Antioksidativna aktivnost komine masline u modelu mesa

Vuletić, Mara

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:388357

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Mara Vuletić

Antioksidativna aktivnost komine masline u modelu mesa

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je prijavljen na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2014-09-9143.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Također hvala asistenticama Kristini Radić, Sanji Jurmanović i tehničarki Gordani Blažinić sa „Zavoda za kemiju prehrane " na ugodnim druženjima i velikoj pomoći.

Isto tako, zahvalila bih se svim prijateljima i kolegama koji su mi bili podrška i bez kojih studij ne bi prošao tako zabavno.

Na kraju najveće hvala mojoj obitelji, ocu Anti, majci Jasminki, sestri Antoniji, baki Aniti i dečku Miranu, na velikoj potpori, pomoći i ljubavi koju su mi pružali tijekom cijelog studija.

KRATICE

4-HNE – 4-hidroksinonenal

BHA – butilhidroksianisol

BHT – butilhidroksitoluen

HP-β-CD – hidroksipropil-β-ciklodekstrin

MAA – malondialdehid - acetaldehid adukti

MDA – malondialdehid

RAMEB-CD – nasumično metilirani β-ciklodekstrin

TBA – tiobarbiturna kiselina

TBARS – reaktivne specije tiobarbiturne kiseline

TBHQ – tert-butilhidrokinon

TXA_2 – tromboksan A_2

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 MASLINA 2
1.2. DOBIVANJE MASLINOVOG ULJA I OTPADNIH PRODUKATA 3
1.3. KOMINA MASLINE 4
1.3.1. Polifenoli 5
1.4. LIPIDNA PEROKSIDACIJA 7
1.4.1. Produkti lipidne peroksidacije 8
1.4.2. Malondialdehid 8

2. OBRAZLOŽENJE TEME 11

3. MATERIJALI I METODE 12

3.1. MATERIJALI 12
3.1.1. Kemikalije 12
3.1.2. Instrumenti i oprema 12
3.1.3. Uzorci komine masline 13
3.1.4. Priprema ekstrakata komine masline 14
3.1.4.1. Ciklodekstrini 15
3.2. TEST S TIOBARBITURNOM KISELINOM (TBA TEST) 16
3.3. OPTIMIZACIJA METODE MJERENJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U MODELU MESA 17

4. REZULTATI I RASPRAVA 19

4.1. KALIBRACIJSKA KRIVULJA MDA 19
4.2. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA KOMINE I BHA 21
4.2.1. Priprema uzoraka za mjerenje 21
4.2.2. Obrada rezultata mjerenja 24
4.2.3. Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakata komine 25
4.3. USPOREDBA REZULTATA I RASPRAVA 31

5. ZAKLJUČAK 34

6. LITERATURA 35

7. SAŽETAK 37

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

1. UVOD

Tijekom proizvodnje, prerade, distribucije i skladištenja, hrana podliježe kemijskim i mikrobiološkim promjenama. Lipidna oksidacija u mesu jedan je od glavnih razloga njegovog propadanja. Radikali prisutni u procesu oksidacije, dovode do stvaranja aldehida odgovornih za promjenu boje i okusa mesa. Kompleksan mehanizam oksidacije utječe tako ne samo na fosfolipide membrane već i na same proteine mesa.

Različiti sintetički antioksidansi kao npr. BHA, BHT, TBHQ su već duže vremena u upotrebi. Njihove prednosti su efikasnost, visoka stabilnost i niska cijena. Danas se međutim sve više teži pronaći prirodne antioksidanse čiji bi izvor bile različite biljke. Problem je što su takvi antioksidansi manje efikasni, skuplji i na njihov sastav značajno utječu uvjeti uzgoja biljke.

Ovaj rad bavi se istraživanjem antioksidativne aktivnosti suhog ekstrakata komine masline na modelu mesa. Postoji nekoliko metoda kvantifikacije produkata lipidne peroksidacije, a ovdje je korištena metoda koja mjeri količinu formiranog malondialdehida pomoću tiobarbiturne kiseline.

Već je dugi niz godina poznato da je maslinovo ulje važan izvor antioksidansa u ljudskoj prehrani. Takva svojstva se većinom mogu pripisati oleinskoj kiselini i fenolnim komponentama koje ne samo da djeluju antioksidativno već i protuupalno, antiproliferativno i antiaterogeno (Ramos i sur., 2013). Zaboravlja se međutim da tijekom proizvodnje maslinovog ulja, veliki udio fenolnih spojeva zaostaje u otpadnim produktima. Otpadnih produkata nastaje mnogo, oni su štetni za okoliš budući da djeluju na mikroorganizme u tlu i vodi ali dovode i do emisije fenola i sumporovog dioksida. Zbog svega navedenog potrebno ih je primjereno zbrinuti što je proizvođačima maslinovog ulja dodatan trošak. Danas se tako budi veliki interes za iskorištavanjem potencijala bioaktivnih sastavnica otpada maslinovog ulja, kako u prehrambenoj industriji tako i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

1.1 Maslina

Rod maslina (*Olea*) sadrži oko 40 vrsta, no u cijeloj Europi može se naći samo jedna vrsta *Olea europea L.* Ostale su rasprostranjene po Africi i Aziji i daleko su manjeg značaja. *Olea europea* je zimzeleni grm ili stablo koje naraste i do 10 metara visine.

Kora je na početku glatka, sivkasta, kasnije postane kvrgava i ispuca u tamne ljuske. Listovi su nasuprotni, kožnati, cjelovitog ruba, duguljasti, na kratkoj peteljci, na naličju srebreno sivi. Cvjetovi rastu iz pazušca listova, skupljeni su u cvatove, dvospolni su i jednodomni. Cvatnja se odvija u travnju i svibnju. Plod je mesnata, jajasta koštunica, duga 1 do 3 cm i široka 2 cm. Nezreli plod je zelene boje, a kasnije postaje modar, crn ili smeđe zelen. Dozrijeva u rujnu i listopadu.

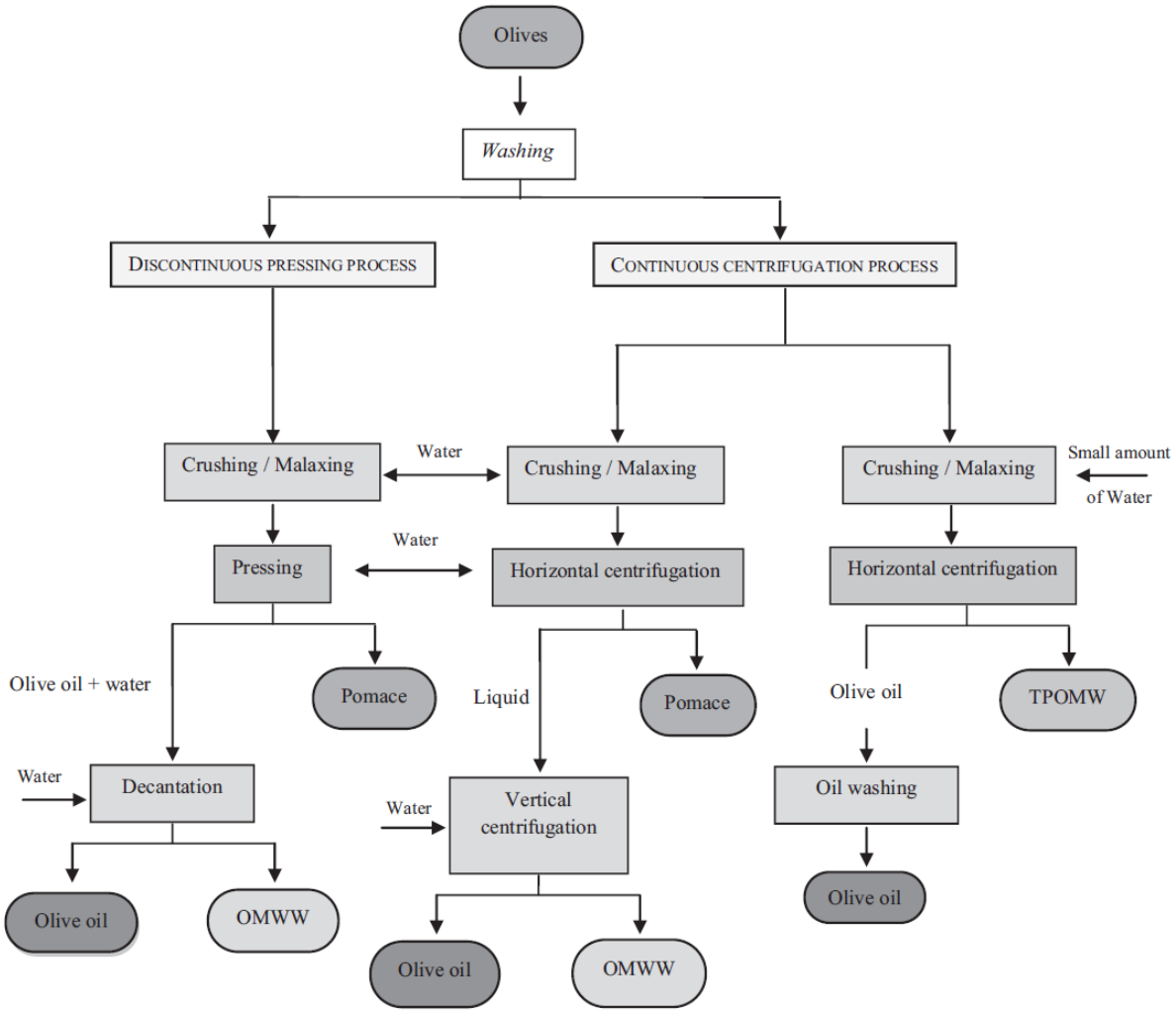
Maslina se uzgaja već tisućama godina i to uglavnom na Sredozemlju. U Dalmaciji je to glavna voćna kultura, njezinim uzgojem bavi se 45 % obitelji u priobalju i čak 98 % obitelji na otocima. Koriste se i plod i listovi. Listovi se beru tokom cijele godine, a plod samo kada dozrije. List se koristi za snižavanje krvnog tlaka, šećera u krvi i kao diuretik, a nalazimo ga u dodatcima prehrani, čajevima i čajnim mješavinama (www.plantea.com.hr). Plod se koristi uglavnom za dobivanje maslinovog ulja, koje je osnova mediteranske dijete. U današnje vrijeme takav način prehrane postaje sve popularniji zbog pozitivnih učinaka na krvne žile, srce i lipidni profil krvi.

1.2. Dobivanje maslinovog ulja i otpadnih produkata

Plod masline može se podijeliti na tri dijela: epikarp (koža), mezokarp (pulpa) i drvenasti endokarp koji sadrži sjemenke. Za ekstrakciju maslinovog ulja koriste se različite tehnike (Slika 1.), ali su uobičajene: tradicionalno prešanje, trofazni sistem i dvofazni sistem centrifugiranja (Nunes i sur., 2016).

Proces diskontinuiranog prešanja je najstariji i najraširenij, a izvodi se hidrauličnom prešom. Masline se prvo samelju u finu pastu koja se potom nanosi na diskove naslagane jedan iznad drugog u preši. Nakon što se primjeni tlak, stvara se kompaktna čvrsta faza, a tekuća faza (maslinovo ulje i voda) se perkolira. Prednosti ove tehnike su jeftina oprema, jednostavan postupak, malen utrošak vode pa tako i malena količina otpadnih voda nastalih u procesu dobivanja ulja. Nedostatci su diskontinuitet i visoki troškovi radne snage.

U današnje vrijeme tradicionalnu metodu zamijenili su trofazni i dvofazni sustavi. Oni koriste centrifugu kako bi odvojili različite frakcije smjese na temelju njihove razlike u gustoći. Trofazni sustav koristi toplu vodu u svakom koraku centrifuge i time stvara velike količine otpadnih voda. On proizvodi tri frakcije: čvrsti ostatak, maslinovo ulje i otpadne vode. Prednosti su potpuna automatizacija postupka i bolja kvaliteta maslinovog ulja, ali nedostatak je veliki utrošak energije i vode. Kako bi se smanjio volumen dobivenih otpadnih voda i ispiranje fenola iz maslinovog ulja, uveden je ekološki prihvatljiviji dvofazni sistem. On proizvodi dvije frakcije: maslinovo ulje i mokru pastu koja sadrži čvrsti dio i otpadne vode. Danas je ovaj postupak široko korišten u Hrvatskoj (Dermeche i sur., 2013).



