

Adsorpcija polifenola soka aronije na proteine smeđe riže: Utjecaj koncentracije polifenola

Heric, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:109:470460>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



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

Lea Heric

**ADSORPCIJA POLIFENOLA SOKA ARONIJE NA PROTEINE SMEĐE
RIŽE: UTJECAJ KONCENTRACIJE POLIFENOLA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za tehnologiju voća i povrća
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Razvoj proizvoda u prehrambenoj industriji
Tema rada je prihvaćena na 12. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 27. svibnja 2022.
Mentor: prof. dr. sc. *Mirela Kopjar*
Pomoć pri izradi: *Dr. sc. Indira Kosović*

Adsorpcija polifenola soka aronije na proteine smeđe riže: Utjecaj koncentracije polifenola

Lea Heric, 0113144753

Sažetak: Provedena je adsorpcija polifenola iz soka aronije na proteine smeđe riže koji su u postupku mikroenkapsulacije služili kao nosači. Količina proteina riže bila je konstantna, a mijenjala se je koncentracija polifenola u soku aronije. Pripremljenim kompleksima određen je udio adsorbiranih polifenola, proantocijanidina i antocijana. Određena je i antioksidacijska aktivnost pomoću DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode, parametri boje dobivenih kompleksa, te nastale strukturne promjene na proteinima riže pomoću IR spektra. Najveći udio adsorbiranih polifenola, proantocijanidina i antocijana, ali i pojedinačnih polifenola utvrđen je u uzorku RP/A (uzorak pripremljen sa sokom s najvećim udjelom polifenola), dok je najmanji udio bio kod uzorka RP/A 1:4 (uzorak pripremljen sa sokom s najmanjim udjelom polifenola). Adsorpcija (odnosno adsorpcijski kapacitet) polifenola bila je najveća kod uzoraka pripremljenih sa sokom s manjim početnim udjelom polifenola. Adsorpcijom polifenolnih komponenti iz soka aronije na proteine riže utvrđena je značajna promjena boje. FTIR-ATR analizom uočene su strukturne promjene na kompleksima u odnosu na čisti protein smeđe riže zbog vezanja komponenta iz aronije.

Ključne riječi: Aronija, polifenoli, adsorpcija, proteini smeđe riže, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 51 stranica
16 slika
13 tablica
0 priloga
35 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

- | | |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Anita Pichler</i> | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Mirela Kopjar</i> | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. <i>Nela Nedić Tiban</i> | član |
| 4. prof. dr. sc. <i>Daniela Čačić Kenjerić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 13. srpnja. 2023.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technologies
Subdepartment of Fruit and Vegetable Technology
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Product development in the food industry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XII held on (May 27, 2022).

Mentor: *Mirela Kopjar*, PhD, prof.

Technical assistance: *Indira Kosović*, PhD

Adsorption of Chokeberry Phenolics on Brown Rice Proteins: Influence of Concentration of Polyphenols

Lea Heric, 0113144753

Summary: The adsorption of polyphenols from chokeberry juice on brown rice proteins, which served as carriers in the microencapsulation process, was carried out. The amount of rice protein was constant, while the concentration of polyphenols in juice changed. The content of adsorbed polyphenols, proanthocyanidins and anthocyanins was determined on the prepared complexes. Antioxidant activity was determined using DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC methods, the color parameters of the obtained complexes and structural changes in rice proteins were determined using IR spectra. The highest proportion of adsorbed polyphenols, proanthocyanidins and anthocyanins, as well as individual polyphenols, was determined in the RP/A sample (sample prepared with the highest initial concentration of polyphenols), while the lowest proportion was in the RP/A 1:4 sample (the sample prepared with the lowest concentration of polyphenols). Adsorption (i.e. adsorption capacity) of polyphenols was highest in samples prepared with juice with a lower initial concentration of polyphenols. Adsorption of polyphenolic components from chokeberry juice onto rice proteins revealed a significant colour change. FTIR-ATR analysis showed structural changes in the complexes compared to the pure protein of brown rice due to the binding of chokeberry components.

Key words: Chokeberry, polyphenols, adsorption, brown rice proteins, antioxidant activity

Thesis contains: 51 pages
16 figures
13 tables
0 supplements
35 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Anita Pichler</i> PhD, prof. | chair person |
| 2. <i>Mirela Kopjar</i> PhD, prof. | supervisor |
| 3. <i>Nela Nedić Tiban</i> PhD, prof. | member |
| 4. <i>Daniela Čačić Kenjerić</i> PhD, prof. | stand-in |

Defense date: July 13 2023

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

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Kopjar na susretljivosti i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Indiri Kosović na pomoć i strpljivosti prilikom rada u laboratoriju.

Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama što su studiranje učini lakšim i zabavnijim, te što su uvijek bili puni podrške i razumijevanja.

I za kraj, najveće hvala mojoj obitelji, za sve!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Aronija	4
2.1.1. Morfološke osobine aronije	4
2.1.2. Kemijski sastav aronije	5
2.1.2.1 Polifenoli	5
2.2. Antioksidansi i slobodni radikali	10
2.3. Interakcije polifenola i proteina	14
2.3.1. Mehanizam nastanka reakcija	14
2.3.2. Parametri koji utječu na interakcije između proteina i polifenola	17
2.3.3. Metode za istraživanje interakcija polifenol-protein	17
2.3.4. Mikroenkapsulacija	18
2.4. Proteini riže	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Zadatak	24
3.2. Materijal i metode	25
3.2.1. Priprema bioaktivnih dodataka hrani	25
3.2.2. Metode	26
3.2.2.1 Uzorci za analizu	26
3.2.2.2 Određivanje pH	26
3.2.2.3 Određivanje ukupnih polifenola	27
3.2.2.4 Određivanje proantocijanidina	27
3.2.2.5 Određivanje monomernih antocijana	27
3.2.2.6 Određivanje antioksidacijske aktivnosti	28
3.2.2.7 Određivanje parametara boje	29
3.2.2.8 Određivanje polifenola primjenom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)	30
3.2.2.9 FTIR-ATR analiza	31
3.2.2.10 Statistička analiza podataka	31

4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	33
4.1.	Udio polifenola, antocijanidina i antocijana u enkapsulatima (kompleksima).....	34
4.2.	Antioksidacijska aktivnost kompleksa	39
4.3.	Boja enkapsulata protein riže/aronija	41
4.4.	FTIR-ATR analiza.....	42
5.	ZAKLJUČAK	45
6.	LITERATURA.....	47

Popis oznaka, kratica i simbola

RP protein riže

A sok aronije

RP/A protein riže + aronija

1. UVOD

Aronija (*Aronia melanocarpa*) iznimno je cijenjena biljka, čiji tamnoljubičasti plodovi su bogat izvor nutritivno vrijednih spojeva poput polifenola, vitamina i minerala. Unatoč trpkom okusu svježih bobica, aronija je našla mjesto u prehrani ljudi zbog izrazito povoljnog utjecaja na zdravlje. Neki od pozitivnih učinaka na zdravlje ljudi su smanjenje ukupnog i LDL kolesterola, sniženje krvnog tlaka, kontrola dijabetesa tipa II, zaštita stanica od oksidativnog stresa i jačavanje imunološkog sustava (Kulling i sur., 2008). Upravo su polifenoli kao najzastupljeniji antioksidansi u aroniji odgovorni za njezinu veliku antioksidativnu aktivnost. Antioksidansi su tvari koje hvataju slobodne radikale, te stupajući s njima u reakcije sprječavaju njihovo daljnje negativno djelovanje. Osim toga polifenoli mogu reagirati s metalnim ionima koji su inicijatori oksidacije i na taj način spriječiti ili odgoditi oksidaciju. Na taj način antioksidansi smanjuju oksidativni stres uzrokovan djelovanjem slobodnih radikala, koji može dovesti do oštećenja stanica i tkiva.

Polifenoli u hrani i organizmu često, zbog svoje nestabilnosti, stupaju u interakcije s proteinima. To im omogućava njihova građa zbog koje mogu biti davaoci vodika i tvoriti vodikove veze s karboksilnim skupinama proteina. Kompleksi polifenola i proteina nastaju reverzibilnim (vodikove veze, hidrofobne veze i van der Waalove veze) i ireverzibilnim (kovalentne veze) molekulskim interakcijama. Na taj način možemo sačuvati polifenolne spojeve i povećati njihovu bioiskoristivost, s obzirom na to da su sami po sebi veoma osjetljivi na čimbenike okoline i njihova razgradnja u probavnom traktu traje kratko i nije potpuna (Ozidal i sur., 2013). Ti nedostaci riješeni su primjenom postupka mikroenkapsulacije, koja se provodi da bi se uklonili nedostaci poput slabe biodostupnosti, slabe stabilnosti ili lošeg okusa. Interakcijom polifenola i proteina nastaju kompleksi koji se mogu primijeniti u hrani odnosno kao funkcionalni dodatci.

Cilj ovoga rada bio je pripremiti bioaktivne dodatke hrani, tj. funkcionalni poluproizvod na bazi proteina riže i polifenola iz soka aronije primjenom liofilizacijom. Osim toga cilj je bio utvrditi utjecaj različite koncentracije polifenola u soku aronije na adsorpciju polifenola na protein riže. U tu svrhu na pripremljenim enkapsulatima (kompleksima) određeni su ukupni polifenoli, proantocijanidini, antocijani, antioksidacijska aktivnost, parametri boje, ali i strukturne promjene koje su polifenoli izazvali na proteinima riže.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ARONIJA

Aronia melanocarpa posljednjih je godina izrazito cijenjena i popularna biljka zbog uočenog pozitivnog učinka na zdravlje ljudi. Unatoč vrlo vrijednom nutritivnom sastavu, zbog trpkog i kiselkastog okusa se rijetko konzumira sirova. Stoga su bobice aronije pogodne za preradu u različite prehrambene proizvode poput sokova, sirupa, likera i džemova. Osim toga, zbog velike količine antocijana često se koristi i kao prirodno bojilo (Thi i sur., 2016).

2.1.1. Morfološke osobine aronije

Aronija je višegodišnja listopadna biljka podrijetlom iz istočnih krajeva Sjeverne Amerike, no danas se zbog malih zahtjeva kod uzgoja uzgaja u različitim krajevima. Zbog velike otpornosti na niske temperature i mraz danas se najviše aronije proizvodi u Rusiji, Češkoj, Slovačkoj, Poljskoj te na sjeveru Njemačke i Francuske (Web 1). Pripada porodici ruža (*Rosacea*), a razlikujemo tri vrste bobica: *Aronia melanocarpa* (crna aronija) i *Aronia arbutifolia* (crvena aronija), te hibrid ove dvije vrste *Aronia prunifolia* (ljubičasta aronija). Raste u obliku listopadnog grma 2 do 2,5 metra visine i 2,5 metra širine (Milić, 2011). Biljka počinje cvjetati u svibnju, a plodovi dozrijevaju u kolovozu. Plodovi su tamnoplave bobice, okruglastog oblika prikazani na **Slici 1**. Meso ploda je tamno crvene boje, kiselkasto-trpkog okusa te se stoga rijetko konzumira neprerađena. Zbog visokog sadržaja fenola smatra se izrazito ljekovitom biljkom, a neke od zdravstvenih prednosti su antimutageno, antidijabetsko, antikancerogeno djelovanje te gastroprotektivni, hepatoprotektivni i kardioprotektivni učinci (Kaloudi i sur., 2022).



Slika 1 Plodovi aronije (*Aronia melanocarpa*) (Web 2)

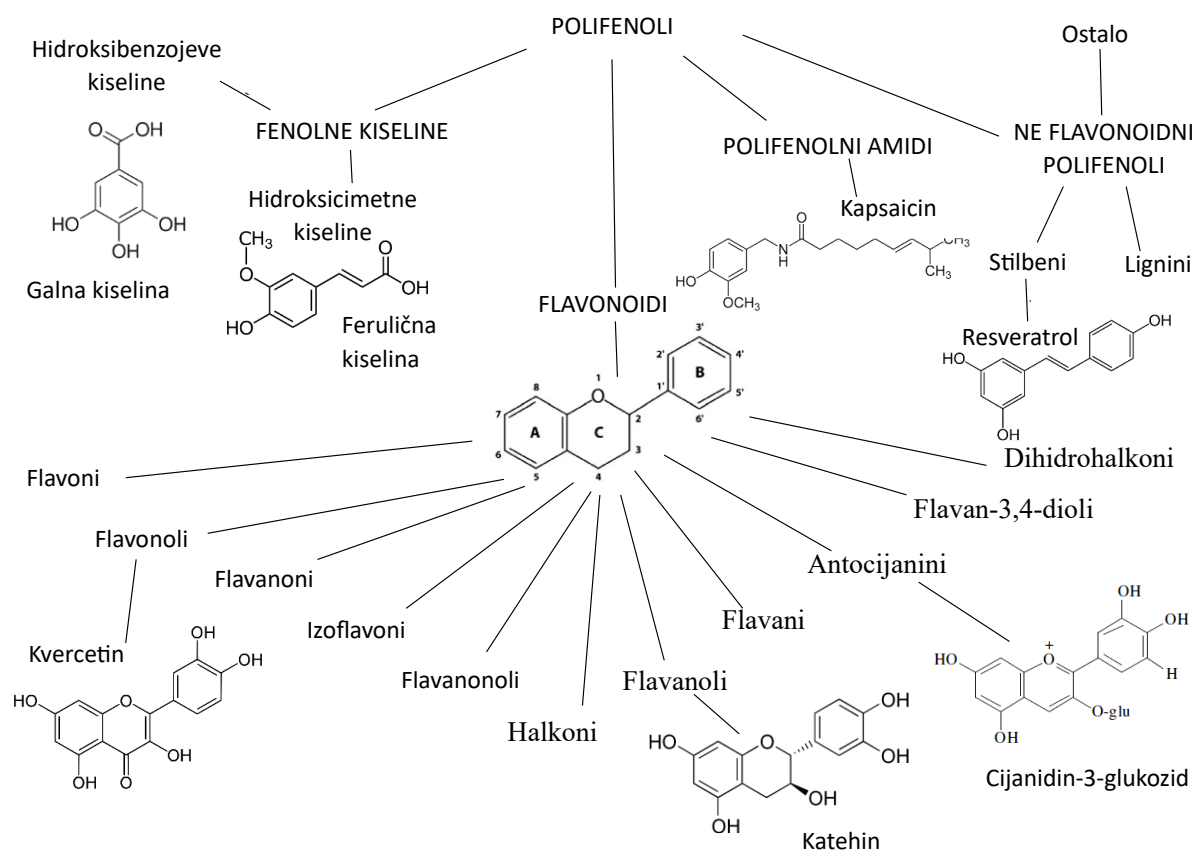
2.1.2. Kemijski sastav aronije

Kemijski sastav aronije ovisi o čimbenicima poput sorte, uvjeta uzgoja i zrelosti ploda. Sadržaj suhe tvari se kreće između 17-29%. Plod aronije izvor je šećera (16-18%), prehrambenih vlakana od čega 0,3-0,6% pektina, organskih kiselina (1-1,5%), malih količina masti i proteina. Sadržaj minerala izražen kao vrijednost pepela iznosi 4,4-5,8 g/kg. Prisutne su značajne količine kalija i cinka. Od vitamina ističu se vitamin C (137 mg/kg) i niacin (3000 µg/kg). Uz to aronija je bogata fenolnim spojevima, koji najviše pridonose njezinom pozitivnim učinku na zdravlje. Od fenola plodovi aronije sadrže značajne količine procijanidina, antocijanina i fenolnih kiselina, a vrijednost ukupnih fenola kreće se od 2010-7849 mg/100 g (Kulling i sur., 2008).

