Utjecaj dodatka glukoze i saharoze na udio fenola i antocijana u soku višnje

Barbarić, Bernardica

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:109:357066

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

Nastavni predmet

Kemija hrane

UTJECAJ DODATKA GLUKOZE I SAHAROZE NA UDIO FENOLA I ANTOCIJANA U SOKU VIŠNJE

Završni rad

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

Studentica: Bernardica Barbarić MB:3423/11

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

Predano:

Pregledano:

Ocjena: Potpis mentora:

_____

Utjecaj dodatka glukoze i saharoze na udio fenola i antocijana u soku višnje

Sažetak

Cilj ovog rada je bio odrediti utjecaj dodatka glukoze i saharoze u sok od višnje na udio fenola, flavonoida, antocijana, polimernu boju i antioksidativnu aktivnost. Mjerenja su provedena nakon pripreme uzoraka i skladištenja od 7 mjeseci na sobnoj temperaturi. Rezultati uzoraka s dodanim šećerima uspoređeni su s kontrolnim uzorkom, a to je sok od višnje bez dodatka šećera. Udio fenola i flavonoida u uzorcima s dodanim šećerima nakon pripreme, je bio veći u odnosu na kontrolni uzorak, a udio antocijana je bio isti. Tijekom skladištenja je došlo do degradacije fenolnih tvari. U uzorcima s dodatkom šećera, udio fenola je bio manji, a udio flavonoida i antocijana veći, u odnosu na kontrolni uzorak. Antioksidativna aktivnost mjerena je pomoću tri metode (ABTS, DPPH i FRAP). Antioksidativna aktivnost se smanjuje skladištenjem, međutim u uzorcima s dodatkom šećera utvrđena je veća antioksidativna aktivnost.

Ključne riječi: *sok višnje, glukoza, saharoza, fenoli, antocijani, antioksidativna aktivnost*

Infulence of glucose and sucrose on phenol and anthocyanin content in sour cherry juice

Summary

The aim of this work was to determine the influence of addition of glucose and sucrose in cherry juice on phenols, flavonoids and anthocyanins content, polymeric color and antioxidant activity. The measurements were done on samples after preparation and after storage of 7 months at room temperature. Samples with addition of sugars were compared with the control samples, with pure juice. After preparation, samples with addition of sugars had higher content of phenols and flavonoids in contrast to control sample, while anthocyanin content was same in all samples. During storage, degradation of phenolic compounds occurred. Samples with addition of sugars had higher content of flavonoids and anthocyanins and lower content of phenols in comparison to control sample. Antioxidant activity was determined by three methods (ABTS, DPPH i FRAP). During storage, antioxidant activity decreased, but samples with addition of sugars had higher antioxidant activity.

Keywords: *sour cherry juice, glucose, sucrose, phenols, anthocyanins, antioxidant activity*

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. VIŠNJA 2
2.2. POLIFENOLI 3
2.2.1. Izvori polifenola 4
2.2.2. Kemijska struktura polifenola 4
2.2.3. Veza između strukture i antioksidativne aktivnosti 5
2.3. ANTOCIJANI 7
2.3.1. Struktura antocijana 7
2.3.2. Stabilnost boje antocijana 8
2.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST 12
2.5. ŠEĆERI 13
2.5.1. Glukoza 14
2.5.2. Saharoza 15
3. EKSPERIMENTALNI DIO 17
3.1. ZADATAK 17
3.2. MATERIJALI 17
3.3. PRIPREMA SOKA 17
3.4. METODE 18
3.4.1. Određivanje ukupnih fenola 18
3.4.2. Određivanje udjela flavonoida 19
3.4.3. Određivanje udjela antocijana 19
3.4.4. Određivanje polimerne boje 20
3.4.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti 21
4. REZULTATI I RASPRAVA 23
4.1. Udio fenola, flavonoida, antocijana i postotak polimerne boje 23
4.2. Antioksidativna aktivnost 24
5. ZAKLJUČAK 27
6. LITERATURA 28

1. UVOD

Voćni sokovi su višestruko važni za ljudski organizam. Prije svega vrijedi istaknuti potrebu ljudskog organizma za tekućinom. Poznato je kako čovjek mora unositi oko dvije litre tekućine dnevno kako bi normalno funkcionirao. Budući da je voće bogato mineralima, neophodno je tijekom rasta i razvoja organizma. Današnji potrošač želi prehrambeni proizvod koji je vizualno privlačan, ukusan i ekonomski prihvatljiv. Tijekom procesiranja sirovina, cilj tehnologa je u što većoj mjeri sačuvati nutritivna svojstva i izbjeći degradaciju hranjivih komponenti namirnica. To se osigurava primjenom odgovarajućih tehnoloških procesa koji će osigurati minimalni gubitak korisnih sastojaka, ali i upotrebom određenih dodataka. Njihovim dodavanjem nastoji se očuvati kvalitetaprehrambenih proizvoda, gdje se prije svega misli na boju, teksturu te aromu.

Višnja je voće koje se zbog svoje hranjive vrijednosti često svrstava u super namirinice.Istraživanja pokazuju da su plodovi višnje bogati tvarima sa antioksidativnim djelovanjem.Osim vode, višnja sadrži određenu količinu šećera, organskih kiselina, tanina, pektina,mineralnih tvari, vitamina C, B1, B2, niacin i karotena.

Fenolni spojevi koji su prirodno prisutni u povrću, voću i žitaricama pokazuju širok raspon fizioloških svojstava i posjeduju sposobnost smanjenja oksidativnog oštećenja za kojeg se vjeruje da je povezan sa kardiovaskularnim, infektivnim i neurodegenerativnim bolestima, dijabetesom, autoimunim bolestima i nekim vrstama karcinoma, i procesom starenja.

Sladila su jedni od najznačajnijih dodataka koji se dodaju u prehrambene proizvode. Njihovdodatak utječe na niz svojstava kao što su slatkoća, tekstura, boja itd. Najčešće se koristisaharoza, invertni šećer i glukozni sirup.

Antocijani su pigmenti topljivi u vodi, vrlo nestabilni tijekom prerade i skladištenja. Na njihovu stabilnost ponajprije utječu pH, temperatura, aktivitet vode, kisik, svjetlost, enzimi, ali i koncentracija samih antocijana te njihova struktura.

U ovom istraživanju praćen je utjecaj dodataka šećera (glukoze i saharoze) na udio fenola, flavonoida i antocijana te polimerna boja i antioksidativna aktivnost u sok višnje i utjecaj tih istih šećera tijekom 7 mjeseci skladištenja na sobnoj temperaturi.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. VIŠNJA

Višnja je voćna vrsta koja spada u koštičave voćke. U biljnoj sistematici spada u porodicuruža (*Rosaceae*), rod *Prunus* i podrod *Cerasus*. Nastala je križanjem domaće trešnje i divljih,kiselih vrsta. Zbog posebnih unutarnjih svojstava ploda, višnja se s pravom naziva plemenitom voćnom vrstom. Njezina najveća važnost je u prerađivačkoj industriji. Aromatični plodovi višnje su vrlo pogodni za pripremanje raznovrsnih prerađevina kao što su kompot, džemovi,sokovi i dr. Osim toga, pojedine sorte višnje su pogodne i za upotrebu u svježem stanju, što im značajno može povećati vrijednost (web 1).

Višnja ima dvospolni cvijet, a plodovi nastaju isključivo iz plodnice pa spadaju u grupu pravih plodova te su kiselkastog i oporog okusa. Koštica se teško odvaja od mesa. Plod se sastoji iz pokožice ploda (epikarpa ili egzokarpa), mesa ploda (mezokarpa) i koštice (endokarpa). Epikarp nastaje iz vanjskog sloja plodnika, a mezokarp iz srednjeg sloja perikarpa, koji se sastoji iz više slojeva. Endokarp nastaje iz unutrašnjeg sloja plodnika, koji na početku druge etape razvitka ploda odrvenjava i pretvara se u košticu. Funkcija endokarpa je prije svega zaštita sjemena (Marković i sur., 2009.).



Slika 1 Plodovi višnje (Jašić, 2009.)

Višnja (**Slika 1**) predstavlja vrlo važnu voćnu vrstu, koja je otporna ne samo prema suši ivjetru, već i prema niskim temperaturama. Ima manju krošnju od trešnje koja naraste 4 - 10 m, te većinom raste kao grmoliko stablo. Najbolje uspijeva na obroncima i blagim padinama okrenutim jugu, jugoistoku i istoku (web 2).

Kemijski sastav (**Tablica 1**) odnosno tehnološke osobine plodova višnje, ovisne o sorti, zatim o stupnju zrelosti i vremenskim prilikama za vrijeme dozrijevanja plodova. pH ploda je 3,3 te u prosjeku sadrži 60 kcal/100 mg (Jašić, 2009.).

