkić, 2014).

2.1.3. Plodovi

Plodovi aronije su okrugli, ljubičasto-crveni do plavičasto-crne boje. Plodovi su u početku prekriveni bjelkastom ovojnicom koja nakon nekog vremena otpadne. U vrijeme kada su sjajno crvene boje plodovi su još nezreli, u kolovozu kada dozriju, postaju ljubičasto-crni. Aronija svoje prve plodove daje u trećoj godini. Mezokarp plodova je izrazito crvene boje. U plodu se nalazi nekoliko sitnih sjemenki, čija apsolutna masa (masa 1000 zrna) iznosi 3 g. Promjer jednog ploda iznosi 6 – 15 mm, a težina 1,0 – 1,5 g. Okus ploda je opor, pomalo kiselo slatkast, najbliže okusu crnog čaja ili crvenog vina, zbog čega se uglavnom plodovi konzumiraju prerađeni, a radi trpkog okusa ploda nosi ime „The Chokeberry“ što znači opora, trpka bobica (Melkić, 2014).

2.1.4. Korijenov sustav

Nadzemni dio aronije dobre je bujnosti. Poznato je da biljka stara 13 godina razvija korijenov sustav u prosjeku od 2 m te od 160 cm dubine. Prema tome, žile tanje od 1 mm u promjeru čine 91 – 95 %, od 1 – 3 mm, 4 – 3 % i svega 1 – 2 % debljih od 3 mm (Melkić, 2014).

2.1.5. Razmnožavanje

Moguće ju je razmnožiti na više načina, najčešće je to vegetativnim putem, no može se vršiti i generativno. Prilikom vegetativnog razmnožavanja nastaju biljke jednake matičnoj biljci, klonovi, dok prilikom generativnog razmnožavanja nastaju biljke koje nisu jednake matičnoj biljci, odnosno dolazi do odstupanja u sličnosti matične i nastale biljke koji nisu klonovi. Vegetativno razmnožavanje može biti putem reznica dijeljenjem (korijenovim izdancima, mladicama), cijepljenjem, povaljenicama i kloniranjem iz meristema u kulturi (Melkić, 2014).

2.2. Ekološki uvjeti

2.2.1. Klima

Nasadu aronije odgovara klima više vlažnosti zraka s optimalnim godišnjim količinama oborina od 500 – 600 mm. Oštećenja nastala zbog hladnoće i isušivanja povezane su jednim dijelom s razvojem zimskog kaljenja i razdoblja mirovanja što omogućuje drvenim biljkama da prežive zimu. Od velike važnosti je korištenje vjetrobrana u smanjenju učinka jakih, trajnih vjetrova koji uzrokuju isušivanje, guljenje i pucanje grana. Vjetar ima velik utjecaj na transpiraciju, odnosi vodenu paru s površine lista i stanjuje granični sloj između lista i okolnog zraka čime se povećava transpiracija, međutim, može i smanjiti transpiraciju ako je zrak izrazito vlažan. Ozljede kore događaju se ljeti i zimi. Ljeti izložena Suncu, kora može izgubiti boju i nabubriti, stvarajući rak-rane, a zimi u izložena Suncu može postati toplija nego zrak dok nakon zalaska Sunca dolazi do naglog zahlađenja što uzrokuje pucanje i mogući razvoj bolesti. Prevencija je izbor blage sjeveroistočne padine za podizanje nasada koja će pomoći u smanjenju ozljeda kore nakon niskih zimskih temperatura te prskanje s razrijeđenom bijelom lateks bojom. Mraz gotovo uopće ne može naškoditi stabljici i cvatu aronije. Cvijet je otporan na niske proljetne temperature, a proljetni mraz joj ne šteti zbog njezine kasnije cvatnje. Otpornost tkiva aroniji omogućuje da podnese temperature i do -47 °C. Ozbiljna oštećenja od smrzavanja mogu se očekivati tek pri temperaturama od -23 °C početkom zime i na -30 °C sredinom zime. Grmovi aronije se obično oporavljaju, a već sljedeće godine daju plod. Kritična temperaturna granica tla iznosi -11 °C (Melkić, 2014).

2.2.2. Tlo

Aronija najbolje uspijeva na plodnoj, vlažnoj i dobro dreniranoj zemlji. Također, uspijeva na slaboj i suhoj zemlji, pa čak i na pješćanim dinama. Prilagodljiva je svakom tlu, osim ako je previše kamenito ili plitko. Treba izbjegavati zemlju s dosta gline bez humusa i ekstremno suha pješćana te zbijena vlažna tla. Dobro uspijeva i na tlima s visokom razinom podzemne vode, gdje druge vrste voća ne uspijevaju. Idealno tlo za uzgoj aronije trebalo bi imati podjednako gline, pijeska i mulja s dosta humusa (2 – 3 % minimalno). Optimalan raspon pH iznosi 5,5 – 6,5 (Melkić, 2014).

2.2.3. Reljef

Pogodan je osunčan teren s blagim nagibom 1 – 2 % kako bi se omogućilo odvođenje vode i hladnog zraka što je posebno važno za vrijeme mraza. Ekspozicija terena ne bi trebala biti okrenuta prema jugu tako da se zemlja sporije grije na proljeće i na taj način odgodi cvjetanje, a teren okrenut na sjever ili istok sprječavaju oštećenja kore uslijed smrzavanja zimi kada je velika razlika između dnevne i noćne temperature. Može rasti u širokom pojasu nadmorskih visina, a odgovaraju joj više nadmorske visine, pri čemu treba naglasiti da se za

svakih 100 m povećanja nadmorske visine berba odgađa za 3 – 5 dana. Aronija ima srednju do malu toleranciju na slanost tla pa se može posaditi i u blizini morske obale, uz prometnice i sl. Dobro je znati da aronija ne usvaja štetne sastojke iz tla, vode i zraka te se može proizvoditi i u blizini industrijskih zagađivača i termoelektrana (Melkić, 2014).

2.3. Sadnja

Osnovni uvjet je odabir pogodnog mjesta za sadnju što ovisi o plodoredu, predkulturi, klimi, reljefu, tipu tla, drenaži, nagibu, zaštiti od vjetrova, dostupnosti vode. Vrijeme sadnje ovisi o tipu sadnica koje će se koristiti. Pri korištenju sadnica s grudom supstrata koje su bile uzgajane na tlu ili sadnice kategorije zrelih izdanaka golih žila, prešanih ili baliranih sadnica odvija se u jesen, tijekom zime i u rano proljeće. Uz uvjet da zemlja nije smrznula i da je vegetacija završila, odnosno da još nije počela. Kontejnerske sadnice mogu se saditi u bilo koje doba godine jer imaju kompaktan sustav korijena i supstrata te njihovom presađnjom se ne oštećuje korijenov sustav. Ljeto nije preporučljivo za sadnju bilo kojeg bilja zbog visokih temperatura i velikih suša. Sadnice uzgajane u plasteniku zahtijevaju kaljenje prije jesenske ili zimske sadnje na otvorenom. Prije podizanja nasada važno je obaviti osnovnu obradu i gnojidbu tla mineralnim ili organskim gnojivima, te ukloniti trajne korovne vrste. Treba točno odrediti razmak sadnje ovisno o ručnom ili strojnom načinu obrade i berbe kako bi se izvukao maksimum od plantaže (Melkić, 2014).

2.4. Berba

Prilikom prvog uroda kod trogodišnjih sadnica, odnosno dvogodišnjih sadnica dobivenih iz kulture tkiva, formiraju se po dva grozda na grmu s 35 – 40 plodova, odnosno 50 – 100 g prinosa po grmu, što iznosi oko 100 – 200 kg po hektaru. Pojedinačni plodovi imaju masu od 0,6 – 1,1 g što znači da jedan kilogram sadrži 1000 – 1600 plodova. Kad aronija dolazi u punu rodnost, nakon sedme godine i kasnije, može se očekivati prinos od 5 – 10 kg po grmu, što iznosi 11 – 22 tone po hektaru. Sredinom srpnja plodovi mijenjaju boju iz crvene u tamnoljubičastu i dozrijevaju u vremenu od početka do sredine kolovoza. Optimalno vrijeme berbe ovisi o nadmorskoj visini. Uglavnom se kreće od kraja srpnja do početka rujna, odnosno, svakih 100 m nadmorske visine odgađa sljedeću berbu za tri dana. Vrijeme berbe određuje se mjerenjem topljive suhe tvari u plodu pomoću refraktometra. Zanimljivo je naglasiti kako se s berbom ne može zakasniti jer zreli plodovi crnoplodne aronije ostaju na voćki, ne otpadaju i ne kvare se. Iz tog razloga branje možemo produžiti i na dva mjeseca od sazrijevanja. Biljka gubitke vode nadoknađuje opskrbljujući plod svježom hranom sve dok je fotosinteza moguća. Također, stajanjem plodovi dobivaju na kvaliteti, slađi su te manje opori.

Berba može biti ručna i strojna. Kod ručnog branja plodovi se otkidaju palcem. Može se odvijati i pomoću vibratora male snage i mreže za skupljanje. Dok su prinosi po grmu mali, ovisno o veličini plantaže i broju sadnica, ekonomičnija je ručna berba, dok je na većim plantažama uobičajena strojna berba. Poželjno je berbu obavljati u ranijim jutarnjim satima dok su vanjske temperature niske kako bi se na taj način očuvala i temperatura i kvaliteta

samih plodova. Nakon berbe plodove je potrebno što prije transportirati i što je moguće prije prerađivati te skladištiti. Zbog svoje velike čvrstoće mogu izdržati dugotrajnije Transporte bez značajnih gubitaka (Melkić, 2014).

2.4.1. Štetnici

Osim štetnika koji su navedeni u daljnjem tekstu, velike štete uzrokuju ptice i neke vrste malih sisavaca koji jedu plodove. Šteta nastala za vrijeme cvjetanja i zametanja plodova dovodi do smanjenja mogućeg prinosa zbog gubljenja cvijeta i ploda, a u vremenu razvoja voća može uzrokovati gubitak mladog voća. Potrebno je provoditi dobre higijenske mjere u voćnjaku i održavati voćnjak urednim što uključujući uklanjanje otpalog voća i lišća. Neki od nametnika koji čine najveću štetu u nasadu aronije su: dlakavi ružičar (*Epicometis hirta* Poda), trešnjina osa (*Caliroa limacina*), lisne uši (*Aphididea*), jabučni moljac (*Hyponomeuta malinellus*), moljac mali mrazovac (*Operophtera brumata*) (Melkić, 2014).

