

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata komine borovnice dobivenih ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlaku

Rukavina, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:578049>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Matea Rukavina

**ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG
KAPACITETA EKSTRAKATA KOMINE
BOROVNICE DOBIVENIH UBRZANOM
EKSTRAKCIJOM OTAPALIMA PRI
POVIŠENOM TLAKU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva te Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Verice Dragović-Uzelac te uz pomoć dr.sc. Erike Dobrosravić.

Ovaj diplomski rad je izrađen u sklopu projekta Održivi pristupi iskorištavanja biopotencijala nusproizvoda bobičastog voća financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ-IP-2022-10-5499), voditeljice prof.dr.sc. Verice Dragović-Uzelac.

Zahvaljujem svojoj dragoj mentorici, prof.dr.sc. Verici Dragović-Uzelac na ukazanoj prilici, povjerenju, susretljivosti i razumijevanju. Također zahvaljujem na prenesenom znanju i kao mentor i kao profesor. Veliko hvala dr.sc. Eriki Dobrosavić na stručnom vodstvu, pomoći pri izradi eksperimentalnog rada, te uloženom trudu i vremenu, kao i dodijeljenim savjetima.

Hvala mojim kolegicama, koje su sa mnom prolazile kroz sve akademske i životne izazove i učinili ih značajno lakšim.

Posebno i najveće hvala mojim roditeljima, sestri i baki, koji su tokom cijelog studija sa mnom dijelili svaki uspon i svaki pad i nisu prestajali vjerovati u mene. Hvala Vam što ste bezuvjetna podrška u svim trenutcima u životu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA EKSTRAKATA KOMINE BOROVNICE
DOBIVENIH UBRZANOM EKSTRAKCIJOM OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU

Matea Rukavina, univ. bacc. nutr. 0058213532

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj parametara ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku uključujući temperaturu (100, 125, 150 °C), vrijeme (5, 10 min) i omjer uzorak:otapalo (1:20, 1:40, 1:60 g/mL), na koncentraciju ukupnih fenola i antocijana te na antioksidacijski kapacitet u komini borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) koja zaostaje kao nusproizvod nakon prerade u prešane sokove, te odrediti optimalne uvjete pri kojima se postižu najviše vrijednosti ispitivanih parametara. Statistička analiza pokazala je kako je temperatura ekstrakcije bila značajan čimbenik, pri čemu su temperature iznad 100°C utjecale na značajno smanjenje koncentracije antocijana i antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom, dok je na antioksidacijski kapacitet određivan ABTS metodom statistički značajan utjecaj imao omjer uzorka i otapala, te je najveći određen pri omjeru uzorka i otapala 1:60. Optimalni uvjeti pri kojima su postignute najveće vrijednosti udjela fenola, antocijana te antioksidacijskog kapaciteta uz najmanji utrošak materijala i energije su: omjer uzorak:otapalo 1:60, optimalna temperatura 100 °C, te vrijeme ekstrakcije 5 min.

Ključne riječi: komina borovnice, fenoli, antocijani, antioksidacijski kapacitet, ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

Rad sadrži: 43 stranice, 9 slika, 7 tablica, 93 literaturna navoda, 0 priloga
Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac
Pomoć pri izradi: dr.sc. Erika Dobrosravić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Sandra Pedišić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Maja Repajić (zamjenski član)

Datum obrane: 24. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF BLUEBERRY POMACE EXTRACTS OBTAINED BY ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION

Matea Rukavina, univ. bacc. nutr. 0058213532

Abstract: The aim of this study was to determine influence of the accelerated solvent extraction parameters, including temperature (100, 125, 150 °C), time (5, 10 min) and sample:solvent ratio (1:20, 1:40, 1:60 g/mL) on the concentration of total phenols and anthocyanins and on the antioxidant capacity in blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) pomace samples that remains as a by-product after processing into pressed juices, and to determine the optimal conditions under which the highest values of the tested parameters are achieved. Statistical analysis showed that the extraction temperature was a significant factor, whereby temperature above 100°C had an effect on a significant decrease in anthocyanin concentration and antioxidant capacity determined by the FRAP method, while in the case of the ABTS method, the sample:solvent ratio was statistically significant, with higher antioxidant activity determined at the sample:solvent ratio 1:60. The optimal conditions under which the highest content of phenols and anthocyanins and antioxidant capacity were achieved with the lowest consumption of materials and energy were: sample:solvent ratio 1:60, temperature 100 °C, and static time 5 min.

Keywords: blueberry pomace, phenols, anthocyanins, antioxidant capacity, accelerated solvent extraction

Thesis contains: 43 pages, 9 figures, 7 tables, 93 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Erika Dobrosravić, PhD

Reviewers:

1. Ivona Elez Garofulić, PhD, Associate professor (president)
2. Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (mentor)
3. Sandra Pedišić, PhD, Associate professor (member)
4. Maja Repajić, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 24th, 2024.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BOROVNICA (<i>Vaccinium myrtillus</i> L).....	2
2.1.1. Morfologija biljke	2
2.1.2. Nutritivna i energetska vrijednost borovnice	3
2.1.3. Komina borovnice	4
2.1.4. Polifenoli u komini borovnice.....	5
2.1.5. Antocijani u komini borovnice.....	5
2.1.6. Zdravstveni benefiti i mogućnost primjene polifenola i antocijana borovnice	7
2.2. TEHNIKE EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH SPOJEVA	9
2.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (ASE)	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Uzorak komine borovnice.....	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Aparatura i pribor	16
3.2. METODE RADA.....	17
3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva	17
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola.....	18
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	20
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	22
3.2.5. Statistička obrada rezultata	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. UTJECAJ TEMPERATURE NA UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTOCIJANA.....	28
4.1.1. Utjecaj temperature na udio ukupnih fenola	28
4.1.2. Utjecaj temperature na udio antocijana	29
4.2. UTJECAJ OMJERA UZORKA I OTAPALA NA UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTOCIJANA	30
4.3. UTJECAJ STATIČKOG VREMENA NA UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTOCIJANA	31
4.4. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ..	32
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA	36

1. UVOD

Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) je listopadni grm čije cvijeće cvijeta u rano proljeće karakterističan za vlažne borealne šume u kojima dominira obična smreka (*Picea abies* (L.) H.Karst.) (Zoratti i sur., 2016). Podrijetlom je iz sjeverne i srednje Europe, a klimatski uspijeva u hladnim do umjerenim i tropskim klimama. Nutritivno je bogata vodom, ugljikohidratima, proteinima, mastima, mikronutrijentima, sterolima, karotenoidima te polifenolima. Od mineralnih tvari, ističe se najvišom koncentracijom kalija, a od vitamina u najvećoj mjeri sadrži vitamin C. Komina borovnice koja zaostaje kao nusproizvod nakon prerade u sokove, sadrži sjemenke, kožicu i ostatak pulpe, predstavlja veliki interes znanstvenika budući da se njezinom obradom smanjuje otpad, te se kao takva može koristiti kao gnojivo ili hrana u poljoprivredi. Zbog sadržaja vrlo visoke koncentracije polifenola, posebice antocijana, ovaj nusproizvod ima značajnu primjenu u području funkcionalne hrane i dodatka prehrani. Antocijani (grč. *anthos* = *cvijet*, *kianos* = *plavo*) najvažniji su pigmenti vaskularnih biljaka, pa tako i borovnice. Imaju jako antioksidacijsko djelovanje, te uz brojne benefite imaju značajnu ulogu u prevenciji neuroloških i kardiovaskularnih bolesti, raka, dijabetesa i pretilosti (Konczak i Zhang, 2004). Kako bi se ovi spojevi učinkovito mogli primijeniti u funkcionalnoj hrani i dodacima prehrani, potrebno ih je ekstrahirati iz biljnog materijala te definirati optimalne uvjete pri kojima se postižu najveći prinosi.

Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (engl. *Accelerated Solvent Extraction, ASE*) jedna je od naprednih tehnika ekstrakcije koja je pronašla široku primjenu u procesima ekstrakcije biološki aktivnih komponenti poput polifenola, uključujući i antocijane. Visokoučinkovita i visokoeconomična je tehnika, jer zahtjeva značajno manje vremena i manju količinu otapala od konvencionalnih metoda koje se primjenjuju s istim ciljem, visoko reproducibilna je, brza i jednostavna za provođenje i interpretaciju rezultata, te se može uz maksimalno iskorištenje koristiti otapalo nižeg vrelišta.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj parametara ASE ekstrakcije uključujući temperaturu (100, 125, 150 °C), vrijeme (5, 10 min) i omjer uzorak:otapalo (1:20, 1:40, 1:60 g/mL), na koncentraciju ukupnih fenola i antocijana te na antioksidacijski kapacitet određen pomoću FRAP i ABTS metode u uzorcima komine borovnice te odrediti optimalne uvjete pri kojima se postižu najviše vrijednosti ispitivanih parametara.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BOROVNICA (*Vaccinium myrtillus* L)

2.1.1. Morfologija biljke

Vaccinium je taksonomski rod koji se sastoji od oko 150 vrsta, a pripada obitelji *Ericaceae* (Padmanabhan i sur., 2016). *Vaccinium* L. je raspostranjen u obliku 400 do 500 vrsta grmova ili malih stabala diljem svijeta (Vander Kloet i Dickinson, 2009; Vander Kloet SP, 1988).

Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) je listopadni grm čije cvijeće cvijeta u rano proljeće karakterističan za vlažne borealne šume u kojima dominira obična smreka (*Picea abies* (L.) H.Karst.) (Zoratti i sur., 2016). Porijeklom je iz srednje i sjeverne Europe, a može se naći i u Sjevernoj Americi i Aziji (Padmanabhan i sur., 2016). Cvjetovi borovnice mogu biti pojedinačni ili u parovima u pupovima. Klimatski uspijevaju u hladnim do umjerenim i tropskim klimama. Na temelju morfoloških razlika izdvojene su dvije podvrste: *V. myrtillus* ssp. *myrtillus* i *V. myrtillus* ssp. *oreophilum* (Zoratti i sur., 2016).

Plodovi su plavičaste boje, okruglog oblika ispunjene crvenkastim sjemenkama; listovi su svjetlozeleni; a cvjetovi blagoroskasti ili zelenkasti (slika 1). Za plavičastu boju plodova zaslužni su antocijani delfinidini.



Slika 1. *Vaccinium myrtillus* L. (Zoratti i sur., 2016)

2.1.2. Nutritivna i energetska vrijednost borovnice

Svježe borovnice sadrže najveći udjel vode (84 %), a potom ugljikohidrata (9,7 %), proteina (0,6 %) i masti (0,4 %) (Michalska i Łysiak, 2015). Niskokalorična su namirnica bogata mikronutrijentima, polifenolima, sterolima i karotenoidima. Energetska vrijednost 100 g svježih borovnica iznosi otprilike 192 kJ (Michalska i Łysiak, 2015).

Sadrže visoku koncentraciju mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina, među kojima dominiraju oleinska (18:1), linolna (18:2) i linolenska (18:3) (Zoratti i sur., 2016). Od mineralnih tvari, detektirana je najveća koncentracija kalija, potom fosfora i magnezija; a od vitamina ističu se visokom koncentracijom vitamina C, pa tako unos 100 g svježih borovnica zadovolji 1/3 preporučenih dnevnih potreba za unosom askorbinske kiseline. Također su značajan izvor dijetalnih vlakana.

Borovnice su bogate i biološki aktivnim komponentama, polifenolima koji imaju dokazano jako antioksidacijsko djelovanje čime djeluju blagotvorno na zdravlje. Izrazito su bogat izvor biljnih pigmenata antocijana odgovornih za ljubičastu boju pokožice i mesa ploda, što objašnjava visoke koncentracije antocijana u usporedbi s mnogim drugim bobicama (Riihinen i sur., 2008).

U tablici 1 je prikazana količina vitamina koja se nalazi u 100 g svježih plodova borovnica, a u tablici 2 količina mineralnih tvari koja se nalazi u 100 g svježih plodova borovnica.

Tablica 1. Vitaminski sastav borovnice na 100 g svježeg ploda (*prema* USDA, 2019)

Vitamin	Masa
Vitamin C	3,7 mg
Vitamin E (α -tokoferol)	0,57 mg
Niacin (B3)	0,418 mg
Pantotenska kiselina (B5)	0,124 mg
Piridoksin (B6)	0,052 mg
Riboflavin (B2)	0,041 mg
Tiamin (B1)	0,037 mg
Vitamin K (filokinon)	19,3 μ g
Folat (B9)	6 μ g
Vitamin A, RAE (engl. retinol acid ekvivalent)	3 μ g
Vitamin A, β -karoten	32 μ g
Vitamin D (D_2+D_3)	0
Kobalamin (B_{12})	0

Tablica 2. Mineralni sastav borovnice na 100 g svježeg ploda (prema USDA, 2019)

Mineralna tvar	Masa
Kalij, K	77 mg
Fosfor, P	12 mg
Magnezij, Mg	6 mg
Kalcij, Ca	6 mg
Natrij, Na	1 mg
Mangan, Mn	0,336 mg
Željezo, Fe	0,28 mg
Cink, Zn	0,16 mg
Bakar, Cu	0,057 mg
Selenij, Se	0,1 µg

2.1.3. Komina borovnice

Zbog svog bogatog kemijskog sastava borovnica predstavlja kvalitetnu voćnu vrstu i pruža velike mogućnosti prerade u prehrambenoj industriji. Voćni sokovi su jedna od najznačajnijih skupina voćnih prerađevina, a komina koja sadrži sjemenke, pokožicu i ostatak pulpe je najzastupljeniji nusproizvod (20-30 %) koji nastaje pri preradi borovnice (Bener i sur., 2013). Posljednjih godina istraživanja komine borovnice u fokusu su brojnih istraživanja, budući da se njezinom obradom smanjuje otpad, te se kao takva može koristiti kao gnojivo ili hrana u poljoprivredi. Sadrži vrlo visoku koncentraciju polifenola što ju dodatno čini interesnim područjem istraživanja, pogotovo u području funkcionalne hrane.

Potencijal u primjeni u području funkcionalne hrane proizlazi iz toga što komina objedinjuje fiziološke učinke dijetalnih vlakana i antioksidansa, u skladu s konceptom "antioksidacijska dijetalna vlakna" (Saura-Calixto, 1998). Tako se danas komina borovnice koristi za proizvodnju pojedinih kekسا i pahuljica za doručak čime se mijenja nutritivan profil ovih proizvoda, ali se i povećava interes potrošača za njihovom konzumacijom. Cheng i sur. (2020) su proveli fermentaciju komine probiotičkom kulturom *Lactobacillus casei* te mjerili antioksidacijsku aktivnost, regulaciju fekalne mikrobiote i proizvodnju masnih kiselina kratkog lanca. Rezultati su pokazali povećanje antioksidacijske aktivnosti zajedno sa povećanjem polifenolnih spojeva u uzorku komine.

Zanimljivo istraživanje Boue i sur. (2019) je pokazalo da obogaćivanje pšeničnih mekinja kominom borovnice smanjuje sadržaj arsena u mekinjama. U uzorcima korištenim u istraživanju, početna koncentracija arsena iznosila je 0,847 ppm, a nakon obogaćivanja kominom borovnice koncentracija se smanjila na 0,445 ppm.

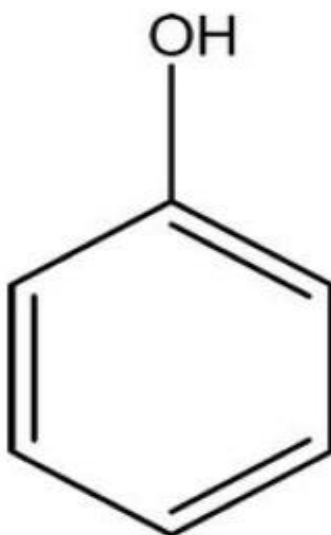
2.1.4. Polifenoli u komini borovnice

Polifenoli zaostali u komini koja je nusproizvod u proizvodnji soka borovnice su antioksidansi koji imaju blagotvorno djelovanje na čovjekov organizam zbog čega su privukli veliki interes znanstvenika u prehrambenom području.

Polifenoli i antocijani se u najvećoj koncentraciji nalaze u pokožici borovnice, ali su prisutni i u sjemenci i u mesu ploda. Što je njihova koncentracija veća, to je i jači antioksidacijski potencijal biljke (Lee i Wrolstad, 2004) što borovnicu svrstava u kategoriju „super hrane“ zbog širokog spektra blagotvornog djelovanja na čovjekov organizam.

Polifenoli su organske molekule koje se sastoje od međusobno povezanih aromatskih prstenova na koje su vezane hidroksilne grupe. Osnova strukture je fenolna jedinica (slika 2) (Said i sur., 2021), ali većina polifenola u biljkama se nalazi u obliku glikozida građenih od različitih jedinica šećera i aciliranih šećera koji se povezuju na različitim mjestima polifenolnog kostura (Tsao, 2010). Prema klasifikaciji polifenoli se dijele na flavonoide (antocijanidini, flavonoli, flavoni, flavan-3-oli, izoflavoni, flavanoni, dihidrohalkoni) i neflavonoide (fenolne kiseline, stilbeni, lignani). U kontekstu ovog rada najvažniji su flavonoidi antocijani. Sadržaj fenolnih struktura varira ovisno o sorti, klimi i tlu na kojem rastu, vremenu berbe, uvjetima skladištenja i slično (Yang i sur., 2022).

