

Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na bioaktivne spojeve heljdinih ljuskica

Buratović, Andrea

Master's thesis / Diplomski 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:151383>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Andrea Buratović

1122/PI

**UTJECAJ ULTRAZVUKA
VISOKOG INTENZITETA NA
BIOAKTIVNE SPOJEVE
HELJDINIH LJUSKICA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Novotni.

Diplomski rad izrađen je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost: Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa (IP-2016-06-3789).

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Dubravki Novotni na uloženom trudu i vremenu, savjetima i iznimnoj susretljivosti.

Asistentici dr. sc. Bojani Voučko dugujem zahvalu za svakodnevni osmijeh, razumijevanje i nesebičnu pomoć bez koje bih s puno više napora odrađivala eksperimentalni dio a zatim obradila rezultate i u konačnici napisala rad. Nikad ne znate do koga vas mjerenje glukoze u krvi može dovesti... :)

Hvala obitelji na ohrabrenju u svim trenucima kada nisam znala trebam li ustati ili odustati. Drago mi je da sam ipak ustala!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju žitarica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA NA BIOAKTIVNE SPOJEVE HELJDINIH LJUSKICA

Andrea Buratović, 1122/PI

Sažetak: *Heljdine ljuskice nusproizvod su postupka ljuštenja heljdinog zrna a predstavljaju važan izvor vlakana i bioaktivnih spojeva zbog čega im se pripisuju brojni pozitivni zdravstveni učinci. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta (400 W, 24 kHz) na povećanje udjela slobodnih bioaktivnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost, sposobnost bubrenja u vodi i aktivnost enzima polifenol oksidaze heljdinih ljuskica. Vodena suspenzija heljdinih ljuskica različitih temperatura (9,7; 20; 45; 70 ili 80,4 °C) tretirana je (2,9; 5; 10; 15 ili 17 min) direktno uronjenom ultrazvučnom sondom (d = 22 mm) pri 100 % amplitude prema složenom centralnom planu pokusa. Usporedbom tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolu utvrđeno je da tretman povećava udio ukupnih fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost, sposobnost bubrenja u vodi i aktivnost polifenol oksidaze. Optimizacija procesa pokazala je da se najbolji učinak postiže kod uzorka temperature 20 °C u trajanju tretmana 15 min što rezultira 22 % većoj FRAP antioksidacijskoj aktivnosti i 106 % većoj aktivnosti polifenol oksidaze.*

Ključne riječi: bioaktivni spojevi, heljdine ljuskice, polifenol oksidaza, ultrazvuk visokog intenziteta

Rad sadrži: 51 stranicu, 18 slika, 2 tablice, 87 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: , izv. prof. dr. sc. *Dubravka Novotni*

Pomoć pri izradi: *Bojana Voučko*, dr. sc.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Duška Ćurić* (predsjednica)
2. Izv. prof. dr. sc. *Dubravka Novotni* (mentorica)
3. Doc. dr. sc. *Tomislava Vukušić* (članica)
4. Prof. dr. sc. *Mladen Brnčić* (zamjena)

Datum obrane: 17. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Cereal Chemistry and Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF HIGH INTENSITY ULTRASOUND ON THE BIOACTIVE COMPOUNDS OF THE BUCKWHEAT HULLS

Andrea Buratović, 1122/PI

Abstract: *Buckwheat hulls are a by-product of the milling industry and an important source of dietary fibre and bioactive compounds with numerous beneficial health effects. This work aimed to investigate the effect of high intensity ultrasound (400 W, 24 kHz) on the release of bioactive compounds, antioxidant activity, water swelling and activity of enzyme polyphenol oxidase of buckwheat hulls. Water suspension of hulls was treated (2,9; 5; 10; 15 or 17 minutes) by direct immersion of the ultrasound probe ($d = 22$ mm) and amplitude of 100 %, at different temperatures (9,7; 20; 45; 70 or 80,4 °C) following a central composite design. In comparison to the control sample, high intensity ultrasound had a positive effect on total phenolic content, antioxidant activity, water swelling and polyphenol oxidase activity. Optimization of the process showed that the best results are achieved with temperature sample 20 °C and 15 min treatment time, resulting in 22 % increase of FRAP antioxidant activity and 106 % polyphenol oxidase activity.*

Keywords: bioactive compounds, buckwheat hulls, polyphenol oxidase, high intensity ultrasound

Thesis contains: 51 pages, 18 figures, 2 tables, 87 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Dubravka Novotni, Associate Professor*

Technical support and assistance: *Bojana Voučko, PhD*

Reviewers:

PhD. Duška Ćurić, Full Professor (president)

PhD. Dubravka Novotni, Associate Professor (mentor)

PhD. Tomislava Vukušić, Assistant Professor (member)

PhD. Mladen Brnčić, Full Professor (substitute)

Thesis defended: 17th September 2019.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. HELJDA	3
2.1.1. Morfologija heljdinog zrna	4
2.1.2. Heljdine ljuskice	5
2.2. BIOAKTIVNI SPOJEVI	7
2.2.1. Fenolni spojevi	7
2.2.2. Rutin	8
2.3. POLIFENOL OKSIDAZA	9
2.4. ULTRAZVUK	10
2.4.1. Mehanizam i djelovanje ultrazvuka visokog intenziteta	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Sirovine	13
3.1.2. Reagensi	13
3.1.3. Aparatura i pribor	14
3.1.4. Priprema uzoraka	15
3.1.4.1. Mljevenje na ultra-centrifugalnom mlinu	15
3.1.4.2. Mljevenje na kugličnom mlinu	16
3.1.4.3. Prosijavanje	17
3.2. METODE RADA	17
3.2.1. Tretman ultrazvukom visokog intenziteta	17
3.2.2. Određivanje udjela vode	19

3.2.3.	Ekstrakcija slobodnih spojeva.....	20
3.2.4.	Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom	21
3.2.5.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti	23
3.2.5.1.	DPPH metoda	23
3.2.5.2.	FRAP metoda	24
3.2.6.	Određivanje udjela rutina.....	26
3.2.7.	Određivanje sposobnosti bubrenja u vodi.....	28
3.2.8.	Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze.....	29
3.2.9.	Statistička obrada podataka.....	29
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	31
4.1.	KINETIKA PROMJENE TEMPERATURE TIJEKOM TRETMANA UVI	32
4.2.	UTJECAJ TRETMANA UVI NA UKUPNE FENOLNE SPOJEVE I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST HELJDINIH LJUSKICA	33
4.3.	REZULTATI HPLC ANALIZE UDJELA RUTINA	35
4.4.	UTJECAJ UVI NA SPOSOBNOST BUBRENJA U VODI	36
4.5.	AKTIVNOST POLIFENOL OKSIDAZE	38
4.6.	OPTIMALNI UVJETI TRETMANA UVI	39
5.	ZAKLJUČCI.....	43
6.	LITERATURA.....	44

1. UVOD

Nove prehrambene navike kao i vodeći prehrambeni trendovi u proizvodnji i konzumaciji prehrambenih proizvoda imaju zdravstveni, okolišni i socijalni utjecaj. Ubrzani način života i nepravilna prehrana doveli su do niza “bolesti modernog doba” kao što su pretilost, osteoporoza, rak, dijabetes i različite vrste alergija. Zbog toga raste interes za istraživanje pozitivnih utjecaja funkcionalne hrane na ljudsko zdravlje, posebice na probavni sustav (Cencic i Chingwaru, 2010). Iako je godinama uzgoj heljde bio zapostavljen, posljednjih godina sve se više uzgaja upravo zbog mnogobrojnih zdravstvenih prednosti (Li i Zhang 2001; Biacs i sur., 2002) te predstavlja dobru sirovinu za proizvodnju funkcionalne hrane u prehrambenoj industriji (Christa i Soral-Šmietana, 2008).

Heljda sadrži spojeve koji pokazuju potencijalni učinak na smanjene pojave određenih bolesti (Mazza i Oomah, 2005) zbog svojih antioksidativnih i prebiotičkih svojstava. Istraživanja *in vitro* i na životinjama (Liu i sur., 2001; Kawa i sur., 2003; Tomotake i sur., 2006; Li i sur., 2010) pokazala su da proteini i bioaktivni spojevi heljde (prvenstveno rutin i kvercetin) imaju utjecaj na snižavanje krvnog tlaka, razinu kolesterola i šećera u krvi, očuvanje živčanog sustava, te protuupalno i antikancerogeno djelovanje. Nadalje, heljda ne sadrži gluten pa je stoga prikladna za prehranu ljudi oboljelih od celijakije (Saturni i sur., 2010).

U industrijskim procesima nastaje velika količina otpadnog materijala, a u želji očuvanja globalnih resursa i poboljšanja energetske učinkovitosti, istražuju se načini ekstrakcije aktivnih tvari iz bioloških izvora sa ciljem primjene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te medicini (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Uobičajeni tehnološki postupak koji se koristi prilikom obrade žitarica je ljuštenje čime nastaje značajna količina nusproizvoda. Ljuštenjem se odstranjuju vanjski dijelovi zrna žitarica u svrhu poboljšanja senzorskih svojstava, uklanjanja antinutrijenata te povećanja probavljivosti i bioraspoloživosti nutritivnih sastojaka. Fenolni spojevi su koncentrirani u vanjskim dijelovima zrna te stoga ljuštenje dovodi do njihovog gubitka (Duodu, 2014).

Korištenjem ultrazvuka visokog intenziteta (UVI) može se potencijalno povećati ekstrakcija određenih bioaktivnih spojeva, kao što su polifenoli, kada se ultrazvuk koristi kao predtretman obrade namirnice. Također, time se nastoji smanjiti upotreba otapala ili potpuno izbjeavati

njihova upotreba, ograničava se povišenje temperature tijekom tretmana i skraćeno je vrijeme tretiranja (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj tretmana UVI na povećanje udjela slobodnih bioaktivnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost, sposobnost bubrenja u vodi i aktivnost enzima polifenol oksidaze (PPO) heljdinih ljuskica. Za razliku od uobičajene upotrebe organskih otapala, u istraživanju je kao disperzno sredstvo korištena voda s obzirom da je potrebno dobiti heljdine ljuskice s oslobođenim bioaktivnim spojevima koje će se primjenjivati u pekarskoj industriji za obogaćivanje bezglutenskih pekarskih proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. HELJDA

Heljda (*Fagopyrum esculentum*) je jednogodišnja biljka iz porodice dvornika (*Polygonaceae*) koja naraste do 120 cm visine. Potječe iz jugoistočne Azije gdje se uzgajala još prije 8000 godina, a u Europu je unesena u 15. stoljeću.

Latinsko ime roda *Fagopyrum* potječe od riječi *fagus* (bukva) i *pyros* (pšenica), zato što trouglasti plodovi podsjećaju na bukov žir a koriste se kao pšenica. Ime vrste *esculentum* znači da služi za jelo (Plantea, 2017).

Rod *Fagopyrum*, član obitelji *Polygonaceae*, sastoji se od 15 vrsta koje se uglavnom uzgajaju u sjevernim područjima. Najviše se uzgaja obična heljda (*F. esculentum*), nakon koje slijede tatarska- (*F. tataricum*) i višegodišnja heljda (*F. dibotrys*) (Mazza i Oomah, 2005; Krkošková i Mrázová, 2005). Najveći svjetski proizvođači heljde su Kina, Rusija, Ukrajina i Kazahstan (Li i Zhang, 2001; Bonafaccia i sur., 2003) a u Hrvatskoj se tradicionalno uzgaja na malim površinama i to najviše u sjeverozapadnoj Hrvatskoj na području Zagorja, Međimurja i Podravine (Turkalj, 2013).

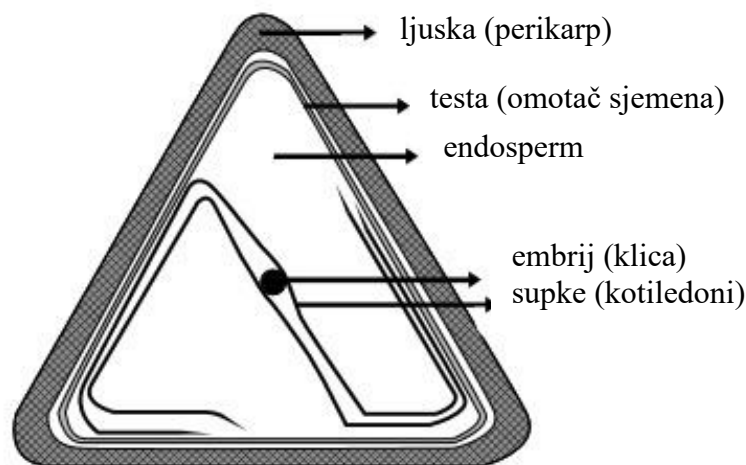
Zanimljiva je činjenica da se u Hrvatskoj heljda svrstava u skupinu žitarica jer prema Pravilniku o žitaricama i proizvodima od žitarica (Pravilnik, 2016) žitarice su biljne vrste iz porodice trava (*Poaceae*) te heljda iz porodice dvornika (*Polygonaceae*). Za razliku od toga, prema zakonodavstvu drugih zemalja Europe heljda je pseudožitarica. Tako su Aufhammer (2000) i Christa i Soral-Šmietana (2008) obrazložili da je heljda pseudožitarica jer pokazuje neke razlike u odnosu na žitarice. Glavna strukturalna razlika u odnosu na ostale žitarice koje su jednosupnice je da je heljda dvosupnica. Stanice endosperma imaju tanke stijenke i pretežito se sastoje od škroba (Pomeranz, 1983; Steadman i sur., 2001) što je karakteristika koja ih povezuje sa žitaricama. Također, obe skupine su jestive i imaju aleuronski sloj (Aufhammer, 2000; Bonafaccia i sur., 2003).

Cjelovita zrna heljde sadrže brojne nutritivne sastojke (Li i Zhang, 2001) pa se heljda smatra dobrom sirovinom za proizvodnju funkcionalne hrane (Wijngaard i Arendt, 2006). Ukupni sastav pojedinih komponenti ovisi o vrsti i/ili okolišnim čimbenicima (Bárta i sur., 2004). Kemijski sastav heljdinog zrna čine škrob (59-70 %), proteini (12-18 %), masti (1,5-4 %), prehrambena vlakna (7 %), vitamini (prvenstveno B skupine), mikroelementi (željezo, selen, mangan, cink,

bakar) i makroelementi (kalij, magnezij, kalcij i natrij) (Wei i sur., 1995; Fabjan i sur., 2003; Kim i sur., 2004) te bioaktivni spojevi (flavonoidi i flavoni, fenolne kiseline, kondenzirani tanini i fitosteroli) (Oomah i Mazza 1996; Watanabe, 1998; Li i Zhang 2001; Chao i sur., 2002).

2.1.1. Morfologija heljdinog zrna

Heljdino zrno sastoji se od ljuske (perikarpa) koja snažno obavija testu (omotač sjemena), endosperm i embrij (klicu) (Slika 1). Oblik, veličina i boja zrna ovisi o vrsti iako uobičajeno zrno izgleda kao trostrana piramida a vanjski slojevi su tamniji od unutrašnjih. Klica je u heljdinom zrnu smještena u sredini endosperma i sadrži dvije supke (kotiledona) (Steadman i sur., 2001). Ljuska može biti sjajna ili zagasito siva, smeđa ili crna, u jednoj boji ili išarana (Pomeranz, 1983). Gustoća ljuske manja je od vode, što omogućava njeno lako uklanjanje prilikom procesa prerade. Tvrdća ljuske ovisi o vrsti heljde. U većini slučajeva *F. esculentum* ima mekšu ljusku od vrste *F. tataricum*. Zrno *F. esculentum* ima opori okus dok zrno *F. tataricum* ima blago gorak okus koji može biti uklonjen određenim kemijskim metodama (Li i Zhang, 2001).



