

Utjecaj dodatka disaharida na udio fenola i antocijana u liofiliziranim kašama višnje

Trtinjak, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:109:458279>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIV I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Ivona Trtinjak

Utjecaj dodatka disaharida na udio fenola i antocijana u liofiliziranim
kašama višnje

završni rad

Osijek, 2015.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

Nastavni predmet

Kemija hrane

**Utjecaj dodatka disaharida na udio fenola i
antocijana u liofiliziranim kašama višnje**

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Studentica: Ivona Trtinjak

MB: 3677/12

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Predano:

Pregledano:

Ocjena:

Potpis mentora:

Utjecaj dodatka disaharida na udio fenola i antocijana u liofiliziranim kašama višnje

Sažetak

U ovom radu ispitivan je utjecaj dodatka različitih količina (5, 10 ili 20%) disaharida (saharoza, maltoza ili trehaloza) na udio fenola, antocijana i antioksidativnu aktivnost liofiliziranih kaša od višanja. Rezultati su uspoređivani s rezultatima za kontrolni uzorak odnosno s liofiliziranom kašom od višanja bez dodatka šećera. Najveći udio antocijana imao je kontrolni uzorak. S povećanjem udjela šećera došlo je do smanjenja udjela antocijana, osim u uzorku s dodatkom 20% maltoze koji je imao najveći udio antocijana od svih uzoraka s dodanim šećerom. Udio fenola je također bio najveći u kontrolnom uzorku a najmanji u uzorku s dodatkom 20% trehaloze. Antioksidativna aktivnost je određena primjenom ABTS, DPPH i FRAP metode. Vrijednosti dobivene primjenom ABTS metode su niže od vrijednosti dobivenih DPPH i FRAP metodama. Najveću antioksidativnu aktivnost primjenom navedenih metoda imao je uzorak s dodatkom 20% maltoze. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da interakcije unutar kompleksnog matriksa proizvoda utječu na udio fenolnih tvari i antioksidativnu aktivnost proizvoda.

Ključne riječi: liofilizirana kaša višnje, saharoza, maltoza, trehaloza, antocijani, polifenoli, antioksidativna aktivnost.

Influence of disaccharides addition on phenolic and anthocyanin content of freeze-dried sour cherry puree

Summary

The aim of this research was investigation of the influence of different amounts (5, 10 or 20%) of disaccharides (sucrose, maltose or trehalose) on phenolics, anthocyanins and antioxidant activity of freeze-dried sour cherry puree. Results were compared with control sample, freeze-dried sour cherry puree without addition of sugars. The highest anthocyanin content had control sample. With increase of sugar addition, increase of anthocyanin content was observed except in the case of addition of 20% of maltose. That sample had the highest anthocyanin content among samples with sugar addition. The highest phenol content was also determined in control sample, while the sample with 20% of trehalose addition had the lowest content. Antioxidant activity was determined by ABTS, DPPH I FRAP methods. Values of antioxidant activity determined by ABTS were lower in comparison to values obtained by FRAP and DPPH method. The highest antioxidant activity (determined with all methods) had sample with addition of 20% of maltose. Results of this research showed that interactions among food component play important part on phenolics and antioxidant activity.

Key words: freeze-dried sour cherry puree, sucrose, maltose, trehalose, anthocyanins, polyphenols, antioxidant activity.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1 VIŠNJA.....	4
2.2 DISAHARIDI.....	5
2.2.1 Maltoza	5
2.2.2 Saharoza	5
2.2.3 Trehaloza.....	6
2.3 ANTOCIJANI.....	7
2.3.1 Struktura antocijana.....	7
2.3.2 Stabilnost boje antocijana	9
2.4 POLIFENOLI	14
2.4.1 Kemijska struktura polifenola	14
2.4.2 Antioksidativna aktivnost polifenolnih spojeva	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1 ZADATAK.....	20
3.2 MATERIJALI.....	21
3.3 METODE	21
3.3.1 Određivanje antioksidativne aktivnosti.....	21
3.3.2 Određivanje udjela antocijana.....	22
3.3.3 Određivanje polimerne boje	23
3.3.4 Određivanje udjela fenola i flavonoida	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	26
4.2 UDIO ANTOCIJANA I POLIMERNA BOJA U LIOFILIZIRANIM KAŠAMA VIŠNJE	27
4.3 UDIO FENOLA I FLAVONOIDA U LIOFILIZIRANIM KAŠAMA VIŠNJE	28
5. ZAKLJUČAK	29
6. LITERATURA	31

1. UVOD

Boja hrane potječe od prirodnih pigmenata ili pak dodanih bojila (aditiva). U prehrambenoj industriji uz aromu i teksturu, ona je jedan od parametara pokazatelja kvalitete hrane. Također utječe na ponašanje i odabir potrošača tijekom kupovine prehrambenih proizvoda. U proizvodnji hrane, boja je vrlo važna, stoga tehnolozi daju sve od sebe kako bi se zadržao prirodni izgled sirovine. Međutim, to je poprilično teško s obzirom na to da se boja hrane može mijenjati pod utjecajem svjetla, temperature, kisika, iona metala i endogenih enzima tijekom obrade i skladištenja. U kojoj mjeri će se boja sačuvati ovisi i o vrsti i svojstvima prirodnih pigmenata i tehnološkom procesu. Ukoliko je voće oštećeno boja može biti rezultat pojave nespecifičnih ili sekundarnih pigmenata. Sekundarni pigmenti obuhvaćaju naknadno formirane pigmente koji nisu prisutni u zdravom plodu već nastaju iz neobojenih spojeva reakcijama posmeđivanja ili degradacijom primarnih pigmenata. Veliku ulogu u kvaliteti prehrambenih proizvoda čine skupina pigmenata pod nazivom antocijani. Ova skupina pigmenata nalazi se u različitim vrstama voća i povrća, od crvene do tamno plave boje. Antocijani su vrlo nestabilni tijekom termičke obrade ali i tijekom skladištenja. Temperatura, pH, kisik i aktivitet vode smatraju se glavnim faktorima koji utječu na stabilnost antocijana (Giusti i sur., 1999.). Kako bi se postigla bolja održivost boje prehrambenih proizvoda treba se utvrditi kemija molekula boje, u ovom slučaju antocijana, i njihova stabilizacija.

Fenolni spojevi koji su prirodno prisutni u povrću, voću i žitaricama pokazuju širok raspon fizioloških svojstava i posjeduju sposobnost smanjenja oksidativnog oštećenja povezanog sa mnogim bolestima uključujući tumor, kardiovaskularne bolesti, aterosklerozu, diabetes, astmu, hepatitis, oštećenje jetre, artritis, imunodeficijenciju i starenje. Neravnoteža između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa potencijalno vodi ka određenom oštećenju i naziva se oksidativni stres, a smatra se uzrokom starenja i različitih bolesti u ljudi. U modernoj medicini se vjeruje da je balans između antioksidacije i oksidacije glavni način za održavanje zdravog biološkog sustava (Gharras, 2009.).

U ovom istraživanju zadatak je bio odrediti udio antocijana i polimerne boje, antioksidativnu aktivnost te udio fenola i flavonoida u liofiliziranim kašama višnje bez i sa dodatkom određenih disaharida (maltoza, saharoza ili trehaloza) u različitim koncentracijama (5, 10 ili 20%).

2. TEORIJSKI DIO

2.1 VIŠNJA

Višnja (lat. *Prunus cerasus* L.) je voćna vrsta koja spada u koštičave voćke. U biljnoj sistematici spada u porodicu ruža (*Rosaceae*), rod *Prunus* i podrod *Cerasus*. Potječe iz Sjeverne Indije i Irana, a popularna je od davnih vremena.

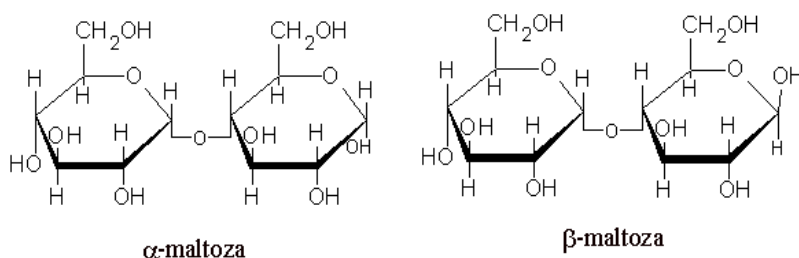
Višnje su bogate vitaminima A, C, E i folnom kiselinom, mineralima kalijem, magnezijem, željezom i vlaknima. Višnja sadrži fenole, galnu i p-kumarinsku kiselinu, kamferol i kvercetin. Jaka antiupalna svojstva sastojaka višnje čine je korisnom za smanjivanje boli kod gihta i upale mišića, osteoartritisa i reumatoidnog artritisa (Web 1). Višnje obiluju fenolnim spojevima - snažnim antioksidansima koji štite živčani sustav i sprečavaju oksidativni stres. Sastojci višnje, posebice fenoli pozitivno djeluju u prevenciji tumora, posebice debelog crijeva. Višnja je jedna od rijetkih vrsta voća koje sadrži melatonin – prirodni hormon koji regulira san (Web 1).

U prosjeku, plodovi višnje sadrže oko 83 do 85% vode, između 15 i 17% suhe tvari. Najviše sadrže ukupnog šećera oko 10%, od čega na invertni šećer otpada 9%. Kiselina u prosjeku sadrže 1,9%, dok mineralnih tvari sadrži oko 0,6%. Sadržaj vitamina C se kreće od 21 do 60 mg/%, što najviše ovisi o pojedinoj sorti višnje (Web 2).

