Primjena biljnih ekstrakata u proizvodnji funkcionalnih napitaka

Kapo, Azra

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:551505

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO - BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Azra Kapo

748/PI

PRIMJENA BILJNIH EKSTRAKATA U PROIZVODNJI FUNKCIONALNIH NAPITAKA

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta "Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane" (IP-PE-FF) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva te Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Verice Dragović-Uzelac, te uz pomoć dr.sc. Ivone Elez Garofulić.

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Verici Dragović–Uzelac na velikoj pomoći i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada, kao i asistentici dr.sc. Ivoni Elez Garofulić na svim savjetima i pomoći tijekom provedbe eksperimentalnog dijela i izrade rada.

Zahvaljujem se svojim roditeljima i bratu na neizmjernoj podršci tijekom cijelog mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA BILJNIH EKSTRAKATA U PROIZVODNJI FUNKCIONALNIH NAPITAKA

Azra Kapo, 748/PI

Sažetak: U ovom istraživanju ispitana je mogućnost primjene biljnih ekstrakata cvijeta i lista trnine i gloga te lista masline u proizvodnji funkcionalnih napitaka. Biljni ekstrakti su dobiveni konvencionalnim postupkom ekstrakcije, a u koncentracijama 0,5%, 1%, 1,5%, 2% i 2,5% ekstrakt svake pojedine biljke dodavan je u sok jabuke. U svim ekstraktima i funkcionalnim napitcima određivana je topljiva suha tvar, pH vrijednost, senzorska svojstva (boja, aroma, miris, okus i opći dojam) te koncentracija ukupnih fenola. Topljiva suha tvar i pH vrijednost su bile podjednake u gotovo svim uzorcima. Dodatak biljnih ekstrakata u sok jabuke značajno je utjecao na senzorska svojstva, a funkcionalni napitci koji su sadržavali 2% biljnog ekstrakta su pokazali bolju opću prihvatljivost kod ocjenjivača. Najviše izražena senzorska svojstva u pripremljenim napitcima su bila intenzivna žuta boja, aroma, okus i miris po jabuci, te slatki okus. Najveći udio ukupnih fenola određen je u ekstraktu trnine, dok je kod obogaćenih sokova jabuke najveći udio ukupnih fenola određen u soku jabuke obogaćen ekstraktom gloga u koncentraciji od 2%.

Ključne riječi: biljni ekstrakti, sok jabuke, senzorska svojstva, ukupni fenoli

Rad sadrži: 53 stranice, 16 slika, 4 tablice, 62 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr.sc. Verica Dragović-Uzelac

Pomoć pri izradi: dr.sc. Ivona Elez Garofulić, asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Branka Levaj (predsjednica)

2. Prof. dr.sc. Verica Dragović-Uzelac (mentorica)

3. Doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević (član)

4. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić (zamjena)

Datum obrane: 25. rujna, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

APPLICATION OF HERBAL EXTRACTS IN THE PRODUCTION OF FUNCTIONAL BEVERAGES

Azra Kapo, 748/PI

Abstract: In this research, the possibility of using flower and leaf extracts of blackthorn and hawthorn as well as olive leaf extracts in the production of functional beverages was examined. Herbal extracts were obtained by conventional extraction procedure, and extract of each herb in concentrations of 0.5%, 1%, 1.5%, 2% and 2.5% was added in apple juice. In all extracts and functional beverages, the following parameters were determined: soluble dry matter, pH value, sensory properties (colour, aroma, scent, flavour and general impression) and concentration of total phenols. The soluble dry matter and pH value were uniform in almost all samples. The addition of herbal extracts in apple juice significantly affected the sensory properties. Beverages containing 2% herbal extract resulted in the best sensory properties. The most pronounced sensory properties in prepared beverages were: intense yellow color, aroma, taste and scent of apples and sweet taste. The highest content of total phenols was determined in blackthorn extract, while in enriched apple juices the highest content of total phenols was determined in apple juice enriched with a 2% concentration of hawthorn extract.

Keywords: herbal extracts, apple juice, sensory properties, total phenols

Thesis contains: 53 pages, 16 figures, 4 tables, 62 references

Original in: Croatian

GraduateThesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full professor

Technical support and assistance: PhD. Ivona Elez Garofulić, Research Assistant

Reviewers:

1. PhD. Branka Levaj, Full professor

2. PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full professor

3. PhD. Danijela Bursać Kovačevič, Assistant Professor

4. PhD. Karin Kovačević Ganić, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 25, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 3
   2.1. FUNKCIONALNI PROIZVODI 3
      2.1.1. Funkcionalni napitci 4
      2.1.2. Funkcionalni napitci na bazi biljnih ekstrakata 5
   2.2. BILJNI EKSTRAKTI-DEFINICIJA, PROIZVODNJA I PRIMJENA 8
      2.2.1. Definicija i podjela biljnih ekstrakata 8
      2.2.2. Proizvodnja biljnih ekstrakata 9
      2.2.3. Primjena biljnih ekstrakata u proizvodnji funkcionalnih pića 12
   2.3. SELEKTIRANE BILJNE VRSTE U PROIZVODNJI BILJNIH EKSTRAKATA 13
      2.3.1. TRNINA (*Prunus spinosa* L.) 14
      2.3.2. GLOG (*Crataegus* spp.) 15
      2.3.3. LIST MASLINE (*Olea Europaea* L.) 17
   2.4. SENZORSKA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA 18
      2.4.1. Senzorska analiza 19
      2.4.2. Senzorske analize voćnih sokova i biljnih ekstrakata 20
3. EKSPERIMENTALNI DIO 22
   3.1. MATERIJALI 22
      3.1.1. Uzorci 22
   3.2. METODE RADA 23
      3.2.1. Priprema biljnih ekstrakata 23
      3.2.2. Priprema obogaćenih sokova jabuke 24
      3.2.3. Određivanje topljive suhe tvari 25
      3.2.4. Određivanje pH vrijednosti 26
      3.2.5. Senzorska analiza obogaćenih sokova jabuke 27
      3.2.6. Određivanje ukupnih fenola 28
4. REZULTATI I RASPRAVA 31
5. ZAKLJUČCI 47
6. LITERATURA 48

1. UVOD

Posljednjih godina zabilježen je povećan interes potrošača za nutritivno vrijednom i kvalitetnom hranom koja sadrži bioaktivne komponente s potencijalnim pozittivnim utjecajima na zdravlje. Kako bi udovoljili trendovima i zahtjevima potrošača i tržišta proizvođači hrane pokušavaju razviti nove prehrambene proizvode koji će privlačiti široki krug potencijalnih potrošača i postati konkurentni na tržištu. Prehrambena industrija fokusirana je na dvije kategorije proizvoda, od koji se prva bazira na vraćanju proizvodnji prirodnih i tradicionalnih proizvoda koji su minimalno prerađeni, dok druga kategorija obuhvaća proizvodnju funkcionalne hrane (Pinacho i sur., 2015). Proizvodnja funkcionalne hrane osim što predstavlja veliki izazov za prehrambenu industriju, posljednjih godina bilježi značajan rast u gotovo svim segmentima te i u segmentu proizvodnje funkcionalnih napitaka. Zahtjevno tržište diktira potražnju za proizvodima visoke biološke i nutritivne vrijednosti, s potencijalnim zdravstvenim učincima te senzorskim svojstvima, što je jedna od osnovnih karakteristika funkcionalne hrane (Siro i sur., 2008).

Značajan segment u kategoriji funkcionalnih proizvoda predstavljaju funkcionalna i obogaćena pića koja se baziraju na biljnim ekstraktima koji su bogat izvor različitih skupina bioaktivnih spojeva. Jednu od važnih skupina bioaktivnih spojeva čine fenolni spojevi koji su prisutni u brojnim biljnim vrstama i koji imaju izrazit antioksidacijski potencijal, a brojne studije svjedoče o potencijalnim zdravstvenim utjecajima polifenola u sprječavanju degenerativnih promjena, pojave kardiovaskularnih bolesti i raka (Pinacho i sur., 2015). Do sada je iz različitih biljnih izvora (voće, povrće, ljekovito i aromatično bilje i sl.) izolirano i identificirano oko 8000 različitih fenola, a među značajne izvore fenola spadaju i biljne vrste poput trnine, gloga i lista masline. Dosadašnja istraživanja potvrđuju da fenolni spojevi navedenih biljaka osim što su poznati kao jaki antioksidansi pokazuju i antimikrobna, protuupalna te brojna druga djelovanja.

Iz biljnih vrsta bogatih fenolnim spjevima proizvode se biljni ekstrakti koji se u konačnici koriste za proizvodnju funkcionalnih pića zadovoljavajućih bioloških, nutritivnih i senzorskih svojstava. Biljni ekstrakti dopušteni za ljudsku prehranu, potječu od jedne vrste ili od više vrsta bilja a dobivaju se vodenom ili alkoholnom ekstrakcijom, digestijom, maceracijom ili destilacijom različitih dijelova bilja. U biljnim ekstraktima potrebno je ispitati sastav i količinu djelatnih tvari, djelatne doze koje mogu postići potencijalne pozitivne učinke, genotoksičnost i sl. kako bi se osigurala sigurna upotreba u skladu sa zahtjevima struke. Voćni sokovi poput soka jabuke na tržištu su prisutni kao gotovi proizvodi, ali su također vrlo dobar medij za proizvodnju funkcionalnih, obogaćenih sokova, te bezalkoholnih

pića. U okviru istraživanja koja se provode u sklopu projekta „Application of innovative technologies for production of plant extract as an ingredients for functional food“ (HRZZ, 2014-2018) dokazano je da biljni ekstrakti cvijeta i lista trnine, gloga i lista masline sadrže različite skupine fenolnih spojeva izrazitog antioksidacijskog potencijala te se stoga mogu primjenjivati za obogaćivanje voćnih sokova poput soka jabuke.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati mogućnost upotrebe biljnih ekstrakata cvijeta i lista trnine i gloga te lista masline u proizvodnji funkcionalnih pića na bazi soka jabuke. Istraživanjem je obuhvaćeno određivanje utjecaja koncentracije dodanih ekstrakata (0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5%) na fizikalno kemijska svojstva (topljiva suha tvar i pH vrijednost), senzorska svojstva (boja, aroma, miris, okus i opći dojam) te udio ukupnih fenola u soku jabuke obogaćenom biljnim ekstraktima u usporedbi sa čistim sokom jabuke.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FUNKCIONALNI PROIZVODI

Pojam „funkcionalna hrana“ prvi je put uveden 1980. godine u Japanu kao rezultat mnogih istraživanja kako bi se definirali oni prehrambeni proizvodi koji su obogaćeni bioaktivnim sastojcima za koje je znanstveno utvrđeno da imaju povoljno djelovanje na zdravlje ljudi. Koncept funkcionalne hrane je razvijen zbog slijedećih razloga: poboljšavanja općeg stanje organizma, smanjivanja rizika od pojave nekih bolesti i/ili upotrebe u liječenju određenih bolesti. Prema provedenoj anketi pod nazivom Euromonitor iz 2014. godine najveće svjetsko tržište funkcionalne hrane je upravo Japan, zatim slijedi SAD, pa Europa. Ova 3 dominantna tržišta doprinose više od 90 % od ukupne prodaje funkcionalnih proizvoda u svijetu (Bigliradi i Galati, 2013). Samo između 1988. i 1998. godine u Japanu je više od 1700 funkcionalnih proizvoda stavljeno na tržište, a do 2001. godine registrirano je čak 271 različitih prehrambenih proizvoda FOSHU statusa (Food for Specified Health Use) za koje su dokazane specifične znanstvene tvrdnje (Menrad, 2003). Što se tiče Europe, glavna tržišta su Velika Britanija, Njemača, Francuska i Italija. Funkcionalna hrana je razvijena u gotovo svim kategorijama hrane (tablica 1), a oni najzastupljeniji na tržištu su mlijeko i mliječni proizvodi, voćni sokovi, pekarski te mesni proizvodi. S gledišta proizvoda postoji klasifikacija vrsta funkcionalne hrane, a to su:

1. Nemodificirana i neprerađena hrana (eng. *whole food*) u koju spada najjednostavniji oblik funkcionalne hrane, odnosno hrana u svom prirodnom obliku (primjer: borovnice)
2. Obogaćeni proizvodi u koje spadaju dvije grupe prozvoda: hrana obogaćena dodanim nutrijentima kao što su voćni sokovi obogaćeni vitaminom C, vitaminom E, folnom kiselinom, cinkom i kalcijem (eng. *fortified food*) i hrana obogaćena s dodanim novim nutrijentima ili komponentama koje se prirodno ne nalaze u određenoj hrani kao što su probiotici ili prebiotici (eng. *enriched food*).
3. Izmjenjeni proizvodi (eng. *altered food)* obuhvaćaju hranu iz koje je uklonjena štetna komponenta, smanjena njena koncentracija ili zamijenjena drugom komponentom s blagotvornim učinkom kao što su mesni proizvodi s dodanim vlaknima (sredstvo za otpuštanje masnoća u mesu) i sladoled.
4. Poboljšani proizvodi (eng. *enhanced commodities*) koji obuhvaćaju hranu u kojoj je jedna od komponenti prirodno pojačana kroz specijalne uvjete uzgoja, genetske

modifikacije i sl. Primjer takvog proizvoda su jaja s povećanim udjelom omega-3-masnih kiselina (Bigliradi i Galati, 2013).

Tablica 1. Najvažniji funkcionalni proizvodi prisutni na svjetskom tržištu (Rimac Brnčić, 2016)

FUNKCIONALNI PREHRAMBENI PROIZVODI
Probiotici (*Lactobacillus spp., Bifidobacteria spp.)*
Prebiotici (inulin, fruktooligosaharidi, pirodekstrini)
Funkcionalni napitci (regulacija tjelesne mase, energetski napitci, sportski napitci, *ready-to-drink* kava/čaj)
Funkcionalne žitarice (proizvodi na bazi zobi, ječma, beta glukani)
Funkcionalno meso (mesni proizvodi s dodanim funkcionalnim sastojcima, mesni proizvodi modificirani tijekom procesa proizvodnje, reformulirani mesni proizvodi)
Jaja (obogaćena omega-3-masnim kiselinama, vitaminom E, selenom, CLA, luteionom)

2.1.1. Funkcionalni napitci

Funkcionalni napitak se može definirati kao proizvod koji potrošaču, osim svoje primarne funkcije- hidratacije ljudskog organizma, nudi i dodatne benefite koje su najčešće direktno povezane s pozitivnim utjecajem na ljudsko zdravlje (Ashurst, 2005). Postoje različite podjele funkcionalnih napitaka, a prema većini istraživanja dijele se na mliječne napitke, biljne i voćne napitke, sportske te energetske napitke. Globalno tržište funkcionalnih napitaka se procjenjuje na oko 130 milijardi dolara u 2014. godini, dok u Sjedinjenim Američkim Državama se tržište funkcionalnih napitaka procjenjuje na oko 59 % od ukupnog tržišta funkcionalne hrane u SAD-u do 2014. godine (Corbo i sur., 2014).

Najzastupljenija kategorija funkcionalnih napitaka su bezalkoholna pića koja su najčešće obogaćena vitaminima A, C i E ili nekim drugim funkcionalnim sastojcima. Iako postoji relativno velik broj proizvoda dostupnih u ovoj kategoriji, tržište je još uvijek malo i fragmentirano na većinu europskih zemalja. Jedna od vodećih europskih zemalja s razvijenim tržištem funkcionalnih napitaka je Njemačka, a smatra se da tome najviše doprinosi potrošnja tzv. ACE napitaka. Druge vrste funkcionalnih napitaka koji se mogu najčešće naći na tržištu su oni čija je svrha snižavanje kolesterola u krvi (dodatkom omega-3-masnih kiselina i soje),

„*eye health*“ napitci obogaćeni luteinom te „*bone health*“ napitci obogaćeni kalcijem i inulinom. U Estoniji je, naprimjer, proizveden napitak obogaćen inulinom, L-karnitinom, vitaminima, kalcijem i magnezijem kao funkcionalnim sastojcima pod trgovačkim nazivom Largo. Jednu od kategorija funkcionalnih napitaka kao što je navedeno čine energetski i sportski napitci. Utvrđeno je da naporno vježbanje može povećati oksidacijski stres kroz povećano stvaranje reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih (RON) vrsta. Upravo zbog toga se u sportu često koriste tzv. izotonični napitci koji služe za rehidrataciju organizma, obnavljanju i podizanju razine energije i nadoknađivanje elektrolita u organizmu izgubljenih znojenjem. Takvi napitci sadrže jednostavne ugljikohidrate, minerale, elektrolite (npr. natrij, kalij, kalcij, magnezij), a mogu sadržavati i vitamine ili dodatne hranjive tvari. Primjer jednog sličnog proizvoda, ispitivanog u istraživanju iz 2013. godine, je napitak s prirodnim antioksidansom iz bobičastog voća i trnine te sokom od limuna. Zaključeno je da sastav tako formuliranog proizvoda može pridonijeti izbjegavanju negativne redoks ravnoteže u organizmu izazvane intenzivnom sportskom aktivnošću (Girones-Vilaplana i sur., 2013).

