

Polifenoli i antioksidacijska aktivnost gelova na bazi karboksimetilceluloze i soka kupina

Majdančić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:109:734414>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**

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**

Maja Majdančić

**POLIFENOLI I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST GELOVA NA BAZI
KARBOKSIMETILCELULOZE I SOKA KUPINA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2022.

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 tehnologiji
Tema rada: je prihvaćena na X redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 21. srpnja 2021.
Mentor: prof. dr. sc. Mirela Kopjar
Pomoć pri izradi: Ina Ćorković, mag. ing. aliment.

Polifenoli i antioksidacijska aktivnost gelova na bazi karboksimetilceluloze i soka kupina

Maja Majdančić, 0113141816

Sažetak: Hidrogelovi na bazi soka kupine pripremljeni su dodatkom soka kupine, karboksimetilceluloze, pululana i proteina mlijeka. Količina karboksimetilceluloze u svim uzorcima iznosila je 2%, pululana 0,1% ili 0,2%, te proteina mlijeka 1%. Uzorcima su određeni različiti parametri nakon pripreme i nakon 6 mjeseci skladištenja: ukupni fenoli, proantocijanidini, antocijani, polimerna boja, indeks posmeđivanja, antioksidacijska aktivnost primjenom FRAP, CUPRAC, DPPH te ABTS metoda te parametri boje. Kontrolni uzorak bio je hidrogel pripremljen sa sokom kupine i karboksimetilcelulozom. Dobiveni rezultati ukazuju na to da dodatak pululana i proteina mlijeka utječe na ispitivane parametre. Najveću koncentraciju polifenola (određeno HPLC-om) imali su hidrogelovi pripremljeni uz dodatak pululana i proteina mlijeka. Ujedno su isti uzorci imali i najveći udio antocijana. Tijekom skladištenja došlo je do gubitka ukupnih fenola, proantocijanidina i antocijana, te do povećanja indeksa posmeđivanja i polimerne boje.

Ključne riječi: Kupina, hidrogelovi, karboksimetilceluloza, pululan, proteini mlijeka, polifenoli

Rad sadrži: 54 stranice
11 slika
16 tablica
0 priloga
76 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

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

Datum obrane: 28. rujna 2022.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food technologies
Subdepartment of 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. X held on July 21, 2021.

Mentor: Mirela Kopjar, PhD, prof.

Technical assistance: Ina Ćorković, mag. ing. aliment

Polyphenols and antioxidant activity of gels based on carboxymethyl cellulose and blackberry juice

Maja Majdančić, 0113141816

Summary: Blackberry juice-based hydrogels are prepared by adding blackberry juice, carboxymethylcellulose, pullulan and milk protein. The amount of carboxymethylcellulose was 2%, pullulan was added in amount of 0.1% or 0.2%, and milk protein in amount of 1%. Different parameters were determined after preparation and after 6 months of storage: total phenols, proanthocyanidins, anthocyanins polymer color, browning index, antioxidant activity using FRAP, CUPRAC, DPPH and ABTS methods, and color parameters. The control sample was hydrogel prepared with carboxymethylcellulose. The results indicate that the amount of additives affected the mentioned parameters. The highest concentration of total phenols (determined by HPLC) was determined in hydrogels with the addition of pullulan and milk proteins. Additionally, the same samples had the highest concentration of anthocyanins. During storage, decrease of total phenols, proanthocyanidins and anthocyanins, and an increase of browning index and polymer color was observed.

Key words: Blackberry, hydrogel, carboxymethylcellulose, pullulan, milk proteins, polyphenols,

Thesis contains: 54 pages
11 figures
16 tables
0 supplements
76 references

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: September 28, 2022

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. HIDROGELOVI.....	4
2.2. KUPINA	6
2.2.1. Polifenoli.....	8
2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST	16
2.4. DODACI HRANI	17
2.4.1. Karboksimetilceluloza.....	17
2.4.2. Pululan	18
2.4.3. Proteini mlijeka.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. ZADATAK	22
3.2. MATERIJALI I METODE	24
3.2.1. Materijali	24
3.2.2. Priprema hidrogelova	24
3.2.3. Određivanje ukupnih fenola	24
3.2.4. Određivanje proantocijanidina.....	25
3.2.5. Određivanje pojedinačnih polifenola	25
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	25
3.2.7. Određivanje antocijana	26
3.2.8. Određivanje postotka polimerne boje	27
3.2.9. Određivanje indeksa posmeđivanja	27
3.2.10. Određivanje boje	28
3.2.11. Statistička analiza podataka	29

4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. UKUPNI FENOLI, PROANTICIJANIDINI I ANTOCIJANI U SOKU KUPINE I HIDROGELOVIMA NAKON PRIPREME I NAKON SKLADIŠTENJA	32
4.2. POJEDINI POLIFENOLI U SOKU KUPINE I HIDROGELOVIMA NAKON PRIPREME I NAKON SKLADIŠTENJA	34
4.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST SOKA KUPINE I HIDROGELOVA NAKON PRIPREME I SKLADIŠTENJA	37
4.4. POLIMERNA BOJA I INDEKS POSMEĐIVANJA HIDROGELOVA NAKON PRIPREME I NAKON SKLADIŠTENJA	39
4.5. PARAMETRI BOJE SOKA KUPINE I HIDROGELOVA NAKON PRIPREME I NAKON SKLADIŠTENJA	41
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	47

Popis oznaka, kratica i simbola

CMC Karboksimetilceluloza

P Pululan

MP Proteini mlijeka

1. UVOD

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji su zbog svoje građe podijeljeni u više skupina, od kojih su najvažniji flavonoidi i fenolne kiseline. Karakteristični su po antioksidacijskoj aktivnosti te konzumacija namirnica bogatih polifenolima, kao što je kupina, povoljno utječe na ljudsko zdravlje sprječavajući nastanak slobodnih radikala (Repajić, 2019). Zbog antioksidacijske aktivnosti, polifenoli smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti, osteoporoze, dijabetesa, karcinoma (Shivashankara i sur., 2010). Komponente koje povećaju nutritivne vrijednosti kupine su vitamin C, vitamin K, folna kiselina, mangan te prehrambena vlakna (Huang i sur., 2012). Najznačajniji polifenolni spojevi u kupini su antocijani, proantocijanidi, flavonoli i flavan-3-oli (Jakobek i sur., 2008). Hidrogelovi su strukture u obliku trodimenzionalne mreže koje mogu biti dobiveni prirodnim i/ili sintetičkim polimerima koji apsorbiraju velike količine vode (Gulrez i sur., 2011). Imaju sposobnost zgusnuti sustav, te na taj način mogu modificirati teksturu proizvoda (Kopjar i sur., 2020). Primjenjuju se u u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Mao i sur., 2020). U prehrambenoj industriji koriste se u proizvodnji želea, džemova, slatkiša, premaza (Kopjar i sur., 2020).

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dodataka (pululana i proteina mlijeka) u hidrogelovima na bazi karboksimetilceluloze i soka kupine na polifenole, antioksidacijsku aktivnost te boju, odnosno, koji dodatak koliko utječe na njihovo zadržavanje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. HIDROGELOVI

Hidrogelovi su trodimenzionalne mrežne strukture dobiveni prirodnim i/ili sintetičkim polimerima koji mogu apsorbirati velike količine vode (Gulrez i sur., 2011).

Navedeno svojstvo bubrenja, u kombinaciji sa širokim spektrom svojstava ovog materijala, rezultat je povećanog interesa za istraživanje hidrogelova (Chirani i sur., 2015). Imaju sposobnost zgusnuti sustav te na taj način izmijeniti teksturu proizvoda. U prehrambenoj industriji koriste se za stabilizaciju disperznih sustava kao što su emulzije.

Tradicionalne primjene hidrogelova su u želeima, džemovima, slatkišima, premazima (Kopjar i sur., 2020), mogu se koristiti i u pripremi proizvoda bez glutena (Morreale i sur., 2018), te za produljenje roka trajanja pečenih proizvoda (Gómez i sur., 2007, Bárcenas i sur., 2007).

Gelovi za primjenu u prehrambenoj industriji obično se temelje na polimerima prisutnima u prirodi zbog potrebe da budu sigurni za konzumaciju (Shewan i sur., 2013). Koriste se u pakiranju hrane jer mogu kontrolirati vlažnost proizvoda ili osigurati antimikrobno djelovanje (Klein i sur., 2020). Također, zbog različitih reoloških i teksturalnih svojstava primjenjuju se u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Mao i sur., 2020).

Trenutačno se gelaste strukture koriste za kapsuliranje bioaktivnih sastojaka i aromatskih spojeva čije se otpuštanje u takvom obliku može kontrolirati. Ove komponente su nestabilne, ali vrlo vrijedne zbog svog pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje. U kapsuliranom obliku mogu se koristiti u pripremi inovativne hrane (Kopjar i sur., 2020). Osim karotenoida, tokoferola i fitosterola, bioaktivni spojevi koji se koriste za kapsuliranje s jestivim polimerima su fenolni spojevi. Oni se koriste kao dodaci funkcionalnoj hrani zbog svoje bioaktivnosti. Međutim, obrada hrane utječe na njihovu stabilnost i time umanjuje vrijednost konačnog proizvoda (Betz i sur., 2012; Pachuau i sur., 2021). Fenolni spojevi se ugrađuju u filmove, premaze ili druge fizikalne oblike hidrogela te se na taj način mogu smanjiti nepoželjne oksidativne reakcije (Talón i sur., 2017).

Na temelju podrijetla hidrogelovi se mogu podijeliti u dvije kategorije: prirodne i sintetičke. Prirodni hidrogelovi potječu od životinjskih i biljnih makromolekula. Poznati su po svojoj sigurnoj uporabi, niskoj toksičnosti, biokompatibilnosti i biorazgradivosti. Dva su glavna nedostatka prirodnih polimera što uključuje to da je ponekad teško objasniti mehanička svojstva polimera i njihovu ovisnost o uvjetima polimerizacije ili geliranja, uz to njihov sastav

varira zbog prirodnog podrijetla. Često je nemoguće dobiti identičan sastav željenih proizvoda. Najčešće korišteni prirodni polimeri su kolagen, hijaluronska kiselina, fibrin i derivati prirodnih materijali poput škroba, alginata, hitozana i vlakana (Chirani i sur., 2015).

Sintetički hidrogelovi obično nisu biorazgradivi te mogu razviti toksičnost od kemikalija u tragovima. Upotreba sintetičkih hidrogelova ima prednosti jer se zbog točno određene kemijske strukture mogu redizajnirati sa svrhom izrade novih, ekološki prihvatljivih hidrogelova (Shu Liu i sur., 2015). Često korišteni sintetički polimeri su akrilna kiselina-hidroksietil metakrilata, vinil acetata i metakrilne kiseline (Bharskar, 2020). Jestivi polimeri su sigurni za konzumaciju, i to mogu biti hidrokoloidi (škrob, hidroksipropil celuloza, alginati, gume, karagenan), proteini (životinjskog porijekla: želatina, kolagen, albumin; na biljnoj bazi: zein, soja, pšenični gluten) i lipidi (masne kiseline, trigliceridi, fosfolipidi) (Ali i Ahmed, 2018).

2.2. KUPINA

Kupina (*Rubus fruticosus L.*) se ubraja u porodicu ruža Rosaceae, rodu Rubus koji ima oko 250 vrsta. Potječe iz Azije i Sjeverne Amerike, dok se u Europi uzgaja preko 2000 godina. Kupina je trnoviti grm, upotrebljavala se za jelo, ali i u medicinske svrhe. Već su stari Grci koristili kupine i njihov sok za liječenje bolesti kostiju, dok su ih u Kini koristili kod problema urinarnog trakta ali i za liječenja bubrežnih bolesti (Amidžić Klarić, 2011).

Kupina je višegodišnja biljka koja pripada grupi jagodastog voća. Može preživjeti i preko 20 godina. Sadrži i podzemne i nadzemne dijelove koji se pojavljuju u obliku manjeg (subfrutex) ili većeg žbunja (frutex). Posjeduje vegetativne organe (korijen, stablo i list) i generativne organe (cvijet, plod i sjeme). Stabljika je bodljikava ili dlakava a može biti uspravna ili pognuta. Na stabljici su perasto izgrađeni listovi s troslojnim polistićima. Dvospolni cvjetovi mogu biti bijele ili ružičaste boje, grupirani su u grozdove ili metličaste cvasti (Mratinić, 2015). Na zajedničkom cvjetištu cvijeta nalazi se 5 (moguće 3 ili 7) listića čašice, 5 ovalnih listića cvjeta te veše prašnika (Volčević, 2005).



Slika 1 Plod kupine (web 1)

Plod kupine je crne boje, sa slatko kiselkastim okusom. U prosjeku plod sadrži 15 - 21% suhe tvari, od čega ukupnih šećera 7,54 - 9,85%, a od toga je 6,13 - 9,15% reducirajućih šećera i 0,57 - 1,41% saharoze. Bjelančevina ima oko 12%, a masti oko 1,0%. Sadržaj ukupnih kiselina iznosi 0,87 - 1,30%, a mineralnih tvari 0,30 - 0,585%. Sadržaj pektina iznosi 0,39 – 0,66%, a celuloze 4,0% (Mratinić, 2015). Energetska vrijednost 100 g svježih plodova kupine iznosi 43 kcal (Kaume i sur., 2012).

