

# Udjel ukupnih fenolnih spojeva i antioksidativna aktivnost kriomljevenih ljski heljde tretiranih hemicelulazom i celulazom

---

**Tokić, Valentina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:193847>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-03**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**VALENTINA TOKIĆ**

**7054/PT**

**UDJEL UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDATIVNA  
AKTIVNOST KRIOMLJEVENIH LJUSKI HELJDE TRETIRANIH  
HEMICELULAZOM I CELULAZOM**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog projekta:** Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Marina Krpan

**Zagreb, 2019.**

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda**

**Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji**

### **UDJEL UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST KRIOMLJEVENIH LJUSKI HELJDE TRETIRANIH HEMICELULAZOM I CELULAZOM**

**Valentina Tokić, 0058206583**

#### **Sažetak:**

Heljda pripada skupini pseudožitarica te se zbog svoje iznimne nutritivne vrijednosti sve više koristi u različitim oblicima u ljudskoj prehrani. Jedna od njenih glavnih karakteristika je visoka antioksidativna aktivnost koja je ponajprije vezana uz vanjski dio zrna. Heljdine ljuske su nusproizvodi pa se u pravilu ne koriste u ljudskoj prehrani, već kao hrana za životinje te u nekim drugim industrijama. U ovom radu određivana je antioksidativna aktivnost, DPPH i FRAP metodom te udio fenolnih spojeva u kriomljevenim ljuskama heljde tretiranim hemicelulazom i celulazom pri različitoj koncentraciji enzima (0,1 % i 1 %) i vremenu tretmana (1 h, 4 h i 8 h). U odnosu na netretirane ljuske heljde, u enzimski tretiranim ljuskama nije utvrđena promjena antioksidativne aktivnosti. Najveći udio fenolnih spojeva utvrđen je u ljuskama tretiranim s dodatkom 1 % enzima tijekom 1 h.

**Ključne riječi:** celulaza, fenolni spojevi, heljda, hemicelulaza, kriomljevenje

**Rad sadrži:** 30 stranica, 15 slika, 1 tablicu, 66 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Marina Krpan

**Pomoć pri izradi:** Saša Drakula, mag. ing.

**Rad predan:** srpanj, 2019.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Bachelor thesis**

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

### **TOTAL PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CRYO-MILLED BUCKWHEAT HULLS TREATED WITH CELLULASE AND HEMICELLULASE**

**Valentina Tokić, 0058206583**

#### **Abstract:**

Buckwheat belongs to a group of pseudocereals and because of its exceptional nutritional value it is increasingly used in different forms in the human diet. One of its main features is the high antioxidant activity, which is primarily related to the outer layer of the grain. Buckwheat hulls are by-product and they are not typically used in the human diet. They have been used as feed and in some other industries. The main goal of this study was to determine antioxidant activity by DPPH and FRAP method and the total phenolic content in cryo-milled buckwheat hulls treated with enzymes at different concentrations (0.1 % and 1 %) and treatment time (1 h, 4 h and 8 h). Compared to untreated buckwheat hulls, change in antioxidant activity in enzymatically treated buckwheat hulls was not observed. The highest content of the phenolic compounds was determined in buckwheat hulls treated for 1 h with the addition of 1% of enzyme.

**Keywords:** buckwheat, cellulase, cryo milling, hemicellulase, phenolic compounds

**Thesis contains:** 30 pages, 15 figures, 1 table, 66 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD. Marina Krpan, Associate Professor

**Technical support and assistance:** Saša Drakula, MSc

**Thesis delivered:** July, 2019

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Heljda.....	2
2.2. Kriomljevenje.....	2
2.3. Antioksidansi.....	3
2.3.1. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti.....	5
2.3.1.1. FRAP metoda.....	5
2.3.1.2. TPC metoda.....	5
2.3.1.3. DPPH metoda.....	6
2.4. Fenolni Spojevi.....	7
2.4.1. Polifenoli.....	7
2.4.1.1. Flavonoidi.....	8
2.4.1.2. Fenolne kiseline.....	8
2.4.1.3. Lignani.....	9
2.4.1.4. Stilbeni.....	9
2.4.1.5. Tanini.....	10
2.5. Enzimi.....	10
2.5.1. Celulaza.....	11
2.5.2. Hemicelulaza.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. Uzorci.....	13
3.2. Ekstrakcija slobodnih polarnih spojeva iz heljдинih ljuski.....	14
3.3. TPC metoda.....	15
3.4. DPPH metoda.....	16
3.5. FRAP metoda.....	16
3.6. Obrada rezultata.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
4.1. Udio ukupnih fenolnih spojeva.....	18
4.2. Antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom.....	19
4.3. Antioksidativna aktivnost određena FRAP metodom.....	21
5. ZAKLJUČAK.....	23
6. LITERATURA.....	24

## 1. UVOD

Žitarice su biljna vrsta koja svakodnevno nalazi svoje mjesto u ljudskoj prehrani u različitim oblicima kao što su kruh, kaše, tjestenina, keksi i slični proizvodi. Jedna od vrsta je heljda čija je konzumacija u porastu. To je zapravo pseudožitarica odličnih nutritivnih svojstava koja uključuju povoljne omjere makronutrijenata, ali i visoke udjele mikronutrijenata, ne sadrži gluten pa je primjenjiva kod osoba s celijakijom, a pokazuje i posebice visoku antioksidativnu aktivnost najviše vezanu uz vanjski dio zrna koji je bogat fenolnim spojevima (1).

Antioksidansi, osim utjecaja na zdravlje, imaju i pozitivan utjecaj kod obrade i skladištenja hrane jer pritom sprječavaju njenu oksidaciju i na taj način poboljšavaju kvalitetu i produžuju rok trajanja (2). Međutim, ljuske su nusproizvod industrije i ne koriste se u ljudskoj prehrani budući da ljudsko tijelo nema enzime celulazu i hemicelulazu, enzime potrebne za njihovu razgradnju. One se primjenjuju u stočarstvu kao hrana za životinje te u proizvodnji jastuka (1). S obzirom na njihovu visoku nutritivnu vrijednost, nastoji se pronaći način obrade koji će omogućiti primjenu u prehrani ljudi.

Jedan od načina je proces kriogenog mljevenja prilikom kojeg se primjenjuju niske temperature kriogenih tekućina čime se sprječava potencijalna degradacija bioaktivnih spojeva uzrokovna visokim temperaturama prilikom mljevenja (3). Također, dobivanjem vrlo sitno samljevenih čestica moguće je povećati bioraspoloživost nutrijenata i time poboljšati nutritivnu vrijednost proizvoda (4, 5).

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj tretmana hemicelulazom i celulazom na antioksidativnu aktivnost i udio ukupnih fenolnih spojeva u ljuskama heljde samljevenim pomoću kriomlina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Heljda

Heljda pripada skupini dvornikovki (lat. *Polygonaceae*), međutim prema kemijskom sastavu sličnija je žitaricama pa se stoga smatra pseudožitaricom, a najviše se uzgaja u područjima Sjeverne Europe i Azije. Postoji nekoliko vrsta, ali za ljudsku upotrebu uzgajaju se dvije, a to su *Fagopyrum esculentum* i *Fagopyrum tataricum* (6, 7).

Heljda je bogat izvor proteina i aminokiselina, vlakana, masti, škroba, vitamina, minerala i drugih funkcionalnih komponenti koje su u različitim omjerima raspoređene ovisno o dijelu zrna. Udjel proteina je kod heljde nešto viši nego kod ostalih žitarica, sadrži esencijalne aminokiseline lizin i arginin te ne sadrži gluten. Najveći udio njenog sastava čine ugljikohidrati, odnosno škrob i to 59-74 %. Nadalje, sadrži oko 2-2,6 % masti, koje su najviše građene od oleinske, linolenske i palmitinske masne kiseline. Udio vlakana u heljdi iznosi 9,3-10,9 %, a od minerala bogata je magnezijem, selenom, željezom, kalijem, kalcijem, bakrom, manganom i cinkom. U usporedbi s ostalim žitaricama, ima i veći udio vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> i E. Heljda se u nekim državama zbog svoje nutritivne vrijednosti i udjela fenolnih spojeva te antioksidativne aktivnosti smatra i funkcionalnom hranom koja štiti od bolesti i poboljšava ljudsko zdravlje (8).

Obrada zrna heljde uključuje čišćenje od različitih nečistoća (ostataka drugih biljaka, kamenja, metala, prašine itd.), zatim uklanjanje ljuski te mljevenje. Mljevenje se može provoditi na dva načina – s uklanjanjem ljuski prije ili nakon mljevenja. Tako obrađena heljda kasnije se koristi za dobivanje proizvoda kao što su brašno, kaša, tjestenina, žitarice za doručak, alkoholna pića i slično. U kombinaciji s ljuskama koristi se kao hrana za životinje (9), a same ljuske koriste se u proizvodnji jastuka (10).