Slika 1. Horizontalni presjek heljdinog zrna (Steadman i sur., 2001).

2.1.2. Heljdine ljuskice

Ljuštenje je uobičajeni postupak prerade heljдинih zrna i vrši se povećanjem udjela vode (22 %) u odnosu na suhu tvar zagrijavanjem zrna pri temperaturi od 150-164 °C u trajanju od 10-20 min (Dietrich-Szostak i Oleszek, 1999). S obzirom na to da ljuska ima manju gustoću od vode lako se odstranjuje od ostatka zrna (Li i Zhang, 2001). Nažalost, za proizvodnju prehrambenih proizvoda koristi se samo oljušteno zrno a ljuska predstavlja nusproizvod (Huang i sur., 2017) čije je korištenje trenutno uočeno samo kod izrade terapijskih jastuka gdje predstavljaju jeftinu, biorazgradivu i antialergijsku sirovinu s dobrim prijenosom topline (Dillard, 2005).

Heljdine ljuskice većim se dijelom sastoje od prehrambenih vlakana (> 90 %) pri čemu udio netopljivih prehrambenih vlakana iznosi 89,1 % a tek 2,7 % čine topljiva prehrambena vlakna. Osim toga, sadrže 0,5 % škroba, 3,7 % proteina, 0,4 % masti, 1,3 % mineralnih tvari i 0,3 % tanina, računato na suhu tvar uzorka (Skrabnja i sur., 2004). Nadalje, predstavljaju bogat izvor prirodnih antioksidansa i imunogeni 4-O-metilglukuronoksilan, koji je blisko povezan s fenolima (Ebringerová i Hromádková, 2010). Također, sadrže veće količine rutina i kvercetina od ostalih dijelova zrna (Oomah i Mazza, 1996) kao i veći udio ukupnih flavonoida (Quettier-Deleu i sur., 2000). Koncentracija ukupnih flavonoida u zrnu iznosi 19 mg na 100 g suhe tvari dok u ljuskicama ta vrijednost iznosi 74 mg na 100 g suhe tvari. Za razliku od zrna u kojima je utvrđena prisutnost samo dva flavonoida (rutina i *iso*-viteksina), u ljuskicama je pronađeno čak šest vrsta flavonoida (rutin, orientin, *iso*-orientin, viteksin, *iso*-viteksin i kvercetin) pri čemu u oba slučaja dominira rutin (95 % u zrnu i 45 % u ljusci, računato na udio ukupnih flavonoida) (Dietrich-Szostak i Oleszek, 1999). Proučavanjem literature uočeno je da udio rutina u heljдинim ljuskicama poprilično varira ovisno o različitim čimbenicima kao što su vrsta heljde, mjesto uzgoja i okolišni uvjeti. Tako je istraživanje Oomah i Mazza (1996) pokazalo da udio rutina u ljusci varira u rasponu od 47 do 77 mg na 100 g suhe tvari uzorka. Međutim, udio rutina u rezultatima Watanabe i sur. (1997) je čak 10 puta manji – 4,3 mg na 100 g suhe tvari uzorka. Slični rezultati dobiveni su u radu Quettier-Deleu i sur. (2000), gdje udio rutina iznosi 5,2 mg na 100 g suhe tvari uzorka. Dietrich-Szostak i Oleszek (1999) su promjenom udjela vlage i temperature prilikom ljuštenja heljдинog zrna pokazali da udio rutina u ljusci ovisi o temperaturi i trajanju zagrijavanja jer je najniži udio rutina u količini od 26,2 mg na 100 g suhe tvari određen kod uzorka tretiranog vodenom parom na temperaturi od 150 °C u ukupnom trajanju tretmana 70

min. S druge strane, kod ručno oljuštenog zrna udio rutina je najviši i iznosi 32,9 mg na 100 g suhe tvari uzorka.

S obzirom da je utvrđeno kako je najveći udio flavonoida koncentriran u ljusci, heljdine ljuskice mogu se konzumirati kao prehrambeni izvor rutina ili se mogu inkorporirati u prehrambene proizvode kao prehrambena vlakna bogata flavonoidima (Oomah i Mazza, 1996).

Zielinska i sur. (2013) ukazali su na mogućnost korištenja heljдинih ljuskica za pripravu čajnih infuzija gdje bi heljdine ljuskice kao izvor flavonoida bile izvrsna nadopuna zelenom čaju bogatom katehinima. Huang i sur. (2017) proveli su istraživanje u kojem su ultrazvučnom ekstrakcijom zelenim otapalima koji predstavljaju prirodne eutektičke smjese (engl. NADES, *Natural deep eutectic solvents*) sastavljene isključivo od prirodnih komponenti nastalih metabolizmom stanice ekstrahirali rutin iz ljuskica tatarske heljde. Izdvajanje rutina iz otapala nakon provedene ekstrakcije postignuto je dodatkom *anti*-otapala te je ekperimentalno utvrđeno kako je NADES za razliku od ostalih organskih otapala korištenih za ekstrakciju biorazgradiv i ne predstavlja opasnost za okoliš. Zhu i sur. (2014) promatrali su utjecaj mikronizacije na fizikalno-kemijska i antioksidacijska svojstva prehrambenih vlakana heljдинih ljuskica. Istraživanje je provedeno na heljдинim ljuskicama samljevenim laboratorijskim mlinom i mikroniziranim heljдинim ljuskicama. Mikronizacijom je povećan udio topljivih prehrambenih vlakana dok je udio netopljivih prehrambenih vlakana smanjen čime se pretpostavlja da mikronizacija uzrokuje ponovnu raspodjelu gradivnih jedinica prehrambenih vlakana. Također, mikronizirana frakcija netopljivih prehrambenih vlakana pokazuje veći udio ukupnih fenola te veću antioksidacijsku (ABTS, DPPH i FRAP) vrijednost. Ebringerová i sur. (2007) istražili su utjecaj dodatka ekstrakta hemiceluloze izolirane iz heljдинih ljuskica u zamjes pšeničnog kruha. Rezultati su pokazali da se optimalnim dodatkom ekstrakta hemiceluloze u iznosu od 0,3 do 0,5 % izraženo na masu pšeničnog brašna, povećava stabilnost, jakost i volumen tijesta, a smanjuje rastezljivost. Navedena istraživanja ukazuju na potencijal korištenja heljдинih ljuskica u proizvodnji funkcionalnih prehrambenih proizvoda što bi ujedno dovelo do smanjenja količine otpada (Huang i sur., 2017).

2.2. BIOAKTIVNI SPOJEVI

Biljke su oduvijek predstavljale važan izvor nutritivnih sastojaka a nakon otkrića njihovih medicinskih svojstava, koriste se u prevenciji i liječenju različitih bolesti (Azmir i sur., 2013). Svaka živa stanica proizvodi razne spojeve potrebne za njeno pravilno funkcioniranje i održivost. Svi spojevi bioloških sustava mogu se podijeliti u dvije glavne skupine. Prvu skupinu čine primarni metaboliti namijenjeni rastu i razvoju stanice, kao što su ugljikohidrati, aminokiseline, proteini i masti. Druga skupina su sekundarni metaboliti, koji pomažu u održavanju stanice i obrani od nepovoljnih okolišnih uvjeta kao što su napadi bakterija i virusa (Azmir i sur., 2013; Šućur, 2015). Utvrđeno je da brojne vrste sekundarnih metabolita pokazuju biološku aktivnost u samom metabolizmu biljaka (fiziološka aktivnost) ali i u komunikaciji biljke s okolišem (ekološka aktivnost). Dije se u tri glavne kategorije (Azmir i sur., 2013):

1. Terpeni i terpenoidi (oko 25 000 vrsta),
2. Alkaloidi (oko 12 000 vrsta),
3. Fenolni spojevi (oko 8000 vrsta).

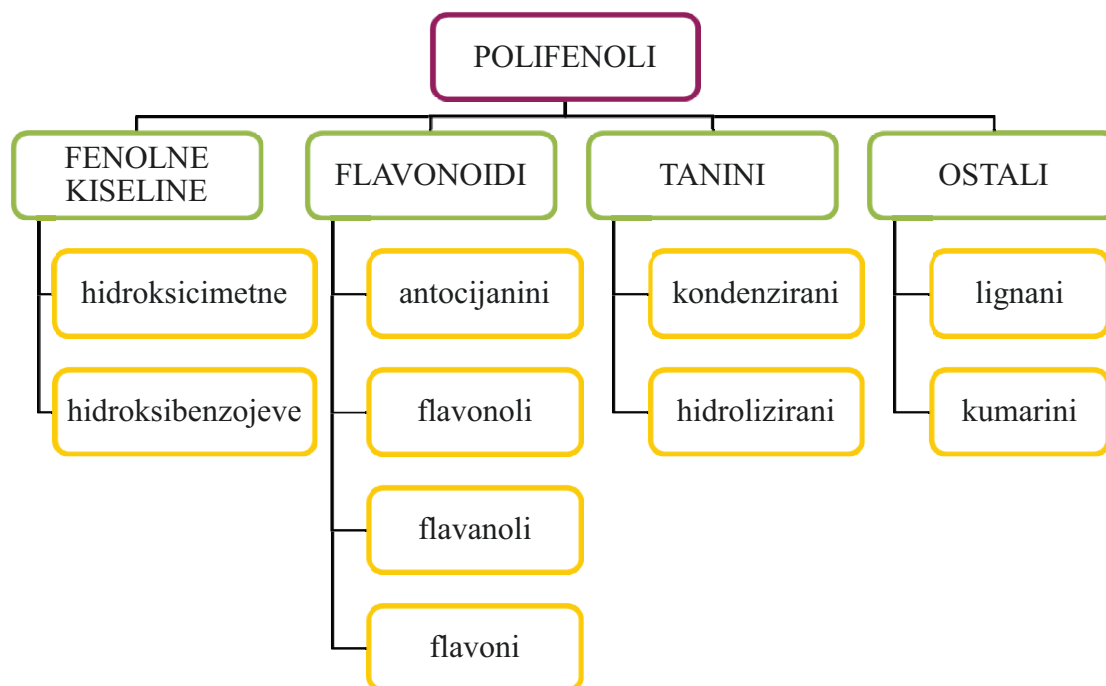
Mehanizam djelovanja bioaktivnih spojeva još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Neki spojevi djeluju kao antioksidansi, dok drugi poboljšavaju obrambenu sposobnost organizma čime se sprječava oksidativni stres stanice i pojava trajnog staničnog oštećenja. Ne postoje znanstveni dokazi o preporučenom dnevnom unosu i djelotvornosti bioaktivnih spojeva kao ni sigurnosti njihove upotrebe ali općenito se smatra da ukoliko čine dio uravnotežene prehrane imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje (Astley i Finglas, 2016).

2.2.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi ili polifenoli su dio jedne od najbrojnijih skupina sekundarnih biljnih metabolita. Doprinosu nutritivnoj i senzorskoj kvaliteti voća, povrća i drugih biljnih vrsta (Lapornik i sur., 2005). Do sada je poznato više od 8000 fenolnih spojeva, a najbrojniju skupinu čine flavonoidi. Osnovna strukturna formula polifenola je konjugirani oblik benzenskog ili aromatskog prstena na koji je direktno vezana hidroksilna skupina (Bravo, 1998). Prirodni fenolni spojevi mogu biti građeni od jednostavnijih molekula kao što su fenolne kiseline i

flavonoidi pa sve do visokopolimeriziranih molekula (tanini, biflavonoidi, lignini) (Bravo, 1998; Naczki i Shahidi, 2006). Shematski prikaz podjele polifenola prikazan je na Slici 2.

Polifenolni spojevi najpoznatiji su zbog svojih iznimnih antioksidacijskih svojstava, zahvaljujući kojima pomažu u prevenciji mnogih patoloških poremećaja u organizmu, kao što su ateroskleroza, disfunkcija moždanog tkiva i kancerogena stanja (Gordon, 1996).



Slika 2. Osnovna podjela polifenola (Bravo, 1998; Naczki i Shahidi, 2006).

2.2.2. Rutin

Rutin (kvercetin-3-*o*-rutinozid) je flavonol glikozid žute boje koji se sintetizira u biljkama zbog zaštite od UV zračenja i bolesti (Kreft i sur., 2006). Pronađen je u velikom broju različitih biljnih vrsta kao što su voće, povrće, lišće čaja ili zrna kave (Koval'skii i sur., 2014). Unatoč tome, važno je naglasiti da nijedna žitarica osim heljde ne sadrži rutin (Huang i sur., 2017).

Zbog antioksidacijskih svojstava i sposobnosti vezanja slobodnih radikala i metalnih iona, rutin pokazuje brojne pozitivne zdravstvene učinke. Još su prije 75 godina Griffith i sur. (1944) ustanovili da rutin utječe na smanjenje propusnosti krvnih žila i ublažavanje kapilarne osjetljivosti povezane s hemoragijskom bolesti. Nadalje, Wojcicki i sur. (1995) uočili su

povoljan utjecaj rutina na smanjenje rizika od ateroskleroze i anti-endemski učinak. Istraživanje na miševima (Janbaz i sur., 2002) pokazalo je da oralna konzumacija rutina ima hepatoprotektivno djelovanje.

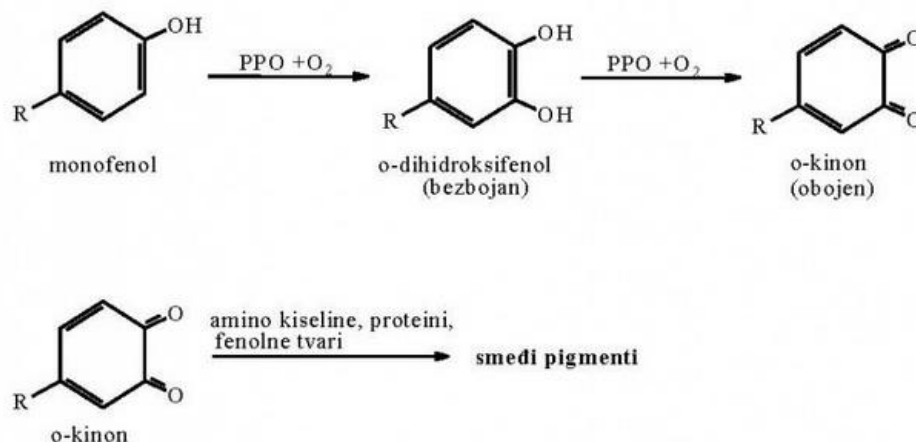
Mehanizam apsorpcije rutina u gastrointestinalnom traktu još uvijek nije u potpunosti razjašnjen ali se smatra da crijevna mikroflora hidrolizira rutin na aglikon kvercetin i šećernu skupinu čime je omogućena njegova apsorpcija (Koval'skii i sur., 2014).

2.3. POLIFENOL OKSIDAZA

PPO, poznata i kao tirozinaza, *o*-difenol oksidaza i katehol oksidaza je enzim koji u aktivnom mjestu sadrži bakar i uzrokuje reakcije enzimskog posmeđivanja biljnog tkiva (Oszmianski i Chang, 1990; Jašić, 2013). Za odvijanje reakcije neophodno je prisutstvo atmosferskog kisika (O_2) i određenog supstrata. Supstrati PPO mogu biti fenolni spojevi niske molekulske mase, ali i tirozinski bočni ostatci proteina (Matheis i Whitaker, 1984). PPO je koncentrirana u plastidima stanice i dok stanica nije oštećena, enzim nije u kontaktu sa supstratima koji se nalaze u citoplazmi. Oštećenjem stanice narušava se stanična struktura i dolazi do enzimske reakcije.

