

Utjecaj dodatka saharoze i trehaloze na adsorpciju fenola aronije na proteine smeđe riže

Janjatović, Gorana

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:480917>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Gorana Janjatović

UTJECAJ DODATKA SAHAROZE I TREHALOZE NA ADSORPCIJU
FENOLA ARONIJE NA PROTEINE SMEĐE RIŽE

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Gorana Janjatović

**UTJECAJ DODATKA SAHAROZE I TREHALOZE NA ADSORPCIJU
FENOLA ARONIJE NA PROTEINE SMEĐE RIŽE**

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: -

Utjecaj dodatka saharoze i trehaloze na adsorpciju fenola aronije na proteine smeđe riže

Gorana Janjatović, 0113140749

Sažetak: Cilj ovog rada je bio pripremiti bioaktivne dodatke hrani na bazi proteina smeđe riže u kombinaciji s fenolima aronije (kompleks proteini/aronija). U tu svrhu se provelo kompleksiranje proteina smeđe riže i soka aronije te kompleksiranje proteina smeđe riže, disaharida (saharaze i trehaloze) i soka aronije. Disaharidi su korišteni s ciljem utvrđivanja da li njihova prisutnost poboljšava adsorpciju fenola na proteine. Pripremljenim kompleksima određen je udio adsorbiranih fenola, proantocijanidina i antocijana. Također je određena i antioksidacijska aktivnost pomoću DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode, te parametri boje dobivenih kompleksa. Najveća količinu fenola, proantocijanidina i antocijana određena je u enkapsuliranim uzorcima nastalim kompleksiranjem proteina riže i aronije te proteina riže/trehaloze i aronije. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazali su enkapsulirani uzorci nastali kompleksiranjem proteina riže/aronije i trehaloze. Najmanja ukupna promjena boje uočena je kod uzoraka nastalih kompleksiranjem aronije/saharaze i proteina riže. Strukturne promjene na dobivenim kompleksima u odnosu na čisti protein određene su snimanjem IR spektra.

Ključne riječi: aronija, fenoli, proteini smeđe riže, saharoza, trehaloza

Rad sadrži: 47 stranica
24 slika
12 tablica
0 priloga
41 literaturna referenca

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. 09. 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 Technologies
Subdepartment of Fruit and Vegetable Technology
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, prof.*

Technical assistance: -

Influence of Sucrose and Trehalose Addition on Adsorption of Chokeberry Phenolics on Brown Rice Proteins

Gorana Janjatović, 0113140749

Summary: The aim of this study was to prepare bioactive food additives based on brown rice proteins in combination with chokeberry phenols (protein/chokeberry complex). For this purpose, complexation of brown rice proteins and chokeberry juice and complexation of brown rice proteins, disaccharides (sucrose and trehalose) and chokeberry juice was performed. Disaccharides were used to determine whether their presence enhances phenol adsorption on proteins. The content of adsorbed phenols, proanthocyanidins and anthocyanins was determined on the prepared complexes. Antioxidant activity was determined using DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC methods. Color parameters of the obtained complexes were determined as well. The highest amount of phenol, proanthocyanidins and anthocyanins was found on encapsulated samples formed by the complexation of proteins and chokeberry and proteins/trehalose and chokeberry. The highest antioxidant activity was evaluated for encapsulated samples formed by complexation of proteins/chokeberry and trehalose. The lowest total color change was observed in samples formed by complexation of chokeberry/sucrose and rice protein. Structural changes of complexes in comparison to proteins were determined by monitoring of IR spectra.

Key words: chokeberry, phenols, brown rice protein, sucrose, trehalose

Thesis contains: 47 pages
24 figures
12 tables
0 supplements
41 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Anita Pichler</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Mirela Kopjar</i> , PhD, prof. | supervisor |
| 3. <i>Nela Nedić Tiban</i> , PhD, 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.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Kopjar na izrazitoj susretljivosti, pomoći i podršci tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se roditeljima i bratu na velikoj podršci, razumijevanju, pomoći i bezuvjetnoj ljubavi koju su mi pružali tijekom godina studiranja.

Od srca Vam zahvaljujem.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. ARONIJA (<i>Aronia melanocarpa</i>)	2
2.1.1. Morfološke osobine aronije	2
2.1.2. Kemijski sastav aronije.....	3
2.1.2.1. Fenolni spojevi	3
2.1.2.2. Polifenoli	4
2.1.2.3. Flavonoidi.....	6
2.1.2.4. Fenolne kiseline.....	7
2.1.2.5. Proantocijanidi	8
2.1.2.6. Vitamini i minerali	9
2.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST	11
2.3. INTERAKCIJE FENOLA I PROTEINA	16
2.3.1. Mehanizam djelovanja interakcija.....	17
2.3.3. Faktori koji utječu na interakcije	19
2.3.5. Metode za istraživanje interakcija fenola i proteina.....	20
2.3.4. Mikroenkapsulacija.....	21
2.4. SVOJSTVA SAHAROZE I TREHALOZE	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. ZADATAK.....	24
3.2.1. Materijali.....	25
3.2.2. Priprema bioaktivnih dodataka hrani	25
3.2.3. Metode	27
3.2.3.1. Uzorci za analizu	27
3.2.3.2. Određivanje ukupnih fenola.....	27
3.2.3.3. Određivanje proantocijanidina.....	27
3.2.3.4. Određivanje monomernih antocijana.....	27
3.2.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	28
3.2.3.6. Određivanje parametara boje	29
3.2.3.7. FTIR-ATR analiza	33
3.2.3.8. Statistička analiza podataka	33
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. UDIO FENOLA, PROANTOCIJANIDINA I ANTOCIJANA NA KOMPLEKSIMA	34
4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KOMPLEKSA	35
4.3. PARAMETRI BOJE.....	37
4.4. FTIR-ATR ANALIZA KOMPLEKSA	39
5. ZAKLJUČAK	43
6. LITERATURA.....	44

Popis oznaka, kratica i simbola

RP	proteini smeđe riže
A	sok aronije
S	saharoza
T	trehaloza
RP/A	proteini smeđe riže + aronija
A/S+RP	aronija/saharoza + proteini smeđe riže
A/T+RP	aronija/trehaloza + proteini smeđe riže
RP/A+S	proteini smeđe riže/aronija + saharoza
RP/A+T	proteini smeđe riže/aronija + trehaloza
RP+S+A	proteini smeđe riže + saharoza + aronija
RP+T+A	proteini smeđe riže + trehaloza + aronija
RP/S+A	proteini smeđe riže/saharoza + aronija
RP/T+A	proteini smeđe riže/trehaloza + aronija

Diplomski rad je napravljen u sklopu projekta PZS-2019-02-1595.

1. UVOD

Aronija (*Aronia melanocarpa*) je izrazito cijenjena biljka zbog svog nutritivnog sastava koje doprinosi nizu pozitivnih učinaka na zdravlje. Neki od pozitivnih učinaka na zdravlje su poticanje metabolizma, detoksikacija organizma, snižava krvni tlak, štiti stanice od oksidacijskog stresa i ojačava imuni sustav. Plod aronije su bobice plavo-ljubičaste boje koje se rijetko konzumiraju u svježem obliku zbog kiselkastog i oporog okusa i obično se prerađuju i konzumiraju u obliku sokova, džemova, vina i gaziranih pića (Kokotkiewicz, 2010). Kemijski sastav aronije sadrži veliki broj polifenolnih spojeva (antocijana, flavona, fenolnih kiselina i flavana) kao i vitamina i minerala. Velika količina polifenolnih komponenti u kemijskom sastavu aronije odgovorna je za njenu antioksidacijsku aktivnost. Antioksidansi su tvari koje hvataju slobodne radikale i sprječavaju daljnje odvijanje lančanih reakcija. Kod aronije antioksidansi su polifenoli koji mogu hvatati slobodne radikale ili reagirati s metalnim ionima koji su inicijatori nastanka slobodnih radikala (Jakobek, 2007).

Fenolni spojevi mogu stupati u interakcije s proteinima, jer su davaoci vodika i tvore vodikove veze s karboksilnim skupinama proteina. Kompleksi fenola i proteina nastaju reverzibilnim (vodikove veze, hidrofobne veze i van der Waalsove veze) i ireverzibilnim (kovalentne veze) molekulskim interakcijama. Tim interakcijama možemo sačuvati fenolne spojeve budući da su veoma osjetljivi na okolne faktore i njihova razgradnja u probavnom traktu traje kratko ili se zadržavaju u želudci pri čemu ostaju dovoljno neiskorišteni (Ozda i sur., 2013). Mikroenkapsulacija fenolnih spojeva rješava nedostatke vezane za fenole poput njihove nestabilnosti, neugodnog mirisa i poboljšanje njihove raspoloživosti. Primjenom proteina i fenolnih spojeva odnosno njihovom interakcijom nastaju kompleksi koji se mikroenkapsulacijom mogu inkorporirati u sastojke hrane i poboljšati iskorištenje u organizmu budući da su u takvom obliku zaštićeni od degradacije, kontrolirano se mogu otpuštati i zamaskirane su neželjene arome (Betz i Kulozik, 2011).

Cilj rada je bio pripremiti bioaktivne dodatke hrani na bazi proteina smeđe riže u kombinaciji sa fenolnim komponentama aronije. Kompleks proteina i fenola nastao je interakcijom fenola iz aronije s proteinima smeđe riže. Osim nastanka kompleksa cilj je bio utvrditi da li će prisustvo disaharida (saharoze i trehaloze) doprinijeti povećanju adsorpcije fenolnih spojeva na proteina smeđe riže. U tu svrhu na pripremljenim kompleksima određeni su ukupni fenoli, proantocijanidini, antocijani, antioksidacijska aktivnost, parametri boje ali i strukturne promjene koje su fenoli izazvali na proteinima riže.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ARONIJA (*Aronia melanocarpa*)

Bobice aronije su izrazito cijenjene zbog bogatog nutritivnog sastava. Imaju karakterističan kiselkasti i trpak okus što ih čini pogodnijim za preradu, a ne za izravnu konzumaciju. Aronija u svom kemijskom sastavu ima visok sadržaj pektina pri čemu su bobice korisne za proizvodnju miješanih džemova zajedno s voćem s niskim sadržajem pektina. Pripravci aronije se mogu koristiti kao dodaci u hranu radi poboljšanja okusa boje i antioksidacijskih svojstava. Bobice su važan izvor antocijana i koriste se kao sigurna i prirodna bojila za hranu (Kokotkiewicz, 2010).

2.1.1. Morfološke osobine aronije

Aronija (*Aronia melanocarpa*) je vrsta grmlja podrijetlom iz istočnih krajeva Sjeverne Amerike, a u Europi se pojavljuje u 20. stoljeću. Spada u porodicu ruža (*Rosacea*). Dvije vrste bobica aronije mogu se razlikovati: *Aronia melanocarpa* (crna aronija) i *Aronia arbutifolia* (crvena aronija). Treća vrsta je *Aronia prunifolia* (ljubičasta aronija) koja je hibridna vrsta između *Aronia melanocarpe* i *Aronia arbutifolie* (Tolić i sur., 2017). Aronija je listopadni grm, visine 2 do 3 metra i 2,5 metra širine (Milić, 2011). **Slika 1** prikazuje plod tamno ljubičaste boje, koji ima gorak okus i dobar je izvor polifenola (Tolić i sur., 2018). Promjer ploda aronije iznosi od 6 do 13,5 mm, a težina od 1,0 do 1,5 g. Plodovi dozrijevaju krajem kolovoza. Meso ploda ima intenzivnu crvenu boju, slatku do kiselkastu i trpku aromu te se rijetko koristi u svježem obliku za stolnu konzumaciju (Milić, 2011). Kemijski sastav bobica aronije koristi se za liječenje kliničkih bolesti. Zdravstvene prednosti uključuju snižavanje masnoće u krvi, gastroprotektivne, hepatoprotektivne i antikarcinogene učinke (Denev i sur., 2018).



Slika 1 Bobice aronije (*Aronia melanocarpa*) (Web 1)

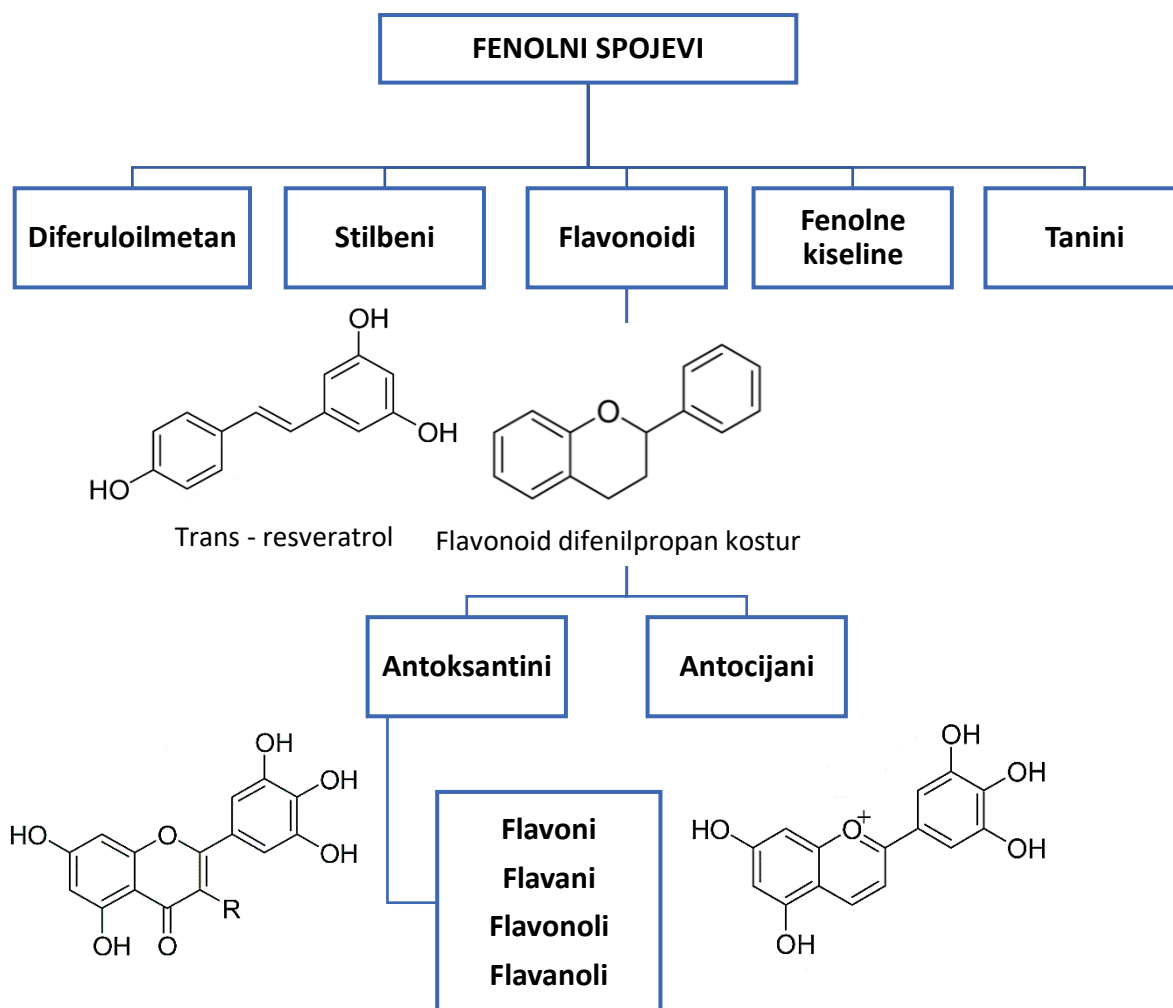
2.1.2. Kemijski sastav aronije

Aronija sadrži veliku skupinu fenolnih spojeva za koje je dokazano da pokazuju antikarcinogene, antioksidacijsko, protuupalnu i antidijabetičko djelovanje. Sadržaj fenola ploda aronije iznosio je 7849,21 mg/100 g suhe tvari, a procijanidi čine 66% ukupnog sadržaja fenola. Osim polifenola, plodovi aronije su izvori: šećera od 10 do 18%, pektina od 0,6 do 0,7%, malih količina masti, vitamina B skupine, pantotenske kiseline, vitamina C od 13 do 270 mg/kg, β -karotena od 7,7 do 16,7 mg/kg, minerala od 4,4 do 5,8 g/kg izraženo kao vrijednost pepela, približno od 16 do 18% od ugljikohidrata među kojima su glukoza, fruktoza, sorbitol, prehrambena vlakna i od 1 do 1,5% organskih kiselina. Specifičan bademov okus ovom voću daje cijanogeni glikozid amigdalinal. Plodovi aronije sadrže triterpene (b-sitosterol i kampesterol) i preko 40 hlapivih spojeva, a najvažniji su benzaldehid cijanohidrin, cijanovodična kiselina, i benzaldehid (Catană i sur., 2017).