Prema Szajdek i Borowska (2008) sadržaj fenola u *Vaccinium myrtillus* iznosi 525 mg/100 g svježih bobica.



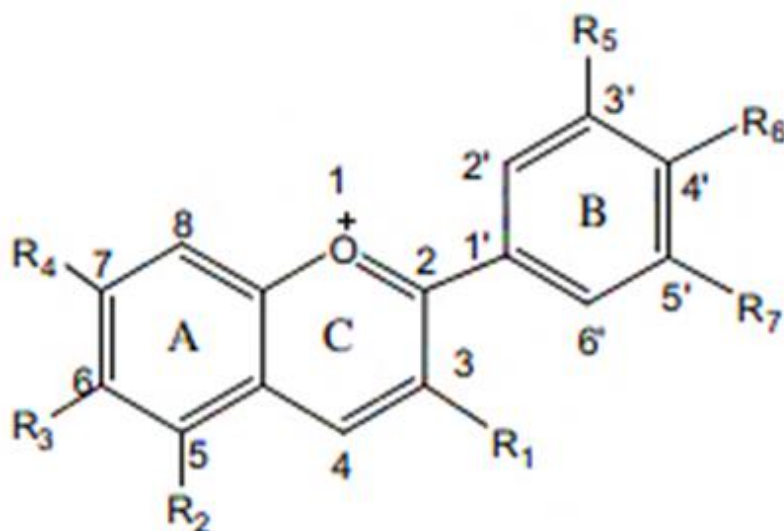
Slika 2. Struktura fenola (Said i sur., 2021)

2.1.5. Antocijani u komini borovnice

Borovnice kao najveći izvor antocijana u odnosu na ostalo bobičasto voće, sadrže antocijane u rasponu od 300 do 700 mg/100 g suhe tvari (Padmanabhan i sur., 2016).

Antocijani se sastoje od antocijanidina (aglikona) i šećernog dijela. Antocijanidini (ili

aglikoni) se sastoje od aromatskog prstena [A] vezanog na heterociklički prsten [C] koji sadrži kisik, koji je također vezan ugljik-ugljik vezom na treći aromatski prsten [B] (Konczak i Zhang, 2004) (slika 3) (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Ovisno o broju hidroksilnih i metoksilnih grupa vezanih na B-prsten, u većini voća, pa i u borovnicama prevladavaju strukture šest vrsta antocijanidina, a to su delfinidin, cijanidin, petunidin, malvidin, pelargonidin, i peonidin (Kong i sur, 2003) (tablica 3) (Villaño i sur., 2016).



Slika 3. Osnovna struktura antocijanidina (Castañeda-Ovando i sur., 2009)

Promatrajući različite kultivare borovnice, uočava se da su vrste antocijana unutar različitih kultivara identične, ali se njihov udio razlikuje. Istraživanjem 17 različitih kultivara borovnice uzgajanih u Kini utvrdilo se da više od 90 % sadržaja antocijana čine glikozidi delfinidina, malvidina i petunidina (Yang i sur., 2022) dok su Zhang i sur. (2022) provođenjem ekstrakcije potpomognute ultrazvukom utvrdili da je u komini borovnice prisutno ukupno 13 vrsta antocijana, među kojima se u najvećoj koncentraciji nalazi malvidin-3-galaktozid. Delfinidin i cijanidin glikozidi po svojoj kemijskoj strukturi spadaju u polarnije spojeve, a malvidin i peonidin glikozidi su manje polarni.

Tablica 3. Podjela antocijana na šest vrsta ovisno o broju hidroksilnih i metoksilnih grupa (prema *Villaño i sur.*, 2016)

ANTOCIJANIDIN	R1	R2
Pelargonidin	H	H
Cijanidin	OH	H
Peonidin	OCH ₃	H
Delfinidin	OH	OH
Petunidin	OCH ₃	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

2.1.6. Zdravstveni benefiti i mogućnost primjene polifenola i antocijana borovnice

Antocijani sačinjavaju do 60 % ukupnih fenolnih spojeva u zrelih borovnicama (Kalt i sur., 2003). Zahvaljujući njihovoj visokoj koncentraciji prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization, FAO*) borovnice su certificirane kao jedne od pet namirnica sa zdravstvenim benefitima, te su stoga vrijedna sirovina za proizvodnju funkcionalnih proizvoda (Zhang, 2021). Tome ide u prilog i činjenica da u kemijskom sastavu borovnice nije pronađen niti jedan alergen. Antocijani se mogu također koristiti kao prirodna bojila obzirom da su po svojoj kemijskoj strukturi biljni pigmenti topljivi u vodi koji pokazuju širok raspon boja (Castañeda-Ovando i sur., 2014). Međutim, takva funkcija je ograničena zbog njihove kemijske strukture i degradativnih promjena koje nastaju tijekom prerade i skladištenja. Poznate su još mnogobrojne funkcije antocijana u zaštiti zdravlja, zbog čega se sve više koriste za proizvodnju brojnih dodataka prehrani. Prirodni su antioksidansi, stoga sprječavaju oksidaciju slobodnih radikala. Njihovo izrazito antioksidacijsko djelovanje, čime se ističu u odnosu na ostale polifenolne strukture, proizlazi iz njihove kemijske strukture zahvaljujući kojoj, u ovisnosti o pH medija u kojem se nalaze, delokaliziraju elektrone, te na taj način postižu više rezonancijskih struktura zahvaljujući pozitivno nabijenom atomu kisika. Neka od istaknutih djelovanja ovih spojeva su kardioprotektivno i neuroprotektivno, poboljšavanje vida, smanjenje rizika od razvoja pretilosti i šećerne bolesti tipa 2. Također, dokazano je njihovo protuupalno, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje.

Istraživanje antioksidacijskog kapaciteta je ispitivano *in vitro* i *in vivo* metodama. *In vitro* studija je pokazala da antocijani borovnice povećavaju razinu aktivnosti enzimatskih antioksidanasa superoksid dismutaze (engl. *superoxide dismutase, SOD*) i katalaze (engl. *catalase, CAT*), a smanjuju koncentraciju malondialdehida (engl. *malondialdehyde, MDA*),

toksičnog produkta lipidne peroksidacije koji je jedan od najčešće korištenih markera u procjeni oksidativnog stresa. Također, studija provedena na ljudskim endotelnim stanicama pokazala je da malvidin, malvidin-3-galaktozid i malvidin-3-glukozid iz borovnice smanjuju razinu reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species, ROS*) i ksantin oksidaze 1 (engl. *xanthine oxidase, XO-1*), a povećavaju razine SOD i hem oksigenaze 1 (engl. *heme oxygenase 1, HO-1*) (Du i sur., 2016; Huang i sur., 2016). Yang i sur. (2022) su u *in vivo* studiji hranili miševe ekstraktom borovnice (250 mg/kg/dnevno) tijekom 14 dana, a miševi su prethodno bili izloženi akrilamidu koji je uzrokovao oksidacijski stres. Rezultati su pokazali smanjenje ROS-a i citokrom P450 2E1 enzima, te povećanje razine glutaciona i njemu sličnih enzima (glutacion peroksidaza, glutacion-S-transferaza, glutacion sintetaza) (Yang i sur., 2022).

Antioksidacijski mehanizam djelovanja može biti povezan s kardioprotektivnim djelovanjem antocijana. Određene studije su pokazale da unos određene količine antocijana rezultira smanjenjem LDL kolesterola, triglicerida i upalnih markera, a povećanjem HDL kolesterola, kao i povećanjem endotelne funkcije. Također, neflavonoidni kataboliti antocijanina bobičastog voća koji prevladavaju u debelom crijevu bi mogli stupiti u interakciju s mikrobiotom te izazvati protuupalne ili druge odgovore koji idu u prilog kardioprotektivnim djelovanjima (Cassidy i Minihane, 2017). Posljednjih desetljeća je proveden velik broj studija koje proučavaju neuroprotektivno djelovanje antocijana prilikom čega je pokazano njihovo pozitivno djelovanje kod kognitivnih poremećaja. Boespflug i sur. (2018) su istraživali učinak suplementacije praha liofiliziranog ploda borovnice tijekom 16 tjedana na regionalnu aktivaciju mozga kod starijih osoba s rizikom od demencije te utvrdili korisne učinke na funkciju mozga i kognitivno ponašanje.

