

Utjecaj enzimskog tretmana na antioksidativnu aktivnost i udjel ukupnih fenolnih spojeva ljusaka heljde kriomljevenih do veličine čestica

Rnjak, Viktorija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:523123>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Viktorija Rnjak

7151/PT

**UTJECAJ ENZIMSKOG TRETMANA NA ANTIOKSIDATIVNU
AKTIVNOST I UDJEL UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA LJUSAKA
HELJDE KRIOMLJEVENIH DO VELIČINE ČESTICA < 56 μ m**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: „Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa" (IP-2016-06-3789) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Marina Krpan

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ ENZIMSKOG TRETMANA NA ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST I UDJEL UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA LJUSAKA HELJDE KRIOMLJEVENIH DO VELIČINE ČESTICA < 56 µm

Viktorija Rnjak, 0058207416

Sažetak: Heljdine ljuske su nusproizvod prehrambene industrije te imaju veliki potencijal za primjenu u ljudskoj prehrani zbog svoje nutritivne vrijednosti. Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj enzimskog tretmana celulazom i hemicelulazom na udjel ukupnih fenolnih spojeva određen TPC metodom te na antioksidativnu aktivnost određenu DPPH i FRAP metodom u uzorcima ljusaka heljde kriomljevenih do veličine čestica < 56 µm. Enzimski tretman proveden je s dodatkom 0,1 % i 1 % enzima, tijekom jednog, četiri i osam sati. Na temelju dobivenih rezultata utvrđeno je da produljenjem enzimskog tretmana dolazi do smanjenja antioksidativne aktivnosti, a primjena različite koncentracije enzima ne dovodi do značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti nakon tretmana. Enzimski tretman s dodatkom 0,1 % ili 1 % enzima tijekom jednog sata dovodi do značajnog povećanja antioksidativne aktivnosti. Povećanje udjela fenolnih spojeva utvrđeno je nakon tretmana s dodatkom 1 % enzima tijekom četiri sata i 0,1 % enzima tijekom jednog sata.

Ključne riječi: DPPH, enzimski tretman, FRAP, heljdine ljuske, TPC

Rad sadrži: 26 stranica, 12 slika, 1 tablica, 47 literaturnih navoda

Jezik izvornika: Hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom formatu pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Marina Krpan

Pomoć pri izradi: Saša Drakula, mag. ing.

Rad predan: 8.srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food technology

Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF ENZYMATIC TREATMENT ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND THE TOTAL PHENOLIC CONTENT OF BUCKWHEAT HULLS CRYO-MILLED TO PARTICLE SIZE < 56 µm

Viktorija Rnjak, 0058207416

Abstract: Buckwheat hulls are a by-product of food industry and they have a great potential for the use in human nutrition because of their nutritional value. The aim of this thesis was to determine the influence of enzymatic treatment with cellulase and hemicellulase on the share of the total phenolic compounds determined by the TPC method and the influence on the antioxidant activity by DPPH and FRAP method in the buckwheat hulls that were cryomilled to the < 56 µm particle size. The enzymatic treatment was performed with the addition of 0,1 % i 1 % enzyme during one, four and eight hours. Based on the obtained results, it is found that by prolonging the enzymatic treatment, the antioxidant activity decreases and the use of different enzymatic concentrations does not lead to significant differences in the antioxidant activity after the treatment. The enzymatic treatment with the addition of 0,1% or 1% of the enzyme during one hour leads to a significant increase in antioxidant activity. The increase in the share of phenolic compounds was found after treatment with the addition of 1% enzyme during four hours and 0,1% enzyme during one hour.

Keywords: buckwheat hulls, DPPH, enzymatic treatment, FRAP, TPC

Thesis contains: 26 pages, 12 figures, 1 table, 47 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Trechnology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000

Mentor: Marina Krpan, PhD, Associate Professor

Tecnical support and assistance: Saša Drakula, MSc

Thesis delivered: July 8th2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Heljda.....	2
2.2. Kriogeno mljevenje.....	2
2.3. Enzimi	3
2.3.1. Hemicelulaze	3
2.3.2. Celulaze	3
2.4. Fenolni spojevi i antioksidansi.....	4
2.5. Određivanje ukupnih fenola TPC metodom.....	5
2.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom.....	6
2.7. Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. Materijali	9
3.1.1. Laboratorijska oprema i uređaji	9
3.1.2. Suspenzije enzima	10
3.1.3. Kemikalije	10
3.2. Metode rada.....	11
3.2.1. Ekstrakcija slobodnih polarnih spojeva iz heljdinih ljusaka.....	11
3.2.2. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva TPC metodom	11
3.2.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom.....	12
3.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom	13
3.2.5. Obrada rezultata.....	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. Rezultati određivanja ukupnih fenolnih spojeva TPC metodom.....	14
4.2. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom	16
4.3. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti FRAP metodom	18
5. ZAKLJUČAK.....	21
6. LITERATURA.....	22

1. UVOD

Obična heljda (*Fagopyrum esculentum*) je žitarica koja potječe iz jugozapadne Kine, a u Europi se uzgaja od početka 15. stoljeća. Napredak u uzgoju heljde bio je spor zbog složenog genetičkog sustava uključujući i spolni dimorfizam. Heljda se u modernom vremenu uglavnom konzumira zbog svog okusa, raznolikosti u jelovniku, tradicije te saznanja o utjecaju na ljudsko zdravlje (Kreft i Germ, 2008). Heljda ne sadrži gluten stoga se u svrhu proizvodnje čistog heljdinog brašna primjenjuju posebne tehnike (Kreft i Germ, 2008). Heljda pokazuje i izuzetan učinak na ljudsko zdravlje, a osobito na liječenje kroničnih bolesti. Heljdine ljuske danas nisu zastupljene u ljudskoj prehrani, već se većinom koriste za izradu jastuka. Proizvođači i distributeri jastuka punjenih heljdinim ljuskama prodaju ih kao korisne za mnoštvo tretmana uključujući glavobolje, hrkanje te bol u donjem dijelu leđa (Fritz i Gold, 2003). Ljuske su, kao i sama zrna heljde, bogate polifenolnim spojevima koji pokazuju antioksidativnu aktivnost, stoga se danas istraživanja odnose i na mogućnost iskorištavanja ljusaka kao nusproizvoda u prehrambenoj industriji. Također se danas sve više naglasak stavlja na pravilnu prehranu koja je ključ u prevenciji bolesti, a hrana bogata antioksidansima iz prirodnih izvora upravo pomaže kod suzbijanja kroničnih bolesti koje su danas sve učestalija pojava radi stresnog načina života. Takav način života, onečišćenja iz prirode i druge pojave pogoduju nastajanju slobodnih radikala koji napadaju imunološki sustav organizma, a antioksidansi su učinkoviti u borbi sa slobodnim radikalima.

Cilj ovog rada je bio utvrditi utjecaj enzimskog tretmana na udjel ukupnih slobodnih fenolnih spojeva određen TPC metodom te na antioksidativnu aktivnost određenu DPPH i FRAP metodom u uzorcima ljusaka heljde kriomljevenih do veličine čestica < 56 µm.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Heljda

Heljda je visoko nutritivna pseudožitarica poznata kao izvor proteina s povoljnim sastavom aminokiselina, vitamina, škroba, prehrambenih vlakana, minerala te elemenata u tragovima. Bogata je i fenolnim spojevima (Sedej i sur., 2012). Karakterizira ju trokutasto zrno i bijeli, ružičasti ili žuti cvijet. Heljdine ljuske imaju manju gustoću od vode što omogućuje njihovo lako odvajanje od zrna. Tvrdoća ljusaka ovisi o vrsti heljde (Si-quan i Howard Zhang, 2001).

Aminokiseline u heljdi nalaze se u dobro uravnoteženom omjeru u usporedbi s drugim žitaricama, osobito lizin koji je prva limitirajuća aminokiselina u biljnim proteinima te arginin. U jestivim dijelovima sjemena heljde, ona sadrži visokokvalitetne proteine koji se mogu dobro nadopunjavati s drugim biljnim proteinima, upravo zbog visokog sadržaja lizina i arginina (Si-quan i Howard Zhang, 2001).