2.1.2.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su spojevi koji na benzenskom prstenu imaju slobodnu hidroksilnu skupinu. Najjednostavniji predstavnik je fenol. Veliki utjecaj ima hidroksilna skupina prisutna u fenol prilikom čega on može stvarati vodikove veze s drugim molekulama fenola i vodom. **Slika 2** prikazuje podjelu fenolnih spojeva prema broju fenolnih prstenova i strukturnim elementima koji povezuju prstenove (Han i sur., 2007).

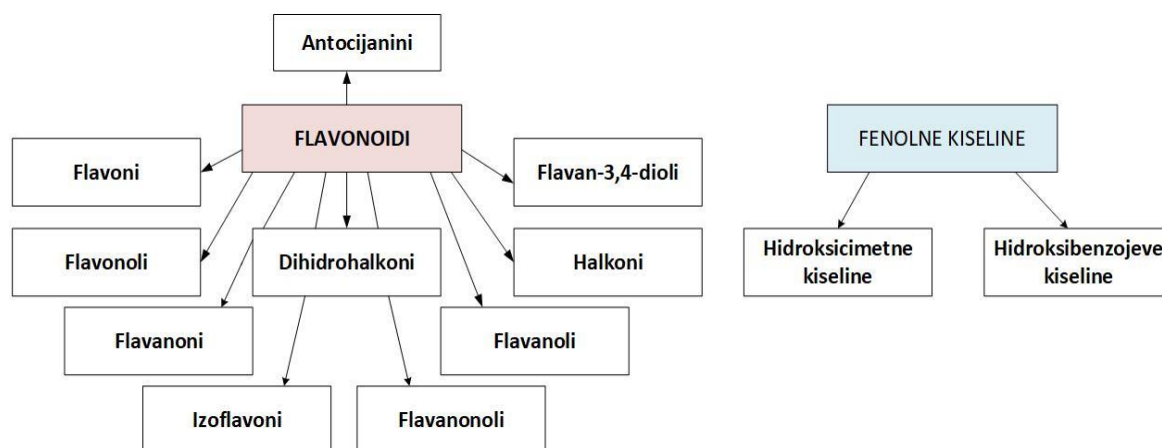
Aronija zbog velikog broja fenolnih spojeva posjeduje jako antioksidacijsko djelovanje. Tolić i sur. (2017), navode u istraživanju da na sadržaj fenolnih spojeva u aroniji utječu okolni faktori kao što su klimatski uvjeti, sastav tla, zrelost bobica, metode berbe i uvjeti skladištenja. Sunčani periodi u razdoblju od svibnja do rujna imaju pozitivan utjecaj na koncentraciju fenolnih tvari i stoga na njihovu antioksidacijsku aktivnost. Negativan učinak na sadržaj fenola ima niža temperatura, relativna vlažnost i kišni periodi. Sokovi aronije što više imaju fenolnih spojeva to posjeduju jače antioksidacijsko djelovanje.



Slika 2 Podjela fenolnih spojeva (Han i sur., 2007)

2.1.2.2. Polifenoli

Polifenoli su složeniji fenolni spojevi koji posjeduju najmanje dvije fenolne podjedinice, dok oni jednostavni imaju samo jednu. Značajni su u organizmu jer su jaki antioksidansi pri čemu brane stanice od oksidacijskog stresa i pojačavaju funkcije vitamina i minerala. Klasifikacija polifenola je izvršena prema izvoru podrijetla, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi (Tsao, 2010). **Slika 3** prikazuje podjela polifenola prema kemijskom sastavu na: flavonoide i fenolne kiseline.



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

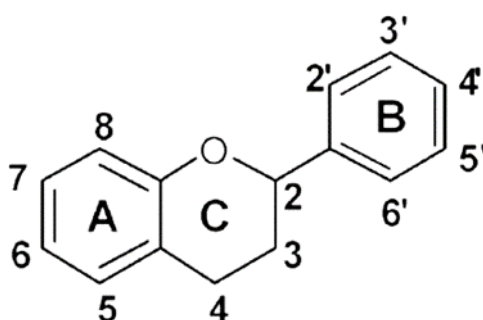
Tablica 1 prikazuje polifenole zastupljene u aroniji: fenolne kiseline (klorogenska i neklorogenska kiselina), flavoni (derivati kvercetina), antocijani (derivati cijanidina) i flavani (procijanidi). Kemijski sastav bobica aronije i tehnološki parametri prerade određuju kakav ćemo funkcionalni proizvod dobiti (Denev i sur., 2018).

Tablica 1 Fenolne komponente u aroniji (Oszmiański i Wojdyło, 2005)

Skupina polifenola	Komponenta	Količina komponente (mg/100 g suhe tvari)
Fenolne kiseline	Klorogenska kiselina	301,85
	Neklorogenska kiselina	290,81
Flavoni	Kvercetin-3-galaktozid	36,98
	Kvercetin-3-glukozid	21,64
	Kvercetin-3-rutinozid	15,10
	Kvarcetin derivati koji su neidentificirani	27,43
Antocijani	Cijanidin-3-galaktozid	1282,41
	Cijanidin-3-arabinozid	581,50
	Cijanidin-3-ksilozid	52,71
	Cijanidin-3-glukozid	42,41
Flavani	Proantocijanidi	5181,60

2.1.2.3. Flavonoidi

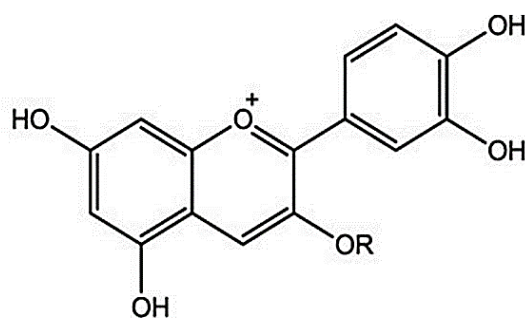
Osnovnu kemijsku struktura flavonoida prikazuje **Slika 4**, a ona se sastoji od 15 atoma ugljika koji su povezani u jezgru od tri fenolna prstena: A, B i C. Flavonoidi su glavne obojene komponente koje se nalaze u biljkama, te su odgovorni okus, boju i sprječavanje oksidacije te zaštitu nekih enzima. U biljkama koje daje crvene plodove akumuliraju se tek na kraju sazrijevanja zajedno sa antocijanima. U hrani se najčešće nalaze kao glikozidi ili esteri s drugim spojevima kao što su steroli, alkoholi, glukozidi i masne kiseline (Kurtagić, 2017). Skupina flavonoida uključuje flavonole, flavone, flavanone, katekine, antocijanine, izoflavone, dihidroflavone i halkone.



Slika 4 Osnovna struktura flavonoida (Kulling i Rawel, 2008)

Sadržaj flavonola predstavljaju samo 1,3% ukupnih fenola aronije. Procijenjeno je da je njihov sadržaj oko 71 mg/100 g. Identificirano je nekoliko derivata kvercetina: kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin derivati koji su neidentificirani (Kulling i Rawel, 2008). Povećani sadržaj antocijana predstavlja jedan od glavnih ciljeva prilikom uzgoja aronije. Antocijani su skupina flavonoida i odgovorni su za tamnocrvenu, plavu i ljubičastu boju bobica. U plodovima aronije antocijani predstavljaju oko 25% ukupnih polifenola (Gao i sur., 2018). Količina antocijana u bobicama aronije razlikuje se svake godine, a ovisi o razlikama genotipova, fazama sazrijevanja, kao i u uvjetima uzgoja.

Slika 5 predstavlja kemijsku strukturu antocijana u sortama koja se uvijek temelji na cijanidinu kao aglikonskoj strukturi: cijanidin-3-O-galaktozid (68,9%), cijanidin-3-O-arabinozid (27,5%), cijanidin-3-O-ksilozid (2,3%) i cijanidin-3-O-glukozid (1,3%) (Kulling i Rawel, 2008).



R=galaktoza cijanidin-3-galaktozid

R=arabinoza cijanidin-3-arabinozid

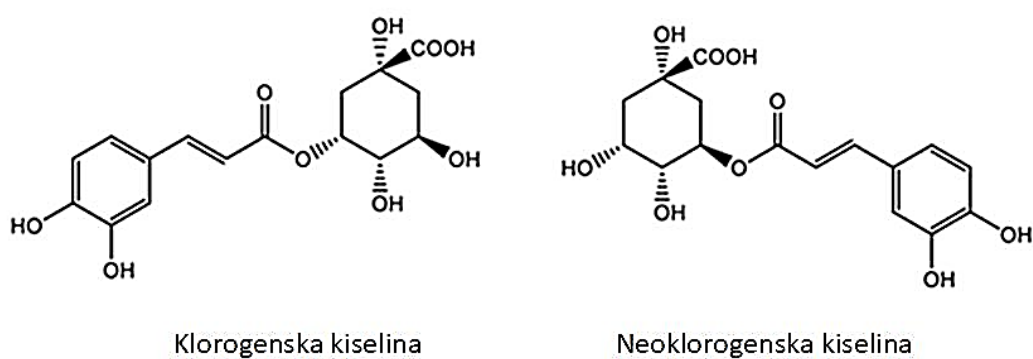
R=ksiloza cijanidin-3-ksilozid

R=glukoza cijanidin-3-glukozid

Slika 5 Kemijska struktura antocijana (Ho i sur., 2014)

2.1.2.4. Fenolne kiseline

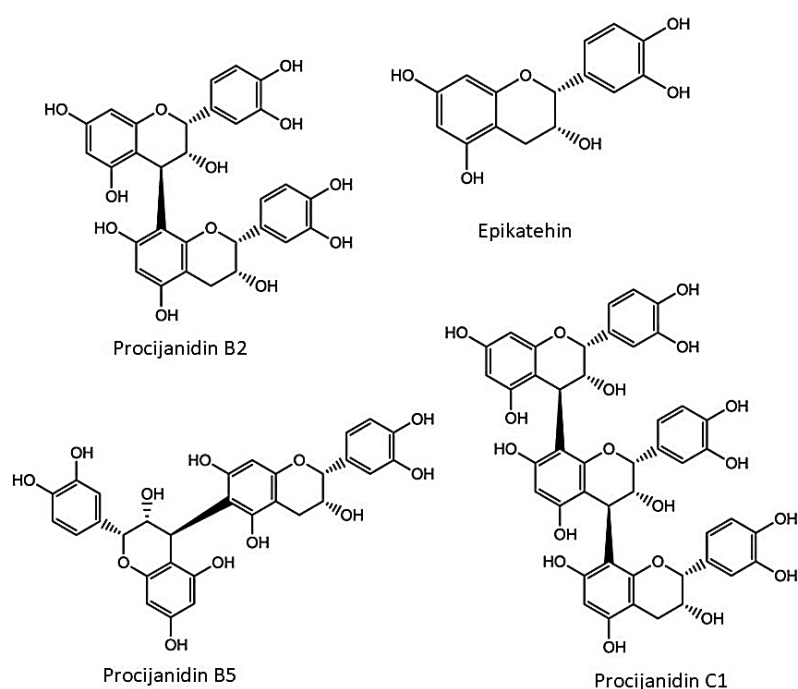
Strukturu fenolnih spojeva tvori benzenski prsten povezan karboksilnom skupinom. Razlikuju se dvije osnovne skupine fenolnih kiselina: derivati benzojeve kiseline (hidroksibenzojeve kiseline) i derivati cimetine kiseline (hidroksicimetine kiseline). Najzastupljeniji derivati hidroksibenzojeve kiseline su galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina. Najzastupljeniji derivati hidroksicimetine kiseline su kavena, kumarinska, ferulična i sinapinska kiselina (Šimunić, 2016). Fenolne kiseline su klorogenske i neoklorogenske kiseline kao glavni predstavnici u bobicama komini i soku, te predstavlja ukupno 7,5% ukupnih polifenola bobica aronije.



Slika 6 Kemijska struktura fenolnih kiselina (Liu i sur., 2017)

2.1.2.5. Proantocijanidi

Proantocijanidini se razlikuju od većine ostalih biljnih polifenola zbog svoje polimerne prirode i velike molekularne težine, ta osobina ograničava njihovu apsorpciju u probavnom traktu. Imaju mogućnost provoditi lokalnu aktivnost u gastrointestinalnom traktu ili aktivnost mogu provodi pomoću fenolne kiseline nastale razgradnjom mikroba. Djelovanje u gastrointestinalnom traktu je važno jer su crijeva podložna raznim upalama i oksidacijskim oštećenjima (Denev i sur., 2012). Katehin i epikatehin su monomeri, koji tvore polimere proantocijanidine (**Slika 7**). Katehin je izomer s trans konfiguracijom, a epikatehin s cis konfiguracijom. Svaka od dvije konfiguracije ima dva stereoizomera tj. (+)-katehin, (-)-katehin, (+)-epikatehin i (-)-epikatehin (Tsao, 2010). Procijanidi su sastavljeni od (-)-epikatehinskih jedinica koje su glavna klasa polifenolskih spojeva u aroniji. Stupanj polimerizacije procijanidina najčešće varira od 2 do 23 jedinice u plodovima. Slobodan epikatehin je također prisutan u aroniji, ali je njegova koncentracija znatno manja u usporedbi s polimernim procijanidima. Bräunlich i sur. (2013) navode da je prema dosadašnjim istraživanjima koncentracija procijanidina u bobicama aronije 4% do 5%. Polimeri procijanidina predstavljaju 40% ukupnog polifenolskog sadržaja i imaju snažne protuupalne učinke i blagotvornog su utjecaja na zdravlje, uključujući antitumorske i antiproliferativne aktivnosti (Oszmiański i Lachowicz, 2016).



Slika 7 Kemijska struktura epikatehina i procijanidina B2, B5 i C1 (Liu i sur., 2017)

2.1.2.6. Vitamini i minerali

Osim fenolnih spojeva, aronija sadrži i vitamine i minerale. **Tablica 2** prikazuje sve vitamine koji se mogu naći u aroniji, a među vitaminima najvažniji je vitamin C (askorbinska kiselina). Poznato je da vitamin C djeluje kao biološki antioksidans koji može smanjiti visoke razine oksidativnog stresa i može pridonijeti prevenciji kroničnih bolesti. Najveće količine vitamina C određene su u svježim i smrznutim bobicama aronije, dok prerađevine od aronije poput kompota i džema sadrže manju količinu vitamina C jer je vrlo osjetljiv na prisutnost kisika i termičko tretiranje (Catană i sur., 2017).