Tablica 1 Prosječan kemijski sastav ploda višnje (Jašić, 2009.)

SASTAV	%
Suha tvar	15,35
Kiseline	1,25
Šećeri (nereducirajući)	8,33
Saharoza	0,64
Pektin	0,30

2.2.Polifenoli

Polifenoli predstavljaju skupinu molekula biljnog podrijetla, čiju strukturu čini aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina (Rastija i sur., 2009.).Termin polifenol dolazi od grčke riječi *poli*-mnogo i *fenol* koja označava kemijsku strukturu koja se tvori vezanjem fenil grupe ($-C_6H_5$) sa hidroksilnom grupom. Molekulska masa im je od 500 do 4000, a složeniji polimerizirani spojevi mogu imati molekulsku masu do 30000.

Slobodni radikali su nestabilne, vrlo reaktivne molekule s nesparenim elektronom.Reagiraju vrlo brzo s drugim tvarima, pokušavajući pridobiti elektron koji im je potreban za postizanje stabilnosti (Šubarić i sur., 2010.). Općenito, slobodni radikali napadaju najbliže stabilne molekule tako što im „kradu“ elektron. Kada molekula koja je napadnuta izgubi elektron i sama postane slobodni radikal, započinje lančana reakcija. Jednom kada proces započne može uzrokovati oksidaciju lipida koja rezultira destabilizacijom i dezintegracijom stanične membrane ili pak može izazvati oksidaciju drugih komponenata stanice kao što su proteini i DNK (Halliwell i sur., 1995.). Kako bi se naše tijelo obranilo od slobodnih radikala, ono sadrži različite učinkovite sisteme obrane kao što su različiti enzimi te niskomolekularni i visokomolekularni antioksidansi. Antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale donirajući jedan od svojih elektrona (Kaur i Kapoor, 2001.).

2.2.1. Izvori polifenola

Polifenoli su dugo smatrani antinutrijentima u prehrani životinja zbog štetnog djelovanja tanina na probavljivost bjelančevina (Bravo, 1998.). Danas se zna da se radi o spojevima sa velikim antioksidativnim kapacitetom koji su se pokazali efikasnim u prevenciji brojnih bolesti (Šubarić i sur., 2010.; Seeram i sur., 2006.; Heim i sur., 2002.; Minussi i sur., 2003.). Mnoga istraživanja pokazala su antikancerogeno, protuupalno, antihepatotoksično, antibakterijsko, antivirusno te antialergijsko djelovanje određenih polifenolnih spojeva, kao i namirnica koje ih sadrže kao što su zeleni čaj, crno vino, tamna čokolada (Šubarić i sur., 2010.). Udio fenolnih spojeva u pojedinim namirnicama je različit, a ovisi o brojnim čimbenicima kao što su sorta, područje uzgoja, klimatski uvjeti, stupanj zrelosti te način kultiviranja i skladištenja (Poyrazoglu i sur., 2002.).

2.2.2. Kemijska struktura polifenola

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka u kojima imaju višestruku ulogu (Häkkinen, 2000.):

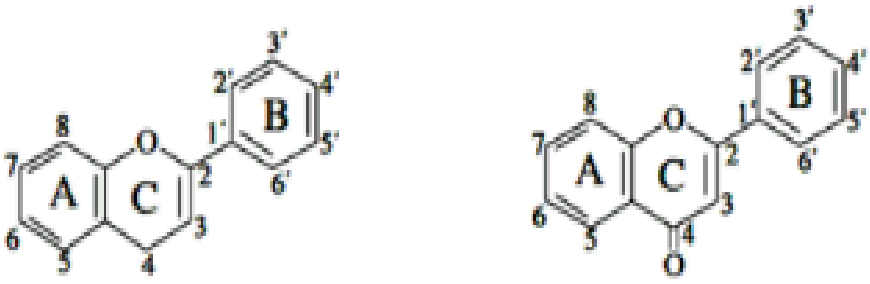
- senzorska svojstva kao što su boja, aroma ili okus,
- utječu na otpornost biljke prema bolestima i mikroorganizmima,
- neki polifenoli indirektno utječu na rast biljke, te štite osjetljive stanične dijelove od štetnog zračenja (apsorpcija UV zračenja).

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 (Naczk i Shahidi, 2006.):

- fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne),
- flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani, itd.),
- tanine (kondenzirani i hidrolizirani),
- ostale polifenolne spojeve (lignani, kumarini)

Najvažnija i najveća skupina polifenola su flavonoidi (više od 5000 do sada poznatih spojeva) koji se pojavljuju u skoro svim dijelovima biljaka (Mattila i sur., 2006.). Njihova struktura se temelji na flavonoidnoj jezgri koja se sastoji od tri fenolna prstena: A, B i C prsten (**Slika 2**). Benzenski prsten A kondenziran je s tročlanim alifatskim nizom koji zajedno s kisikom tvori šesteročlani prsten C, a na poziciji 2 prstena C nalazi se benzenski prsten B (Šubarić i sur., 2010.).

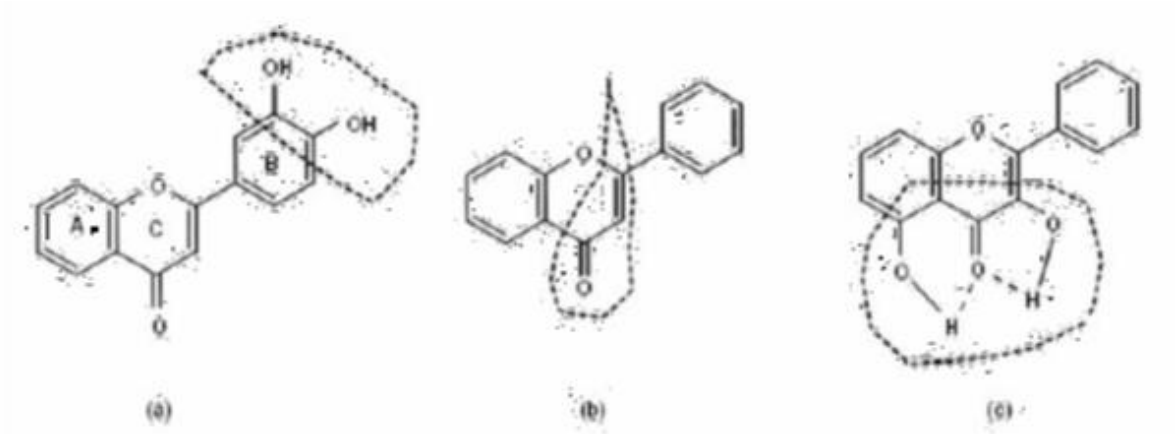
U prirodi se flavonoidi nalaze uglavnom u obliku glikozida, tj. povezani su s različitim molekulama šećera. Osim šećera, supstitucijske skupine koje se nalaze na osnovnoj jezgri su hidroksilna skupina te metoksi skupina što pridonosi velikoj raznolikosti i velikom broju tih spojeva (Jakobek, 2007.).



Slika 2 Osnovna struktura flavonoida (Rein, 2005.)
(lijevo-flavan jezgra; desno-okso flavonoid jezgra)

2.2.3. Veza između strukture i antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost hrane biljnog podrijetla proizlazi iz kumulativnog i sinergističkog djelovanja velikog broja antioksidanasa kao što su vitamini C i E, polifenoli, uglavnom fenolne kiseline i flavonoidi, terpenoidi, karotenoidi, Maillardove komponente i minerali u tragovima (Pérez-Jiménez i sur., 2008.). Polifenoli predstavljaju glavni izvor antioksidanasa u prehrani. Antioksidativna aktivnost flavonoida i njihovih metabolita ovisi o strukturnom rasporedu funkcionalnih grupa na glavnoj okosnici flavonoida (Šubarić i sur., 2010.). Postoje tri strukture flavonoida sa sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala i/ili s antioksidativnim potencijalom (**Slika 3**).

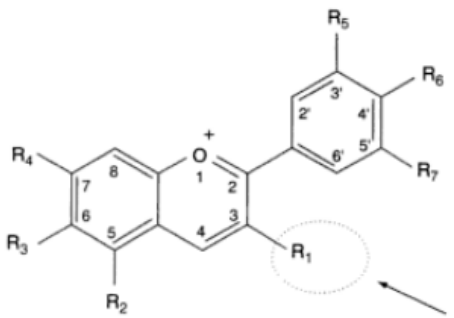


Slika 3 Veza između antioksidativne aktivnosti i strukture flavonoida (Kopjar, 2007.)