U prisutnosti fenolnih spojeva djelovanjem PPO monofenoli se transformiraju u *o*-difenole, a kasnije oksidiraju do *o*-kinona. U drugom stupnju nastali reaktivni *o*-kinon se kondenzira i neenzimski reagira s drugim fenolnim spojevima, aminokiselinama ili proteinima čime nastaju tamno obojeni produkti (Slika 3) (Jašić, 2013).

Međutim, u nedostatku fenolnih spojeva kao supstrata, supstrat PPO predstavljaju tirozinski bočni ogranci proteina koji se hidroksiliraju u 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) i konačno oksidiraju u odgovarajući *o*-kinon. Nastali *o*-kinoni mogu se kondenzirati međusobno ali i reagirati s amino- i sulfhidrilnim bočnim ostacima proteina, čime dolazi do promjene funkcionalnih svojstava proteina, njihovog povezivanja i nastanka proteinske mreže. Uočeno je da ta reakcija ima pozitivan utjecaj na jačanje glutenske mreže u pšenici s obzirom da se proteini glutena povezuju međusobno i/ili s molekulama pentozana (Matheis i Whitaker, 1984).



Slika 3. Kemijske reakcije PPO (Jašić, 2013).

2.4. ULTRAZVUK

Bioaktivni spojevi iz biljnih materijala mogu se ekstrahirati različitim ekstrakcijskim tehnikama koje se mogu podijeliti na klasične (konvencionalne) metode i suvremene (nekonvencionalne) metode ekstrakcije.

Klasične metode ekstrakcije temelje se na ekstrakcijskoj sposobnosti korištenih otapala uz zagrijavanje i/ili miješanje suspenzije (Azmir i sur., 2003). Glavni nedostaci korištenja ovih metoda su dugo vrijeme ekstrakcije, visoka cijena i potreban visoki stupanj čistoće otapala, isparavanje velikog dijela otapala, mala selektivnost ekstrakcije i temperaturna degradacija termolabilnih spojeva (Luque de Castro i García-Ayuso, 1998).

Kako bi se poboljšala navedena ograničenja konvencionalnih ekstrakcijskih tehnika, uvedene su nove metode ekstrakcije. U ovu skupinu spadaju: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom, ekstrakcija pomoću enzima, ekstrakcija pomoću električnog polja i ekstrakcija superkritičnim tekućinama (Azmir i sur., 2003).

Ultrazvučni val sličan je zvučnom valu s frekvencijom višom od 16 kHz te stoga ne spada u ljudsko slušno područje. U prehrambenoj industriji primjenjuju se ultrazvučni valovi dvaju područja frekvencija. To su ultrazvučni valovi niskog intenziteta (manje od 1 W cm⁻²) i frekvencija viših od 100 kHz, te ultrazvučni valovi visokog intenziteta (10 do 1 000 W cm⁻²) i frekvencija od 20 do 100 kHz.

Najraširenija upotreba ultrazvuka je vjerojatno u procesima ekstrakcije različitih organskih komponenti iz biljnih sirovina. Primjena metode sastoji se u tome što nastale kavitacije uzrokuju bubrenje stanica te probijanje staničnih stijenki biljnih materijala čime se olakšava ulaz otapala u materijal, povećava efikasnost izmjene mase i olakšava ispuštanje staničnog sadržaja (Lelas, 2006; Drmić i Režek Jambrak, 2010). Nadalje, djelovanjem ultrazvuka dolazi do kompresije i smicanja koji uzrokuju denaturaciju proteina. Zbog toga je za očekivati da će doći do smanjenja enzimske aktivnosti iako kratki “pljusak” ultrazvuka može u nekim slučajevima povećati enzimsku aktivnost, vjerojatno zbog razaranja staničnih molekula pri čemu enzimi postaju raspoloživiji za reakcije sa supstratom (Lelas, 2006). McClements (1995) je ustanovio da ukoliko se meso izloži djelovanju ultrazvuka dolazi do mekšanja tkiva i oslobađanja proteina mišićnog tkiva što u mesnim proizvodima uzrokuje povećanje kapaciteta vezanja vode. Zbog toga je očito da UVI, osim na bioaktivne spojeve, djeluje i na ostale stanične komponente pa se može iskoristiti kao predtretman sirovine koji izaziva određene poželjne učinke s ciljem proizvodnje prehrambenih proizvoda veće nutritivne vrijednosti uz znatnu uštedu energije i kraće vrijeme trajanja procesa proizvodnje (Lelas, 2006; Brnčić i sur., 2009).

2.4.1. Mehanizam i djelovanje ultrazvuka visokog intenziteta

Ultrazvučni valovi u kontaktu s tretiranom tvari stvaraju silu koja izaziva kompresiju ili smicanje valova koji prolaze kroz medij zbog čega dolazi do promjena u tlaku i temperaturi namirnice, kavitacije, stvaranja slobodnih radikala, oštećenja membrane stanica i kemijskih reakcija (Lelas, 2006).

Kada se ultrazvučni val prostire tekućim medijem, stvaraju se longitudinalni valovi i područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka, koji uzrokuju pojavu kavitacije i stvaranje mjehurića plina. Nastali mjehurići imaju veću površinu tijekom ciklusa ekspanzije pa se povećava difuzija plina. Maksimum je dostignut tamo gdje osigurana ultrazvučna energija nije dovoljna kako bi se zadržala plinska faza u mjehuriću zbog čega dolazi do brze kondenzacije. Kondenzirane molekule se sudaraju stvarajući udarne valove koji stvaraju područja vrlo visoke temperature (do 5500 K) i tlaka (do 50 MPa) (Kuijpers i sur., 2002).

Uz otapalo, temperaturu i pritisak, za optimizaciju procesa potrebno je dobro posložiti čimbenike ultrazvučnog tretmana poput frekvencije, vremena tretiranja, snage ultrazvuka te distribucije

ultrazvučnih valova. Za postizanje maksimalnog učinka, potrebno je optimirati uvjete temperature, snage ultrazvuka te izbor otapala (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovine

Za izradu ovog diplomskog rada korišten je uzorak heljдинih ljuskica dobiven nakon ljuštenja zrna heljde prilikom procesa prerade u mlinu Pukanić (Velika Gorica, Hrvatska).

3.1.2. Reagensi

Korišteni reagensi su visoke analitičke ili HPLC čistoće.

- L-DOPA (L-dihidroksifenilalanin), 10 mM (Acros Organics, New Jersey, SAD)
Priprema: Otopljeno je 98,595 g L-DOPA reagensa u 50 mL 50 mM MOPS.
- Tween-20 (Polioksietilensorbitan monolaurat) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- MOPS (3-(N-morfolino) propansulfonska kiselina), 50 mM, pH = 6,5 (Acros Organics, New Jersey, SAD)
Priprema: Otopljeno je 1,031 g MOPS u 100 mL 1 M NaOH u laboratorijskoj čaši. pH vrijednost je regulirana polaganim dodavanjem destilirane vode i NaOH a nakon postignute pH vrijednosti 6,5 sadržaj je kvantitativno prebačen u odmjernu tikvicu.
- Titritiv NaOH, 0,1 M (Kefolab, Ljubljana, Slovenija)
- Metanol, apsolutni, HPLC čistoće (Avantor Performance Materials B.V., Arnhem, Nizozemska)
- Etanol, 80 % (w/v) (Kefolab, Ljubljana, Slovenija)
- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3), 20 % (w/v) (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
Priprema: 20 g anhidrida Na_2CO_3 otopljeno je u 80 mL vruće destilirane vode u odmornoj tikvici od 100 mL. Otopina je ohlađena na sobnu temperaturu, nadopunjena destiliranom vodom do oznake, ostavljena 24 sata a nakon toga je profiltrirana.
- Rutin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

- Trolox (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Željezov (III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
Priprema: Otopljeno je 0,0541 g kristala $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ u 10 mL destilirane vode.
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Njemačka)
Priprema: Otopljeno je 0,0312 g TPTZ u 10 mL 40 mM HCl. Otopinu je uvijek potrebno pripremiti na dan određivanja.
- Octena kiselina, ledena, 99,5 % (Macron, Center Valley, SAD)
- Acetatni pufer, 300 mM (Iach-Ner, Neratovice, Češka)
Priprema: 0,93 g bezvodnog natrijevog acetata otopljeno je u 8 mL ledene octene kiseline u odmjernoj tikvici od 500 mL i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake.
- DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil), 0,06 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
Priprema: Otopljeno je 1,1800 mg DPPH u 50 mL metanola. Otopinu je uvijek potrebno pripremiti na dan određivanja.

3.1.3. Aparatura i pribor

- Ultra-centrifugalni mlin ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Njemačka)
- Kuglični kriogeni mlin (Retsch GmbH, Haan, Njemačka)
- Vibracijsko sito (Fritsch GmbH, Analysette 3 PRO, Idar-Oberstein, Njemačka)
- Ultrazvučni uređaj (Hielscher Ultrasonics GmbH, UP400St, Teltow, Njemačka)
- Ultrazvučna sonda promjera 22 mm (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Njemačka)
- Liofilizator (Christ GmbH, Alpha 1-4 LSCplus, Osterode am Harz, Njemačka)
- Laboratorijske čaše volumena 50, 100, 200 i 250 mL (ISOLAB GmbH, Wertheim, Njemačka)
- Električna ploča za kuhanje (Corona, Zagreb, Hrvatska)
- Štapni alkoholni termometar (Amarell GmbH & Co.KG, Kreuzwertheim, Njemačka)
- Automatske pipete volumena 10-100 μL , 100-1000 μL i 1000-5000 μL (Eppendorf Austria GmbH, Beč, Austrija)
- Analitička vaga (Kern & Sohn GmbH, ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)

- Menzure volumena 10 i 50 mL (ISOLAB, Wertheim, Njemačka)
- Odmjerne tikvice volumena 10, 25, 50, 100 i 2000 mL (ISOLAB, Wertheim, Njemačka)
- Metalna špatula
- Eppendorf epruvete volumena 1 i 2 mL
- Posude za urin s navojnim zatvaračem volumena 100 mL
- Stalak za epruvete
- pH metar (Jenway, 3510, Staffordshire, UK)
- Plastična žlica
- Mikrokovčice
- Metalne zdjelice
- Syringe filteri veličine pora 0,45 µm (LAB-EX Labortrading LTD., Budimpešta, Mađarska)
- Plastične šprice volumena 5 mL
- Sušionik (Instrumentaria, ST-01/02, Zagreb, Hrvatska)
- Eksikator
- Magnetska mješalica s grijanjem (IKA Werke GmbH & Co.KG, C-MAG HS 7, Staufen, Njemačka)
- Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, MicroCL 21, Waltham, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Njemačka)
- Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Komprimirani dušik (Messer Croatia Plin d.o.o., UN 1066, Zaprešić, Hrvatska)
- HPLC uređaj (Agilent 1200 Series, Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- pH metar s termometrom (Testo SE & Co. KGaA, Testo 206, Lenzkirch, Njemačka)

3.1.4. Priprema uzoraka

3.1.4.1. *Mljevenje na ultra-centrifugalnom mlinu*

Heljdine ljuskice najprije su podvrgnute procesu mljevenja na ultra-centrifugalnom mlinu (Slika 4) pri brzini od 6000 o min⁻¹ sa sitima promjera otvora 500 µm. Uzorak je u mlin dodavan

polako kako bi se postigao maksimalan učinak mlina (100 %) te da ne bi došlo do naglog pregrijavanja mlina.



Slika 4. Ultra-centrifugalni mlin (vlastita fotografija).

3.1.4.2. Mljevenje na kugličnom mlinu

Dobiveni uzorak heljdinih ljuskica s ultra-centrifugalnog mlina dalje je mljeven na kugličnom mlinu (Slika 5) s upotrebom tekućeg dušika (N_2) na temperaturi od $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. U posudicu zapremnine 50 mL s kuglicom promjera 25 mm stavljeno je 8 g samljevenog uzorka s obzirom da prema uputama proizvođača kuglica zauzima 1/3 posude, 1/3 smije zauzimati uzorak, a 1/3 mora ostati prazna kako bi se postigao optimalan učinak mljevenja. Prethlađenje uzorka provedeno je na automatskom programu nakon čega slijedi jedan ciklus mljevenja u trajanju od 4 min pri frekvenciji od 30 Hz.



Slika 5. Kuglični mlin (Voučko, 2018).

3.1.4.3. Prosijavanje

Uzorak s kugličnog mlina prosijan je na vibracijskom situ sa sitima promjera 180 i 56 μm . Za svaki ciklus prosijavanja korišteno je 50 g uzorka uz neprestano prosijavanje 10 min. Sakupljana je frakcija manja od 56 μm koja je korištena u daljnim postupcima rada a ostatak na situ je dodatno mljeven na kugličnom mlinu.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Tretman ultrazvukom visokog intenziteta

Izdvojena frakcija tretirana je UVI ukupne snage procesora 400 W i frekvencije 24 kHz sa sondom promjera 22 mm (Slika 6). Tretmani uzoraka provedeni su prema složenom centralnom planu pokusa (engl. CCD, *Central Composite Design*) korištenjem programa Design Expert 10 (StatEase, SAD). Centralni plan pokusa uključivao je dvije nezavisne varijable: početnu temperaturu uzorka ($^{\circ}\text{C}$) i vrijeme tretmana UVI (min). Centralna točka (45 $^{\circ}\text{C}$, 10 min) imala je 5 ponavljanja, što je u konačnici rezultiralo s 13 pokusa. Plan pokusa prikazan je u Tablici 1.

Amplituda tretmana UVI fiksirana je na 100 %. Vrijeme tretmana iznosilo je 2,9; 5; 10; 15 ili 17 min a početna temperatura uzoraka regulirana je na 9,7; 20; 45; 70 ili 80,4 °C.

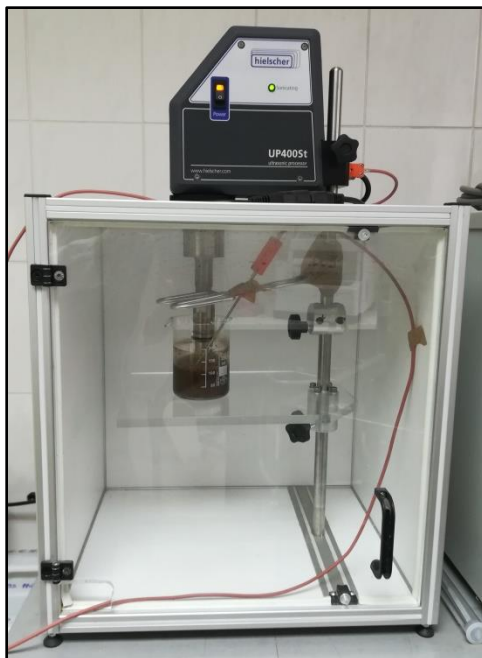
Tablica 1. Složeni centralni plan pokusa tretmana UVI izdvojene frakcije.