Slika 1. Glavni procesi ekstrakcije (preuzeto od: Dermeche i sur., 2013)

1.3. Komina masline

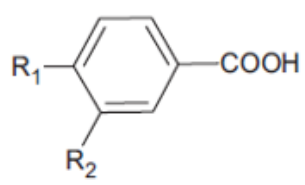
Kada se spominje komina masline, misli se na čvrsti nusprodukt nastao ekstrakcijom maslinovog ulja. Ona može sadržavati kožicu, pulpu, košticu, male količine ulja i vode. S obzirom na vrstu ekstrakcije koja je provedena, komina masline može ima različit postotak vlage. Tako komina dobivena tradicionalnim načinom prešanja sadrži 20-25 % vlage, ona dobivena trofaznim postupkom centrifugiranja 40-45 % vlage, dok ona dobivena dvofaznim postupkom 65-75 % (Dermeche i sur., 2013).

1.3.1. Polifenoli

U fenolne se spojeve ubrajaju mnogi organski spojevi koji sadrže aromatski prsten s jednom ili više supstituiranih hidroksilnih grupa i funkcionalan postraničan lanac. U prirodi ih ima raznih, od jednostavnih fenolnih kiselina, do visoko polimeriziranih spojeva kao što su tanini, a mogu biti i konjugirani sa šećerima, organskim kiselinama, lipidima i drugim fenolima. Fenolni spojevi daju boju cvijeću i plodovima, štite biljku od UV zračenja i sprječavaju oštećenje sjemenki. Ovisno o svojoj strukturi, ti spojevi manifestiraju različito djelovanje. Fenolne spojeve možemo tako podijeliti u nekoliko glavnih skupina: fenolne kiseline i aldehidi, flavonoidi, lignani, stilbeni, tanini i lignini. U komini masline su najzastupljenije fenolne kiseline, sekoiridoidi i flavonoidi (Dermeche i sur., 2013).

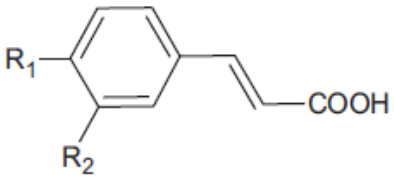
Sastav komine masline je kompleksan i varira ovisno o klimatskim prilikama, uzgoju biljke, skladištenju ploda i procesu ekstrakcije maslinovog ulja. Ipak, istraživanja su pokazala kako postoje spojevi koji su uvijek zastupljeni u većim koncentracijama, neovisno o uvjetima. To su hidroksitirosol, tirosol i oleuropein (Slika 2.). Hidroksitirosol, (3,4-dihidroksifeniletanol) je jak antioksidans. Njegova aktivnost proizlazi iz *o*-difenolne strukture, koja uz pomoć intermolekulske vodikove veze uspješno stabilizira radikale i inhibira lipidnu peroksidaciju. Smatra se da ima važan utjecaj na transport kolesterola (inhibicija peroksidacije LDL molekula) i na kardio-vaskularni sustav. Oleuropein spada u sekoiridoide. To je zapravo ester hidroksitirosola i elenoične kiseline, na koju je vezana glukoza. On stoga posjeduje *o*-difenolnu grupu koja djeluje antioksidativno, otklanjajući dušikov oksid i hipoklornu kiselinu, nastale djelovanjem dušik oksid sintaze i neutrofilne mijeloperoksidaze. Tijekom razvoja ploda masline količine oleuropeina se smanjuju zbog hidrolize komponenata veće molekulske mase, ali se povećavaju zalihe hidroksitirosola, tako da antioksidativna aktivnost ostaje jednaka. Sastavnice kojih ima u manjem postotku su vanilična kiselina, verbaskoid, rutin, kafeična kiselina, luteolin-4-glukozid, 11-metil oleozid, luteolin-7-rutinozid, oleozid.

Postotak komponenti se uvelike razlikuje s obzirom na proces ekstrakcije. Tako otpadne vode, nastale trofaznim procesom centrifugiranja, sadrže samo u vodi topljive supstance – šećere, fenolne spojeve, polialkohole i pektine. Od fenolnih sastavnica u otpadnim vodama, najzastupljeniji su tirosol, hidroksitirosol i oleuropein (Nunes i sur., 2016; Araujo i sur., 2015; Cioffi i sur., 2010; Aldini i sur., 2006).



R_1 = OH R_2 = H 4-hidroksi benzojeva kiselina

R_1 = OH R_2 = OCH_3 vanilična kiselina

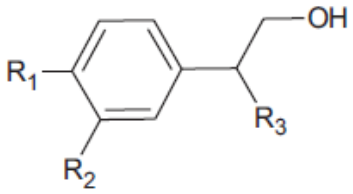


R_1 = H R_2 = H cinamična kiselina

R_1 = OH R_2 = H *p*-kumarinska kiselina

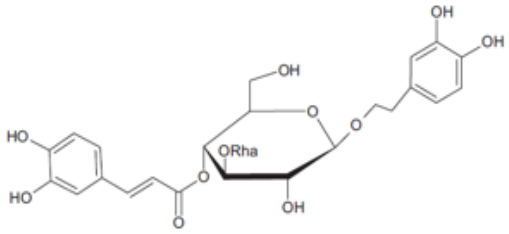
R_1 = OH R_2 = OH kafeinska kiselina

R_1 = OH R_2 = OCH_3 ferulična kiselina

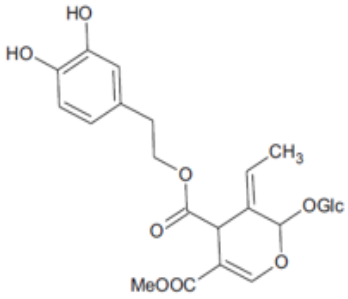


R_1 = OH R_2 = H R_3 = H tirosol

R_1 = OH R_2 = OH R_3 = H hidroksitirosol



Verbaskoid

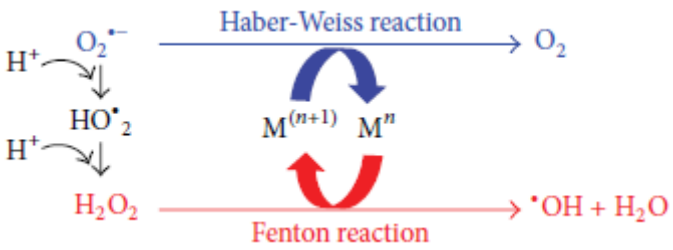


Oleuropein

Slika 2. Kemijske strukture glavnih fenolnih spojeva komine masline (preuzeto od: Dermeche i sur., 2013)

1.4. Lipidna peroksidacija

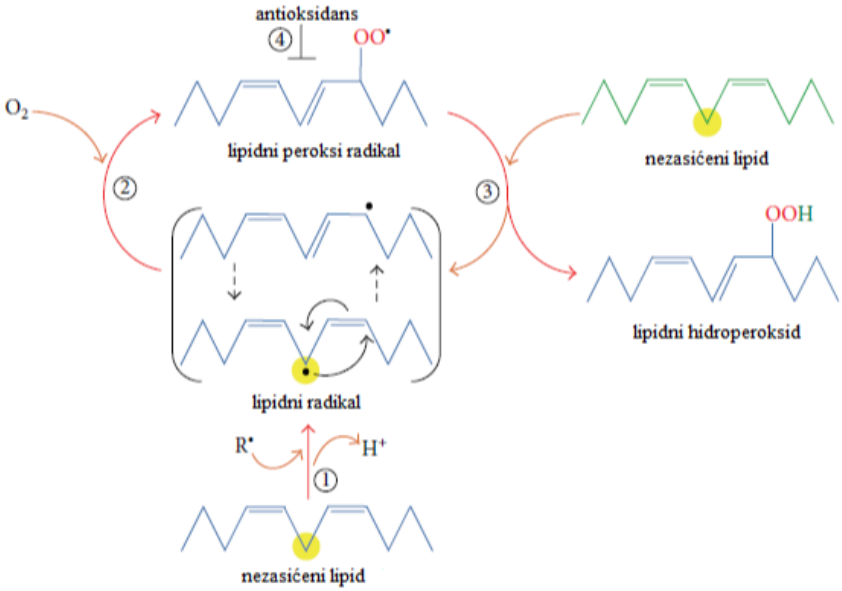
Lipidnu peroksidaciju može se opisati kao proces u kojem oksidansi (slobodni radikali ili neradikalni spojevi) napadaju lipide koji sadrže dvostruku C-C vezu. Glavne mete su glikolipidi, fosfolipidi i kolesterol. Lipidi se također mogu oksidirati enzimatski pomoću lipooksigenaze, ciklooksigenaze i citokroma P450. Za neenzimatsku oksidaciju uglavnom su odgovorni hidroksilni radikal (HO·) i hidroperoksilni radikal ($HO\cdot_2$). Hidroksilni radikal (HO·) je mala, u vodi topljiva, kratko živuća molekula koja u stanici nastaje u uvjetima stresa. Smatra se da nastaje redoks reakcijama – Fentonovom i Haber – Weissovom reakcijom (Slika 3.). Protonirani hidroperoksilni radikal ($HO\cdot_2$) tvori vodikov peroksid (H_2O_2) koji u reakciji s prijelaznim metalima može također dati hidroksilni radikal (HO·).



Slika 3. Nastajanje hidroksilnog (HO·) i hidroperoksilnog radikala ($HO\cdot_2$)

(preuzeto od: Ayala i sur., 2014)

Proces lipidne peroksidacije sastoji se od tri koraka: inicijacije, propagacije i terminacije (Slika 4.). U koraku inicijacije prooksidans kao što je hidroksilni radikal, napada dvostruku vezu lipida, izvlači iz nje vodik i tvori lipidni radikal (L•). Kod faze propagacije, lipidni radikal (L•) brzo reagira s kisikom formirajući lipidni peroksi radikal (LOO·). Lipidni peroksi radikal dalje napada novu lipidnu molekulu i tvori lipidni radikal (L•) i lipidni hidroperoksid (LOOH). Na taj način se održava lančana reakcija. U reakciji terminacije sudjeluje antioksidans koji donira vodikov atom lipidnom peroksi radikalu (LOO·). Pri tom nastaje odgovarajući radikal antioksidansa koji s drugim radikalom tvori neradikalne produkte (Ayala i sur., 2014). Kao odgovor na peroksidaciju membranskih lipida, stanica može pokrenuti reakcije za preživljavanjem ili inducirati staničnu smrt, ovisno u kakvim se metaboličkim uvjetima nalazi.



Slika 4. Proces lipidne peroksidacije (preuzeto od: Ayala i sur., 2014)

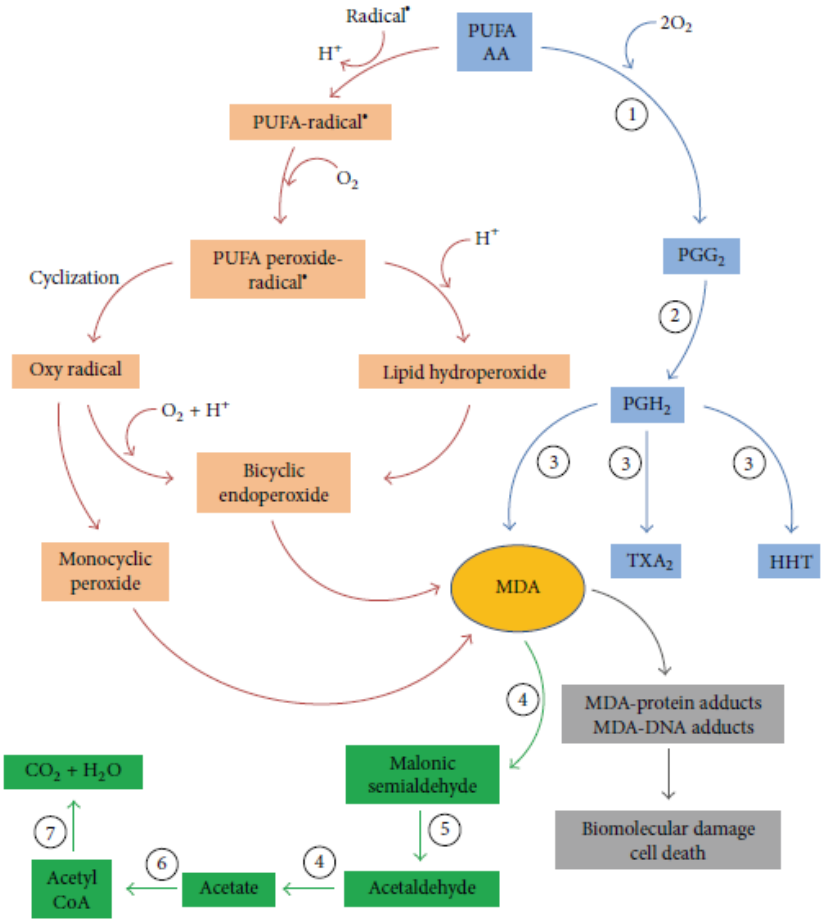
1.4.1. Produkti lipidne peroksidacije

Tijekom lipidne peroksidacije nastaju brojni produkti koje se u grubo može podijeliti na primarne i sekundarne. Glavni primarni produkti su lipidni hidroperoksidi (LOOH) koji nastaju tijekom faze propagacije. Oni se mogu vezati za brojne lipidne strukture kao što su trigliceridi, slobodne masne kiseline, fosfolipidi i steroli. Sudjeluju u reakcijama redukcije koje dovode ili do inhibicije oksidativnog oštećenja ili do indukcije. Ako se prilikom redukcije primaju dva elektrona, dolazi do inhibicije peroksidacije, u suprotnom, primajući samo jedan elektron, oni nastavljaju korak propagacije. Kao glavni sekundarni produkti navode se malondialdehid (MDA), propanal, heksanal i 4-hidroksinonenal (4-HNE). Ispostavilo se kako je MDA najmutageniji produkt peroksidacije dok je 4-HNE najtoksičniji (Ayala i sur., 2014).