2.5. Skladištenje

Zreli plodovi mogu se održati dva tjedna kod običnog uskladištenja od 15 – 25 °C i 80 % relativne vlažnosti zraka. Svježe ubrano voće važno je brzo ohladiti i uskladištiti nakon berbe ako se odmah ne prerađuju. Hlađenje usporava kemijske promjene koje dovode do prezrelosti i propadanja, čime se smanjuje aktivnost mikroorganizama koji uzrokuju truljenje voća i smanjuje sušenje te produžuje vijek ploda. Plodovi se nakon odmrzavanja gotovo ne razlikuju od svježih po boji ili tvrdoći. Hladnjača je često neophodna (Melkić, 2014).

2.6. Prerada

Neposredno prije početka prerade, potrebno je oprati plodove. Nakon pranja, slijedi hladno prešanje i pasterizacija koja se provodi na temperaturi približnoj 90 °C. Također je moguće primijeniti dodatne postupke sumporenja. Plodovi aronije najčešće se prerađuju u prah, sirup, žele, sok, liker, voćno vino ili kao dodatak za mješavine vodenih pripravaka. Proizvodnja sokova i ostalih prerađevina ograničena je zbog njenog jedinstvenog oštrog, kiselog, trpkog okusa i mirisa nedozrelog voća koji je mnogima vrlo neugodan. Međutim, razblaživanje tog okusa moguće je miješanjem s drugim voćnim sokovima poput jabučnog soka ili ribiza (Kulling i Rawel, 2008). Jedna od mogućnosti proizvodnje soka je da se homogenizirani sok pasterizira u stroju s funkcijom kontinuiranog zagrijavanja na temperaturi od 130 °C te kasnije hladi na 90 °C i pakira u za to predviđenu ambalažu prethodno steriliziranu. Stabilnost soka može se postići dodavanjem pektina (Dauthy, 1995). Nakon procesa cijedenja i odvajanja soka preostaje pulpa koja se dalje može prerađivati ili za potrebe dobivanja praha ili ukuhavanjem u džem. Za dobivanje praha, pulpa se suši pri 60 °C, do postizanja sadržaja vode u suhom proizvodu od 10%. Suha pulpa se zatim usitnjava u prah.

Takav prah, kao dodatak, svoju primjenu pronalazi u širokom spektru različitih prehrambenih proizvoda (Tolić i sur., 2015).

2.7. Bioaktivni spojevi

Od bioaktivnih spojeva plodovi aronije posjeduju visok sadržaj flavonoida (Slimestad i sur., 2005) i to najviše antocijana (Kulling i Rawel, 2008) i proantocijanida (Oszmiański i Wojdyło, 2005), fenolnih kiselina (Slimestad i Solheim, 2002) kao i visok sadržaj vitamina C (Benvenuti i sur., 2004). Flavonoidi su najzastupljeniji polifenoli u našoj prehrani. Podijeljeni su u šest podskupina: flavonoli, flavanoli, flavoni, flavanoni, izoflavoni i antocijani (Dai i Mumper, 2010). Antocijani su grupa flavonoidnih spojeva koja cvijeću, lišću i plodovima daju karakterističnu crvenu, ljubičastu i plavu boju. U građi ploda, antocijani prevladavaju u epidermalnom i hipodermalnom sloju kože ploda, a topivi su u vodi i staničnom soku (Gould i sur., 2009). Temeljna uloga biljnih fenola jest da su izravno uključeni u prirodni obrambeni biljni mehanizam i štite biljku od različitih biotičkih i abiotičkih čimbenika stresa, ali i odgovorni za cjelokupno organoleptičko svojstvo biljne hrane, odnosno boju i aromu (Shahidi i Naczki, 2004; Wuyts i sur., 2006; Dai i Mumper, 2010; Diaz Napal i sur., 2010; Kennedy i Wightman, 2011).

Vitamin C je najvažniji u vodi topljiv vitamin s najznačajnijom funkcijom antioksidacijske aktivnosti. Antioksidacijska svojstva vitamina C očituju se u nekoliko funkcija: direktno inaktivira slobodne radikale što je važno u prevenciji karcinoma, štiti vitamin E od razgradnje, inhibira nastajanje N-nitrozo spojeva i toksičnih i kancerogenih nitrozamina (Šic Žlabur i sur., 2016).

Navedeni bioaktivni spojevi, osobito polifenolni, pokazuju značajan učinak na ljudsko zdravlje prvenstveno u prevenciji razvoja karcinoma i kardiovaskularnih bolesti (Carocho i Ferreira, 2013). Takav pozitivan učinak posljedica je snažne antioksidacijske aktivnosti polifenolnih spojeva koja se očituje kroz nekoliko mehanizama: (a) uklanjanje slobodnih radikala (antioksidacijski učinak); (b) zaštita i regeneracija drugih antioksidansa (npr. vitamina E); (c) kelatna svojstva (Šic Žlabur, 2015).

2.8. Ekstrakcija

Ekstrakcija je postupak izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese prikladnim otapalom. Razlikujemo dva tipa ekstrakcije: tekuće-tekuće i čvrsto-tekuće (Gertenbach, 2001). Kod ekstrakcije tekuće-tekuće dolazi do prijelaza tvari između dvije tekuće faze koje se ne miješaju (Grandison i Lewis, 1996). Kod ekstrakcije čvrsto-tekuće tvar se iz čvrste faze izdvaja u tekuću (Gertenbach, 2001). Jedna od najčešćih tehnika u pripremi ekstrakta iz biljnih materijala jest upotreba organskih ili neorganskih otapala (Dai i Mumper, 2010). Ekstrahiranje klasičnim putem temelji se na upotrebi adekvatnog otapala, uglavnom alkoholna otopina uz korištenje visokih temperatura i agitaciji (Vinatoru, 2001). U posljednje vrijeme uobičajena što manja upotreba alkoholnih organskih otapala i njihova zamjena s vodom zbog štetnih posljedica koje ispoljavaju na ljudsko zdravlje (Xu i sur., 2007; Bimakov i sur., 2011).

Također, u postupcima ekstrakcije biljnih materijala sve više se populariziraju neinvazivne tehnike s temeljnim ciljem očuvanja bioaktivnih spojeva. Jedna od takvih tehnika je tehnika ultrazvuka koja je našla široku primjenu u procesima prehrambene industrije i biotehnologije (Brnčić i sur., 2009). Razlikujemo ultrazvuk niskog i visokog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta odnosi se na intenzitete niže od 1 W/cm^2 pri frekvencijama većim od 2 MHz (Dujmić i sur., 2013), dok ultrazvuk visokog intenziteta podrazumijeva intenzitete više od 1 W/cm^2 i frekvencije između 18 i 100 kHz (Knorr i sur., 2004 ; Brnčić, 2006; Bosiljkov i sur., 2010). Glavni mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta je prijelazna kavitacija. Kavitacija je proces formiranja mjehurića plina u tekućem mediju uslijed djelovanja ultrazvučnog polja (Suslick i sur., 2011). Djelovanje ultrazvuka visokog intenziteta, frekvencije 20 – 100 KHz te razine snage u rasponu od 10 – 1000 W/cm^2 kroz tekući medij, veličina mjehurića snažno oscilira. Znanstvena istraživanja pokazuju da učinak ultrazvuka pri procesiranju hrane ovisi o broju mjehurića te o jačini njihove implodije. Broj mjehurića povećava se povećavanjem amplitude ultrazvučnih valova, budući da pri višim amplitudama veći dio volumena tekućeg medija podliježe kavitaciji. Intenzitet implodije mjehurića ovisi o omjeru maksimalne i početne veličine mjehurića, a taj je omjer u uskoj vezi sa snagom ultrazvuka. Da bi učinkovitost ultrazvuka u procesiranju hrane bila veća, potrebno je odabrati odgovarajuću snagu, amplitudu, odnosno frekvenciju ultrazvučnih valova, te provesti tretiranje pri odgovarajućem odnosu temperature i tlaka (Herceg, 2009).

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal

Plodovi crnoplodne aronije (*Aronia melanocarpa* L.) ubrani su u optimalnom roku berbe (krajem kolovoza) na Pokušalištu Zavoda za voćarstvo, Hrvatskog centra za poljoprivredu, hranu i selo (HCPHS), a potom transportirani u laboratorij Zavoda za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje su oprani, a oni s mehaničkim oštećenjima i vidljivim znakovima kvarenja uklonjeni.

3.2. Priprema praha od aronije

Iz svježih plodova aronije izdvojen je sok. Ostatak voćne pulpe osušen je postupkom konvekcijskog sušenja u laboratorijskom sušioniku „INKO” ST 40 (Hrvatska) pri temperaturi od 60 °C do postizanja sadržaja vode od 10 %. Osušena pulpa aronije usitnjena je u prah (veličina čestica manja od 1 mm) laboratorijskim mlinom „IKA“ MF-10 (Njemačka) te je kao takva skladištena u staklenu ambalažu u hladnom prostoru.

3.3. Priprema uzoraka za klasičnu ekstrakciju

Dizajn eksperimenta klasične ekstrakcije prikazan je u Tablici 2. U staklenu laboratorijsku čašu volumena 250 mL dodan je prethodno izvagan uzorak praha aronije (Slika 3) u količini 2,5 g ($\pm 0,0001$). Sve odvage rađene su na analitičkoj vagi „Sartorius” BP221S (Njemačka) razredne točnosti 1 i podjeljka od 0,1 mg. Na prah aronije dodano je 150 mL vode sobne temperature (prosječna temperatura 21,4 °C).

Tablica 2. Dizajn eksperimenta klasične i ultrazvučne ekstrakcije

Način ekstrakcije	Otopalo	Volumen otopala (mL)	Vrijeme	Ultrazvučna kupelj	Uzorak
Klasična	Destilirana voda	150	5 min	-	A1
Klasična	Destilirana voda	150	10 min	-	A2
Klasična	Destilirana voda	150	15 min	-	A3
Klasična	Destilirana voda	150	20 min	-	A4
Klasična	Destilirana voda	150	25 min	-	A5
Klasična	Destilirana voda	150	30 min	-	A6
Klasična	Destilirana voda	150	24 h	-	A7
UZV	Destilirana voda	150	5 min	35 kHz 140 W	B1
UZV	Destilirana voda	150	10 min	35 kHz 140 W	B2
UZV	Destilirana voda	150	15 min	35 kHz 140 W	B3
UZV	Destilirana voda	150	20 min	35 kHz 140 W	B4
UZV	Destilirana voda	150	25 min	35 kHz 140 W	B5
UZV	Destilirana voda	150	30 min	35 kHz 140 W	B6



Slika 3. Priprema vodenih uzoraka za određivanje sadržaja osnovnog kemijskog sastava
(Fotografija: Daniela Patricia Bilić, 2016)

Pripremljeni uzorci ostavljeni su na sobnoj temperaturi u trajanju od: 5 minuta (A1), 10 minuta (A2), 15 minuta (A3), 20 minuta (A4), 25 minuta (A5), 30 minuta (A6) i 24 sata (A7). Nakon svakog navedenog perioda uzorci su profiltrirani preko običnog Whatmanovog filter papira kako bi se uklonio prah aronije i time zaustavila daljnja ekstrakcija istog.