2.1.2.1 Polifenoli

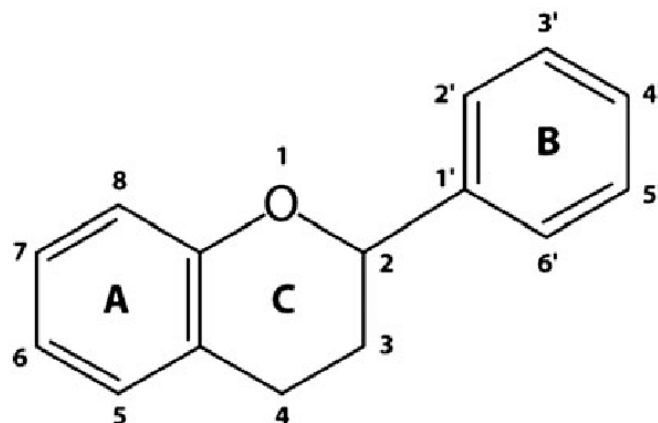
Polifenoli su prirodni organski spojevi koji nastaju kao sekundarni metaboliti u biljkama. Jaki su antioksidansi i potpomažu djelovanje antioksidativnih vitamina i enzima u obrani od oksidativnog stresa. Danas je identificirano preko 8000 polifenolnih spojeva, te unatoč tome što ih karakterizira zajednička fenolna struktura ova skupina spojeva zbog svoje se različitosti dijeli u nekoliko podskupina, što prikazuje **Slika 2**. Klasifikacija polifenola vrši se prema: podrijetlu, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi (Tsao i sur, 2010). Najzastupljenija skupina

polifenola su flavonoidi s preko 4000 identificiranih spojeva. Uz njih najviše su u prirodi zastupljene fenolne kiseline.



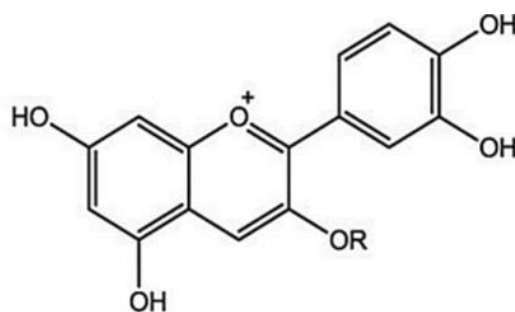
Slika 2 Podjela polifenola (adaptirano prema Tsoo i sur., 2010)

Flavonoidi su spojevi kojima je zajednička flavonoidna jezgra koju prikazuje **Slika 3**, a čini ju 15 ugljikovih atoma koji su povezani u tri fenolna prstena: A, B i C. Prstenovi A i B su fenolne strukture, a ovisno o oksidaciji i stupnju nezasićenosti C prstena flavonoidi se mogu podijeliti u slijedeće podskupine: flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavanonoli, flavani, flavanoli, halkoni, dihidrohalkoni, flavan-3,4-dioli i antocijanidini (Jakobek, 2007). Uglavnom dolaze u obliku glikozida, a vezanjem šećera dobiva se na raznolikosti spojeva. Najčešće se na molekule flavonoida veže glukoza, ali mogu se vezati i arabinoza, galaktoza, glukoramnoza, ramnoza i ksiloza.



Slika 3 Osnovna struktura flavonoida (Pietta, 2000)

Prethodna istraživanja pokazuju nizak udio flavonola u aroniji, svega 1,30% od ukupnih polifenola. Od flavonola najzastupljeniji je kvecertin, dok je kaempferol detektiran u malim količinama ili nije uopće detektiran (Tolić i sur., 2018; Jakobek i sur., 2007). Antocijanini su jedni od najzastupljenijih polifenolnih spojeva u aroniji i čine do 41% od ukupnih polifenola (Jakobek, 2007). To su pigmenti topljivi u vodi, a po strukturi su glikozidi antocijanidina. Antocijanidini su polimetoksi i polihidroksi derivati flavilium kationa, a šest je vrsta antocijanidina značajnih za hranu: cijanidin, delfinidin, pelargonidin, malvidin, peonidin i petunidin. Ovi se aglikoni međusobno razlikuju po broju hidroksilnih i metoksilnih grupa na B prstenu flavilium kationa. Značajan udio antocijanina u aroniji rezultira intenzivnom bojom ploda, jer su ti spojevi odgovorni za tamnocrvene, plave i ljubičaste nijanse. Boja pigmenta se mijenja s promjenom pH, pa tako su u kiselom području pH izraženije crvene nijanse, dok u lužnatom prevladavaju plave, a općenito su antocijanini stabilniji u kiselom pH (Tsao i sur., 2010). Osim pH na stabilnost boje antocijanina utječu i temperatura, koncentracija i struktura antocijanina, kisik, svjetlost, enzimi i drugi sastojci prisutni u matriksu hrane. Udio antocijanina najviše ovisi o genotipu, no ovisi i o stupnju zrelosti te uvjetima uzgoja (Kulling i sur., 2008). Wu i sur. (2004) navode da je u aroniji identificirano 8 različitih antocijanina, od čega su dominantni glikozidi cijanidina i to cijanidin-3-*o*-galaktozid i cijanidin-3-*o*-arabinozid koji čine više od 90% ukupnih antocijanina, a slijede ih cijanidin-3-*o*-glukozid i cijanidin-3-*o*-ksilozid (Jakobek i sur., 2007; Tolić i sur., 2015), a njihova građa prikazana je na **Slici 4**.



R=galaktoza cijanidin-3-galaktozid

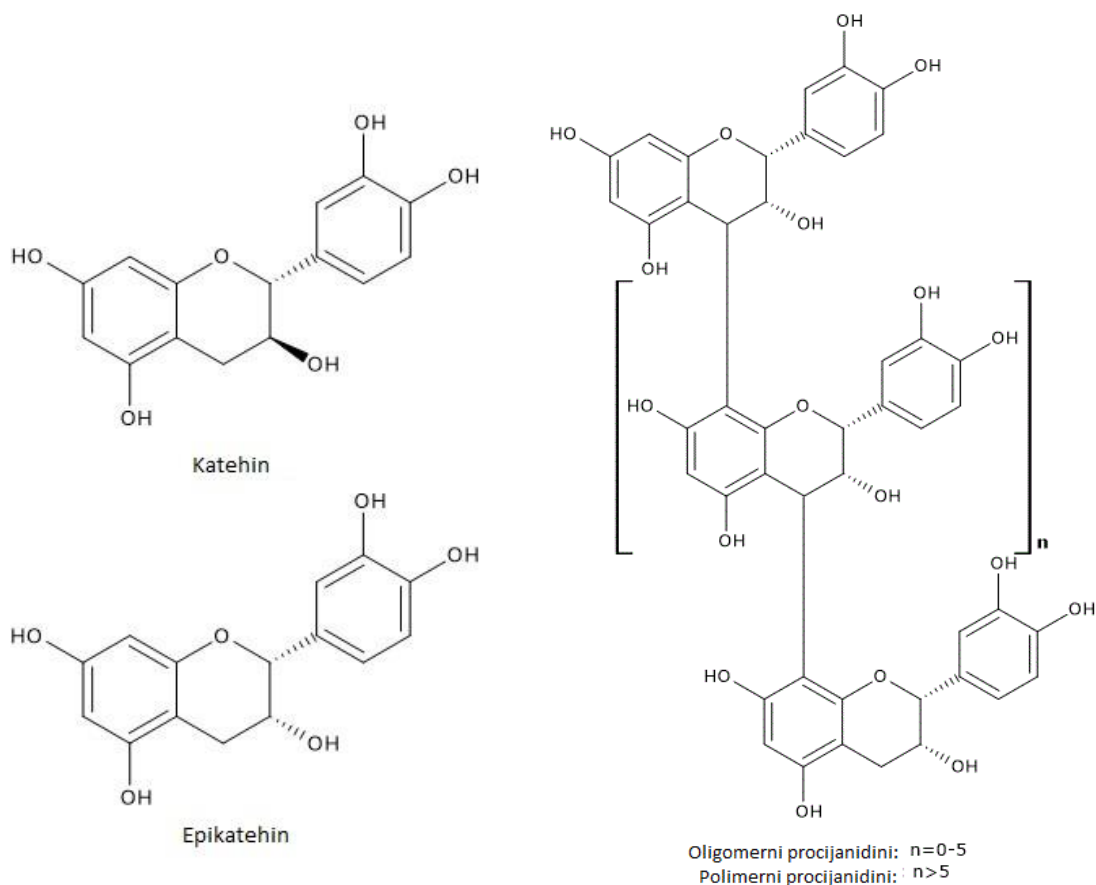
R=arabinoza cijanidin-3-arabinozid

R=ksiloza cijanidin-3-ksilozid

R=glukoza cijanidin-3-glukozid

Slika 4 Struktura glikozida cijanidina (Kulling i sur., 2008)

Najzastupljeniji polifenolni spojevi u aroniji su proantocijanidini sa 66% od ukupnih polifenola (Oszmianski i sur., 2005). To su polimerne molekule, velike molekularne težine koje nastaju povezivanjem monomernih molekula flavanola – katehina i epikatehina. Katehin je učestali naziv za flavanol-3-ole, koji se u strukturi razlikuju od većine flavonoida jer ima dva kiralna C atoma što omogućuje postojanje četiri dijastereoizomera. Katehin je izomer sa trans, a epikatehin sa cis konfiguracijom što prikazuje **Slika 5**. Svaki od njih ima dva stereoizomera (-)-epikatehin, (+)-epikatehin, (-)-katehin i (+)-katehin. Kiselinskom hidrolizom proantocijanidina nastaju antocijanidini (Tsao, 2007).

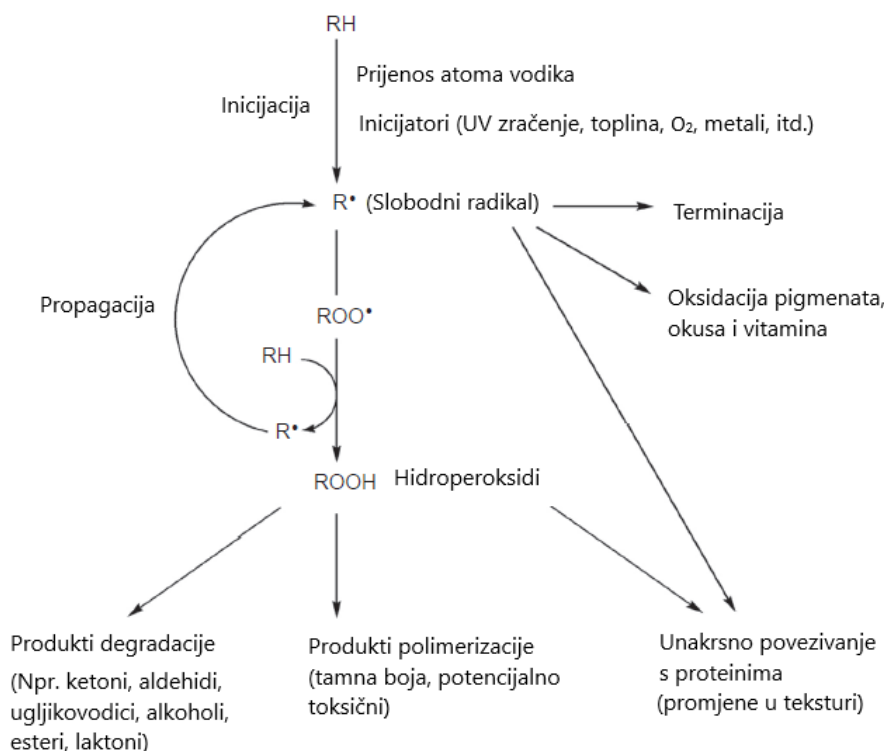


Slika 5 Struktura katehina, epikatehina i procijanidina (Tsao i sur., 2010)

Fenolne kiseline su prema strukturi neflavonoidni polifenolni spojevi, koji se mogu podijeliti u dvije velike skupine, derivate benzojeve (hidroksibenzojeve kiseline) ili cimetne kiseline (hidroksicimetne kiseline). Najčešće hidroksibenzojeve kiseline su *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska i protokatehinska kiselina, galna i elaginska, dok su najčešće hidroksicimetne kiseline *p*-kumarinska, kafeinska, ferulična i sinapinska kiselina. U prirodi se češće pojavljuju hidroksicimetne kiseline. Obje skupine fenolnih kiselina najčešće dolaze u obliku različitih konjugata, dok prisutnost slobodnih oblika uglavnom ukazuje na enzimsku ili kemijsku hidrolizu (Jakobek, 2007). U aroniji udio fenolnih kiselina iznosi 7,5% od ukupnih polifenola, a najzastupljenije su klorogenska, neoklorogenska i *p*-kumarinska kiselina, a najmanje je zastupljena galna kiselina (Kullig i sur., 2008; Tolić i sur., 2018).