1.4.2. Malondialdehid

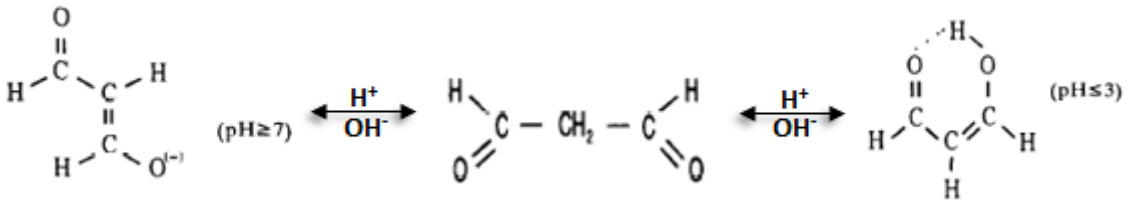
MDA je završni produkt enzimatske ili neenzimatske razgradnje arahidonske kiseline i većih polinezasićenih masnih kiselina. Kod enzimatskog procesa biosinteze tromboksana A_2 (TXA_2), MDA nastaje kao nusprodukt. TXA_2 je biološki aktivni metabolit arahidonske kiseline, a nastaje iz prostaglandina H_2 djelovanjem tromboksan A_2 sintaze.

Neenzimatski način stvaranja MDA je slabo razjašnjen. Smatra se da tijekom lipidne peroksidacije peroksi radikali sa cis-dvostrukom vezom u homoalilnom položaju mogu ciklizirati pri čemu nastaje novi ciklički radikal. On može dalje ciklizirati i davati bicikličke endoperokside, strukturno slične prostaglandinima. Njihovim cijepanjem nastaje MDA. Arahidonska kiselina je glavni prekursor bicikličkih endoperoksida koji onda dalje podliježu reakcijama razgradnje pri čemu se oslobađa MDA (Slika 5.). Ako se već jednom formirani MDA enzimatski ne metabolizira, on će tvoriti adukte s proteinima i DNA, oštećujući tkiva i stanice. Metabolizam MDA uključuje oksidaciju mitohondrijskom aldehid dehidrogenazom uz dekarboksilaciju pri čemu nastaje acetaldehid. On se dalje oksidira do acetata, pa do CO2 i H_2O.



Slika 5. Nastanak i metabolizam MDA (preuzeto od: Ayala i sur., 2014)

MDA je bifunkcionalni elektrofilni aldehid, čija bioaktivnost ovisi o pH. Pri fiziološkom pH, on se nalazi u obliku enolatnog iona (konjugirana baza s negativnim nabojem na kisiku) i slabo je reaktivan (Slika 6.). Smanjenjem pH, reaktivnost mu raste i on prelazi u beta-hidroksiakrolein. Zbog elektrofilne naravi MDA se jako veže za nukleofile kao što su bazične aminokiseline. Reakcija između MDA i slobodne aminokiseline ili proteina daje Schiffove baze ($R_2C=NR'$). Takvi adukti se zovu još i krajnjim produktima uznapredovale lipidne peroksidacije. Acetaldehid (produkt metabolizma MDA), u uvjetima stresa i uz prisutnost MDA, može proizvesti visoko imunogene malondialdehid acetaldehid adukte (MAA). Svi ovi adukti mogu uzrokovati unakrsno povezivanje proteina/DNA te tako dovesti do oštećenja funkcije biomolekula i njihove akumulacije tijekom starenja i kroničnih bolesti. Također se pokazalo da MDA može reagirati i sa nekoliko nukleozida tvoreći adukte. Ako ne dođe do popravka DNA, adukti MDA-DNA mogu dovesti do mutacija, pucanja lanca, zaustavljanja staničnog ciklusa i indukcije apoptoze (Ayala i sur., 2014).



Slika 6. Strukturne promjene MDA u ovisnosti o promjeni pH

(preuzeto od: Fernandez i sur., 1997)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Maslinovo ulje je vrijedan izvor antioksidansa. Njegova proizvodnja raste iz dana u dan, a s njom i količine otpadnih produkata. Komina masline i otpadne vode su bogate fenolnim spojevima koji imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje, ali štetan učinak na okoliš ako se neispravno odlažu.

Obzirom da su nusprodukti ekstrakcije maslinovog ulja bogati potentnim antioksidansima, cilj ovog rada je istražiti mogućnosti korištenja ekstrakata komine masline kao antioksidansa u prehrambenoj industriji. Naime sintetski antioksidansi, kao što su butil-hidroksi anisol (BHA) i butilhidroksitoluen (BHT), se povezuju s dugoročno štetnim učincima na zdravlje (mutagenost, kancerogenost) pa se intenzivno istražuju mogućnosti njihove zamjene sigurnijim, prirodnim spojevima.

Kako antioksidacijska učinkovitost nekog spoja značajno ovisi o matriksu namirnice, izrazito je važno istraživati njegovu mogućnost primjene u modelima hrane koji svojim karakteristikama što više nalikuju kompleksnom matriksu prave namirnice. U okviru ovog istraživanja antioksidacijski potencijal ekstrakata komine masline izražen je na modelu mesa, a metoda koja je korištena za određivanje učinkovitosti ekstrakata komine kao antioksidansa jest tiobarbiturni (TBA) test. Metoda rada je optimira kako bi bila pogodna za istraživanje ekstrakata komine masline. Uspoređene su aktivnosti različitih ekstrakata kako bi se utvrdilo da li način pripreme ekstrakta utječe na antioksidacijsku aktivnost. Određeni su i djelatni koncentracijski rasponi te uspoređeni s onima BHA, koja se u te svrhe standardno koristi.

Dobiveni rezultati doprinijet će trenutnim saznanjima o mogućnostima korištenja ekstrakta komine masline kao antioksidansa u hrani, što je važno i s aspekta poboljšanja sigurnosti hrane i s aspekta rješavanja ekoloških problema vezanih uz neadekvatno odlaganje velikih količina komine u okoliš.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Etanol, p.a., 96 %, Kemika d.o.o, kataloški br.: 1170
- Lauril sulfat, Sigma-Aldrich, kataloški br.: L-5750
- 2-Tiobarbiturna kiselina, ≥98 %, Sigma-Aldrich, kataloški br.: T550-0
- Octena kiselina, p.a., 99.5 %, Kemika d.o.o, kataloški br.: 1500301
- n-Butanol, p.a., Lach-Ner, kataloški br.: 30079
- Hidroksipropilirani derivat β-ciklodekstrina (HP-β-CD): Wacker Chemie GMBH, kataloški br.: 0110193
- Nasumično metilirani derivat β-ciklodekstrina (RAMEB-CD): Wacker Chemie GMBH, Lot – No.:3292
- MDA-tetrabutilamonijeva sol, Sigma-Aldrich, kataloški br.: 63287
- Komina masline, jesen/zima 2017.
- Miješano mljeveno meso, 850 g, PIK Vrbovec
- Pročišćena voda

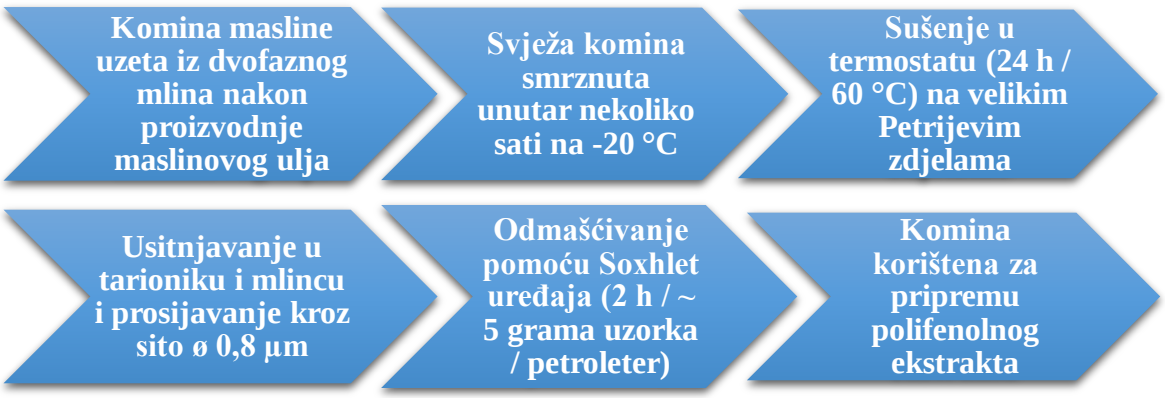
3.1.2. Instrumenti i oprema

- Analitička vaga, Mettler Toledo AB265S
- Laboratorijska peć, Over industrijska elektronika
- Termostatirana kupelj s mućkalicom, Gesellschaft für Labortechnik, tip 1086
- Termostat, INKO
- Soxhlet aparatura, INKO SK6ESS + Petroleum ether, Carlo Erba reagents V7L559307L
- Metalna sita, Prüfsieb DIN 4188
- Büchi Vacuum controller V-800
- Büchi Heating bath B-490
- Vakuum pumpa, Büchi Vac V-500

- Zamrzivač, Zanussi
- Liofilizator, Christ Alpha 1-4 LOC-1 + mast za pomašćivanje, Vacuum grease, Sigma Aldrich 18405
- Vakuum pumpa, Leybold Trivac D 2,5 E + ulje za pumpu, Leybonol LVO 100
- Plamenik, Poligas OMM
- Vortex miješalica, Mixer UZUSIO, tip VTY-3000L
- Štoperica, Oregon scientific, model NO.TR118
- Centrifuga, Centric 322A, Tehtnica
- UV-Vis spektrofotometar, Photometer MA 9510, Iskra

3.1.3. Uzorci komine masline

Komina masline, koja je korištena u ovom radu, dobivena je dvofaznim postupkom centrifugiranja u nekoliko hrvatskih uljara. Prikupljena je u jesen 2017. godine. Svježa komina brzo je zamrznuta na - 20 °C kako bi se onemogućilo raspadanje aktivnih sastavnica, bitnih za ovo istraživanje. Slijedilo je prebacivanje komine u Petrijeve zdjelice i sušenje na 60 °C, 24 h kako bi se uklonila preostala voda. Usitnjavanje je provedeno u tarioniku i pomoću mlina, nakon čega je komina prosijana kroz sito veličine pora 0,8 µm, da se uklone koštice i homogenizira uzorak. Sljedeći cilj je bio ukloniti uljnu komponentu uzorka koja je ometala daljnju analizu. To je postignuto Soxhlet uređajem za odmašćivanje (2 h / ~ 5 grama uzorka / petroleter). Ovim postupcima (Slika 7.) dobiven je sitan, sivkasto-smeđi prah.