Pretpostavlja se da antioksidacijsku aktivnost flavonoida uglavnom određuje rasporedsupstituenata. Antioksidacijska aktivnost većine polifenolnih spojeva ovisi o

rasporedu iukupnom broju hidroksilnih skupina (Kazazić, 2004.; Burda i sur., 2001.; Cao i sur., 1997.).

Hidroksilacija B prstena je najznačajnija u hvatanju reaktivnih čestica kisika i reaktivnihčestica dušika. Hidroksilacijom dolazi do doniranja vodikova atoma i elektrona hidroksilnim iperoksidnim radikalima koji se stabiliziraju, a ujedno nastaje i relativno stabilni flavonoidniradikal.Hvatanje peroksidnih i hidroksilnih radikala kod strukturno homolognih flavona iflavanona povećava se linearno za flavone, odnosno teži zasićenju za flavanone ovisno oukupnom broju hidroksilnih skupina (Cao i sur., 1997.). Prsten B sa samo jednomhidroksilnom skupinom nije efikasan donor vodika. Naime, kapacitet hidroksilnih grupa u„hvatanju“ slobodnih radikala je najizraženiji kada se hidroksilne grupe nalaze u položajima3’- i 4’- u prstenu B (Mora i sur., 1990.). Utjecaj na aktivnost rasporeda hidroksilnih skupinana prstenu A manje je poznat. Ipak, u usporedbi s rasporedom hidroksilnih skupina na prstenuB utjecaj rasporeda pojedinih skupina na prstenu A na antioksidacijsku aktivnost je upitan.Prsten C doprinosi, ali nije presudan za antioksidacijsku aktivnost flavonoida. Naime, onpridonosi antoksidacijskoj aktivnosti u slučaju ako je hidroksilna grupa prisutna u položaju 3'-ili da je omogućena konjugacija između aromatskih prstenova (Kazazić, 2004.; Burda i sur.,2001.). Hvatanje slobodnih radikala pomoću flavonoida jako ovisi i o slobodnoj 3-OH grupitako da je utvrđeno da flavonoidi koji imaju slobodnu 3-OH grupu i 3´,4´-katehol strukturuposjeduju 10 puta jaču sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Van Acker i sur., 1996.; Heimi sur., 2002.). Velik utjecaj na antioksidativnu aktivnost ima i prisutnost 2,3 dvostruke veze, te 4 keto skupine, budući da uvelike povećava antioksidacijsku aktivnost polifenola.



Slika 4 Najčešće mjesto vezanja šećerne jedinica (Heldman i sur., 2006.)

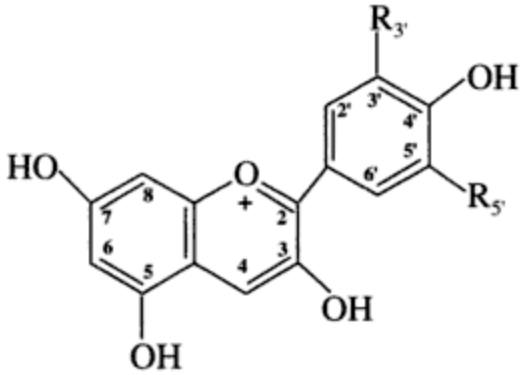
Što se tiče glikozidacije, pozicija vezivanja i struktura šećera koji se veže su vrlo bitni te suglikozidne jedinice uglavnom vezane na 3- ili 7- poziciji (**Slika 4**). Vezivanje šećera na Aprsten rezultira većim smanjenjem aktivnosti nego 3-glikozilacija. No, bitno je
imati na umu da se u samom tijelu čovjeka, šećer odvaja od flavonoidne okosnice, tako da je njegov utjecaj u tom slučaju upitan (Heim i sur., 2002.).

2.3. ANTOCIJANI

Ove komponetne su zaslužne za širok raspon boja kod biljaka uključujući plavu, crvenu,ljubičastu, narančastu i purpurnu. Sam naziv dolazi od grčkih riječi *anthos* što znači cvijet i*kyanos* što znači plav (Fennema, 1996.). U voću se nalaze u kožici ploda (šljiva, grožđe) ili umezokarpu ploda (jagoda, kupina, ribizl) (Katalinić, 2006.). Radi se o grupi biljnih pigmenatakoja je posebno zanimljiva zbog mogućeg pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje. S drugestrane jako je bitna i njihova moguća primjena u prehrambenoj industriji kao alternativaumjetnim bojilima (Stoner i sur., 2011.). Do sada je ukupno izolirano 539 antocijana od kojihje 277 izoliranih poslije 1992. godine, što ukazuje na to koliko se intenzivno istražuju (Ćujić isur., 2013.).

2.3.1. Struktura antocijana

Antocijanini pripadaju flavonoidnoj grupi polifenola. Imaju $C_6C_3C_6$kostur tipičan za flavonoide. Antocijanini su glikozilirani polihidroksi i polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilium kationa odnosno flavilium kationa (**Slika 5**) (Francis, 1989.)



Slika 5 Strukturna formula antocijana; glavni dio molekule- aglikon, flavilium kation (Sikorski, 2006.)

Antocijanidini su osnova strukture antocijana, a to su aglikoni koji se sastoje od aromatičnog prstena, kondenziranog heterociklusa koji sadrži kisik, za koga je vezan C-C vezom trećiaromatični prsten. Supstitucija sa H, OH i OCH_3na B prstenu je uzrok postojanja 6 različitih antocijanidina (Wrolstad, 2004.). Iako postoji veći broj poznatih antocijanidina sa različitim brojem i pozicijom hidroksilnih grupa i/ili metil eter grupa, za hranu su najvažniji: pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfinidin, malvidin, petunidin. Glikozidni dio mogu činiti šećeri kao što su glukoza, galaktoza, ramnoza, ksiloza, arabinoza. Ovi šećeri mogu biti vezani za položaj 3 i 5 na prstenovima A i C (Ćujić, 2013.). Raznolikost u strukturi antocijana se najviše javlja zbog aciliranja šećernih grupa različitim kiselinama.

Kiseline mogu biti alifatične kao što su (Ovando i sur., 2009.):

- octena kiselina,
- p-kumarinska kiselina,
- kafeinska kiselina,
- malonska kiselina,
- maleinska kiselina,
- ferulična kiselina.

2.3.2. Stabilnost boje antocijana

Antocijani su vrlo osjetljivi spojevi i na njihovu stabilnost utječe:

- Struktura i koncentracija,
- pH,
- temperatura,
- kisik i svjetlost,
- enzimi,
- askorbinska kiselina,
- šećeri,
- kopigmentacija.

Utjecaj strukture. Glikozilne jedinice i acilne grupe vezane za aglikon, i mjesto njihova vezanja imaju značajan utjecaj na stabilnost i reaktivnost antocijana. Također, supstitucijski uzorak antocijanida, broj i mjesto hidroksilnih i metoksilnih grupa u aglikonu utječu na kemijsko ponašanje molekula pigmenta. Povišena hidroksilacija aglikona stabilizira antocijanidin;

delfinidin je stabilniji od cijanidina u zakiseljenom metanolu. Povećanjem metilacije hidroksilnih skupina smanjuje se stabilnost antocijana (Dao i sur., 1998.). Glikozilnom supstitucijom postiže se stabilnija molekula antocijana, ali na stabilnost utječe i sama pozicija glikolizacije, te vrsta glikozilne jedinice (Timberlake i Bridle, 1966.). Samo male razlike u strukturi imaju veliki utjecaj na boju kao i intenzitet boje antocijanina, ali i drugih flavonoida (Dangles i sur.,1993.). Boja neaciliranih kao i monoaciliranih antocijanina u velikoj je mjeri određena tipom substituenta na B prstenu aglikona, dok aciliranje igra jako veliku ulogu u boji i intenzitetu boje antocijana (Bechtold i sur., 2009.; Jackman i sur., 1987.).

Utjecaj pH. U vodenom mediju većina antocijana se ponašaju kao pH indikatori: pri niskimpH vrijednostima pokazuju crveno obojenje, pri srednjim plavkasto, a pri viskom pH vrijednostima dolazi do obezbojenja. U kiselim i neutralnim vodenim medijima antocijani mogu postojati u četiri osnovna strukturna oblika (Sikorski, 2006.):

- plava kinoidalna baza (A),
- crveni flavilium kation (AH^+),
- bezbojna karbinolna pseudobaza (B) i
- bezbojni halkon (C).

