

# Utjecaj dodatka saharoze i trehaloze na adsorpciju fenola aronije na proteine graška

---

**Botak, Ivana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:256324>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 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**

**Ivana Botak**

**UTJECAJ DODATKA SAHAROZE I TREHALOZE NA ADSORPCIJU**  
**FENOLA ARONIJE NA PROTEINE GRAŠKA**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, rujan, 2020.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za prehrambene tehnologije  
Katedra za tehnologiju voća i povrća  
Franje Kuhača 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 IX redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 9. srpnja 2020.

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

**Pomoć pri izradi:** -

### Utjecaj dodatka saharoze i trehaloze na adsorpciju fenola aronije na proteine graška

*Ivana Botak, 48-D/2020, 0113141335*

**Sažetak:** Cilj diplomskog rada bio je pripremiti bioaktivne dodatke hrani na bazi proteina graška u kombinaciji s fenolima aronije. Također, u radu je ispitivana mogućnost primjene saharoze i trehaloze s ciljem povećanja adsorpcije fenolnih spojeva iz soka aronije na proteine graška. Kompleksi su pripremljeni kompleksiranjem konstantne količine proteina, disaharida i soka aronije različitim redoslijedom. Na dobivenim kompleksima određeni su adsorbirani ukupni fenoli, proantocijanidini i antocijani aronije, antioksidacijska aktivnost kompleksa (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode), parametri boje i strukturne promjene kompleksa u odnosu na proteine graška. Najveća adsorpcija fenola, proantocijanidina i antocijana postignuta je prvobitnim kompleksiranjem proteina graška i disaharida te dodatnim kompleksiranjem s fenolima aronije. Ukupna promjena boje kontrolnog uzorka u odnosu na proteine graška iznosila je 44,63. Najmanja promjena boje utvrđena je za kompleks GP/T+A, a najveća za komplekse GP+T+A i GP/A+T. Utvrđene su i strukturne promjene na proteinima graška nakon kompleksiranja s disaharidima odnosno s disaharidima i fenolima aronije.

**Ključne riječi:** proteini graška, disaharidi, fenoli aronije, kompleksi

**Rad sadrži:** 48 stranica  
22 slike  
10 tablica  
68 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. izv. 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. doc. dr. sc. <i>Ante Lončarić</i>       | zamjena člana |

**Datum obrane:** 21. rujna 2020.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Food Technologies  
Subdepartment of fruits and vegetables 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 food industry  
**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on July 9, 2020  
**Mentor:** *Mirela Kopjar*, PhD, prof.  
**Technical assistance:** -

### Influence of Sucrose and Trehalose Addition on Adsorption of Chokeberry Phenolics on Pea Proteins

*Ivana Botak*, 48-D/2020, 0113141335

**Summary:** The aim of this research was preparation of bioactive food supplements based on pea protein in combination with chokeberry phenols. Also, the possibility of using sucrose and trehalose in increasing the adsorption of phenolic compounds from chokeberry juice on pea proteins was investigated. Complexes are prepared by complexing a constant amount of protein, disaccharide and juice chokeberries in a different order. Adsorbed total phenols, proanthocyanidins and chokeberry anthocyanins, antioxidant activity of the complex (DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC methods), colour parameters and structural changes of the complex in relation to pea proteins were determined on complexes. The highest adsorption of phenolics, proanthocyanidins and anthocyanins was achieved when first pea proteins were complexed with disaccharides and afterward with chokeberry phenolics. Total colour change of the control sample relative to pea proteins was 44.63. The smallest color change was noticed for GP/T+A complex, and the largest for GP+T+A and GP/A+T complexes. Structural changes on pea proteins after complexation with disaccharides or with disaccharides and chokeberry phenols were also proven.

**Key words:** pea proteins, disaccharides, chokeberry phenols, complexes

**Thesis contains:** 48 pages  
22 figures  
10 tables  
68 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

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

**Defense date:** September 21<sup>st</sup>, 2020

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

## Sadržaj

<b>1.</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.</b>	<b>ARONIJA.....</b>	<b>2</b>
2.1.1.	Fenoli.....	3
2.1.2.	Antocijani.....	6
<b>2.2.</b>	<b>ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3.</b>	<b>INTERAKCIJE FENOLA S PROTEINIMA .....</b>	<b>12</b>
2.3.1.	Parametri koji utječu na interakciju između fenolnih spojeva i proteina .....	14
2.3.2.	Utjecaj interakcija fenolnih spojeva i proteina na fenolne spojeve i proteine.....	17
<b>2.4.</b>	<b>BIOAKTIVNI DODACI HRANI NA BAZI PROTEINA.....</b>	<b>20</b>
<b>3.</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.</b>	<b>ZADATAK.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>24</b>
3.2.1.	Materijali.....	24
3.2.2.	Priprema bioaktivnih dodataka hrani .....	24
3.2.3.	Metode.....	25
3.2.3.1.	Uzorci .....	25
3.2.3.2.	Određivanje ukupnih fenola .....	26
3.2.3.3.	Određivanje proantocijanidina .....	26
3.2.3.4.	Određivanje monomernih antocijana .....	26
3.2.3.5.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	27
3.2.3.6.	Određivanje parametara boje .....	27
3.2.3.7.	FTIR-ATR analiza.....	31
3.2.3.8.	Statistička analiza podataka .....	31
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.</b>	<b>UDIO FENOLA, PROANTOCIJANIDINA I ANTOCIJANA NA KOMPLEKSIMA.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2.</b>	<b>ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KOMPLEKSA .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.</b>	<b>PARAMETRI BOJE KOMPLEKSA .....</b>	<b>35</b>
<b>4.4.</b>	<b>FTIR-ATR ANALIZA KOMPLEKSA.....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>44</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

BSA	Albumin iz goveđeg seruma (engl. Bovine Serum Albumin)
SOD	Enzim superoksid dismutaza (engl. Superoxide dismutaze)
CGA	Klorogena kiselina (engl. Chlorogenic acid)
FTIR	FTIR spektroskopija (engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
ATR	(engl. Attenuated Total Reflectance)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ABTS	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
CUPRAC	(engl. CUPric Reducing Antioxidant Capacity)
FRAP	(engl. Ferric Reducing Antioxidant Power)

## **1. UVOD**

Jagodasto, bobičasto i koštuničavo voće niskoenergetska je hrana bogata polifenolnim spojevima. Mnogobrojnim je istraživanjima utvrđeno da sitno tamno obojeno voće iz porodica *Rosaceae* (višnja, kupina, jagoda, malina, aronija), *Ericaceae* (borovnice) i *Saxifragaceae* (ribiz) sadrži veće količine polifenolnih spojeva od povrća, žitarica i nekih drugih vrsta voća. Zbog velike količine polifenola, ovo voće ima i jaku antioksidacijsku aktivnost. Između različitih vrsta bobičastog voća posebno se po količini polifenola i antioksidacijskoj aktivnosti ističe aronija. Aronija sadrži veće količine polifenola i ima snažniju antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ostalim vrstama voća. Zbog svojih svojstava aronija se svrstava u kategoriju „super voća“ (eng. *superfruits*) i zahvaljujući tome aronija dobiva sve veći marketinški prostor (Kolobarić, 2014).

Interakcije između različitih spojeva prisutnih u hrani su česte i imaju utjecaja na nutritivna, senzorska i funkcionalna svojstva prehrambenih proizvoda. Među takve interakcije ubrajaju se i interakcije proteina i fenolnih spojeva odnosno stvaranje njihovih kompleksa. Stvaranje ovakvih kompleksa može imati utjecaj na bioraspoloživost fenola u organizmu, ali može i poslužiti za formuliranje bioaktivnih dodataka hrani. Takvi bioaktivni dodatci hrani mogu u dodanom proizvodu povećati udio fenola, a samim time i antioksidacijski potencijal, ali mogu poboljšati i senzorske karakteristike (boju i aromu) i produžiti vijek trajanja proizvoda sprječavanjem oksidacijskih reakcija. Složenost interakcija proteina i fenolnih spojeva predstavlja izazov za prehrambene tehnologe te je potrebno pronaći adekvatan način njihovog kompleksiranja (Czubinski i Dwiecki, 2016).

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti komplekse na bazi proteina graška i fenola aronije. Kako bi se ispitala mogućnost povećanja adsorpcije fenola na proteine graška prilikom kompleksiranja korišteni su disaharidi, saharoza i trehaloza. Načinom kompleksiranja, odnosno redoslijedom povezivanja sastojaka (proteini graška, disaharid i sok aronije) pokušala se je postići što veća adsorpcija fenola aronije.



## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. ARONIJA

Aronija (*Aronia Melanocarpa*) (**Slika 1**) je podrijetlom iz sjeverne Amerike, ali je kao voćna vrsta najraširenija u državama bivšeg Sovjetskog Saveza. Raste kao bujan grm visok 1,5 – 3 m koji cvate u svibnju bijelim cvjetovima, a dozrijevaju u kolovozu kada postaju crno obojeni i slatko – trpkoga okusa. Dobro podnosi sušu, niske temperature i mrazove, otporna je na bolesti i štetnike. Upotreba plodova aronije je svestrana. Plodovi aronije prerađuju se u sokove, kompot, marmelade, džemove, a mogu se koristiti i svježi, sušeni ili se zamrzavaju (Kulling i Rawel, 2008).



**Slika 1** Aronija (*Aronia Melanocarpa*) (Web 1)

**Tablica 1** Energetska vrijednost i prosječan sastav 100 g aronije (Web 2)

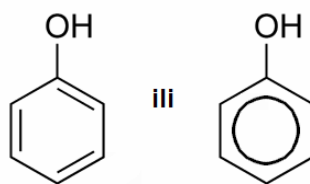
Energija	196 kJ (47 kcal)
Masti	0,5 g
Ugljikohidrati	9,6 g
Vlakna	5,3 g
Bjelančevine	1,4 g
Vitamin E	1,20 mg
Vitamin K	20 µg
Vitamin C	21 mg
Folna kiselina	15 µg
Kalcij	30 mg
Magnezij	20 mg
Željezo	0,62 mg
Cink	0,53 mg
Mangan	0,65 mg

Poznati su ljekoviti učinci zrelih plodova, koji pored prirodne boje, koja potječe od antocijana, sadrže i vitamine A, B, C, te minerale (**Tablica 1**). Izvršena su brojna istraživanja u svrhu otkrivanja antikancerogenih, kardioprotektivnih i antidijabetskih svojstava aronije. Aroniju sadrži više od 300 biološki aktivnih spojeva, a sadrži i rijedak voćni šećer sorbitol. Kao većina voća bogata je vodom i ima nisku energetska vrijednost (Kulling i Rawel, 2008).

### 2.1.1. Fenoli

Sekundarni metaboliti biljaka su skupina spojeva koji nastaju tijekom raznih transformacija u stanicama biljaka koji imaju zaštitnu i signalizirajuću funkciju i na taj način omogućuju kontakt sa okolnim ekosustavom, a njihova se biosinteza događa u specijaliziranim stanicama. Polifenoli imaju višestruku ulogu uključujući poboljšanje senzorskih svojstava kao što su boja, aroma ili okus, otpornost biljke prema bolestima i mikroorganizmima, indirektan utjecaj na rast biljke, zaštita osjetljivih staničnih dijelova od štetnog UV zračenja (Häkkinen, 2000). Najbrojnija skupina sekundarnih metabolita su fenolni spojevi, vrlo raznolikih struktura, molekularnih težina i fizikalno-kemijskih svojstava (Kroll i sur., 2003).

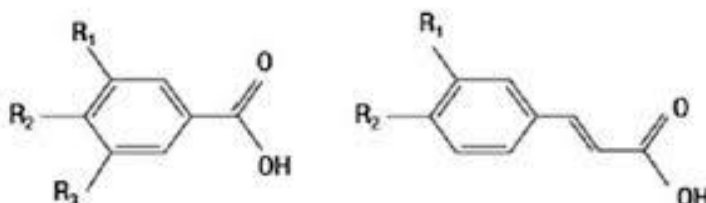
Strukturno uobičajena značajka svih fenolnih spojeva je prisutnost aromatskog prstena i najmanje jedne hidroksilne skupine (**Slika 2**) (Kroll i sur., 2003). Fenolni spojevi koji se nalaze u biljkama uglavnom su glikozilirani. Glikozidni dio povezan je s benzenskim prstenom preko hidroksilne skupine (O-glikozidi) ili direktno preko ugljika (C-glikozidi). Fenolni spojevi klasificirani su kao prirodni antioksidansi i postali su središte zanimanja istraživača zbog njihovih zdravstvenih učinaka, posebno u liječenju i prevenciji nekih kroničnih bolesti (Ozidal i sur., 2013). Osim toga, njihova prisutnost u hrani sprječava potencijalno nepoželjne promjene tijekom procesiranja, transporta i skladištenja (Masqsood i sur., 2014). Fenolni spojevi osjetljivi su na povišenu koncentraciju kisika, povišenu temperaturu te ulaze u reakcije enzimskog i neenzimskog posmeđivanja. Najvažniji fenolni spojevi koji se pojavljuju u biljkama su flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni i lignani. Kriterij koji se uzima u obzir tijekom klasifikacije fenolnih spojeva je broj atoma ugljika u strukturi (Crozier i sur., 2009).



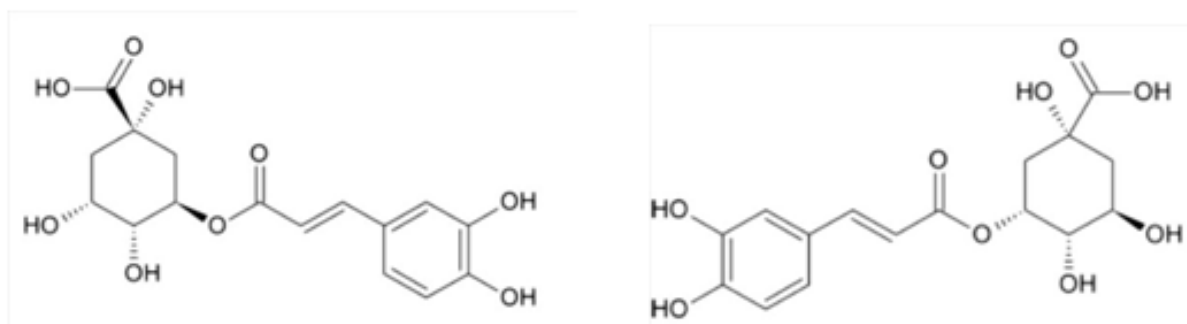
**Slika 2** Strukturna formula fenola (Web 3)

Fenolne kiseline su skupina biljnih fenola relativno jednostavne strukture, ali se također mogu povezati sa jedinicama šećera. Najčešće su prisutne kao derivati benzojeve (p-hidroksibenzojeva kiselina, siringinska, galna, elaginska) ili cimetine kiseline (hidroksicimetine kiseline: p-kumarinska, kafeinska, ferulinska, sinapinska) (**Slika 3**). Hidroksibenzojeve kiseline imaju isti osnovni C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> kostur, a razlika u strukturi uzrokovana je hidroksilacijom ili metilacijom aromatskog prstena. U biljkama se nalaze u topljivoj formi, konjugirane sa šećerima ili organskim kiselinama, odnosno vezane s dijelovima stanične stjenke kao što su lignini (Häkkinen, 2000). Hidroksicimetine kiseline se nalaze u svim dijelovima biljaka, u različitim konjugiranim oblicima. Kafeinska kiselina najrasprostranjenija je fenolna kiselina u prirodi i predstavlja 75% - 100% sadržaja ukupnih hidroksicimernih kiselina u voću (Häkkinen, 2000). Antioksidacijski kapacitet fenolnih kiselina povećava se s povećanjem stupnja hidroksilacije (trihidroksilirana galna kiselina pokazuje visoku antioksidacijsku aktivnost). Hidroksicimetine kiseline pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s hidroksibenzojevim kiselinama zbog CH=CH-COOH skupine koja doprinosi većoj mogućnosti doniranja atoma vodika i stabilizaciju radikala nego -COOH skupina u hidroksibenzojevim kiselinama (Häkkinen, 2000).

Od fenolnih kiselina, u aroniji su pronađene klorogenska i neoklorogenska kiselina, esteri hidroksibenzojevih kiselina s kina kiselinom (**Slika 4**) (Kulling i Rawel, 2008).

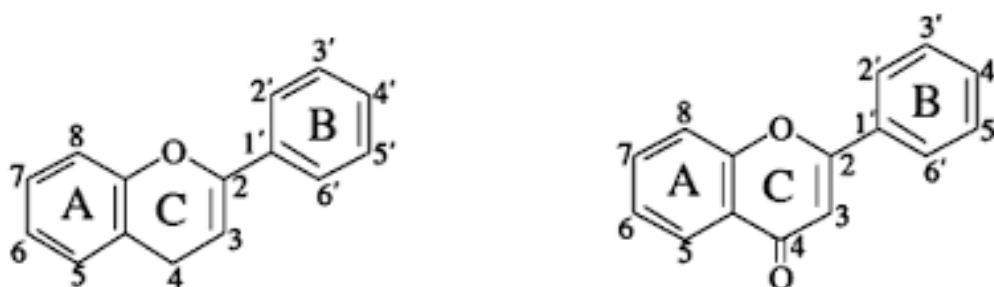


**Slika 3** Lijevo - hidroksibenzojeva kiselina; desno - hidroksicimetna kiselina (Ignat i sur., 2011)



**Slika 4** Struktura klorogenske (lijevo) i neoklorogenske kiseline (desno) (Kokotkiewicz i sur., 2010)

Flavonoidi čine najveću (uključuju preko 5000 spojeva) i najvažniju skupinu fenolnih spojeva (Kroll i sur., 2003). Nalaze se u gotovo svim dijelovima biljke, a njihova je koncentracija određena genetikom biljke te ovisi o klimatskim uvjetima, načinu uzgoja i zrelosti biljke. Razlikuju se od ostalih aromatičnih spojeva zbog prisutnosti strukture  $C_6C_3C_6$  koja se sastoji od dva benzenska prstena (A i B) međusobno povezanim  $C_3$  priključkom (heterociklički prsten C) (**Slika 5**). U prirodi se flavonoidi nalaze uglavnom u obliku glikozida, tj. povezani su s molekulama šećera. Supstitucijske skupine također mogu biti hidroksilna skupina te metoksi skupina (Kroll i sur., 2003).