2.2. ANTIOKSIDANSI I SLOBODNI RADIKALI

Antioksidans može biti definiran kao bilo koja tvar koja: „značajno inhibira ili odgađa oksidaciju nekog supstrata iako prisutna u koncentraciji manjoj od supstrata“ (Jakobek, 2007). Antioksidansi djeluju tako da neutraliziraju slobodne radikale donirajući im svoj elektron ili tako da inhibiraju stvaranje slobodnih radikala. Slobodni radikali su molekule koje u vanjskoj elektronskoj ljusci imaju nesparen elektron kojeg mogu donirati ili ga uzeti od druge molekule kako bi postigli svoju stabilnost. Iz tog razloga su visoko reaktivni, te imaju kratko vrijeme poluživota (10^{-6} sekundi ili manje) (Young, 2001). Najvažniji slobodni radikali su derivati kisika: superoksidni (O_2^-), hidroksilni (OH^-), hidroperoksidni (HOO^-), peroksidni (ROO^-) i aloksilni (RO^-) radikali. U nastojanju da se stabiliziraju slobodni radikali brzo stupaju u reakcije, a napadnuta molekula sama postaje novi slobodni radikal te tako pokreće niz lančanih reakcija koje prikazuje **Slika 6**. Te reakciju mogu biti inicirane svjetlošću, temperaturom, metalima, metaloproteinima, enzimima i mikroorganizmima. Oksidacija supstrata slobodnim radikalima odvija se u tri faze: inicijacija (nastajanje slobodnih radikala), propagacija i terminacija (nastajanje neradikalnog produkta, koji dalje ne stupa u reakcije) (Shahidi i sur., 2015). Lančana reakcija se odvija tako dugo dok se ne spoje dva slobodna radikala u stabilan produkt ili dok slobodnom radikalumu antioksidans ne preda svoj nesparesni elektron. Slobodni radikali nastaju u normalnim procesima metabolizma, no neki uvjeti okoline poput ultraljubičastog zračenja, zagađenja zraka i dima cigareta mogu dovesti do dodatnog nastajanja slobodnih radikala (Young, 2001). Ukoliko nastane neravnoteža između nastajanja slobodnih radikala i antioksidativne obrane dolazi do oštećenja staničnih membrana ili oksidacije drugih staničnih komponenti. Na taj način slobodni radikali mogu uzrokovati promjene u stanici i oštećenje tkiva, te pridonijeti razvoju različitih bolesti.



Slika 6 Opća shema oksidacije nezasićenih lipida i njihovih produkata (Shahidi i sur., 2015)

Jakobek (2007) navodi kako je ljudski organizam razvio sustav antioksidativne obrane kako bi spriječio negativno djelovanje slobodnih radikala. Prvu liniju obrane čine enzimi, proteini i polifenoli koji vežu ione metala, reduciraju perokside i hvataju pojedinačne molekule kisika. Drugu liniju obrane čine antioksidansi koji hvataju slobodne radikale i doniraju im jedan elektron, ometajući tako fazu propagacije, ali sami ne stupaju u nove lančane reakcije jer su nisko reaktivni. U taj tip antioksidansa spadaju vitamin E i C, karotenoidi i flavonoidi. Treću liniju obrane čine enzimi koji popravljaju oksidativna oštećenja nastala na lipidima, proteinima i molekulama DNA. S obzirom na mehanizam djelovanja antioksidansi se mogu podijeliti u primarne, sekundarne i sinergiste. Primarni antioksidansi djeluju tako da neutraliziraju slobodne radikale HAT ili SET mehanizmom i stvaraju stabilne produkte. Kod HAT (hydrogen atom transfer) mehanizma antioksidans prenosi vodikov ion na slobodni radikal, a kod SET prenosi slobodan elektron. Sekundarni antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale tako što smanjuju brzinu inicijacije npr. inaktivacijom metala, hvatanjem kisika ili razgradnjom peroksida. Kopjar (2007) navodi da je uobičajeno da sekundarni antioksidansi pokazuju

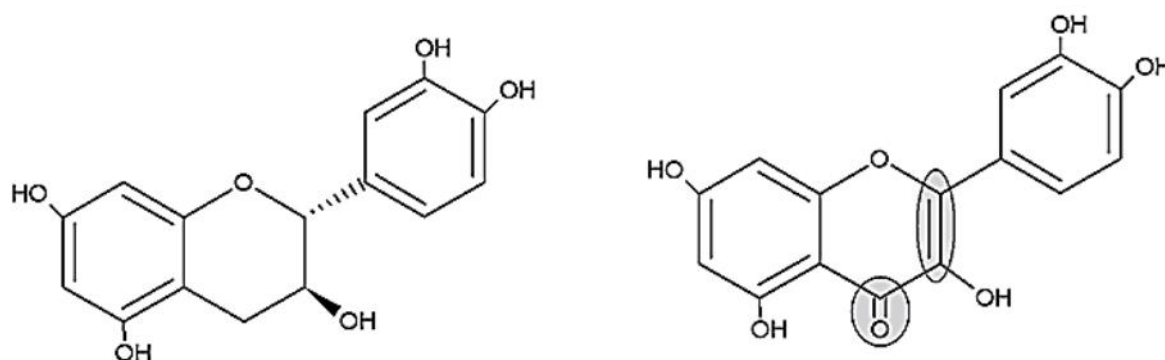
antioksidativno djelovanje samo u prisutnosti neke druge manje komponente. Sinergizam je moguć kod tvari koje imaju različit mehanizam djelovanja, tada takav sustav ima znatno jače antioksidativno djelovanje nego što bi imali individualni antioksidansi. **Tablica 1** prikazuje podjelu antioksidansa prema mehanizmu djelovanja.

Tablica 1 Mehanizam antioksidativne aktivnosti (Kopjar, 2007)

Skupina antioksidanasa	Mehanizam antioksidativne aktivnosti	Primjer antioksidansa
Pravi antioksidansi	Inaktivacija slobodnih radikala lipida	Fenolne tvari
Stabilizatori hidroperoksida	Sprječavanje raspada hidroperoksida na slobodne radikale	Fenolne tvari
Sinergisti	Poboljšavaju aktivnost pravih antioksidansa	Limunska kiselina, askorbinska kiselina
Metalni helatori	Vežu teške metale u inaktivne komponente	Fosforna kiselina, tvari nastale u Maillard-ovim reakcijama, limunska kiselina
Tvari za vezivanje singelton kisika	Transformiraju singlet kisik u triplet	Karoteni
Tvari koje reduciraju hidroperokside	Reduciraju hidroperokside bez stvaranja slobodnih radikala	Proteini, aminokiseline

Istraživanja pokazuju da aronija ima najveću antioksidativnu aktivnost među voćem (Jakobek i sur., 2007; Grunovaite i sur., 2016). Aronija ima visok TAC (total antioxidant capacity) i RP (reducing power). Polifenoli svoju antioksidacijsku aktivnost temelje na više mehanizama, no najveći dio se temelji na sposobnosti hvatanja slobodnih radikala. To se još naziva antiradikalna aktivnost. Mehanizam se temelji na redoks svojstvima polifenola. Oni mogu donirati elektron slobodnom radikalu, djelujući pri tom kao reducens, a radikal polifenola koji nastane je stabilna molekula i ne nastavlja lančanu reakciju. Na antiradikalnu aktivnost polifenola utječe kemijska struktura i orijentacija grupa koje su povezane na osnovnu

flavonoidnu molekulu, posebno broj i pozicija hidroksilnih grupa i struktura substituenta na aromatskom prstenu. Tako na primjer hidroksilne grupe ukoliko su povezane dvostrukom vezom na aromatski prsten pridonose većoj antioksidativnoj aktivnosti. Kao primjer Minatel i sur. (2017) navode katehin i kvecertin koji imaju isti broj hidroksilnih skupina na istim pozicijama, ali je kod kvecertina prisutna 2,3-dvostruka veza na C prstenu i 4-okso funkcija, što prikazuje **Slika 7**. Struktura kvercetina ima veći ekvivalent antioksidacijskog djelovanja ako se usporedi sa zasićenim heterocikličkim prstenom katehina.

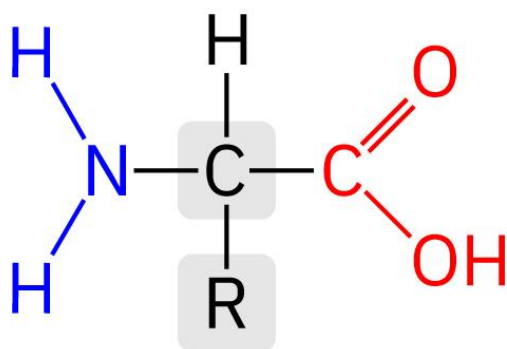


Slika 7 Usporedba strukture katehina i kvercetina (Minatel i sur., 2017)

Od fenolnih kiselina najzastupljenija je *p*-kumarinska, a od flavonola kvecertin. Antocijanima i proantocijanidinima koji u svojoj strukturi sadrže *o*-dihidroksifenilne skupine se njihova antioksidacijska aktivnost pripisuje zbog sposobnosti keliranja s metalima poput Fe^{3+} i Cu^{2+} . Oni su skloni stvaranju kopigmenata s metalima, i na taj način je prisutno manje iona metala koji mogu biti prekursori oksidacije, samim time usporeno je nastajanje slobodnih radikala (Kulling i sur., 2008). Kaloudi i sur. (2022) navode kako većina polifenolnih komponenata izoliranih iz aronije sadrže kateholni hidroksil pa zbog svoje strukture imaju povišenu antiradikalnu aktivnost.

2.3. INTERAKCIJE POLIFENOLA I PROTEINA

Polifenoli kojima obiluje aronija nastaju sintezom biljaka kao produkt njihovih obrambenih mehanizama, te se zbog pozitivnog utjecaja na zdravlje koriste u prehrambenim, kozmetičkim i drugim industrijama. Polifenoli su građeni od jedne ili više -OH skupina vezanih na aromatski prsten, te upravo zbog te građe stupaju u interakcije s proteinima, a kao rezultat toga dolazi do promjena svojstava obiju komponenata. Proteini su makromolekule nastale međusobnim povezivanjem α -aminokiselina peptidnom vezom. Građa α -aminokiselina, prikazana na **Slici 8**, sastoji se od α -ugljikovog atoma koji je kovalentno vezan s amino skupinom, karboksilnom skupinom, specifičnom R-skupinom (aminokiselinski ogranak ili pobočni lanac) i vodikovim atomom. Svojstva aminokiselina ovise o R-skupini (Fennema, 1996).

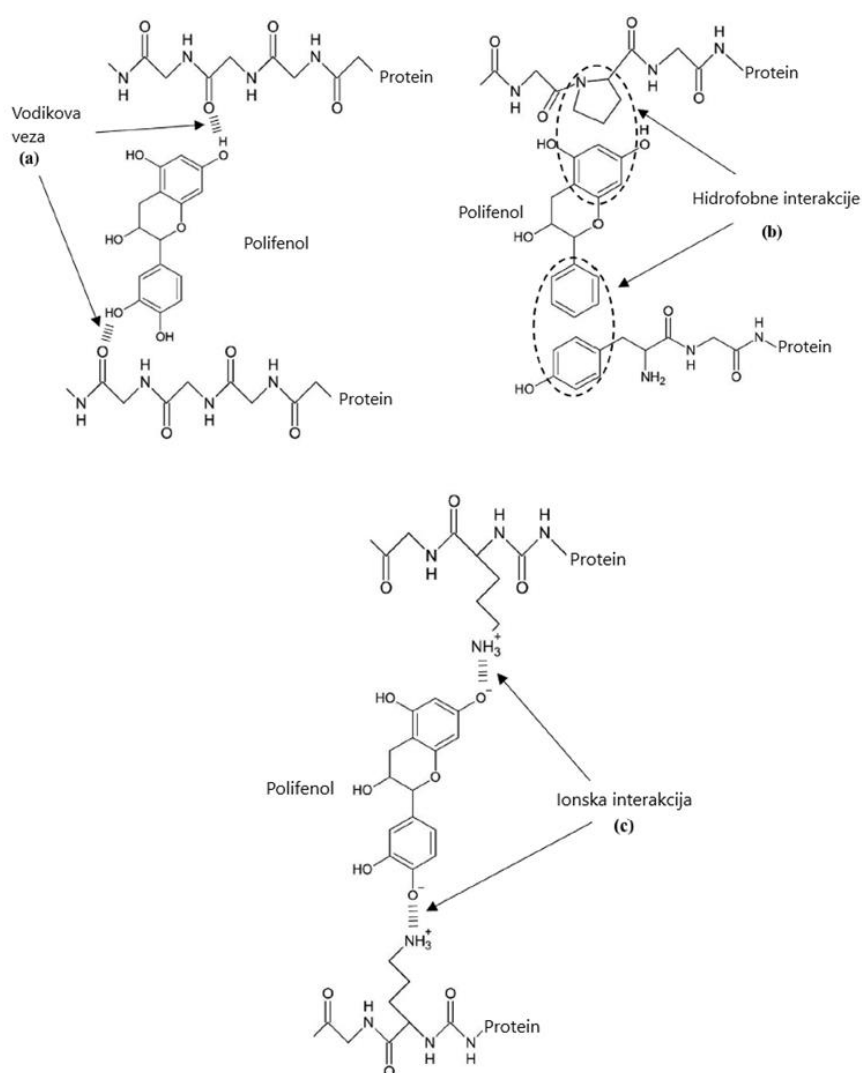


Slika 8 Građa aminokiseline (Web 3)

2.3.1. Mehanizam nastanka reakcija

Polifenoli mogu stupati u komplekse s proteinima ireverzibilno i reverzibilno. Reverzibilne interakcije su nekovalentne prirode i obuhvaćaju vodikovu vezu, hidrofobne veze i van der Waalsove interakcije. Ireverzibilne reakcije podrazumijevaju kovalentne veze ili enzimske reakcije (Ozidal i sur., 2013). Do nastanka kovalentnih i nekovalentnih veza između proteina i polifenola dolazi zbog kemijskih ili enzimskih reakcija. Nastajanje konjugata povezivanjem preko nekovalentnih veza se rjeđe odvija jer su takve interakcije reverzibilne i slabije od kovalentnih. Najčešće dolazi do hidrofobnih interakcija, nastajanja vodikovih ili ionskih veza

što je prikazano na **Slici 9**. Do interakcija dolazi prvenstveno zbog svojstva polifenola da su izvrsni donori vodika, pa tako mogu tvoriti vodikove veze se karbonilnom skupinom proteina. Također vodikova veza može nastati između hidroksilne skupine polifenola i hidroksilne ili amino skupine proteina. Hidrofobne interakcije nastaju interakcijom hidrofobnih aminokiselina (leucin, izoleucin, glicin, metionin, alanin, fenilalanin, tirozin, cistein, triptofan) s nepolarnim aromatskim prstenom polifenola. Ionske interakcije nastaju kada pozitivno nabijene skupine proteina reagiraju s negativno nabijenim OH skupinama polifenola (Quan i sur., 2019).