2.1.2. Funkcionalni napitci na bazi biljnih ekstrakata

Proizvođači različitih vrsta pića, pa tako i funkcionalnih napitaka kao bazu u proizvodnji često koriste biljne ekstrakte. Prema Međunarodnom izvješću o funkcionalnim bezalkoholnim pićima iz 2003. godine koje pokriva Sjedinjene Američke Države, Japan i 16 zemalja zapadne Europe (Zenith, 2003) biljni napitci spadaju u funkcionalne napitke te imaju sve veću važnost u ovom sektoru. Nažalost vrijednost biljnih ekstrakata i njihov biološki potencijal još uvijek nisu dovoljno prepoznati od strane proizvođača ili proizvođači iz ekonomskih razloga pribjegavaju upotrebi konzervansa, stabilizatora, aroma i zaslađivača. Smatra se kako je biljka ginseng prije otprilike 5000 godina prva priznata kao biljka koja sadrži bioaktivne komponente povoljne za ljudsko zdravlje te se tradicionalno konzumirala kao infuzija napravljena od suhog korijena te biljke. Osim infuzija kao najjednostavnije kategorije biljnih ekstrakata, kasnije su se počeli tradicionalno proizvoditi likeri od različitih biljnih vrsta i to isključivo ljekovite namjene za olakšavanje tjelesne i mentalne iscrpljenosti te liječenje glavobolja (Ashurst, 2005). Biljni ekstrakti koji se često koriste za proizvodnju funkcionalnih napitaka su ekstrakti matičnjaka, ginsenga, biljke ginko te guarane (Gruenwald, 2009).

Promjenom životnog stila, ponajviše u visoko razvijenim društvima i slojevima višeg životnog standarda, sredinom 1980-ih godina započela je nova era biljnih napitaka kao posljedica povećane brige za osobno zdravlje te razvijanja svijesti i povećane potrebe za konzumacijom prirodnih proizvoda. Zbog toga se proizvodnja funkcionalnih napitaka, uključujući one s biljnim ekstraktima, zasniva na dobivanju takvog proizvoda koji će direktno ili indirektno pozitivno utjecati na jačanje imunološkog sustava te preventivno smanjiti ili onemogućiti razvoj različitih oboljenja (Ashurst, 2005). Bioaktivni spojevi koji su izrazito važni za biološka svojstva funkcionalnih napitaka su prvenstveno polifenoli, karotenoidi, vitamini i minerali, ali i mnogi drugi ovisno o kakvom napitku je riječ. Navedene komponente su vrlo labilne te mogu biti lako degradirane pod utjecajem svjetlosti, topline ili kisika. Glavno svojstvo ovih spojeva je što djeluju kao antioksidansi, odnosno njihova funkcija je neutralizacija slobodnih radikala i zaštita stanice čime se sprječava pojava i razvoj različitih bolesti vezanih za oksidativni stres. Voće, povrće te različite biljne vrste su dominantan izvor polifenola, karotenoida, vitamina i minerala, ali s obzirom da se s današnjom prehranom ne unose dovoljne količine antioksidansa potrebno ih je unositi putem suplemenata prehrani (Mendiola i sur., 2008; Segundo i sur., 2007).

U samom početku razvoja funkcionalnih napitaka u njih je dodavan voćni sok ili prirodno identična aroma okusa određenog voća, nakon čega su pasterizirani kako bi se izbjegla upotreba konzervansa. Kasnije su se počeli dodavati biljni ekstrakti u bezalkoholna pića na bazi voćnog soka te u flaširane vode. Nekoliko biljnih napitaka koji se nalaze na tržištu imaju i certifikat organskog proizvoda jer je upotrijebljeno organski uzgojeno voće ili bilje. Osim nutritivne i biološke vrijednosti važno je da je funkcionalni napitak i potrošaču privlačnih i prihvatljivih senzorskih svojstava (Ashurst, 2005).

S obzirom da su prirodne komponente poželjnije od sintetskih, napitci koji sadrže funkcionalne biljne sastojke prepoznati su na tržištu i prihvaćeni od strane potrošača. Budući da je ovo segment prehrambene industrije koji bilježi stalan porast, postojeći proizvodi se stalno unaprijeđuju čemu svjedoče primjeri funkcionalnih napitaka poput obogaćene vode, čaja ili mliječnih napitaka koji su dobili status zdravog napitka. Primjena biljnih ekstrakta u proizvodnji funkcionalnih napitaka ima brojne prednosti budući sadrže široki raspon bioaktivnih komponenata. Osim različitih biljnih vrsta koje se koriste u proizvodnji biljnih ekstrakata, značajna je i primjena bioaktivnih spojeva iz drugih izvora kao što su npr. mikroalge. Mikroalge koje rastu u vodenom mediju imaju prednost u usporedbi s nekim višim biljkama budući su lako probavljive jer nemaju stanični zid, a različita istraživanja su

pokazala da učinkovito djeluju i štite organizam od različitih bolesti. Aloe vera je još jedan primjer biljke poželjnog sastava preko 200 bioaktivnih komponenti zbog kojeg se sve više koristi u proizvodnji napitaka. Među mnogim pozitivnim učincima koji se pripisuju bioaktivnim komponentama biljnih ekstrakata selektiranih biljnih vrsta, a koji dolaze najviše do izražaja u funkcionalnim napitcima su imunostimulacija, uspostavljanje probavne ravnoteže, antidijabetičko i protuupalno djelovanje. Popularni, ali ne i novi biljni sastojak je i citronovac koji također ima određena terapijska svojstva te se koristi za olakšavanje grčeva probavnog trakta i jačanje živčanog sustava. Lišće ove biljke se često koristi za proizvodnju biljnog čaja, a ekstrakti se koriste u proizvodnji funkcionalne vode. U ovoj skupini je važno spomenuti u različite vrste čajeva odnosno ekstrakte čajeva koji se mogu dodati vodi i time proizvesti funkcionalni napitak. Čajevi koji se najčešće koriste su crni, zeleni i bijeli čaj (*Camellia sinensis*). Istraživanja su pokazala razne benefite spomenutih čajeva, pa tako napitci na bazi crnog čaja štite stanice i tkiva od oksidacijskog oštećenja uklanjanjem slobodnih radikala, napitci na bazi zelenog čaja su popularni sastojci suplemenata za mršavljenje dok napitci na bazi bijelog čaja pokazuju potencijalna antikancerogena svojstva. Općenito, može se zaključiti da je biljno carstvo neiscrpan izvor novih biljnih vrsta i bioaktivnih komponenti koji imaju potencijal primjene u proizvodnji novih funkcionalnih napitaka na bazi biljnih ekstrakata (Gruenwald, 2009).

Napitci na bazi žitarica imaju ogroman potencijal u formuliranju funkcionalnih proizvoda, a tome doprinosi velik broj bioaktivnih spojeva kao što su antioksidansi, dijetetska vlakna, minerali, probiotici i vitamini. Zdravstveni učinci dijetetskih vlakana u ovakvoj vrsti proizvoda su dobro poznati, a izazov predstavlja tehnološki postupak proizvodnje zbog povećane viskoznosti ovakve vrste proizvoda koja je posljedica prisutnosti većeg udjela vlakana te također sprječavanje gubitka vitamina i minerala. Uz sve navedeno potrebno je formulirati nutritivno vrijedan proizvod, zadovoljavajućih bioloških, fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava kako bi se ispunili zahtjevi potrošača (Kreisz i sur., 2008).

2.2. BILJNI EKSTRAKTI-DEFINICIJA, PROIZVODNJA I PRIMJENA

2.2.1. Definicija i podjela biljnih ekstrakata

Biljni ekstrakti se mogu definirati kao spoj ili smjesa spojeva dobiveni iz svježih ili osušenih aromatičnih biljaka ili dijelova biljaka kao što su list, cvijet, sjemenke, korijen ili kora, različitim postupcima ekstrakcije. Aktivni spojevi iz tih biljaka se dobivaju zajedno s ostalim spojevima iz biljne mase. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljnih materijala je dio fitofarmaceutske i prehrambene tehnologije (Vinatoru, 2001).

Tako dobiveni proizvodi biljaka su relativno složene smjese metabolita, u tekućem ili polukrutom stanju ili u stanju suhog praha (nakon uklanjanja otapala), te su namijenjeni za oralnu ili vanjsku upotrebu. To uključuje grupe biljnih pripravaka poznate kao: infuzije, dekokti, tekući ekstrakti, polukruti (pilularni) ekstrakti, praškasti ekstrakti i tinkture (Handa i sur., 2008). Infuzija je opći naziv za ekstrakte koji nastaju prelaskom biljnih sirovina u tekućinu. Tradicionalno, infuzije se proizvode zalijevanjem sušene biljke kipućom vodom, ostavljajući je da se natopi, a zatim se iscijedi nastala tekućina. Suvremene infuzije za primjenu u napitcima se uglavnom proizvode pri sobnoj temperaturi, ali se u tekućini koristi alkohol. Dekokti su ekstrakti dobiveni dekokcijom koja podrazumijeva varijantu općeg procesa dobivanja infuzije, odnosno kuhanjem biljaka u ključaloj vodi. Tekući ekstrakti su najjednostavniji i najčešće upotrijebljeni tipovi ektrakata. Polukruti ekstrakti se inicijalno proizvode kao tekući ekstrakt, ali se koncentriranje provodi tako dugo dok se ne postigne sadržaj vlage 30 % ili manje. Ovakav ekstrakt ima teksturu guste paste ili viskoznog sirupa i obično je tamnosmeđe boje. Praškasti ekstrakti se proizvode metodama uklanjanja vlage iz tekućeg ili polukrutog ekstrakta. Tinktura je ekstrakt sobne temperature koja je proizvedena s visokim postotkom alkohola u ekstrakcijskoj tekućini, tipično sa 60-70 % ili više (Ashurst, 2005). Osnovni parametri koji utječu na kvalitetu biljnog ekstrakta su: dijelovi biljke korišteni kao polazni materijal, otapalo koje se koristi za ekstrakciju te sama metoda ekstrakcije (Handa i sur., 2008). Kod proizvodnje te kasnije upotrebe biljnih ekstrakata u proizvodnji funkcionalnih napitaka važno je uzeti u obzir stabilnost ekstrakta, mutnoću i biodostupnost bioaktivnih komponenti (Ashurst, 2005).

Ovisno o komponentama koje su sastavni dio biljnog ekstrakta, odnosno funkcionalnog napitka, tijekom skladištenja može doći do određenih promjena poput stvaranja taloga, zamućenja i sl, te je takve pojave važno istaknuti na etiketi proizvoda. Također,

tijekom skladištenja je važno odabrati i adekvatnu ambalažu naročito kod proizvoda koji sadrže fotoosjetljive komponente koje su podložne fotooksidaciji i fotoizomerizaciji (Ashurst, 2005).

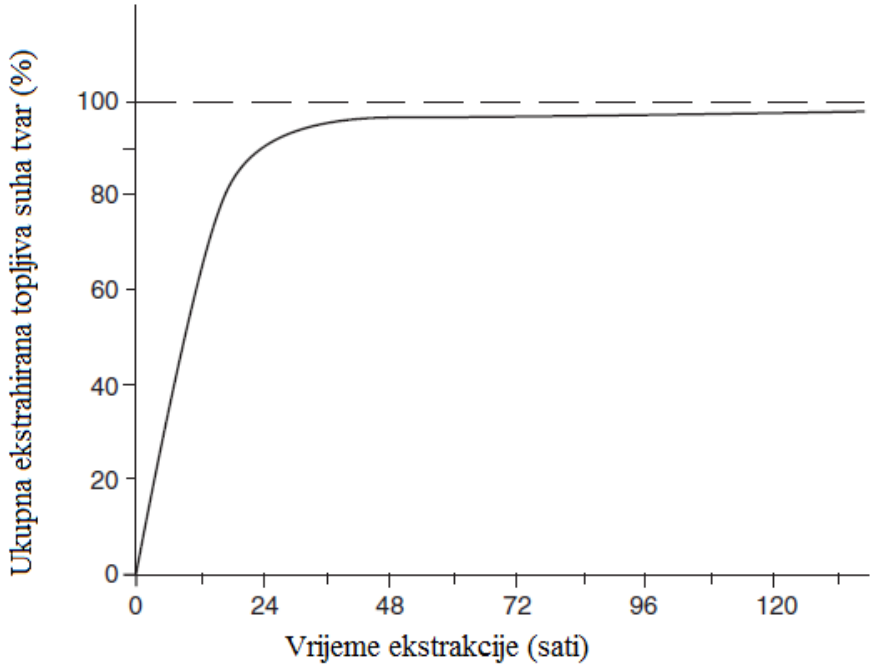
Ukoliko je proizvod, za koji je namijenjen biljni ekstrakt, mutni napitak poput voćnog soka, tada se taj proizvod u svom pakiranju može protresti svaki put da se talog ponovno dispergira prije vaganja proizvoda. Ukoliko je važno da ekstrakt bude bistar, treba pažljivo provesti postupak dekantiranja prilikom vaganja za proizvodnu seriju. Također, treba obratiti pažnju na stabilnost boje biljnog ekstrakta prilikom dužeg skladištenja jer može doći do promjene boje što posljedično stvara probleme kod potrošača. Isto tako, bitno je razmotriti interakcije koje mogu nastati interakcijom komponenti biljnog ekstrakta i bazičnog matriksa u koji se ekstrakt dodaje kako bi se izbjeglo stvaranje kompleksa koji mogu uzrokovati taloženje, mutnoću, opalescenciju, promjenu boje i sl. Pojava zamućenja i/ili opalescencije se najčešće objašnjava razlikom u pH vrijednosti između ekstrakta i gotovog proizvoda. Tekući biljni ekstrakti obično imaju pH vrijednost oko 5,5-6,5 dok bezalkoholna pića imaju pH vrijednost oko 3,0. Razlika u pH vrijednostima se najčešće rješava prethodnim kondicioniranjem ekstrakta do približne pH vrijednosti krajnjeg proizvoda (Ashurst, 2005).

2.2.2. Proizvodnja biljnih ekstrakata

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari pomoću različite topljivosti otapala koje se koristi (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Odabir otapala za ekstrakciju je jedan od važnijih faktora o kojem značajno ovisi uspješnost samog postupka ekstrakcije, a vrši se u ovisnosti o svojstvima komponente koju se želi ekstrahirati. Otapalo mora imati što nižu točku ključanja kako bi se olakšalo odvajanje otapala od komponente, ne smije reagirati s komponentama ekstrakta, mora imati nisku viskoznost, mora biti stabilno pri postavljenim uvjetima ekstrakcije (temperatura, kisik, svijetlost i sl.) te ne smije biti štetno za ljudsko zdravlje i okoliš (Albu i sur., 2004). Za proizvodnju biljnih ekstrakata najčešće se koriste vodene otopine alkohola i to najčešće etanola, ali se postupak ekstrakcije ovisno o namjeni ekstrakta može provoditi i primjenom drugih otapala poput heksana koji je lako dostupan, jeftin i efikasan, izopropanola, propilen glikola, glicerina, acetona i sl. Za ekstrakciju se često kao otapalo koristi i voda jedno od najpolarnijih otapala koje je pogodna za izolaciju polarnijih komponenti. Manje polarna otapala poput propilen glikola, glicerina, acetona i sl. uglavnom se koriste za ekstrakciju nepolarnih komponenti

poput ulja, masti i smole. Nakon završene ekstrakcije otapalo je potrebno ukloniti iz smjese (Ashurst, 2005).

Postoje različite metode ekstrakcije, od kojih su konvencionalne: ekstrakcija otapalom (vodena ili alkoholna), destilacija te hladno prešanje korišteno uglavnom u industriji ulja. Nekonvencionalne metode obuhvaćaju ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima, ekstrakciju potpomognutu visokim tlakom, ultrazvučnu ekstrakciju i ekstrakciju upotrebom superkritičnih fluida (Vinatoru i sur., 2001). Važni parametri ekstrakcije koji utječu na kvalitetu dobivenog ekstrakta su temperatura i vrijeme ekstrakcije, veličina čestica sirovog materijala te količina korištenog otapala. Temperatura utječe na topljivost i difuziju otapala te također na viskoznost i površinsku napetost tekućina. Prilikom ekstrakcije iz prirodnih proizvoda poput biljaka potrebno je koristiti blaže uvjete poput umjerene temperature i zaštite od svjetlosti i kisika, da se spriječi degradacija termo osjetljivih spojeva što bi rezultiralo smanjenom kvalitetom proizvoda. Vrijeme ekstrakcije je parametar koji je izravno povezan sa temperaturom. Iako produženje procesa poveća iskorištenje istog, produženo izlaganje bioaktivnih spojeva krutog materijala visokoj temperaturi može dovesti do njihove degradacije (Palma i sur., 2013). Prilikom ekstrakcije biljaka otapalo prodire u osušenu biljku i otapa topljive komponente biljnog materijala do postizanja ravnoteže. U praksi, 90 % ciljanih bioaktivnih spojeva koji se ekstrahiraju iz biljnog materijala migrira u otapalo za ekstrakciju u roku do 24 sata, a potrebno vrijeme ekstrakcije ovisi osim o vrsti i o dijelu biljke i o drugim faktorima (temperatura, vrijeme fizikalna i kemijska svojstva ciljane bioaktivne komponente itd.). Kada se ekstrahira iz suhog drvenastog korijena ili kore potrebno je dulje vrijeme da se postigne zadovoljavajući stupanj ekstrakcije. Vrijeme ekstrakcije je vrlo bitan parametar stoga treba biti oprezan pri njegovom određivanju kako ne bi došlo do pojave neželjenih komponenti poput smeđe boje od degradacije klorofila ili gorkog okusa uslijed potpunog otapanja tanina (slika 1) (Ashurst, 2005).