**Slika 5** Osnovna struktura flavonoida, lijevo - flavan jezgra; desno - okso-flavonoid jezgra (Rein, 2005)

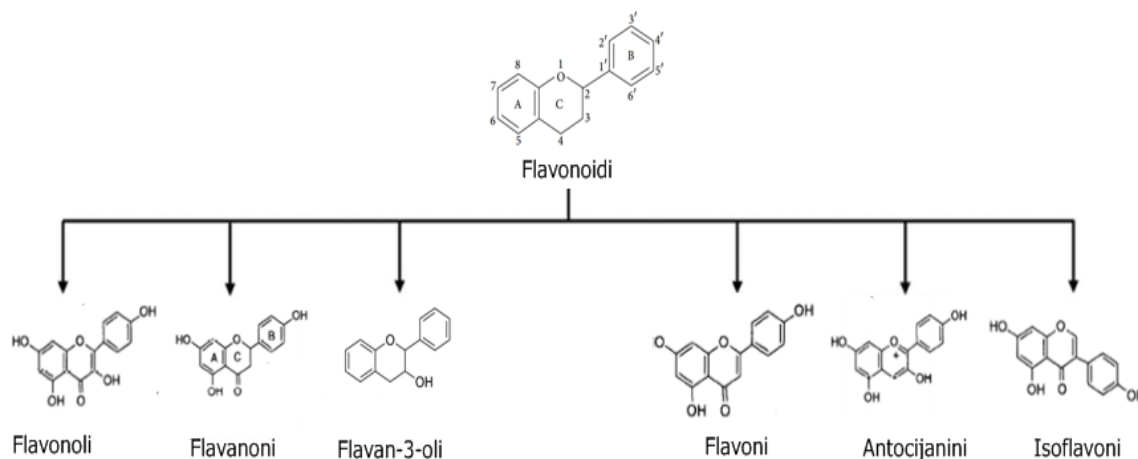
Na temelju razlika u stupnju nezasićenosti i oksidacijskog stanja dodatka  $C_3$ , flavonoide se može podijeliti u nekoliko podskupina: flavanoni (hesperetin i naringenin); flavoni (apigenin); flavonoli (isorhamnetin, kaempferol i kvercetin); izoflavoni (genistein i daidzein); flavan-3-oli/katehini (epigalokatehin epikatehin i galokatehin) i antocijanini (cijanidin, delphinidin, pelargonidin i malvidin) (**Tablica 2**) (Kroll i sur., 2003).

**Tablica 2** Fenolne komponente u bobicama aronije (Oszmianski i Wojdylo, 2005)

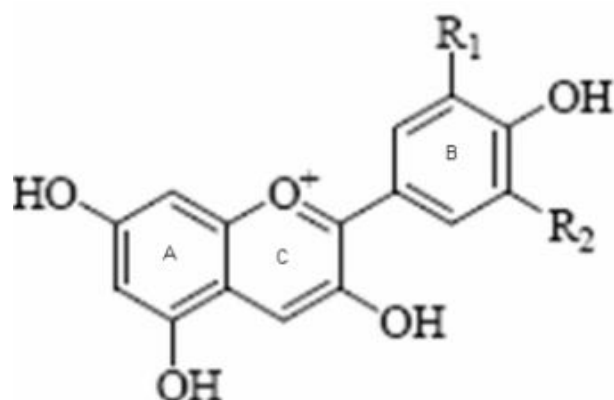
Skupina polifenola	Komponenta	Količina komponente (mg/100 g suhe tvari)
Flavani	Proantocijanidini	5181,6
Fenolne kiseline	Klorogenska kiselina	301,85
	Neoklorogenska kiselina	290,81
Flavonoli	Kvercetin-3-galaktozid	36,98
	Kvercetin-3-glukozid	21,64
	Kvercetin-3-rutinozid	15,1
	Derivati kvarcetina (neidentificirani)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

### 2.1.2. Antocijani

Antocijani su biljni pigmenti topljivi u vodi i odgovorni su za ružičastu, crvenu, ljubičastu i plavu boju biljaka (grožđe, bobičasto voće, šljive, patliđan, višnje). Antocijani pripadaju flavonoidnoj grupi polifenola (**Slika 6**) (Kong i sur, 2003).

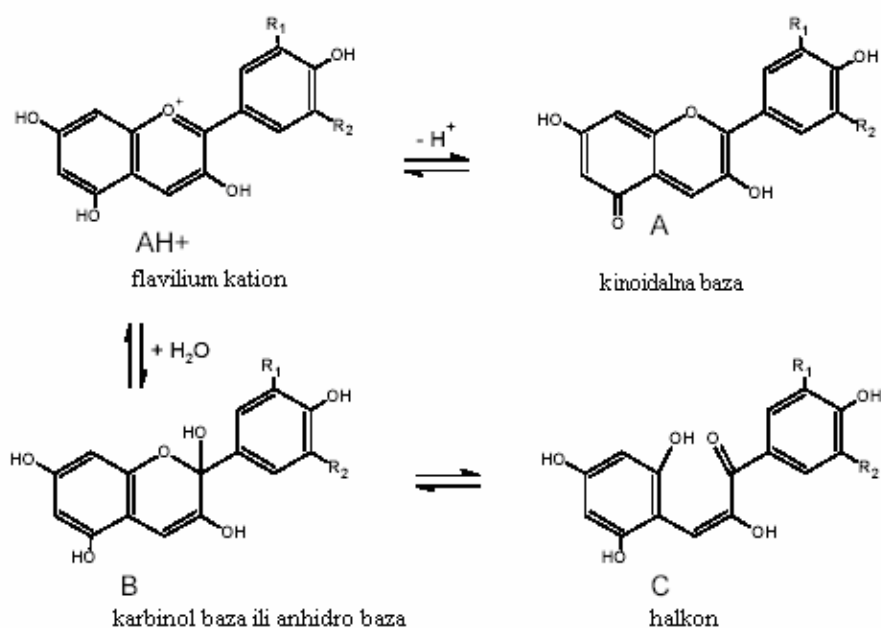
**Slika 6** Podjela flavonoida (Web 4)

Antocijani su glikozilirani polihidroksi i polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilium kationa odnosno flavilium kationa. Aglikon, odnosno flavilium kation je glavni dio antocijana, još se naziva antocijanidin, i obično je penta (3,5,7,3',4') ili hekso substituirani (3,5,7,3',4',5'), a predstavlja nešećerni produkt hidrolize (**Slika 7**) (Kong i sur, 2003).



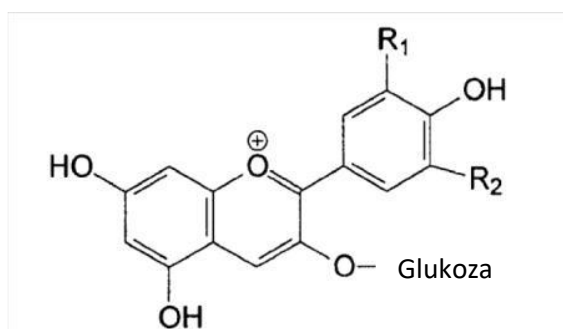
Slika 7 Flavilium kation (Kong i sur., 2003)

U vakuolama biljnih stanica antocijanini se pojavljuju u četiri strukturna oblika koja su međusobno u ravnoteži: flavilium kation te kinoidalna baza, karbinol pseudo-baza i halkon pseudo-baza. U ovisnosti o pH otopine u kojoj se nalaze, ove kemijske forme antocijana pokazuju različitu obojenost. Pri pH 1 prevladava crveno obojeni flavilium kation, plava boja kinoidalne baze prevladava pri pH 2-4, a pri pH 5 i 6 se stvaraju dvije bezbojne forme koje imaju karbinol i halkon bazu (Slika 8). Pri pH vrijednostima iznad 7, molekula antocijana se degradira (Clifford, 2000).



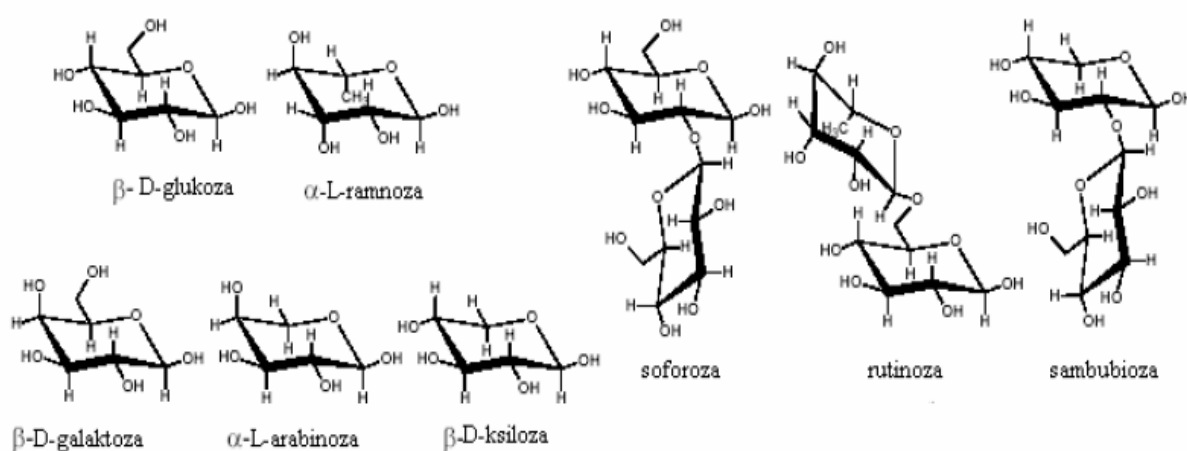
Slika 8 Četiri strukturna oblika antocijana (Rein, 2005)

Danas su poznata 22 različita antocijanidina, a najznačajniji antocijanidini koji doprinose pigmentaciji voća su pelargonidin, cijanidin, delphinidin, peonidin, petunidin i malvidin (**Slika 9**).



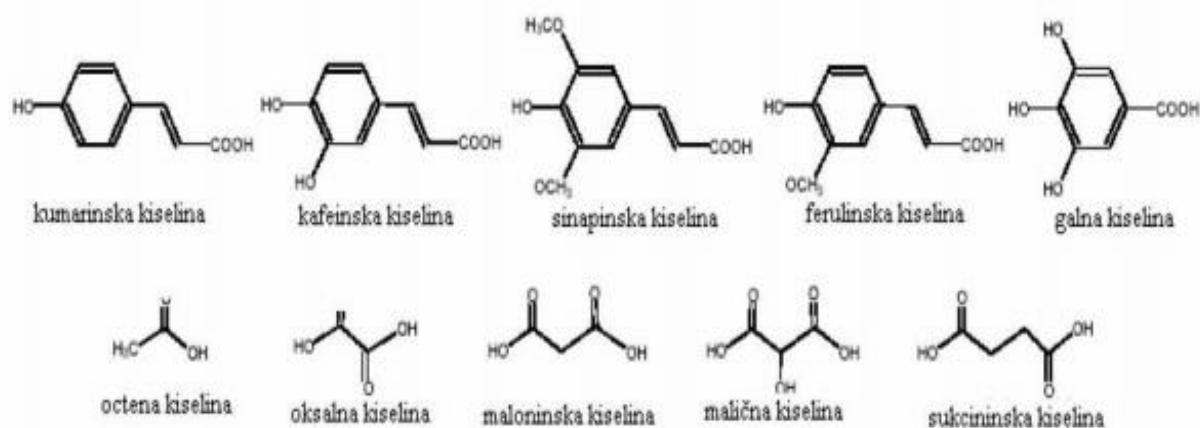
**Slika 9** Kemijska struktura osnovnih antocijanina: pelargonidin-3-glukozid,  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ; cijanidin-3-glukozid,  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ; delphinidin-3-glukozid,  $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$ ; peonidin-3-glukozid,  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=H$ ; petunidin-3-glukozid,  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=OH$ ; malvidin-3-glukozid,  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=OCH_3$  (Clifford, 2000)

Njihova količina ovisi o zrelosti voća, klimatskim uvjetima, svjetlosti i temperaturi, a razlikuju se s obzirom na broj hidroksi i/ili metoksi grupa, vrsti, broju i mjestu vezanog šećera na molekulu te vrsti i broju alifatskih ili aromatskih kiselina koje su vezane na šećer. Šećeri koji su najčešće vezani na antocijane su glukoza, ramnoza, galaktoza, arabinoza, ksiloza, rutinoza, soforoza, sambubioza i glukorutinoza (**Slika 10**). Glikolizirani antocijani su puno stabilniji i topljiviji u vodi od antocijanidina (Rein, 2005). Antocijani mogu biti i acilirani s raznim alifatskim (jabučna, oksalna, octena) ili hidroksicimetnim kiselinama (*p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska kiselina) što omogućuje njihovu primjenu u prehrambenoj industriji jer aciliranjem postaju stabilniji (**Slika 11**) (Jakobek, 2007).



**Slika 10** Glikozilne jedinice antocijana (Rein, 2005)





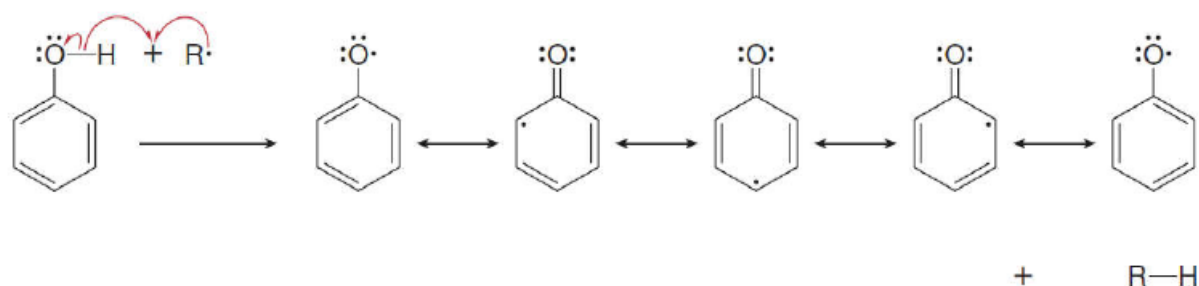
Slika 11 Najčešće acilne jedinice antocijanina (Francis, 1989)

Antocijani u kiselom mediju postaju stabilni, a njihova stabilnost ovisi o pH, temperaturi, prisustvu kisika i strukturnoj konformaciji, ali i o prisustvu razgradnih enzima, sumpor dioksida, metalnih iona, askorbinske kiseline i šećera. Dokazano je da su antocijani brusnice koji sadrže galaktozu stabilniji tijekom skladištenja od onih koji sadrže arabinozu. Pri pH 2-4 i povišenoj temperaturi dolazi do hidrolize glikozidne veze i stvaranja aglikona koji je manje stabilan od glikozida. Šećeri u visokim koncentracijama čuvaju stabilnost antocijana što je posljedica smanjenja aktiviteta vode. Niske koncentracije fruktoze, arabinoze, laktoze i sarboze imaju veći degradativni učinak od glukoze, saharoze i maltoze. Brzina degradativnih reakcija antocijana slijedi brzinu degradativnih reakcija šećera do furfurala koji kondenzira s antocijanima pri čemu nastaju smeđe obojeni produkti. Navedena reakcija ovisi o kisiku i temperaturi, a česta je kod voćnih sokova. Brzina degradacije antocijana povećava se prisustvom svjetlosti (iako je neophodna za njihovu biosintezu), povećanjem temperature, prisustvom kisika, prisustvom askorbinske kiseline (ubrzava polimerizaciju pigmenta i uzrokuje obezbojenje), povećanjem hidrosilacije, dok antocijane stabilizira inaktivacija enzima i povećana metilacija i glikozilacija na aglikonu. Metalni kompleksi stabiliziraju boju, iako može doći do negativnog efekta jer se metali spajaju s taninima koji daju plavo i smeđe obojenje. Također, antocijani se mogu kondenzirati sami sa sobom, ali i sa drugim organskim komponentama, a taj se proces naziva kopigmentacija (Markakis, 1982).

Antocijanini u aroniji većinom su prisutni kao smjesa glikozida cijanidina: 3-galaktozida, 3-arabinozida, 3-ksilozida i 3-glukozida, a najviše ima cijanidin-3-galaktozida (Kulling i Rawel, 2008).