2.2 DISAHARIDI

2.2.1 Maltoza

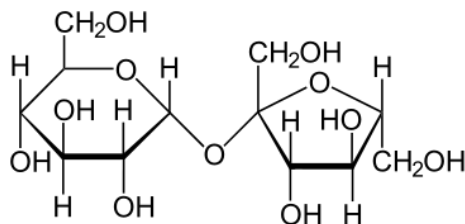
Maltoza (**Slika 1**) je disaharid koji nastaje hidrolizom molekula škroba. Sastoji se od dvije jedinice glukoze povezane $\alpha(1\rightarrow4)$ -glikozidnom vezom. Prirodno prisutna u žitaricama, osobito proklijalima. Temeljna je sirovina u procesu vrenja piva (oslađivanje). U organizmu se pod utjecajem enzima maltaze razlaže na glukozu. Za industrijske potrebe koristi se prije svega u obliku sirupa za pripremu raznih dijetetskih preparata. Svojom slatkoćom, koja je blizu laktoze (oko 50% u odnosu na saharozu), pokriva gorke i trpke frakcije hmelja u pivu. Naziva se još i sladni šećer.



Slika 1 Stukturni prikaz molekula maltoze (Babić, 2007.)

2.2.2 Saharoza

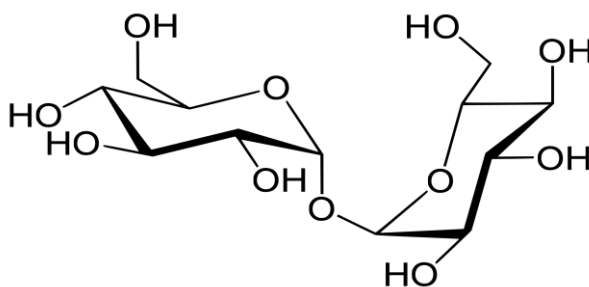
Saharoza (**Slika 2**) je obični, stolni ili konzumni šećer koji se dobiva od šećerne repe ili trske. Kristalna saharoza je najvažnije sladilo u ljudskoj prehrani. Ima vrlo visoku energetske vrijednost (1650 J/100 g), a uz masti je jedan od najjeftinijih izvora energije. Saharoza je nereducirajući šećer, sastoji se od α -D-glukoze i β -D-fruktoze povezanih glikozidnom vezom. Hidrolizom molekule saharoze u zakiseljenoj otopini nastaje jedna molekula glukoze i jedna molekula fruktoze. Kristalizira u monoklinskom sustavu i daje hemimorfne kristale. Kristal saharoze je vrlo složen i predstavlja kombinaciju šest kristalografskih oblika. Topljiva je u vodi, a netopljiva u većini organskih otapala (Babić, 2007.). Saharoza je prije svega sladilo, zatim i sredstvo za konzerviranje brojnih prehrambenih proizvoda, a podjednako se upotrebljava u prehrambenoj industriji i kućanstvima. Dobro je topljiva u vodi, ima ugodan sladak okus, a u organizmu se potpuno i brzo resorbira (Babić, 2007.).



Slika 2 Stukturni prikaz molekule saharoze (Babić, 2007.)

2.2.3 Trehaloza

Trehaloza (**Slika 3**) je disaharid koji se sastoji od dvije molekule D-glukoze povezane α -1,1 glikozidnom vezom (Choi i sur., 2006.). U prirodi se uglavnom nalazi u α , α obliku (α -D-glukopiranozil α -D-glukopiranozid, šećer gljiva) (El-Bashiti i sur., 2005.). Trehalozu sadrže različite biljke, alge, gljivice, kvasci, bakterije, kukci i drugi nekralježnjaci (Babić, 2007.). To je nereducirajući šećer koji se ne hidrolizira lako djelovanjem kiselina, te se glikozidna veza ne može cijepati pod utjecajem α -glukozidaze. Kombinacija molekulske strukture i fizikalno-kemijskih svojstava rezultira vrlo stabilnim disaharidom (Kopjar, 2007). Pregledom utjecaja trehaloze u živim sustavima dobije se uvid u moguće pozitivno djelovanje trehaloze na svojstva prehrambenih i medicinskih proizvoda. Osim zaštitne uloge, trehaloza ima i druga pozitivna svojstva koja proizlaze iz prirode stabilne 1,1 veze. Jedno od tih svojstava je niska higroskopnost. Sadržaj vode trehaloze dihidrata je konstantan (9,54%) sve do relativne vlažnosti do 92%. Trehaloza ima topljivost i osmotski profil sličan maltozi. U usporedbi s drugim šećerima, trehaloza je stabilnija pri širokom rasponu pH vrijednosti i temperatura (Colacço i Roser, 1995.). Trehaloza ima slatkoću oko 40 do 45% slatkoće saharoze. Trehaloza ima primjenu u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, u biotehnologiji za očuvanje bakterija i kvasaca te u prehrambenoj industriji (u proizvodnji pića, smrznute hrane i konditorskih proizvoda) (Patist i Zoerb, 2005.; Pinto i sur., 2006.; Leslie i sur., 1995.; Van Dijak i sur., 1995.).

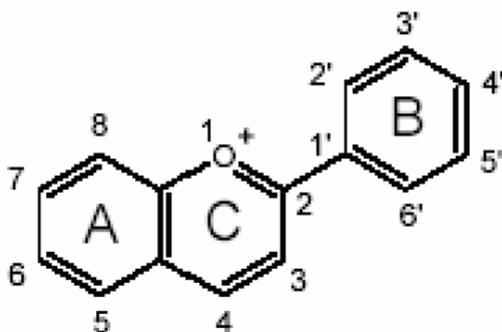


Slika 3 Strukturni prikaz molekule trehaloze (Babić, 2007.)

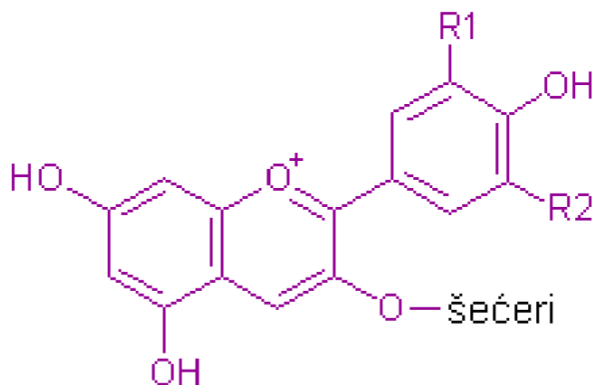
2.3 ANTOCIJANI

2.3.1 Struktura antocijana

Antocijani pripadaju skupini flavonoida. Oni su biljni pigmenti topivi u vodi koji cvijeću, voću i povrću daju plavu, purpurnu i crvenu boju. Antocijani su glikozilirani polihidroksi i polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilium kationa odnosno flavilium kationa (**Slika 4**) (Brouillard, 1982.). Glavni dio antocijana je njegov aglikon, flavilium kation, koji sadrži konjugirane dvostruke veze odgovorne za apsorpciju svjetla pri valnim duljinama oko 500 nm, pri čemu se pigment ljudskom oku čini crvenim. Aglikoni se nazivaju antocijanidini, a obično su penta (3, 5, 7, 3', 4') ili hekza supstituirani (3, 5, 7, 3', 4', 5'). Antocijani posjeduju karakterističnu kemijsku strukturu flavonoida $C_6C_3C_6$. U prirodi antocijani dolaze u obliku glikozida, tj. vezani na molekulu šećera (**Slika 5**) (Katalinić, 2006.). Različite kemijske strukture antocijana pokazuju različitu boju u ovisnosti o pH otopine u kojoj se nalaze. Pri pH 1 prevladava crveno obojenje, izmenu pH 2 i 4 prevladava plava boja, kod pH 5 i 6 bezbojno, a pri pH vrijednostima višim od 7, molekula antocijana se raspada (Costa i sur, 1998). Kiselom hidrolizom antocijani se razgrađuju do šećera i svog aglikonskog oblika.

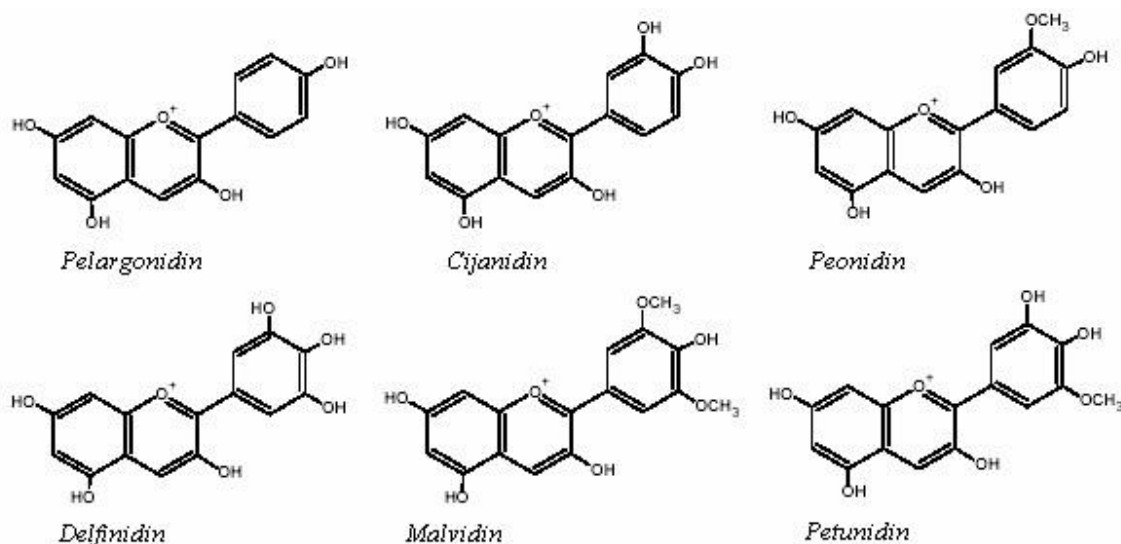


Slika 4 Flavilium kation (Rein, 2005.)