Slika 1. Tipična krivulja ekstrakcije (Ashurst, 2005).

Veličina čestica sirovine koja se koristi u procesu ekstrakcije je također bitan parametar povezan s vremenom ekstrakcije. Što su čestice sirovine manje veličine, to je veća aktivna površina između biljnog materijala i otapala za ekstrakciju, a za posljedicu ima povećanje učinkovitosti postupka ekstrakcije u kraćem vremenu. Najčešće korišteno otapalo za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz biljaka te za dobivanje biljnih ekstrakata koji se koriste za proizvodnju bezalkoholna pića su vodene otopine etanola i to najčešće 20-40 %. Ekstrakti proizvedeni primjenom vodenih otopina alkohola imaju djelomično i konzervirajući učinak na ekstrakt čime se smanjuje mogućnost mikrobiološke kontaminacije ekstrakta tijekom skladištenja. Potpuno vodeni ekstrakti moraju se adekvatno skladištiti osim ako se ekstrakt ne sterilizira ili aseptički pakira jer su sirovi vodeni ekstrakti vrlo pogodan medij za rast mikroorganizama. Pri odabiru biljke prema njenim specifičnim aktivnim tvarima koje sadrži, važno je da je ekstrakt te biljke dobiven upotrebom otapala koje je učinkovito za otapanje željenih aktivnih tvari (Ashurst, 2005).

2.2.3. Primjena biljnih ekstrakata u proizvodnji funkcionalnih pića

Najčešći i prvi izbor primjene biljnih ekstrakata u proizvodnji funkcionalnih napitaka su infuzije kao najjednostavnija vrsta biljnih ekstrakata, budući da su najmanje obrađene i ekonomski su najisplativije za proizvodnju napitaka. Infuzije se često primjenjuju u proizvodnji tzv. „*ready-to-drink*“ pića. Biljni ekstrakti se u funkcionalna pića dodaju u fazi nastajanja sirupa zajedno sa drugim sastojcima kao što su arome, boje, sladila i konzervansi. Međutim, biljni ekstrakti imaju dvije značajke koje mogu otežati njihovu upotrebu u bezalkoholnim pićima. Imaju vlastiti često intenzivan okus koji obično maskira željeni okus proizvoda te izvornu najčešće intenzivnu smeđu boju. Ipak, količine ekstrakata koje se dodaju u pića su relativno mali, pa njihov dodatak najčešće ne uzrokuje problem u okusu i boji konačnog proizvoda (Ashurst, 2005).

Glavna primjena polukrutih ekstrakata u proizvodnji bezalkoholnih pića je kod proizvoda koji zahtijevaju visoki udio aktivnih tvari biljke u svojoj formulaciji. Ono što je tehnički i procesni izazov je proizvesti takvu formulaciju napitka koja može maskirati i boju i okus biljnog ekstrakta. Polukruti ekstrakti se često upotrebljavaju dalje u procesima sušenja zamrzavanjem i sušenja raspršivanjem. Praškasti biljni ekstrakti mogu biti korisni kod proizvodnje praškastih napitaka tako što se na suho pomiješaju s drugim sastojcima (Ashurst, 2005).

Mineralna voda s dodanim funkcionalnim komponentama trenutno predstavlja jedan od najviše rastućih proizvoda u sektoru funkcionalnih pića. Ti proizvodi također često sadrže različite ekstrakte biljaka poput ginsenga i kamilice, a mogu biti dodatno obogaćeni vitaminima i mineralima. Skoro sva energetska pića imaju jednu zajedničku osobinu osim njihove kalorijske vrijednosti, a to je visoki udio kafeina. Biljni ekstrakti koji se koriste u proizvodnji energetskih pića su uglavnom ekstrakti stimulativnih biljaka i to najčešće guarana (*Paullinia cupana*) koja je prirodni izvor kofeina. U njenu zamjenu se često koristi i biljka maté (*Ilex paraguariensis*) koja sadrži približnu količinu kofeina kao guarana (Ashurst, 2005; De Maria, 2006).

2.3. SELEKTIRANE BILJNE VRSTE U PROIZVODNJI BILJNIH EKSTRAKATA

Oko 1000 spojeva koji imaju polifenolnu strukturu, s hidroksilnim skupinama unutar aromatskih prstenova, identificirano je u viših biljaka i čak oko 100 polifenolnih spojeva je identificirano u jestivih biljaka (Servili i sur., 2011). Prema Ashurst (2005) kako je već prethodno navedeno najčešće biljne vrste koje se koriste u proizvodnji biljnih ekstrakata su čičak, maslačak, bazga, kamilica, ginseng, guarana, matičnjak te lipa.

Čičak (Articum lappa) je biljka podrijetlom iz Europe, a dijelovi koji se koriste u proizvodnji ekstrakta su suhi list te korijen. Nadzemni dijelovi biljke čičak sadrže flavonoide dok korijen sadrži gorke komponente i inulin. Tradicionalno, čičak se koristi kao sredstvo za pročišćavanje krvi tako što pomaže bubrezima da uklone toksine iz krvi.

Svježi i osušeni listovi te korijen ***maslačka (Taraxacum officinale)*** se koriste u proizvodnji biljnih ekstrakata. Dominantni bioaktivni sastojci ove biljke su seskviterpenski laktoni, koji su gorkog okusa, triterpeni, steroidi, flavonoidi i inulin. Smatra se dobrim diuretikom te pomaže uklanjanje toksina iz organizma.

Sušeni ili svježi cvjetovi ***bazge (Sambuccus nigra)*** također se koriste u proizvodnji ekstrakata. Prevladavajući sastojci cvijeta bazge su flavonoidi, eterična ulja, fenolne kiseline, mineralne tvari te triterpeni.

Kamilica (Chamomilla recutita) je gorka aromatska biljka koja se tradicionalno koristi za ublažavanje tegoba probavnog sustava te ima sedativno svojstvo. Glavni sastojak kamilice koji joj daje ljekovito svojstvo je eterično ulje, a sadrži još i flavonoide. Za proizvodnju ekstrakta kamilice koriste se cvjetovi i cvjetni vrhovi.

Ginseng (Panax ginseng) je biljka čija je glavna funkcija povećanje imuniteta organizma. Dokazan je učinak ginsenga na smanjenje razine šećera u krvi kod ljudi oboljelih od dijabetesa tipa II. Kemijski sastav čine triterpenski saponini (ginsenozidi), eterično ulje, polisaharidi, fenolni spojevi, trigliceridi, pektini, steroli, proteini, mineralne tvari.

Biljka guarana (Paullinia cupana) poznata je po visokom udjelu kofeina u svom kemijskom sastavu, čak 6-8 %. Sadrži i male količine teobromina, oko 12 % tanina i neke saponine. Takav kemijski sastav ovu biljku čini jakim stimulansom za središnji živčani sustav. Sjemenke su ljubičasto-smeđe do crne boje te se upravo sjemenke koriste za proizvodnju ekstrakta.

Dijelovi ***matičnjaka (Melissa officinalis)*** koji se najčešće koriste su suhi listovi te vrhovi grančica koje su u fazi cvatnje. Bioaktivni sastojci matičnjaka su eterično ulje, 10-30 % citrata te oko 4 % ružmarinske kiseline.

Lipa (Tilia cordata) je također česta biljka u proizvodnji biljnih ekstrakata. Cvjetovi lipe su bogati fenolima, a sadrže i eterično ulje, šećer, saponin i vitamin C te se koriste u proizvodnji vitamina (Ashurst, 2005).

Na području RH rastu brojne biljne vrste koje se u našoj zemlji uglavnom otkupljuju i prerađuju postupkom sušenja u poluproizvod ili gotov proizvod, dok proizvodnja biljnih ekstrakata gotovo da i ne postoji (Toplak Galle, 2001). Neke od značajnijih biljnih vrsta koje samoniklo rastu, a imaju značajan biološki potencijal su trnina i glog, ali je u zadnje vrijeme vrlo interesantan i list masline kao potencijalna sirovina u proizvodnji biljnih ekstrakata. U nastavku su detaljnije opisane biljne vrste koje su obuhvaćene ovim istraživanjem.

2.3.1. TRNINA (*Prunus spinosa* L.)

Trnina (*Prunus spinosa* L.) višegodišnja je biljka iz roda *Prunus*, iz obitelji *Rosaceae* koja raste kao grm na obroncima divljih neobrađenih područja (slika 2). Specifična je za područje zapadne Azije uključujući Tursku, Iran, Kavkaz te za područje Europe. Vrste trnine se lokalno mogu naći u sjeverozapadnoj Africi, na Novom Zelandu i u sjevernoj Americi. Najviše je pronađena u Turskoj i to uglavnom divljeg rasta. Trnina je listopadni grm ili manje stablo crnkaste kore i gustih, tvrdih i trnovitih grana. Može rasti do 5 metara u pogodnim klimatskim uvjetima (Yuksel, 2015). Trnina sadrži znatnu količinu fenolnih antioksidansa, uključujući posebice flavonole (kvercetin i kampferol), fenolne kiseline, derivate kumarina, antocijana i proantocijanidina koji spadaju u sekundarne metabolite (Pinacho i sur., 2015). Trnina je biljka prepoznata kao izvor zdravlja zbog visoke koncentracije antioksidacijskih i polifenolnih spojeva prisutnih, te vitamina i minerala. Plodovi se mogu jesti sirovi, ali su previše gorki za ljudsku prehranu. Stoga se općenito trnina obrađuje i koristi u proizvodnji džemova i pekmeza, soka ili digestivnih alkoholnih pića (Yuksel, 2015).

Gotovo svi dijelovi ove biljke uključujući plodove, koru, korijen, lišće i cvijeće korišteni su od davnih vremena za liječenje različitih bolesti. Cvjetovi trnine, koji se obično prerađuju sušenjem i koriste se kao čaj, sirup, svježi sok ili tinktura za liječenje raznih bolesti, imaju veliku potencijalnu primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Međutim, unatoč velikom potencijalu i dugoj tradiciji korištenja trnine u narodnoj medicini, sustavnih

fitokemijskih istraživanja ove biljke još uvijek nedostaje (Lovrić i sur., 2017). Zbog prisustva fenolnih spojeva, cvijet trnine ima zdravstveni blagotvorni učinak: može eliminirati štetne proizvode i višak natrijevih iona iz metabolizma, može pomoći u pročišćavanju krvi i pluća, u jačanju želuca i smanjenju propusnosti krvnih žila te se mogu koristiti kao prirodni laksativi i diuretici (Sikora i sur., 2013). Prethodna istraživanja se uglavnom odnose na određivanje kompleksne mješavine flavonoida u cvjetovima trnine: kampferol, kvercetin i njihovi glikozidi uglavnom s arabinozom, ksilozom i ramnozom. U istraživanju Olszewska i Wolbiś je detektiran visoki udio flavonoida u trnini s područja države Poljske i to oko 3,8 % kao glikozidi te oko 2,7 % kao aglikoni. U istraživanju koje je proveo Tamas je dokazano da u populaciji ove biljke sa područja države Rumunjske se nalazi oko 1,2 % flavonoida u obliku aglikona. Osim flavonoida dokazana je prisutnost fenolnih kiselina u cvijetu trnine, pa se tako kroz određeno istraživanje pokazalo kako je *p*- hidroksibenzojeva kiselina dominantna frakcija fenolnih kiselina u samom cvijetu trnine (Olszewska i Wolbiś, 2000). Najpoznatija etnobotanička upotreba trnine je u Navarri (autonomna zajednica na sjeveru Španjolske) gdje su se grane trnine koristile u liječenju hipertenzije, a macerirani plodovi trnine za liječenje gastrointestinalnih poremećaja (Pinacho i sur., 2015).

Slika 2. Cvijet i plod trnine (Popescu i sur., 2016)

2.3.2. GLOG (*Crataegus* spp.)

Glog (*Crataegus* spp.) (slika 3) je kao i trnina član obitelji ruža (*Rosaceae*), raste kao trnovit grm ili manje stablo koje se najčešće može pronaći kao živica koja proizvodi ružičaste ili bijele cvjetove u proljeće i crvene bobice u jesen koje su male i jabučastog oblika (Shortle i sur., 2014). Može doseći visinu i do 10 m, iako je visina najčešće u rasponu od 2 do 5 m (Özcan i sur., 2005). *Crataegus monogyna* je najčešća vrsta pronađena na cijelom području Republike Irske i Velike Britanije. Ostale vrste gloga uključuju *Crataegus azarolus, Crataegus nigra* i *Crataegus pentagyna* koje predstavljaju glavne vrste koje se koriste u

južnoj Europi, a *Crataegus pinnatifida* i *Crataegus scobrifolia* predstavljaju glavne vrste koje se koriste u Kini (Shortle i sur., 2014). Unutar roda *Crategus* postoji mnogo drvenastih vrsta i njihovih hibrida koje razlikujemo po prisutnosti trnja na samoj biljci (Spira, 2011).

Kemijski sastav lista, cvijeta i ploda gloga upućuje na to da je glog biljka visokog biološkog potencijala. Plod, list i cvijet gloga u svom sastavu imaju šećere i šećerne alkohole, terpene, organske kiseline, eterična ulja, fenilpropanoide, fenolne kiseline, lignane i flavonoide. Flavonoidi koji su izolirani iz *Crataegus* vrsta sintetiziraju se iz apigenina i kvercetina. Uz apigenin, prisutni su i njegovi derivati viteksin, viteksin-2″-*O*-ramnozid, viteksin-4″-*O*-ramnozid, acetilviteksin-2″-*O*-ramnozid, viteksin-2″-*O*-glukozid, viteksin-4″-*O*-glukozid, saponaretin i saponaretin ramnozid. Uz kvercetin, u glogu su određeni i flavonoidi koji su nastali iz kvercetina, a to su izokvercetin, hiperozid, rutin, spireozid i ideain. Važne bioaktivne komponente gloga su i proantocijanidini kiselina (Edwards i sur., 2012). Točan udio spomenutih flavonoida i proantocijanidina u biljkama, pa tako i u glogu ovisi o mnogim čimbenicima kao što su okoliš, padaline,temperatura, cvjetanje i dozrijevanje, mjesto uzgoja, razdoblje berbe, vrsta u određenom rodu, starost i dio biljke te se ovisno o tome razlikuju koncentracije ovih spojeva u biljci. Posljedično starija stabla imaju niži udio ukupnih flavonoida, a lišće sadrži više flavonoida u odnosu na suhe cvjetove (Peschel i sur., 2008). Fenolne kiseline koje su identificirane i kvantificirane u rodu Crategus su hidroksicimetne kiseline i to: su sinapinska, klorogenska, ferulinska i *p*-kumarinska kiselina (Edwards i sur., 2012).

Plodovi (bobice), lišće i cvjetovi gloga sadrže slične sastojke, a osnovna razlika je omjer specifičnih flavonoida i proantocijanidina prisutnih u svakom tom dijelu biljke. Smatra se da su antioksidansi prisutni u glogu, pa i u ekstraktima gloga uključeni u proces smanjenja proizvodnje slobodnih radikala, što smanjuje moguća daljnja oštećenja srca te može smanjiti razinu kolesterola koji se taloži u arterijama. Smatra se da biljni polifenoli imaju molekulsku strukturu koja omogućava učinkovito "hvatanje" slobodnih radikala (Shortle i sur., 2013).

U Europi cvijeće, lišće i bobice gloga, pojedinačno ili u kombinaciji, se tradicionalno koriste za liječenje raznih bolesti kao što su naprimjer visoki krvni tlak, te srčane i probavne tegobe. Klinička ispitivanja su pokazala da ekstrakt gloga ima kardioprotektivni učinak *in vivo*, te da se može koristiti za liječenje kroničnog zatajenja srca uz konvencionalne tretmane liječenja (Shortle i sur., 2014). Komponente koje su odgovorne za farmakološke učinke su flavonoidi i oligomerni procijanidini koji imaju antioksidacijski protuupalni učinak (Sokół-Łętowska i sur., 2007). List i cvijet gloga se upotrebljavaju u travarstvu, a u Kini se glog koristi u prehrani i to svjež ili se prerađuje u džem ili sok (Liu i sur., 2010).

a) b)

Slika 3. a) Cvijet i list gloga b) plod gloga (Shortle i sur., 2013)

2.3.3. LIST MASLINE (*Olea Europaea* L.)

Stablo masline (*Olea europaea L.*) potječe iz porodice *Oleaceae* i predstavlja jednu od najvažnijih poljoprivrednih kultura u Mediteranskom području. Uzgaja se na više od 8 milijuna hektara diljem cijelog svijeta, a 98 % od toga čini Mediteransko područje (Abaza i sur., 2015). Maslina se prvenstveno koristi za proizvodnju maslinovog ulja i plodova.