Plod također sadrži razne organske kiseline (jantarna, jabučna, oksalna, mliječna, salicilna, pkumarinska, cimetna, elagična...), eterično ulje, tanine, bogat je izvor vitamina C, vitamin A, vitamin E i drugim vitaminima i mineralima. Kemijski sastav svježe kupine prikaza je u **Tablici 1.**

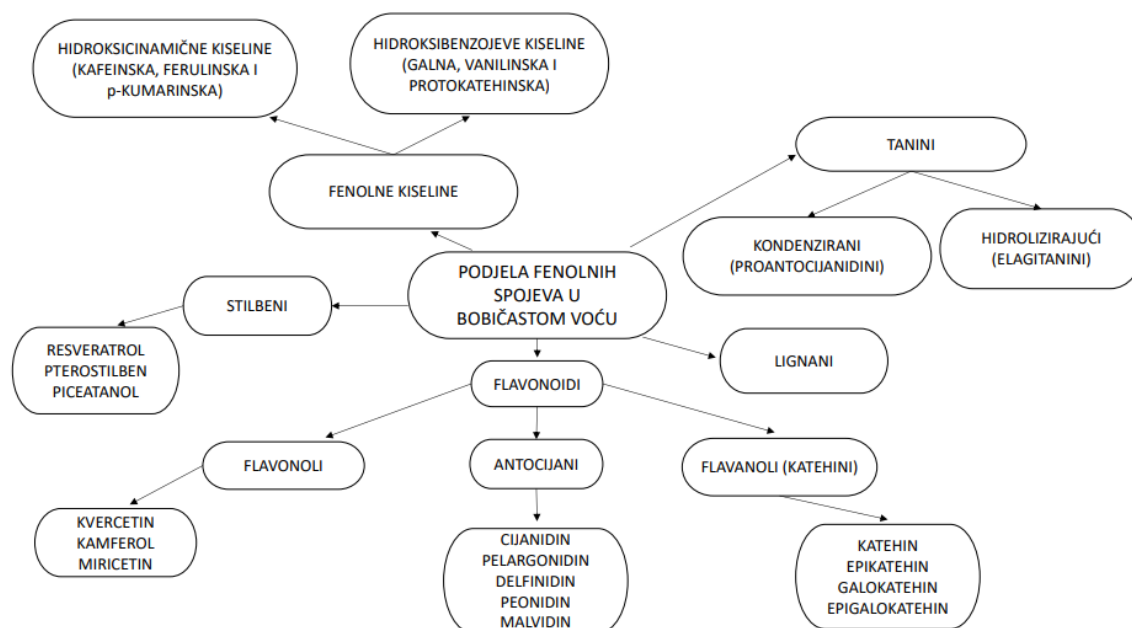
Tablica 1 Kemijski sastav svježe kupine (web 2)

Količina	100 g
Energija	43 kcal
Masti	0,5 g
Zasićene masne kiseline	-
Ugljikohidrati	10 g
Prehrambena vlakna	5 g
Šećeri	4,9 g
Bjelančevine	1,4 g
Kolesterol	-
Natrij	1 mg
Kalij	162 mg
Vitamin B6	-
Vitamin B12	-
Vitamin C	21 mg
Vitamin D	-
Željezo	0,6 mg
Magnezij	20 mg
Kalcij	29 mg

Kupina je bogat izvor vitamina, minerala te prehrambenih vlakana, također su bogate i fenolnim spojevima kao što su antocijani, flavonoli, elagitanini, galotanini, proantocijanidini i fenolne kiseline (Seeram i sur., 2006). Veliki se dio svježih kupina prerađuje u druge proizvode od kupina kao što su pekmezi, sokovi i/ili vina (Amidžić Klarić i sur., 2011).

2.2.1. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka. Posjeduju višestruke funkcije: senzorska svojstva (boja, aroma), antioksidacijska svojstva, utječu na otpornost biljke prema bolestima i mikroorganizmima, na indirektan način mogu utjecati na rast biljke te štite osjetljive stanične dijelove od štetnih UV zraka. Polifenoli čine široko rasprostranjenu heterogenu grupu sekundarnih biljnih metabolita. Karakteristično svojstvo polifenolnih spojeva povezanost je s drugim molekulama, obično s molekulama šećera i proteina. Najčešće se u biljnim tkivima nalaze u vezanom obliku jer slobodni oblici polifenola mogu imati toksične učinke (Reis Giada, 2013). Najveća i najvažnija skupina polifenola su flavonoidi (Brand, 2010). Polifenolni spojevi pokazuju biološko djelovanje u ljudskom organizmu (Kaur i Kapoor, 2001). Mnoga istraživanja pokazala su da polifenoli imaju važnu ulogu u prevenciji mnogih bolesti zbog potencijalnog antikancerogeno, protuupalno, antihepatotoksično, antibakterijsko, antivirusno te antialergijsko djelovanje (Šubarić i sur., 2010.).



Slika 2 Podjela fenolnih spojeva u bobičastom voću (Azofeifa, 2014)

Visokim udjelom polifenola ističu se tamno obojeno bobičasto i jagodasto voće iz porodica Ericaceae (borovnice), Rosaceae (kupina, malina, trešnja, višnja, jagoda) te Caprifoliaceae (bobice bazge) (Määttä-Riihinen i sur. 2004). Na **Slici 2** prikazana je podjela polifenola u bobičastom voću, dok se u **Tablici 2** nalazi sadržaj polifenola u različitim namirnicama.

Tablica 2 Sadržaj polifenola u različitim namirnicama (Gharras, 2009)

IZVORI	SADRŽAJ POLIFENOLA (mg/kg ili mg/L)	VRSTA POLIFENOLA
Borovnica	30 – 160	Flavonoli
Ribizli	30 – 70	
Marelica	25 – 50	
Jabuka	20 – 40	
Crno grožđe	15 – 40	
Rajčica	2 – 15	
Cherry rajčica	115 – 200	
Poriluk	30 – 225	
Žuti luk	350 – 1200	
Kelj	300 – 600	
Brokula	40 – 100	
Crni čaj	30 – 45	
Zeleni čaj	20 – 35	
Crno vino	2 – 30	
Kupina	80 – 270	Fenolne kiseline (Hidroksibenzojeva kiselina)
Malina	60 – 100	
Jagoda	20 – 90	
Patlidžan	750	Antocijani
Kupina	1000 – 4000	
Ribizli	250 – 5000	
Crno grožđe	300 – 7500	
Trešnja	350 – 4500	
Rabarbara	2000	
Jagoda	150 – 750	
Crno vino	200 – 350	
Šljiva	20 – 250	
Crveni kupus	250	Flavoni
Narančin sok	215 – 685	
Sok od grejpa	100 – 650	
Limunov sok	50 – 300	
Peršin	240 – 1850	

2.2.1.1 Flavonoidi

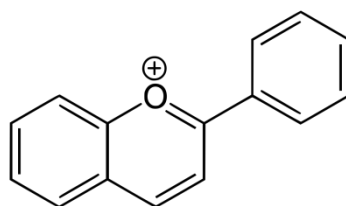
Flavonoidi su spojevi čija se struktura sastoji od C₆-C₃-C₆ kostura, odnosno, imaju fenilbenzopiransku strukturu. Prirodni flavonoidi se dijele u tri skupine ovisno o poziciji aromatskog prstena, a to su: flavonoidi (2-benzopirani), izoflavonoidi (3-benzopirani) i neoflavonoidi (4-benzopirani) (Grotewald, 2006). Flavonoidi su podijeljeni u nekoliko grupa: halkoni, flavani, flavoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoni, flavanonoli i antocijani (Brand, 2010). Struktura flavonoida obuhvaća flavonoidnu jezgru koja se sastoji od tri fenolna prstena A, B i C. Prsten A kondenziran je tročlanim alifatskim nizom te zajedno s kisikom tvori prsten C koji je šesteročlani, dok se na poziciji 2 prstena C nalazi benzenski prsten B. Često se koristi naziv 4-okso-flavonoid za flavonoid koji ima vezanu karbonilnu skupinu na C-4 atomu prstena C. Flavonoidi, uključujući flavone, izoflavone i antocijanidine nastaju kondenzacijom fenilpropanoida pri čemu prvo nastaju halkoni, a zatim dolazi do sinteze raznih strukturnih klasa. Proces sinteze flavonoida kataliziraju čitav niz biljnih enzima (Grotewald, 2006).

Velika količina flavonoida nalazi se u namirnicama kao što su voće i povrće, zeleni i crni čaj, čokolada, crna vina i bobičasto voće. Također značajne količine se nalaze u cvijeću, čajevima, sjemenkama, medu i propolisu (Grotewald, 2006; Harborne i sur., 1999). Flavonoidi su sastavni dio i ljudske i životinjske prehrane, međutim ne mogu se sintetizirati u ljudima niti u životinjama (Keler, 2009).

Važno svojstvo flavonoida je antioksidacijska aktivnost, ono je posljedica redoks svojstva koje im omogućuje da djeluju i kao oksidacijsko i redukcijsko sredstvo. Kao donori vodikovih atoma uklanjaju slobodne radikale, pri čemu dolazi do formiranja fenoksil radikala koji je stabiliziran rezonancijom, te je manje reaktivan (Kukrić i sur., 2013). Također, kao donori protona flavonoidi sprječavaju redukciju dehidroaskorbinske kiseline ili inhibiraju određene enzime i tako usporavaju proces razlaganja elastina (Gokce i Haznedaroglu, 2008). Antioksidacijska aktivnost flavonoida raste povećanjem broja hidroksilnih skupina (Marinova i Yanishlieva, 1992).

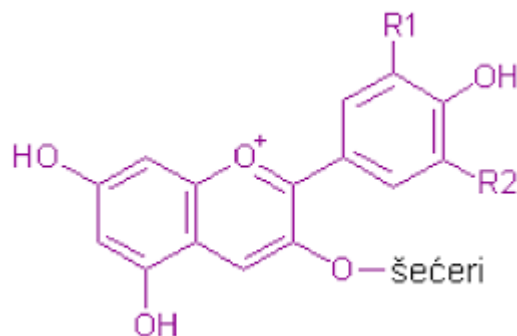
2.2.1.2 Antocijani

Antocijani su skupina prirodnih fenolnih spojeva, definirani kao fenolni flavonoidi koji imaju karakterističan C6-C3-C6 kostur. Te polifenolne tvari su glikozidi polihidroksi- i polimetoksi-derivata 2-fenilbenzopirilijeve ili flavilijeve soli (Francis, 1989.) Antocijani (grč. anthos – cvijeće, kyanos – plav) su biljni pigmenti topljivi u vodi koji voću, povrću te cvijeću daju crveno, plavo i ljubičasto obojenje (Costa i sur, 1998). Iako antocijani imaju veliku raznolikost boja u hrani su vrlo nestabilne molekule. Na njihovu stabilnost uvelike utječu čimbenici kao što su pH, temperatura, kisik, otapalo, struktura, enzimi, prisutnost askorbinske kiseline, neki nukleofili koji se koriste kao aditivi za hranu (SO_2 , NO_2^- , H_2O_2) te svjetlost (Contreras-Lopez i sur., 2014). Antocijani pripadaju skupini flavonoidnih polifenola te imaju tipičan C6-C3-C6 kostur flavonoida. Flavilium kation predstavlja glavni dio antocijana, odnosno aglikon. Flavilium kation se nalazi na **Slici 3**. On sadrži konjugirane dvostruke veze odgovorne za apsorpciju svjetla pri valnim duljinama oko 500 nm te omogućuje da se ljudskom oku pigment čini crvenim. Aglikoni se nazivaju antocijanidini, a najčešće su supstituirani penta (3,5,7,3',4') ili hekza (3,5,7,3',4',5') (Francis, 1989). Poznata su 22 različita antocijanidina, dok su najznačajniji za hranu pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfinidin, malvidin i petunidin. Šest navedenih antocijanidina, odnosno aglikona, razlikuju se međusobno po broju metoksilnih i hidroksilnih grupa na B prstenu flavilium kationa (Rein, 2005).



Slika 3 Flavilium kation (web 3)

Vežanjem šećera na antocijanidine dolazi do tvorbe molekule antocijanina. Najčešće vezani šećer je glukoza, zatim galaktoza, ramnoza, ksiloza (De Man, 1999). Na **Slici 4** je prikazana osnovna struktura antocijana.



Slika 4 Osnovna struktura antocijana (R1, R2-H, OH, OCH₃; šećeri – glukoza, arabinoza, galaktoza) (web 4)

Na stabilnost boje antocijana utječu mnogi faktori:

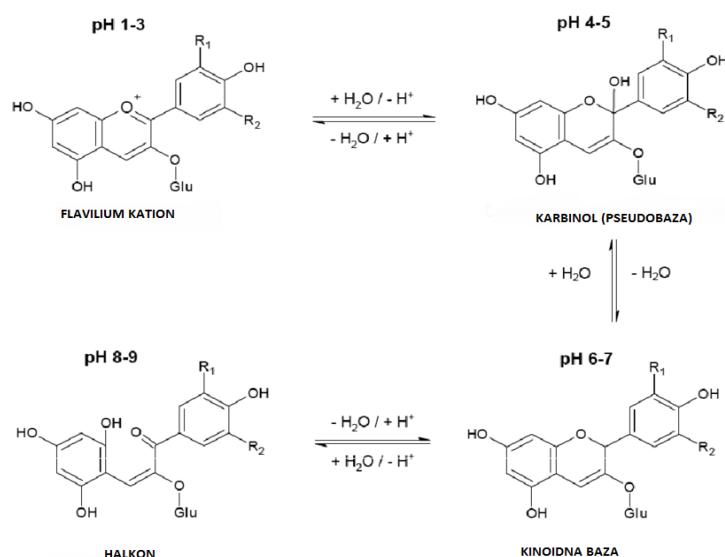
- struktura,
- koncentracija,
- pH,
- enzimi,
- kisik,
- svjetlost,
- prisutnost askorbinske kiseline,
- šećeri i
- kopigmentacija.

