

Adsorpcija fenola aronije na citrus vlakna

Balen, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:011738>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Balen

ADSORPCIJA FENOLA ARONIJE NA CITRUS VLAKNA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za prehrambene tehnologije

Katedra za tehnologiju voća i povrća

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Razvoj proizvoda u prehrambenoj industriji

Tema rada: je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 20. srpnja 2020.

Mentor: prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Pomoć pri izradi: -

Adsorpcija fenola aronije na citrus vlakna

Ivana Balen, 0113137533

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene citrus vlakana kao nosioca fenolnih komponenti te karakterizacija dobivenih kompleksa. Kompleksi citrus vlakna/fenoli aronije su bili pripremljeni kompleksiranjem (15 minuta, sobna temperatura) citrus vlakna i soka aronije. Udio citrus vlakana je varirao (1, 2, 3 i 4%) dok je količina soka aronije bila konstantna. Pripremljenim kompleksima odredio se je udio adsorbiranih fenola, proantocijanidina i antocijana gdje je utvrđeno da se udio ukupnih fenola, proantocijanidina i monomernih antocijana na kompleksima citrus vlakna/aronija smanjio povećanjem količine vlakna. Također, određeni su parametri boje (L^* , a^* , b^* , $^{\circ}h$, C^*) i antioksidacijska aktivnost (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode) dobivenih kompleksa. Mjereni parametri boje (L^* , a^* , b^*) izraženi su kao ukupna promjena boje (ΔE). Najveća promjena boje i vrijednosti antioksidacijske aktivnosti utvrdile su se kod kompleksa s najmanjim udjelom citrus vlakna (1%). Strukturne promjene na citrus vlaknima izazvane adsorpcijom fenolnih komponenata su se odredile snimanjem IR spektra gdje su dobiveni rezultati potvrdili vezivanje fenolnih komponenta aronije na citrus vlakna.

Ključne riječi: aronija, fenoli, antioksidacijska aktivnost, citrus vlakna

Rad sadrži: 40 stranica
19 slika
11 tablica
33 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|-------------------------------------|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Anita Pichler | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. Mirela Kopjar | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban | član |
| 4. doc. dr. sc. Ante Lončarić | zamjena člana |

Datum obrane: 29. rujna 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technology
Subdepartment of technology of fruit and vegetables
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Product development in the food industry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on July 20, 2020

Mentor: *Mirela Kopjar*, PhD, full prof.

Technical assistance: -

Adsorption of Chokeberry Phenolics on Citrus Fiber

Ivana Balen, 0113137533

Summary: The aim of this study was to examine the possibility of application of citrus fibers as a carrier of phenolic components and the characterization of the obtained complexes. Citrus fiber/chokeberry phenol complexes were prepared by complexation (15 minutes, room temperature) of citrus fiber and chokeberry juice. The citrus fiber content varied (1, 2, 3, and 4%) while the amount of chokeberry juice was constant. The content of adsorbed phenols, proanthocyanidins and anthocyanins was determined on the prepared complexes, where it was found that the amount of total phenols, proanthocyanidins and monomeric anthocyanins on citrus fiber/chokeberry complexes decreased by increasing the amount of fiber. Also, the color parameters (L^* , a^* , b^* , $^{\circ}h$, C^*) and antioxidant activity (DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC methods) of the obtained complexes were determined. The measured color parameters (L^* , a^* , b^*) were expressed as the total color change (ΔE). The largest change in color and values of antioxidant activity were found in the complex with the lowest amount of citrus fiber (1%). Structural changes in citrus fibers caused by adsorption of phenolic components were determined by recording the IR spectra where the obtained results confirmed the binding of phenolic components of chokeberry on citrus fibers.

Key words: chokeberry, phenols, antioxidant activity, citrus fiber

Thesis contains: 40 pages
19 figures
11 tables
33 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Anita Pichler</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Mirela Kopjar</i> , PhD, full prof. | supervisor |
| 3. <i>Nela Nedić Tiban</i> , PhD, full prof. | member |
| 4. <i>Ante Lončarić</i> , PhD, assistant prof. | stand-in |

Defense date: September 29, 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Funkcionalna hrana	2
2.2. Aronija	4
2.3. Polifenoli.....	6
2.4. Antioksidacijska aktivnost	14
2.5. Prehrambena vlakna.....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. Zadatak	21
3.2. Materijali i metode.....	22
3.2.1. Materijali	22
3.2.2. Priprema bioaktivnih dodataka hrani	22
3.2.3. Metode.....	23
3.2.3.1. Ekstrakcija uzoraka	23
3.2.3.2. Određivanje ukupnih fenola.....	23
3.2.3.3. Određivanje proantocijanidina	23
3.2.3.4. Određivanje monomernih antocijana	24
3.2.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	24
3.2.3.6. Određivanje parametara boje	25
3.2.3.7. FTIR-ATR analiza	28
3.2.3.8. Statistička analiza podataka.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1. Adsorpcija fenolnih komponenata na citrus vlakna.....	29
4.2. Antioksidacijska aktivnost kompleksa citrus vlakna/aronija	30
4.3. Ovisnost antioksidacijske aktivnosti o fenolnim komponentama.....	31
4.4. Boja kompleksa citrus vlakna/aronija	32
4.5. FTIR-ATR analiza	34
5. ZAKLJUČAK	36
6. LITERATURA	38

Popis oznaka, kartica i simbola

L^*	parametar CIEL a^*b^* prostora boja - svjetlina (eng. <i>lightness</i>)
a^*	kormatska komponenta CIEL a^*b^* prostora boja (zeleno-crveno)
b^*	kormatska komponenta CIEL a^*b^* prostora boja (plavo-žuto)
$^{\circ}h$	ton boje
C^*	zasićenje boje
ΔE	ukupna promjena boje
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
FRAP	ferric reducing antioxidant power
CUPRAC	cupric reducing antioxidant power
A	apsorbancija uzorka
M	molekulska masa
FR	faktor razrjeđenja
ϵ	molarna absorptivnost
l	duljina kivete

1. UVOD

Prehrana ima značajnu ulogu u sprječavanju i liječenju bolesti. Povećanje svijesti o zdravijim izborima hrane, njenim prednostima i mogućnostima zasigurno osigurava povećanu kvalitetu života, stoga nije iznenađujuće pojačano zanimanje potrošača, ali i prehrambene industrije za funkcionalnu hranu. Iako ne postoji opće prihvaćena definicija, funkcionalnu hranu možemo definirati kao hranu koja pored svoje osnovne nutritivne vrijednosti na pozitivan i zadovoljavajući način utječe na jednu ili više ciljanih funkcija tijela smanjujući rizike razvoja pojedinih bolesti (Čalić i sur., 2011).

Kada odnos oksidansa i antioksidansa nije u ravnoteži tj. veća je zastupljenost oksidansa, u organizmu dolazi do različitih oštećenja koja su posljedica oksidacijskog stresa. Rezultat toga su starenje i raznovrsne bolesti zastupljene kod ljudi. Postoji uvaženo mišljenje da se održavanjem ravnoteže između oksidansa i antioksidansa postiže balans za zdrav biološki sustav (Bilić, 2011). Polifenoli su spojevi koji imaju snažnu antioksidacijsku aktivnost. Oni mogu djelovati *in vitro*, ali i *in vivo* kao hvatači slobodnih radikala te mogu vezati prekursore slobodnih radikala, metalne ione (Jakobek, 2007). Polifenoli se mogu adsorbirati u ljudskom organizmu, no njihovi mehanizmi adsorpcije kao ni biološka raspoloživost te mehanizam antioksidacijskog djelovanja nisu u potpunosti razjašnjeni, tako da nije upitno postojanje interesa za istraživanje polifenolnih spojeva. Voće predstavlja glavni izvor polifenola. S obzirom na bogat izvor spojeva u voću, polifenole ubrajamo u grupu neesencijalnih spojeva koji pokazuju određeno biološko djelovanje u ljudskom organizmu. Od esencijalnih mikronutrijenata u voću su vitamini i minerali. Između različitih vrsta voća po količini polifenola ističe se tamno obojeno bobičasto, koštuničavo i jagodasto voće gdje se ubraja i aronija (Jakobek, 2007).

Prehrambena vlakna su tvari biljnog podrijetla koje probavni enzimi u organizmu čovjeka ne mogu razgraditi do adsorpcijskih komponenata. Nemaju posebnu prehrambenu ili energetska vrijednost, ali zato pozitivno djeluju na rad crijeva, potpomažu rastu i razvitku crijevne mikroflore te reguliraju probavu (Krešić, 2012).

U ovom radu cilj istraživanja bio je ispitati mogućnost primjene citrus vlakana kao nosioca fenolnih komponenti te karakterizacija dobivenih kompleksa. Spajanjem vlakana i fenola, biljnih komponenti s dokazanim pozitivnim učinkom na zdravlje (kroz višegodišnja istraživanja) kreirali bi se novi bioaktivni dodatci hrani. Pripremljenim kompleksima odredit će se udio adsorbiranih fenola, proantocijanidina i antocijana. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti kompleksa citrus vlakna/aronija koristit će se DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode. Mjerenje parametra boje kao i promjena boje biti će praćeni kromametrom. Strukturne promjene na citrus vlaknima izazvane adsorpcijom fenolnih komponenata bit će određene snimanjem IR spektra.

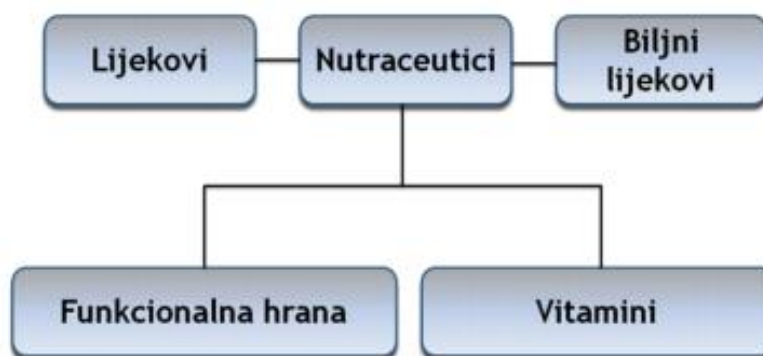
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Funkcionalna hrana

U većini zemalja ne postoje zakonske definicije naziva „Funkcionalna hrana“ i postavljanje granice između konvencionalne i funkcionalne hrane je čak i za nutricioniste i prehrambene tehnologe izazov (Mark-Herbert, 2004). Jedna od definicija koja na jednostavan način objašnjava pojam funkcionalne hrane je da se hrana može nazvati „funkcionalna“ ako pored svoje osnovne nutritivne vrijednosti na pozitivan i zadovoljavajući način utječe na jednu ili više ciljanih funkcija tijela smanjujući rizike razvoja pojedinih bolesti (Roberfroid, 2000). FUFOS (The European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe) je dala jedinstvene značajke funkcionalne hrane (Roberfroid, 2000):

- treba biti konvencionalna i svakodnevna hrana,
- mogućnost konzumiranja kao dio uobičajene prehrane,
- prirodnog sastava (kao suprotno od sintetskih) s komponentama koje se mogu prirodno naći u toj hrani ili su dodane u tu hranu u većoj količini od koncentracije specifične za tu hranu,
- ima pozitivan utjecaj na fiziološke funkcije,
- može poboljšati opće zdravstveno stanje ili smanjiti rizik od bolesti,
- ima potvrđene i utemeljene zdravstvene tvrdnje.

Vrlo važno je naglasiti činjenicu da funkcionalna hrana nije lijek. Funkcionalna hrana je najbliže povezana s nutraceuticima. Pojam „nutraceutik“ možemo definirati kao svaku tvar koja je hrana ili je dio hrane i pruža medicinske ili zdravstvene pogodnosti uključujući prevenciju ili liječenje bolesti. To su proizvodi koji se mogu naći u raznovrsnim oblicima bilo kao pročišćeni i koncentrirani nutrijenti, dodatci prehrani, biljni proizvodi ili prirodne komponente biljaka i procesirana hrana. Nutraceutike ne možemo svrstati u samo jednu skupinu kao što je lijek ili hrana već se za njih može reći da se nalaze u „sivoj zoni“ između hrane i lijeka. Povezanost nutraceutika s biljnim lijekovima, lijekovima, funkcionalnom hranom, vitaminima je vrlo kompleksna te se stroge granice između navedenih kategorija ponekad ne mogu odrediti (**Slika 1**). Funkcionalna hrana u većini slučajeva sadrži nutraceutike, kao što su na primjer polifenoli ili joj se dodaju probiotici, vitamini, minerali te je upravo zbog toga najviše povezana s nutraceuticima. Vitamini se mogu svrstati u kategoriju lijekova, ali se isto tako mogu naći i u slobodnoj prodaji. Lijekovi su klasificirani zakonom o lijekovima te se ne mogu nabaviti bez liječničkog recepta. Biljni lijekovi isto mogu biti klasificirani kao lijekovi, ali samo u slučaju njihovog djelovanja u prevenciji bolesti (Čalić i sur., 2011).