Tablica 2 Vitamini u aroniji (Kulling i sur., 2008)

Vitamin	Bobice aronije (µg/kg)
Tiamin (B1)	180
Riboflavin (B2)	200
Piridoksin (B6)	280
Niacin	3 000
Menakinon (K)	242
Askorbinska kiselina (C)	137000
Tokoferoli	17100

Minerali imaju važnu ulogu u aktivaciji enzima koji sudjeluju u metabolizmu i antioksidacijskim sustavima. Visok unos K, Mg i Ca povezan je sa smanjenim rizikom od moždanog udara, hipertenzije i osteoporoze. Željezo i drugi minerali važan su dio mnogih spojeva u sustavu prijenosa i skladištenja kisika i djeluju kao kofaktori enzima (Staszowska-Karkut i Materska, 2020). **Tablica 3** prikazuje minerale u bobicama aronije, gdje je vidljivo da je u najvećoj količini u bobicama aronije prisutan kalij. Kulling i Rawel (2008) navode da količina minerala u aroniji prema udjelu pepela varira između 4400 mg/kg i 5800 mg/kg.

Tablica 3 Minerali u bobicama aronije (Kulling i sur., 2008)

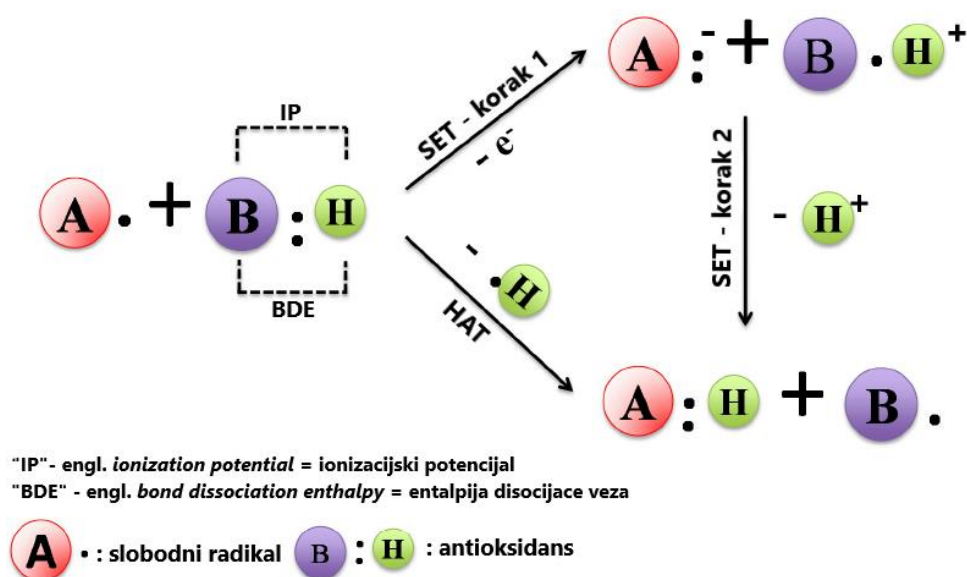
Mineral	Bobice aronije (mg/kg)
Natrij	26
Kalij	2 180
Kalcij	322
Magnezij	162
Željezo	9,3
Cink	1,47

2.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidansi su tvari koje odgađaju reakcije oksidacije, a glavna im je uloga uklanjanje radikala i pretvorba u manje reaktivne oblike. Postoje četiri mehanizma kojima ove tvari sprječavaju oksidaciju makromolekula:

- antioksidativna donacija vodika tzv. HAT mehanizam (*engl. hydrogen atom transfer*),
- antioksidativna donacija elektrona tzv. SET mehanizam (*engl. single electron transfer*),
- vezanje lipida na antioksidans i
- formiranje kompleksa lipida i antioksidansa (Mijatović, 2019; Jakobek, 2007).

Slika 8 prikazuje mehanizam reakcije antioksidansa sa slobodnim radikalima: HAT prijenos atoma vodika i SET prijenos elektrona. U mehanizmu SET za određivanje antioksidacijske aktivnosti najvažniji faktor je ionizacijski potencijal, dok je u mehanizmu HAT entalpija disocijacije veza (Liang i Kitts, 2014).

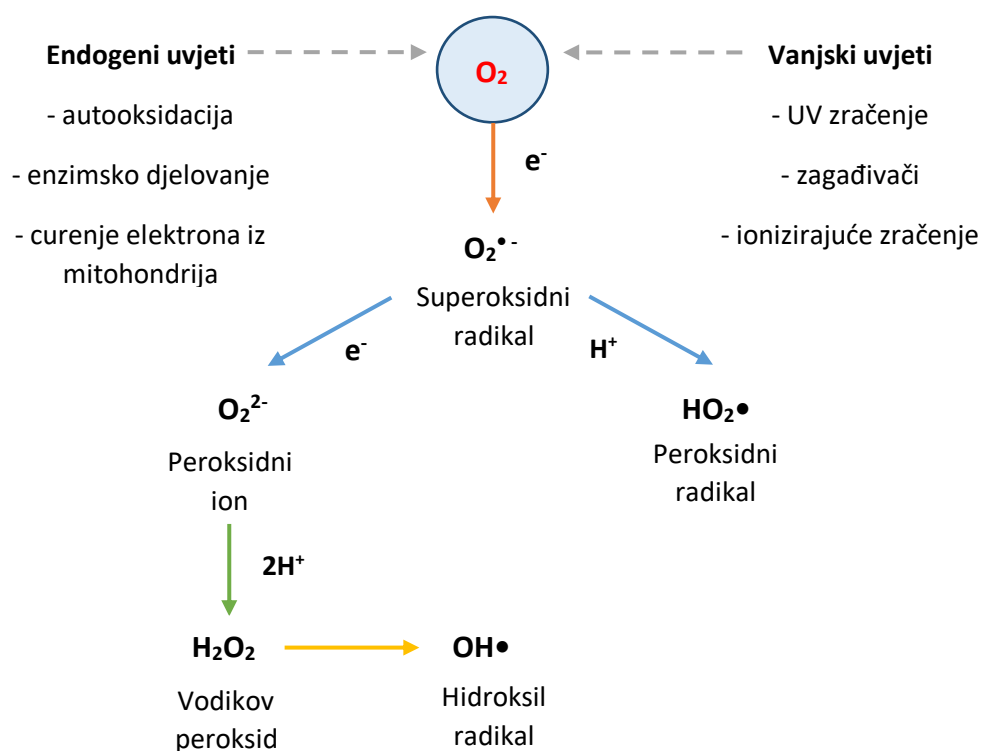


Slika 8 Mehanizam reakcije antioksidansa (Liang i Kitts, 2014)

Kisik je bitan za život na zemlji, te su bez njega sve normalne i po život bitne funkcije neizvodive. Međutim, kisiku se mogu pripisati i štetni učinci povezani uz nastanak slobodnih radikala. U radikale kisika ubrajamo: superoksidne (O_2^-), hidroksilne (OH^-), hidroperoksilne (HOO^-), peroksilne (ROO^-), i aloksilne (RO^-) radikale (Denver i sur., 2012).

Nastali radikali ulaze u reakciju s drugim spojevima, tako da im pokušavaju oduzeti elektron kako bi postigli stabilnost. Spojevi koji ostaju bez elektrona postaju slobodni radikali te nastavljaju lančanu reakciju (Jakobek, 2007). Šteta od slobodnih radikala može uzrokovati denaturaciju proteina, mutaciju DNA i vezanje za nezasićenu lipidnu membranu koja može izgubiti fluidnost (Banjarnahor i Artanti, 2014).

Superoksidni radikal i hidroksilni radikal su najvažniji slobodni radikali kisika jer su uzročnici mnogih bolesti. Na njihov nastanak utječu endogeni uvjeti i vanjski uvjeti (**Slika 9**). Superoksidni anion može nastati na više načina: autooksidacijom molekula poput glukoze uz prisutnost metalnih iona, metaboličkim reakcijama u mitohondriju stanice, kao posljedica reakcija imunološkog sustava ali i djelovanjem enzima. Osim superoksida, biološke stanice kao posljedicu niza reakcija mogu proizvesti i vodikov peroksid ili on može nastati iz superoksidnog aniona. Vodikov peroksid može oštetiti proteine koji sadrže tiolnu skupinu ili migrirati u ostale stanice i tkiva prije nego što se pretvori u hidroksilni radikal. Hidroksilni radikal je najčešći uzročnik nastanka oštećenja na stanicama posredstvom slobodnih radikala (Jakobek, 2007).



Slika 9 Mehanizam nastanka radikala kisika

(adaptirano prema Das i Roychoudhury, 2014)

Jakobek (2007) objašnjava mehanizam antioksidacijske obrane u ljudskom organizmu kroz tri linije obrane: prvu liniju obrane čine enzimi, proteini, prirodni antioksidansi i antocijani tako da vežu metalne ione, reduciraju hidroperoksidge i pojedinačne molekule kisika; drugu liniju obrane čine vitamin E, karotenoidi i flavonoidi, vitamin C tako da hvataju slobodne radikale i doniraju jedan od svojih elektrona ali ne potiču daljnje reakcije jer imaju malu reaktivnost i treća linija obrane su polifenolni spojevi koji služe kako bi popravili oksidativno oštećenje na lipidima, proteinima i molekulama DNA.

Antioksidansi se mogu prema mehanizmu djelovanja podijeliti na primarne i sekundarne. **Tablica 4** prikazuje skupine antioksidansa i mehanizam njihovog djelovanja s pripadajućim primjerima. Pravi ili primarni antioksidansi direktno uklanjaju slobodne radikale, dok sekundarni antioksidansi uključuju više mehanizama hvatanja slobodnih radikala (Kopjar, 2007).

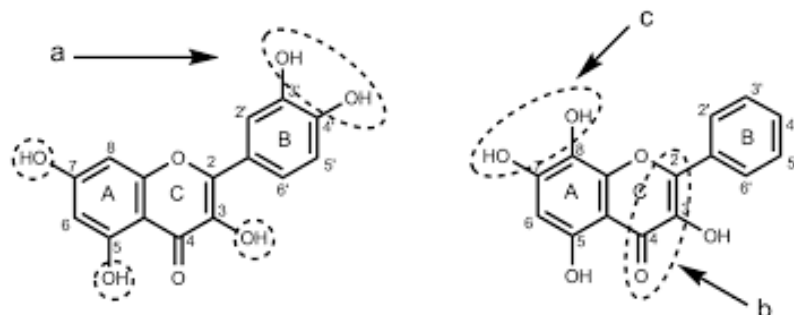
Tablica 4 Mehanizam antioksidativne aktivnosti (Kopjar, 2007)

Skupina antioksidansa	Mehanizam antioksidativne aktivnosti	Primjeri antioksidanasa
Pravi antioksidansi	Inaktivacija slobodnih radikala lipida	Fenolne tvari
Stabilizatori hidroperoksida	Sprječavanje raspadanja hidroperoksida na slobodne radikal	Fenolne tvari
Sinergisti	Poboljšavaju aktivnost pravih antioksidanasa	Limunska kiselina, askorbinska kiselina
Metalni helatori	Vežu teške metale u inaktivne komponente	Fosforna kiselina, tvari nastale Maillard-ovim reakcijamam, limunska kiselina
Tvari za vezivanje singleton kisika	Transformiraju singlet kisik u triplet kisik	Karoteni
Tvari koje reduciraju hidroperoksidge	Reduciraju hidroperoksidge bez stvaranja radikala	Proteini, amino kiseline

Aronija sadrži veliki udio polifenola i upravo su oni odgovorni za antioksidacijsku aktivnost. Od polifenola koji su prisutni kvercetin je najjači antioksidans među monomernim fenolima u aroniji, a pored njega su cijanidin glikozid i klorogenska kiselina. Antocijani, flavonoli i hidroksicimetne kiseline doprinose oko 59,4% ukupne antioksidacijske aktivnosti aronije. To znači da bi se 40% antioksidacijskog djelovanja aronije moglo pripisati polifenolima (Tolić i sur, 2015).

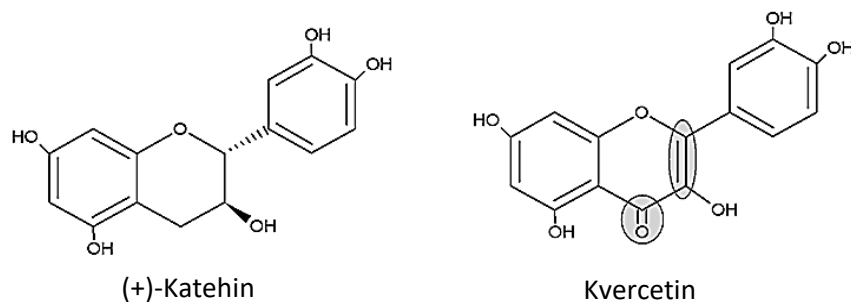
Jakobek (2007) objašnjava da polifenoli pokazuju antioksidacijsku aktivnost sljedećim reakcijama: mogu hvatati slobodne radikale te time razbijati lančane reakcije uzrokovane slobodnim radikalima ili mogu reagirati s metalnim ionima koji su prekursori slobodnih radikala. Polifenoli djeluju kao reducensi tj. mogu donirati elektron slobodnom radikal, a radikali fenola koji nastaju slobodne su molekule. Flavonoidi mogu djelovati kao antioksidansi na način da izravno uklanjaju slobodne radikale ili kao unutarstanični antioksidansi na način da inhibiraju enzime koji stvaraju slobodne radikale poput ksantin oksidaze, lipoksigenaze, protein kinaze C, mitohondrijske suksinoksidaze i NADPH oksidaze (Banjarnahor i Artanti, 2014).

Molekularna struktura, posebno broj i položaj hidroksilnih skupina (**Slika 10**), te priroda supstitucija na aromatskim prstenovima, fenolnim spojevima daju sposobnost inaktivacije slobodnih radikala (Minatel i sur., 2017). Banjarnahor i Artanti (2014) u svom radu određuju karakteristike kemijske strukture za koje je utvrđeno da djeluju na antioksidacijsku aktivnost polifenolnih spojeva, a među njima su sljedeće: hidroksilne skupine (označeno s C), orto-dihidroksi raspored u B prstenu (označeno s A), kombinirana nezasićena veza C2-C3 s C-4 karbonilnom skupinom u C kosturu (označeno s B) i O-metilacija.



Slika 10 Veza antioksidacijske aktivnosti i kemijske strukture (Banjarnahor i Artanti, 2014)

Minatel i sur. (2017) objašnjavaju da se vezu između antioksidacijske aktivnosti i strukture na kvercetin i katehinu. **Slika 11** prikazuje da oba spoja dijele sličan broj hidroksilnih skupina, na istim položajima, međutim kvercetin također sadrži 2,3-dvostruku vezu u C prstenu i 4-okso funkciju. Struktura kvercetina imaće veći ekvivalent antioksidacijskog djelovanja ako se usporedi sa zasićenim heterocikličkim prstenom katehina.