Listovi masline su nusproizvod uzgoja maslina i proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja (slika 4). S obzirom da se proizvede značajna količina nusproizvoda, oni se mogu koristiti kao stočna hrana. Lišće masline predstavlja potencijalan izvor bioaktivnih spojeva, posebice polifenola koji je jeftin i obnovljiv. Jedan od glavnih komponenata lista masline je oleuropein. Ostali polifenoli koji su prisutni u listu masline su flavonoidi i to: flavoni (apigenin i luteolin), flavan-3-ol (katehin) te fenolne kiseline (kafeinska kiselina, kumarinska kiselina, vanilinska kiselina, klorogenska kiselina) i hidroksitirosol. Hidroksitirosol je jaki antioksidans koji ima znanstveno dokazano kardioprotektivno djelovanje, antikancerogena i antidijabetička svojstva (Jimenez i sur., 2016; Abaza i sur., 2015). Čimbenici koji utječu na kvalitativni i kvantitativni sastav polifenola lista masline su starost lista, stupanj zrelosti, zemljopisno podrijetlo, sorta, udio vlage te stupanj onečišćenja sa zemljom (Şahin i Şamli, 2013). Ovi polifenolni spojevi se zbog svoje biološke vrijednosti izoliraju iz lista masline u obliku biljnog ekstrakta koji se onda koristi kao namirnica, aditiv ili funkcionalni sastojak (Lafka i sur., 2013). Ekstrakt lista maslina se koristi u velikom broju lijekova zbog svojih pozitivnih svosjtava koje posjeduje te u nekim kozmetičkim proizvodima (Navarro i sur., 2016).

Lišće masline ima široku primjenu kao tradicionalni lijek u europskim i mediteranskim zemljama. Eksperimentalna istraživanja na životinjama s različitim ekstraktima lista masline ili njegovih sastojaka su pokazali antiaritmijsko, antiaterosklerozno, hipoglikemijsko i vazodilatacijsko djelovanje. Također su uočena i antimikrobna (protiv bakterija i gljivica), antivirusna, antitumorska i antiupalna svojstva (Al-Attar i Alsalmi, 2017).

Slika 4. List masline (vlastita fotografija)

2.4. SENZORSKA SVOJSTVA BILJNIH EKSTRAKATA

Primarni cilj industrije funkcionalne hrane je odrediti optimalni udio dodanih bioaktivnih sastojaka u funkcionalnom proizvodu koji će omogućiti ciljani biološki učinak, istovremeno vodeći računa da se zadovolje i osiguraju prihvatljiva senzorska svojstva proizvoda (Granato i sur., 2010). Funkcionalni napitci predstavljaju veliku skupinu unutar funkcionalne hrane. Osim nutritivnih i potencijalnih zdravstvenih karakteristika funkcionalnih napitaka vrlo je važno da imaju i zadovoljavajuća senzorska svojstva. Provedena su različita istraživanja kojima je obuhvaćena proizvodnja funkcionalnih napitaka s ciljem postizanja izbalansiranog omjera nutrijenata uz zadovoljavanje i senzorskih svojstava. U jednom od istraživanja proizvedeni su funkcionalni napitci kojima su baza bili sokovi od jabuke, borovnice i brusnice, a obogaćivani su dodatkom ekstrakta đumbira, određenih aminokiselina, vitamina i minerala s ciljem postizanja kardioprotektivng učinka. Dodavane su 4 koncentracije ekstrakta đumbira (0,5%, 1%, 1,5% i 2%) te je zaključeno kako sve navedene koncentracije mogu biti dodane u napitak bez narušavanja senzorskih svojstava kao što su

boja, miris i okus, ali istovremeno doprinose povećanju biološkog potencijala proizvoda (Gunathilake i sur., 2013).

Provedeno je istraživanje na proizvedenim funkcionalnim napitcima kojima je baza bila voda i mlijeko, a obogaćeni su ekstraktom rogača i maka. Provedena je senzorska analiza tako pripremljenih napitaka kroz koju su se ocjenjivala svojstva arome, okusa i mirisa ocjenama od 1 (najmanje izraženo svojstvo) do 5 (jako izraženo svojstvo). Zaključeno je da su napitci rogača senzorski prihvatljiviji u odnosu na napitke maka te da su odabrana svojstva različito izražena kod mliječnih, odnosno vodenih napitaka rogača i maka (Buneta, 2015).

Senzorska svojstva prehrambenih proizvoda pa tako i biljnih ekstrakata i funkcionalnih napitaka provode se primjenom različitih senzorskih analiza testova ili primjenom za to predviđenih instrumenata (npr. elektronski nos, elektronski jezik, i sl.).

2.4.1. Senzorska analiza

Senzorska analiza je znanstvena disciplina koja postoji već oko 60-ak godina. Mnogi pripisuju koncepciju senzorske analize 1940-im godinama zbog razvoja hedonističke procjene hrane od strane ptrošača. Međutim, senzorska (osjetilna) znanost se može pratiti jos iz 1800-ih godina uz razvoj psiholoških teorija za mjerenje i predviđanje ljudskih odgovora na vanjske podražaje, kao što je naprimjer hrana. Kao i druga područja znanosti, senzorska analiza je napredovala s vremenom, pogotovo u drugoj polovici 20. stoljeća, te je i dalje u razvitku (Drake, 2007).

Senzorska analiza se definira kao znanstvena metoda koja je koristi u svrhu izazivanja, mjerenja, analiziranja i interpretiranja odgovora ljudskog organizma na svojstva određenog prehrambenog proizvoda koristeći osjetila vida, mirisa, dodira, okusa i sluha. Ova definicija je prihvaćena i potvrđena od strane odbora za senzorsku procjenu hrane unutar različitih profesionalnih organizacija poput Instituta za tehnologiju hrane (Lawless i Heymann, 2010). Obuhvaća kvalitativne i kvantitativne senzorske komponente proizvoda koji se konzumira od strane senzorskog panela te je jedan od pokazatelja kakvoće proizvoda, pa se zbog toga često koristi u kontroli kvalitete hrane (Murray i sur., 2001).

Najčešće korištene senzorske metode testiranja namirnica u Europi su metode bodovanja. Različite zemlje koriste metode bodovanja s različitom strukturom bodova, pa se

razlikuju sustavi s 5, 10, 18, 20, 30, 50, 100 i 200 bodova od kojih se najčešće primjenjuju one s 5 i 20 bodova. Europska organizacija za kontrolu kvalitete (EOQC) je predložila jedinstvenu metodu bodovanja za sve prehrambene proizvode na temelju čega je ona i koncipirana. To omogućuje razmjenu informacija o senzorskoj kvaliteti i poboljšanje međunarodne trgovine namirnicama (Filajdić i sur., 1988). Ta jedinstvena metoda bodovanja se sastoji od skale od 20 bodova za ukupnu senzorsku kvalitetu proizvoda uz mogućnost upotrebe faktora značajnosti (vaganja) koji izražava težinu pojedinog ocjenjivanog parametra u odnosu na ukupnu senzorsku kvalitetu (Ritz i sur., 1991).

2.4.2. Senzorske analize voćnih sokova i biljnih ekstrakata

Senzorska svojstva rezultat su kompozicije parametara koji daju konačan senzorski učinak. Boja, okus i miris obično nisu rezultat jedne kemijske tvari, nego nastaje kao kompleks utjecaja različitih tvari. Na primjer, na okus voćnog soka utječe kompozicija ili relativni odnosi sadržaja tvari arome, kiselina, šećera i tanina prisutnih u voću (Jašić, 2007).

Senzorske metode koje se najčešće koriste u analizi voćnih sokova i biljnih ekstrakta su kvantitativne deskriptivne analize koje podrazumijevaju korištenje numeričke skale bodova. Raspon te numeriče skale može biti različit (0-6, 1-7, 1-10). Najmanji broj uvijek predstavlja slabi intenzitet određenog svojstva, a najveći broj predstavlja jaki intenzitet (Mansour i sur., 2000).

Za uspješnu provedbu senzorske analize potrebna je skupina treniranih ispitivača, tj. senzorski panel. On predstavlja „mjerni instrument“, pa rezultati provedene analize ovise o članovima panela. Upravo zbog toga, članovi senzorskog panela se biraju posebnim testovima. Veličina panela ovisi o svrsi i postupku testiranja kao i o stupnju treninga ocjenjivača. Preporuča se da senzorski panel sadrži najmanje 5 ocjenjivača, a optimalno je 10 ocjenjivača u panelu (Bijeljac i Toroman, 2008.). Od najveće važnosti za ukupni uspjeh senzorske analize je predanost i motivacija panelista.

Parametri kakvoće koji se koriste za definiranje senzorskih svojstava su: izgled, miris, okus, aroma i tekstura. Izgled se zasniva na osjetilu vida pomoću kojeg se vizualno procjenjuje i zapaža boja, oblik, površina (sjaj, hrapavost i glatkoća) i tekstura proizvoda. Optimalan osjet mirisa može se dobiti samo umjerenim udisajem. Prilikom ocjenjivanja mirisa može doći do spajanja dva mirisa pa nastane treći miris ili neutraliziranja jednog mirisa

drugim pa se u tom slučaju ne osjeti ni jedan. Osjet okusa obuhvaća četiri primarna okusa: slano, slatko, kiselo i gorko. Osjetljivost jezika za razne okuse varira na različitim dijelovima jezika, a jačina okusa ovisi o koncentraciji otopljenih tvari u uzorku i temperaturi. Aromu određujemo kao hlapiva svojstva koja se očituju kod gutanja i kod izdisaja (često kao tzv. „naknadni“ okus). Kod krutih i polutekućih namirnica se ocjenjuje teksutra dok se kod tekućih ocjenjuje konzistencija. Senzorski se teksutra, odnosno konzistencija procjenjuje kao fizička struktura (osjetom vida i dodira se ocjenjuju veličina, oblik, boja i priroda namirnice) te kao osjećaj koji hrana daje u ustima (mekoća, tvrdoća) (Bijeljac i Toroman, 2008.).

Primjer jedne senzorske analize voćnih sokova je u istraživanju iz 2013. godine. Ti uzorci soka su posluženi u prozirnim polietilenskim čašama na pladnju. Uzorci na pladnju su bili raspoređeni u nasumičnom rasporedu. Svaki uzorak je imao troznamenkastu šifru kako bi se smanjila pogreška panelista. Trenirani panelisti su ocjenjivali voćne sokove kroz 4 parametra: miris, slatkoća, kiselost i astrigencija. Sve ocjene su zabilježavali na horizontalnoj 15 centimetara dugoj ljestvici, na kojoj su zabilježeni relativni položaji pri čemu s lijeva na desno se ocjene povećavaju. Između svakog uzorka panelisti su uzimali vodu ili neslane krekere kako bi očistili nepce za slijedeći uzorak. Nakon završene senzorske analize rezultati su se obrađivali statistički (Gunathilake i sur., 2013).

Arabshahi-Delouee i Urooj (2007) su proveli istraživanje s listovima triju biljaka: dud (*Morus indica*), konjska rotkvica (*Moringa oleifera*) i metvica (*Mentha spicata*). Ekstrakti navedenih biljaka su dobiveni klasičnim postupkom ekstrakcije s metanolom/acetonom/ vodom. Metodom UV spektrofotometrije je određena koncentracija ukupnih fenola. Nakon toga su dobiveni biljni ekstrakti dodani u sok ananasa u različitim koncentracijama te se provela senzorska analiza prihvaćenosti takvih sokova. Senzorski panel se sastojao od 6 senzorskih analitičara kojima su poslužena tri različito označena uzorka soka te su morali ocijeniti svojstva tih uzoraka: boja, okus izgled te sveukupna kvaliteta proizvoda.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za istraživanje su korišteni koncentrat jabuke nabavljen u suradnji s tvrtkom Prijedorčanka d.o.o. (Prijedor, Bosna i Hercegovina) te tri osušene biljne vrste: cvijet trnine (*Prunus spinosa* L.*)* proizvođača „Suban“ d.o.o., Strmec, cvijet i list gloga (*Crataegus oxyacanta* L.) proizvođača „Suban“ d.o.o., Strmec te lišće masline (*Olea europaea* L.) koje je prikupljeno u masliniku u Republici Hrvatskoj (Ravni kotari), a predstavljalo je mješavinu sorti: Orkula (90 %), Lećina (5 %), Marokanka i Garbunčela, a ubrano je u studenom 2016. Godine (slika 5,6 i 7).

Slika 5. Trnina (vlastita fotografija)

Slika 6. Glog (vlastita fotografija)

Slika 7. List masline (vlastita fotografija)

3.2. METODE RADA

U ovom radu korištene su sljedeće metode:

- Metoda pripreme biljnih ekstrakata
- Metoda za određivanje topljive suhe tvari
- Metoda za određivanje pH vrijednosti
- Metoda za određivanje senzorskih svojstava primjenom kvantitativne deskriptivne analize (QDA)
- Metoda za određivanje ukupnih fenola

3.2.1. Priprema biljnih ekstrakata

Princip određivanja:

Odvagano je 5 g prethodno usitnjenog uzorka i prebačeno u tikvicu s okruglim dnom u koju je dodano 250 mL destilirane vode te je ručno homogenizirano par minuta. Ekstrakcija se provodila kuhanjem na povratnom hladilu 30 min, počevši od trenutka vrenja. Dobiveni ekstrakti su ohlađeni na sobnu temperaturu i korišteni za pripremu obogaćenih sokova jabuke te za provođenje fizikalno – kemijskih analiza (određivanje topljive suhe tvari i pH) i masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva . Do trenutka provođenja analiza ekstrakti su bili pohranjeni na -18 ˚C.

Aparatura i pribor:

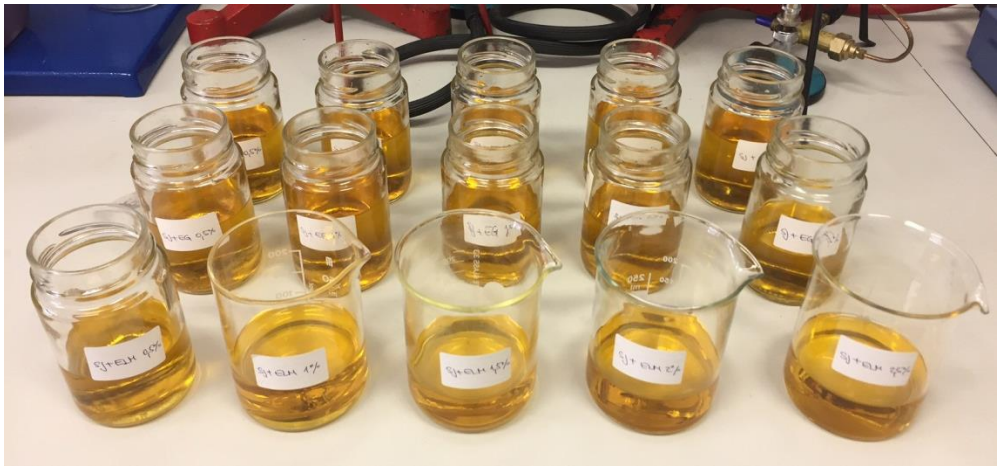
1) analitička vaga (OHAUS),
2) tikvica sa okruglim dnom,
3) stakleni ljevak,
4) povratno hladilo,
5) tronožac,
6) plamenik,
7) azbestna mrežica,
8) filter papir
9) menzura volumena 100 mL

3.2.2. Priprema obogaćenih sokova jabuke

Za pripremu obogaćenih sokova jabuke korišteni su ekstrakti cvijeta i lista trnine (ET), cvijeta i lista gloga (EG) te ekstrakti lista masline (ELM), a popis svih uzoraka koji je obuhvaćen ovim istraživanjem prikazan je u tablici 2. Obogaćeni sokovi jabuke su pripremljeni tako da udio biljnog ekstrakta u soku jabuke bude redom 0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5 % (slika 8). Direktno su miješani s koncentratom soka jabuke u zadanim koncentracijama (1, 2, 3, 4 i 5 mL). Suha tvar soka jabuke obogaćenog biljnim ekstraktima podešavana je do zadanog volumena (200 mL), a iznosila je 11 %. Suha tvar kocentrata jabuke iznosila je 70 %.