3.4. Priprema uzorka za ultrazvučnu ekstrakciju

Dizajn eksperimenta ultrazvučne ekstrakcije prikazan je u Tablici 2. Prije ultrazvučnog tretmana, prah aronije mase 2,5 g ($\pm 0,0001$) odvagani je u staklenu laboratorijsku čašu volumena 250 mL. Na odvagani prah aronije dodano je 150 mL destilirane vode sobne temperature (21,4 °C) te je odmah po dodatku vode proveden ultrazvučni tretman prilikom čega su varirani sljedeći vremenski periodi ekstrakcije praha: 5 minuta (uzorak B1), 10 minuta (uzorak B2), 15 minuta (uzorak B3), 20 minuta (uzorak B4), 25 minuta (uzorak B5) i 30 minuta (uzorak B6). Nakon svakog navedenog vremenskog perioda uzorci su profiltrirani preko običnog Whatmanovog filter papira kako bi se zaustavila daljnja ekstrakcija praha. Ultrazvučna ekstrakcija provedena je u ultrazvučnoj kupelji „Bandelin” RK 103H (Njemačka) frekvencije 35 kHz i nominalne maksimalne snage uređaja od 140 W (Slika 4). Također, tijekom svakog pojedinog ultrazvučnog tretmana infracrvenim termometrom „Uni-trend technology” UT 300C (Kina) u vremenskim intervalima od 30 sekundi mjerena je temperatura uzorka. Promjena temperature uzorka vodenih ekstrakata praha aronije ovisno o ultrazvučnom tretmanu prikazana je na Grafikonu 1.



Slika 4. Ultrazvučna kupelj „Bandelin” RK 103H
(Fotografija: Daniela Patricia Bilić, 2016)

3.5. Metode rada

Osnovni kemijski sastav istraživanih uzoraka temeljio se na određivanju sljedećih parametara: gustoće otopine, topljive suhe tvari (TST), ukupne kiselosti, pH-vrijednosti, sadržaja vitamina C, ukupnih fenola i flavonoida, ukupnih antocijana, te antioksidacijskog kapaciteta.

3.5.1. Određivanje gustoće otopine

Gustoća otopine (g/cm^3) istraživanih ekstrakata određena je digitalnim denziometrom „Mettler–Toledo” Densito 30PX (Švicarska) direktnim očitanjem s uređaja.

3.5.2. Određivanje topljive suhe tvari (TST) vodenih ekstrakata praha aronije

Sadržaj topljive suhe tvari određen je refraktometrijski izravno očitanjem s ljestvice refraktometra, a izražena je u postocima (AOAC, 1995).

Aparatura i pribor: stakleni štapić, refraktometar „Mettler–Toledo” Refracto 30PX (Švicarska).

3.5.3. Određivanje ukupne kiselosti

Metoda određivanja ukupne kiselosti temelji se na potenciometrijskoj titraciji otopinom natrijeva hidroksida. Primjenjuje se za određivanje ukupne kiselosti u voću i povrću i proizvodima od voća i povrća (AOAC, 1995).

Aparatura i pribor: graduirana pipeta, volumena 25 i 100 mL, odmjerne tikvice (volumena 250 mL), analitička vaga (Sartorius), potenciometar sa staklenom elektrodom (Mettler Toledo, Sevenmulti), bireta volumena 100 mL, filter papir

Reagensi: natrijev hidroksid, otopina c (NaOH) = 0,1 mol/L, puferna otopina poznatog pH

Priprema uzoraka: Uzorak se homogenizira i odvagane se 20 g, te se prenese u odmjernu tikvicu volumena 200 mL, tikvica se dopuni do oznake destiliranom vodom i njezin se sadržaj dobro promućka i profiltrira. pH-metar se baždari pomoću standardne puferne otopine. Ovisno o očekivanoj kiselosti otpipetira se 20 mL pripremljenog uzorka i prenese u čašu u koju se prethodno stavi magnet koji će pospješiti miješanje sadržaja. Miješalica se pusti u rad, a zatim iz birete brzo dodaje otopina natrijevog hidroksida dok se ne postigne pH oko 7. Tada se dodavanje uspori do pH 8,1±8,2. Uzorak se analizira u najmanje dva ponavljanja.

$$\text{Ukupna kiselost (\%)} = \frac{V \times F \times G}{D} \times 100$$

V (mL) - volumen otopine NaOH utrošene pri titraciji

F* - faktor otopine NaOH $c = 0,1 \text{ mol/L}$

G (g/mL) - faktor najzastupljenije kiseline u uzorku

D (g) - masa uzorka u 25 mL razrijeđenog homogeniziranog uzorka

3.5.4. Određivanje pH-vrijednosti

Mjerenje pH vrijednosti određuje se pH-metrom (Slika 4), uranjanjem kombinirane elektrode u homogenizirani uzorak i očitavanjem vrijednosti (AOAC, 1995).

Aparatura i pribor: čaša volumena 25 mL, magnet za miješanje, magnetska miješalica (MM-510), pH-metar (Mettler Toledo, SevenMulti, Švicarska), analitička vaga (Sartorius)

Priprema uzoraka: Priprema uzorka za određivanje pH- vrijednosti ista je kao i za ukupne kiseline.

Postupak određivanja: Prije mjerenja pH-metar je potrebno baždariti pufernom otopinom poznate pH vrijednosti kod sobne temperature. pH vrijednost određuje se uranjanjem elektrode u ispitivani uzorak.



Slika 4. Određivanje pH vrijednosti
(Fotografija: Daniela Patricia Bilić, 2016)

3.5.5. Određivanje vitamina C

2,6-diklorindofenol oksidira L-askorbinsku kiselinu u dehidrosaskorbinsku kiselinu, dok boja reagensa ne prijeđe u bezbojnu leukobazu, pa služi istovremeno i kao indikator ove redoks reakcije. Ova metoda se primjenjuje za određivanje askorbinske kiseline u proizvodima od voća i povrća (AOAC, 2002).

Aparatura i pribor: homogenizator (Zepter international), analitička vaga (Sartorius), odmjerna tikvica volumena 100 mL, čaše volumena 100 mL, bireta 50 mL

Reagensi: 2,6-p-diklorindofenol, 2 %-tna oksalna kiselina

Priprema uzoraka: Na odmjernu tikvicu od 100 mL postavi se lijevak te se preko njega u tikvicu odvaže 10 g uzoraka na tehničkoj vagi. Takav se uzorak kvantitativno prenese u tikvicu pomoću 2 %-tne otopine oksalne kiseline, a odmjerna se tikvica nadopuni do oznake otopinom oksalne kiseline.

Postupak određivanja: Sadržaj iz odmjerne tikvice se profiltrira, a filtrat služi a određivanje askorbinske kiseline. Otpipetira se 10 mL filtrata koji se titrira otopinom 2,6-diklorindofenolom i to do pojave ružičaste boje koja mora biti postojana barem pet sekundi. Iz volumena 2,6- diklorindofenola utrošenog za titraciju filtrata, izračuna se količina L-askorbinske kiseline (vitamin C) te se izrazi u mg/100 g svježeg uzorka.

$$\text{Vitamin C (mg/100g)} = \frac{V \times F}{D} \times 100$$

V (mL) - volumen utrošenog 2,6-diklorindofenola pri titraciji

F* - faktor normaliteta 2,6-diklorindofenola

D (g) - masa uzorka u filtratu u gramima

***Određivanje faktora otopine 2,6-diklorindofenola:**

Za određivanje faktora otopine 2,6-diklorindofenola potrebno je napraviti otopinu askorbinske kiseline koja će se titrirati s otopinom 2,6-diklorindofenola. Prema očitanoj volumenu 2,6-diklorindofenola potrebnog za titraciju poznate mase standarda vitamina C izračuna se faktor te otopine. U odmjernu tikvicu od 50 mL na analitičkoj vagi odvagane se $\pm 0,0100$ g askorbinske kiseline, a tikvica nadopuni do oznake 2%-tnom otopinom oksalne kiseline. U Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL otpipetira se 5 mL 2%-tne otopine oksalne kiseline i 5 mL pripremljene otopine askorbinske kiseline te se titrira s otopinom 2,6-diklorindofenola do pojave ružičaste boje koja mora biti postojana barem 5 sekundi. Iz podatka utrošenog volumena otopine 2,6-diklorindofenola potrebnog za titraciju određene mase askorbinske kiseline izračuna se faktor (F) otopine 2,6-diklorindofenola.

3.5.6. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određuju se spektrofotometrijski u etanolnom ekstraktu uzorka mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 750 nm. Metoda se bazira na obojenoj reakciji koju fenoli razvijaju s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdene kiseline, koje se pri oksidaciji fenolnih spojeva iz uzorka reduciraju u wolfram-oksidi i molibden oksid koji su plavo obojeni (Ough i Amerine, 1988).

Aparatura i pribor: tehnička vaga (s točnošću $\pm 0,01$), konusna tikvica, odmjerne tikvice (50 i 100 mL), obični lijevak, filter papir, povratno hladilo, pipete, kivete, spektrofotometar (Schimadzu, UV 1650 PC)

Kemikalije: 80 %-tni etanol, Folin-Ciocalteu reagens, zasićena otopina natrijeva karbonata

Izrada baždarnog pravca: Za pripremu baždarnog pravca odvažuje se 500 mg galne kiseline, otopi u 80 %-om etanolu i nadopuni u odmjerne 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 i potom se nadopunjavaju do oznake 80 %-im 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 dodaje redom 30 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 7,5 mL zasićene otopine natrijevog karbonata. Dobro se izmiješa i nadopunjava destiliranom vodom do oznake. Uzorci se ostave dva sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac tako da se na apscisi nanese koncentracija galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije.