Heljdine ljuske predstavljaju nusproizvod u prehrambenoj industriji te se zbog svog sastava sve više istražuju u svrhu primjene u ljudskoj prehrani. U heljdinim ljuskama prevladavaju polifenolni spojevi od kojih se ističu flavonoidi i to rutin, orientin, viteksin, kvercetin, izoviteksin i izoorientin koji pokazuju snažnu antioksidativnu aktivnost (Dietrych-Szostak i Oleszek, 1999).

2.2. Kriogeno mljevenje

Termin „kriogenika“ dolazi od grčke riječi koja znači studen ili mraz, a kojom se označava proizvodnja pomoću hladnoće.

Kriogenika proučava ponašanje materijala pri niskim temperaturama (Rohit, 2013). Kriogeno mljevenje je proces hlađenja materijala te njegovog usitnjavanja na čestice manjih veličina. Najčešće korištena kriogena tekućina je tekući dušik jer je u prirodi inertan. Čuva se u niskotlačnim spremnicima koji su izrađeni za održavanje radnog tlaka unutar tekuće faze pomoću odzračivanja, izolacije i hlađenja (Junghare i sur., 2017). Kriogeno mljevenje danas ima široku primjenu. De Boer i Maessen (1980) tehniku kriogenog mljevenja primjenili su na uzorke ljudske posteljice. Korištenjem dva različita rashladna medija, suhi ledeni aceton (-78 °C) te tekući dušik (-196 °C), usporedili su efikasnost

redukcije čestica te pokazali kako je mljevenje pri nižim temperaturama dovelo do tvorbe čestica manjih veličina.

Tehnika kriogenog mljevenja također se može primjeniti kod očuvanja kvalitete začina. Izrazito niske temperature dovode do skrućivanja ulja čime začini postaju krhki, lako se mrve što omogućuje finije mljevenje do konzistentnih veličina (Li i sur., 1991).

2.3. Enzimi

Tradicionalna prerada hrane obično uključuje upotrebu endogenih enzima čija se aktivacija postiže klijanjem ili ih stvaraju mikroorganizmi tijekom fermentacije. Brojni enzimi kao što su amilaze, hemicelulaze i celulaze se koriste za preradu žitarica poput pšenice, raži, ječma i drugih, u proizvodnji kruha i piva kako bi se poboljšala tekstura, volumen, viskoznost, kapacitet zadržavanja vode, trajnost i druga svojstva (Hamer, 1991).

2.3.1. Hemicelulaze

Hemicelulaze su enzimi ključni za degradaciju biljne biomase te za prijenos ugljika u prirodi. Supstrati tih enzima su hemiceluloze, heterogena skupina razgranatih i linearnih polisaharida koji su vodikovim vezama vezani za celulozne mikrofibrile u biljnoj staničnoj stijenci, povezujući ih u robusnu mrežu (Shallom i Shoham, 2003). Dijelovi enzima odgovorni za katalitičku ulogu kod hemicelulaza dijele se na glikozidne hidrolaze koje hidroliziraju glikozidne veze te na ugljikohidratne esterase koje hidroliziraju esterske veze bočnih skupina octene i ferulinske kiseline (Shallom i Shoham, 2003).

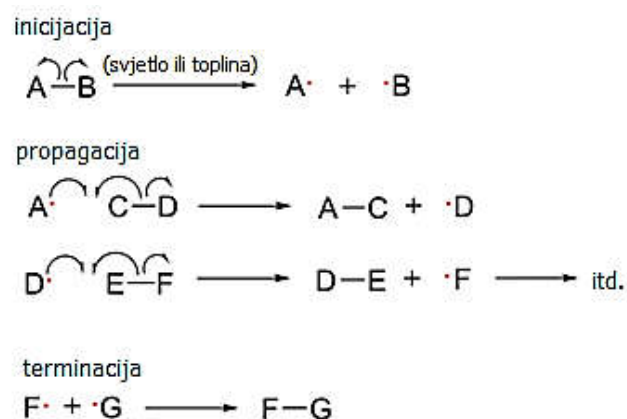
2.3.2. Celulaze

Celulaze su enzimi koji razgrađuju celulozna biljna vlakna u beta-glukozu i kratkolančane polisaharide. Gotovo sve vrste bakterija, gljiva i protozoa mogu sintetizirati celulazu, no ljudi i životinje ne. Celulaza se sastoji od kompleksa nekoliko različitih enzima, uključujući egzoglukanaze (također zvane celobiohidrolaze), endoglukanaze te beta-glukozidaze (Bhat i Bhat, 1997). Ovi enzimi djeluju zajedno i tako omogućuju potpunu razgradnju celuloze na jednostavne šećere (Koivula, 1996).

2.4. Fenolni spojevi i antioksidansi

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti i ubikvitarni su u biljkama. Sastavni su dio ljudske prehrane, osobito zbog svojih antioksidativnih svojstava (Balasundram i sur., 2006). Strukturu fenolnih spojeva čini aromatski prsten na kojeg je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Molekule fenolnih spojeva mogu biti jednostavne strukture, ali i visoko polimerizirani spojevi (Bravo, 1998). Prema kemijskoj strukturi, fenolni spojevi dijele se na flavonoide i fenolne kiseline te njima srodne spojeve. Flavonoidi su široko rasprostranjeni u biljkama (Rice Evans i sur., 1995).

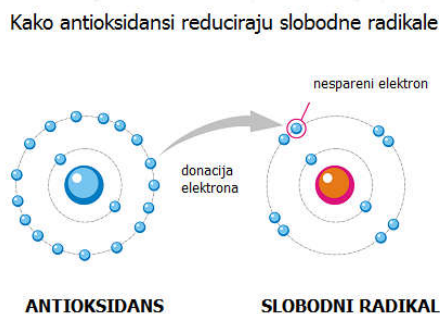
Fenolni spojevi smatraju se prirodnim antioksidansima (Parr i Bolwell, 2000). Antioksidativna svojstva fenolnih spojeva igraju važnu ulogu u adsorbiranju te neutralizaciji slobodnih radikala (Velioglu i sur., 1998; Osawa i sur., 1994). Slobodni radikal može se definirati kao atom ili molekula koji sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj orbitali valentne ljuske i sposoban je za neovisno postojanje. Jedinstveni broj elektrona slobodnog radikala čini ga nestabilnim, kratkotrajnim i vrlo reaktivnim. Zbog visoke reaktivnosti, radikali mogu povući elektrone iz drugih spojeva kako bi postigli stabilnost. Tako napadnute molekule oslobađaju svoj elektron i postaju slobodni radikali, čime započinje kaskada lančanih reakcija, a to u konačnici oštećuje živu stanicu (Phaniendra i sur., 2014). Mehanizam nastajanja slobodnih radikala koji obuhvaća fazu inicijacije, terminacije i propagacije prikazan je na slici 1.



Slika 1. Faze lančane reakcije nastanka slobodnog radikala (Chemistry LibreTexts, 2019)

Antioksidansi mogu odgoditi ili inhibirati oksidaciju lipida ili drugih molekula tako što inhibiraju proces inicijacije i propagacije oksidacijskih lančanih reakcija. Imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala tj. reaktivnih kisikovih oblika zbog toga što je redukcijski

potencijal elektrona fenolnog radikala niži od redukcijskog potencijala elektrona reaktivnog kisikovog oblika (Mathew i sur., 2015). Kako antioksidansi djeluju na slobodne radikale prikazano je na slici 2.



Slika 2. Prikaz djelovanja molekule antioksidansa na molekulu slobodnog radikala
(ResearchGate, 2019)

Antioksidansi mogu biti prirodni i sintetski (Velioglu i sur., 1998). Većina prirodnih antioksidansa je prisutna u voću, povrću i začinicima kao što su grožđe, ružmarin, kurkuma, zeleni čaj, đumbir, češnjak. Oni sadrže širok raspon antioksidativnih spojeva kao što su fenoli, polifenoli, flavonoidi, karotenoidi, steroidi i tiolni spojevi (Lotito i Frei, 1996).

