

Utjecaj dodatka disaharida na udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost gelova na bazi karboksimetil celuloze i soka aronije

Balog, Željka

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:782917>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Željka Balog

**UTJECAJ DODATKA DISAHARIDA NA UDIO POLIFENOLA I
ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST GELOVA NA BAZI KARBOKSIMETIL
CELULOZE I SOKA ARONIJE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2023.

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

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Razvoj proizvoda u prehrambenoj industriji**Tema rada** je prihvaćena na 12. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 27. svibnja 2022.**Mentor:** prof. dr. sc. *Mirela Kopjar***Pomoć pri izradi:** *Ina Ćorković*, mag. ing. aliment.**Utjecaj dodatka disaharida na udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost gelova na bazi karboksimetil celuloze i soka aronije***Željka Balog*, 0113144384**Sažetak:**

Cilj rada bio je ispitati utjecaj dodatka disaharida na udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost gelova na bazi karboksimetil celuloze i soka aronije. Kontrolni uzorak je bio gel bez dodatka disaharida. Gelovi s disaharidima pripremljeni su s dodatkom saharoze ili trehaloze u količini od 30 %, 40 % ili 50 %. Uzorci su analizirani nakon pripreme i nakon 3 mjeseca skladištenja, a određeni su ukupni polifenoli, proantocijanidini, monomerni antocijani, koncentracije pojedinačnih polifenola, antioksidacijska aktivnost te parametri boje. Nakon provedenih analiza utvrđeno je da kontrolni uzorak odnosno gel s dodatkom karboksimetil celuloze ima najveći udio polifenola. Dodatak disaharida uzrokovao je smanjenje polifenola. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti pratile su udio polifenola. Usporedbom utjecaja tipa disaharida i količine dodanih disaharida utvrđeno je da je gel s dodatkom 30 % trehaloze imao najveći udio polifenola. Trend je zadržan i nakon skladištenja gelova.

Ključne riječi: *aronija, gelovi, karboksimetil celuloza, disaharidi, polifenoli***Rad sadrži:** 47 stranica
13 slika
8 tablica
0 priloga
45 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

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

Datum obrane: 13. srpanj 2023.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Graduate program Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Product development in the food industry

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

Mentor: *Mirela Kopjar*, PhD, prof.

Technical assistance: *Ina Ćorković*, mag. ing. aliment.

Influence of the Addition of Disaccharides on Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Gels Based on Carboxymethyl Cellulose and Chokeberry Juice

Željka Balog, 0113144384

Summary:

The aim of this study was to investigate impact of disaccharides addition on content of polyphenols and antioxidant activity of gels prepared on the basis of carboxymethyl cellulose and chokeberry juice. Control sample was gel without addition of disaccharides. Gels with the addition of disaccharides were prepared with the addition of sucrose or trehalose in the amount of 30 %, 40 % or 50 %. Samples were analyzed after preparation and 3 months of storage for the content of polyphenols, proanthocyanidins, monomeric anthocyanins, concentration of individual polyphenols and color parameters. Results of analysis showed that control sample i.e. sample without addition of disaccharides had the highest amount of polyphenols. Addition of disaccharides caused decrease of amount of polyphenols. Values of antioxidant activity followed amount of polyphenols. Comparing effect of type of disaccharides and their amount it was established that gel with the addition of 30 % of trehalose had the highest amount of polyphenols. The same trend as after preparation was retained after storage of samples.

Key words: chokeberry, gels, carboxymethyl cellulose, disaccharides, polyphenols

Thesis contains: 47 pages
13 figures
8 tables
0 supplements
45 references

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: July 13, 2023

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

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Mireli Kopjar na pomoći, susretljivosti i razumijevanju prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem svim profesorima i ostalom osoblju na posvećenosti, vremenu, trudu i radu kojeg su uložili tijekom svih ovih godina studiranja.

Posebno hvala mojim roditeljima i sestri, zaručniku Jakovu i prijateljici Dariji te svima koji su bili uz mene i pružali neizmjernu ljubav i podršku.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. ARONIJA	4
2.1.1. Kemijski sastav aronije	5
2.1.2. Učinci na zdravlje	7
2.2. POLIFENOLI	8
2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST	13
2.4. KARBOKSIMETIL CELULOZA	15
2.5. DISAHARIDI	16
2.5.1. Saharaza	17
2.5.2. Trehaloza	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. ZADATAK	21
3.2. MATERIJALI I METODE	22
3.2.1. Materijali	22
3.2.2. Priprema uzorka	23
3.2.3. Metode	23
3.2.3.1. Ekstrakcija uzorka	23
3.2.3.2. Određivanje ukupnih polifenola	24
3.2.3.3. Određivanje proantocijanidina	24
3.2.3.4. Određivanje monomernih antocijana	24
3.2.3.5. Određivanje koncentracije pojedinačnih polifenola.....	25
3.2.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	26
3.2.3.7. Određivanje parametara boje	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. UKUPNI POLIFENOLI, PROANTOCIJANIDINI I ANTOCIJANI	31
4.2. UDIO POJEDINAČNIH POLIFENOLA	34

4.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST	37
4.4. PARAMETRI BOJE.....	39
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERATURA	43

Popis oznaka, kratica i simbola

DNK	deoksiribonukleinska kiselina
CMC	karboksimetil celuloza
S	saharoza
T	trehaloza
SET	(engl. <i>Single Electron Transfer</i>)
HAT	(engl. <i>Hydrogen Atom Transfer</i>)
ORAC	(engl. <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)
FRAP	(engl. <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)
CUPRAC	(engl. <i>Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity</i>)
ABTS	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
TEAC	(engl. <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

1. UVOD

1. Uvod

Biološki aktivne komponente u hrani najčešće su definirane kao prirodni sastojci hrane koji imaju brojne pozitivne učinke na zdravlje čovjeka. Zahvaljujući njihovim funkcionalnim svojstvima u organizmu, djeluju kao pomoćna sredstva u prevenciji i liječenju bolesti. Zaštita organizma od oksidacijskog stresa osobito je važna za zdravlje i prevenciju sve češćih stanja kao što su bolesti srca i krvožilnog sustava, dijabetes te razne vrste karcinoma (Jašić, 2010). Najčešći izvor antioksidansa, odnosno polifenola općenito je bobičasto voće koje je posebno primamljivo zbog okusa, mirisa te boje, a osim toga sadrži i znatnu količinu vlakana, vitamina i minerala. Najpoznatije *super voće* današnjice je aronija koja svoja snažna antioksidacijska svojstva posjeduje zahvaljujući izuzetno visokom sadržaju polifenola. Od polifenola najviše se ističu antocijanini, fenolne kiseline te proantocijanidini u količini od čak 66 % od ukupnog sadržaja polifenola (Oszmianski i Wojdylo, 2005). Osim antioksidacijske aktivnosti, komponente aronije pružaju podršku imunološkom sustavu, detoksikaciju organizma, djeluje antimutageno te smanjuje razinu kolesterola. Konzerviranje ovakvog voća uglavnom se odnosi na proizvodnju džema, soka te alkoholnih pića poput likera i vina. Procesni parametri i uvjeti skladištenja uvelike utječu na sastav prerađenog voća i diktiraju nutritivan profil proizvoda te njegovu kvalitetu. Osim nutritivne vrijednosti, kvalitetu hrane definiraju i čimbenici senzorske prihvatljivosti hrane – izgled, aroma i tekstura (Kopjar, 2007). Neke od uloga karboksimetil celuloze su stabilizacija proizvoda, poboljšanje organoleptičkih svojstava te ugušćivanje. Pored zaslađivanja, disaharidi poput saharoze i trehaloze važni su i radi konzerviranja mnogih prehrambenih proizvoda (Pichler, 2011). Saharozu je najrasprostranjeniji disaharid sastavljen od jedne molekule glukoze i jedne molekule fruktoze, dok trehalozu čine dvije molekule glukoze. Oba šećera predstavljaju nereducirajuće šećere, iako je utvrđeno da je trehaloza stabilnija te da ima manju slatkoću od saharoze (Jovanović, 2012).

Cilj ovog rada bio je pripremiti gelove na bazi karboksimetil celuloze i soka aronije bez i s dodatkom disaharida. Od disaharida koristili su se saharozu i trehalozu u količinama od 30 %, 40 % i 50 %. Nakon pripreme i skladištenja u uzorcima je određen udio polifenola, proantocijanidina, antocijana i antioksidacijska aktivnost primjenom spektrofotometrijskih metoda (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode) te individualni fenoli primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Također su gelovima određeni i parametri boje.

2. TEORIJSKI DIO

2. Teorijski dio

2.1. ARONIJA

Jedna od najpoznatijih listopadnih voćnih vrsta koja je u posljednjem desetljeću postala izuzetno tražena i cijenjena je crna aronija (*Aronia melanocarpa*), prikazana na **Slici 1**. Pripada porodici ruža (*Rosaceae*), podrijetlo vuče iz Sjeverne Amerike, raste u obliku grma, a visina može iznositi čak do 6 m, iako se najčešće oblikuje na visinu 1,5 - 2,5 m. Obilježavaju je listovi tamnozeleno boje ovalnog oblika te plodovi, tamnoplave bobice težine 1 – 1,5 grama oporog okusa koje sazrijevaju krajem kolovoza (Jurikova i sur., 2017). One su jedini ljekoviti i jestivi dio biljke, a nakon sazrijevanja na grmu mogu se održati još dva mjeseca. Uzgoj aronije u Europi najzastupljeniji je u Rusiji, Poljskoj, Češkoj te Slovačkoj. Poznate su tri vrste čija je osnovna razlika boja (crvene, crne i ljubičaste). S obzirom na činjenicu da crna aronija, kao i tamnocrvena (*Aronia arbutifolia*) te ljubičasta (*Aronia prunifolia*) nemaju prirodnih neprijatelja, tj. nametnika, nema potrebe za tretiranjem prskanjem i poduzimanjem kemijskih agrotehničkih mjera (Web 1). Ovo bobičasto voće prisutno je u raznim oblicima. Naime, osim kao svježju, sušenu i zamrznutu, može se preraditi i konzumirati kao džem, sok, sirup, kompot, vino te liker. Uz to, poznata je njena primjena kao prirodno bojilo za hranu te uloga ukrasne biljke. Njena se ljekovitost pripisuje činjenici da pripada kulturama s visokim sadržajem biljnih fenola te ostalih biološki aktivnih spojeva koji će biti opisani u ovom radu.



Slika 1 Zreli plodovi aronije (Web 2)

2. Teorijski dio

2.1.1. Kemijski sastav aronije

Aronija je izvor brojnih bioaktivnih spojeva širokog spektra djelovanja koji imaju pozitivan učinak na zdravlje čovjeka, a njen sastav i zdravstveni značaj ovise o mnogim čimbenicima kao što su sorta, zrelost te okolišni i klimatski uvjeti (Gramza-Michalowska i Sidor, 2019). Kemijski sastav aronije prikazan je **Tablicom 1**.

Tablica 1 Kemijski sastav ploda i svježe cijeđenog soka aronije (Gramza-Michalowska i Sidor, 2019)

	Plod aronije (g/100 g)	Svježe cijeđeni sok aronije (g/100 g)
Suha tvar	17,9 – 26	11,1 – 17,4
Masti	0,09 – 0,17	< 0,1
Proteini	0,6 – 0,8	0,2
Ugljikohidrati	13,73 – 15,06	17,9
Saharoza	0,7	0,3
Fruktoza	2,6 – 4,7	2,2 – 3,2
Glukoza	3,6 – 5,7	2,6 – 4,3
Sorbitol	4,63 – 8,56	3,6 – 7,7
Topiva vlakna	0,81 – 1,03	-
Netopiva vlakna	4,01 – 5,25	-
Limunska kiselina	0,07 – 0,13	0,07 – 0,25
Jabučna kiselina	0,45 – 0,128	0,9 – 0,133

Količina suhe tvari u plodu aronije kreće se od 17,9 do 26 %, dok u svježe cijeđenom soku iznosi 11,1 – 17,4 %. Saharozu u bobicama aronije ima vrlo malo, dok se sadržaj glukoze i fruktoze kreće oko 2 do 6 %. Gramza-Michalowska i Sidor (2019) također navode kako su od aminokiselina detektirani arginin, tirozin, histidin, lizin, cistein, alanin, asparagin, serin, glutaminska kiselina i treonin, dok je ukupna količina proteina u plodu aronije 3,7 g/100 g suhe tvari. Više od 60 % prehrambenih vlakana aronije sastoji se od netopljive frakcije koja podrazumijeva lignin, celulozu te hemicelulozu (Gramza-Michalowska i Sidor, 2019). Bobice aronije u većoj količini nego ostalo bobičasto voće sadrže sorbitol te u malom postotku organske kiseline, uglavnom jabučnu i limunsku.