### 2.2. Kriomljevenje

Kriogeno mljevenje ili skraćeno kriomljevenje predstavlja proces usitnjavanja materijala korištenjem niskih temperatura koje se postižu primjenom kriogenih tekućina kao što su tekući helij, vodik, neon, dušik, zrak, argon ili kisik. Razna istraživanja pokazala su kako

svakim usitnjavanjem dolazi do promjena u strukturi i funkcionalnim svojstvima hrane. Primjena kriogenika prilikom mljevenja ima brojne prednosti. Niske temperature povećavaju lomljivost i krhkost materijala čime se omogućava lakše i finije usitnjavanje (11), ujedno se sprječavaju toplinska oštećenja i ponovna aglomeracija čestica (12) te čuva aktivnost specifičnih spojeva u hrani (13). Kod ljsuki takav proces rezultira bržom fragmentacijom na sitne čestice i izaziva veću bioraspoloživost nutrijenata od mljevenja pri sobnoj temperaturi (14). Slika 1. prikazuje primjer kriomlina kojim se takve karakteristike postižu.



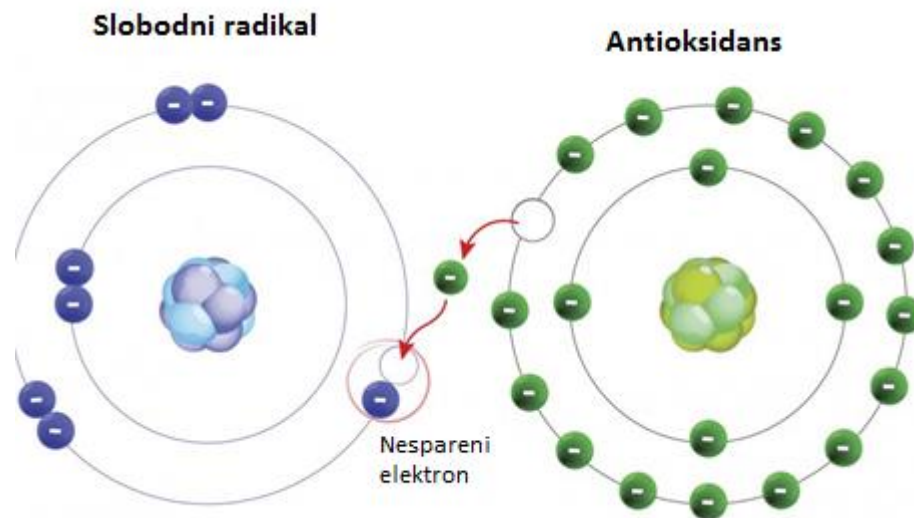
Slika 1. Uređaj za kriomljevenje CryoMill (15)

### 2.3. Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje u malim koncentracijama mogu spriječiti oštećenja biološkog materijala do kojih dolazi zbog nastanka i djelovanja slobodnih radikala. Njihovo djelovanje očituje se u reakciji sa slobodnim radikalima prilikom čega imaju ulogu donora elektrona čime nastaju stabilni radikali i prekidaju se lančane reakcije oksidacije. Slobodni radikal je bilo koji atom ili molekula koja ima jedan ili više nesparenih elektrona, a nastaje na dva općenita načina: homolitičkim cijepanjem kovalentne veze u molekuli djelovanjem topline ili svjetlosti te reakcijom molekula s drugim slobodnim radikalima (16). Najčešće su to reaktivni



kisikovi (ROS) i reaktivni dušikovi spojevi (RNS) koji pri previsokim koncentracijama uzrokuju oksidativni stres zbog neravnoteže između ROS/RNS i prirodno prisutnih antioksidansa (17). Na slici 2. je prikazan način na koji antioksidans molekuli slobodnog radikala donira elektron kako bi nastao stabilni radikal.



Slika 2. Djelovanje antioksidansa na molekulu slobodnog radikala doniranjem elektrona (18)

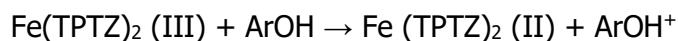
Postoji nekoliko mehanizama djelovanja antioksidansa: poticanje peroksidacije, keliranje metalnih iona tako da se onemogući tvorba reaktivnih spojeva ili razgradnja lipidnih peroksida, reduciranje  $O_2$  do vode čime se sprječava formiranje peroksida, prekidanje autooksidacijskih lančanih reakcija i/ili smanjenje povišenih koncentracija  $O_2$  (19).

U ljudskom tijelu razlikujemo dvije skupine spojeva koji djeluju kao antioksidansi, a to su antioksidativni enzimi u koje ubrajamo superoksid dismutazu (SOD), glutation-peroksidazu (GPRx), askorbat oksidazu (Aox), glutation s-transferazu (GSTs), katalazu i glutation reduktazu (GR), te neenzimske antioksidanse koji uključuju polifenolne spojeve, vitamine (C i E), koenzim Q10 i glutation (20). S obzirom da se antioksidansi nalaze u raznim namirnicama, njihova se koncentracija u organizmu može povećati konzumacijom hrane bogate antioksidansima ili korištenjem određenih suplemenata (21).

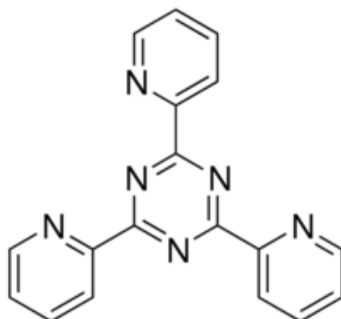
## 2.3.1. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

### 2.3.1.1. FRAP metoda

FRAP metoda (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) temelji se na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona reduciraju žuti kompleks  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  pri čemu  $\text{Fe}^{2+}$  reagira s 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom (TPTZ) koja je prikazana na slici 3. te dolazi do stvaranja plavo-ljubičaste boje čiji se apsorpcijski maksimum bilježi na 593 nm (22) pri čemu se detektiraju čestice koje imaju standardni redukcijski potencijal ispod 0,77 V (23). Kemijska reakcija je prikazana u kemijskoj jednadžbi (24):



Navedena reakcija odvija se u kiselim uvjetima (pH 3,6) u kojima se osigurava dobra topljivost željeza (25). Karakteristike FRAP metode su jednostavnost, brzina reakcije, linearnost u širokom području i pristupačnost jer ne zahtjeva nikakvu dodatnu opremu osim spektrofotometra. Međutim, može doći do lažnih rezultata zbog vezanja drugih neantioksidativnih spojeva s redoks potencijalom nižim od 0,77 V (26).



Slika 3. Struktura molekule TPTZ (27)

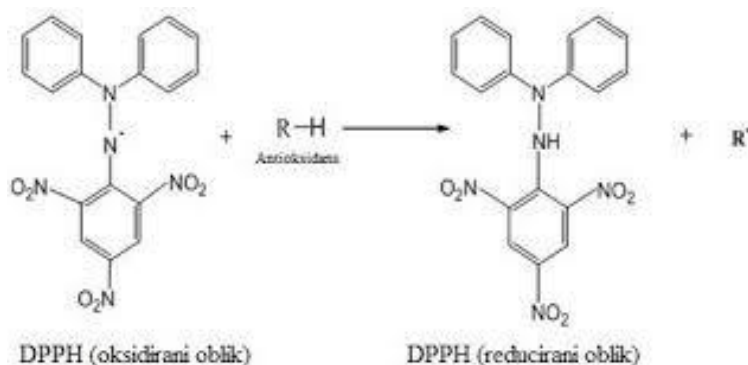
### 2.3.1.2. TPC metoda

TPC (engl. *Total Phenolic Content*) je kolorimetrijska metoda kojom se korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa određuje koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u uzorku. Metoda se temelji na redukciji Folin-Ciocalteu reagensa prilikom čega dolazi do stvaranja plavog obojenja koje se mjeri spektrofotometrijski pri 760 nm, a intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji fenolnih spojeva (28). Što se tiče prirode reakcije, pretpostavlja se da se

sastoji od niza reverzibilnih redoks reakcija gdje dolazi do prijenosa elektrona s fenolnih spojeva na kompleks fosfomolibdenske/fosfovolframove kiseline i nastanka spojeva koji daju plavo obojenje. Za prikazivanje rezultata koriste se standardi fenolnih spojeva te se koncentracija zapravo prikazuje kao ekvivalent korištenog standarda fenolnog spoja po masi ili volumenu uzorka. Kao standardi najčešće se koriste galna kiselina, taninska kiselina, katehin i drugi (29). Prednosti ove metode su brzina, jednostavnost i visoka reproducibilnost. Navedena metoda se često koristi kod mjerenja koncentracije fenolnih spojeva voća, povrća, žitarica i biljaka. Folin-Ciocalteu reagens ne reagira specifično samo s fenolnim spojevima, već i s drugim spojevima kao što su askorbinska kiselina, aromatski amini i aminokiseline, reducirajući šećeri i proteini, što predstavlja nedostatak metode budući da može doći do lažno pozitivnih rezultata (**Error! Bookmark not defined.**).

### 2.3.1.3. DPPH metoda

DPPH metoda je široko primjenjiva metoda koja se temelji se na spektrofotometrijskom mjerenju promjene koncentracije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazila) do koje dolazi uslijed reakcije DPPH s antioksidansima (30). DPPH• je stabilan slobodni radikal ljubičaste boje koji ima apsorpcijski maksimum pri 515 nm u metanolu. DPPH• prima elektron, odnosno proton (H) od molekule antioksidansa prilikom čega dolazi do redukcije u DPPH<sub>2</sub> i stvaranja žute boje čiji se intenzitet mjeri pomoću spektrofotometra. Intenzitet žute boje proporcionalan je stupnju redukcije DPPH (**Error! Bookmark not defined.**). Ova metoda najviše se koristi kod mjerenja antioksidativne aktivnosti žitarica, povrća, konjugirane linolne kiseline, začina, jestivih ulja sjemenki te brašna u otapalima kao što su etanol, aceton, metanol i benzen koja ujedno olakšavaju ekstrakciju antioksidativnih spojeva (31). Slika 4. prikazuje reakciju u kojoj dolazi do opisane redukcije DPPH molekule iz njenog oksidiranog u reducirani oblik.