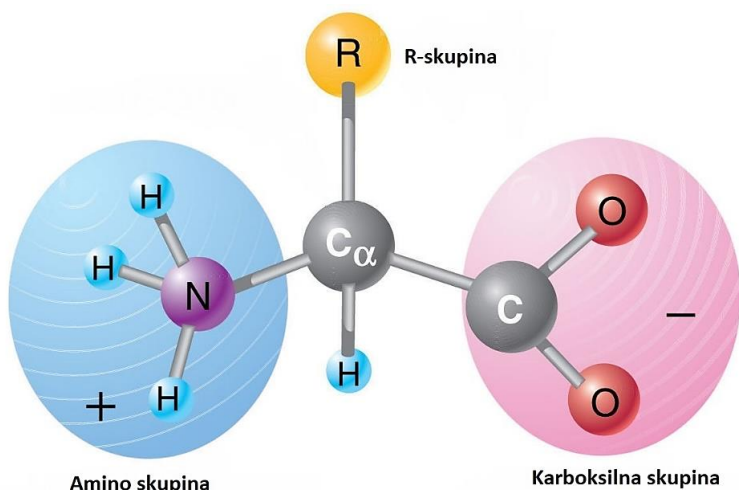


Slika 11 Kemijska struktura katehina i kvarcetina (Minatel i sur., 2017)

2.3. INTERAKCIJE FENOLA I PROTEINA

U biljkama nastaju pored primarnih metabolita i sekundarni metaboliti specijalnim transformacijama. Sekundarni metaboliti imaju zaštitnu i signalnu funkciju, te za razliku od primarnih nisu nužno bitni za život biljke. Najznačajnija skupina sekundarnih metabolita su fenolni spojevi koji imaju različitu strukturu, molekularnu težinu i fizikalno kemijska svojstva. Fenolni spojevi su prirodni antioksidansi, njihova prisutnost u hrani potiče bolje očuvanje svojstva proizvoda, uklanjanje slobodnih radikala, inhibiciju aktivnosti mnogih enzima i sprječava moguće promjene tijekom skladištenja. Osim navedenog mogu djelovati i sinergistički tako da povećavaju djelovanje drugih antioksidanasa (Czubinski i sur., 2017). Polifenoli stupaju u interakcije s proteinima mijenjajući svojstva oba spoja (Ozda i sur., 2013).

Proteini su građeni od aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama. Zajedničko svojstvo svih proteina je da se sastoje od dugih lanaca α -amino kiselina. Opća struktura α -amino kiselina je α -ugljikov atom u molekuli koji nosi amino skupinu ($-\text{NH}_2$) i karboksilnu skupinu ($-\text{COOH}$) (**Slika 12**). Pored navedenog, struktura aminokiselina je određena i bočnim lancem koji se naziva ostatak i obilježava se s R. Upravo R skupine sadrže osobine pojedinih aminokiselina (Karlson, 1993).



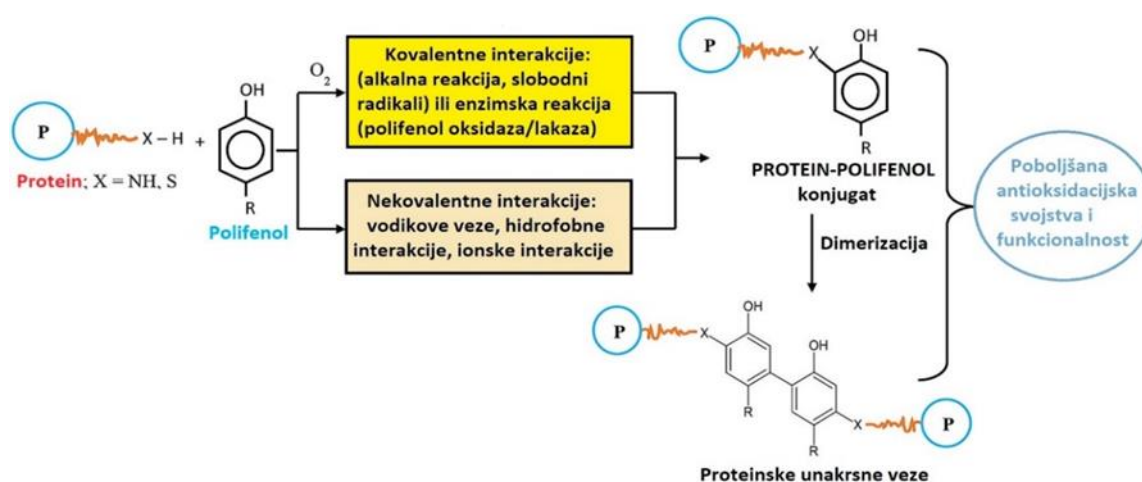
Slika 12 Struktura aminokiseline (Web 2)

Fenolni spojevi sadrže aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (-OH). Najvažnije karakteristike fenolnih spojeva su: molekularna težina, strukturna fleksibilnost i broj OH grupa (Czubinski i sur., 2017). Razlike u strukturi fenolnih spojeva mogu utjecati na stvaranje kompleksa s proteinima. Fenolni spojevi se razlikuju po molekularnoj težini, stupnju metilacije, hidroksilacije i glikozilacije. Afinitet vezanja fenolnih spojeva na proteine povećava se povećanjem njihove molekularne težine (Ozdal i sur., 2013).

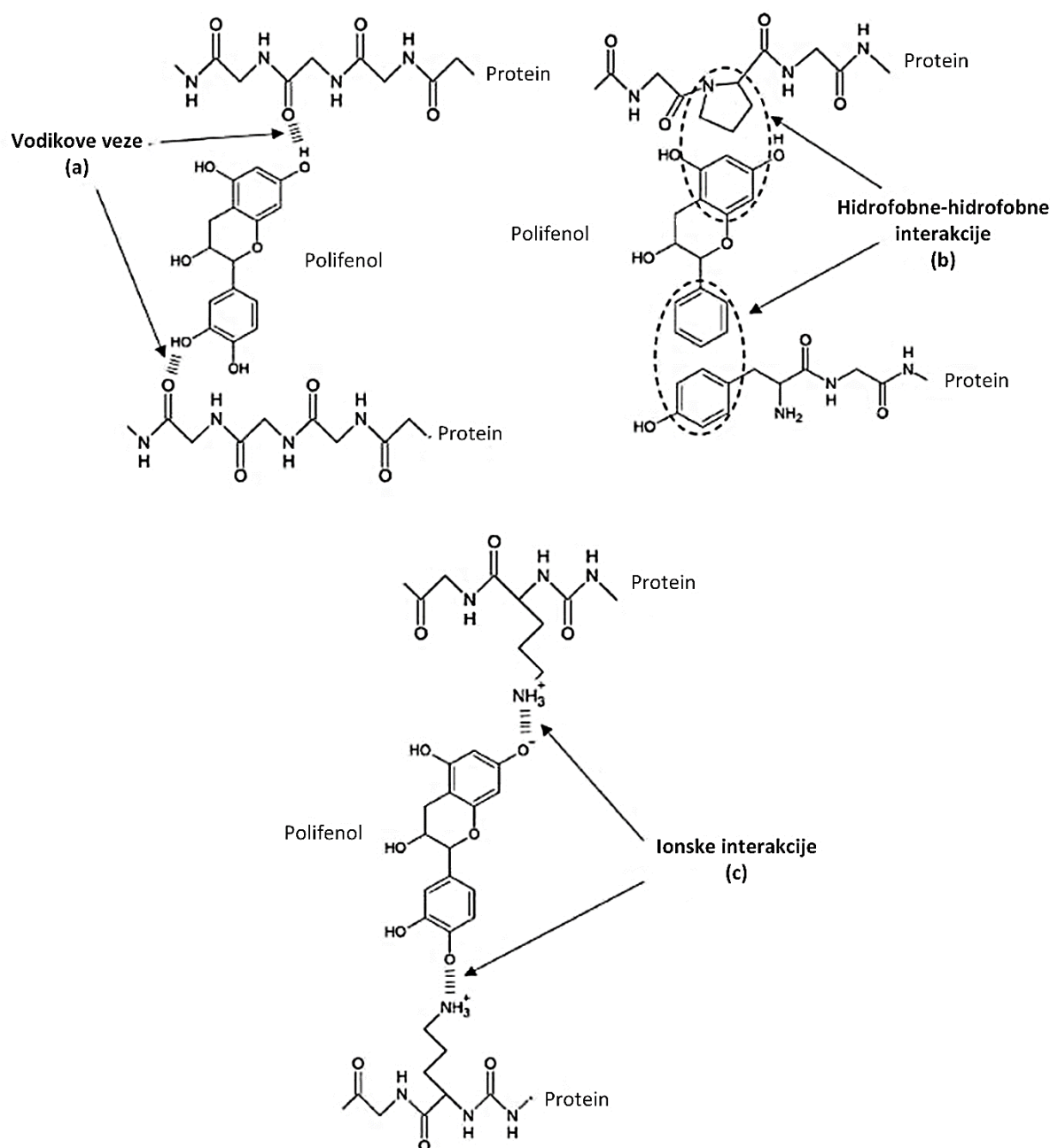
2.3.1. Mehanizam djelovanja interakcija

Tijekom proizvodnje i prerade hrane fenolni spojevi dolaze u interakciju s drugim sastojcima hrane poput polisaharida, lipida i proteina. Temeljito razumijevanje interakcija i promjena bitno je ekonomskog, industrijskog i znanstvenog stajališta. Fenolni spojevi najčešće stupaju u interakcije s proteinima, jer su izvrsni davatelji vodika i tvore vodikove veze s karboksilnim skupinama proteina (Ozdal i sur., 2013).

Ozdal i sur. (2013) objašnjavaju da polifenoli mogu stupati u komplekse s proteinima reverzibilno i ireverzibilno. **Slika 13** prikazuje shematski prikaz nastanka kompleksa fenola i proteina gdje je vidljivo da su reverzibilne reakcije nekovalentne molekulske interakcije, dok ireverzibilne interakcije podrazumijevaju stvaranje kovalentne veze ili enzimске reakcije. Nekovalentne molekulske interakcije su ionske interakcije, hidrofobne veze i van der Waalsove interakcije.



Slika 13 Shematski prikaz nastanka interakcije između fenola i proteina (Quan i sur., 2019)



Slika 14 Nekovalentna interakcija proteina i polifenola (Quan i sur., 2019)

Slika 14 prikazuje nekovalentne molekulske interakcije između proteina i polifenola a to su: vodikove veze (a), hidrofobne (b) i ionske interakcije (c).

Mehanizam nastanka nepovratnih interakcija temelji se na kovalentnoj vezi koja nastaje između fenolnih spojeva i proteina ili posredstvom enzima. Quan i sur. (2019) objašnjavaju da se reakcija nastanka interakcije između fenola i proteina posredstvom enzima odvija sljedećim koracima: prvi korak je hidroksilacija mono-fenola u o-difenole inducirana enzimom

monofenolazom (ili krezolazom). Nakon toga se o-difenoli transformiraju u o-kinone pomoću o-difenolaze (ili kateholaze) u prisutnosti kisika. Reaktivni kinoni mogu s nukleofilnim aminokiselinskim ostacima u lancu proteina stvarati umrežene proteine ili polimere.

Pri nastanku fenol-protein kompleksa mogu nastati promjene u fizikalno kemijskim svojstvima proteina i fenolnih spojeva. Kod proteina dolazi do promjena u enzimskoj aktivnosti i fizikalno kemijskim svojstvima poput topljivosti ili toplinske stabilnosti proteina, smanjenju prehrambene vrijednosti i dostupnosti aminokiselina. Nastankom kompleksa može doći do smanjena bioraspoloživosti polifenola i u nekim slučajevima do prekrivanja antioksidacijskog djelovanja.

2.3.3. Faktori koji utječu na interakcije

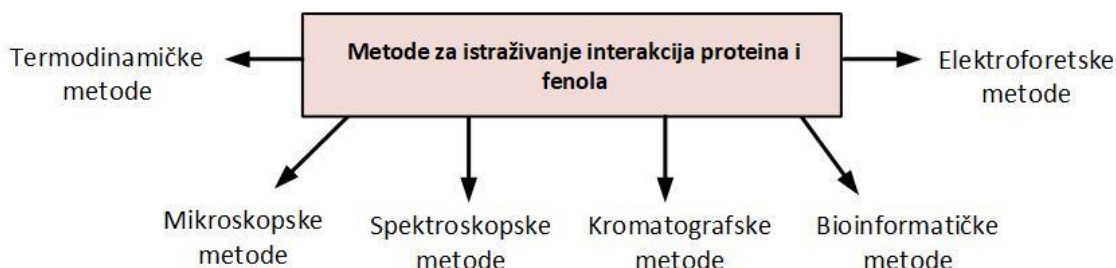
Na interakciju između proteina i fenola utječu: temperatura, pH, koncentracija soli i dodavanje određenih reagensa. Ozdal i sur. (2013) objašnjavaju da na interakcije osim navedenih parametara utječe i vrsta proteina kao i struktura fenolnog spoja. Obzirom da se svaki protein razlikuje u hidrofobnosti, vrijednosti izoelektrične točke i aminokiselinskom slijedu.

Quan i sur. (2019) u svom radu navode temperaturu najvažnijim parametrom koji utječe na interakciju fenola i proteina, na njihova funkcionalna svojstva i bioaktivnost. Povećanje temperature dovodi do denaturacije proteina, a kod polifenola do oksidacije stvaranjem derivata kinona. Denaturacijom proteina narušena je konformacija bjelančevine prilikom čega su mjesta za vezanje polifenola izloženija. Zagrijavanje potiče kovalentnu interakciju između proteina i polifenola.

Kompleksi proteina i polifenola mogu nastati u širokom rasponu pH, bilo kovalentnom ili nekovalentnom molekulskom interakcijom. Pri niskom pH ($\text{pH} < 7.0$) dolazi do interakcije fenola i proteina elektrostatskim interakcijama, dok povećanjem pH ($\text{pH} > 7.0$) dolazi do kovalentne interakcije između proteina i polifenola neenzimskom oksidacijom. Promjena da pH utječe na konformaciju proteina određujući tako kovalentnu ili nekovalentnu interakciju između proteina i polifenola (Quan i sur., 2019).

2.3.5. Metode za istraživanje interakcija fenola i proteina

Metode dostupne za istraživanje interakcija fenola i proteina igraju važnu ulogu za buduća istraživanja (**Slika 15**), obzirom da nastanak kompleksa mogu nastati brojne promjena na fenolima i proteinima kako pozitivne tako i negativne.



Slika 15 Podjela metode za istraživanje (adaptirano prema Czubinski i Dwiecki, 2017)

Bioinformatičke metode se temelje na bazi podataka tzv. „*Protein Data Bank*“ koja sadrži eksperimentalne podatke koje se odnose na vezanje proteina i polifenola. Baza omogućava odabiranje proteina koji će prema eksperimentalnim podacima udovoljiti određenim ciljevima koje želimo postići. Elektroforetske i kromatografske metode predstavljaju jednu od najjednostavnijih metoda koja se koristi a to je elektroforeza. Elektroforeza određuje utjecaj fenolnih spojeva na prirodnu elektromobilnost proteina. Termodinamičke metode se izvode dodavanjem fenolnog spoja u proteinsku otopinu prilikom čega može doći do termodinamičkog učinka poput promjene entalpije. Termodinamička (termokemijska) svojstva vezana uz interakcije između fenolnih spojeva i proteina mogu se istražiti izotermalnom titracijskom kolorimetrijom (ITC), a ona se temelji na mjerenju topline koja se razvijala tijekom molekularnog povezivanja (Czubinski i Dwiecki, 2017).

Mikroskopske metode daju informacije o obliku i veličini konjugata, a mjerenje se isključivo provodi u dehidriranim uzorcima. Spektroskopske metode se provode pobuđivanjem proteina na 240-280 nm pri čemu dolazi do emisije fluorescencije u rasponu 340-350 nm kao rezultat prisutnosti aromatskih aminokiselina, a smanjenje ovog raspona emisije fluorescencije može se pripisati vezanju liganda. Fluorescentna anizotropija ovisi o pokretnoj slobodi molekula koje emitiraju fluorescenciju. Porast anizotropije fluorescencije uzrokovan je smanjenjem slobode kretanja molekula i vezivanjem polifenola s proteinima (Czubinski i Dwiecki, 2017).