2.5. Određivanje ukupnih fenola TPC metodom

TPC (engl. *Total Phenolic Content*) je analitička metoda koja se koristi za kvantifikaciju ukupnih fenolnih spojeva u hrani ili nekom drugom biološkom uzorku, a temelji se na reakciji fenolnih spojeva s kolorimetrijskim reagensom zvanim Folin-Ciocalteu reagens koji omogućava mjerenja u vidljivom dijelu spektra (Magalhães, 2006; Robards i Antolovich, 1997).

Metoda se zasniva na prijenosu elektrona s fenolnih spojeva na kompleks fosfomolibdenske ili fosfovolframatne kiseline u bazičnom mediju pri čemu dolazi do nastanka plavog obojenja čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri 760 nm (Singleton i Rossi, 1965; Singleton i sur., 1999). Iako kemijska priroda reakcija Folin-Ciocalteu reagensa nije u potpunosti poznata, pretpostavlja se da se sastoji od slijeda reverzibilnih redukcijskih reakcija koje uključuju prijenos jednog ili dva elektrona i vode k nastanku plavo obojenih kemijskih vrsta (moguće $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$) (Singleton i Rossi, 1965).

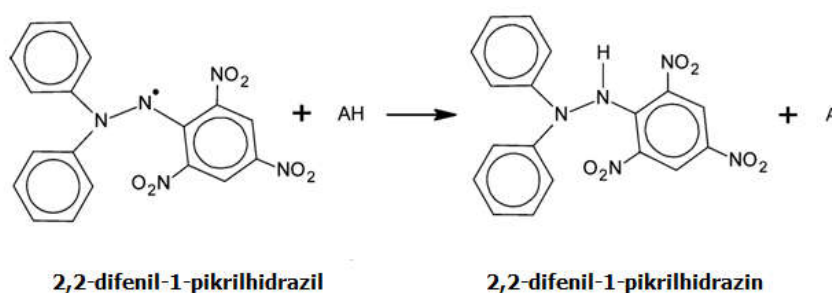
Poseban značaj treba se pridodati tumačenju rezultata dobivenih reakcijama s Folin-Ciocalteu reagensom jer te reakcije nisu potpuno selektivne te na rezultate mogu utjecati drugi oksidansi odnosno supstrati na način da inhibiraju, djeluju sinergijski ili pak pojačavaju učinak samog reagensa (Huang i sur., 2005). Do inhibicije može doći uslijed kompetitivnog ponašanja oksidansa u odnosu na Folin-Ciocalteu reagens ili zbog oksidacije iz zraka nakon što uzorak dođe u kontakt s bazičnim medijem. Zbog tog se Folin-Ciocalteu reagens dodaje u suvišku da bi u potpunosti reagirao sa svim fenolnim spojevima (Singleton i Rossi, 1965). Spojevi poput taninske kiseline, galne kiseline, katehina i drugih se koriste kao standardi za prikazivanje rezultata, a izražavaju se kao maseni ekvivalent po masi ili volumenu uzorka (Singleton i sur., 1999).

2.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda jedna je od najpopularnijih i najčešće korištenih metoda za ispitivanje sposobnosti spojeva za hvatanje slobodnih radikala ili doniranje vodika te za procjenu antioksidativne aktivnosti sastojaka iz hrane (Pyrzynska i Pełal, 2013).

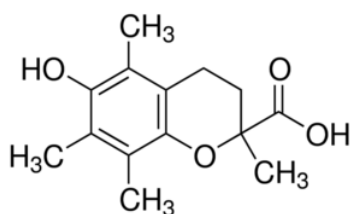
DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O$) je stabilan dušikov radikal tamno ljubičaste boje. Metoda se temelji na tome da se ion DPPH reducira u DPPH[•] prilikom primanja vodikovog iona (H) od molekule „hvatača“ odnosno antioksidansa što rezultira prelaskom ljubičaste u žutu boju te se pritom smanjuje apsorbanacija pri 515 nm (Mishra i sur., 2012).

Promjena intenziteta boje određuje se spektrofotometrijski te se koristi za određivanje parametara antioksidativne aktivnosti (Mishra i sur., 2012). Kemijska struktura DPPH radikala prikazana je na slici 3.



Slika 3. Kemijska struktura DPPH radikala te reakcija s molekulom antioksidansa (Pyrzynska i Pełal, 2013)

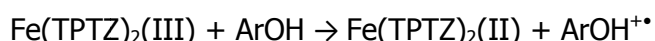
Metoda je jedinstvena zbog mogućnosti izvođenja reakcije uzorka s DPPH u metanolu/vodi što olakšava ekstrakciju antioksidativnih spojeva iz uzorka (Kedare i Singh, 2011). Analiza antioksidativnih spojeva s drugim metodama može biti ograničena na spojeve topljive u odabranim otapalima. Prednost ove metode je to što DPPH može reagirati s cijelim uzorkom te će, ukoliko je uloženo dovoljno vremena, sporije reagirati i sa slabim antioksidansima (Prakash, 2001). Promjena apsorbancije kod DPPH metode može se usporediti s promjenom induciranom od strane referentnog spoja. Spojevi koji se koriste kao standardni antioksidansi uključuju limunsku kiselinu, α -tokoferol, galnu kiselinu, butilhidroksiltoulen (BHT) i trolox ((\pm)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiselina). Trolox, u vodi topljiv analog vitamina E, nema neki fiziološki značaj i njegov izbor kao standarda za antioksidativnu aktivnost je proizvoljan. Međutim, izražavanje rezultata u ekvivalentima troloxa pomaže pri usporedbi objavljenih podataka (Kedare i Singh, 2011). Slika 4. prikazuje kemijsku strukturu molekule troloxa.



Slika 4. Kemijska struktura troloxa (Sigma-Aldrich, 2019)

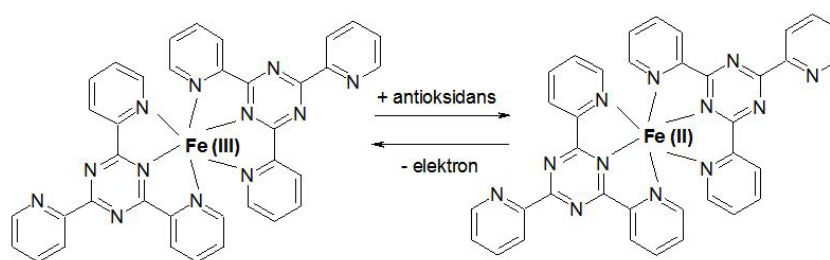
2.7. Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) je jednostavna, brza te robusna metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti (Benzie i Strain, 1999). Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu dolazi do stvaranja plavo obojenog kompleksa koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm. Kemijska reakcija prikazana je u kemijskoj jednadžbi na slici 5. (Ou i sur., 2002).



Slika 5. Kemijska jednadžba reakcije prijenosa elektrona između kompleksa željeza i TPTZ (Ou i sur., 2002)

FRAP analiza se mora provoditi u kiselom mediju pri pH=3,6 da bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a također dolazi i do povećanja redoks potencijala koji onda omogućuje pomicanje ravnoteže u smjeru prijenosa elektrona. Standardni redoks potencijal reakcije prelaska Fe^{3+} u Fe^{2+} iznosi 0,77 V pa bi stoga svi spojevi s nižim redukcijskim potencijalom teoretski mogli ulaziti u reakcije redukcije željeza te na taj način doprinijeti konačnom rezultatu antioksidativnog kapaciteta (Benzie i Strain, 1996). Redukcija žuto obojenog kompleksa TPTZ u plavo obojeni kompleks prikazana je na slici 6.