Slika 9 Nekovalentne interakcije između proteina i polifenola- vodikova veza (a), hidrofobne interakcije (b) i ionske interakcije (c) (Quan i sur., 2019)

Kovalentna veza uvodi se pomoću ne-enzimskih (kemijskih) ili enzimskih reakcija. Kemijske metode uključuju asocijaciju preko slobodnog radikala, alkalne reakcije i kemijskog spajanja. Alkalna reakcija je najčešće korištena ne-enzimska metoda stvaranja protein-polifenol konjugata. Reakcija se temelji na oksidaciji polifenola u alkalnoj sredini uz prisustvo molekularnog kisika do kinona, koji zbog svoje reaktivnosti stupaju u reakcije s sulfidrilnim i amino skupinama u proteinskim lancima (metionin, lizin, triptofan, cistein) i tako nastaje protein-polifenol konjugat (Ozđal i sur., 2013; Fennema, 1996). Kod asocijacije pomoću slobodnog radikala reakciju iniciramo pomoću askorbinske kiseline i vodik peroksida. Aminokiselina iz bočnog lanca proteina se oksidira pomoću hidroksilnog radikala nastalog tijekom redoks reakcije. Nastaje slobodni radikal proteinske makromolekule koji se tada kovalentno veže s polifenolima i tako postiže svoju stabilnost. Kod metode kemijskog spajanja za uvođenje veze između proteina i polifenola koristi se komponenta za umrežavanje poput glutaraldehida (GLA). GLA reagira s nukleofilnim bočnim lancima proteina i zatim s karboksilnom skupinom polifenola. Kod enzimskih metoda koriste se enzimi poput polifenoloksidaze koji oksidiraju polifenole u kinone koji su elektrofilni. Nastali kinoni stupaju u reakcije s nukleofilnim amino skupinama proteina slično kao i kod alkalne metode (Benjakul i sur., 2021).

Kao posljedica interakcija između proteina i polifenola dolazi do promjena kod obje komponente. Kod proteina dolazi do promjena enzimske aktivnosti (ako su u pitanju enzimi) i fizikalno kemijskim svojstvima, poput smanjenja topljivosti i povećanje termostabilnosti. Kako se povećava molekularna težina proteina zbog vezanja većeg polifenola tako se smanjuje njegova topljivost u vodi, a samim time i probavljivost (Ozđal i sur., 2013). Time se mijenja i nutritivna vrijednost proteina. Nastajanjem konjugata protein-polifenol poboljšavaju se svojstva geliranja i emulgiranja proteina (Benjakul i sur., 2021). Istraživanja pokazuju da protein-polifenol konjugati imaju veću antioksidativnu aktivnost nego originalni protein, s tim da konjugati nastali metodom asocijacije imaju veću antioksidativnu aktivnost od onih nastalih alkalnom metodom (Gu i sur., 2017). Kod polifenola najznačajnija je promjena smanjenje njihove bioraspoloživosti i maskiranje njihovog antioksidacijskog djelovanja (Arts i sur., 2002; Quan i sur., 2019).

2.3.2. Parametri koji utječu na interakcije između proteina i polifenola

Na interakcije između proteina i polifenola utječu: temperatura, pH, vrsta proteina, koncentracija proteina, vrsta i strukturna građa polifenola, koncentracija soli i dodatak određenih reagensa. Kako temperatura i pH utječu na strukturnu konformaciju proteina i polifenola, Benjakul i sur. (2021) navode da su upravo to parametri koji najviše utječu na interakcije protein-polifenol. Zagrijavanjem dolazi do denaturacije proteina, čime se odmotava struktura proteina i otkrivaju se hidrofobne skupine. To pogoduje nastajanju hidrofobnih interakcija i vodikovih veza između proteina i polifenola. Također kod povišenih temperatura dolazi do oksidacije polifenola u derivate kinona. Nastajanje protein-polifenol interakcija može se odvijati u širokom rasponu pH (4,0-10,0) (Benjakul i sur., 2021). Kako promjena pH utječe na promjenu konformacije proteina, samim time utječe i na vrstu interakcija koje će se uspostaviti. Kod pH vrijednosti niže od 7,0 dolazi do ionskih interakcija, a kod pH vrijednosti viših od 7,0 dolazi do kovalentne interakcije između polifenola i proteina neenzimskim posredovanjem. Vrsta i redoslijed aminokiselina utječu na funkcionalna svojstva proteina, samim time i utječu na uspješnost stvaranja konjugata s polifenolima (Benjakul i sur., 2021). Proteini s manje zbijenom strukturom imaju veći afinitet za vezivanje polifenola od onih koji imaju zbijenu strukturu u kojoj su hidrofobne aminokiseline manje dostupne za vezivanje. Kako se u skupinu polifenola ubraja veliki broj spojeva, različite građe, te razlike u strukturi utječu na afinitet za vezivanje proteina. Polifenolni spojevi razlikuju se u molekularnoj težini, stupnju metilacije, hidrogenacije, glikolizacije i hidroksilacije. Afinitet vezanja polifenola na proteine raste s porastom njihove molekularne težine (Ozidal i sur., 2013). Aglikoni stupaju u jače interakcije s proteinima, metilacija smanjuje afinitet prema vezivanju proteina dok hidroksilacija A i B prstena polifenola povećava (Czubinski i sur., 2017).

2.3.3. Metode za istraživanje interakcija polifenol-protein

Kako se nastajanjem protein-polifenol kompleksa uključuje niz promjena, nastale interakcije se mogu analizirati na više načina. Prema Czubinski i sur. (2017) imamo šest osnovnih tipova metoda za analiziranje protein-polifenol konjugata. Navode da su najčešće metode spektroskopske, a uz njih još se koriste mikroskopske, termodinamičke, bioinformatičke,

kromatografske i elektroforetske metode. Spektroskopske metode se provode pobuđivanjem proteina na valnim duljinama od 240 do 280 nm pri čemu dolazi do emisije fluorescencije u rasponu 340-350 nm kao rezultat prisutnosti aromatskih aminokiselina, a smanjenje ovog raspona emisije fluorescencije može se pripisati vezanju liganda. Fluorescentna anizotropija ovisi o pokretnoj slobodi molekula koje emitiraju fluorescenciju. Porast anizotropije fluorescencije uzrokovan je smanjenjem slobode kretanja molekula i vezivanjem polifenola s proteinima (Czubinski i sur., 2017). Mikroskopske metode daju informacije o obliku i veličini konjugata, ali se provode isključivo na dehidriranim uzorcima. Kod termodinamičkih metoda se promatraju promjene termodinamičkih parametara poput entalpije, entropije i slobodne entalpije. Vrše se tako da se dodaje fenolni spoj u proteinski otopinu. Termodinamička svojstva vezana uz interakcije između fenolnih spojeva i proteina mogu se istražiti izotermalnom titracijskom kolorimetrijom (ITC), a ona se temelji na mjerenju topline koja se razvijala tijekom molekularnog povezivanja (Czubinski i sur, 2017). Elektroforetske i kromatografske metode koriste se za utvrđivanje promjena u molekularnoj težini, veličini i aminokiselinama kod proteina, što dovodi i do promjena u izoelektričnoj točki proteina. Jedna od najjednostavnijih metoda je elektroforeza i kod nje se određuje utjecaj fenolnih spojeva na prirodnu elektromobilnost proteina. Bioinformatičke metode se temelje na bazi podataka tzv. „Protein Data Bank“ koja sadrži eksperimentalne podatke koje se odnose na vezanje proteina i polifenola. Baza omogućava odabiranje proteina koji će prema eksperimentalnim podacima udovoljiti određenim ciljevima koje želimo postići (Czubinski i sur, 2017).

2.3.4. Mikroenkapsulacija

Polifenoli su skupina spojeva koja ima pozitivan učinak na ljudsko zdravlje zbog hvatanja slobodnih radikala i smanjenja negativnog utjecaja oksidativnog stresa. Njihova dostupnost nakon unosa u organizam je ograničena jer je većina polifenolnih spojeva *in vivo* tretirana kao ksenobiotici. Unatoč tome neki polifenoli se mogu uključiti u stanični metabolizam te na taj način pozitivno pridonijeti organizmu. Metabolizam polifenola započinje odmah u ustima djelomičnom hidrolizom, zatim se u tankom i debelom crijevu podvrgavaju djelovanju mukoznih i mikrobnih enzima. Većina polifenola i njihovih derivata se izlučuje iz tijela fecesom,

ali neki podliježu konjugacijskim reakcijama koje omogućuju njihovu adsorpciju u krv. Na taj način metaboliti polifenola krvotokom mogu doći do različitih tkiva i ući u stanice. Kako bi se čim više povećala dostupnost polifenola u organizmu provodi se mikroenkapsulacija polifenola. Mikroenkapsulacija je postupak oblaganja aktivnih tvari u polimere koji služe kao nosači materijala. Svrha ovog postupka je povećanje stabilnosti aktivnih tvari koje su osjetljive na okolišne uvjete. Osim povećanja fizikalne stabilnosti, čime se sprječava degradacija i produljuje rok trajanja, postiže se i povećanje biodostupnosti, mogućnost kontroliranog, ciljanog otpuštanja, te lakše manipuliranje i skladištenje (Mohammadalinejad i sur., 2021). Ćorković i sur. (2021) navode kako je do danas razvijeno nekoliko različitih tehnika koje se koriste za mikroenkapsulaciju - fizikalne metode (sušenje raspršivanjem, liofilizacija), kemijske metode (molekularna inkluzija) i fizikalnokemijske metode (ionsko želiranje i koacervacija). Proizvod koji se dobije varira u veličini od 1 do 1000 μm , ali i u morfologiji pa tako postoje tri osnovna oblika – mikrosfere, mikrokapsule i mikročestice koji su prikazani na **Slici 10**. Prednost mikroenkapsulacije je to što se osim krutih tvari mogu enkapsulirati i tekuće i plinovite tvari te se na taj način mogu uspješno inkorporirati u sastojke hrane.



Slika 10 Morfološki prikaz mikroenkapsulata: mikrosfera (A), monosloj i mononuklearna mikrokapsula (B), multisloj i mononuklearna mikrokapsula (C), multisloj i multinuklearna mikrokapsula (D), mikročestica (E) (Mohammadalinejad i sur., 2021)

Kao glavne ciljeve mikroenkapsulacije u prehrambenoj industriji Trifković (2016) navodi sljedeće:

- Zaštita bioaktivnih komponenti od degradacije – smanjenjem njihove reaktivnosti prema okolišnim faktorima;
- Smanjenje isparavanja i gubitka aktivnih tvari u okolinu;

- Modifikacija fizičkih svojstava bioaktivnih tvari da se omogući lakše rukovanje – npr. prevođenje iz tekućeg u čvrsto stanje;
- Kontrolirano otpuštanje bioaktivne tvari u organizmu, u određeno vrijeme ili na određenom mjestu u organizmu;
- Maskiranje neželjenih aroma bioaktivnih komponenti;
- Smanjenje koncentracije aktivne tvari – u slučajevima kada su potrebne male količine;
- Razdvajanje pojedinih komponenata iz smjese koje bi mogle reagirati međusobno.

Za enkapsulaciju bioaktivnih spojeva osjetljivih na visoke temperature, poput polifenola, koristi se liofilizacija.

2.4. PROTEINI RIŽE

Riža (*Oryza sativa*) je jedna od najrasprostranjenijih žitarica na svijetu, a dominantno se koristi za prehranu ljudi. Uzgaja se na svim kontinentima osim na Antartici, a osigurava preko 20% ukupnog unosa kalorija u svijetu čemu pridonose dobar nutritivni sastav i dobra probavljivost. Proteini su u riži druga najzastupljenija komponenta riže, nakon škroba, a čine 6-7% u kemijskom sastavu riže (Jayaprakash i sur., 2022). Prema topljivosti proteini riže kategorizirani su u četiri osnovne skupine: albumin (topiv u vodi), globulin (topiv u soli), glutelin (topiv u kiselinama/lužinama) i prolamin (topiv u alkoholu). Udio pojedinog proteina ovisi o sorti riže i udjelu pojedine frakcije nastale mljevenjem. Najzastupljenija frakcija proteina u smeđoj i mljevenoj riži je glutelin (75-83%), a najmanje prisutan je prolamin (1-7%). Albumina u riži ima 4-22%, dok globulina ima 5-13% i ova dva proteina se u smeđoj riži nalaze u većoj koncentraciji nego u bijeloj riži (Balindong i sur., 2016). Osim skladišnih proteina, riža sadrži i biološki aktivne proteine poput enzima (lipaze, amilaze, katalaze i drugi). Visoka nutritivna vrijednost proteina riže proizlazi i iz njihovog aminokiselinskog sastava, koji je prikazan u **Tablici 2**. U usporedbi s ostalim žitaricama riža sadrži najveće količine lizina. Rižini proteini su minimalno topljivi u vodi kod pH 4-7, a povećanjem kiselosti odnosno lužnatosti ta topljivost se povećava. Ovo svojstvo proizlazi iz činjenice da je glutelin, koji nije topljiv u vodi, najzastupljenija frakcija u proteinima

riže. Visoka netopljivost rižinog glutelina u vodi uglavnom je posljedica njegove izrazite agregacije i umrežavanja disulfidnim vezama, a ekstremne pH vrijednosti dovode do razaranja agregata što povećava topljivost. Već je spomenuto da proteini zbog svoje građe mogu stupati u interakcije s polifenolima i stvarati konjugate. Kod pH 3 struktura proteina se djelomično odmotava, što omogućuje vezanje hidroksilne ili aromatske skupine polifenola (Jayaprakash i sur., 2022). Na taj način mijenja se sekundarna struktura proteina i njegove funkcionalne grupe.