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzoraka voća ili povrća: 10 g uzorka se izvažuje s točnošću $\pm 0,01$ g i homogenizira se s 40 mL 80 %-tnog etanola. Homogena smjesa kuha se 10 minuta uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt se filtrira u odmjernu tikvicu od 100 mL. Zaostali talog zajedno s filter papirom se prebaci s 50 mL 80 %-tnog etanola u tikvicu sa šlifom i dodatno kuha uz povratno hladilo još 10 min. Dobiveni ekstrakt se spoji s prethodno dobivenim ekstraktom i nadopuni do oznake s 80 %-tnim etanolom. U odmjernu tikvicu od 50 mL otpipetira se 0,5 mL ekstrakta i redom dodaje 30 mL destilirane vode i 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 7,5 mL otopine zasićenog natrijeva karbonata. Sadržaj tikvica dobro se izmiješa i nadopuni destiliranom vodom do oznake te se ostavi dva sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

Račun: Baždarni pravac nacrtava se pomoću računala u programu Microsoft Excel, te se izračuna jednadžba pravca prema kojoj se izračuna koncentracija ukupnih fenola.

$$y = 0,001 x + 0,0436$$

y – apsorbancija na 750 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg/ L)

3.5.7. Određivanje flavonoida

Za taloženje flavonoidnih fenolnih spojeva preporuča se upotreba formaldehida. Formaldehid reagira s C-6 ili C-8 pozicijom na 5,7-dihidroksi flavonoidu 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 (Ough i Amerine, 1988). Razlika ukupnih fenola i neflavonoida daje količinu flavonoida.

Aparatura i pribor: filter papir, stakleni lijevci, Erlenmeyer-ova 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 (Schimadzu, UV 1650 PC)

Kemikalije: klorovodična kiselina, HCl 1: 4 (konc. HCl razrijedi se vodom u omjeru 1: 4), formaldehid (13 mL 37 %-tnog formaldehida u 100 mL vode), dušik za propuhivanje uzorka, zasićena otopina natrijeva karbonata, Folin-Ciocalteu reagens, 80 %-tni etanol

Priprema uzoraka: Ekstrakt ukupnih fenola (opisan u poglavlju 3.5.6.) 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.

Račun: 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.

3.5.8. Određivanje sadržaja antocijana

Određivanje sadržaja antocijana metodom izbjeljivanja disulfitom temelji se na principu da se HSO_3^- ion veže na 2' položaj molekule antocijana te tako prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Istovremeno se kontrolni uzorak tretira s destiliranom vodom, a zatim se kolorimetrijski određuje razlika apsorbancije u oba uzorka. Dobivena razlika pokazuje količinu antocijana u nekom uzorku (Ough i Amerine, 1988).

Aparatura i pribor: analitička vaga (s točnošću $\pm 0,0001$), staklena čaša volumena 50 mL, pipete (2, 5, 10 i 20 mL), epruvete, kivete, spektrofotometar (Schimadzu, UV 1650 PC), centrifuga (HETTICH, ROTOFIX 32)

Kemikalije: 0,1 % HCl s 96%-im etanolom (0,1 mL koncentrirane HCl nadopuni se s 96 %-tnim etanolom do 100 mL), 2 %-tna otopina HCl, 15 %-tna otopina natrij-hidrogensulfita (NaHSO_3)

Priprema uzorka: U kivetu se odvaži 2 g uzorka s točnošću $\pm 0,0001$, otpipetira se 2 mL 0,1% HCl s 96 %-im etanolom i 40 mL 2 %-ne otopine HCl. Dobro se promiješa i kivete se stave na centrifugiranje 10 minuta pri 4500 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja bistri dio otopine se od dekantira i dalje koristi za analizu sadržaja antocijana.

Postupak određivanja: Nakon centrifugiranja od bistrog dijela otopine, otpipetira se po 10 mL u dvije epruvete. U jednu epruvetu doda se 4 mL destilirane vode, a u drugu 4 mL 15 %-og natrijeva hidrogensulfita. Epruvete se ostave 15 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se na spektrofotometru izmjeri apsorbancija pri 520 nm. Slijepa proba je 2 %-na otopina HCl-a.

$$Ac \text{ (mg/L)} = 615 \times (A1 - A2)$$

Ac - količina antocijana u ispitivanom uzorku (mg/L)

615 - faktor preračunavanja

A1 - apsorbancija uzorka kojem je dodana voda

A2 - apsorbancija uzorka kojem je dodana 15 %-tna otopina natrijeva hidrogensulfita.

3.5.9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom temelji se 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 kiselina) pri istim uvjetima (Miller i sur., 1993; Re i sur., 1999).

Priprema reagensa:

1.dan:

•140 mM otopina kalijeva persulfata, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0,1892 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ izvaži se i otopi u 5 mL destilirane vode u odmjerne tikvici od 10 mL

•7 mM ABTS otopina (0,0192 g ABTS reagensu otopi se u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL)

•stabilna ABTS^{•+} otopina (88 µL K₂S₂O₈ otopine (140 mM) 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 12-16 sati pri sobnoj temperaturi; stajanjem intenzitet plavo-zelene boje se pojačava)

2. dan:

Na dan provođenja svih analiza priprema se 1%-na otopina ABTS^{•+} (1 mL ABTS^{•+} otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 96%-im etanolom do oznake. Nakon toga mjeri se apsorbancu 1%-ne otopine ABTS^{•+} pri 734 nm koja mora iznositi $0,70 \pm 0,02$. Ako apsorbancu otopine ne iznosi 0,734 onda ju je potrebno namjestiti, odnosno ako je apsorbancu premala u tikvicu od 100 mL pripremljene 1%-ne otopine ABTS^{•+} treba dodati još par kapi stabilne ABTS^{•+} otopine, a ako je apsorbancu prevelika onda treba razrijediti odnosno u tikvicu (100 mL) dodati još 96 %-og etanola.

NAPOMENA: Isti dan kada se pripremi 1%-na otopina ABTS^{•+} s podešenom apsorbancu 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 uzoraka za analizu: Procedura ekstrakcije iz uzoraka ista je kao i u protokolu određivanja fenola Folin-Ciocalteu metodom. ABTS metodu najbolje je provesti kada se rade i fenoli te iz pripremljenih fenolnih ekstrakata napraviti analizu i za fenole i za ABTS tako da se poslije rezultati sadržaja fenola i ABTS-a mogu korelirati.

Postupak određivanja (spektrofotometrijski): 160 µL uzorka (ekstrakta) pomiješa se s 2 mL 1 %-ne otopine ABTS^{•+} te se nakon 5 min mjeri apsorbancu pri 734 nm. Za slijepu probu se koristi 96 % etanol.

Izrada baždarnog pravca: Za izradu baždarnog pravca u ABTS metodi koristi se Trolox koji uzrokuje smanjenje boje ABTS^{•+} otopine. Točke određene za izradu baždarnog pravca su sljedeće: 0, 100, 200, 400, 1000, 2000 i 2500 µmol/dm³. Najprije se pripremi stock otopina i to tako da se u odmjernu tikvicu od 25 mL izvaže 0,0156 Trolox-a, a tikvica se 80 %-im etanolom nadopuni do oznake. Iz stock otopine uzimaju se sljedeći volumeni Trolox-a za pripremu daljnjih razrjeđenja koja se pripremaju u odmjernim tikvicama od 25 mL:

- 0 → 0 mL Trolox (samo EtOH)
- 100 → 0,4 mL
- 200 → 0,8 mL
- 400 → 1,6 mL
- 1000 → 4 mL
- 2000 → 8 mL
- 2500 → 10 mL

Nakon pripreme navedenih koncentracija Trolox-a iz svake tikvice u kojoj je navedena koncentracija Trolox-a uzima se 160 µL otopine Trolox-a i dodaje 2 mL 1%-ne ABTS^{•+}

otopine podešene apsorbance ($0,70 \pm 0,02$). Nakon što pomiješamo dodanu koncentraciju Trolox-a i 1 %-ne ABTS^{•+} otopine izmjeri se apsorbance pri 734 nm. I tako za svaku točku koncentracije Troloxa. Temeljem izmjerenih vrijednosti apsorbance za svaku točku napravi se baždarni pravac.

3.6. Statistička obrada podataka

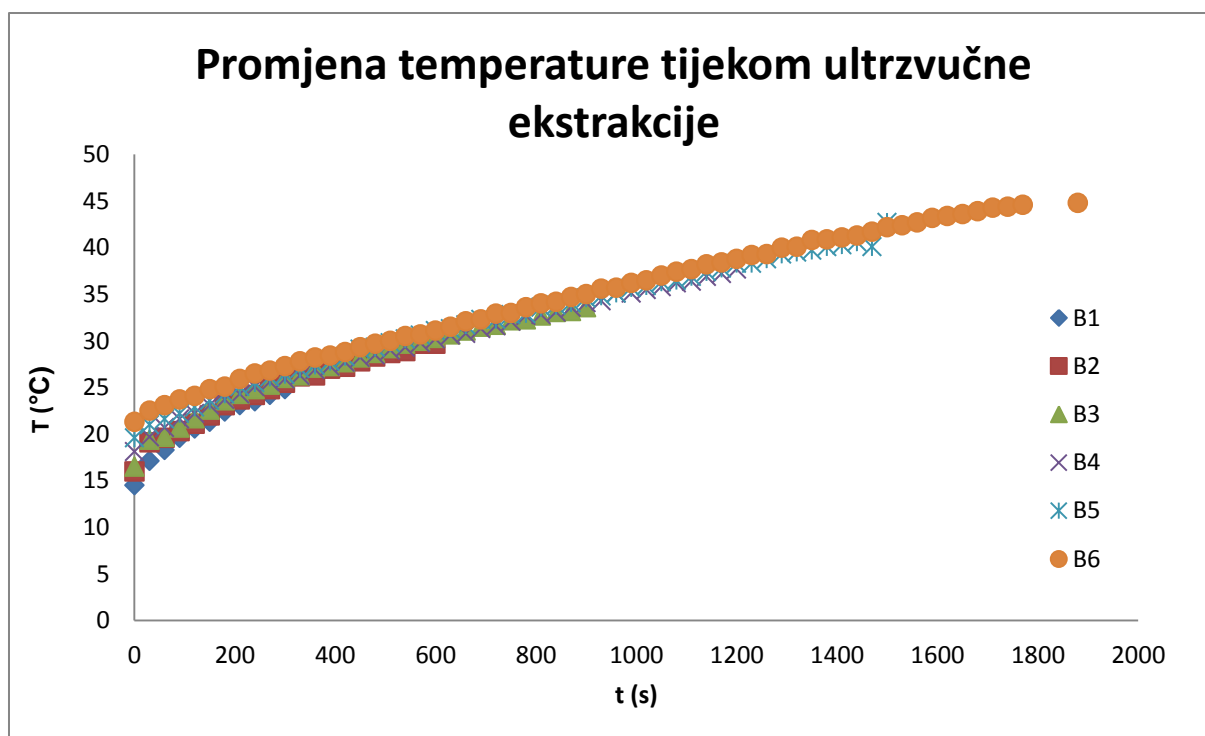
Rezultati istraživanja statistički su obrađeni u programskom paketu SAS, verzija 9.3 (SAS, 2010). Svaki tretman klasične i ultrazvučne ekstrakcije vodenog uzorka s dodanim prahom aronije proveden je u tri ponavljanja ($n=3$). Rezultati su podvrgnuti jednosmjernoj analizi varijance (ANOVA). Srednje vrijednosti uspoređene su t-testom (LSD), a smatraju se značajno različitim prema $p \leq 0,0001$. Uz rezultate u tablicama nalaze se i eksponenti različitih slova koji označavaju značajne statističke razlike između promatranih kemijskih parametara kod $p \leq 0,0001$. Vrijednostima standardne devijacije (s) prikazano je prosječno odstupanje rezultata od srednje vrijednosti za pojedini kemijski parametar.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Osnovni kemijski sastav