Primjer računa za obogaćivanje sokova jabuke biljnim ekstraktima:
Suha tvar koncentrata jabuke: 70 %
Suha tvar soka jabuke (koji želimo proizvesti): 11 %
V_1: volumen koncentrata jabuke potreban za pripremu 200 mL soka jabuke s udjelom suhe tvari od 11 %

$$c_1V_1 = c_2V_2$$
$$70\ \% * V_1 = 11\ \% * 200\ mL$$
$$V_1 = 31{,}43\ mL$$
$$\text{Udio ekstrakta} = 0{,}5\ \% = 0{,}005 \times 200\ mL$$
$$\text{Udio ekstakta} = 1\ mL$$
$$V\ (\text{voda}) = 200\ mL - 31{,}43\ mL - 1\ mL$$
$$V\ (\text{voda}) = 167{,}57\ mL$$



Slika 8. Pripremljeni obogaćeni sokovi jabuke (vlastita fotografija)

Tablica 2. Uzorci korišteni u istraživanju s pripadajućim oznakama

UZORCI		OZNAKE
Trnina	Sok jabuke obogaćen s 0,5% biljnog ekstrakta trnine	SJ + ET 0,5%
	Sok jabuke obogaćen s 1% biljnog ekstrakta trnine	SJ + ET 1%
	Sok jabuke obogaćen s 1,5% biljnog ekstrakta trnine	SJ + ET 1,5%
	Sok jabuke obogaćen s 2% biljnog ekstrakta trnine	SJ + ET 2%
	Sok jabuke obogaćen s 2,5% biljnog ekstrakta trnine	SJ + ET 2,5%
Glog	Sok jabuke obogaćen s 0,5% biljnog ekstrakta gloga	SJ + EG 0,5%
	Sok jabuke obogaćen s 1% biljnog ekstrakta gloga	SJ + EG 1%
	Sok jabuke obogaćen s 1,5% biljnog ekstrakta gloga	SJ + EG 1,5%
	Sok jabuke obogaćen s 2% biljnog ekstrakta gloga	SJ + EG 2%
	Sok jabuke obogaćen s 2,5% biljnog ekstrakta gloga	SJ + EG 2,5%
List masline	Sok jabuke obogaćen s 0,5% biljnog ekstrakta lista masline	SJ + ELM 0,5%
	Sok jabuke obogaćen s 1% biljnog ekstrakta lista masline	SJ + ELM 1%
	Sok jabuke obogaćen s 1,5% biljnog ekstrakta lista masline	SJ + ELM 1,5%
	Sok jabuke obogaćen s 2% biljnog ekstrakta lista masline	SJ + ELM 2%
	Sok jabuke obogaćen s 2,5% biljnog ekstrakta lista masline	SJ + ELM 2,5%
Sok jabuke		SJ
Koncentrat jabuke		KJ

3.2.3. Određivanje topljive suhe tvari

Princip određivanja:

Određivanje se temeljilo na direktnom očitavanju topljive suhe tvari digitalnim refraktometrom. Prije početka mjerenja refraktometar se destiliranom vodom izbaždario na

nulu. Zatim je dio uzorka nanesen na optičko okno te se na refraktometru pritiskom na tipku „start“ očitala vrijednost topljive suhe tvari.

Aparatura i pribor:

1) pipeta, volumena 1 mL,
2) refraktometar (ATAGO PAL-3)

3.2.4. Određivanje pH vrijednosti

Princip određivanja:

Mjerenje pH vrijednosti provodilo se pH-metrom uranjanjem kombinirane elektrode u uzorak i očitavanjem vrijednosti na uređaju. Prije određivanja, elektroda pH-metra se ispirala destiliranom vodom te je nakon toga uronjena u čašu s ispitivanim uzorkom. Dobro se promiješa te se očita pH vrijednost.

Aparatura i pribor:

1) čaša, volumena 25 mL,
2) pH-metar (METTLER TOLEDO)

Postupak:

Vrijednost pH se odredila uranjanjem elektrode u ispitivani uzorak.

3.2.5. Senzorska analiza obogaćenih sokova jabuke

Senzorsko ocjenjivanje provedeno tijekom ovog rada odvijalo se u odgovarajuće temperiranom i osvijetljenom laboratoriju. U ocjenjivanju je sudjelovala panel grupa od 10 ispitivača, 8 žena i 2 muškarca. U svrhu kvantitativnog izražavanja intenziteta senzorskih svojstava, korištena je skala od 1 do 7 (1 – slabi intenzitet, 7 – jaki intenzitet) te je svaki od ispitivača ocjenom od 1 do 7 na obrascu (slika 9), izrađenom za tu svrhu, obilježavao intenzitet svakog pojedinog senzorskog svojstva za svaki od uzoraka.

Uzorci su bili ponuđeni u označenim staklenim prozirnim čašama te prethodno temperirani na sobnu temperaturu. Ocijenjena su sljedeća senzorska svojstva: intenzitet žute boje, aroma po jabuci, aroma po biljnom ekstraktu dodanom u sok, aroma na kuhano, strana aroma, miris intenzivan po jabuci, miris po biljnom ekstraktu dodanom u sok, strani miris, kiseo okus, slatki okus, okus po jabuci, okus po biljnom ekstraktu dodanom u sok, harmoničnost okusa, strani okus te opći dojam proizvoda. Na taj je način provedeno senzorsko ocjenjivanje obogaćenih sokova jabuke s različitim udjelima (0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5%) ekstrakta trnine, gloga i lista masline te soka jabuke bez dodanog ekstrakta. Rezultati senzorske analize sokova prikazane su grafički u obliku „*paukove mreže*“.

BOJA	Intenzivna žuta	1	2	3	4	5	6	7
AROMA	Po jabuci	1	2	3	4	5	6	7
	Po biljnom ekstraktu dodanom u sok	1	2	3	4	5	6	7
	Na kuhano	1	2	3	4	5	6	7
	Strana aroma	1	2	3	4	5	6	7
MIRIS	Intenzivan po jabuci	1	2	3	4	5	6	7
	Po biljnom ekstraktu dodanom u sok	1	2	3	4	5	6	7
	Strani miris	1	2	3	4	5	6	7
OKUS	Kiselo	1	2	3	4	5	6	7
	Slatko	1	2	3	4	5	6	7
	Po jabuci	1	2	3	4	5	6	7
	Po biljnom ekstraktu dodanom u sok	1	2	3	4	5	6	7
	Harmoničnost	1	2	3	4	5	6	7
	Strani okus	1	2	3	4	5	6	7
OPĆI DOJAM O PROIZVODU		1	2	3	4	5	6	7

Slika 9. Ocjenjivački listić korišten za senzorsku analizu obogaćenih sokova jabuke

3.2.6. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

Metoda se temelji na kolornoj reakciji koja je posljedica reakcije fenola sa Folin- Ciocalteu reagensom te je primjenom spektrofotometrijske metode mjeren intenzitet nastalog obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Aparatura i pribor:

1) Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2) Staklene kivete
3) Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
4) Staklene čaše volumena 25 i 500 mL
5) Staklene epruvete

Reagensi:

1) Folin – Ciocalteu reagens,
2) zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %- tna otopina Na_2CO_3).

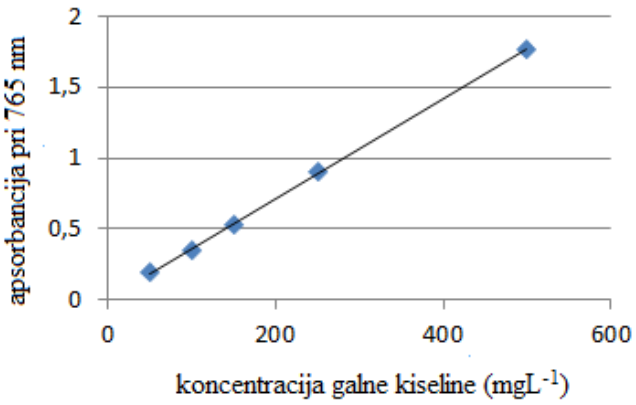
Postupak:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 20 μL ekstrakta i 80 μL vode (ekstrakti su razrijeđeni 5x), 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju, u ovom slučaju 100 μL destilirane vode.

Račun:

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mgL^{-1}. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode.. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije galne kiseline (mgL^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



mgL^{-1}	A 765 nm
50	0,194
100	0,347
150	0,535
250	0,902
500	1,761

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0{,}0035 \times X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mgL^{-1}).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Miješanjem vodenih ekstrakata cvijeta i lista trnine (*Prunus spinosa L.*), cvijeta i lista gloga (*Crataegus oxyacanta L.*) i lista masline (*Olea europaea L.*) i koncentrata jabuke napravljeni su sokovi s različitim udjelom biljnog ekstrakta (0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5%).

Rezultati određivanja topljive suhe tvari i pH vrijednosti ekstrakata cvijeta i lista trnine, cvijeta i lista gloga, lista masline, koncentriranog soka jabuke te sokova obogaćenih biljnim ekstraktima su prikazani u **tablicama 3 i 4**.

Na **slikama 10, 11 i 12** prikazani su rezultati senzorskih analiza soka jabuke obogaćenog različitim udjelima biljnih ekstrakata cvijeta i lista trnine, cvijeta i lista gloga te lista masline provedenih primjenom kvantitativne deskriptivne analize, u obliku paukovih mreža.

Udio ukupnih fenola je određen spektrofotometrijskom metodom s Folin- Ciocalteu reagensom u vodenim ekstraktima cvijeta i lista trnine, cvijeta i lista gloga te lista masline te u pripremljenim sokovima jabuke koji su obogaćeni tim biljnim ekstraktima. Rezultati mjerenja izraženi su u mgL^{-1}, a prikazani su na **slikama 13, 14, 15 i 16**.

Tablica 3. Topljiva suha tvar soka jabuke, ekstrakata cvijeta i lista trnine, gloga i lista masline te sokova jabuke obogaćenih ekstraktima trnine, gloga i lista masline

UZORAK	TOPLJIVA SUHA TVAR (%)
Sok jabuke	12,7
Ekstrakt trnine	0,6
Ekstrakt gloga	0,4
Ekstrakt lista masline	0,6
Sokovi obogaćeni ekstraktom cvijeta i lista trnine	
SJ+ET 0,5%	13,9
SJ+ET 1%	13,7
SJ+ET 1,5%	13,5
SJ+ET 2%	13,3
SJ+ET 2,5%	14,0
Sokovi obogaćeni ekstraktom cvijeta i lista gloga	
SJ+EG 0,5%	14,3
SJ+EG 1%	14,0
SJ+EG 1,5%	13,9
SJ+EG 2%	14,8
SJ+EG 2,5%	13,8
Sokovi obogaćeni ekstraktom lista masline	
SJ+ELM 0,5%	14,4
SJ+ELM 1%	12,2
SJ+ELM 1,5%	14,6
SJ+ELM 2%	14,2
SJ+ELM 2,5%	13,0

Topljiva suha tvar koncentrata jabuke je iznosila 70 %, a nakon razrjeđivanja za potrebe pripreme sokova obogaćenih biljnim ekstraktima iznosila je 12,7 %. Biljni ekstrakti su imali izrazito nizak udio topljive suhe tvari: ekstrakt trnine 0,6 %, ekstrakt gloga 0,4 % te ekstrakt lista masline 0,6 %. Niski udjeli topljive suhe tvari ekstrakta su bili i očekivani budući su ugljikohidrati u istraživanim biljnim vrstama zastupljeni u niskim udjelima (Shortle i sur., 2013; Abaza i sur., 2015; Yuksel, 2015). Udio topljive suhe tvari određen je u sokovima jabuke obogaćenim biljnim ekstraktima: cvijeta i lista trnine u rasponu od 13,3 % (SJ+ET 2%) do 14 % (SJ+ET 2,5%), cvijeta i lista gloga u rasponu od 13,8 (SJ+EG 2,5%) do 14,8 % (SJ+EG 2%) te lista masline u rasponu od 12,2 % (SJ+ELM 1%) do 14,6 % (SJ+ELM 1,5%). Udjeli suhe tvari u obogaćenim sokovima jabuke bili su viši u usporedbi s udjelom suhe tvari u komercijalno dostupnim sokovima ili sličnim istraživanjima. U istraživanju koje

su proveli Dobričević i sur. (2016) cilj je bio utvrditi nutritivna i biološka svojstva selektiranih vrsta voća i povrća u svježem stanju i soka proizvedenog na centrifugalnom sokovniku od istih. Sok je pripremljen od jabuke, naranče, mrkve i krastavca. Analizirana je suha tvar, ukupna kiselost, pH, topljiva suha tvar, sadržaj C vitamina, β karotena, ukupnih klorofila, ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida i antioksidacijska aktivnost u svježoj sirovini, kao i u soku. Topljiva suha tvar soka jabuke proizvedenog od svježih jabuka iznosila je 11,00 %

Tablica 4. pH vrijednost soka jabuke tvar soka jabuke, ekstrakata trnine, gloga i lista masline te sokova jabuke obogaćenih ekstraktima trnine, gloga i lista masline

UZORAK	pH
Sok jabuke	3,75
Ekstrakt trnine	4,94
Ekstrakt gloga	5,58
Ekstrakt lista masline	5,35
Sokovi obogaćeni ekstraktom cvijeta i lista trnine	
SJ+ET 0,5%	3,73
SJ+ET 1%	3,72
SJ+ET 1,5%	3,72
SJ+ET 2%	3,72
SJ+ET 2,5%	3,72
Sokovi obogaćeni ekstraktom cvijeta i lista gloga	
SJ+EG 0,5%	3,71
SJ+EG 1%	3,71
SJ+EG 1,5%	3,71
SJ+EG 2%	3,71
SJ+EG 2,5%	3,71
Sokovi obogaćeni ekstraktom lista masline	
SJ+ELM 0,5%	3,70
SJ+ELM 1%	3,71
SJ+ELM 1,5%	3,71
SJ+ELM 2%	3,71
SJ+ELM 2,5%	3,70

Čisti sok jabuke bez dodanih biljnih ekstrakata ima pH vrijednost 3,75 što je u skladu s literaturnim podacima prema kojima pH vrijednost za ovu vrstu proizvoda iznosi između 3 – 4,5 (Mayer i Harel, 1979). U već spomenutom istraživanju Dobričević i sur. (2016.) gdje se utvrđivala nutritivna i biološka vrijednost svježeg voća i povrća te soka proizvedenog od njih, određivala se pH vrijednost soka jabuke i iznosila je 3,58 što je podjednako kao i pH vrijednost čistog soka jabuke koji je korišten za pripremu funkcionalnih napitaka u ovom radu.

Biljni ekstrakti su imali višu pH vrijednost u usporedbi s pH vrijednosti soka jabuke. Izmjerene pH vrijednosti biljnih ekstrakata su: ekstrakt trnine 4,94, esktrakt gloga 5,58 i ekstrakt lista masline 5,35. Viša pH vrijednost u biljnim ekstraktima uvjetovana je niskim udjelom organskih kiselina u biljnim vrstama iz kojih su ekstrakti pripremani (Haciseferogullari i sur., 2007). U obogaćenim sokovima jabuke pH vrijednosti su bile vrlo

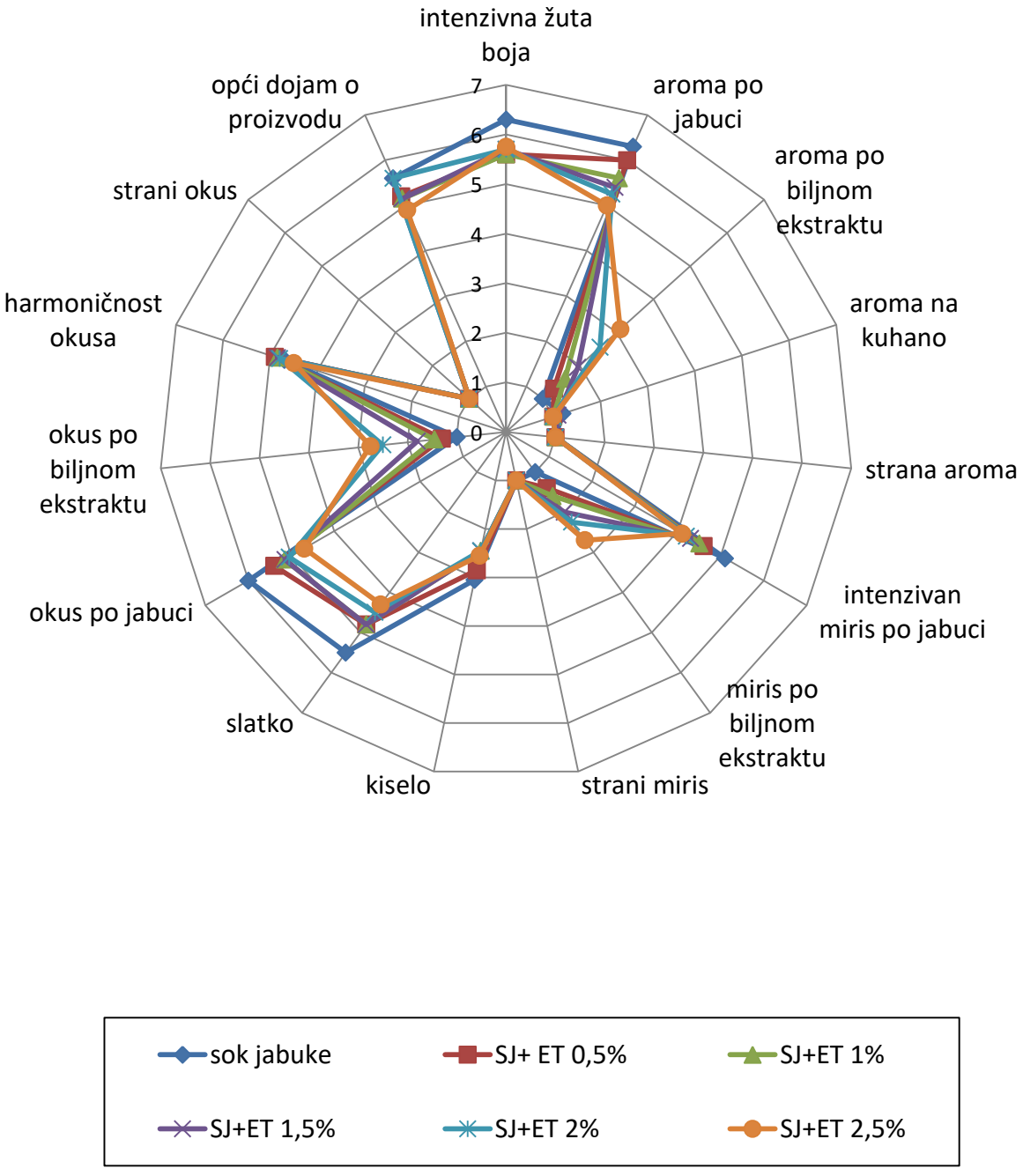
ujednačene i iznosile su kako slijedi: sokovi obogaćeni ekstraktom cvijeta i lista trnine 3,72, sokovi obogaćeni ekstraktom cvijeta i lista gloga 3,71 te sokovi obogaćeni ekstraktom lista masline 3,71.