Slika 6. Redukcija $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{III})$ u $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2(\text{II})$ (ResearchGate, 2019)

Kod FRAP metode, predtretman uzorka nije potreban, stehiometrijski faktori su konstantni, linearnost se postiže u širokom rasponu koncentracija te su reproduktivnost i osjetljivost metode visoki (Benzie i Strain, 1999). FRAP metoda je prikladna za određivanje antioksidativnog kapaciteta fenolnih spojeva koji u reakciju ulaze brzo jer se i sam prijenos elektrona odvija relativno brzo. Za spojeve s dužim vremenskim pomakom u mehanizmu djelovanja, ova metoda nije izrazito prikladna (Benzie i Strain, 1996).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Tretman uzorka proveden je u okviru diplomskog rada Prodanović, 2019. Korištene su heljdine ljuske proizvođača Pukanić koje su prvo samljevene na ciklomlinu na veličinu manju od 500 μm , a zatim na kriomlinu nakon čega je uslijedilo prosijavanje na situ promjera manjeg od 56 μm . Tako samljevene heljdine ljuske tretirane su enzimima celulazom i hemicelulazom u 10 %-tnoj suspenziji pri pH 5, temperaturi od 50 °C i 120 min^{-1} u vodenoj kupelji. Inaktivacija enzima provedena je prije i nakon tretmana zagrijavanjem na temperaturu višu od 90 °C tijekom 10 minuta. Uzorci su nakon tretmana liofilizirani i čuvani pri -20 °C do analize.

Tablica 1. Oznake uzoraka, vrijeme tretmana te primijenjeni udjel enzima

UZORAK	VRIJEME TRETMANA (h)	UDJEL ENZIMA (%)
0	-	-
1h E 0,1 %	1	0,1
1h E 1 %	1	1
4h E 0,1%	4	0,1
4h E 1 %	4	1
8h E 0,1 %	8	0,1
8h E 1 %	8	1

3.1.1. Laboratorijska oprema i uređaji

- plastična epruveta od 2 mL, Eppendorf, Njemačka
- odmjerna tikvica
- mikrokiveta od 1 mL
- špatula
- štrcaljka
- filter poroznosti 0,45 μm
- automatske pipete, Eppendorf, Njemačka

- ultra-centrifugalni mlin, Retsch GmbH, ZM 200, Njemačka
- kriomlin, Retch Cryomill, Njemačka
- sito <56 μm , Analysette 3PRO
- UV/VIS Spektrometar Lambda 35, PerkinElmer, SAD
- mikrocentrifuga, MICROCL 21 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, SAD
- vorteks, IKA VORTEX 4 basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Njemačka
- ultrazvučna kupelj, VWR Ultrasonic Cleaners, SAD
- analitička vaga tip JK 180, YMC CHYO, Mikrotehna, Hrvatska
- boca s 4,6 % dušikom pod tlakom od 200 bara, Messer Croatia Plin d.o.o., Hrvatska
- magnetska miješalica s termoregulacijom, IKA C-MAG HS 7, Njemačka

3.1.2. Suspenzije enzima

- celulaza, Alphamalt C 21032, Mühlencemie GmbH & Co. KG, Njemačka
- hemicelulaza, 5000 HCU/g, BIO-CAT, SAD

3.1.3. Kemikalije

- apsolutni etanol (HPLC čistoća), Fisher Chemical, SAD
- Folin & Ciocalteu reagens, Sigma-Aldrich, SAD
- 20 % otopina bezvodna natrijeva karbonata (Na_2CO_3), Gram-mol, Hrvatska
- 98 % galna kiselina, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, SAD
- 2,2-difenil-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma-Aldrich, SAD
- 97 % 6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich, SAD
- metanol (HPLC čistoća), J.T. Baker, Poljska
- željezov(III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), Kemika d.d., Hrvatska
- 98 % 2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazin (TPTZ), Alfa Aesar, SAD
- natrijev acetat trihidrat, Lach-Ner, Češka
- ledena octena kiselina, CARLO ERBA Reagents, Francuska
- 37% klorovodična kiselina, CARLO ERBA Reagents, Francuska

3.2. Metode rada

3.2.1. Ekstrakcija slobodnih polarnih spojeva iz heljdinih ljusaka

Odvagano je 0,1000 g \pm 0,0001 g liofiliziranog uzorka u plastičnu epruvetu volumena 2 mL i dodan je 1 mL 80 % etanola. Uzorak je homogeniziran na vorteksu tijekom 10 minuta te stavljen u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta. Nakon ultrazvučne kupelji uzorak je centrifugiran u mikrocentrifugi pri 8000 o min⁻¹ tijekom 15 minuta. Nakon centrifugiranja, odvojen je supernatant u novu plastičnu epruvetu volumena 2 mL i podvrgnut uparavanju pod strujom dušika uz zagrijavanje na 40 °C. Ekstrakcija je ponovljena još dva puta s po 1 mL 80 % etanola. Nakon ekstrakcije supernatanti su spojeni i upareni do suhog te čuvani na -20 °C do analize. Prije analize dodan je 1 mL metanola i uzorak je homogeniziran 30 sekundi. Zatim je provedeno centrifugiranje pri 14 000 o min⁻¹ tijekom 10 minuta i filtriranje kroz filter poroznosti 0,45 μ m stavljen na špricu.

3.2.2. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva TPC metodom

3.2.2.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Za potrebe analize pripremljena je 20% otopina natrijeva karbonata. U odmjernoj tikvici od 100 mL otopljeno je 20 g anhidrida natrijeva karbonata u 80 mL vruće destilirane vode. Otopina je zatim stavljena na hlađenje te dopunjena destiliranom vodom do oznake nakon čega je odstajala 24 sata i bila profiltrirana. Pripremljene su i otopine galne kiseline u metanolu koncentracija: 0,9898; 0,7918; 0,5939; 0,3959; 0,1980; 0,0990 mg mL⁻¹.

3.2.2.2. Postupak određivanja udjela polifenolnih spojeva

Pripremljeni ekstrakti otopljeni su u 1 mL metanola. U kivetu je dodano 400 μ L destilirane vode, a zatim 20 μ L uzorka i 100 μ L Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon tri minute, dodano je 300 μ L 20% otopine natrijeva karbonata i 1180 μ L vode. Kiveta je začepljena, promućkana te je nakon stajanja u mraku dva sata, mjerena apsorbancija pri 765 nm. Mjerenja su provedena u dvije paralelne probe. Slijepa proba sadržavala je 20 μ L metanola umjesto uzorka. Vrijeme je mjereno od trenutka dodatka reagensu u uzorak.

3.2.2.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za TPC metodu

Postupak pripreme za izradu baždarnog dijagrama identičan je određivanju ukupnih fenolnih spojeva TPC metodom, samo je umjesto 20 μL uzorka dodano 20 μL galne kiseline poznate koncentracije. Mjerenja su provedena u rasponu od šest različitih koncentracija galne kiseline u tri paralele.

3.2.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

3.2.3.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Za potrebe analize pripremljena je 0,06 mmol L^{-1} otopina DPPH reagensa. 0,00236 g DPPH otopljeno je u metanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL te nadopunjeno do oznake. Pripremljene su i otopine troloxa u metanolu koncentracija: 0,1941; 0,1455; 0,0969; 0,0486; 0,0096; 0,2424 mg mL^{-1} .

3.2.3.2. Postupak određivanja antioksidativne aktivnosti

Pripremljeni ekstrakti uzoraka otopljeni su u 1 mL metanola. U mikrokivetu dodano je 20 μL uzorka te 0,95 mL 0,06 mmol L^{-1} pripremljene otopine DPPH nakon čega je mikrokiveta začepljena i promućkana. Nakon 30 minuta stajanja u mraku na sobnoj temperaturi, mjerena je apsorbancija pri 517 nm. Mjerenja provedena su tri paralelna mjerenja, a slijepa proba je sadržavala 20 μL metanola umjesto uzorka. Vrijeme je mjereno od trenutka dodatka reagensa u uzorak.

3.2.3.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama

Postupak pripreme za izradu baždarnog dijagrama identičan je određivanju antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, samo se umjesto 20 μL uzorka, dodaje 20 μL troloxa poznate koncentracije. Mjerenja su provedena sa šest različitih koncentracija troloxa u tri paralele.

3.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

3.2.4.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Za potrebe analize pripremljen je FRAP reagens koji je sadržavao 2,5 mL 20 mmol L⁻¹ otopine željezovog (III) klorida heksahidrata, 2,5 mL 10 mmol L⁻¹ TPTZ-a u 40 mmol L⁻¹ kloridne kiseline i 25 mL 300 mmol L⁻¹ acetatnog pufera. Pripremljeni FRAP reagens zagrijan je te temperiran na 37 °C. Pripremljene su i otopine troloxa u metanolu koncentracija: 0,1876; 0,1407; 0,0937; 0,0470; 0,0093; 0,2343 mg mL⁻¹.