## 2.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidansi su spojevi koji utječu na oksidaciju nekog supstrata tako što inhibiraju ili odgađaju njegovu oksidaciju. Voće i povrće bogati su izvori prirodnih antioksidansa (vitamini A, B, C, tokoferoli, prehrambena vlakna, selen, kalcij, fenolne kiseline, flavonoidi), a najvažniji su polifenolni spojevi jer su odgovorni za veliki dio antioksidacijskog kapaciteta voća i povrća (Jakobek, 2007). Slobodni radikali su vrlo reaktivne, nestabilne molekule koje sadrže nespareni elektron u vanjskoj elektronskoj ljusci koji mogu donirati ili ga uzeti drugoj molekuli. Upravo iz tog razloga ulaze u reakcije s raznim molekulama kako bi postigli stabilnost. Najčešće reaktivne tvari su singletni kisik, hidroksilni radikal, hidroperoksidni radikal, vodikov peroksid, lipidni radikali. Vodikov atom iz fenolne hidroksilne skupine može se donirati štetnom reaktivnom slobodnom radikalu uslijed čega nastaje novi slobodni radikal na fenolu koji je stabiliziran rezonancijom i stoga manje reaktivan (**Slika 12**). Kada se u organizmu naruši ravnoteža između oksidativnog oštećenja i antioksidativne reparacije dolazi do oksidativnog stresa odnosno starenja stanica, oštećenja DNA te razvoja raznih bolesti (Kazazić, 2004).



**Slika 12** Reakcija djelovanja antioksidansa na slobodne radikale (Krijan, 2017)

Antioksidansi, dakle, brane organizam od oksidacijskog stresa na više načina. Jedan od njih je hvatanje slobodnih radikala čime se postiže neutralizacija i stabilizacija radikala doniranjem elektrona. Smatra se da flavonoidi mogu sudjelovati u reakcijama hvatanja slobodnih radikala, pri čemu nastaje flavonoidni fenoksidni radikal koji ne potiče daljnje lančane reakcije. Ovaj način obrane još se naziva i antiradikalna aktivnost. Antioksidacijski učinak postiže se i prilikom interakcija flavonoida i drugih molekula kao što su vitamini. Sljedeći način je vezanje iona metala tj. kelacija metala koji u oksidacijskim reakcijama djeluju kao

katalizatori. Sinergistički učinak je primijećen u međudjelovanju vitamina C i kvercetina, te  $\alpha$ -tokoferola i nekih polifenolnih spojeva (**Tablica 3**) (Kazazić, 2004). Pretpostavlja se da polifenoli mogu zaštititi od nastanka tumora kroz inhibiciju određenih oksidativnih procesa koji oštećuju stanice. Konjugirana prstenasta struktura i hidroksilne grupe omogućuju polifenolima ulogu antioksidansa tako da stabiliziraju slobodne radikale (Kulling i Rawel, 2008).

Antioksidacijska aktivnost ovisi o strukturnim svojstvima antioksidanasa, temperaturi, svjetlosti, tipu supstrata, fizikalnom stanju sustava te mikrokomponentama koje djeluju kao prooksidansi ili sinergisti. Antioksidativna aktivnost polifenolnih spojeva povećava se povećanjem broja hidroksilnih grupa, a smanjuje glikozidacijom (Yao i sur., 2004). Jedan od načina na koji polifenoli mogu djelovati antioksidativno je i stvaranje kompleksa s ionima metala. Pokazalo se da neki polifenoli iz aronije djeluju kao kelatori (*eng. chelators*) metala kao što su željezo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ili bakar ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Sposobnost polifenola da vežu katione metala smanjuje koncentraciju metala, a time i njihovu ulogu u iniciranju oksidacijskih procesa. Potvrđeno je da crvena frakcija pigmenata iz aronije, sastavljena od derivata cijanidina, ima snažno djelovanje na slobodne radikale. Istraživanjem provedenim na ljudima, koji su konzumirali sok aronije, primijećeno je smanjenje oksidativnog oštećenja crvenih krvnih stanica uzrokovanog intenzivnim vježbanjem (Kulling i Rawel, 2008).

**Tablica 3** Mehanizam antioksidativne aktivnosti (Rein, 2005)

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

### 2.3. INTERAKCIJE FENOLA S PROTEINIMA

Interakcije između različitih spojeva prisutnih u hrani su česte i imaju utjecaja na hranjiva i funkcionalna svojstva prehrambenih proizvoda. Među navedene interakcije spada i stvaranje kompleksa fenolnih spojeva i proteina. Složenost interakcija fenolnih spojeva i proteina predstavlja izazov za analitičare hrane (Czubinski i Dwiecki, 2016).

U posljednje vrijeme značajan je broj istraživanja usredotočen na proučavanje interakcija fenolnih spojeva s glavnim sastojcima hrane poput polisaharida, proteina ili lipida. Fenolni spojevi koji se nalaze u hrani podvrgavaju se kemijskim promjenama zbog prerade hrane i interakcije s proteinima ili drugim makromolekulama čak i nakon konzumacije hrane, probavom u gastrointestinalnom traktu (Nydia i sur, 2017).

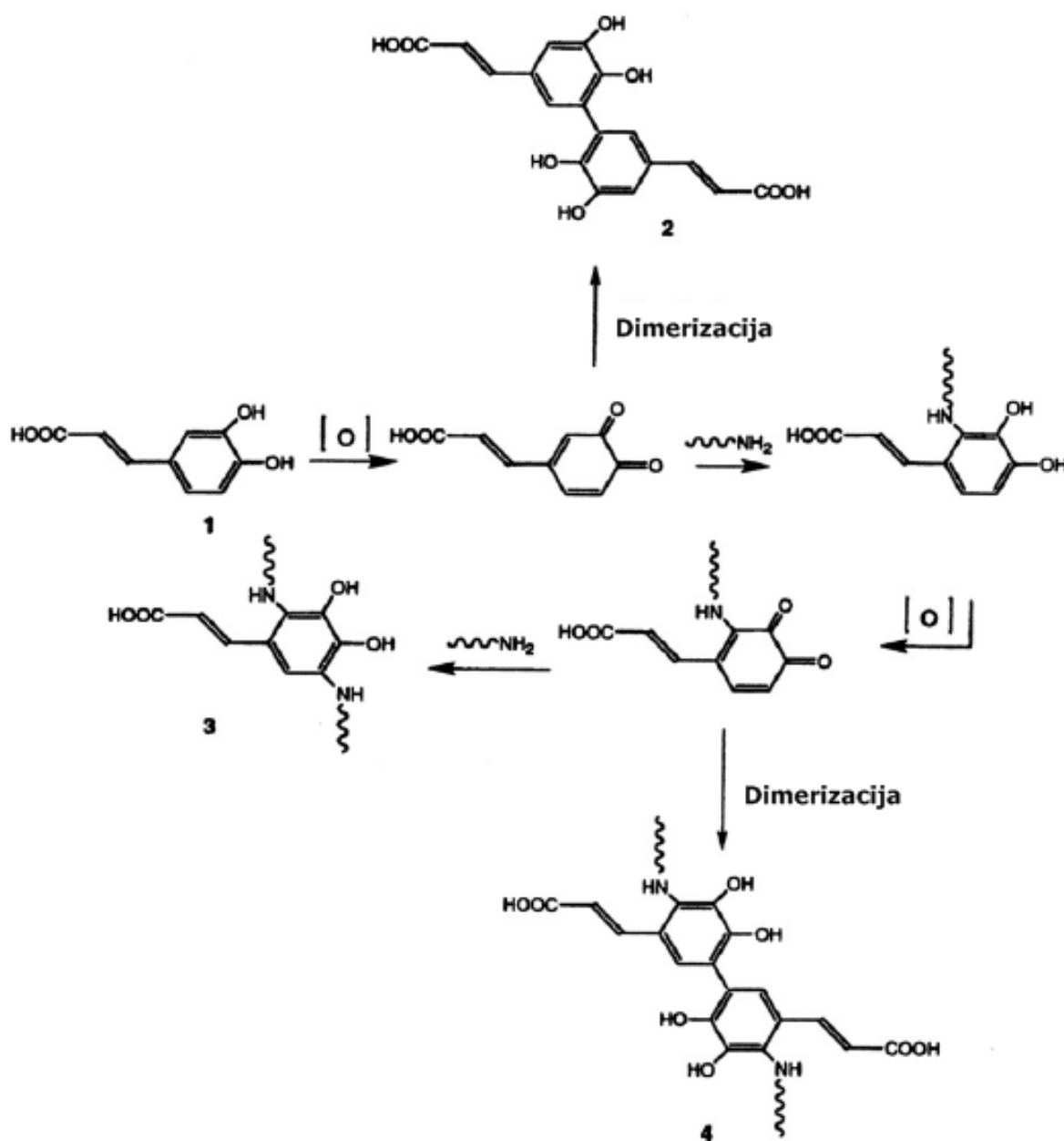
Učinkovitost pojedinog fenolnog spoja u ljudskom tijelu uvelike ovisi o učinkovitosti njihove apsorpcije. Teoretski, fenolni spojevi, koji se unose prehrambenim proizvodima u tijelo, trebali bi se osloboditi tijekom početnih faza probave. Od svih hranjivih tvari koje okružuju fenolne spojeve unutar gastrointestinalnog trakta, proteini imaju najjači utjecaj na njihovu dostupnost za apsorpciju. Stoga postoji niz dokaza koji upućuju na to da se fenolni spojevi apsorbiraju u relativno malim količinama (Arts i sur., 2001; Tomás-Barberán i Andrés-Lacueva, 2012). Interakcije između fenolnih spojeva i proteina mogu se dogoditi i prije njihovog unosa, za vrijeme proizvodnje i prerade hrane. Polifenoli i hranjive tvari mogu doći u međusobni kontakt i kao posljedica toga, podvrgnuti se različitim interakcijama koje dovode do smanjenja brzine njihove apsorpcije. Interakcije između fenolnih spojeva i proteina mogu se proučavati iz dva aspekta. Interakcija s fenolnim spojevima uzrokuje promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima proteina. Formiranje takvih kompleksa može dovesti do smanjenja hranjivih sastojaka, tehnološke vrijednosti, enzimske aktivnosti i drugih bioloških učinaka proteina promjenom njihove topljivosti, toplinske stabilnosti i probavljivosti (Kroll i sur., 2003; Tomás-Barberán i i Andrés-Lacueva, 2012; Ozdal i sur., 2013). Istovremeno nastajanje kompleksa s proteinima može značajno smanjiti razinu utjecaja na zdravlje zbog maskiranja njihovih antioksidacijskih svojstava (Ozdal i sur., 2013; Gonzales i sur., 2015).

Fenolna skupina izvrstan je donor vodika koji tvori veze s karboksilnom skupinom proteina. Da bi fenolni spojevi imali visok afinitet za proteine, moraju biti dovoljno mali za prodiranje u

interfibrilarna područja molekula proteina, ali i dovoljno veliki za umrežavanje peptidnih lanaca (Mulaudzi i sur., 2012). Stvaranje interakcije između fenolnih spojeva i proteina prikazano je na **Slici 13**. Difenolski dio polifenola (Almajano i sur., 2007) lako se oksidira na ortokinon, bilo enzimatski kao u biljnim tkivima bilo molekularnim kisikom (Strauss i Gibson, 2004). Kinin tvori dimer (Arimboor i Arumughan, 2011) u sporednoj reakciji ili reagira s amino ili sulfhidrilnim bočnim lancima polipeptida stvarajući kovalentne C- N ili C-S veze s fenolnim prstenom, uz regeneraciju hidrokinona. Dimer se može reoksidirati i vezati drugi polipeptid, što rezultira unakrsnim vezivanjem (Arts i sur., 2001). Inače, dva kinina, od kojih svaki nosi jedan lanac, mogu se dimerizirati. Poznato je da reakcije kinona i amino skupina smanjuju probavljivost i bioraspoloživost proteina koji sadrži lizin i cistein. Budući da se kinoni/hidrokinoni lako reduciraju/oksidiraju, služe kao odlični prenosioci elektrona u biološkim sustavima (Strauss i Gibson, 2004).

Interakcije polifenola i proteina odvijaju se nekovalentnim, hidrofobnim interakcijama i kovalentnim vezanjem, a spojevi koji nastaju kasnije se mogu stabilizirati vodikovim vezama. Nekovalentno vezanje je reverzibilno i slabije od kovalentnog vezanja koje je rezultat ireverzibilnih interakcija, gdje se polifenoli transformiraju do kinona koji pak mogu reagirati sa nukleofilnim skupinama na proteinskim molekulama. Važni čimbenici kod vezanja polifenola i proteina su struktura, molarna masa polifenola (visokomolekularni polifenoli mogu se čvršće i selektivnije vezati na proteine) i broj hidroksilnih skupina (čvršće vezanje na proteine kod polifenola sa većim brojem hidroksilnih skupina). Ukoliko se polifenoli vežu na hidrofobnu stranu proteina, može doći do promjene u strukturi proteina uslijed čega protein gubi svoju funkcionalnost. Proteini mogu zaštititi polifenole od oksidativne degradacije zahvaljujući interakcijama (Jakobek, 2015).

Poznato je da interakcije fenolnih spojeva i proteina utječu na strukturu proteina, sadržaj slobodnih polifenola, antioksidacijski kapacitet i bioraspoloživost fenolnih spojeva u hrani. Razumijevanje interakcija fenolnih spojeva i proteina pomaže u kontroli funkcionalnih svojstava proteina u prehrambenim proizvodima tijekom prerade, transporta i skladištenja (Ozdal i sur., 2013).



**Slika 13** Reakcije fenolne kiseline s amino bočnim lancima polipeptida (Strauss i Gibson, 2004)

### 2.3.1. Parametri koji utječu na interakciju između fenolnih spojeva i proteina

Tijekom formiranja interakcije između fenolnih spojeva i proteina dolazi do mnogih promjena čiji intenzitet ovisi o uvjetima kao što su temperatura, pH, vrsti proteina, koncentraciji proteina, vrsti i strukturi fenolnih spojeva i nekoliko drugih čimbenika (Ozđal i sur., 2013).

### *Temperatura*

Temperatura može utjecati na vodikove veze i uzrokuje stvaranje hidrofobnih veza, stoga je važan parametar pri stvaranju interakcije proteina i fenola. Sastry i Rao (1990) uočili su da temperatura ima značajan utjecaj na vezanje slobodnog 11S proteina (heliantinin) iz sjemenki suncokreta s 5-O-kofooil-kinom kiselinom. Vezanje se značajno smanjivalo kako se temperatura povećavala s 30 °C na 45 °C, a interakcija je potpuno nestala na 55 °C. Prigent i sur. (2003) proučavali su interakcije goveđeg serumskog albumina (BSA) s 5-O-kofooil-kinom kiselinom na 5, 25 i 60 °C. Uočili su da se afinitet vezanja za 5-O-kofooil-kinu kiselinu za BSA smanjivao s porastom temperature. Tsai i She (2006) procijenili su doprinos interakcije fenola i proteina u antioksidacijskom kapacitetu graška nakon njegovog izlaganja fenolima pri različitim temperaturama zagrijavanja, između 30 i 70 °C. Ekstrahirali su enzim superoksid dismutazu (SOD) iz graška i stvorili interakciju proteina i fenolnih spojeva pri čemu su mjerili aktivnost SOD i sposobnost vezivanja ovog kompleksa s proteinima graška. Aktivnost SOD u svježem ili prerađenom voću vrlo je slaba zbog deformacija proteina nastalih uslijed zagrijavanja. Toplinska stabilnost SOD povećala se nakon interakcije sa fenolnim spojevima kao rezultat povećanja energije aktivacije SOD uzrokovano vezanjem fenolnih spojeva na protein. Dakle, vezanje fenolnog spoja je pojačano pri povišenoj temperaturi (Tsai i She, 2006).

### *pH vrijednost*

Najniža topljivost kompleksa polifenola i proteina je na 0,3-3,1 pH jedinica ispod izoelektričnih točaka proteina (Naczki i sur., 2006). Za razliku od temperature, pH utječe samo na stupanj vezanja fenola i proteina, ne i na njihov afinitet vezanja. Niži pH dovodi do jačeg vezanja jer je disocijacija proteina oslobodila više mjesta za vezanje (Sastry i Rao, 1990). Interakcije između klorogene kiseline (CGA) i nekoliko proteina kao što su BSA, lizozim,  $\alpha$ -laktalbumin pri  $\text{pH} \leq 7$  bile su nekovalentne veze, a količina CGA vezana za BSA bila je nešto viša pri nižem pH (Prigent i sur., 2003). S povećanjem pH, kovalentna interakcija lizozima i CGA bila je jača zbog stvaranja više radikala ili kinona uslijed autooksidacije CGA. Nakon toga reaktivni radikali i kinoni kovalentno se povezuju s proteinima (Prigent i sur., 2003). Naczki i sur. (1996) navode kako optimalan pH varira za različite proteine i općenito je blizu izoelektričnih točaka proteina. Rawel i sur. (2005) također su uočili veći afinitet vezanja s ferulinskom kiselinom i CGA blizu izoelektrične točka BSA. Papadopoulou i sur. (2006)

pretpostavljali su da elektrostatičke veze nisu glavni faktor u stvaranju kompleksa. Doista, povećano taloženje proteinsko-polifenolnih kompleksa u neposrednoj blizini izoelektrične točke može se pripisati minimalnoj topljivosti proteina pri ovom pH (Papadopoulou i sur., 2006).