Antocijani reverzibilno prolaze strukturne transformacije promjenom pH vrijednosti što ima najveći utjecaj na boju. Flavilium kation je stabilan jedino u veoma niskom pH području.Kako se pH vrijednost povećava, boja flavilium kationa (crvena) prelazi u bezbojni kromenol (pH = 4 - 5). Pri pH vrijednosti 6 - 7 boja je ljubičasta, zbog prisustva kinoidalne anhidrobaze, kod pH = 7-8 zbog prisustva jonske anhidro baze boja je tamno plava, te se anhidro baza transformira tako što se prsten otvara i nastaje halkon žute boje. Pri višim pH vrijednostima boja se može stabilizirati prisustvom viševalentnih iona Al^{3+}, Fe^{3+}. Formirani kompleks sametalima je tamno plave boje. Povećanje broja hidroksilnih grupa u molekulu vodi više ka plavoj boji (pelargonidin→cijanidin→delfinidin), dok formiranje glikozida i metiliranjerezultira pojavom crvene boje (pelargonidin→pelargonidin-3-glikozid, cijanidin→peonidin) (Beliz i sur., 2004.; Ćujić i sur., 2013.).

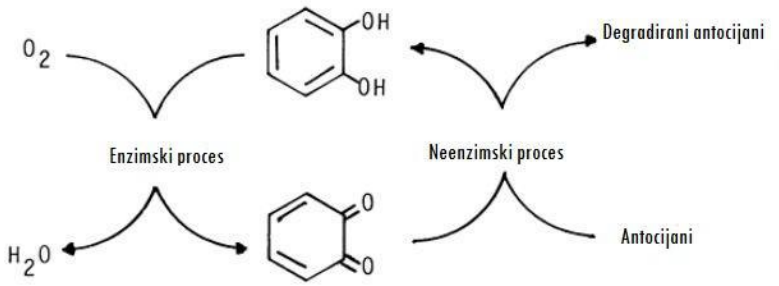
Utjecaj temperature. Brzina degradacije antocijana se povećava tijekom prerade i skladištenja s porastom temperature (Palamidis i Markakis, 1978.; Maccarone i sur., 1985.). Temperaturni porast u pH intervalu 2-4 uzrokuje gubitak glikozidnih jedinica antocijana, hidrolizom

glikozidne veze (Adams, 1973.). To dovodi do daljnjeg gubitka boje, s obzirom da su aglikoni manje stabilni od svojih glikozidnih oblika. Stvaranje halkona je prvi korak tijekom termičke degradacije antocijana (Markakis i sur., 1957.; Adams, 1973.). Termička degradacija dovodi do smeđih proizvoda, posebno u prisutnosti kisika (Markakis i sur., 1957.).

Utjecaj kisika. Kisik pojačava učinak ostalih procesa degradacije antocijana. Štetan učinak kisika na antocijane se može manifestirati kroz izravnu oksidaciju i/ili neizravnu oksidaciju, gdje oksidirane komponente medija dalje reagiraju sa antocijanima što dovodi do bezbojnih ili smeđih proizvoda (Jackman i sur.,1987.). Antocijani reagiraju s peroksiradikalima. U takvim reakcijama antocijanini djeluju kao antioksidansi, a ova značajka antocijanina se smatra kao atribut antocijana protiv kardiovaskularnih bolesti (Matsufuji i sur., 2003.; Garcia-Alonso i sur., 2004.;Rossetto i sur.; 2004.).

Utjecaj svjetla. Izlaganje svjetlu ima jako velik učinak na većinu flavonoida (Ćujić, 2013.;Macheix i sur., 1990.). Svjetlost utječe na antocijane na dva načina, neophodna je za biosintezu antocijana, ali i ubrzava njihovu degradaciju (Markakis, 1982.).

Utjecaj enzima. Određene grupe enzima, pogotovo peroksidaze, fenolaze i β–glukozidazemogu dovesti do enzimskog posmeđivanja, uzrokujući tako nastanak spojeva smeđe boje(Sikorski, 2006.). Glikozidaze cijepaju kovalentnu vezu između glikoznih jedinica i aglikonašto dovodi do nastajanja vrlo nestabilnog antocijanidina (Kader i sur., 1997.; Pifferi i Cultera,1974.). Antocijani nisu pogodan supstrat za djelovanje o-difenol oksidaze, ali vrlo čestodolazi do njihove oksidacije u klorogenska kiselina↔klorogenokinon redoks procesu. Takoenzimska oksidacija klorogenske kiseline može teći istodobno sa neenzimskom oksidacijom ipolimerizacijom antocijanina. Ovaj fenomen se događa i uz prisutnost katehina (Sikorski,2006.). Iako fenolaza može direktno oksidirati antocijanine, njezino djelovanje je izraženijekada je u početku neka druga fenolna komponenta substrat. Istraživanja su tako pokazala dase vrlo često odvija sljedeći niz reakcija: fenolaza oksidira pirokatehol do o-benzokinona,nakon čega o-benzokinon oksidira antocijane do bezbojnih produkata (**Slika 6**) (Markakis,2012.).



Slika 6 Mogući mehanizmi degradacije antocijana djelovanjem fenolaze (Peng i Markakis 1963.)

Utjecaj askorbinske kiseline. Askorbinska kiselina ima nekoliko različitih uloga u postojanosti boje antocijana. Ubrzava se njihova razgradnja uz prisustvo askorbinske kiseline (Meschter, 1953.; Starr i Francis, 1968.; Poei-Langston i Wrolstad, 1981.; Marti i sur., 2002.). Degradacija antocijana se ubrzava prisustvom askorbinske kiseline jer ubrzava polimerizaciju pigmenata i uzrokuje obezbojenje (Poei-Langston i Wrolstad, 1981.).Izravna kondenzacija izmeĆu antocijana i askorbinske kiseline se smatra kao mehanizam razgradnje antocijana (Poei-Langston i Wrolstad, 1981.). Također, formiranje vodikovog peroksida iz askorbinske kiseline oksidacijom može utjecati na stabilnost antocijana (Meschter, 1953.; Markakis, 1982.; Talcott i sur., 2003.). Međutim, stabilnost aciliranih antocijana raste u prisutnosti askorbinske kiseline.

Utjecaj šećera. Šećer, kao i njegovi produkti degradacije smanjuju stabilnost antocijana.Reakcijom između antocijana i degradacijskih produkata šećera i askorbinske kiseline nastajusmeđi pigmenti (Krifi i sur., 2000.). Primijećeno je da dodatak šećera stabilizira brzo smrznuteproizvode te spriječava reakcije posmeđivanja i tako im produžuje rok trajanja (Delgado-Vargas i sur., 2000.; Wrolstod i sur., 1990.).

Utjecaj kopigmentacije. Kopigmenti su spojevi koji se vežu s antocijanima. Oni su 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 vrijedno, prirodno pomagalo za poboljšanje boje prehrambenih proizvoda bogatih antocijanima, čija boja može biti stabilizirana i poboljšana dodavanjem različitih biljnih ekstrakata bogatih kopigmentima (Rein, 2005.). Najznačajniji mehanizmi

kopigmentacije su formiranje intermolekularnih i intramolekularnih kompleksa. Također, povezivanje i stvaranje metalnih kompleksa su mogući mehanizmi stvaranja kopigmenata.

2.4. Antioksidativna aktivnost

Antioksidansi u hrani se mogu definirati kao bilo koji sastojak koji može odgoditi, zaustaviti ili spriječiti kvarenje hrane ili stvaranje nepoželjne arome kao posljedice oksidacije (Gordon, 2001.). Spojevi koji lakše oksidiraju su često najbolji antioksidansi (molekule koje donira slobodan elektron ili vodikove atome da reaktiviraju slobodne radikale). Nekoliko istraživanja je pokazalo da sadržaj antocijana i njihova odgovarajuća antioksidativna aktivnost doprinose zaštitnom učinku voća i povrća protiv degenerativnih i kroničnih bolesti (Heinonen i sur., 1998.; Record i sur., 2001.). Prirodni antioksidansi su učinkovitiji i sigurniji od sintetskih. Antioksidativna aktivnost ovisi o strukturnim svojstvima antioksidansa, ali i o mnogim drugim čimbenicima kao što su (Yanishlieva-Maslarova i Heinonen, 2001.):

- temperatura,
- svijetlost,
- tip supstrata,
- fizikalno stanje sustava,
- kao i o brojnim mikrokomponentama koje djeluju kao prooksidansi ili sinergisti.

Antioksidansi mogu inhibirati ili usporiti oksidaciju na dva načina i s obzirom na to ih djelimo na primarne i sekundarne. Primarni su fenolne tvari koje zaustavljaju oksidaciju direktnim uklanjanjem slobodnih radikala, a sekundarni su oni koji djeluju mehanizmom koji ne uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala. Zaustavljanje oksidacije je bitno za prehrambeni proizvod, te se to može učiniti uklanjanjem kisika, upotrebom niskih temperatura, inaktivacijom enzima koji kataliziraju oksidaciju, upotrebom prikladne ambalaže. Drugi način zaštite od oksidacije je upotreba inhibitora, koji se dodaju u hranu kao aditivi, te mogu biti različite kemijske strukture i mehanizma djelovanja (**Tablica 2**).