2.3.4. Mikroenkapsulacija

Mikroenkapsulacija je postupak ugradnje i oblaganja aktivnih tvari značajnih za naš organizam, a koji su osjetljivi na okolišne faktore (temperature, pH, kisik), lako isparljivi ili je njihova apsorpcija u probavnom traktu ograničena. Mikroenkapsulirani aktivni sastojci mogu se dodavati prehrambenim proizvodima u stabilnom obliku, čime se mogu spriječiti štetni utjecaji na senzorska svojstva hrane zbog male veličine enkapsulata (Betz i Kulozik, 2011). Jedna od najvažnijih prednosti upotrebe enkapsulacije je činjenica da se tekuće komponente koje su osjetljive i nestabilne mogu uspješno inkorporirati u sastojke hrane, te na kraju imamo proizvod u čvrstom obliku i praktičnije primjene (Štažić, 2019).

Trifković (2016) definira osnovne razloge za enkapsulaciju u prehrambenoj industriji:

- zaštita aktivnih tvari bitnih za zdravlje od degradacije (utjecaj vanjskih faktora, neželjeni utjecaj vlage, nagle promjene pH),
- smanjenje isparavanja i gubitak aktivnih tvari u okolinu,
- modifikacija fizikalnih karakteristika (pretvorba iz tekućeg u čvrsto stanje),
- kontrolirano otpuštanje aktivne tvari odnosi se na ciljani trenutak ili određeno mjesto u organizmu,
- maskiranje neželjenih aroma i okusa aktivnih tvari,
- smanjenje koncentracije aktivne tvari (slučajevi kada su nam potrebne male količine) i
- razdvajanje pojedinih komponenti koje bi mogle reagirati zajedno.

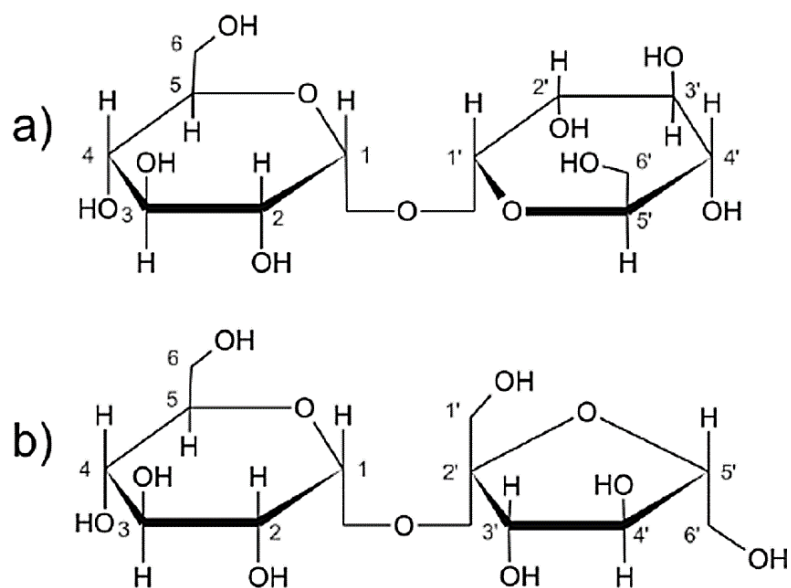
Fenoli su skupina spojeva koji imaju pozitivno djelovanje na ljudski organizam, ali njihova efikasnost nakon unosa ovisi o njihovoj raspoloživosti s obzirom na to da su osjetljivi na utjecaj kisika i svjetla tijekom skladištenja. Nakon unosa u organizam ograničena je dostupnost fenolnih spojeva, obzirom da se kratko zadržavaju u gastrointestinalnom traktu ili se razgrađuju u želucu (Betz i Kulozik, 2011). Upravo ove navedene činjenice ograničavaju njihove pozitivne efekte. Enkapsulacija fenolnih spojeva rješava nedostatke vezane za slobodne polifenole poput njihove nestabilnosti, neugodnog mirisa i unapređenje njihove raspoloživosti. Liofilizacija je jedna od tehnika koja se pored sušenja raspršivanjem koristiti za enkapsulaciju bioaktivnih spojeva, posebno onih koji su osjetljivi na razgradnju na visokim temperaturama (Papoutsis i sur., 2018).

2.4. SVOJSTVA SAHAROZE I TREHALOZE

Kopjar (2007) objašnjava da disaharidi, kao što su saharoza, laktoza i trehaloza, imaju vrlo široku primjenu kao krioprotektori, posebno pri smrzavanju hrane i liofilizaciji. Saharoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$) je disaharid poznata kao bijeli konzumni šećer, slatkastog okusa koja se zagrijavanjem pretvara u smeđi karamel (Khiraoui i Guedira, 2018). **Slika 16** prikazuje kemijsku strukturu molekule saharoze u kojoj su jedinice α -D-glukoze i β -D-fruktoze povezane glikozidnom vezom. Saharoza je poznata kao nereducirajući šećer koji ne pokazuje mutarotaciju, jer nema slobodnih poluacetalnih skupina ni poluketalnih skupina. Djelovanjem kiseline i enzima na molekulu saharoze dolazi do njenog cijepanja na sastavne komponente glukozu i fruktozu, a dobivena smjesa je invertni šećer (Barkijević, 2017; Khiraoui i Guedira, 2018).

Trehaloza ($C_{12}H_{22}O_{11}$) je disaharid građen od jedinica D-glukoze vezane α -1,1 glikozidnom vezom (**Slika 16**). To je nereducirajući šećer koji se ne može lako hidrolizirati na jedinice glukoze niti djelovanjem kiselina niti djelovanjem α -glukozidaze. Otpornost trehaloze na neenzimsko posmeđivanje je rezultat niske energije glikozidne veze, što određuje njezinu visoku stabilnost i nisku osjetljivost na hidrolizu u glukozu (Burek i sur., 2015). Trehaloza ima 45% slatkoće saharoze, odnosno manju slatkoću od saharoze, te se zbog toga primjenjuje u hrani koja zahtjeva smanjenje slatkoće ali fizikalna svojstva saharoze (Kopjar, 2007). Upotrebom trehaloze dolazi do zaštite enzima, proteina ili peptida od različitih stresnih uvjeta sušenja. U blizini proteina trehaloza koncentrira vodu, te se može vratiti u izvornu strukturu nakon završetka postupka liofilizacije (Jórárt-Laczovich i sur., 2016).

Kopjar (2007) objašnjava tri mehanizma zaštitnog učinka trehaloze: zamjena vode, staklasti prijelaz i kemijska stabilnost. Staklasti prijelaz podrazumijeva da trehaloza u vodenoj otopini zadržava staklasto stanje umjesto kristaličnog. Staklasto stanje je stabilno kroz široki raspon ekstremnih uvjeta poput povišenjem temperature. Trehaloza u staklastoj formi može prijeći iz dihidrata u anhidrat što ima pozitivan učinak kod dehidriranih i zamrznutih namirnica. Vezanje proteina i trehaloze kao i nastanak staklastog prijelaza važni su za zaštitu od oštećenja prilikom dehidratacije (Kopjar, 2007).



Slika 16 Kemijska struktura: a) trehaloze i b) saharoze (Tarpan i sur., 2011)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je priprema bioaktivnih dodataka hrani na bazi proteina smeđe riže u kombinaciji s fenolima aronije (kompleks proteini/aronija). Kompleks proteini/aronija dobiven je adsorpcijom fenola soka aronije na proteine smeđe riže. Osim pripreme ovog kompleksa, zadatak diplomskog rada bio je utvrditi mogućnost primjene disaharida (saharoze i trehaloze) u povećanju adsorpcije fenolnih spojeva iz soka aronije na proteine smeđe riže.

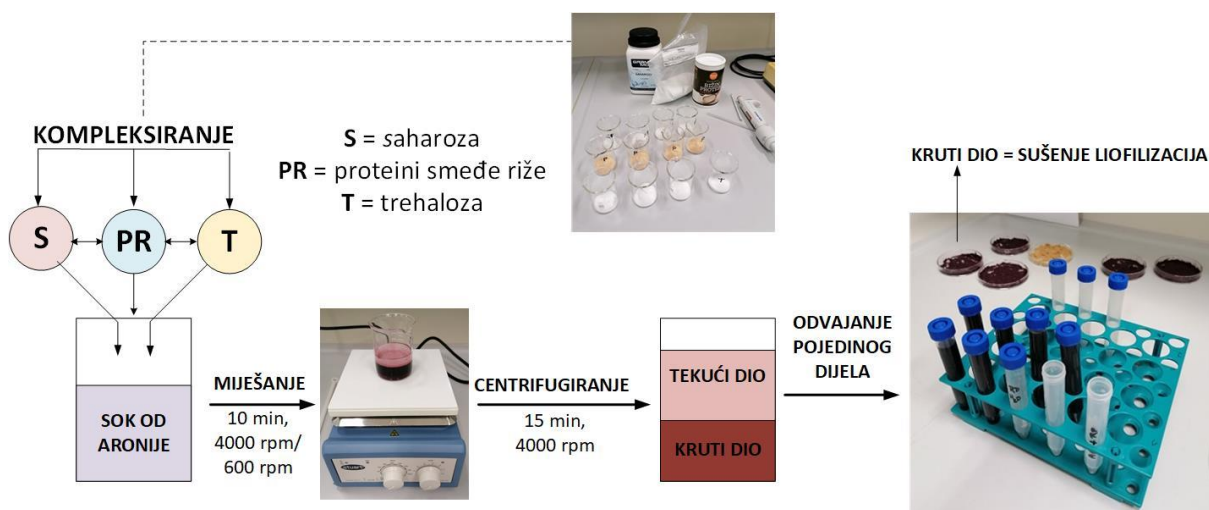
U tu svrhu pripremljeni su:

- kompleks proteini/aronija u obliku suhog praha - kontrolni uzorak;
- kompleksi proteini riže/saharoza/aronija u obliku suhog praha;
- kompleksi proteini riže/trehaloza/aronija u obliku suhog praha;

Kompleksiranje proteina smeđe riže, disaharida i fenola soka aronije provedeno je različitim redoslijedom kako bi se utvrdio utjecaj načina kompleksiranja na adsorpciju fenola.

Na dobivenim kompleksima određeni su:

- adsorbirani ukupnih fenola aronije;
- adsorbirani ukupni proantocijanidini aronije;
- adsorbirani antocijani aronije;
- antioksidacijska aktivnost kompleksa (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode);
- parametri boje (L^* , a^* , b^* , $^{\circ}h$, C^* , ΔE);
- strukturne promjene kompleksa u odnosu na proteine smeđe riže.



Slika 17 Shematski prikaz rada

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-etilbenztiozolin-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, saharoza i bakar klorid su proizvodi Gram-mola (Hrvatska). Trehaloza je dobivena od Hayashibara doo (Nagase group, Japan), a proteini smeđe riže od Biesterfeld AG (Hrvatska).

3.2.2. Priprema bioaktivnih dodataka hrani

Bioaktivni dodatci hrani na bazi proteina smeđe riže pripremljeni su kompleksiranjem proteina smeđe riže i soka aronije (kontrolni uzorak) odnosno proteina smeđe riže, disaharida i soka aronije. Za pripremu kompleksa proteini/aronija, proteini smeđe riže i sok aronije miješani su 10 minuta na magnetskoj miješalici (600 rpm) na sobnoj temperaturi. 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 proteini/aronija. Za pripremu kompleksa proteini/disaharidi/aronija korišteni su proteini smeđe riže, disaharid (saharoza ili

trehaloza u omjeru na proteine smeđe riže 1:1) i sok aronije miješanjem različitim redoslijedom na magnetskoj miješalici (600 rpm) na sobnoj temperaturi. 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 proteini/disaharid/aronija.

Suhi kompleksi 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 10 sati.

Tablica 5 Kemijski sastav kompleksa proteini/aronija i kompleksa proteini/disaharid/aronija, te način kompleksiranja

Oznaka uzoraka	Proteini smeđe riže (g)	Sok aronije (mL)	Disaharid (g)
RP/A			
Kompleksiranje proteina smeđe riže i soka aronije 10 minuta.			
A/S+RP			
A/T+RP			
Kompleksiranje disaharida i soka aronije 10 minuta, te dodavanje proteina smeđe riže i dodatno kompleksiranje 10 minuta.			
RP/A+S			
RP/A+T			
Kompleksiranje proteina smeđe riže i soka aronije 10 minuta, te dodavanje disaharida i dodatno kompleksiranje 10 minuta.			
RP+S+A			
RP+T+A			
Kompleksiranje svih sastojaka odjednom 10 minuta.			
RP/S+A			
RP/T+A			
Kompleksiranje proteina smeđe riže i disaharida 10 minuta, te dodavanje soka aronije i dodatno kompleksiranje 10 minuta.			

3.2.3. Metode

3.2.3.1. Uzorci za analizu

Za određivanje ukupnih fenola, proantocijanidina, monomernih antocijana i antioksidacijske aktivnosti korištena je indirektna metoda odnosno navedeni parametri su određeni u soku i u tekućem dijelu dobivenom nakon centrifugiranja.

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-cinamaldehida. 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:

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

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

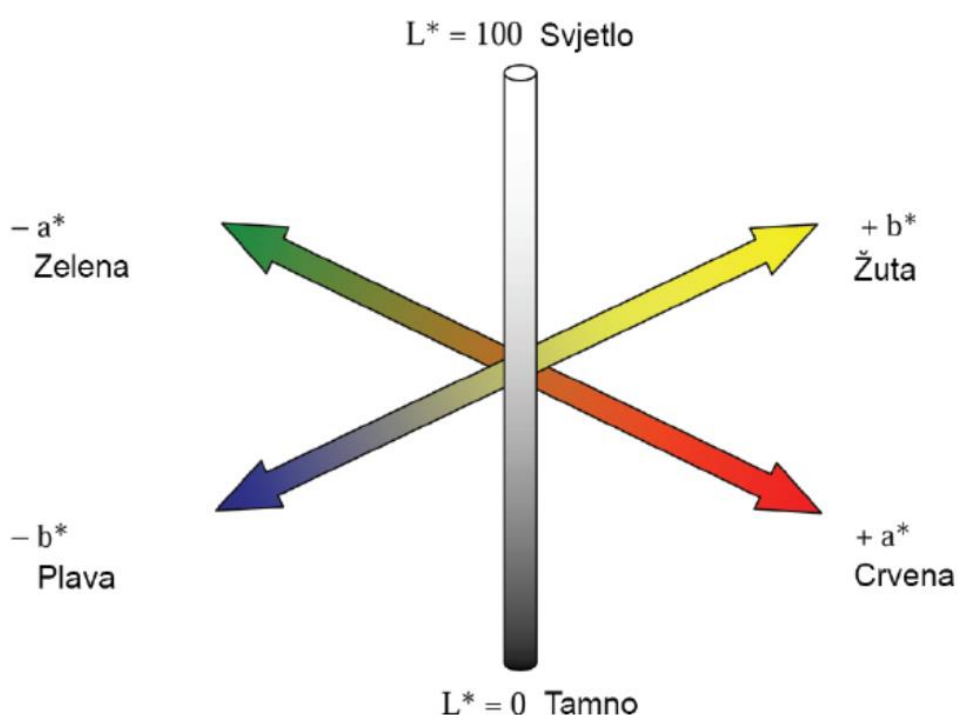
Postupak: otpipetira se 1 mL otopine bakar klorida, 1 mL otopine neokuproina, 1 mL amonij acetata, 0,2 mL uzorka te 0,9 mL vode. Smjesa se homogenizira te ostavi stajati 30 minuta. Nakon inkubacije mjeri se absorbanca na 450 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena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