#### *Vrsta i koncentracija proteina*

Na interakciju proteina i fenola utječu vrste proteina i molarni omjer fenola i proteina (Prigent i sur., 2003). Mogu se vezati hidrofobno ili hidrofilno. Razlika u afinitetu vezanja među proteinima ovisi o nekoliko čimbenika, poput hidrofobnosti, izoelektričnoj točki i aminokiselinskom sastavu proteina (Prigent i sur., 2003). Primjerice, afinitet vezanja CGA na BSA bio je veći nego lizozimu i  $\alpha$ -laktalbuminu. Količina proteina u otopini utječe na interakcije. Ako je koncentracija BSA niska, razlika u taloženju proteina između 0,5 mg/mL BSA i 1,0 mg/mL BSA nije bila statistički značajna. S druge strane, kad je koncentracija BSA veća od 1,0 mg/mL, učinak taloženja proteina bio je značajno niži u odnosu na učinak dobiven iz viših koncentracija od BSA (Naczki i sur., 1996).

#### *Vrsta i struktura polifenola*

Različite vrste fenolnih spojeva utječu na interakcije proteina i fenola ovisno o faktorima kao što su molekulska masa, metilacija, hidroksilacija, glikozilacija i hidrogenacija fenolnih spojeva. Afinitet vezanja polifenola na proteine raste s njihovom molekularnom masom. Veći polifenoli poput onih u crnom čaju (teaflavin, tearubigin) vjerojatnije će se vezati za mliječne proteine zbog fermentacije (oksidacije/polimerizacije) katehinskih monomera (Dubeau i sur., 2010). Fenolni spojevi niske molekularne mase uključujući p-kumarinsku kiselinu, p-hidroksibenzojevu kiselinu, cimetnu kiselinu (protokatekuična i kofeinska kiselina) i katehin, 3,4-dihidroksibenzojeva i cimetna kiselina imaju najjači afinitet vezanja za BSA (Bartolome i sur., 2000). Iako su i kvercetin i kvercetin 3-O- $\beta$ -D-glukopiranozid flavonoidi, njihovi afiniteti vezivanja za BSA su različiti (Martini i sur., 2008). Otkriveno je da hidroksicimetne kiseline koje uključuju ferulinsku kiselinu, kumarinsku i kofeinsku kiselinu povećavaju toplinsku stabilnost SOD u grašku bolje od hidroksibenzojeve kiseline. Potvrđeno je da je kumarinska kiselina superiorna za pojačavanje antioksidacijskog djelovanja SOD, pokazala je najjači afinitet vezanja za proteine graška (Tsai i She, 2006). Xiao i sur. (2011) istraživali su odnos između strukturalnih svojstava prehrambenih polifenola i njihove afinitete za mliječne



proteine. Metilacija i metoksilacija flavonoida smanjile su njihov afinitet vezanja za mliječne proteine 1,10–14,79 puta (Xiao i sur., 2011).

#### *Ostali čimbenici*

Ostali čimbenici koji utječu na interakcije proteina i fenola su koncentracija soli i dodatak određenih reagensa. Jačina vezanja klorogene kiseline za 11S protein suncokreta smanjila se s povećanjem koncentracije kuhinjske soli (NaCl). Koncentracija NaCl smanjila je količinu točaka za vezanje, a nije utjecala na afinitet vezanja zbog činjenice da soli u visokoj koncentraciji mogu inhibirati disocijaciju oligomernih proteina (Sastry i Rao, 1990). Neki reagensi, kao što su  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (redukcijsko sredstvo), čak i pri niskoj koncentraciji, mogu utjecati na interakcije proteina i fenola. Interakcija CGA i 11S proteina potpuno je nestala pri 0,01 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (Sastry i Rao, 1990).

### **2.3.2. Utjecaj interakcija fenolnih spojeva i proteina na fenolne spojeve i proteine**

Tijekom interakcija fenolnih spojeva i proteina, dolazi i do promjena na samim proteinima i fenolnim spojevima. Glavne promjene na proteinima odnose se na njihovu strukturu, funkcionalna i prehrambena svojstva i probavljivost proteina. S druge strane, ove interakcije rezultiraju promjenama ukupnog sadržaja fenola, antioksidacijske aktivnosti, sadržaja pojedinih fenolnih spojeva, kao i bioraspoloživost fenolnih spojeva (Ozidal i sur., 2013).

Biološka aktivnost i funkcionalnost proteina promijenjena je njihovom interakcijom s različitim fenolnim spojevima te dolazi do promjene u enzimskoj aktivnosti i fizikalno-kemijskim svojstvima, poput topljivosti ili toplinske stabilnosti proteina (Rohn i sur., 2005; Ozidal i sur., 2013). Topljivost ili netopljivost proteina važan je čimbenik za razumijevanje funkcionalnosti proteina u hrani jer njihova netopljivost može ograničiti i ostala funkcionalna svojstva proteina. Topljivost proteina ovisi o unutarnjim (npr. sastav aminokiselina proteina, slijed aminokiselina) i vanjskim čimbenicima (pH, temperatura, ionska čvrstoća) (Sathe, 2012).

Međutim, najvažnija promjena nastala stvaranjem proteinsko-fenolnog kompleksa je smanjenje hranjivih svojstava proteina smanjujući dostupnost određenih aminokiselina. O'Connell i Fox (1999) analizirali su formaciju kompleksa između mliječnih proteina i kava

kiseline tijekom zagrijavanja. Interakcija fenolne kiseline uzrokuje smanjenje količine dostupnog lizina i tiolne skupine u mliječnim proteinima. Nadalje, prisutnost kava kiseline dovodi do povećanja veličine umreženih kazeinskih micela. Autori su predložili mehanizam pri kojem se kava kiselina tijekom zagrijavanja podvrgava oksidaciji kinonima. Nastali kinoni tada mogu formirati kovalentni kompleks s aminokiselinama (Kroll i sur., 2003).

Belščak i sur. (2009) proučavali su ukupni sadržaj fenola, ukupni sadržaj flavonoida i antioksidacijske kapacitete raznih čokoladnih proizvoda. Uočili su da najniži ukupni sadržaj fenola, ukupni sadržaj flavonoida i antioksidativni kapaciteti ima mliječna čokolada iako sadrži veći udio kakaa (29%) od kakao pločica (16%). Pretpostavili su da je to rezultat povećanja interakcije između katehina i proteina. Proizvodi na bazi mlijeka predstavljaju vrlo složeni matriks gdje je dobro poznato da snažne interakcije katehina i proteina izravno utječu na ukupni sadržaj fenola, ukupni sadržaj flavonoida i antioksidacijske kapacitete (Belščak i sur., 2009).

Dubeau i sur. (2010) izmjerili su antioksidacijske kapacitete primjenom tri različite metode (ABTS metoda, voltometrija i inhibicija peroksidacije lipida). Koristeći ABTS metodu i voltometrijske metode uočili su da je mlijeko smanjilo antioksidacijski kapacitet čajeva. Suprotno tome, u metodi inhibicije lipidne peroksidacije, rezultati su pokazali da mlijeko pojačava antioksidacijsko djelovanje čajeva. Autori su objasnili kako mlijeko može imati dvostruki učinak na antioksidacijsku sposobnost čaja; inhibicijski učinak za reakcije koje se odvijaju u otopini ili na granici kruto-tekuće te pojačan učinak za emulzije ulja u vodi (Dubeau i sur., 2010). Sličnu interakciju između fenolnih spojeva čaja i proteina mlijeka su uočili i Sharma i sur. (2008) za crni čaj sa šećerom, mlijekom i kombinacijom šećera i mlijeka. Ekstrakt crnog čaja imao maksimalnu količinu polifenola, nakon čega slijedi crni čaj sa šećerom te crni čaj sa šećerom i mlijekom. Ryan i Petit (2010) koristeći FRAP metodu, uočili su da dodatak mlijeka čaju značajno smanjuje ukupni antioksidativni kapacitet ovisno o količini mlijeka. Dakle, antioksidativno djelovanje smanjeno je s povećanom količinom dodanog mlijeka.

Ferruzzi i Green (2006) proučavali su interakcije katehina iz čaja s proteinima. Cilj im je bio procijeniti utjecaj tretiranja sa pepsinom u svrhu povećanja iskorištenja katehina iz mlijeka i drugih namirnica bogatih proteinima. Kombinirali su kuhani zeleni čaj s obranim mlijekom u

omjerima od 10% do 50%. Rezultati su ukazali da se iskorištenje katehina smanjilo s povećanjem sadržaja mlijeka.

Arts i sur. (2002) izvijestili su da su čisti  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\kappa$ -kazeini maskirali antioksidacijska svojstva ekstrakta zelenog i crnog čaja i nekih čistih flavonoida koji se obično nalaze u čajevima u različitim količinama vjerojatno zbog kovalentnih ili nekovalentnih interakcija. Obje interakcije mogu dovesti do taloženja proteina kroz interakcije na više mjesta i višestruke interakcije. U interakcijama s više mjesta nekoliko se fenola veže za jednu proteinsku molekulu, a kod višestruke interakcije jedan se fenol veže na nekoliko proteinskih mjesta ili proteinskih molekula. Te interakcije mogu uzrokovati maskiranje sadržaja polifenola u proteinima. Također, interakcije polifenola i proteina mogu umanjiti antimikrobne učinke polifenola. Von Staszewski i sur. (2011) proučavali su promjene antimikrobnih kapaciteta različitih vrsta argentinskog zelenog čaja dodavanjem proteina sirutke. Rezultati su otkrili određeni stupanj maskiranja u antimikrobnoj aktivnosti zelenog čaja. Antimikrobni učinci u prisutnosti proteina sirutke u korelaciji su sa sadržajem polifenola u zelenom čaju i povećavaju se smanjenjem koncentracije proteina sirutke. Serafini i sur. (2009) proučavali su bioraspodivnost fenolnih kiselina i antioksidativni kapacitet borovnica koje se konzumiraju sa i bez mlijeka, provođenjem pokusa s jedanaest zdravih volontera koji su konzumirali ili 200 g borovnica sa 200 mL vode ili 200 g borovnica sa 200 mL punomasnog mlijeka. Rezultati su pokazali da je došlo smanjenja koncentracija kofeinske i ferulinske kiseline u plazmi kao i do smanjene cjelokupne apsorpcije kofeinske kiseline. Kao zaključak ovog istraživanja, autori smatraju da interakcije mlijeka i borovnica smanjuju antioksidativna svojstva borovnica i da se smanjuje apsorpcija kofeinske kiseline (Serafini i sur., 2009).

Tsai i She (2006) uočili su da je toplinska stabilnost superoksid dismutaze (SOD) povećana nakon njegove interakcije s fenolnim spojevima. Primjena viših temperatura rezultirala je većom sposobnošću vezanja fenolnih spojeva na proteine. Međutim, zagrijavanje je također dovelo do razaranja proteinsko-fenolnog kompleksa. Zabilježeno je da je aktivnost SOD bila veća nakon inkubacije s fenolnim spojevima. Kapacitet antioksidanata graška povećan je nakon interakcije s fenolnim spojevima i kumarinska kiselina je grašku omogućila maksimalno antioksidativno djelovanje u usporedbi s galijskom kiselinom, katehinom, ferulinskom kiselinom i kofeinskom kiselinom. Povećanje antioksidacijske aktivnosti u grašku rezultat je interakcije proteina i fenola u grašku koja je stabilizirala protein SOD i osigurao

antioksidacijski kapacitet proteina tijekom zagrijavanja. Dakle, interakcije s proteinima mogu utjecati na antioksidacijsku aktivnost fenolnih spojeva (Tsai i She, 2006).

#### **2.4. BIOAKTIVNI DODACI HRANI NA BAZI PROTEINA**

Bioaktivni spojevi prisutni su u malim količinama u hrani, uglavnom u voću, povrću i cjelovitim žitaricama, a posjeduju potencijalno pozitivan utjecaj na zdravlje. Bioaktivni spojevi su molekule koje mogu imati terapijski potencijal s utjecajem na unos energije, istodobno smanjujući proupalno stanje, oksidacijski stres i metaboličke poremećaje (Siriwardhana i sur., 2013). Epidemiološke studije pokazuju da konzumacija hrane bogate bioaktivnim spojevima s antioksidacijskim djelovanjem, uključujući vitamine, fitokemikalije i uglavnom fenolne spojeve, poput flavonoida i karotenoida, ima pozitivan učinak na ljudsko zdravlje i može umanjiti rizik od brojnih bolesti, poput tumora, bolesti srca, moždanog udara, Alzheimerove bolesti, dijabetesa, katarakte i dobne funkcionalne dekadencije (Siriwardhana i sur., 2013). Bioaktivni spojevi mogu modulirati metaboličke procese i pokazuju pozitivna svojstva poput antioksidacijskog učinka, inhibicije aktivnosti receptora, inhibicije ili indukcije enzima i indukcije i inhibicije ekspresije gena (Carbonell-Capella i sur., 2014).

Raznolikost kemijskih struktura bioaktivnih spojeva utječe na bioraspoloživost i biološka svojstva, dok antinutritivni efekt uključuje smanjenje bioraspoloživosti određenih spojeva ili inhibiciju probavnih enzima (Septembre-Malaterre i sur., 2018). Potencijalni učinci bioaktivnih spojeva i hranjivih sastojaka na zdravlje ovise o procesu probave, jer to utječe na bioaktivne spojeve i njihovu stabilnost, a kao posljedica utječe na bioraspoloživost i potencijalne pozitivne učinke na zdravlje (Carbonell-Capella i sur., 2014).

Proizvodi bogati polifenolima i proteinima vrlo su traženi na tržištu hrane, iako može biti teško formulirati prikladne prehrambene proizvode s fiziološki važnim količinama ovih sastojaka, a da se i dalje održi kvaliteta proizvoda. Dijelom je to zato što proteini mogu kompleksirati s ostalim sastojcima hrane i ubrzati destabilizirajuće efekte, što može promijeniti strukturu hrane i smanjiti rok trajanja proizvoda. Prethodnim kompleksiranjem proteina i polifenola u stabilne koloidne čestice mogu su pripremiti izuzetno kvalitetne formulacije hrane, pri čemu su ukupna strukturna svojstva hrane značajno poboljšana. Svi pozitivni učinci proteina i koncentriranih polifenola na taj način ostaju raspoloživi. U ovom procesu kompleksiranja, od velikog su značaja reaktivni alergeni epitopi određenih proteina

jer su učinkovito oslabljeni vezivanjem s polifenolima, čime umanjuju alergičnost prehrambenih proteina. Svinjski makrofagi proizvodili su protuupalni citokin kada se je na njih djelovalo proteinima sirutke, ali je proizvodnja citokina potpuno blokirana kada su stanice stimulirane česticama koje su nastale kompleksiranjem proteina sirutke s polifenolima cimeta. Polifenoli su blokirali proizvodnju citokina i kemokina, karakteristične za alergijske reakcije, što omogućava potencijalno stvaranje hipoalergijske hrane obogaćene proteinima i polifenolima (Lila i sur., 2017).

Proteini i polifenoli doprinose hranjivim sastojcima, prevencijama bolesti i poboljšanju stanja metabolizma te mogu sudjelovati u stvaranju strukture i stabilizaciji hrane. Želja je povećati potrošnju proteina i polifenola iz zdravstvenih razloga, a jedan je pristup stvaranje i primjena proteinsko-polifenolnih čestica koje bi uz zdravstvenu imale i strukturnu funkcionalnost u prehrambenim proizvodima. Uloge proteina i polifenola (pojedinačno ili kada su povezani), razmatraju se u vidu zdravstvenih koristi (prehrana, prevencija bolesti, sitost, ublažavanje alergija). Cilj je kompleksiranje čestica proteina i polifenola kako bi se osigurao pozitivan doprinos kvaliteti hrane te dovoljan unos proteina i polifenola (Foegeding i sur., 2017). Proteini i polifenoli mogu doprinjeti organizmu kao neovisne molekule, gdje je molekularna struktura važna za svojstva poput vezanja proteina za komponente okusa i interakcije polifenola sa receptorima i enzimima (Murakami i Ohnishi, 2012). Kada prirodni afinitet između molekula proteina i polifenola uzrokuje njihovu interakciju i međusobno se vežu u prehrambenim sustavima, mogu se zaštititi značajna zdravstvena svojstva polifenola tijekom probavnog procesa. Čestice kompleksa mogu stabilizirati i koncentrirati polifenolne molekule, stvarajući oštri i trpki okus koji daju polifenoli pri čemu se „maskira“ okusa proteina. Polifenoli su zaštićeni proteinskim nosačem, što omogućuje transport do gastrointestinalnog trakta (Grace i sur., 2014). Najznačajnije iz zdravstvene perspektive, bioaktivna djelotvornost polifenola očuvana je i u kompleksu (Roopchand i sur., 2012). Unutar širokog raspona testiranih fitoaktivnih spojeva, polifenoli (antocijani, proantocijanidini, stilbeni i drugi flavonoidni spojevi) su bili stabilizirani u kompleksima koji su zadržali protuupalna i antidijabetička svojstva. Uz njihove prepoznate uloge u prevenciji bolesti polifenoli mogu modulirati alergijski potencijal na proteine hrane kroz niz predloženih mehanizama (Scalbert i sur., 2005).