Djelovanje antocijana na poboljšanje vida proizlazi iz njihove sposobnosti smanjenja vjerojatnosti pojavnosti glaukoma, očne mrežne, makularne degeneracije i retinopatije, te poboljšanje cirkulacije unutar kapilara retine. Poznato je da je borovnica bogata vitaminom A, stoga neke od ovih nabrojanih funkcija proizlaze iz samog djelovanja tog vitamina. Tsuda i sur. (2006) su istraživali genske ekspresije u ljudskim adipocitnim stanicama tretiranim antocijaninima i pokazalo se da antocijanini mogu regulirati ekspresiju gena adipocitokina za pozitivnu modulaciju funkcije adipocita kako bi se kontrolirala pretilost i dijabetes. Promatrajući antikancerogeno djelovanje, proantocijanidini i drugi flavonoidi iz brusnica i borovnica pokazuju potencijal u ograničavanju procesa uključenih u invaziju i metastaze tumora, kao što je blokiranje ekspresije matriksnih metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinase, MMP*), koji su uključeni u remodeliranje izvanstaničnog matriksa (Neto, 2007). Antiinflamatorno djelovanje antocijana borovnice proizlazi iz njegovog utjecaja na regulaciju NF- κ B puta čime se smanjuje ekspresija gena koji sudjeluju u nastanku upale. Tako su Karlsen i sur. (2007) u grupi od 120 ispitanika (muškarci i žene između 40 i 75

godina) 3 tjedna provodili suplementaciju ekstraktima borovnice što je rezultiralo smanjenjem proupalnih citokina i kimokina (IL-4, IL-13, IL-8, IFN- α) NF- κ B staničnog puta.

Kao što je spomenuto na samom početku poglavlja, navedena svojstva čine borovnicu poželjnom sirovinom za razvoj funkcionalne hrane, što dokazuju i neka istraživanja. Tako su Perez i sur. (2017) u procesu proizvodnje suhih keksa pšenično brašno zamijenili kominom borovnice prilikom čega se povećao sadržaj vlakana (najmanje 6 g dijetalnih vlakana na 100 g proizvoda) što je kekse svrstalo u kategoriju proizvoda "s visokim udjelom vlakana". Uspoređujući antioksidacijski potencijal mjeren ABTS metodom, kontrolni uzorak tj. keks s pšeničnim brašnom je imao niži antioksidacijski potencijal od novo-dizajniranog keksa s kominom borovnice. Irigoytia i sur. (2022) su na temelju različitih metoda sušenja kreirali nove prahove na bazi borovnica koji su koji su sadržavali veću koncentraciju vlakana te pokazali dobro zadržavanje i biodostupnost antioksidativnih spojeva. Dobiveni prahovi su tijekom procesa proizvodnje dodani u muffine prilikom čega je porasla nutritivna vrijednost i senzorska kvaliteta muffina. Hurtado-Romero i sur. (2023) su kominu i sirup borovnice implementirali u Petit Suisse sir koji sadrži probiotike i inulin. Jednako kao i u prethodnim studijama, dodatak navedenih sastojaka povećao je sadržaj vlakana, bioaktivnih komponenti i antioksidacijskog kapaciteta. Međutim, nakon određenog vremenskog perioda čuvanja sira, sadržaj bioaktivnih komponenti i antioksidacijski kapacitet počeo se smanjivati. Nešto veća koncentracija bioaktivnih komponenti i veći antioksidacijski kapacitet uočen je u proizvodima s kominom borovnice u usporedbi s proizvodima sa sirupom borovnice. Danas na tržištu postoje brojni dodaci prehrani na bazi borovnice. Primjeri toga su kapsule koje uz ostale sastojke sadržavaju i ekstrakt borovnice, listovi borovnice koji se pripremaju u obliku čaja, sokovi od plodova borovnice, praškovi za napitak, kapi koje sadrže liofiliziran ekstrakt lista.

Dobro poznavanje kemijskih i nutritivnih komponenti u borovnici, te odabir metode koja je adekvatna za njihovu izolaciju je ključno za dizajn visoko kvalitetnih proizvoda na bazi borovnice koji pokazuju primjenu u različitim tehnološkim područjima.

2.2. TEHNIKE EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH SPOJEVA

Postoji velik broj tehnika ekstrakcije i izolacije polifenolnih spojeva iz prirodnih supstrata, s krajnjim ciljem primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Izolacija polifenolnih struktura iz staničnih struktura ovisi o primijenjenoj tehnici ekstrakcije i parametrima kao što su otapalo, temperatura, vrijeme ekstrakcije, tlak, snaga, itd. Osnovni cilj ekstrakcije je dobivanje što većih prinosa uz zadržavanje, tj. sprječavanje razgradnje fenolnih spojeva.

Ekstrakcija prirodnih spojeva se provodi kroz sljedeće faze (Zhang i sur., 2018):

1. Otapalo prodire u matricu
2. Otopljena tvar se otapa u otapalu
3. Otopljena tvar difundira iz čvrste matrice
4. Ekstrahirane otopljene tvari se skupljaju

Osnovna podjela ekstrakcijskih tehnika je na konvencionalne i napredne tehnike.

Konvencionalne tehnike ekstrakcije polifenolnih spojeva karakterizira relativno dugo trajanje procesa, te upotreba velike količine otapala. Obično kao otapalo koriste metanol, etanol i aceton te njihove vodene otopine, a sam odabir otapala ovisi o polarnosti fenolnih grupa i interakcijama koje se stvaruju između uzorka i otapala. Najčešće korištena konvencionalna tehnika za ekstrakciju fenolnih spojeva je konvencionalna ekstrakcija otapalom za koju su bitni sljedeći radni parametri: vrsta i koncentracija organskih otapala, temperatura, vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije (M'hiri i sur., 2014). Neke od često korištenih konvencionalnih tehnika su maceracija, perkolacija i ekstrakcija uz refluks (Zhang i sur., 2018). Otapalo je jedan od najvažnijih parametara; uspješnost i odabir ekstrakcije diktira njegova polarnost, tj. stvaranje kemijskih veza između otapala i otopljene tvari. Također, na efikasnost ekstrakcije uvelike utječe i omjer otapala i uzorka. Optimalan odabir omjera otapala i uzorka je ključan jer prevelik omjer znači i utrošak veće količine otapala, što samim time zahtjeva i veći utrošak vremena iako veći omjer može značiti i veće prinose.

Novije, naprednije tehnike ekstrakcije bioaktivnih spojeva su razvijene kako bi se skratilo vrijeme ekstrakcije, povećao prinos i selektivnost ekstrakcije, koristilo manje energije i manje otapala, te spriječila razgradnja fenolnih spojeva (M'hiri i sur., 2014). Takve tehnike su: ubrzana ekstrakcija otapalima (engl. *accelerated solvent extraction*, ASE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *microwave-assisted extraction*, MAE), ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (engl. *high pressure assisted extraction*, HPAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *ultrasound assisted extraction*, UAE), ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem (engl. *high voltage electrical discharge*, HVED) i ekstrakcija superkričnim fluidima (engl. *supercritical fluid extraction*, SFE) (Bursać Kovačević i sur., 2016; Putnik i sur., 2016; Nayak i sur., 2015).

Ekstrakcijske tehnike koriste kemijski kompleksne uzorke koji međusobno stupaju u razne interakcije, stoga ih je potrebno prethodno pročititi, tj. razdvojiti ciljani uzorak od ostalih uzoraka smjese. Separacija aktivnih frakcija ovisi o fizikalnim i kemijskim karakteristikama komponenata uzorka, a kao najčešća metoda u tu svrhu se koristi kromatografija (Zhang i sur., 2018).

2.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (ASE)

Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (engl. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE) je tehnika koja je pronašla široku primjenu u procesima ekstrakcije biološki

aktivnih komponenti poput polifenola, uključujući i antocijane, nakon čega se oni mogu identificirati i kvantificirati specifičnim metodama, poput tekućinske kromatografije s masenom spektrofotometrijom.

Karakteristika ASE ekstrakcije je što povišeni tlak omogućuje primjenu otapala na temperaturama znatno višim od njihovog vrelišta pri atmosferskom tlaku. Ekstrakcija obično traje 15–25 min, uz utrošak 15–45 mL otapala, pri tlaku od 3,5 do 20 MPa (Mottaleb i Sarker, 2012). ASE tehnika se smatra visokoučinkovitom i visokoekonomičnom tehnikom, jer zahtjeva značajno manje vremena i manju količinu otapala od postojećih tehnika koje se primjenjuju s istim ciljem. Prilikom ASE ekstrakcije, zbog povišenog tlaka, otapalo puno lakše i brže prodire u strukturu biljnog materijala. Neke od očiglednih prednosti ASE uključuju mogućnost ekstrakcije za uzorak veličine 1-100 g u vrlo kratkom vremenu; značajnu redukciju volumena otapala, čak i do 90 %; širok raspon primjene; i mogućnost analize i kiselih i alkalnih materijala (Mottaleb i Sarker, 2012).

Još jedna prednost je širok spektar veličine ćelija koje koristi ASE sustav koje se kreću u vrijednostima 1, 5, 10, 22, 34, 66 i 100 mL. Također, kao što je već navedeno, tehnika koristi otapala različitog polariteta, a odabir zavisi o vrsti analita koji se ekstrahira (Mottaleb i Sarker, 2012). Vrlo često, ako su odabir analita i otapala adekvatni povećava se selektivnost procesa jer se ekstrahiraju željeni spojevi, a neželjeni spojevi zaostaju u ćeliji. Prednosti i nedostaci ASE sumirane su u tablici 4 (Giergielewicz-Možajska i sur., 2010).