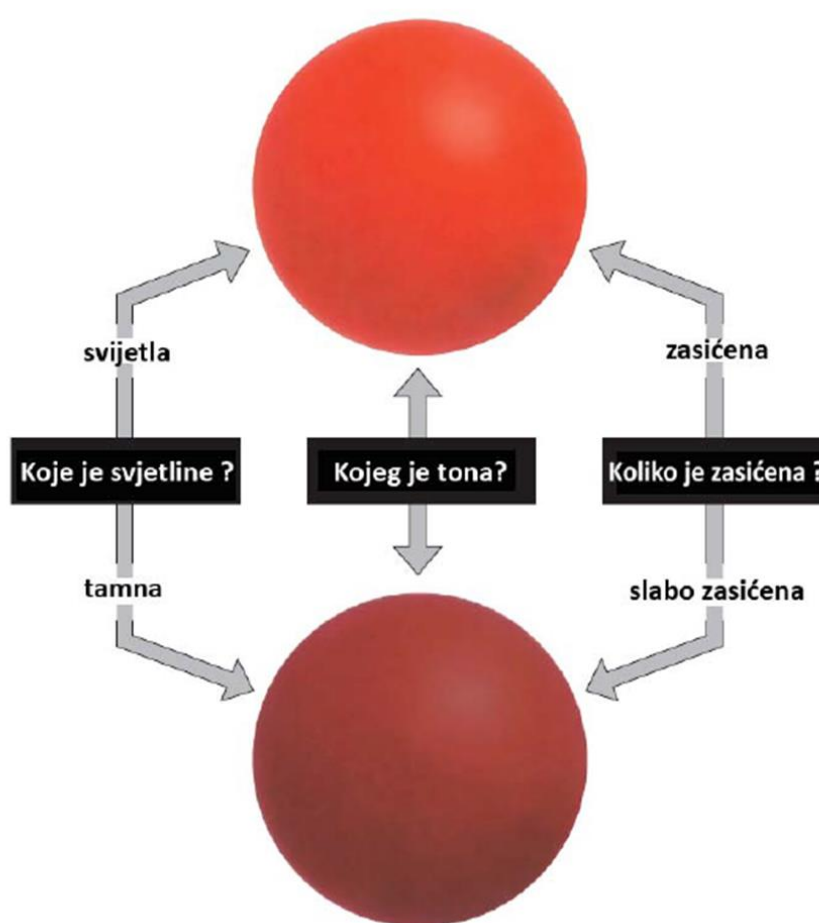
Mjerenje boje kao i promjena boje praćeni su kromametrom (Minolta CR-400). Ovaj tip kromametra mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Svjetlost se reflektira, te takvu svjetlost mjeri šest jako osjetljivih silikonskih fotočelija. Podatke zapisuje računalo i izražava ih u pet različitih sustava (X, Y, Z; Yxy; LCH; Lab; Hunter Lab). U radu je korišten Lab sustav koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko (**Slika 18**).



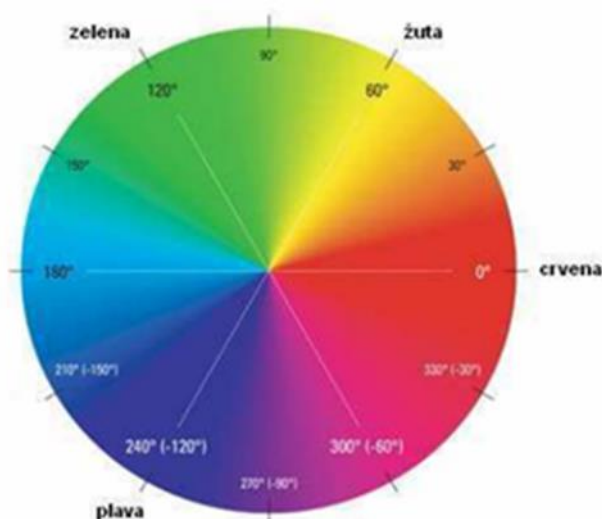
Slika 18 Prikaz CIE LAB prostora boja

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 kromometru su određeni i zasićenje (C^*) i ton boje ($^{\circ}h$). Ton boje ($^{\circ}h$) definira vizualni doživljaj na temelju kojeg točno definiramo pojedinu boju npr. crvenu, plavu, zelenu itd. ovisno o dominantnoj valnoj duljini. 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 19 Prikaz značenja svjetline, tona i zasićenja



Slika 19 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:

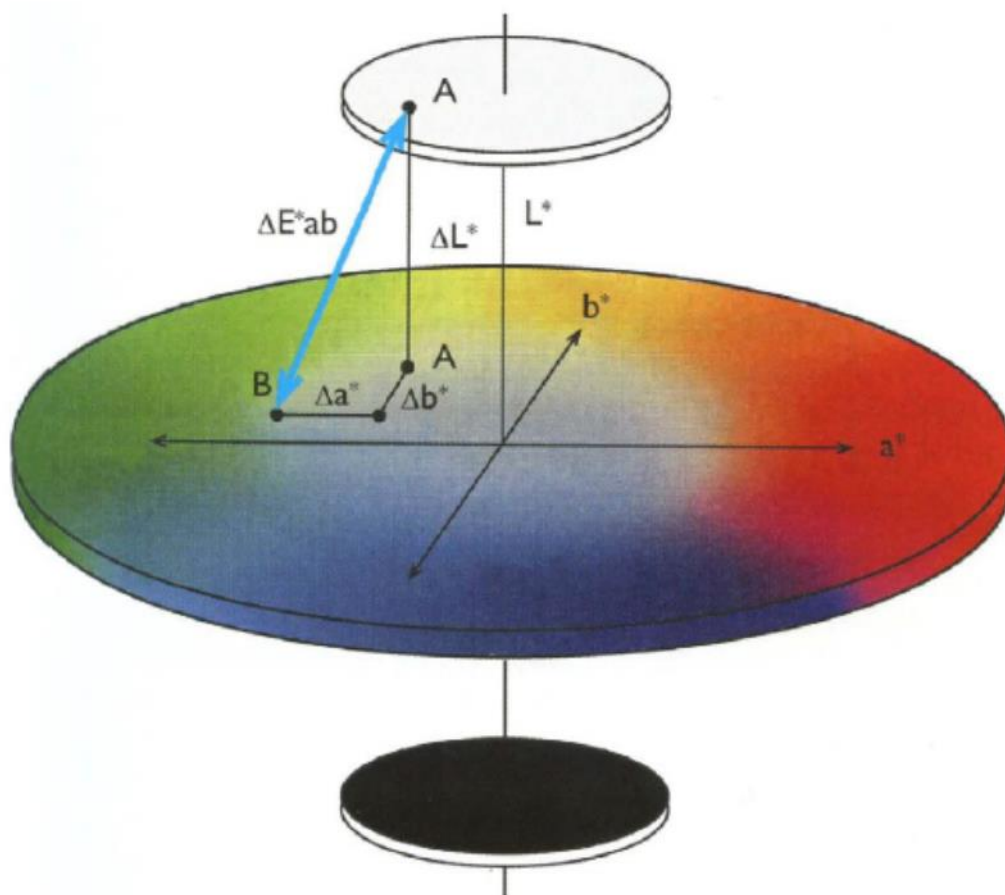
$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5}$$

$$\Delta L^* = L^*_k - L^*_u$$

$$\Delta a^* = a^*_k - a^*_u$$

$$\Delta b^* = b^*_k - b^*_u$$

(k – kontrolni uzorak; u – uspoređivani uzorak)



Slika 20 Grafički prikaz određivanja promjene boje

Veza između izračunate promjene boje (ΔE) i ljudske percepcije boje dana je u **Tablici 6**.

Tablica 6 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 kupine. Snimanje FTIR spektra provedeno je od 4000 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 $P < 0,5$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitivan je utjecaj različitih načina kompleksiranja na adsorpciju fenolnih komponenata na odabrane nosače. Izvor fenolnih spojeva je bio sok aronije a osnovni nosač su bili proteini smeđe riže. Dodatkom disaharida (saharoze i trehaloze) pokušalo se je postići poboljšanje u adsorpciji fenolnih spojeva na proteine smeđe riže. Kontrolni uzorak je bio enkapsulat proteini smeđe riže/fenoli aronije (RP/A) a svi ostali enkapsulati su pripremljeni kompleksiranjem soka aronije, proteina smeđe riže i disaharida prema različitom redoslijedu. Enkapsulati A/S+RP i A/T+RP pripremljeni su tako da su najprije kompleksirani sok aronije i disaharidi a zatim su dodani proteini smeđe riže te kompleksirani s prvobitnom smjesom. Enkapsulati RP/A+S i RP/A+T pripremljeni su tako da su najprije kompleksirani sok aronije i proteini smeđe riže a zatim su dodani disaharidi te kompleksirani s prvobitnom smjesom. Enkapsulati RP+S+A i RP+T+A pripremljeni su tako da su zajedno kompleksirani sok aronije, proteini smeđe riže i disaharidi. Enkapsulati RP/S+A i RP/T+A pripremljeni su tako da su najprije kompleksirani proteini smeđe riže i disaharidi a zatim je dodan sok aronije te kompleksiran s prvobitnom smjesom.

4.1. UDIO FENOLA, PROANTOCIJANIDINA I ANTOCIJANA NA KOMPLEKSIMA

Tablica 7 Udio fenola, proantocijanidina i antocijana u soku aronije i enkapsulatima

Uzorci	Fenoli (mg/g)	Proantocijanidini (mg/g)	Antocijani (ng/g)
Sok	8,097±0,107 ^a	2,311±0,008 ^a	468,25±0,77 ^a
RP/A	5,549±0,030 ^b	1,856±0,006 ^d	361,36±0,66 ^d
A/S+RP	4,657±0,051 ^e	1,718±0,003 ^g	328,47±0,85 ^f
A/T+RP	4,922±0,042 ^d	1,761±0,005 ^f	333,46±1,06 ^e
RP/A+S	5,418±0,015 ^c	1,884±0,008 ^c	360,21±0,62 ^d
RP/A+T	5,338±0,056 ^c	1,919±0,001 ^b	369,89±0,94 ^b
RP+S+A	4,696±0,058 ^e	1,781±0,002 ^e	343,80±0,98 ^e
RP+T+A	4,562±0,038 ^e	1,753±0,007 ^f	332,78±0,70 ^e
RP/S+A	5,040±0,041 ^d	1,766±0,003 ^f	332,56±0,74 ^e
RP/T+A	5,510±0,081 ^b	1,905±0,004 ^b	364,04±0,21 ^b

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

RP – proteini smeđe riže; A – sok aronije; S – saharoza; T – trehaloza.

U **Tablici 7** prikazan je udio fenola, proantocijanidina i antocijana u soku aronije i enkapsulatima pripremljenim kompleksiranjem na različite načine. Udio fenola u soku aronije iznosio je 8,097 mg/g. Svi enkapsulati su imali manji udio fenola od soka aronije (od 4,562 mg/g do 5,549 mg/g). Enkapsulati RP/A i RP/T+A su imali najveći udio adsorbiranih fenola, 5,5 mg/g, te je jedino s ovom kombinacijom postignuta jednaka adsorpcija fenola kao i s čistim proteinom. Najmanja adsorpcija fenola postignuta je zajedničkim kompleksiranjem svih sastojaka (RP+S+A i RP+T+A) i na enkapsulatima A/S+RP, oko 4,6 mg/g. Udio proantocijanidina u soku aronije iznosio je 2,311 mg/g. Svi enkapsulati su imali manji udio proantocijanidina od soka aronije (od 1,718 mg/g do 1,905 mg/g). Iako je enkapsulat RP/A imao najveći udio fenola, ovaj trend nije postignut i za adsorpciju proantocijanidina. Enkapsulati pripremljeni s trehalozom, RP/A+T i RP/T+A imali su najveći udio adsorbiranih proantocijanidina (1,919 mg/g i 1,905 mg/g). Najmanja adsorpcija proantocijanidina utvrđena je na A/S+RP enkapsulatu (1,718 mg/g). Udio antocijana u soku aronije iznosio je 468,25 ng/g. Kao i u slučaju proantocijanidina najveća adsorpcija antocijana utvrđena je na enkapsulatima RP/A+T i RP/T+A, 369,89 ng/g i 364,04 ng/g, a najmanja na A/S+RP enkapsulatu (328,47 ng/g). Uspoređujući učinkovitost adsorpcije fenolnih spojeva na nosače odnosno na proteine smeđe riže i proteine smeđe riže/disaharide, utvrđeno je da je adsorpcija ukupnih fenola bila od 56% do 68%, dok su navedeni nosači imali veći afinitet prema proantocijanidinima (od 74% do 83%) i antocijanima (od 70% do 79%).

4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KOMPLEKSA

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je primjenom DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metoda koje se međusobno razlikuju prema samom mehanizmu određivanja antioksidacijske aktivnosti. Primjenom DPPH metode, antioksidacijska aktivnost soka aronije iznosila je 470,97 nmol TE/g. Antioksidacijska aktivnost pripremljenih kompleksa varirala je od 260,85 nmol TE/g do 316,28 nmol TE/g. Kontrolni uzorak je imao najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti (316,28 nmol TE/g). Od preostalih enkapsulata pripremljenih sa sva tri sastojka, RP/A+T je imao najveću antioksidacijsku aktivnost (313,03 nmol TE/g) a RP+T+A najmanju (260,85 nmol TE/g). Primjenom ABTS metode, antioksidacijska aktivnost soka aronije iznosila je 692,98 nmol TE/g, a kompleksa od 346,98 nmol TE/g do 418,84 nmol TE/g. Antioksidacijska aktivnost kontrolnog uzorka iznosila je 406,96 nmol TE/g. Enkapsulati pripremljeni kompleksiranjem

soka aronije i proteina riže pa naknadnim kompleksiranjem s disaharidima imali su veću antioksidacijsku aktivnost od kontrolnog uzorka, 418,84 nmol TE/g i 409,14 nmol TE/g za trehalozu i saharozu. Najmanju antioksidacijsku aktivnost imali su enkapsulati A/S+RP i A/S+RP (359,14 nmol TE/g i 346,98 nmol TE/g).

Tablica 8 Antioksidacijska aktivnost soka aronije i enkapsulata

Uzorci	DPPH (nmol/g)	ABTS (nmol/g)	FRAP (nmol/g)	CUPRAC (μ mol/g)
Sok	470,97 $\pm$ 2,43 ^a	692,98 $\pm$ 1,28 ^a	56,88 $\pm$ 0,57 ^a	5,289 $\pm$ 0,106 ^a
RP/A	316,28 $\pm$ 1,18 ^a	406,96 $\pm$ 3,69 ^b	40,24 $\pm$ 0,31 ^b	3,814 $\pm$ 0,007 ^c
A/S+RP	280,88 $\pm$ 1,12 ^{e,f}	359,14 $\pm$ 4,41 ^f	35,76 $\pm$ 0,49 ^f	3,451 $\pm$ 0,015
A/T+RP	282,62 $\pm$ 2,27 ^e	346,98 $\pm$ 5,19 ^f	36,62 $\pm$ 0,02 ^e	3,622 $\pm$ 0,023 ^e
RP/A+S	304,43 $\pm$ 2,43 ^d	409,14 $\pm$ 3,77 ^b	39,63 $\pm$ 0,30 ^{b,c}	3,830 $\pm$ 0,023 ^c
RP/A+T	313,03 $\pm$ 0,26 ^b	418,84 $\pm$ 8,02 ^b	39,89 $\pm$ 0,23 ^{b,c}	4,037 $\pm$ 0,023 ^b
RP+S+A	277,58 $\pm$ 1,18 ^f	385,58 $\pm$ 7,73 ^e	37,60 $\pm$ 0,11 ^d	3,724 $\pm$ 0,046 ^d
RP+T+A	260,85 $\pm$ 4,60 ^g	391,21 $\pm$ 2,06 ^{d,e}	36,38 $\pm$ 0,08 ^{e,f}	3,616 $\pm$ 0,021 ^e
RP/S+A	281,11 $\pm$ 0,46 ^e	397,94 $\pm$ 2,27 ^c	36,33 $\pm$ 0,52 ^{e,f}	3,549 $\pm$ 0,044 ^e
RP/T+A	289,43 $\pm$ 2,56 ^c	395,20 $\pm$ 1,07 ^{c,d}	38,85 $\pm$ 0,24 ^c	3,837 $\pm$ 0,054 ^c

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

RP – proteini smeđe riže; A – sok aronije; S – saharoza; T – trehaloza.