3.2.4.2. Postupak određivanja antioksidativne aktivnosti

Pripremljeni ekstrakti uzoraka otopljeni su u 1 mL metanola. U mikrokivetu je dodano 20 µL uzorka te 1 mL FRAP reagensa nakon čega je kiveta začepljena i promućkana. Nakon četiri minute, mjerena je apsorbancija pri 593 nm. Mjerenja su provedena u tri paralelne probe, a slijepa proba je sadržavala 20 µL metanola umjesto uzorka. Vrijeme je mjereno od trenutka dodatka reagensa u uzorak.

3.2.4.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama

Postupak pripreme za izradu baždarnog dijagrama identičan je onom za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom samo je umjesto 20 µL uzorka, dodano 20 µL troloxa poznate koncentracije. Mjerenja su provedena sa šest različitih koncentracija troloxa u tri paralele.

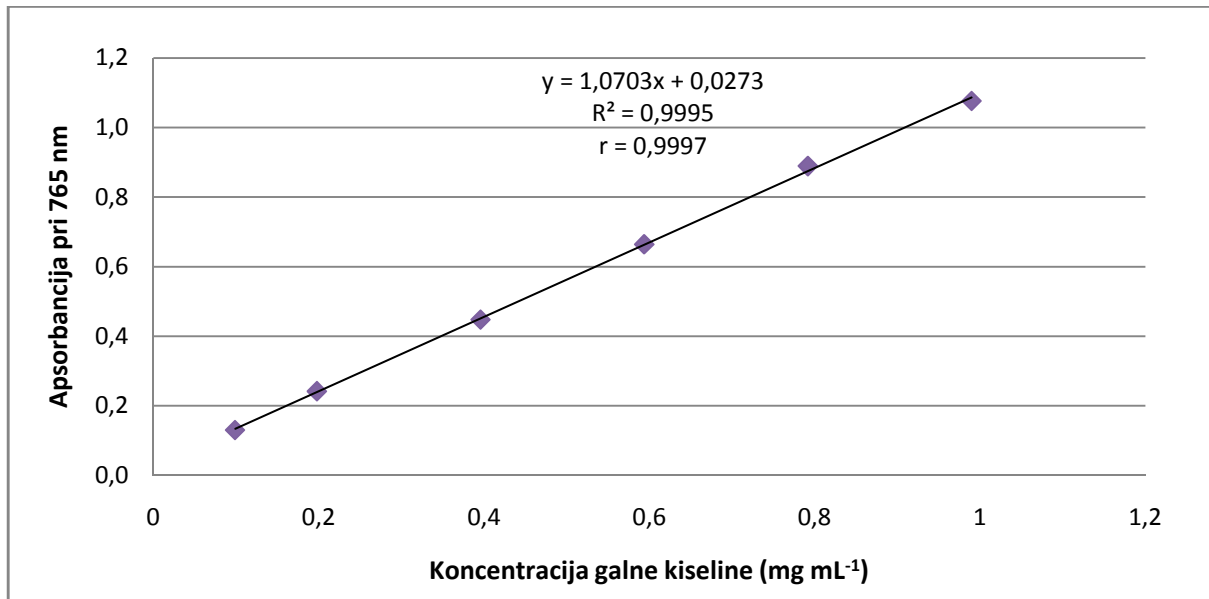
3.2.5. Obrada rezultata

Rezultati analiza obrađeni su u programu MS Excel 2010. Statistička analiza obuhvaćala je jednosmjernu analizu varijance, uz *post hoc* Tukey test ($\alpha = 0,05$), a provedena je pomoću programa Statistica 8 (Stat Soft Inc., USA).

4. REZULTATI I RASPRAVA

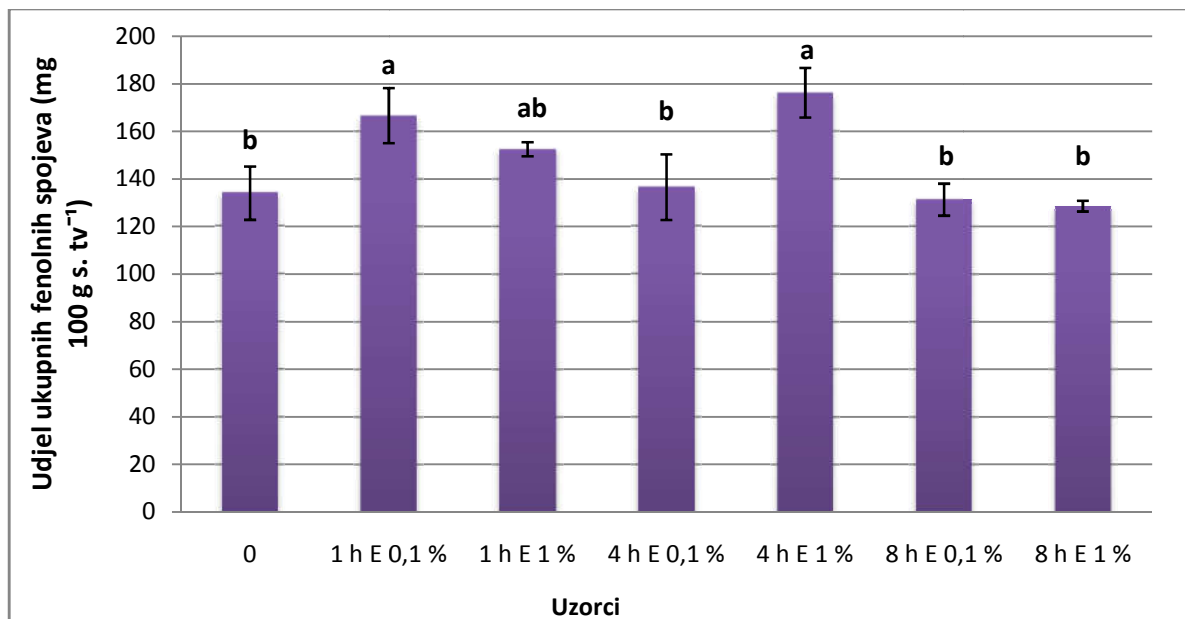
4.1. Rezultati određivanja ukupnih fenolnih spojeva TPC metodom

Za prikaz rezultata određivanja udjela ukupnih fenolnih spojeva prisutnih u ljuskama heljde korišteni su ekvivalenti galne kiseline. Baždarni dijagram za određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva prikazan je na slici 7.



Slika 7. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o koncentraciji galne kiseline

Rezultati određivanja ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima prikazani su na slici 8. pri čemu su različitim slovima označeni statistički značajno različiti rezultati.



Slika 8. Udjel ukupnih fenolnih spojeva izražen u obliku mg ekvivalenata galne kiseline na 100 g suhe tvari uzorka

Iz grafički prikazanih podataka vidljivo je da je kod uzorka koji je bio podvrgnut tretmanu s enzimskom koncentracijom od 1 % kroz četiri sata znatno povećan udjel fenolnih spojeva za 23,9 % u odnosu na uzorak koji nije bio enzimski tretiran. Za 19,8 % veći udjel fenolnih spojeva u odnosu na netretirani uzorak utvrđen je i za uzorak tretiran enzimskom koncentracijom od 0,1 % kroz jedan sat.

Produljenjem tretmana s enzimskom koncentracijom od 0,1 % dolazi do smanjenja udjela fenolnih spojeva. Nakon četiri sata tretmana, utvrđen je za 17,9 % niži udjel fenolnih spojeva u odnosu na uzorak tretiran jedan sat.

Uzorci koji su bili tretirani različitom enzimskom koncentracijom, no kroz isti vremenski period, ne pokazuju značajnu razliku u udjelu fenolnih spojeva. Iznimka su uzorci tretirani kroz četiri sata pri čemu je vidljiva značajna razlika u udjelu fenolnih spojeva pa je tako u uzorku tretiranom enzimskom koncentracijom od 1 % utvrđen za 22,1 % veći udjel fenolnih spojeva u odnosu na uzorak tretiran enzimskom koncentracijom od 0,1 %.