Tablica 2 Aminokiselinski sastav proteina riže (Jayaprakash i sur., 2022)

	Amino kiseline	Proteini riže (g/100g)
Esencijalne aminokiseline	Treonin	2,09–5,06
	Valin	3,78–6,80
	Izoleucin	2,69–5,18
	Leucin	5,30–9,51
	Lizin	2,2–6,24
	Histidin	1,19–3,49
	Metionin	0,65–3,49
	Cistein	0,13–3,42
	Tirozin	1,33–6,0
	Fenilalanin	3,5–6,30
Neesencijalne aminokiseline	Asparaginska kiselina	8,10–10,98
	Serin	2,96–5,64
	Glutaminska kiselina	13,36–22,42
	Glicin	4,21–5,98
	Alanin	3,69–6,20
	Arginin	5,30–9,84
	Prolin	2,70–14,88

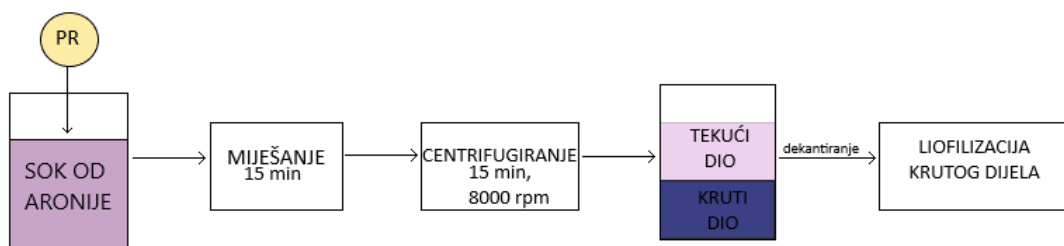
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je priprema bioaktivnih dodataka hrani na bazi proteina riže u kombinaciji s polifenolima aronije (kompleks proteini/aronija). Kompleks proteini/aronija dobiven je adsorpcijom polifenola soka aronije na proteine riže. U tu svrhu pripremljena količina proteina riže je bila konstantna a soku aronije se je mijenjala koncentracija polifenola, kako bi se utvrdio utjecaj koncentracije polifenola na količinu adsorbiranih polifenola na proteine riže.

Na dobivenim kompleksima određeni su:

- adsorbiranje ukupnih polifenola aronije;
- adsorbiranje ukupnih proantocijanidina aronije;
- adsorbiranje antocijana aronije;
- antioksidativna aktivnost kompleksa (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode);
- udio vezanja ukupnih polifenola, proantocijanidina i antocijana soka aronije na rižin protein
- parametri boje (L^* , a^* , b^* , $^{\circ}h$, C^* , ΔE);
- strukturne promjene kompleksa u odnosu na proteine riže.



Slika 11 Shematski prikaza rada

3.2. MATERIJAL I METODE

Sok aronije nabavljen je od lokalnog proizvođača. Proteini riže nabavljeni su od kompanije Myristica (Hrvatska) a prah je sadržavo oko 85% proteina. Klorovodična kiselina (37%) nabavljena je od Carlo Erba Reagents (Sabadell, Španjolska). Folin-Ciocalteu reagens nabavljen je od Kemike (Zagreb, Hrvatska). Trolox, 2,2'-azinobis (3-etilbenztiozolin-sulfonska kiselina), p-dimetilaminocinamaldehyd, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil i većina standarda korištenih za HPLC analizu (rutin, klorogenska kiselina, cijanidin-3-arabinozid) kupljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD), dok su cijanidin-3-galaktozid i neoklorogenska kiselina kupljeni od proizvođača Extrasynthese (Genay, Francuska). Neokuproin i bakar klorid proizvodi su Gram-mola (Zagreb, Hrvatska). Metanol (HPLC čistoće) nabavljen je od proizvođača J.T. Baker (Deventer, Nizozemska) i ortofosforna kiselina (HPLC čistoće >85%) nabavljena je od Fisher Scientific (Loughborough, UK). 2,4,6,-tri(2-piridil)-s-triazin kupljen je od Acros Organica (Geel, Belgija).

3.2.1. Priprema bioaktivnih dodataka hrani

Bioaktivni dodaci hrani na bezi proteina riže pripremljeni su kompleksiranjem proteina riže i soka aronije s različitim koncentracijama polifenola. Uzorci su definirani i prikazani u **Tablici 3**. Za pripremu kompleksa protein riže/aronija, proteini riže i sok aronije s različitim koncentracijama polifenola miješani su 15 minuta na magnetnoj miješalici na sobnoj temperaturi. Nakon toga, dobivena smjesa je prebačena u plastične kivete i centrifugirana 15 minuta na 8000 rpm. Centrifugiranjem se odvojio tekući od krutog dijela, te je supernatant dekantiran, a kruti dio izdvojen kako bi se pripremio za liofilizaciju tj. pripremu suhog praha kompleksa proteini/aronija.

Prije postupka liofilizacije, mokri kruti dio dobiven centrifugiranjem je zamrznut na -18 °C 24 sata a liofilizacija je provedena u liofilizatoru (Christ Freeze Dryer, Alpha 1-4, Germany). Uvjeti liofilizacije podešeni su tako da je temperatura zamrzavanja bila -55 °C, temperatura sublimacije od -35 °C do 0 °C pod vakuumom od 0,220 mbar te u završnoj fazi temperatura

izotermne desorpcije od 0 °C do 22 °C pod vakuumom od 0,060 mbar. Cijeli proces liofilizacije trajao je 8 sati.

Tablica 1 Kemijski sastav kompleksa rižin protein/sok od aronije

Oznaka uzorka	Protein riže (g)	Sok aronije (mL)	Voda (mL)
RP/A	2	40	0
RP/A 1:1	2	20	20
RP/A 1:2	2	13,3	26,6
RP/A 1:3	2	10	30
RP/A 1:4	2	8	32

3.2.2. Metode

3.2.2.1 Uzorci za analizu

Za određivanje ukupnih polifenola, proantocijanidina, monomernih antocijana i antioksidacijske aktivnosti korištena je indirektna metoda odnosno navedeni parametri su određeni u soku i u tekućem dijelu dobivenom nakon centrifugiranja. Za određivanje ukupnih polifenola, proantocijanidina, antioksidacijske aktivnosti i pojedinačnih polifenola HPLC-om iz praha RP/A kompleksi su ekstrahirani iz praha. Ekstrahiralo se 0,3 g uzorka s 15 mL zakiseljenog metanola na sobnoj temperaturi.

3.2.2.2 Određivanje pH

Svim uzorcima je prije stavljanja na centrifugu određena pH vrijednost pomoću pH-metra. Rezultati su prikazani u **Tablici 4**.

Tablica 4 pH vrijednosti uzoraka riža protein/sok aronije

Uzorak	pH
A	3,66
A 1:1	3,72
A 1:2	3,74
A 1:3	3,79
A 1:4	3,77
RP/A	3,85
RP/A 1:1	4,08
RP/A 1:2	4,25
RP/A 1:3	4,40
RP/A 1:4	4,52

3.2.2.3 Određivanje ukupnih polifenola

Udio ukupnih polifenola određen je Folin-Ciocalteu metodom.

Postupak: otpipetira se 0,1 mL uzorka, 0,9 mL destilirane vode, 5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 4 mL 7,5% otopine natrijeva karbonata u epruvetu, promućka se i ostavi se na tamnom mjestu 2 sata, na sobnoj temperaturi. Apsorbancija se određuje na spektrofotometru pri 765 nm. Slijepa proba se pripravi sa destiliranom vodom (2 mL). Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.2.4 Određivanje proantocijanidina

Postupak: u epruvetu se otpipetira 0,1 mL uzorka i 0,4 mL zakiseljenog etanola i promiješa se na laboratorijskoj mućkalici. Od pripravljenog uzorka otpipetira se 0,5 mL i doda se 1 mL otopine 4-dimetil-amino-cinamaldehida. Reakcijska smjesa se ostavi stajati 30 minuta te se mjeri apsorbancija na 640 nm. Slijepa proba pravi se od 0,5 mL etanola i 1 mL otopine 4-dimetil-amino-cinamaldehida. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za procijanidin B2. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.2.5 Određivanje monomernih antocijana

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda. Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka u dvije kivete, u jednu je dodano 2,8 mL pufera pH 1, a u drugu 2,8 mL pufera pH 4,5. Nakon stajanja od 15 min na sobnoj temperaturi uzorcima je pomoću spektrofotometra mjerena apsorbancija pri valnim duljinama od 515 nm i 700 nm. Za svaki uzorak pripremljene su tri paralele. Udio antocijana je izračunat prema slijedećoj formuli:

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

A – apsorbancija uzorka, a računa se prema formuli:

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

M – molekulska masa, 449,2 g/mol

FR - faktor razrjeđenja

ϵ - molarna absorptivnost, 26 900 L/molcm

l - duljina kivete, 1 cm

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

3.2.2.6 Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Da bi se odredila antioksidacijska aktivnost korištene su četiri metode: DPPH, CUPRAC, ABTS i FRAP.

DPPH metoda. Otpipetira se 3 mL otopine DPPH i 0,1 mL uzorka, dobro se promiješa i nakon 15 minuta mirovanja se mjeri apsorbancija pri 517 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

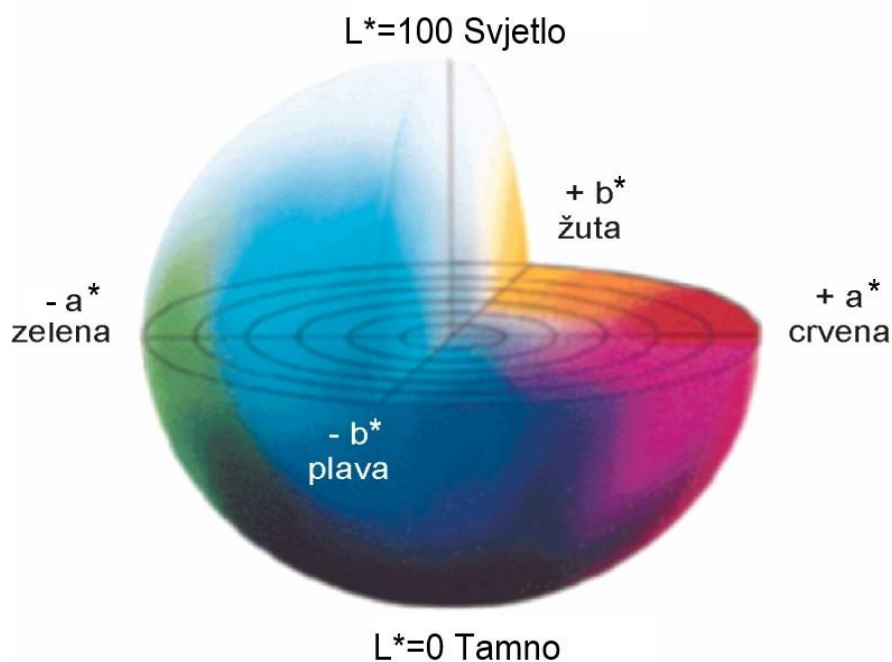
CUPRAC metoda. Otpipetira se 1 mL otopine bakrovog klorida, 1 mL otopine neokuproina, 1 mL amonijevog acetata (1M), 0,2 mL uzorka i 0,9 mL destilirane vode. Smjesa se homogenizira. Nakon pola sata mirovanja mjeri se apsorbancija na 450 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

ABTS metoda. Otpipetira se 0,1 mL uzorka i doda se 3,2 mL otopine ABTS-a, dobro se promiješa i ostavi se mirovati na tamnom mjestu 1 h i 35 min. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 734 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

FRAP metoda. Otpipetira se 0,2 mL uzorka i 3 mL FRAP otopine, promiješa se i ostavi mirovati na tamnom 30 min. Nakon toga se očita apsorbancija na 593 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.2.7 Određivanje parametara boje

Za određivanje promjene boje i njezino numeričko izražavanje korištena je CIELAB metoda. Prema njoj se boja mjeri u trodimenzionalnom sustavu (L^* , a^* , b^*) i to pomoću kolorimetra s mogućnošću određivanja čitavog vidljivog spektra.



Slika 12 Prikaz CIE LAB prostora boja (Web 4)

Pomoću L^* vrijednosti određuje se je li neki predmet taman ili svijetao. Ako je vrijednost L^* 0 tada je boja predmeta potpuno crna, a ako je 100 onda je potpuno bijela. Parametar a^* ima raspon vrijednosti od -100 do +100 i određuje je li neki predmet crvene ili zelene boje. Ako je a^* pozitivan predmet se približava crvenoj boji (+100 označava da je predmet crven), a ako je a^* negativan boja se približava zelenoj. Parametar b^* ima isti raspon vrijednosti samo on određuje je li neki predmet žute (+100) ili plave boje (-100). Udaljenost između dvije točke u koordinatnom sustavu boje se izražava kao promjena boje odnosno ΔE . Promjena boje izračunava se na temelju L^* , a^* i b^* vrijednosti prema slijedećoj formuli:

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

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

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

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

k-kontrolni uzorak; u- uspoređivani uzorak

Veza između izračunate promjene boje (ΔE) i ljudske percepcije boje dana je u **Tablici 5**.

Tablica 5 Veza između izračunate promjene boje (ΔE) i ljudske percepcije boje

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

Osim L^* , a^* i b^* vrijednosti na kromometru su određeni i zasićenje (C^*) i ton boje ($^{\circ}h$). Ton boje ($^{\circ}h$) definira vizualni doživljaj na temelju kojeg točno definiramo pojedinu boju npr. crvenu, plavu, zelenu itd. ovisno o dominantnoj valnoj duljini. Zasićenje (C^*) definira udio čiste boje u ukupnom vizualnom doživljaju boje tj. udio pojedinih valnih duljina u ukupnom tonu boje.

3.2.2.8 Određivanje polifenola primjenom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Sadržaj antocijana, fenolnih kiselina i flavonola određen je koristeći HPLC sustav 1260 Infinity II (Agilent technology, Santa Clara, CA, USA). Navedeni sustav se sastoji od sljedećih dijelova: kvaterna pumpa, detektor s diodnim nizom i kolona Poroshell 120 EC-C 18 (4,6 x 100 mm, 2,7 μ m). Korištena metoda je opisana u radu Ivić i sur. (2021) te prethodno validirana. Kao mobilne faze korišteni su 0,1 %-tna H_3PO_4 (A) i 100%-tni metanol (B). Količina injektiranog uzorka iznosila je 10 μ L, a protok je bio postavljen na 1 mL/min. Za razdjeljivanje je upotrijebljen

sljedeći gradijent: 0 min 5 % B, 3 min 30 % B, 15 min 35 % B, 22 min 37 % B, 30 min 41 % B, 32 min 45 % B, 40 min 49 % B, 45 min 80 % B, 48 min 80 % B, 50 min 5 % B, 53 min 5 % B. Za pripremu kalibracijskih krivulja, korištene su koncentrirane otopine standarda koje su se razrjeđivale s metanolom kako bi se dobile različite koncentracije. Kromatogrami su snimani u području od 190 do 600 nm. Antocijani su identificirani na 520 nm, kiseline na 320 nm, a flavonoli na 360 nm. Uzorci su analizirani u paralelama.