Rezultati osnovnog kemijskog sastava vodenih uzoraka s dodanim prahom aronije ekstrahiranih klasično (A1 do A7) i ultrazvukom (B1 do B6) prikazani su u Tablici 3, a obuhvaćaju: gustoću otopine, sadržaj topljive suhe tvari, sadržaj ukupnih kiselina i pH-vrijednost. Analizom varijance dobivenih rezultata utvrđene su vrlo značajne statističke razlike ($p \leq 0,0001$) između svih istraživanih uzoraka (A, B).

Gustoća otopine analiziranih vodenih uzoraka bila je u rasponu od 1,0032 (A7) do 1,0040 g/cm³ (B6) te prosječno za sve vodene uzorke s dodanim prahom aronije ekstrahiranim klasično iznosi 1,0035 g/cm³, a za vodene uzorke u kojima je prah ekstrahiran ultrazvukom iznosi 1,0037 g/cm³. Najveća gustoća otopine utvrđena je u uzorku B6 (1,0040 g/cm³) u kojem je prah aronije ekstrahirano ultrazvučno u vremenskom razdoblju od 30 minuta. Ultrazvuk visokog intenziteta svoju primjenu pronašao je u mnoštvu procesa prehrambene industrije od kojih je i homogenizacija (Brnčić i sur., 2009). Učinak ultrazvuka na proces homogenizacije temelji se na pojavi kavitacije prilikom koje pod djelovanjem zvučnog vala dolazi do ubrzanog miješanja otopine i čestica praha (Režek Jambrak i sur., 2009). Jedna od glavnih posljedica procesa kavitacije je i povećanje temperature sustava što može utjecati na niz fizikalnih svojstava otopine, a između ostalog na njenu gustoću (Bosiljkov i sur., 2012) što je dokazano i u ovom istraživanju. Uzorci s dodanim prahom aronije tretirani ultrazvukom u dužim vremenskim periodima (15-30 min) imali su najviše vrijednosti gustoće. Porast temperature kao nužna posljedica primjene ultrazvuka visokog intenziteta utječe na fizikalne promjene tekućine i to prvenstveno u sustavima u kojima je primijenjena ultrazvučna snaga (amplituda) veća (Bosiljkov i sur., 2012). Temeljem navedenog, očekivano je da uzorci s dodanim prahom aronije tretirani ultrazvukom (B1 do B6) imaju i veću gustoću s obzirom na zabilježen porast temperature sustava (Grafikon 1).



Grafikon 1. Promjena temperature ($^{\circ}\text{C}$) uzoraka vodenih ekstrakata praha aronije tijekom ultrazvučnog tretmana (B1-B6) u vremenskim intervalima od 30 sekundi

Sadržaj topljive suhe tvari bio je u rasponu od 1,46 (B1) do 1,63 % (B6). Prosječni sadržaj topljive suhe tvari vodenih uzoraka s dodanim prahom aronije ekstrahiranih klasično iznosi 1,55 %, a za uzorke ultrazvučno tretirane prosječni sadržaj iznosi 1,57 %. Temeljem navedenih rezultata niskog sadržaja topljive suhe tvari (prosječne vrijednosti za sve ekstrakte od 1,56 %) može se zaključiti kako vodeni ekstrakti praha aronije nisu bogat izvor šećera bez obzira na način ekstrakcije. Uzorci s dodanim prahom aronije tretirani ultrazvukom pokazuju trend rasta topljive suhe tvari ovisno o primijenjenim vremenskim intervalima od 5 do 30 minuta. Najviša vrijednost topljive suhe tvari (1,63 %) u uzorcima tretiranim ultrazvukom utvrđena je za uzorak B6 u kojem je prah ekstrahiran 30 minuta. Parametar topljive suhe tvari ne pokazuje značajne razlike ovisno o načinu ekstrakcije praha (klasično i ultrazvukom), odnosno može se zaključiti kako ultrazvuk visokog intenziteta nije značajno utjecao na promjenu njenog sadržaja u ispitivanim uzorcima. Najviši sadržaj ukupnih kiselina (2,24 %) utvrđen je kod vodenog uzorka (B7) kod kojeg je ekstrakcija praha trajala 24 h, dok je najniži sadržaj (2,18 %) utvrđen kod uzorka s dodanim prahom aronije ekstrahiranim ultrazvukom u vremenskom trajanju od 30 minuta (B6). Prosječni sadržaj ukupnih kiselina za uzorke u kojima je prah ekstrahiran klasično u vremenskom periodu od 5 min do 24 h iznosi 2,17 %, dok za uzorke tretirane ultrazvukom u razdoblju od 5-30 min 2,11 %. U skladu s utvrđenim visokim vrijednostima ukupnih kiselina, pH-vrijednosti bile su relativno niske te prosječno i za vodene uzorke s dodanim prahom aronije ekstrahirane klasično (A1 do A7) i za uzorke tretirane ultrazvukom (B1 do B6) iznose 3,6. Bosiljkov i sur. (2012) navode kao jedan od ključnih parametara pojave kavitacije porast temperature sustava koji utječe na pojedina fizikalna svojstva otopine kao što je pH-vrijednost. U ovom istraživanju nije utvrđena

značajna promjena pH-vrijednosti u uzorcima s dodanim prahom aronije tretiranim ultrazvukom (B1 do B6) s obzirom da nije zabilježen značajan porast temperature sustava (Grafikon 1).

Tablica 3. Osnovni kemijski sastav vodenih uzoraka s dodanim prahom aronije ekstrahiranih klasično i ultrazvukom

Uzorak	Gustoća (g/cm ³) *	TST (%) ***	Uk. kis. (%) *	pH NS
Klasična ekstrakcija				
A1	1,0035abc	1,54cde	2,12abc	3,62
A2	1,0035abc	1,57abcd	2,16abc	3,60
A3	1,0036abc	1,60abc	2,18ab	3,58
A4	1,0034bc	1,56bcd	2,16abc	3,58
A5	1,0034bc	1,53de	2,18ab	3,59
A6	1,0036abc	1,57abcd	2,13abc	3,64
A7	1,0032c	1,49ef	2,24a	3,59
Ultrazvučna ekstrakcija				
B1	1,0034bc	1,46f	2,03c	3,61
B2	1,0035abc	1,51def	2,05bc	3,57
B3	1,0037abc	1,57abcd	2,09bc	3,53
B4	1,0035abc	1,62ab	2,16abc	3,63
B5	1,00395ab	1,62ab	2,14abc	3,62
B6	1,0040a	1,63a	2,18ab	3,58

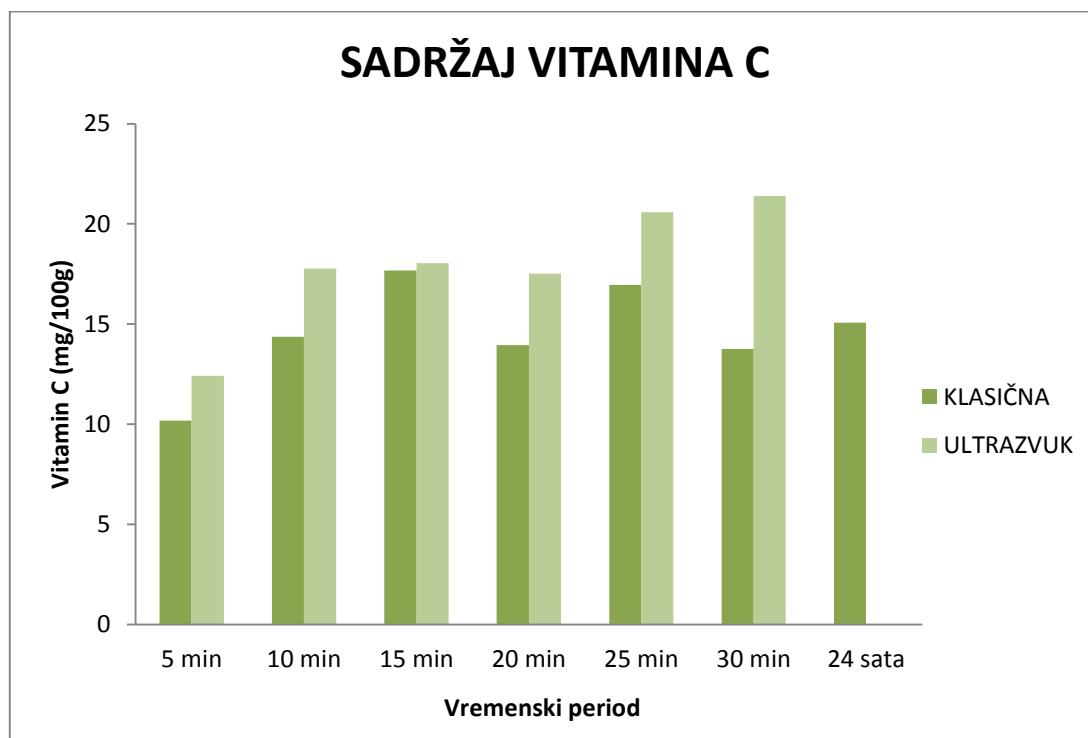
*0,01 ≤ p ≤ 0,05; *** p ≤ 0,0001; NS- nije signifikantno; TST- topljiva suha tvar; Uk. Kis.- ukupne kiseline

4.2. Bioaktivne komponente

Rezultati sadržaja bioaktivnih komponenti koje obuhvaćaju sadržaj: vitamina C, ukupnih fenola i flavonoida te ukupnih antocijana vodenih uzoraka s dodanim prahom aronije ekstrahiranih klasično (A1 do A7) i ultrazvukom (B1 do B6) prikazani su u Grafikonima 2–4. Analizom varijance dobivenih rezultata utvrđene su vrlo značajne statističke razlike (p ≤ 0,0001) između svih istraživanih uzoraka u kojima je prah ekstrahiran klasično (A1-A7) i ultrazvukom visokog intenziteta (B1-B6) s obzirom na promatran sadržaj bioaktivnih komponenti i antioksidacijski kapacitet (Tablica 4, Prilog).