Slika 1 Povezanost nutraceutika s ostalim proizvodima (Čalić i sur., 2011)

Funkcionalna hrana se može podijeliti u više kategorija (Čalić i sur., 2011):

- hrana u nemodificiranom i neprerađenom obliku koja sadrži biološki aktivne tvari s pozitivnim djelovanjem na organizam,
- obogaćeni proizvodi kod kojih je količina jednog nutrijenta uvećana ili je pak dodan novi nutrijent koji se uobičajeno ne nalazi u toj namirnici,
- izmijenjeni proizvodi kod kojih je jedan od sastojaka zamijenjen s drugim nutrijentom koji ima pozitivan učinak,
- poboljšani proizvodi u kojima je jedna ili više komponenti hrane prirodno obogaćena kroz specifične načine uzgoja biljaka i životinja.

Najjednostavnija skupina funkcionalne hrane je nemodificirana i neprerađena hrana. U tu skupinu ubrajamo voće, povrće, začinsko bilje, začine. Primjer funkcionalne hrane su rajčica, brokula, mrkva jer su bogate fiziološki aktivnim sastojcima likopen, sulforan, beta karoten. Začinsko bilje i začini su bogati fitokemikalijama koje pozitivno djeluju na fiziološko stanje organizma i pomažu u smanjenju rizika nastanka bolesti. Češnjak utječe na smanjenje rizičnih faktora kao što su ukupni kolesterol, razina LDL u krvi (lipoproteini male gustoće koji prenose kolesterol), reducira agregaciju trombocita i snižava visoki krvni tlak koji su glavni faktori nastanka kardiovaskularnih bolesti (Pathak, 2010).

U skupinu obogaćenih proizvoda ubrajaju se voćni sokovi s povećanom količinom vitamina A, C, E, zatim mlijeko obogaćeno vitaminom D te se ovakav postupak obogaćivanja proizvoda nutrijentima pokazao vrlo ekonomičan i učinkovit način poboljšanja proizvoda (Spence, 2006).

Kod izmijenjenih proizvoda cilj je zamijeniti štetne i nepoželjne komponente s komponentama koje imaju pozitivan i blagotvoran učinak i to tako da se ne utječe na kvalitetu proizvoda.

Jedan od primjera takve vrste funkcionalne hrane su vlakna koja se koriste kao zamjena za masti, a proizvode se od žitarica (Spence, 2006).

Posljednja kategorija funkcionalne hrane su poboljšani proizvodi. Primjeri ovakve skupine proizvoda su kukuruz s visokim udjelom lizina, voće i povrće s povećanim udjelom vitamina, te proizvodnja fitonutrijenata u raznom voću i povrću uključujući uvođenje u biljke nekih od komponenti koje te biljke normalno ne proizvode kao što je krumpir s karotenoidom. Ovakva vrsta hrane može stvoriti probleme vezano za sastav hrane kao što su jaja s povećanim sadržajem omega-3 masnih kiselina postignute kroz izmijenjenu prehranu kokoši (Lewis i sur., 2000).

Funkcionalna hrana predstavlja obećavajući i dinamički dio prehrambene industrije koji se sve brže razvija zahvaljujući sve boljem razumijevanju uske povezanosti prehrane i zdravlja. Kako bi se uspješno doprinijelo razumijevanju povezanosti prehrane i zdravlja potrebno je razviti novi pristup razvoju novih proizvoda. Neki od faktora koji utječu na sve veći razvoj funkcionalnih proizvoda su prvenstveno nova istraživanja i znanstveni dokazi da prehrana može promijeniti učestalost i napredovanje bolesti, ali i starenje populacije, povećani troškovi zdravstvene zaštite, autonomija u zdravstvenoj zaštiti te svjesnost i želja za poboljšanjem osobnog zdravlja (Čalić i sur., 2011).

2.2. Aronija

Aronija je višegodišnja listopadna biljka koja raste u obliku grma. Visina grma doseže i do 3 metra. Pripada porodici ruža (*Rosaceae*), a unutar roda *Aronia* postoje četiri vrste: crvenoplodna aronija (*Aronia arbutifolia*), crnoplodna aronija (*Aronia melanocarpa*), ljubičastoplodna aronija (*Aronia prunifolia*) i *Aronia mitschurinii* koja je nastala uzgojem. Aronija je izuzetno otporna i prilagodljiva vrsta. Ima visok stupanj otpornosti na mraz i sušu te nije utvrđeno da je posebno osjetljiva na štetnike i određene bolesti. U doba zimskog mirovanja može podnijeti temperature i do -30 °C. Dobro podnosi i visoke temperature, ali kod visokih ljetnih temperatura, ako se uzgaja bez sustava navodnjavanja postižu se znatno manji prinosi te plodovi budu lošije kvalitete. Plodovi aronije su bobice koje čine grozd, a bobice mogu biti spljoštenog ili okruglastog oblika (**Slika 2**). Plodovi dozrijevaju od sredine kolovoza, a meso ploda zbog svoje intenzivne crvene boje te trpkog i kiselkastog okusa podsjeća na nezrele borovnice. Listovi aronije su ovalnog oblika tamnozelene boje koji u jesen prelaze u crvenu boju (Tomić i sur., 2016).



Slika 2 Aronija (Web 1)

Podrijetlom potječe iz istočnog dijela Sjeverne Amerike, a u Europi se počinje koristiti početkom 20. stoljeća. U Europi se najviše uzgaja u sjevernim dijelovima Rusije, u Poljskoj, Češkoj, Slovačkoj te na sjeveru Njemačke i Francuske. Na kemijski sastav plodova aronije utječu različiti čimbenici kao što su sorta, način uzgoja, stupanj zrelosti plodova, period berbe te stanište (Jeppsson i Johansson, 2000). Plodovi aronije sadrže visoke koncentracije polifenola, proantocijanida, antocijana. Antocijani u plodovima aronije su prisutni u obliku cijanidin glikozida i to: 3-O-galaktozida, 3-O-glukozida, 3-O-arabinozida i 3-O-ksilozida. Također, plodovi su bogati vitaminima, mineralima (Kulling i Rawel, 2008).

Tablica 1 Sadržaj mineralnih tvari u bobicama, neprerađenom i prerađenom soku (Kulling i Rawel, 2008)

Mineral	Bobice (mg kg⁻¹)	Svježe iscijeđeni sok (g L⁻¹)	Pasterizirani sok (g L⁻¹)
Natrij	26	5	5,7
Kalij	2180	2850	1969
Kalcij	322	150	185
Magnezij	162	140	160
Željezo	9,3	4	0,4
Cink	1,47	1,3	0,6
Jod	nije analiziran	nije analiziran	< 5

U **Tablici 1** prikazan je sadržaj mineralnih tvari u bobicama aronije. Iz priloženog možemo vidjeti da je kalij najzastupljeniji, dok je koncentracija cinka najmanja, te jod nije analiziran u bobicama i svježe iscijeđenom soku, dok u pasteriziranom soku iznosi < 5 . Sadržaj vitamina koji je prisutan u bobicama aronije je raznolik. U najvećoj koncentraciji zastupljen je vitamin C, dok je vitamin K najmanje zastupljen, a udjeli preostalih vitamina prikazani su u **Tablici 2** (Kulling i Rawel, 2008).

Tablica 2 Sadržaj vitamina u bobicama, neprerađenom i prerađenom soku aronije (Kulling i Rawel, 2008)

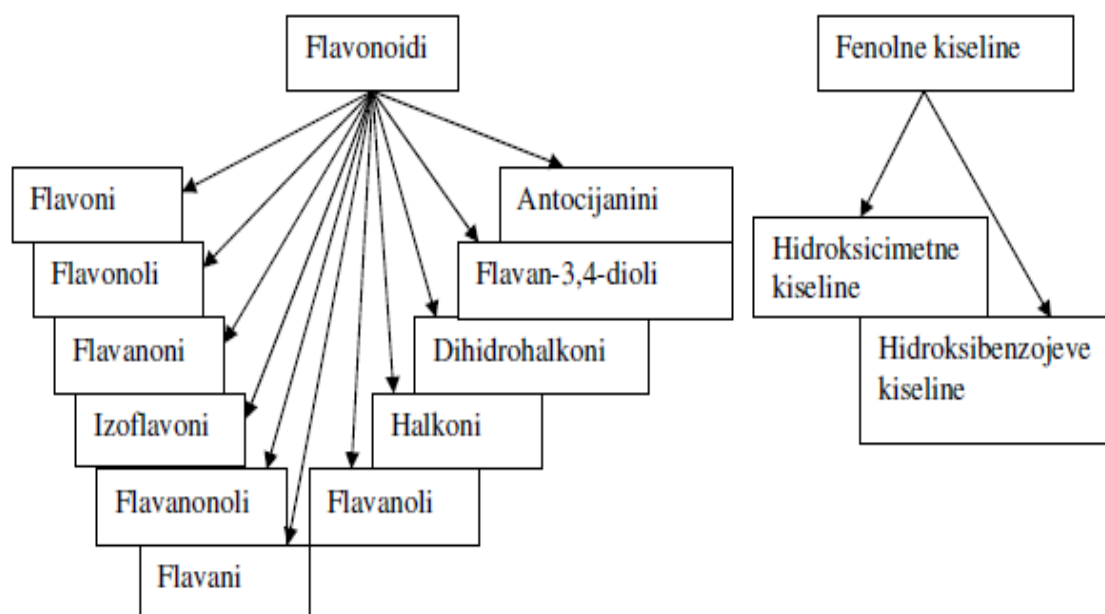
Vitamin	Bobice ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Svježe iscijeđeni sok ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pasterizirani sok ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Vitamin C	137000	200000	nije detektiran
Folat	200	nije analiziran	35
Vitamin B1	180	500	nije analiziran
Vitamin B2	200	600	nije analiziran
Vitamin B6	280	550	nije analiziran
Niacin	3000	3400	nije analiziran
Pantotenska kiselina	2790	2200	nije analizirana
Tokoferoli	17100	nije analizirano	nije analizirano
Vitamin K	242	nije analiziran	nije analiziran

Od cjelokupnog kemijskog sastava aronije, koji imaju brojne blagodati, najviše pažnje se posvećuje polifenolnim komponentama. Visok sadržaj i sastav fenolnih komponenta u plodovima aronije odgovorni su za širok spektar ljekovitih i terapijskih učinaka aronije (Tolić i sur., 2015). Velik broj istraživanja utvrdio je da polifenolni spojevi djeluju antimutageno, antikancerogeno, kardioprotektivno, no najznačajnija je njihova antioksidacijska aktivnost. Mehanizam djelovanja polifenolnih spojeva u organizmu čovjeka jedna je od temeljnih tematika znanstvenih istraživanja u cilju njegovog obrazloženja (Vauzour i sur., 2010).

2.3. Polifenoli

U skupinu polifenolnih spojeva uključujemo velik broj strukturno različitih spojeva, od vrlo jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline do mnogo kompleksnijih molekula kao što su flavonoidi. Iako se polifenolni spojevi najčešće spominju kao spojevi s fenolnim prstenom

oni su zapravo vrlo raznolika skupina zbog čega su u literaturi prisutni mnogi načini njihove klasifikacije: prema strukturi, na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli, na temelju biološke aktivnosti, biosintetskog puta i sl. Na **Slici 3** prikazana je podjela polifenolnih spojeva u dvije osnovne skupine, flavonoide i fenolne kiseline te njihove podskupine (Kurtagić, 2017).



Slika 3 Glavne skupine biljnih flavonoida i fenolnih kiselina (Jakobek, 2007)

Najvažnija i najveća skupina polifenola su flavonoidi koji su podijeljeni na nekoliko podskupina. Njihovu raznovrsnost uglavnom kontroliraju geni biljke, ali na nju imaju utjecaj i drugi čimbenici kao što su stadij zrelosti biljke, klima i način uzgoja. U biljkama su dominantne tri podskupina flavonoida, a to su flavonoli, antocijanini i flavan-3-oli (flavanoli) (Jakobek, 2007). Izvori biljnih polifenola su bobičasto voće kao borovnice, kupine, aronija, zatim crveno grožđe, rajčica, masline. Mnogobrojnim je istraživanjima utvrđeno da sitno tamno obojeno voće koje pripada porodicama *Rosaceae* (višnja, kupina, jagoda, malina), *Ericaceae* (borovnice), *Saxifragaceae* (ribiz) sadrži veće količine polifenolnih spojeva od povrća, žitarica i nekih drugih vrsta voća (Jakobek, 2007). U **Tablici 3** prikazan je sadržaj polifenola u različitim vrstama namirnica te koja vrsta polifenola je zastupljena (Bilić, 2011).