Početna temperatura uzorka (°C)	Vrijeme tretmana UVI (min)
45*	10
45*	10
70	15
20	15
45*	10
80,4	10
70	5
20	5
45	2,9
45*	10
45	17
9,7	10
45*	10

*centralna točka

Tretman UVI proveden je na 10 % vodenoj suspenziji (10 g uzorka suspendiranog u 100 mL destilirane vode) u čaši volumena 600 mL. Suspenzije su izložene djelovanju UVI uranjanjem sonde 1 cm u suspenziju. Prije i nakon tretmana UVI izmjerena je temperatura suspenzija. Početna temperatura izmjerena je pH metrom s termometrom a temperatura nakon tretmana UVI očitana je na ultrazvučnom procesoru. Također, određena je i pH vrijednost prije i nakon tretmana UVI pomoću pH metra s termometrom. Nakon tretmana UVI uzorak je dekantiran u plastične posudice u debljini sloja od 2 cm te smrznut na -20 °C do početka liofilizacije. Uzorak je prije liofilizacije dodatno smrznut na -80 °C. Sam proces liofilizacije trajao je 30-48 h tj. dok temperatura uzorka nije postigla sobnu temperaturu. Osušeni uzorak je homogeniziran i čuvan u

zamrzivaču na -20 °C do analiza. Osim uzoraka tretiranih UVI, u daljnim postupcima analizirana je i netretirana frakcija koja predstavlja kontrolni uzorak.



Slika 6. Ultrazvučni procesor, ultrazvučna sonda, temperaturna sonda za vrijeme tretmana heljdinih ljuskica u 10 % vodenoj suspenziji u izolacijskoj komori (vlastita fotografija).

3.2.2. Određivanje udjela vode

Udio vode u heljdinim ljuskicama određen je metodom AACC International Method 44-19.01 (1999).

Postupak:

U prethodno osušenu i izvaganu metalnu zdjelicu izvagano je $2 \text{ g} \pm 1 \text{ mg}$ uzorka. Otvorena metalna zdjelica s uzorkom i poklopcem stavljena je u sušionik zagrijan na 130 °C te je sušenje trajalo 2 h. Nakon sušenja metalna zdjelica je pokrivena poklopcem i stavljena na hlađenje u eksikator. Kada je potpuno ohlađena, slijedi ponovno vaganje. Za svaki uzorak rađene su dvije paralele, a kao rezultat je uzeta srednja vrijednost. Količina vode u uzorku prikazuje se u postotcima, a izračunava prema formuli:

$$\text{Udio vode (\%)} = \frac{(m_0 - m_1) \cdot 100}{m_0} \quad (1)$$

gdje su:

m_0 = masa uzorka (g)

m_1 = masa uzorka nakon sušenja (g)

Dobiveni podatci o količini vode u uzorku korišteni su za izračun udjela suhe tvari (%) prema formuli:

$$\text{Suha tvar (\%)} = 100 \% - \text{udio vode (\%)} \quad (2)$$

3.2.3. Ekstrakcija slobodnih spojeva

Ekstrakcija slobodnih spojeva provedena je prema modificiranoj metodi Čukelj i sur. (2015).

Postupak:

Za ekstrakciju je izvagano 100 mg pripremljenog liofiliziranog i homogeniziranog uzorka kao i kontrolnog uzorka u Eppendorf epruvete od 2 mL. Dodano je 25 μL internog standarda 3,5-dikloro-4-hidroksibenzojeve kiseline koncentracije 5,92 mg mL^{-1} i 1 mL 80 % etanola. Epruvete su stavljene na vortex mješalicu u horizontalnom položaju 10 min. Nakon miješanja epruvete su podvrgnute tretmanu ultrazvučne kupelji na sobnoj temperaturi 10 min. Zatim su centrifugirane u mikro-centrifugi pri 8000 rpm 15 min. Supernatant je dekantiran u novu Eppendorf epruvetu pomoću automatskih pipeta od 1 mL i podvrgnut procesu uparavanja u struji dušika (N_2) s grijanjem uzoraka na 40 $^{\circ}\text{C}$. Proces ekstrakcije ponovljen je još 2 puta dodavanjem 1 mL 80 % etanola. Supernatanti su nakon svakog centrifugiranja spojeni i stavljeni na uparavanje pod dušikom. Upareni ekstrakti čuvani su u zamrzivaču na -20 $^{\circ}\text{C}$ do početka analize.

Prije početka analiza opisanih u sljedećim poglavljima (3.2.4.-3.2.8.) u uparene ekstrakte dodano je 1 mL metanola HPLC čistoće. Uzorci su stavljeni na vortex mješalicu 30 s nakon čega su

centrifugirani pri brzini od 14 000 o min⁻¹ 10 min te filtrirani pomoću mikro-filtera promjera pora 0,45 µm kako bi se postigla HPLC čistoća ekstrakata.

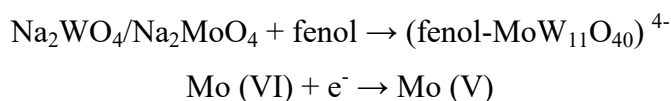
3.2.4. Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom

Ukupni fenolni spojevi (TPC) određeni su prema modificiranoj metodi Yu i sur. (2002b).

Princip metode:

Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva određen je Folin-Ciocalteu metodom koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s fenolima kao reducensima.

Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida.



Nakon 2 h reakcije u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na valnoj duljini od 765 nm (Agbor i sur., 2014). Očitana apsorbancija je proporcionalna intenzitetu razvijene plave boje, odnosno koncentraciji ukupnih fenola u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak:

U mikrokivete je otpipetirano 400 µL destilirane vode, 20 µL ekstrakta i 100 µL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 min dodano je 300 µL 20 % otopine Na₂CO₃ te 1185 µL destilirane vode. Mikrokiveta je zatvorena čepom za mikrokivete i sadržaj je dobro promiješan. Pripremljenim uzorcima je nakon 2 h stajanja u mraku na sobnoj temperaturi određena apsorbancija na 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Iz jednadžbe baždarnog pravca, konstruiranog za standard galne kiseline, koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg mL^{-1}), određen je udio ukupnih fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku. Jednadžba baždarnog pravca:

$$y = 1,0557 \cdot x - 0,0333 \quad (3)$$

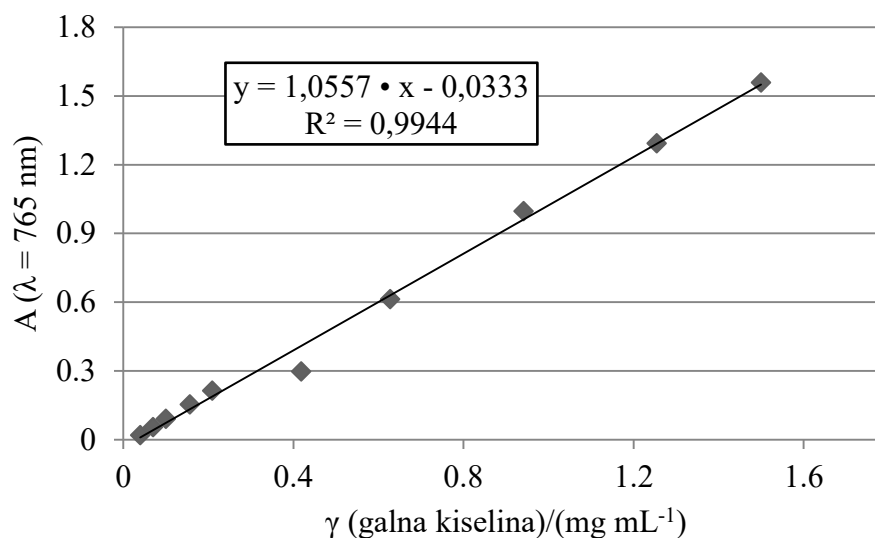
$$R^2 = 0,9944$$

pri čemu je:

x – koncentracija ukupnih fenola (mg mL^{-1})

y – izmjerena vrijednost apsorbancije pri 765 nm

Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva provedeno je u 3 paralelne probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) na 100 g suhe tvari uzorka (Yu i sur., 2002a). Za izradu baždarnog pravca (Slika 7) pripremljena je otopina galne kiseline u metanolu u deset različitih koncentracija.



Slika 7. Baždarni pravac za ukupne fenolne spojeve.

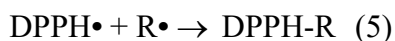
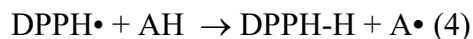
3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

DPPH i FRAP antioksidacijska aktivnost određena je prema modificiranoj metodi Belščak i sur. (2009).

3.2.5.1. DPPH metoda

Princip metode:

Metoda se temelji na redukciji stabilnog radikala DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), koji zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u VIS dijelu elektromagnetskog spektra (515 nm). Sparivanjem elektronskog para stabilnog radikala DPPH• u prisutnosti elektron donora – antioksidansa (AH) (4) ili slobodnog radikala (R•) (5) dolazi do promjene boje otopine iz ljubičaste u žutu. Nastali spoj ima smanjeni intenzitet apsorpcije u VIS dijelu spektra, što se prati smanjenjem vrijednosti apsorbancije (Brand-Williams i sur., 1995).



Postupak:

Otpipetirano je 20 µL ekstrakta u mikrokivete te je dodano 950 µL 0,06 mM DPPH otopine. Nakon 30 min trajanja reakcije u mraku, izmjerena je apsorbancija uzoraka pri 517 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Iz jednadžbe baždarnog pravca konstruiranog za standard Trolox, koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg mL^{-1}), određena je antioksidacijska aktivnost u ispitivanom uzorku. Jednadžba baždarnog pravca:

$$y = 1,6797 \cdot x + 0,0092 \quad (6)$$

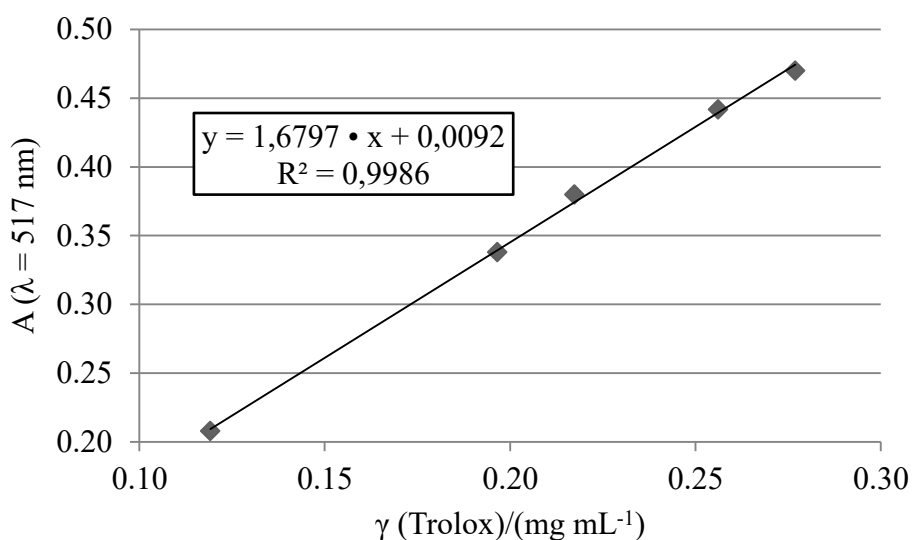
$$R^2 = 0,9986$$

pri čemu je:

x – koncentracija standarda otopine Trolox (mg mL^{-1})

y – izmjerena vrijednost apsorbancije pri 517 nm

Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom provedeno je u 3 paralelene probe (n = 3), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg Trolox ekvivalenata (TE) na 100 g suhe tvari uzorka. Za izradu baždarnog pravca (Slika 8) pripremljena je otopina Trolox-a u metanolu u pet različitih koncentracija.



Slika 8. Baždarni pravac za DPPH metodu.

3.2.5.2. FRAP metoda

Princip metode:

Metoda se temelji na redukciji žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-tirazin (Fe (III)-TPTZ) u intenzivno plavi kompleks Fe (II)-TPTZ u prisutstvu antioksidansa kao

reducensa. Reakcija se odvija pri pH = 3,6 jer se time osigurava dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Promjena boje mjeri se spektrofotometrijski pri 593 nm a intenzitet boje proporcionalan je antioksidacijskom kapacitetu (Ou i sur., 2002).

Postupak:

Na dan analize pripremljeno je 60 mL FRAP reagensa. Reagens je pripremljen na način da je pomiješano 5 mL 20 mM FeCl₃ * 6H₂O, 5 mL otopine 10 mM TPTZ u 40 mM HCl i 50 mL 300 mM acetatnog pufera. Otopina je zagrijana na 37 °C prije korištenja i temperatura je održavana na toj vrijednosti. U mikrokivete je dodano 20 µL ekstrakta i 1 mL FRAP reagensa te je nakon 4 min trajanja reakcije izmjerena apsorbancija uzoraka pri 593 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Iz jednadžbe baždarnog pravca konstruiranog za standard Trolox, koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg mL⁻¹), određena je antioksidacijska aktivnost u ispitivanom uzorku. Jednadžba baždarnog pravca:

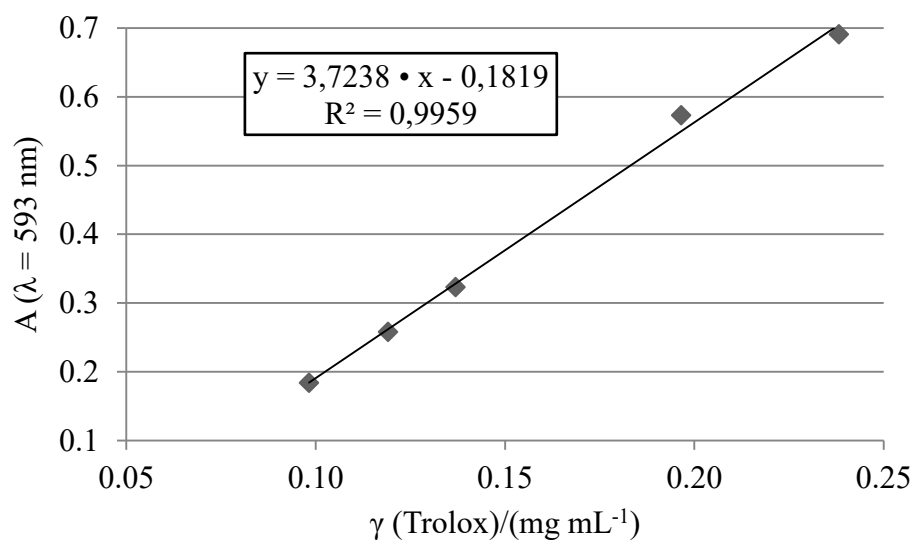
$$y = 3,7238 \cdot x - 0,1819 \quad (7)$$
$$R^2 = 0,9959$$

pri čemu je:

x – koncentracija standardne otopine Trolox (mg mL⁻¹)

y – izmjerena vrijednost apsorbancije pri 593 nm

Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom provedeno je u 3 paralelne probe (n = 3), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg Trolox ekvivalenata (TE) na 100 g suhe tvari uzorka. Za izradu baždarnog pravca (Slika 9) pripremljena je otopina Trolox-a u metanolu u pet različitih koncentracija.



Slika 9. Baždarna krivulja za FRAP metodu.

3.2.6. Određivanje udjela rutina

Udio rutina određen je prema metodi Li i sur. (2009) uz modifikaciju kromatografskih uvjeta.

Postupak:

Udio rutina u ekstraktu određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) opremljenom kvaternom pumpom s UV/VIS PDA (engl. *Photo Diode Array*) detektorom na kojem je provedena detekcija pri valnoj duljini od 280 i 330 nm. Mjerenja su rađena pri sobnoj temperaturi kolone uz protok $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, tlak od 250 bar i gradijentno eluiranje. Korištene su sljedeće mobilne faze: A – 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi i B – 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu. Na kromatografsku kolonu injektirano je $100 \mu\text{L}$ ekstrakta. Računalni program korišten za identifikaciju i kvantifikaciju rutina je LC/MSD ChemStation a dobiveni kromatogram heljдинih ljuskica prikazan je na Slici 11.