Tablica 4. Prednosti i nedostaci ASE metode (prema Giergielewicz-Možajska i sur.,2010)

PREDNOSTI	NEDOSTATCI
1. Brzo vrijeme ekstrakcije (obično oko 15 minuta)	1. Visoka cijena aparature
2. Jednostavno korištenje	2. Slabo selektivna metoda
3. Priprema uzoraka je brza i jednostavna	3. Zahtjeva pročišćavanje ekstrakta prije daljne analize
4. Ekstrakcija labilnih analita zahvaljujući visokom tlaku	4. Otežano održavanje aparature
5. Korištenje malog volumena otapala (oko 15-25 mL)	
6. Moguće je koristiti čista otapala ili mješavinu otapala	
7. Moguće je koristiti širok raspon otapala, osim jakih kiselina ili jakih baza, ili otapala sa temperaturom samozapaljenja od 40 do 200 °C	
8. Potpuno automatizirana metoda koja omogućuje visoku reproducibilnost parametara kao što su temperatura, tlak, statičko vrijeme, volumen	
9. Moguća ekstrakcija 24 uzorka u jednom ciklusu	

Što se tiče samog postupka provođenja procesa, prilikom punjenja ćelija propisanim masama uzorka, uzorci se miješaju s dijatomejskom zemljom koja ima sposobnost vezanja vlage na sebe čime se sprječava agregacija čestica i okluzija ćelije, te time povećava efikasnost ekstrakcije.

Osnovni cilj ASE je izdvojiti ciljane čestice iz matriksa na način da one stupe u interakciju s otapalom, tj. da se efikasno otope u korištenom otapalu. Ključni parametri koji utječu na sposobnost otapanja čestica uzorka u otapalu su temperatura, tlak, broj ciklusa, te statičko vrijeme.

Povišena temperatura povećava stupanj difuzije; oslabljuje Wan der Waalsove sile, vodikove veze i dipolna privlačenja između otopine i matrice; te smanjuje viskoznost otapala što pridonosi poboljšanju ekstrakcije (Richter i sur., 1996). Prethodno, povišeni tlak omogućava zagrijavanje otapala na temperaturama koje su više od njihove točke vrelišta. Iako se ASE metoda izvodi u temperaturnom rasponu od 75 do 125 °C, najčešća temperatura koja se primjenjuje je 100 °C (Mottaleb i Sarker, 2012).

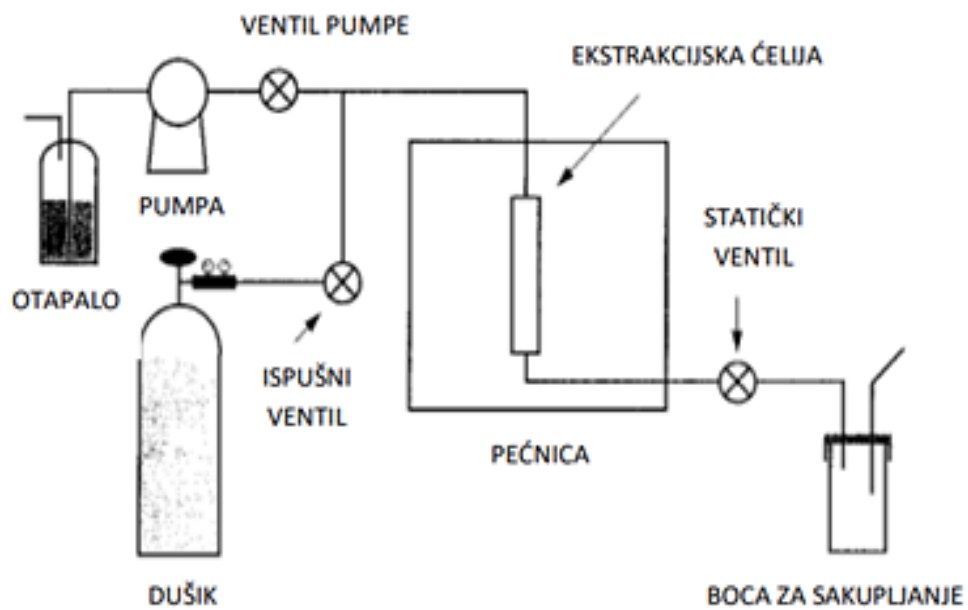
Utjecaj povišenog tlaka je prethodno objašnjen i usko je povezan s utjecajem povišene temperature. Dakle, povišeni tlak omogućava zagrijavanje otapala na temperaturama koje su više od njihove točke vrelišta pri atmosferskom tlaku, što ubrzava cjelokupan proces ekstrakcije zbog samog bržeg protoka tekućine. Vrijednosti tlaka pri kojima se može izvoditi ekstrakcija u ASE se kreće između 6,8948 i 13,7895 MPa, međutim većina primjena obavlja se na 10,3421 MPa (Mottaleb i Sarker, 2012).

Svrha statičkog ciklusa je uvođenje svježeg otapala tijekom postupka ekstrakcije koji pomaže u održavanju povoljne ravnoteže ekstrakcije što je vrlo korisno za uzorke s visokom koncentracijom analita ili za uzorke u kojima je teško prodrijeti do ciljanih spojeva (Mottaleb i Sarker, 2012). Naposljetku, povišenje statičkog vremena praćeno povišenjem temperature omogućava otapanje analita u otapalu budući da vrlo često matriks može imati pore unutar kojih može doći do zaostajanja analita, a smatra se da je maksimalno vrijeme ekstrakcije ovog tipa 20 minuta (Mottaleb i Sarker, 2012). Nakon što je postignuta ravnoteža otopljene tvari izvan i unutar čvrstog materijala, povećanje vremena neće utjecati na ekstrakciju (Zhang i sur., 2018).

Za potrebe ovog rada kao uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku korišten je Dionex ASE 350 (slika 4) čiji je shematski prikaz na slici 5. Osnovni dijelovi su: boca sa otapalom, pumpa sa ventilom, pećnica sa ekstrakcijskom ćelijom, boca sa dušikom, te boce za sakupljanje ekstrakta.



Slika 4. Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku (Dionex ASE 350)(Yang i sur., 2014)



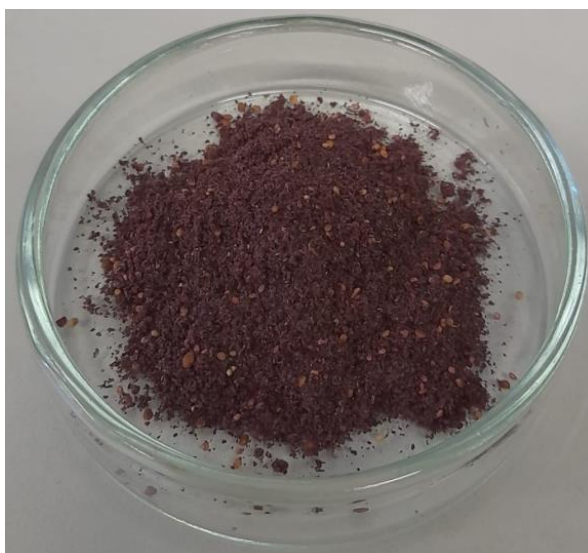
Slika 5. Shematski prikaz ASE uređaja (prema Richter i sur., 1996)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak komine borovnice

U ovom istraživanju korišten je uzorak komine borovnice klase 1 *Vaccinium myrtillus* L. (serija L-52-02, naziv proizvođača: Camposol) zaostao nakon proizvodnje soka borovnice. Komina je zamrznuta na – 80 °C te zatim liofilizirana tijekom 24 h na temperaturi -55 °C u liofilizatoru dok nije postignut sadržaj vlage niži od 3 %, određen analizatorom vlage. Liofilizirani uzorak je samljeven (slika 6), zapakiran u staklenu ambalažu i skladišten na sobnoj temperaturi do provođenja ekstrakcije.



Slika 6. Uzorak komine borovnice (*vlastita fotografija*)

3.1.2. Kemikalije

Kemikalije za ekstrakciju fenolnih spojeva

- Ekstrakcijsko otapalo: 50 % vodena otopina etanola s 1 % mravlje kiseline

Reagensi za određivanje ukupnih fenola

- Destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata, 20 %-tna otopina

Priprema: 200 g anhidrida natrijevog karbonata (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska) se dodaje u 800 mL vruće destilirane vode, te se pričekava da se natrijev karbonat otopi. Nakon toga se ostavi da se ohladi na sobnu temperaturu. Potom se u takvu ohlađenu smjesu doda nekoliko kristalica natrijeva karbonata. Nadopuni se u odmjernoj tikvici volumena 1000 mL. Nakon 24

sata dobivena otopina se filtrira.