Slika 7. Priprema uzorka komine masline

3.1.4. Priprema ekstrakata komine masline

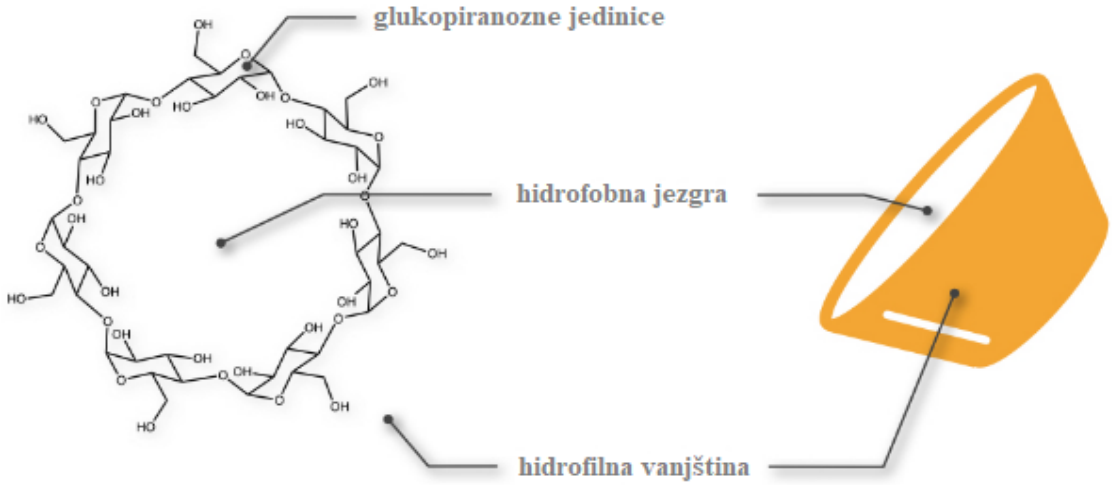
Kako bi se dobio polifenolni ekstrakt, prah komine je potrebno ekstrahirati s 60 %-tnim etanolom, u vodenoj kupelji (2 h / 70 °C / 110 rpm). Postupak je rađen s tri uzorka u Erlenmeyerovim tikvicama od 1000 ml. Prvi uzorak je bio nativni pa je u tikvicu vagano samo 10 g čiste komine, drugi uzorak je sadržavao 10 g komine i 4 g hidroksipropil β-ciklodekstrina (HP-β-CD), dok je treći sadržavao 10 g komine i 4 g nasumično metiliranog β-ciklodekstrina (RAMEB-CD). U svaku od Erlenmeyerovih tikvica je dodano 500 ml 60 %-tnog etanola i ostavljeno da se ekstrahira u vodenoj kupelji 2 h pri 70 °C. Masena koncentracija komine u ekstraktima je iznosila 20 g/L, dok je ona ekscipijensa bila 8 g/L (Tablica1.). Ekstrakti su zatim filtrirani preko naboranog filter papira uz ispiranje pročišćenom vodom. Od svake tikvice je dobiveno 500 ml filtriranog ekstrakta, koji je podijeljen u tri tikvice okruglog dna od 250 ml (u svaku je išlo približno 166,7 ml ekstrakta). Sve tikvice se upariavalo rotavaporom (50 °C / ~ 60 mbar) kako bi se uklonio etanol. On onemogućuje sljedeći korak pripreme uzorka, a to je liofilizacija, sušenje uzorka smrzavanjem na -20 °C (Miao i sur., 2017). Po sušenju uzoraka dobivene su sljedeće masene koncentracije: 50 g/L za suhi nativni ekstrakt komine i 90 g/L za suhe ekstrakte komine s ciklodekstrinima.

Tablica 1. Izrada ekstrakta komine masline

Oznaka uzorka	Odvaga komine/g	Ekscipijens	Odvaga ekscipijensa/g	Volumen ekstrakcijskog sredstva/mL
nativni	10,001		/	500
HP-β	9,994	hidroksipropil-β-ciklodekstrin	3,999	500
RAMEB $_1$	10,001	nasumično metilirani β-ciklodekstrin	3,994	500
RAMEB $_2$	10,004	nasumično metilirani β-ciklodekstrin	4,004	500

3.1.4.1. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi koji se sastoje od šest (α-ciklodekstrin), sedam (β-ciklodekstrin) i osam (γ-ciklodekstrin) ili više glukopiranoznih jedinica povezanih α-(1,4) vezom. Osnovni ciklodekstrini se mogu derivatizirati i to uglavnom aminacijom, esterifikacijom i eterifikacijom primarnih i sekundarnih hidroksilnih grupa. Ovisno o supstituentu koji je dodan, mijenjaju se fizikalno-kemijska svojstva ciklodekstrina. Glavna osobina ciklodekstrina, iz koje proizlaze i ostale, jest sposobnost formiranja krnjeg stošca u prostoru. Hidroksilne grupe su pri tom okrenute prema van, dok unutrašnjost čini hidrofoban kostur glukopiranoznih jedinica (Slika 8.). Zbog navedenog mogu stvarati inkluzijske komplekse s raznolikim molekulama bilo da je riječ o čvrstim tvarima, tekućinama ili plinovima. U inkluzijskim kompleksima, strana molekula ulazi u centralnu šupljinu ciklodekstrina pri čemu ne dolazi do pucanja ili stvaranja novih kovalentnih veza. Glavna sila koja pokreće formaciju kompleksa jest oslobađanje entalpijom bogatih molekula vode iz šupljine. Molekule vode zamjenjuje hidrofobnija molekula koja sada s ciklodekstrinom tvori stabilan kompleks, niže energije. Nastajanje kompleksa ovisi o dva faktora. Prvi je sterički faktor , tj. dobar inkluzijski kompleks nastaje ako je centralna šupljina ciklodekstrina dovoljno velika da može primiti određenu molekulu. Drugi faktor su termodinamičke reakcije između komponenti sustava (ciklodekstrin, molekula koja se uklapa i otapalo).



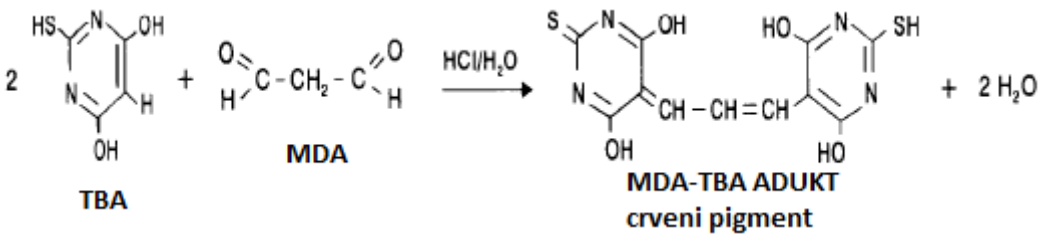
Slika 8. Prikaz građe ciklodekstrina (preuzeto s www.okklo.com)

Inkluzija strane molekule u ciklodekstrin dovodi promjene njenih fizikalno-kemijskih svojstava. Na takav način mogu se poboljšati topljivost molekule, stabilnost, fizička izolacija, kromatografska separacija, ali i oslobađanje ako je riječ o djelatnoj tvari bitnoj u farmaceutskoj industriji (Del Valle, 2014).

Ciklodekstrini koji su korišteni u ovom radu (HP-β i RAMEB), izabrani su na temelju prethodnih spoznaja o njihovom djelovanju u doticaju s kominom (Albahari i sur., 2018).

3.2. Test s tiobarbiturnom kiselinom (TBA test)

MDA se već dugi niz godina koristi kao biomarker lipidne peroksidacije zbog lake reakcije s tiobarbiturnom kiselinom. TBA test se prvotno najviše koristio u kemiji prehrane kako bi se pratila autooksidativna degradacija masti i ulja u prehrambenim proizvodima. Tijekom reakcije dolazi do kondenzacije dvije molekule TBA s jednom molekulom MDA uz izdvajanje H_2O (Slika 9.). Enolni oblik MDA pri tom napada metilnu skupinu TBA i nastaje jarko crveni, fluorescentni adukt. Mjerenjem UV-Vis spektrofotometrije adukta, dobivaju se dva maksimuma apsorbancije. Prvi se nalazi na valnoj duljini od 532-535 nm dok se drugi nalazi na 245-305 nm. Intenzitet obojenja reakcijske smjese je mjera koncentracije nastalog MDA, odnosno lipidne peroksidacije, ali je ujedno i mjera narušenosti organoleptičkih svojstava oksidiranog prehrambenog proizvoda (osobito mesnog). Brzina reakcije TBA s MDA ovisi o koncentraciji TBA u reakcijskoj otopini, o temperaturi i o pH. Povećanjem koncentracije TBA, kuhanjem 60 min i održavanjem pH na 3, skraćuje se vrijeme potrebno da TBA i MDA izreagiraju. Kiseli medij i kuhanje su potrebni ne samo zbog brže reakcije, već i zbog oslobađanja MDA iz svog vezanog oblika (adukti s proteinima, aminokiselinama). Pri tom se može naštetiti stabilnost MDA-TBA kompleksa i uzrokovati probleme točne kvantifikacije MDA.



Slika 9. Mehanizam testa s tiobarbiturnom kiselinom
(preuzeto od: Fernandez i sur., 1997)

Teško je utvrditi optimalne uvjete za određivanje MDA, stoga postoji više vrsta TBA testa. U njih se ubrajaju: metoda direktne reakcije na cijelom uzorku, destilacijska metoda, ekstrakcijska metoda, lipidni ekstrakcijski postupak i spektrofluorimetrijska metoda (Fernandez i sur., 1997). U ovom radu je korištena metoda direktne reakcije na cijelom uzorku. Ona obuhvaća: zagrijavanje uzorka mesa s TBA otopinom u kiselom mediju i ekstrakciju crvenog pigmenta n-butanolom. Metoda je kvantitativna, ali dugotrajna i zbog koraka zagrijavanja i ekstrakcije uzrokuje dodatnu oksidaciju uzorka. Općenito problem TBA testa je nespecifičnost jer tiobarbiturna kiselina reagira s drugim spojevima (TBARS – TBA reaktivni spojevi) kao što su na primjer šećeri, amino kiseline, urea, biliverdin, glioksal, aldehidi. Oni mogu tvoriti komplekse koji će apsorbirati na 530-535 nm, istoj valnoj duljini kao i MDA-TBA kompleks. Kako bi se razlikovalo MDA od ostalih komponenti koriste se još i GC i HPLC metode. Glavno ograničenje ove metode je činjenica da su MDA i drugi produkti lipidne peroksidacije, nestabilne, kratko živuće molekule koje se raspadaju na alkohole i kiseline . Njih je pak nemoguće odrediti reakcijom s TBA.

3.3. Optimizacija metode mjerenja antioksidativne aktivnosti u modelu mesa

Originalni protokol preuzet je iz radova Fasseasa i suradnika (2007) i Wonga i suradnika (1995). Prema originalnoj proceduri kao model mesa korišteno je mljeveno meso, kojeg je prethodno potrebno očistiti od vidljivih dijelova masti i dodatno homogenizirati kako bi se dobila pasta jednoličnog sastava. Vagano je 50 mg mesa u Falcon kivete od 50 ml, nakon čega je dio uzoraka termički obrađen (85 °C/ 60 minuta), dok je drugi dio ostao sirov. Za svaki uvjet (termička obrada, sirovo meso) uzorci su vagani u triplikatu. Nakon termičke obrade svim uzorcima je dodano: 1 ml pročišćene vode, 1.5 ml 20 % octene kiseline i 1.5 ml 0.8 % TBA otopljene u 1.1 % SDS-u (pH reakcijske smjese treba biti 2). Sve je vorteksirano i zagrijavano na 100 °C jedan sat. Nakon hlađenja reakcijskoj smjesi je dodano 5 ml n-butanola. Zatim je vorteksirana trideset sekundi i centrifugirana na 2500 rpm, tri minute. Gornji sloj (butanol) korišten je za spektrofotometrijsko određivanje TBA-reaktivnih produkata na 532 nm.

Tijekom optimizacije metode povećana je količina mesa u reakcijskoj smjesi na 100 mg. Kako bi tijekom zagrijavanja raspodjela temperature u matriksu mesa bila jednolika, meso je suspendirano u 300 µl deionizirane vode i tek onda podvrgnuto termičkoj obradi. Da bi se intenzivirali oksidacijski procese i osigurao nastanak dovoljno jakog obojenja, termička obrada pri 85 °C produžena je sa 60 na 120 minuta. Nakon termičke obrade svim uzorcima je dodano: 1 ml pročišćene vode, 1.5 ml 20 % octene kiseline i 1.5 ml 0.8 % TBA otopljene u 1.1 % SDS-u. Tiobarbiturnu kiselinu (TBA) je bilo potrebno pripremati svježu, u suprotnom je dolazilo do njenog taloženja i zamućenja otopine. Završni korak ekstrakcije osobito je osjetljiv jer vrlo lako dolazi do miješanja butanolnog sloja, koji sadrži reaktivne TBA produkte, s donjim vodenim slojem. To rezultira zamućenjem mjerne otopine. Stoga su dva po dva uzorka centrifugirana na 4000 g, 5 minuta. Alikvot butanolnog sloja je korišten za spektrofotometrijsko mjerenje neposredno nakon centrifugiranja. Obzirom da je maksimum apsorbancije određen na 540 nm, spektrofotometrijsko određivanje TBA reaktivnih produkata provedeno je upravo na toj valnoj duljini.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Kalibracijska krivulja MDA

U svrhu izrade kalibracijske krivulje pripremljene su standardne otopine malondialdehida (MDA) koncentracija 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 µM. Koncentracije su dobivene otapanjem odgovarajućeg volumena stock otopine standarda (c=3035 µM) u pročišćenoj vodi, octenoj kiselini i TBA (Tablica 2.). Za standard je korištena malondialdehid (MDA)-tetrabutilamonijeva sol jer MDA nije stabilan kao takav, no kvantitativno se oslobađa kad je sol pomiješana s kiselinom. Primjer izračuna razrjeđenja:

$V(stock_{MDA}$ + pročišćena voda) = 300 µl

V (ukupni) = 300 µl + 1 ml + 1.5 ml + 1.5 ml = 4.3 ml

$c(stock_{MDA})$ = 3035 µM

c(konačno) = 0.5 µM

$c(stock_{MDA})$ * $V(stock_{MDA})$ = c(konačno) * V (ukupni)

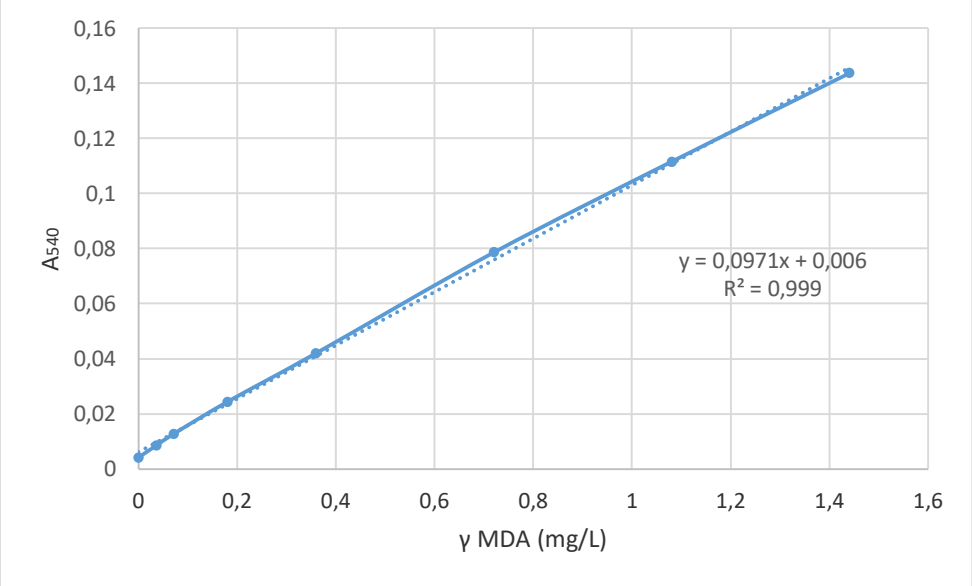
$V(stock_{MDA}) = \frac{3035\ \mu M * 4.3\ ml}{0.5\ \mu M} = 0.708\ \mu l$

V(pročišćena voda) = 300 µl – 0.708 µl = 299.29 µl

U svaku od Falcon kiveta (15 ml) dodano je 300 µL stock otopine i pročišćene vode, a potom 1 ml pročišćene vode, 1.5 ml 20 % octene kiseline i 1.5 ml 0.8 % TBA otopljene u 1.1 % SDS-u. Nakon vorteksiranja, sve kivete su zagrijane u vodenoj kupelji (100 °C/1 h). Po završetku reakcije, mjerena je apsorbancija standardnih otopina na UV-Vis spektrofotometru pri 540 nm. Rađena su dva mjerenja pomoću kojih je dobivena prosječna apsorbancija (aritmetička sredina dvaju mjerenja) prikazana u tablici 2. Uvrštavanjem rezultata dobivena je linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji MDA s zadovoljavajućim koeficijentom korelacije (R^2 = 0,999).

Tablica 2. Podaci za izradu kalibracijske krivulje MDA

c(MDA)/ µm	V(3035µM stock otopine)/µL	V(pročišćene vode)/µL	γ(MDA)/ mgL^{-1}	A_{540}
0	0	300	0	0,00415
0,5	0,708	299,29	0,03603	0,0085
1	1,415	298,59	0,07206	0,0128
2,5	3,538	296,46	0,18015	0,02435
5	7,075	292,93	0,3603	0,04205
10	14,15	285,85	0,7206	0,07865
15	21,25	278,75	1,0809	0,1116
20	28,30	271,66	1,4412	0,1437



Grafikon 1. Kalibracijska krivulja MDA

Kalibracijska krivulja (Grafikon 1.) služi kako bi se zaključilo koliko je MDA nastalo u uzorcima mesa prilikom peroksidacije. Izmjerene apsorbancije ekstrakata komine (TBA-MDA adukti) uvrštene su u jednadžbu pravca kalibracijske krivulje MDA i dobivene su koncentracije nastalog MDA. Tako da su rezultati antioksidativne aktivnosti izraženi u ekvivalentima nastalog MDA po gramu mesa.

4.2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata komine i BHA

4.2.1. Priprema uzoraka za mjerenje

Stock otopina antioksidansa dobivena je otapanjem 100 mg ekstrakta komine masline s dodatkom ciklodekstrina (bilo da je riječ o HP-β ili RAMEB-CD) u 5 ml pročišćene vode. Dok je stock otopina nativnog uzorka dobivena otapanjem 25 mg ekstrakta komine u 5 ml pročišćene vode. Stock otopine su dalje razrijeđene pročišćenom vodom prema shemi prikazanoj u tablici 3., kako bi se dobile 0.5, 1, 2 i 3 %-tne otopine uzorka. Postotak je izračunat kao masa uzorka u odnosu na masu mesa u reakcijskoj smjesi.

Primjer izračuna:

$c_{\text{stock otopina}}$ (komina +CD) = $\frac{m}{V} = \frac{100\ mg}{5\ mL}$ = 20 mg/mL

0.5 % otopina → 0.5 mg u 300 µL → c (0.5 %-tne ot.) = $\frac{0.5\ mg}{0.3\ ml}$ = 1.667 mg/mL

$c_{\text{stock otopine}} V_{\text{stock otopine}} = c_{\text{konačna}} V_{\text{konačni}}$

20 mg/mL * $V_{\text{stock otopine}}$ = 1.67 mg/mL * 0.3 mL

$V_{\text{stock otopine}}$ = 0.025 mL = 25 µL

$V_{\text{pročišćene vode}}$ = 300 µL – 25 µL = 275 µL, isti račun vrijedi i za ostale koncentracije otopina

Istraživanje je provedeno prema prethodno optimiziranom protokolu navedenom u poglavlju 3.2. Radilo se u dvije paralele, a za svaki od uzoraka pripremljena je i slijepa proba (indikatorska otopina bez mesa) kako bi se isključile interferencije. U uzorke sa sirovim mesom (S) nije dodan antioksidans i za njih je očekivano da će imati najniži stupanj oksidacije. Termički obrađeni uzorci bez dodatka antioksidansa (T), su korišteni kao negativna kontrola (imali su najveći stupanj oksidacije). U ostale uzorke mesa dodan je antioksidans u rastućim koncentracijama.

Tablica 3. Shema pripreme uzoraka s ekstraktima komine

Oznaka uzorka		V(stock otopina ekstrakta)/µL	V(pročišćena voda)/µL	m(meso)/mg
S	sirovo meso	0	300	100
T	termički obrađeno meso bez dodatka ekstrakta komine	0	300	100
SP	slijepa proba za S i T uzorke	0	300	0
$H_{0.5}$/ $R_{0.5}$/ $N_{0.5}$	termički obrađeno meso s dodatkom 0.5 % ekstrakta	25	275	100
$SP_{0.5}$	slijepa proba za 0.5 %-tne uzorke	25	275	0
H_1/ R_1/ N_1	termički obrađeno meso s dodatkom 1 % ekstrakta	50	250	100
SP_1	slijepa proba za 1%-tne uzorke	50	250	0
H_2/ R_2/ N_2	termički obrađeno meso s dodatkom 2 % ekstrakta	100	200	100
SP_2	slijepa proba za 2 %-tne uzorke	100	200	0
H_3/ R_3/ N_3	termički obrađeno meso s dodatkom 3 % ekstrakta	150	150	100
SP_3	slijepa proba za 3 %-tne uzorke	150	150	0

Pripremljena je stock otopina butil-hidroksianisola (BHA) koncentracije 0,05 mg/mL. Nju je potrebno dodatno razrijediti pročišćenom vodom kako bi se dobile 0.000625, 0.00125, 0.005, 0.01 %-tne otopine (postotak izražen na masu mesa u reakcijskoj smjesi). Višestruka razrjeđenja su potrebna jer je BHA sintetski antioksidans jake aktivnosti (Tablica 4.). Za sve uzorke je korištena jedna slijepa proba.

Tablica 4. Shema pripreme uzoraka s BHA

Oznaka uzorka		**V(stock otopina BHA)/µL**	**V(pročišćena voda)/µL**	**m(meso)/mg**
S	sirovo meso	0	300	100
T	termički obrađeno meso bez dodatka BHA	0	300	100
SP	slijepa proba za sve uzorke	0	300	0
$B_{0.000625}$	termički obrađeno meso s dodatkom 0.000625 % BHA	12	288	100
$B_{0.005}$	termički obrađeno meso s dodatkom 0.005 % BHA	99	201	100
$B_{0.01}$	termički obrađeno meso s dodatkom 0.01 % BHA	198	102	100

4.2.2. Obrada rezultata mjerenja

Nakon provedenog mjerenja uzoraka, dobivene su i odgovarajuće vrijednosti apsorbancije. Od izmjerene apsorbancije je oduzeta apsorbancija slijepe probe kako bi se dobio realan podatak bez utjecaja onečišćenja, prema formuli:

A (uzorka) = A (izmjerena) – A (slijepe probe)

Apsorbancija uzorka je zatim uvrštena u jednadžbu pravca MDA kako bi se antioksidativna aktivnost izrazila u koncentraciji nastalog MDA. Prema grafikonu 1. slijedi da je :

$$\gamma_{MDA} = \frac{A-0.006}{0.0971}$$

Količina nastalog MDA u mg je podijeljena s masom korištenog mesa (100 mg) i pomnožena s 1000 kako bi se dobili miligrami nastalog MDA po gramu mesa. Rezultati su izraženi kao aritmetičke sredine paralelnih mjerenja ± standardna devijacija. Pomoću njih su izrađeni stupčasti grafikoni nastalog MDA u svakom od uzoraka.

Izračun se radio prema sljedećim formulama (www.enciklopedija.hr):

- Aritmetička sredina → $\overline{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} x_i$, srednja vrijednost koja se dobiva zbrajanjem vrijednosti mjerenja i dijeljenjem zbroja s brojem mjerenja. Pošto je mjerenje rađeno u dvije paralele za svaki uzorak onda je u brojnik išao zbroj dvaju rezultata mjerenja, a u nazivnik broj 2.
- Standardna devijacija → $\sigma = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x})^2}$, prosječno srednje kvadratno odstupanje rezultata mjerenja x_1, x_2, …, x_n od njihove aritmetičke sredine $\overline{x}$, gdje je n broj mjerenja.
- Relativna standardna devijacija → $V = 100 \frac{\sigma}{\overline{x}}$, omjer standardne devijacije i aritmetičke sredine (x) pomnožen sa 100.

Postotak smanjenja peroksidacije dobiven je oduzimanjem količine nastalog MDA po 1 g mesa uzorka od onog negativne probe (T) i dijeljenjem s njim:

$$\%\text{-ak smanjenja peroksidacije} = \frac{mg\ MDA\ po\ 1g\ mesa\ (T) - mg\ MDA\ po\ 1g\ mesa\ (uzorka)}{mg\ MDA\ po\ 1g\ mesa\ (T)} * 100$$

Izračunata je i masa ekstrakta dodana po gramu mesa:

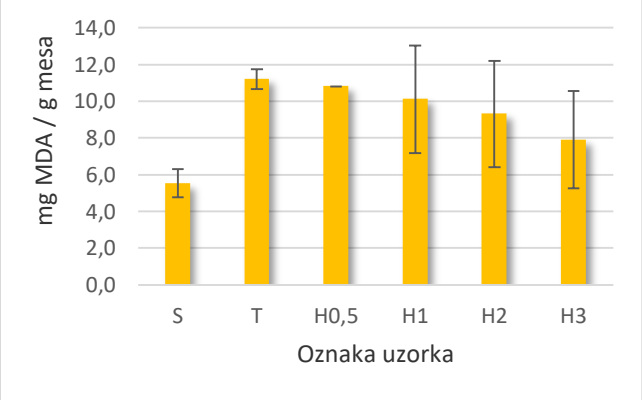
$$\gamma = \frac{m}{V} \rightarrow m(\text{ekstrakta}) = \gamma_{\text{stock otopine}} * V_{\text{stock otopine}} \text{ na 100 mg mesa} \rightarrow$$

$$m(\text{ekstrakta}) = \gamma_{\text{stock otopine}} * V_{\text{stock otopine}} * 10 \text{ na 1 g mesa}$$

Sve ovo je rađeno kako bi se mogao dobiti graf ovisnosti postotka smanjenja peroksidacije o masi ekstrakta u mesu. Graf daje linearnu ovisnost pa je moguće izračunati koncentraciju pri kojoj dolazi do 50 %-tnog smanjenja peroksidacije (EC_{50}). Na temelju nje je uspoređivana efikasnost uzoraka.