2. Teorijski dio

Sadržaj pojedinih vitamina i minerala u bobicama aronije te svježe cijeđenom soku prikazan je u **Tablici 2.**

Tablica 2 Sadržaj vitamina i minerala u plodu i svježe cijeđenom soku aronije (Zhang i sur., 2021)

	Plod aronije (mg/kg)	Svježe cijeđeni sok (g/L)
Vitamini		
C	137	0,2
K	0,242	Nepoznat podatak
B1	0,18	Nepoznat podatak
B2	0,20	0,006
B6	0,28	Nepoznat podatak
Niacin (B3)	3	Nepoznat podatak
Folat (B9)	0,03	Nepoznat podatak
Minerali		
Natrij	26	Nepoznat podatak
Kalij	2180	0,0053
Kalcij	322	0,150
Magnezij	162	0,140
Željezo	9,3	Nepoznat podatak
Cink	1,47	Nepoznat podatak

Predstavnici vitamina, esencijalnih nutrijenata, u bobicama aronije su vitamini C i B, a osim njih detektirani su i vitamin E i K te veće količine beta kriptoksantina (463 µg/100 g) i beta karotena (770 µg/100 g), odnosno provitamini vitamina A (Tanaka i sur., 2001). Mineralne tvari su, kao i vitamini, od iznimne važnosti za mnoge funkcije i biokemijske reakcije u organizmu. Udio pepela u bobicama aronije, prema autoru Tanaka (2001), kreće se između 440 mg/100 g i 580 mg/100 g, a nakon termičke obrade taj raspon iznosi od 300 do 640 mg/100 mL. Kalij i cink detektirani su u većoj količini nego u ostalom bobičastom voću. Od elemenata u tragovima, osim željeza i cinka, mogu se detektirati i selen, bakar te mangan (Pavlović i sur., 2015). Bobice aronije sadrže i triterpene – kampesterol, stigmasterol i betasitosterol te amigdalini identificirani u količini od 5,7 mg/100 g u svježe cijeđenom soku aronije. Upravo taj cijanogeni glikozid i opori tanini stvaraju karakterističan gorkasti i trpkli okus i miris na bademe (Kulling i Rawel, 2008).

2. Teorijski dio

2.1.2. Učinci na zdravlje

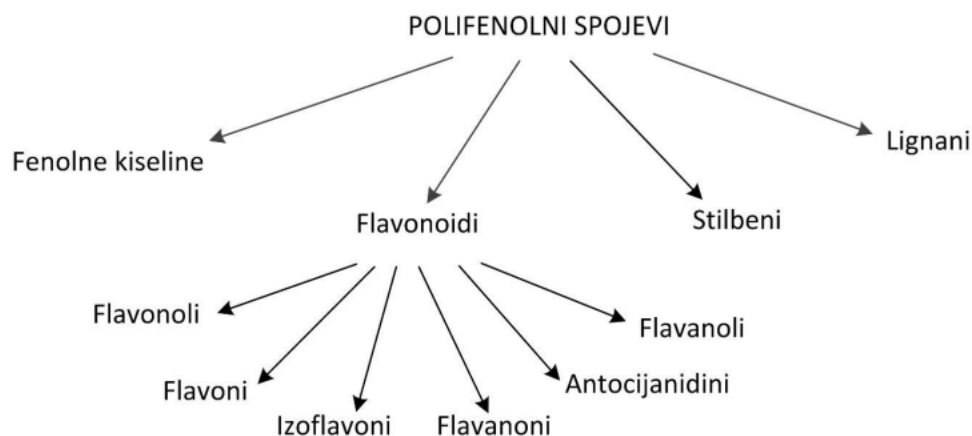
Plodovi aronije poznati su po specifičnom, izrazito bogatom sastavu koji ovom jagodičastom voću omogućava protuupalna, kardioprotektivna, antimutagena te imunostimulacijska svojstva. Najveći i najključniji doprinos aronije je obrana organizma od oksidativnog stresa zahvaljujući antioksidativnim komponentama kojima je bogata, a kemoprotektivni učinak polifenolne komponente postižu prevencijom oksidacije, zaustavljanjem staničnog ciklusa, apoptozom te promjenom u staničnoj signalizaciji (Jurikova i sur., 2017). Integracija upravo ovakvih funkcionalnih namirnica u prehranu omogućava uvijek poželjnu prevenciju raznih bolesti i stanja koji su i najveća prijetnja današnjice kada gledamo sa zdravstvene strane. Hrana se može nazvati funkcionalnom ako pored svoje osnovne nutritivne vrijednosti na pozitivan i zadovoljavajući način utječe na jednu ili više funkcija tijela smanjujući rizike razvoja pojedinih bolesti (Roberfroid, 2000). Dakle, osim zadovoljavanja gladi i žeđi te osiguranja hranjivih tvari, specifična uloga takvih namirnica je poboljšanje psihičkog i fizičkog stanja. Najpoznatiji i, nažalost, sve češći slučajevi su bolesti srca i krvožilnog sustava, a glavni rizični faktori su nedovoljna fizička aktivnost te neadekvatna prehrana u kojoj prevladavaju kalorične namirnice bogate mastima i soli, ali i konzumacija duhanskih proizvoda i alkoholnih pića. Parametri koji jasno ukazuju na veliki rizik ili već postojanje kardiovaskularnih bolesti su uglavnom povišeni krvni tlak, visoka količina lipida (kolesterola) u krvi te prekomjerna tjelesna masa, odnosno postotak masti. Konzumacijom plodova aronije i njenog soka postiže se smanjenje razine kolesterola, triglicerida i LDL kolesterola u krvi, a smanjuje se i rizik od ateroskleroze (Zhang i sur., 2021). Istraživanja ukazuju da može poboljšati i rad, funkciju i strukturu stanica endotela koje oblažu krvne žile i obavljaju neophodne funkcije (Nowak i sur., 2016). Također, snižava krvni tlak te razinu glukoze u krvi, stoga je vrlo poželjna radi prevencije ili kontrole dijabetesa. Moguće antidijabetičko djelovanje aronije može se ostvariti i mehanizmima smanjenja maltazne i invertazne aktivnosti u tankom crijevu poticanjem iskorištavanja glukoze ili pak izlučivanja inzulina te smanjenjem oksidativnog stresa (Kokotkiewicz i sur., 2010).

2. Teorijski dio

2.2. POLIFENOLI

Biološki aktivne komponente hrane su sastojci koji se u hrani nalaze u vrlo malim količinama, ali imaju izrazito povoljan utjecaj na zdravlje. Zanimljivost je da njihov pozitivan učinak ne ovisi o njihovoj količinskoj zastupljenosti, već se mjeri sposobnošću da prilikom svoje biološke aktivnosti neutraliziraju negativne utjecaje štetnih komponenti u organizmu. Međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi, porijeklu, obliku te po funkciji djelovanja na određene organe i tkiva u organizmu, a najpoznatije biološki aktivne komponente su vitamini, minerali, fenolni spojevi, flavonoidi, izoflavoni, tanini, alkaloidi i drugi (Jašić, 2010).

Polifenoli uključuju više od 8000 spojeva različite kemijske strukture te su iz tog razloga jedna od najvećih skupina spojeva u prirodi, a podjela je prikazana **Slikom 2**. Neflavonoidi su polifenoli jednostavnije građe i podrazumijevaju fenolne kiseline, lignane i stilbene, dok flavonoidi obuhvaćaju oko 5000 spojeva.



Slika 2 Podjela polifenola (Krešić, 2017)

Fenoli su organski spojevi s hidroksilnom skupinom koja je vezana izravno za aromatski, tj. benzenski prsten, a specifična svojstva koja posjeduje potječu upravo od njihova aromatskog karaktera, dok se klasificiraju prema broju atoma ugljika u strukturi (Tsao, 2010). Fenolni spojevi jedni su od najpoznatijih antioksidansa koji bitnu funkciju imaju u prevenciji, ali i liječenju kroničnih bolesti i stanja. Građa polifenola uključuje 12 - 16 fenolnih grupa s čak pet do sedam aromatskih prstenova (Jašić, 2010). Definiraju se i kao sekundarni biljni metaboliti

2. Teorijski dio

koji pružaju biljkama zaštitu od bolesti i nametnika, utječu na rast te štite stanice od nepoželjnog UV zračenja. Najznačajnija svrha je ona vezana za prehrambenu industriju, omogućavanje i diktiranje senzorskih svojstava. Daju prepoznatljivu boju, aromu i okus, gdje se posebno ističu fenolne kiseline i flavonoidi, a velik se broj nalazi u obliku glikozida. Koncentracija ukupnih polifenola u plodu aronije iznosi 7194 mg/kg (Lukačević, 2007). Spojevi koji karakteriziraju aroniju su klorogenska i neklorogenska kiselina, kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid i kvercetin-3-rutinozid iz podskupine flavonola, cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-ksilozid i cijanidin-3-glukozid iz podskupine antocijana te proantocijanidini koji pripadaju podskupini flavana. Kao što je i vidljivo u **Tablici 3**, aronija kao svježi plod sadrži najviše proantocijanidina i cijanidin-3-galaktozida.

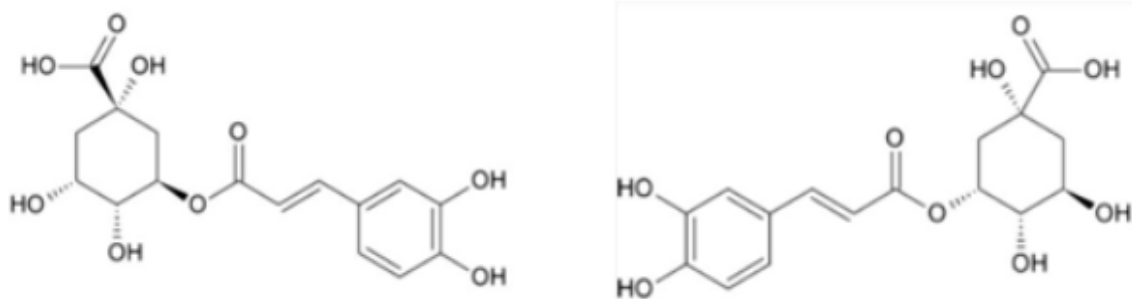
Tablica 3 Fenolne komponente u plodu aronije (Oszmianski i Wojdylo, 2005)

Skupina polifenola	Spoj	Udio (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 kvercetina (neidentificirani)	27,43
Antocijanini	Cijanidin-3-galaktozid	1282,41
	Cijanidin-3-arabinozid	581,5
	Cijanidin-3-ksilozid	52,71
	Cijanidin-3-glukozid	42,14

Fenolne kiseline su hidroksi derivati benzojeve i cimetne kiseline, organski spojevi čija benzenska jezgra ima barem jednu karboksilnu i jednu hidroksilnu skupinu. One mogu biti slobodne i esterificirane s vinskom ili kina kiselinom. Njihova antioksidacijska aktivnost proporcionalna je broju hidroksilnih skupina u molekuli. Neoklorogenska i klorogenska su najzastupljenije fenolne kiseline u aroniji, opisane kao esteri hidroksicimetnih kiselina s kina kiselinom (**Slika 3**). Neke od hidroksicimetnih kiselina su kumarinska, kafeinska te ferulična kiselina, dok hidroksibenzojeve kiseline mogu imati različitu strukturu, ovisno o hidroksilaciji

2. Teorijski dio

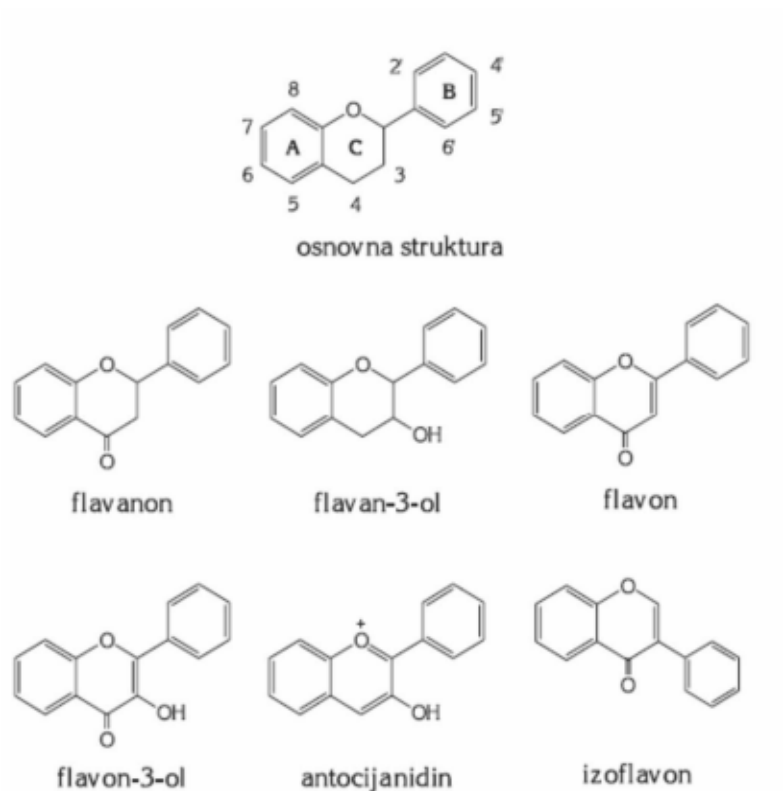
ili metilaciji na aromatskom prstenu, a najpoznatije su galna, vanilinska te salicilna kiselina (Saibabu i sur., 2015).