Tablica 3 Sadržaj polifenola u različitim namirnicama (Bilić, 2011)

Izvor	Sadržaj polifenola (mg kg⁻¹ ili mg L⁻¹)	Vrsta polifenola
Borovnica	30-160	Flavonoli
Ribizla	30-70	
Kajsija	25-50	
Jabuka	20-40	
Crno grožđe	15-40	
Rajčica	2-15	
Cherry rajčice	115-200	
Poriluk	30-225	
Žuti luk	350-1200	
Kelj	300-600	
Brokula	40-100	
Crni čaj	30-45	
Zeleni čaj	20-35	
Crno vino	2-30	
Patlidžan	7500	Antocijani
Kupina	1000-4000	
Ribizla	250-5000	
Crno grožđe	300-7500	
Trešnja	350-4500	
Rabarbara	2000	
Jagoda	150-750	
Crno vino	200-350	
Šljiva	20-250	
Crveni kupus	250	Flavoni
Sok od grejpa	100-650	
Sok od limuna	50-300	
Peršin	240-1850	
Celer	20-140	
Sojino brašno	800-1800	Hidroksibenzojeva kiselina
Kupina	80-270	
Malina	60-100	
Jagoda	20-90	

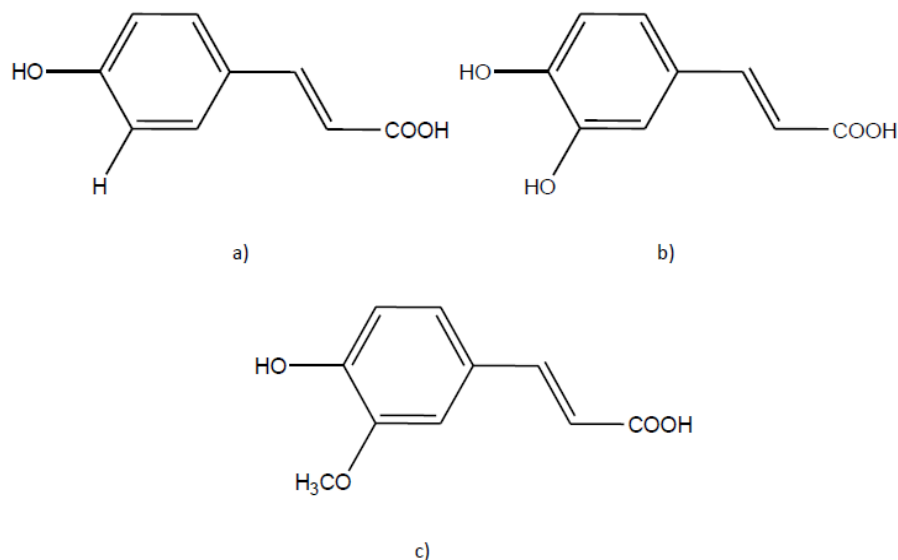
Od bobičastog voća po količini polifenola i antioksidacijskoj aktivnosti ističe se aronija koja sadrži znatno veće količine polifenola u usporedbi s drugim vrstama voća, povrća, žitarica, začinskih biljaka. Važno je naglasiti da se polifenolni spojevi nalaze u svim dijelovima biljke, te ovisno o biljnom podrijetlu količinski omjer je različit. U **Tablici 4** prikazan je udio fenolnih spojeva u bobicama aronije (Oszmiański i Wojdyło, 2005).

Tablica 4 Fenolne komponente u bobicama aronije (Oszmiański i Wojdyło, 2005)

Skupina polifenola	Komponenta	Količina komponente (mg 100 g ⁻¹ suhe tvari)
Flavani	Proantocijanidini	5181,6
Fenolne kiseline	Klorogenska kiselina	301,85
	Neklorogenska kiselina	290,81
Flavonoli	Kvercetin-3-galaktozid	36,98
	Kvercetin-3-glukozid	21,64
	Kvercetin-3-rutinozid	15,1
	Derivati kvercetina (neidentificirani)	27,43
Antocijani	Cijanidin-3-galaktozid	1282,41
	Cijanidin-3-arabinozid	581,5
	Cijanidin-3-ksilozid	52,71
	Cijanidin-3-glukozid	42,14

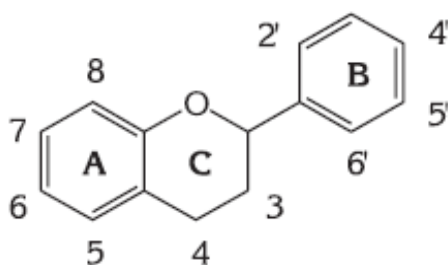
Fenolne kiseline, uz flavonoide, su druga najvažnija skupina polifenolnih spojeva prisutnih u aroniji. Rijetko se nalaze u slobodnom obliku. Najčešće se pojavljuju u vezanom obliku kao glikozidi ili esteri konjugirani s ostalim prirodnim spojevima. Dije se na hidroksicimetne kiseline (C₆-C₃) i hidroksibenzojeve kiseline (C₆-C₁) te njihove derivate. Najrasprostranjenije hidroksicimetne kiseline su sinapična, kafeinska, ferulična i *p*-kumarinska (**Slika 4**). One se u biljnim stanicama nalaze u različitim oblicima, ali najčešće se pojavljuju u obliku jednostavnih estera. U voću, hidroksicimetne kiseline, prisutne su u svim dijelovima te se najveće koncentracije nalaze u vanjskim dijelovima zrelog voća. Najviše zastupljena u prirodi je kafeinska kiselina koja čini 75 - 100% sadržaja hidroksicimetnih kiselina u voću, a u žitaricama je u najvećoj koncentraciji prisutna ferulična kiselina (Jakobek, 2007). Od hidroksibenzojevih kiselina, najrasprostranjenije su *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska i protokatehinska kiselina, a u biljkama se nalaze vezane za dijelove stanične stijenke. Imaju antioksidacijsko djelovanje koje je vidljivo u primjeru tanina ili galotina koji su esteri 3,4,5-trihidroksibenzojeve kiseline. Upravo galoilna skupina tih tanina i monomernih

katehina u zelenom čaju djelomično je odgovorna za svojstva kelatiranja i hvatanja slobodnih radikala (Kazazić, 2004).



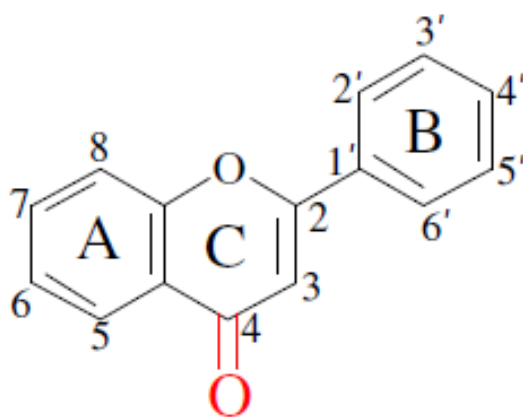
Slika 4 Strukturne formule a) *p*-kumarinske kiseline, b) kafeinske kiseline i c) ferulične kiseline (Jakobek, 2007)

Flavonoidi predstavljaju najbrojniju skupinu polifenolnih spojeva koji se međusobno razlikuju po karakteristikama i strukturi. Možemo ih pronaći u kori drveća, lišću, cvijeću, mnogim biljkama, ali su koncentrirane i u sjemenkama. Flavonoidi su sekundarni metaboliti što znači da predstavljaju organske spojeve koji nemaju direktnog utjecaja na rast i razvoj biljaka. Dosad je poznato oko 5000 vrsta flavonoida. Osnovna struktura svih flavonoida je difenilpropan molekulske formule C₆-C₃-C₆. Nizom kemijskih reakcija nastaje tzv. flavan jezgra čiju osnovu čine tri fenolna prstena A, B i C (**Slika 5**) (Tapas i sur., 2008).



Slika 5 Osnovna struktura flavonoida tzv. flavan jezgra (Kazazić, 2014)

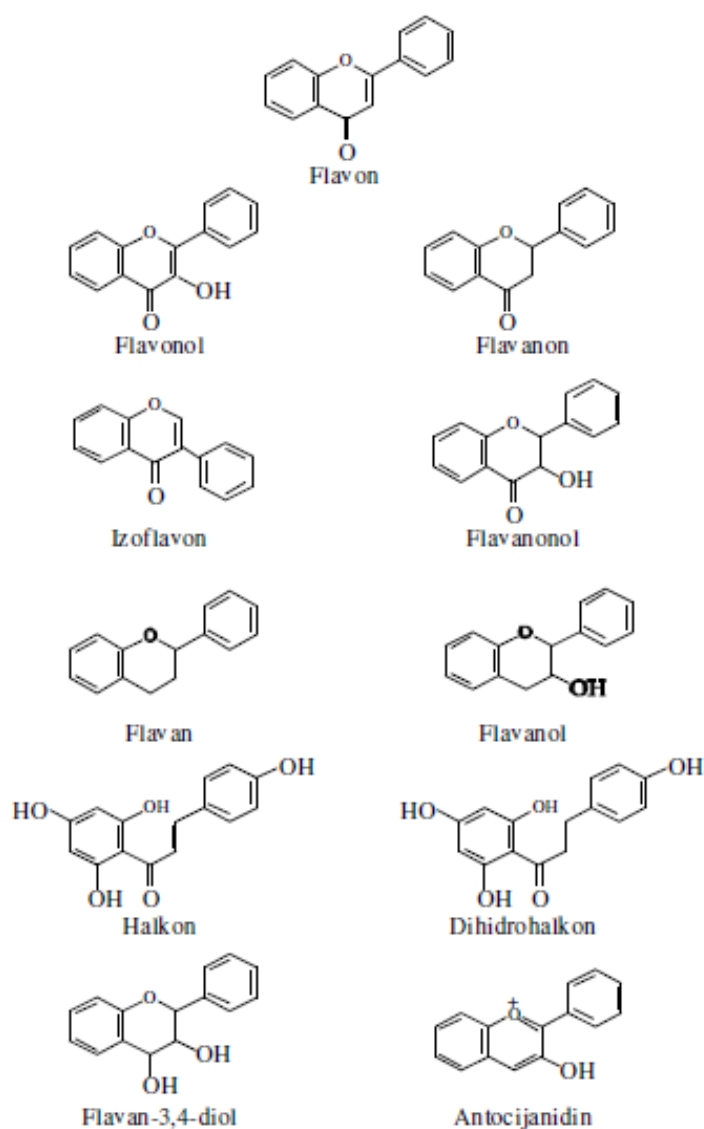
Benzenski prsten A kondenziran je s tročlanim alifatskim nizom koji zajedno s kisikom tvori šesteročlani prsten C, a na poziciji 2 prstena C nalazi se benzenski prsten B. Postoje flavonoidi koji mogu imati vezanu karbonilnu skupinu na C-4 atomu prstena C, te se za njih često koristi izraz 4-okso-flavonoidi (**Slika 6**) (Jakobek, 2007).



Slika 6 Osnovna struktura flavonoida tzv. 4-okso-flavonoid jezgra (Jakobek, 2007)

Flavonoidne podgrupe međusobno se razlikuju po stupnju njihove alkilacije i/ili glikozidacije, različitih kombinacija broja i hidroksilnih grupa, metoksi grupa te konjugaciji između prstena A i B (Kurtagić, 2017). Flavonoidi se uglavnom nalaze u obliku glikozida što znači da su povezani s molekulama šećera. Najčešći šećer koji se nalazi vezan za glikozide jest glukoza, iako može biti vezan i neki drugi šećer kao što je galaktoza, ksiloza, arabinoza. Upravo ta raznolikost vezivanja različitih šećera na molekulu flavonoida pridonosi njihovoj velikoj raznovrsnosti i širokom spektru spojeva. Vezanje šećera, odnosno glikozilacija se u pravilu odvija na poziciji C-3 ili rjeđe na C-7. Flavonoidi su podijeljeni unutar nekoliko kategorija kao što su flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavanonoli, flavani, flavanoli, halkoni, dihidrohalkoni, flavan-3,4-dioli i antocijanidini koje prikazuje **Slika 7**.

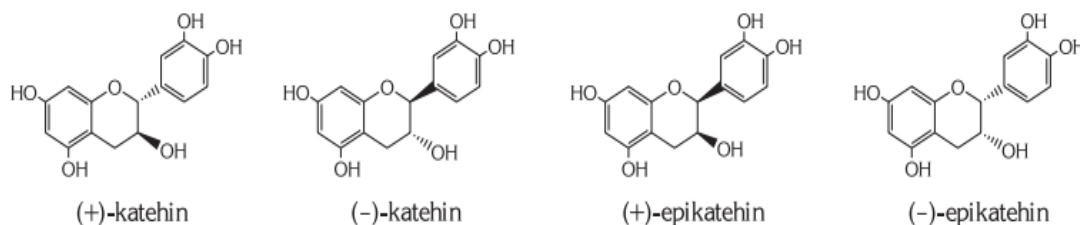
Flavonoli se većinom pojavljuju u stanicama kao glikozidi. Za molekulu aglikona flavonola, najčešće je od šećera vezana glukoza premda se mogu vezati i drugi šećeri poput galaktoze, arabinoze, ksiloze. Flavonoli su prisutni u nadzemnim dijelovima biljaka dok njihovi aglikoni nisu prisutni u biljkama. Do sada je poznato oko 200 aglikona flavonola. Neki od uobičajenih aglikona prisutnih u voću su kvercetin, miricetin i kemferol. Žute su boje te imaju slabu topljivost u vodi. Ukoliko dođe do nekog procesa obrade hrane kao što je smrzavanje, fermentacija ili sterilizacija, njihova prisutnost može biti detektirana (Jakobek, 2007).