3.2.2.9 FTIR-ATR analiza

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

3.2.2.10 Statistička analiza podataka

Rezultati su statistički obrađeni primjenom programa Statistica 13.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitivana je promjena adsorpcije polifenolnih komponenti na odabrani nosač odnosno protein smeđe riže, s obzirom na promjenu koncentracije polifenola u soku aronije. Kontrolni uzorak je bio enkapsulat proteini riže/sok aronije (RP/A), a ostali enkapsulati su pripremljeni sa sokom aronije različite koncentracije polifenola. Kod uzorka RP/A 1:1 sok je aronije razrijeđen s vodom u omjeru 1:1. Kod uzorka RP/A 1:2 sok aronije je razrijeđen s vodom u omjeru 1:2, kod uzorka RP/A 1:3 u omjeru 1:3, a kod uzorka RP/A 1:4 u omjeru 1:4.

4.1. UDIO POLIFENOLA, ANTOCIJANIDINA I ANTOCIJANA U ENKAPSULATIMA (KOMPLEKSIMA)

Udio ukupnih polifenola, proantocijanidina i antocijana u soku aronije i supernatantima dobivenim nakon kompleksiranja proteina riže i soka aronije prikazan je u **Tablici 6**.

Tablica 6 Udio ukupnih polifenola, proantocijanidina i antocijana sokova aronije i supernatanta nakon kompleksiranja proteina riže i soka aronije

Uzorak	Polifenoli	Proantocijanidini	Antocijani
	mg GAE/mL	mg PB2/mL	mg/mL
A	11,26 ± 0,24 ^a	3,06 ± 0,08 ^a	0,67 ± 0,00 ^a
A 1:1	5,71 ± 0,16 ^c	1,38 ± 0,00 ^c	0,38 ± 0,01 ^c
A 1:2	3,23 ± 0,01 ^d	0,80 ± 0,04 ^d	0,23 ± 0,00 ^d
A 1:3	2,79 ± 0,00 ^e	0,59 ± 0,00 ^{ef}	0,16 ± 0,01 ^f
A 1:4	1,35 ± 0,03 ^g	0,54 ± 0,02 ^f	0,11 ± 0,00 ^g
RP/A	8,24 ± 0,01 ^b	2,19 ± 0,01 ^b	0,48 ± 0,00 ^b
RP/A 1:1	3,34 ± 0,22 ^d	0,65 ± 0,01 ^e	0,18 ± 0,00 ^e
RP/A 1:2	1,74 ± 0,03 ^f	0,26 ± 0,01 ^g	0,11 ± 0,00 ^g
RP/A 1:3	1,02 ± 0,02 ^h	0,13 ± 0,00 ^h	0,08 ± 0,00 ^h
RP/A 1:4	0,65 ± 0,04 ⁱ	0,06 ± 0,00 ^h	0,05 ± 0,00 ⁱ

A - sok aronije; RP - protein riže; vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

Određivanje količine adsorbiranih polifenola na proteine riže određeno je indirektnom metodom, odnosno parametri su određeni u sokovima i supernatantima dobivenim nakon

kompleksiranja proteina riže i soka aronije. S povećanjem razrijeđena soka udio polifenolnih komponenata se je smanjio što je bilo i za očekivati. Obzirom da je korištena indirektna metoda u **Tablici 7** prikazan udio adsorbiranih polifenola na protein riže koji je prezentiran razlikom odnosno od ukupnog udjela polifenola u soku aronije oduzeta je vrijednost za ukupni udio polifenola u supernatantu.

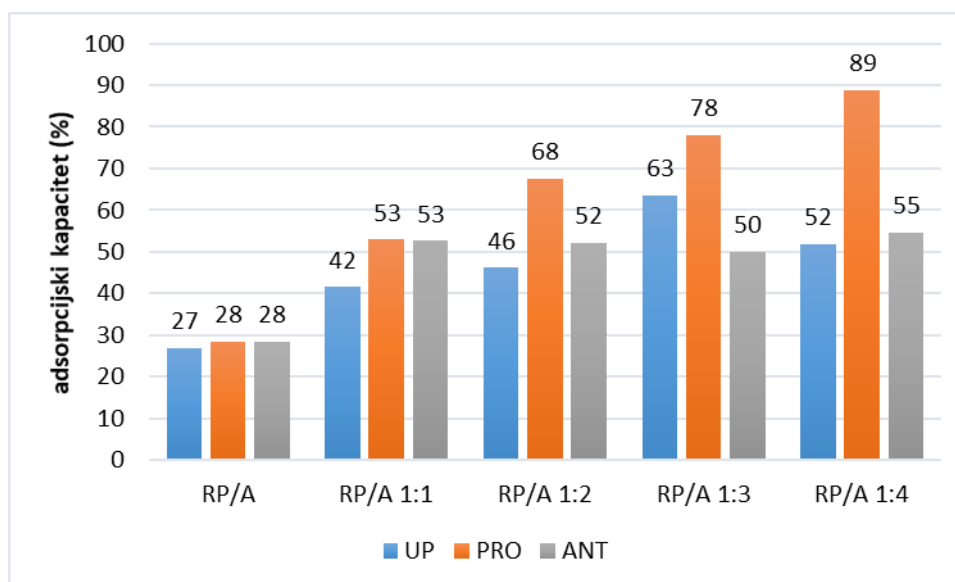
Tablica 7 Udio adsorbiranih ukupnih polifenola, proantocijanidina i antocijana soka aronije na rižin protein ovisno o promjeni koncentracije polifenola u početnom soku

Uzorak	Polifenoli	Proantocijanidini	Antocijani
	mg GAE/mL	mg PB2/mL	mg/mL
A	11,26 ± 0,24	3,06 ± 0,08	0,67 ± 0,00
RP/A	8,24 ± 0,01	2,19 ± 0,01	0,48 ± 0,00
razlika (mg/g)	3,02	0,87	0,19
A 1:1	5,71 ± 0,16	1,38 ± 0,00	0,38 ± 0,01
RP/A 1:1	3,34 ± 0,22	0,65 ± 0,01	0,18 ± 0,00
razlika (mg/g)	2,37	0,73	0,20
A 1:2	3,23 ± 0,01	0,80 ± 0,04	0,23 ± 0,00
RP/A 1:2	1,74 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,11 ± 0,00
razlika (mg/g)	1,49	0,54	0,12
A 1:3	2,79 ± 0,00	0,59 ± 0,00	0,16 ± 0,01
RP/A 1:3	1,02 ± 0,02	0,13 ± 0,00	0,08 ± 0,00
razlika (mg/g)	1,77	0,46	0,08
A 1:4	1,35 ± 0,03	0,54 ± 0,02	0,11 ± 0,00
RP/A 1:4	0,65 ± 0,04	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00
razlika (mg/g)	0,70	0,48	0,06

A - sok aronije; RP - protein riže

Utvrđeno je da s povećanjem razrjeđenja soka aronije odnosno sa smanjenjem početne koncentracije polifenola za kompleksiranje s proteinima riže dolazi i do smanjenja adsorbiranih polifenola. Udio adsorbiranih ukupnih polifenola na proteine riže iznosi je 3,02 mg/g, 2,37 mg/g, 1,49 mg/g, 1,77 mg/g i 0,7 mg/g za RP/A, RP/A 1:1, RP/A 1:2, RP/A 1:3 i RP/A 1:4. Utvrđene su manje razlike između uzoraka za proantocijanidine i antocijane. Tako da je udio adsorbiranih proantocijanidina na proteine riže iznosio je 0,87 mg/g, 0,73 mg/g, 0,54

mg/g, 0,46 mg/g i 0,48 mg/g za RP/A, RP/A 1:1, RP/A 1:2, RP/A 1:3 i RP/A 1:4. Udio adsorbiranih monomernih antocijana na proteine riže iznosio je 0,19 mg/g, 0,20 mg/g, 0,12 mg/g, 0,08 mg/g i 0,06 mg/g za RP/A, RP/A 1:1, RP/A 1:2, RP/A 1:3 i RP/A 1:4. Kako bi se utvrdio točan utjecaj koncentracije polifenola u soku aronije na adsorpciju polifenola na proteine riže bilo je potrebno izračunati adsorpcijski kapacitet. Adsorpcijski kapacitet je prikazan na **Slici 13**.



Slika 13 Prikaz adsorpcijskog kapaciteta proteina riže za polifenole (UP – ukupni polifenoli, PRO – proantocijanidini, ANT - antocijani, A - sok aronije; RP - protein riže)

Utvrđeno je da se adsorpcijski kapacitet sa smanjenjem početne koncentracije polifenola povećava. Adsorpcijski kapacitet za ukupne polifenole iznosi je 27% za RP/A, a za preostale uzorke od 42% do 63% odnosno utvrđeno je značajno povećanje adsorpcijskog kapaciteta sa smanjenjem početne koncentracije ukupnih polifenola u soku aronije. Vrlo značajna promjena adsorpcijskog kapaciteta utvrđena je za proantocijanidine. Adsorpcijski kapacitet se je s 27% za RP/A povećao na 89% za RP/A 1:4. Za RP/A adsorpcijski kapacitet za antocijane također je iznosio 28%, a za preostale uzorke 50% do 55% odnosno nije utvrđen tako značajan porast kao u slučaju proantocijanidina.

U **Tablici 8** prikazane su koncentracije pojedinačnih polifenola u sokovima te supernatantima dobivenim nakon kompleksiranja proteina riže i soka aronije. U soku aronije najzastupljenije su fenolne kiseline, od kojih najviše ima neoklorogenske, a slijedi ju klorogenska. Od antocijanina je najviše prisutan cijanidin-3-galaktozid, a u manjem udjelu prisutan je i cijanidin-

3-arabinozid, što se poklapa s literaturom (Jakobek i sur., 2007; Tolić i sur., 2015). Od flavonola je najzastupljeniji rutin (kvercetin-3-rutinozid). Povećanjem razrjeđenja soka udio prisutnih pojedinačnih polifenola se smanjuje u korištenim sokovima za kompleksiranje.

Tablica 8 Pojedinačni polifenoli u sokovima aronije i supernatantima nakon kompleksiranja proteina riže i soka aronije (mg/L)

Uzorak	C 3-gal	C 3-ara	Rutin	NCA	ChA
A	331,69 ± 0,33 ^a	69,95 ± 0,46 ^a	60,62 ± 0,22 ^a	495,51 ± 1,95 ^a	442,39 ± 4,34 ^a
A 1:1	146,95 ± 3,28 ^c	30,83 ± 0,13 ^c	31,48 ± 0,65 ^c	278,24 ± 4,36 ^c	232,22 ± 2,60 ^c
A 1:2	100,43 ± 0,37 ^d	22,09 ± 0,27 ^d	22,42 ± 0,35 ^d	197,19 ± 1,05 ^d	169,26 ± 0,34 ^d
A 1:3	68,62 ± 0,04 ^f	15,52 ± 0,24 ^e	16,62 ± 0,09 ^e	146,00 ± 0,82 ^f	126,63 ± 0,01 ^f
A 1:4	60,22 ± 0,05 ^g	13,87 ± 0,14 ^f	14,30 ± 0,07 ^f	119,47 ± 0,35 ^g	107,88 ± 1,38 ^g
RP/A	217,08 ± 0,03 ^b	41,37 ± 0,16 ^b	33,12 ± 0,01 ^b	394,34 ± 0,95 ^b	286,61 ± 2,71 ^b
RP/A 1:1	85,27 ± 0,22 ^e	15,93 ± 0,24 ^e	12,92 ± 0,13 ^g	182,07 ± 2,31 ^e	132,92 ± 0,23 ^e
RP/A 1:2	51,32 ± 0,43 ^h	10,00 ± 0,03 ^g	7,90 ± 0,09 ^h	118,24 ± 1,14 ^g	89,88 ± 0,55 ^h
RP/A 1:3	34,95 ± 0,20 ⁱ	7,34 ± 0,02 ^h	5,87 ± 0,07 ⁱ	89,56 ± 0,58 ^h	70,18 ± 0,69 ⁱ
RP/A 1:4	23,76 ± 0,40 ^j	5,33 ± 0,22 ⁱ	4,57 ± 0,08 ^j	67,63 ± 0,07 ⁱ	55,88 ± 0,45 ^j

A – sok aronije; RP/A – riža protein/sok aronije; C 3-gal - cijanidin 3-galaktozid; C 3-ara – cijanidin 3-arabinozid; NCA – neoklorogenska kiselina; ChA – klorogenska kiselina; vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

U **Tablici 9** prikazani su rezultati za udio adsorbiranih pojedinačnih polifenola na protein riže ovisno o promjeni početne koncentracije polifenola u soku. Za oba identificirana antocijana utvrđeno je da se sa smanjenjem početne koncentracije u sokovima i adsorbirana količina na proteine riže smanjuje. Za cijanidin 3-galaktozid adsorbirane vrijednosti su iznosile 114,61 mg/kg, 61,68 mg/kg, 49,11 mg/kg, 33,67 mg/kg i 36,46 mg/kg za RP/A, RP/A 1:1, RP/A 1:2, RP/A 1:3 i RP/A 1:4. Za iste uzorke, adsorbirani udio cijanidin 3-arabinozida bio je 28,58 mg/kg, 14,9 mg/kg, 12,09 mg/kg, 8,18 mg/18 i 8,54 mg/kg. Udio adsorbiranog rutina je također imao jednaki trend kao i antocijani, odnosno adsorbirani udio ove komponente bio je 27,5 mg/kg, 18,56 mg/kg, 14,52 mg/kg, 10,75 mg/kg i 9,73 mg/kg za RP/A, RP/A 1:1, RP/A 1:2, RP/A 1:3 i RP/A 1:4. Za iste uzorke udio adsorbirane neoklorogenske iznosio je 101,17 mg/kg, 96,17