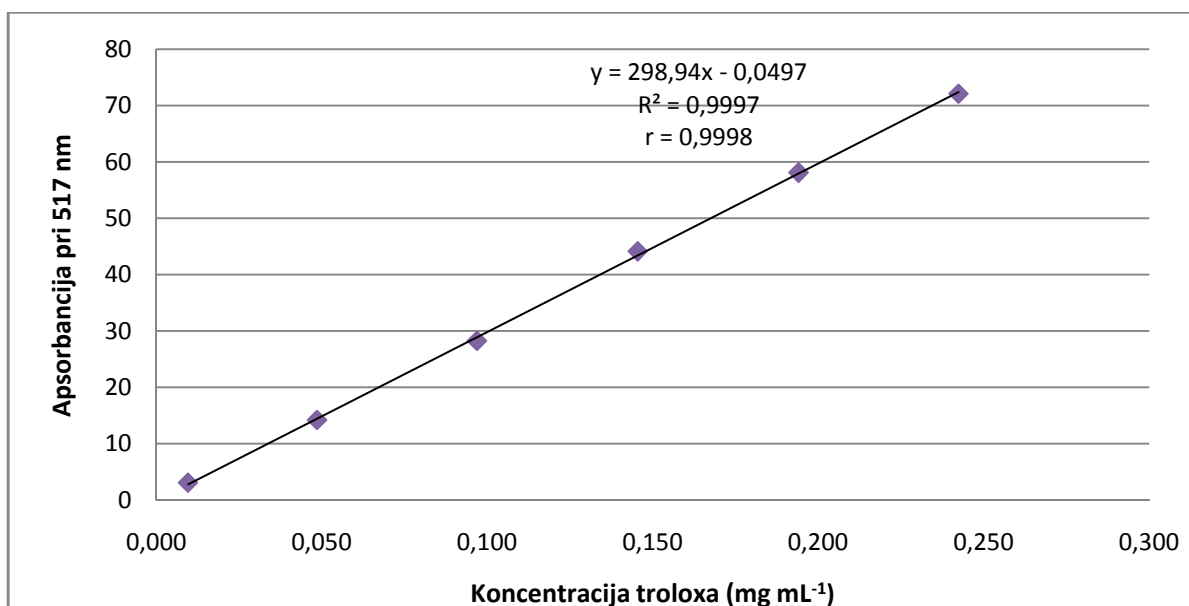
Afanas'ev i sur. (1989) te Hsu i sur. (2008) su utvrdili da se u heljdinim ljuskama nalazi flavonoid rutin, a Quettier-Deleu i sur. (2000) su utvrdili prisutnost proantocijanidin B₂ dimera koji pokazuju značajnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala.

Treba spomenuti i druga istraživanja provedena istim enzimskim tretmanima pa su tako prilikom analize fenolnih kiselina u ječmu, Yu i Temmelli (2001) su utvrdili kako dodatak degradacijskog enzima celulaze, uzrokuje razgradnju polisaharida u ječmu poput arabinoksilana te β -1,3- β -1,4 glukana na jednostavne ugljikohidrate što uzrokuje otpuštanje više fenolnih kiselina koje su bile vezane za arabinoksilan. Također, tretman celulazom povećao je koncentracije p-hidroksibenzojeve, vanilinske, klorogenske, p-kumarinske i ferulinske kiseline.

Kim i Lim (2015) su u svrhu poboljšanja antioksidativne aktivnosti, tretirali rižine mekinje različitim karbohidrazama pri čemu su utvrdili kako komercijalno dostupni enzimi za razgradnju ugljikohidrata značajno povećavaju moć ekstrakcije fenolnih spojeva iz rižinih mekinja poput fenolnih kiselina kao ferulinske, p-kumarinske, vanilinske te p-hidroksibenzojeve kiseline.

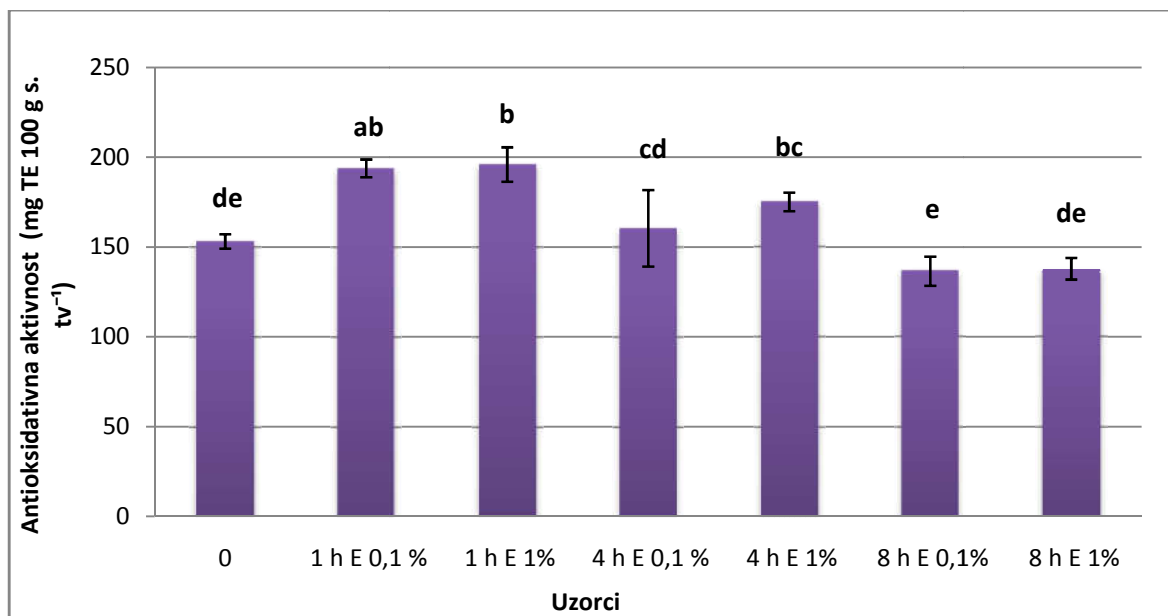
4.2. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

Baždarni dijagram za određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom prikazan je na slici 9.



Slika 9. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 517 nm o koncentraciji troloxa

Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidativne aktivnosti uzoraka heljdinih ljusaka izraženih kao mg ekvivalenata troloxa (TE) / 100 g s.tv. prikazan je na slici 10. pri čemu su različitim slovima označeni statistički značajno različiti rezultati.



Slika 10. Antioksidativna aktivnost uzoraka heljdinih ljusaka određena DPPH metodom

Iz grafički prikazanih podataka vidljivo je kako nakon enzimskog tretmana dolazi do najvećeg povećanja antioksidativne aktivnosti kod uzoraka tretiranih jedan sat, pri čemu je antioksidativna aktivnost veća za 21,1 % za uzorak tretiran enzimskom koncentracijom od 0,1 % u odnosu na netretirani uzorak, a za 21,9 % za uzorak tretiran enzimskom koncentracijom od 1 %.

Produljenjem tretmana uzoraka dolazi do smanjenja antioksidativne aktivnosti. U uzorku tretiranom enzimskom koncentracijom od 0,1 % kroz četiri sata utvrđeno je smanjenje antioksidativne aktivnosti za 17,3 %, a u uzorku tretiranom osam sati za 29,4 %, u odnosu na uzorak tretiran jedan sat. U uzorku tretiranom enzimskom koncentracijom od 1 % kroz četiri sata ne dolazi do značajnog smanjenja antioksidativne aktivnosti, dok je u uzorku tretiranom osam sati utvrđeno smanjenje za 29,6% u odnosu na uzorak tretiran jedan sat.

Primjena različite enzimske koncentracije za tretman nije utjecala na značajnu promjenu antioksidativne aktivnosti uzoraka nakon tretmana.