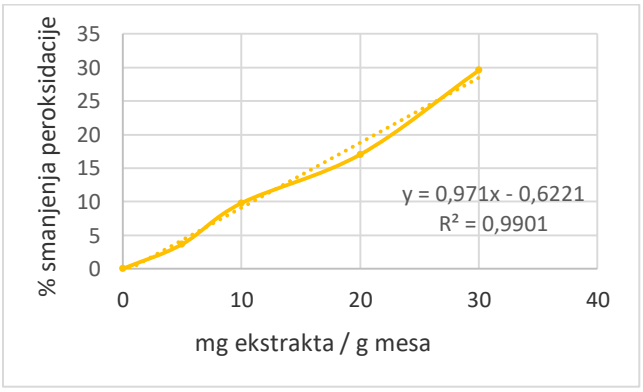
4.2.3. Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakata komine

Rezultati mjerenja prikazani su grafovima ovisnosti postotka smanjenja peroksidacije o količini antioksidansa u mesu i grafovima nastalog MDA po gramu mesa u svakom od uzoraka ± SD. Uzorci koji su sadržavali ekstrakt komine i HP-β-CD označeni su žutom bojom. Uzorci s ekstraktom komine i RAMEB-CD su naznačeni narančastom bojom, nativni uzorak je obojan zeleno, dok je uzorak BHA prikazan plavom bojom.



Grafikon 2. Antioksidativna učinkovitost uzorka s HP-β-CD

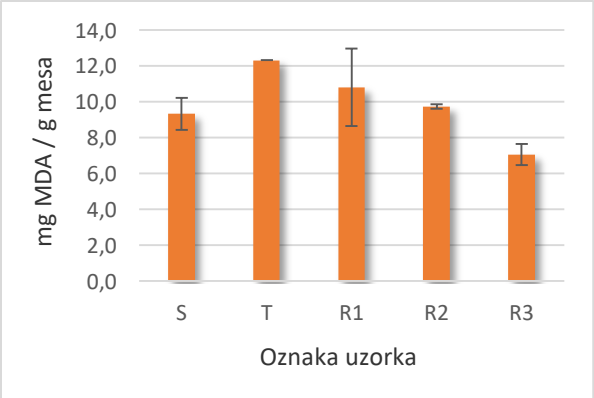
Iz grafikona 2. je vidljivo da uzorak komine masline s HP-β-CD smanjuje oksidacijske procese. Kako su njegove koncentracije veće tako je količina nastalog MDA manja. Doduše uzorak $H_{0,5}$, s najmanjom koncentracijom ekstrakta komine, gotovo da i nema antioksidativan učinak. Vrijednosti nastalog MDA su kod njega jednake onima negativne kontrole (T). Svi ostali uzorci pokazuju dobru antioksidativnu aktivnost. Metoda mjerenja međutim nema baš dobru ponovljivost što se da zaključiti iz većih vrijednosti standarnih devijacija za pojedine uzorke.



Grafikon 3. Graf ovisnosti smanjenja peroksidacije o količini ekstrakta (HP-β-CD)

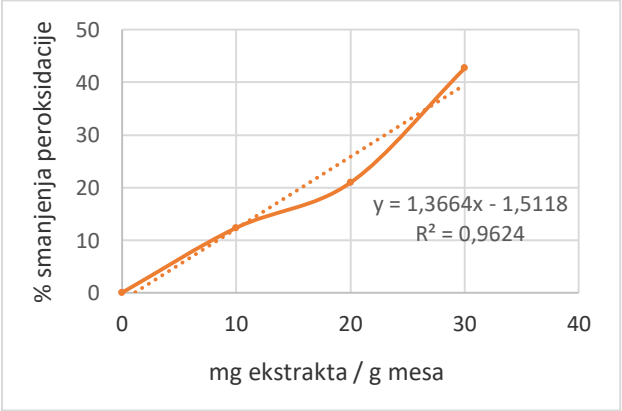
Grafikon 3. prikazuje linearnu ovisnost smanjenja peroksidacije o količini ekstrakta u mesu i ima zadovoljavajući koeficijent korelacije (R^2 = 0.9901). Dodatkom veće količine ekstrakta dolazi do većeg pada peroksidacije. Iz grafa je moguće izvući podatak o količini antioksidansa koja je potrebna da se stupanj peroksidacije smanji za 50 %. Ta količina je označena s EC_{50} i računata je iz jednadžbe pravca:

EC_{50} (eks. komine + HPβCD) = $\frac{50+0.6221}{0.971}$ = 52 mg ekstrakta / g mesa



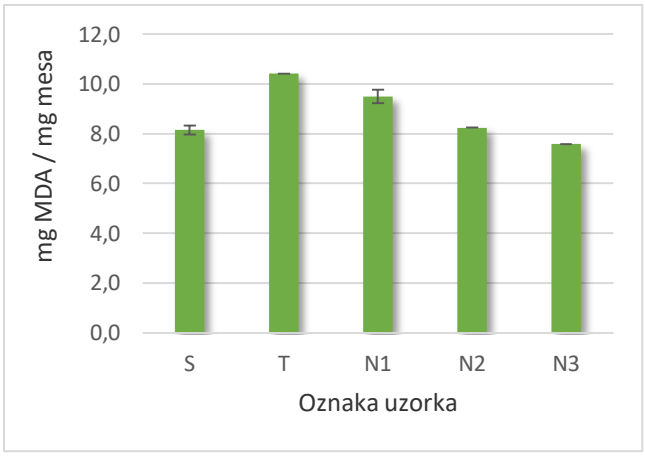
Grafikon 4. Antioksidativna učinkovitost uzorka s RAMEB-CD

Uočljivo je da je 0.5 %-tna koncentracija izbačena iz mjerenja, obzirom da se u istraživanju učinkovitosti uzorka HP-β-CD pokazala neučinkovitom. Rezultati na grafikonu 4. su izraženi kao aritmetičke sredine paralelnih mjerenja ± standardna devijacija. Iz priloženog grafikona je vidljivo da povećanjem koncentracije antioksidansa u uzorcima, dolazi do smanjenja nastalog MDA, odnosno da dolazi do smanjenja oksidacije mesa. Uzorak R_3 pokazuje jak antioksidativan učinak smanjujući razinu MDA u mesu na manju od one prisutne u sirovom mesu.



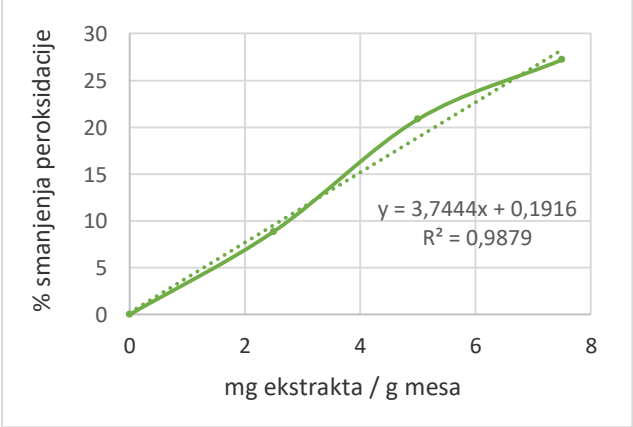
Grafikon 5. Graf ovisnosti smanjenja peroksidacije o količini ekstrakta (RAMEB)

Iz grafikona 5. se može zaključiti da porast pada peroksidacije linearno prati povećanje koncentracije ekstrakta u mesu. Koeficijent korelacije je zadovoljavajući (R^2 = 0.9624). EC_{50} je moguće izračunati iz jednadžbe pravca: EC_{50} (eks. komine + RAMEBCD) = $\frac{50+1.5118}{1.3664}$ = 38 mg ekstrakta / g mesa. Pomoću nje će biti lakše kasnije uspoređivati uspješnost antioksidativnog djelovanja uzoraka.



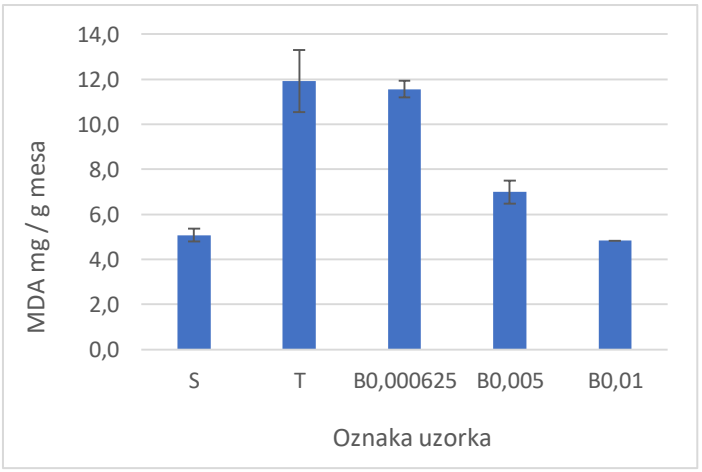
Grafikon 6. Antioksidativna učinkovitost nativnog uzorka

Na grafikonu 6. je vidljivo da nativni uzorak ima antioksidativna svojstva budući da smanjuje količinu nastalog MDA, ako se za negativnu kontrolu uzme T. Uzorak s najvišom koncentracijom komine N_3 je iskazao najbolji učinak, smanjujući razinu MDA ispod one u samom sirovom mesu.



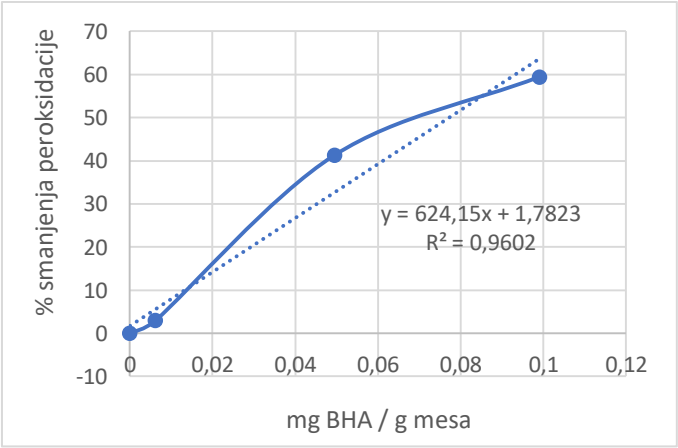
Grafikon 7. Graf ovisnosti smanjenja peroksidacije o količini ekstrakta (nativni)

Grafikon 7. pokazuje linearnu korelaciju smanjenja peroksidacije povećanjem količine nativnog uzorka u mesu. Koeficijent korelacije je zadovoljavajući (R^2 = 0.9879). EC_{50} je dobivena uvrštavanjem u jednadžbu pravca: EC_{50} (eks. komine) = $\frac{50-0.1916}{3.7444}$ = 13 mg ekstrakta / g mesa.



Grafikon 8. Antioksidativna učinkovitost BHA

Iz grafikona 8. je vidljivo da BHA i u ovako malim koncentracijama ostvaruje jako dobar antioksidativan učinak. Uzorci se ponašaju u skladu s očekivanim, a uzorak s najvišom koncentracijom BHA ($B_{0,01}$) smanjuje razinu MDA na 4,8 mg po gramu mesa, što je manje od 5.1 mg MDA nastalog u gramu sirovog mesa (S).



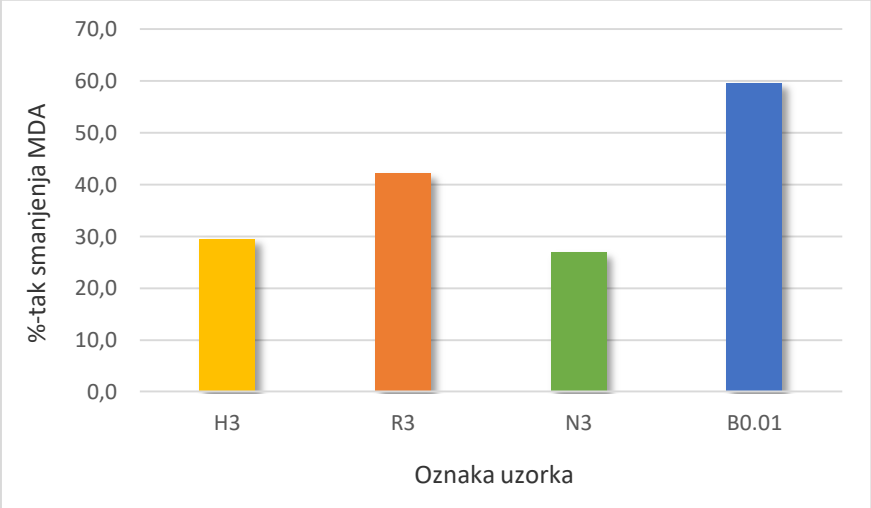
Grafikon 9. Graf ovisnosti smanjenja peroksidacije o količini BHA

Iz grafikona 9. može se zaključiti da s povećanjem količine butil-hidroksianisola (BHA) dolazi do povećanog smanjenja peroksidacije. Strmiji nagib pravca ukazuje upravo na činjenicu da se već s malim količinama BHA postižu jako dobri antioksidativni učinci u modelu mesa. EC_{50} je izračunata iz jednadžbe pravca : EC_{50} (BHA) = $\frac{50-1.7823}{624.15}$ = 0.08 mg BHA / g mesa.