Slika 4. Redukcija DPPH molekule (32)

## 2.4. Fenolni Spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji sadrže aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Također mogu biti vezani i druge funkcionalne skupine te mogu sadržavati i nekoliko aromatskih prstena. Prema tome se mogu klasificirati na polifenole i jednostavne fenole (33).

### 2.4.1. Polifenoli

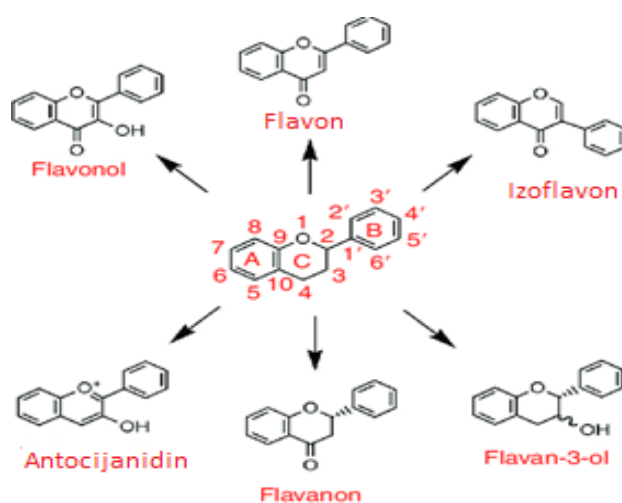
Polifenoli su tvari prirodno prisutne u voću, povrću i cjelovitim žitaricama. Oni štite biljke od štetnog UV zračenja i djelovanja patogenih mikroorganizama. Zadnjih godina pridaje im se sve veća važnost zbog pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje u cjelini, a posebice na sprječavanje kroničnih upala, nastanak raka, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze, alergija i usporavanja starenja. Polifenoli utječu na svojstva hrane kao što su boja, okus, gorčina, miris te oksidacijska stabilnost koja je povezana s kvarenjem hrane (34). Taj utjecaj rezultat je njihove antioksidativne aktivnosti koja se očituje u sposobnosti fenolne skupine za hvatanje slobodnih radikala, uz formiranje stabiliziranog fenoksil radikala, jer je redukcijski potencijal elektrona fenolnog radikala niži od redukcijskog potencijala elektrona reaktivnog kisikovog oblika prilikom čega se prekidaju lančane reakcije oksidacije u stanicama (35). Ta stabilizacija radikala postiže se delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom, a uz to njihovo antioksidativno djelovanje očituje se i u interakciji flavonoida s drugim fiziološkim antioksidansima, npr. vitaminom C ili vitaminom E (36).

Polifenoli igraju veliku ulogu u prehrambenoj industriji pa se često dodaju zbog svoje sposobnosti usporavanja kvarenja hrane, ali i kako bi se povećala nutritivna vrijednost. Obrada hrane ima utjecaj na njihovu koncentraciju pa tako u nekim slučajevima može djelovati pozitivno kao na primjer prilikom maceracije, dok u drugim slučajevima negativno kao što je to kod uklanjanja dijelova žitarica, voća i slično (37).

Postoji nekoliko načina kategorizacije polifenolnih spojeva – prema porijeklu, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi. Najčešće se svrstavaju prema strukturi aglikona na flavonoide i neflavonoide (fenolne kiseline, stilbene, lignane i tanine) (38).

### 2.4.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su biljni pigmenti građeni od 15 atoma ugljika koji su povezani u jezgru od tri prstena koje čine dva aromatska prstena međusobno povezana piranskim prstenom, odnosno imaju fenilbenzopiransku strukturu. U prirodi se najčešće nalaze u obliku glikozida (39). Dijele se u nekoliko podskupina, a to su: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanidini i izoflavoni. Nositelji su boje cvijeća, voća i lišća te zajedno s neflavonoidima grade drvenaste dijelove biljaka (40). Izvori flavonoida su voće i povrće, zeleni i crni čaj, čokolada, crna vina, bobičasto voće, sjemenke, med i propolis (34). Na slici 5. prikazane su kemijske strukture osnovnih vrsta flavonoida.



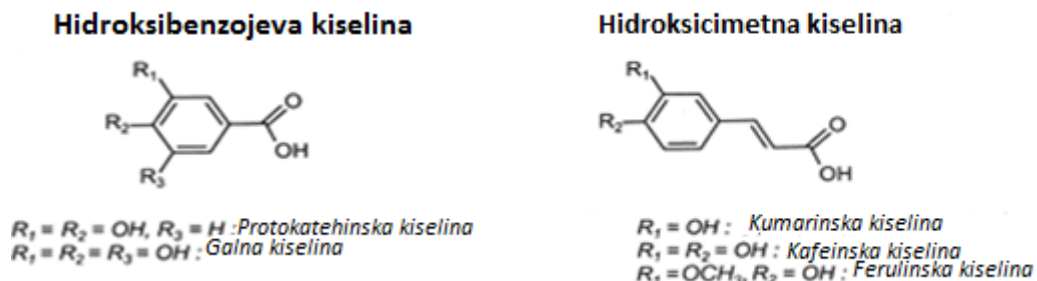
Slika 5. Struktura flavonoida (41)

### 2.4.1.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline pokazuju snažnu antioksidativnu, protuupalnu, antikancerogenu i antimikrobnu aktivnost, a također i pozitivan učinak u liječenju mnogih kardiovaskularnih bolesti i sprječavanju ateroskleroze (42). Njihova uloga u biljkama povezana je s apsorpcijom, sintezom proteina, aktivnošću enzima, fotosintezom i aleopatijom. Svrstavaju se dvije skupine: derivate benzojeve kiseline i derivate cimetine kiseline. Osim po strukturi, razlikuju se i prema stupnju hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (43).

Hidroksibenzojeve kiseline sastoje se od 7 ugljikovih atoma strukture  $C_6-C_1$ , a glavni predstavnici te skupine su: vanilinska, siriginska, protokatehinska, galna, m-hidroksibenzojeva, p-hidroksibenzojeva, gentisinska kiselina. Njihovi prirodni izvori su crveno voće, radič, luk, čaj i začini (44). Hidroksicimetine kiseline uglavnom dolaze u konjugiranim

oblicima ili u obliku estera. U njih se ubrajaju p-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina, a možemo ih naći u borovnicama, šljivama, jabukama, kiviju, artičokama, kruškama, žitaricama, rajčici, kavi i drugim namirnicama (44). Na slici 6. prikazane su osnovne kemijske strukture hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline.



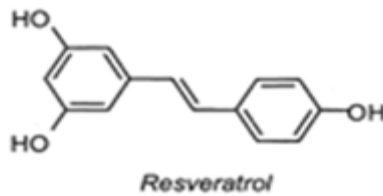
Slika 6. Struktura hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (44)

#### **2.4.1.3. Lignani**

Strukturu lignana karakteriziraju ponavljajuće n-propilbenzenske jedinice te se mogu pronaći u sjemenkama lana i sezama, raži, brokuli, češnjaku, jagodama te crnom i zelenom čaju (45). Imaju antikancerogena, antioksidativna svojstva te pokazuju utjecaj na hormon estrogen, a dobivaju se sintezom iz šikiminske kiseline (**Error! Bookmark not defined.**).

#### **2.4.1.4. Stilbeni**

Stilbeni su građeni od dva aromatska prstena povezana etanolom ili etilenom i u malim količinama su prisutni u hrani. Glavni izvori stilbena su grožđe i proizvodi od grožđa kao što je vino koje je izvor stilbena resveratrola čija je kemijska struktura prikazana na slici 7. Smatra se da imaju antikancerogena svojstva te da štite od kardiovaskularnih bolesti (44, 46, 47).



Slika 7. Struktura resveratrola (34)

#### **2.4.1.5. Tanini**

Tanini su polifenolni spojevi molekulske mase između 500 i 3000 Da. Dijele se na dvije skupine: hidrolizirajuće i kondenzirane tanine. Hidrolizirajući tanini po svojoj kemijskoj strukturi sastoje se od centralne glukoze vezane za molekulu galne kiseline ili njenih derivata, dok su kondenzirani tanini polimeri flavana (48). Namirnice koje sadrže tanine su sirak, proso, ječam, mahunarke, jabuke, banane, bobičasto voće, grožđe, breskve, kruške, a može ih se pronaći i u vinu i čaju. Iako posjeduju antikancerogena, antimikrobna i antimutagena svojstva, vežu se u komplekse s proteinima, ugljikohidratima, vitaminima, mineralima te probavnim enzimima i na taj način negativno djeluju na metabolizam. Stoga je poželjno kontrolirati njihov unos hranom (49).