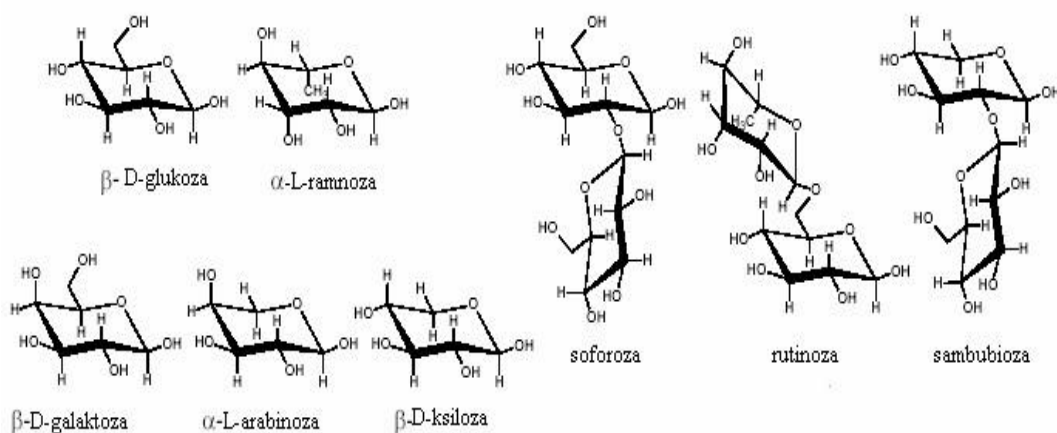
Slika 5 Strukturni prikaz antocijana u obliku mono-glukozida (Katalinić, 2006.)

Danas su poznata 22 različita antocijanidina od kojih je samo 6 značajno za hranu (Francis, 1989.). Najznačajniji antocijanidini su pelargonidin, cijanidin, peonidin, delphinidin, malvidin i petunidin (**Slika 6**). Ovi spojevi se međusobno razlikuju po stupnju hidroksilacije. Što ima više OH skupina to je spoj obojeniji. Najslabije obojen je pelargonidin, prisutan je u jagodi, i nema OH skupna vezanih na B prsten (Katalinić, 2006.).



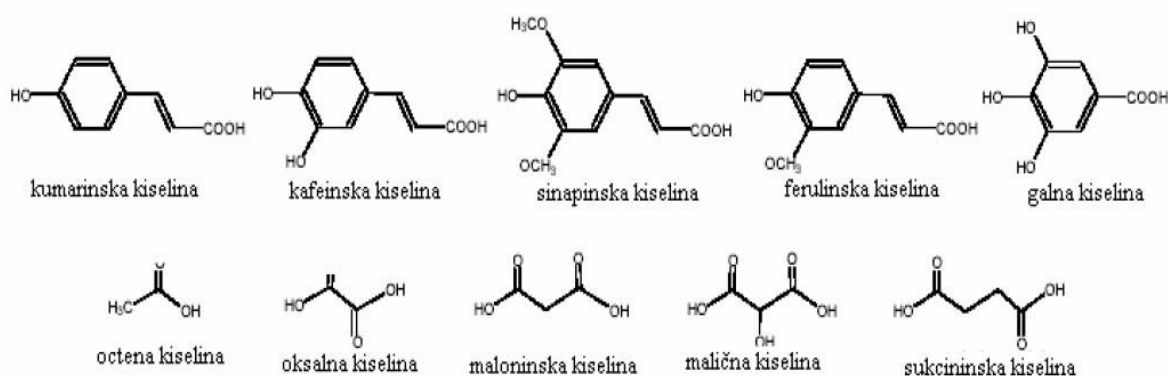
Slika 6 Najznačajniji antocijanidini u prirodi (Rein, 2005.)

Antocijani su stabilniji i topljiviji u vodi od antocijanidina zbog glikolizacije (**Slika 7**) (Rein, 2005.). Najčešće vezani monosaharidi su: glukoza, ramnoza, galaktoza, arabinoza i ksiloza. Od disaharida i trisaharida: rutinoza, soforoza, sambubioza i glukorutinoza (De Ancos i sur., 1999.; Kähkönen i sur., 2003.)



Slika 7 Najčešće glikozilne jedinice antocijana (Rein, 2005.)

Antocijani mogu biti i acilirani. Organske kiseline koje su vezane na antocijanin glikozil jedinicu preko esterskih veza jesu aromatske fenolne kiseline ili alifatske dikarboksilne kiseline ili njihova kombinacija. Najčešće fenolne kiseline su derivati hidroksicinaminske kiseline (kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, kafeinska kiselina i sinapikinska kiselina) i hidroksibenzojeve kiseline (galna kiselina). Najčešće alifatske kiseline su maloninska kiselina, octena kiselina, malična kiselina, sukcininska kiselina i oksalna kiselina (**Slika 8**) (Francis, 1989.; Cabrita i sur. 2000.).



Slika 8 Najčešće acilne jedinice antocijanina (Francis, 1989.)

2.3.2 Stabilnost boje antocijana

Kao što je rečeno ranije, antocijani su vrlo nestabilna skupina pigmenata, naročito u matriksu hrane. Na stabilnost boje utječe niz fizikalnih i kemijskih parametara, kao što su:

- sama struktura antocijana,
- kisik,
- svjetlost,
- temperatura,
- pH,
- enzimi,
- šećeri,
- askorbinska kiselina, te
- kopigmenti.

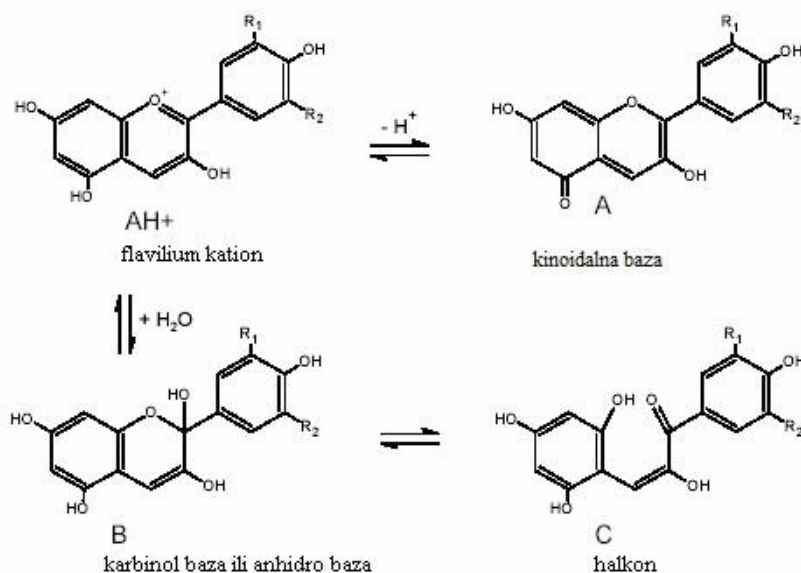
Utjecaj strukture antocijana na stabilnost boje. Glikozilne jedinice i acilne grupe vezane na aglikon, te mjesto vezanja imaju značajan utjecaj na stabilnost i reaktivnost antocijana. Mjesto supstitucije na antocijanidinu, te broj i pozicija hidroksilnih i metoksilnih grupa na aglikonu utječu na kemijsko ponašanje antocijana. Povećana hidroksilacija na aglikonu stabilizira antocijanidin; delfinidin je stabilniji od cijanidina u zakiseljenom metanolu (Dao i sur., 1998.). Ipak, postoje odstupanja od pravila utjecaja hidroksilacije aglikona na stabilnost molekule. Povećanjem metilacije hidroksilnih skupina smanjuje se stabilnost antocijana. Prisutnost hidroksilnih i metoksilnih skupina ne utječe samo na stabilnost antocijana, već i na predodžbu boje. Boja antocijana se mijenja od ružičaste prema plavoj kako se broj hidroksilnih skupina povećava (Mazza i Brouillard, 1987.). Glikozilnom supstitucijom postiže se stabilnija molekula antocijana, ali na stabilnost utječe i sama pozicija glikozilacije te vrsta glikozilne jedinice (Timberlake i Bridle, 1966. a; 1966. b). Bronnum-Hansen i Flink (1985.) otkrili su da su antocijani koji sadrže disaharid sambubiozu, stabilniji od onih koji sadrže monosaharid glukozu. Povećanje broja glukoznih jedinica uzrokuje stvaranje pigmenta žute boje (Giusti i sur., 1999.).

Utjecaj kisika na stabilnost boje antocijana. Kisik pojačava utjecaj drugih degradacijskih procesa antocijana. Štetan utjecaj kisika na antocijane može se manifestirati kroz direktnu oksidaciju i/ili indirektnu oksidaciju gdje oksidirane komponente medija dalje reagiraju s antocijanima, te se stvaraju bezbojni ili smeđi produkti (Jackman i sur., 1987.). Antocijani reagiraju i sa radikalima kisika odnosno peroksi radikalima. U takvim reakcijama antocijani djeluju kao antioksidansi, te se smatra da je to svojstvo antocijana odgovorno za njihov pozitivan utjecaj na kardiovaskularna oboljenja (Matsufuji i sur., 2003.; Rossetto i sur., 2004.; Garcia-Alonso i sur., 2004.).

Utjecaj svjetlosti na stabilnost boje antocijana. Svjetlost utječe na antocijane na dva različita načina. Svjetlost je neophodna za biosintezu antocijana, ali i ubrzava njihovu degradaciju (Markakis, 1982.). Boja antocijana očuva se mnogo bolje ako se proizvodi čuvaju u mraku.

Utjecaj temperature na stabilnost boje antocijana. Brzina degradacije antocijana povećava se povišenjem temperature tijekom procesiranja i skladištenja (Bronnum-Hansen i Flink, 1985.; Giusti i sur., 1999.). Povećanje temperature u pH intervalu 2-4 izaziva gubitak glikozilnih jedinica antocijana hidrolizom glikozidne veze, što dovodi do gubitka boje antocijana s obzirom da su aglikoni manje stabilni od svojih glikozidnih oblika. Stvaranje halkona je prvi korak tijekom termičke degradacije antocijana (Adams, 1973.; Markakis, 1957.). Termička degradacija povećava mogućnost stvaranja smeđih pigmenata, posebno u prisustvu kisika.