Uzorci sa sirovim mesom bez dodatka antioksidansa su prema očekivanjima trebali imati najniže koncentracije MDA ako se smatra da je u njima peroksidacija zanemariva. Ipak je pokazano u radu Fasseas i suradnika (2007) da i kod sirovog mesa koje je prethodno držano u hladnjaku na 4 °C dolazi do peroksidacije lipida. U njihovom radu dodavani su ekstrakti esencijalnog ulja origana i kadulje u 3 %-tnim koncentracijama (masa uzorka u odnosu na masu mesa u reakcijskoj smjesi) na uzorke sirovog i termički obrađenog goveđeg mesa. Pokazano je kako ti ekstrakti smanjuju lipidnu peroksidaciju i u sirovom mesu. To potvrđuju i rezultati ovog mjerenja prikazani u grafikonima 4. i 6., budući da su 3 %-tni ekstrakti komine smanjili razinu MDA ispod one koja je bila u sirovom mesu. Termički obrađeno meso bez ikakvih dodataka služilo je kao negativna kontrola, odnosno imalo je najveće količine nastalog MDA. Ovo pokazuje da se MDA formira tijekom oksidacijskih procesa, ali da ga većina ipak nastaje lipidnom dekompozicijom tijekom termičke obrade u kiselim uvjetima. Nadalje kod svih uzoraka je uočena ovisnost antioksidativne aktivnosti o koncentraciji, pa su tako najkoncentriraniji uzorci (3 %-tni) imali najbolje djelovanje. Oni su doveli do 27 % tnog (ekstrakt komine), 30 %-tnog (ekstrakt komine s HP-β-CD) i 43 %-tnog (ekstrakt komine s RAMEB-CD) smanjenja MDA tj. peroksidacije. Što se iskazalo blago lošijim rezultatom u usporedbi s 3 %-tnim ekstraktima origana i kadulje. Slično je i s rezultatima dobivenim u studiji o antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata ružmarina, kadulje i vitamina E u modelu mesa (Wong i sur., 1995). U njoj su ekstrakti ružmarina i kadulje korišteni u samo jednoj koncentraciji od 30 μg/g, koja je dovela do smanjenja MDA za 38 i 47 %. U oba istraživanja je uzet vitamin E, za usporedbu djelotvornosti biljnih ekstrakata (Fasseas i sur., 2007; Wong i sur., 1995). Korištene su različite koncentracije vitamina E - 25,50 i 100 μg/g koje su donijele smanjenje oksidacije za 30, 39 i 47 %. Što ide u prilog dobivenoj linearnoj ovisnosti antioksidativne aktivnosti o koncentraciji ekstrakta komine u uzorku. Međutim u ovom radu je za usporedbu djelotvornosti ekstrakata komine uzet sintetski antioksidans butil-hidroksianisol (BHA). On je već pri vrlo niskim koncentracijama pokazao zavidnu antioksidativnu aktivnost. Svakako je bitno zaključiti da je antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata (komine, kadulje, ružmarina, origana) temeljena na njihovom polifenolnom sastavu. Sam mehanizam nije u potpunosti razjašnjen budući da je peroksidacija lipida proces koji je kompleksan i koji se odvija u više koraka. Fenoli štite namirnice od razvoja primarnih oksidacijskih produkata, no problem su sekundarni produkti koji znatno narušavaju miris, okus i samim time kvalitetu prehrambenih proizvoda (Ruberto i Baratta, 2000).

4.3. Usporedba rezultata i rasprava

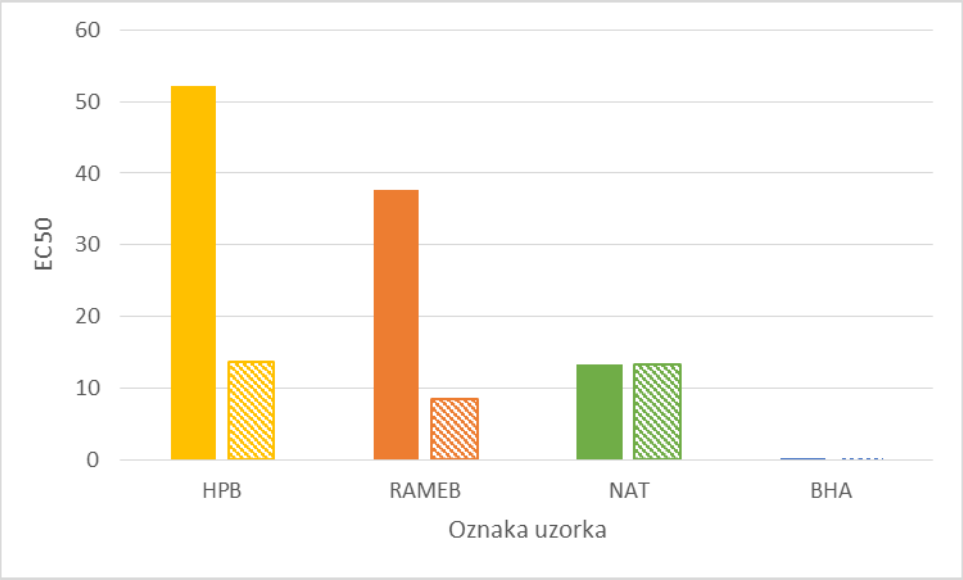
Iz prethodno prikazanih rezultata se može zaključiti kako svi uzorci ekstrakata komine masline imaju antioksidativni učinak jer povećanjem njihove koncentracije u mesu, dolazi do značajnog smanjenja stope lipidne peroksidacije. To je vidljivo iz velikih razlika u količini nastalog MDA u negativnim kontrolama (T uzorci) i 3 %-tnim otopinama ekstrakata komine. Usporedbom rezultata slijedi da je među istraženim uzorcima ekstrakt komine pripremljen s RAMEB-om najučinkovitiji, zatim uzorak pripremljen s HP-β-CD, dok najmanju aktivnost pokazuje nativni uzorak (pripremljen bez ciklodekstrina). Prema navedenom bi se moglo zaključiti da ciklodekstrini, osim što poboljšavaju stabilnost i tehnološke parametre suhih ekstrakta, povećavaju antioksidacijsku aktivnost uzoraka u modelu mesa (Grafikon 10.).



Grafikon 10. Usporedba antioksidativnog učinka različitih uzoraka komine masline i BHA

No situacija nije tako jasna budući da vrijednosti EC_{50} pokazuju na drugačije stanje (Grafikon 11.). EC_{50} je količina ekstrakta koju je potrebno dodati po gramu mesa da bi se peroksidacija smanjila za 50 %. Što je ta vrijednost manja, to je antioksidans potentniji. Prema grafikonu 11. najbolju aktivnost ima nativni ekstrakt, potom onaj s RAMEB-om, a onda tek ide uzorak s HP-β-CD. Ovo bi značilo da dodatak ciklodekstrina interferira s antioksidativnom aktivnošću ekstrakta komine. Ako se potom gleda aktivnost same komine u suhim ekstraktima (bez ciklodekstrina), dobije se da komina iz ekstrakta s RAMEB-CD ima najbolja antioksidativna svojstva. Njen EC_{50} je 8 mg komine po gramu mesa. Iz svega navedenog može se izvući da manje količine nativnog ekstrakta prije postižu bolje rezultate i da RAMEB-CD u ekstraktu s

kominom poboljšava njena antioksidativna svojstva iako je samog uzorka potrebno uzeti više nego nativnog. Literatura upućuje na kontradiktorne podatke. Pregled radova koji su proučavali ciklodekstrine kao pojačivače antioksidacijske aktivnosti donosi zapravo zaključak da se ne može sa sigurnošću reći da oni potpomažu ili odmažu antioksidativno djelovanje enkapsulirajućih molekula. Iskazali su se međutim dobrima u povećanju stabilnosti, zaštiti od svjetla, temperature i oksidativnih enzima. Enkapsulacija antioksidansa ovisi o mnogo faktora, a najznačajniju ulogu igraju pH medija odnosno pK_a antioksidanta (Lopez-Nicolas i sur., 2014).



Grafikon 11. Usporedba EC_{50} suhog ekstrakta i EC_{50} same komine u uzorcima (bojom ispunjeni stupci prikazuju EC_{50} suhog ekstrakta, dok stupci ispunjeni linijama prikazuju EC_{50} same komine)

Razmatrajući rezultate dobivene s BHA, uočava se da oni već pri vrlo niskim koncentracijama postižu zavidan antioksidativan učinak, bolji od onog uzoraka komine masline. Uzorak s najvišom koncentracijom BHA ($B_{0,01}$) smanjuje razinu MDA za 60 %, što je manje od svih prethodno navedenih rezultata postignutih s kominom, a pri tom je koncentracija antioksidansa 300 puta manja. U prijevodu bi značilo da je kominu masline potrebno koristiti u 300 puta većim količinama kako bi se postigao učinak usporediv sa sintetskim antioksidansom. EC_{50} (BHA) je svega 0.008 mg ekstrakta po gramu mesa, što ga i dalje čini najefikasnijim i cjenovno najpristupačnijim antioksidansom. U radu koji je uspoređivao antioksidativnu aktivnost ekstrakta suhe šljive i ekstrakta ružmarina s BHA/BHT, korištene su

slične koncentracije kao i u ovom radu (Movileanu i sur., 2013). Smjesa BHA/BHT je korištena u 0.02 %-tnoj koncentraciji (u odnosu na meso u uzorku) i pokazala je najbolje djelovanje – 69 %-tno smanjenje MDA. Ekstrakt ružmarina korišten je u 0.25 %-tnoj koncentraciji i imao je sniženje MDA od 67 %. Ekstrakt suhe šljive korišten je u koncentraciji od 3 % i uzrokovao je sniženje MDA za 47 % te time bio nešto lošiji od BHA/BHT i ekstrakta ružmarina. Sve navedeno je u skladu s rezultatima ovog rada, budući da je ekstrakt komine masline, korišten u 3 %-tnoj koncentraciji, postigao sličan rezultat kao i ekstrakt suhe šljive, što je i dalje manje od onog BHA. Ipak treba naglasiti da je ekstrakt komine doveo do značajnog smanjenja peroksidacije uspoređujući ga s negativnom kontrolom tj. termički obrađenim mesom bez ikakvih dodataka.

Polifenolni sastav komine odgovoran je za antioksidativna svojstva, pa je za očekivati da će istraživani ekstrakti biti aktivniji u hidrofilnim uvjetima, odnosno sustavima s nižim udjelom masti. Sam model mesa je dosta kompleksan i težak za ispitivanje jer mnogo parametara utječe na rezultate – od izbora mesa (različit udio masti), homogenizacije (dijelovi s više masti su podložniji lipidnoj peroksidaciji) do izbora metode praćenja i produkata peroksidacije koji će se pratiti. Primarni produkti peroksidacije su bez mirisa, okusa i ne utječu na kvalitetu prehrambenih proizvoda, a uz to ih je i lako kontrolirati. Problem su sekundarni produkti kao što je MDA. Tiobarbiturni test (TBA) je kritiziran zbog nespecifičnosti koja se realizira u nešto višim rezultatima MDA nego što to zaista jest. Ipak TBA je najbolji test za opisivanje oksidacije u uzorku mesa, budući da su lipidi najviše zahvaćeni oksidacijom. Pokazalo se da bez obzira na na povišene rezultate, formacija TBA-reaktivnih specija korelira i slična je stvarnoj formaciji MDA. Kako bi se što bolje razjasnio cijeli proces antioksidativnog mehanizma ekstrakta komine bilo bi dobro karakterizirati pojedine sastavnice i njihov učinak zasebno, a potom ih ukoncentrirati. Isto tako bi bilo dobro odrediti sastav triacilglicerida i fosfolipida u mesu kao i njihove oksidacijske produkte nastale kuhanjem. Dodatne informacije se mogu dobiti praćenjem specifičnih proteina u mesu koji su modificirani u procesu oksidacije ili praćenjem proteina koji pospješuju oksidaciju lipida kao što je katalitička aktivacija hem proteina. Rezultati prezentirani u ovom radu ukazuju na antioksidativnu aktivnost ekstrakta komine masline koja uvelike ovisi koncentraciji ekstrakta, o kemikalijama korištenim u radu, modelu mesa i njegovom sastavu i samoj metodi mjerenja.