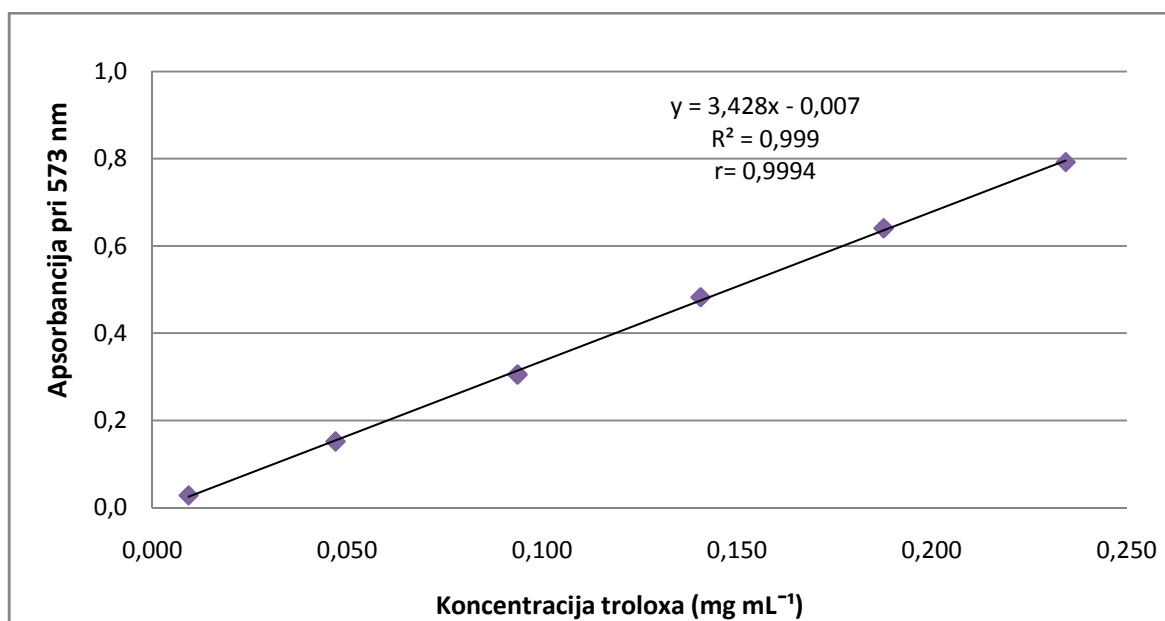
Iako najveći porast antioksidativne aktivnosti u odnosu na netretirani uzorak pokazuje uzorak tretiran jedan sat s enzimskom koncentracijom od 1 %, on s obzirom na rezultate dobivene

TPC metodom, ne pokazuje i najveći udjel fenolnih spojeva. Mogući razlog je utjecaj i drugih spojeva (osim fenolnih spojeva) na antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom.

Alrahmany i sur. (2013) su tretiranjem zobnih mekinja enzimima utvrdili kako su enzimski tretmani ekstrakata mekinja rezultirali značajnim promjenama u sposobnostima hvatanja slobodnih radikala te u svojstvima keliranja metala što ukazuje na korisnost enzima poput celulaze, amilaze i drugih u razvoju funkcionalne hrane s povećanom stabilnošću.

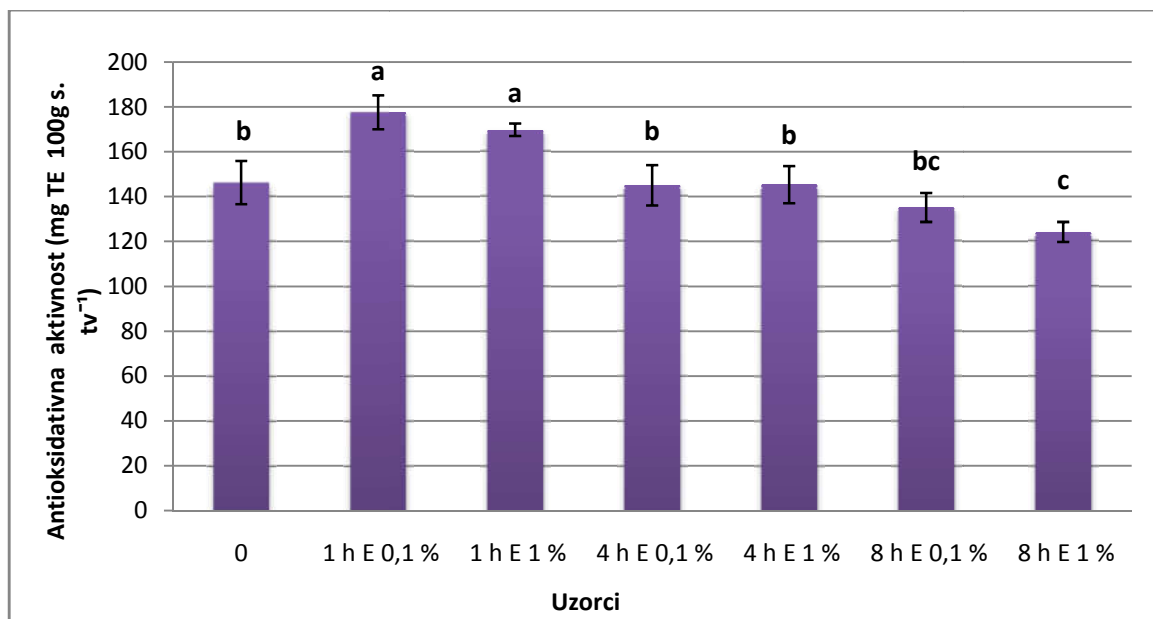
4.3. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

Baždarni dijagram za određivanje antioksidativne aktivnosti određene FRAP metodom prikazan je na slici 11.



Slika 11. Baždarni dijagram ovisnosti antioksidativne aktivnosti o koncentraciji troloxa

Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidativne aktivnosti uzoraka heljdinih ljusaka izraženih kao mg ekvivalenata troloxa (TE) / 100 g s.tv. prikazan je na slici 12. pri čemu su različitim slovima označeni statistički značajno različiti rezultati.



Slika 12. Antioksidativna aktivnost uzoraka heljdinih ljusaka određena FRAP metodom

Iz grafičkog prikaza, vidljivo je kako najveći porast antioksidativne aktivnosti u odnosu na netretirani uzorak pokazuje uzorak tretiran enzimskom koncentracijom od 0,1 % kroz jedan sat i to za 17,9 %.

Produljenjem tretmana uzoraka dolazi do smanjenja antioksidativne aktivnosti. Uzorak tretiran enzimskom koncentracijom od 0,1 % kroz četiri sata ima za 18,5 % manju antioksidativnu aktivnost, a uzorak tretiran kroz osam sati za 24,1 % manju antioksidativnu aktivnost, u odnosu na uzorak tretiran jedan sat. Uzorak tretiran enzimskom koncentracijom od 1 % kroz četiri sata ima za 14,7 % manju antioksidativnu aktivnost, a uzorak tretiran kroz osam sati za 27,1 % manju antioksidativnu aktivnost, u odnosu na uzorak tretiran jedan sat.

Primjena različite enzimске koncentracije za tretman nije utjecala na značajnu promjenu antioksidativne aktivnosti uzoraka nakon tretmana.

Iako najveći porast antioksidativne aktivnosti u odnosu na netretirani uzorak pokazuje uzorak tretiran jedan sat s enzimskom koncentracijom od 0,1 %, on s obzirom na rezultate dobivene TPC metodom, ne pokazuje i najveći udjel fenolnih spojeva. Mogući razlog je utjecaj i drugih spojeva (osim fenolnih spojeva) na antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom.

Radenkos i sur. (2014) su istraživanjem utjecaja enzimskog tretmana na udjel bioaktivnih spojeva pšeničnih i ražinih mekinja, utvrdili kako tretmani imaju značajan utjecaj na udjel fenolnih spojeva, antocijana te i na antioksidativni potencijal. Utjecaj enzimskih tretmana na kemijski sastav proizvoda pšeničnih i ražinih mekinja pokazao je kako upotrebom enzima dobivena veća koncentracija biokativnih spojeva u tretiranim mekinjama u odnosu na netretirane mekinje.

Prema istraživanju Chena i sur. (2016) tretman celulazom povećao je sadržaj fenola u ekstraktima zobnih mekinja što je rezultiralo povećanjem antioksidativne aktivnosti.