Utjecaj pH na stabilnost boje antocijana. Antocijani pokazuju široki spektar boja zbog ionske prirode koja omogućava promjenu strukture antocijana s obzirom na pH, što rezultira različitim bojama i nijansama boja pri različitim pH vrijednostima (Brouillard, 1982.; Von Elbe i Schwartz, 1996.). U vodenim otopinama antocijani postoje u četiri glavna oblika: kinoidalna baza (A), flavilium kation (AH⁺), karbinol ili pseudobaza (B) i halkon (C) (**Slika 9**). U vrlo kiselom mediju crveni flavilium kation je dominantan oblik. Povećanjem pH dolazi do smanjenja intenziteta boje i koncentracije flavilium kationa zbog hidratacije preko nukleofilnih veza, te nastaje bezbojni karbinolni oblik. Karbinolni oblik gubi konjugirane dvostruke veze između A i B prstena i ne absorbira vidljivu svjetlost (Brouillard, 1982.). Također dolazi do brzog gubitka protona s flavilium kationa kako pH dalje raste i nastaje obojeni kinoidalni oblik. Relativna količina svakog oblika varira ovisno o pH i strukturi svakog antocijana (Mazza i Brouillard, 1987.; Jackman i sur., 1987.). Ovisnost boje antocijana o pH prikazana je u **Tablici 1**.



Slika 9 Četiri glavna oblika antocijana u vodenom mediju (Rein, 2005.)

Tablica 1 Ovisnost boje i strukture antocijana o rasponu pH (Mazza i Brouillard, 1987.)

pH	Struktura i boja antocijana
<2	antocijan kation (crven)
2 - 4,5	kation + leukobaza (crven + bezbojna)
4,5	Leukobaza
4,5 - 8	antocijan kao hidrobaza (ljubičast)
8 - 10	antocijan kao anion hidrobaze (plav)
>10	halkon (žut)

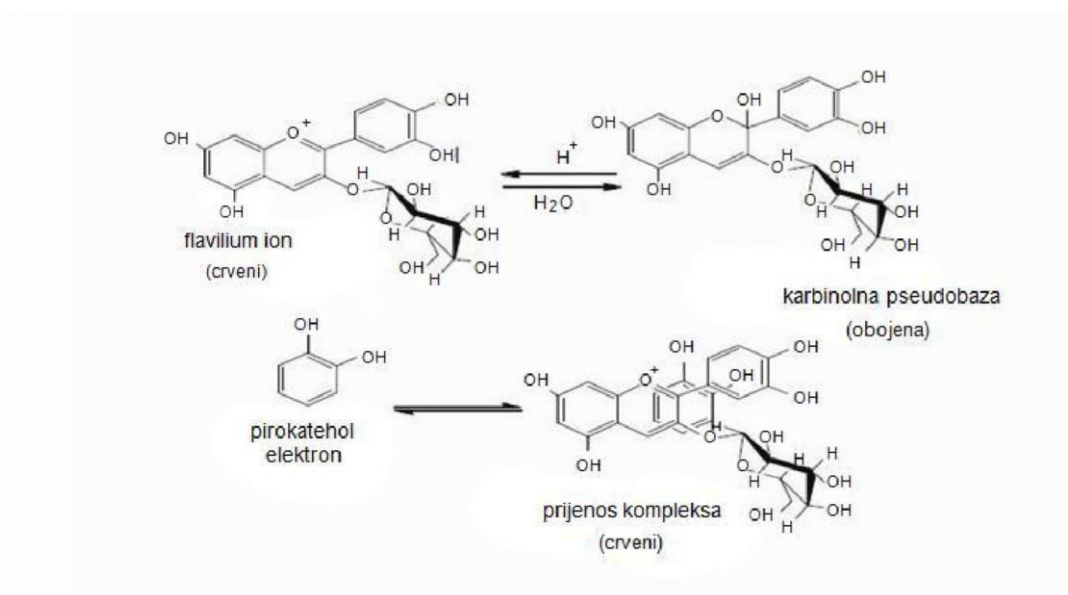
Utjecaj enzima na stabilnost boje antocijana. Najčešći enzimi koji uzrokuju degradaciju antocijana su glikozidaze. One cijepaju kovalentnu vezu između glikozilnih jedinica i aglikona što dovodi do degradacije vrlo nestabilnog antocijanidina. Peroksidaze i fenolaze kao što su fenol oksidaza i polifenol oksidaza koji prirodno postoje u voću, također su česti enzimi (Kader i sur., 1997.; Pifferi i Cultrera, 1974.). Kod enzimske degradacije antocijana, kinoni imaju značajnu ulogu. Enzimi najprije oksidiraju druge fenolne tvari u mediju do odgovarajućih kinona, koji zatim reagiraju s antocijanima i dolazi do njihove degradacije i stvaranja smeđih produkata kondenzacije. Inaktivacijom enzima poboljšat će se stabilnost antocijana (Garcia-Palazon i sur., 2004.).

Utjecaj šećera na stabilnost boje antocijana. Šećer, kao i njegovi produkti degradacije smanjuju stabilnost antocijana. Reakcijom između antocijana i degradacijskih produkata šećera i askorbinske kiseline nastaju smeđi produkti (Krifi i sur., 2000.). Do razgradnje antocijana dolazi zbog porasta intermedijera razgradnje šećera (furfural i hidroksimetilfurfural HMF). Furfural i HMF nisu prirodni sastojci voća, nego nastaju kao produkti enzimskog i neenzimskog posmeđivanja, kao rezultat nepovoljnog djelovanja temperature tijekom procesa prerade i skladištenja. Prema intenzitetu djelovanja na antocijane, šećere možemo poredati: glukuronska kiselina > fruktoza > saharoza > laktoza > maltoza > glukoza > glukonska kiselina (Katalinić, 2006.). Također je ustanovljeno da šećer može i štititi antocijane. Saharoza štiti antocijane tijekom skladištenja zamrzavanjem i sprječava njihovo posmeđivanje i stvaranje polimera vjerojatno zbog inhibicije enzimskih reakcija, ili pak smanjenja aktiviteta vode (Wrolstad i sur., 1990.; De Ancos i sur., 1999.). Disaharidi djeluju zaštitno na antocijane sve dok se ne razgrade na monosaharide (Katalinić, 2006.).

Utjecaj askorbinske kiseline na stabilnost boje antocijana. Askorbinska kiselina ima nekoliko različitih uloga u stabilizaciji boje antocijana. Degradacija antocijana je ubrzana prisustvom askorbinske kiseline jer ubrzava polimerizaciju pigmenata i uzrokuje obezbojenje. Smatra se da je mehanizam degradacije antocijana, direktna kondenzacija između askorbinske kiseline i antocijana (Poei-Langston i Wrolstad, 1981.).

Utjecaj kopigmenata na stabilnost boje antocijana. Kopigmenti su spojevi bogati elektronima i povezivajući se sa flavilium ionima, stabiliziraju ih. Većinom su bezbojni: flavonoidi, alkaloidi, amino kiseline, organske kiseline, polisaharidi, metali i drugi antocijani. Kopigmentacija može biti vrlo korisna odnosno prirodan način za poboljšanje boje prehrambenih proizvoda bogatih antocijanima. Boja antocijana se može stabilizirati i pojačati kopigmentacijskim reakcijama. Iako su antocijani obojeni u prirodi, njihov obojeni oblik se stabilizira drugim prirodnim komponentama tzv. kopigmentima, koji postoje u stanicama cvijeća i voća (Brouillard, 1982.). Kopigmentacija se može odvijati na nekoliko načina. Najznačajniji mehanizmi kopigmentacije

su formiranje intermolekularnih i intramolekularnih kompleksa. Međusobno povezivanje i stvaranje metalnih kompleksa su također mogući mehanizmi za stvaranje kopigmenata (Slika 10).



Slika 10 Interakcija antocijana i kopigmenata sa slobodnim elektronskim parom (Rein, 2005.)

2.4 POLIFENOLI

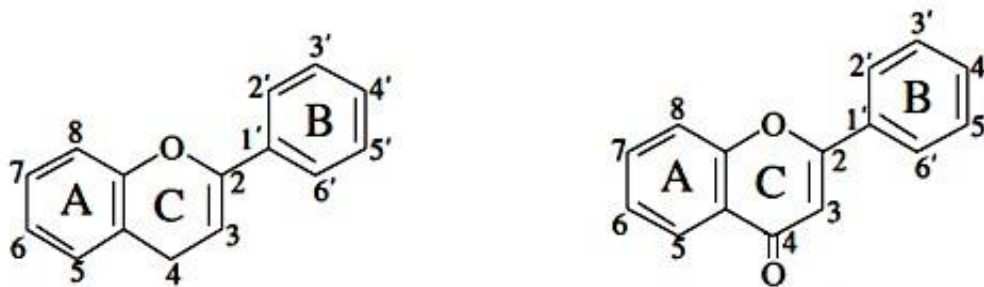
Polifenoli su jedna od najmnogobrojnijih skupina u prirodi koji se nalaze u voću, povrću, cjelovitim žitaricama, začinima i nekim pićima kao što su čaj i vino. Ovi spojevi su najrašireniji antioksidansi u ljudskoj prehrani. Posebno bogato polifenolnim spojevima je bobičasto voće (Seeram i Heber, 2007.). U našem organizmu, polifenoli pokazuju antibakterijski, antialergijski, sedativni, antimutageni učinak te imaju druga pozitivna djelovanja (Kazazić, 2004.). Mnoga istraživanja ukazuju da uz vitamine i minerale, polifenoli iz voća i povrća imaju važnu ulogu u prevenciji različitih ljudskih bolesti. Tako su mnoga istraživanja pokazala antikancerogeno, protuupalno, antihepatoksično, antibakterijsko, antivirusno te antialergijsko djelovanje određenih polifenolnih spojeva, kao i namirnica koje ih sadrže. Antioksidacijsko svojstvo polifenola je uglavnom posljedica njihova redoks svojstva koje im omogućuje djelovanje kao redukcijsko sredstvo, donor vodika, uklanjanje slobodnih radikala, ali i inhibicija enzima koji povećavaju oksidacijski stres (Šubarić i sur., 2010.). Od vrlo jednostavnih spojeva antocijana koji su zaslužni za boju biljaka, do vrlo složenih spojeva tanina koji su važni za zaštitu od insekata, polifenoli danas broje preko 8000 spojeva (Šubarić i sur., 2010). U biljkama ovi spojevi djeluju antimikrobno, kao fotoreceptori, kao agensi za privlačenje pozornosti (Kazazić, 2004.), no zanimanje za tim spojevima raste upravo zbog njihove antioksidativne aktivnosti (Kazazić, 2004.; Gharras, 2009.).