Slika 7 Osnovna struktura glavnih podgrupa flavonoida (Jakobek, 2007)

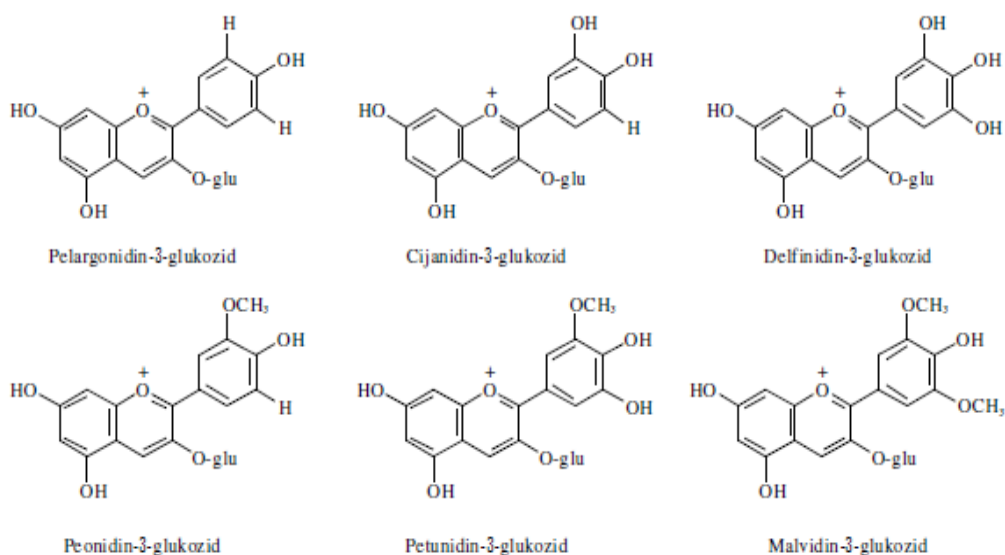
Osnovna flavonoidna struktura $C_6-C_3-C_6$ karakterizira flavanole. Kao i kod antocijanidina na heterocikličkom C prstenu na poziciji 4 se ne nalazi atom kisika. U voću se flavanoli najčešće nalaze u obliku oligomernih ili polimernih formi tj. u obliku proantocijanidina ili tanina. Proantocijanidini se sastoje od flavanolnih monomera, a nastaju procesom polimerizacije koji može biti rezultat autooksidacije, ali najčešće te reakcije su katalizirane nekim enzimima (polifenoloksidaza) koji se nalaze u većini biljnih tkiva. U jednoj molekuli može biti i do 17 flavanolnih jedinica. Izvori proantocijanidina su razne vrste voća kao što je aronija, grožđe i dr. Proantocijanidini imaju niz pozitivnih učinaka na zdravlje čovjeka zahvaljujući svom jakom antioksidativnom djelovanju. Proantocijanidini koji se sastoje od monomera (+)-katehina i (–)-epikatehina zovu se procijanidini (**Slika 8**). (–)-Katehini i (+)-epikatehini su fitotoksični i neke ih biljke sintetiziraju u korijenu da bi spriječile naseljavanje drugih biljaka na tom teritoriju

(Bais i sur., 2003). Manje poznati procijanidini su propelargonidini i prodelfinidini. Propelargonidini se sastoje od epiafzelekina, a prodelfinidini od epigalokatehinskih jedinica (Del Rio i sur., 2013).



Slika 8 Monomeri procijanidina ($\pm$) katehin i ($\pm$) epikatehin (Kazazić, 2014)

Antocijani pripadaju skupini biljnih pigmenata. Općenito, pigmenti su prirodne tvari koje se mogu naći u tkivima i stanicama biljaka te se dijele na one koji su topljivi u vodi (antocijani) i na one koji su topljivi u ulju (klorofil). Postoji šest osnovnih antocijanidina: cijanidin, delfinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin i malvidin čije su kemijske strukture prikazane na **Slici 9**. Osnovna razlika između pojedinog antocijana je u broju hidroksilnih skupina u molekuli, stupnju metilacije tih hidroksilnih skupina, prirodi, broju i položaju glikozilacije, te prirodi i broju aromatskih ili alifatskih kiselina vezanih na ostatak (Sikorski, 2002).



Slika 8 Kemijska struktura 6 osnovnih glukozida antocijana (Jakobek, 2007)

Prisutni su u većini biljaka te u voću i povrću dajući im boju kao što su plava, crvena, purpurna. Po kemijskom sastavu su glikozidi antocijanidina s karakterističnom kemijskom strukturom flavonoida. Antocijani nastaju vezanjem šećera na osnove antocijanidina.

Glukoza, arabinoza, galaktoza su najčešći vezani šećeri za molekulu antocijanidina, a isto tako mogu biti acilirani s raznim kiselinama kao što su kafeinska (hidroksicimetna) ili octena (alifatska). U kiselj sredini, zbog pozitivnog naboja na kisiku u heterocikličkom prstenu C, antocijani se ponašaju kao kationi i grade soli s kiselinama. U alkalnoj sredini grade soli s bazama jer se ponašaju kao anioni (Jakobek, 2007). Antocijani, zbog svojih različitih kemijskih struktura, pokazuju različitu boju u ovisnosti pH otopine u kojoj se nalaze. Crveno obojenje prevladava pri pH 1, plava boja između pH 2 i 4, bezbojno obojenje kod pH 5 i 6, a pri pH višim od 7 dolazi do raspadanja molekule antocijana. Upravo zbog boje koje daju prehrambenim proizvodima, pokazan je veći interes za istraživanje antocijana, iako se prvotno nisu koristili kao aditivi u prehrambenoj industriji zbog svoje nestabilnosti. Jedno od najznačajnijih svojstava antocijana je njihovo antioksidacijsko djelovanje (Jakobek, 2007).

2.4. Antioksidacijska aktivnost

Povezanost pozitivnog utjecaja voća i povrća na zdravlje ljudi dokazana je brojnim epidemiološkim istraživanjima. Osim što imaju nutritivnu i senzorsku ulogu, pojedini sastojci ističu se sa svojom zaštitnom ulogom. Posebno je to slučaj s hranom koja sadrži prirodne antioksidanse (Thomas, 1995). Najjednostavnije rečeno, antioksidansi su spojevi koji utječu na oksidaciju nekog supstrata tako da odgađaju ili inhibiraju njegovu oksidaciju. Oksidacija je kemijska reakcija u kojoj dolazi do prijenosa elektrona ili vodika sa supstance na oksidativni agens, kojom mogu nastati slobodni radikali. Vrlo reaktivne molekule koje sadrže nespareni elektron u vanjskoj elektronskoj ljusci nazivaju se slobodnim radikalima. Kako bi postigli stabilnost, slobodni radikali, ulaze u reakcije s drugim molekulama nastojeći im uzeti elektron. Takvim reakcijama dolazi do narušavanja ravnoteže između oksidativnog oštećenja i antioksidativne reparacije u organizmu. Posljedica toga je oksidativni stres koji pogoduje starenju stanica, karcinogenezi, oštećenju DNA (Kazazić, 2004).

Oksidacija i razgradnja oksidacijskih produkata su glavne reakcije degradacije koje dovode do smanjenja nutritivne vrijednosti i senzorske kvalitete hrane. U prehrambenoj industriji je od velike važnosti utjecati na sprječavanje oksidacijskih procesa. Postoji više načina kojima se mogu inhibirati oksidacijski procesi. Neki od njih su upotreba prikladne ambalaže, niskih temperatura, uklanjanje kisika, inaktivacija enzima koji kataliziraju oksidaciju i dr. Za zaštitu od oksidacije mogu se upotrebljavati i specifični aditivi koji inhibiraju oksidaciju tj. antioksidansi. Inhibitore oksidacije čine tvari različite kemijske strukture te mehanizma djelovanja koji su prikazani u **Tablici 5** (Rein, 2005).

Tablica 5 Mehanizam antioksidativne aktivnosti (Rein, 2005)

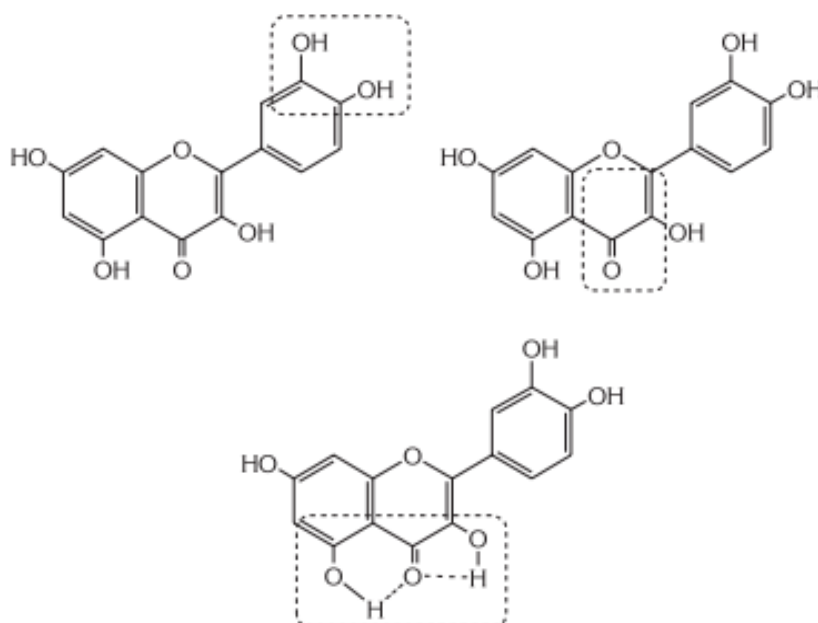
Skupina antioksidansa	Mehanizam antioksidacijske aktivnosti	Primjeri antioksidansa
Pravi antioksidansi	Inaktivacija slobodnih radikala lipida	Fenolne tvari
Stabilizatori hidroperoksida	Sprječavanje raspadanja hidroperoksida na slobodne radikale	Fenolne tvari
Sinergisti	Poboljšanje aktivnosti pravih antioksidansa	Limunska kiselina, askorbinska kiselina
Metalni helatori	Vezanje teških metala u inaktivne komponente	Fosforna kiselina, tvari nastale Maillard-ovim reakcijama, limunska kiselina
Tvari za vezanje singleton kisika	Transformacija singlet kisika u triplet kisik	Karoteni
Tvari koje reduciraju hidroperokside	Redukcija hidroperoksida bez stvaranja radikala	Proteini, aminokiseline

Uz prirodne antioksidanse razvijeni su i sintetski antioksidansi koji se u praksi koriste kao aditivi, nadomjesci i lijekovi, ali je opće prihvaćena činjenica da su prirodni antioksidansi vrijedniji, učinkovitiji i sigurniji od sintetskih (Yanishlieva-Maslarova i Heinonen, 2001). Ljudski organizam sadrži antioksidativne enzime i neenzimske antioksidanse. U antioksidativne enzime se ubrajaju superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GSPHx), aldehyd oksidaza (AOx), glutation S-transferaza (GSTs), katalaza i glutation reduktaza (GR), dok u neenzimske antioksidanse spadaju flavonoidi, karotenoidi, vitamin C, vitamin E i koenzim Q10 (Starlin i Gopalakrishnan, 2013).

Flavonoidi mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko načina, a najvažniji način njihovog djelovanja je kada hvataju slobodne radikale i tako prekidaju njihovu lančanu reakciju. Kako bi djelovao kao antioksidans, flavonoid, mora ispuniti dva uvjeta. Prvi uvjet koji mora ispuniti jest da kada je prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar koja je podložna reakciji, mora usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije. Drugi uvjet je da iz njega nastali slobodni radikal mora biti stabilan kako ne bi bio podložan lančanoj reakciji. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala moguća je zbog strukture flavonoida (**Slika 10**) (Kazazić, 2004):

- o-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu koja daje stabilnost radikalu i omogućuje delokalizaciju elektrona,
- 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto skupinom, što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B-prstena,

- hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- koje osiguravaju vodikovu vezu s keto-skupinom.



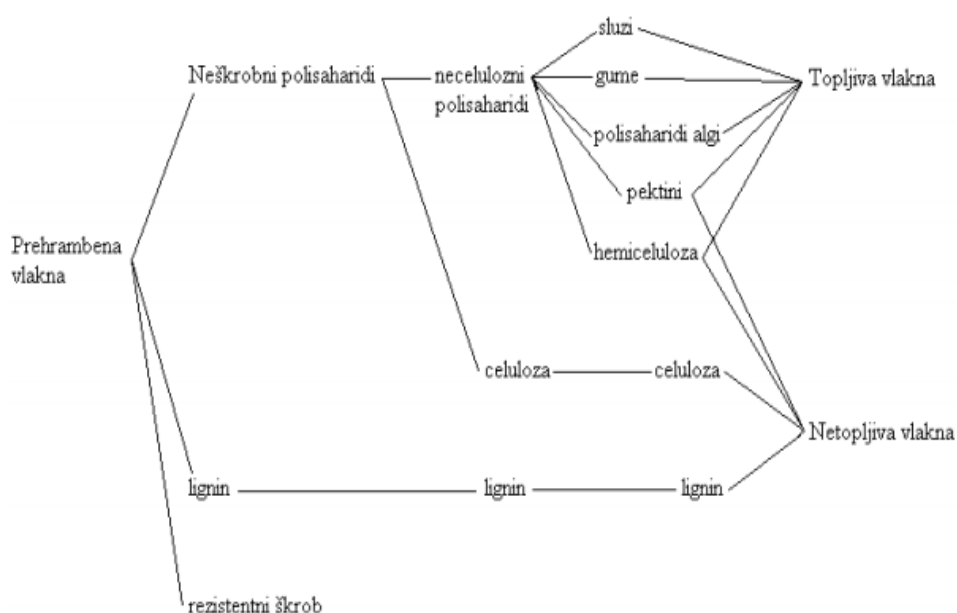
Slika 9 Strukturne skupine važne za hvatanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004)

Važniji čimbenik u određivanju antioksidacijske aktivnosti je prostorni raspored supstituenata nego osnovni kostur flavonoida. Na antioksidativnu aktivnost značajno utječe konfiguracija i broj hidroksilnih skupina. B-prsten ima važnu ulogu jer donira vodik i elektron hidroksilnim, peroksi i peroksinitrit radikalima, stabilizirajući ih i stvarajući relativno stabilne flavonoidne radikale (Cao i sur., 1997).