2.2.1.2.1 Utjecaj strukture

Na stabilnost i reaktivnost antocijana utječu glikozilne jedinice i acilne grupe koje su vezane za aglikon, te broj i mjesto hidroksilnih i metoksilnih skupina na aglikonu. Povećanjem hidroksilnih skupina boja antocijana prelazi iz ružičaste prema plavoj (Mazza i Brouillard, 1987). Antocijanidin stabiliziraju povišena hidroksilacija i glikolizacija, dok se stabilnost antocijana smanjuje povećanjem metilacije hidroksilnih grupa (Dao i sur., 1998).

2.2.1.2.2 Utjecaj pH

Stabilnost antocijana ovisi o pH sredine u kojoj se nalazi. Stabilnost im se povećava sniženjem pH, dok se povećanjem pH njihova stabilnost smanjuje (Brouillard, 1982; Von Elbe i Schwartz, 1996). Pri niskim pH, odnosno u kiselim vodenim otopinama antocijani postoje u četiri glavna oblika: kinoidalna baza (A), flavilium kation (AH⁺), karbinol ili pseudobaza (B) i halkon (C) (Brouillard, 1982). Pri pH 0-3 (u vrlo kiselom mediju), flavilium kation poprima crvenu boju, povišenjem pH, odnosno, pri pH 4-5 flavilium kation prelazi u bezbojni karbonilni oblik te takav oblik gubi konjugirane dvostruke veze između A i B prstena (Brouillard, 1982). Pri višim pH (u lužnatom mediju) flavilium kation poprima od plavih do žutih tonova. Na **Slici 5** nalaze se četiri glavna oblika antocijana u vodenom mediju.



Slika 5 Četiri glavna oblika antocijana u vodenom mediju (Rein, 2005)

2.2.1.2.3 Utjecaj enzima

Inaktivacijom enzima povećava se stabilnost antocijana. Značajnu ulogu kod enzimske degradacije antocijana imaju kinoni. U mediju enzimi najprije oksidiraju druge fenolne tvari do odgovarajućih kinona koji reagiraju s antocijanima i dolazi do njihove degradacije i nastanka smeđih produkata kondenzacije. Najčešći enzimi koji uzrokuju degradaciju su glikozidaze,

peroksidaze i fenolaze. Glikozidaze cijepaju kovalentnu vezu između glikozilnih jedinica i aglikona što dovodi do nastajanja vrlo nestabilnog antocijanidina, dok se peroksidaze i fenolaze (prirodno nalaze u voću) kataliziraju degradaciju drugih molekula te dolazi do interakcije antocijana s nastalim razgradnim produktima (Kader i sur., 1997; Pifferi i Cultrera, 1974).

2.2.1.2.4 Utjecaj kisika

Kisik uzrokuje oksidaciju što rezultira obezbojenjem ili posmeđivanjem proizvoda, te povećava efekt drugih postupaka degradacije antocijana (Jackman i sur., 1987).

2.2.1.2.5 Utjecaj svjetlosti

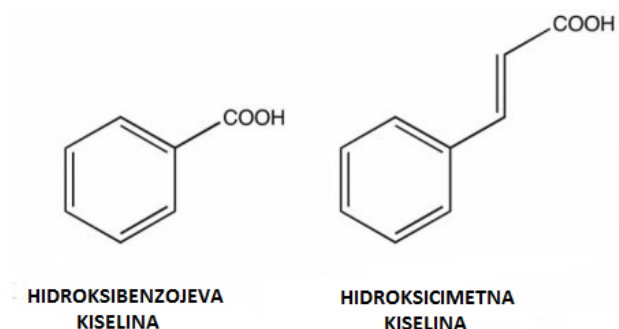
Svjetlost je nužno potrebna za biosintezu antocijana, no ubrzava njihovu degradaciju (Ćujić, 2013).

2.2.1.2.6 Utjecaj šećera

Stabilnost antocijana smanjuje se prisustvom šećera. Smeđi pigmenti nastaju reakcijom antocijana i degradacijskih produkata šećera i askorbinske kiseline (Krifi i sur., 2000). Šećer saharoza sprječava polimerizaciju i stvaranje smeđih produkata te sprječava degradaciju antocijana (Wrolstad i sur., 1990)

2.2.1.3 Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su široko rasprostranjene skupine prirodnih fenolnih spojeva koje imaju karakterističan aromatski prsten s minimalno jednom hidroksilnom skupinom (Robbins, 2003). Postoje kao hidrosibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (**Slika 6**).

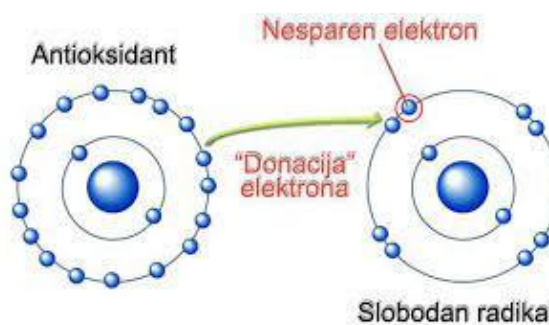


Slika 6 Hidrosibenzojeva i hidroksicimetna kiselina (web 5)

Hidrosibenzojeve kiseline karakterizira skupina hidroksiliranih derivata benzojeve kiseline s primarnom strukturom C₆-C₁, dok hidroksicimetne kiseline karakterizira skupina hidroksiliranih derivata cimetne kiseline s primarnom strukturnom jedinicom C₆-C₃ (Dewick, 2007). Mali dio fenolnih kiselina dolazi u slobodnom obliku, te je veliki dio vezan eterskim, esterskim ili acetalnim vezama za strukturne jedinice biljke (proteini, celuloza, lignin), veće polifenole, manje organske molekule (glukoza) ili druge prirodne spojeve (terpeni). Rasprostranjene su u žitaricama, voću, povrću, ljekovitim biljkama (Robbins, 2003).

2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidansi mogu spriječiti ili usporiti oksidaciju na dva načina; kao primarni antioksidans uklanjanjem slobodnih radikala ili kao sekundarni antioksidans mehanizmom koji ne uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala. Primarni antioksidansi su fenolne tvari. Sekundarni antioksidansi djeluju putem različitih mehanizama. Za njih je uobičajeno da pokazuju antioksidacijsku aktivnost samo u prisustvu neke druge manje komponente (Gordon, 2001.). Na **Slici 7** prikazano je djelovanje antioksidanasa.



Slika 7 Mehanizam djelovanja antioksidanasa (web 6)

Antioksidacijska aktivnost izdvaja se kao važna karakteristika polifenola, a izražava se hvatanjem slobodnih radikala te vezanjem metalnih iona (Rice-Evans i sur., 1997). 3-glukozid je najaktivniji antioksidans, dok je cijanidin najčešće prisutan antocijanidin (Einbond i sur., 2004). Pored prirodno prisutnih antioksidanasa, razvijeni su i sintetski koji se u praksi koriste kao aditivi, nadomjesci i lijekovi. Međutim, prirodni su antioksidansi sigurniji, učinkovitiji i vrjedniji od sintetskih (Yanishlieva-Maslarova i Heinonen, 2001). Antioksidacijska aktivnost ovisi o strukturnim svojstvima, temperaturi, svjetlosti, tipu supstrata, fizikalnom stanju sustava, kao i o brojnim mikrokomponentama koje djeluju kao prooksidansi ili sinergisti (Yanishlieva-Maslarova i Heinonen, 2001). Na antioksidacijsku aktivnost utječu također i glikolizacija i hidroksilacija kostura antocijanidina (Einbond i sur., 2004). Antioksidacijskom kapacitetu kupine značajnije pridonose flavonoli negoli antocijani jer su flavonoli jači antioksidansi (Zorzi i sur., 2020).

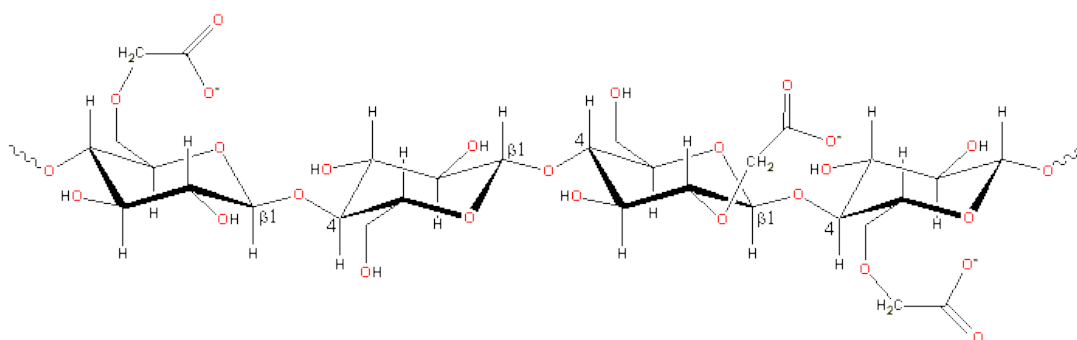
2.4. DODACI HRANI

Dodaci hrani ili prehrambeni aditivi su tvari poznatog kemijskog sastava koji se ne nalaze u hrani kao tipičan sastojak već se namjerno dodaju radi povećanja nutritivne vrijednosti hrane, radi poboljšanja/mijenjanja teksture proizvoda, produženja trajnosti proizvoda. U hranu se dodaju tijekom samog postupka proizvodnje, tijekom pripreme, obrade proizvoda, oblikovanja, pakiranja, transporta te čuvanja. Prihvatljiv dnevni unos aditiva ili Acceptable Daily Intake (ADI) je ona količina aditiva prisutna u namirnici koja svakodnevnim unosom tijekom cjeloživotnog razdoblja nema nikakav rizik za zdravlje čovjeka. Najčešće se dodaju se u miligramskim količinama, dok se neki aditivi dodaju i u gramima. Prije uporabe u proizvodnji moraju proći toksikološko ispitivanje koje uključuje kutni, subakutni i kronični toksicitet i kancerogenost. Također, ispituje se i interakcija s drugim sastojcima namirnice i s lijekovima (European Parliament and Council Directive 89/107/EEC, 1989). Aditiv mora ispuniti tri uvjeta kako bi se dodao u hranu: ne smije ugrožavati zdravlje potrošača, mora biti tehnološki nužan te ne smije dovesti u zabludu potrošača. Označavaju se E-brojem, te se svrstavaju u 22 kategorije: konzervansi, bojila, antioksidansi, emulgatori, zgušnjivači, stabilizatori, kiseline, pojačivači okusa, modificirani škrobovi, tvari za želiranje, tvari za sprječavanje zgrudnjavanja, regulatori kiselosti, tvari za zaslađivanje ili sladila, tvari za poliranje, tvari za zadržavanje vlage, tvari za tretiranje brašna, učvršćivači, tvari za povećanje volumena, tvari za potiskivanje plinova, emulgatorske soli, tvari protiv pjenjenja i tvari za rahljenje. Ukoliko se nalaze u namirnici, aditivi moraju biti označeni na deklaraciji proizvoda nazivom kategorije, koja je samim time i tehnološka svrha uporabe aditiva, zatim slijedi E-broj ili specifičan kemijski naziv. Ako aditiv ima dvije ili više tehnološke funkcije pri proizvodnji proizvoda, neophodno je definirati onu tehnološku svrhu zbog kojeg je aditiv i dodan u namirnicu (NN 81/08, 2010).

2.4.1. Karboksimetilceluloza

Karboksimetilceluloza (CMC) ili celulozna guma je ionski polimer koji u reakcijama s topljivim proteinima stvara komplekse, topljiva je u hladnoj i toploj vodi, te daje bistru i bezbojnu

otopinu (**Slika 8**) (Phillips i sur., 2000). CMC se proizvodi eterifikacijom hidroksilnih skupina s natrijevim monokloroacetatom (SMCA) u prisutnosti vodene lužine. Metoda se temelji na Williamsonovoj sintezi etera (Tijssen i sur., 2001). Prvi korak u karboksimetilaciji je ravnotežna reakcija između NaOH i hidroksilne skupine celuloze. Drugi korak je stvarna formacija karboksimetilne skupine supstitucijom SMCA. Sljedeći koraci su neutralizacija, pročišćavanje i odvajanje CMC. Stabilnost CMC ovisi o pH, o sastavu i koncentraciji proteina, temperaturi, te također o samoj koncentraciji i vrsti karboksimetilceluloze. Manje je podložna djelovanju mikroorganizama od ostalih hidrokoloida. Proizvodnja CMC-a jednostavnija je od proizvodnje drugih celuloznih etera jer se sve reakcije odvijaju pri atmosferskom tlaku pomoću komercijalno dostupnih reagensa. Reagens za eterizaciju, natrijev monokloroacetat, jednostavan je za rukovanje i vrlo je učinkovit. Iz tih je razloga CMC postao najveći industrijski celulozni eter (Dahlman i sur., 2003). Navedeni polimer koristi se kao zamjena za škrob, dekstrin, želatinu ili biljnu gumu u različitim industrijama. U prehrambenoj industriji upotrebljava se kao stabilizator, zgušnjivač, emulgator (E466) u proizvodnji instant proizvoda, umaka i preljeva, smrznutih proizvoda, bezalkoholnih pića, pekarskih proizvoda te mliječnih proizvoda koji imaju niski pH. U proizvodima koji sadrže škrob sprječava izdvajanje vode i taloženje proteinskih molekula, dok kod pekarskih proizvoda povećava prinos, usporava starenje proizvoda te produžuje rok trajanja (Phillips i sur., 2000).