Reagensi za određivanje antocijana

- Kalijev kloridni pufer pH 1,0 (kalij klorid 0,025 M)
Priprema: Na analitičkoj vagi se izvaže 1,86 g kalijeva klorida (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Izvagana masa se kvantitativno prenese u staklenu čašu od 1 L kako bi se kalijev klorid otopio u destiliranoj vodi. Doda se destilirana voda do punog volumena čaše što je 1 L. Potom se izmjeri pH vrijednost tako pripremljenoj otopini. pH vrijednost bi trebala iznositi 1,0 ($\pm 0,05$) što se korigira dodatkom klorovodične kiseline (HCl-a) (37 %-tni HCl). Nakon što je pH vrijednost podešena na 1,0 otopina se prelije u bocu.
- Natrijev acetatni pufer 4,5 (natrijev acetat; 0,4 M)
Priprema: U staklenoj čaši volumena 100 mL izvaže se 54,43 g natrijeva acetata trihidrata ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Dobivena masa se kvantitativno prenese u staklenu čašu od 1 L, zatim se u čašu doda 960 mL deionizirane vode, te se odvagana masa otopi. Potom slijedi mjerenje pH vrijednosti otopine koja mora iznositi 4,5 ($\pm 0,05$). Navedena pH vrijednost se postiže dodatkom HCl-a (37 %-tni HCl). Kada je postignuta ciljana pH vrijednost, otopina se prebaci u odmjernu tikvicu od 1 L, koja se nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

Reagensi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna HCl (Carlo Erba, Cornaredo, Italija)
- Klorovodična kiselina, 40 Mm
Priprema: U odmjernu tikvicu od 100 mL se otpipetira 330 μL 37 %-tne klorovodične kiseline, te se nadopuni deioniziranom vodom do oznake.
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD)
Priprema: Na analitičkoj vagi u lađici se odvaže 0,0312 g TPTZ-a. Kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica se nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.
- Željezo (III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska), 20 mM otopina
Priprema: Na analitičkoj vagi u lađici se odvaže 0,541 g $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Dobivena masa se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL. Tikvica se nadopuni do volumena deioniziranom vodom.
- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna (Carlo Erba, Cornaredo, Italija)
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6
Priprema: 3,1 g natrij-acetat trihidrata se izvaže na analitičkoj vagi. Nakon toga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 1 L pomoću destilirane vode. U tu istu tikvicu se nakon toga otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se

destiliranom vodom do oznake volumena.

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL se pomiješaju 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III) klorida u omjeru 10:1:1.

Reagensi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

- 140 mM otopina kalijeva persulfata, $K_2S_2O_8$

Priprema: Izvagati 0,1892 g $K_2S_2O_8$ (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska) u tikvicu od 5 mL. Pustiti da se otopi u destiliranoj vodi.

- 7 mM ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) otopina

Priprema: Masa ABTS (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD) od 0,0192 g se otopi u tikvici volumena 5 mL te se taj volumen tikvice nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Stabilna ABTS •+ otopina

Priprema: U pripremljenu ABTS otopinu koja se nalazi u tikvici volumena 5 mL se prenese 88 μ L $K_2S_2O_8$. Dobivena otopina se promiješa, čvrsto zatvori i čuva na tamnom mjestu 12-16 sati na sobnoj temperaturi. Konačna koncentracija $K_2S_2O_8$ iznosi 2,45 mmol/L.

- 1 %-tna otopina ABTS •+, priprema se na dan provođenja

Priprema: 1000 μ L ABTS •+ otopine prenese se uz pomoć pipete su odmjernu tikvicu od 100 mL. Tikvica se nadopuni etanolom do oznake. U ovisnosti o apsorbanciji se podešava koncentracija ABTS •+. Apsorbancija pri 734 nm mora iznositi $0,70 \pm 0,02$. Tako dobivena otopina služi kao uzorak za spektrofotometrijsko određivanje.

3.1.3. Aparatura i pribor

- Liofilizator (Alpha 1–4 LSCPlus, Osterode am Harz, Germany)
- Analizator vlage OHAUS - MB23 (Ohaus, New Jersey, SAD)
- ASE ekstraktor, Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
- Celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Dijatomejska zemlja
- Staklene bočice za prihvat ekstrakata sa septa-čepovima (Thermo Scientific, 250 mL)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, SAD)
- Spektrofotometar, UV – 1600PC (VWR International, SAD)
- Plastične lađice za vaganje
- Metalna žličica
- Aluminijska folija

- Odmjerne tikvice (1 L, 100 mL, 50 mL, 10 mL, 5 mL)
- Automatske mikropipete (5000 μ L, 1000 μ L, 100 μ L)
- Stakleni lijevci
- Filter papir
- Kivete
- Staklene čaše (1 L, 100 mL)
- Staklene epruvete
- Staklene menzure (1 L)
- Falkonice volumena 50 mL

3.2. METODE RADA

3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzorka komine borovnice provedena je primjenom ASE prema zadanom planu eksperimenta (tablica 5) uz fiksne parametre: tlak 10,34 MPa, 30 s ispuhivanje dušikom i 50 % volumen ispiranja. Odvagane mase komine borovnice pomiješaju se s dijatomejskom zemljom, kvantitativno pomoću lijevka sa širokim grlom prenesu u ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika, propisno se postave celulozni filtri te se zatvorene ćelije pozicioniraju u uređaju na za to predviđeno mjesto. Ekstrakcijsko otapalo postavljeno u uređaj se povlači iz spremnika za otapalo. Prolazi kroz ćelije koje sadržavaju uzorke, te zajedno s uzorcima komine iz ekstrakcijskih ćelija stvara ekstrakte kojih sakupljaju staklene bočice za prihvata ekstrakata sa septa-čepovima. Nastali ekstrakti se uz pomoć filter papira i lijevka profiltriraju u odmjernu tikvicu volumena 50 mL. Tikvica se do oznake nadopuni ekstrakcijskim otapalom. Dobiveni ekstrakti služe za daljne analize određivanja ukupnih fenola, antocijana te za određivanje antioksidacijskog kapaciteta.

Omjer biljnog otapala i odvage su slijedeći:

- 20 mL/g otapala=2,5 g uzorka komine
- 40 mL/g otapala=1,25 g uzorka komine
- 60 mL/g otapala=0,83 g uzorka komine

Tablica 5 . Plan eksperimenta ASE

UZORAK	TEMPERATURA (°C)	STATIČKO VRIJEME (min)	OMJER OTAPALO/UZORAK (mL/g)
1	100	5	20
2	100	5	40
3	100	5	60
4	100	10	20
5	100	10	40
6	100	10	60
7	125	5	20
8	125	5	40
9	125	5	60
10	125	10	20
11	125	10	40
12	125	10	60
13	150	5	20
14	150	5	40
15	150	5	60
16	150	10	20
17	150	10	40
18	150	10	60

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

Princip određivanja ukupnih fenola se bazira na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom (smjesa fosfovolframske i fosfomolibdenske kiseline). Metoda se temelji na reakcijama oksidacije i redukcije. Prilikom oksidacije fenolnih tvari u blago lužnatom mediju fosfovolframska i fosfomolibdenska kiselina se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid prilikom čega dolazi do promjene boje iz žute u plavu. Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka, a plavo obojenje, čiji je intenzitet veći ukoliko je u uzorku prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa fenolnih spojeva, mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Priprema uzorka:

Za određivanje ukupnih fenola ekstrakti uzoraka se razrjeđuju ekstrakcijskim otapalom razrjeđenjem prema potrebi.