Polihidroksilirani i polimetoksilirani flavonoidi se razlikuju u antioksidacijskoj aktivnosti te je njihova razlika vjerojatno posljedica hidrofobnosti i molekularne strukture. Metilacija smanjuje antioksidacijsku aktivnost tako što utječe na steričke efekte. Polimerizacija također utječe na antioksidacijsku aktivnost. Dimeri i trimeri procijanidina su učinkovitiji od monomernih flavonoida, ali razlika u aktivnosti između dimera i trimera je vrlo mala. Antioksidacijska aktivnost ovisi ne samo o strukturnim svojstvima antioksidanasa već i o mnogim drugim čimbenicima kao što su temperatura, svjetlost, tip supstrata, fizikalno stanje sustava, kao i o brojnim mikrokomponentama koje djeluju kao prooksidansi ili sinergisti (Yanishlieva-Maslarova i Heinson, 2001).

2.5. Prehrambena vlakna

Vlakna su tvari biljnog podrijetla koje probavni enzimi u organizmu čovjeka ne mogu razgraditi do adsorpcijskih komponenata. U prehrani nemaju neku posebnu prehrambenu ili energetska vrijednost, ali zato pozitivno djeluju na rad crijeva, potpomažu rast i razvitak crijevne mikroflore te reguliraju probavu. S obzirom na topljivost, razlikujemo topljiva i netopljiva prehrambena vlakna. Na **Slici 11** prikazana je opsežnija klasifikacija prehrambenih vlakana (Krešić, 2012).



Slika 10 Klasifikacija prehrambenih vlakana (Mandić i Nosić, 2009)

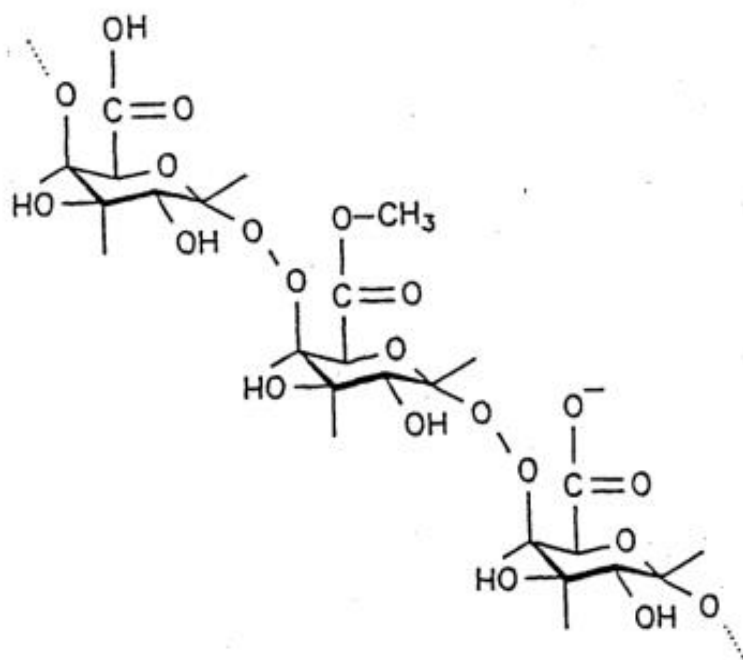
Netopljiva prehrambena vlakna se ne mijenjaju prolaskom kroz probavni sustav, iako može doći do razgradnje jednog dijela u debelom crijevu fermentacijom pomoću bakterija. Pozitivne karakteristike netopljivih prehrambenih vlakana je što mogu vezati velike količine vode, sprječavaju opstipaciju i potiču peristaltiku crijeva. Možemo ih pronaći u integralnim žitaricama i mekinjama, a manja im je zastupljenost u povrću, voću i mahunarkama (**Slika 12**). U netopljiva prehrambena vlakna ubrajamo celulozu, hemicelulozu i linin (Gačina, 2014).

Najrasprostranjenije prehrambeno vlakno je celuloza. To je složeni polisaharid sastavljen od linearno povezanih jedinica D-glukoze. Naročito značajna svojstva celuloze su biokompatibilnost i biorazgradljivost. Prisutnost OH skupine daju hidrofilnost celulozi i omogućuju stvaranje vodikovih veza unutar pojedine ili između različitih molekula celuloze.



Pektini su skupina bilinih polisaharida. Zbog sposobnosti želiranja primenjuju se u

pektinskih tvari je D-galakturonska kiselina, povezana α -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidnim vezama u polisaharidni lanac (**Slika 13**) (Thakur i sur., 1997).



Slika 12 Ponavljajući segment pektinske molekule (Thakur i sur., 1997)

Gume se također koriste kao stabilizatori i sredstva za ugušćivanje, a građeni su od 10000-30000 jedinica ugljikohidrata u koje se ubrajaju glukoza, galaktoza, manozna i ramnoza. Služi se proizvode iz algi i morskih trava, a osnovnu komponentu strukturne građe čini galakturonska kiselina. β -glukani su dugolančani polisaharidi koji se sastoje od velikog broja molekula D-glukoze povezanih β -glikozidnim vezama. U prirodi se javljaju u staničnim stjenkama mekinja, žitarica. β -glukani nisu esencijalni za naš organizam, ali imaju određen utjecaj na naše zdravlje. Odgovorni su za usporavanje udjela glukoze u krvi (Živković, 2002).

Brojna su pozitivna djelovanja vlakana na zdravlje čovjeka. Osim, kao što je već spomenuto, pozitivnog utjecaja na rad crijeva, probavu te crijevnu mikrofloru, vlakna također snižavaju koncentraciju ukupnog kolesterola i koncentraciju LDL-kolesterola u krvi. Do smanjenja kolesterola dolazi zbog promjena u metabolizmu kolesterola jer se žučne kiseline vežu na prehrambena vlakna te potiču izlučivanje kolesterola. Na taj način se indirektno utječe i na prevenciju kardiovaskularnih bolesti. Neka istraživanja su pokazala da mogu utjecati i na prevenciju pojave raka dojke te povoljno djeluju na kožu. Unos vlakana nije rezerviran samo za odrasle već ih i djeca moraju unositi. Za djecu stariju od dvije godine unos bi trebao

iznositi 5 g po danu, a za adolescente 10 - 13 g po danu. Prosječan unos vlakna za zdravu odraslu osobu ovisno o tjelesnoj masi iznosi oko 20 - 35 g po danu (Slavino, 1987).

U današnje vrijeme koncept prehrambenih vlakana, u kojem su se zdravi učinci prije pripisivali samo polisaharidima i komponentama lignina, se mijenja kako bi se hrana počela promatrati iz drugačije perspektive. U ovom smislu, definiran je koncept prehrambenih vlakana s antioksidansima koji sadrži značajne količine prirodnih antioksidansa (uglavnom fenolnih spojeva) povezanih s neprobavljivim vlaknima (Quiros-Sauceda i sur., 2014). Prethodna istraživanja su potvrdila da polifenoli mogu ulaziti u interakcije s makromolekulama kao što su ugljikohidrati, proteini i lipidi (Jakobek, 2015). Sukladno s tim, prehrambena vlakna se smatraju potencijalnim nosiocima polifenola te ih mogu zaštititi od razgradnje i prenijeti u donje dijelove probavnog trakta, s potpunom ili djelomičnom razgradnjom u debelom crijevu. To može utjecati na bioraspoloživost odnosno količinu nutrijenata raspoloživu za adsorpciju u probavnom traktu, ali imati i druge potencijalno pozitivne efekte. Na taj način polifenoli u donjim dijelovima probavnog trakta mogu u izvornom obliku pokazati pozitivnu bioaktivnost kao što je antioksidacijsko djelovanje, modulacija enzima, interakcija s mikroflore te djelovanje metabolita polifenola. Buduća istraživanja o formuliranju kompleksa prehrambenih vlakana i fenolnih spojeva su potrebna kako bi se u potpunosti razjasnio doprinos na zdravstveno stanja potrošača ali i na kvalitetu prehrambenih proizvoda (Quiros-Sauceda i sur., 2014).

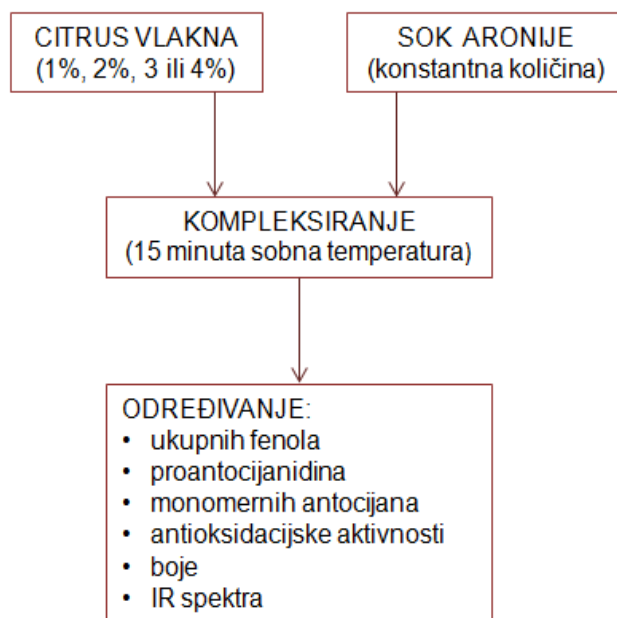
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak diplomskog rada bio je priprema bioaktivnih dodataka hrani na bazi citrus vlakana u kombinaciji s fenolima aronije i karakterizacija dobivenih kompleksa odnosno bioaktivnih dodataka.

Pripremu bioaktivnih dodataka hrani na bazi citrus vlakana i njihova karakterizacija (**Slika 14**):

- Priprema kompleksa citrus vlakna/aronija u obliku suhog praha (citrus vlakna su korištena u različitim količinama dok je količina soka aronije bila konstantna);
- Određivanje adsorbiranih ukupnih fenola aronije na citrus vlakna;
- Određivanje adsorbiranih ukupnih proantocijanidina aronije na citrus vlakna;
- Određivanje adsorbiranih antocijana aronije na citrus vlakna;
- Određivanje antioksidacijske aktivnosti kompleksa citrus vlakna/aronija (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode);
- Određivanje parametara boje kompleksa citrus vlakna/aronija (L^* , a^* , b^* , $^{\circ}h$, C^* , ΔE);
- Određivanje strukturnih promjena kompleksa citrus vlakna/kupina u odnosu na citrus vlakna;
- Utvrđivanje utjecaja različite količine citrus vlakana na ispitivane parametre.



Slika 13 Shematski prikaz rada

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Materijali

Kalij klorid, natrij acetat, klorovodična kiselina, octena kiselina, metanol, natrij karbonat, željezo klorid, amonij acetat, Folin-Ciocalteu reagens su nabavljeni od proizvođača Kemika (Zagreb). Trolox je nabavljen od proizvođača Sigma (Njemačka). 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiozolin-sulfonska kiselina) (ABTS) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) su nabavljeni od proizvođača Fluka (Njemačka). 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), galna kiselina, procijanidin B2 su nabavljeni od proizvođača Sigma, Njemačka. Neokuproin, bakar klorid su proizvodi Gram-mola (Hrvatska).

3.2.2. Priprema bioaktivnih dodataka hrani

Bioaktivni dodatci hrani na bazi vlakana pripremljeni su kompleksiranjem citrus vlakana i soka aronije.

Za pripremu kompleksa citrus vlakna/aronija, citrus vlakna i sok aronije miješani su 15 minuta na magnetskoj miješalici (600 rpm) na sobnoj temperaturi u odgovarajućim omjerima (**Tablica 6**). Nakon toga, dobivena smjesa je centrifugirana 15 minuta pri 4000 rpm. Centrifugiranjem se je odvojio kruti od tekućeg dijela te je mokri kruti dio odvojen kako bi se upotrijebio za pripremu suhog praha odnosno suhog kompleksa citrus vlakna/aronija. Suhi kompleksi citrus vlakna/aronija dobiveni su liofilizacijom. Prije postupka liofilizacije, mokri kruti dio dobiven centrifugiranjem je zamrznut na -18 °C 24 sata, a liofilizacija je provedena u liofizatoru (Christ Freeze Dryer, Alpha 1-4, Germany). Uvjeti liofilizacije podešeni su tako da je temperatura zamrzavanja bila -55 °C, temperatura sublimacije od -35 °C do 0 °C pod vakuumom od 0,220 mbar te u završnoj fazi temperatura izotermne desorpcije od 0 °C do 22 °C pod vakuumom od 0,060 mbar. Cijeli proces liofilizacije trajao je 12 sati.

Tablica 6 Kemijski sastav kompleksa citrus vlakna/aronija

Oznaka uzoraka	Citrus vlakna (g)	Sok aronije (mL)
CV_1%_A	0,5	50
CV_2%_A	1	50
CV_3%_A	1,5	50
CV_4%_A	2	50

(CV – citrus vlakna; 1 – 4 % - udio vlakana prilikom pripreme kompleksa)

3.2.3. Metode

3.2.3.1. Ekstrakcija uzoraka

Za određivanje ukupnih fenola, proantocijanidina, monomernih antocijana i antioksidacijske aktivnosti kompleksi su ekstrahirani. 0,3 g uzorka ekstrahiralo se je s 15 mL zakiseljenog metanola na sobnoj temperaturi. Nakon 24 sata smjesa se je profiltrirala te se je dobiveni ekstrakt koristio u daljnjim analizama.