Svi sokovi jabuke obogaćeni biljnim ekstraktima cvijeta i lista trnine i gloga te lista masline senzorski su ocijenjeni. Panel grupa od 10 članova (8 žena i 2 muškarca) senzorski je ocijenila 15 uzoraka sokova jabuke obogaćenih različitim udjelima ekstrakta trnine, gloga i lista masline (0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5%) metodom kvantitativne deskriptivne analize.

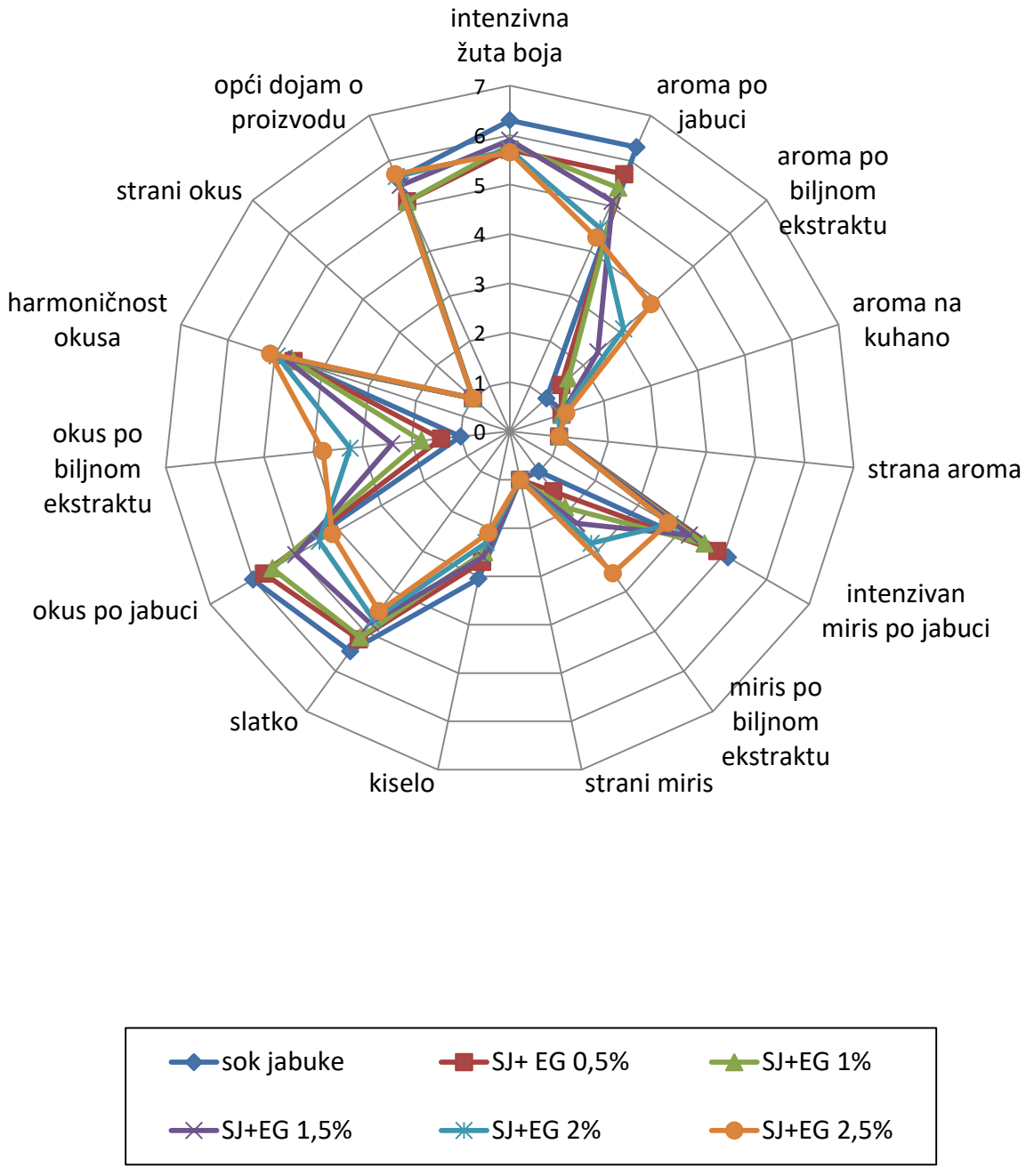
U uzorcima soka jabuke obogaćenih različitim udjelima ekstrakta trnine, gloga i lista masline ocjenjivana su slijedeća senzorska svojstva:

- Boja: intenzitet žute boje,
- Aroma: aroma po jabuci, aroma po biljnom ekstraktu dodanom u sok, aroma na kuhano, strana aroma,
- Miris: intenzivan miris po jabuci, miris po biljnom ekstraktu dodanom u sok, strani miris,
- Okus: kiseo okus, sladak okus, okus po jabuci, okus po biljnom ekstraktu dodanom u sok, harmoničnost okusa, strani okus
- Opći dojam proizvoda.

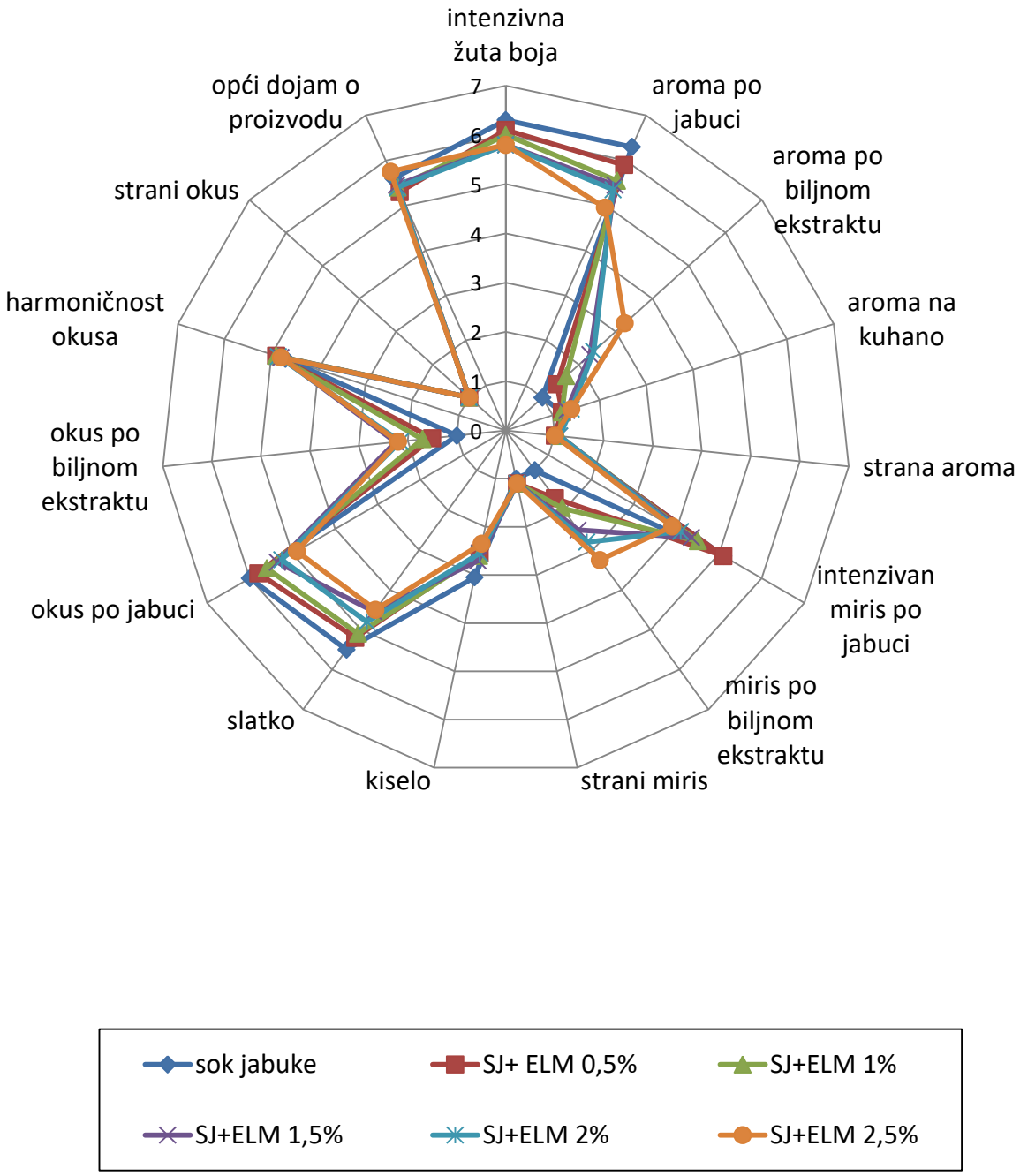
Senzorski su analitičari kvantitativno, ocjenom od 1 do 7 (1 – slabi intenzitet, 7 – jaki intenzitet), izrazili intenzitet svakog pojedinog svojstva. Ocjene senzorske procjene prikupljene ocjenjivačkim listićima, korištene su za prikaz ukupne srednje ocjene za svako senzorsko svojstvo soka jabuke obogaćenog biljnim ekstraktima u različitim koncentracijama prikazane na slikama 14, 15 i 16 u obliku „*paukove mreže*“, pri čemu se procijenjeni intenzitet svakog od ocijenjenih senzorskih svojstava povećava s povećanom udaljenosti od centralne točke (Lawless i Heymann, 2010).



Slika 10. Rezultati senzorske analize soka jabuke obogaćenog različitim udjelima biljnih ekstrakta cvijeta i lista trnine (*Prunus spinosa L.*)



Slika 11. Rezultati senzorske analize soka jabuke obogaćenog različitim udjelima biljnih ekstrakta cvijeta i gloga (*Crataegus oxyacanta L.*)



Slika 12. Rezultati senzorske analize soka jabuke obogaćenog različitim udjelima biljnih ekstrakta lista masline (*Olea europaea L.*)

Intenzitet žute boje čistog soka jabuke je iznosio 6,3, dok je u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine intenzitet žute boje određen je u rasponu od 5,6 (SJ+ET 0,5% i 1%) do 5,75 (SJ+ET 2,5%). Rezultati upućuju na zaključak da udjel dodanog ekstrakta nije bitno utjecao na smanjenje intenziteta boje.

Aroma po jabuci čistog soka jabuke ocijenjena je sa 6,3. U sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine aroma po jabuci određena je u rasponu od 5,25 (SJ+ET 2%) do 6 (SJ+ET 0,5%), aroma po biljnom ekstraktu dodanom u sok u rasponu od 1,3 (SJ+ET 0,5%) do 3,1 (SJ+ET 2,5%). Aroma na kuhano te strana aroma nisu utvrđene u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine. Ovi rezultati pokazuju kako se s većim udjelom dodanog ekstrakta smanjuje aroma jabuke, a povećava aroma po biljnom ekstraktu dodanom u sok, s tim da osnovna aroma po jabuci dominira u svim uzorcima. Intenzitet arome u uzorcima s većim udjelom biljnog ekstrakta ne narušava harmoničnost arome konačnog proizvoda.

Procijenjeni intenzitet mirisa po jabuci u čistom soku jabuke iznosio je 5,1, dok se u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine kretao u rasponu od 4,1 (SJ+ET 2,5%) do 4,6 (SJ+ET 0,5%). Miris po biljnom ekstraktu dodanom u sok je određen u rasponu od 1,4 (SJ+ET 0,5%) do 2,7 (SJ+ET 2,5%). Strani miris nije utvrđenim u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine.

Intenzitet kiselog okusa čistog soka jabuke iznosio je 3,05 dok se u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine kretao u rasponu od 2,45 (SJ+ET 1%, 1,5%, 2%) do 2,85 (SJ+ET 0,5%). Rezultati upućuju na zaključak da se kiselost sokova nakon obogaćivanja biljnim ekstraktima smanjila, a razlog je manji udio organskih kiselina u biljnim ekstraktima što su pokazale i pH vrijednosti ekstrakata. Intenzitet slatkog okusa čistog soka jabuke iznosio je 5,5 dok se u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine kretao u rasponu od 4,3 (SJ+ET 2,5%) do 4,8 (SJ+ET 0,5%, 1% i 1,5%). Harmoničnost okusa čistog soka jabuke ocijenjena je sa 4,7, dok se u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine kretala u rasponu od 4,5 (SJ+ET 2,5%) do 4,9 (SJ+ET 0,5%). Strani okus nije utvrđen utvrđenim u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine. Opći dojam čistog soka jabuke ocijenjen je sa 5,6, a u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine u rasponu od 4,9 (SJ+ET 2,5%) do 5,6 (SJ+ET 2%). Na temelju ocjena karakteristika okusa konačnih proizvoda obogaćenih biljnim ekstraktima, pokazalo se da se intenzitet okusa po jabuci dodavanjem biljnih ekstrakata neznatno smanjio, a na temelju harmoničnosti se može zaključiti da je dodavanjem ekstrakta trnine u višoj koncentraciji

nastao proizvod okusa koji je po harmoničnosti ocjenjivačima bio prihvatljiviji od čistog soka jabuke.

Intenzitet žute boje čistog soka jabuke je iznosio 6,3, dok je u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga intenzitet žute boje određen u sličnom rasponu vrijednosti kao i sok jabuke obogaćen ekstraktom cvijeta trnine - 5,65 (SJ+EG 2,5%) do 5,9 (SJ+EG 1,5%). Udjel dodanog ekstrakta nije značajno utjecao na smanjenje intenziteta boje.

Aroma po jabuci čistog soka jabuke ocijenjena je sa 6,3. U sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga aroma po jabuci određena je u rasponu od 4,3 (SJ+EG 2,5%) do 5,7 (SJ+EG 0,5%), aroma po biljnom ekstraktu dodanom u sok u rasponu od 1,4 (SJ+EG 0,5%) do 3,85 (SJ+EG 2,5%). Aroma na kuhano te strana aroma nisu utvrđene u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga. Ovi rezultati pokazuju kako se sa većim udjelom dodanog ekstrakta smanjuje aroma jabuke, a povećava aroma po biljnom ekstraktu dodanom u sok.

Procijenjeni intenzitet mirisa po jabuci u čistom soku jabuke iznosio je 5,1, dok se u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga kretao u rasponu od 3,7 (SJ+EG 2,5%) do 4,85 (SJ+EG 0,5%). Miris po biljnom ekstraktu dodanom u sok je određen u rasponu od 1,5 (SJ+EG 0,5%) do 3,55 (SJ+EG 2,5%). Strani miris nije utvrđenim u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga. Prema rezultatima senzorske analize vidljivo je da se dodavanje ekstrakta cvijeta i lista gloga u sok jabuke više odrazilo na promjenu intenziteta mirisa nego kod dodatka ekstrakta cvijeta i lista trnine. Dodatak ekstrakta u većoj koncentraciji dobro je prihvaćen od strane ocjenjivača.