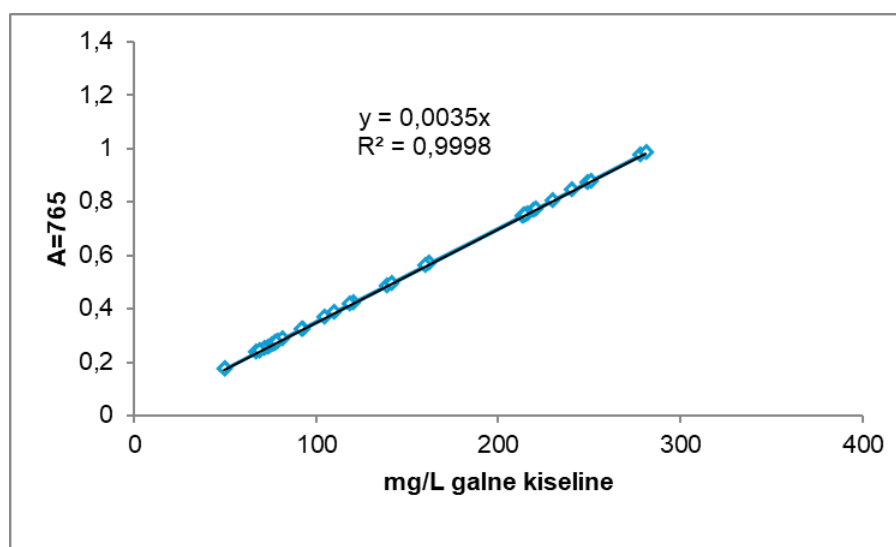
Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu se redom otpipetira 100 μ L ekstrakta, 200 μ L Folin Cioclteu reagensa te 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL vodene otopine natrijevog karbonata, te se pripremljeni uzorci miješaju pomoću Vortex mješalice. Nakon miješanja uzorci se termostatiraju 25 min na 50 °C. Na kraju slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj

duljini od 765 nm. Istim protokolom se priprema slijepa proba, uz razliku da se umjesto 100 μL ekstrakta uzima 100 μL ekstrakcijskog otapala.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca se pripremljena otopina galne kiseline (5 mg/L) razrijedi destiliranom vodom u pet razrjeđenja: 50, 100, 150, 250, 500 mg/L. Nakon toga se određeno razrjeđenje galne kiseline otpipetira u volumenu od 100 μL u staklenu epruvetu. U epruvetu se zatim redom dodaje 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode, te nakon 3 min 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Slijepa proba se priprema na isti način, samo što slijepa proba umjesto galne kiseline sadrži 100 μL destilirane vode. Uzorci se promiješaju pomoću Vortex mješalice i termostatiraju 25 min pri 50 °C. Nakon toga slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 765 nm, te crtanje baždarnog pravca pomoću programa Microsoft Excel obradom vrijednosti dobivenih mjerenjem apsorbancije. Na apscisu baždarnog pravca nanose se koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu se nanose izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (slika 7).



Slika 7. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X \quad [1]$$

gdje je:

Y= apsorbancija pri 765 nm,

X = koncentracija galne kiseline (mg/L)

R^2 = koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su kao srednja vrijednost dvaju mjerenja u mg

ekvivalenta galne kiseline (GAE) po g uzorka.

Određivanje antocijana

Princip određivanja:

Reakcija se odvija na način da se za mjerenje jednog uzorka pripreme dvije epruvete. U svaku epruvetu se otpipetira 1 mL ekstrakta. U jednu epruvetu se doda 4 mL pufera pH 1,0 a u drugu 4 mL pufera pH 4,5. Nakon 20 minuta se pripremljenim otopinama mjeri apsorbanacija pri 520 nm i 700 nm. Za slijepu probu se koriste pufer pH 1,0 i pufer pH 4,5.

Izračunavanje:

Koncentracija monomernih antocijana u uzorku izračunava se kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida (mg/L) prema formuli:

$$\frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad [2]$$

gdje je:

$A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}=4,5}$

MW = molekulska masa (za cijanidin-3-glukozid 449,2 g/mol)

DF = faktor razrijeđenja

10^3 = faktor za preračunavanje g u mg

ϵ = molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (za cijanidin-3-glukozid 26900 Lmol⁻¹cm⁻¹)

l = debljina kivete (1 cm)

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip određivanja:

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP) metoda temelji se reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u kiselom mediju pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996). FRAP vrijednosti najčešće se izražavaju preko FeSO₄, askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

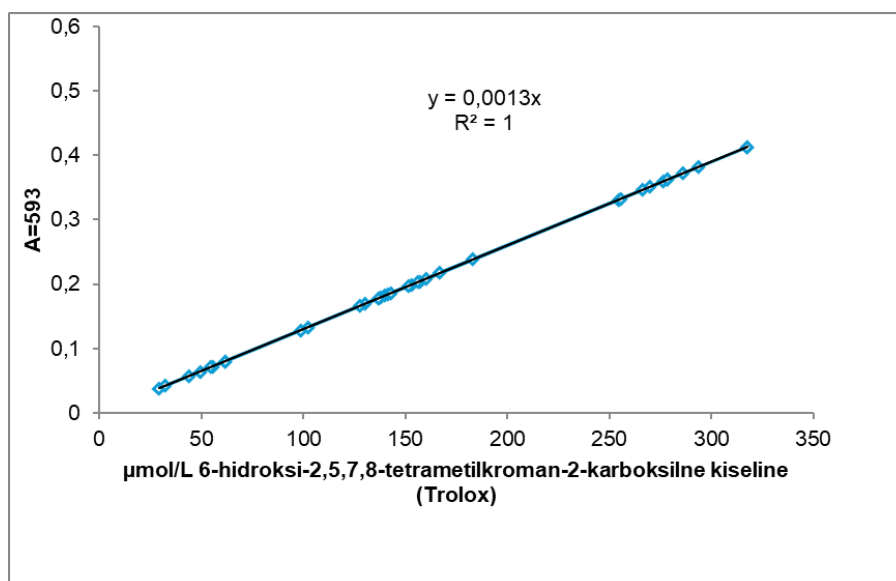
Postupak određivanja:

U staklene epruvete potrebno je redom otpipetirati 240 µL destilirane vode, 80 µL uzorka i 2080 µL FRAP reagensa. Potom se pripremljeni uzorci miješaju pomoću Vortex mješalice, te se termostatiraju 5 minuta na temperaturi 37° C. Mjere se vrijednosti apsorbanacija pri valnoj duljini od 593 nm. Slijepa proba se priprema na isti način, uz razliku

što slijepa proba ne sadržava uzorak već ekstrakcijsko otapalo.

Izrada baždarnog pravca:

Pripremi se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) na način da se izvaže 0,0501 g Troloxa. Izvagana masa se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom. Iz pripremljene otopine standarda Troloxa rade se razrijeđenja u odmjernim od tikvicama od 10 mL. Otpipetira se redom: 0,125, 0,5, 0,625, 1,25, 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa u svaku tikvicu, te se tikvice nadopune do oznake sa 96 %-tnim etanolom. U tikvicama, koncentracije Troloxa iznose: 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 $\mu\text{mol/L}$. Potom se u staklene epruvete redom otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine Trolox standarda iz prethodno pripremljenih odmjernih tikvica i 2080 μL FRAP reagensa. Slijedi miješanje pomoću Vortex mješalice i termostatanje na temperaturi 37 °C. Naposljetku se mjeri apsorbanacija pripremljenih uzoraka pri 563 nm. Slijepa proba sadržava sve iste komponente osim uzorka koji je zamijenjen 96 %-tnim etanolom. Pomoću Microsoft Excel programa se nacrtaju baždarni pravci. Na apscisu se nanose koncentracije Troloxa ($\mu\text{mol/L}$), a na ordinatu se nanose izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 593 nm. Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (slika 8).



Slika 8. Prikaz ovisnosti apsorbanacije o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,00133 \times X \quad [3]$$

gdje je:

$$Y = \text{apsorbancija pri 765 nm}$$

X = koncentracija 6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)
($\mu\text{mol/L}$)

R^2 = koeficijent determinacije

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip određivanja:

Metoda se bazira na oksidacijsko-redukcijskoj reakciji. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) je plavo-zeleno obojeni stabilni radikal koji u reakciji s antioksidansima gubi intenzitet boje, tj. otopina ABTS-a se obezboji. Potom se izmjeri apsorbanacija pri 734 nm.

Priprema uzorka:

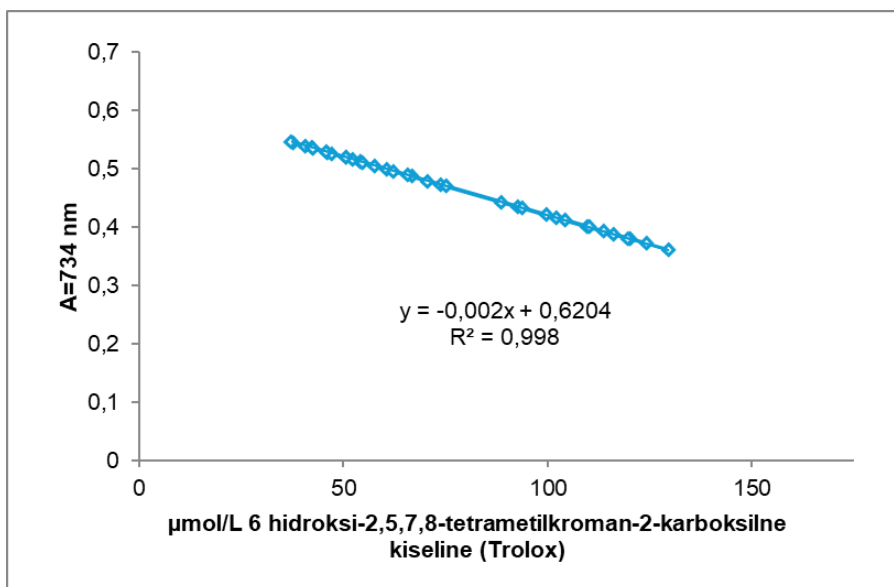
Uzorke komine borovnice je potrebno razrijediti ekstrakcijskim otapalom po potrebi.