Višnja sadrži brojne antioksidanse i polifenole koji imaju biološku ulogu kao što su antikancerogeno, antiupalno ili antioksidativno djelovanje (Skinner i sur., 2013.). Istraživanja su pokazala da najveću antioksidativnu aktivnost ima cijanidin-3-glukozid.

Inače, antocijani uvelike doprinose antioksidativnim svojstvima voća koje ih sadrži (Einbond i sur., 2004.). Zanimljivo je i da je višnja pored antioksidativne aktivnosti u in-vitro, pokazala tu istu aktivnost i u in-vivo uvjetima (Skinner i sur., 2013.; Sarić i sur., 2009.).

Tablica 2 Mehanizam antioksidativne aktivnosti (Rein, 2005.)

	Mehanizam antioksidativne aktivnosti	Primjeri antioksidanasa
Pravi antioksidansi	inaktivacija slobodnih radikala peroksida	fenolne tvari
Stabilizatori hidroperoksida	sprječavanje raspadanja hidroperoksida na slobodne radikale	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 reakcijama, limunska kiselina
Tvari za vezivanje singleton kisika	transformiraju singlet kisik u triplet kisik	Karoteni

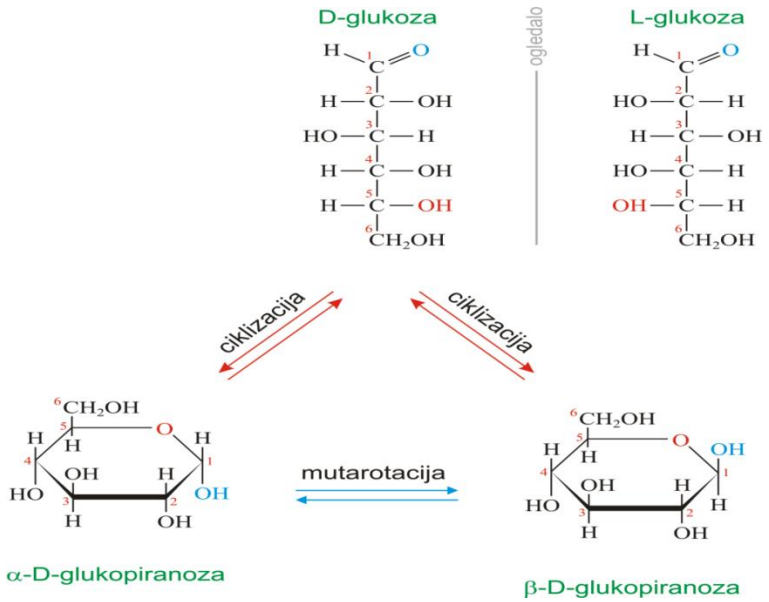
2.5. ŠEĆERI

Ugljikohidrati su kemijski spojevi hrane koji imaju važnu energetsku ulogu u čovjekovu organizmu. Osim opskrbe energijom u našem tijelu, potpomažu probavu i upijanje drugih sastojaka hrane, sudjeluju u metabolizmu masti i bjelančevina (Katalinić, 2011.). U voću se nalaze kao makronutrijenti, a rjeđe kao mikronutrijenti. Ugljikohidrati su poli-hidroksi aldehidi ili ketoni, odnosno spojevi čijom hidrolizom nastaju aldehidi ili ketoni. Većinu ugljikohidrata možemo prikazati empirijskom formulom $C_n(H_2O)_n$. Neki ugljikohidrati sadrže dušik, fosfor ili sumpor, pa se oni ne mogu prikazivati navedenom empirijskom formulom. Šećeri mogu biti reducirajući i nereducirajući. Reducirajući šećeri imaju slobodnu aldehidnu skupinu ili keto-skupinu koja može izomerizirati u slobodni aldehid (Jašić, 2009.).

Sladila se ubrajaju među najznačajnije dodatke hrani, jer utječu na slatkoću, teksturu, miris i ostalo. Ugljikohidrati se dijele na tri velike skupine: jednostavne šećere, oligosaharide i polisaharide.

2.5.1. Glukoza

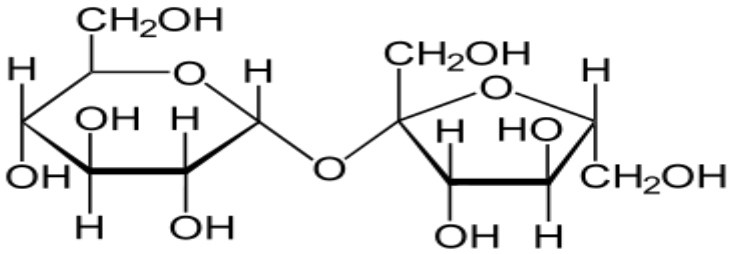
Glukoza (grožđani šećer, krvni šećer) ugljikohidrat je iz skupine monosaharida ili jednostavnih šećera kemijske formule $C_6H_{12}O_6$. Prema broju ugljikovih atoma u svojoj molekuli glukoza je heksoza, a prema funkcionalnoj skupini aldoza (aldoheksoza). Glukoza je najrasprostranjeniji šećer u prirodi. Slobodna se nalazi u raznom voću i medu a vezana u disaharidima (saharozi, maltozi, laktozi), polisaharidima (škrobu, glikogenu, celulozi) i raznim drugim spojevima. Kod čovjeka se može naći slobodna u krvi ili kao rezerva pohranjena u jetri i mišićima u obliku glikogena. Glukozu sintetiziraju biljke procesom fotosinteze i pohranjuju u polimernom obliku kao škrob. U probavnom sustavu škrob se hidrolizira u glukozu koja se zatim iskorištava u stanicama za dobivanje energije. Ukupno se iz jedne molekule glukoze može dobiti 36 molekula ATP-a.Zbog tetraedarskih kutova koje čine veze među ugljikovim atomima, molekula glukoze može zauzeti takvu konformaciju da hidroksilna skupina vezana na petom ugljikovom reagira s karbonilnom skupinom pri čemu nastaje poluacetal, odnosno šesteročlani heterociklički prsten. Time se javlja još jedan asimetrični centar na atomu C-1, tako da D-glukoza može postojati u dva oblika, kao α-D-glukopiranoza i β-D-glukopiranoza. Ta su dva ciklička (**Slika 7**) oblika u ravnoteži, tj. oni mogu preći jedan u drugog preko aldehidnog oblika (Web 3).



Slika 7 Ciklički oblici glukoze (Web 3)

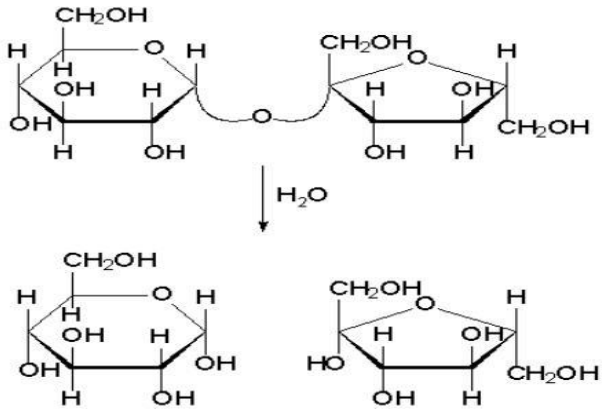
2.5.2. Saharoza

Disaharidi su šećeri sastavljeni od dvije molekule monosaharida spojene glikozidnom vezom.Najčešće i najpoznatije sladilo u prehrambenoj industriji je saharoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (**Slika 8**). Nastaje međusobnim povezivanjem jedne molekule glukoze ($C_6H_{12}O_6$) i jedne molekule fruktoze ($C_6H_{12}O_6$) (Jašić, 2009.).



Slika 8 Saharoza (web 4)

Djelovanjem vode uz prisutnost kiseline ili enzima dolazi do razlaganja na monosaharide (**Slika 9**). Saharoze najviše ima u šećernoj repi (16-20%) i u šećernoj trsci (14-26%), pa je zbog toga još dobila ime tršćani ili repin šećer. Proizvođači koriste proces rafiniranja radi izolacije saharoze iz šećerne trske i šećerne repe (Jašić, 2009.).



Slika 9 Hidroliza saharoze (Jašić, 2011.)