Intenzitet kiselog okusa čistog soka jabuke iznosio je 3,05 dok se u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga kretao u rasponu od 2,1 (SJ+EG 2,5%) do 2,7 (SJ+EG 0,5%). Budući da ekstrakt gloga ima viši pH odnosno manji udio kiselina, dodavanjem istog u sok jabuke prouzročio je smanjivanje kiselosti u konačnom proizvodu. Intenzitet slatkog okusa čistog soka jabuke iznosio je 5,5 dok se u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga kretao u rasponu od 4,5 (SJ+EG 2,5%) do 5,2 (SJ+EG 0,5%). Harmoničnost okusa čistog soka jabuke ocijenjena je sa 4,7, dok se u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga kretala u rasponu od 4,6 (SJ+EG 0,5% i 1%) do 5,1 (SJ+EG 2,5%). Strani okus nije utvrđen utvrđenim u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga.

Opći dojam čistog soka jabuke ocijenjen je sa 5,6, a u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga u rasponu od 5,1 (SJ+EG 0,5% i 1%) do 5,7 (SJ+EG 2,5%).

Prema općem dojmu sokovi jabuke obogaćeni ekstraktima cvijeta i lista trnine, ali također gloga ocjenjeni su visokim ocjenama.

Kao i u prethodnim proizvodima u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima lista masline intenzitet žute boje određen je u rasponu od 5,8 (SJ+ELM 1,5%, 2% i 2,5%) do 6,1 (SJ+ELM 0,5%) što je gotovo identično kao i soku jabuke (6,3) koji je korišten kao baza za proizvodnju funkcionalnih napitaka.

U usporedbi s aromom soka jabuke koja je ocjenjena ocjenom 6,3 dodatak ekstrakta lista masline utjecao je na smanjenje intenzita po jabuci te je pri višim kncentracijama dodanog ekstrakta bila značajno izražena aroma po listu masline. Tako je u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima lista masline aroma po jabuci određena je u rasponu od 4,95 (SJ+ELM 2,5%) do 5,9 (SJ+ELM 0,5%), aroma po biljnom ekstraktu dodanom u sok u rasponu od 1,4 (SJ+ELM 0,5%) do 3,25 (SJ+ELM 2,5%). Aroma na kuhano te strana aroma nisu utvrđene u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima lista masline. Ovi rezultati pokazuju kako se intenzitet arome povećavao se s porastom koncentracije dodanog ekstrakta.

Intenzitet mirisa po jabuci u čistom soku jabuke iznosio je 5,1, dodatak ekstrakta lista masline u koncentraciji 0,5% nije se odrazio na svojstvo mirisa i za proizvod SJ+ELM 0,5% iznosio je 5,1, dok je u soku s najvišim udjelom ekstrakta lista masline intenzitet po jabuci bio najslabije izražen 3,9 (SJ+ELM 2,5%). Miris po biljnom ekstraktu dodanom u sok je određen u rasponu od 1,7 (0,5%) do 3,25 (SJ+ELM 2,5%). Strani miris nije utvrđenim u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima lista masline.

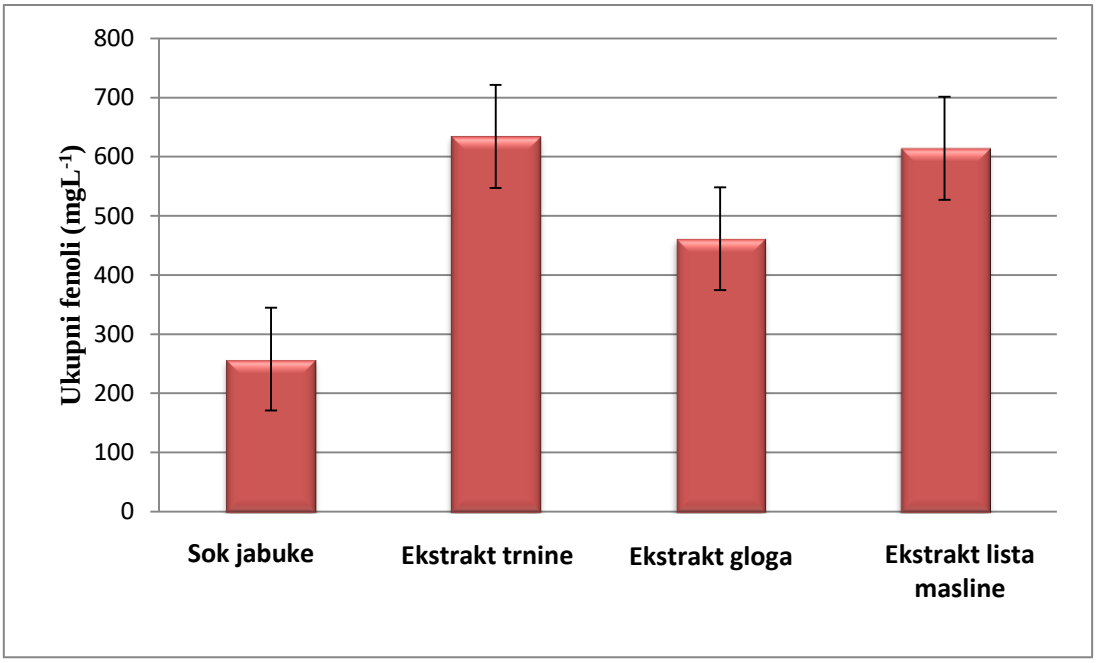
Intenzitet kiselog okusa čistog soka jabuke iznosio je 3,05 dok se u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima lista masline kretao u rasponu od 2,35 (SJ+ELM 2,5%) do 2,7 (SJ+ELM 1,5%). S obzirom da ekstrakt lista masline također ima višu pH vrijednost, dodavanjem istog u sok jabuke prouzročio je smanjivanje kiselosti u konačnom proizvodu.

Intenzitet slatkog okusa čistog soka jabuke iznosio je 5,5 dok se u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima lista masline kretao u rasponu od 4,5 (SJ+ELM 2,5%) do 5,2 (SJ+ELM 0,5%). Harmoničnost okusa čistog soka jabuke ocijenjena je sa 4,7, dok se u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima lista masline kretala u rasponu od 4,8 (SJ+ELM 1,5% i 2,5%) do 4,9 (SJ+ELM 0,5% i 1%). Strani okus nije utvrđen utvrđenim u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima lista masline.

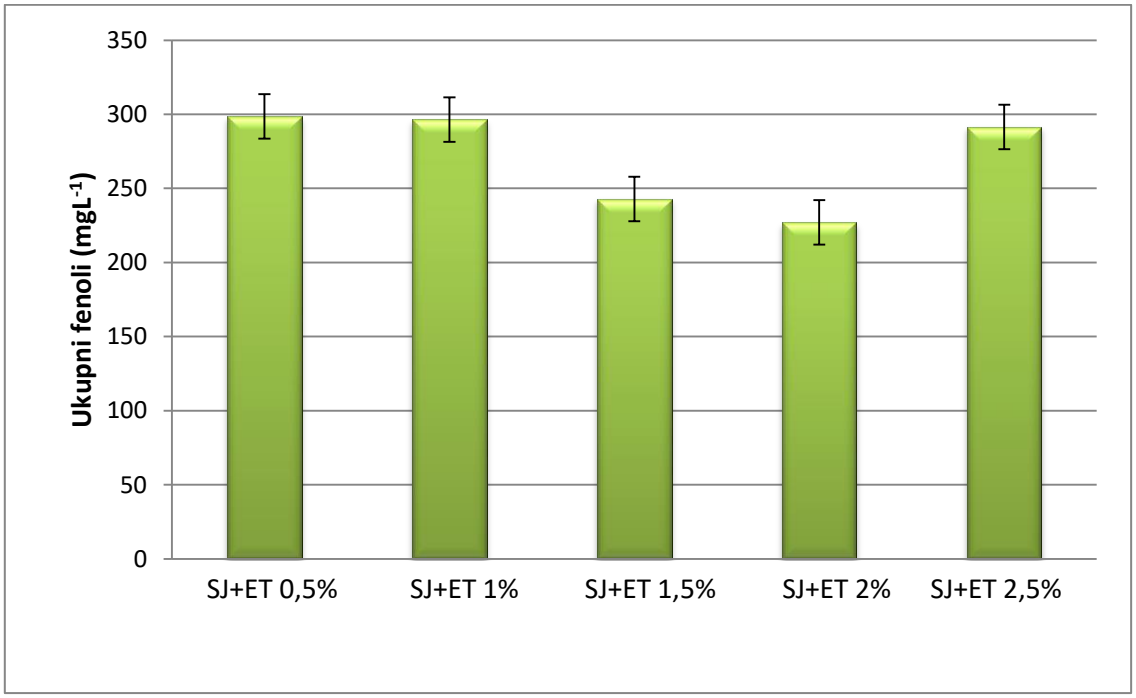
Opći dojam čistog soka jabuke ocijenjen je sa 5,6, a u sokovima jabuke obogaćenim ekstraktima lista masline u rasponu od 5,3 (SJ+ELM 0,5%) do 5,75 (SJ+ELM 2,5%). Prema ocjenama općeg dojma sokova jabuke obogaćenim ekstraktima lista masline je vidljivo da je

dodavanjem ekstrakta lista masline u višoj koncentraciji nastao proizvod okusa koji je ocjenjivačima bio prihvatljiviji od čistog soka jabuke.

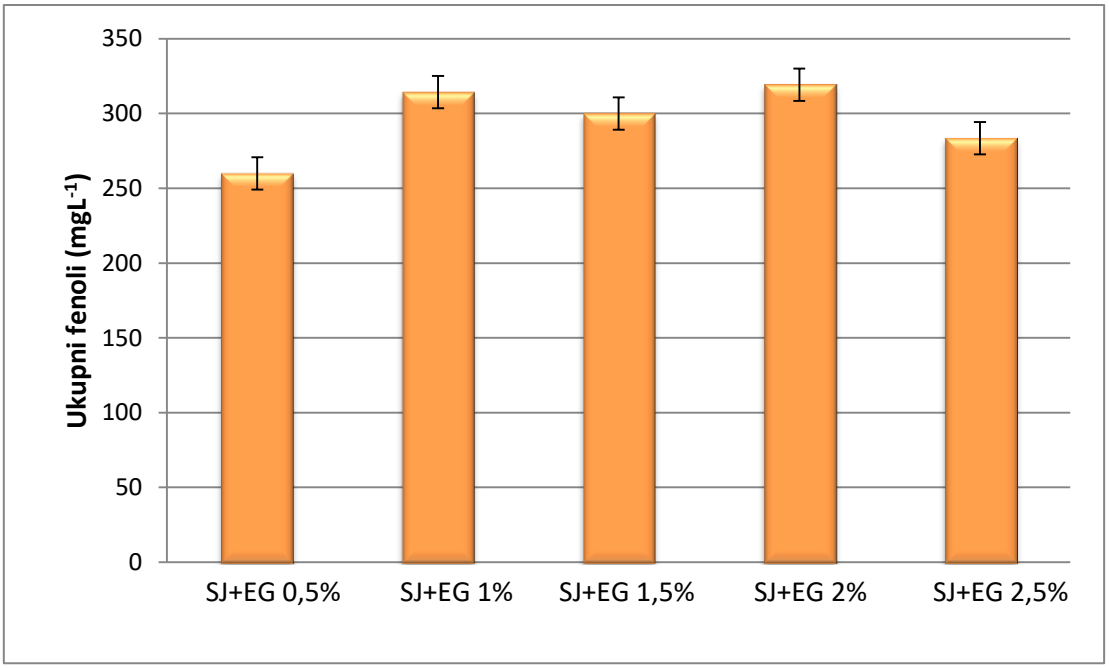
Provedeno je istraživanje kojim je obuhvaćeno usporedno određivanje senzorskih svojstava izgleda, arome, mirisa i okusa u 6 uzoraka sokova jabuke: sokovi pripremljeni od 3 različite sorte jabuke, sok jabuke obogaćen vitaminom C, sok od jabuke i kruške te jabukovača. Senzorska analiza navedenih sokova provedena je primjenom kvantitivne deskriptivne analize te instrumentalnih tehnika elektronskog nosa i elektronskog jezika. Na temelju provedenog istraživanja zaključeno je da postoji korelacija između rezultata senzorskog ocjenjivanja koje su proveli senzorski analitičari te onih koji su dobiveni elektronskim nosom i jezikom (Bleibaum i sur., 2002). Također, provedeno je istraživanje na sokovima jabuke pripremljenim od svježih jabuka koji su termički obrađeni. Primjenom kvantitivne deskriptivne analize ocjenjivala su se senzorska svojstva mirisa i to: voćno, kiselo, slatko, svježe, zeleno te miris po izgorenom. Nakon provedenog istraživanja zaključeno je kako se intenzitet senzorskih svojstava mirisa soka jabuke mijenja s obzirom na temperaturu obrade te trajanje same termičke obrade soka (Kato i sur., 2003).



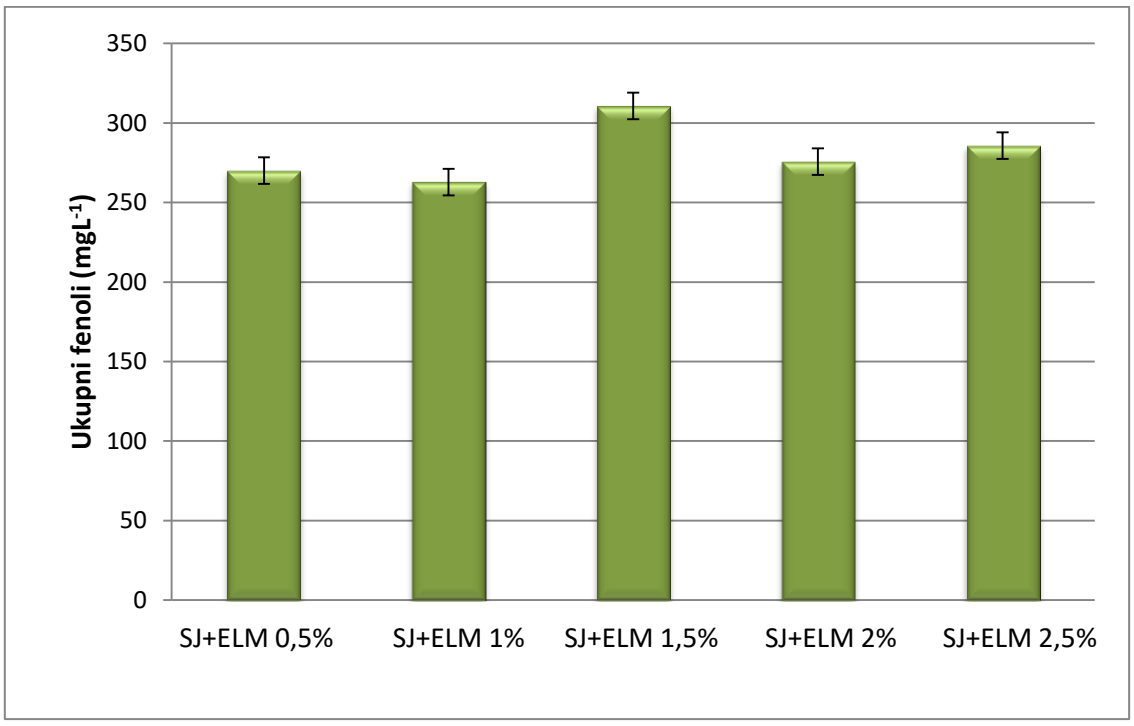
Slika 13. Koncentracija ukupnih fenola (mgL^{-1}) u soku jabuke te ekstraktima trnine, gloga i lista masline (prosječna vrijednost dva paralelna određivanja ± SD)



Slika 14. Koncentracija ukupnih fenola (mgL^{-1}) u sokovima jabuke obogaćenog ekstraktom trnine u pet različitih koncentracija (prosječna vrijednost dva paralelna određivanja ± SD)



Slika 15. Koncentracija ukupnih fenola (mgL^{-1}) u sokovima jabuke obogaćenog ekstraktom gloga u pet različitih koncentracija (prosječna vrijednost dva paralelna određivanja ± SD)



Slika 16. Koncentracija ukupnih fenola (mgL^{-1}) u sokovima jabuke obogaćenog ekstraktom lista masline u pet različitih koncentracija (prosječna vrijednost dva paralelna određivanja ± SD)

Iz rezultata prikazanih na slici 13 vidljivo je da najveći udio ukupnih fenola ima ekstrakt trnine (634,29 ± 4,04 mgL^{-1}), a u padajućem nizu slijede ekstrakt lista masline (614,29 ± 9,06 mgL^{-1}) te ekstrakt gloga (461,43 ± 4,04 mgL^{-1}).