Correia i sur. (2017) pripremili su bioaktivne dodatke kompleksiranjem pšeničnog brašna, brašna slanutka, kokosovog brašna i izolata proteina soje s vodenim ekstraktima divlje borovnice. U istraživanju je korišteno sušenje raspršivanjem, sušenje zamrzavanjem i vakuumsko sušenje za pripremu suhih matriksa sličnih brašnu. Najviše koncentracije polifenola i antocijana imali su osušeni matriksi nastali raspršivanjem formulirani s izolatom proteina soje. Izolat proteina soje najučinkovitije adsorbira i stabilizira fitokemikalije divlje borovnice od ostalih izvora proteina. Sušenje raspršivanjem pokazalo se ekološkom strategijom za proizvodnju stabilnih funkcionalnih sastojaka s višestrukom primjenom za prehrambenu industriju kao i najučinkovitijom tehnikom za proizvodnju matriksa polifenola i proteina borovnice. Veća fitokemijska koncentracija pronađena u izolatu proteina soje (sušen raspršivanjem) povezana je s povećanom sposobnošću izolata da veže polifenole borovnice. Pretpostavljaju da se uz vezivanje i kompleksiranje s ekstraktom borovnice ekstrahiraju i polifenoli, a proteini soje migriraju na površinu kompleksa polifenola i proteina, djelujući kao učinkoviti nosač za sušenje i uklanjajući potrebu za popularnim polisaharidima kao nosačima za sušenje, poput maltodekstrina. Slična se strategija može primijeniti i na druge nusproizvode voća i povrća, koji su jeftini izvori antioksidansa (Correia i sur., 2017).

Odmašćeno sojino brašno, izolat proteina soje, izolat proteina konoplje, brašno kikirikija i izolat proteina graška stabilno vežu i koncentriraju polifenole brusnice, stvarajući matrikse obogaćene polifenolima. Kompleksiranje s izolatom proteina soje stabilizirao je i očuvao integritet polifenola soka brusnice najmanje 15 tjedana na 37 °C. Proantocijanidini izolirani iz obogaćenih matriksa pokazali su usporedivu antiadhezijsku bioaktivnost s proantocijanidinima izoliranim izravno iz soka brusnice, što ukazuje na njihovu potencijalnu korisnost za održavanje zdravlja mokraćnog sustava. Otprilike 1,0 g matriksa obogaćenog polifenolima imalo je istu količinu proantocijanidina dostupnu u 1 šalici (300 mL) soka brusnice, za koji se klinički pokazalo da je profilaktička doza za smanjenje ponavljajućih infekcija mokraćnog sustava. Kompleks sok brusnice-izolat proteina soje inhibirao je rast gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Prehrambene i senzorske analize pokazale su da ciljane kombinacije polifenola i proteina imaju visoki potencijal za ugradnju u funkcionalne formulacije hrane (Grace i sur., 2013).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

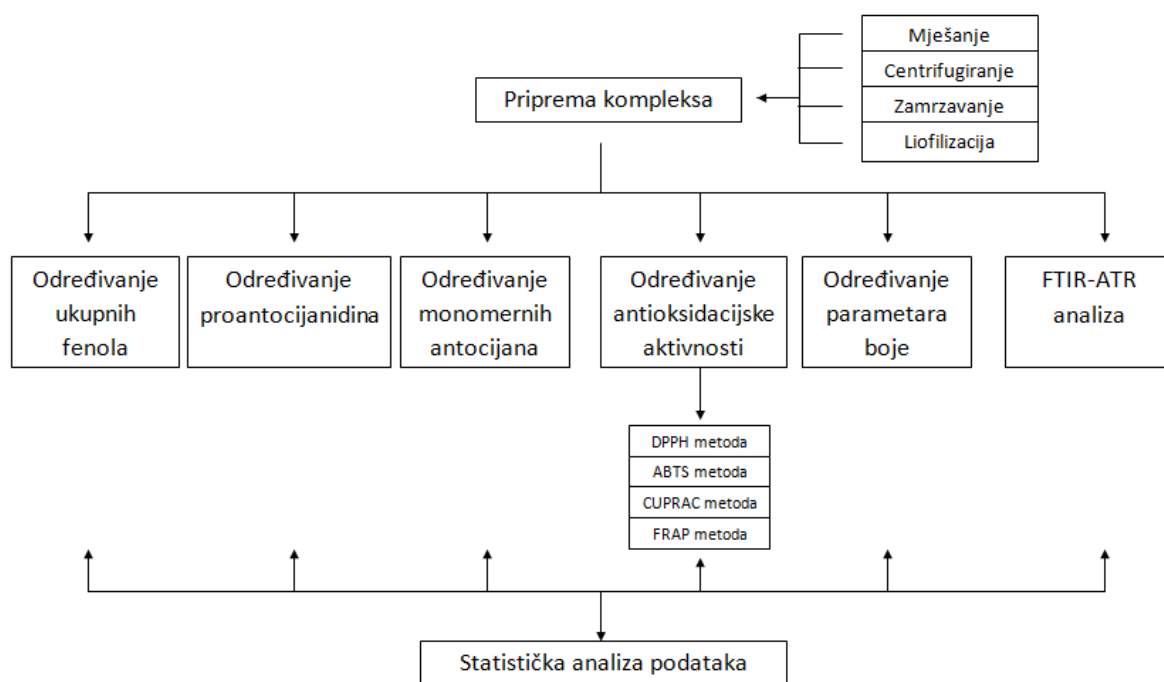
### 3.1. ZADATAK

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

U tu svrhu pripremljeni su:

- kompleks proteini/aronija u obliku suhog praha – kontrolni uzorak;
- kompleksi proteini graška/saharoza/aronija u obliku suhog praha;
- kompleksi proteini graška/trehaloza/aronija u obliku suhog praha.

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



Slika 14 Shematski prikaz rada



Na dobivenim kompleksima određeni su:

- adsorbirani ukupni fenoli aronije;
- adsorbirani ukupni proantocijanidini aronije;
- adsorbirani antocijani aronije;
- antioksidacijska aktivnost kompleksa (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode);
- parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $^{\circ}h$ ,  $C^*$ ,  $\Delta E$ );
- strukturne promjene kompleksa u odnosu na proteine graška (**Slika 14**).

## 3.2. MATERIJALI I METODE

### 3.2.1. Materijali

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

### 3.2.2. Priprema bioaktivnih dodataka hrani

Bioaktivni dodatci hrani na bazi proteina graška pripremljeni su kompleksiranjem proteina graška i soka aronije (kontrolni uzorak) odnosno proteina graška, disaharida i soka aronije.

Za pripremu kompleksa proteini/aronija, proteini graška i sok aronije miješani su 10 minuta na magnetskoj miješalici (600 rpm) na sobnoj temperaturi. Nakon toga, dobivena smjesa je centrifugirana 15 minuta pri 4000 rpm. Centrifugiranjem se je odvojio kruti od tekućeg dijela te je mokri kruti dio odvojen kako bi se upotrijebio za pripremu suhog praha odnosno suhog kompleksa proteini/aronija. Za pripremu kompleksa proteini/disaharidi/aronija korišteni su proteini graška, disaharid (saharoza ili trehaloza u omjeru na proteine graška 1:1) i sok aronije miješanjem različitim redoslijedom na magnetskoj miješalici (600 rpm) na sobnoj

temperaturi. Nakon toga, dobivena smjesa je centrifugirana 15 minuta pri 4000 rpm. Centrifugiranjem se je odvojio kruti od tekućeg dijela te je mokri kruti dio odvojen kako bi se upotrijebio za pripremu suhog praha odnosno suhog kompleksa proteini/disaharid/aronija.

Suhi kompleksi dobiveni su liofilizacijom. Prije postupka liofilizacije, mokri kruti dio dobiven centrifugiranjem je zamrznut na  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  24 sata, a liofilizacija je provedena u liofizatoru (ChristFreezeDryer, Alpha 1-4, Germany). Uvjeti liofilizacije podešeni su tako da je temperatura zamrzavanja bila  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura sublimacije od  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  pod vakuumom od 0,220 mbar te u završnoj fazi temperatura izotermnedesorpcije od  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  pod vakuumom od 0,060 mbar. Cijeli proces liofilizacije trajao je 10 sati.

**Tablica 4** Kemijski sastav kompleksa proteini/aronija i kompleksa proteini/disaharid/aronija te način kompleksiranja

Oznaka uzoraka	Proteini graška (g)	Sok aronije (mL)	Disaharid (g)
GP/A	2	20	0
Kompleksiranje proteina graška i soka aronije 10 minuta.			
A/S+GP	2	20	2
A/T+GP	2	20	2
Kompleksiranje disaharida i soka aronije 10 minuta te dodavanje proteina graška i dodatno kompleksiranje 10 minuta.			
GP/A+S	2	20	2
GP/A+T	2	20	2
Kompleksiranje proteina graška i soka aronije 10 minuta te dodavanje disaharida i dodatno kompleksiranje 10 minuta.			
GP+S+A	2	20	2
GP+T+A	2	20	2
Kompleksiranje svih sastojaka odjednom 10 minuta.			
GP/S+A	2	20	2
GP/T+A	2	20	2
Kompleksiranje proteina graška i disaharida 10 minuta te dodavanje soka aronije i dodatno kompleksiranje 10 minuta.			

### 3.2.3. Metode

#### 3.2.3.1. Uzorci

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

### 3.2.3.2. Određivanje ukupnih fenola

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

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

### 3.2.3.3. Određivanje proantocijanidina

Postupak: otpipetira se 0,1 mL uzorka te se doda 1 mL otopine 4-dimetil-amino-cinamaldehida. Reakcijska smjesa se ostavi stajati 30 minuta te se mjeri apsorbancija na 640 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za procijanidin B2. Mjerenja su provedena u tri paralele.

### 3.2.3.4. Određivanje monomernih antocijana

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda.

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

Udio antocijana je izračunat prema slijedećoj **formuli (1)**:

$$C_{\text{antocijana}} = (A \times M \times FR \times 1000) / \epsilon \times l \quad (1)$$

A – apsorbancija uzorka, a računa se prema **formuli (2)**:

$$A = (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad (2)$$

gdje je: M - molekulska masa, 449,2

FR - faktor razrjeđenja

$\epsilon$  – molarna absorptivnost, 26 900

$l$  - duljina kivete, 1 cm

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

### 3.2.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

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

#### *DPPH metoda*

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

#### *ABTS metoda*

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

#### *CUPRAC metoda*

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

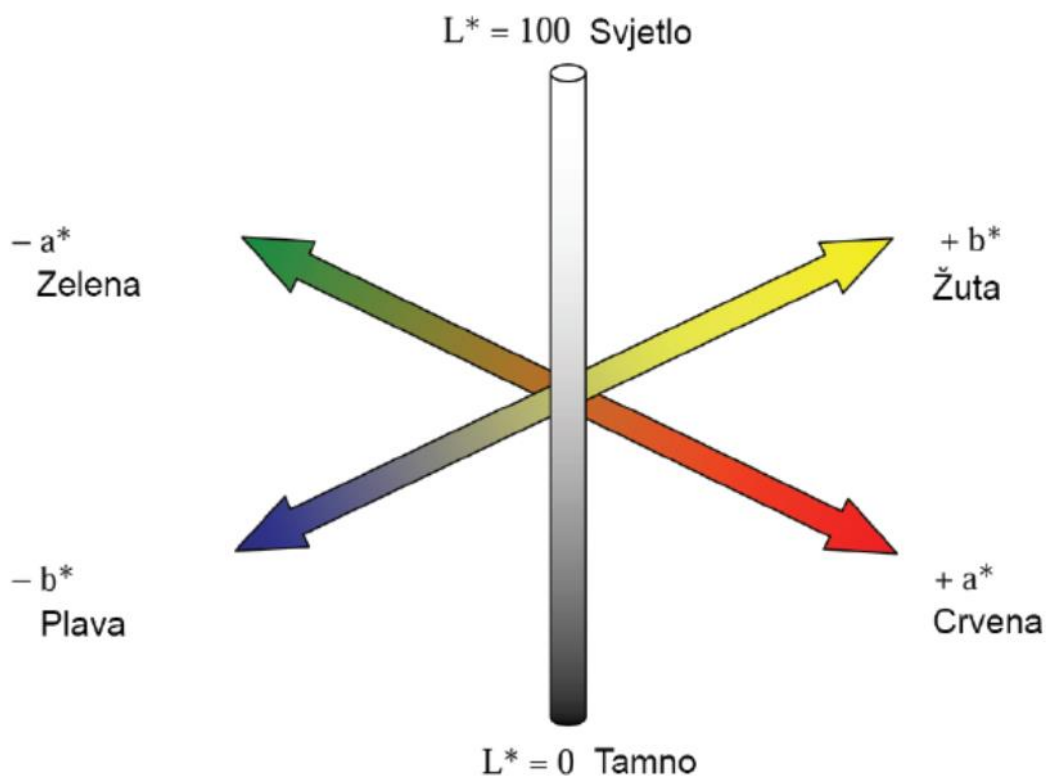
#### *FRAP metoda*

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

### 3.2.3.6. Određivanje parametara boje

Mjerenje boje kao i promjena boje praćeni su kromametrom (Minolta CR-400). Ovaj tip kromametra mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Svjetlost se reflektira te takvu

svjetlost mjeri šest jako osjetljivih silikonskih fotoćelija. Podatke zapisuje računalo i izražava ih u pet različitim sustava (X, Y, Z; Yxy; LCH; Lab; Hunter Lab). U radu je korišten Lab sustav koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko (**Slika 15**).

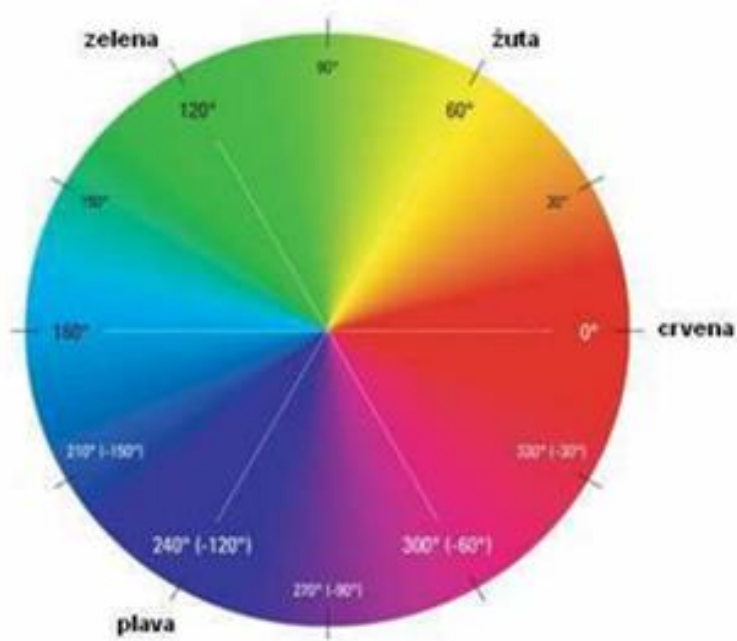


**Slika 15** Prikaz CIE LAB prostora boja

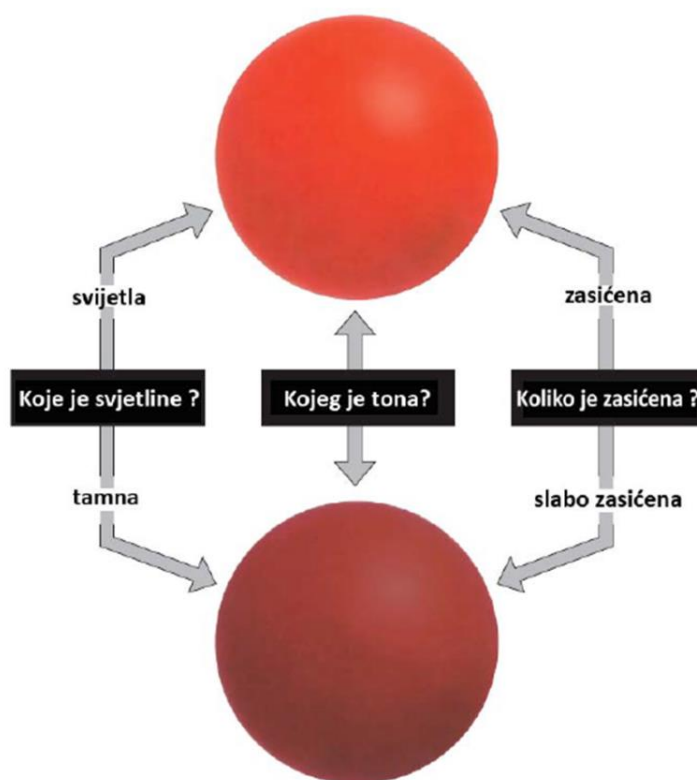
Pomoću  $L^*$  vrijednosti određuje se je li neki predmet taman ili svijetao. Ako je  $L^* = 0$  tada je predmet taman, a ako je  $L^* = 100$  predmet je svijetao.  $a^*$  vrijednost određuje je li neki predmet crvene ili zelene boje. Ako je  $a^*$  pozitivan predmet je crvene boje, a ako je  $a^*$ 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

Osim  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti na kromametri su određeni i zasićenje ( $C^*$ ) i ton boje ( $^{\circ}h$ ). Ton boje ( $^{\circ}h$ ) definira vizualni doživljaj na temelju kojeg točno definiramo pojedinu boju npr. crvenu, plavu, zelenu itd. ovisno o dominantnoj valnoj duljini (**Slika 16**). Zasićenje ( $C^*$ ) definira udio čiste boje u ukupnom vizualnom doživljaju boje tj. udio pojedinih valnih duljina

u ukupnom tonu boje. Svjetlina ( $L^*$ ) opisuje sličnost boje s nizom akromatskih boja od crne preko sive do bijele odnosno udio crne u nekom tonu boje (**Slika 17**).