3.2.3.2. Određivanje ukupnih fenola

Udio ukupnih fenola određen je Folin-Ciocalteu metodom. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje galne kiseline.

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka, 1,8 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu (1:10) reagensa i 8 mL otopine natrijevog karbonata u epruvetu, promućka se i ostavi da stoji 2 sata na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija se određuje na spektrofotometru pri 765 nm. Slijepa proba se pripravi sa destiliranom vodom (2 mL). Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.3.3. Određivanje proantocijanidina

Postupak: otpipetira se 0,1 mL uzorka te se doda 1 mL otopine 4-dimetil-amino-cinamaldehyda. Reakcijska smjesa se ostavi stajati 30 minuta te se mjeri apsorbancija na

640 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za procijanidin B2. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.3.4. Određivanje monomernih antocijana

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda.

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka u dvije kivete, u jednu je dodano 2,8 mL pufera pH 1, a u drugu 2,8 mL pufera pH 4,5. Nakon stajanja od 15 min uzorcima je pomoću spektrofotometra mjerena apsorbancija pri valnim duljinama od 515 nm i 700 nm. Za svaki uzorak pripremljene su tri paralele.

Udio antocijana je izračunat prema slijedećoj formuli

$$C_{\text{antocijana}} = (A \times M \times FR \times 1000) / \epsilon \times l$$

A – apsorbancija uzorka, a računa se prema formuli

$$A = (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

M – molekulska masa, 449,2

FR - faktor razrjeđenja

ϵ - molarna absorptivnost, 26 900

l - duljina kivete, 1 cm

(M i ϵ su uzeti za dominantnu vrstu antocijana odnosno za cijanidin-3-glukozid).

3.2.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje mjerenje antioksidacijske aktivnosti korištene su četiri metode; DPPH, ABTS, CUPRAC i FRAP.

DPPH metoda

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka, 3 mL otopine DPPH, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 15 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

ABTS metoda

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka te se doda 3,2 mL otopine ABTS, dobro promiješa i smjesa se ostavi reagirati 1h i 35 min u mraku. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 734 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

CUPRAC metoda

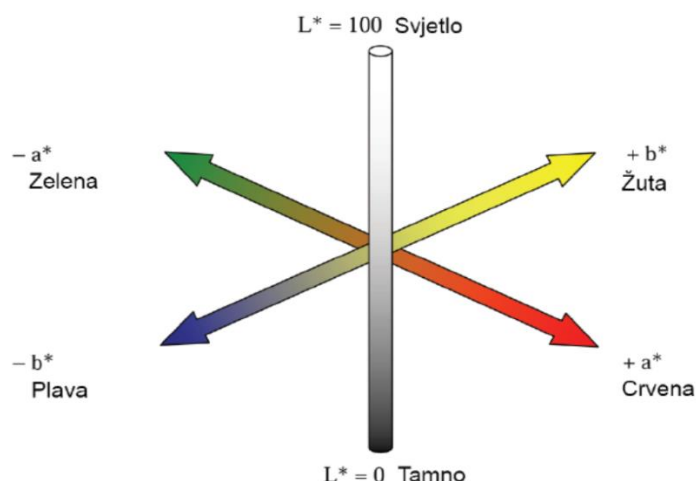
Postupak: otpipetira se 1 mL otopine bakar klorida, 1 mL otopine neokuproina, 1 mL amonij acetata, 0,2 mL uzorka te 0,9 mL vode. Smjesa se homogenizira te ostavi stajati 30 minuta. Nakon inkubacije mjeri se absorbanca na 450 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

FRAP metoda

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka, 3 mL FRAP otopine, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 30 minuta. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.3.6. Određivanje parametara boje

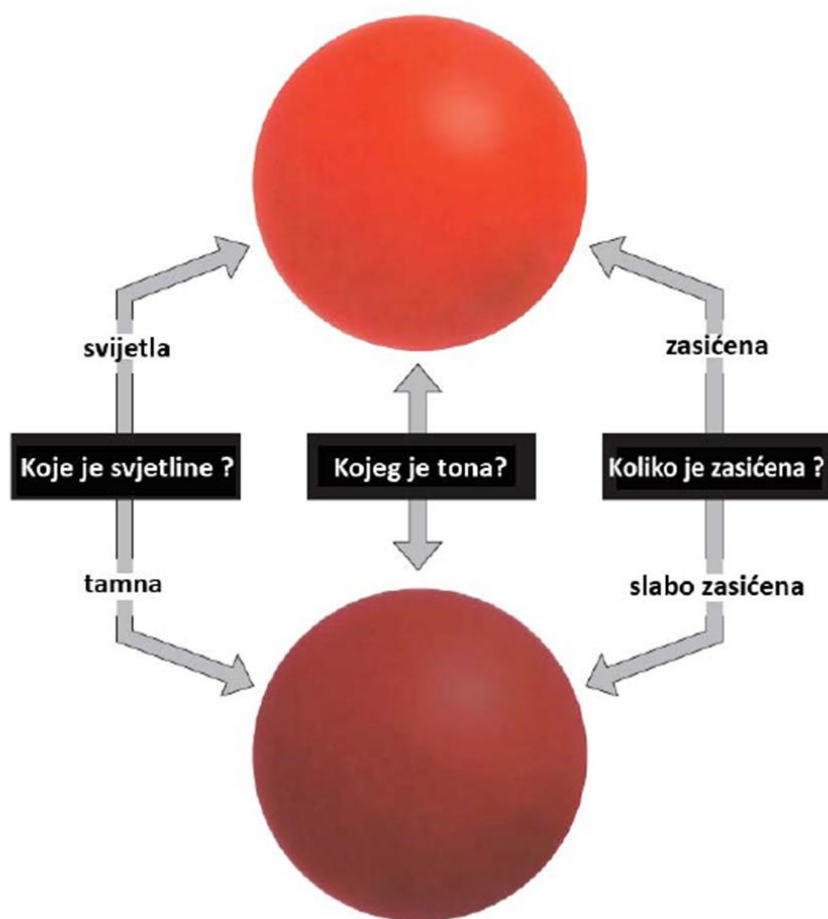
Mjerenje boje kao i promjena boje praćeni su kromametrom (Minolta CR-400). Ovaj tip kromametra mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Svjetlost se reflektira te takvu svjetlost mjeri šest jako osjetljivih silikonskih fotoćelija. Podatke zapisuje računalo i izražava ih u pet različitih sustava (X, Y, Z; Yxy; LCH; Lab; Hunter Lab). U radu je korišten Lab sustav koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko (**Slika 15**).



Slika 14 Prikaz CIE LAB prostora boja

Pomoću L^* vrijednosti određuje se je li neki predmet taman ili svijetao. Ako je $L^* = 0$ tada je predmet taman, a ako je $L^* = 100$ predmet je svijetao. a^* vrijednost određuje je li neki predmet crvene ili zelene boje. Ako je a^* pozitivan predmet je crvene boje, a ako je a^* negativan predmet je zelen. b^* vrijednost određuje je li neki predmet žute ili plave boje. Ako je b^* pozitivan predmet je žute boje, a ako je b^* negativan predmet je plav.

Osim L^* , a^* i b^* vrijednosti na kromametri su određeni i zasićenje (C^*) i ton boje ($^{\circ}h$). Značenje tona boje ($^{\circ}h$), zasićenja (C^*) i svjetline (L^*) prikazano je na **Slici 16**. Ton boje ($^{\circ}h$) definira vizualni doživljaj na temelju kojeg točno definiramo pojedinu boju npr. crvenu, plavu, zelenu itd. ovisno o dominantnoj valnoj duljini (**Slika 17**). Zasićenje (C^*) definira udio čiste boje u ukupnom vizualnom doživljaju boje tj. udio pojedinih valnih duljina u ukupnom tonu boje. Svjetlina (L^*) opisuje sličnost boje s nizom akromatskih boja od crne preko sive do bijele odnosno udio crne u nekom tonu boje.



Slika 15 Prikaz značenja svjetline, tona i zasićenja



Slika 16 Prikaz ovisnosti tona boje ($^{\circ}h$) i boje

Udaljenost između dvije točke u koordinatnom sustavu boje se izražava kao promjena boje odnosno ΔE . Promjena boje izračunava se na temelju L^* , a^* i b^* vrijednosti prema slijedećoj formuli:

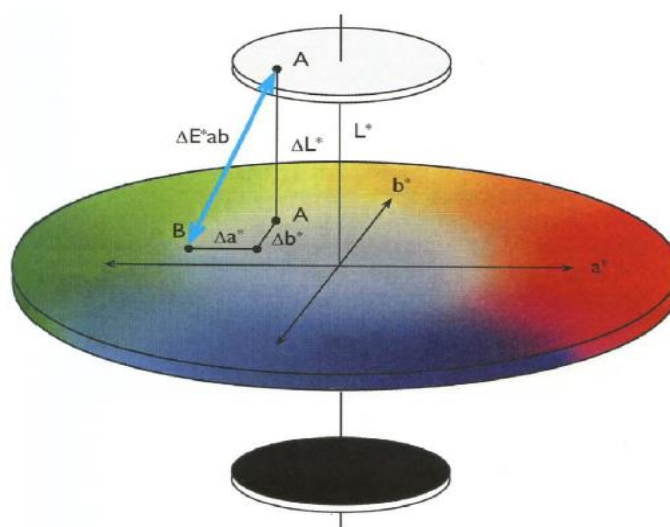
$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0.5}$$

$$\Delta L^* = L_k^* - L_u^*$$

$$\Delta a^* = a_k^* - a_u^*$$

$$\Delta b^* = b_k^* - b_u^*$$

(k – kontrolni uzorak; u – uspoređivani uzorak)



Slika 17 Grafički prikaz određivanja promjene boje

Na **Slici 18** prikazan je grafički prikaz određivanja promjene boje odnosno ΔE . Veza između izračunate promjene boje (ΔE) i ljudske percepcije boje dana je u **Tablici 7**.

Tablica 7 Veza između izračunate promjene boje (ΔE) i ljudske percepcije boje

ΔE	Vidljivost razlike ljudskim okom
< 0,2	Razlika boja se ne vidi
0,2 - 1	Razlika boja se primjećuje
1 - 3	Razlika boja se vidi
3 - 6	Razlika boja se dobro vidi
> 6	Očigledna odstupanja boja

3.2.3.7. FTIR-ATR analiza

FTIR-ATR analizom utvrđene su strukturne promjene na vlaknima nakon kompleksiranja s fenolima soka aronije. Snimanje FTIR spektra provedeno je od 4000 cm^{-1} do 600 cm^{-1} pomoću Cary 630 FTIR spektrometra.

3.2.3.8. Statistička analiza podataka

Statistička analiza rezultata je provedena pomoću ANOVA testa uz statističku značajnost od $P < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju pripremljena su četiri uzorka odnosno 4 kompleksa citrus vlakna/fenoli aronije (CV_A) koji se međusobno razlikuju po količini upotrijebljenog vlakna prilikom pripreme kompleksa odnosno prilikom kompleksiranja vlakna i fenola aronije. Koncentracija fenola aronije odnosno količina soka aronije tijekom kompleksiranja je bila konstantna. Količina vlakna za pripremu kompleksa je bila 1%, 2%, 3% i 4%, daljnjim povećanjem koncentracije vlakna dobiven je gel tako da se veće količine vlakna nisu ispitivale. Cilj istraživanja bio je ispitati mogućnost primjene citrus vlakana kao nosioca fenolnih komponenti. Spajanjem vlakana i fenola, biljnih komponenti s dokazanim pozitivnim učinkom na zdravlje (kroz višegodišnja istraživanja) kreirali bi se novi bioaktivni dodatci hrani. U ovom radu je ispitivana adsorpcija fenolnih komponenti na citrus vlakna, antioksidacijska aktivnost dobivenih kompleksa CV_A i boja CV_A kompleksa u ovisnosti sa promjenom količine citrus vlakana. Ujedno je i definirana promjena u strukturi kompleksa CV_A u odnosu na citrus vlakna.