Izrada baždarnog pravca:

Iz jednadžbe baždarnog pravca konstruiranog za standard rutina, koji prikazuje ovisnost izmjerene površine o koncentraciji standarda ($\mu\text{g mL}^{-1}$), određena je koncentracija rutina u ispitivanom uzorku. Jednadžba baždarnog pravca:

$$y = 0,006 \cdot x - 0,006 \quad (8)$$

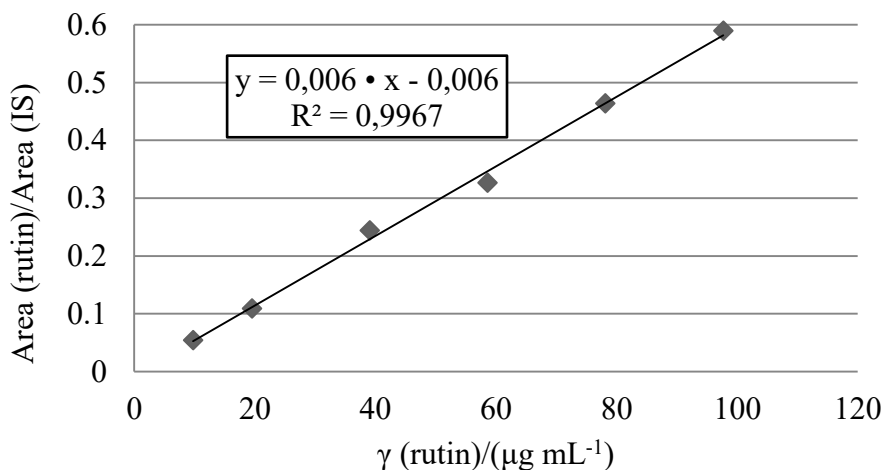
$$R^2 = 0,9967$$

pri čemu je:

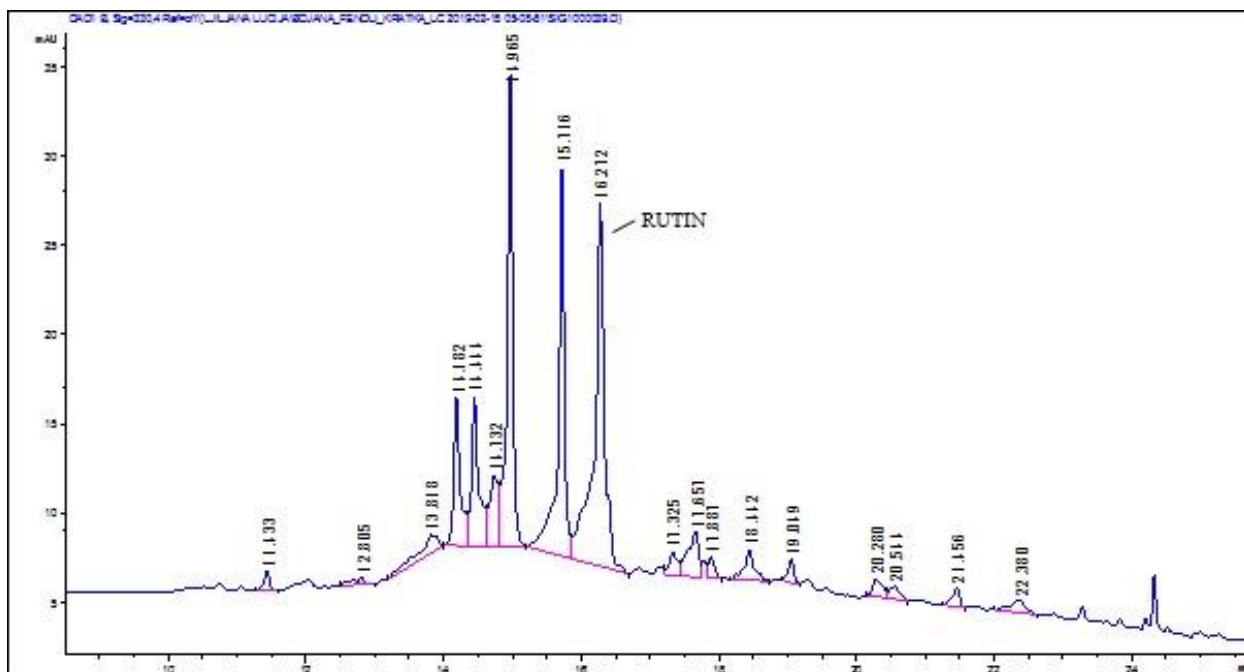
x – koncentracija standardne otopine rutina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

y – površina rutina/površina internog standarda

HPLC analiza provedena je 3 paralelne probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi u mg na gram suhe tvari uzorka kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Za izradu baždarnog pravca (Slika 10) u Eppendorf kivete dodano je 25 μL internog standarda 3,5-dikloro-4-hidroksibenzojeve kiseline koncentracije 5,92 mg mL^{-1} kao i kod pripreme ekstrakata nakon čega je provedeno uparavanje u struji dušika (N_2) pri temperaturi od 40 $^{\circ}\text{C}$. Poslije uparavanja dodana je pripremljena standardna otopina rutina u metanolu u šest različitih koncentracija. Na kromatografsku kolonu injektirano je 100 μL standarda rutina.



Slika 10. Baždarna krivulja rutina.



Slika 11. Kromatogram uzorka heljдинih ljuskica.

3.2.7. Određivanje sposobnosti bubrenja u vodi

Sposobnost bubrenja u vodi određena je prema metodi Roberston i sur. (2000).

Postupak:

Izvagano je 100 mg uzorka u menzure od 10 mL, dodano je 10 mL destilirane vode i sadržaj je promiješan metalnom špatulom. Uzorci su pokriveni i ostavljeni na sobnoj temperaturi 18 h nakon čega je očitán volumen koji zauzima uzorak u menzuri i određena je sposobnost bubrenja u vodi prema formuli:

$$\text{Sposobnost bubrenja u vodi} = \frac{\text{Volumen uzorka u menzuri nakon 18 h (mL)}}{\text{Masa uzorka za analizu (g)}} \quad (9)$$

3.2.8. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze

Aktivnost PPO određena je prema metodi AACC International Method 22-85.01 (2000) za određivanje aktivnosti PPO u cjelovitom zrnju pšenice.

Postupak:

U odmjernu tikvicu s L-DOPA i MOPS reagensom dodano je 0,02 % Tween-20. Otopina je promućkana i ostavljena 45 min kako bi se otopili kristali L-DOPA. U međuvremenu je izvagano 100 mg uzorka u Eppendorf epruvete od 2 mL. Nakon što su se kristali otopili, u epruvete s uzorkom dodano je 1,5 mL pripremljene otopine. U slijepu probu dodano je samo 1,5 mL otopine, bez uzorka. Epruvete su stavljene na vortex mješalicu 55 min a nakon toga su centrifugirane na maksimalnoj brzini od 14 000 o min^{-1} 5 min. Nakon centrifugiranja u mikrokivete je otpipetirano 1 mL otopine. Na spektrofotometru je izmjerena apsorbancija pri 475 nm.

3.2.9. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati mjerenja prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija, izraženo na suhu tvar uzorka. Za izradu eksperimentalnog plana, statističku obradu eksperimentalnih rezultata i izradu grafova korišteni su programi Microsoft Office Excel 2010 i Design Expert 10 (StateEase, SAD). Jednosmjerna analiza varijance s Tukey post-hoc testom i analiza korelacije provedene su u programu Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, SAD). Nakon analize varijance (ANOVA) na nivou značajnosti $p = 0,05$, optimirani su uvjeti tretmana UVI metodom poželjnosti. Važnost svih ciljanih parametara je bila 3 (od 5). Prilikom optimizacije u obzir su uzete minimalne i maksimalne vrijednosti dobivenih rezultata mjerenja. Temperatura tretmana UVI može varirati u ispitivanom rasponu od 20 do 70 °C a trajanje tretmana UVI može varirati u rasponu od 5 do 15 min. Vrijednosti FRAP antioksidacijske aktivnosti, aktivnosti PPO i udio rutina su maksimizirane zbog utvrđenog značajnog utjecaja trajanja tretmana UVI na dobivene rezultate. Početna temperatura uzoraka i vrijeme tretmana

UVI nisu utjecali na udio TPC, DPPH antioksidacijsku aktivnost i sposobnost bubrenja u vodi te stoga navedeni parametri nisu uzeti u obzir pri optimizaciji. Prema dobivenim rezultatima mjerenja, udio rutina iznosi od 23, 92 mg do 28,95 mg na 100 g suhe tvari uzorka. Minimalna aktivnost polifenol oksidaze iznosi 0,64, dok maksimalna aktivnost dostiže vrijednost od 0,98. FRAP antioksidacijska aktivnost varira u rasponu od 115,18 mg TE do 179,39 mg TE na 100 g suhe tvari uzorka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Iako je djelovanje tretmana UVI proučavano na više od stotinu biljnih vrsta (do Nascimento i sur., 2016; Lazar i sur., 2016; Buratović, 2017), pregledom baza podataka znanstvenih radova uočeno je da je učinak djelovanja UVI na bioaktivne spojeve heljdinih ljuskica do sada slabo istražen, jer su samo Huang i sur., (2017) kombinacijom UVI i zelenih otapala koji predstavljaju prirodne eutektičke smjese uspješno razvili metodu izolacije rutina iz heljdinih ljuskica.

U ovom radu ispitan je utjecaj tretmana UVI na bioaktivne spojeve heljdinih ljuskica. Za razliku od većine prijašnjih radova, UVI u ovom radu nije korišten kao ekstrakcijska tehnika, već kao predtretman vodene suspenzije heljdinih ljuskica čija bi daljnja primjena bila namijenjena proizvodnji funkcionalnih pekarskih proizvoda.

Utvrđeno je da se fitokemikalije žitarica uglavnom nalaze vezane esterskim i glikozidnim vezama za polimere stanične stijenke (Čukelj i sur., 2010). Unatoč tome da je neosporan pozitivan zdravstveni učinak bioaktivnih spojeva (Fraga i sur., 2010) još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno *in vivo* djelovanje slobodnih, konjugiranih i vezanih oblika. Pretpostavlja se da je većina bioaktivnih spojeva žitarica zbog vezanog oblika otporna na uvjete probavnog sustava te da pod utjecajem mikroorganizama u debelom crijevu dolazi do njihovog oslobađanja i apsorpcije iako stupanj apsorpcije još uvijek nije u potpunosti utvrđen (Shahidi i Yeo, 2016). Za razliku od toga, bioaktivni spojevi voća u najvećem se udjelu nalaze u slobodnom obliku te vjerojatno glavno djelovanje imaju u tankom crijevu (Fardet i sur., 2008). Zbog toga se postavlja pitanje bi li oslobađanje vezanih oblika povećalo bioaktivni i antioksidacijski potencijal žitarica te bi li takvi spojevi mogli imati ulogu u oksidativnoj zaštiti proizvoda od žitarica i produljenju njihove trajnosti.

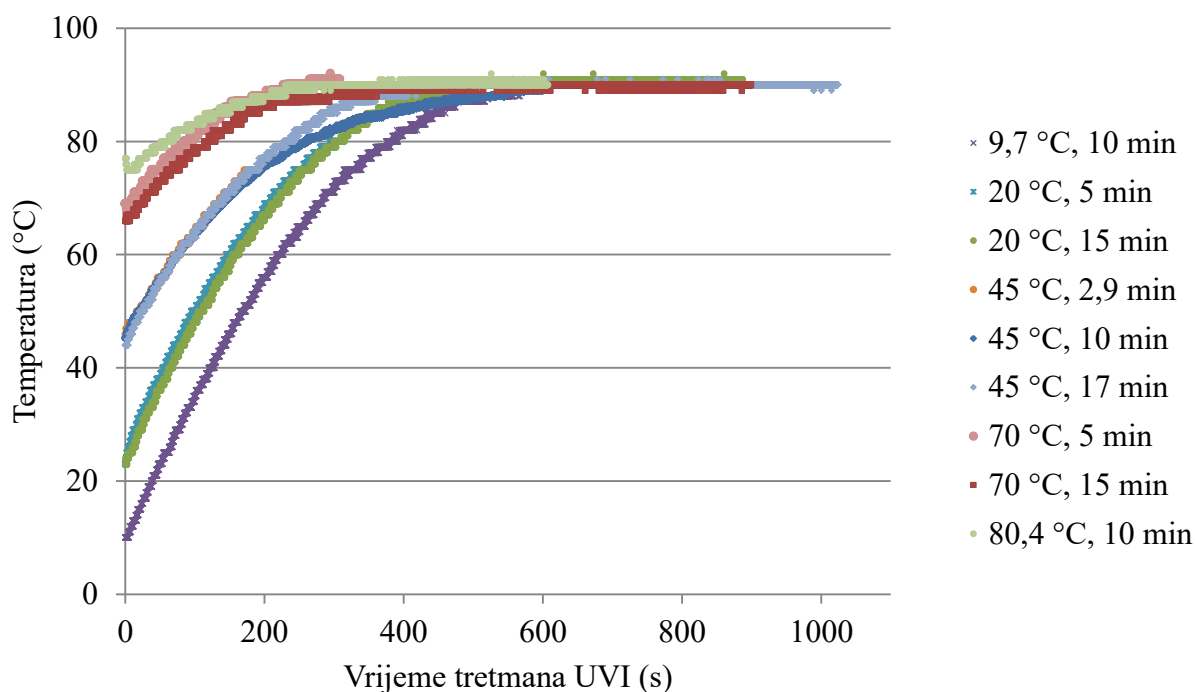
Heljdine ljuskice su nusproizvod prehrambene industrije i bogat izvor bioaktivnih spojeva. S obzirom na to da ultrazvučni valovi visokog intenziteta, zbog velike snage kojom djeluju na materijal izazivaju fizikalne i kemijske promjene staničnih sastojaka (Drmić i Režek Jambrak, 2010), UVI je izabran kao tehnologija obrade koja će poboljšati oslobađanje bioaktivnih spojeva i tehnološka svojstva heljdinih ljuskica i time omogućiti njihovu primjenu u ljudskoj prehrani.

Pripremljenim uzorcima nakon tretmana UVI i liofilizacije određen je udio vode i suhe tvari izražen u postotcima, sposobnost bubrenja u vodi izražena kao volumen uzorka (mL) na gram suhe tvari te je spektrofotometrijski određena aktivnost PPO. Nakon provedene ekstrakcije UVI

tretiranih, liofiliziranih uzoraka i otapanja uparenih ekstrakata u metanolu, spektrofotometrijski je određen udio TPC i antioksidacijska aktivnost. Udio TPC određen je pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, a antioksidacijska aktivnost određena je DPPH i FRAP metodama. Dobiveni rezultati za TPC prikazani su kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) na 100 g suhe tvari uzorka dok su rezultati za antioksidacijsku aktivnost prikazani kao Trolox ekvivalenti (TE) na 100 g suhe tvari uzorka. Nakon provedene UV/VIS PDA analize, HPLC metodom određen je udio rutina u metanolnom ekstraktu heljdinih ljuskica a rezultati su prikazani kao mg rutina na 100 g suhe tvari uzorka. Kako bi se ustanovio utjecaj početne temperature uzorka i vremena tretmana UVI na rezultate ispitivanih parametara heljdinih ljuskica navedenih u sljedećim poglavljima (4.2.-4.5), provedena je faktorska ANOVA. Tukey testom utvrđene su razlike između srednjih vrijednosti pojedinih svojstava u nativnom i obrađenim uzorcima.