Bijeli šećer i šećer u prahu imaju visok stupanj rafinacije i sadrže 100% saharoze. Otopina saharoze skreće ravan polariziranog svjetla u desno. Budući da smjesa monosaharida nastala

hidrolizom saharoze skreće polarizirano svjetlo ulijevo, takva se smjesa često naziva invertnim šećerom (Katalinić, 2011.). Kristalizira u monoklinskom sustavu i daje hemimorfne kristale. Kristal saharoze je vrlo složen i predstavlja kombinaciju šest kristalografskih oblika (Babić, 2007.). Molarna masa iznosi 342,2965 g/mol, a njena gustoća je 1,59 g/cm^3. Topljiva je u vodi, a netopljiva u većini organskih otapala. Talište joj je na temperaturi 186 °C, a pri 200 °C prelazi u smeđe obojeni karamel.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

U ovom radu zadatak je bio:

Ispitati utjecaj dodataka šećera (glukoze i saharoze) u sok višnje na:

- udio fenola,
- udio flavonoida,
- udio antocijana,
- polimernu boju,
- antioksidativnu aktivnost.

Utvrditi promjene navedenih parametara tijekom skladištenja od 7 mjeseci na sobnoj temperaturi.

Ispitivanje se radilo nakon pripreme i nakon skladištenja uzoraka 7 mjeseci na sobnoj temperaturi. Ispitivani uzorci soka s dodatkom glukoze i saharoze uspoređivani su sa sokom bez dodataka (kontrolni uzorak) (**Slika 10**).

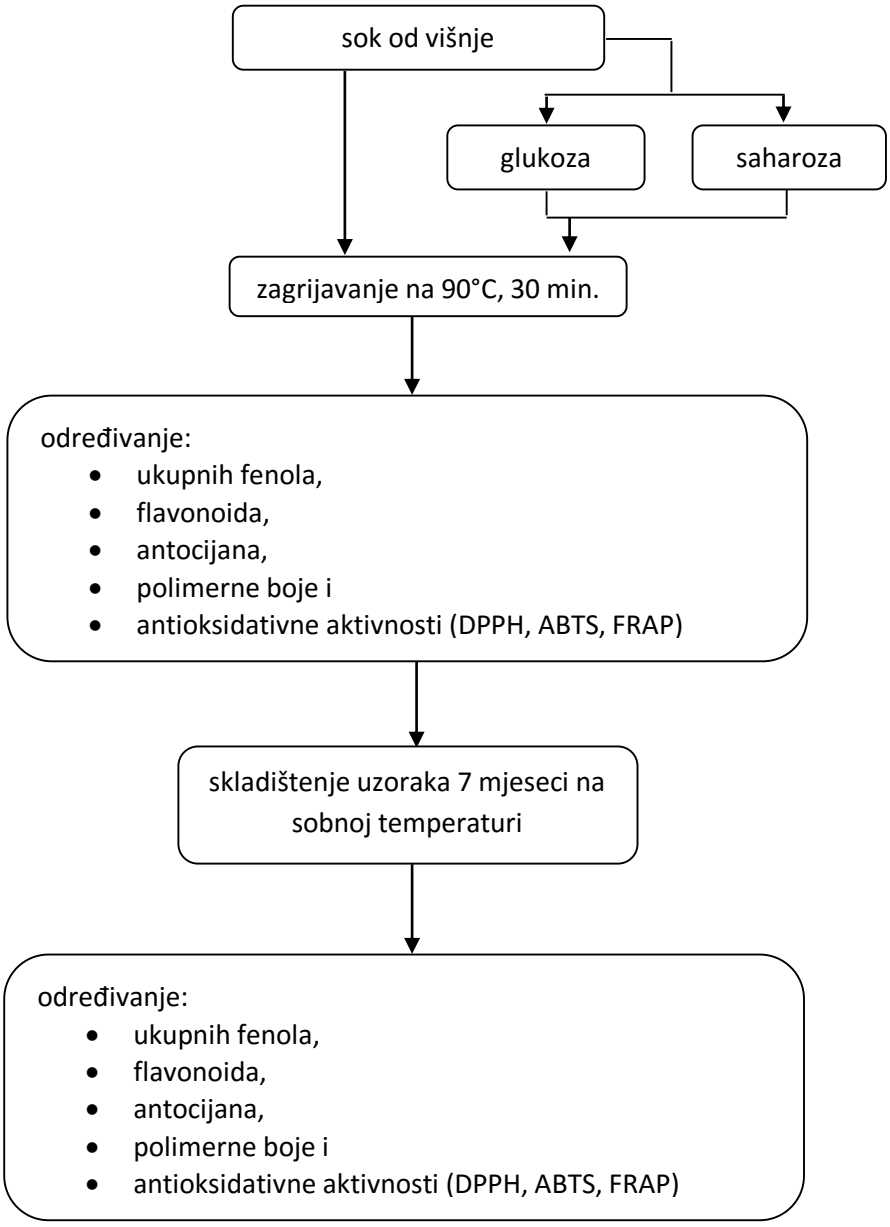
3.2. MATERIJALI

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. Šećeri, glukoza i saharoza, nabavljeni su od tvrtke Kemike, Hrvatska.

3.3. PRIPREMA SOKA

Uzorci na kojima je rađeno ispitivanje, su uzorci:

- sok (višnja) – kontrolni uzorak
- sok G (sok + glukoza)
- sok S (sok + saharoza)



Slika 10 Shematski prikaz rada

3.4. METODE

3.4.1. Određivanje ukupnih fenola

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

Postupak: Odpipetira se 0,2 mL uzorka, 1,8 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 8 mL otopine natrijevog karbonata u epruvetu, promućka se i ostavi stajati 2 sata na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija se određuje na spektrofotometru pri 765 nm. Slijepa proba se pripravi s destiliranom vodom. Određivanje je provedeno u tri paralele.

3.4.2. Određivanje udjela flavonoida

Udio flavonoida određen 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 λ=510 nm, u odnosu na deioniziranu vodu kao slijepu probu. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje katehina. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.4.3. 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 absorbancije. 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.).

Pptupak: 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 apsorbanca pri valnim duljinama od 513 nm i 700 nm. Sadržaj antocijana je izračunat prema slijedećoj formuli:

$$c\ (\text{antocijana})\ (\text{mg/kg}) = (A \times M \times FR \times 1000) / \varepsilon \times l$$

gdje je:

A - apsorbanca uzorka, koja se izračunava prema izrazu:

A = (A513- A700)pH 1 - (A513 - A700)pH 4,5 M - 449,2

FR - faktor razrjeđenja

ε - molarna absorptivnost, 26 900

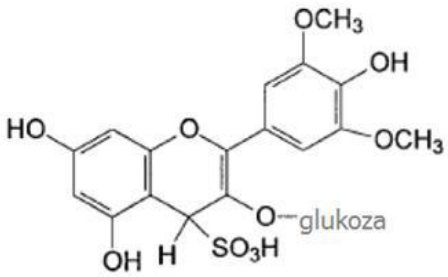
l - duljina kivete, 1 cm

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

Određivanje je provedeno u tri paralele.

3.4.4. Određivanje polimerne boje

Degradacija antocijana može se pratiti očitanjem apsorbance u uzorcima koji su tretiranibisulfitom. Antocijani s bisulfitom tvore bezbojan kompleks (**Slika 11**). Boja koja nastajepolimerizacijom antocijana odnosno nastajanjem kompleksa antocijani/tanini, je otporna nadjelovanje bisulfita. Apsorbanca uzorka tretiranog bisulfitom, na 420 nm predstavlja stupanjposmeđivanja. Gustoća boje se definira kao suma apsorbanci na 420 nm i $\lambda_{vis\text{-}max}$. Omjerizmeđu polimerne boje i gustoće boje se koristi kao postotak boje koja je nastalapolimerizacijom sastojaka.



Slika 11 Kompleks između antocijana i bisulfita (Giusti i Wrolstadu, 2001.)

Postupak: Otpipetirano je 2,8 mL uzorka u dvije kivete, u jednu je dodano 0,2 mL vode, a u drugu 0,2mL otopine bisulfita. Nakon stajanja od 15 min uzorcima je pomoću spektrofotometra mjerena apsorbanca pri valnim duljinama od 420 nm, 513 nm i 700 nm.

Izračun gustoće boje kontrolnog uzorka (uzorak tretiran vodom):

$$\text{Gustoća boje} = [(A_{420\ nm} - A_{700nm}) + (A_{513\ nm} - A_{700\ nm})] \times FR$$

Izračun polimerne boje uzorka (uzorak tretiran bisulfitom):

$$\text{Polimerna boja} = [(A_{420\ nm} - A_{700\ nm}) + (A_{513\ nm} - A_{700\ nm})] \times FR$$

Izračun postotka polimerne boje:

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

Određivanje je provedeno u tri paralele.