4.2.1. Sadržaj vitamina C

Svježi plod aronije, kao i proizvodi od aronije poput soka i praha, značajan su izvor vitamina C (Benvenuti i sur., 2004; Kulling i Rawel, 2008; Szajdek i Borowska, 2008) što je dokazano i u ovom istraživanju. Sadržaj vitamina C iznosio je od 10,17 mg/100 g otopine u vodenim uzorcima s prahom aronije ekstrahiranih klasično u vremenskom periodu od 5 minuta (A1) do 21,39 mg/100 g u vodenim uzorcima u kojem je prah aronije ekstrahirano ultrazvukom tijekom 30 minuta (B6) (Grafikon 2). U uzorcima s dodanim prahom aronije ekstrahiranim klasično (A1 do A7) prosječni sadržaj vitamina C iznosio je 14,56 mg/100 g, dok u onima tretiranim ultrazvukom (B1 do B6) prosječno je iznosio 17,95 mg/100 g. Vrlo značajna razlika ($p \leq 0,0001$) u sadržaju vitamina C primjetna je između uzoraka u kojem je prah aronije ekstrahirano klasično u vremenskom razdoblju od 24 sata (A7) i vodenog uzorka praha tretiranog ultrazvukom kroz 30 minuta (B6). Može se zaključiti kako primjena ultrazvuka visokog intenziteta u vremenskom periodu od 30 minuta značajnije doprinosi izolaciji vitamina C iz praha aronije u usporedbi s klasičnim načinom (Grafikon 2). Ultrazvuk visokog intenziteta izrazito je učinkovit u procesu ekstrakcije različitih spojeva (Brnčić i sur., 2009; Šic Žlabur i sur., 2015; Šic Žlabur i sur., 2016) i to mehanizmom ubrzanja procesa difuzije odnosno prijenosa tvari (Lovrić, 2003). Važno je naglasiti kako povišenje temperature koje se događa tijekom ultrazvučnog tretmana kao posljedica kavitacije pospješuje proces difuzije (Lovrić, 2003), a istovremeno ne utječe na degradaciju sadržaja vitamina C u vodenim uzorcima s dodanim prahom aronije tretiranim ultrazvukom.

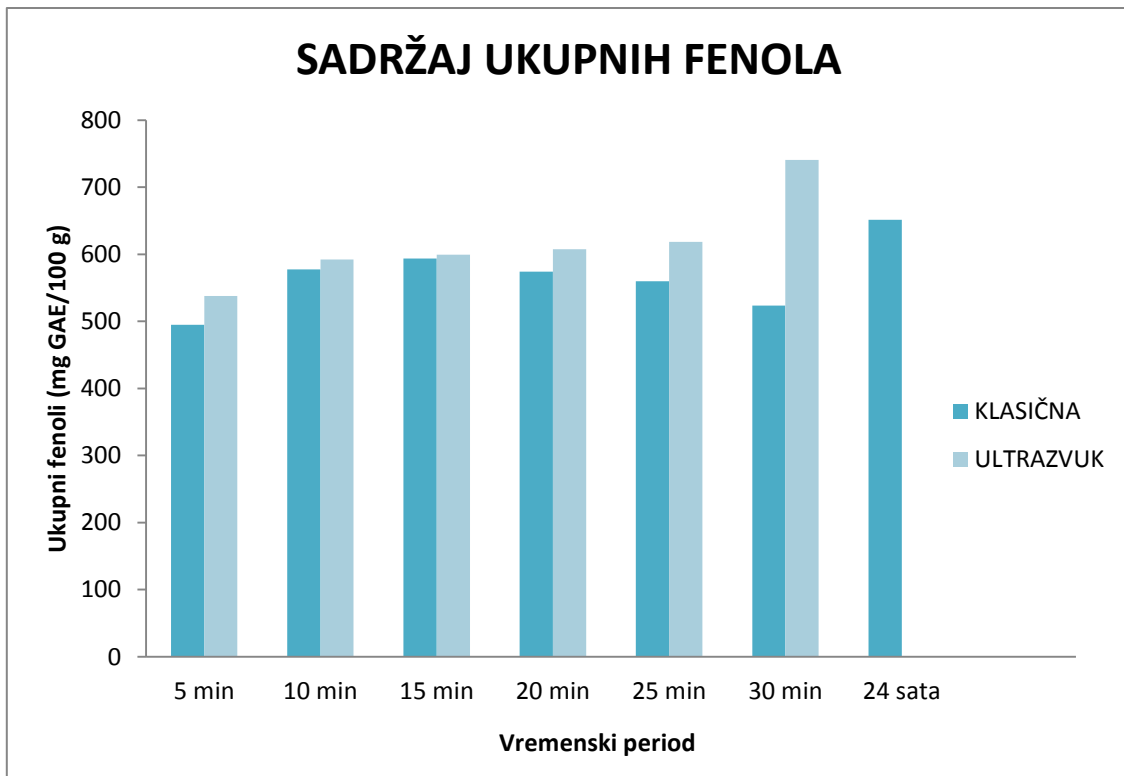


Grafikon 2. Sadržaj vitamina C (mg/100 g svježe tvari) u vodenim uzorcima s dodanim prahom aronije ekstrahiranih klasično u vremenskom periodu od 5 minuta do 24 sata i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 30 minuta

4.2.2. Sadržaj ukupnih fenola

Prirodni, biljni antioksidansi, sve više se koriste u komercijalne svrhe kao nutritivni dodaci u raznim prehrambenim proizvodima (Chu i sur., 2000). U ljudskom organizmu najznačajniji učinak fenolnih spojeva je njihovo antioksidacijsko djelovanje prvenstveno kroz mehanizam uklanjanja slobodnih radikala, odnosno inhibicije oksidacijskih procesa (Buyukokuroglu i sur., 2001; Garcia-Salas i sur., 2010). Aronija posjeduje vrlo visok sadržaj polifenola, antocijana i flavonoida. U istraživanju na 143 različita uzorka voća, najviši sadržaj polifenola kao i antioksidacijska aktivnost utvrđeni su upravo u uzorku aronije (Tolić i sur., 2015).

Sadržaj ukupnih fenola značajno se statistički razlikovao ($p \leq 0,0001$) između svih istraživanih uzoraka (A, B) (Tablica 4, Prilog). Sadržaj ukupnih fenola u vodenim uzorcima s dodanim prahom aronije ekstrahiranih klasično bio je u rasponu od 494,85 (A1) do 651,63 mg GAE/100 g u uzorku u kojem je prah ekstrahiran 24 sata (B7). Kod uzoraka s dodanim prahom aronije ekstrahiranim ultrazvukom sadržaj ukupnih fenola bio je u rasponu od 538,03 mg GAE/100 g u vodenom uzorku u kojem je ultrazvuk primijenjen 5 minuta (B1) do 740,62 mg GAE/100 g u kojem je prah ekstrahiran 30 minuta (B6) (Grafikon 3). Prosječni sadržaj ukupnih fenola za uzorke koji su ekstrahirani klasično iznosio je 567,86 mg GAE/100 g, dok je za vodene uzorke ekstrahirane ultrazvukom iznosio 616,05 mg GAE/100 g. Kod vodenih uzoraka u kojima je prah aronije ekstrahiran klasično utvrđen je trend rasta sadržaja fenolnih spojeva tijekom svih istraživanih vremenskih perioda, od 5 minuta do 24 sata (Grafikon 3). Uzorci s dodanim prahom aronije tretirani ultrazvukom također pokazuju trend rasta ukupnih fenola ovisno o primijenjenim vremenskim intervalima od 5 do 30 minuta (Grafikon 3). Ultrazvuk visokog intenziteta značajno je utjecao na povećanje sadržaja ukupnih fenola već tijekom prvih 5 minuta primjene. U uzorku u kojem je prah ekstrahiran ultrazvukom 30 min (B6) utvrđeno je povećanje sadržaja ukupnih fenola za čak 30 % u usporedbi s uzorkom u kojem je prah ekstrahiran klasično 30 min (A6) i 12 % s uzorkom u kojem je prah ekstrahiran klasično kroz 24 sata (A7). Navedeni trend pozitivnog učinka ultrazvuka visokog intenziteta na ekstrakciju fenolnih spojeva u skladu je s drugim literaturnim navodima koji ističu značajnu učinkovitost ultrazvuka u ekstrakciji spojeva različitih kemijskih struktura (Vinatoru i sur., 2001; Wang i Weller, 2006; Vilku i sur., 2008; Alupului i sur., 2009; Pingret i sur., 2012; Puri i sur., 2012; Šic Žlabur i sur., 2015).