Slika 3 Struktura klorogenske (lijevo) i neoklorogenske kiseline (desno) (Kokotkiewicz i sur., 2010)

Posebna grupa fenolnih spojeva izdvojena zbog rasprostranjenosti te važnosti su flavonoidi, kemijski spojevi koje se nalaze u svim biljkama i njihovim dijelovima. Povrće, zeleni i crni čaj, čokolada, vino i bobičasto voće bogati su izvori ovih žutih, crvenih i ljubičastih pigmenata. Iako se neki mogu pronaći kao slobodni flavonoidi, većina ih se nalazi u obliku estera s taninskim kiselinama te u formi glikozida topljivih u vodi zbog povećane polarnosti molekule. Flavonoidnu jezgru čine tri fenolna prstena. Broj identificiranih vrsta flavonoida kreće se od 4000 do 5000, a raznolik broj skupina posljedica je različitog stupnja nezasićenosti i stupnja oksidacije C prstena (**Slika 4**) (Horvatić, 2020). Podskupine flavonoida - flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni te antocijanini, nazivaju još i biološkim modifikatorima zbog antioksidativne i protuupalne zadaće koju obavljaju. Jedan od načina zaštite nasljednog materijala stanica od utjecaja karcinogenih tvari je maskiranje mjesta vezivanja tih tvari na DNK. Pozitivno utječu na moždanu aktivnost, poboljšavaju funkciju srca i neutraliziraju slobodne radikale (Zhang i sur., 2021).

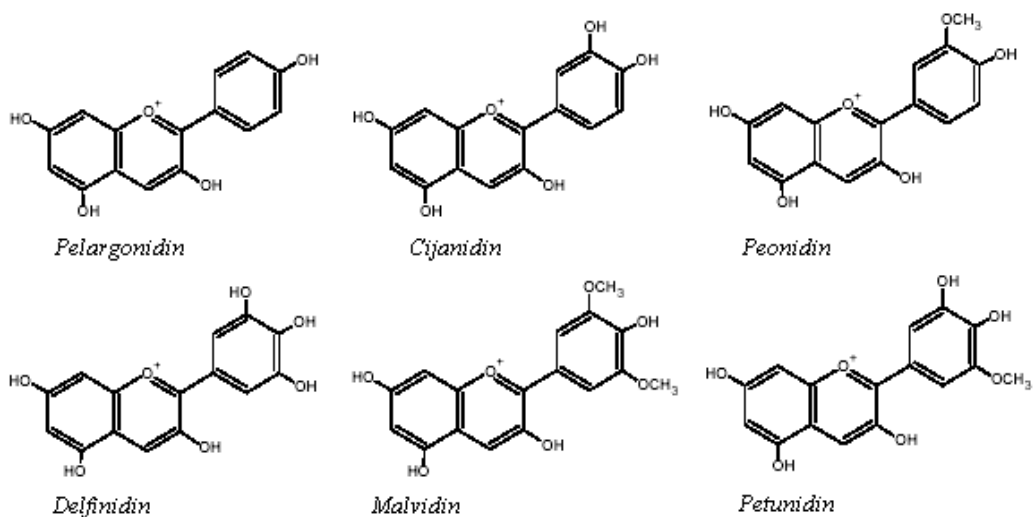
2. Teorijski dio



Slika 4 Osnovna struktura flavonoida i glavne skupine (Kazazić, 2004)

Antocijani su jedni od najznačajnijih skupina biljnih pigmenata s obzirom na to da su prisutni u velikoj većini voća i povrća, ali i cvijeća. U biljkama imaju protektivnu ulogu kada su u pitanju insekti, a s druge strane svojom bojom privlače kukce te se tako pospješuje oprašivanje i raspršivanje sjemena. Postoje purpurni, plavi te crveni antocijani i najviše ih ima u aroniji, borovnicama, brusnicama, šljivama, višnjama, grožđu i patlidžanu. Neka istraživanja navode da se njihova dnevna potreba kreće do 200 mg na dan (Ćujić i sur., 2013). Cijanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin i petunidin, prikazani na **Slici 5**, jedini su za prehrambenu industriju značajni aglikoni, a razlikuje ih broj hidroksilnih i metoksilnih skupina na B prstenu flavilium kationa (Kopjar, 2007).

2. Teorijski dio



Slika 5 Najvažniji prirodni antocijanidini (Kopjar, 2007)

Antocijani su zapravo glikozidi navedenih antocijanidina koji imaju karakterističan flavonoidni kostur (C₆-C₃-C₆) i kao takvi se jedino i nalaze u prirodi. Glikozilacija s raznim monosaharidima poput glukoze, galaktoze, arabinoze, ksiloze i ramnoze omogućava im stabilniju strukturu i veću topljivost u vodi. Osim toga, mogu biti i acilirani s hidroksicimetnim ili alifatskim kiselinama. Zanimljivost i značajka ovih spojeva je pozitivan naboj na kisiku u heterocikličkom prstenu koji omogućuje da se u kiseljoj sredini ponašaju kao kationi, a u baznoj kao anioni. U vakuoli biljne stanice nalaze se četiri molekulske forme u ravnoteži, a njihova boja i struktura ovisit će, odnosno mijenjat će se u zavisnosti od pH sredine. To znači da će prilikom pH 1 ovi spojevi dati crvenu boju, između 2 i 4 plavu, između 5 i 6 bezbojno, a iznad pH 7 njihova molekula se raspada. Početni sastav voća i procesni parametri poput temperature, kisika i svjetlosti su, uz pH, čimbenici koji će utjecati na boju i općenito stabilnost njihove strukture. Termička degradacija i prisutni šećeri rezultiraju stvaranjem smeđih pigmenata, prisustvo kisika dodano pojačava učinak neželjenih procesa, dok će skladištenje u mraku osigurati očuvanje boje antocijanina (Pichler, 2011.)

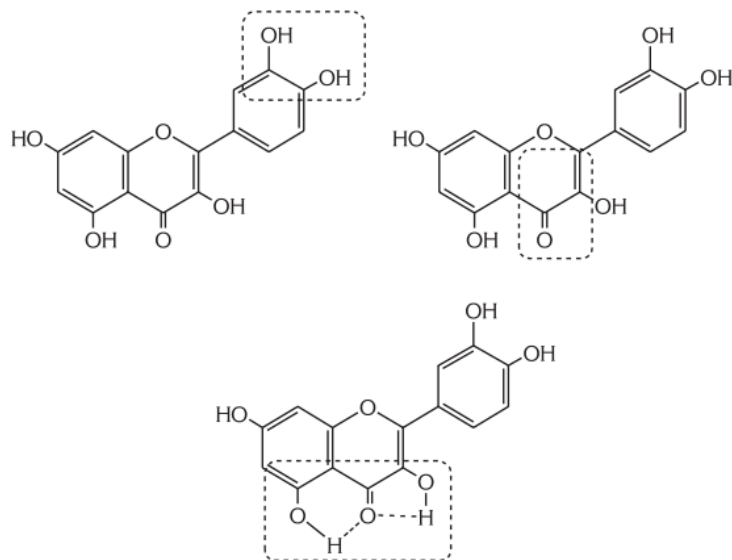
2.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Neizmjerne važnost pridaje se antioksidansima, spojevima koji hvataju i neutraliziraju slobodne radikale, izrazito reaktivne molekule čiji nespareni elektron u vanjskoj ljusci nastoji nadoknaditi taj jedan elektron uzimajući ga drugim molekulama u organizmu. Također, posjeduju sposobnost vezanja iona prijelaznih metala (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}), aktiviranja antioksidacijskih enzima te inhibicije oksidaze (Krivak, 2010.). Jedan od izvora slobodnih radikala je sam organizam, upravo zbog aerobnog metabolizma te rada imunološkog sustava. Hrana, zagađeni zrak i ostali vanjski utjecaji drugi su izvor slobodnih radikala od kojih su najučestaliji reaktivni oblici kisika (superoksidni anion, perhidroksilni radikal, hidroksilni radikal, vodikov peroksid), ali i reaktivne dušikove vrste (Parčetić-Kostelac i sur., 2016.). U slučaju postojanja neravnoteže između prooksidansa i antioksidansa te antioksidacijske sposobnosti, u organizmu dolazi do oksidacijskog stresa. Oksidativni stres je u velikoj mjeri uzročnik mutageneze, starenja stanica, oštećenja DNK te mnogih drugih bolesti. Osim sprječavanja oksidacije i lančanih reakcija, antioksidansi prisutni u hrani poboljšavaju senzorska svojstva namirnice i čuvaju od reakcija i promjena do kojih vrlo brzo i lako dolazi, a izrazito su nepoželjne i negativne. Uz polifenole, poznate tvari antiradikalnih svojstava jesu karotenoidi, vitamini A, E i C te selen. Spojevi u aroniji zaslužni za antioksidacijsku aktivnost su upravo polifenoli od kojih se ističe kvercetin, cijanidin glikozidi te klorogenska kiselina. Ostalih 60 % djelovanja može se pripisati antocijanima, flavonolima te hidroksicimetnim kiselinama (Tolić i sur., 2015). Kazazić (2004) navodi kako je najvažnije djelovanje flavonoida hvatanje slobodnih radikala i na taj način prekidaju lančane reakcije koje su slobodni radikali započeli. Nadalje, moguća je interakcija s drugim fiziološkim antioksidansima kao što su vitamini C i E. Usporavanje i sprječavanje reakcije oksidacije te nastajanje stabilnog spoja koji neće poticati daljnju lančanu reakciju osigurava polifenolima da se nazivaju i definiraju antioksidansima. **Slikom 6** prikazana su osnovna strukturna obilježja flavonoida o kojima ovisi sposobnost neutralizacije slobodnih radikala:

- o-dihidroksilna struktura (kateholna struktura) u B prstenu zadužena za stabilnost radikala i delokalizaciju elektrona,

2. Teorijski dio

- 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto skupinom uz pomoć koje se elektroni iz B prstena delokaliziraju i
- hidroksilne skupine na 3- i 5- položaju koje omogućavaju vodikovu vezu s keto skupinom.



Slika 6 Strukturne skupine zaslužne za hvatanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004)

Sposobnost doniranja vodikovih atoma i hvatanja elektrona slobodnih radikala, vezanje iona metala te inhibiranje oksidaza diktira stupanj, odnosno jačinu antioksidacijskog djelovanja polifenola. Osim strukture, aktivnost će ovisiti i o temperaturi, svjetlosti, supstratu te ostalim tvarima koji će sudjelovati kao prooksidansi ili sinergisti (Kazazić, 2004).

Jakobek (2007) navodi da se, ovisno o mehanizmima reakcija koji se odvijaju između antioksidansa i slobodnih radikala, antioksidacijske metode mogu podijeliti na metode temeljene na prijenosu elektrona (eng. *Single Electron Transfer*, SET) te na one koje su temeljene na prijenosu vodika (eng. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT). Metode zasnovane na prijenosu elektrona mjere redukcijsku sposobnost antioksidansa, a baziraju se na redoks reakciji, dok one koje se zasnivaju na prijenosu atoma vodika mjere sposobnost antioksidansa da slobodnim radikalima prenosi, točnije donira vodikom atom. Ono što je važno napomenuti je činjenica da se u reakciji antioksidansa i slobodnog radikala ove dvije metode mogu odvijati paralelno, no koja će dominirati ovisi o strukturi, topljivosti i svojstvima molekule

2. Teorijski dio

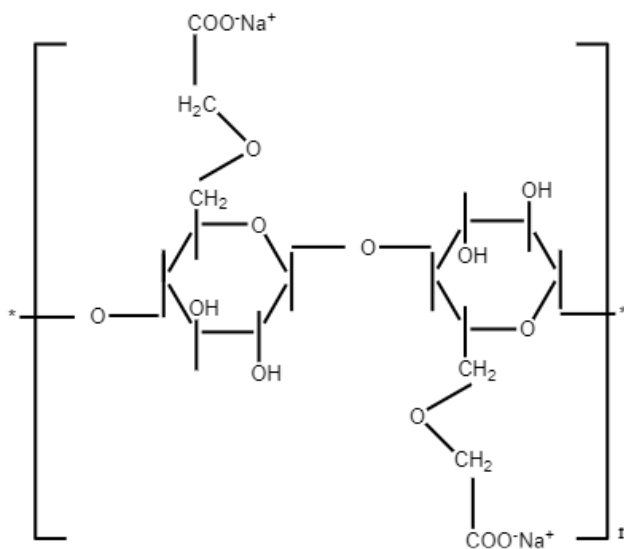
antioksidansa te pH vrijednosti. Također, konačni rezultat je identičan, bez obzira na način odvijanja, iako su potencijal i kinetika reakcija različiti. ORAC i TRAP uobičajene su HAT metode, gdje se prilikom ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metode detektira aktivnost antioksidansa za vrijeme raskidanja lančane reakcije uz pomoć prijenosa vodikovog atoma, a prilikom TRAP (eng. *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) metode određuje kapacitet apsorpcije kojom antioksidans apsorbira tri moguća oksidansa – hidroksil radikal, peroksil radikal te peroksinitrit (Jakobek 2007). FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), TEAC i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) spadaju pod SET reakcije, pri čemu je TEAC (eng. *Trolox equivalent antioxidant capacity*) jedna od najučestalijih metoda pomoću koje se definira antioksidativni kapacitet prema topljivom ekvivalentu vitamina E (Trolox ekvivalent). Sve navedene metode podrazumijevaju spektrometrijsku analizu, iako postoje i elektrokemijske i kromatografske metode. Prema autorima Oszmianski i Wojdylo (2005), antiradikalna aktivnost aronije, odnosno polifenola koje sadrži njen plod, mjerena hvatanjem slobodnog DPPH radikala iznosi 279,38 μmol Trolox/100 g suhe tvari. Općenito, antioksidacijsku aktivnost voća diktirat će kemijska struktura i polarnost prisutnih antioksidansa, pH vrijednost te heterogenost matriksa (Karadag i sur., 2019).