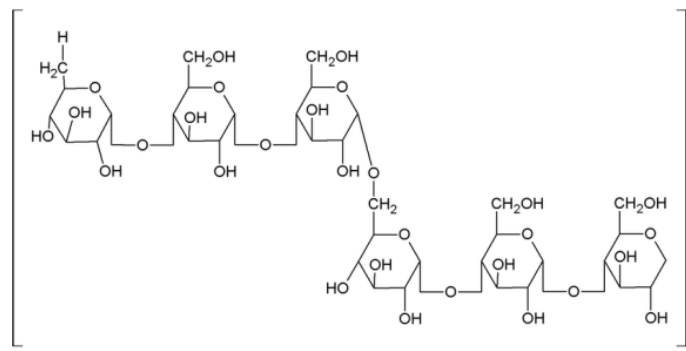
Slika 8 Struktura karboksimetilceluloze (web 7)

2.4.2. Pululan

Pululan je linarni polisaharid sastavljen od maltotrioznih jedinica povezanih α -(1-4) glikozidnim vezama (**Slika 9**). Maltotrioza je trisaharid, čije su osnovne jedinice molekule glukoze (Chi i sur., 2009). To je jedan od rijetkih neutralnih, u vodi topljivih mikrobnih

polisaharida koji tvore topive i prozirne filmove s relativno niskom propusnošću kisika te se može proizvesti u velikim količinama procesom fermentacije. Međutim, zbog različitih problema pri proizvodnji ovog polisaharida, njegova primjena u prehrambenoj industriji je ograničena (Seo i sur. 2004). Proizvode ga *Aureobasidium pullulans* (Wang i sur. 2015), gljivice izolirane iz okoliša koje su patogene za biljke (Cooke, 1959). Uspješna sinteza pululana bit će ostvarena ukoliko su postignuti slijedeći uvjeti: pH od 4 do 5 (Madi i sur. 1996) i temperatura od 24° do 30°C (Cheng i sur., 2011). Također, na sintezu utječe i prisutnost pojedinih vitamina i minerala (Bender i sur., 1959). Supstrat koji je najučinkovitiji za sintezu pululana je saharoza, pospješuje ju dodatak dušikova nitrata u mediju u kojem se gljivice razvijaju (Ravella i sur., 2010). Višak supstrata negativno utječe na sintezu pululana (Kim i sur., 2000).

U prehrambenoj industriji pululan se koristi za proizvodnju biorazgradivih slojeva, kao zamjena za škrob u dijetalnoj hrani, te kao dodatak u prehrani kao prebiotik. Pululanu se mogu dodavati razni okusi, razne boje, lizosomi zbog kojih sloj ima antimikrobno djelovanje (Cheng i sur. 2011; Kandemir i sur., 2005; Oku i sur., 1979; Yuen 1974).



Slika 9 Struktura pululana (web 8)

2.4.3. Proteini mlijeka

Proteini mlijeka dijele se na proteine sirutke i kazein (Markeš, 1977). Kazein čini oko 80% ukupne količine proteina u mlijeku. Dijeli se na nekoliko frakcija, a to su α -kazein, β -kazein, κ -kazein (Šumić, 2008). Proizvodi se iz obranog mlijeka te može biti sirišni ili kiseli kazein. Sirišni kazein proizvodi se korištenjem sirila u obranom mlijeku, dok se kiseli kazein dobiva djelovanjem kiselina, kao što su mliječna, octena, sumporna i druge, na obrano mlijeko. Najčešće se upotrebljava kiseli kazein, dok je sirišni kazein našao primjenu u industriji

plastičnih masa (Markeš, 1952). U prehrambenoj industriji kazein je našao primjenu u proizvodnji sira (Šćurić, 1991), dok se u drugim industrijama koristi u proizvodnji nekih vrsta plastike, dok je poznato i kazeinsko ljepilo (Filjak, 1962). Danas se kazein koristi i kao zamjena za proteine jer stvara određenu vrstu gela u želucu gdje se otpuštaju aminokiseline. Druga vrsta mliječnih proteina su proteini sirutke koji čine 18 – 20% ukupnih proteina mlijeka. Radi svojih nutritivnih i funkcionalnih svojstava imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji. Koriste se kao sredstva za želiranje, emulgiranje, stvaranje pjene te za vezivanje vode. Proteini sirutke najvećim dijelom sadrže β -laktoglobuline i α -laktalbumine, izuzetno su hidrofilni te otporniji na djelovanje kiselina i enzima. S druge strane, termolabilni su te denaturiraju pri temperaturi iznad 60 °C. β -laktoglobulin je dimer sastavljen od dva ista peptidna lanca koji su čvrsto povezani nekovalentnim vezama, a sadrži 162 aminokiseline. α -laktalbumin je kompaktan protein, jednostruki lanac s oko 123 aminokiseline, približno kružnog oblika (Herceg i Režek, 2006).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

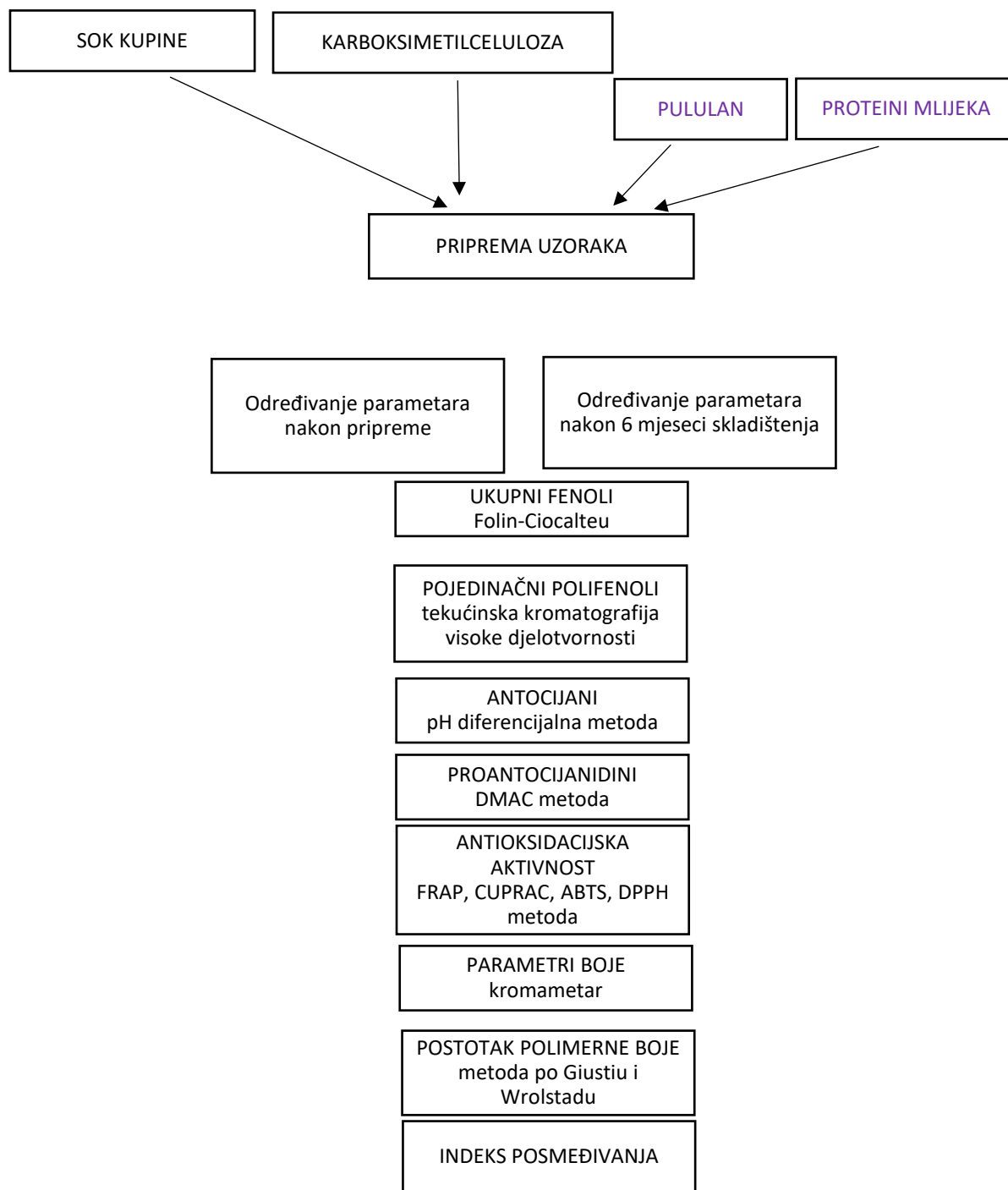
U ovom diplomskom rada zadatak je bio pripremiti gelove na bazi soka kupine i karboksimetilceluloze. Gelovi su se dodatno još pripremili s dodatkom pululana i proteina mlijeka. Za istraživanje je pripremljeno 5 uzoraka:

1. sok kupine + karboksimetilceluloza,
2. sok kupine + karboksimetilceluloza + 0,1% pululan,
3. sok kupine + karboksimetilceluloza + 0,2% pululan,
4. sok kupine + karboksimetilceluloza + 0,1% pululan + 1% protein mlijeka i
5. sok kupine + karboksimetilceluloza + 0,2% pululan + 1% protein mlijeka.

Na dobivenim uzorcima određeni su sljedeći parametri:

- ukupni fenoli, proantocijanidini i antocijani spektrofotometrijski;
- pojedinačni fenoli primjenom HPLC-a;
- antioksidacijska aktivnost primjenom DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metoda;
- parametri boje (L^* , a^* , b^* , $^{\circ}h$, C^* , ΔE).

Na temelju dobivenih rezultata utvrdit će se utjecaj pululana i proteina mlijeka na ispitivane parametre. Uzorci su skladišteni 6 mjeseci na sobnoj temperaturi te su evaluirani svi prethodno navedeni parametri kako bi se utvrdile promjene tijekom skladištenja.



Slika 10 Blok shema rada

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Materijali

Sok kupine je napravljen prešanjem kupina. Klorovodična kiselina, octena kiselina, metanol, natrij karbonat, željezo klorid, amonij acetat Folin-Ciocalteu reagens su nabavljeni od proizvođača Kemika (Zagreb). Trolox je nabavljen od proizvođača Sigma (Njemačka). 2,2'-azinobis (3-etilbenztiozolin-sulfonska kiselina) (ABTS) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) su nabavljeni od proizvođača Fluka (Njemačka). 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), galna kiselina, procijanidin B2 su nabavljeni od proizvođača Sigma, Njemačka. Neokuproin, bakar klorid su proizvodi Gram-mola (Hrvatska). Pululan je dobiven od Hayashibara doo kompanije (Nagase group, Japan). Karboksimetilceluloza i proteini mlijeka su nabavljeni od Biesterfeld AG (Hrvatska).

3.2.2. Priprema hidrogelova

Za pripremu hidrogelova, na magnetskoj miješalici se je miješala i zagrijavala (70 °C) smjesa soka kupine i karboksimetilceluloze (2%). Vruća smjesa se je prelila u zagrijane staklenke od 40 mL i zatvorila. Hidrogelovi s dodacima su se pripremali tako da se je u prvobitnu smjesu dodao pululan (0,1% ili 0,2%) s/bez dodatka proteina mlijeka. Jedan set uzoraka je korišten za određivanje definiranih parametara odmah nakon pripreme, a drugi set uzoraka se je skladištio 6 mjeseci na sobnoj temperaturi zbog utvrđivanja promjena tijekom skladištenja.

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola

Za određivanje ukupnih fenola korištena je Folin-Ciocalteu metoda. Rezultat se preračunava iz kalibracijske krivulje galne kiseline.

Postupak: otpipetira se 0,5 mL koncentriranog uzorka, 1,5 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu (1:10) reagensa i 8 mL otopine natrijevog karbonata u epruvetu, promućka se, zatim se ostavi pri sobnoj temperaturi dva sata na tamnom mjestu. Apsorbancija se mjeri na spektrofotometru pri 765 nm. Slijepa proba se određuje destiliranom vodom (2 mL). Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.4. Određivanje proantocijanidina

Za određivanje proantocijanidina korištena je DMAC metoda.