4.1. Adsorpcija fenolnih komponenata na citrus vlakna

Kao parametri za definiranje adsorpcije fenolnih komponenata soka aronije na citrus vlakna određeni su ukupni fenoli, proantocijanidini i monomerni antocijani. Udio ukupnih fenola, proantocijanidina i monomernih antocijana na kompleksima citrus vlakna/aronija prikazan je u **Tablici 8**. Iz rezultata je vidljivo da su svi parametri određeni u najvećem udjelu na kompleksima pripremljenima s najmanjom količinom dodanog vlakna. Sukladno tome, udio ukupnih fenola na kompleksu CV_1%_A iznosi je 35,942 mg g⁻¹. Daljnjim povećanjem količine vlakna prilikom kompleksiranja došlo je do smanjenja adsorpcije ukupnih fenola na vlakna, tako da je duplim povećanjem količine vlakna došlo do smanjenja udjela ukupnih fenola za 30,95%. Smanjenje adsorbiranih ukupnih fenola na kompleks CV_3%_A iznosilo je 52,72% a na kompleks CV_4%_A čak 63,84%. Ovisnost smanjenja adsorbiranih ukupnih fenola s povećanjem količine vlakna je linearna, a koeficijent korelacije iznosio je 0,9585. Udio proantocijanidina na kompleksu CV_1%_A iznosi je 18,639 mg g⁻¹. Kao i u slučaju ukupnih fenola, ovisnost smanjenja adsorbiranih proantocijanidina s povećanjem količine vlakna je linearna, a koeficijent korelacije iznosio je 0,9838. Povećanjem količine vlakna na 2% došlo je do smanjenja adsorpcije proantocijanidina za 38,18% odnosno nešto više nego slučaju ukupnih fenola. Daljnjim povećanjem količine vlakna, smanjenje adsorpcije proantocijanidina u odnosu na ukupne fenole je bilo znatno više, odnosno na kompleks CV_3%_A smanjenje adsorpcije je iznosilo 70,24% a na kompleks CV_4%_A čak 91,07%. U slučaju antocijana, utvrđen je drugačiji trend nego u slučaju ukupnih fenola i proantocijanidina. Povećanjem količine vlakna, ali do 3% došlo je do linearnog smanjenja

adsorpcije antocijana, koeficijent korelacije je iznosio 0,9952. Kompleks CV_4%_A i kompleks CV_3%_A imali su jednaku količinu adsorbiranih antocijana odnosno povećanjem količine vlakna s 3% na 4% nije utvrđena razlika u afinitetu vlakna prema antocijanima. Na kompleksu CV_1%_A utvrđeno je 3,419 mg g⁻¹ antocijana, povećanjem količine vlakna na 2% udio antocijana se je smanjio za 22,44% , a povećanjem količine vlakna na 3% i 4% za 50%. Smanjenje adsorpcije antocijana s povećanjem količine vlakna je manje u usporedbi s smanjenjem ukupnih fenola i proantocijanidina s povećanjem količine vlakna.

Tablica 8 Udio ukupnih fenola, proantocijanidina i antocijana na kompleksima citrus vlakna/aronija

Uzorci	Ukupni fenoli (mg g ⁻¹)	Proantocijanidini (mg g ⁻¹)	Antocijani (mg g ⁻¹)
CV_1%_A	35,942±0,047 ^a	18,639±0,032 ^a	3,419±0,096 ^a
CV_2%_A	24,812±0,085 ^b	11,522±0,033 ^b	2,652±0,037 ^b
CV_3%_A	16,991±0,048 ^c	5,548±0,012 ^c	1,676±0,073 ^c
CV_4%_A	12,997±0,048 ^d	1,665±0,005 ^d	1,697±0,066 ^c

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

CV – citrus vlakna; A – sok aronije; 1% - 4% - udio citrus vlakna prilikom kompleksiranja.

4.2. Antioksidacijska aktivnost kompleksa citrus vlakna/aronija

Antioksidacijska aktivnost kompleksa citrus vlakna/aronija prikazana je u **Tablici 9**. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene su primjenom četiri metode; DPPH, ABTS, CUPRAC i FRAP. Primjenom sve četiri metode utvrđena je najveća antioksidacijska aktivnost kompleksa CV_1%_A, a povećanjem količine vlakana dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti. Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom za kompleks CV_1%_A iznosila je 1,992 μmol g⁻¹, za kompleks CV_2%_A 1,672 μmol g⁻¹, za kompleks CV_3%_A 1,137 μmol g⁻¹ i za kompleks CV_4%_A 0,909 μmol g⁻¹. Antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom bila je viša u odnosu na vrijednosti dobivene DPPH metodom za komplekse CV_1%_A i CV_2%_A, dok su za preostala dva kompleksa dobivene gotovo iste vrijednosti. ABTS metoda je manje selektivna u usporedbi s DPPH metodom tako da su takvi rezultati očekivani za komplekse CV_1%_A i CV_2%_A. Što se tiče preostala dva kompleksa vjerojatno je tijekom kompleksiranja došlo do dodatnih interakcija između slobodnih grupa te nije postignuti isti efekt s većom količinom vlakana. Antioksidacijska aktivnost za kompleks CV_1%_A iznosila je 3,560 μmol g⁻¹, za kompleks CV_2%_A 2,022 μmol g⁻¹, za kompleks

CV_3%_A 1,178 $\mu\text{mol g}^{-1}$ i za kompleks CV_4%_A 0,923 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Navedene dvije metode imaju jednaki mehanizam, odnosno baziraju se na blokiranju slobodnih radikala. Preostale dvije metode, CUPARC i FRAP imaju drugačiji mehanizam odnosno baziraju se na interakciji antioksidanasa s metalima i inaktivaciji metala kroz te interakcije. Antioksidacijska aktivnost određena CUPRAC metodom za kompleks CV_1%_A iznosila je 20,118 $\mu\text{mol g}^{-1}$, za kompleks CV_2%_A 15,927 $\mu\text{mol g}^{-1}$, za kompleks CV_3%_A 10,373 $\mu\text{mol g}^{-1}$ i za kompleks CV_4%_A 8,508 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Primjenom FRAP metode dobivene su znatno niže vrijednosti. Antioksidacijska aktivnost za kompleks CV_1%_A iznosila je 0,232 $\mu\text{mol g}^{-1}$, za kompleks CV_2%_A 0,191 $\mu\text{mol g}^{-1}$, za kompleks CV_3%_A 0,122 $\mu\text{mol g}^{-1}$ i za kompleks CV_4%_A 0,092 $\mu\text{mol g}^{-1}$.

Tablica 9 Antioksidacijska aktivnost citrus vlakna/fenoli aronije kompleksa

Uzorci	DPPH ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	ABTS ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	CUPRAC ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
CV_1%_A	1,992 $\pm$ 0,005 ^a	3,560 $\pm$ 0,010 ^a	20,118 $\pm$ 0,048 ^a	0,232 $\pm$ 0,002 ^a
CV_2%_A	1,672 $\pm$ 0,018 ^b	2,022 $\pm$ 0,063 ^b	15,927 $\pm$ 0,110 ^b	0,191 $\pm$ 0,003 ^b
CV_3%_A	1,137 $\pm$ 0,007 ^c	1,178 $\pm$ 0,005 ^c	10,373 $\pm$ 0,058 ^c	0,122 $\pm$ 0,002 ^c
CV_4%_A	0,909 $\pm$ 0,014 ^d	0,923 $\pm$ 0,004 ^d	8,508 $\pm$ 0,055 ^d	0,092 $\pm$ 0,001 ^d

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

CV – citrus vlakna; A – sok aronije; 1% - 4% - udio citrus vlakna prilikom kompleksiranja.

4.3. Ovisnost antioksidacijske aktivnosti o fenolnim komponentama

Profil antioksidanasa u uzorku odnosno struktura antioksidanasa diktiraju mehanizam antioksidacijskog djelovanja komponenata. Obzirom na primijenjene metode utvrđivanja antioksidacijske aktivnosti, u ovom istraživanju možemo definirati da li kompleksi imaju jaču sposobnost inaktivacije odnosno blokiranja slobodnih radikala ili veći afinitet prema inaktivaciji metala. Stavljanjem u odnos dobivene rezultate za pojedine fenolne komponente i antioksidacijske aktivnosti na temelju koeficijenta korelacije možemo definirati sklonost komponenata određenom mehanizmu antioksidacijskog djelovanja. Što je koeficijent korelacije veći to je jača veza između pojedinih fenolnih skupina i antioksidacijske aktivnosti. Ukupni fenoli i proantocijanidini (**Tablica 10**) imaju vrlo visoki koeficijent korelacije s antioksidacijskom aktivnosti utvrđenom sa sve četiri metode. Na temelju toga možemo zaključiti da je mehanizam antioksidacijskog djelovanja i preko blokiranja slobodnih radikala i preko interakcije s metalima te njihove inaktivacije. Monomerni antocijani imaju također

zadovoljavajući visoki koeficijent korelacije sa sve četiri metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti (**Tablica 10**), ali su koeficijenti korelacije nešto niži u odnosu na koeficijente korelacije za ukupne fenole i proantocijanidine. Na temelju ovih vrijednosti također možemo zaključiti da i antocijani posjeduju oba navedena mehanizma antioksidacijskog djelovanja.

Tablica 10 Koeficijent korelacije (R^2) koji prikazuje ovisnost udjela fenolnih komponenata i antioksidacijske aktivnosti

	DPPH	ABTS	FRAP	CUPRAC
Ukupni fenoli	0,9607	0,9873	0,9611	0,9806
Proantocijanidini	0,9803	0,9634	0,9809	0,9886
Monomerni antocijani	0,9488	0,9599	0,9475	0,9738

4.4. Boja kompleksa citrus vlakna/aronija

Od parametara boje za citrus vlakna i dobivene komplekse izmjereni su L^* , a^* , b^* , $^{\circ}h$ i C^* parametri, a ujedno je i izračunata promjena boje (ΔE) kompleksa u odnosu na citrus vlakna. Dobiveni rezultati su prikazani u **Tablici 11**.

Citrus vlakna imala su vrlo visoku L^* vrijednost, 82,69 što definira svijetli uzorak. Adsorpcijom fenolnih komponenata aronije na vlakna došlo je do značajne promjene L^* vrijednosti te se ona smanjuje odnosno kompleksi postaju tamniji. L^* vrijednost je iznosila 40,03 za kompleks CV_1%_A, 43,60 za kompleks CV_2%_A, 45,92 za kompleks CV_3%_A i 46,54 za kompleks CV_4%_A. Povećanjem količine vlakna povećavala se je i vrijednost L^* odnosno kompleksi su bili sve svjetliji. Vlakna su imala nisku pozitivnu vrijednost parametra a^* koji definira crveni ton uzorka, 1,20. Adsorpcijom antocijana aronije na vlakna, a^* vrijednost se je značajno povećala te je iznosila 21,26 za kompleks CV_1%_A, 23,14 za kompleks CV_2%_A, 23,69 za kompleks CV_3%_A i 26,64 za kompleks CV_4%_A. Između kompleksa s 3% i 4% vlakna nije bilo razlike. b^* vrijednost definira žuti ton uzorka, a za vlakna ova vrijednost je iznosila 19,21. Adsorpcijom fenola aronije, b^* vrijednost se je značajno smanjila što je bilo i za očekivati obzirom da se je povećala a^* vrijednost odnosno kompleksi su poprimili crvenu boju te je blaga žuta boja čistog vlakna prikrivena. b^* vrijednost je iznosila 3,90 za kompleks CV_1%_A, 4,21 za kompleks CV_2%_A, 3,79 za kompleks CV_3%_A i 3,71 za kompleks CV_4%_A. Između kompleksa s 3% i 4% vlakna nije bilo

razlike. Na temelju izmjerenih L^* , a^* i b^* vrijednosti izračunata je promjena boje kompleksa u odnosu na vlakno (ΔE). Najveća promjena boje utvrđena je za kompleks CV_1%_A, 49,55, a daljnjim povećanjem količine vlakna promjena boje se je smanjivala. Promjena boje za kompleks CV_2%_A iznosila je 47,26, za kompleks CV_3%_A 45,76 i za kompleks CV_4%_A 45,27. I u ovom slučaju je vidljivo da između kompleksa s 3% i 4% nema značajne razlike. Prema prikazu veze između izračunate promjene boje i ljudske percepcije boje u eksperimentalnom dijelu, vidljivo je da je razlika u boji pripremljenih kompleksa u odnosu na vlakno vrlo vidljiva ljudskim okom. Obzirom da je kompleks CV_1%_A imao najveći udio fenolnih komponenti i najveću antioksidacijsku aktivnost, boja ostalih kompleksa je uspoređena s tim uzorkom, ΔE^1 . Promjena boje u odnosu na kompleks CV_1%_A, za kompleks CV_2%_A iznosila je 4,04, za kompleks CV_3%_A 6,37 i za kompleks CV_4%_A 6,94. Prema prikazu veze između izračunate promjene boje i ljudske percepcije boje u eksperimentalnom dijelu, vidljivo je da je razlika u boji ostalih kompleksa u odnosu na kompleks CV_1%_A vidljiva ljudskim okom.