3.4.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Uklanjanje slobodnih radikala je glavni mehanizam djelovanja antioksidansa u hrani. 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) i 2,2'-azinobis(3- etilbenztiazolin-sulfonska kiselina) (ABTS) radikale.

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

Postupak: otpipetira se 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 absorbancija pri 734 nm. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard.

Kod **DPPH** testa, uklanjanje $DPPH^{\cdot}$ radikala je praćeno smanjenjem apsorbance pri 517 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa ili reakcije s radikalima (Brand-Williams i sur., 1995.).

$DPPH^{\cdot} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\cdot}$

$DPPH^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow DPPH\text{-}R$

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 absorbancija pri 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard.

FRAP metoda je prvobitno razvijena za određivanje sadržaja smanjenih supstanci u krvnoj plazmi, ali je kasnije našla primjenu i za određivanje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata. Dolazi do redukcije kompleksa feri-tripiridiltriazina do intezivnog plavog kompleksa fero-tripiridiltriazina pri malim pH vrijednostima (Magalhaes i sur., 2008.; Benzie i Strain, 1996.). Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 593 nm (Benzie i Strain, 1996.).

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka, 3 mL FRAP otopine, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 30 minuta. Nakon toga mjeri se absorbancija pri 593 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodana je voda. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard.

Određivanje je provedeno u tri paralele.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Važnost konzumacije namirnica bogatih polifenolima je u tome što fenolni spojevi pokazuju širok spektar fizioloških učinaka, kao što je antialergijsko, protuupalno, antimikrobno, antioksidativno, kardioprotektivno. Upravo tim spojevima bogata je višnja, ali i njezine prerađevine kao što je sok višnje.

U ovom radu ispitivan je utjecaj dodatka šećera glukoze i saharoze u soku višnje na udio fenola, flavonoida, antocijana te na polimernu boju i antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost mjerena je pomoću više metoda (DPPH, ABTS i FRAP). Dobiveni rezultati uspoređivani su s kontrolnim uzorkom odnosno sa čistim sokom višnje. Sva mjerenja obavljena su nakon pripreme uzorka i nakon skladištenja uzorka na sobnoj temperaturi, 7 mjeseci.

4.1 Udio fenola, flavonoida, antocijana i postotak polimerne boje

U **Tablici 3**prikazan je udio ukupnih fenola, flavonoida, antocijana te polimerna boja sokova od višnje sa dodatkom šećera, glukoze i saharoze. Udio fenola u kontrolnom uzorku nakon pripreme bio je najmanji i iznosio je 1222,33 μg GAE/mL. Nakon pripreme, udio fenola je približno sličan nakon dodatka glukoze i saharoze, ali je taj udio ipak nešto veći kod soka s dodanom glukozom te iznosi 1350,76 μg GAE/mL. U uzorcima s dodanom saharozom, nakon pripreme, udio fenola iznosio je 1275,15 μg GAE/mL. Tijekom skladištenja od 7 mjeseci na sobnoj temperaturi, udio fenola se znatno smanjio. Skladištenjem, kontrolni uzorak ima najviše fenola (937,72 μg GAE/mL), a sok u kojeg je dodana glukoza ima najmanji udio fenola a iznosio je 450,96 μg GAE/mL. U uzorku s dodatkom saharoze, nakon skladištenja, udio fenola iznosio je 753,40 μg GAE/mL.

Udio flavonoida u kontrolnom uzorku, nakon pripreme, iznosio je 462,95 μg CE/mL. Nakon pripreme udio flavonoida u uzorku s dodatkom glukoze je bio viši, a u uzorku s dodatkom saharoze niži u odnosu na kontrolni uzorak (474,84 i 413,79 μg CE/mL). Nakon skladištenja od 7 mjeseci na sobnoj temperaturi, udio flavonoida se je znatno smanjio u kontrolnom uzorku, 364,52 μg CE/mL, a u uzorku s dodatkom glukoze ili saharoze povećao (512,54 i 595,60 μg CE/mL), što je vjerojatno posljedica degradacije fenolnih spojeva.

Tablica 3 Udio ukupnih fenola, flavonoida i antocijana te polimerna boja sokova od višnje sa dodatkom šećera

Uzorci	Ukupni fenoli (µg GAE/mL)	Ukupni flavonoidi (µg CE/mL)	Antocijani (µg/mL)	Polimerna boja (%)
Nakon pripreme				
Sok	1222,33 ± 53,06	462,95 ± 21,16	141,14 ± 4,71	35,76 ± 0,56
Sok + G	1350,76 ± 28,51	474,84 ± 38,86	135,26 ± 6,33	36,06 ± 0,68
Sok + S	1275,15 ± 20,45	413,79 ± 21,66	132,01 ± 3,73	36,06 ± 1,85
Nakon skladištenja				
Sok	937,72 ± 7,99	364,52 ± 17,07	8,71 ± 0,27	74,09 ± 0,30
Sok + G	450,96 ± 28,69	512,54 ± 20,42	19,43 ± 0,67	78,67 ± 2,40
Sok + S	753,40 ± 10,77	595,60 ± 39,10	27,12 ± 1,00	78,71 ± 0,22

G- glukoza; **S**-saharoza

Udio antocijana u kontrolnom uzorku, nakon pripreme, iznosi je oko 141,14 µg/mL. U uzorcima s dodatkom glukoze i saharoze je bio nešto niži, 135,26 i 132,01µg/mL.Udio antocijana u kontrolnom uzorku znatno se smanjio nakon skladištenja od 7 mjeseci na sobnoj temperaturi. Kontrolni uzorak, odnosno čisti sok imao je najmanji udio antocijana, 8,71 µg/mL. Uzorci s dodatkom glukoze i saharoze imali su znatno veći udio antocijana u odnosu na kontrolni uzorak, 19,43 µg/mL i 27,12 µg/mL.

Udio polimerne boje u uzorcima nakon pripreme iznosio je oko 36%. Udio polimerne boje se je povećao skladištenjem uzoraka. Tako se taj udio duplo povećao skladištenjem soka tijekom 7 mjeseci na sobnoj temperaturi. Postotak polimerne boje imao je čisti sok (kontrolni uzorak) te je iznosio 74,09%. Dodatkom glukoze i saharoze postotak polimerne boje se je se također povećao,oko 78%.

4.2. Antioksidativna aktivnost

Epidemiološke studije su pokazale jasnu pozitivnu povezanost između unosa voća i povrća i smanjenog broja srčanih bolesti, tumora i drugih degenerativnih bolesti kao i usporavanja starenja (Skupien i Oszmainski, 2004.). Sa povećanjem eksperimentalnih, kliničkih i epidemioloških podataka koji pokazuju pozitivne efekte antioksidanasa, njihova važnost i uloga poprimaju novu pozornost (Shi i sur., 2001.). Osim nutritivnih i senzorskih svojstava, hrana, a posebno neki njezini sastojci imaju zaštitnu ulogu. Posebno je to slučaj s hranom koja

sadrži prirodne antioksidanse (Thomas, 1995.). Polifenoli, ispitivani u ovom radu, dobar su izvor antioksidanasa.

Tablica 4 Antioksidativna aktivnost (mmol TE/100 mL) sokova od višnje s dodatkom šećera

Uzorci	ABTS	DPPH	FRAP
Nakon pripreme			
Sok	12,62 ± 0,20	4,25 ± 0,10	9,12 ± 0,13
Sok + G	11,63 ± 0,11	5,68 ± 0,11	8,07 ± 0,55
Sok + S	10,31 ± 0,50	5,42 ± 0,26	6,65 ± 0,23
Nakon skladištenja			
Sok	7,46 ± 0,28	3,08 ± 0,05	4,89 ± 0,14
Sok + G	11,52 ± 0,48	4,50 ± 0,11	6,33 ± 0,24
Sok + S	11,41 ± 0,62	4,65 ± 0,16	6,79 ± 0,37

G - glukoza; **S** - saharoza

Tablica 4prikazuje rezultate antioksidativne aktivnosti u različitim uzorcima soka od višnje dobivene pomoću tri različite metode (ABTS, DPPH, FRAP). Rezultati antioksidativne aktivnosti su izraženi preko trolox-a kao standarda.

Mjerenjem antioksidativne aktivnosti nakon pripreme najveće vrijednosti su dobivene ABTS metodom. Nakon pripreme uzoraka, antioksidativna aktivnost izmjerena ABTS metodom u kontrolnom uzorku iznosila je 12,62 µmol TE/100 mL. U uzorcima s dodatkom šećera antioksidativna aktivnost je bila niža, 11,63 i 10,31 µmol TE/100 mL. Rezultati dobiveni DPPH metodom su najmanji pa je tako vrijednost antioksidativne aktivnosti za kontrolni uzorak iznosila 4,25 µmol TE/100 mL, a za sok s dodatkom šećera oko 5,5 µmol TE/100 mL. FRAP metodom antioksidativna aktivnost kontrolnog uzorka je najveća i iznosi 9,12 µmol TE/100 mL, a kod soka s glukozom i saharozom pokazuje manje vrijednosti, 8,02 i 8,85 µmol TE/100 mL.