2.4.1 Kemijska struktura polifenola

Polifenoli uključuju više od 8000 spojeva različite kemijske strukture (Šubarić i sur., 2010.; Blasco i sur., 2005.). Razlikuju se prvenstveno s obzirom na broj fenolnih prstenova, i funkcionalnih grupa koje povezuju prstenove.

Prema kemijskoj strukturi mogu se podijeliti na: fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne), flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani, itd.), tanine (kondenzirani i hidrolizirani) te ostale polifenolne spojeve (lignani, kumarini) (Naczki i Shahidi, 2006.).

Najvažnija i najveća skupina polifenola su flavonoidi (više od 5000 do sada poznatih spojeva) koji se pojavljuju u skoro svim dijelovima biljaka. Struktura flavonoida temelji se na flavonoidnoj jezgri koja se sastoji od tri fenolna prstena (A, B i C prsten) (**Slika 11**). Benzenski prsten A kondenziran je sa tročlanim alifatskim nizom koji zajedno sa kisikom tvori šesteročlani prsten C, a na poziciji 2 prstena C nalazi se benzenski prsten B. Za flavonoide koji imaju vezanu karbonilnu skupinu na C-4 atomu prstena C često se koristi izraz 4-okso-flavonoidi.



Slika 11 Osnovna struktura flavonoida.

Lijevo-Flavan jezgra; desno-okso-flavonoid jezgra (Rein, 2005.)

Flavonoidi su podijeljeni u nekoliko podgrupa: flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavanonoli, flavani, flavanoli, halkoni, dihidrohalkoni, flavan-3,4-dioli te antocijani. Ovu raznovrsnost uglavnom kontroliraju geni biljke, ali i drugi čimbenici kao što su zrelost biljke, klima i način uzgoja. U prirodi se flavonoidi nalaze uglavnom u obliku glikozida, tj. povezani su sa različitim molekulama šećera. Supstitucijske skupine koje se nalaze na osnovnoj jezgri, osim šećera, su hidroksilna skupina te metoksi skupina što pridonosi velikoj raznolikosti i velikom broju tih spojeva (Jakobek, 2007.). Uglavnom se sintetiziraju iz cinamične kiseline koja nastaje iz fenilalanina djelovanjem L-fenilalanin amonijak liaze (Michalak, 2006.).

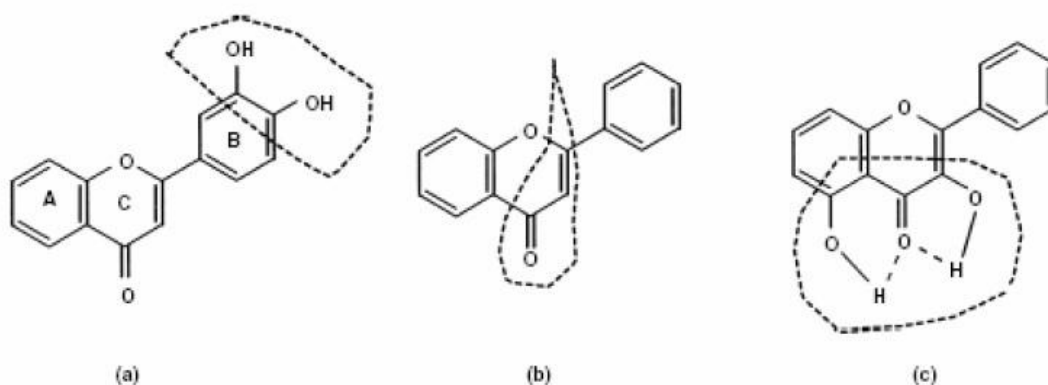
2.4.2 Antioksidativna aktivnost polifenolnih spojeva

Antioksidansi u hrani mogu se definirati kao bilo koje tvari koje su sposobne odgoditi, zaustaviti ili spriječiti razvoj užeglosti ili drugog neugodnog okusa radi oksidacije. Antioksidansi usporavaju razvoj nepoželjne arome na način da odgađaju indukcijski period, što znači da je dodatak antioksidansa nakon tog perioda neučinkovit. Oni mogu inhibirati ili odgoditi oksidaciju na dva načina. Prvi način uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala, a takve komponente se nazivaju primarnim antioksidansima. Drugi obuhvaća mehanizme koji ne uključuju direktno uklanjanje slobodnih radikala, u tom slučaju komponente se nazivaju sekundarnim antioksidansima. Sekundarni antioksidansi imaju sljedeće mehanizme djelovanja: vezanje metalnih iona, vezanje kisika, pretvaranje hidroperoksida u ne-radikalske vrste, apsorpcija UV radijacije i deaktivacija singleton kisika (Pokorny, 2001.).

Polifenolni spojevi kao antioksidansi djeluju na više različitih načina. Smatra se da mogu neutralizirati slobodne radikale doniranjem elektrona ili vodika čime oni sami postaju radikali, ali stabilni, manje reaktivni (Tsao, 2010.). Ovi radikali se stabiliziraju delokalizacijom

elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom. Kao hvatači slobodnih radikala, polifenoli prekidaju lančanu reakciju slobodnih radikala. Upravo je to najvažniji način djelovanja polifenola kao antioksidansa. Sljedeći mogući način antioksidacijskog djelovanja je interakcija flavonoida s drugim fiziološkim antioksidansima, npr. vitaminom C ili vitaminom E. Iz sinergijskog efekta međudjelovanjem tih antioksidansa povećava se antiproliferativni učinak, npr. kod interakcije kvercetina s askorbinskom kiselinom (Kazazić, 2004.). Fenolni spojevi imaju antioksidativnu aktivnost zbog njihove sposobnosti vezanja slobodnih radikala, tako što doniraju vodikov atom ili elektron, ili kelat metalnog kationa (Afanas'ev i sur., 1989). Na antioksidativnu aktivnost utječe više različitih čimbenika kao što su sastav lipida, koncentracija antioksidansa, temperatura, prisutstvo drugih antioksidansa i drugi sastojci hrane kao što su proteini i voda (Pokorny, 2001.).

Antioksidativna aktivnost flavonoida ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi. Općenito postoje tri strukture flavonoida sa sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala i/ili s antioksidativnim potencijalom (**Slika 12**): (a) katehol jedinice na B prstenu, (b) 2,3 dvostruka veza i 4-okso funkcija na C prstenu, (c) prisustvo hidroksilnih grupa na 3 i 5 poziciji.



Slika 12 Veza između antioksidativne aktivnosti i strukture flavonoida (Kopjar, 2007.)

Hidroksilne skupine. Prostorni raspored supstituenata je najznačajniji čimbenik koji utječe na jačinu antioksidativne aktivnosti flavonoida. Osim toga, i konfiguracija i broj hidroksilnih grupa utječu na mehanizam antioksidativne aktivnosti (Cao i sur., 1997; Haenen i sur., 1997.; Sekher Pannala i sur., 2001; Burda i Oleszek, 2001.). Hidroksilne skupine prstena B pokazuju najveću sposobnost hvatanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta. Hidroksilne skupine prstena B doniraju vodik i elektron hidroksilnim i peroksidnim radikalima i tako stabiliziraju slobodne radikale, a nastaje relativno stabilan flavonoidni radikal (Kazazić,

2004.). Između strukturnih homologa flavona i flavonona, hvatanje peroksil i hidroksil radikala, povećava se sa ukupnim brojem OH grupa (Cao i sur., 1997.). 3'4'-katehol struktura B prstena pojačava inhibiciju oksidacije lipida. Takva struktura je najznačajnija odlika potencijalnih hvatača peroksil, superoksid i peroksinitril radikala. Na primjer, iako i luteolin i kampferol imaju jednaku hidroksilnu konfiguraciju, luteolin ima jaču sposobnost hvatanja peroksil radikala od kamferola zbog toga što kampferol nema B prsten katehola. Hvatanje peroksinitril radikala pomoću katehina također se pripisuje B prstenu katehola (Kerry i Rice-Evans, 1999.). Oksidacija flavonoida se odvija na B prstenu katehola te nastaje stabilan o-semikinon radikal. Flavoni kojima nedostaje kateholna ili o-trihidroksil struktura tvore vrlo nestabilne radikale i slabi su hvatači radikala. Važnost drugih hidroksilnih grupa je manje jasna, ali osim što povećava ukupni broj OH grupa, A prsten vrlo malo doprinosi antioksidativnoj aktivnosti. Heterociklički dio flavonoida doprinosi antioksidativnoj aktivnosti tako što osigurava prisutnost slobodnih OH grupa i omogućava konjugaciju između aromatskih prstenova. S obzirom da su halkoni aktivni antioksidansi, zatvoreni C prsten nije neophodan za aktivnost flavonoida (Matthiesen i sur., 1997.). Hvatanje slobodnih radikala pomoću flavonoida jako ovisi i o slobodnoj 3-OH grupi (Burda i Oleszek, 2001.), tako da je utvrđeno da flavonoidi koji imaju slobodnu 3-OH grupu i 3',4'-katehol strukturu posjeduju 10 puta jaču sposobnost hvatanja slobodnih radikala.