### **2.5. Enzimi**

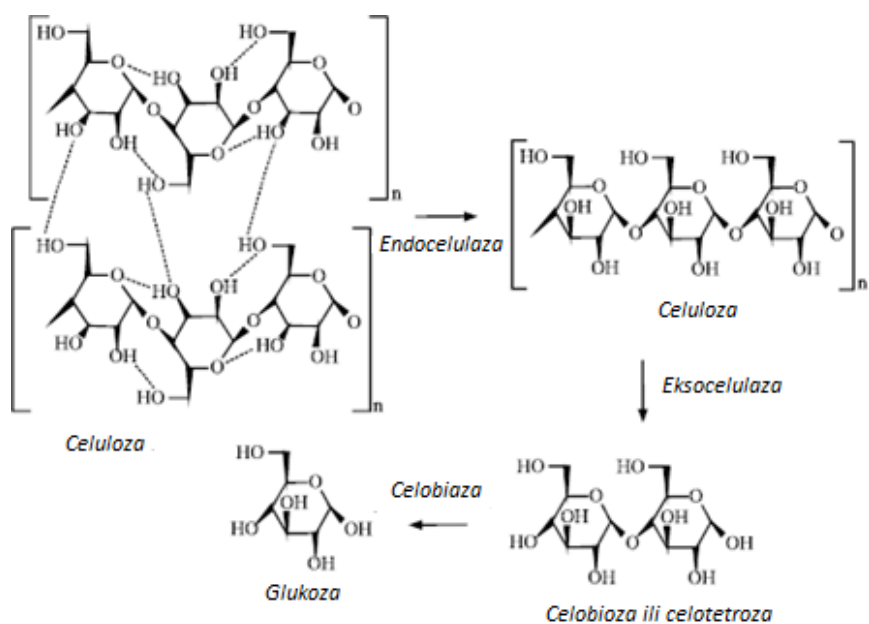
Enzimi su skupina proteina koja na sebe veže supstrat i kataliziraju specifične reakcije prevođenja vezanog supstrata u određeni produkt. U prehrambenoj industriji enzimi se vrlo često primjenjuju, posebice u industriji piva, vina, pekarskih proizvoda, sira, mesa te proizvodnji funkcionalne hrane (50). Izvori enzima koji se pritom koriste su životinjski, biljni te mikrobn (bakterije, gljive, kvasci, aktinomicete) koji se ujedno smatraju i najboljima (51). Najčešće korišteni u prehrambenoj industriji su:  $\alpha$ -amilaze, proteaze, lipaze, katalaze, laktaze, celulaze, glukoza oksidaza, glukoza izomeraza, invertaza (52). Široku primjenu imaju zahvaljujući djelovanju na poboljšanje kvalitete, okusa i izgleda hrane te povećanje nutritivne vrijednosti. Enzimi utječu i na sigurnost hrane tako što sprječavaju nastanak toksičnih

komponenti, a mogu se koristiti i kao zamjena za neke aditive. Dodaju se tijekom pripreme, obrade, pakiranja, transporta i/ili skladištenja hrane te je pritom bitno da svojim svojstvima ne narušavaju zdravlje ljudi (53). Pojedini enzimi u određenom trenutku tijekom obrade trebaju biti inaktivirani kako bi se spriječio neželjeni utjecaj ili kako bi se prekinulo njihovo djelovanje nakon što je postignut željeni cilj. Inaktivacija enzima može se postići primjenom toplinske obrade, tretmana visokim tlakom, mikrovalovima, infracrvenim i ultraljubičastim zračenjem, pulsirajućim električnim poljem i ultrazvukom (50).

### **2.5.1. Celulaza**

Celulaza je enzim koji katalizira hidrolizu celuloze, polisaharida građenog od  $\beta$ -1,4- glukoznih jedinica, pri čemu dolazi do stvaranja monosaharida, manjih polisaharida te oligosaharida. Postoji nekoliko vrsta celulaze kao što je  $\beta$ -1,4-endoglukanaza (EC 3.2.1.4) koja cijepa  $\beta$ -1,4-glikozidne veze u celulozi i  $\beta$ -D-glukanima, celobiohidrolaza (EC. 3.2.1.91) koja katalizira hidrolizu  $\beta$ -1,4-D-glikozidnih veza s nereducirajućeg kraja pri čemu se nastaju celobiozne jedinice te celobioza (EC. 3.2.1.21) koja cijepa celobiozu i stvara glukozu. Celulaze sintetiziraju bakterije i gljive, najčešće se radi o vrstama iz roda *Penicillium*. Uloga celulaze, osim u prirodi, bitna je u mnogim industrijama. U prehrambenoj industriji najčešće se koristi prilikom proizvodnje vina i voćnih sokova kako bi poboljšala maceraciju, prešanje i na taj način ekstrakciju određenih pigmenata, okusa, aroma, fermentabilnih šećera i antioksidansa. Koristi se i u pekarskoj industriji u svrhu poboljšanja dizanja tijesta, njegovih mehaničkih svojstva poput elastičnosti i čvrstoće te pojačavanje arome i okusa proizvoda (54, 55, 56). Na slici 8. prikazane su reakcije nekih vrsta celulaze prilikom čega dolazi do razgradnje celuloze do glukoze.

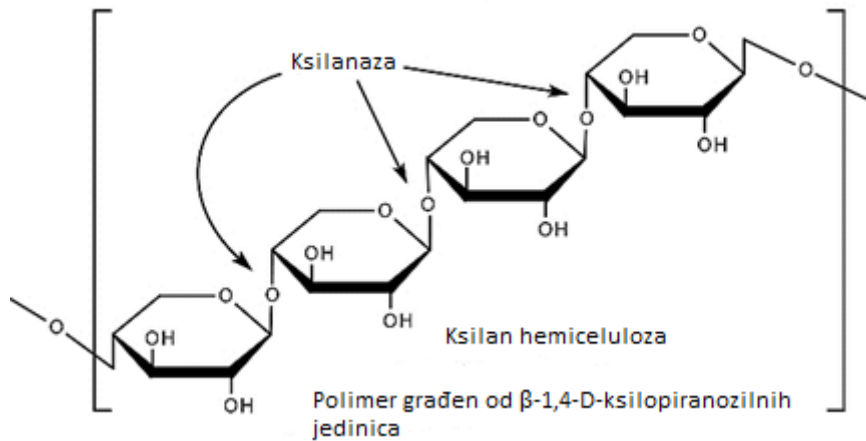




Slika 8. Prikaz reakcije različitih vrsta celulaze (57)

## 2.5.2. Hemicelulaza

Hemicelulaze predstavljaju skupinu enzima koji kataliziraju hidrolizu hemiceluloze, heterogene skupine razgranatih i linearno povezanih polisaharida koji povezani s celulozom i lignanom čine visoko kompleksnu strukturu. Sintetiziraju ju mikroorganizmi, a prisutna je i u probavnom sustavu nekih životinja. Prema građi katalitičkih domena dijele se na glikozidaze čija je uloga hidroliza glikozidnih veza i ugljikohidratne esteraze koje hidroliziraju esterske veze. U skupinu ugljikohidratnih esteraza pripadaju ksilanaze,  $\beta$ -manaze,  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaze,  $\alpha$ -D-glukuronidaze,  $\beta$ -ksilozidaze te hemicelulozne esteraze. Osim katalitičkih domena, postoje funkcionalne domene koje vežu ugljikohidrate i Dockerinove domene koje vežu katalitičke domene za površinu mikrobne stanice ili za određene enzimatske komplekse. Hemicelulaza ima značajnu ulogu u degradaciji biljne biomase te u procesu kruženja ugljika, a najveću primjenu ima u proizvodnji papira, kao dodatak hrani za životinje te u obradi brašna u pekarskoj industriji (58). Na slici 9. prikazana je kemijska struktura jedne vrste hemiceluloze građene od  $\beta$ -1,4-D-ksilopiranozilnih jedinica.



Slika 9. Hemiceluloza izolirana iz *Aspergillus niger* (59)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Uzorci

Heljdine ljuske (lat. *Fagopyrum esculentum*) dobavljene su od proizvođača Pukanić, Hrvatska. Mljevenje i enzimski tretman uzoraka provedeni su u okviru diplomskog rada Prodanović, 2019. Samljevene su na ciklomlinu (Retsch ZM200, Njemačka) pri postavljenoj brzini 6000 RPM na veličinu čestica  $< 500 \mu\text{m}$ . Nakon mljevenja na ciklomlinu ljuske heljde mljevene su na kugličnom kriomlinu (Retsch Cryomill, Njemačka) u trajanju od 8 minuta, uz primjenu hlađenja tekućim dušikom. Nakon mljevenja uzorci su tretirani enzimima hemicelulazom (5000 HCU/g, BIO-CAT, SAD) i celulazom (Alphamalt C 21032, Mühlenchemie GmbH & Co. KG, Njemačka). Pripremljena je 10 % suspenzija uzorka (m/V) u 0,1 M natrij acetatnom puferu. Enzimski tretman proveden je u vodenoj kupelji pri 120 rpm tijekom 1 h, 4 h i 8 h, uz dodatak 0,1 % i 1 % enzima na masu uzorka. Enzimi su prije i poslije tretmana inaktivirani zagrijavanjem na temperature veće od 90 °C kroz 10 minuta. Nakon tretmana uzorci su liofilizirani i čuvani pri -20 °C do analize. U tablici 1. nalazi se vrijeme trajanja enzimskog tretmana i udio enzima koji se pritom koristio za svaki uzorak.