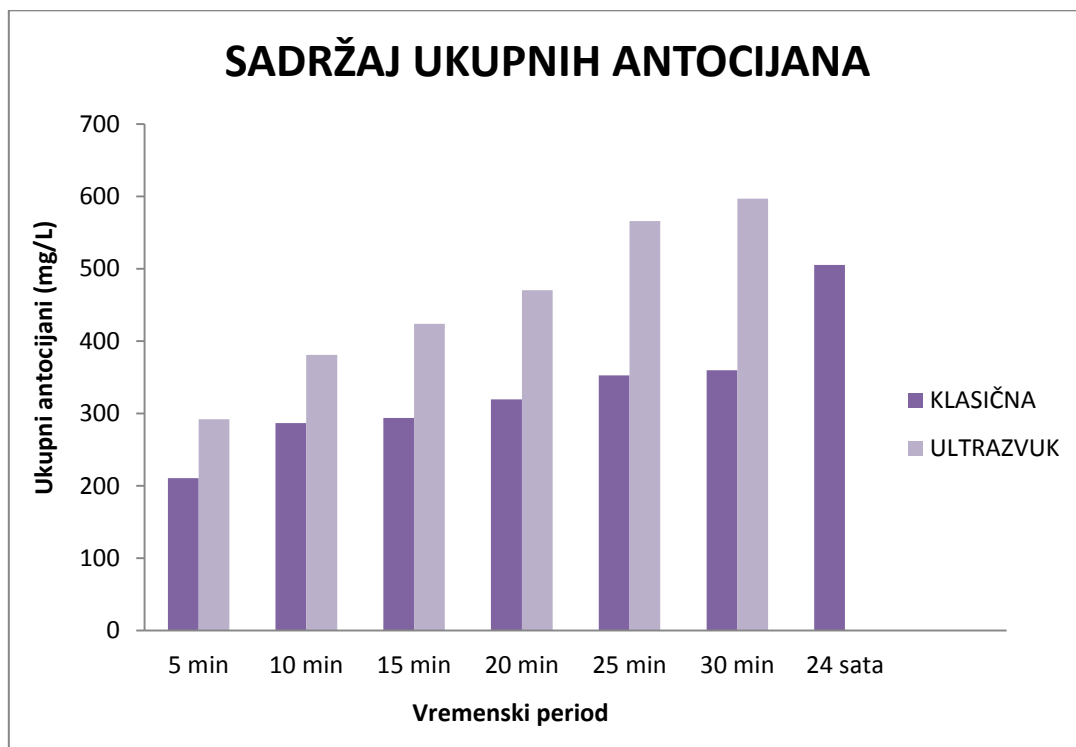
Grafikon 3. Sadržaj ukupnih fenola u vodenim uzorcima ekstrahiranih klasično u vremenskom periodu od 5 minuta do 24 sata i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 30 minuta

4.2.3. Sadržaj ukupnih antocijana

Prema kemijskoj strukturi antocijani su glikozidi koji kiselim hidrolizom oslobađaju aglikon, nazvan antocijanidin i jedan ili više šećera (obično glukozu, ramnozu ili galaktozu, a od disaharida gentobiozu i rutinozu). U prirodi dolaze u obliku svojih glikozida, tj. vezani uz molekulu šećera. Antocijani u građi ploda prevladavaju u epidermalnom i hipodermalnom sloju kože ploda, a topljivi su u vodi i staničnom soku (Gould i sur., 2009; Pérez-Gregorio i sur., 2011). Proizvodi aronije zbog karakterističnog tamnocrvenog obojenja koriste se između ostalog u prehrambenoj industriji kao prirodna bojila. Tamnocrvena boja posljedica je prisutnosti pigmenata antocijana, koji su prvenstveno najpoznatiji po svojoj snažnoj antioksidacijskoj aktivnosti. U usporedbi s drugim jagodastim voćem kao što su borovnica, kupina, jagoda, crni ribiz, crveni ribiz, brusnica, jagoda, upravo aronija pokazuje najveći sadržaj antocijana (Oszmiański i Wojdyło, 2005; Jakobek i sur., 2007; Szajdek i Borowska, 2008; Šnebergrová i sur., 2014).

Između analiziranih uzoraka vodenih ekstrakata s dodanim prahom aronije utvrđene su vrlo značajne statističke razlike ($p \leq 0,0001$) s obzirom na način ekstrakcije. Sadržaj ukupnih antocijana (Tablica 4, Prilog) u vodenim uzorcima u kojima je prah ekstrahiran klasično kretao se u rasponu od 210,75 mg/L u uzorku ekstrahiranom 5 minuta (A1) do 505,33 mg/L u uzorku u kojem je prah ekstrahiran 24 sata (A7). Sadržaj ukupnih antocijana kod vodenih

uzoraka u kojima je prah aronije ekstrahirani ultrazvukom kretao se u rasponu od 292,13 (B1) do 596,87 mg/L (B6) te također pokazuje trend rasta u vremenskom periodu od 5 do 30 minuta (Grafikon 4). Najviša vrijednost ukupnih antocijana (596,87mg/L) u uzorcima tretiranih ultrazvukom utvrđena je u soku B6 pri kojem je ultrazvuk visokog intenziteta primjenjivan 30 minuta. Prema rezultatima iz Tablice 3 utvrđena je gotovo dvostruko veća vrijednost ukupnih antocijana u uzorku praha ekstrahiranim ultrazvukom 30 min (B6) u usporedbi s uzorkom ekstrahiranim klasično tijekom istog vremenskog perioda (A6). Ukupni antocijani pokazuju značajne razlike ovisno o načinu ekstrakcije praha (klasično i ultrazvukom) (Grafikon 4). Drugi autori navode suprotne rezultate od prikazanih u ovom istraživanju, prilikom čega naglašavaju degradacijski učinak ultrazvuka visokog intenziteta na sadržaj ukupnih antocijana (Tiwari i sur., 2008a; Tiwari i sur., 2008b, Šic Žlabur, 2015). Literaturni izvori kao glavni razlog negativnog utjecaja ultrazvuka na sadržaj antocijana navode učinak amplitude (snage) i vremenskog perioda. Pri višim razinama ultrazvučne amplitude i duljim vremenskim periodima utvrđen je i veći stupanj degradacije antocijana (Ciccolini i sur., 1997; Tiwari i sur., 2008a; Tiwari i sur., 2010). Također, još jedan od bitnih čimbenika koji pokazuju utjecaj na sadržaj antocijana je i temperatura sustava. Visoke temperature utječu na smanjenje sadržaja ukupnih antocijana (Sadilova i sur., 2007; Patras i sur., 2010). Temeljem gore opisanih parametara ultrazvuka i njihova utjecaja na sadržaj ukupnih antocijana može se zaključiti kako u ovom istraživanju nije utvrđena redukcija sadržaja istih zbog upotrebe niže razine snage i ne tako značajnog porasta temperature sustava (Grafikon 1).



Grafikon 4. Sadržaj ukupnih antocijana u vodenim uzorcima ekstrahiranih klasično u vremenskom periodu od 5 minuta do 24 sata i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 30 minuta

4.2.4. Antioksidacijski kapacitet

Antioksidacijski spojevi predstavljaju inhibitore oksidacijskih procesa zbog njihove sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala (Devasagayam i sur., 2004). Antioksidacijsko djelovanje biljnih vrsta u izravnoj je korelaciji sa sastavom vitamina, biljnih pigmenta i različitih fenolnih fitokemikalija, poput flavonoida, glikozida, alkaloida i drugih. Odnosno, biljne vrste koje posjeduju veći sadržaj navedenih spojeva pokazuju i veću antioksidacijsku aktivnost (Leja i sur., 2007; Šic Žlabur i sur., 2016). Spojevi snažne antioksidacijske aktivnosti još se zovu biološki aktivni spojevi, a njihova najveća karakteristika je da pokazuju pozitivan učinak na zdravlje ljudi (Heim i sur., 2002; Benvenuti i sur., 2004; Oszmiański i Wojdyło, 2005).

Između svih istraživanih uzoraka utvrđene su značajne statističke razlike ($p \leq 0,0001$) (Tablica 4). Antioksidacijski kapacitet u vodenim uzorcima u kojima je prah aronije ekstrahirano klasično kretao se od najmanje dobivene vrijednosti 2253,15 u uzorku u kojem je prah ekstrahirano 30 minuta (A6) do 2281,94 $\mu\text{mol TE/L}$ u vodenom uzorku s dodanim prahom ekstrahiranim tijekom 24 sata (A7) te pokazuje trend rasta tijekom svih istraživanih vremenskih perioda od 5 minuta do 24 sata.

5. Zaključci

Na temelju ostvarenih rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta u usporedbi s klasičnim načinom ekstrakcije praha od aronije utječe na povećanje istraživanih parametara: vitamina C, ukupnih fenola i flavonoida te ukupnih antocijana.
2. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta značajno smanjuje vrijeme potrebno za ekstrakciju biljnog materijala s obzirom da je tijekom 30 minuta postignut značajno veći sadržaj svih analiziranih bioaktivnih komponenti.

Analizirani prah aronije zbog bogatog sadržaja bioaktivnih komponenti može poslužiti kao dobra sirovina u prehrambenoj industriji.

6. Popis literature

1. Alupului A., Calinescu I., Lavric V. (2009). Ultrasonic vs. Microwave extraction intensification of active principles from medical plants, AIDIC Conference Series, 09: 1-8. DOI: 10.3303/ACOS09090001.
2. AOAC (1995). Official methods of Analysis (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, USA.
3. AOAC (2002). Official methods of Analysis (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, USA.
4. Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., Bertelli, D. (2004). Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Robus*, *Ribes* and *Aronia*. *Journal of Food Science*, 69: 164–169.
5. Bimakr M., Rahman R. A., Taip F. S., Ganjloo A., Salleh L. M., Selamat J., Hamid A., Zaidul I. S. M. (2011). Comparison of different extraction methods for the extraction of major flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing*, 89: 67-72.
6. Bosiljkov T., Tripalo B., Brnčić M., Ježek D., Karlović S., Jagušt, I. (2010). Influence of High Intensity Ultrasound With Different Probe Diameter on the Degree of Homogenization (variance) and Physical Properties of cow Milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(1): 34-41.
7. Bosiljkov T., Tripalo B., Ježek D., Brnčić M., Karlović S., Dujmić F. (2012). Influence of High Intensity Ultrasound Treatments on Physical Properties of Sheep Milk. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 7 (Special Issue): 44-48.
8. Brnčić M. (2006). Utjecaj ultrazvuka na svojstva sirovine za ekstruziju i gotovog ekstrudiranog proizvoda. Doktorski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
9. Brnčić M., Tripalo B., Penava, A., Karlović D., Ježek D., Vikić Topić D., Karlović S., Bosiljov T. (2009). Applications of Power Ultrasound for Foodstuffs Processing. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 1-2: 32-37.
10. Buyukokuroglu M., Gulcin I., Oktay M., Kufrevioglu O. (2001). In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacol Research*, 44: 491–494.
11. Carocho M., Ferreira I.C. (2013). The role of phenolic compounds in the fight against cancer-a review. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(8):1236-1258.

12. Chu Y., Chang C., Hsu H. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 561–566.
13. Ciccolini L., Taillandier P., Wilhem A. M., Delmas H., Strehaiano P. (1997). Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: effect of temperature and of ultrasonic power. *Chemical Engineering Journal*, 65: 145-149.
14. Ciocoiu M., Badescu L., Miron A., Badescu M. (2013). The Involvement of a Polyphenol-Rich Extract of Black Chokeberry in Oxidative Stress on Experimental Arterial Hypertension. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/912769>; Pristupljeno: 12.01.2016.
15. Dai J., Mumper R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.
16. Dauthy M. E. (1995). Fruit and vegetable processing, FAO Agricultural services bulletin No. 119, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
17. Devasagayam T., Tilak J., Boloor K., Sane K., Ghaskadbi S., Lele R. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 52: 794–804.
18. Diaz Napal G.N., Defago M., Valladares G., Palacios, S. (2010). Response of *Epilachna paenulata* to two flavonoids, Pinocembrin and quercetin, in a comparative study. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 898–904.
19. Dujmić F., Brnčić M., Karlović S., Bosiljkov T., Ježek D., Tripalo B., Mofardin I. (2013). Ultrasound-Assisted Infrared Drying of Pear Slices: Textural Issues. *Journal of Food Process Engineering*, 36: 397–406.
20. Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15: 8813-8826.
21. Gertenbach D. D. (2001). Solid–liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals from botanicals. U knjizi: Shi J., Mazza G., Le Maguer M. (ur.): *Functional foods: biochemical and processing aspects*. CRC Press Inc., Boca Raton, SAD, pp. 331–366.
22. Gould K., Davies K., Winefield C. (2009). *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications*. Springer, New York, SAD, pp. 85-100.