2-3 dvostruka veza i 4-keto skupina. Istraživanja dokazuju da su flavonoidi kojima nedostaju ova dva obilježja slabiji antioksidansi. Konjugacija A i B prstena omogućava rezonanciju aromatske jezgre što vodi ka nastajanju stabilnijeg radikala flavonoida (Bors i sur., 1990) i time optimizira efekat 3',4'-katehol strukture (Heim i sur., 2002).

O-metilacija. Velik utjecaj na antioksidativnu aktivnost flavonoida ima i O-metiliranje gdje postoji razlika u antioksidativnoj aktivnosti između polihidroksiliranih i polimetoksiliranih flavonoida zbog razlike u hidrofobnosti i molekularnoj planarnosti. O-metiliranje narušava planarnost, stoga je antioksidativna aktivnost manja u odnosu na polihidroksilirane flavonoide (Kazazić, 2004.). Kvercetin je potencijalni hvatač peroksilradikala, a za njim slijede i O-glikozilirani derivati (Dugas i sur., 2000.). Antioksidativna aktivnost 3',4'-katehol strukture je znatno kompromitirana ako dođe do 4'-O-metilacije zbog steričkih promjena molekule (Heim i sur., 2002.).

Glikozidacija. Flavonoidi se pojavljuju u hrani obično kao o-glikozidi sa šećerom vezanim najčešće u C3 položaju (Cao i sur., 1997.). Struktura šećera te položaj u kojem se nalazi pojedina skupina utječe na antioksidativnu aktivnost. S povećanjem broja glikozidnih skupina smanjuje se antioksidativna aktivnost flavonskih glikozida. Aglikoni su potencijalno jači antioksidansi od odgovarajućih glikozida (Ratty i Das, 1988; Gao i sur., 1999). Dokazano je

da se antioksidativna aktivnost glikozida flavonola iz čaja smanjuje kako se broj glikozidnih jedinica povećava (Plumb i sur., 1999). Osim prisutnosti i broja, pozicija vezivanja i struktura šećera je vrlo bitna. Uobičajeno je da su glikozidne jedinice vezane na 3- ili 7- poziciji, ali vezivanje šećera na A prsten rezultira većim smanjenjem aktivnosti nego 3- glikozilacija. Glikozilacija, kao i O-metilacija, narušava planarnost B prstena u odnosu na ostatak molekule flavonoida i smanjuje sposobnost delokalizacije elektrona (Van Acker i sur., 1996; Bors i sur., 1990). Iako su glikozidi slabiji antioksidansi nego aglikoni (Burda i Oleszek, 2001; Williamson i sur., 1999), biodostupnost se ponekad pojačava prisustvom glukoze (Hollman i sur., 1999). Tip šećera znatno utječe na antioksidativnu aktivnost, tako da je vrlo bitno da li je na flavonoidnu okosnicu vezana glukoza, ramnoza ili rutinoza. Na primjer, u usporedbi s rutinozom, ramnoza vezana na kvercetin značajno smanjuje sposobnost hvatanja radikala (Limasset i sur., 1993). Osim što šećer okupira slobodnu OH grupu neophodnu za hvatanje radikala, šećer smanjuje planarnost B prstena i/ili mijenja hidrofilnost molekule što rezultira promjenom dostupnosti za radikale lipida.

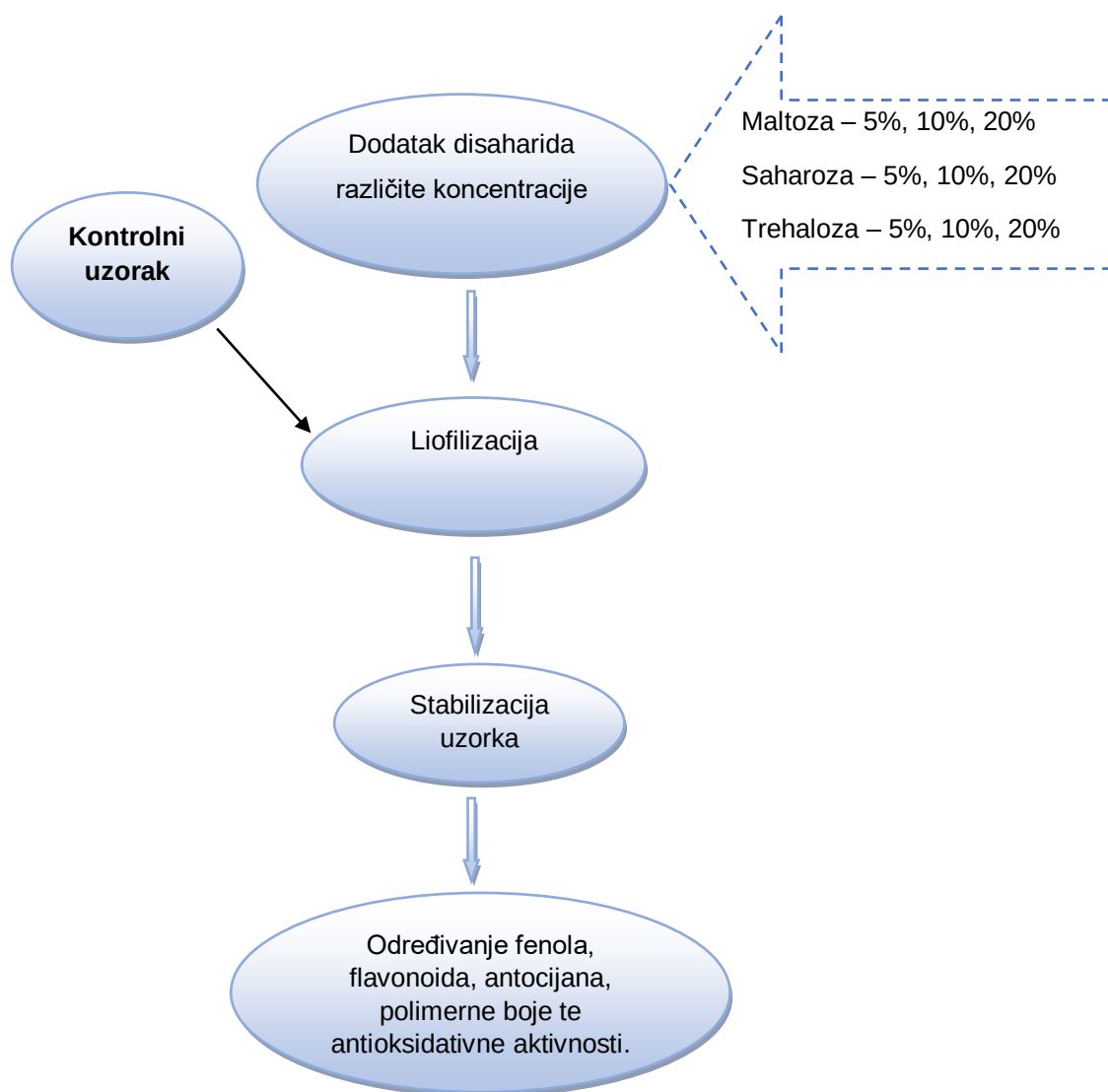
Stupanj polimerizacije. Na antioksidativnu aktivnost također utječe i stupanj polimerizacije. Procijanidni dimeri i trimeri učinkovitiji su od monomera kada su u pitanju superoksid anioni (Vennat i sur., 1994.). Tetrameri su učinkovitiji antioksidansi nego trimeri kada su u pitanju peroksinitril (Arteel i Sies, 1999.) i superoksid radikali. Heksameri i heptameri pokazuju veću antioksidativnu aktivnost od trimera i tetramera (Vennat i sur., 1994.). Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina ovisi o broju i položaju hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilnu funkcionalnu grupu (Rice-Evans i sur., 1996.; Robards i sur., 1999.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je ispitati:

- udio antocijana i polimernu boju u liofiliziranim kašama višnje bez i sa dodatkom različitih koncentracija disaharida (maltoza, trehaloza i saharoza),
- udio fenola i flavonoida u liofiliziranim kašama višnje bez i sa dodatkom različitih koncentracija disaharida (maltoza, trehaloza i saharoza), te
- antioksidativnu aktivnost (mg GAE/100 g) liofilizirane kaše višnje bez i sa dodatkom različitih koncentracija disaharida (maltoza, trehaloza i saharoza), pomoću DPPH, ABTS te FRAP metode (**Slika 13**).



Slika 13 Shematski prikaz rada

3.2 MATERIJALI

Višnja je nabavljena na lokalnoj tržnici u Osijeku i čuvana na -20 °C do pripreme uzorka. Kalij klorid, natrij acetat, klorovodična kiselina, metanol, natrij karbonat, natrij bisulfit, 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) nabavljen je od proizvođača Sigma, Njemačka.

Priprema kaše od višnje – liofilizacija

Nakon otkoštčavanja, višnje su dezintegrirane štapnim mikserom (Braun Multiquick Professional 600 Watt Turbo, Germany). U dobivenu kašu od višanja dodani su šećeri maltoza, saharoza ili trehaloza (5, 10 ili 20%), te su tako pripremljeni uzorci stavljeni u plitke posude i zamrznuti u zamrzivaču (Gorenje FH331W, Slovenija) pri -18 °C. Zamrznuta kaša liofilizirana je u liofilizatoru GAMMA 2-20 (Martin Christ, Njemačka). Proces liofilizacije trajao je oko 48 h, a provodio se je do postizanja suhe tvari uzoraka 95 do 97%.