5. ZAKLJUČAK

S obzirom na provedeno ispitivanje utjecaja tretmana kriomljevenih ljusaka heljde enzimima celulazom i hemicelulazom na udjel ukupnih fenolnih spojeva i antioksidativnu aktivnost te dobivene rezultate, može se zaključiti sljedeće:

1. Povećanje udjela fenolnih spojeva u heljdinim ljuskama utvrđeno je nakon tretmana s dodatkom 1 % enzima kroz četiri sata i 0,1 % enzima kroz jedan sat.
2. Enzimski tretman kroz jedan sat s dodatkom 0,1 % ili 1 % enzima dovodi do značajnog povećanja antioksidativne aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom.
3. Produljenjem enzimskog tretmana dolazi do smanjenja antioksidativne aktivnosti tretiranih heljdinih ljusaka.
4. Primjena različite koncentracije enzima za tretman ne utječe na značajnu promjenu antioksidativne aktivnosti heljdinih ljusaka nakon tretmana.

6. LITERATURA

Afanas'ev I. B., Dcrozsko A. I., Brodskii A. V., Kostyuk V. A., Potapovitch A.I. (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology* **38**: 1763 – 1769.

Alrahmany R., Avis T. J., Tsopmo A. (2013) Treatment of oat bran with carbohydrases increases soluble phenolic acid content and influences antioxidant and antimicrobial activities. *Food Research International* **52 (2)**: 568 – 574.

Antony U., Chandra, T. S. (1999) Enzymatic Treatment and Use of Starters for the Nutrient Enhancement in Fermented Flour of Red and White Varieties of Finger Millet (*Eleusine coracana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47 (5)**: 2016 – 2019.

Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99 (1)**: 191 – 203.

Benzie I. F., Strain J. J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* **239 (1)**: 70 – 76.

Benzie, I. F., Strain J. J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology* **299**: 15 – 27.

Bhat M. K., Bhat S. (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances* **15 (3-4)**: 583 – 620.

Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317 – 333.

Chemistry Libre Texts (2019)

<[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_\(McMurry\)/Chapter_06%3A_An_Overview_of_Organic_Reactions/6.03_Radical_Reactions](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(McMurry)/Chapter_06%3A_An_Overview_of_Organic_Reactions/6.03_Radical_Reactions)>

Pristupljeno 27. travnja 2019.

Chen D., Shi J., Hu X. (2016) Enhancement of polyphenol content and antioxidant capacity of oat (*Avena nuda* L.) bran by cellulase treatment. *Applied Biological Chemistry* **59 (3)**: 397 – 403.

- De Boer J. L. M., Maessen F. J. M. J. (1980) Optimum experimental conditions of the brittle fracture technique for homogenisation of biological materials. *Analytica Chimica Acta* **177**: 371 – 375.
- Dietrych-Szostak D., Oleszek W. (1999) Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 4383 – 4387.
- Fritz S. B., Gold B. L. (2003) Buckwheat pillow-induced asthma and allergic rhinitis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **90 (3)**: 355 – 358.
- Hamer R. J. (1991) Enzymes in the baking industry. U: Enzymes in food processing, 2.izd., Tucker G. A., Woods L. F. J., Blackie Academic & Professional, str. 168 – 93.
- Hsu C. K., Chiang B. H., Chen Y. S., Yang J. H., Liu C. L. (2008) Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) sprout with trace element water. *Food Chemistry* **108**: 633 – 641.
- Huang D., Ou B., Prior R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 1841 – 1856.
- Junghare H., Hamjade M., Patil C. K., Girase S. B., Lele M. M. (2017) A Review on Cryogenic Grinding. *International Journal of Current Engineering and Technology, Special Issue-7* 420 – 423.
- Kedare S. B., Singh R. P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* **48 (4)**: 412 – 422.
- Kim S. M., Lim S. T. (2016) Enhanced antioxidant activity of rice bran extract by carbohydrase treatment. *Journal of Cereal Science* **68**: 116 – 121.
- Koivula A. (1996) Structure-function studies of two polysaccharide-degrading enzymes: *Bacillus stearothermophilus* α -amylase and *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II. *Academic Dissertation*. University of Helsinki, Technical Research Centre of Finland.
- Kreft I., Germ M. (2008) Organically grown buckwheat as a healthy food and a source of natural antioxidants. *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva* **70 (4)**: 397 – 406.

- Li S., Ge S., Huang Z., Wang Q., Zhao H., Pan H. (1991) Cryogenic grinding technology for traditional Chinese herbal medicine. *Cryogenics* **31**: 136 – 137.
- Lotito S.B., Frei B. (2006) Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine* **41 (12)**: 1727 – 1746.
- Magalhães L. M., Segundo M. A., Reis S., Lima J. L. F. C., Rangel A. O. S. S. (2006) Automatic Method for the Determination of Folin–Ciocalteu Reducing Capacity in Food Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54 (15)**: 5241 – 5246.
- Mathew S., Abraham T. E., Zakaria Z. A. (2015) Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *Journal of Food Science and Technology* **52 (9)**: 5790 – 5798.
- Mishra K., Ojha H., Chaudhury N. K. (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* **130 (4)**: 1036 – 1043.
- Osawa T. (1994) Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. U: Postharvest Biochemistry of plant Food-Materials in the Tropics, Uritani, I., Garcia, V. V., Mendoza, E. M., Japan Scientific Societies Press, str. 241 – 251.
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K. (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 3122 – 3128.
- Parr A. J., Bolwell G. P. (2000) Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80 (7)**: 985 – 1012.
- Phaniendra A., Jestadi D. B., Periyasamy L. (2014) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **30 (1)**: 11 – 26.
- Prakash A. (2001) Antioxidant activity. *Medallion Laboratories Analytical progress* **19 (2)**: 1 – 6.

Pyrzyska K., Pękal A. (2013) Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods* **5**: 4288.

Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J. C., Bailleul F., Trotin F. (2000) Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology* **72 (1-2)**: 35 – 42.

Radenkovs V., Klava D., Krasnova I., Juhnevica-Radenkova K. (2014) Application of enzymatic treatment to improve the concentration of bioactive compounds and antioxidant potential of wheat and rye bran. *9th Baltic Conference on Food Science and Technology "Food for Consumer Well-Being" FoodBalt 2014 Conference Proceedings*. LLU, Jelgava, Latvia, str. 127 – 132.

ResearchGate (2019)

<https://www.researchgate.net/figure/Reduction-of-free-radicals-by-antioxidants-28_fig1_321058687> Pristupljeno 14. svibnja 2019.

ResearchGate (2019)

<https://www.researchgate.net/figure/Ferrum-reduction-reaction-of-2-4-6-tripyridyl-s-triazine-TPTZ-forming-a-blueish_fig5_318685362> Pristupljeno 14. svibnja 2019.

Rice-Evans C. A., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* **22**: 375 – 383.

Robards K., Antolovich M. (1997) Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids A Review. *The Analyst* **122 (2)**: 11 – 34.

Rohit S., Soni A., Saxna S. N., Rathore S. S., Barnwal P. (2013) Cryogenic grinding: A physical technique to retain volatile content in natural products. *International Journal of Modern Physics: Conference Series* **22**: 589 – 592.

Sedej I., Sakač M., Mandić A., Mišan A., Tumbas V., Čanadanović-Brunet J. (2012) Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Grain and Fractions: Antioxidant Compounds and Activities. *Journal of Food Science* **77 (9)**: 954 – 959.

Shallom D., Shoham Y. (2003) Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* **6 (3)**: 219 – 228.

Sigma-Aldrich (2019)

<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/238813?lang=en®ion=HR>>

Pristupljeno 8. svibnja 2019.

Singleton V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144 – 158.

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventó's R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 152 – 178.

Si-quan L., Howard Zhang Q. (2001) Advances in the Development of Functional Foods from Buckwheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **41 (6)**: 451 – 464.

Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 4113 – 4117.

Yu J., Vasanthan T., Temelli F. (2001) Analysis of Phenolic Acids in Barley by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49 (9)**: 4352 – 4358.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Viktorija Rnjak
ime i prezime studenta