23. Grandison A. S., Lewis M. J. (1996). Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries: Principles and applications. Woodhead Publishing Limited, Abington, UK.
24. Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10): 572-584.
25. Herceg Z. (2009) *Procesi konzerviranja hrane novi postupci*, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.
26. Horszwald A., Julien H., Andlauer W. (2013). Characterisation of Aronia powders obtained by different drying processes. *Food Chemistry*, 141: 2858–2863.
27. Huang W., Zhang H., Liu W., Li C. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B - Biomedicine & Biotechnology*, 13 (2): 94-102.
28. Jakobek L., Šeruga M., Medvidović-Kosanović M., Novak I. (2007). Antioxidant Activity and Polyphenols of Aronia in Comparison to other Berry Species. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 72(4): 301-306.
29. Jeppsson N. (2000). The effects of fertilizer rate on vegetative growth, yield and fruit quality, with special respect to pigments, in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) cv. 'Viking'. *Scientia Horticulturae*, 83: 127-137.
30. Kennedy D. O., Wightman E. L. (2011). Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition*, 2: 32–50.
31. Knorr D., Zenker M., Heinz V., Lee D-U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 261-266.
32. Kulling S. E., Rawel H. M. (2008). Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)- A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica*, 74: 1625–1634.
33. Leja M., Mareczek G., Wyzgolik G., Klepacz-Baniak J., Czekońska K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plants species. *Food Chemistry*, 100: 237–240.
34. Lovrić T. (2003). *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. HINUS, Zagreb.

35. Melkić A. (2014). Utjecaj intenziteta rezidbe na vegetativni razvoj aronije, Diplomski rad, Agronomski fakultet u Zagrebu
36. Miller N. J., Diplock A. T., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V., Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84 (4): 407–412.
37. Oszmiański J., Wojdyło A. (2005). Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research Technology*, 22: 809–813.
38. Ough C. S., Amerine M. A. (1988). *Methods for Analysis of Musts and Wines*. John Wiley and Sons, New York, USA.
39. Patras A., Brunton N. P., O'Donnell C., Tiwari B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*, 21: 3-11.
40. Pérez-Gregorio M. R., Regueiro J., Alonso-González E., Pastrana-Castro L. M., Simal-Gándara J. (2011). Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1793-1801.
41. Pingret D., Fabiano-Tixier A. S., Le Bourvellec C., Renard M. G. C. C. (2012). Lab and pilot scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, 111: 73-81.
42. Puri M., Sharma D., Barrow C. J., Tiwari A. K. (2012). Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*, 132: 1113-1120.
43. Ramos L., Kristenson E. M., Brinkman U. A. T. (2002). Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975: 3–29.
44. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10): 1231-1237.
45. Režek Jambrak A., Lelas V., Herceg Z., Badanjak M., Batur V., Muža M. (2009). Prednosti i nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* 59 (4), 267-281.

46. Sadilova E., Carle R., Stintzing F. C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular and Nutrition Food Research*, 51: 1461-1471.
47. SAS/STAT (2010). SAS Institute, Cary, NC, USA.
48. Shahidi F., Naczki M. (2004). *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press Taylor&Francis Group, Boca Raton, SAD.
49. Slimestad R., Solheim H. (2002). Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11): 3228–3231.
50. Slimestad R., Torskangerpoll K., Nateland H. S., Johannessen T., Giske N. K. (2005). Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 61–68.
51. Suslick K. S., Eddingsaas N. C., Flannigan D. J., Hopkins S. D., Xu H. (2011). Extreme conditions during multibubble cavitation: Sonoluminescence as a spectroscopic probe. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 842–846.
52. Szajdek A., Borowska E. J. (2008). Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63:147–156.
53. Šic Žlabur J., Voća S., Dobričević N., Rimac Brnčić S., Dujmić F., Brnčić M. (2015). Optimization of Ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *International Agrophysics*, 29(2): 231-237.
54. Šic Žlabur J., Voća S., Dobričević N., Pliestić S., Galić A., Boričević A., Borić N. (2016). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from lemon balm and peppermint leaves. *International Agrophysics*, 30(1): 95-104.
55. Šic Žlabur J., Voća S., Dobričević N. (2016). *Kvaliteta voća, povrća i prerađevina-priručnik za vježbe*. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
56. Šnebergrová J., Čížková H., Neradová E., Kapci B., Rajchl A., Voldřich M. (2014). Variability of Characteristic Components of *Aronia*. *Czech Journal of Food Science*, 32(1): 25-30.
57. Tiwari B. K., O'Donnell C. P., Muthukumarappan K., Cullen P. J. (2008a). Effect of ultrasound processing on quality of fruit juices. *Stewart Postharvest Review*, 4: 1–6.
58. Tiwari B. K., O'Donnell C. P., Patras A., Cullen P. J. (2008b). Anthocyanin and ascorbic acid degradation in sonicated strawberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 10071–10077.

59. Tiwari B. K, Patras A., Brunton N., Cullen P. J., O'Donnell C. P. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17: 598-604.
60. Tolić M. T., Landeka Jurčević I., Panjkota Krbavčić I., Marković K., Vahčić N. (2015). Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Quality of Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Products. *Food Technology and Biotechnology*, 53(2): 171–179.
61. Vikram V. B., Ramesh M. N., Prapulla S. G. (2005). Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. *Journal of Food Engineering*, 69: 31–40.
62. Vilku K., Mawson R., Simons L., Bates D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 161–169.
63. Vinatoru M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303-313.
64. Wang J., Weller C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 300–312.
65. Wilkes K., Howard L. R., Brownmille C., Prior R. L. (2014). Changes in Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) Polyphenols during Juice Processing and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 4018–4025.
66. Wuyts N., De Waele D., Swennen R. (2006). Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* grandr naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 308-314.
67. Xu B. J., Chang S. K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72: S159-166.

7. Prilog

Tablica 4. Sadržaj bioaktivnih komponenti i antioksidacijski kapacitet vodenih uzoraka praha aronije ekstrahiranih klasično i ultrazvukom

*** $p \leq 0,0001$

Uzorak	Vitamin C (mg/100g)	Ukupni fenoli (mgGAE/100g)	Ukupni antocijani (mg/L)	Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{molTE/L}$)
	***	***	***	***
Klasična ekstrakcija				
A1	10,17g \pm 0,85	494,85j \pm 0,50	210,75i \pm 0,73	2281,94c \pm 1,91
A2	14,37def \pm 0,88	577,67fg \pm 1,10	286,59h \pm 0,43	2285,49c \pm 0,57
A3	17,67bcd	593,62de \pm 0,60	293,97gh \pm 0,44	2287,09c \pm 0,29
A4	13,95ef	574,12gh \pm 0,70	319,39g \pm 0,58	2273,39d \pm 0,64
A5	16,96cde \pm 0,88	559,58h	352,61f \pm 1,59	2284,19c \pm 1,27
A6	13,75ef	523,56i \pm 1,00	359,58f \pm 1,01	2253,15e \pm 0,64
A7	15,07cdef	651,63b \pm 1,81	505,33c \pm 1,59	2281,94c \pm 1,91
Ultrazvučna ekstrakcija				
B1	12,42fg \pm 0,53	538,03i \pm 10,23	292,13gh \pm 1,74	2293,19b \pm 2,54
B2	17,77bc \pm 0,99	592,14ef \pm 12,74	381,61f \pm 5,66	2293,47b \pm 2,79
B3	18,04bc \pm 1,53	599,44de \pm 3,01	423,74e \pm 10,44	2295,67b \pm 2,86
B4	17,51bcd \pm 2,89	607,73cd \pm 0,70	470,48d \pm 0,87	2297,24a \pm 1,91
B5	20,58ab \pm 1,04	618,37c \pm 0,70	566,11b \pm 21,31	2294,59b \pm 1,19
B6	21,39a \pm 0,71	740,62a \pm 6,32	596,87a \pm 25,67	2292,29b \pm 1,91

Različita slova prikazuju značajne statističke razlike između srednjih vrijednosti

Životopis

Daniela Patricia Bilić rođena je u Zagrebu 12. listopada 1990. godine. Osnovnu naobrazbu stekla je u Osnovnoj školi Ivan Gundulić. Srednju je upisala 2005./2006. u Srednjoj školi za medicinske sestre Mlinarska. Preddiplomski studij Hortikulture na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je akademske godine 2009./2010. Diplomski (Ms) studij Hortikultura-voćarstvo upisala je akademske godine 2014./2015. na istoimenom fakultetu. Koristi se engleskim (razumijevanje – stupanj B2, govor – stupanj B1, pisanje – stupanj B1) i talijanskim jezikom (razumijevanje – stupanj A2, govor – stupanj A1, pisanje – stupanj A1). Dobro upravlja uredskim protokolom (procesorom teksta Microsoft Office Word 2007, tablica Microsoft Office Excel 2007, prezentacija Microsoft Office PowerPoint 2007, Prezi prezentacija) i software-ima uređivanja fotografija stečeno amaterskim bavljenjem fotografijom. Kroz studij se bavila volonterskim radom u ljetnom kampu za srednjoškolsku i studentsku mladež duhovno-rekreativnog sadržaja Modrave 2014./2015. i 2015./2016. godine te u vidu instrukcija predviđenih za osnovnoškolsku i srednjoškolsku djecu u Oratoriju 2015./2016. Nagrađena je dvjema dekanovim nagradama: na preddiplomskom studiju za rad Učinak dehidriranih organskih gnojiva na mineralni sastav i prinos salate 2013./2014. godine te diplomskom studiju za rad Nutritivna kvaliteta voćnog soka s dodanim prahom aronije (*Aronia melanocarpa*) 2015./2016. godine. Studentica je iznimno zainteresirana za preradu voća, povrća i aromatičnog bilja te ekološke proizvodnje istih, kao i njihovu nutritivnu vrijednost.