Uvjeti liofilizacije:

Operacija	Temperatura (°C)	Vrijeme (h)	Vakuum (mbar)
Zamrzavanje	-55	5	atm
Sublimacija	-35	20	0,220
	-15	20	0,220
	0	2	0,065
Izotermna desorpcija	0	2	0,065
	10	2	0,065
	20	2	0,065

3.3 METODE

3.3.1 Određivanje antioksidativne aktivnosti

Glavni mehanizam djelovanja antioksidansa u hrani jest uklanjanje slobodnih radikala. Nekoliko metoda je razvijeno za određivanje antioksidativne aktivnosti na osnovi uklanjanja sintetskih radikala u polarnom organskom otapalu (npr. metanolu) pri sobnoj temperaturi. One koje su najčešće, koriste 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azinobis(3-etilbenztiazolin-sulfonska kiselina) (ABTS) i 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin (TPTZ) radikale. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.

ABTS metoda. U ovoj metodi prati se raspadanje $\text{ABTS}^{\cdot+}$ koji nastaje oksidacijom 2,2'-azinobis(3- etilbenzotizilin-6-sulfonat) (ABTS) djelovanjem fenolnih tvari. U odsustvu fenolnih tvari, $\text{ABTS}^{\cdot+}$ je relativno stabilan, ali brzo reagira u prisustvu donora H^+ te prelazi u neobojeni oblik ABTS-a (Arnao i sur., 2001.).

Postupak: otpipetirano je 0,2 mL uzorka te se doda 3,2 mL otopine ABTS, dobro promiješa i smjesa se ostavi reagirati 1 h i 35 min u mraku. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 734 nm. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz galnu kiselinu kao standard.

FRAP metoda. Metoda se temelji na redukciji Fe^{3+} iona u Fe^{2+} ion u prisutnosti antioksidansa. Nastali Fe^{2+} ion u prisutnosti TPZT reagensa formira intenzivno obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorpcije pri 593 nm.

Postupak: otpipetirano je 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. Za slijepu probu umjesto uzorka dodana je voda. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz galnu kiselinu kao standard.

DPPH metoda. DPPH metoda je jedna od najrazvijenijih metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti na osnovi sintetskih radikala. Kod DPPH testa, uklanjanje DPPH radikala je praćeno smanjenjem apsorbancije pri 517 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa ili reakcije s radikalima (Brand-Williams i sur., 1995.).

Postupak: otpipetirano je 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. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz galnu kiselinu kao standard.

3.3.2 Određivanje udjela antocijana

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda. pH-diferencijalna metoda se zasniva na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjeni pH. Antocijani podliježu reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja se manifestira promjenom spektra apsorbancije. pH-diferencijalna metoda za određivanje antocijana omogućava brzo i točno mjerenje ukupnih antocijana, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenata i drugih tvari koje bi mogle smetati. Antocijani su određivani metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001.).

Postupak: Otpipetirano je 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 510 nm i 700 nm. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.

Sadržaj antocijana je izračunat prema slijedećoj formuli:

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

U ovoj formuli :

A - apsorbancija uzorka računatu prema $A = (A_{517} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{517} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$

M - 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).

3.3.3 Određivanje polimerne boje

Postotak polimerne boje određivan je prema metodi po Giustiu i Wrolstadu (2001.). Degradacija antocijana može se pratiti očitanjem apsorbance u uzorcima koji su tretirani bisulfitom. Antocijani s bisulfitom tvore bezbojan kompleks (**Slika 14**). Boja koja nastaje polimerizacijom antocijana odnosno nastajanjem kompleksa antocijani/tanini, je otporna na djelovanje bisulfita. Apsorbancija uzorka tretiranog bisulfitom, na 420 nm predstavlja stupanj posmeđivanja. Gustoća boje se definira kao suma apsorbanci na 420 nm i $\lambda_{\text{vis-max}}$. Omjer između polimerne boje i gustoće boje se koristi kao postotak boje koja je nastala polimerizacijom sastojaka.

Postupak: Otpipetirano je 2,8 mL uzorka u dvije kivete, u jednu je dodano 0,2 mL vode, a u drugu 0,2 mL otopine bisulfita. Nakon stajanja od 15 min uzorcima je pomoću spektrofotometra mjerena apsorbancija pri valnim duljinama $\lambda_{\text{vis-max}}$, 420 nm i 700 nm.

Gustoća boje kontrolnog uzorka izračunata je prema formuli:

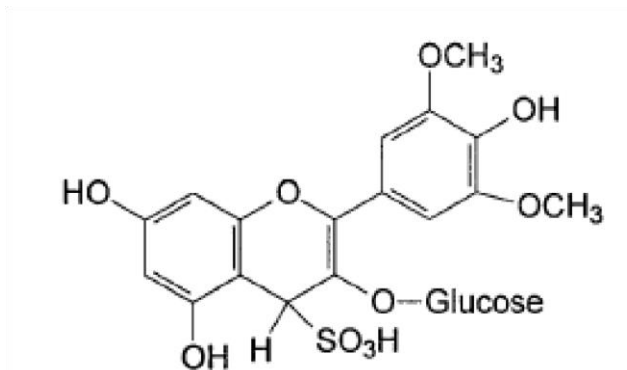
$$\text{Gustoća boje} = [(A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{517 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})] \times FR$$

Izračun polimerne boje uzorka tretiranog bisulfitom:

$$\text{Polimerna boja} = [(A_{420\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}}) + (A_{517\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}})] \times \text{FR}$$

Postotak polimerne boje izračunat je pomoću formule:

$$\text{Postotak polimerne boje} = (\text{polimerna boja/gustoća boje}) \times 100$$



Slika 14 Kompleks između antocijana i bisulfita (Giusti i Wrolstadu, 2001.)

3.3.4 Određivanje udjela fenola i flavonoida

Određivanje ukupnih polifenola

Koncentracija ukupnih fenola je određena 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 2-20 sati na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija se određuje na spektrofotometru pri 765 nm. Slijepa proba pripravi se sa destiliranom vodom (2 mL). Mjerenja su provedena u tri paralele.

Određivanje flavonoida

Koncentracija flavonoida određena je primjenom AlCl_3 kao reagensa spektrofotometrijskom metodom.

Postupak: Otopina se priprema miješanjem određenog volumena uzorka (0,5 mL), 4 mL deionizirane vode i 0,3 mL 5% NaNO_2 . Nakon 5 min doda se 1,5 mL 2% AlCl_3 , nakon 5 min još 2 mL 1 mol/L NaOH i deionizirane vode do 10 mL. Apsorbanca se mjeri na $\lambda=510\text{ nm}$, u odnosu na deioniziranu vodu kao slijepu probu. Mjerenja su provedena u tri paralele.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U radu je ispitivan utjecaj dodatka različitih koncentracija i vrsta šećera na sadržaj antocijana, postotak polimerne boje, udio polifenola te flavonoida u liofiliziranim kašama višnje. Također ispitivana je antioksidativna aktivnost dodatkom različitih koncentracija šećera, različitim metodama. Od šećera ispitivan je utjecaj dodatka maltoze, saharoze i trehaloze, a šećeri su dodavani u sadržaju od 5%, 10% i 20%. Rezultati istraživanja uzoraka sa šećerom uspoređivani su sa kontrolnim uzorkom liofilizirane kaše višnje, odnosno uzorkom bez šećera.

4.1 Antioksidativna aktivnost

U **Tablici 2** prikazani su rezultati antioksidativne aktivnosti liofiliziranih kaša višnje bez i sa dodatkom različitih udjela šećera. Određivalo se pomoću ABTS metode, FRAP metode te DPPH metode. Vrijednosti su izražene u mg GAE/100 g.

Tablica 2 Antioksidativna aktivnost (GAE/100 g) liofiliziranih kaša višnje bez i sa dodatkom različitih koncentracija disaharida

UZORCI	DPPH	ABTS	FRAP
Kontrolni uzorak	44,68 ± 1,48	23,29 ± 0,11	53,28 ± 0,60
Kaša + Saharoza 5%	49,25 ± 1,81	18,07 ± 0,39	44,83 ± 0,93
Kaša + Saharoza 10%	53,94 ± 1,78	14,96 ± 0,04	42,44 ± 0,73
Kaša + Saharoza 20%	60,33 ± 0,94	11,00 ± 0,28	39,35 ± 0,64
Kaša + Maltoza 5%	55,78 ± 1,35	23,61 ± 0,16	45,70 ± 1,57
Kaša + Maltoza 10%	58,19 ± 1,47	22,54 ± 0,08	45,90 ± 0,87
Kaša + Maltoza 20%	65,46 ± 1,34	28,45 ± 0,24	62,24 ± 1,23
Kaša + Trehaloza 5%	58,69 ± 2,57	21,68 ± 0,24	52,46 ± 0,13
Kaša + Trehaloza 10%	61,32 ± 1,26	22,38 ± 0,12	50,45 ± 0,16
Kaša + Trehaloza 20%	59,26 ± 1,70	18,27 ± 0,02	37,87 ± 0,90

Iz navedenih rezultata vidljivo je da je kod DPPH metode najniža antioksidativna aktivnost u kontrolnom uzorku u odnosu na ostale (44,68 GAE/100 g). Dodatkom većih udjela disaharida antioksidativna aktivnost se povećala nakon dodatka saharoze i maltoze (20%), dok se dodatkom istog udjela trehaloze antioksidativna aktivnost smanjila. Najmanja antioksidativna aktivnost utvrđena je dodatkom 5% saharoze (49,25 GAE/100 g), dok je najveća vrijednost izmjerena dodatkom 20% maltoze (65,46 GAE/100 g).