2.4. KARBOKSIMETIL CELULOZA

Hidrofilni karakter, mogućnost kombiniranja s raznim spojevima, sposobnost stabilizacije i zgušnjavanja samo su neki od karakteristika karboksimetil celuloze (CMC), hidrokoloida koji je privukao pažnju u mnogim industrijama, ponajviše prehrambenoj. Karboksimetil celuloza (**Slika 7**) predstavlja derivat celuloze koji sadrži karboksilne i hidroksilne skupine pomoću kojih stvara interakcije s pozitivno nabijenim ionskim vrstama (Singh i sur., 2022). Otapanjem u vodi daje bistru i bezbojnu otopinu bez specifičnog okusa, može stvarati komplekse s topivim proteinima što sprječava sinerezu i njihovo taloženje, a neki oblici CMC-a imaju i odlična svojstva vezivanja vode. Na svojstva ovog ionskog polimera djelovat će sastav i koncentracija proteina, temperatura, pH vrijednost, ali i sama koncentracija i tip CMC. Upotrebljava se u proizvodnji različitih proizvoda kao zamjena za škrob, dekstrine i želatinu. Visoka otpornost na mikroorganizme ključna je prednost zbog koje se najviše koristi u proizvodnji bezalkoholnih pića, pekarskih proizvoda, umaka i preljeva te smrznutih i instant proizvoda (Mihić, 2009). Ovaj

2. Teorijski dio

prirodni anionski polisaharid na tržištu se nalazi u obliku natrijeve soli, bijeli prah bez mirisa i okusa, a moguće ju je pronaći i kao tekućinu (Phillips i Williams, 2000).



Slika 7 Struktura karboksimetil celuloze (CMC) (Asmal Rani i sur., 2014)

2.5. DISAHARIDI

Ugljikohidrate kao najraširenije organske spojeve u prirodi sintetiziraju i metaboliziraju gotovo sve biljke i životinje. Uloga ovih spojeva molekulske formule $C_n(H_2O)_m$ je skladištenje energije do čijeg oslobađanja dolazi u stanicama, a nastaju fotosintezom. Ona podrazumijeva mnoštvo kompleksnih reakcija prilikom kojih se ugljikov dioksid i voda pretvaraju u glukozu i kisik, a sve s pomoću Sunčeve energije. Najjednostavniji šećeri su monosaharidi koji se ne mogu hidrolizirati u jednostavnije spojeve, a njih predstavljaju glukozu i fruktozu. Sljedeća skupina su disaharidi, šećeri čija molekula može hidrolizirati u dvije molekule monosaharida, a najpoznatiji primjer je saharoza koja se može hidrolizirati na glukozu i fruktozu. Polisaharidi predstavljaju najkompleksniju podskupinu ugljikohidrata, a sastavljeni su od mnogo monosaharidnih jedinica spojenih glikozidnim vezama. Nazivaju se još i biopolimeri, s obzirom na činjenicu da se pojavljuju u prirodi. Naime, postoje i kraći polisaharidi koji su sastavljeni od tri do deset monosaharidnih jedinica i njih nazivamo oligosaharidima. Premda, najveći dio polisaharida sastavljen je od stotina ili čak tisuću jednostavnih šećernih jedinica povezanih u dugačke polimerne lance (Andričić, 2009).

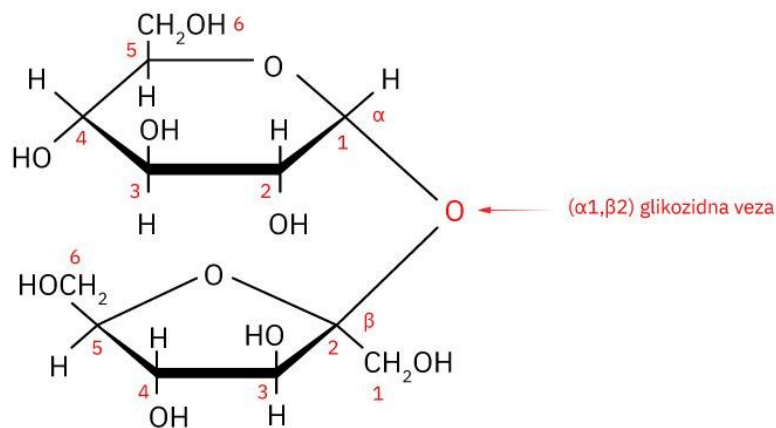
2. Teorijski dio

Disaharidi su šećeri nastali spajanjem dviju monosaharidnih jedinica glikozidnom vezom pri čemu dolazi do oslobađanja jedne molekule vode, a osnovna karakteristika je podjela u dvije grupe: reducirajući te nereducirajući disaharidi. Kod reducirajućih disaharida glikozidna veza se uspostavlja između anomerne (poluacetalne) grupe jednog i OH skupine drugog monosaharida, kod nereducirajućih veza nastaje između poluacetalnih grupa oba monosaharida. Međusobno se razlikuju po vrsti monosaharida koji ih čine ali i po vrsti glikozidne veze koja je prisutna između tih molekula (Wade, 2017). Iako anomerni ugljikov atom prvog šećera može reagirati s bilo kojom hidroksilnom skupinom drugog šećera da bi nastao disaharid, u prirodnim disaharidima pojavljuju se samo tri vrste glikozidnih veza. Veza 1,4' povezuje anomerni ugljikov atom i kisikov atom C4 drugog šećera, a oznaka prim ('') odnosi se na C4 drugog šećera. 1,6' je veza koja spaja anomerni ugljikov atomu za kisikov atom C6 drugog šećera. Naposljetku, veza 1,1' omogućuje povezivanje anomernog ugljikovog atoma prvog šećera za anomerni ugljik drugog šećera preko atoma kisika (Wade, 2017). Maltoza, laktoza, celobioza te izomaltoza pripadaju kategoriji reducirajućih šećera, a u nereducirajuće pripadaju saharoza i trehaloza, predmet ispitivanja i istraživanja ovog rada.

2.5.1. Saharoza

Osim činjenice da je najčešće korišten disaharid u prehrambenoj industriji te svakodnevnom životu, osnovna obilježja saharoze su da je pri sobnoj temperaturi bijela kristalna čvrsta, topljiva je u vodi i ima nisko talište. Sirovina za dobivanje je šećerna repa ili šećerna trska, no može biti i šećerni javor te šećerna palma. Mada u manjoj količini nego glukoza i fruktoza, saharozu se nalazi u voću i povrću, a glikemijski indeks šećera iznosi 70 (Krtanjek, 2014). U saharozu ($C_{12}H_{22}O_{11}$) prisutna je izravna veza između anomernih ugljikovih atoma. Ona je, dakle, sačinjena od jedne glukozne i jedne fruktozne jedinice, dok su anomerni ugljikovi atomi spojeni preko kisikova atoma (α,β)(1,2) glikozidnom vezom. Može se uočiti da je ova veza tipa 1,2' s obzirom na glukozni prsten u alfa položaju, a s obzirom na fruktozni prsten u beta položaju (**Slika 8**). Hidroliza saharoze posljedica je djelovanja enzima invertaze koji se mogu detektirati u pčelama te u kvascu. Tom reakcijom dobiva se invertni šećer, ravnotežna smjesa glukoze i fruktoze koja zakreće ravninu polarizirane svjetlosti u suprotnom smjeru od saharoze (Jovanović, 2012).

2. Teorijski dio



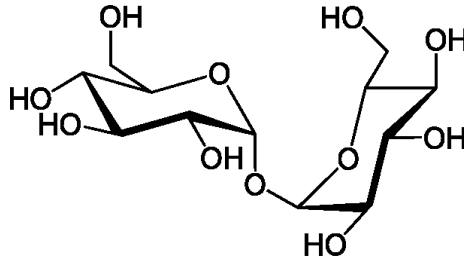
Slika 8 Kemijska formula saharoze (Web 3)

2.5.2. Trehaloza

Trehaloza (α, α -trehaloza) je nereducirajući disaharid ($C_{12}H_{22}O_{11}$) strukturiran od dvije molekule α -D-glukoze vezane α -1,1' – glikozidnom vezom na koju α -glukozidaza nema utjecaj i ne može ju pocijepati (Kopjar, 2007). Opisuje se kao prirodni produkt stabilniji od saharoze čija je slatkoća 45 % slatkoće saharoze. Poznata je i pod nazivom α -D-glukopiranozil- α -D-glukopiranozid (Slika 9) koji se djelovanjem kiselina ne može lako hidrolizirati (Janjatović, 2020). Točka taljenja iznosi $97\text{ }^{\circ}\text{C}$, a osmotski profil i topljivost identični su kao kod maltoze. Karakterizira ju niska higroskopnost, niski intenzitet slatkoće, visoki stupanj optičke rotacije, nekariogenost, smanjenje aktiviteta vode i molekularne mobilnosti te imobilizacija aktivnih krajeva molekula (Vranić, 2015). Stabilnost prilikom skladištenja i izlaganja višim temperaturama posjeduje zahvaljujući kombinaciji molekulske strukture i navedenih fizikalno - kemijskih svojstava. Nadalje, svojstva poput stabilizacije proteina, ugljikohidrata, masnih kiselina, teksture, tvari arome i boje izrazito doprinose kvaliteti široke palete proizvoda. S obzirom na to da je trehaloza nereducirajući šećer, ne sudjeluje u Maillard-ovim reakcijama posmeđivanja (Burek i sur., 2015). Najveću primjenu ovaj disaharid ima u pekarskoj i konditorskoj industriji, npr. tvrdi bomboni i žvakaće gume, ali i proizvodnji smrznutih proizvoda te napitaka. Razlog tomu su njene jedinstvene funkcije poput ubrzavanje rehidracije, inhibicije retrogradacije škroba, zadržavanje strukture proteina nakon

2. Teorijski dio

odmrzavanja, sprječavanje nastanka nepoželjne arome, zaštite lipidnih membrana za vrijeme sušenja te općenito omogućavanje povratka biomolekula u prvobitno stanje. Široku primjenu trehaloze u prehrambenoj i srodnoj industriji osiguralo je i olakšalo uvođenje enzimskog postupka proizvodnje trehaloze te značajan pad njene cijene (Web 8).