Postupak: otpipetira se 0,5 ml uzorka i 1 ml 4-dimetilaminocinamaldehyd (DMAC) otopine i ostavi 30 minuta da odstoji. Adsorbancu određujemo na valnoj duljini od 640 nm. Slijepa proba se priredi sa etanolom i DMAC otopinom. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.5. Određivanje pojedinačnih polifenola

Za određivanje pojedinih polifenola korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti na uređaju HPLC 1260 Infinity II (Agilent Technologies, CA, USA).

Postupak: Sadržaj antocijana, fenolnih kiselina i flavonola određen je koristeći HPLC sustav 1260 Infinity II (Agilent technology, Santa Clara, CA, USA). Navedeni sustav se sastoji od sljedećih dijelova: kvaterna pumpa, detektor s diodnim nizom i kolona Poroshell 120 EC-C 18 (4,6 x 100 mm, 2,7 μ m). Kao mobilne faze korišteni su 0,1 %-tna H_3PO_4 (A) i 100%-tni metanol (B). Količina injektiranog uzorka iznosila je 10 μ L, a protok je bio postavljen na 1 mL/min. Za razdjeljivanje je upotrijebljen sljedeći gradijent: 0 min 5 % B, 3 min 30 % B, 15 min 35 % B, 22 min 37 % B, 30 min 41 % B, 32 min 45 % B, 40 min 49 % B, 45 min 80 % B, 48 min 80 % B, 50 min 5 % B, 53 min 5 % B. Kromatogrami su snimani u području od 190 do 600 nm. Antocijani su identificirani na 520 nm, hidroksicimetne kiseline na 320 nm, a flavonoli na 360 nm. Uzorci su analizirani u paralelama.

3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

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

DPPH metoda

Postupak: otpipetira se 0,2 mL koncentriranog uzorka, 3 mL otopine DPPH, dobro promiješa te se reakcijska smjesa ostavi 15 minuta. Zatim se mjeri 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 te se reakcijska smjesa ostavi 1h i 35 min u mraku. Zatim se mjeri 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 koncentriranog uzorka te 0,9 mL vode. Smjesa se homogenizira te ostavi 30 minuta. Nakon toga 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 te se reakcijska smjesa ostavi 30 minuta. Zatim se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.7. Određivanje antocijana

Za određivanje antocijana korištena je pH-diferencijalna metoda.

Ukupni monomerni antocijani izraženi su kao cijanidin-3-glukozid. Apsorbancija uzorka se određivala na spektrofotometru.

Postupak: otpipetira se 0,2 mL koncentriranog uzorka u dvije kivete. U jednu je dodano 2,8 mL kalij klorid pufer pH 1, a u drugu 2,8 mL natrij acetat pufera pH 4,5, te se reakcijske smjese ostave 15 min. Zatim se mjeri apsorbancija pri valnim duljinama od 510 nm i 700 nm.

Za svaki uzorak provedena su dva mjerenja.

Sadržaj antocijana je izračunat prema formuli:

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

gdje je: A - absorbanca uzorka, koja se izračunava prema izrazu:

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

M - 449,2

FR - faktor razrjeđenja

ϵ - molarna absorptivnost, 26 900

l - duljina kivete, 1 cm

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

3.2.8. Određivanje postotka polimerne boje

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

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

Gustoća boje izračunata je uz korištenje kontrolnog uzorka prema formuli:

$$\text{Gustoća boje} = [(A_{420\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}}) + (A_{510} - A_{700\text{ nm}})] \times \text{FR}$$

Koristeći uzorak tretiran bisulfitom izračunata je polimerna boja prema sljedećoj formuli:

$$\text{Polimerna boja} = [(A_{420\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}}) + (A_{510} - A_{700\text{ nm}})] \times \text{FR}$$

Postotak polimerne boje izračunat je pomoću formule:

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

3.2.9. Određivanje indeksa posmeđivanja

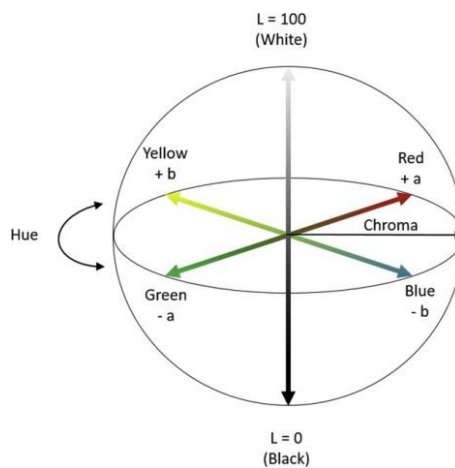
Indeks posmeđivanja određen je prema sljedećoj formuli

$$\text{BI} = A_{420}/A_{510}$$

gdje je A_{420} absorbanca na 420 nm, a A_{510} absorbanca na 510 nm.

3.2.10. Određivanje boje

Mjerenje i promjena boje praćeni su kromametrom (Minolta CR-400) koji ovaj kromametar mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Svjetlost se reflektira, te takvu svjetlost mjeri šest osjetljivih silikonskih fotoćelija. Računalo zapisuje podatke te ih izražava u pet različitih sustava (X, Y, Z; Yxy; LCH; Lab; Hunter Lab). U radu je korišten Lab sustav koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko (**Slika 10**)



Slika 11 Prikaz CIELAB prostora boja (web 9)

L^* vrijednosti izražava svjetlinu, odnosno je li predmet taman ili svijetao. Ukoliko je $L^* = 0$, predmet je taman, a ako je $L^* = 100$ predmet je svijetao. a^* vrijednost izražava crvenu ili zelenu boju. Ukoliko je a^* pozitivan predmet je crvene boje, ukoliko je a^* negativan predmet je zelen. b^* vrijednost izražava žutu ili plavu boju. Ukoliko je b^* pozitivan predmet je žute boje, a ako je b^* negativan predmet je plav. Uz L^* , a^* i b^* vrijednosti na kromometru se mjeri i zasićenje (C^*) i ton boje ($^{\circ}h$). Zasićenje (C^*) predstavlja udio čiste boje u ukupnom vizualnom doživljaju boje tj. udio pojedinih valnih duljina u ukupnom tonu boje. Ton boje ($^{\circ}h$) predstavlja vizualni doživljaj na osnovi kojeg definiramo pojedinu boju (plavu, žutu, crvenu itd.) ovisno o dominantnoj valnoj duljini. Svjetlina (L^*) izražava udio crne u nekom tonu boje, odnosno sličnost boje s nizom akromatskih boja od crne preko sive do bijele.

ΔE predstavlja promjenu boje, odnosno udaljenost između dvije točke u koordinatnom sustavu boje. Promjena boje izračunava se na temelju L^* , a^* i b^* vrijednosti prema formuli:

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

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

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

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

(k – kontrolni uzorak; u – uspoređivani uzorak)

Veza između izračunate promjene boje (ΔE) i ljudske percepcije boje dana je u **Tablici 3**.

Tablica 3 Odnos izračunate promjene boje (ΔE) i ljudske percepcije boje

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

3.2.11. Statistička analiza podataka

Rezultati su obrađeni pomoću ANOVA testa uz statističku značajnost od $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UKUPNI FENOLI, PROANTICIJANIDINI I ANTOCIJANI U SOKU KUPINE I HIDROGELOVIMA NAKON PRIPREME I NAKON SKLADIŠTENJA

U **Tablici 4** prikazana je koncentracija ukupnih fenola, proantocijanidina i antocijana u soku kupine i hidrogelovima nakon pripreme dok je u **Tablici 5** koncentracija ukupnih fenola (TPC), proantocijanidina (PAC) i monomernih antocijana (MAC) u hidrogelovima nakon 6 mjeseci skladištenja. Najveći udio ukupnih fenola nakon pripreme imao je uzorak hidrogela s 0,1% pululana (0,91 g/kg), zatim uzorak hidrogela s 0,2% pululana (0,89 g/kg), uzorak hidrogela bez dodataka (0,82 g/kg), hidrogel s 0,2% pululana + 1% mliječni protein (0,80 g/kg), hidrogel s 0,1% pululan + 1% mliječni protein (0,77 g/kg).

Nakon 6 mjeseci skladištenja, najveću koncentraciju ukupnih fenola imao je uzorak hidrogela s 0,2% pululana, uzorak s 0,1% pululana i hidrogel bez dodataka (oko 0,83 g/kg), zatim hidrogel s 0,2% pululana + 1% protein mlijeka (0,72 g/kg) te najmanju koncentraciju imao je hidrogel s 0,1% pululana + 1% protein mlijeka (0,68 g/kg).

Koncentracija proantocijanidina nakon pripreme slijedi slijedeći niz: najveću koncentraciju ima hidrogel bez dodataka (40,16 µg/g), zatim hidrogel s 0,1% pululana (38,81 µg/g), hidrogel sa 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (33,06 µg/g), hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (29,81 µg/g), hidrogel s 0,2% pululana (25,64 µg/g) te sok kupine (19,73 µg/g). Nakon 6 mjeseca skladištenja došlo je do degradacije proantocijanidina.

Najveću koncentraciju antocijana ima sok kupine (92,57 mg/kg), nakon pripreme gelova koncentracija MAC se smanjuje te slijedi niz: hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (32,93 mg/kg), zatim hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (25,84 mg/kg), hidrogel s 0,1% pululana (22,75 mg/kg), hidrogel s 0,2% pululana (21,85 mg/kg) te hidrogel bez dodataka (19,38 mg/kg).

Nakon 6 mjeseci skladištenja, koncentracija antocijana je sljedeća: najveću koncentraciju ima hidrogel sa 0,2% pululana + 1% protein mlijeka (8,44 g/L), zatim uzorak sa 0,1% pululana + 1% protein mlijeka (7,44 g/L), hidrogel bez dodataka (5,67 g/L), hidrogel sa 0,2% pululana (5,42 g/L) te najmanju koncentraciju bilježi hidrogel sa 0,1% pululana (4,55 g/L).

Tablica 4 Ukupni fenoli (TPC), proantocijanidini (PAC) i monomerni antocijani (MAC) u soku kupine i hidrogelovima nakon pripreme

uzorci	TPC (g/kg)	PAC ($\mu\text{g/g}$)	MAC (mg/kg)
sok kupine	$0,63 \pm 0,00^e$	$19,73 \pm 0,22^f$	$92,57 \pm 0,32^a$
2% CMC	$0,82 \pm 0,00^c$	$40,16 \pm 0,72^a$	$19,38 \pm 0,17^e$
2% CMC + 0,1% P	$0,91 \pm 0,00^a$	$38,81 \pm 0,83^b$	$22,75 \pm 0,64^d$
2% CMC + 0,2% P	$0,89 \pm 0,00^b$	$25,64 \pm 0,83^e$	$21,85 \pm 0,23^d$
2% CMC + 0,1% + 1% MP	$0,77 \pm 0,01^d$	$29,81 \pm 0,33^d$	$32,93 \pm 0,68^b$
2% CMC + 0,2% + 1% MP	$0,80 \pm 0,01^c$	$33,06 \pm 0,81^c$	$25,84 \pm 0,75^c$

2% CMC – količina karboksimetilceluloze; 0,1 – 0,2% P – količina pululana; 1% MP – količina proteina mlijeka; vrijednosti označene različitim slovima u istoj koloni su statistički različite.

Tablica 5 Ukupni fenoli (TPC), proantocijanidini (PAC) i monomerni antocijani (MAC) u hidrogelovima nakon 6 mjeseca skladištenja

uzorci	TPC (g/kg)	PAC ($\mu\text{g/g}$)	MAC (mg/kg)
2% CMC	$0,81 \pm 0,02^a$	-	$5,67 \pm 0,16^c$
2% CMC + 0,1% P	$0,83 \pm 0,05^a$	-	$4,55 \pm 0,69^e$
2% CMC + 0,2% P	$0,84 \pm 0,04^a$	-	$5,42 \pm 0,89^d$
2% CMC + 0,1% P + 1% MP	$0,68 \pm 0,00^c$	-	$7,44 \pm 0,37^b$
2% CMC + 0,2% P + 1% MP	$0,72 \pm 0,00^b$	-	$8,44 \pm 0,10^a$

2% CMC – količina karboksimetilceluloze; 0,1 – 0,2% P – količina pululana; 1% MP – količina proteina mlijeka; vrijednosti označene različitim slovima u istoj koloni su statistički različite.

4.2. POJEDINI POLIFENOLI U SOKU KUPINE I HIDROGELOVIMA NAKON PRIPREME I NAKON SKLADIŠTENJA

U **Tablici 6** nalaze se koncentracije pojedinih polifenola (mg/kg) u soku kupine određeni HPLC metodom. Koncentracija cijanidin-3-glukozid u soku kupine iznosi 67,96 mg/kg, cijanidin-3-O-dioksalilglukozida 23,76 mg/kg, klorogenske kiseline 6,31 mg/kg, elaginske kiseline 5,47 mg/kg, kofeinske kiseline 0,76 mg/kg, galne kiseline 7,26 mg/kg, p-kumarinske kiseline 8,22 mg/kg, rutina 0,74 mg/kg, kvercetin 4,54 mg/kg, te ukupno fenola u soku kupine ima 125,02 mg/kg.