Tablica 1. Analizirani uzorci tretiranih heljdinih ljuski

UZORAK	VRIJEME ENZIMSKOG TRETMANA	UDJEL ENZIMA
0	0 h	Bez enzima
E 1 % 1 h	1 h	1 %
E 0,1 % 1 h	1 h	0,1 %
E 1 % 4 h	4 h	1 %
E 0,1 % 4 h	4 h	0,1 %
E 1 % 8 h	8 h	1 %
E 0,1 % 8 h	8 h	0,1 %

### 3.2. Ekstrakcija slobodnih polarnih spojeva iz heljdinih ljuski

Kemikalije, oprema i uređaji:

- plastična epruveta volumena 2 mL
- analitička vaga JK 180, YMC CHYO, Mikrotehnavorteks, IKA 4 basic
- ultrazvučna kupelj VWR
- centrifuga MICROCL 21, Thermo Scientific
- pipetman, Eppendorf
- magnetska miješalica s termoregulacijom IKA C-MAG HS7, dušik 4,6, Messer Croatia Plin d.o.o.
- filter na špricu poroznosti 0,45  $\mu\text{m}$
- metalna špatula
- etanol, Fisher Chemical
- metanol, J.T.Baker

Postupak:

U plastičnu epruvetu volumena 2 mL izvagano je  $100 \pm 0,1$  mg uzorka. Dodan je 1 mL 80 % etanola te je uzorak vorteksiran 10 minuta u horizontalnom položaju, a potom stavljen 10 minuta u ultrazvučnu kupelj. Uzorci su zatim 15 minuta centrifugirani pri 8000 rpm nakon čega je supernatant odvojen, a ekstrakcija je ponovljena još dvaput. Svi supernatanti su

spojeni i upareni do suhog pod strujom dušika uz zagrijavanje, 40 °C. Upareni ekstrakti čuvani su pri -20 °C do analize.

Prije analize ekstrakti su otopljeni u metanolu, vorteksirani 30 sekundi, centrifugirani 10 minuta na 14000 rpm, a potom profiltrirani kroz filter na špricu poroznosti 0,45 µm.

### 3.3. TPC metoda

Kemikalije, oprema i uređaji:

- metanol, J.T.Baker
- kiveta
- pipetman, Eppendorf
- Folin-Ciocalteu reagens, SIGMA
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, GRAM-MOL
- spektrofotometar, UV/VIS Spectrometer Lambda 35, PerkinElmer
- galna kiselina, 98 %-tna, Acros Organics

Postupak:

U kivetu je dodano 20 µL ekstrakta, 400 µL destilirane vode i 100 µL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 minute dodano je 300 µL 20 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1180 µL destilirane vode i kiveta je promućkana. Reakcija se odvijala tijekom 2 sata, u mraku na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije izmjerena je apsorbancija pri 765 nm. Mjerenja su provedena u dva paralelna mjerenja, a slijepa proba je napravljena sa svakom šaržom mjerenja tako da je umjesto uzorka dodano 20 µL metanola.

Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline. Baždarna krivulja izrađena je u rasponu koncentracija galne kiseline od 0,1 do 1,0 mg/mL na 6 koncentracijskih razina u ovisnosti o apsorbanciji izmjerenoj pri 765 nm. Za izradu baždare krivulje je u reakciju umjesto uzorka dodano 20 µL otopine galne kiseline. Mjerenja su provedena u tri paralelna mjerenja.

### 3.4. DPPH metoda

Kemikalije, oprema i uređaji:

- metanol, J. T. Baker
- mikrokivete
- pipetman, Eppendorf
- DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil), Aldrich
- spektrofotometar, UV/VIS Spectrometer Lambda 35, PerkinElmer
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina), 97 %, Aldrich

Postupak:

U kivetu je dodano 20  $\mu\text{L}$  uzorka, 950  $\mu\text{L}$  0,06 mM otopine DPPH te je kiveta promućkana. Slijepa proba je pripremljena s 20  $\mu\text{L}$  metanola umjesto ekstrakta i napravljena je sa svakom šaržom mjerenja. Nakon 30 minuta stajanja u mraku izmjerena je apsorbancija pri 517 nm. Mjerenja su provedena u dva paralelna mjerenja.

Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata Troloxa. Baždarna krivulja izrađena je u rasponu koncentracija Troloxa od 0,01 do 0,2 mg/mL na 6 koncentracijskih razina u ovisnosti o apsorbanciji izmjerenoj pri 517 nm. Za izradu baždarne krivulje je u reakciju umjesto uzorka dodano 20  $\mu\text{L}$  otopine Troloxa. Mjerenja su provedena u tri paralelna mjerenja.

### 3.5. FRAP metoda

Kemikalije, oprema i uređaji:

- metanol, J.T.Baker
- mikrokivete
- pipetman, Eppendorf
- $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , željezov(III) klorid heksahidrat, Kemika
- TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazin), Alfa Aesar
- $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ , natrij acetat trihidrat, Lachner
- ledena octena kiselina, Carlo Erba
- klorovodična kiselina, 37 %, Carlo Erba

- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina), 97 %, Aldrich
- spektrofotometar, UV/VIS Spectrometer Lambda 35, PerkinElmer

Postupak:

FRAP reagens pripremljen je miješanjem 20 mM FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 10 mM TPTZ s 40 mM HCl i 300 mM acetatnim puferom u omjeru 1 : 1 : 10. U mikrokivetu je otpipetirano 20 µL ekstrakta i dodano je 1 mL FRAP reagensa. Slijepa proba je pripremljena sa svakom šaržom mjerenja tako da se dodalo 20 µL metanola umjesto ekstrakta. Nakon 4 minute reakcije izmjerena je apsorbancija pri 593 nm. Mjerenja su provedena u dva paralelna mjerenja.

Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata Troloxa. Baždarna krivulja izrađena je u rasponu koncentracija Troloxa od 0,01 do 0,2 mg/mL na 6 koncentracijskih razina u ovisnosti o apsorbanciji izmjerenoj pri 593 nm. Za izradu baždarne krivulje je u reakciju umjesto uzorka dodano 20 µL otopine Troloxa. Mjerenja su provedena u tri paralelna mjerenja.

### **3.6. Obrada rezultata**

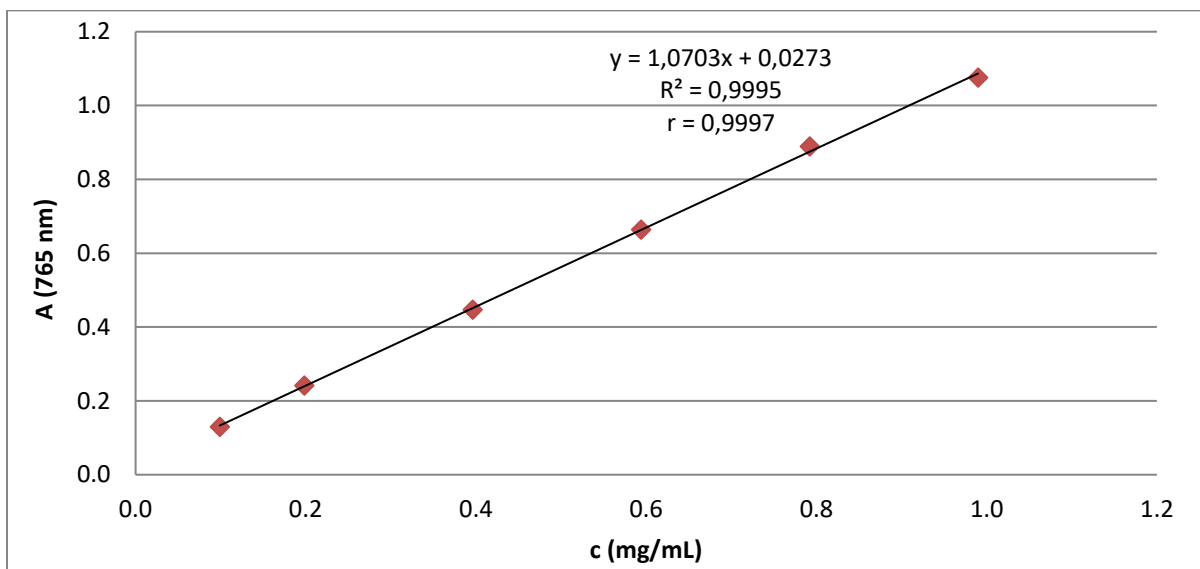
Rezultati analiza obrađeni su u programu MS Excel 2010. Statistička analiza obuhvaćala je jednosmjernu analizu varijance, uz *post hoc* Tukey test ( $\alpha = 0,05$ ), a provedena je pomoću programa Statistica 8 (Stat Soft Inc., USA).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom završnom radu određivana je antioksidativna aktivnost i udio fenolnih spojeva u kriomljevenim i enzimski tretiranim heljdinim ljuskama te su rezultati prikazani grafički (slike 11., 13. i 15.).