U literaturi nema velik broj podataka o masenim udjelima ukupnih fenola u ekstraktu cvijeta i lista trnine. Prema jedom od istraživanja u ekstraktima cvijeta i lista trnine koji su dobiveni ekstrakcijom po Soxhlet-u sa 70 %-tnim etanolom maseni udio ukupnih fenola iznosio je 46,68 mg GAE/100g suhog uzorka (Kapuralić, 2016). Slična masena koncentracija ukupnih fenola je dobivena u u etanolnim ekstrakatima cvijeta i lista trnine, a iznosila je 57,14 mg GAE/100g suhog uzorka (Fadić, 2016). Lovrić i sur. (2017) su istraživali utjecaj parametara ekstrakcije tijekom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na koncentraciju ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola u cvijetovima trnine te antioksidacijski kapacitet određen sa dvije različite metode (DPPH i FRAP). Parametri ekstrakcije koji su se ispitivali su: vrsta otapala, udio alkohola u otapalu (metanol i etanol), vrijeme i temperatura ekstrakcije. Dobiveni rezultati pokazuju raspon koncentracije ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima trnine od 46.1 ± 1.3 do 63.7 ± 2.9 mg GAE/g, a u metanolnim ekstraktima od 45.2 ± 1.2 do 58.4 ± 13.0 mg GAE/g.

Shortle i sur. (2014) su u svom istraživanju određivali ukupne fenole u ekstraktima lista, cvijeta i ploda gloga. Ekstrakti su dobiveni maceracijom biljke koja je trajala 4 tjedna pri sobnoj temperaturi sa 45 %-tnom vodenom otopinom etanola. Nakon provedenog istraživanja, u ekstraktima lista i cvijeta gloga su određene puno veće koncentracije ukupnih fenola (1,424 ± 0,029 mg GAE/L) u odnosu na koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima plodova gloga (0,800 ± 0,011 mg GAE/L).

Ben Salah i sur. (2012) su proveli istraživanje s 8 varijeteta lista masline u kojima su određivali koncentraciju ukupnih fenola i flavonoida. Različiti kultivari različitog podrijetla su podvrgnuti istim geografskim, geološkim u klimatskim uvjetima. Lišče masline je sušeno koristeći mikrovalnu pećnicu (2500 MHz), tri puta po 2 minute na maksimalnoj snazi. Nakon toga su proizvedeni etanolni ekstrakti osušenog lišća (70 %-tni) te se nakon tjedan dana u njima određivala koncentracija ukupnih fenola koja je bila u rasponu od 73.05 ± 15.52 mgg^{-1}, pa sve do 144.19 ± 10.27 mgg^{-1} ekstrakta.

Rezultati određivanja ukupnih fenola u sokovima jabuke obogaćenih ekstraktima trnine, gloga i lista masline u pet različitih koncentracija (0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5 %) prikazani su na slikama 14, 15 i 16. Iz rezultata je vidljivo da svi sokovi jabuke obogaćeni navedenim biljnim ekstraktima imaju znatno veći udio ukupnih fenola od čistog soka jabuke, što je bilo i za očekivati. U sokovima obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine nije utvrđena pravilnost odnosno povećanje udjela ukupnih fenola s porastom koncentracije dodanog ekstrakta. Tako je najveći udio ukupnih fenola određen u sokovima obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista trnine u kojem je udio ekstrakta dodan u koncentraciji 0,5 % (298,57 ± 2,02), a najmanji udio fenola u sokovima u kojima je udio ekstrakta iznosio 2 % (227,14 ± 4,04). U sokovima obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga je utvrđena pravilnost odnosno povećanje udjela ukupnih fenola s porastom koncentracije dodanog ekstrakta. Tako je najveći udio ukupnih fenola određen u sokovima obogaćenim ekstraktima cvijeta i lista gloga u kojem je udio ekstrakta dodan u koncentraciji 2 % (319,29 ± 7,07), a najmanji udio fenola u sokovima u kojima je udio ekstrakta iznosio 0,5 % (260 ± 12,12). U sokovima obogaćenim ekstraktima lista masline također nije utvrđena pravilnost odnosno povećanje udjela ukupnih fenola s porastom koncentracije dodanog ekstrakta, pa je tako najveći udio ukupnih fenola određen u sokovima obogaćenim ekstraktima lista masline u kojem je udio ekstrakta dodan u koncentraciji 1,5 % (310,71 ± 11,11), a najmanji udio fenola u sokovima u kojima je udio ekstrakta iznosio 1 % (262,86 ± 8,08).

Usporede li se svi sokovi jabuke obogaćeni biljnim ekstraktima sve tri biljne vrste, najveći udio ukupnih fenola od svih 15 uzoraka ima sok jabuke obogaćen ekstraktom gloga dodanog u koncentraciji od 2% (319,29 ± 7,07 mgL^{-1}), dok najmanji udio ukupnih fenola ima sok jabuke obogaćen ekstraktom trnine dodanog u koncentraciji 2 % (227,14 ± 4,04 mgL^{-1}).

U istraživanju koje su proveli Ivanišova i suradnici (2009) ispitivan je utjecaj dodatka ekstrakata odabranih biljnih vrsta u sok jabuke na poboljšanje svojstava okusa i mirisa te funkcionalnih karakteristika. Rezultati antioksidacijskog učinka pripremljenih obogaćenih sokova jabuke su bili vrlo visoki, a kretali su se u rasponu od 73 % do 78,49 %. Prema tome zaključeno je kako se biljni ekstrakti mogu koristiti kao potencijalni aditivi za hranu radi izbjegavanja oksidacijskih promjena u prehrambenim proizvodima te poboljšavanja senzorskih i funkcionalnih svojstava nekih vrsta napitaka.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog eksperimenta te analiza, dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Topljiva suha tvar biljnih ekstrakata cvijeta i lista trnine i gloga te lista masline bila je ispod 1 %, a pH vrijednost oko 5.
2. Dodatkom biljnih ekstrakata cvijeta i lista trnine i gloga te lista masline proizvedeni su funkcionalni napitci ujednačenih vrijednosti topljive suhe tvari i pH vrijednosti.
3. Dodatkom većeg udjela biljnih ekstrakata u sok jabuke intenzitet žute boje sokova se značajno ne mijenja, aroma i miris po jabuci se smanjuju, dok se aroma i miris po biljnom ekstraktu povećavaju. Slatkoća i kiselost sokova je bila slična u svim uzorcima.
4. Harmoničnost sokova je bila veća kod sokova koji su obogaćeni biljnim ekstraktima ispitivanih biljaka, a koji su bili u konačnom proizvodu zastupljeni u udjelima 0,5 i 1 %. Unatoč boljoj harmoničnosti u proizvodima s nižim udjelom ekstrakata, uzimajući u obzir sve parametre senzorske analize funkcionalni napitci koji su sadržavali 2 % biljnog ekstrakta pokazuju bolju opću prihvatljivost kod ocjenjivača.
5. Aroma na kuhano, strana aroma, strani miris i strani okus nisu utvrđeni niti u jednom od ispitivanih uzoraka.
6. U svim ekstraktima određen je visok udio ukupnih fenola s tim da je najveća koncentracija određena u ekstraktu trnine (634,29 ± 4,04 mgL^{-1}), a najmanja u ekstraktu gloga (461,43 ± 4,04 mgL^{-1}).
7. Najveći udio ukupnih fenola između 15 uzoraka sokova obogaćenih biljnim ekstraktima ima sok jabuke obogaćen ekstraktom gloga u koncentraciji od 2 %, dok najmanji udio ukupnih fenola ima sok jabuke obogaćen ekstraktom trnine u koncentraciji od 2 %.
8. Općenito, može se zaključiti da ekstrakti istraživanih biljaka s obzirom na udio fenolnih spojeva te opću prihvaćenost na temelju rezultata senzorske analize predstavljaju dobru bazu za proizvodnju funkcionalnih napitaka.

6. LITERATURA

Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., Zarrouk, M. (2015) Olive tree (*Olea europeae* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants* **4**, 682-698.

Al-Attar, A. M., Alsalmi, F. A. (2017) Effect of Olea europaea leaves extract on streptozotocin induced diabetes in male albino rats. *Saudi J. Biol. Sci.* **17**, 1-37.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., Mason, T.J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 261-265.

Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A. (2007) Application of phenolic extracts from selected plants in fruit juice. *Int. J. Food Prop.* **10**, 479-488.

Ashurst, P. R. (2005) Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices, 2.izd., Blackwell Publishing, Hereford, UK.

Ben Salah, M., Abdelmelek, H., Abderraba, M. (2012) Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Med. chem.* **2**, 107-111.

Bigliardi, B., Galati, F. (2013) Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends Food Sci Technol.* **31**, 118-129.

Bijeljac, S., Toroman, A. (2008) Senzorska analiza. Interna skripta, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo.

Bleibaum, R. N., Stone, H., Tan, T., Labreche, S., Saint – Martin, E., Isz, S. (2002) Comparison of sensory and consumer results with electronic nose and tonque sensors for apple juices, Tragon Corporation, Redwood City, USA.

Buneta, A. (2015) Rogač i mak kao izvori funkcionalnih sastojaka. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P., Sinigaglia, M. (2014) Functional beverages: The emerging side of functional foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **13**, 1192-1206.

De Maria, G. (2006) Functional beverages: An overview. *Agro Food Ind. Hi Tech.* **4**, 34-40.

Dobričević, N., Voća, S., Žlabur, J. Š., Galić, A., Pliestić, S., Dunđer, T. (2016) Uporaba komercijalnih sokovnika u pripremi svježih sokova. *J. Agric. Eng.* **10**, 455-459.

Drake, M. A. (2007) Invited review: Sensory analysis of dairy foods. *J. Dairy Sci.* **90**, 4925-4937.

Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22-33.

Edwards, E. J., Brown, N. P., Talent, N., Dickinson, T.A., Shipley, P.R. (2012) A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* **79,** 5-26.

Fadić, K. (2016) Izolacija bioaktivnih komponenti iz cvijeta i lista trnine. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Filajdić, M., Ritz, M., Vojnović, V. (1988) Senzorska analiza mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* **38**, 295-301.

Gironés-Vilaplana, A., Villano, D., Moreno, D. A., García-Viguera, C. (2013) New isotonic drinks with antioxidant and biological capacities from berries (maqui, açaí and blackthorn) and lemon juice. *Int. J. Food Sci. Nutr*. **64**, 897-906.

Granato, D., Ribeiro, J. C. B., Castro, I. A., Masson, M. L. (2010) Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. *Food Chem.* ***121***, 899-906.

Gruenwald, J. (2009) Novel botanical ingredients for beverages. *Clin. Dermatol.* **27**, 210-216.

Gunathilake, K. D. P. P., Rupasinghe, H. V., Pitts, N. L. (2013) Formulation and characterization of a bioactive-enriched fruit beverage designed for cardio-protection. *Food Res. Int* **52**, 535-541.

Hacıseferoğulları, H., Gezer, I., Özcan, M. M., MuratAsma, B. (2007) Post-harvest chemical and physical–mechanical properties of some apricot varieties cultivated in Turkey. *J. Food Eng*. ***79***, 364-373.

Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D. (2008) Extraction technologies for medicinal and aromatic, International Centre for Science and High Technology, Trieste.

HRZZ (2017) Hrvatska zaklada za znanost. <www.hrzz.hr>. Pristupljeno 14. kolovoza 2017.

Ivanišová, E., Fikselová, M., Vietoris, V., Mellen, M. (2009) Antioxidant effects of herbal extracts and their food application. *Slovak J. Food Sci.* **4**, 34-37.

Jašić, M. (2007) Fizikalno – kemijska i senzorska svojstva voća i povrća, Tehnološki fakultet Tuzla.

Jiménez, P., García, P., Bustamante, A., Barriga, A., Robert, P. (2016) Thermal stability of oils added with avocado (*Persea americana* cv. *Hass*) or olive (*Olea europaea* cv. *Arbequina*) leaf extracts during the French potatoes frying. *Food Chem.* **221**, 123-129.

Kapuralić, T. (2016) Izolacija i karakterizacija bioaktivnih komponenata iz cvijeta i lista trnine. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Kato, T., Shimoda, M., Suzuki, J., Kawaraya, A., Igura, N., Hayakawa, I. (2003) Changes in the odors of squeezed apple juice during thermal processing, *Food Res. Int.* **36**, 777 – 785.

Kavaz Yuksel, A. (2015) The effects of blackthorn (*Prunus spinosa L.*) addition on certain quality characteristics of ice cream. *J. Food Qual.* **38**, 413-421.

Kreisz, S., Arendt, E. K., Hübner, F., Zarnkov, M. (2008) Cereal-based gluten-free functional drinks. U: Gluten Free Cereal Products and Beverages, (Arendt, K., E., Dal Bello, F., ured.), Food Science and Technology International Series. Elsevier, Academic Press, Amsterdam, str. 373-391.

Lafka, T. I., Lazou, A. E., Sinanoglou, V. J., Lazos, E. S. (2013) Phenolic extracts from wild olive leaves and their potential as edible oils antioxidants. *Foods* **2**, 18-31.

Lawless, H. T., Heymann, H. (2010) Sensory evaluation of food: principles and practices, 4.izd., Springer Science & Business Media, London.

Liu, P., Yang, B., Kallio, H. (2010) Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. Var. *major*) fruit by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem.* **121**, 1188-1197.

Lovrić, V., Putnik, P., Kovačević, D. B., Jukić, M., Dragović-Uzelac, V. (2017) Effect of Microwave-Assisted Extraction on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackthorn Flowers. *Food Technol. Biotechnol.* **55**, 243-250.

Mansour, E. H., Khalil, A. H. (2000) Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application to ground beef patties. *Food Chem.* **69**, 135-141.

Mayer, M. A., Harel, E. (1979) Review: polyphenol oxidases in plants, *Phytochem.* **18**, 277 – 282.

Mendiola, J. A., Marin, F. R., Señoráns, F. J., Reglero, G., Martín, P. J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2008) Profiling of different bioactive compounds in functional drinks by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A.* **1188**, 234-241.

Menrad, K. (2003) Market and marketing of functional food in Europe. *J. Food Eng.* **56**, 181-188.

Murray, J. M., Delahunty, C. M., Baxter, I. A. (2001) Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Res. Int.* **34**, 461-471.

Navarro, M., Morales, F. J. (2016) Evaluation of an olive leaf extract as a natural source of antiglycative compounds. *Food Res. Int.* **92**, 56-63.

Olszewska, M., Wolbiś, M. (2000) Phenolic acids in flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Herba Pol.* **46**, 249-254.

Özcan, M., Haciseferoğullari, H., Marakoğlu, T., Arslan, D. (2005) Hawthorn (*Crataegus* spp.) fruit: some physical and chemical properties. *J. Food Eng.* **69**, 409-413.

Palma, M., Barbero, G. F., Pineiro, Z., Liazid, A., Barroso, C. G., Rostagno, M. A., Prado, J. M., Meireles, M. A. A. (2013) Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects. U: *Natural Product Extraction Principles and Application* (Rostagno, M. A., Prado, J. M., ured.) RSC Publishing, Cambridge, str. 58-88.

Peschel, W., Bohr, C., Plescher, A. (2008) Variability of total flavonoids in *Crataegus*-Factor evaluation for the monitored production of industrial starting material. *Fitoterapia* **79**, 6-20.

Pinacho, R., Cavero, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., Calvo, M. I. (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of *in vitro* digestion on their antioxidant capacity. *J. Funct Foods.*, **19**, 49-62.

Popescu, I., Caudullo, G. (2016) *Prunus spinosa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: European Atlas of Forest Tree Species, (San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. ured.), Luxembourg, str. 145.

Rimac Brnčić, S. (2016) Nova hrana. Interna skripta, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Ritz, M., Vojnović, V., Vahčić, N. (1991) Sistem bodovanja u senzorskoj procjeni kvalitete sira. *Mljekarstvo* **41**, 127-135.

Şahin, S., Şamlı, R. (2013) Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 595–602.

Segundo M, Magalheas L, Reis S. (2007) Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta.* **613**, 1-19.

Servili, M., Rizzello, C. G., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Mazzacane, F., Di Maio, I., Selvaggini, R., Gobbetti, M., Di Cagno, R. (2011) Functional milk beverage fortified with phenolic compounds extracted from olive vegetation water, and fermented with functional lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **147**, 45-52.

Shortle, E., Kerry, J., Furey, A., Gilroy, D. (2013) Optimisation of process variables for antioxidant components from *Crataegus monogyna* by supercritical fluid extraction (CO_2) using Box- Behnken experimental design. *J. Supercrit. Fluids* **81**, 112-118.

Shortle, E., O'Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.

Sikora, E., Bieniek, M. I., Borczak, B. (2013) Composition and antioxidant properties of fresh and frozen stored blackthorn fruits (*Prunus spinosa L.*). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **12**, 365-372.

Siro, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A. (2008) Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite,* **51**, 456-467.

Sokół-Łętowska, A., Oszmiański, J., Wojdyło, A. (2007) Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Chem.* **103**, 853-859.

Spira, T. P. (2011) *Wildflowers & Plant Communities of the Southern Apalachian Mountains and Piedmont*, University of North Carolina Press.

Toplak Galle, K. (2001) *Hrvatsko ljekovito bilje*, Mozaik knjiga, Zagreb

Vinatoru, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* **8**, 303-313.

Zenith (2003) *The 2003 Zenith Report on International Functional Soft Drinks*. Zenith International Publishing Ltd, Bath, United Kingdom.