U **Tablici 7** prikazani su rezultati polifenola u hidrogelovima određeni HPLC metodom nakon pripreme, dok se u **Tablici 8** nalaze koncentracije polifenola u hidrogelovima određeni nakon 6 mjeseci skladištenja. Određeni su antocijani: cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-O-dioksalilglukozid. Nakon pripreme najveću koncentraciju cijanidin-3-glukozida imao je hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (124,06 mg/kg), zatim hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (120,15 mg/kg), hidrogel s 0,2% pululana (105,67 mg/kg), hidrogel s 0,1% pululana (103,93 mg/kg), te hidrogel bez dodataka (95,24 mg/kg). Nakon skladištenja najveću koncentraciju antocijana cijanidin-3-glukozida imali su hidrogel s 0,1% pululana + 1% protein mlijeka i hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (oko 40 mg/kg). Hidrogel s 0,1% pululana, hidrogel s 0,2% pululana i hidrogel bez dodataka imali su oko 35,01 mg/kg ovog antocijana. Iz rezultata je vidljivo da je došlo do gubitka cijanidin-3-glukozida tijekom skladištenja.

Nakon pripreme najveću koncentraciju cijanidin-3-O-dioksalilglukozida imao je hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (58,01 mg/kg), zatim hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (56,21 mg/kg), hidrogel s 0,1% pululana (52,95 mg/kg), hidrogel s 0,2% pululana (50,81 mg/kg), te hidrogel bez dodataka (49,80 mg/kg). Nakon skladištenja došlo je do degradacije ovo antocijana.

Određene su fenolne kiseline: klorogenska kiselina i elaginska kiselina, dok kofeinska kiselina, galna kiselina i p-kumarinska kiselina nisu određene u hidrogelovima za razliku od soka. Nakon pripreme najveću koncentraciju klorogenske kiseline imali su hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka i hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (oko 43,6 mg/kg), nešto niže koncentracije imali su hidrogel s 0,1% pululana i hidrogel s 0,2% pululana (42 mg/kg), a

hidrogel bez dodataka imao je najmanju koncentraciju (40,36 mg/kg). Tijekom skladištenja došlo je do malog povećanja koncentracije klorogenske kiseline te su najveću koncentraciju imali hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (43,27mg/kg), hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (43,25 mg/kg), a preostali hidrogelovi oko 42,5 mg/kg.

Nakon pripreme najveću koncentraciju elaginske kiseline imao je hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (23,03 mg/kg), zatim hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (21,27 mg/kg), hidrogel s 0,2% pululana (20,40 mg/kg), hidrogel s 0,1% pululana (19,71 mg/kg), te hidrogel bez dodataka (18,85 mg/kg). Nakon skladištenja koncentracija elaginske kiseline je opala kod uzorka hidrogela s 0,2% pululana + 1% protein mlijeka (22,71 mg/kg), dok se kod ostalih uzoraka povećala. Najveću vrijednost navedene kiseline nakon skladištenja imali hidrogel bez dodataka, su hidrogel s 0,1% pululana i hidrogel s 0,2% pululana (23,4 mg/kg), te najmanju vrijednost imao je hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (22,15 mg/kg). Ukupno fenola nakon pripreme najviše su sadržavali hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka i hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka. Hidrogel bez dodataka imao je najnižu vrijednost ukupnih fenola (204,25 mg/kg). Tijekom skladištenja značajno opada koncentracija ukupnih fenola te slijedi trend koji je utvrđen nakon pripreme uzoraka.

Tablica 6 Koncentracija pojedinih polifenola (mg/kg) u soku kupine određena HPLC metodom

Fenoli	sok kupine
cijanidin-3-glukozid	67,96 ± 0,40 ^a
cijanidin-3-O-dioksalilglukozid	23,76 ± 0,03 ^a
klorogenska kiselina	6,31 ± 0,03 ^a
elaginska kiselina	5,47 ± 0,00 ^a
kofeinska kiselina	0,76 ± 0,00 ^a
galna kiselina	7,26 ± 0,01 ^a
p-kumarinska kiselina	8,22 ± 0,00 ^a
rutin	0,74 ± 0,00 ^a
kvercetin	4,54 ± 0,05 ^a
ukupno	125,02

Tablica 7 Koncentracija pojedinih polifenola (mg/kg) u hidrogelovima određena HPLC metodom

Uzorci	cijanidin-3-glukozid	cijanidin-3-O-dioksalilglukozid	klorogenska kiselina	elaginska kiselina	ukupno
2% CMC	95,24 ± 3,08 ^b	49,80 ± 0,55 ^b	40,36 ± 0,66 ^b	18,85 ± 0,35 ^b	204,25
2% CMC + 0,1% P	103,93 ± 0,29 ^c	52,95 ± 0,75 ^c	42,00 ± 0,23 ^c	19,71 ± 0,12 ^c	218,59
2% CMC + 0,2% P	105,67 ± 0,55 ^c	50,81 ± 1,15 ^b	41,74 ± 0,16 ^c	20,40 ± 0,16 ^d	218,62
2% CMC + 0,1% P + 1% MP	124,06 ± 0,81 ^e	58,01 ± 0,33 ^d	43,06 ± 0,10 ^d	21,27 ± 0,13 ^e	246,40
2% CMC + 0,2% P + 1% MP	120,15 ± 0,40 ^d	56,21 ± 0,66 ^e	43,17 ± 0,04 ^d	23,03 ± 0,00 ^f	242,56

2% CMC – količina karboksimetilceluloze, 0,1 – 0,2% P – količina pululana, 1% MP – količina proteina mlijeka u hidrogelovima; vrijednosti označene različitim slovima u istoj koloni su statistički različite.

Tablica 8 Koncentracija pojedinih polifenola (mg/kg) u hidrogelovima određena HPLC metodom nakon 6 mjeseci skladištenja

Uzorci	cijanidin-3-glukozid	cijanidin-3-O-dioksalilglukozid	klorogenska kiselina	elagična kiselina	Ukupno
2% CMC	35,01 ± 0,02	-	42,34 ± 0,01	23,28 ± 0,04	100,63
2% CMC + 0,1% P	34,74 ± 0,15	-	42,81 ± 0,03	23,21 ± 0,03	100,76
2% CMC + 0,2% P	35,12 ± 0,07	-	42,99 ± 0,03	23,66 ± 0,04	101,77
2% CMC + 0,1% P + 1% MP	40,01 ± 0,13	-	43,22 ± 0,11	22,15 ± 0,18	105,38
2% CMC + 0,2% P + 1% MP	39,47 ± 0,06	-	43,27 ± 0,09	22,71 ± 0,17	105,45

2% CMC – količina karboksimetilceluloze, 0,1 – 0,2% P – količina pululana, 1% MP – količina proteina mlijeka u hidrogelovima; vrijednosti označene različitim slovima u istoj koloni su statistički različite.

4.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST SOKA KUPINE I HIDROGELOVA NAKON PRIPREME I SKLADIŠTENJA

Antioksidacijska aktivnost ispitana je primjenom FRAP, CUPRAC, DPPH i ABTS metodama. Metode se međusobno razlikuju prema mehanizmu određivanja antioksidacijske aktivnosti. FRAP i CUPRAC temelje se na inaktivaciji metala, dok se DPPH i ABTS temelje na blokiranju slobodnih radikala. Prikazani su podaci antioksidacijske aktivnosti nakon pripreme (**Tablica 9**) te nakon 6 mjeseci skladištenja (**Tablici 10**). FRAP metodom su najveće antioksidacijske aktivnosti nakon pripreme imali uzorci hidrogela bez dodataka, hidrogela s 0,1% pululana te hidrogela s 0,2% pululana (0,50 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), zatim hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (0,44 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (0,41 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$) te sok kupine (0,39 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$). Nakon skladištenja zadržan je isti trend kao i nakon pripreme uzoraka te nije došlo do značajnije promjene antioksidacijske aktivnosti. CUPRAC metodom izmjerene su veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u usporedbi s FRAP metodom, tako da najveću aktivnost nakon pripreme uzoraka imao hidrogel bez dodatka (37,13 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), zatim hidrogel s 0,2% pululana i hidrogel s 0,1% pululana (oko 35 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), te hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka i hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (oko 30 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$). Antioksidacijska aktivnost soka kupine iznosila je 28,20 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$. Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja antioksidacijske aktivnosti, te je najveću vrijednost imao hidrogel s 0,2% pululana (35,62 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), zatim hidrogel s 0,1% pululana i hidrogel bez dodataka (33,3 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), a najmanju vrijednost su imali hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (28,34 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), te hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (25,73 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$). DPPH metodom uzorci s najvećom vrijednosti antioksidacijske aktivnosti nakon pripreme bili su hidrogel bez dodataka, hidrogel s 0,2% pululana i hidrogel s 0,1% pululana (oko 3,63 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), dok su hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka i hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (3,43 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$) imali niže vrijednosti. Najmanju vrijednost antioksidacijske aktivnosti imao je sok kupine (2,78 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$). Nakon skladištenja zadržan je isti trend kao i nakon pripreme. Primjenom ABTS metode najveću antioksidacijsku aktivnost imao je uzorak soka kupine (5,41 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$) za razliku od ostalih metoda koje su se koristile. Od hidrogelova najveću antioksidacijsku aktivnost imao je hidrogel bez dodataka (3,91

$\mu\text{mol}/100\text{ g}$), te hidrogel s 0,1% pululana i hidrogel s 0,2% pululana (3,7 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$). Preostala dva hidrogela imala su niže vrijednosti, hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (3,38 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$) te hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (3,19 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$). Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja antioksidacijske aktivnosti. Najveću antioksidacijsku aktivnost imali su hidrogel bez dodataka, hidrogela s 0,1% pululana i hidrogel s 0,2% pululana (oko 3,3 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$), dok su hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka i hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (2,4 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$) imali nižu antioksidacijsku aktivnost.

Tablica 9 Antioksidacijska aktivnost soka kupine i hidrogelova nakon pripreme

uzorci	FRAP ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)	CUPRAC ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)	DPPH ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)	ABTS ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)
sok kupine	0,39 ± 0,01 ^a	28,20 ± 0,22 ^a	2,78 ± 0,07 ^a	5,41 ± 0,05 ^e
2% CMC	0,50 ± 0,02 ^c	37,13 ± 0,78 ^d	3,69 ± 0,02 ^c	3,91 ± 0,06 ^d
2% CMC + 0,1% P	0,50 ± 0,02 ^c	34,70 ± 0,48 ^c	3,60 ± 0,04 ^c	3,77 ± 0,11 ^{c,d}
2% CMC + 0,2% P	0,50 ± 0,02 ^c	35,47 ± 0,10 ^c	3,63 ± 0,02 ^c	3,67 ± 0,14 ^c
2% CMC + 0,1% P + 1% MP	0,41 ± 0,00 ^b	29,86 ± 0,16 ^{a,b}	3,40 ± 0,11 ^b	3,19 ± 0,07 ^a
2% CMC + 0,2% P + 1% MP	0,44 ± 0,02 ^b	31,38 ± 0,52 ^b	3,47 ± 0,06 ^b	3,38 ± 0,07 ^b

2% CMC – količina karboksimetilceluloze; 0,1 – 0,2% P – količina pululana; 1% MP – količina proteina mlijeka; vrijednosti označene različitim slovima u istoj koloni su statistički različite.

Tablica 10 Antioksidacijska aktivnost hidrogelova nakon 6 mjeseci skladištenja

uzorci	FRAP ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)	CUPRAC ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)	DPPH ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)	ABTS ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)
2% CMC	0,49 ± 0,00 ^c	33,05 ± 0,90 ^c	3,70 ± 0,09 ^b	3,44 ± 0,14 ^b
2% CMC + 0,1% P	0,50 ± 0,00 ^c	33,46 ± 0,22 ^c	3,66 ± 0,02 ^b	3,26 ± 0,28 ^b
2% CMC + 0,2% P	0,51 ± 0,01 ^c	35,62 ± 0,04 ^d	3,59 ± 0,06 ^b	3,48 ± 0,16 ^b
2% CMC + 0,1% P + 1% MP	0,38 ± 0,00 ^a	25,73 ± 0,93 ^a	3,27 ± 0,02 ^a	2,22 ± 0,38 ^a
2% CMC + 0,2% P + 1% MP	0,42 ± 0,00 ^b	28,34 ± 0,81 ^b	3,33 ± 0,06 ^a	2,61 ± 0,23 ^a

2% CMC – količina karboksimetilceluloze; 0,1 – 0,2% P – količina pululana; 1% MP – količina proteina mlijeka; vrijednosti označene različitim slovima u istoj koloni su statistički različite.

4.4. POLIMERNA BOJA I INDEKS POSMEĐIVANJA HIDROGELOVA NAKON PRIPREME I NAKON SKLADIŠTENJA

U **Tablici 11** prikazana je polimerna boja i indeks posmeđivanja hidrogelova nakon pripreme, dok su rezultati skladištenja prikazani u **Tablici 12**.

Rezultati ukazuju da je najviša vrijednost polimerne boje nakon pripreme utvrđena za hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (32,79%), zatim hidrogel bez dodataka (31,57%), hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (30,03%), hidrogel s 0,1% pululana (28,35%), a za hidrogel s 0,2% pululana najmanja (27,61%).

Nakon 6 mjeseci skladištenja, polimerna boja raste te najveću vrijednost ima hidrogel bez dodataka (70,10%), zatim hidrogel s 0,1% pululana (67,83%), uzorak hidrogela s 0,2% pululana (66,98%), hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (57,24%), a najmanju vrijednost imao je hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (57,24%).