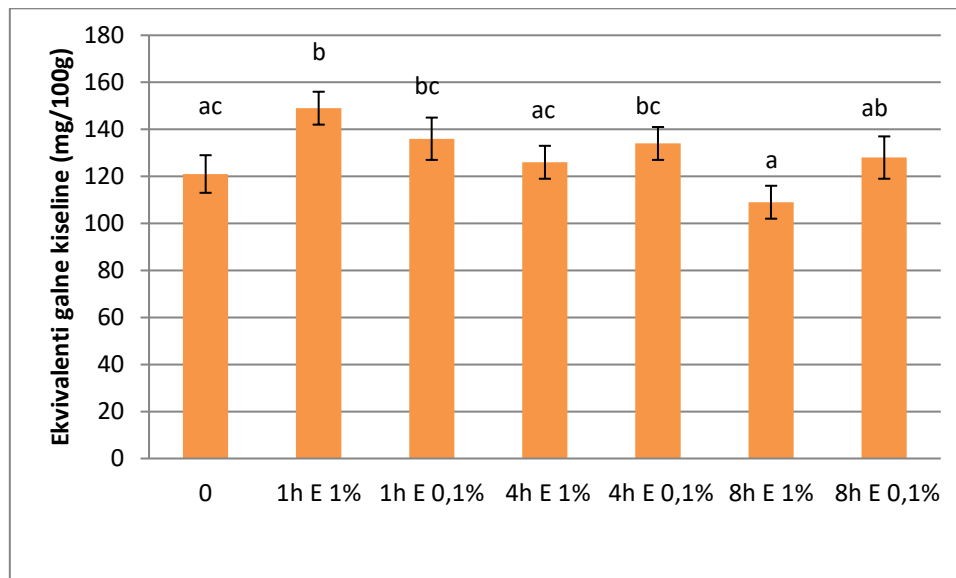
### 4.1. Udio ukupnih fenolnih spojeva

Na slici 10. prikazan je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o masenoj koncentraciji galne kiseline. Jednadžba pravca glasi  $y = 1,0703x + 0,0273$  gdje x predstavlja koncentraciju ekvivalenata galne kiseline izraženu u mg/mL, a y apsorbanciju mjerenu pri 765 nm.



Slika 10. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o masenoj koncentraciji galne kiseline

Na slici 11. prikazani su rezultati dobiveni korištenjem TPC metode koji se odnose na udio fenolnih spojeva u analiziranim uzorcima heljdinih ljuski.



Slika 11. Udio fenolnih spojeva dobiven korištenjem TPC metode

Iz dobivenih rezultata utvrđeno je da kod uzoraka koji su tretirani enzimima u koncentraciji 0,1 % ne dolazi do znatnih promjena udjela fenolnih spojeva produljenjem vremena tretmana. Kod uzoraka tretiranih enzimima u koncentraciji 1 % dolazi do smanjenja udjela fenolnih spojeva produljenjem vremena tretmana – 15,44 % nakon 4 h te 28,86 % nakon 8 h, u odnosu na tretman 1 h.

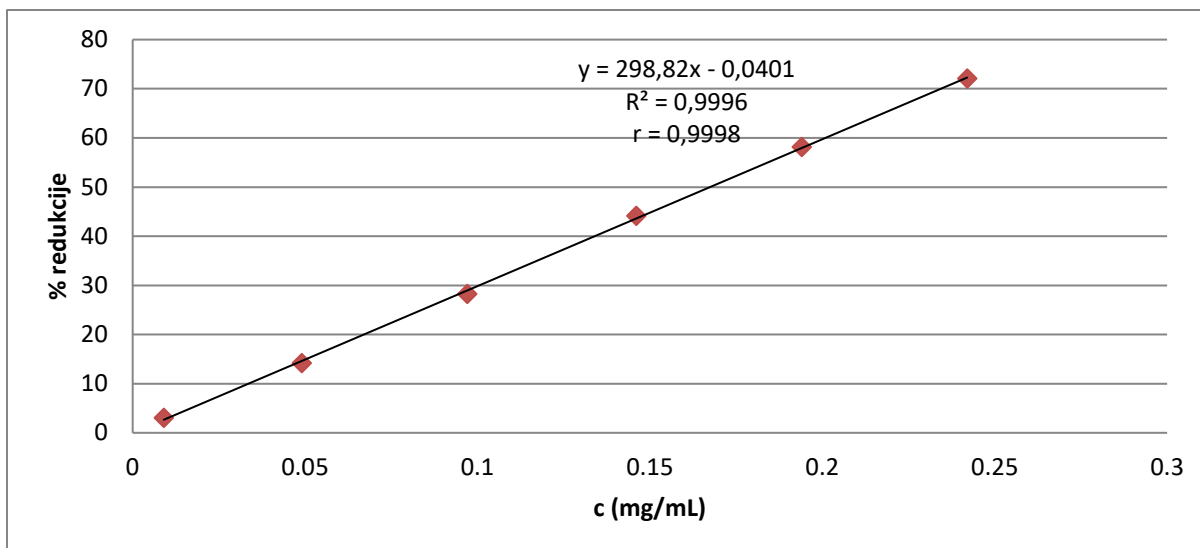
S obzirom na koncentraciju enzima koja je korištena u tretmanima, nije utvrđena razlika među uzorcima.

U usporedbi s netretiranim uzorkom, značajno povećanje udjela fenolnih spojeva utvrđeno je jedino kod uzorka tretiranog 1 h pri koncentraciji enzima 1 %, a koje iznosi 18,79 %.

## 4.2. Antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom

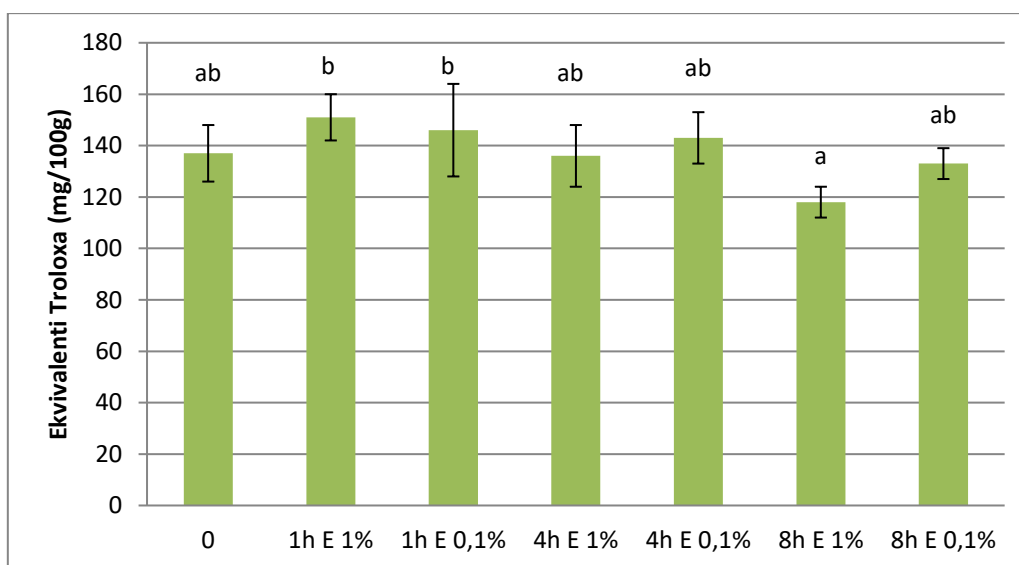
Na slici 12. prikazan je baždarni dijagram ovisnosti postotka redukcije o masenoj koncentraciji Troloxa. Jednadžba pravca glasi  $y = 298,82x - 0,0401$  gdje y predstavlja stupanj redukcije, a x koncentraciju Troloxa u mg/mL te iz dijagrama vidimo da stupanj redukcije raste proporcionalno s povećanjem koncentracije.





Slika 12. Baždarni dijagram ovisnosti postotka redukcije o masenoj koncentraciji Troloxa

Na slici 13. nalaze se rezultati dobiveni korištenjem DPPH metode koji prikazuju antioksidativnu aktivnost u analiziranim uzorcima.



Slika 13. Antioksidativna aktivnost dobivena korištenjem DPPH metode

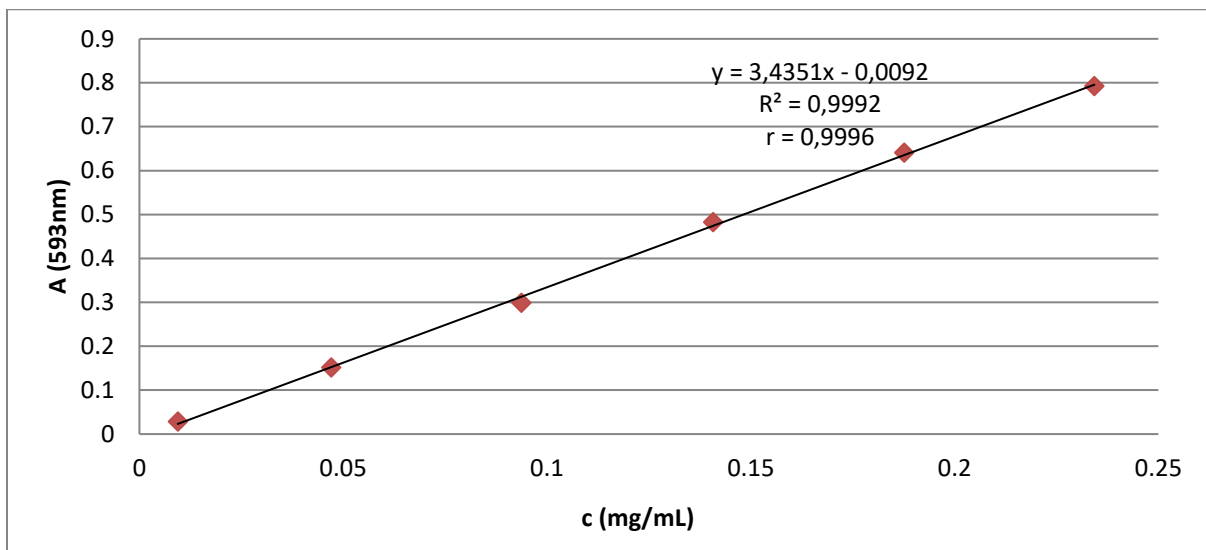
Uspoređujući antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom s obzirom na vrijeme trajanja tretmana, utvrđeno je da primjenom koncentracije enzima od 1 % dolazi do pada antioksidativne aktivnosti od 21,85 % produljenjem vremena tretmana s 1 h na 8 h, dok kod koncentracije 0,1 % produljenje vremena ne dovodi do značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti među uzorcima.