Primjenom FRAP metode, antioksidacijska aktivnost soka aronije iznosila je 56,88 nmol TE/g, a kompleksa od 35,76 nmol TE/g do 40,24 nmol TE/g. Kontrolni uzorak (40,24 nmol TE/g) i uzorci RP/A+S i RP/A+T (39,7 nmol TE/g) imali su najveću antioksidacijsku aktivnost. Svi ostali enkapsulati imaju nešto nižu vrijednost od tih enkapsulata. Primjenom CUPRAC metode, antioksidacijska aktivnost soka aronije iznosila je 5,289 μ mol TE/g, a kompleksa od 3,451 μ mol TE/g do 4,037 μ mol TE/g. Najveću antioksidacijsku aktivnost imao je enkapsulat RP/A+T (4,037 μ mol TE/g), kontrolni uzorak 3,814 μ mol TE/g, a sve ostale vrijednosti bile su približno jednake antioksidacijskoj aktivnosti kontrolnog uzorka.

Tablica 9 Korelacija između fenolnih komponenata i antioksidacijske aktivnosti

	DPPH	ABTS	FRAP	CUPRAC
Fenoli	0,7245	0,3766	0,7420	0,5209
Proantocijanidini	0,5844	0,5545	0,8468	0,8829
Antocijani	0,6693	0,5525	0,9279	0,8987

U **Tablici 9** prikazane su vrijednosti koeficijenata korelacije koji definira ovisnost antioksidacijske aktivnosti o fenolima. Kod DPPH metode, najveći koeficijent korelacije (0,7245) dobiven je za fenole, i on pokazuje slabu vezu između antioksidacijske aktivnosti dobivene ovom metodom i fenola. Koeficijenti korelacije za ovu metodu i proantocijanidine i antocijane definiraju još slabiju vezu. Kod ABTS metode, dobiveni su još niži koeficijenti korelacije, a posebice za fenole kod kojih je definirana vrlo slaba povezanost s vrijednostima antioksidacijske aktivnosti. Za antioksidacijsku aktivnost dobivenu FRAP metodom i ispitivane komponente dobivene su najviši koeficijenti korelacije, a posebice za antocijane (0,9279) što definira jako povezanost ovih parametara. Kod CUPRAC metode, visoki koeficijenti korelacije odnosno jaka povezanost antioksidacijske aktivnosti dobivena je za proantocijanidine i antocijane.

4.3. PARAMETRI BOJE

U **Tablici 11** prikazani su rezultati dobiveni za boju ispitivanih uzoraka. Osim parametara L^* , a^* , b^* , $^{\circ}h$ i C^* , izračunata je i promjena boje (ΔE) uzoraka u odnosu na čisti protein riže. Vrijednosti ΔE^1 predstavljaju razliku boje između uzoraka u odnosu na uzorak RP/A.

Uzorak proteina riže imao je visoku L^* vrijednost što ukazuje na svijetao uzorak. Prilikom kompleksiranja proteina riže sa sokom od aronije i disaharidom (trehaloza/saharoza), vrijednosti L^* se smanjuju, odnosno uzorak postaje tamniji. Kao i kod ostalih provedenih analiza, utjecaj redoslijeda kompleksiranja (protein/disaharid/polifenoli iz soka aronije) vidljiv je i kod rezultata dobivenih za boju. Najnižu vrijednost L^* imali su kompleksi RP/A+S i RP+S+A (40,52), dok je najvišu vrijednost (ako izostavimo uzorak čistog proteina riže) imao uzorak RP/A (47,81), a od kompleksa s dodatkom disaharida, najvišu vrijednost L^* imao je uzorak A/S+RP (43,68). Parametar a^* , koji definira crvenu, odnosno zelenu boju, je u pozitivnim vrijednostima što upućuje na blagu crvenu nijansu uzoraka. Adsorpcijom antocijana aronije na protein riže dolazi do povećanja vrijednosti parametra a^* što je vidljivo kod uzorka RP/A (15,71). Dodatkom disaharida u kompleks, vrijednosti parametra a^* se malo smanjuju. Najvišu vrijednost parametra a^* u kompleksima s disaharidom imao je uzorak A/S+RP (15,43), a najnižu uzorak RP+S+A (13,77). Pozitivne vrijednosti parametra b^* upućuju na prisutnost žute boje. Uzorak rižinog proteina imao je vrijednost parametra b^* 21,22. Prilikom kompleksiranja

proteina riže s polifenolima iz aronije i disahridom prikrila se žuta boja, a vrijednost za uzorke prosječno je iznosila 1,25 bez većih odstupanja između uzoraka.

Tablica 10 Parametri boje L^* , a^* i b^* dobivenih kompleksa

Uzorci	L^*	a^*	b^*	ΔE	ΔE^1
RP	$74,84 \pm 0,01^h$	$4,77 \pm 0,01^a$	$21,22 \pm 0,01^g$		
RP/A	$47,81 \pm 0,04^g$	$15,71 \pm 0,03^j$	$1,08 \pm 0,01^b$	35,45	
A/S+RP	$43,68 \pm 0,01^f$	$15,43 \pm 0,01^i$	$1,70 \pm 0,02^f$	38,29	4,19
A/T+RP	$42,71 \pm 0,04^e$	$15,13 \pm 0,01^h$	$1,59 \pm 0,01^e$	39,06	5,15
RP/A+S	$40,52 \pm 0,05^a$	$14,15 \pm 0,02^e$	$1,18 \pm 0,02^c$	40,84	7,45
RP/A+T	$40,86 \pm 0,02^b$	$14,30 \pm 0,01^f$	$1,18 \pm 0,01^c$	40,59	7,09
RP+S+A	$40,52 \pm 0,03^a$	$13,77 \pm 0,04^b$	$1,19 \pm 0,01^c$	40,75	7,54
RP+T+A	$42,01 \pm 0,02^c$	$13,99 \pm 0,02^d$	$1,06 \pm 0,01^b$	39,62	6,05
RP/S+A	$42,24 \pm 0,03^d$	$14,60 \pm 0,02^g$	$1,26 \pm 0,02^d$	39,47	5,68
RP/T+A	$42,06 \pm 0,06^c$	$13,86 \pm 0,08^c$	$0,98 \pm 0,03^a$	39,58	6,04

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

RP – proteini smeđe riže; A – sok aronije; S – saharoza; T – trehaloza.

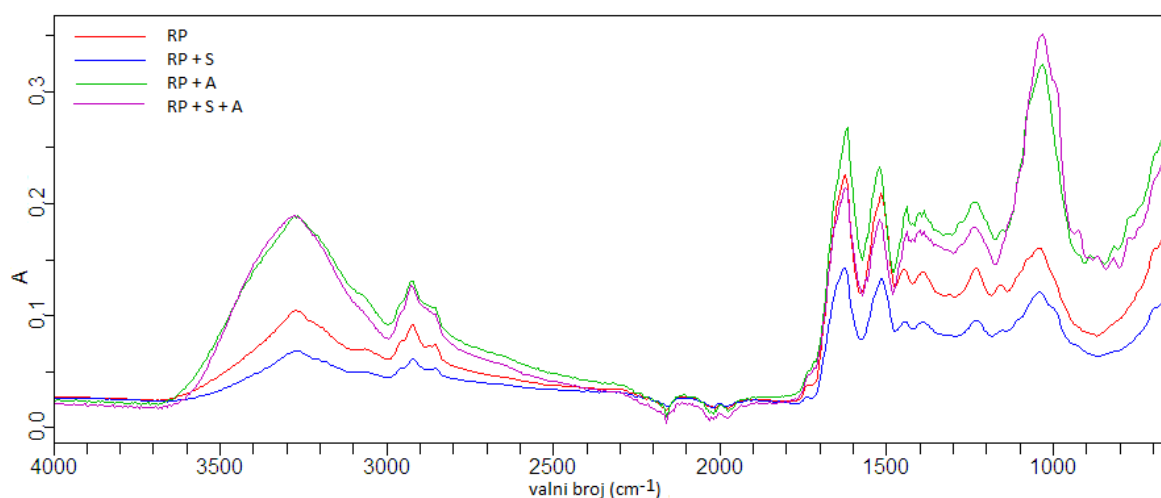
Pomoću parametara L^* , a^* i b^* izračunata je promjena boje (ΔE) uzoraka u odnosu na čisti protein riže. Najmanja promjena boje (35,45) uočena je kod uzorka RP/A. Prisutnost disaharida u kompleksu je dovela do većih promjena boje, a najviše se uočava kod uzorka RP/A+S (40,84). Promatrajući vezu između izračunate vrijednosti promjene boje (ΔE) i ljudske percepcije boje kod svih uzoraka (uspoređenih s uzorkom čistog proteina riže) očigledna su odstupanja u boji. Kada se promatra veza između ljudske percepcije boje i vrijednost ΔE^1 , koja predstavlja razliku boje između uzoraka u odnosu na uzorak RP/A, dolazi se do sljedećih zaključaka. Uzorci RP/A+T, RP/A+S, RP/T+A, RP+T+A i RP+S+A imaju očigledna odstupanja u boji u odnosu na uzorak RP/A. Kod uzoraka RP/S+A, A/T+RP i A/S+RP veza između ΔE^1 i ljudske percepcije boje ukazuje na promjenu boje koja se dobro vidi. Vrijednost tona boje ($^{\circ}h$) za uzorak proteina riže iznosio je 77,34 dok su se prilikom adsorpcije polifenola iz aronije (i dodatkom disaharida, osim u uzorku RP/A) vrijednosti za ton boje značajno smanjile. Kod uzorka RP/A najmanja je vrijednost $^{\circ}h$ i iznosi 3,93. Kod ostalih uzoraka, najmanju vrijednost $^{\circ}h$ ima kompleks RP/T+A (4,05), a najvišu vrijednost ima kompleks A/S+RP (6,27). Vrijednost C^* (zasićenje boje) kod uzorka proteina riže iznosila je 21,75 dok se u ostalim uzorcima nakon kompleksiranja vrijednost smanjila i kretala u rasponu od 13,89 do 18,82.

Tablica 11 Parametri boje C* i °h dobivenih kompleksa

Uzorci	°h	C*
RP	77,34 ± 0,03 ^h	21,75 ± 0,01 ^j
RP/A	3,93 ± 0,03 ^a	15,75 ± 0,02 ^h
A/S+RP	6,27 ± 0,05 ^g	15,52 ± 0,01 ^g
A/T+RP	5,99 ± 0,03 ^f	15,21 ± 0,01 ^f
RP/A+S	4,75 ± 0,07 ^d	14,20 ± 0,02 ^c
RP/A+T	4,73 ± 0,03 ^d	14,35 ± 0,01 ^d
RP+S+A	4,94 ± 0,03 ^e	18,82 ± 0,04 ⁱ
RP+T+A	4,36 ± 0,04 ^c	14,03 ± 0,02 ^b
RP/S+A	4,94 ± 0,06 ^e	14,66 ± 0,02 ^e
RP/T+A	4,05 ± 0,11 ^b	13,89 ± 0,08 ^a

4.4. FTIR-ATR ANALIZA KOMPLEKSA

U **Tablici 12** dan je prikaz karakterističnih apsorpcijskih vrpca proteina riže pri odgovarajućim valnim brojevima. Na **Slikama 21 - 24** prikazani su IR spektri kompleksa. Obzirom da na IR spektar kompleksa proteini riže/disaharid/aronija ne utječe način kompleksiranja, na slikama je prikazan IR spektar samo jednog kompleksa i uspoređen je s ostalim uzorcima odnosno IR spektrom proteina riže, kontrolnog uzorka i kompleksom proteini riže/disaharid. Na **Slikama 21 i 22** prikazani su IR spektri proteina riže (RP), kompleksa proteini riže/saharoza (RP+S), proteini smeđe riže/aronija (RP+A) i proteini smeđe riže/saharoza/aronija (RP+S+A).

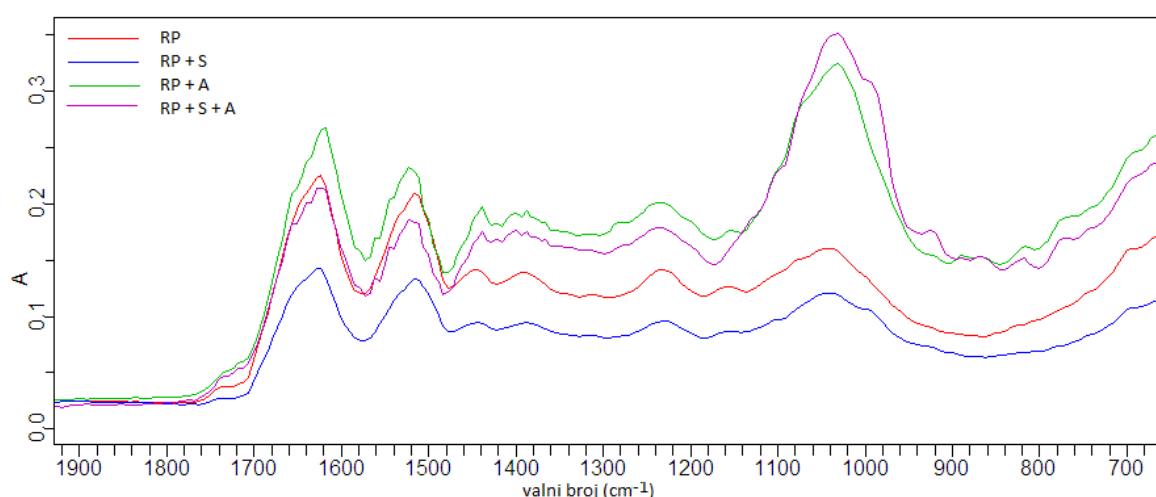


Slika 21 Prikaz IR spektra proteina riže (RP) i kompleksa proteini riže/saharoza (RP+S), proteini riže/aronija (RP+A) i proteini riže/saharoza/aronija (RP+S+A)

Tablica 12 Prikaz karakterističnih apsorpcijskih vrpca pri odgovarajućem valnom broju (cm^{-1}) proteina smeđe riže