Slika 9 Kemijska formula trehaloze (Web 4)

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3. Eksperimentalni dio

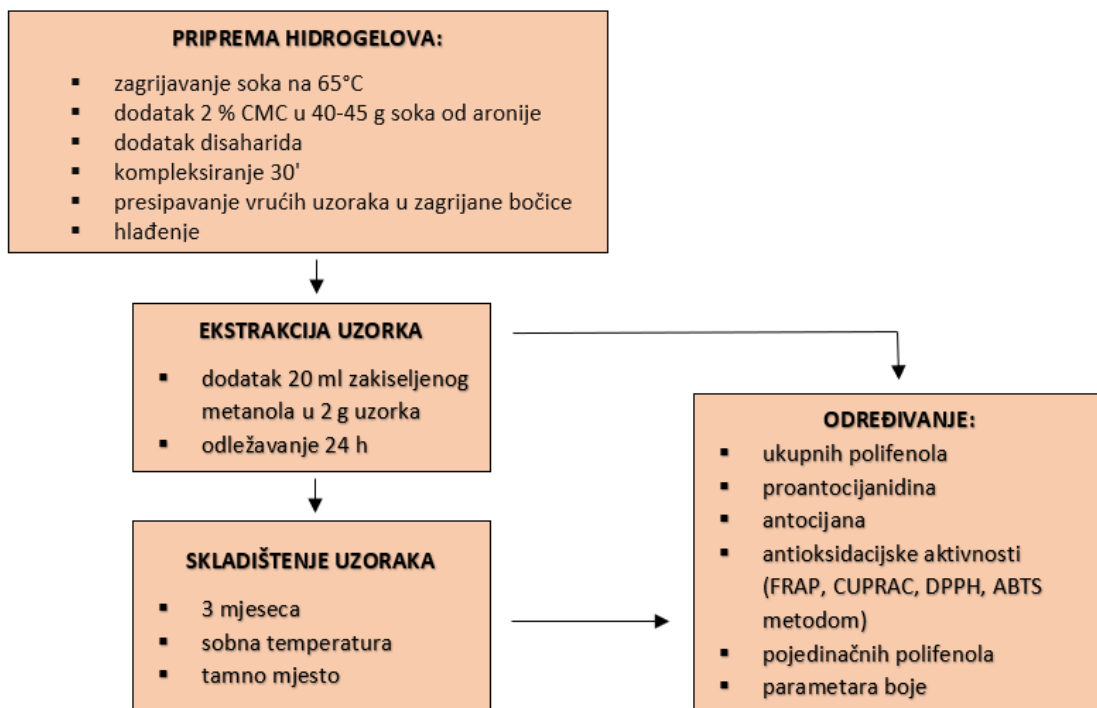
3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka dva disaharida na udio polifenola te antioksidacijsku aktivnost u gelu na bazi karboksimetil celuloze i soka aronije. Disaharidi koji su se dodavali u prilikom pripreme gelova bili su saharoza i trehaloza, a njihovi udjeli bili su 30, 40 te 50 %. Uzorci su se skladištili 3 mjeseca. Shema rada prikazana je **Slikom 10**.

Nakon pripreme uzoraka i nakon skladištenja određeni su sljedeći parametri:

- ukupni polifenoli;
- proantocijanidini;
- antocijani;
- antioksidacijska aktivnost (FRAP, CUPRAC, DPPH i ABTS testovi);
- koncentracija pojedinačnih polifenola (HPLC analiza);
- parametri boja (L^* , a^* , b^* , $^{\circ}h$, C^*).

3. Eksperimentalni dio



Slika 10 Shematski prikaz rada

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

Sok aronije nabavljen je od lokalnog proizvođača. Trehaloza je dobivena od Hayashibara d.o.o. (Nagase group, Okayama, Japan), dok je saharoza nabavljena od Fluke (Buchs, Švicarska). Karboksimetil celuloza nabavljena je od CP Kelco (Äänekoski, Finska). Klorovodična kiselina (37%) nabavljena je od Carlo Erba Reagents (Sabadell, Španjolska). Folin-Ciocalteu reagens nabavljen je od Kemike (Zagreb, Hrvatska). Trolox, 2,2'-azinobis (3-etilbenztiozolin-sulfonska kiselina), p-dimetilaminocinamaldehyd, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil i većina standarda korištenih za HPLC analizu (rutin, klorogenska kiselina, cijanidin-3-arabinozid) kupljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD), dok su cijanidin-3-galaktozid i neoklorogenska kiselina kupljeni od proizvođača Extrasynthese (Genay, Francuska). Neokuproin i bakar klorid proizvodi su Gram-mola (Zagreb, Hrvatska). Metanol (HPLC čistoće) nabavljen je od proizvođača J.T. Baker (Deventer, Nizozemska) i ortofosforna kiselina (HPLC čistoće >85%) nabavljena je od

3. Eksperimentalni dio

Fisher Scientific (Loughborough, UK). 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin kupljen je od Acros Organica (Geel, Belgija).

3.2.2. Priprema uzorka

Sok je prvotno zagrijan na magnetskoj miješalici na temperaturu od 60 °C. Dodavanjem karboksimetil celuloze u sok formirani su hidrogelovi koji su se na miješalici kompleksirali tijekom 30 minuta. Udio CMC koji je korišten za pripremu uzoraka iznosio je 2 %. Nakon dodavanja 30 %, 40 % i 50 % saharoze ili trehaloze, dodan je ostatak soka kako bi ukupna masa uzorka iznosila 50 g. **Tablicom 4** prikazani su pripremljeni uzorci. Naredni korak podrazumijevao je presipavanje vrućih uzoraka u prethodno zagrijane staklene bočice, a uzorci su se podvrgnuli ispitivanju neposredno nakon hlađenja. Sljedeća analiza uslijedila je nakon tri mjeseca skladištenja na tamnom mjestu i sobnoj temperaturi.

Tablica 4 Sastav pripremljenih gelova

uzorak	karboksimetil celuloza (%)	saharoza (%)	trehaloza (%)
2 % CMC	2	–	–
2 % CMC 30 % S	2	30	–
2 % CMC 30 % T	2	–	30
2 % CMC 40 % S	2	40	–
2 % CMC 40 % T	2	–	40
2 % CMC 50 % S	2	50	–
2 % CMC 50 % T	2	–	50

3.2.3. Metode

3.2.3.1. Ekstrakcija uzorka

Uzorak namijenjen analizi, odnosno određivanju ukupnih polifenola, proantocijanidina, antocijana te antioksidacijske aktivnosti ekstrahiran je tako što je 2 g uzorka homogenizirano s 20 mL zakiseljenog metanola. Navedena smjesa je stajala 24 sata, a nakon toga je filtrirana te je dobiven ekstrakt koji se je koristio za daljnje analize.

3. Eksperimentalni dio

3.2.3.2. Određivanje ukupnih polifenola

Jednostavna i lako ponovljiva metoda kojom je detektiran udio ukupnih polifenola naziva se Folin-Ciocalteu metoda. Ona se temelji na reakcijama koje dovode do nastanka obojenih spojeva. Folin-Ciocalteu reagens u alkalnom mediju oksidira fenolne spojeve, pri čemu se prisutne kiseline u reagensu reduciraju u okside obojene plavo (Ndhlala, 2010).

Postupak podrazumijeva pipetiranje 0,2 mL uzorka, 1,8 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu (1:10) reagensa te 8 mL otopine natrijevog karbonata. Epruveta se promućka i ostavi na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi tijekom 2 sata. Određivanje apsorbancije provodi se na spektrofotometru pri 765 nm, a slijepa proba se pripravi s 2 mL destilirane vode. Mjerenje je provedeno u tri paralele. Dobiveni rezultat se preračunava iz kalibracijske krivulje galne kiseline.

3.2.3.3. Određivanje proantocijanidina

Određivanje proantocijanidina započinje pipetiranjem 0,1 mL uzorka te dodavanjem 1 mL otopine 4-dimetil-aminocinamaldehida. Dobivena reakcijska smjesa služi za mjerenje apsorbancije na 640 nm nakon prethodnog mirovanja u trajanju od 30 minuta. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za procijanidin B2. Mjerenje je provedeno u tri paralele.

3.2.3.4. Određivanje monomernih antocijana

Metoda korištena za određivanje antocijana je pH-diferencijalna metoda prilikom koje se otpipetira 0,2 mL uzorka u dvije kivete. U jednu od njih se dodaje 2,8 mL pufera čiji pH iznosi 1, a u drugu kivetu dodaje se ista količina pufera čiji je pH 4,5. Apsorbancija je, nakon stajanja od 15 minuta, spektrofotometrom izmjerena pri valnim duljinama od 515 nm i 700 nm. Mjerenje je provedeno u tri paralele.

Udio antocijana izračunat je prema sljedećoj **Formuli (1)**:

$$C_{antocijani} (\mu g/g) = \frac{A \times M \times FR \times 1000}{\epsilon \times l}$$

3. Eksperimentalni dio

A – apsorbancija uzorka računa se prema **Formuli (2)**:

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

gdje je: M – molekulska masa (449,2)

FR – faktor razrjeđenja

ϵ – molarna apsorbivnost (26 900)

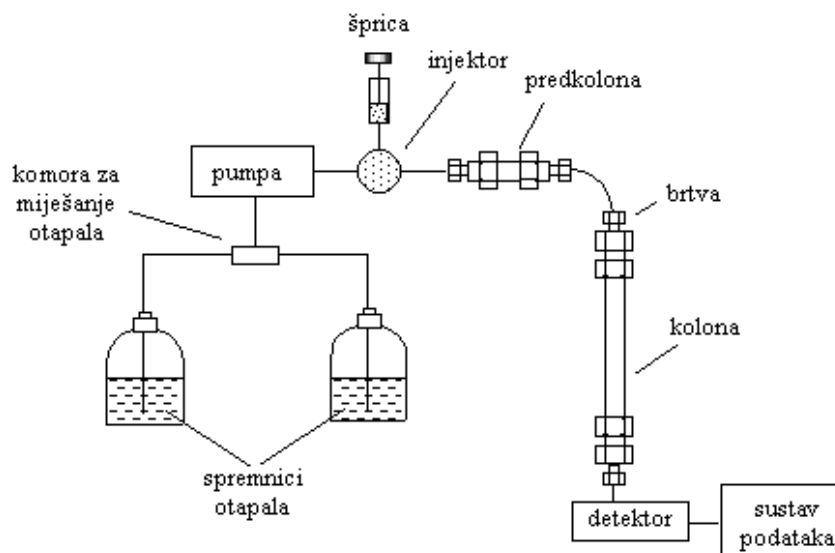
l – duljina kivete (1 cm)

3.2.3.5. Određivanje koncentracije pojedinačnih polifenola

Određivanje fenola provedeno je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Sadržaj antocijana, fenolnih kiselina i flavonola određen je koristeći HPLC sustav 1260 Infinity II (Agilent technology, Santa Clara, CA, USA). Navedeni sustav se sastoji od sljedećih dijelova: kvaterna pumpa, detektor s diodnim nizom i kolona Poroshell 120 EC-C 18 (4,6 x 100 mm, 2,7 μ m). Korištena metoda je opisana u radu Ivić i sur. (2021) te prethodno validirana. Kao mobilne faze korišteni su 0,1 %-tna H₃PO₄ (A) i 100 %-tni metanol (B). Količina injektiranog uzorka iznosila je 10 μ L, a protok je bio postavljen na 1 mL/min. Za razdjeljivanje je upotrijebljen sljedeći gradijent: 0 min 5 % B, 3 min 30 % B, 15 min 35 % B, 22 min 37 % B, 30 min 41 % B, 32 min 45 % B, 40 min 49 % B, 45 min 80 % B, 48 min 80 % B, 50 min 5 % B, 53 min 5 % B. Za pripremu kalibracijskih krivulja, korištene su koncentrirane otopine standarda koje su se razrjeđivale s metanolom kako bi se dobile različite koncentracije. Kromatogrami su snimani u području od 190 do 600 nm. Antocijani su identificirani na 520 nm, kiseline na 320 nm, a flavonoli na 360 nm. Uzorci su analizirani u paralelama. Shematski prikaz HPLC kromatografa prikazan je **Slikom 11**.

Od antocijana identificirani su cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid, dok su od flavonoida izdvojeni kvercetin-3-rutinozid (rutin), neoklorogenska kiselina te klorogenska kiselina i njeni derivati.

3. Eksperimentalni dio



Slika 11 Shematski prikaz HPLC kromatografa (Web 5)

3.2.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Testovi koji se izvode u svrhu određivanja antioksidacijske aktivnosti su bili FRAP, CUPRAC, DPPH i ABTS.

FRAP metoda

FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) je ET metoda u kojoj dolazi do izmjene jednog elektrona te se na taj način mjeri sposobnost redukcije. Ne zahtijeva posebnu opremu, vrlo je jednostavna, brza, ali i jeftina. Prilikom ove metode dolazi do reakcije antioksidansa sa Fe (III) kompleksom. Posebno je korištena u slučaju identifikacije antioksidacijske aktivnosti u voćnim ekstraktima, a razlog je brza provedba te povezanost s fenolima i askorbinskom kiselinom (Shahidi i Zhong, 2015).

Postupak uključuje pipetiranje 0,2 mL uzorka i 3 mL FRAP otopine, miješanje i mirovanje reakcijske smjese u trajanju od 30 minuta. Apsoorbancija se mjeri pri 593 nm, a rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za Trolox. Mjerenje je provedeno u tri paralele.

3. Eksperimentalni dio

CUPRAC metoda

CUPRAC (eng. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*) metoda poznata je po svojoj jednostavnosti i sličnosti FRAP metodi, reagensi su vrlo stabilni te selektivni, a odvija se pri pH 7, za razliku od FRAP metode gdje je prisutan kiseli medij. U slučaju CUPRAC metode dolazi do redukcije Cu (II) u Cu (I) pomoću antioksidansa (Shahidi i Zhong, 2015).

Postupak uključuje pipetiranje 1 mL otopine bakar klorida, 1 mL otopine neokuproina, 1 mL amonij acetata, 0,2 mL uzorka i 0,9 mL vode. Nakon homogenizacije i mirovanja u trajanju od 30 minuta, smjesa se podvrgava mjerenju absorbance na 450 nm, a rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za Trolox. Mjerenje je provedeno u tri paralele.