4.1. KINETIKA PROMJENE TEMPERATURE TIJEKOM TRETMANA UVI

Analizom varijance je ustanovljeno kako promjena temperature ovisi o početnoj temperaturi i kvadratu vremena tretmana UVI. No, iz Slike 12 je vidljivo da se bez obzira na početnu temperaturu uzoraka na kraju tretmana UVI temperatura približno izjednači (od 87 do 90 °C).



Slika 12. Kinetika promjene temperature tijekom tretmana UVI.

4.2. UTJECAJ TRETMANA UVI NA UKUPNE FENOLNE SPOJEVE I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST HELJDINIH LJUSKICA

U Tablici 2. prikazani su TPC i antioksidacijska aktivnost heljdinih ljuskica određena DPPH i FRAP metodom. Između UVI tretiranih uzoraka nisu utvrđene statistički značajne razlike u TPC ni DPPH, dok je antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom ovisila o vremenu tretmana ($p = 0,016$).

Tablica 2. TPC i antioksidacijska aktivnost određena DPPH i FRAP metodama ovisno o tretmanu UVI u usporedbi sa kontrolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$) na 100 g suhe tvari uzorka. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti ($p < 0,05$).

Uzorak	TPC (mg GAE/100 g)	DPPH (mg TE/100 g)	FRAP (mg TE/100 g)
Kontrola	(180,05 $\pm$ 1,31) ^{ab}	(155,13 $\pm$ 18,15) ^a	(133,78 $\pm$ 1,65) ^{abc}
9,7 °C; 10 min	(206,37 $\pm$ 4,02) ^{ab}	(187,18 $\pm$ 2,87) ^{ab}	(135,63 $\pm$ 10,47) ^{ab}
20 °C; 5 min	(186,54 $\pm$ 0,89) ^{ab}	(184,33 $\pm$ 10,01) ^{ab}	(126,52 $\pm$ 3,12) ^a
20 °C; 15 min	(238,68 $\pm$ 20,13) ^{ab}	(214,92 $\pm$ 10,69) ^{ab}	(168,08 $\pm$ 6,24) ^{abc}
45 °C; 2,9 min	(183,52 $\pm$ 11,33) ^a	(150,20 $\pm$ 5,60) ^a	(115,18 $\pm$ 7,51) ^a
45 °C; 10 min	(217,04 $\pm$ 23,73) ^{ab}	(183,84 $\pm$ 24,50) ^{ab}	(142,87 $\pm$ 9,25) ^{abc}
45 °C; 17 min	(219,54 $\pm$ 6,63) ^{ab}	(193,93 $\pm$ 3,67) ^{ab}	(166,25 $\pm$ 11,57) ^{abc}
70 °C; 5 min	(205,21 $\pm$ 24,39) ^{ab}	(207,62 $\pm$ 11,27) ^{ab}	(145,90 $\pm$ 12,89) ^{abc}
70 °C; 15 min	(202,93 $\pm$ 1,18) ^{ab}	(188,87 $\pm$ 5,87) ^{ab}	(158,44 $\pm$ 4,25) ^{abc}
80,4 °C; 10 min	(245,63 $\pm$ 4,93) ^b	(228,34 $\pm$ 4,92) ^b	(179,39 $\pm$ 3,33) ^{abc}

Udio ukupnih fenolnih spojeva u kontrolnom uzorku (180 mg GAE na 100 g suhe tvari uzorka) se razlikuje od rezultata istraživanja Quettier-Deleu i sur. (2000) u kojem je udio ukupnih fenolnih spojeva u heljdinim ljuskicama određenih Folin-Ciocalteu metodom znatno viši i iznosi 333 mg GAE na 100 g suhe tvari uzorka. Dobiveni rezultati mogu se pripisati različitom

mjestu uzgoja i okolišnim uvjetima s obzirom da su Oomah i Mazza (1996) pokazali da su upravo okolišni uvjeti razlog promjenjivog udjela bioaktivnih spojeva heljdinih ljuskica.

Iz Tablice 2. vidljivo je da tretman UVI kod početne temperature 80,4 °C i trajanjem od 10 min uzrokuje statistički značajno povećanje udjela TPC heljdinih ljuskica od 36 % u odnosu na kontrolni uzorak ($p < 0,05$). Međusobnom usporedbom uzoraka tretiranih UVI nisu zabilježene statistički značajne ($p < 0,05$) razlike u TPC.

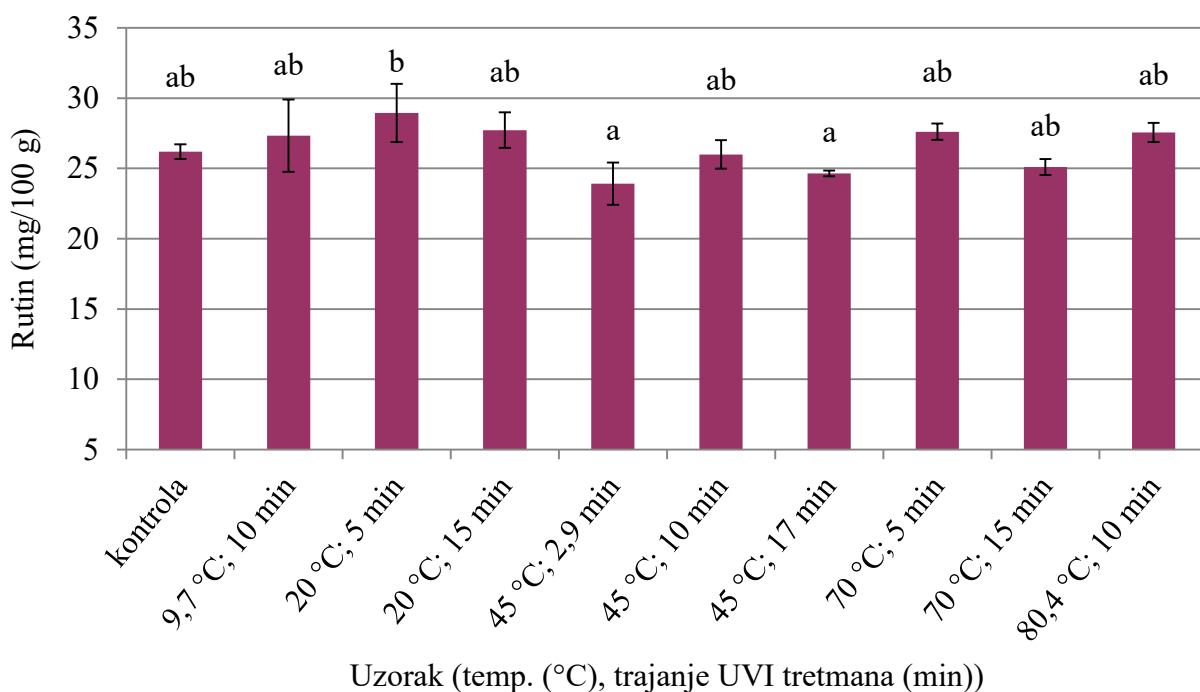
Slično kao i za TPC, najveće povećanje antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom u odnosu na kontrolni uzorak postignuto je kod tretmana UVI početne temperature 80,4 °C tijekom 10 min (47 %) te je ta razlika bila i statistički značajna ($p < 0,05$). Kao i kod DPPH metode, rezultati FRAP metode pokazuju da je najveće povećanje antioksidacijske aktivnosti (34 %) u odnosu na kontrolni uzorak kod uzorka temperature 80,4 °C tijekom 10 min tretmana iako je ta razlika statistički neznčajna ($p < 0,05$). S druge strane, na temelju ANOVA-e tretiranih UVI antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom ovisila je o vremenu tretmana ($p = 0,016$). Početna temperatura uzorka prije tretmana UVI nije značajno utjecala na TPC niti antioksidacijsku aktivnost, vjerojatno zato što se tijekom tretmana temperatura približno izjednačila.

S obzirom da se testovi za određivanje antioksidacijske aktivnosti međusobno trebaju nadopunjavati ispitani su i Pearsonovi koeficijenti korelacije (r) s pripadajućim p -vrijednostima. Analizom korelacije između provedenih testova utvrđena je linearna korelacija između sadržaja TPC i antioksidacijske aktivnosti – pri većem udjelu TPC povećava se i antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH i FRAP metodom, pa tako koeficijent korelacije između TPC i DPPH metode iznosi $r = 0,83$ ($p = 0,0005$) dok je nešto manji koeficijent $r = 0,69$ ($p = 0,0093$) utvrđen između TPC i FRAP metode. Također, utvrđena je jaka korelacija i između samih testova za mjerenje antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP metoda) gdje koeficijent korelacije iznosi $r = 0,83$ ($p = 0,0005$), unatoč tome što se mehanizam ovih reakcija razlikuje (Apak i sur., 2013). Naime, DPPH metoda temelji se na mehanizmu prijenosa elektrona i vodikog atoma (Pérez-Jiménez i sur., 2008), pa povećanjem koncentracije ili stupnja hidroksilacije fenolnih spojeva veći je stupanj uklanjanja DPPH radikala, a time i antioksidacijska aktivnost (Zhou i Yu, 2004). S druge strane, FRAP test najčešće se koristi za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta hidrofilnih spojeva (Pérez-Jiménez i sur., 2008).

4.3. REZULTATI HPLC ANALIZE UDJELA RUTINA

Prisutnost rutina jedan je od glavnih razloga korištenja heljde za proizvodnju različitih vrsta prehrambenih proizvoda (Kreft i sur., 2006). Heljdine ljuskice sadrže veći udio rutina u odnosu na ostale dijelove zrna (Ooomah i Mazza, 1996; Dietrich-Szostak i Oleszek, 1999; Quettier-Deleu i sur., 2000). U rezultatima istraživanja Dietrich-Szostak i Oleszek (1999) udio rutina u ljusci varira u rasponu od 26 do 33 mg na 100 g suhe tvari uzorka što je u skladu s dobivenim rezultatima u ovom radu gdje udio rutina u kontrolnom uzorku iznosi 26,2 mg na 100 g suhe tvari uzorka.

Zbog navedenih pozitivnih utjecaja rutina na ljudsko zdravlje proučen je i utjecaj tretmana UVI na sadržaj rutina u heljdinim ljuskicama u usporedbi s kontrolnim uzorkom (Slika 13). Analizom varijance utvrđena je ovisnost koncentracije rutina u tretiranim uzorcima o kvadratu početne temperature ($p = 0,038$).



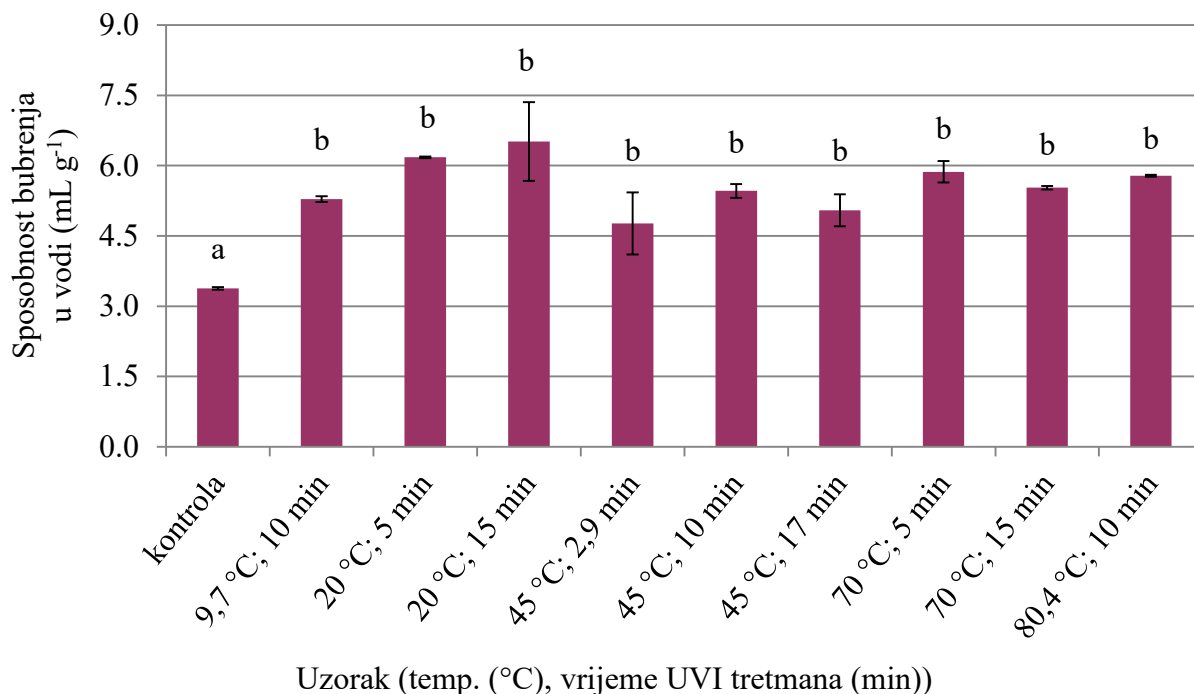
Slika 13. Udio rutina ovisno o tretmanu UVI u usporedbi sa kontrolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$) na 100 g suhe tvari uzorka. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

U usporedbi s kontrolnim uzorkom, može se uočiti da tretman UVI ne uzrokuje statistički značajno povećanje udjela rutina u heljdinim ljuskicama (Slika 13). Ipak, malo povećanje udjela rutina uočeno je kod uzorka s početnom temperaturom 20 °C i trajanjem tretmana UVI 5 min koje iznosi samo 6 % u odnosu na kontrolni uzorak. Zbog utvrđenih antioksidacijskih svojstava rutina (Griffith i sur., 1944; Wojcicki i sur., 1975; Janbaz i sur., 2002) ispitani su i Pearsonovi koeficijenti korelacije (r) s pripadajućim p -vrijednostima između izmjerenih vrijednosti udjela rutina i antioksidativne aktivnosti određene DPPH i FRAP metodama. Analizom korelacije između provedenih testova utvrđena je linearna korelacija između sadržaja rutina i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom pa tako koeficijent korelacije između udjela rutina i DPPH metode iznosi $r = 0,77$ ($p = 0,0023$). S druge strane, nizak koeficijent korelacije $r = 0,42$ ($p = 0,1562$) utvrđen je između udjela rutina i FRAP metode.

Dobiveni rezultati uspoređeni su sa statistički neznačajnim ($p \leq 0,05$) rezultatima rada Braje (2017) u kojem je uzorak oljuštenog heljdinog zrna podvrgnut predtretmanu UVI (100 % amplitude i vrijeme tretmana 5, 10, 20 min) u 48 % etanolnoj suspenziji nakon čega je provedena ekstrakcija etilnim acetatom, a upareni ekstrakt otopljen je u metanolu. Usporedbom rezultata uočeno je da UVI ima isti utjecaj na rutin unatoč tome što je riječ o drugačijoj metodi ekstrakcije i tretiranju različitog dijela heljdinog zrna. Upotreba drugog otapala prilikom tretmana UVI potencijalno bi mogla biti efikasnija u oslobađanju rutina iz heljde s obzirom da su Peng i sur. (2013) u svom istraživanju tretirali heljdino zrno UVI i uočili korelaciju između udjela metanola kao otapala i učinkovitosti ekstrakcije. Tako je prilikom korištenja 50-70 % metanola udio rutina bio veći u usporedbi s korištenjem 10-50 % metanola a kao mogući uzrok takvih rezultata navode brzu degradaciju rutina pri nižem udjelu metanola.