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



**Slika 17** Prikaz značenja svjetline, tona i zasićenja

Udaljenost između dvije točke u koordinatnom sustavu boje se izražava kao promjena boje odnosno  $\Delta E$ . Promjena boje izračunava se na temelju  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti prema slijedećoj formuli (3):

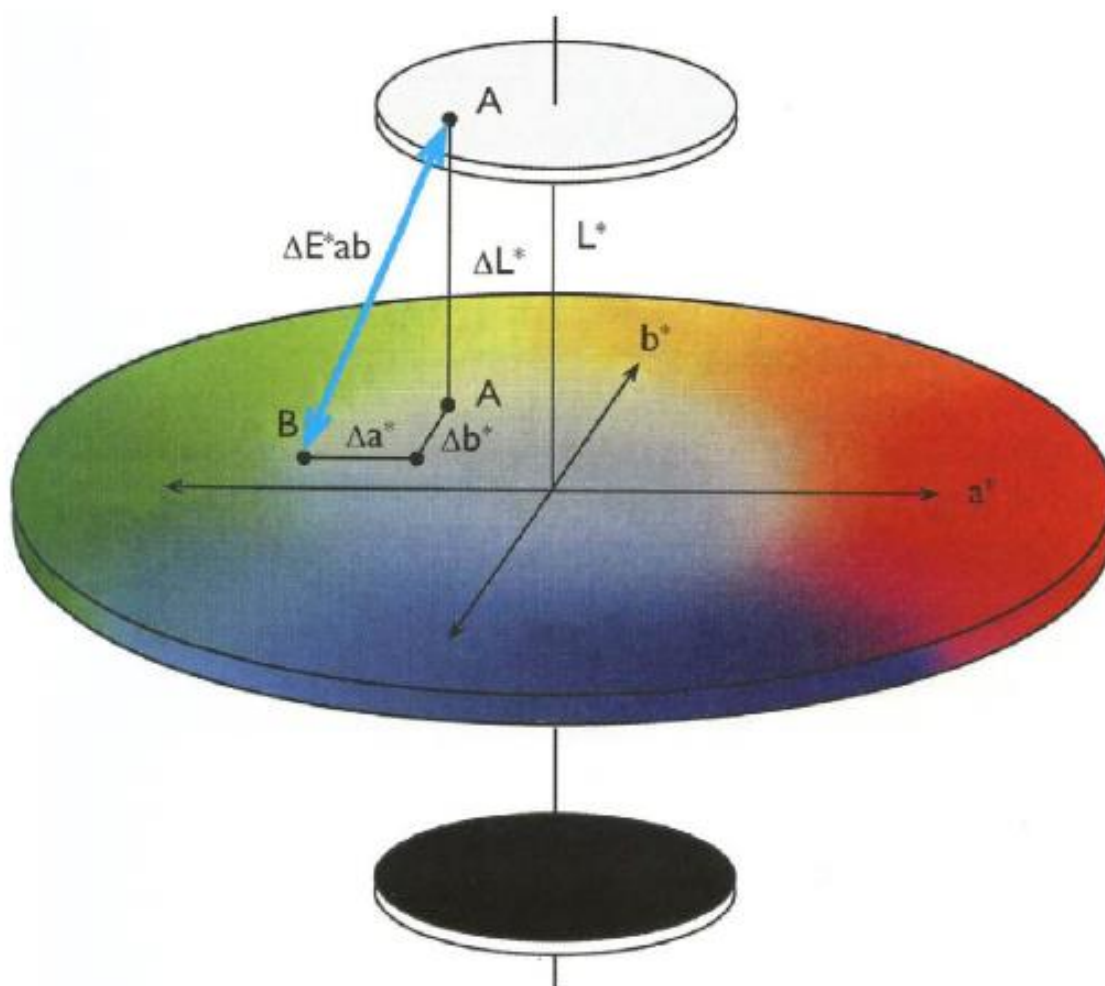
$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5} \quad (3)$$

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

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

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

(k – kontrolni uzorak; u – uspoređivani uzorak)



Slika 18 Grafički prikaz određivanja promjene boje

Veza između izračunate promjene boje ( $\Delta E$ ) i ljudske percepcije boje dana je u **Tablici 5**.

**Tablica 5** Veza između izračunate promjene boje ( $\Delta E$ ) i ljudske percepcije boje

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

### 3.2.3.7. FTIR-ATR analiza

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

### 3.2.3.8. Statistička analiza podataka

Statistička analiza rezultata je provedena pomoću ANOVA testa uz statističku značajnost od  $P < 0,5$ .



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu ispitivan je utjecaj različitih načina kompleksiranja na adsorpciju fenolnih komponenata na odabrane nosače, odnosno na proteine graška, proteine graška/saharozu i proteine graška/trehalozu. Izvor fenolnih spojeva bio je sok aronije, a osnovni nosač, kao što je navedeno, su bili proteini graška. Dodatkom disaharida (saharoze i trehaloze) pokušalo se postići poboljšanje u adsorpciji fenolnih spojeva na proteine graška. Kontrolni uzorak je bio kompleks proteini graška/fenoli aronije (GP/A), a svi ostali kompleksi su pripremljeni kompleksiranjem soka aronije, proteina graška i disaharida prema različitom redoslijedu. Kompleksi A/S+GP i A/T+GP pripremljeni su tako da su prvo kompleksirani sok aronije i disaharidi, a zatim su dodani proteini graška te kompleksirani s prvobitnom smjesom. Kompleksi GP/A+S i GP/A+T pripremljeni su tako da su prvo kompleksirani sok aronije i proteini graška, a zatim su dodani disaharidi te kompleksirani s prvobitnom smjesom. Kompleksi GP+S+A i GP+T+A pripremljeni su tako da su zajedno kompleksirani sok aronije, proteini graška i disaharidi. Kompleksi GP/S+A i GP/T+A pripremljeni su tako da su prvo kompleksirani proteini graška i disaharidi, a zatim je dodan sok aronije te kompleksiran s prvobitnom smjesom.

#### **4.1. UDIO FENOLA, PROANTOCIJANIDINA I ANTOCIJANA NA KOMPLEKSIMA**

U **Tablici 6** prikazan je udio fenola, proantocijanidina i antocijana u soku aronije i kompleksima pripremljenim kompleksiranjem na različite načine. Udio fenola u soku aronije iznosio je 8,097 mg/g. Svi kompleksi su imali manji udio fenola od soka aronije (od 3,671 mg/g do 7,523 mg/g). Kontrolni uzorak odnosno kompleks GP/A imao je 4,681 mg/g fenola. Kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T imali su znatno niže vrijednosti ukupnih fenola (4,118 mg/g, 3,671 mg/g, 3,873 mg/g i 3,704 mg/g). Kod pripreme ovih kompleksa disaharidi nisu povećali adsorpciju fenola na nosač, a vidljivo je da su kompleksi s dodatkom saharoze imali veći udio fenola. Kompleksi GP+S+A i GP+T+A imali su nešto veće vrijednosti ukupnih fenola (4,855 mg/g i 5,137 mg/g). Najveća adsorpcija fenola postignuta je na kompleksima kada su najprije disaharidi kompleksirani s proteinima graška, a zatim sa sokom aronije. Na tim uzorcima odnosno, kompleksima GP/S+A i GP/T+A utvrđena je adsorpcija fenola od 7,188 mg/g i 7,523 mg/g. Kod ovih kompleksa utvrđeno je da je dodatkom disaharida, a posebice trehaloze postignuto povećanje adsorpcije ukupnih fenola na nosač. Na navedenim

kompleksima adsorpcija fenola aronije iznosila je 88,8% i čak 92,9% za razliku od kontrolnog uzorka na kojem je učinkovitost adsorpcije bila 57,8%.

Udio proantocijanidina u soku aronije iznosio je 2,311 mg/g. Svi kompleksi su imali manji udio proantocijanidina od soka aronije (od 1,547 mg/g do 2,113 mg/g). Adsorpcija fenola na kontrolnom uzorku, GP/A, iznosila je 1,832 mg/g. Kao i u slučaju adsorpcije fenola, kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T imali su znatno niže vrijednosti proantocijanidina, a kompleksi GP+S+A, GP+T+A, GP/S+A i GP/T+A znatno više vrijednosti. Za komplekse A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T udio proantocijanidina iznosio je 1,667 mg/g, 1,547 mg/g, 1,665 mg/g i 1,614 mg/g. I u slučaju proantocijanidina, kompleksi s dodatkom saharoze imali su nešto više vrijednosti ovih komponenata.

Za komplekse GP+S+A, GP+T+A, GP/S+A i GP/T+A udio proantocijanidina iznosio je 1,991 mg/g, 1,930 mg/g, 2,063 mg/g i 2,113 mg/g. Kao i u slučaju adsorpcije fenola, tako i u slučaju adsorpcije proantocijanidina, najveća adsorpcija je postignuta prilikom kompleksiranja disaharida s proteinima graška, a zatim kompleksiranjem sa sokom. U slučaju dodatka trehaloze postignut je veći afinitet nosača za fenole aronije. Na ovim kompleksima je učinkovitost adsorpcije iznosila 91,6% i 89,4%, a za kontrolni uzorak 79,4%.

**Tablica 6** Udio fenola, proantocijanidina i antocijana u soku aronije i kompleksima

Uzorci	Fenoli (mg/g)	Proantocijanidini (mg/g)	Antocijani (ng/g)
Sok	8,097±0,107 <sup>a</sup>	2,311±0,008 <sup>a</sup>	468,25±0,77 <sup>a</sup>
GP/A	4,681±0,086 <sup>f</sup>	1,832±0,014 <sup>d</sup>	417,00±0,77 <sup>d</sup>
A/S+GP	4,118±0,075	1,667±0,017 <sup>e</sup>	393,56±0,92 <sup>e</sup>
A/T+GP	3,671±0,075 <sup>h</sup>	1,547±0,020 <sup>f</sup>	358,25±0,99 <sup>h</sup>
GP/A+S	3,873±0,092 <sup>b</sup>	1,665±0,016 <sup>e</sup>	369,78±0,95 <sup>f</sup>
GP/A+T	3,704±0,045 <sup>g,h</sup>	1,614±0,015 <sup>e,f</sup>	366,86±0,90 <sup>g</sup>
GP+S+A	4,855±0,047 <sup>e</sup>	1,991±0,011 <sup>b</sup>	418,63±0,97 <sup>d</sup>
GP+T+A	5,137±0,049 <sup>d</sup>	1,930±0,015 <sup>b</sup>	425,86±0,84 <sup>c</sup>
GP/S+A	7,188±0,014 <sup>c</sup>	2,063±0,018 <sup>b</sup>	425,47±0,83 <sup>c</sup>
GP/T+A	7,523±0,016 <sup>b</sup>	2,113±0,017 <sup>b</sup>	432,14±0,91 <sup>b</sup>

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

GP – proteini graška; A – sok aronije; S – saharoza; T – trehaloza.

Udio antocijana u soku aronije iznosio je 468,25 ng/g, dok je na kompleksima utvrđen udio antocijana od 358,25 ng/g do 432,14 ng/g. Trend utvrđen za adsorpciju fenola i proantocijanidina za komplekse A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T utvrđen je i za antocijane,

odnosno navedeni kompleksi su imali znatno niže vrijednosti antocijana (393,56 ng/g, 358,25 ng/g, 369,78 ng/g i 366,86 ng/g) od kontrolnog uzorka (417,00 ng/g). Kompleks GP+S+A imao je jednaku količinu adsorbiranih antocijana kao i kontrolni uzorak, dok su preostala tri kompleksa imali znatno veće vrijednosti odnosno 425,5 ng/g (GP+T+A i GP/S+A) i 432,14 ng/g (GP/T+A).

## 4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST KOMPLEKSA

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je primjenom DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metoda koje se međusobno razlikuju prema samom mehanizmu određivanja antioksidacijske aktivnosti. Primjenom DPPH metode, antioksidacijska aktivnost soka aronije iznosila je 470,97 nmol TE/g. Antioksidacijska aktivnost pripremljenih kompleksa varirala je od 234,49 nmol TE/g do 457,56 nmol TE/g. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti prate trend utvrđen za fenolne komponente odnosno kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T imali su manju (250,31 nmol TE/g, 234,49 nmol TE/g, 249,38 nmol TE/g i 238,48 nmol TE/g) antioksidacijsku aktivnost od kontrolnog kompleksa (297,33 nmol TE/g), a preostala četiri kompleksa veću. Najveću antioksidacijsku aktivnost imali su kompleksi dobiveni kompleksiranjem disaharida s proteinima graška, a zatim sa sokom aronije, 442,77 nmol TE/g i 457,56 nmol TE/g za saharozu odnosno trehalozu.

**Tablica 7** Antioksidacijska aktivnost soka aronije i kompleksa

Uzorci	DPPH (nmol TE/g)	ABTS (nmol TE/g)	FRAP (nmol TE/g)	CUPRAC ( $\mu$ mol TE/g)
Sok	470,97 $\pm$ 2,43 <sup>a</sup>	692,98 $\pm$ 1,28 <sup>a</sup>	56,88 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	5,289 $\pm$ 0,106 <sup>a</sup>
GP/A	297,33 $\pm$ 2,70 <sup>f</sup>	425,76 $\pm$ 3,48 <sup>e</sup>	39,65 $\pm$ 0,08 <sup>f</sup>	3,743 $\pm$ 0,004 <sup>e</sup>
A/S+GP	250,31 $\pm$ 0,69 <sup>g</sup>	305,08 $\pm$ 8,13 <sup>f</sup>	35,80 $\pm$ 0,18 <sup>g</sup>	3,328 $\pm$ 0,010 <sup>g</sup>
A/T+GP	234,49 $\pm$ 2,85 <sup>h</sup>	256,86 $\pm$ 2,19 <sup>h</sup>	32,56 $\pm$ 1,62 <sup>h,i</sup>	3,034 $\pm$ 0,208 <sup>h</sup>
GP/A+S	249,38 $\pm$ 1,94 <sup>g</sup>	309,01 $\pm$ 0,80 <sup>f</sup>	33,05 $\pm$ 0,27 <sup>h</sup>	3,350 $\pm$ 0,014 <sup>g</sup>
GP/A+T	238,48 $\pm$ 1,78 <sup>h</sup>	284,32 $\pm$ 2,14 <sup>g</sup>	31,38 $\pm$ 0,48 <sup>i</sup>	3,505 $\pm$ 0,096 <sup>f</sup>
GP+S+A	414,97 $\pm$ 2,52 <sup>d</sup>	447,45 $\pm$ 5,76 <sup>d</sup>	50,29 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>	3,737 $\pm$ 0,028 <sup>e</sup>
GP+T+A	326,88 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>	424,40 $\pm$ 1,82 <sup>e</sup>	42,66 $\pm$ 0,24 <sup>e</sup>	3,893 $\pm$ 0,009 <sup>d</sup>
GP/S+A	442,77 $\pm$ 1,38 <sup>c</sup>	599,61 $\pm$ 5,56 <sup>c</sup>	51,97 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>	4,844 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>
GP/T+A	457,56 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	631,96 $\pm$ 1,04 <sup>b</sup>	53,75 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	5,009 $\pm$ 0,044 <sup>b</sup>

Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

GP – proteini graška; A – sok aronije; S – saharozu; T – trehalozu.

Primjenom ABTS metode, antioksidacijska aktivnost soka aronije iznosila je 692,98 nmol TE/g, a kompleksa od 256,86 nmol TE/g do 631,96 nmol TE/g. Kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T imali su manju (305,08 nmol TE/g, 256,86 nmol TE/g, 309,01 nmol TE/g i 284,32 nmol TE/g) antioksidacijsku aktivnost od kontrolnog kompleksa (425,76 nmol TE/g). I ovom metodom najveću antioksidacijsku aktivnost imali su GP/S+A i GP/T+A, 599,61 nmol TE/g i 631,96 nmol TE/g. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene i ABTS i FRAP metodom prate trend utvrđen za fenolne komponente.

Primjenom FRAP metode, antioksidacijska aktivnost soka aronije iznosila je 56,88 nmol TE/g, a kompleksa od 31,38 nmol TE/g do 53,75 nmol TE/g. Kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T imali su manju (35,80 nmol TE/g, 32,56 nmol TE/g, 33,05 nmol TE/g i 31,38 nmol TE/g) antioksidacijsku aktivnost od kontrolnog kompleksa (39,65 nmol TE/g), a preostala četiri kompleksa veću. Najveću antioksidacijsku aktivnost imali su GP/S+A i GP/T+A, a ona je iznosila 51,97 nmol TE/g i 53,75 nmol TE/g. Primjenom CUPRAC metode, antioksidacijska aktivnost soka aronije iznosila je 5,289  $\mu$ mol TE/g, a kompleksa od 3,034 nmol TE/g do 5,009  $\mu$ mol TE/g. Ovom metodom je utvrđen nešto drugačiji trend u odnosu na ostale tri metode. Kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T su imali manju (3,328  $\mu$ mol TE/g, 3,034  $\mu$ mol TE/g, 3,350  $\mu$ mol TE/g i 3,505  $\mu$ mol TE/g) antioksidacijsku aktivnost od kontrolnog kompleksa (3,743  $\mu$ mol TE/g) odnosno ovaj trend je zadržan, ali kompleksi GP+S+A i GP+T+A su imali slične vrijednosti kao i kontrolni uzorak. I u ovom slučaju, kompleksi GP/S+A i GP/T+A su imali najveću antioksidacijsku aktivnost, a ona je iznosila 4,844  $\mu$ mol TE/g i 5,009  $\mu$ mol TE/g.