DPPH metoda

DPPH metoda (2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil) je najpoznatija metoda koja se temelji na mjerenju sposobnosti redukcije organskog 2,2'-difenilpikrilhidrazil radikala pomoću antioksidansa. DPPH radikal predstavlja stabilan dušikov radikal čija je otopina tamnoljubičaste boje. Jednostavna je i brza, a za provedbu zahtjeva UV-VIS spektrofotometar (Krivak, 2010).

Postupak uključuje pipetiranje 0,2 mL uzorka i 3 mL otopine DPPH te miješanje, nakon čega se reakcijska smjesa ostavlja stajati 15 minuta. Apsorbancija se mjeri pri 517 nm, a rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenje je provedeno u tri paralele.

ABTS metoda

ABTS metoda (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina)) poznata i kao TEAC metoda (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), mjeri sposobnost vezanja flavonoida i fenola s radikalima, dakle, dolazi do reakcije antioksidansa s organskim kationskim radikalom. Idenična je DPPH metodi, a također se temelji na prijenosu elektrona (Jakobek, 2007).

Postupak uključuje pipetiranje 0,2 mL uzorka kojemu se dodaje 3,2 mL otopine ABTS. Nakon miješanja, potrebno je odležavanje smjese u trajanju od 1 h i 35 minuta na tamnom mjestu. Apsorbancija se mjeri pri 734 nm, a rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za Trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3. Eksperimentalni dio

3.2.3.7. Određivanje parametara boje

Uređaj pomoću kojeg se dolazi do točnih vrijednosti traženih parametara je kolorimetar, a princip rada temelji se na mjerenju karakteristike svjetla odbijenog od površine ispitivanog uzorka. U kromametri (Minolta CR-400), prikazanom na **Slici 12**, dolazi do reflektiranja svjetla kojeg zabilježava šest vrlo preciznih silikonskih fotoćelija. Podaci ostaju zapisani u sustavu računala u vidu pet različitih sustava, X, Y, Z; Yxy; LCH; Lab i Hunter Lab. CIE Lab, korišten u ovom ispitivanju, predstavlja trodimenzionalni prostor boja temeljen na objektivnom vrednovanju boja te je najbliži vizualnoj percepciji.



Slika 12 Kromametar Minolta CR-400 (Web 6)

L^* je oznaka za svjetlinu (eng. *luminance*), a vrijednost se kreće 0 – 100. Dakle, ako je $L^* = 0$, uzorak je taman, a ako L^* iznosi 100, uzorak je svijetao. Oznaka a^* govori kojoj boji teži uzorak, crvenoj ili zelenoj, dok se b^* odnosi na boje žutu i plavu (**Slika 13**). Zasićenje (eng. *chroma*), C^* podrazumijeva udio pojedinih valnih duljina u ukupnom tonu boje, dakle odnosi se na udio čiste boje u ukupnim vizualnom doživljaju boje. Također se kreće u rasponu 0 – 100, od potpunog nezasićenja do maksimalnog zasićenja. Nadalje, ton boje označen kao h (eng. *hue*) izražava se u stupnjevima, gdje je 0° crveno, $> 90^\circ$ žuto, 180° zeleno te $< 270^\circ$ područje za plavo. Posljednja oznaka odnosi se na kolorimetrijsku razliku, ΔE , tj. ukupnu razliku boja koja se izračunava kao srednja vrijednost između L^* , a^* i b^* referentne vrijednosti i vrijednosti izmjerene na uzorku (**Formula 3**).

3. Eksperimentalni dio

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

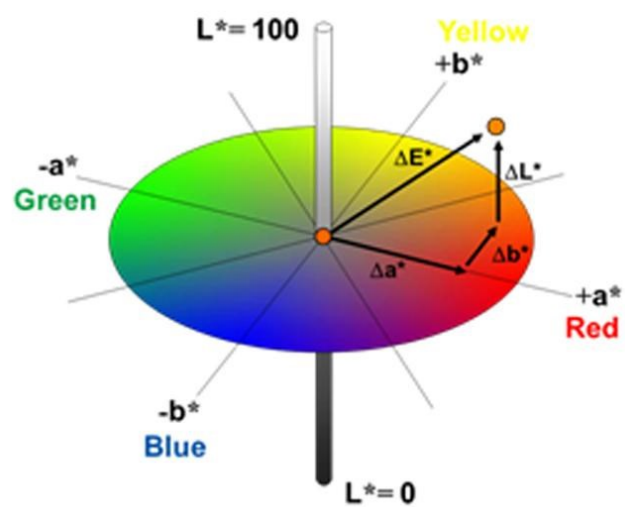
$$\Delta L^* = L^*_k - L^*_u$$

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

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

k – kontrolni uzorak

u – uspoređivani uzorak



Slika 13 CIE Lab prikaz (Web 7)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4. Rezultati i rasprava

U ovom radu pripremljeni su gelovi na bazi karboksimetil celuloze i soka od aronije. Osim CMC-a, dodavali su se i saharoza ili trehaloza u udjelima od 30, 40 i 50 % kako bi se ispitaio utjecaj dodatka različitih disaharida na udio polifenola, antioksidacijsku aktivnost i boju. Pripremljeni gelovi su se skladištili tri mjeseca te su utvrđene promjene nakon definiranog vremena.

4.1. UKUPNI POLIFENOLI, PROANTOCIJANIDINI I ANTOCIJANI

U **Tablici 5** prikazani su rezultati određivanja ukupnih polifenola, proantocijanidina i antocijana nakon pripreme i skladištenja gelova na bazi karboksimetil celuloze bez i s dodatkom disaharida.

Tablica 5 Udio ukupnih polifenola, proantocijanidina i antocijanina nakon pripreme gelova te nakon skladištenja

Uzorci	Ukupni polifenoli (g/kg)	Proantocijanidini (mg/kg)	Antocijani (mg/kg)
Sok aronije	133,56 ± 0,06 ^f	964,47 ± 3,56 ^c	156,30 ± 0,79 ^h
Nakon pripreme			
2 % CMC	35,44 ± 0,79 ^e	1878,50 ± 2,62 ^h	27,77 ± 0,02 ^g
2 % CMC 30 % S	27,81 ± 0,29 ^c	1121,76 ± 1,84 ^d	23,73 ± 0,53 ^e
2 % CMC 30 % T	31,81 ± 0,53 ^d	1693,49 ± 3,94 ^g	26,52 ± 0,17 ^f
2 % CMC 40 % S	25,16 ± 0,13 ^b	753,06 ± 4,99 ^b	21,91 ± 0,08 ^d
2 % CMC 40 % T	27,46 ± 0,92 ^c	1470,51 ± 3,67 ^f	17,29 ± 0,49 ^c
2 % CMC 50 % S	27,40 ± 0,32 ^c	487,12 ± 1,58 ^a	13,87 ± 0,42 ^b
2 % CMC 50 % T	22,92 ± 0,59 ^a	1244,48 ± 4,06 ^e	10,21 ± 0,23 ^a
Nakon skladištenja			
2 % CMC	5,43 ± 0,19 ^a	1873,03 ± 0,92 ^a	16,71 ± 0,70 ^a
2 % CMC 30 % S	4,16 ± 0,21 ^c	1109,19 ± 4,32 ^e	13,16 ± 0,21 ^c
2 % CMC 30 % T	4,54 ± 0,01 ^b	1659,41 ± 3,28 ^b	15,63 ± 0,15 ^b
2 % CMC 40 % S	3,40 ± 0,18 ^d	719,07 ± 3,15 ^f	10,63 ± 0,57 ^d
2 % CMC 40 % T	3,86 ± 0,01 ^c	1447,07 ± 4,34 ^c	11,09 ± 0,19 ^d
2 % CMC 50 % S	3,52 ± 0,06 ^d	455,96 ± 1,83 ^g	8,75 ± 0,13 ^e
2 % CMC 50 % T	3,34 ± 0,01 ^d	1210,83 ± 5,12 ^d	8,38 ± 0,49 ^d

CMC – karboksimetil celuloza; S – saharoza; T – trehaloza. Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima statistički su različite.

U soku aronije, udio ukupnih polifenola iznosio je 133,56 g/kg, proantocijanidina 964,47 mg/kg, a udio antocijana bio je 156,30 mg/kg. Tijekom pripreme gelova, došlo je do promjene navedenih parametara što je bilo i za očekivati s obzirom da je primijenjena povišena temperatura kroz 30 minuta. Osim uvjeta pripreme gelova, iz rezultata je vidljivo da je dodatak

4. Rezultati i rasprava

disaharida odnosno tip disaharida i količina dodanih disaharida imao utjecaj na udio ukupnih polifenola, proantocijanidina i antocijana. Gel pripremljen s 2 % karboksimetil celuloze (kontrolni uzorak) sadržavao je 35,44 g/kg ukupnih polifenola. Gelovi s dodatkom disaharida sadržavali su manji udio ukupnih polifenola, od 22,92 g/kg do 31,91 g/kg. Gelovi s dodatkom saharoze imali su 25,16 do 27,81 g/kg ukupnih fenola, dok je dodatak trehaloze značajnije utjecao na udio ukupnih polifenola, odnosno s povećanjem količine dodane trehaloze utvrđeno je smanjenje udjela ukupnih fenola. Usporedbom tipa šećera pri dodanoj istoj količini, dodatak trehaloze imao je bolji učinak na zadržavanje ukupnih polifenola prilikom dodavanja u količini od 30 % i 40 %, dok je u slučaju dodatka 50 % disaharida, veće zadržavanje utvrđeno za gel sa saharozom. U uzorcima nakon skladištenja, udio ukupnih polifenola se je znatno smanjio. Najveći udio polifenola, nakon skladištenja, imao je gel s 2 % karboksimetil celuloze (5,43 g/kg) dok su gelovi s dodatkom disaharida imali manje vrijednosti u odnosu na kontrolni gel.

Kontrolni uzorak (gel s 2 % CMC-a) sadržavao je najveći udio proantocijanidina, 1878,5 mg/kg. S dodatkom disaharida utvrđeno je smanjene udjela ovih komponenata. S povećanjem dodatka disaharida utvrđeno je smanjenje udjela proantocijanidina. Udio proantocijanidina u gelovima s dodatkom saharoze iznosio je 1121,76 mg/kg, 753,06 mg/kg i 487,13 mg/kg za 30 %, 40 % i 50 % dodane saharoze. U gelovima s dodatkom trehaloze udio proantocijanidina je bio veći u odnosu na gelove s dodatkom saharoze, a iznosio je 1693,49 mg/kg, 1470,51 mg/kg i 1244,48 mg/kg za 30 %, 40 % i 50 % dodane trehaloze. Za razliku od ukupnih polifenola, tijekom skladištenja nije došlo do značajnije promjene udjela proantocijanidina te je zadržan trend koji je utvrđen nakon pripreme gelova.

Udio monomernih antocijana u kontrolnom uzorku iznosio je 27,77 mg/kg, a u gelovima s dodatkom disaharida utvrđene su manje vrijednosti antocijana kao i u slučaju ukupnih polifenola i proantocijanidina. S povećanjem dodatka disaharida utvrđeno je smanjenje udjela antocijana. U gelovima s dodatkom 30 % disaharida utvrđeno je da je gel s dodatkom trehaloze (26,52 mg/kg) imao veći udio antocijana u odnosu na gel s dodatkom saharoze (23,73 mg/kg). Za razliku od ovih gelova, u gelovima s dodatkom 40 % i 50 % disaharida, uzorci s dodanom saharozom imali su veći udio antocijana. Tijekom skladištenja došlo je do degradacije antocijana, ali je kontrolni uzorak imao najveći udio antocijana. U gelovima s dodatkom 30 %

4. Rezultati i rasprava

disaharida zadržan je trend koji je utvrđen nakon pripreme uzoraka odnosno gel s dodatkom trehaloze imao je veći udio antocijana u odnosu na gel s dodatkom saharoze. U gelovima s dodatkom 40 % i 50 % disaharida nije utvrđena razlika između uzoraka s dodatkom saharoze i trehaloze.

4. Rezultati i rasprava

4.2. UDIO POJEDINAČNIH POLIFENOLA

Udio pojedinačnih polifenola određen je HPLC analizom, tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Od antocijana identificirani su cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-arabinozid, dok su od flavonoida izdvojeni rutin, neoklorogenska kiselina te klorogenska kiselina i njeni derivati. Koncentracija pojedinačnih polifenola nakon pripreme uzorka te nakon skladištenja prikazana je u **Tablici 6**.