4.4. UTJECAJ UVI NA SPOSOBNOST BUBRENJA U VODI

Nakon provedenog tretmana UVI i liofilizacije uzoraka, provedeno je ispitivanje sposobnosti bubrenja u vodi tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolu. Na Slici 14. prikazani su dobiveni rezultati.



Slika 14. Sposobnost bubrenja u vodi ovisno o tretmanu UVI u usporedbi sa kontrolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

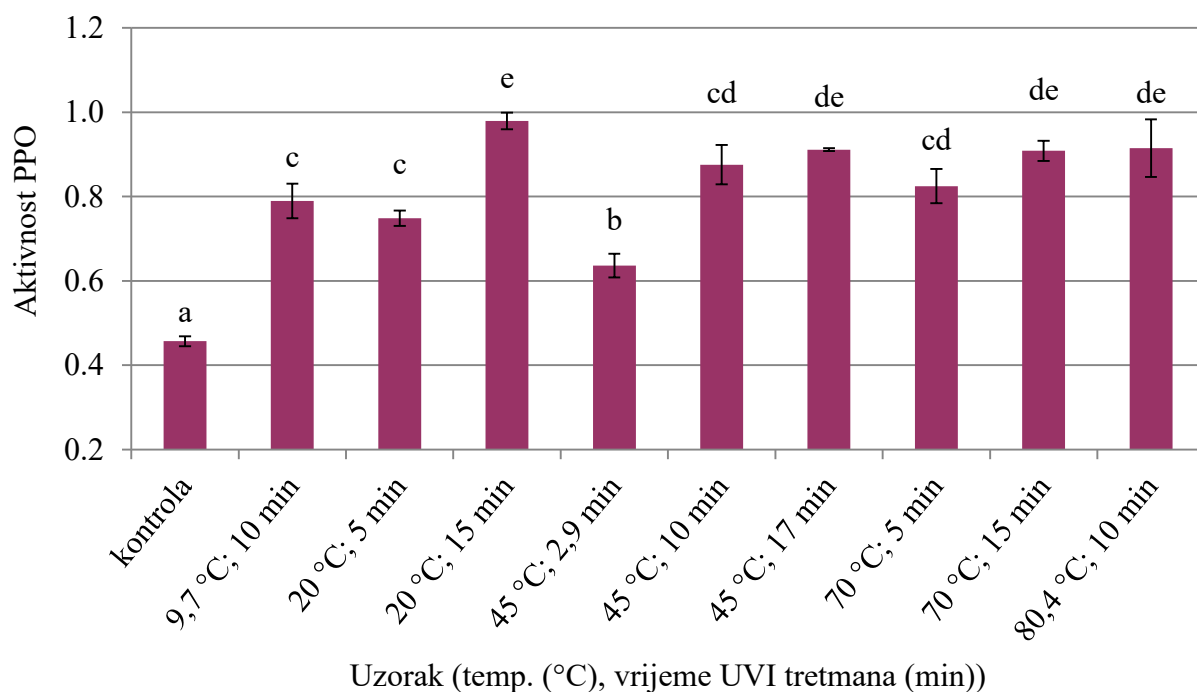
Sposobnost bubrenja u vodi kontrolnog uzorka iznosi $3,38 \text{ mL g}^{-1}$. Rezultat je uspoređen s rezultatima rada Zhu i sur. (2014) u kojem je određivana sposobnost bubrenja u vodi netopljivih prehrambenih vlakana heljdinih ljuskica koje su podvrgnute tretmanu ultrazvučne kupelji nakon čega su dodani enzimi (α -amilaza i proteaza) i anhidrid etanola. Nastali talog ispran je hladnom vodom, osušen u vakuum pećnici i korišten u postupku određivanja sposobnosti bubrenja u vodi istim postupkom kao u ovom radu a dobiveni rezultat iznosi $5,09 \text{ mL g}^{-1}$. Razlika u rezultatima može se pripisati različitom tretmanu heljdinih ljuskica zato što je moguće da tretman ultrazvučne kupelji u kombinaciji s enzimima u većoj mjeri pospješuje sposobnost bubrenja u vodi u odnosu na sami tretman UVI korišten u ovom radu.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da svi uzorci tretirani UVI imaju statistički značajno ($p < 0,05$) veću sposobnost upijanja vode u odnosu na kontrolni uzorak pri čemu najveću sposobnost upijanja vode u odnosu na kontrolni uzorak imaju uzorci temperature 20 °C s vremenom tretiranja 5 min (83 %) i 15 min (93 %). Uzevši u obzir činjenicu da prehrambena vlakna čine >

90 % kemijskog sastava heljdinih ljuskica (Skrabanja i sur., 2004) može se pretpostaviti da je djelovanjem UVI došlo do pucanja i/ili preraspodjele kemijskih veza između gradivnih molekula prehrambenih vlakana što je omogućilo bolju apsorpciju vode. Međutim, nije bilo statistički značajne ($p < 0,05$) razlike među uzorcima tretiranih UVI. Potrebno je provesti daljnja istraživanja na ovom području s obzirom da se postavlja pitanje bi li veće vezanje vode dodatkom heljdinih ljuskica tretiranih UVI prilikom proizvodnje pekarskih proizvoda omogućilo postizanje optimalne elastičnosti tijesta ili bi apsorpcija velike količine vode negativno utjecala na razvoj strukture tijesta.

4.5. AKTIVNOST POLIFENOL OKSIDAZE

Ispitivanim uzorcima spektrofotometrijski je određena aktivnost PPO. Dobivene vrijednosti uzoraka tretiranih UVI uspoređene su s dobivenom vrijednošću aktivnosti PPO kontrolnog uzorka (Slika 15).



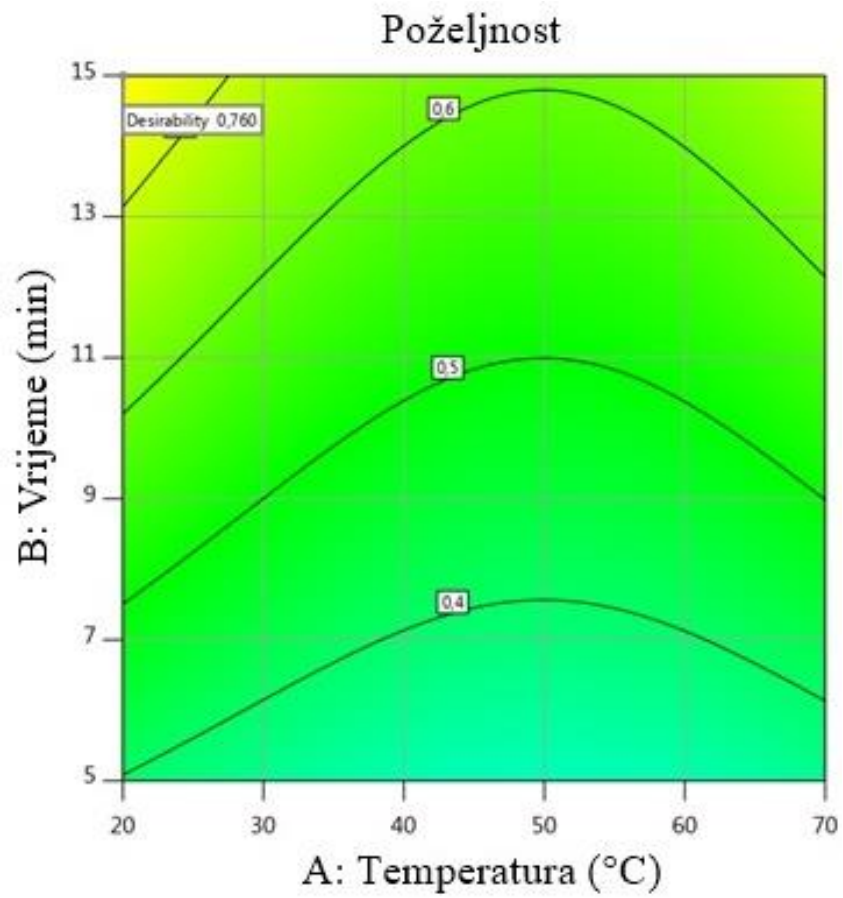
Slika 15. Aktivnost PPO ovisno o tretmanu UVI u usporedbi sa kontrolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 3$) na 100 mg suhe tvari uzorka. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je tretman UVI uzrokovao statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje aktivnosti PPO kod svih uzoraka u odnosu na kontrolni uzorak. Najmanje izraženo povećanje je kod uzorka s najkraćim trajanjem tretmana UVI (2,9 min) i početnom temperaturom 45 °C (39 %), dok je najveće povećanje zabilježeno pri temperaturi uzorka od 20 °C uz trajanje tretmana UVI 15 min i iznosi 114 % u odnosu na kontrolni uzorak. Time se ponovno ističe važnost trajanja tretmana UVI što je i potvrđeno ANOVA analizom ($p = 0,0014$).

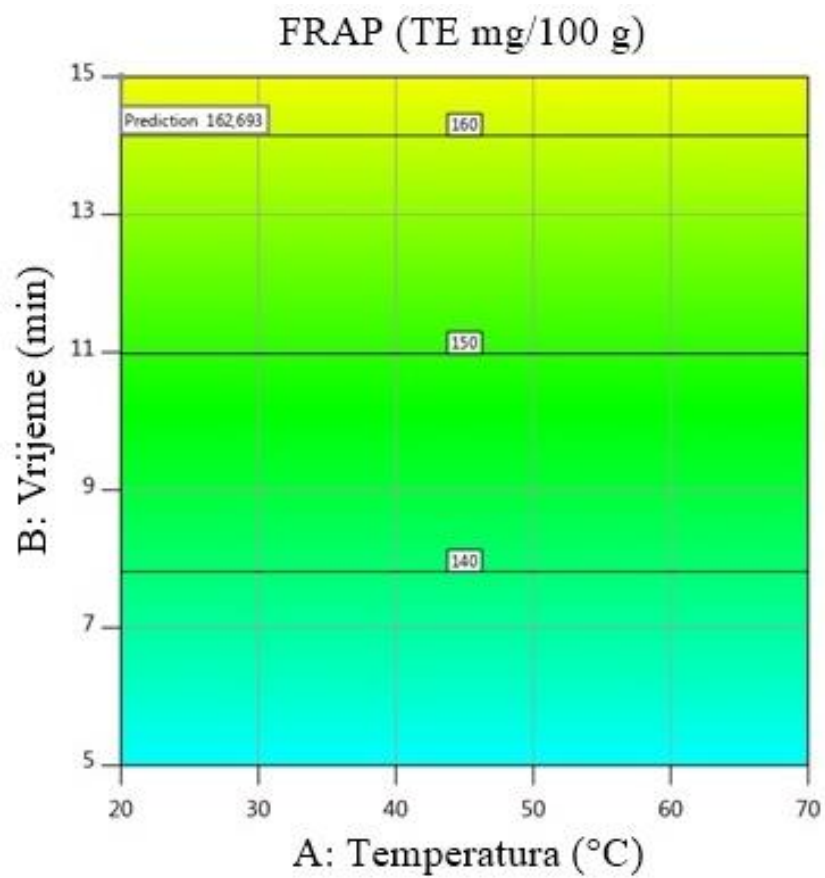
Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima Bi i sur., (2015) koji su pokazali da tretman UVI uzrokuje povećanje aktivnosti PPO u odmašćenom pireu avokada što se pripisuje njenom oslobađanju iz stanice prilikom nastalog oštećenja stanice djelovanjem UVI. Iako povećana aktivnost PPO dovodi do posmeđivanja, a time i nepoželjne promjene boje prilikom procesa prerade biljnih sirovina (Oszmianski i Chang, 1990). Kuninori i sur. (1976) su koristeći PPO ekstrahiranu iz gljiva ekstenzografom potvrdili da PPO ima isti oksidativni učinak kao i kemijski oksidirajući agens kalijev jodat čiji dodatak prilikom miješanja reformira disulfidne veze i povećava snagu tijesta što rezultira proizvodom bolje kvalitete. Time su ukazali na mogućnost korištenja prirodnih ekstrakata bogatih PPO u proizvodnji pekarskih proizvoda u zamjenu za komercijalno dostupne kemijske aditive. Uzimajući u obzir dobivene rezultate proizlazi zaključak da heljdine ljuskice tretirane UVI predstavljaju dobru sirovinu za daljnja istraživanja pozitivnog djelovanja PPO na razvoj tijesta u proizvodnji bezglutenskih pekarskih proizvoda.

4.6. OPTIMALNI UVJETI TRETMANA UVI

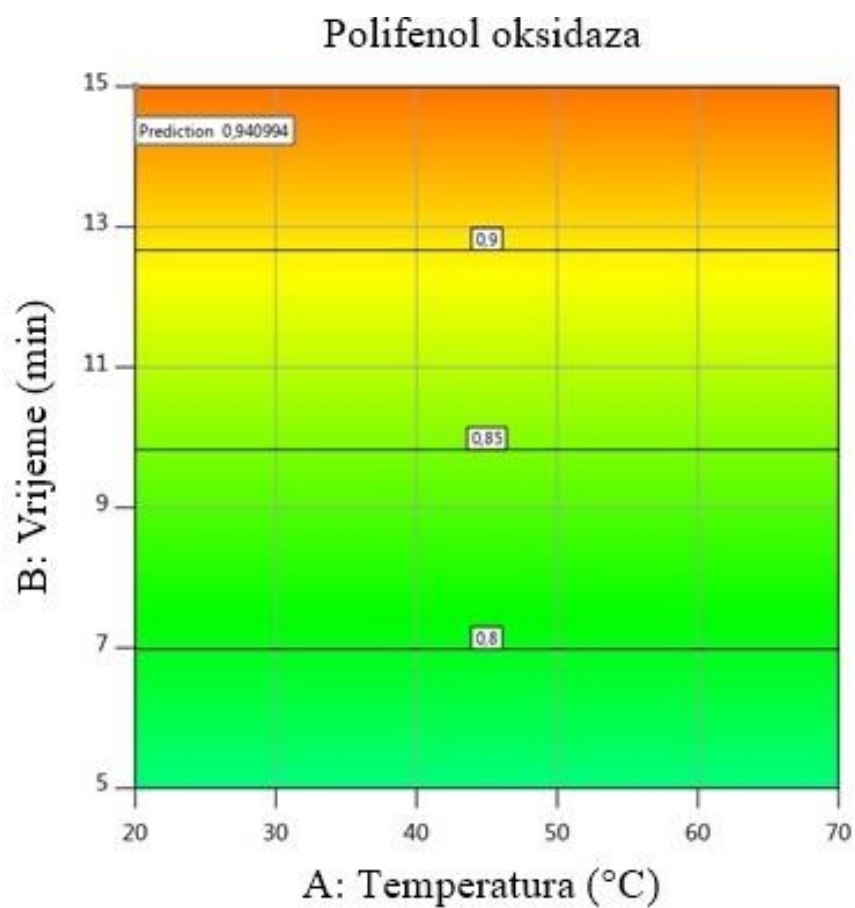
Nakon statističke obrade dobivenih podataka, provedena je optimizacija tretmana UVI u programu Design Expert 10 s ciljem povećanja udjela komponenti s antioksidacijskim djelovanjem. Optimalni uvjeti tretmana UVI prikazani su kao poželjnost (Slika 16). Najbolje rješenje je bilo ono s početnom temperaturom uzorka 20 °C i trajanjem tretmana UVI 15 min pri čemu poželjnost tretmana UVI iznosi 0,76. Kao što se vidi iz prikazanih modela takav tretman rezultirao bi 22 % većom FRAP antioksidacijskoj aktivnosti (Slika 17), 106 % većom aktivnosti polifenol oksidaze (Slika 18) i 4 % većoj koncentraciji rutina u odnosu na kontrolni uzorak.