### 4.3. PARAMETRI BOJE KOMPLEKSA

Parametri boje dobivenih kompleksa prikazani su u **Tablici 8**. Proteini graška imali su visoku L\* vrijednost, 79,35. Svi kompleksi imali su nižu L\* vrijednost, od 39,56 do 42,11 odnosno kompleksiranjem fenola aronije na proteine graška i proteine graška/disaharide utvrđeno je tamnjenje proteina graška. Kontrolni uzorak, GP/A imao je L\* vrijednost 40,93. Kompleksi GP/A+S i GP/T+A imali su najveće L\* vrijednosti (42,11 i 41,85) odnosno bili su svjetliji u odnosu na kontrolni uzorak. Najmanje L\* vrijednosti, imali su kompleksi GP+T+A (39,56), GP+S+A, GP/A+T i A/S+GP (svi oko 40,3). Kompleksiranjem fenola aronije na proteine graška i proteine graška/disaharide utvrđena je i promjena a\* vrijednosti. Proteini graška imali su

nisku  $a^*$  vrijednost, 2,97, dok je  $a^*$  vrijednost pripremljenih kompleksa bila od 14,29 do 16,62, odnosno crvena boja je bila izraženija. Kontrolni uzorak, imao je  $a^*$  vrijednost 15,01. Svi kompleksi osim GP+T+A i GP/T+A (14,29, i 14,75) imali su veće  $a^*$  vrijednosti od kontrolnog uzorka, a najveću  $a^*$  vrijednost imali su GP/A+S i A/T+GP (16,62 i 16,44).  $b^*$  vrijednost proteina graška iznosila je 18,80, dok su svi kompleksi imali znatno niže vrijednosti (od -0,69 do -0,13). Kontrolni uzorak imao je  $b^*$  vrijednost -0,5. Kompleksi GP/A+S, GP/A+T, GP/S+A, GP+S+A i GP+T+A su imali višu vrijednost od kontrolnog uzorka s time da su kompleksi GP+S+A i GP+T+A imali najvišu  $b^*$  vrijednost. Najnižu  $b^*$  vrijednost imao je kompleks GP/T+A (-0,69).

**Tablica 8** Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) kompleksa i promjena boje

Uzorci	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$	$\Delta E_1$
GP	79,35±0,01	2,97±0,03	18,80±0,03		
GP/A	40,96±0,02	15,01±0,03	-0,50±0,02	44,63	
A/S+GP	40,31±0,01	15,56±0,01	-0,52±0,01	45,34	0,84
A/T+GP	41,71±0,04	16,44±0,02	-0,57±0,04	44,42	1,61
GP/A+S	42,11±0,07	16,62±0,05	-0,44±0,01	44,08	1,97
GP/A+T	40,27±0,06	16,32±0,03	-0,46±0,02	45,56	1,47
GP+S+A	40,29±0,01	15,02±0,02	-0,13±0,03	45,05	0,76
GP+T+A	39,56±0,02	14,29±0,02	-0,16±0,01	45,50	1,61
GP/S+A	41,11±0,01	15,23±0,03	-0,47±0,02	44,54	0,26
GP/T+A	41,85±0,01	14,75±0,03	-0,69±0,02	43,87	0,95

GP – proteini graška; A – sok aronije; S – saharoza; T – trehaloza;  $\Delta E$  – promjena boje kompleksa u odnosu na proteine graška;  $\Delta E_1$  – promjena boje kompleksa proteini graška/disaharidi/aronija u odnosu na kontrolni uzorak odnosno kompleks proteini graška/aronija

Na temelju  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  parametara izračunata je promjena boje kompleksa u odnosu na proteine graška ( $\Delta E$ ) i promjena boje kompleksa proteini graška/disaharidi/aronija u odnosu na kontrolni uzorak ( $\Delta E_1$ ) (**Tablica 8**). Promjena boje kontrolnog uzorka u odnosu na proteine graška iznosila je 44,63. Najmanja promjena boje utvrđena je za kompleks GP/T+A (43,87), a najveća za komplekse GP+T+A GP/A+T (oko 45,5).

Promjene boje kompleksa proteini graška/disaharidi/aronija u odnosu na kontrolni uzorak odnosno kompleks proteini graška/aronija bile su znatno manje. Najveću promjenu boje imali su kompleksi GP/A+S (1,97) i A/T+GP i GP+T+A (1,61) te prema tablici koja prikazuje vezu između izračunate promjene boje i ljudske percepcije boje ta promjena boje je vidljiva. Najmanju promjenu boje u odnosu na kontrolni uzorak imao je kompleks GP/S+A (0,26).

**Tablica 9** Parametri boje °h i C\* kompleksa

Uzorci	°h	C*
GP	81,01±0,09	19,03±0,02
GP/A	358,08±0,07	15,02±0,03
A/S+GP	358,11±0,04	15,57±0,01
A/T+GP	358,01±0,11	16,45±0,02
GP/A+S	358,47±0,04	16,62±0,09
GP/A+T	358,38±0,07	16,32±0,03
GP+S+A	359,49±0,04	15,02±0,03
GP+T+A	359,37±0,03	14,29±0,02
GP/S+A	358,23±0,06	15,23±0,04
GP/T+A	357,33±0,06	14,77±0,03

GP – proteini graška; A – sok aronije; S – saharoza; T – trehaloza

Ton boje (°h) proteina graška iznosio je 81,01, a kompleksiranjem se je ton boje značajno povećao obzirom da su kompleksi promijenili boju te je ton boje kompleksa iznosi od 357,33 do 359,47. Najnižu vrijednost tona boje imao je kompleks GP/T+A, a najvišu kompleksi GP+S+A i GP+T+A. Zasićenje boje (C\*) proteina graška bilo je 19,03, dok su svi kompleksi imali niže vrijednosti (od 14,29 do 16,62). Kontrolni uzorak je imao zasićenje boje 15,02, kompleks GP+S+A imao je jednaku vrijednost kao i kontrolni uzorak, dok su kompleksi GP+T+A i GP/T+A imali manju vrijednost zasićenja boje (14,29 i 14,77). Najviše vrijednosti imali su kompleksi GP/A+S, A/T+GP i GP/A+T.

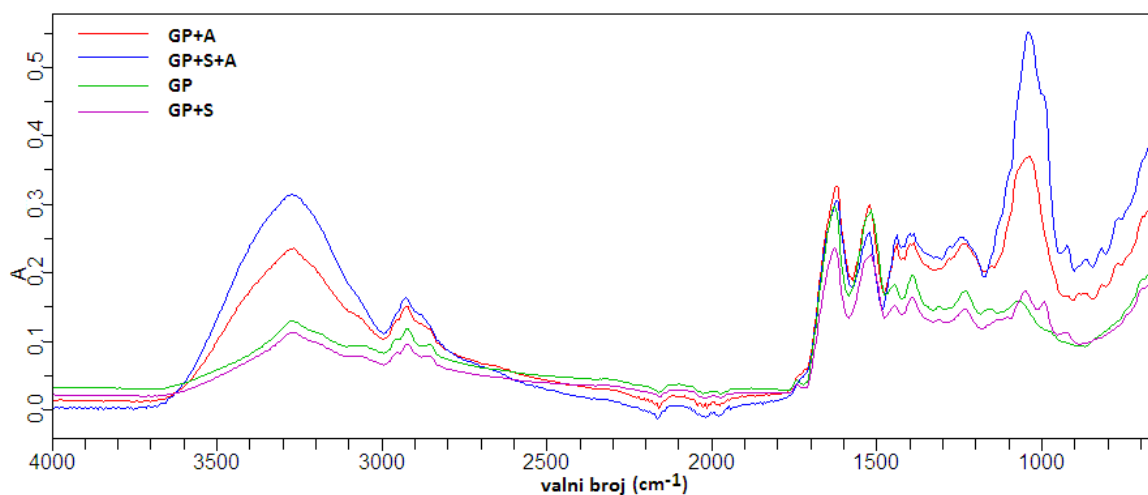
#### 4.4. FTIR-ATR ANALIZA KOMPLEKSA

U **Tablici 10** dan je prikaz karakterističnih apsorpcijskih vrpca proteina graška pri odgovarajućim valnim brojevima. Na **Slikama 19-22** prikazani su IR spektri kompleksa. Obzirom da na IR spektar kompleksa proteini graška/disaharid/aronija ne utječe način kompleksiranja, na slikama je prikazan IR spektar samo jednog kompleksa i uspoređen je s ostalim uzorcima odnosno IR spektrom proteina graška, kontrolnog uzorka i kompleksom proteini graška/disaharid.

Na **Slikama 19 i 20** prikazni su IR spektri proteina graška (GP), kompleksa proteini graška/saharoza (GP+S), proteini graška/aronija (GP+A) i proteini graška/saharoza/aronija (GP+S+A).

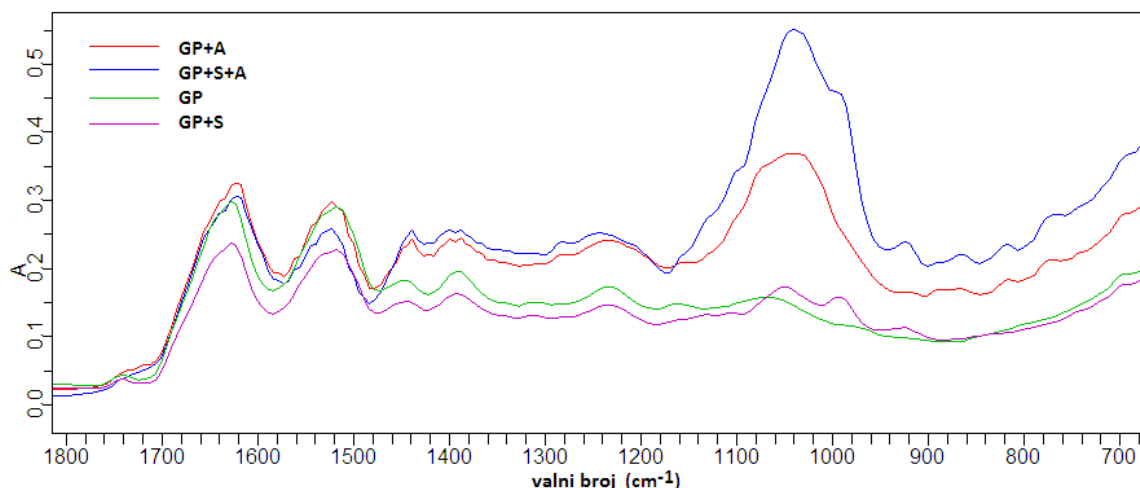
**Tablica 10** Prikaz karakterističnih apsorpcijskih vrpca proteina graška

Valni broj ( $\text{cm}^{-1}$ )	Veze
3280	asimetrično istezanje O-H
2922	istezanje C-H
2850	istezanje $\text{CH}_2$
1745	C=O
1625	amid I
1520	amid II
1450	deformacija $\text{CH}_3$
1394	simetrično savijanje $\text{CH}_3$ na proteinima
1310	amid III
1237	amid III
1160	istezanje vodikove veze u C-OH
1073	istezanje $\text{PO}_2^-$

**Slika 19** Prikaz IR spektra proteina graška (GP) i kompleksa proteini graška/saharoza (GP+S), proteini graška/aronija (GP+A) i proteini graška/saharoza/aronija (GP+S+A)

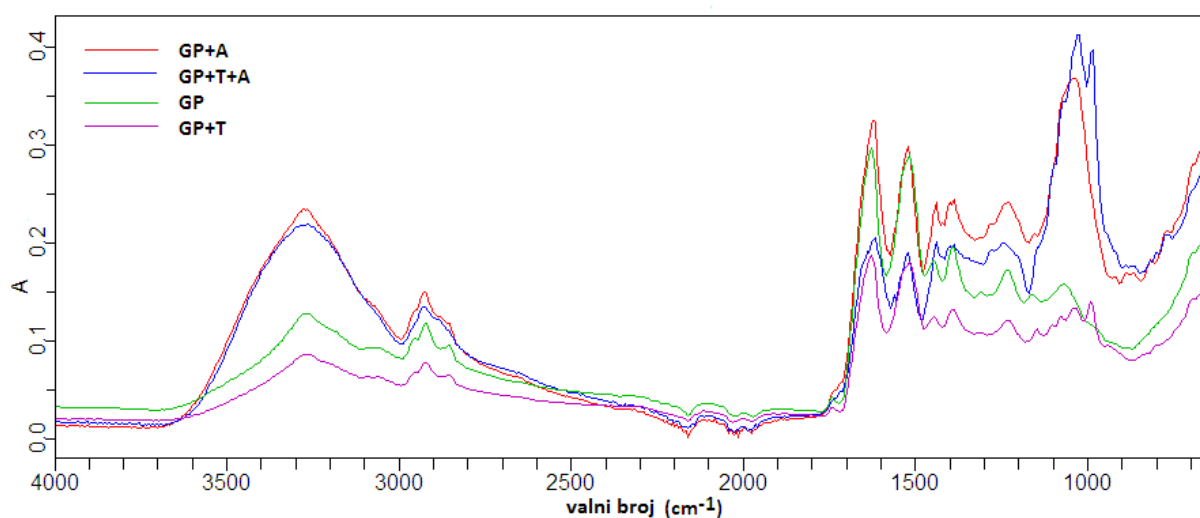
Apsorpcijska vrpca na  $3280 \text{ cm}^{-1}$ , koja je povezana s istezanjem O-H skupina, se širi i većeg je intenziteta kod kompleksa na kojima su adsorbirani fenoli aronije (GP+A i GP+S+A) u odnosu na GP i GP+S uzorke. Također, na uzorcima GP i GP+S, postoji apsorpcijska vrpca na  $1745 \text{ cm}^{-1}$  koja postaje manje izražena prilikom adsorpcije fenola na nosače.





**Slika 20** Prikaz IR spektra proteina graška (GP) i kompleksa proteini graška/saharozu (GP+S), proteini graška/aronija (GP+A) i proteini graška/saharozu/aronija (GP+S+A) u regiji od 1800  $\text{cm}^{-1}$  do 700  $\text{cm}^{-1}$

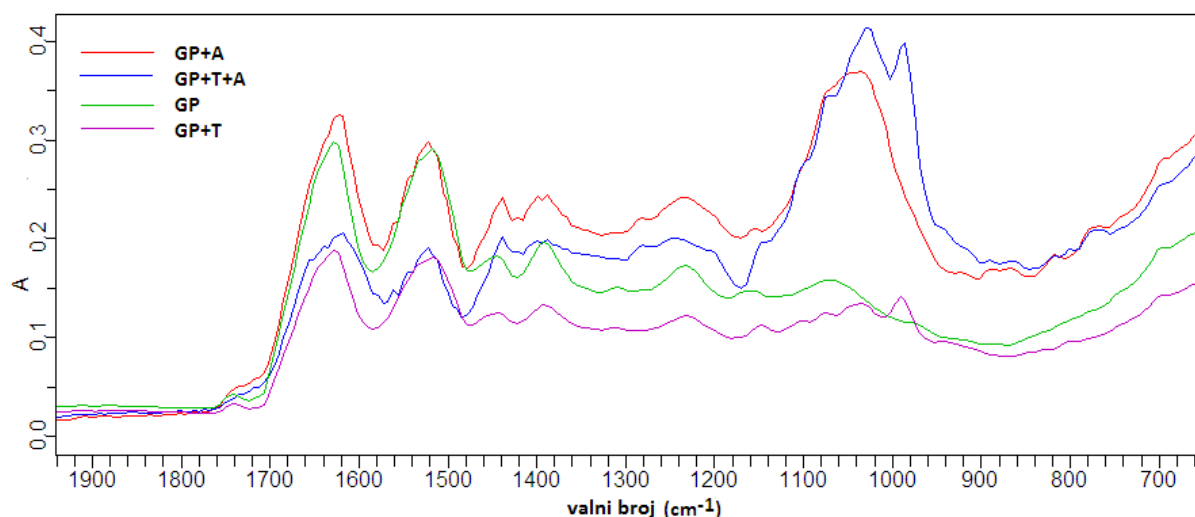
Kompleksiranjem proteina graška i saharoze također su vidljive promjene u IR spektru, posebice u regiji od 1200  $\text{cm}^{-1}$  do 850  $\text{cm}^{-1}$ . Apsorpcijske vrpce na 1160  $\text{cm}^{-1}$  i 1073  $\text{cm}^{-1}$  nestaju, a javljaju se nove karakteristične za saharozu na 1150  $\text{cm}^{-1}$ , 990  $\text{cm}^{-1}$  i 920  $\text{cm}^{-1}$ . Na IR spektrima kompleksa s adsorbiranim fenolima osim već navedenih promjena utvrđene su dodatne promjene. Apsorpcijska vrpca na 1150  $\text{cm}^{-1}$  je šira i većeg intenziteta, isti trend je utvrđen i za apsorpcijsku vrpcau na 1237  $\text{cm}^{-1}$  (amid III) na kojoj se dodatno formirao i popratna apsorpcijska vrpca na 1290  $\text{cm}^{-1}$ .