Mjerenja obavljena nakon što je uzorak bio skladišten 7 mjeseci na sobnoj temperaturi pokazuju obrnute rezultate za ABTS i FRAP metodu, naspram mjerenja obavljenih nakon pripreme uzoraka. Naime, kontrolni uzorci sada imaju manju vrijednost antioksidativne aktivnosti nego uzorci s dodanim šećerom. ABTS metodom određeno je da antioksidativna aktivnost kontrolnog uzorka iznosi 7,46 µmol TE/100 mL što je puno manje od vrijednosti dobivene mjerenjem antioksidativne vrijednosti soka u koji je dodan šećer. Dodatkom šećera u sok, vrijednosti antioksidativne aktivnosti iznosilesu oko 11,5 µmol TE/100 mL. Nešto manji rezultati dobiveni su FRAP metodom gdje se vrijednost antioksidativne aktivnosti povećava

dodatkom šećera u uzorak te tako iznosi kod kontrolnog uzorka 4,89 µmol TE/100 mL, kod uzorka s glukozom 6,33 µmol TE/100 mL, a kod uzorka s dodanom saharozom 6,79 µmol TE/100 mL. Najmanje vrijednosti dobivene su DPPH metodom gdje je antioksidativna aktivnost za kontrolni uzorak 3,08 µmol TE/100 mL. Veće vrijednosti antioksidativne aktivnosti imaju sokovi s dodanim šećerima pa tako vrijednost antioksidativne aktivnosti uzorka s dodanom glukozom iznosi 4,50 µmol TE/100 mL, a kod uzorka s dodanom saharozom iznosi 4,65 µmol TE/100 mL.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivan je utjecaj dodatka šećera glukoze i saharoze u sok višnje na udio fenola, flavonoida, antocijana te polimernu boju i antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost mjerena je pomoću tri metode (ABTS, DPPH i FRAP). Mjerenja su određena u soku nakon pripreme te u soku koji je skladišten 7 mjeseci na sobnoj temperaturi. Tim paralelnim ispitivanjem, uspoređivani su dobiveni rezultati te je omogućeno praćenje djelovanja dodanih šećera u sok prije i nakon skladištenja, na sve navedene parametre.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

- Dodatkom šećera (glukoze i saharoze) u sok od višnje udio fenolnih spojeva povećao se je nakon pripreme uzoraka. Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja udjela fenola, s time da je najmanje smanjenje utvrđeno u kontrolnom uzorku.
- Nakon pripreme uzoraka udio antocijana u svim uzorcima je bio isti. Iako se udio antocijana smanjuje nakon stajanja kroz određeno vrijeme, glukoza i saharoza pospješuju očuvanje određenog udjela antocijana.
- Antioksidativna aktivnost mjerena ABTS metodom, nakon pripreme uzorka se smanjila dodatkom šećera. Istim mjerenjem se antioksidativna aktivnost smanjila i nakon skladištenja uzoraka tijekom 7 mjeseci na sobnoj temperaturi, ali uzorci s dodatkom šećera imaju veće vrijednosti antioksidativne aktivnosti.
- FRAP metodom, antioksidativna aktivnost se smanjuje dodatkom glukoze i saharoze u ispitivani uzorak soka, nakon pripreme. Nakon skladištenja uzorka, vrijednost antioksidativne aktivnosti je veća u uzorcima s dodatkom šećera.
- Primjenom DPPH metode, dobiven je drugačiji trend u odnosu na ABTS i FRAP metode. Antioksidativna aktivnost mjerena DPPH metodom nakon pripreme uzoraka je bila najviša u uzorku s dodatkom glukoze. Nakon skladištenja uzorci s dodatkom šećera imali su veće vrijednosti antioksidativne aktivnosti.

6. LITERATURA

Adams JB: Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3 glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100.deg. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 24, 747-762, 1973.

Babić J: Utjecaj acetiliranja i dodataka na reološka i termofizikalna svojstva škroba kukuruza i tapioke. Disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

Brouillard R: Chemical structure of antocyanins. U *Antocyanins as Food Colors*, Academic Press Inc., New York, 1982.

Choi Y, Cho KW, Jeong K, Jung S: Molecular dynamics simulations of trehalose as a 'dynamic reducer' for solvent water molecules in the hydration shell. *Carbohydrate Research,* 341, 1020–1028, 2006.

Ćujić N, Kundaković T, Šavikin T: Antocijani-Kemijska analiza i biološka aktivnost. *Lekovite sirovine*, 33, 19-37, 2013.

Dao LT, Takeoka GR, Edwards RH, Berrios JDJ: Improved method for the stabilization of anthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:3564-3569, 1998.

De Pascual TS, Sanchez BS: Anthocyanins, from plant to health. *Phytochemistry Reviews*, 7, 281 299, 2008.

Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O: Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains-Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Journal of Food Science and Nutrition*, 40(3), 173–289, 2000.

Francis J: Food colorants: anthocyanins. *Food Science and nutrition*, 28:273-314, 1989.

Giusti MM, Rodriguez-Saona LE, Wrolstad RE: Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food* Chemistry, 47:4631-4637, 1999.

Gharras, HE: Polyphenols: food sources, properties and applications. *International Journal of Food Science and Technology,* 44:2512–2518, 2009.

Gordon MH: The development of oxidative rancidity in foods. U *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing Ltd, 2001.

Gould K, Davies K, Winefield C (2009.): Anthocyanins, Biosynthesis, Functions and Applications, Springer.

Heinonen IM, Meyer AS, Frankel EN: Antioxidant activity of berryphenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 46(10), 4107–4112, 1998.

Hakkinen S: Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. *Disertacija*. Kuopio University, Finland, 2000.

Hollman PC, Bijsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB: The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research,* 31:569–573, 1999.

Huang HT: Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3: 141-146, 1955.

Huang HT: The kinetics of the decolorization of anthocyanins by fungal anthocyanase. *Journal of the American Chemical Society*, 78: 2390-2393, 1956.

Jackman RL, Yada RY, Tung MA, Speers RA: Anthocyanins as food colorants. *Journal of Food Biochemistry*, 11:201-247, 1987.

Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

Katalinić V: Kemija mediteranskog voća i tehnologija prerade. Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2006.

Kaur C, Kapoor HC: Antyoxidants in fruits and vegetables – the millennium's Health. Review. *Interernational Journal of Food Science and Technology*, 36:703-725, 2001.

Kopjar M: Utjecaj dodatka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda. *Disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

Krifi B, Chouteau F, Boudrant J, Metche M: Degradation of anthocyanins from blood orange juices. *International Journal of Food Science and Technology,* 35:275-283, 2000.

Maccarone E, Maccarrone A, Rapisarda P: Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *Journal of Food Science*, 50: 901-904, 1985.

Mattila P, Hellström J, Törrönen R: Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7193-7199, 2006.

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

Naczk M, Shahidi F: Phenolics in cereal, fruits and vegetables: Occurrence extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542. 2006.

Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, i sur.: Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International,* 41, 274–285, 2008.

Poei-Langston MS, Wrolstad RE: Color degradation in an ascorbic acid anthocyaninflavanol model system. *Journal of Food Science*, 46:1218-1236, 1981.

Rastija V, Medić-Šarić M: Kromatografske analize polifenola. *Kemija u industriji.* 58(3), 121-128, 2009.

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

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acid. *Free Radical Biology and Medicine,* 20, 56-396, 1996.

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.

Torronen, R., 2000: Flavonols and ellagic acid in berries. *Recent Advances in Agricultural and Food Chemistry*, 1:31-37.

Van Acker SABE, De Groot MJ, van den Berg DJ, Tromp MNJL, den Kelder GDO, van der Vijgh WJF, Bast A: A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoid. *Chemical Research in Toxicology*, 9:1305–1312, 1996.

Van Dijak P, Colavizza D, Smet P, Thevelein JM: Diferential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermentong Saccharomyces cerevisiae cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 109-115, 1995.

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.

Von Elbe JH, Schwartz SJ: Colorants. U *Food Chemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.

Web 1 http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/vocarstvo/vocne-vrste/visnja

Web 2 http://www.scribd.com/doc/207918742/Vi%C5%A1nja

Web 3 http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=glukoza

Web 4 https://hr.wikipedia.org/wiki/Saharoza#/media/File:Sucrose-inkscape.svg