Tablica 11 Parametri boje kompleksa citrus vlakna/fenoli aronije

Uzorci	L^*	a^*	b^*	ΔE	ΔE^1	$^{\circ}h$	C^*
CV_100%	82,69±0,15 ^a	1,20±0,07 ^a	19,21±0,03 ^a			86,42±0,19 ^a	19,25±0,03 ^a
CV_1%_A	40,03±0,02 ^b	21,26±0,04 ^b	3,90±0,02 ^b	49,55		10,41±0,03 ^b	21,61±0,04 ^b
CV_2%_A	43,60±0,07 ^c	23,14±0,01 ^c	4,21±0,03 ^c	47,26	4,04	10,31±0,07 ^b	23,52±0,01 ^c
CV_3%_A	45,92±0,05 ^d	23,69±0,03 ^d	3,79±0,04 ^d	45,76	6,37	9,09±0,02 ^c	23,97±0,03 ^d
CV_4%_A	46,54±0,02 ^e	23,64±0,02 ^d	3,71±0,04 ^d	45,27	6,94	8,92±0,01 ^d	23,93±0,03 ^d

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

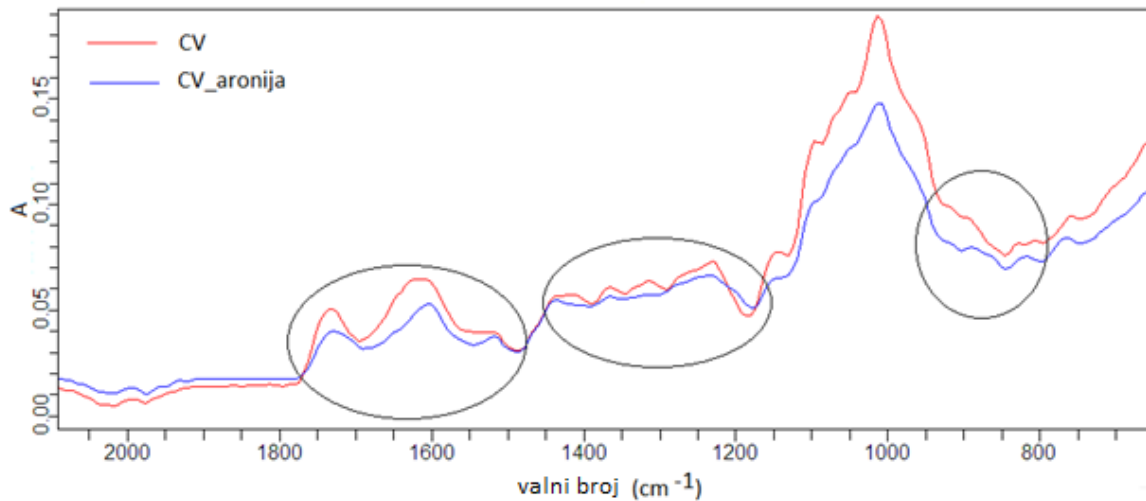
CV – citrus vlakna; A – sok aronije; 1% - 4% - udio citrus vlakna prilikom kompleksiranja.

ΔE – promjena boje kompleksa u odnosu na citrus vlakna; ΔE^1 – promjena boje kompleksa u odnosu na kompleks CV_1%_A

Ton boje odnosno $^{\circ}h$ vrijednost za vlakno je iznosila 80,42 a adsorpcijom fenola aronije došlo je do značajne promjene tona boje. $^{\circ}h$ vrijednost za kompleks CV_1%_A iznosila je 10,41, za kompleks CV_2%_A 10,31, za kompleks CV_3%_A 9,09 i za kompleks CV_4%_A 8,92. Između kompleksa s 1% i 2% vlakna nije bilo razlike već je razlika uočena s daljnjim povećanjem količine vlakna. Zasićenje boje odnosno C^* vrijednost za vlakno je iznosila 19,25. Adsorpcijom fenola aronije došlo je do povećanja zasićenja i to najviše na kompleksu CV_1%_A (21,61). Preostali kompleksi imali su zasićenje boje u rasponu od 23,52 i 23,97.

4.5. FTIR-ATR analiza

Primjenom FTIR-ATR snimljeni su IR spektri citrus vlakna i dobivenih kompleksa citrus vlakna/aronija. IR spektri uzoraka prikazani su na **Slici 19**. Iz dobivenih spektra je vidljivo da tijekom kompleksiranja citrus vlakna sa sokom aronije dolazi do promjene u spektru u odnosu na čisto citrus vlakna. Navedene promjene definiraju promjenu u strukturi kompleksa u odnosu na vlakno zbog vezivanja komponenta iz aronije na vlakna. Citrus vlakno ima široku apsorpcijsku vrpca s maksimumom na 3295 cm^{-1} . Navedena regija je karakteristična za O-H veze. Na kompleksima je utvrđena razlika u tom dijelu spektra u odnosu na vlakna odnosno došlo je do pomicanja maksimuma vrpce na 3280 cm^{-1} što je indikator u promjeni O-H veze (npr. rastezanja veze, promjena simetričnosti veze). Slijedeća regija u kojoj su pronađene razlike između kompleksa i vlakna je od 1730 cm^{-1} do 1500 cm^{-1} . U toj regiji vidljive su promjene u širini apsorpcijskih vrpca, ali i u izraženosti vrpca. Apsorpcijska vrpca na $1729,5\text{ cm}^{-1}$ definira C=O vezu, a iz spektra je vidljivo da je kompleksiranjem došlo do širenja te vrpce što znači i do promjene u C=O vezi. Tijekom kompleksiranja došlo je do suženja vrpce na $1610,2\text{ cm}^{-1}$ što definira promjene na C-C vezi (istezanje) fenilnog prstena. Na kompleksima je utvrđen jasna vrpca na 1510 cm^{-1} koja ukazuje na planarne vibracije savijanja C-H veze fenilnog prstena. Slijedeća regija u kojoj su pronađene razlike između kompleksa i vlakna je od 1450 cm^{-1} do 1200 cm^{-1} . Vlakno je imalo vrpca na 1416 cm^{-1} (promjena C-H), koja se prilikom kompleksiranja gubi te je na kompleksima izraženija vrpca na 1438 cm^{-1} (koja je karakteristična za savijanje CH_2 veze). Na vlaknu je utvrđena vrpca na 1312 cm^{-1} koja je kompleksiranjem nestala. Također, u ovoj regiji vlakna imaju vrpca na 1230 cm^{-1} koja se kompleksiranjem pomiče na 1237 cm^{-1} i mijenja oblik što ukazuje na promjene PO_2^- veze. Također je uočena i promjena u regiji od 950 cm^{-1} do 800 cm^{-1} . Blaga vrpca na 900 cm^{-1} na vlaknu se pomiče na kompleksima i širi odnosno dolazi do promjena u C-C vezi, a stvara se na kompleksima i jedna vrpca na 820 cm^{-1} . Dobiveni rezultati snimanjem IR spektra potvrđuju vezivanje fenolnih komponentata aronije na citrus vlakna.



Slika 19 IR spektri citrus vlakna i dobivenih kompleksa citrus vlakna/aronija kompleksa

Dobiveni kompleksi mogli bi se koristiti kao bioaktivni dodatci u prehrambene proizvode s ciljem obogaćivanja proizvoda fenolima, antocijanima odnosno komponentama s antioksidacijskim djelovanjem. Ujedno te komponente zbog svog antioksidacijskog potencijala mogle bi spriječiti određene degradacijske reakcije u proizvodu kao što su npr. reakcije oksidacije koje uzrokuju smanjenje kvalitete konačnog proizvoda. Obzirom da je navedeni izvor fenola odnosno sok aronije bogat antocijanima, tako dobiveni bioaktivni dodatci imali bi i utjecaj na boju proizvoda u koji su dodani.

5. ZAKLJUČAK

Cilj istraživanja bio je ispitati mogućnost primjene citrus vlakana kao nosioca fenolnih komponenti na temelju kojih bi se kreirali novi bioaktivni dodatci hrani. Na osnovi rezultata dobivenih ovim istraživanjem, možemo zaključiti:

- Udio ukupnih fenola, proantocijanidina i monomernih antocijana na kompleksima citrus vlakna/aronija smanjuje se povećanjem količine vlakna.
- Antioksidacijska aktivnost kompleksa citrus vlakna/aronija određena ABTS metodom bila je viša u odnosu na vrijednosti dobivene DPPH metodom za komplekse CV_1%_A i CV_2%_A, dok su za preostala dva kompleksa dobivene gotovo iste vrijednosti.
- Antioksidacijska aktivnost određena CUPRAC i FRAP bila je najveća za kompleks CV_1%_A, a najmanje za kompleks CV_4%_A.
- Najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene su CUPRAC metodom, a najmanje FRAP metodom.
- Mehanizam antioksidacijskog djelovanja ukupnih fenola i proantocijanidina djeluje i preko blokiranja slobodnih radikala i preko interakcije s metalima te njihove inaktivacije jer imaju vrlo visoki koeficijent korelacije s antioksidacijskom aktivnosti utvrđenom za sve četiri metode.
- Monomerni antocijani imaju također zadovoljavajući visoki koeficijent korelacije sa sve četiri metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti, ali su koeficijenti korelacije nešto niži u odnosu na koeficijente korelacije za ukupne fenole i proantocijanidine.
- Adsorpcijom fenolnih komponenata aronije na vlakna došlo je do značajne promjene L^* vrijednosti te se ona smanjuje odnosno kompleksi postaju tamniji no povećanjem količine vlakna na kompleksima citrus vlakna/aronija povećavala se je i vrijednost L^* odnosno kompleksi su bili sve svjetliji.
- Vlakna su imala nisku pozitivnu vrijednost parametra a^* koji definira crveni ton uzorka, ali adsorpcijom antocijana aronije na vlakna, a^* vrijednost se je značajno povećala.
- Adsorpcijom fenola aronije na kompleksima citrus vlakna/aronija, b^* vrijednost se je značajno smanjila što je bilo i za očekivati obzirom da se je povećala a^* vrijednost odnosno kompleksi su poprimili crvenu boju te je blaga žuta boja čistog vlakna prikrivena.
- Najveća ukupna promjena boje (ΔE) kompleksa u odnosu na vlakno utvrđena je za kompleks CV_1%_A, a daljnjim povećanjem količine vlakna ukupna promjena boje se je smanjivala.
- Adsorpcijom fenola aronije došlo je do značajne promjene tona boje.

- Adsorpcijom fenola aronije došlo je do povećanja zasićenja i to najviše na kompleksu CV_1%_A.
- Dobiveni rezultati snimanjem IR spektra potvrđuju vezivanje fenolnih komponenata aronije na citrus vlakna.

6. LITERATURA

- Bais HP, Walker TS, Kennan AJ, Stermitz FR, Vivanco JM: Structure-dependent phytotoxicity of catechins and other flavonoids: Flavonoid conversions by cell-free protein extracts of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:897-901, 2003.
- Bilić B: Utjecaj dodataka biljnih ekstrakata na stabilnost antocijana u soku kupine. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Cao G, Sofic E, Prior RL: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* 22:749–760, 1997.
- Čalić S, Friganović E, Maleš V, Mustapić A: Funkcionalna hrana i potrošači. *Praktični menadžment* 2:51-57, 2011.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A: Dietary (Poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling* 18:1818-1892, 2013.
- Gaćina N: Alternativne sirovine prehrambenih vlakana. U *Zbornik radova Veleučilišta u Šibeniku*, str. 123-30. Veleučilište u Šibeniku, Šibenik, 2014.
- Jakobek L: Karakterizacija polifenola u vodu i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voda. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Jakobek L: Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry* 175:556-567, 2015.
- Jeppsson N, Johansson R: Changes in fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) during maturation. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75:340-345, 2000.
- Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 55:279-290, 2004.
- Krešić G: *Trendovi u prehrani*. Fakultet za menadžment u turizmu i ugostiteljstvu, Opatija, 2012.
- Kullig SE, Rawel HM: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica* 74:1625-1634, 2008.
- Kurtagić H: Polifenoli i flavonoidi u medu. *Hrana u zdravlju i bolesti* 6:28-35, 2017.

- Lewis NM, Seburg S, Flanagan NL: Enriched eggs as a source of N-3 polyunsaturated fatty acids for humans. *Poultry Science* 79:971-974, 2000.
- Mandić M, Nosić M: *Funkcionalna svojstva prehrambenih vlakana*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2009.
- Mark-Herbert C: Innovation of a new product category - Functional foods, *Technovation* 24: 713-719, 2004.
- Oszmiański J, Wojdylo A: *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology* 221:809-813, 2005.
- Pathak Y: *Handbook of nutraceuticals*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2010.
- Quirós-Sauceda AE, Palafox-Carlos H, Sáyago-Ayerdi SG, Ayala-Zavala JF, Bello-Perez LA, Alvarez-Parrilla E, de la Rosa LA, González-Córdova AF, González-Aguilar GA: Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & Function* 5:1063-1072, 2014.
- Rein MJ: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *Disertacija*. Sveučilište Helsinki, Helsinki, 2005.
- Roberfroid MB: Defining functional foods. In *Functional foods concept to product*, str. 9-25. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, 2000.
- Sikorski Z: Chemical and functional properties of food components. CRC Press, USA, 2002.
- Slavino JL: Dietary fiber: classification, chemical analyses, and food sources. *Journal of the American Dietetic Association* 87:1164-1171, 1987.
- Spence JT: Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:4-6, 2006.
- Starlin T, Gopalakrishnan VK: Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* wight and arn-an *in vitro* study. *Asian Journal of Pharmacy and Clinical Research* 6:152-157, 2013.
- Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB: Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7:1089-1099, 2008.

- Thakur BR, Singh RK, Handa AK: Chemistry and uses of pectin: a review. *Food Science & Nutrition* 37:47-73, 1997.
- Thomas MJ: The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35:21-39, 1995.
- Tolić MT, Landeka-Jurčević I, Panjkota-Krbavčić I, Marković K: Antioxidant Properties of Chokeberry Products. *Food Technology and Biotechnology* 53:171-179, 2015.
- Tomić A, Tomaz I, Jeromel A: Kemijski sastav voćnih vina od aronije. *Glasnik Zaštite Bilja*, 39:63-69, 2016.
- Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JPE: Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanism of action. *Nutrients* 2: 1106- 1131, 2010.
- Yanishlieva-Maslarova NV, Heinonen IM: Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. U *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing Ltd, 2001.
- Živković R: *Hranom do zdravlja*. Medicinska naklada, Zagreb, 2002.