Indeks posmeđivanja nakon pripreme uzoraka slijedi niz: istu vrijednost imali su hidrogela bez dodataka i hidrogela s 0,2% pululana (0,43), zatim hidrogel s 0,1% pululana (0,41), hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (0,39) te hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka. Nakon 6 mjeseci skladištenja, indeks posmeđivanja raste i to najviše kod uzorka hidrogela s 0,1% pululana (0,99), zatim hidrogel bez dodataka te hidrogel s 0,2% pululana imaju jednake vrijednosti (0,97), hidrogel s 0,2% pululana i 1% protein mlijeka (0,76), te najmanju vrijednost indeksa posmeđivanja imao je uzorak hidrogela s 0,1% pululana + 1% protein mlijeka (0,73).

Tablica 11 Polimerna boja (PC) i indeks posmeđivanja (BI) hidrogelovima nakon pripreme

uzorci	PC (%)	BI
2% CMC	31,57 ± 0,22	0,43 ± 0,01
2% CMC + 0,1% P	28,35 ± 0,97	0,41 ± 0,01
2% CMC + 0,2% P	27,61 ± 0,53	0,43 ± 0,01
2% CMC + 0,1% P + 1% MP	32,79 ± 0,70	0,38 ± 0,00
2% CMC + 0,2% P + 1% MP	30,03 ± 0,33	0,39 ± 0,01

2% CMC – količina karboksimetilceluloze; 0,1 – 0,2% P – količina pululana; 1% MP – količina proteina mlijeka

Tablica 12 Polimerna boja (PC) i indeks posmeđivanja (BI) hidrogelovima nakon 6 mjeseci skladištenja

uzorci	PC (%)	BI
2% CMC	70,10 ± 0,81	0,97 ± 0,00
2% CMC + 0,1% P	67,83 ± 0,50	0,99 ± 0,00
2% CMC + 0,2% P	66,98 ± 0,07	0,97 ± 0,01
2% CMC + 0,1% P + 1% MP	53,99 ± 0,55	0,73 ± 0,03
2% CMC + 0,2% P + 1% MP	57,24 ± 0,30	0,76 ± 0,00

2% CMC – količina karboksimetilceluloze; 0,1 – 0,2% P – količina pululana; 1% MP – količina proteina mlijeka

4.5. PARAMETRI BOJE SOKA KUPINE I HIDROGELOVA NAKON PRIPREME I NAKON SKLADIŠTENJA

U **Tablicama 13 i 14** prikazani su rezultati boje soka kupine i hidrogelova nakon pripreme, dok su u **Tablicama 15 i 16** prikazani rezultati boje hidrogelova nakon 6 mjeseci skladištenja. Pomoću L^* vrijednosti određuje se je li predmet taman ili svijetao, svi uzroci nakon pripreme imaju nisku L^* vrijednost što ukazuje na to da su relativno tamni, najtamniji je hidrogel s 0,2% pululana (20,69), a najsvjetliji je hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (29,68). Tijekom skladištenja došlo je do povećanja L^* vrijednosti, što znači da su svi uzorci posvijetlili. Najveću L^* vrijednost nakon 6 mjeseci skladištenja imali su hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka i hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (oko 31), a preostali hidrogelovi su imali L^* vrijednost oko 22.

Pomoću a^* vrijednosti izražava se crvena boja te su uzorci nakon pripreme imali vrijednosti: najmanje izraženu crvenu boju imao je hidrogel s 0,1% pululana (3,24), dok je najveći intenzitet crvene boje imao uzorak hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (15,15). Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja a^* vrijednosti, odnosno do gubitka intenziteta crvene boje tako da jesu najmanje izraženu crvenu boju imali hidrogel bez dodatka, hidrogel s 0,1% pululana i hidrogel s 0,2% pululana (oko 2,7), dok su najveći intenzitet crvene boje imali hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka i hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (oko 10,2).

Pomoću b^* vrijednosti definiramo žutu boju, te su svi uzorci imali pozitivnu vrijednost. Nakon pripreme najveći intenzitet žute imao je hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (4,50), najmanji intenzitet žute imali su hidrogelovi s pululanom (1,56). Tijekom skladištenja intenzitet žute se povećava, to jest vrijednost b^* raste te nakon skladištenja najveću vrijednost ima hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (5,31), dok najmanju vrijednost ima uzorak hidrogela s 0,1% pululana (2,38).

Na osnovi L^* , a^* i b^* izračunava se promjena boje ΔE nakon pripreme i nakon skladištenja. Nakon pripreme ukupna promjena boje se računala u odnosu na početni sok kupine od kojeg su pripremljeni uzorci. Najveća promjena boje uočena je kod hidrogela s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (14,79), zatim hidrogela s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (14,17), manje promjene boje imali su uzorci hidrogela bez dodatka (0,61), hidrogela s 0,1% pululana (0,59),

dok je najmanju promjenu boje imao hidrogel s 0,2% pululana (0,48). Tijekom skladištenja također je došlo do promjene ukupne promjene boje. Najveća ukupna promjena boje utvrđena je kod hidrogela s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (5,30), zatim hidrogela s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (4,78), hidrogela bez dodataka (1,95), hidrogel s 0,2% pululana (1,61), te najmanju ukupnu promjenu boje ima uzorak hidrogela s 0,1% pululana (1,49).

Tablica 13 Parametri boje (L^* , a^* , b^*) soka kupine i hidrogelova nakon pripreme

uzorci	L^*	a^*	b^*	ΔE
Sok kupine	20,75 ± 0,01 ^c	3,64 ± 0,05 ^c	2,00 ± 0,01 ^c	
2% CMC	21,00 ± 0,01 ^b	4,18 ± 0,04 ^d	1,90 ± 0,02 ^b	0,61
2% CMC + 0,1% P	20,72 ± 0,01 ^b	3,24 ± 0,00 ^a	1,56 ± 0,01 ^a	0,59
2% CMC + 0,2% P	20,69 ± 0,01 ^a	3,39 ± 0,09 ^b	1,59 ± 0,03 ^a	0,48
2% CMC + 0,1% P + 1% MP	28,93 ± 0,01 ^e	14,98 ± 0,04 ^e	4,26 ± 0,01 ^d	14,17
2% CMC + 0,2% P + 1% MP	29,68 ± 0,00 ^f	15,15 ± 0,01 ^f	4,50 ± 0,01 ^e	14,79

2% CMC – količina karboksimetilceluloze; 0,1 – 0,2% P – količina pululana; 1% MP – količina % proteina mlijeka; vrijednosti označene različitim slovima u istoj koloni su statistički različite.

Tablica 14 Parametri boje ($^{\circ}h$, C^*) soka kupine i hidrogelova nakon pripreme

uzorci	$^{\circ}h$	C^*
Sok kupine	28,78 ± 0,40 ^d	4,15 ± 0,04 ^c
2% CMC	24,45 ± 0,34 ^b	4,59 ± 0,03 ^d
2% CMC + 0,1% P	25,73 ± 0,21 ^c	3,60 ± 0,01 ^a
2% CMC + 0,2% P	25,20 ± 1,06 ^{b,c}	3,75 ± 0,06 ^b
2% CMC + 0,1% P + 1% MP	15,86 ± 0,07 ^a	15,57 ± 0,03 ^e
2% CMC + 0,2% P + 1% MP	16,54 ± 0,03 ^a	15,81 ± 0,01 ^f

2% CMC – količina karboksimetilceluloze; 0,1 – 0,2% P – količina pululana; 1% MP – količina % proteina mlijeka; vrijednosti označene različitim slovima u istoj koloni su statistički različite.

Tablica 15 Parametri boje (L^* , a^* , b^*) hidrogelova nakon 6 mjeseca skladištenja

uzorci	L^*	a^*	b^*	ΔE
2% CMC	$22,08 \pm 0,01^a$	$2,69 \pm 0,04^a$	$2,55 \pm 0,02^a$	1,95
2% CMC + 0,1% P	$21,84 \pm 0,01^a$	$2,70 \pm 0,04^a$	$2,38 \pm 0,04^a$	1,49
2% CMC + 0,2% P	$21,85 \pm 0,01^a$	$2,67 \pm 0,02^a$	$2,44 \pm 0,01^a$	1,61
2% CMC + 0,1% P + 1% MP	$31,15 \pm 0,01^b$	$10,21 \pm 0,05^b$	$4,93 \pm 0,03^b$	5,30
2% CMC + 0,2% P + 1% MP	$30,96 \pm 0,00^b$	$10,61 \pm 0,03^b$	$5,31 \pm 0,02^b$	4,78

2% CMC – količina karboksimetilceluloze; 0,1 – 0,2% P – količina pululana; 1% MP – količina % proteina mlijeka; ΔE određeno u usporedbi s gelovima nakon pripreme; vrijednosti označene različitim slovima u istoj koloni su statistički različite.

Tablica 16 Parametri boje (L^* , a^* , b^*) hidrogelova nakon 6 mjeseca skladištenja

uzorci	$^{\circ}h$	C^*
2% CMC	$43,39 \pm 0,31^c$	$3,71 \pm 0,04^a$
2% CMC + 0,1% P	$41,42 \pm 0,77^b$	$3,60 \pm 0,01^a$
2% CMC + 0,2% P	$42,46 \pm 0,24^{b,c}$	$3,62 \pm 0,02^a$
2% CMC + 0,1% P + 1% MP	$25,79 \pm 0,20^a$	$11,35 \pm 0,04^b$
2% CMC + 0,2% P + 1% MP	$26,55 \pm 0,12^a$	$11,86 \pm 0,02^b$

2% CMC – količina karboksimetilceluloze; 0,1 – 0,2% P – količina pululana; 1% MP – količina % proteina mlijeka; ΔE određeno u usporedbi s gelovima nakon pripreme; vrijednosti označene različitim slovima u istoj koloni su statistički različite.

Ton boje ($^{\circ}h$) najveći je kod soka kupine (28,78), a kod hidrogelova najveću vrijednost imali su hidrogel s 0,1% pululana (25,73), hidrogel s 0,2% pululana (25,20), hidrogela bez dodataka (24,45), dok nešto nižu vrijednost imaju uzorci hidrogela s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (16,54) te hidrogela s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (15,86). Tijekom skladištenja dolazi do rasta vrijednosti tona boje, tako da je najveću vrijednost imao hidrogel bez dodataka (43,39), zatim hidrogel s 0,2% pululana (42,46), hidrogel s 0,1% pululana (41,42), dok su nešto manje vrijednosti imali hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (26,55) i hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (25,79).

Zasićenje, odnosno C* vrijednost nakon pripreme uzoraka slijedi niz: najveću C* vrijednost imao je hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (15,81), zatim hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (15,57), hidrogel bez dodataka (4,59), hidrogel s 0,2% pululana (3,75), te hidrogel s 0,1% pululana (3,60). Tijekom skladištenja došlo je do gubitka zasićenja, odnosno smanjena C* vrijednosti kod svih uzoraka. Najveću C* vrijednost nakon 6 mjeseci skladištenja imao je hidrogel s 0,2% pululana + 1% proteina mlijeka (11,86), zatim hidrogel s 0,1% pululana + 1% proteina mlijeka (11,35), dok nižu vrijednost imaju hidrogel bez dodataka (3,71), hidrogel s 0,2% pululana (3,62) te hidrogel s 0,1% pululana (3,60).

5. ZAKLJUČCI

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

1. Dodatak pululana i proteina mlijeka u hidrogelove na bazi karboksimetilceluloze i soka kupine imao je utjecaj na udio polifenola i antocijana.
2. Nakon pripreme najveći udio proantocijanidina utvrđen je u hidrogelu bez dodataka pululana i proteina mlijeka, a tijekom skladištenja došlo je do degradacije navedenih spojeva.
3. Nakon pripreme najveći udio monomernih antocijana utvrđen je u hidrogelovima s dodatkom pululana i proteina mlijeka, te su isti uzroci imali i najveći udio ovih spojeva nakon skladištenja.
4. Najveći udio fenola utvrđen HPLC-om utvrđen je u hidrogelovima s dodatkom pululana i proteina mlijeka, te su isti uzroci imali i najveći udio ovih spojeva nakon skladištenja.
5. Nakon pripreme, u uzorcima su utvrđeni cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-O-dioksalilglukozid. Tijekom skladištenja došlo je do potpunog gubitka cijanidin-3-O-dioksalilglukozid u hidrogelovima.
6. Antioksidacijska aktivnost određena je FRAP, CUPRAC, DPPH i ABTS metodama. Nakon pripreme najveću antioksidacijsku aktivnost izmjerenu navedenim metodama imao je hidrogel bez dodataka.
7. Tijekom skladištenja osim što je utvrđen gubitak fenola utvrđeno je povećanje indeksa posmeđivanja i polimerne boje.
8. Dodatak pululana i proteina mlijeka utjecao je i na parametre boje. Najveća promjena ukupne boje nakon pripreme (u odnosu na sok kupine) utvrđena je u hidrogelovima s dodatkom pululana i proteina mlijeka.