Promjena koncentracije enzima korištene prilikom tretmana ne utječu značajno na antioksidativnu aktivnost.

Antioksidativna aktivnost svih tretiranih uzoraka ne razlikuje se značajno od netretiranog uzorka.

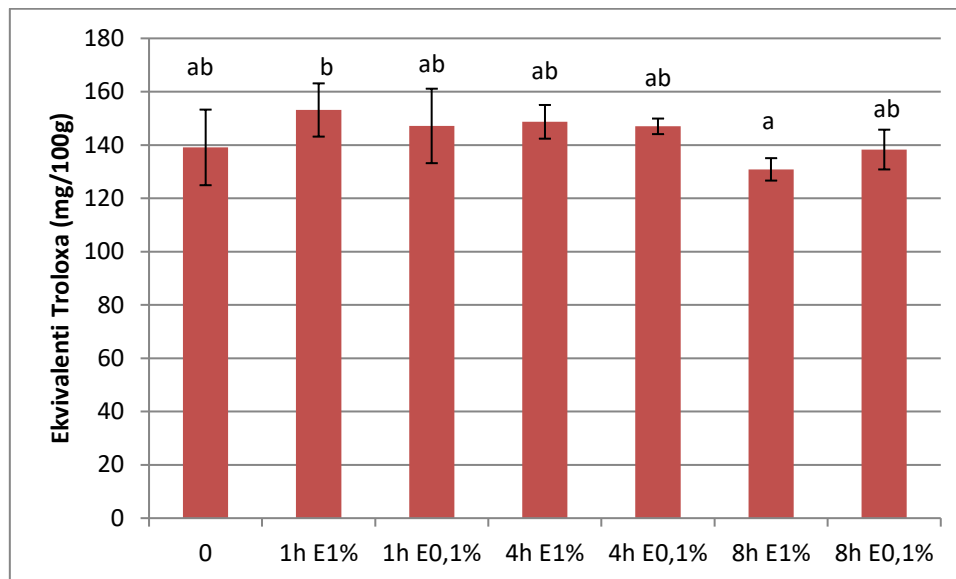
### 4.3. Antioksidativna aktivnost određena FRAP metodom

Na slici 14. prikazan je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o masenoj koncentraciji Troloxa. Jednadžba pravca glasi  $y = 3,4351x - 0,0092$ , gdje y predstavlja izmjerenu apsorbanciju pri 593 nm, a x koncentraciju Troloxa izražen u mg/mL te se isto kao i kod prethodnih metoda može zaključiti da apsorbancija raste proporcionalno s povećanjem koncentracije.



Slika 14. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o masenoj koncentraciji Troloxa

Na slici 15. nalaze se rezultati dobiveni korištenjem FRAP metode koji prikazuju antioksidativnu aktivnost u analiziranim uzorcima.



Slika 15. Antioksidativna aktivnost dobivena korištenjem FRAP metode

Rezultati FRAP metode u skladu su s onima dobivenim DPPH metodom. Produljenjem vremena tretmana s 1 h na 8 h korištenjem koncentracije enzima od 1 % dolazi do pada antioksidativne aktivnosti u iznosu od 14,37 %, a kod primjene koncentracije enzima od 0,1 % nije utvrđena značajna razlika.

Uzevši u obzir isključivo primijenjenu koncentraciju enzima, nisu utvrđene razlike u antioksidativnoj aktivnosti među uzorcima.

Antioksidativna aktivnost svih tretiranih uzoraka ne razlikuje se značajno od netretiranog uzorka.

Prema istraživanju koje su proveli Sedej i suradnici gdje su usporedili antioksidativnu aktivnost i udio fenolnih spojeva različitih vrsta žitarica, heljda ima najveći udio fenolnih spojeva te najveću antioksidativnu aktivnost koja je vezana za vanjski dio zrna (60). Do oslobađanja i time povećanja udjela fenolnih spojeva kao što je dobiveno i u rezultatima ovog rada te povećanja antioksidativne aktivnosti dolazi tretmanom s enzimima što su dokazali Bartolome i Gomez-Cordoves tako da su ječam tretirali različitim vrstama enzima, među kojima su i celulaze i hemicelulaze (61). Također u istraživanju koje su proveli Alrahmany i Tsopmo u kojem su zobene mekinje tretirane celulazom i hemicelulazom i potom

podvrgnute metodama mjerenja, između ostalog udjela fenolnih spojeva i antioksidativne aktivnosti, dokazano je da se tretmanom enzimima taj udio povećava, što je dobiveno i u ovom radu (62). Slično tomu istraživanju proveli su i Vong, Lim i Liu koji su tretirali ostatke soje enzimima celulazom i hemicelulazom pri čemu je došlo do povećanja udjela fenolnih spojeva te je ujedno dokazano da se enzimskim tretmanom povećava bioraspoloživost poželjnih spojeva iz hrane (63). Osim navedenih, s rezultatima ovog rada slažu se i rezultati istraživanja Wanyoa, Meesoa i Siriamornpuna provedenog na rižinim ljuskama i mekinjama koje su tretirane celulazom gdje je također došlo do povećanja udjela fenolnih spojeva, međutim nije utvrđena korelacija između udjela fenolnih spojeva i antioksidativne aktivnosti (64). Povezanost udjela fenolnih spojeva i antioksidativne aktivnosti, dobivena je u istraživanju na različitim vrstama voća, povrća i žitarica koje su proveli Velioglu, Mazza i Oomah (65) što se također poklapa s dobivenim rezultatima.

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobivenih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti sljedeće:

- ❖ Tretmanom kriomljevenih heljdinih ljuski enzimima celulazom i hemicelulazom dolazi do promjene udjela fenolnih spojeva.
- ❖ Produljenjem vremena tretmana s dodatkom 1 % enzima dolazi do smanjenja udjela fenolnih spojeva i antioksidativne aktivnosti, dok kod uzoraka tretiranih s dodatkom 0,1 % nije utvrđen značajni utjecaj vremena tretmana.
- ❖ Primijenjena različita koncentracija enzima (0,1 % i 1 %) nije utjecala na značajnu razliku udjela fenolnih spojeva i antioksidativnu aktivnost tretiranih uzoraka.
- ❖ U odnosu na netretirane ljuske heljde, u enzimski tretiranim ljuskama nije utvrđena značajna promjena antioksidativne aktivnosti.
- ❖ Najveći udio fenolnih spojeva utvrđen je u ljuskama heljde tretiranim s dodatkom 1 % enzima tijekom 1 h.
- ❖ Fenolni spojevi i njihova antioksidativna aktivnost imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje pa je poželjno konzumirati hranu bogatu takvim spojevima kako bi se organizam dodatno zaštitio od svakodnevnog utjecaja slobodnih radikala.

## 6. LITERATURA

---

1. Ikeda K. (2002) Buckwheat composition, chemistry and processing. *Advances in Food and Nutrition Research* **44**: 395 – 434.
2. Lin L.-Y., Liu H.-M., Yu Y.-W., Lin S.-D., Mau J.-L. (2009) Quality and antioxidant property of buckwheat enhanced wheat bread. *Food Chemistry* **112**: 987 – 991.
3. Şensoy İ., Rosen R. T., Ho C.-T., Karwe M. V. (2006) Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry* **99**: 388 – 393.
4. Steadman K. J., Burgoon M. S., Lewis B. A., Edwardson S. E., Obendorf R. L. (2001) Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**: 1094 – 1100.
5. Kuijsten A., Arts I. C. W., van't Veer P., Hollman P. C. H. (2005) The Relative Bioavailability of Enterolignans in Humans Is Enhanced by Milling and Crushing of Flaxseed. *The Journal of Nutrition* **135**: 2812 – 2816.
6. Sytar O., Brestic M., Zivcak M., Phan Tran L.S. (2016) The contribution of buckwheat genetic resources to health and dietary diversity. *Current genomics* **17**: 193 – 206.
7. Nam T.-G., Lee S. M., Park J.-H., Kim D.-O., Baek N., Eom S. H. (2015) Flavonoid analysis of buckwheat sprouts. *Food Chemistry* **170**: 97 – 101.
8. Cai Y. Z., Corke H., Wang D., Li W. D. (2016) Buckwheat: overview. U: Encyclopedia of Food Grains, 2. izd., Wrigley C. W., Corke H., Seetharaman K., Faubion J., ur., Elsevier, str. 307 – 315.
9. Mazza G., Oomah B. D. (2003) Buckwheat. U: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition 2. izd., Caballero B., Finglas P., Toldra F., ur., Elsevier, str. 692–699.