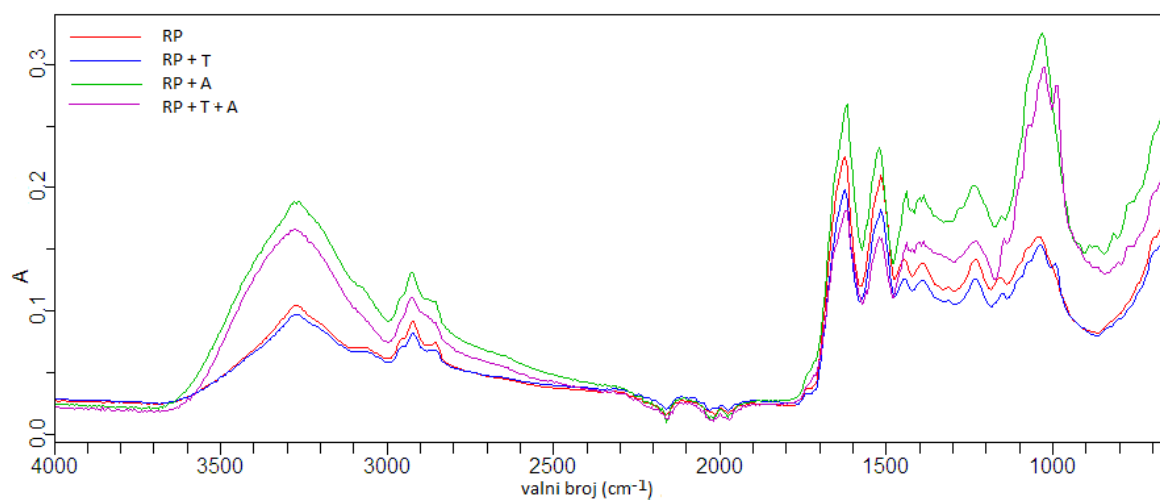
valni broj (cm^{-1})	veze
3280	asimetrično istezanje O-H
2922	istezanje C-H
2850	istezanje CH_2
1745	C=O
1625	amid I
1520	amid II
1446	deformacija CH_3
1386	istezanje C-O, deformacija C-H, deformacija N-H
1310	amid III
1230	amid III
1155	istezanje C-O
1043 s pratećom apsorpcijskom vrpcom na 1080	istezanje C-O uz istezanje PO_2^-

Apsorpcijska vrpca na 3280 cm^{-1} , koja je povezana s istezanjem O-H skupina, se širi i većeg je intenziteta kod kompleksa na kojima su adsorbirani fenoli aronije (RP+A RP+S+A) u odnosu na RP i RP+S uzorke. Također, na uzorcima RP i RP+S, postoji apsorpcijska vrpca na 1745 cm^{-1} koja postaje manje izražena prilikom adsorpcije fenola na nosače. Kompleksiranjem proteina riže i saharoze također su vidljive promjene u IR spektru. Javlja se nova apsorpcijske vrpca karakteristična za saharozu na 990 cm^{-1} uz apsorpcijsku vrpca na 1050 cm^{-1} . Na IR spektrima kompleksa s adsobiranim fenolima osim već navedenih promjena utvrđene su dodatne promjene. Na kompleksu RP+A se javljaju dodatne vrpce na 880 cm^{-1} , 820 cm^{-1} i 770 cm^{-1} . Na RP+S+A, uz već spomenute promjene, nestaje apsorpcijska vrpca na 1150 cm^{-1} i nastaje dodatna vrpca na 920 cm^{-1} .

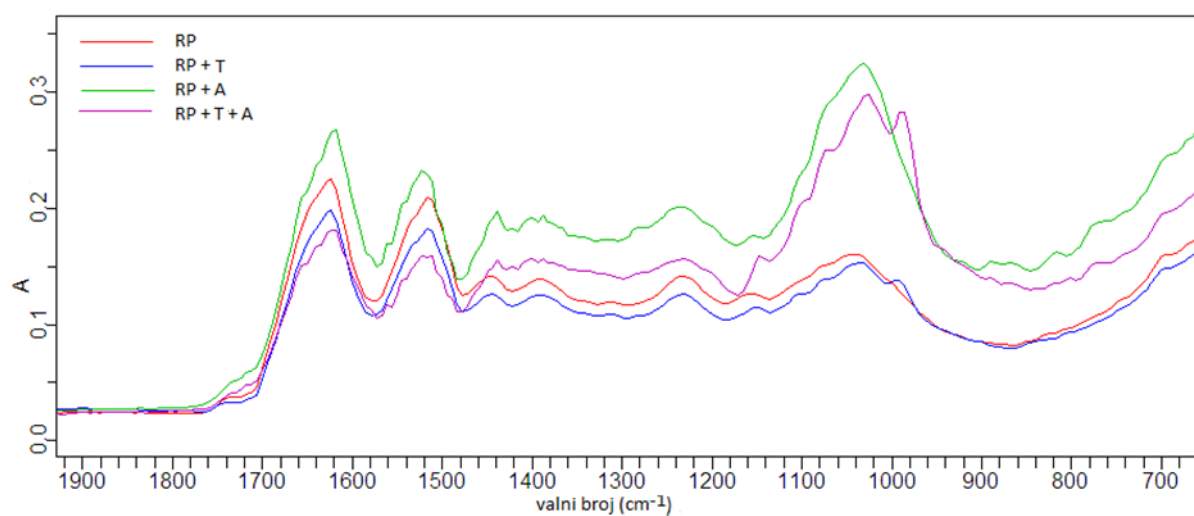


Slika 22 Prikaz IR spektra proteina riže (RP) i kompleksa proteini riže/saharoza (RP+S), proteini riže/aronija (RP+A) i proteini riže/saharoza/aronija (RP+S+A) u regiji od 1900 cm^{-1} do 700 cm^{-1}

Kao i kod uzoraka s saharozom, apsorpcijska vrpca na 3280 cm^{-1} , koja je povezana s istežanjem O-H skupina, se širi i većeg je intenziteta kod kompleksa na kojima su adsorbirani fenoli aronije (RP+A i RP+T+A) u odnosu na RP i RP+T uzorke. Također, na uzorcima RP i RP+S, postoji apsorpcijska vrpca na 1745 cm^{-1} koja postaje manje izražena prilikom adsorpcije fenola na nosače. Kompleksiranjem proteina riže i trehaloze također su vidljive promjene u IR spektru, odnosno javlja se nova apsorpcijske vrpca karakteristična za trehalozu na 990 cm^{-1} . Na kompleksu RP+A se javljaju dodatne vrpce na 880 cm^{-1} , 820 cm^{-1} i 770 cm^{-1} . Na RP+T+A, uz već spomenute promjene, nastaje i dodatna vrpca na 110 cm^{-1} i 1090 cm^{-1} , a vrpca na 1150 cm^{-1} postaje znatno izraženija.



Slika 23 Prikaz IR spektra proteina riže (RP) i kompleksa proteini riže/trehaloza (RP+T), proteini riže/aronija (RP+A) i proteini riže/trehaloza/aronija (RP+T+A)



Slika 24 Prikaz IR spektra proteina riže (RP) i kompleksa proteini riže/trehaloza (RP+T), proteini riže/aronija (RP+A) i proteini riže/trehaloza/aronija (RP+T+A) u regiji od 1900 cm^{-1} do 700 cm^{-1}

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata u ovom radu se može zaključiti sljedeće:

1. Količina adsorbiranih fenola, proantocijanidina i antocijana mijenjala se u uzorcima kompleksiranjem proteina smeđe riže/aronije kao i kod proteina smeđe riže/aronije uz dodatak disaharida. Enkapsulirani uzorci kojima je dodana trehaloza imali su najveći udio adsorbiranih fenola, proantocijanidina i antocijana. Točnije sljedeći uzorci imali su najveću količinu adsorbiranih fenola RP/A i RP/T+A, proantocijanidina RP/A+T i RP/T+A, i antocijana RP/A+T i RP/T+A.
2. Antioksidacijska aktivnost analizirana metodama DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC varirala je između kompleksiranih uzoraka, međutim najbolje rezultate su dali uzorci koji su kompleksirani uz dodatak trehaloze. Najveću antioksidacijsku aktivnost analiziranu metodama DPPH, FRAP i CUPRAC pokazali su uzorci dobiveni kompleksiranjem proteina smeđe riže/aronije uz dodatak trehaloze. Kod ABTS metode enkapsulirani uzorci pripremljeni kompleksiranjem soka aronije/proteina uz naknadno dodavanje trehaloze imali su najveću antioksidacijsku aktivnost.
3. Parametri boje L^* i a^* dobivenih kompleksa mijenjali su se također kompleksiranjem, dok vrijednost b^* nije toliko varirala između uzoraka. Najveću vrijednost parametra L^* i a^* imao je uzorak nastao kompleksiranjem aronija/saharoza/proteini riže. Promjena boje (ΔE) najmanje se uočila kod uzorka nastalog kompleksiranjem proteina smeđe riže i aronije, dok je dodatkom disaharida došlo do promjene najviše kod uzorka RP/A+S. Vrijednost tona boje ($^{\circ}h$) se smanjivao prilikom adsorpcije polifenola i dodatkom šećera. Vrijednost C^* (zasićenje boje) smanjila se kompleksiranjem u odnosu na uzorak proteina riže.
4. Prema FTIR-ATR analizi kompleksiranih uzoraka vidljivo je da se apsorpcijska vrpca širi kao rezultat istezanja -OH skupina kod uzoraka na kojima su adsorbirani fenoli aronije (RP+A, RP+S+A, RP+T+A) u odnosu na uzorke bez dodatka aronije poput uzorka čistog proteina smeđe riže i proteina smeđe riža uz dodatak disaharida. Kompleksiranjem proteina riže i saharoze kao i kod kompleksiranja proteina riže i trehaloze vidljive su promjene u IR spektru. Javljaju se nove apsorpcijske vrste karakteristične za saharozu i trehalozu.

6. LITERATURA

- Banjarnahor SD, Artanti N: Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia* 23(4): 239-44, 2014.
- Barkijević M: Analiza sastava šećera HPLC metodom u uzorcima meda s područja Hrvatske. *Doktorski rad*. Agronomski fakultet, Zagreb, 2017.
- Betz M, Kulozik U: Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels. *Procedia food science* 1: 2047-2056, 2011.
- Bräunlich M, Slimestad R, Wangensteen H, Brede C, Malterud KE, Barsett H: Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients* 5(3): 663-678, 2013.
- Burek M, Waśkiewicz S, Wandzik I: Trehalose—properties, biosynthesis and applications. *Methods* 3: 9-10, 2015.
- Catană L, Catană M, Iorga E, Asănică AC, Lazăr AG, Lazăr MA, Belc N: Vitamin c and total polyphenol content and antioxidant capacity of fresh and processed fruits of *Aronia melanocarpa*. *Scientific Papers. Series B, Horticulture* 61: 433-440, 2017.
- Czubinski J, Dwiecki K: A review of methods used for investigation of protein-phenolic compound interactions. *International Journal of Food Science & Technology* 52(3): 573-585, 2017.
- Das K, Roychoudhury A: Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science* 2: 53, 2014.
- Denev P, Kratchanova M, Petrova I, Klisurova D, Georgiev Y, Ognyanov M, Yanakieva I: Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) fruits and functional drinks differ significantly in their chemical composition and antioxidant activity. *Journal of Chemistry* 2018.
- Denev PN, Kratchanov CG, Ciz M, Lojek A, Kratchanova MG: Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols: in vitro and in vivo evidences and possible mechanisms of action: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11(5): 471-489, 2012.
- Dumančić, T: Fenoli i kinoni. *Doktorski rad*. Odjel za kemiju, Osijek, 2017.
- Gao N, Wang Y, Jiao X, Chou S, Li E, Li B: Preparative purification of polyphenols from *Aronia melanocarpa* (Chokeberry) with cellular antioxidant and antiproliferative activity. *Molecules* 23(1): 139, 2018.

- Han X, Shen T, Lou H: Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8(9): 950-988, 2007.
- Ho GT, Bräunlich M, Austarheim I, Wangensteen H, Malterud KE, Slimestad R, Barsett H: Immunomodulating activity of Aronia melanocarpa polyphenols. *International journal of molecular sciences* 15(7): 11626-11636, 2014.
- Jakobek, L.: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Jórárt-Laczkovich O, Katona G, Aigner Z, Szabó-Révész P: Investigation of recrystallization of amorphous trehalose through hot-humidity stage X-ray powder diffraction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95: 145-151, 2016.
- Karlson P: *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb, 1993.
- Khiraoui A, Guedira T: Effect of Stevia rebaudiana, sucrose and aspartame on human health: A comprehensive. *Journal of Medicinal Plants*, 6(1): 102-108, 2018.
- Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M: Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *Journal of medicinal food* 13(2): 255-269, 2010.
- Kopjar M: Utjecaj dodatka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Kulling SE, Rawel HM: Chokeberry (Aronia melanocarpa)-A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta medica* 74(13): 1625-1634, 2008.
- Kurtagić H: Polifenoli i flavonoidi u medu. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* 6(1): 28-35, 2017.
- Liang N, Kitts DD: Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules* 19(11): 19180-19208, 2014.
- Liu B, Cao L, Zhang L, Yuan X, Zhao B: Preparation, phytochemical investigation, and safety evaluation of chlorogenic acid products from Eupatorium adenophorum. *Molecules* 22(1): 67, 2017.
- Mijatović E: Antioksidativni sinergizam cijeđenog soka aronije i miješavine crnog vina triju sorti grožđa s područja Bujištine. *Doktorski rad*. Medicinski fakultet, Rijeka, 2019.
- Milić M: *Priručnik za uzgoj aronije*. Rasadnik Milić, Donji Miholjac, 2011.

- Minatel IO, Borges CV, Ferreira MI, Gomez HAG, Chen CYO, Lima GPP: Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compounds Biological Activity* 1-24, 2017.
- Oszmiański J, Wojdyło A: Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology* 221(6): 809-813, 2005.
- Ozdal T, Capanoglu E, Altay F: A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International* 51(2): 954-970, 2013.
- Papoutsis K, Golding JB, Vuong Q, Pristijono P, Stathopoulos CE, Scarlett CJ, Bowyer M: Encapsulation of citrus by-product extracts by spray-drying and freeze-drying using combinations of maltodextrin with soybean protein and ι -Carrageenan. *Foods* 7(7): 115, 2018.
- Quan TH, Benjakul S, Sae-leaw T, Balange AK, Maqsood S: Protein–polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications. *Trends in Food Science & Technology*, 91: 507-517, 2019.
- Staszowska-Karkut M, Materska M: Phenolic composition, mineral content, and beneficial bioactivities of leaf extracts from black currant (*Ribes nigrum* L.), raspberry (*Rubus idaeus*), and aronia (*Aronia melanocarpa*). *Nutrients* 12(2): 463, 2020.
- Šimunić, M. : Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrsta *Geranium macrorrhizum* L. i *G. dalmaticum* (Beck) Rech. f., Geraniaceae. *Doktorski rad*. Fakultet za farmaciju i biokemiju, Zagreb, 2016.
- Tarpan MA, De Cooman H, Sagstuen E, Waroquier M, Callens F: Identification of primary free radicals in trehalose dihydrate single crystals X-irradiated at 10 K. *Physical Chemistry Chemical Physics* 13(23): 11294-11302, 2011.
- Tolić MT, Jurčević IL, Krbavčić IP, Marković K, Vahčić N: Phenolic content, antioxidant capacity and quality of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Food technology and biotechnology*, 2015.
- Tolić MT, Krbavčić IP, Vujević P, Milinović B, Jurčević IL, Vahčić N: Effects of weather conditions on phenolic content and antioxidant capacity in juice of chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). *Polish journal of food and nutrition sciences* 67(1): 67-74, 2017.

- Tolić MT, Marković K, Vahčić N, Rumora Samarin I, Mačković N, Panjkota Krbavčić I:
Polyphenolic profile of fresh chokeberry and chokeberry products. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 13(3-4): 147-153, 2018.
- Trifković K: Hidrogelovi na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola. *Doktorski rad*. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2017.
- Tsao R: Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2(12): 1231-1246, 2010.
- Web 1: (OPG Lesjak) <http://www.opg-lesjak.hr/> (pristupljeno 05.08.2020.)
- Web 2 (autor nepoznat): https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_06-01.html (pristupljeno 10.08.2020.)