ABTS metodom dobivene su najniže vrijednosti antioksidativne aktivnosti u odnosu na ostale metode. Ovom metodom najveću antioksidativnu aktivnost ima kontrolni uzorak (23,29 GAE/100 g). Dodatkom većih udjela disaharida antioksidativna aktivnost pada, ali izuzetak je maltoza čijim se dodatkom od 20% antioksidativna aktivnost znatno povećava. Najniža

vrijednost antioksidativne aktivnosti izmjerena je dodatkom 20% saharoze (11,00 GAE/100 g), dok je najviša vrijednost izmjerena dodatkom 20% maltoze (28,45 GAE/100 g).

Rezultatima koji su dobiveni FRAP metodom kontrolni uzorak (53,28 GAE/100 g) nije imao najnižu ili najvišu vrijednost kao u prethodnih metodama. Ovdje je najviša vrijednost antioksidativne aktivnosti izmjerena dodatkom 20% maltoze (62,24 GAE/100g). Najnižu vrijednost pokazuje dodatak 20% trehaloze (37,87 GAE/100g).

4.2 Udio antocijana i polimerna boja u liofiliziranim kašama višnje

U **tablici 3** prikazani su rezultati udjela antocijana i polimerne boje u liofiliziranim kašama višnje s obzirom na dodatak različitih udjela disaharida.

Rezultati pokazuju kako je najviša vrijednost antocijana u kontrolnom uzorku (408,70 mg/L). Poveća li se udio dodanih disaharida proporcionalno se povećava i udio antocijana. U uzorcima s dodatkom disaharida najniža vrijednost antocijana izmjerena je u kaši u koju je dodano 20% saharoze (189,42 mg/L), dok je najviša vrijednost izmjerena u kaši s 20% maltoze (361,63 mg/L).

Rezultati polimerne boje pokazuju da najviše vrijednosti polimerne boje ima kaša u koju smo dodali 5% maltoze (29,02%), dok su najniže vrijednosti izmjerene u kaši u koju smo dodali 5% trehaloze (20,29%).

Tablica 3 Udio antocijana i polimerna boja u liofiliziranim kašama višnje

UZORCI	UDIO ANTOCIJANA (mg/L)	POLIMERNA BOJA (%)
Kontrolni uzorak	408,70 ± 4,93	22,23 ± 0,68
Kaša + Saharoza 5%	270,69 ± 3,37	23,14 ± 0,27
Kaša + Saharoza 10%	241,85 ± 4,07	24,80 ± 0,13
Kaša + Saharoza 20%	189,42 ± 5,11	24,61 ± 0,17
Kaša + Maltoza 5%	270,69 ± 4,32	29,02 ± 0,76
Kaša + Maltoza 10%	291,85 ± 3,58	23,57 ± 0,16
Kaša + Maltoza 20%	361,63 ± 5,96	21,58 ± 0,67
Kaša + Trehaloza 5%	302,60 ± 4,07	20,29 ± 0,03
Kaša + Trehaloza 10%	294,92 ± 3,37	23,07 ± 0,28
Kaša + Trehaloza 20%	205,50 ± 4,95	21,09 ± 0,15

4.3 Udio fenola i flavonoida u liofiliziranim kašama višnje

U **tablici 4** prikazane su vrijednosti rezultata dobivenih mjerenjem udjela fenola i flavonoida u liofiliziranim kašama višnje. Iz navedenih rezultata vidimo da je najmanji udio fenola imala kaša u koju smo dodali 20% trehalozu (1,90 g/L), dok je najviša vrijednost fenola u kontrolnom uzorku (2,99 g/L).

Udio flavonoida kreće se u rasponu od 0,36 do 0,66 g/L. Najniža vrijednost izmjerena je u kaši u koju smo dodali 20% trehaloze dok je najviša vrijednost izmjerena u kontrolnom uzorku.

Tablica 4 Udio fenola i flavonoida u liofiliziranim kašama višnje

UZORCI	FENOLI (g/L)	FLAVONOIDI (g/L)
Kontrolni uzorak	2,99 ± 0,55	0,66 ± 0,03
Kaša + Saharoza 5%	2,32 ± 0,03	0,51 ± 0,03
Kaša + Saharoza 10%	2,07 ± 0,03	0,42 ± 0,02
Kaša + Saharoza 20%	2,09 ± 0,09	0,37 ± 0,04
Kaša + Maltoza 5%	2,53 ± 0,05	0,65 ± 0,02
Kaša + Maltoza 10%	2,50 ± 0,08	0,54 ± 0,02
Kaša + Maltoza 20%	2,68 ± 0,03	0,52 ± 0,01
Kaša + Trehaloza 5%	2,72 ± 0,05	0,53 ± 0,01
Kaša + Trehaloza 10%	2,56 ± 0,06	0,55 ± 0,02
Kaša + Trehaloza 20%	1,90 ± 0,06	0,36 ± 0,01

5. ZAKLJUČAK

U radu je ispitivan utjecaj dodatka različitih udjela disaharida u liofilizirane kaše višnje, na udio antocijana, polimernu boju, udio fenola, udio flavonoida te antioksidativnu aktivnost.

Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da je udio antocijana najviši u kontrolnom uzorku u koji nije dodan ni jedan od disaharida. Najniže vrijednosti antocijana određene su nakon dodatka najvećeg udjela disaharida, izuzev maltoze nakon čijeg se dodatka udio antocijana povećao. U rezultatima je isto tako vidljivo da se vrijednosti polimerne boje u uzorcima u koje su dodani disaharidi ne razlikuju mnogo od izmjerenih vrijednosti u kontrolnom uzorku, osim nakon dodatka 5% maltoze gdje se može uočiti blagi porast polimerne boje u odnosu na ostale uzorke.

Antioksidativna aktivnost izmjerena je pomoću tri metode (ABTS, FRAP te DPPH). Najniže vrijednosti rezultata dobivene su pomoću ABTS metode dok se kod ostalih metoda vrijednosti ne razlikuju mnogo. Zabilježene su najviše vrijednosti antioksidativne aktivnosti kod svih metoda, u uzorku u koji smo dodali 20% maltoze.

Udio fenola u uzorcima u koje su se dodali disaharidi, ne razlikuje se mnogo u odnosu na kontrolni uzorak osim u uzorku u koji se dodalo 20% trehaloze, čija je vrijednost nešto niža. Udio flavonoida se smanjuje povišenjem udjela disaharida s obzirom na kontrolni uzorak.

6. LITERATURA

- Arnao MB, Cano A, Acosta M: The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73:239-244, 2001.
- Arteel GE, Sies H: Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Letters*, 462:167–170, 1999.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28:25–30, 1995.
- Cao G, Sofic E, Prior RL: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22:749–760, 1997.
- Colacço C.A.L.S., Roser B: Trehalose-a multifunctional additive for food preservation. U *Food Packaging and Preservation*, Blackie Professional, London, 1995.
- Gharras, HE: Polyphenols: food sources, properties and applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 44:2512–2518, 2009.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13:572-84, 2002.
- Jakobek, L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća, *Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek*, 2007.
- Katalinić V: Temeljno znanje o prehrani. *Kemijsko-tehnološki fakultet Split*, 2011.
- Kaur C, Kapoor HC: Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium's health. *Interernational Journal of Food Science and Technology*, 2001.
- Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiva Higijene Rada i Toksikologije* 55:279-290, 2004.
- Kopjar, M: Utjecaj dodataka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda, *Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek*, 2007.
- Kopjar M, Jakšić K, Piližota V: Influence of sugars and chlorogenic acid addition on anthocyanin content, antioxidant activity and color of blackberry juice during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, rad prihvaćen za objavljivanje, 2011.
- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM: Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 3592-3597, 1995.

Markakis P, Livingston GE, Fellers CR: Quantitative aspects of strawberry-pigment degradation. *Food Research*, 22:117-130, 1957. cit. U Rein MJ: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Doktorska dizertacija. Sveučilište Helsinki, Helsinki, 2005.

Matthiesen L, Malterud KE, Sund RB: Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. *Free Radical Biology and Medicine*, 2:307–311, 1997.

Matsufuji H, Otsuki T, Takeda T, Chino M, Takeda M: Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:3157-3161, 2003.

Michalak, A. (2006.): Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress, *Polish Journal of Environ. Stud.* Vol. 15, 4, 523530

Mazza G, Brouillard R: Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, 25:207-225, 1987.

Mazza G, Fukumoto L, Delaquis P, Girard B, Ewert B: Anthocyanins, phenolics and color of cabernet franc, merlot and pinot noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41:4009-4017, 1999.

Ough CS, Amerine MA: Phenolic compounds. U *Methods for analysis of must and wines*, John Wiley and Sons, Inc., New York. 196-221, 1998.

Pine, SP: Organic chemistry, McGraw-Hill Book Company, Školska knjiga Zagreb, 1994.

Pokorny J: Antioxidants in food. Woodhead Publishing Ltd, 2001.

Rein MJ: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Disertacija. Sveučilište Helsinki, Helsinki, 2005.

Seeram, N. P., Nair, M. G. (2002.): Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins and catechins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5338-5312.

Shahidi F, Zhong, Y: Measurement of Antioxidant Activity in Food and Biological Systems. U *Antioxidant Measurement and Applications* (Shahidi, F., Ho, C.H., ured.), American Chemical Society, Washington, 2007.

Šubarić D, Kopjar M, Ačkar Đ: Polifenoli i zdravlje. U Zbornik radova i sažetaka sa međunarodnog seminara „Dodaci prehrani u zdravlju i bolesti“. Tuzla, 32-39, 2010.

Tsao, R: Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients* 2(12): 1231-1246, 2010.

Vennat B, Bos MA, Pourrat A, Bastide P: Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17:1613–1615, 1994.

Web 1 <http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/visnja>

Web 2 <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/voce-u-bosni-i-hercegovini>

Wrolstad RE: Anthocyanin Pigments-Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science*, 69, 419-425, 2004.

Wrolstad RE, Skrede G, Lea P, Ernesen G: Influence of sugar and anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. *Journal of Food Science*, 55, 1064-1065, 1990.

Yanishlieva-Maslarova NV, Heinonen IM: Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. U *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing Ltd, 2001.