- 
10. Fritz S. B., Gold B. L. (2003) Buckwheat pillow-induced asthma and allergic rhinitis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **90**: 355 – 358.
11. Junghare H., Hamjade M., Patil C. K., Girase S. B., Lele M. M. (2017) A review on Cryogenic Grinding. *International Journal of Current Engineering and Technology, Special Issue-7*, str. 420 – 423.
12. Hemery Y., Chaurand M., Holopainen U., Lampi A. M., Lehtinen P., Piironen V., Sadoudi A., Rouau X. (2011) Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part I: Influence of ultra-fine grinding. *Journal of Cereal Science* **53**: 1 – 8.
13. Dhital S., Shrestha A. K., Flanagan B. M., Hasjim J., Gidley M. J. (2011) Cryo-milling of starch granules leads to differential effects on molecular size and conformation. *Carbohydrate Polymers* **84**: 1133 – 1140.
14. Hemery Y., Mabilhe F., Martelli M. R., Rouau X. (2010) Influence of water content and negative temperatures on the mechanical properties of wheat bran and its constitutive layers. *Journal of Food Engineering* **98**: 360 – 369.
15. RETSCH – Laboratory Mills, Crushers and Sieve Shakers, <[www.retsch.com](http://www.retsch.com)> Pristupljeno 04. lipnja 2019.
16. Pine H. S. (1994) Slobodni radikali. U: *Organska kemija*, 3. izd., Runje V., Bešelić D., ur., Školska knjiga, str. 909 – 937
17. Beta T., Duodu K. G. (2016) Bioactives: Antioxidants. U: *Encyclopedia of Food Grains*, 2. izd., Wrigley C. W., Corke H., Seetharaman K., Faubion J., ur., Elsevier, str. 277 – 282.
18. Medical News Today: Health News, <[www.medicalnewstoday.com](http://www.medicalnewstoday.com)> Pristupljeno 04. lipnja 2019.
19. Asimi O. A., Sahu N. P., Pal A. K. (2013) Antioxidant capacity of crude water and ethyl acetate extracts of some Indian species and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*. *Journal Of Medicinal Plants Research* **7**: 1907 – 1915.

- 
20. Gopalakrishnan V. K., Starlin T. (2013) Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* Wight and Arn.–an in vitro study. *Asian Journal Of Pharmaceutical and Clinical Research* **6**: 68 – 71.
21. Srdić-Rajić T., Konić Ristić A. (2016) Antioxidants: Role on Health and Prevention. Encyclopedia of Food and Health, 1. izd., Caballero B., Finglas P., Toldra F., ur., Elsevier, str. 227 – 233.
22. Jones A., Pravadali-Cekic S., Dennis G. R., Bashir R., Mahon P. J., Shalliker R. A. (2017) Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography. *Analytica Chimica Acta* **967**: 93 – 101.
23. Bolanos de la Torre A. A. S., Henderson T., Nigam P. S., Owusu-Apenten R. K. (2015) A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chemistry* **174**: 119 – 123.
24. Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K. (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 3122 – 3128.
25. Huang D., Ou B., Prior R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 841 – 850.
26. Prior R. L., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 3101 – 3113.
27. Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science, <[www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)> Pristupljeno 04. lipnja 2019.

- 
28. Malta L. G., Liu R. H. (2014) Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements. U: *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 1. izd., Van Alfen N. K., ur., Elsevier, str. 305 – 314.
29. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 152 – 178.
30. Dawidowicz A. L., Wianowska D., Olszowy M. (2012) On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry* **131**: 1037 – 1043.
31. Mishra K., Ojha H., Chaudhury N. K. (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* **130**: 1036 – 1043.
32. Casanovas E. M., Fasciglione G., Barassi C. A. (2015) Azospirillum spp. and related PGPRs inocula use in intensive agriculture. U: *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols*, Cassán F. D., Okon Y., Creus C. M., ur., Springer International Publishing Switzerland, str. 447 – 467.
33. Bravo L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317 – 333.
34. Pandey K. B., Rizvi S. I. (2009) Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**: 270 – 278.
35. Mathew S., Abraham T. E., Zakaria Z. A. (2015) Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *Journal of Food Science and Technology* **52**: 5790 – 5798.
36. Kazazić S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiva Higijene Rada i Toksikologije* **55**: 279 – 290.



- 
37. Cory H., Passarelli S., Szeto J., Tamez M., Mattei J. (2018) The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition* **5**: 87.  
doi.org/10.3389/fnut.2018.00087
38. Tsao R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **12**: 1231 – 1246.
39. Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B. (2008) Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **7**: 1089 – 1099.
40. Gharras H. E. (2009) Polyphenols: food sources, properties and applications. *International Journal of Food Science and Technology* **44**: 2512 – 2518.
41. Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. (2006) Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview, U: Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet, 1. izd, Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H., ur., Blackwell Publishing Ltd. str. 3.
42. Chandrasekara A. (2019) Phenolic Acids. U: Encyclopedia of Food Chemistry, 1. izd., Varelis P., Melton L., Shahidi F., ur., Elsevier, str. 535 – 545.
43. Robbins R.J. (2003) Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 2866 – 2887.
44. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**: 727 – 747.
45. Aryee A. N. A., Agyei D., Akanbi T. O. (2019) Food for Oxidative Stress Relief: Polyphenols. U: Encyclopedia of Food Chemistry, 1. izd., Varelis P., Melton L., Shahidi F., ur., Elsevier, str. 392 – 398.
46. Moreno J., Peinado R. (2012) Polyphenols. U: Enological Chemistry, 1. izd, Moreno J., Peinado R., ur., Elsevier, str. 53 – 76.

- 
47. Valavanidis A., Vlachogianni T. (2013) Plant Polyphenols. *Studies in Natural Products Chemistry* **39**: 269 – 295.
48. Pietta P., Minoggio M., Bramati L. (2003) Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry* **28**: 257 – 312.
49. Chung K. T., Wong T. Y., Wei C.-I., Huang Y.-W., Lin Y. (1998) Tannins and Human Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **38**: 421 – 464.
50. Zhang Y., He S., Simpson B.K. (2018) Enzymes in Food Bioprocessing – novel food enzymes, applications, and related techniques. *Current Opinion in Food Science* **19**: 30 – 35.
51. Singh P., Kumar S. (2019) Microbial Enzyme in Food Biotechnology. U: Enzymes in Food Biotechnology, 1. izd., Kuddus M., ur., Elsevier, str. 19 – 28.
52. Singh R., Singh A., Sachan S. (2019) Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes?. U: Enzymes in Food Biotechnology, 1. izd., Kuddus M., ur., Elsevier, str. 827 – 843.
53. Reig M., Toldrá F. (2019) Use of Enzymes to Preserve Food. U: Encyclopedia of Food Security and Sustainability, 1. izd., Ferranti P., Berry E., Jock A., ur., Elsevier, str. 511 – 517.
54. Simpson B.K., Rui X., Klomklo S. (2012) Enzymes in food processing. U: Food Biochemistry and Food Processing, 2. izd., Simpson B.K., ur., John Wiley & Sons, Inc. str. 181 – 206.
55. Wilson D. B. (2009) Cellulases. U: Encyclopedia of Microbiology, 3. izd., Schmidt T., ur., Elsevier, str. 252 – 258.
56. Meena M., Zehra A., Dubey M. K., Aamir M., Upadhyay R. S. (2018) Penicillium Enzymes for the Food Industries. U: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, 1. izd., Gupta V., ur., Elsevier, str. 167 – 186.
57. Karmakar M., Ray R.R. (2011) Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. *Research Journal of Microbiology* **6**: 41 – 53.

- 
58. Shallom D., Shoham Y. (2003) Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 219 – 228.
59. Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science, <[www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)> Pristupljeno 04. lipnja 2019.
60. Sedej I., Sakač M., Mandić A., Mišan A., Tumbas V., Hadnađev M. (2011) Assessment of antioxidant activity and rheological properties of wheat and buckwheat milling fractions. *Journal of Cereal Science* **54**: 347 – 353.
61. Bartolome B., Gomez-Cordoves C. (1999) Barley spent grain: release of hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric acids) by commercial enzyme preparations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**: 435 – 439.
62. Alrahmany R., Tsopmo A. (2012) Role of carbohydrases on the release of reducing sugar, total phenolics and on antioxidant properties of oat bran. *Food Chemistry* **132**: 413 – 418.
63. Vong W. C., Lim X. Y., Liu S.-Q. (2017) Biotransformation with cellulase, hemicellulase and *Yarrowia lipolytica* boosts health benefits of okara. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**: 7129 – 7140.
64. Wanyo P., Meeso N., Siriamornpun S. (2014). Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice husk. *Food Chemistry* **157**: 457 – 463.
65. Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 4113 – 4117.