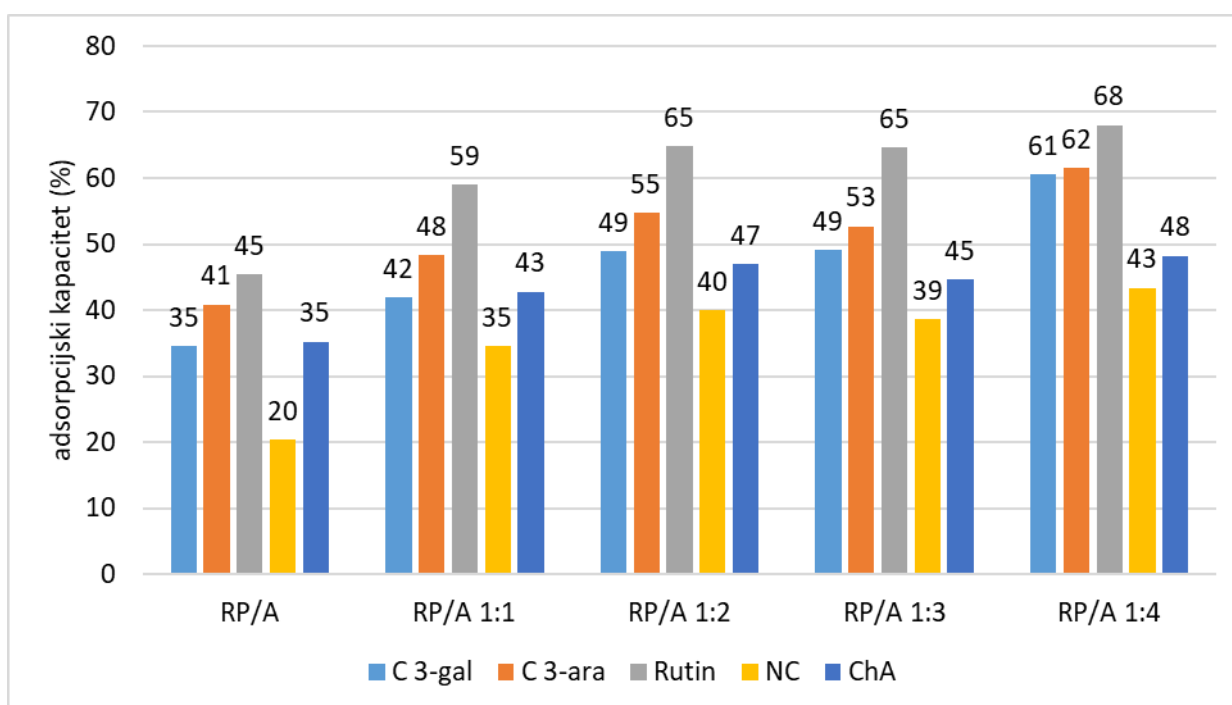
mg/kg, 78,95 mg/kg, 56,44 mg/kg i 51,84 mg/kg a za klorogensku kiselinu 155,78 mg/kg, 99,3 mg/kg, 79,38 mg/kg, 56,45 mg/kg i 52 mg/kg. I za fenolne kiseline kao i za rutin i antocijane utvrđen je trend smanjenja adsorpcije s smanjenjem početne koncentracije polifenola.

Tablica 9 Udio adsorbiranih pojedinačnih polifenola soka aronije na rižin protein ovisno o promjeni koncentracije polifenola u početnom soku

Uzorak	C 3-gal	C 3-ara	Rutin	NCA	ChA
A	331,69 ± 0,33	69,95 ± 0,46	60,62 ± 0,22	495,51 ± 1,95	442,39 ± 4,34
RP/A	217,08 ± 0,03	41,37 ± 0,16	33,12 ± 0,01	394,34 ± 0,95	286,61 ± 2,71
razlika (mg/kg)	114,61	28,58	27,5	101,17	155,78
A 1:1	146,95 ± 3,28	30,83 ± 0,13	31,48 ± 0,65	278,24 ± 4,36	232,22 ± 2,60
RP/A 1:1	85,27 ± 0,22	15,93 ± 0,24	12,92 ± 0,13	182,07 ± 2,31	132,92 ± 0,23
razlika (mg/kg)	61,68	14,9	18,56	96,17	99,3
A 1:2	100,43 ± 0,37	22,09 ± 0,27 ^d	22,42 ± 0,35	197,19 ± 1,05	169,26 ± 0,34
RP/A 1:2	51,32 ± 0,43	10,00 ± 0,03 ^e	7,90 ± 0,09	118,24 ± 1,14	89,88 ± 0,55
razlika (mg/kg)	49,11	12,09	14,52	78,95	79,38
A 1:3	68,62 ± 0,04	15,52 ± 0,24 ^e	16,62 ± 0,09	146,00 ± 0,82	126,63 ± 0,01
RP/A 1:3	34,95 ± 0,20	7,34 ± 0,02 ^h	5,87 ± 0,07	89,56 ± 0,58	70,18 ± 0,69
razlika (mg/kg)	33,67	8,18	10,75	56,44	56,45
A 1:4	60,22 ± 0,05	13,87 ± 0,14 ^f	14,30 ± 0,07	119,47 ± 0,35	107,88 ± 1,38
RP/A 1:4	23,76 ± 0,40	5,33 ± 0,22 ⁱ	4,57 ± 0,08	67,63 ± 0,07	55,88 ± 0,45
razlika (mg/kg)	36,46	8,54	9,73	51,84	52

A – sok aronije; RP/A – riža protein/sok aronije; C 3-gal - cijanidin 3-galaktozid; C 3-ara – cijanidin 3-arabinozid; NCA – neoklorogenska kiselina; ChA – klorogenska kiselina

Izračunom adsorpcijskog kapaciteta koji je prikazan na **Slici 14**, utvrđen je jednaki trend kao i kod ukupnih polifenola odnosno adsorpcijski kapacitet se je povećao sa smanjenjem koncentracije polifenola u početnim sokovima koji su korišteni za kompleksiranje. Adsorpcijski kapacitet cijanidin 3-galaktozida i cijanidin 3-arabinozida se je povećao s 35% i 41% za RP/A na 61% i 62% kod uzorka s najmanjom početnom koncentracijom ovih komponenteata (RP/A 1:4). Za rutin je utvrđeno povećanje adsorpcijskog kapaciteta s 45% na 68% za iste uzorke, a za neoklorogensku i klorogensku kiselinu s 20% i 35% na 43% i 48%.



Slika 14 Prikaz adsorpcijskog kapaciteta proteina riže za pokedinačne polifenole (A – sok aronije; RP/A – riža protein/sok aronije; C 3-gal - cijanidin 3-galaktozid; C 3-ara – cijanidin 3-arabinozid; NCA – neoklorogenska kiselina; ChA – klorogenska kiselina)

4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KOMPLEKSA

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je primjenom DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metoda koje se međusobno razlikuju prema samom mehanizmu određivanja antioksidacijske aktivnosti. Dobivene vrijednosti za početne sokove te za supernatante su prikazane u **Tablici 10**, dok su u **Tablici 11** prikazani rezultati antioksidacijske aktivnosti samih enkapsulata. Iz rezultata je vidljivo da antioksidacijska aktivnost enkapsulata prati vrijednosti koje su doivene za adsorpciju polifenolnih komponenti.

Tablica 10 Antioksidacijska aktivnost sokova aronije i supernatanta nakon kompleksiranja proteina riže i soka aronije

Uzorak	DPPH ($\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$)	ABTS ($\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$)	CUPRAC ($\text{mmol TE}/100\text{ mL}$)
A	85,06 \pm 0,49 ^a	131,55 \pm 0,56 ^a	9,01 \pm 0,04 ^a	0,56 \pm 0,00 ^a
A 1:1	41,69 \pm 1,57 ^c	54,64 \pm 0,46 ^c	3,32 \pm 0,11 ^c	0,25 \pm 0,00 ^c
A 1:2	23,94 \pm 0,78 ^e	33,10 \pm 0,64 ^d	2,45 \pm 0,11 ^d	0,15 \pm 0,00 ^e
A 1:3	18,37 \pm 0,33 ^f	23,56 \pm 0,36 ^f	2,09 \pm 0,00 ^e	0,13 \pm 0,00 ^f
A 1:4	13,62 \pm 0,59 ^g	15,75 \pm 0,87 ^g	1,59 \pm 0,02 ^f	0,10 \pm 0,00 ^g
RP/A	65,32 \pm 0,79 ^b	88,44 \pm 0,49 ^b	6,68 \pm 0,08 ^b	0,42 \pm 0,00 ^b
RP/A 1:1	26,93 \pm 0,96 ^d	30,91 \pm 0,31 ^e	2,45 \pm 0,09 ^d	0,17 \pm 0,00 ^d
RP/A 1:2	16,83 \pm 0,58 ^f	22,62 \pm 0,45 ^f	1,34 \pm 0,03 ^g	0,09 \pm 0,00 ^h
RP/A 1:3	8,31 \pm 0,31 ^h	12,87 \pm 0,28 ^h	0,84 \pm 0,03 ^h	0,04 \pm 0,00 ⁱ
RP/A 1:4	4,79 \pm 0,32 ⁱ	6,54 \pm 0,15 ⁱ	0,52 \pm 0,04 ⁱ	0,03 \pm 0,00 ^j

A – sok aronije; RP/A – riža protein/sok aronije; C 3-gal - cijanidin 3-galaktozid; C 3-ara – cijanidin 3-arabinozid; NCA – neoklorogenska kiselina; ChA – klorogenska kiselina; vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

Tablica 11 Antioksidacijska aktivnost dobivenih enkapsulata

Uzorak	DPPH ($\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$)	ABTS ($\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$)	CUPRAC ($\text{mmol TE}/100\text{ mL}$)
A	85,06 \pm 0,49 ^a	131,55 \pm 0,56 ^a	9,01 \pm 0,04 ^a	0,56 \pm 0,00 ^a
RP/A	65,32 \pm 0,79 ^b	88,44 \pm 0,49 ^b	6,68 \pm 0,08 ^b	0,42 \pm 0,00 ^b
razlika	19,74	43,11	2,33	0,14
A 1:1	41,69 \pm 1,57 ^c	54,64 \pm 0,46 ^c	3,32 \pm 0,11 ^c	0,25 \pm 0,00 ^c
RP/A 1:1	26,93 \pm 0,96 ^d	30,91 \pm 0,31 ^e	2,45 \pm 0,09 ^d	0,17 \pm 0,00 ^d
razlika	14,76	23,73	0,87	0,08
A 1:2	23,94 \pm 0,78 ^e	33,10 \pm 0,64 ^d	2,45 \pm 0,11 ^d	0,15 \pm 0,00 ^e
RP/A 1:2	16,83 \pm 0,58 ^f	22,62 \pm 0,45 ^f	1,34 \pm 0,03 ^g	0,09 \pm 0,00 ^h
razlika	7,11	10,48	1,11	0,06
A 1:3	18,37 \pm 0,33 ^f	23,56 \pm 0,36 ^f	2,09 \pm 0,00 ^e	0,13 \pm 0,00 ^f
RP/A 1:3	8,31 \pm 0,31 ^h	12,87 \pm 0,28 ^h	0,84 \pm 0,03 ^h	0,04 \pm 0,00 ⁱ
razlika	10,06	10,69	1,25	0,09
A 1:4	13,62 \pm 0,59 ^g	15,75 \pm 0,87 ^g	1,59 \pm 0,02 ^f	0,10 \pm 0,00 ^g
RP/A 1:4	4,79 \pm 0,32 ⁱ	6,54 \pm 0,15 ⁱ	0,52 \pm 0,04 ⁱ	0,03 \pm 0,00 ^j
razlika	8,83	9,21	1,07	0,07

A – sok aronije; RP/A – riža protein/sok aronije

4.3. BOJA ENKAPSULATA PROTEIN RIŽE/ARONIJA

Za protein riže i dobivene enkapsulate (komplekse) protein riže/aronija izmjerensu parametri boje L*, a*, b*, °h i C* čije su vrijednosti prikazane u **Tablici 12**. Iz dobivenih L*, a* i b* vrijednosti izračunata promjena je boje (ΔE) enkapsulata u odnosu na protein riže.

Tablica 12 Parametri boje enkapsulata protein riže/sok aronije

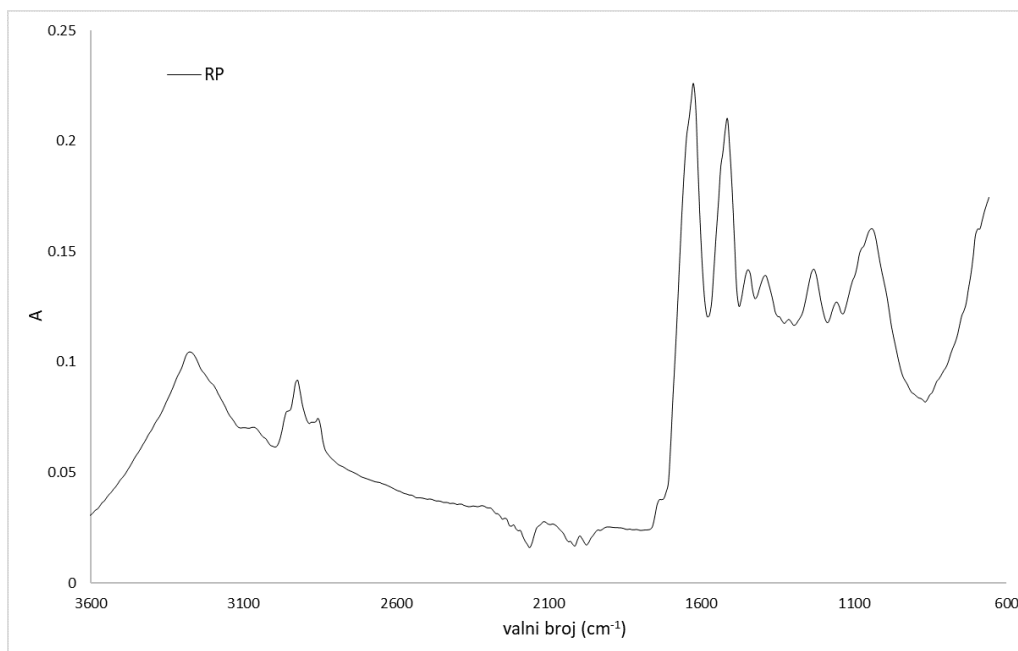
Uzorak	L*	a*	b*	°h	C*	ΔE
RP	78,84 ± 0,01 ^a	4,77 ± 0,01 ^f	21,22 ± 0,01 ^a	78,39 ± 0,27 ^d	22,32 ± 0,04 ^a	
RP/A	34,92 ± 0,04 ^f	12,83 ± 0,02 ^b	-0,02 ± 0,02 ^d	359,91 ± 0,08 ^a	12,83 ± 0,02 ^c	46,55
RP/A 1:1	44,41 ± 0,02 ^e	14,69 ± 0,03 ^a	-0,98 ± 0,02 ^f	356,80 ± 0,06 ^c	14,72 ± 0,03 ^b	42,15
RP/A 1:2	47,47 ± 0,08 ^d	12,35 ± 0,04 ^c	-0,34 ± 0,01 ^e	358,41 ± 0,05 ^b	12,35 ± 0,04 ^d	38,81
RP/A 1:3	50,52 ± 0,01 ^c	10,46 ± 0,01 ^d	0,71 ± 0,00 ^c	3,87 ± 0,01 ^f	10,49 ± 0,01 ^e	35,43
RP/A 1:4	52,72 ± 0,01 ^b	8,93 ± 0,01 ^e	1,67 ± 0,01 ^b	10,61 ± 0,06 ^e	9,09 ± 0,00 ^f	32,89