Tablica 6 Koncentracija pojedinačnih polifenola u gelovima nakon pripreme i skladištenja

Uzorci	Cy3-gal (mg/kg)	Cy3-arab (mg/kg)	Rut (mg/kg)	NcA (mg/kg)	ChA (mg/kg)	ChAD1 (mg/kg)	ChAD2 (mg/kg)
Nakon pripreme							
2 % CMC	282,13 ± 1,75 ^h	62,18 ± 1,85 ^h	3,75 ± 0,06 ^f	10,64 ± 0,07 ^f	11,75 ± 0,00 ^d	54,49 ± 1,59 ^e	43,34 ± 1,10 ^f
2 % CMC 30 % S	212,75 ± 0,13 ^f	47,99 ± 0,22 ^f	2,27 ± 0,01 ^d	7,33 ± 0,24 ^d	9,22 ± 0,14 ^c	43,16 ± 0,21 ^c	34,68 ± 0,17 ^d
2 % CMC 30 % T	241,00 ± 1,22 ^g	53,93 ± 0,44 ^g	2,83 ± 0,04 ^e	6,38 ± 0,07 ^e	8,87 ± 0,06 ^b	48,26 ± 0,21 ^d	38,50 ± 0,04 ^e
2 % CMC 40 % S	187,34 ± 1,00 ^e	42,58 ± 0,15 ^e	1,63 ± 0,07 ^c	4,93 ± 0,07 ^c	7,66 ± 0,02 ^a	37,27 ± 0,18 ^b	30,10 ± 0,09 ^c
2 % CMC 40 % T	168,19 ± 1,05 ^d	38,00 ± 0,20 ^d	1,77 ± 0,04 ^c	4,96 ± 0,03 ^c	7,78 ± 0,01 ^a	37,53 ± 0,15 ^b	30,07 ± 0,08 ^c
2 % CMC 50 % S	59,19 ± 0,11 ^b	12,29 ± 0,20 ^b	1,35 ± 0,08 ^b	5,51 ± 0,07 ^b	7,38 ± 0,03 ^a	36,39 ± 0,09 ^b	30,24 ± 0,02 ^c
2 % CMC 50 % T	53,67 ± 0,19 ^a	10,55 ± 0,07 ^a	0,96 ± 0,03 ^a	4,26 ± 0,01 ^a	7,36 ± 0,01 ^a	33,37 ± 0,02 ^a	27,57 ± 0,04 ^b
Nakon skladištenja							
2 % CMC	148,99 ± 2,56 ^a	28,63 ± 1,82 ^a	3,11 ± 0,01 ^a	11,19 ± 0,17 ^a	6,75 ± 0,05 ^e	66,58 ± 0,15 ^a	56,38 ± 1,95 ^a
2 % CMC 30 % S	121,35 ± 1,91 ^c	24,79 ± 0,30 ^b	2,00 ± 0,05 ^c	5,74 ± 0,00 ^e	8,43 ± 0,03 ^c	52,34 ± 0,55 ^e	34,14 ± 0,07 ^e
2 % CMC 30 % T	144,40 ± 0,81 ^b	29,09 ± 0,17 ^a	2,74 ± 0,03 ^b	6,74 ± 0,01 ^d	9,40 ± 0,01 ^a	65,33 ± 0,23 ^b	53,31 ± 0,27 ^b
2 % CMC 40 % S	82,68 ± 0,00 ^e	17,43 ± 0,21 ^c	1,11 ± 0,06 ^e	7,47 ± 0,10 ^c	8,00 ± 0,01 ^d	46,99 ± 0,01 ^f	30,14 ± 0,31 ^f
2 % CMC 40 % T	98,55 ± 0,43 ^d	18,98 ± 0,19 ^c	1,52 ± 0,04 ^d	5,56 ± 0,01 ^e	8,69 ± 0,02 ^b	54,09 ± 0,08 ^d	45,00 ± 0,51 ^c
2 % CMC 50 % S	16,45 ± 0,27 ^f	3,70 ± 0,07 ^d	1,20 ± 0,04 ^e	5,09 ± 0,13 ^b	8,05 ± 0,01 ^d	45,38 ± 0,06 ^g	37,25 ± 0,01 ^d
2 % CMC 50 % T	18,29 ± 0,05 ^f	3,18 ± 0,13 ^e	0,93 ± 0,00 ^f	4,69 ± 0,01 ^f	8,73 ± 0,12 ^b	55,00 ± 0,26 ^c	45,81 ± 0,28 ^c

CMC – karboksimetil celuloza; S – saharoza; T – trehaloza; Cy3-gal – cijanidin-3-galaktozid; Cy3-arab – cijanidin-3-arabinozid; Rut – rutin; NcA – neoklorogenska kiselina; ChA – klorogenska kiselina; ChAD1 i ChAD2 – derivati klorogenske kiseline. Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima statistički su različite.

4. Rezultati i rasprava

Cijanidin-3-galaktozid je utvrđen u većoj koncentraciji, u svim uzorcima, nego cijanidin-3-arabinozid. Za oba antocijana je utvrđeno da s povećanjem dodatka disaharida dolazi do smanjenja njihove koncentracije. Kontrolni uzorak imao je 281,13 mg/kg cijanidin-3-galaktozida, dok su gelovi s dodatkom disaharida imali manju koncentraciju ovog antocijana. Gelovi s dodatkom 30 % trehaloze imali su veću koncentraciju (241 mg/kg) cijanidin-3-galaktozida nego gelovi s dodatkom saharoze (212,75 mg/kg). U gelovima s dodatkom 40 % i 50 % disaharida, utvrđen je suprotan trend odnosno gelovi s dodatkom saharoze imali su veću koncentraciju. Trend koji je utvrđen za cijanidin-3-galaktozid, utvrđen je i za cijanidin-3-arabinozid. Nakon skladištenja, koncentracija oba antocijana se je smanjila. Kontrolni uzorak je i dalje imao najveću koncentraciju cijanidin-3-galaktozida, a koncentracija ovog antocijana se je smanjila s povećanjem dodane količine disaharida kao i nakon pripreme. Za razliku od početnih uzoraka, svi gelovi s dodatkom trehaloze imali su veću koncentraciju cijanidin-3-galaktozida u odnosu na gelove sa saharozom. U slučaju cijanidin-3-arabinozida, navedeni trend je utvrđen samo u gelovima s 30 % trehaloze. Rutin je također utvrđen u najvećoj koncentraciji u kontrolnom uzorku, a s dodatkom disaharida njegova se koncentracija smanjuje. Gel s dodatkom 30 % trehaloze imao je veću koncentraciju rutina, dok 40 % dodanog disaharida nije uzrokovao razliku između uzoraka. Tijekom skladištenja zadržan je isti trend. Identificirane su četiri fenolne kiseline. Kao i sve ostale komponente, tako su i sve fenolne kiseline utvrđene u najvećoj koncentraciji u kontrolnom uzorku. Gelovi s dodatkom 30 % i 50 % saharoze imali su veću koncentraciju neoklorogenske kiseline u odnosu na uzorke s trehalozom. Tijekom skladištenja utvrđeno je da je neoklorogenska kiselina bila relativno stabilna. Na koncentraciju klorogenske kiseline značajniji utjecaj imao je dodatak 30 % disaharida, s time da je gel s dodatkom trehaloze imao veću koncentraciju ove kiseline. Gelovi s dodatkom 40 % i 50 % disaharida imali su jednake vrijednosti klorogenske kiseline. Određena su dva derivata klorogenske kiseline. Za oba derivata utvrđen je jednaki trend odnosno gelovi s 30 % trehaloze imali su veću koncentraciju navedenih derivata, u gelovima s 40 % disaharida nije bilo razlike između saharoze i trehaloze, a u gelovima s dodatkom 50 % saharoze utvrđena je veća koncentracija nego u gelu s trehalozom. Tijekom skladištenja došlo je do promjene koncentracije derivata klorogenske kiseline odnosno povećanja što je vjerojatno posljedica transformacije određenih fenolnih spojeva u navedene kiseline.

4. Rezultati i rasprava

Rezultati istraživanja ukazuju da je zadržavanje i ukupnih polifenola, proantocijanidina i antocijana, ali i pojedinačnih polifenola soka aronije tijekom pripreme gelova bilo u gelovima samo s dodatkom karboksimetil celuloze, a dodatak disaharda je negativno utjecao na zadržavanje ovih komponenata. Tijekom pripreme je vjerojatno došlo do vezivanja disaharida s karboksimetil celulozom te su formirani kompleksi koji su isključili dodatno vezivanje polifenola odnosno smanjen je broj slobodnih mjesta za vezivanje polifenola (Ćorković i sur. 2023).

4. Rezultati i rasprava

4.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidacijska aktivnost određena je primjenom DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode te su rezultati prikazani u **Tablici 7**.

Tablica 7 Antioksidacijska aktivnost gelova nakon pripreme i nakon skladištenja

Uzorci	FRAP ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)	CUPRAC ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)	DPPH ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)	ABTS ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$)
Sok aronije	$3,57 \pm 0,01^g$	$237,08 \pm 2,03^h$	$31,65 \pm 0,01^e$	$49,88 \pm 0,54^e$
Nakon pripreme				
2 % CMC	$3,52 \pm 0,03^f$	$231,46 \pm 0,96^g$	$29,24 \pm 0,50^d$	$38,31 \pm 0,38^d$
2 % CMC 30 % S	$2,55 \pm 0,02^c$	$168,18 \pm 1,61^d$	$24,69 \pm 0,28^b$	$26,69 \pm 0,58^b$
2 % CMC 30 % T	$3,07 \pm 0,01^e$	$202,58 \pm 1,76^f$	$27,15 \pm 0,65^c$	$31,59 \pm 0,85^c$
2 % CMC 40 % S	$2,26 \pm 0,02^b$	$152,45 \pm 0,56^b$	$22,28 \pm 0,62^a$	$21,74 \pm 0,34^a$
2 % CMC 40 % T	$2,62 \pm 0,03^d$	$170,49 \pm 1,11^e$	$24,99 \pm 0,63^b$	$27,22 \pm 0,39^b$
2 % CMC 50 % S	$2,19 \pm 0,02^a$	$158,61 \pm 1,11^c$	$22,84 \pm 0,89^a$	$21,15 \pm 0,10^a$
2 % CMC 50 % T	$2,16 \pm 0,01^a$	$137,23 \pm 1,21^a$	$22,04 \pm 0,50^a$	$20,98 \pm 0,48^a$
Nakon skladištenja				
2 % CMC	$1,83 \pm 0,02^a$	$189,24 \pm 0,50^a$	$28,35 \pm 0,11^a$	$25,72 \pm 0,46^b$
2 % CMC 30 % S	$1,29 \pm 0,02^c$	$163,54 \pm 0,76^c$	$21,78 \pm 0,24^c$	$18,67 \pm 0,59^c$
2 % CMC 30 % T	$1,61 \pm 0,02^b$	$170,75 \pm 0,45^b$	$25,11 \pm 0,70^b$	$28,23 \pm 0,84^a$
2 % CMC 40 % S	$0,95 \pm 0,03^f$	$101,20 \pm 1,31^g$	$20,52 \pm 0,26^{e,f}$	$14,73 \pm 0,08^e$
2 % CMC 40 % T	$1,25 \pm 0,02^{c,d}$	$123,78 \pm 0,71^f$	$21,35 \pm 0,64^{c,d}$	$17,23 \pm 0,24^d$
2 % CMC 50 % S	$1,06 \pm 0,01^e$	$143,89 \pm 1,01^d$	$20,17 \pm 0,32^f$	$12,21 \pm 0,59^f$
2 % CMC 50 % T	$1,22 \pm 0,02^d$	$127,23 \pm 0,30^e$	$20,96 \pm 0,27^{d,e}$	$18,48 \pm 0,71^{c,d}$

CMC – karboksimetil celuloza; S – saharoza; T – trehaloza. Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima statistički su različite.

Bez obzira na primijenjenu metodu određivanja antioksidacijske aktivnosti, kontrolni uzorak odnosno gel s 2 % CMC-a imao je najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Navedeni rezultati su za očekivati s obzirom da navedeni uzorak sadrži i najviše polifenolnih komponenti. Utvrđen je sljedeći trend: gelovi s dodatkom 30 % i 40 % trehaloze imali su veću antioksidacijsku vrijednost od gelova sa saharozom, dok u gelovima s dodatkom 50 % disaharida nije bilo razlike između uzoraka, osim u slučaju CUPRAC metode. Primjenom CUPRAC metode utvrđeno je da veću antioksidacijsku aktivnost ima gel s dodatkom 50 % saharoze od gela s dodatkom trehaloze. Nakon skladištenja došlo je do promjene antioksidacijske aktivnosti. Kontrolni uzorak je zadržao najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti bez obzira na primijenjenu metodu. Primjenom FRAP i ABTS metoda utvrđeno je da gelovi s dodatkom trehaloze imaju veću antioksidacijsku aktivnost od gelova s dodatkom

4. Rezultati i rasprava

saharoze. Primjenom CUPRAC metode zadržan je isti trend kao i nakon pripreme uzoraka, a primjenom DPPH metode samo gel s dodatkom 30 % trehaloze imao je veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na gel sa saharozom, dok su preostali gelovi imali vrlo slične vrijednosti.