**Slika 21** Prikaz IR spektra proteina graška (GP) i kompleksa proteini graška/trehaloza (GP+T), proteini graška/aronija (GP+A) i proteini graška/trehaloza/aronija (GP+T+A)

Kao i kod uzoraka s saharozom, apsorpcijska vrpca na  $3280\text{ cm}^{-1}$ , koja je povezana s istežanjem O-H skupina, se širi i većeg je intenziteta kod kompleksa na kojima su adsorbirani fenoli aronije (GP+A i GP+T+A) u odnosu na GP i GP+T uzorke. Također, na uzorcima GP i GP+T, postoji apsorpcijska vrpca na  $1745\text{ cm}^{-1}$  koja postaje manje izražena prilikom adsorpcije fenola na nosače. Kompleksiranjem proteina graška i trehaloze također su vidljive promjene u IR spektru, posebice u regiji od  $1200\text{ cm}^{-1}$  do  $850\text{ cm}^{-1}$ . Apсорpcijske vrpce na  $1160\text{ cm}^{-1}$  i  $1073\text{ cm}^{-1}$  nestaju, a javljaju se nove karakteristične za trehalozu na  $1150\text{ cm}^{-1}$ ,  $1100\text{ cm}^{-1}$ ,  $1070\text{ cm}^{-1}$ ,  $1030\text{ cm}^{-1}$  i  $990\text{ cm}^{-1}$ .

Na IR spektrima kompleksa s adsorbiranim fenolima osim već navedenih promjena utvrđene su dodatne promjene. Apсорpcijska vrpca na  $1237\text{ cm}^{-1}$  (amid III) je šira i većeg intenziteta, na kojoj se dodatno formirala i popratna apсорpcijska vrpca na  $1290\text{ cm}^{-1}$ .



**Slika 22** Prikaz IR spektra proteina graška (GP) i kompleksa proteini graška/trehaloza (GP+T), proteini graška/aronija (GP+A) i proteini graška/trehaloza/aronija (GP+T+A) u regiji od  $1800\text{ cm}^{-1}$  do  $700\text{ cm}^{-1}$

Ove promjene IR spektra su potvrda promjene strukture nakon vezanja proteina graška, disaharida i fenola aronije.

## **5. ZAKLJUČCI**

U ovom istraživanju pripremljeni su bioaktivni dodaci hrani na bazi proteina graška u kombinaciji s fenolima aronije te se je ispitala mogućnost primjene saharoze i trehaloze u povećanju adsorpcije fenolnih spojeva iz soka aronije na proteine graška. U tu svrhu je kompleksiranje proteina graška, disaharida i fenola soka aronije provedeno različitim redoslijedom kako bi se utvrdio utjecaj načina kompleksiranja na adsorpciju fenolnih komponenata, parametre boje i strukturne promjene. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Kod kompleksa A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T disaharidi nisu povećali adsorpciju fenola na nosač (proteine graška) u odnosu na kontrolni uzorak, a kompleksi s dodatkom saharoze imali su veći udio fenola. Najveća adsorpcija fenola postignuta je na kompleksima kada su disaharidi kompleksirani s proteinima graška, a onda sa sokom aronije. Kod kompleksa GP/S+A i GP/T+A dodatkom disaharida (posebice trehaloze) postignuto povećanje adsorpcije ukupnih fenola na nosač (proteine graška).
- Kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T imali su niže vrijednosti proantocijanidina, a kompleksi GP+S+A, GP+T+A, GP/S+A i GP/T+A više vrijednosti u odnosu na kontrolni uzorak. Kompleksi s dodatkom saharoze imali su nešto više vrijednosti ovih komponenata. Najveća adsorpcija je postignuta prilikom kompleksiranja disaharida s proteinima graška, a zatim sa sokom. Dodatkom trehaloze postignut je veći afinitet nosača za fenole aronije.
- Kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T su imali niže vrijednosti antocijana od kontrolnog uzorka. Kompleks GP+S+A imao je jednaku količinu adsorbiranih antocijana kao i kontrolni uzorak, dok su GP+T+A, GP/S+A i GP/T+A imali znatno veće vrijednosti. Dakle najveći udio antocijana postignut je kompleksiranjem disaharida s proteinima graška, a potom sa sokom aronije.
- Primjenom DPPH metode, kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T imali su manju antioksidacijsku aktivnost od kontrolnog kompleksa, a kompleksi GP+S+A, GP+T+A, GP/S+A i GP/T+A veću. Najveću antioksidacijsku aktivnost imali su kompleksi dobiveni kompleksiranjem disaharida s proteinima graška, a zatim sa sokom aronije.
- Primjenom ABTS metode, kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T imali su manju antioksidacijsku aktivnost od kontrolnog kompleksa. Najveću antioksidacijsku

aktivnost imali su GP/S+A i GP/T+A, što ukazuje da je kompleksiranje disaharida s proteinima graška pa sa sokom aronije najučinkovitije.

- Primjenom FRAP metode, kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T imali su manju antioksidacijsku aktivnost od kontrolnog kompleksa, a preostala četiri kompleksa veću. Najveću antioksidacijsku aktivnost imali su GP/S+A i GP/T+A.
- Primjenom CUPRAC metode, kompleksi A/S+GP, A/T+GP, GP/A+S i GP/A+T su imali manju antioksidacijsku aktivnost od kontrolnog kompleksa, ali kompleksi GP+S+A i GP+T+A su imali slične vrijednosti kao i kontrolni uzorak. Kompleksi GP/S+A i GP/T+A su imali najveću antioksidacijsku aktivnost.
- Svi kompleksi imali su nižu L\* vrijednost od vrijednosti za proteine graška, odnosno kompleksiranjem fenola aronije na proteine graška i proteine graška/disaharide utvrđeno je tamnjenje kompleksa. Kompleksi GP/A+S i GP/T+A imali su najveće L\* vrijednosti odnosno bili su svjetliji u odnosu na kontrolni uzorak. Najmanje L\* vrijednosti, imali su kompleksi GP+T+A, GP+S+A, GP/A+T i A/S+GP, odnosno bili su tamniji od kontrolnog uzorka.
- a\* vrijednost pripremljenih kompleksa bila je veća od vrijednosti za proteine graška, odnosno crvena boja je bila izraženija. Svi kompleksi osim GP+T+A i GP/T+A imali su veće a\* vrijednosti od kontrolnog uzorka, a najveću a\* vrijednost imali su GP/A+S i A/T+GP.
- Svi kompleksi imali znatno niže b\* vrijednosti od vrijednosti za proteine graška. Kompleksi GP+S+A i GP+T+A imali su najvišu b\* vrijednost, a najnižu b\* vrijednost imao je kompleks GP/T+A.
- Najmanja promjena boje utvrđena je za kompleks GP/T+A, a najveća za komplekse GP+T+A i GP/A+T u odnosu na proteine graška.
- Najveću promjenu boje imali su kompleksi GP/A+S, A/T+GP i GP+T+A, a najmanju promjenu boje u odnosu na kontrolni uzorak imao je kompleks GP/S+A.
- Najnižu vrijednost tona boje imao je kompleks GP/T+A, a najvišu kompleksi GP+S+A i GP+T+A.
- Svi kompleksi imali su niže vrijednosti zasićenja boje od vrijednosti za proteine graška. Kompleksi GP+T+A i GP/T+A imali su manju vrijednost zasićenja boje, a najviše vrijednosti imali su kompleksi GP/A+S, A/T+GP i GP/A+T.

- Apsorpcijska vrpca na  $3280\text{ cm}^{-1}$  većeg je intenziteta kod kompleksa na kojima su adsorbirani fenoli aronije u odnosu na ostale uzorke. Na uzorcima GP, GP+S i GP+T postoji apsorpcijska vrpca na  $1745\text{ cm}^{-1}$  koja postaje manje izražena prilikom adsorpcije fenola na nosače. Dakle, vezanjem proteina graška, disaharida i fenola aronije dolazi do promjene strukture.

## **6. LITERATURA**

- Almajano MP, Delgado ME, Gordon MH: Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. *Food Chemistry* 101:126-130, 2007.
- Arimboor R, Arumughan C: Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) proanthocyanidins inhibit in vitro enzymatic hydrolysis of protein. *Journal of Food Science* 76:130-137, 2011.
- Arts MJ, Haenen GR, Voss HP, Bast A: Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology* 39:781-791, 2001.
- Arts MJ, Haenen, GR, Wilms, LC: Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1184-1187, 2002.
- Bartolome B, Estrella I, Hernandez MT: Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). *Journal of Food Science* 65:617-621, 2000.
- Belščak A, Komes D, Horžić D, Ganić KK, Karlović D: Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International* 42:707-716, 2009.
- Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Barba FJ, Esteve MJ, Frigola A: Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 2014.
- Clifford MN: Antocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1063-1072, 2000.
- Correia R, Grace MH, Esposito D, Lila MA: Wild blueberry polyphenol-protein food ingredients produced by three drying methods: Comparative physico-chemical properties, phytochemical content, and stability during storage. *Food Chemistry* 235:76-85, 2017.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN: Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26:1001-1043, 2009.
- Czubinski J, Dwiecki K: Protein–phenolic compound interactions. *International Journal of Food Science and Technology*, 2016.
- Dubeau S, Samson G, Tajmir-Riahi HA: Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling and English breakfast teas. *Food Chemistry* 122:539-545, 2010.
- Ferruzzi MG, Green RJ: Analysis of catechins from milk–tea beverages by enzyme assisted extraction followed by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 99:484-491, 2006.
- Foegeding EA: Food protein functionality- A new model. *Journal of Food Science* 80:2670-2677, 2015.



- Francis J: Food colorants: anthocyanins. *Food Science and nutrition* 28:273-314, 1989.
- Frazier RA, Papadopoulou A, Green RJ: Isothermal titration calorimetry study of epicatechin binding to serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:1602-1605, 2006.
- Gonzales GB, Smagghe G, Grootaert CH, Zotti M, Raes K, Van Camp J: Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug Metabolism Reviews* 47:175-190, 2015.
- Grace MH, Guzman I, Roopchand DE, Moskal K, Cheng DM, Pogrebnyak N, Raskin I, Howell A, Lila MA: Stable Binding of Alternative Protein-Enriched Food Matrices with Concentrated Cranberry Bioflavonoids for Functional Food Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013.
- Grace MH, Yousef GG, Esposito D, Raskin I, Lila MA: Bioactive capacity, sensory properties, and nutritional analysis of a shelf stable protein-rich functional ingredient with concentrated fruit and vegetable phytoactives. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 69(4):372-378, 2014.
- Häkkinen S: Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products. *Doctoral dissertation*. Kuopio University, Finland, 2000.
- Ignat I, Volf I, Popa VI: A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126:1821-1835, 2011.
- Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Jakobek L: Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry* 175: 556-567, 2015.
- Kanakis CD, Hasni I, Bourassa P, Tarantilis PA, Polissiou MG, Tajmir-Riahi HA: Milk b-lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry* 127:1046-1055, 2011.
- Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 55:279-290, 2004.
- Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M: Aronia Plants - A review of traditional use, biological activities and perspectives for modern medicine. *Journal of Medicinal Food* 13:255-269, 2010.
- Kolobarić S: Aronija – voće sadašnjosti i budućnosti. *Zdrav život, obiteljski časopis o zdravlju* 125, 2014.
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R: Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64:923-933, 2003.
- Krijan L: Slobodni radikali. *Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.

- Kroll J, Rawel HM, Rohn S: Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds. *Food Science and Technology Research* 9:205-218, 2003.
- Kulling SE, Rawel HM: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica* 74(13):1625-1634, 2008.
- Lila MA, Schneider M, Devlin A, Plundrich N, Lasterc S, Foegeding EA: Polyphenol-enriched berry extracts naturally modulate reactive proteins in model foods. *Food & Function* 8:4760-4767, 2017.
- Markakis P: *Anthocyanins as Food Colors*. Academic Press, Michigan, 1982.
- Martini S, Claudia B, Claudio R: Interaction of quercetin and its conjugate quercetin 3-O-b-D-glucopyranoside with albumin as determined by NMR relaxation data. *Journal of Natural Products* 71:175-178, 2008.
- Masqsood S, Benjakul S, Abushelaidi A, Alam A: Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: a detailed review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13:1125-1140, 2014.
- Mulaudzi RB, Ndhlala AR, Kulkarni MG, Staden JV: Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. *Journal of Ethnopharmacology* 143:185-193, 2012.
- Murakami A, Ohnishi K: Target molecules of food phytochemicals: Food science bound for the next dimension. *Food and Function* 3:462-476, 2012.
- Nacz M, Oickle D, Pink D, Shahidi F: Protein precipitating capacity of crude canola tannins: effect of pH, tannin, and protein concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:2144-2148, 1996.
- Nacz M, Grant S, Zadernowski R, Barre E: Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits. *Food Chemistry* 96:640-647, 2006.
- Nydia E. Buitimea-Cantúa, Janet A. Gutiérrez-Uribe, Sergio O. Serna-Saldívar: Phenolic-Protein Interactions: Effects on Food Properties and Health Benefits. *Journal of medicinal food* 1-11, 2017.
- O'Connell JE, Fox PF: Proposed mechanism for the effect of polyphenols on the heat stability of milk. *International Dairy Journal* 9:523-536, 1999.
- Oszmiański J, Wojdyło A: *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology* 221:809-813, 2005.
- Ozdal T, Capanoglu E, Altay F: A review on proteinphenolic interactions and associated changes. *Food Research International* 51:954-970, 2013.
- Prigent SVE, Gruppen H, Visser AJWG, Van Koningsveld GA, Alfons GJV: Effects of non-covalent interactions with 5-o-caffeoylquinic acid (CGA) on the heat denaturation and

- solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:5088-5095, 2003.
- Rawel HM, Czajka D, Rohn S, Kroll J: Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal of Biological Macromolecules* 30:137-150, 2002a.
- Rawel HA, Meidtner K, Kroll J: Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:4228-4235, 2005.
- Rein MJ: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *Disertacija*. Sveučilište Helsinki, Helsinki, 2005.
- Rohn S, Rawel HM, Rober M, Kroll J: Reactions with phenolic substances can induce changes in some physico-chemical properties and activities of bromelain – the consequences for supplementary food products. *International Journal of Food Science and Technology* 40:771-782, 2005.
- Roopchand D, Grace M, Kuhn P, Cheng D, Plundrich N, Pouleva A, Lila M: Efficient sorption of polyphenols to soybean flour enables natural fortification of foods. *Food Chemistry* 131:1193-1200, 2012.
- Ryan L, Petit S: Addition of whole, semiskimmed, and skimmed bovine milk reduces the total antioxidant capacity of black tea. *Nutrition Research* 30:14-20, 2010.
- Sastry MCS, Rao MSN: Binding of CGA by the isolated polyphenol-free 11S protein of sunflower (*Helianthus annuus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38:2103-2110, 1990.
- Sathe SK: Protein solubility and functionality. In NS Hettiarachchy, K Sato, MR Marshall, A Kannan (Eds.), *Food proteins and peptides: chemistry, functionality, interactions, and commercialization*. New York: CRC Press 95-124, 2012.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L: Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45:287-306, 2005.
- Septembre-Malaterre A, Remize F, Poucheret P: Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food research international*, 2018.
- Serafini M, Francesca M, Villaño D, Pecorari M, Wieren KV, Azzini E: Antioxidant activity of blueberry fruit is impaired by association with milk. *Free Radical Biology & Medicine* 46:769-774, 2009.
- Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M, LeMieux M, Greerd B, Moustaid-Moussaa N: Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24(4): 613-623, 2013.

- Sharma V, Vijaykumar H, Jaganmohanrao L: Influence of milk and sugar on antioxidant potential of black tea. *Food Research International* 41:124-129, 2008.
- Strauss G, Gibson SM: Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids* 18:81-89, 2004.
- Tomás-Barberán FA, Andrés-Lacueva C: Polyphenols and health: current state and progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:8773-8775, 2012.
- Tsai P, She C: Significance of phenol–protein interactions in modifying the antioxidant capacity of peas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:8491-8494, 2006.
- Van Koningsveld G, Gruppen H, de Jongh HJ, Wijngaards G, van Boekel MAJS, Walstra P: The solubility of potato proteins from industrial potato fruit juice as influenced by pH and various additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 134-142, 2002.
- Von Staszewski MV, Pilosof AMR, Jagus RJ: Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry* 125:186–192, 2011.
- Xiao J, Mao F, Yang F, Zhao Y, Zhang C, Yamamoto K: Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: molecular structure–affinity relationship and influencing bioactivity aspects. *Molecular Nutrition & Food Research* 55:1637–1645, 2011.
- Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS: Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 59:113-122, 2004.
- Web 1: <https://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/aronija-355/>[17.8.2020.]
- Web 2: <http://www.opg-lesjak.hr/nutritivna-vrijednost-aronije.php>[17.8.2020.]
- Web 3: <http://www.nutricionizam.com>[17.8.2020.]
- Web 4: [https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-the-main-flavonoids-subclasses-The-flavonoid-skeleton-has-two-aromatic\\_fig1\\_328289876](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-the-main-flavonoids-subclasses-The-flavonoid-skeleton-has-two-aromatic_fig1_328289876) [2.9.2020.]