A – sok aronije; RP/A – riža protein/sok aronije

Čisti protein riže ima visoku vrijednost L* 78,84 što upućuje na svjetlinu uzorka, a kompleksiranjem s čistim sokom ta se vrijednost smanjila više nego dvostruko. Povećanjem razrjeđenja soka aronije odnosno sa smanjenjem koncentracije polifenola, L* vrijednost se je povećala. Vrijednost a* čistog proteina riže iznosi 4,77, a adsorpcijom antocijana iz aronije vrijednost se je povećala, što upućuje na izraženije crvene nijanse kod enkapsulata. Najviša vrijednost a* je izmjerena kod uzorka RP/A 1:1 i iznosi 14,69. Vrijednost b* za čisti protein riže iznosila je 21,22, a vezivanjem polifenola iz aronije se je značajno smanjila. Najmanju b* vrijednost imao je enkapsulat RP/A 1:1, a najveću RP/A 1:4. Izračunom promjene boje enkapsulat protein riže/aronija u odnosu na čisti protein riže utvrđeno je da je smanjenjem razrjeđenja soka, a time povećanjem udjela polifenolnih komponenti došlo do povećanja promjene boje. Stoga je najveća promjena boje utvrđena za kompleks RP/A, 46,55. Vrijednost °h čistog proteina riže iznosila je 78,39, a kompleksiranjem s polifenolima aronije se je ta vrijednost značajno promijenila. Za uzorke RP/A, RP/A 1:1, RP/A 1:2 vrijednost za °h su se kretale u rasponu od 356 i 359, dok su vrijednosti za RP/A 1:3 i RP/A 1:4 bile znatno niže. Vrijednost C* za čisti rižin protein iznosila je 22,32, a kod kompleksa je ta vrijednost bila nešto niža i kretala se u rasponu od 9,09 do 14,72.

4.4. FTIR-ATR ANALIZA

Na **Slici 15** prikazan je IR spektar proteina riže, a u **Tablici 13** su prikazane karakteristične apsorpcijskih vrpca pri odgovarajućem valnom broju (cm^{-1}) proteina riže.

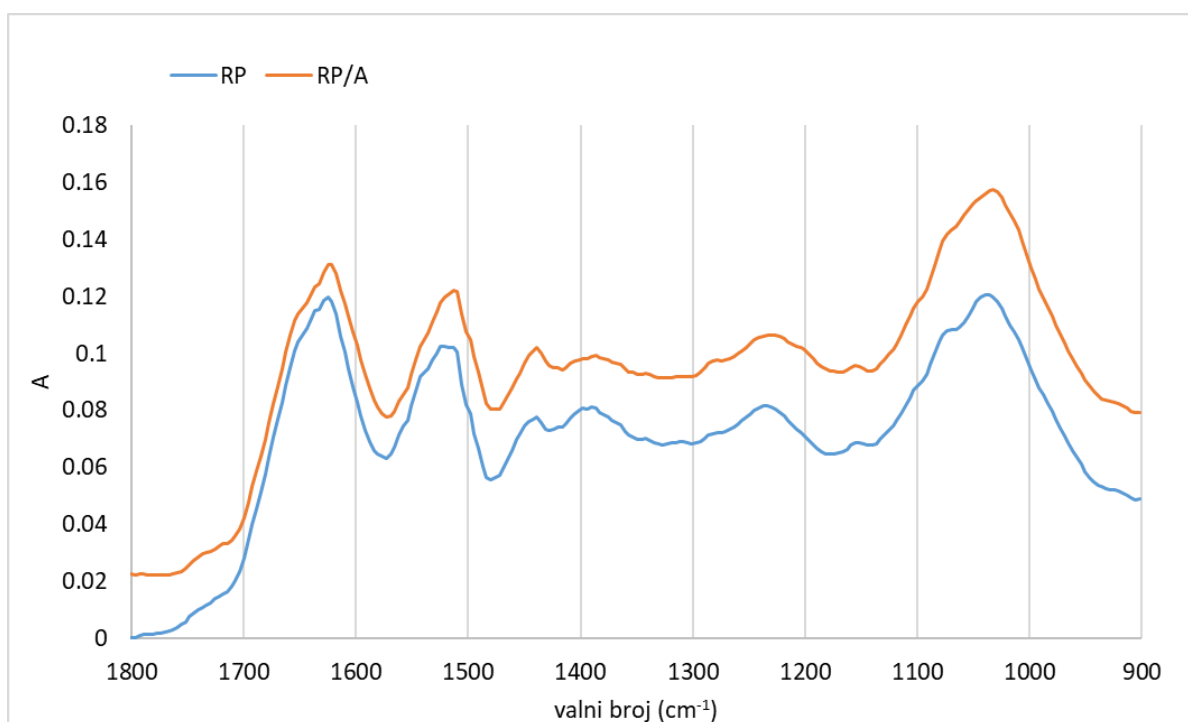


Slika 13 Prikaz IR spektra proteina riže (RP)

Tablica 13 Prikaz karakterističnih apsorpcijskih vrpca pri odgovarajućem valnom broju (cm^{-1}) proteina smeđe riže

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

Na **Slici 16** prikazan je dio IR spektra enkapsulata protein riže/aronija i proteina riže u kojem su značajno vidljive promjene u strukturi proteina riže nakon adsorpcije polifenola iz soka aronije. Općenito je vidljivo da je intenzitet apsorpcijskih vrpca niži za čisti protein.



Slika 16 Prikaz IR spektra enkapsulata protein riže/aronije (RP/A) i proteina riže (RP)

Apsorpcijska vrpca na 3280 cm^{-1} , koja je povezana sa istezanjem O-H skupina, se širi i većeg je intenziteta kod enkapsulata s polifenolima iz soka aronije u usporedbi sa čistim proteinom riže zbog nastajanja vodikovih veza. Došlo je do promjena i na apsorpcijskoj vrpici na 1043 cm^{-1} s popratnom vrpcom na 1080 cm^{-1} nakon vezanja fenola na nosač odnosno popratna vrpca je nestala što je indikacija promjena u istezanju C-O uz istezanje PO_2 . Apsorpcijska vrpca na 1520 cm^{-1} vezana za amid II strukturu je promijenila svoj oblik nakon vezivanja polifenola dok na vrpici na 1625 cm^{-1} (vezana za amid I strukturu) nije došlo do promjene. Apsorpcijska vrpca s 1230 cm^{-1} se je pomaknula na 1220 cm^{-1} nakon vezivanja polifenola što je indikator u promjeni amid III strukture, a vrpca na 1390 cm^{-1} se je proširila.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Količina adsorbiranih polifenola, proantocijanidina i antocijana ali i pojedinačnih polifenola mijenjala se s promjenom koncentracije polifenola u početnom soku koji se je koristio za kompleksiranje.
2. Najveći udio adsorbiranih polifenola, proantocijanidina i antocijana ali i pojedinačnih polifenola imao je uzorak RP/A, dok je najmanji udio imao uzorak RP/A 1:4, odnosno enkapsulati pripremljeni od soka s najvećim udjelom polifenola imali su i najveći udio polifenolnih komponenti.
3. Izračunom adsorpcijskog kapaciteta utvrđeno je da je došlo do veće adsorpcije polifenola kada se je za kompleksiranje koristio sok s manjom početnom koncentracijom polifenola.
4. Adsorpcijom polifenolnih komponenata aronije na protein riže utvrđena je i značajna promjena boje.
5. Tijekom kompleksiranja proteina riže sa sokom aronije dolazi do promjene u IR spektru u odnosu na čisti protein riže zbog vezivanja komponenata iz aronije na proteine riže.

6. LITERATURA

- Arts MJTJ, Haenen GRMM, Wilms LC, Beetstra SAJN, Heijnen CGM, Voss HP, Bast A: Interactions between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 1184-1187, 2002.
- Balindong JL, Liu L, Ward RM, Barkla BJ, Waters DL: Optimization and standardization of extraction and HPLC analysis of rice grain protein. *J. Cereal Sci.*, 72: 124–130, 2016.
- Benjakul S, Singh A, Chotphruethipong L, Mittal A: Protein-polyphenol conjugates: Preparation, functional properties, bioactivities and applications in foods and nutraceuticals. *Advances in Food and Nutrition Research*; Academic Press: London, UK, 2021.
- Czubinski J, Dwiecki K: A review of methods used for investigation of protein-phenolic compound interactions. *International Journal of Food Science & Technology* 52(3): 573-585, 2017.
- Ćorković I, Pichler A, Ivić I, Šimunović J, Kopjar M: Microencapsulation of Chokeberry Polyphenols and Volatiles: Application of Alginate and Pectin as Wall Materials. *Gels* 7:231, 2021.
- Fennema OR: *Food Chemistry*, Marcel Dekker Inc, 270 Madison Avenue, New York, 1996.
- Gao N, Wang Y, Jiao X, Chou S, Li E, Li B: Preparative Purification of Polyphenols from *Aronia melanocarpa* (Chokeberry) with Cellular Antioxidant and Antiproliferative Activity. *Molecules*: 23(1), 139, 2018.
- Grunovaite L, Pukalskiene M, Pukalskas A, Rimantas Venskutonis P: Fractionation of black chokeberry pomace into functional ingredients using high pressure extraction methods and evaluation of their antioxidant capacity and chemical composition. *Journal of Functional Foods* 24: 85–96, 2016.
- Gu L, Peng N, Chang C, McClements DJ, Su Y, Yang Y: Fabrication of surface-active antioxidant food biopolymers: Conjugation of catechin polymers to egg white proteins. *Food Biophysics*, 12(2): 198–210, 2017.

- Jakobek L, Šeruga M, Medvidiović-Kosanović M, Novak I: Antioxidant Activity and Polyphenols of Aronia in Comparison to other Berry Species. *Agriculturae Conspectus Scientii* 72(4), 301-306, 2007.
- Jakobek, L.: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Jayaprakash G, Bains A, Chawla P, Fogarasi M, Fogarasi S: A Narrative Review on Rice Proteins: Current Scenario and Food Industrial Application. *Polymers* 14: 3003, 2022.
- Kaloudi T, Tsimogiannis D, Oreopoulou V: Aronia Melanocarpa: Identification and Exploitation of Its Phenolic Components. *Molecules* 27(14): 4375, 2022.
- Kopjar M: Utjecaj dodatka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Kulling SE, Rawel HM: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)-A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta medica* 74(13): 1625-1634, 2008.
- Milić M: Priručnik za uzgoj aronije. Rasadnik Milić, Donji Miholjac, 2011.
- Minatel IO, Borges CV, Ferreira MI, Gomez HAG, Chen CYO, Lima GPP: Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compounds Biological Activity* 1-24, 2017.
- Mohammadalinejad S, Kurek MA: Microencapsulation of Anthocyanins—Critical Review of Techniques and Wall Materials. *Applied sciences* 11:3936, 2021.
- Oszmiański J, Wojdyło A: Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology* 221(6): 809-813, 2005.
- Ozidal T, Capanoglu E, Altay F: A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International* 51(2): 954-970, 2013.
- Pietta PG: Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63: 1035–1042, 2000.

- Quan TH, Benjakul S, Sae-leaw T, Balange AK, Maqsood S: Protein–polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications. *Trends in Food Science & Technology*, 91: 507-517, 2019.
- Shahidi F: Antioxidants: principles and applications. U *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, str. 1-14. Woodhead Publishing, Elsevier 80 High Street, Sawston, Cambridge, 2015.
- Thi ND, Hwang E: Effects of Drying Methods on Contents of Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of Black Chokeberries (*Aronia melanocarpa*). *Food Science and Biotechnology*, 25(1): 55-61, 2016.
- Tolić MT, Jurčević IL, Krbavčić IP, Marković K, Vahčić N: Phenolic content, antioxidant capacity and quality of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Food technology and biotechnology*, 2015.
- Tolić MT, Marković K, Vahčić N, Rumora Samarin I, Mačković N, Panjkota Krbavčić I: Polyphenolic profile of fresh chokeberry and chokeberry products. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 13(3-4): 147-153, 2018.
- Trifković K: Hidrogelovi na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola. Doktorski rad. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2017.
- Tsao R: Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2(12): 1231-1246, 2010.
- Wangensteen H, Braünlich M, Nikolic V, Malterud KE, Slimestad R, Barsett H: Anthocyanins, proanthocyanidins and total phenolics in four cultivars of aronia: Antioxidant and enzyme inhibitory effects. *Journal of Functional Foods* 7: 746-752, 2014.
- Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S: Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. *Journal of agricultural and food chemistry* 52: 7846-7856, 2004.
- Young IS, Woodside JV: Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54:176–186, 2001.

Web 1 (Poljoprivredna savjetodavna služba): https://www.savjetodavna.hr/wp-content/uploads/publikacije/aronija_2312_finish_opt.pdf (pristupljeno 05.09.2022.)

Web 2 (autor nepoznat): <https://opgsmid.hr/> (pristupljeno 05.09.2022.)

Web 3 (autor nepoznat): <https://api.izzi.digital/preview/page/11082> (pristupljeno 07.09.2022.)

Web 4 (autor nepoznat): <https://www.tehnologijahrane.com/wp-content/uploads/2009/05/cielab-obojeni-prostor.jpg> (pristupljeno 09.06.2023.)