Slika 16. Optimizacija tretmana UVI prikazana kao poželjnost (vrijednosti rastu od zelene prema žutoj boji).



Slika 17. Predviđanje FRAP antioksidacijske aktivnosti nakon optimizacije tretmana UVI (vrijednosti rastu od plave prema žutoj boji).



Slika 18. Predviđanje aktivnosti PPO nakon optimizacije tretmana UVI (vrijednosti rastu od plave prema narančastoj boji).

5. ZAKLJUČCI

1. Heljdine ljuskice bogat su izvor rutina i polifenolnih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem.
2. Ultrazvuk visokog intenziteta pozitivno djeluje na udio ukupnih fenolnih spojeva i povećava antioksidacijsku aktivnost u heljdinim ljuskicama. Najveći udio ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost zabilježena je kod uzorka početne temperature 80,4 °C s trajanjem tretmana UVI 10 minuta.
3. Za razliku od ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti, tretman UVI, ovisno o kvadratu početne temperature, ima mali učinak na ekstrakciju najvažnijeg flavonoida heljdinih ljuskica – rutina.
4. Visoki koeficijent korelacije utvrđen je između izmjerenih vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH i FRAP metodama, između izmjerenih vrijednosti udjela rutina i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom te između testova za mjerenje antioksidacijske aktivnosti.
5. Ultrazvuk visokog intenziteta povećava sposobnost bubrenja u vodi u odnosu na netretirani uzorak heljdinih ljuskica. Najveća vrijednost postignuta je kod početne temperature uzorka 20 °C i trajanjem tretmana UVI 5 i 15 minuta.
6. Djelovanjem ultrazvuka visokog intenziteta povećava se aktivnost enzima polifenol oksidaze ovisno o trajanju tretmana pri čemu je najveće povećanje zabilježeno pri početnoj temperaturi uzorka 20 °C uz trajanje tretmana UVI 15 minuta.
7. Optimiranim procesom UVI obrade heljdinih ljuskica s početnom temperaturom uzorka 20 °C i trajanjem tretmana UVI 15 minuta povećava se njihova antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom za 22 %, aktivnost polifenol oksidaze za 106 % i koncentracija rutina za 4 % u odnosu na kontrolni uzorak. Tako obrađene heljdine ljuskice mogle bi poslužiti kao vrijedna sirovina za obogaćivanje bezglutenskih pekarskih proizvoda.

6. LITERATURA

AACC International Method 44-19.01 (1999).

AACC International Method 22-85.01 (2000).

Agbor, G. A., Vinson, J. A., Donnelly P. E. (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int. J. Sci. Food Tech.* **8**, 147-156.

Apak, R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K.M., Özyürek M., Güçlü K. (2013) Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **85** (5), 957-998.

Astley, S., Finglas, P. (2016, 31. prosinca) Nutrition and Health, <https://www.researchgate.net/publication/302480713_Nutrition_and_Health>. Pristupljeno: 11. ožujka 2019.

Aufhammer, W. (2000) Pseudo-getreidearten-Buchweizen, Reismelde und Amarant. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *J. Food Eng.* **117**, 426-436.

Bárta, J., Kalinová, J., Moudrý, J., Čurn, V. (2004) Effects of environmental factors on protein content and composition in buckwheat flour. *Cereal Res. Commun.* **32**, 541-548.

Belščak, A., Komes, D., Horžić, D., Ganić, K. K., Karlović, D. (2009) Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Res. Int.* **42** (5-6), 707-716.

Bi, X., Hemar, Y., Balaban, M. O., Liao, X. (2015) The effect of ultrasound on particle size, color, viscosity and polyphenol oxidase activity of diluted avocado puree. *Ultrason. sonochem.* **27**, 567-575.

Biacs, P., Aubrecht, E., Léder, I., Lajos, J. (2002) Buckwheat. U: Pseudocereals and Less Common Cereals, (Belton, P. i Taylor, J., ured.), Springer Verlag, Berlin, str. 123-151.

Bonafaccia, G. Marocchini, M., Kreft, I. (2003) Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chem.* **80**, 9-15.

Braje, M. (2017) Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na slobodne fenolne spojeve i antioksidacijsku aktivnost bučine pogače, heljde i prosa, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25-30.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.

Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S.,

Bosiljkov, T., (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Croat. J. Food Technol. Biotech. Nutr.* **4**, 32 - 37.

Buratović, A. (2017) Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u acetonskim ekstraktima lišća ružmarina (*Rosmarinus officinalis*), Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Chao, P.L., Hsiu, S., Hou, Y. (2002) Flavonoids in herbs: biological fates and potential interactions with xenobiotics. *J. Food Drug Anal.* **10**, 219-228.

Christa, K., Soral-Šmietana, M. (2008) Buckwheat Grains and Buckwheat Products – Nutritional and Prophylactic Value of their Components – a Review. *Czech J. Food Sci.* **26**, 153-162.

Cencic, A., Chingwaru, W. (2010) The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health, *Nutrients* **2**, 611-625.

Čukelj, N., Novotni, D., Čurić, D. (2010) Antioxidant properties of whole grain cereals. *Croat. J. Food Sci. Technol. Biotechnol. Nutr.* **5 (1-2)**, 18-23.

Čukelj, N., Ajredini, Š., Krpan, M., Novotni, D., Voučko, B., Vrana Špoljarić, I., Hruškar, M., Čurić, D. (2015) Bioactives in organic and conventional milled cereal products from Croatian market. *Croat. J. Food Sci. Technol. Biotechnol. Nutr.* **10 (12)**, 23-30.

Dietrich-Szostak, D. , Oleszek, W. (1999) Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain, *J. Agr. Food Chem.* **47 (10)**, 4383-4387.

Dillard, L. M. (2005) Therapeutic compressive cushions having buckwheat hulls therein. U.S. Patent No. 6,891,078.

- Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22-33.
- Duodu, K. G. (2014) Effects of processing on phenolic phytochemicals in cereals and legumes. *Cereal Foods World* **59** (2), 64-70.
- Ebringerová, Z., Stavová, A., Ebringerová, A., Hirsch, J. (2007) Effect of buckwheat hull hemicelluloses addition on the bread-making quality of wheat flour. *J. Food Nutr. Res.* **46** (4), 158-166.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z. (2010) An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides, *Cent. Eur. J. Chem.* **8** (2), 243-257.
- Fabjan, N., Rode, J., Košir, I.J., Zhang, Z., Kreft, I. (2003) Tatar buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercetin. *J. Agr. Food Chem.* **51**, 6452-6455.
- Fardet, A., Rock, E., Rémésy, C. (2008) Is the in vitro antioxidant potential of wholegrain cereals and cereal products well reflected in vivo? *J. Cereal Sci.* **48** (2), 258-276.
- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I. (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* **31** (6), 435-445.
- Gordon, M. H. (1996) Dietary antioxidants in disease prevention. *Nat. Prod. Rep.* **13**, 265-273.
- Griffith, J. Q., Couch, J. F., Lindauer, M. A. (1944) Effect of Rutin on Increased Capillary Fragility in Man. *Exp. Biol. Med.* **55** (3), 228-229.
- Hromadkova, Z., Ebringerová, A. (2003) Ultrasonic extraction of plant materials—investigation of hemicellulose release from buckwheat hulls. *Ultrason. sonochem.* **10** (3), 127-133.
- Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., Chen, Z. G. (2017) Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chem.* **221**, 1400-1405.
- Janbaz, K. H., Saeed, S. A., Gilani, A. H. (2002) Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* **73** (7-8), 557-563.

Jašić, M. (2013, 10. siječnja) Biljni pigmenti, <<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/biljni-pigmenti>>. Pristupljeno: 10. ožujka 2019.

Kawa, J. M., Taylor, C. G., Przybylski, R. (2003). Buckwheat concentrate reduces serum glucose in streptozotocin-diabetic rats. *J. Agr. Food Chem.* **51** (25), 7287-7291.

Kim, S.L., Kim, S.K., Park, C.H. (2004) Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable. *Food Res. Int.* **37**, 319-327.

Koval'skii, I. V., Krasnyuk, I. I., Nikulina, O. I., Belyatskaya, A. V., Kharitonov, Y. Y., Feldman, N. B., Lutsenko, S. V. (2014) Mechanisms of rutin pharmacological action. *Pharm. Chem. J.* **48** (2), 73-76.

Kreft, I., Fabjan, N., Yasumoto, K. (2006) Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chem.* **98**, 508–512.

Krkošková, B., Mrázová, Z. (2005) Prophylactic components of buckwheat. *Food Res. Int.* **38**, 561-568.

Kuijpers, W.A., van Eck, D., Kemmere, M.F., Keurentjes, J.T.F. (2002) Cavitation-induced reactions in high-pressure carbon dioxide, *Science* **298** (5600), 1969-1971.

Kuninori, T., Nishiyama, J., Matsumoto, H. (1976) Effect of mushroom extract on the physical properties of dough. *Cereal Chem.* **53** (42), 428.

Lapornik, B., Prosek, M., Golc, Wondra, A. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* **71**, 214-222.

Lazar, L., Talmaciu, A. I., Volf, I., Popa, V. I. (2016) Kinetic modeling of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Picea abies* bark. *Ultrason. Sonochem.* **32**, 191-197.

Lelas, V. (2006) Nove tehnike procesiranja hrane. *Mljekarstvo* **56**, 311-330.

Li, A. R. (2003) *Fagopyrum*. U: Flora of China, (Zhengyi, W., Raven, P. H., ured.), Missouri Botanical Garden Press, Beijing, Kina, str. 320-323.

Li, L., Harflett, C., Beale, M. H., Ward, J. L. (2009) Phenolic acids. U: HEALTHGRAIN methods: analysis of bioactive components in small grain cereals, (Shewry P.R., Ward J.L., ured.), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, SAD, str. 41-52.

- Li, D., Li, X., Ding, X. (2010). Composition and antioxidative properties of the flavonoid-rich fractions from tartary buckwheat grains. *Food Sci. Biotechnol.* **19** (3), 711-716.
- Li, S., Zhang, Q. H. (2001) Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Crit. Rev. Food Sci.* **41**, 451-464.
- Liu Z., Ishikawa W., Huang X., Tomotake H., Watanabe H., Kato N. (2001) Buckwheat protein product suppresses 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats by reducing cell proliferation. *J. Nutr.* **131**, 1850-1853.
- Luque de Castro, M.D., García-Ayuso L.E. (1998) Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chem. Acta* **369**, 1-10.
- Matheis, G., Whitaker, J. R. (1984) Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *J. Food Biochem.* **8** (3), 137-162.
- Mazza, G., Oomah, B. D. (2005) Buckwheat as a food and feed. *Specialty grains for food and feed*. AACC International, St. Paul, MN, USA, 375-293.
- McClements, D. J. (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends Food Sci. Tech.* **6**, 293-299.
- Naczek, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharmaceut. Biomed.* **41**, 1523-1542.
- do Nascimento, E. M., Mulet, A., Ascheri, J. L. R., de Carvalho, C. W. P., Cárcel, J. A. (2016) Effects of high-intensity ultrasound on drying kinetics and antioxidant properties of passion fruit peel. *J. Food Eng.* **170**, 108-118.
- 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. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3122 - 3128.
- Oomah, B. D., Mazza, G. (1996) Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1746-1750.
- Oszmianski, J., Chang Y. L. (1990) Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *J. Agric. Food Chem.* **38** (10), 1892-1895.

- Peng, L. X., Zou, L., Zhao, J. L., Xiang D. B. , Zhu, P., Zhao, G. (2013) Response surface modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of three flavonoids from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Pharmacogn. Mag.* **9**, 35.
- Pérez-Jiménez, J., S. Arranz, M. Tabernero, M. E. Díaz-Rubio, J. Serrano, I. Goñi i sur. (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int.* **41**, 274–285.
- Plantea (2017, 22. siječnja) Heljda, <<https://www.plantea.com.hr/heljda/>> Pristupljeno: 12. veljače 2019.
- Pomeranz, Y. (1983) Buckwheat: Structure, composition and utilization. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **19**, 213-258.
- Pravilnik o žitaricama i proizvodima od žitarica (2016) *Narodne novine* **81**, Zagreb.
- 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. *J. Ethnopharmacol.* **72 (1-2)**, 35-42.
- Robertson, J. A., de Monredon, F. D., Dysseler, P., Guillon, F., Amado, R., Thibault, J. F. (2000) Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a European collaborative study. *LWT-Food Sci. Technol.* **33 (2)**, 72-79.
- Saturni, I., Ferretti, G., Bacchetti, T. (2010) The gluten-free diet: safety and nutritional quality. *Nutrients*, **2** 16-34.
- Shahidi, F., Yeo, J. D. (2016) Insoluble-bound phenolics in food: a review. *Molecules* **21 (9)**, 1216.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Sci. Dir.* **16**, 144 - 158.
- Skrabanja, V., Kreft, I., Golob, T., Modic, M., Ikeda, S., Ikeda, K., Kreft, S., Bonaffacia, G., Knapp, M., Kosmelj, K. (2004) Nutrient content in buckwheat milling fractions, *Cereal Chem.* **81 (2)**, 172-176.
- Steadman, K. J., Burgoon, M. S., Lewis, B. A., Edwardson, S. E., Obendorf, R. L. (2001) Buckwheat seed milling fractions: description, macronutrient composition and dietary fibre. *J. Cereal Sci.* **33**, 271–278.

- Šućur, J. (2015) Biopesticidna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta familije *Lamiaceae*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Novom Sadu.
- Tomotake, H., Yamamoto, N., Yanaka, N., Ohinata, H., Yamazaki, R., Kayashita, J., Kato, N. (2006) High protein buckwheat flour suppresses hypercholesterolemia in rats and gallstone formation in mice by hypercholesterolemic diet and body fat in rats because of its low protein digestibility. *Nutrition* **22** (2), 166-173.
- Turkalj, B. (2013) Heljda (*Fagopyrum esculentum*) – zaboravljena biljka ili biljka budućnosti, Završni rad, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
- Voučko, B., (2018) Primjena nusproizvoda prehrambene industrije i inovativnih tehnologija u razvoju pekarskih proizvoda za oboljele od celijakije i šećerne bolesti, Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Watanabe, M. (1998) Catechins as antioxidant from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. *J. Agr. Food Chem.* **46**, 839-845.
- Wei, Y., Zhang, G.Q., Li, Z.X. (1995) Study on nutritive and physico-chemical properties of buckwheat flour. *Nahrung* **39**, 48-54.
- Wijngaard, H. H., Arendt, E. K. (2006) Buckwheat. *Cereal Chem.* **83**, 391-401.
- Wojcicki, J., Barcew-Wiszniewska, B., Samochowiec, L., Roze-wicka, L. (1995) Extractum Fagopyri reduces arteriosclerosis in high-fat diet fed rabbits. *Die Pharm.* **50**, 560-562.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. (2002a) Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 1619-1624.
- Yu, L., Perret, J., Davy, B., Wilson, J., Melby, C. L. (2002b) Antioxidant properties of cereal products. *J. Food Sci.* **67** (7), 2600-2603.
- Zielinska, D., Szawara-Nowak, D., Zielinski, H. (2013) Antioxidative and anti-glycation activity of buckwheat hull tea infusion. *Int. J. Food Prop.* **16** (1), 228-239.
- Zhou, K., Yu. L. (2004) Effects of extraction solvent on the wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT Food Sci. Technol.* **37**, 717–721.

Zhu, F., Du, B., Li, R., Li, J. (2014) Effect of micronization technology on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from buckwheat hulls. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **3** (3), 30-34