6. LITERATURA

- Ali A, Ahmed S: Recent Advances in Edible Polymer Based Hydrogels as a sustainable alternative to conventional Polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66:6940–6987, 2018. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b01052> [7.9.2020.]
- Amidžić Klarić D, Klarić I, Velić D, Velić N, Marček T: Evaluation of quercetin content, colour and selected physico-chemical quality parameters of Croatian blackberry wines. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 67(1):75–83, 2017.
- Bender H, Lehman J, Wallenfels K: Pullulan, an extracellular glucan from *Pullularia pullulans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 36:310–317, 1959.
- Betz M, Steiner B, Schantz M, Oidtmann J, Mäder K, Richling E, Kulozik U: Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. *Food Research International* 47:51–57, 2012.
- Bharskar, G: A review on hydrogel. *World Journal of Pharmaceutical Sciences* 9:1288–1298, 2020.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28:25–30, 1995.
- Cheng K, Demirci A, Catchmark JM. Pullulan: biosynthesis, production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92:29, 2011.
- Chi Z, Wang F, Chi Z, Yue L, Liu G, Zhang T: Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82:793–804, 2009.
- Chirani N, Yahia L, Gritsch L, Motta F, Chirani S, Fare S: History and Applications of Hydrogel. *Journal of Biomedical Science* 4:13, 2015. <https://www.itmedicalteam.pl/articles/history-and-applications-of-hydrogels-106819.html> [7.9.2022.]
- Contreras-Lopez E, Castañeda-Ovando A, González-Olivares LG, Añorve-Morga J, Jaimez-Ordaz J: Effect of Light on Stability of Anthocyanins in Ethanollic Extracts of *Rubus fruticosus*. *Food and Nutrition Sciences* 5:488-494, 2014.
- Cooke WB: An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. *Mycopathologia et mycologia applicata* 12:1–45. 1959.

- Costa CT, Nelson BC, Margoli SA, Horton D: Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography Analysis* 799:321-327, 1998.
- Dahlman O, Jacobs A, Sjoberg J: Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps. *Cellulose* 10:325-334, 2010.
- De Man JM: Anthocyanins and flavonoids. Carbohydrates. U *Principles of food chemistry*, Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, 1999.
- Dewic PM: *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. 2:121-132. John Wiley & Sons, West Sussex, Engleska, 2007.
- Einbond LS, Reynertson KA, Xiao-DongLuo, Basile MJ, Kennelly EJ: Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry* 84:23–28, 2004.
- European Parliament and Council: Directive (89/107/EEC) on the approximation of the laws of the Member States concerning food additives authorized fouse in foodstuffs intended for human consumption of 21 December 1988, OJ L 40, 11.2.1989.
- Filjak D: Kazeinsko ljepilo – novi proizvod Zagrebačke mljekare. *Mljekarstvo* 12:14-15, 1962.
- Francis J: Food colorants: anthocyanins. *Food Science and nutrition* 28:273-314, 1989.
- Gokce G, Haznedaroglu, M. Z.: Evaluation of antidiabetic, antioxidant and vasoprotective effects of Posidonia oceanica extract. *Journal of Ethnopharmacology* 115(1,4):122-130, 2008.
- Gómez M, Ronda F, Caballero PA, Blanco CA, Rosell CM, Functionality of different hydrocolloids on the quality and shelf-life of yellow layer cakes. *Food Hydrocolloids* 21:167–173, 2007.
- Grotewald E: *The Stereochemistry of Flavonoids*. Springer, 2006.
- Gulrez KH, Al-Assaf S, O Philips G: Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. In Progress in Molecular and Environmental Bioengineering—From Analysis and Modeling to Technology Applications. *IntechOpen*, London, 2011.
- Harborne JB, Baxter H: *Handbook of natural flavonoids*, vol 2. John Wiley & Sons, Chichester, Engleska, 1999.
- Herceg Z, Režek A: Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. *Mljekarstvo* 56:379-396, 2006.
<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2F>
-

-
- [figure%2FThe-CIELAB-color-space-diagram-The-CIELAB-or-CIE-L-a-b-color-system-represents_fig1_338303610&psig=AOvVaw1sG_8K-Pe8WDLO8XJASZS7&ust=1631036977013000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRxqFwoTCNjStrD06vICFQAAAAAdAAAAABAD](#) [6.9.2021.]
- Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidović-Kosanović M, Lukačević I: Antioksidacijska aktivnost polifenola iz borovnice i jagode. *Pomologija Croatica* 14(1):13 - 26, 2008.
- Jones D: *Injectable fillers: Principles and Practice*, Wiley – Blackwell, Oxford, 2010.
- Kähkönen MP, Heinämäki J, Ollilainen V, Heinonen M: Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:1403-1411, 2003.
- Kandemir N, Yemenicioglu A, Mecitoglu C, Elmaci ZS, Arslanoglu A, Goksungur Y, Baysal T.: Production of antimicrobial films by incorporation of partially purified lysozyme into biodegradable films of crude exopolysaccharides obtained from *Aureobasidium pullulans* fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 43:343–350, 2005.
- Kaume L, Howard LR, Devareddy L: The Blackberry Fruit: A Review on its composition and chemistry. Metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 60:5716-5727, 2012.
- Kaur C, Kapoor HC: Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology* 36: 703-725, 2001.
- Keller RB: *Flavonoidas, Byosintesis, biological effects and Dethary sources*. Nova Science Publishers, New York, 2009.
- Kim JH, Kim MR, Lee JH, Lee JW, Kim SK: Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* using glucosamine. *Biotechnology Letters* 22:987–990, 2000.
- Klein M, Poverenov E: Natural biopolymer-based hydrogels for use in food and agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100:2337–2347, 2020. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.10274> [7.9.2022.]
- Kopjar M, Ivić I, Vukoja J, Šimunović J, Pichler A: Retention of linalool and eugenol in hydrogels. *Journal of Food Science and Technology* 55:1416-1425, 2020. <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.14344> [7.9.2022.]
- Kukrić, Z, Jašić, M., Samelak, I.: *Biohemija hrane – biološki aktivne komponente*. Tehnološki fakultet Banja Luka, 2013.
-

- Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Mattila PH, González-Paramás AM, Törrönen AR: Distribution and content of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4477-4486, 2004.
- Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR: Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6178-6187, 2004.
- Madi NS, Harvey LM, Mehlert A, McNeil B: Synthesis of two distinct exopolysaccharide fractions by cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers* 32:307–314, 1997.
- Mao L, Lu Y, Cui M, Miao S, Gao Y: Design of gel structures in water and oil phases for improved delivery of bioactive food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60:1651–1666, 2020.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1048398.2019.1587737> [7.9.2020.]
- Marinova EM, Yanishlieva NV: Effect of temperature on the antioxidative action of inhibitors in lipid autoxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60:313-318, 1992.
- Markeš M: O opremi laboratorija u mljekari, *Stručni rad*, Hrvatska mljekarska udruga, *Mljekarstvo* 2:3, 1952.
- Morreale F, Garzón R, Rosell CR: Understanding the role of hydrocolloids viscosity and hydration in developing gluten-free bread. A study with hydroxypropylmethylcellulose. *Food Hydrocolloids* 77:629–635, 2018.
- Mratinić E: *Kupina*. Partenon, Beograd, 2015.
- MZSS, Ministarstvo Zdravstva i Socijalne Skrbi RH: *Pravilnik o prehranbenim aditivima*, Narodne novine 81/08, 2010.
- Narain R: *Engineered carbohydrate-based materials for biomedical applications: Polymers, Surfaces, Dendrimers, Nanoparticles and Hydrogels*. John Wiley and Sons, Edmonton, 2011.
- Oku T, Yamada K, Hosoya N.: Effect of pullulan and cellulose on the gastrointestinal tract of rats. *Nutrition & Food Science*, 32:235–241, 1979.
- Pachau L, Probin Kumar Roy L, Zothantluanga JH, Ray S, Das S: Encapsulation of Bioactive Compound and Its Therapeutic Potential. U *Bioactive Natural Products for*

- Pharmaceutical Applications, Advanced Structured Materials* 140:687–714, Springer Nature, Cham, Švicarska, 2021.
- Phillips GO, Williams PA: *Handbook of hydrocolloids*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, Engleska, 2000.
- Rein MJ: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *Disertacija*. Sveučilište Helsinki, Helsinki, 2005.
- Repajić M, Markov K, Frece J, Vujević P, Ćurić D, Levaj B: Studija kvalitete plodova više vrsta jagodastog voća tijekom skladištenja. *Glasnik Zaštite Bilja* 42(4):68-81, 2019.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G: Antioxidant properties of phenolic compounds, 1997.
- Robbins RJ: Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:2866-2887, 2003.
- Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D: Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry* 54(25):9329-9339, 2006.
- Seo H, Son C, Chung C, Jung D, Kim S, Gross RA, Kaplan DL, Lee J: Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. *Bioresource Technology* 95:293–299, 2004.
- Shivashankara KS, Acharya SN: Bioavailability of Dietray Polyphenols and the Cardiovascular Diseases. *The Open Nutraceuticals Journal* 3:227-241, 2010.
- Shu Liu L, Kost J, Yan F, Spiro R: Hydrogels from Biopolymer Hybrid for Biomedical, Food, and Functional Food Applications. *Polymers* 4:997, 2012.
- Šćurić M: Proizvodnja sira feta. *Mljekarstvo* 41:329-333, 1991.
- Šubarić D, Kopjar M, Ačkar Đ: Polifenoli i zdravlje. U *Zbornik radova i sažetaka sa međunarodnog seminara „Dodaci prehrani u zdravlju i bolesti“*, str 32-39, Tuzla, 2010.
- Šumić Z: Kazein. *Seminarski rad*, Novi Sad, 2008.
- Talón E, Trifkovic KT, Nedovic VA, Bugarski BM, Vargas M, Chiralt A, Gonzalez-Martinez C: Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. *Carbohydrate Polymers* 157:1153–1161, 2017.

- Tijssen CJ, Kolk HJ, Stamhuis EJ, Beenackers AACM.: An experimental study on the carboxymethylation of granular potato starch in non-aqueous media, *Carbohydrate Polymers* 45:219–226. 2001.
- Volčević B: *Jagoda, malina, kupina*. Neron, Bjelovar, 2005.
- Wang D, Chen F, Wei G, Jiang M, Dong M.: The mechanism of improved pullulan production by nitrogen limitation in batch culture of *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers* 127:325-331, 2015.
- WEB 1: <https://i2.wp.com/www.satvai.com/wp-content/uploads/2020/02/download-3.jpg?fit=225%2C225&ssl=1> [6.9.2021.]
- WEB 2: <https://en.wikipedia.org/wiki/Blackberry> [6.9.2021.]
- WEB 3: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fbs.wikipedia.org%2Fwiki%2FDatoteka%3AFlavylium_cation.svg&psig=AOvVaw3GcrYilbPssP-naTj3Ys9S&ust=1628011842064000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRqxqFwoTC KDHpvDukvICFQAAAAAdAAAAABAD [6.9.2021.]
- WEB 4: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Frepozitorij.ptfos.hr%2Fislandora%2Fobject%2Fptfos%253A645%2Fdatastream%2FPDF%2Fview&psig=AOvVaw3WF0b0V87gwxprfHiGmF2C&ust=1630177924850000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRqxqFwoTCLCy3JT00fICFQAAAAAdAAAAABAD> [6.9.2021.]
- WEB 5: <https://europepmc.org/articles/PMC6270361/bin/molecules-18-02328-g001.jpg> [9.8.2022.]
- WEB 6: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Frepozitorij.kemija.unios.hr%2Fislandora%2Fobject%2Fkemos%253A178%2Fdatastream%2FPDF%2Fview&psig=AOvVaw3kNy9hsa5L3IZ36lw0vQz9&ust=1630177889508000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRqxqFwoTCJC3gIX00fICFQAAAAAdAAAAABAD> [6.9.2021.]
- WEB 7: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2Fstructural-unit-of-carboxymethyl-cellulose-CMC_fig1_265467350&psig=AOvVaw34UQHqQmSQRxJ9lee6xPhi&ust=16301780917

-
- [35000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRxqFwoTCMDx6-T00fICFQAAAAAdAAAAABAD](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FChemical-structure-of-pullulan_fig1_290532201&psig=AOvVaw2NGCBv1thYhIxp0u5rNygi&ust=1630178142676000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRxqFwoTCID-gf_00fICFQAAAAAdAAAAABAD) [6.9.2021.]
- WEB 8:
- [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FChemical-structure-of-pullulan_fig1_290532201&psig=AOvVaw2NGCBv1thYhIxp0u5rNygi&ust=1630178142676000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRxqFwoTCID-gf_00fICFQAAAAAdAAAAABAD](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FThe-CIELAB-color-space-diagram-The-CIELAB-or-CIE-L-a-b-color-system-represents_fig1_338303610&psig=AOvVaw1sG_8K-Pe8WDLO8XJASZS7&ust=1631036977013000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRxqFwoTCNjStrD06vICFQAAAAAdAAAAABAD) [6.9.2021.]
- WEB 9:
- https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FThe-CIELAB-color-space-diagram-The-CIELAB-or-CIE-L-a-b-color-system-represents_fig1_338303610&psig=AOvVaw1sG_8K-Pe8WDLO8XJASZS7&ust=1631036977013000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRxqFwoTCNjStrD06vICFQAAAAAdAAAAABAD [6.9.2021.]
- Yanishlieva-Maslarova NV, Heinonen IM: Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. U *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing, 2001.
- Yuen S.: Pullulan and its applications. *Process Biochemistry* 9:7–9, 1974.
- Zorzi M, Gai F, Medana C, Aigotti R, Morello S, Peiretti PG: Bioactive compounds and antioxidant capacity of small berries. *Foods* 9(5):623, 2020.