4. Rezultati i rasprava

4.4. PARAMETRI BOJE

U gelovima su određeni L*, a* i b* parametri te je izračunata promjena boje uzoraka. Rezultati su prikazani u **Tablici 8**.

Tablica 8 Parametri boje gelova nakon pripreme i nakon skladištenja

Uzorak	L*	a*	b*	ΔE
Sok aronije	19,60 ± 0,01 ^d	1,65 ± 0,04 ^d	1,21 ± 0,01 ^f	
Nakon pripreme				
2 % CMC	19,66 ± 0,01 ^e	1,15 ± 0,01 ^c	0,99 ± 0,04 ^c	0,55
2 % CMC 30 % S	19,09 ± 0,02 ^a	0,72 ± 0,01 ^b	0,84 ± 0,01 ^b	1,13
2 % CMC 30 % T	19,17 ± 0,00 ^b	0,58 ± 0,01 ^a	0,88 ± 0,01 ^b	1,45
2 % CMC 40 % S	19,99 ± 0,01 ^g	2,37 ± 0,00 ^g	1,03 ± 0,01 ^d	0,83
2 % CMC 40 % T	19,79 ± 0,03 ^f	1,96 ± 0,04 ^f	0,80 ± 0,03 ^a	0,54
2 % CMC 50 % S	19,20 ± 0,01 ^c	1,78 ± 0,03 ^e	1,09 ± 0,02 ^e	0,44
2 % CMC 50 % T	20,27 ± 0,00 ^h	3,29 ± 0,00 ^h	1,42 ± 0,02 ^g	1,78
Nakon skladištenja				
2 % CMC	20,12 ± 0,01 ^a	2,40 ± 0,03 ^a	1,42 ± 0,02 ^a	1,41
2 % CMC 30 % S	19,14 ± 0,01 ^c	1,87 ± 0,02 ^b	1,30 ± 0,02 ^b	1,25
2 % CMC 30 % T	19,08 ± 0,01 ^d	0,66 ± 0,03 ^e	0,86 ± 0,01 ^e	0,11
2 % CMC 40 % S	19,05 ± 0,01 ^e	1,45 ± 0,08 ^c	1,21 ± 0,01 ^c	1,33
2 % CMC 40 % T	19,50 ± 0,03 ^b	0,98 ± 0,03 ^d	1,01 ± 0,03 ^d	1,04
2 % CMC 50 % S	18,97 ± 0,01 ^f	0,72 ± 0,04 ^e	1,03 ± 0,03 ^d	1,09
2 % CMC 50 % T	18,86 ± 0,00 ^g	1,04 ± 0,06 ^d	1,23 ± 0,01 ^c	2,66

CMC – karboksimetil celuloza; S – saharoza; T – trehaloza. Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima statistički su različite. Nakon pripreme ΔE je izračunat za promjenu boje gelova u odnosu na sok aronije, a nakon skladištenja je izračunata promjena boje gelova nakon skladištenja u odnosu na gelove nakon pripreme.

L* parametar koji definira da li uzorak taman ili svijetao, za sok aronije iznosi je 19,60. Prilikom pripreme gelova, L* vrijednost kontrolnog uzorka se nije značajno promijenila, dok su gelovi s 30 % disaharida imali nižu L* vrijednost od soka aronije i kontrolnog uzorka, a ostali gelovi višu. Tijekom skladištenja došlo je do povećanja L* vrijednosti u kontrolnom uzorku. Gelovi s 30 % disaharida imali su gotovo jednaku L* vrijednost kao i nakon pripreme uzoraka, dok je kod ostali gelova utvrđeno smanjenje ovog parametra. a* vrijednost soka aronije iznosila je 1,65. Prilikom pripreme gela s karboksimetil celulozom i gelova s dodatkom 30 % disaharida utvrđeno je smanjenje ovog parametra dok je kod ostalih gelova utvrđeno povećanje. Nakon skladištenja utvrđena je promjena a* vrijednosti, kod kontrolnog uzorka i gelova s 30 % disaharida utvrđeno je povećanje, a kod preostalih gelova smanjenje ovog parametra.

4. Rezultati i rasprava

Parametar b^* za sok aronije iznosio je 1,21, a svi gelovi osim gela s 50 % trehaloze imali su nižu vrijednost ovog parametra. nakon skladištenja, utvrđeno je povećanje parametra b^* osim za uzorke s 50 % disaharida. Promjena boje gelova nakon pripreme u odnosu na sok aronije iznosi od 0,44 do 1,78. To su vrijednosti koje ljudsko oko ne može zapaziti. Ujedno i promjena boje nakon skladištenja nije dovoljno izražena da bi mogla zamijetiti ljudskim okom.

5.ZAKLJUČCI

5. Zaključci

Na osnovi provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Tip disaharida i dodana količina imali su utjecaj na ukupne polifenole, proantocijanidine, antocijane i pojedinačne polifenole u gelovima na bazi soka aronije i karboksimetil celuloze.
- Gelovi na bazi soka aronije pripremljeni samo s karboksimetil celulozom imali su veći udio polifenola, proantocijanidina i antocijane, odnosno dodatak disaharida negativno je utjecao na polifenolne komponente aronije.
- Općenito je utvrđen trend da s povećanjem količine disaharida dolazi do smanjenja udjela ukupnih polifenola, proantocijanidina i antocijana.
- Gelovi s dodatkom 30 % disaharida imali su najveći udio fenolnih komponenata s time da su gelovi s trehalozom imali veći udio navedenih komponenata.
- Tijekom skladištenja je došlo do smanjenja udjela ukupnih polifenola i antocijana, ali je trend zadržan kao i nakon pripreme gelova.
- Za razliku od ukupnih polifenola i antocijana, proantocijanidini su bili stabilni tijekom skladištenja.
- Od pojedinačnih polifenola identificirani su cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-arabinozid, rutin, neoklorogenska kiselina, klorogenska kiselina i dva derivata klorogenske kiseline.
- Za pojedinačne komponente je također utvrđeno da gelovi bez dodatka disaharida imaju najveću koncentraciju.
- Antioksidacijska aktivnost je određena primjenom DPPH, ABTS, CUPRAC i FRAP metoda te je također utvrđeno da gel s dodatkom karboksimetil celuloze ima najveći antioksidacijski potencijal.
- Određeni su parametri boje L^* , a^* i b^* te je izračunata promjena boje gelova nakon pripreme u odnosu na sok aronije i promjena boje nakon skladištenja. Vrijednosti dobivene za promjenu boje ukazuju da promjena boje nije uočljiva ljudskom oku.

6.LITERATURA

6. Literatura

Andričić B: Prirodni polimerni materijali. Sveučilište u Splitu, Split, 2009.

Asmal Rani MS, Rudhziah S, Ahmad A, Mohamed NS: Biopolymer Electrolyte Based on Derivatives of Cellulose from Kenaf Bast Fiber. *Polymers* 6(9):2371-2385, 2014.

Burek M, Waśkiewicz S, Wandzik I, Kamińska K: Trehalose – properties, biosynthesis and applications. *Chemik* 2015, 69, 8, 469-476.

Ćorković I, Rajchl A, Škorpilova T, Pichler A, Šimunović J, Kopjar M: Evaluation of Chokeberry/Carboxymethylcellulose Hydrogels with the Addition of Disaccharides: DART-TOF/MS and HPLC-DAD Analysis. *International Journal of Molecular Science* 2023, 24(1), 448.

Ćujić N, Kundaković T, Šavikin K: Antocijani – hemijska analiza i biološka aktivnost. Pregledni rad. *Lekovite Sirovine*. Vol. 33, 19-37, Beograd, 2013.

Generalić I: Fenolni profil, antioksidacijski i antimikrobni potencijal odabranog ljekovitog mediteranskog podneblja. Doktorska disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2011.

Gramza-Michałowska A, Sidor A: Black Chokeberry *Aronia Melanocarpa* L.-A Qualitative Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential. *Molecules*. Oct 15;24(20):3710, 2019.

Horvatić I: Utjecaj količine saharoze i trehaloze na fenolne i hlapljive komponente u punilima na bazi kupine. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2020.

Janjatović G: Utjecaj dodatka saharoze i trehaloze na adsorpciju fenola aronije na proteine smeđe riže. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2020.

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

Jašić M: Biološki aktivni sastojci hrane, dodaci prehrani, funkcionalna hrana i fortifikacija hrane. Tehnološki fakultet, Tuzla, 2010.

Jovanović D: Utjecaj dodatka saharoze i trehaloze na udio fenola, antioksidativnu aktivnost i boju soka jabuke. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2012.

6. Literatura

Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, Snopek L, Orsavova J: Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules*, 7;22(6):944, 2017.

Karadag A, Ozcelik B, Saner S: Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal Met*, 2:41-60., 2009.

Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol*, 55: 279-290, 2004.

Kokotkiewicz A, Jeremicz Z, Luczkiewicz M: Aronia plants: A review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *Journal of Medicinal Food* 13(2):255-269, 2010.

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

Krešić V: Adsorpcija polifenolnih spojeva iz jabuke na β -glukanu. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2017.

Krivak P: Utjecaj različitih skupina polifenolnih spojeva prisutnih u aroniji na njezinu antiradikalnu aktivnost. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2010.

Krtanjek J: Zaslađivači i zdravlje. Diplomski rad. Medicinski fakultet, Zagreb, 2014.

Kulling SE, Rawel HM: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica* 74(13):1625-1634, 2008.

Mihić Đ: Reološka svojstva brašna s dodatkom karboksimetilceluloze, mliječne kiseline i starter kulture. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2009.

Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden J: Review of natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules* 15:6905-6930, 2010.

Nowak D, Grąbczewska Z, Gośliński M, Obońska K, Dąbrowska A, Kubica J: Effect of chokeberry juice consumption on antioxidant capacity, lipids profile and endothelial function in healthy people; a pilot study. *Czech journal of food science* 34(1):39-46, 2016.

6. Literatura

Lukačević I: Određivanje ukupnih antocijanina, ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti voća spektroskopskim metodama. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, Osijek, 2007.

Oszmianski J, Wojdylo A: Aronia melanocarpa Phenolics and their Antioxidant Activity. *Eur Food Res. Tech.* 221:809-813, 2005.

Parčetić-Kostelac I, Bešlo D, Šperanda M, Jović T, Đidara M, Kopačin T, Jozinović A: Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja. *Stočarstvo: Časopis za unapređenje stočarstva*, Vol. 70 No. 2, 2016.

Pavlović AN, Brčanović JM, Veljković JN, Mitić SS, Tošić SB, Kaličanin BM, Kostić DA, Đorđević MS, Velimirović DS: Characterization of commercially available products of aronia according to their metal content. *Fruits*, Vol. 70 (6): 385–393, 2015.

Roberfroid MB: Defining functional foods. In *Functional foods, Concept to product*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, (9-25). Cambridge, 2001.

Saibabu V, Fatima Z, Ahmad Khan L, Hameed S: Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 2015, 1-10, 2015.

Shahidi F, Zhong Y: Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* 18: 757–781, 2015.

Tanaka T, Tanaka A: Chemical components and characteristics of black chokeberry. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Japan)* 48: 606 – 610, 2001.

Tolić MT, Jurčević IL, Krbavčić IP, Marković K, Vahčić N: Phenolic content, antioxidant capacity and quality of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Food technology and biotechnology*. 53(2):171-179, 2015.

Tsao R: Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2(12): 1231-1246, 2010.

Vranić K: Svojstva trehaloze i njena primjena u prehrambenoj industriji. Diplomski rad. Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet, Mostar, 2015.

6. Literatura

Zhang Y, Zhao Y, M Liu X, Chen X, Ding C, Dong L, Zhang J, Suna S, Ding Q, Khatoom S, Cheng Z, Liu W, Shen L, Xiao F: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) as a new functional food relationship with health: an overview. *Journal of Future Foods*. 1-2: 168-178, 2021.

Wade L: *Organska kemija*. Školska knjiga, Zagreb, 2017.

Web 1: <https://www.savjetodavna.hr/2013/09/18/aronija/> [16.08.2022.]

Web 2: <https://prirodni-sokovi.hr/aronija-i-sve-o-njoj/> [19.08.2022.]

Web 3: <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/fd4e4aca-de35-49a7-9436-638df9b1c154/ugljikohidrati.html> [12.09.2022.]

Web 4: <https://www.doccheck.com/de/detail/photos/42165-strukturformel-trehalose> [21.09.2022.]

Web 5:

<https://repozitorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma%3A524/datastream/PDF/view> [23.09.2022.]

Web 6: <https://www.dstech.com.my/konica-minolta-chroma-meter-cr-400/> [25.09.2022.]

Web 7: <https://hakkisenkeser.blogspot.com/2018/01/renk-ve-boyar-madde-nedir.html> [23.09.2022.]

Web 8: http://www.ptfos.unios.hr/projekti/kopjar/?page_id=7&lang=hr [15.09.2022.]