5. ZAKLJUČAK

- Ekstrakti komine masline imaju antioksidativan učinak budući da su značajno smanjili peroksidaciju lipida u svim uzorcima
- Antioksidativna aktivnost ekstrakata komine je ovisna o koncentraciji pa su tako najbolji rezultati dobiveni korištenjem najviših koncentracija ekstrakata u odnosu na masu mesa (3 %)
- Primjena ciklodekstrina u formulaciji ekstrakta komine masline povećava stabilnost, ali i antioksidacijska svojstva suhog ekstrakta komine
- RAMEB-CD pokazuje najznačajniji pozitivni učinak na antioksidacijsku aktivnost suhog ekstrakta u modelu mesa
- Ekstrakt komine s HP – β ciklodekstrinom imao je najslabiju antioksidativnu aktivnost
- Sintetski antioksidans butil-hidroksianisol (BHA) ima bolja antioksidativna svojstva budući da sličan učinak kao i komina postiže u 300 puta manjim koncentracijama
- Model mesa je zahtjevan model za provođenje istraživanja jer mnogo parametara utječe na točnost i ponovljivost rezultata

6. LITERATURA

Albahari P, Jug M, Radić K, Jurmanović S, Brnčić M, Rimac Brnčić S, Vitali Čepo D. Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin enhanced pulsed ultrasound assisted extraction. *LWT - Food Sci Technol,* 2018, 92, 22-31.

Aldini G, Piccoli A, Beretta G, Morazzoni P, Riva A, Marinello C, Maffei Facino R. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. *Fitoterapia*, 2006, 77, 121-128.

Araujo M, Pimentel FB, Alves RC, Oliveira MBPP. Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends Food Sci Techn,* 2015, 45, 200-211.

Aritmetička sredina, 2018., http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=3839, pristupljeno 10.06.2018.

Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev,* 2014, 2014, 1-31.

Cioffi G, Pesca MS, De Caprariis P, Braca A, Severino L, De Tommasi N. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chem,* 2010, 121, 105-111.

Cyclodextrins, 2018., http://www.okklo.com/technology/cyclodextrins, pristupljeno 20.05. 2018.

Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem,* 2004, 39, 1033-1046.

Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Moulti-Mati F, Michaud P. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem,* 2013, 48, 1532-1552.

Fasseas MK, Mountzouris KC, Tarantilis PA, Polissiou M, Zervas G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chem*, 2007, 106, 1188-1194.

Fernandez J, Perez-Alvarez JA, Fernandez-Lopez JA. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem*, 1997, 59, 345-353.

Leouifoudi I, Harnafi H, Zyad A. Olive Mill Waste Extracts: Polyphenols Content, Antioxidant, and Antimicrobial Activities. *Adv Phar Sc*, 2015, 2015, 1-11.

Lopez-Nicolas JM, Rodriguez-Bonilla P, Garcia-Carmona F. Cyclodextrins and Antioxidants. *Crit Rev Food Sci*, 2014, 54, 251-276.

Maslina, 2015., https://www.plantea.com.hr/maslina/, pristupljeno 26.05.2018.

Miao J, Wei K, Li X, Zhao C, Chen X, Mao X, Huang H, Gao W. Effect of boiling and drying process on chemical composition and antioxidant activity of Chaenomeles speciosa. *Food Sci Techn*, 2017.

Movileanu I, Nunez de Gonzales MT, Hafley B, Miller RK, Keeton JT. Comparison of Dried Plum Puree, Rosemary Extract, and BHA/BHT as Antioxidants in Irradiated Ground Beef Patties. *Int J Food Sci*, 2013, 2013, 1-7.

Nunes MA, Pimentel FB, Costa ASG, Alves RC, Oliveira MBPP. Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innov Food Sci Emerg*, 2016, 35, 139-148.

Ramos P, Santos SAO, Guerra AR, Guerreiro O, Felicio L, Jeronimo E, Silvestre AJD, Neto CP, Duarte M. Valorization of olive mill residues: Antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Ind Crop Prod*, 2013, 46, 359-368.

Standardna devijacija, 2018., http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=57758, pristupljeno 10.06.2018.

Wong JW, Hashimoto K, Shibamoto T. Antioxidant Activities of Rosemary and Sage Extracts and Vitamin E in a Model Meat System. *J Agric Food Chem*, 1995, 43, 2707-2712.

7. SAŽETAK

Za maslinovo ulje se već od davnina zna da ima blagotvoran učinak na organizam, ali ono što je manje poznato jest da prilikom njegove proizvodnje nastaju velike količine otpadnih produkata. Te nusprodukte se skupnim imenom naziva kominom masline, a njihov sastav varira ovisno o načinu proizvodnje. Svima je pak zajedničko da sadrže visok postotak polifenolnih spojeva. Upravo zbog njih mogu biti prijetnja okolišu ako se neispravno odlažu, ali isto tako i vrijedna sirovina u prehrambenoj industriji, farmaciji i kozmetici. Tako ekstrakt komine masline ima potencijal da zamijeni sintetske antioksidanse u prehrambenim proizvodima. U ovom radu je antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata komine masline ispitana tiobarbiturnim (TBA) testom na modelu mesa. Uzorci komine pripremljeni su korištenjem različitih derivata ciklodekstrina kako bi im se poboljšala fizikalno-kemijska svojstva od okusa i mirisa do topljivosti, stabilnosti i antioksidativne aktivnosti.

Mjerenjem antioksidacijske aktivnosti na modelu mesa utvrđene su značajne razlike među istraživanim uzorcima, a najboljim uzorcima su se pokazali ekstrakt komine masline s dodatkom nasumično metiliranog β-ciklodekstrina (RAMEB-CD) i nativni ekstrakt (bez dodatka ciklodekstrina). Ipak, njihova učinkovitost nije bila mjerljiva s onom sintetičkog antioksidansa butil hidroksianisola (BHA). Naime, da bi ekstrakt komine postigao učinak sličan onom BHA, njegovu količinu je potrebno uvećati za 300 puta, a to dovodi do poskupljenja prehrambenog proizvoda i smanjenja količine hrane u proizvodu. Obzirom na polifenolni sastav, za očekivati je da će istraživani ekstrakti biti aktivniji u hidrofilnim uvjetima, odnosno sustavima s nižim udjelom masti. Sintetski antioksidansi tako ostaju ekonomski pristupačniji, stabilniji i učinkovitiji. Uz sve navedeno, malo je i dokaza o njihovoj mogućoj mutagenosti i kancerogenosti. Ovo ne isključuje u potpunosti korištenje komine masline u prehrambenoj industriji jer se u današnje vrijeme naglasak stavlja na prirodno i ekološki prihvatljivo.

SUMMARY

Olive oil is known to have beneficial effect on human health. During the process of making it, huge amount of waste products are made. Olive mill waste composition depends on extraction procedure but is generally characterized by high percentage of polyphenolic compounds. If they are not properly disposed, they pose a threat to the environment. On the other hand, because of high content of antioxidants they can be used in food industry, pharmacy or cosmetic industry. That is why olive pomace extracts could be used as natural replacement for synthetic antioxidants in different food products. In this paper, antioxidative activity of olive pomace extracts was tested in meat model. Different cyclodextrins were used during sample preparation in order to improve physical and chemical properties such as taste, odor, stability, solubility and possibly, antioxidant efficiency.

The best results were obtained by extracts prepared with RAMEB-CD and by native extract. However, their antioxidative activity was still not comparable with the one provided by commonly used synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA). In order to achieve the same level of antioxidant protection, 300 times higher concentrations of olive pomace extract is needed (3 % olive pomace vs 0.01 % BHA). Taking into consideration polyphenolic composition of olive pomace extracts, they might be expected to show higher efficiency under hydrophilic conditions. That leaves synthetic antioxidants cheaper, more stable and effective in comparison to natural alternatives. At the same time there are no evidence of them being mutagenic or cancerous in low concentrations used in food. However, this does not exclude the potential use of olive pomace extracts in the food industry because current emphasis is being placed on natural and ecologically acceptable resources.

8. Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za kemiju prehrane
Biokemija prehrane
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST KOMINE MASLINE U MODELU MESA

Mara Vuletić

SAŽETAK

Za maslinovo ulje se već od davnina zna da ima blagotvoran učinak na organizam, ali ono što je manje poznato jest da prilikom njegove proizvodnje nastaju velike količine otpadnih produkata. Te nusprodukte se skupnim imenom naziva kominom masline, a njihov sastav varira ovisno o načinu proizvodnje. Svima je pak zajedničko da sadrže visok postotak polifenolnih spojeva. Upravo zbog njih mogu biti prijetnja okolišu ako se neispravno odlažu, ali isto tako i vrijedna sirovina u prehrambenoj industriji, farmaciji i kozmetici. Tako ekstrakt komine masline ima potencijal da zamijeni sintetske antioksidanse u prehrambenim proizvodima. U ovom radu je antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata komine masline ispitana tiobarbiturnim (TBA) testom na modelu mesa. Uzorci komine pripremljeni su korištenjem različitih derivata ciklodekstrina kako bi im se poboljšala fizikalno-kemijska svojstva od okusa i mirisa do topljivosti, stabilnosti i antioksidativne aktivnosti.
Mjerenjem antioksidacijske aktivnosti na modelu mesa utvrđene su značajne razlike među istraživanim uzorcima, a najboljim uzorcima su se pokazali ekstrakt komine masline s dodatkom nasumično metiliranog β-ciklodekstrina (RAMEB-CD) i nativni ekstrakt (bez dodatka ciklodekstrina). Ipak, njihova učinkovitost nije bila mjerljiva s onom sintetičkog antioksidansa butil hidroksianisola (BHA). Naime, da bi ekstrakt komine postigao učinak sličan onom BHA, njegovu količinu je potrebno uvećati za 300 puta, a to dovodi do poskupljenja prehrambenog proizvoda i smanjenja količine hrane u proizvodu. Obzirom na polifenolni sastav, za očekivati je da će istraživani ekstrakti biti aktivniji u hidrofilnim uvjetima, odnosno sustavima s nižim udjelom masti. Sintetski antioksidansi tako ostaju ekonomski pristupačniji, stabilniji i učinkovitiji. Uz sve navedeno, malo je i dokaza o njihovoj mogućoj mutagenosti i kancerogenosti. Ovo ne isključuje u potpunosti korištenje komine masline u prehrambenoj industriji jer se u današnje vrijeme naglasak stavlja na prirodno i ekološki prihvatljivo.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 20 grafičkih prikaza, 4 tablice i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: komina masline, ciklodestrini, antioksidativno djelovanje, model mesa, lipidna peroksidacija

Mentor: **Prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Prof. dr. sc. Mario Jug, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Doc. dr. sc. Marija Grdić Rajković, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Food Chemistry
Food Biochemistry
Domagojeva 2, 1000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF OLIVE POMACE IN A MODEL MEAT SYSTEM

Mara Vuletić

SUMMARY

Olive oil is known to have beneficial effect on human health. During the process of making it, huge amount of waste products are made. Olive mill waste composition depends on extraction procedure but is generally characterized by high percentage of polyphenolic compounds. If they are not properly disposed, they pose a threat to the environment. On the other hand, because of high content of antioxidants they can be used in food industry, pharmacy or cosmetic industry. That is why olive pomace extracts could be used as natural replacement for synthetic antioxidants in different food products. In this paper, antioxidative activity of olive pomace extracts was tested in meat model. Different cyclodextrins were used during sample preparation in order to improve physical and chemical properties such as taste, odor, stability, solubility and possibly, antioxidant efficiency.
The best results were obtained by extracts prepared with RAMEB-CD and by native extract. However, their antioxidative activity was still not comparable with the one provided by commonly used synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA). In order to achieve the same level of antioxidant protection, 300 times higher concentrations of olive pomace extract is needed (3 % olive pomace vs 0.01 % BHA). Taking into consideration polyphenolic composition of olive pomace extracts, they might be expected to show higher efficiency under hydrophilic conditions. That leaves synthetic antioxidants cheaper, more stable and effective in comparison to natural alternatives. At the same time there are no evidence of them being mutagenic or cancerous in low concentrations used in food. However, this does not exclude the potential use of olive pomace extracts in the food industry because current emphasis is being placed on natural and ecologically acceptable resources.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 38 pages, 20 figures, 4 tables and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive pomace, cyclodextrins, antioxidant activity, meat model, lipid peroxidation

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mario Jug, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marija Grdić Rajković, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2018.