Postupak određivanja:

U 160 μL razrijeđenog uzorka otpipetira se 2 mL 1 %-tnog $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Nakon 1 min se izmjeri apsorbanacija na 734 nm. Slijepa proba je umjesto uzorka sadržavala 96 %-tni etanol.

Izrada baždarnog pravca:

Pripremi se otopina Troloxa koncentracije 0,02 mol/L na način da se na analitičkoj vagi izvaže 500 mg Troloxa. Izvagana masa se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nakon toga nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake. Potom se iz tako pripremljene otopine rade razrjeđenja koncentracije 25, 50, 100 i 200 $\mu\text{mol/L}$, a dobiju se pipetiranjem redom 0,125; 0,25; 0,5 i 1 mL u odmjerne tikvice koje se nakon toga nadopune 100 %-tnim metanolom do oznake. U epruvetu se otpipetira 160 μL otopine Troloxa i 2 mL 1 %-tnog $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Nakon 1 min izmjeri se apsorbanacija pri 734 nm. Pomoću Microsoft Excell programa se skicira baždarni pravac, te se rezultati izražavaju preko Trolox ekvivalenta (TE). Na apscisu se nanese koncentracije otopina Troloxa, a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbanacija pri 734 nm. Antioksidacijski kapacitet uzorka se izračuna iz dobivene jednadžbe pravca (slika 9).



Slika 9. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = -0,002X + 0,6204 \quad [4]$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 734 nm

X = koncentracija 6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)(µmol/L)

R² = koeficijent determinacije

3.2.5. Statistička obrada rezultata

Eksperimentalni dizajn te statistička obrada podataka provedeni su programom Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Zavisne varijable bile su: koncentracija ukupnih fenola, koncentracija antocijana te antioksidacijska aktivnost određena FRAP i ABTS metodom te je ispitivan utjecaj neovisnih varijabli: a) temperatura (100, 125 i 150°C), b) statičko vrijeme (5 i 10 min) c) omjer uzorak:otapalo (1:20, 1:40 i 1:60 g/mL). Ispitana je normalnost i homoskedastičnost ostataka te je na uzorcima koji su udovoljili uvjetima provedena jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) dok je višestruko uspoređivanje provedeno Tukey LSD testom višestrukog uspoređivanja. Na podacima koji nisu udovoljili uvjetima normalnosti i homoskedastičnosti preveden je neparametrijski Kruskal-Wallis test uz usporedbu rangova. Razina značajnosti za sve testove je bila $\alpha \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Istraživanje je provedeno prema planu eksperimenta koji je obuhvatio 18 uzoraka, a s ciljem određivanja antioksidacijskog potencijala ekstrakata komine borovnice proizvedenih primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku. Udio suhe tvari uzorka komine iznosio je 97,87 %. Rezultati dobiveni prilikom provođenja eksperimenta koji pokazuju utjecaj parametara poput temperature (100, 125 i 150°C), vremena (5 i 10 min), omjera uzorak:otapalo (1:20, 1:40, 1:60 g/mL), na koncentraciju ukupnih fenola i antocijana te na antioksidacijski kapacitet (FRAP, ABTS) u uzorcima prikazani su u tablici 6. Navedeni su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Rezultati statističke analize prikazani su u tablici 7 kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

Tablica 6. Utjecaj temperature (°C), vremena (min), omjera otapalo/uzorak (mL/g), na koncentraciju ukupnih fenola, antocijana te na antioksidacijski kapacitet u uzorcima koline borovnice.

UZORAK	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (min)	OMJER OTAPALO/ UZORAK (mL/g)	UKUPNI FENOLI (mg GAE/g s.tv.)	ANTOCIJANI (mg ekvivalent cijanidin-3-glukozida/g s.tv.)	FRAP (μmol TE/ g s.tv.)	ABTS (μmol TE/g s.tv.)
1	100	5	20	48,03 ±1,61	4,62 ±0,05	275,55 ±7,80	365,28 ±9,25
2	100	5	40	37,71 ±0,08	5,00 ±0,06	296,86 ±5,21	387,62 ±13,89
3	100	5	60	44,53 ±0,62	3,61 ±0,05	288,86 ±7,83	459,42 ±6,96
4	100	10	20	45,07 ±0,12	3,72 ±0,06	304,82 ±0,00	400,85 ±9,28
5	100	10	40	48,78 ±0,50	2,77 ±0,07	297,78 ±11,44	342,79 ±16,18
6	100	10	60	47,95 ±0,37	3,44 ±0,10	398,72 ±4,69	534,57 ±3,47
7	125	5	20	57,01 ±0,41	2,80 ±0,02	264,80 ±1,56	296,10 ±9,24
8	125	5	40	20,28 ±0,08	2,13 ±0,06	259,90 ±15,62	459,43 ±32,40
9	125	5	60	48,07 ±2,48	3,49 ±0,06	765,86 ±48,45	505,42 ±10,42
10	125	10	20	43,06 ±0,08	1,32 ±0,01	165,25 ±10,79	371,10 ±21,69
11	125	10	40	43,61 ±1,48	1,26 ±0,01	88,90 ±7,27	256,00 ±13,85
12	125	10	60	41,75 ±0,74	2,41 ±0,09	168,00 ±12,50	390,00 ±34,73
13	150	5	20	51,28 ±0,30	1,31 ±0,04	267,41 ±11,00	404,22 ±31,38
14	150	5	40	65,88 ±0,58	1,41 ±0,10	253,37 ±12,50	477,61 ±20,83
15	150	5	60	44,74 ±3,34	0,58 ±0,02	88,25 ±6,24	433,42 ±20,80
16	150	10	20	43,89 ±0,16	0,89 ±0,01	248,96 ±7,27	336,85 ±4,62
17	150	10	40	57,16 ±0,74	0,98 ±0,06	286,15 ±17,69	632,30 ±27,74
18	150	10	60	47,74 ±0,62	0,78 ±0,07	167,89 ±14,15	632,01 ±24,46
Prosječna vrijednost				46,47 ±0,80	2,36 ±0,05	271,52 ±11,22	426,94 ±17,29

U uzorku komine borovnice koncentracije ukupnih fenola određene su u rasponu od 20,28 (125 °C/ 5 min/ 40 mL/g) do 65,88 (150 °C/ 5 min/ 40 mL/g) mg GAE/g suhe tvari (s.tv.), a koncentracije antocijana od 0,58 (150 °C/ 5min/ 60 mL/g) do 5,00 (100 °C/ 5 min/ 40 mL/g) mg/g s.tv. Prilikom određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom raspon vrijednosti iznosio je od 88,25 (150 °C/ 5 min/ 60 mL/g) do 765,86 (125 °C/ 5 min/ 60 mL/g) µmol TE/g s.tv., dok su određivanjem ABTS metodom iznosile od 256,00 (125 °C/ 10 min/ 40 mL/g) do 632,30 (150 °C/ 10 min/ 60 mL/g) µmol TE/g s.tv. Iz dobivenih podataka se zaključuje da je promatrani uzorak borovnice bogat antocijanima i ukupnim fenolima, te proporcionalno tome ima visok antioksidacijski kapacitet.

Prosječna koncentracija ukupnih fenola iznosila je 46,47 mg GAE/g s.tv, dok je prosječna koncentracija antocijana iznosila 2,36 mg/g s.tv. Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom iznosio je 271,52 µmol TE/g s.tv., a ABTS metodom je iznosio 426,94 µmol TE/g s.tv.

U radu Rodrigues i sur. (2011) provedena je metanolna ekstrakcija ultrazvukom u uzorcima borovnice uzgojenim u Brazilu te je koncentracija ukupnih fenola u analiziranim uzorcima borovnice bila u rasponu od 274,48 do 694,60 mg GAE/100 g s.tv., koncentracija antocijana od 40,62 do 378,31 mg/100 g s.tv, antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom bio je u rasponu od 1238,48 do 2445,96 µmol TE/100 g s.tv, a antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom od 699,78 do 1740,25 µmol TE/100 g s.tv uzorka. Dobiveni rezultati za koncentraciju ukupnih fenola, te antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP i ABTS metodom su manji u usporedbi s rezultatima dobivenim u ovom radu, dok su vrijednosti za koncentraciju antocijana unutar raspona dobivenog u ovom radu, s nešto nižim vrijednostima najniže i najviše koncentracije. Za razliku od uzorka borovnice, Patthamakanokporn i sur. (2008) su istraživali antioksidacijski potencijal FRAP metodom tijekom skladištenja guave. Vrijednosti su iznosile od 57,5 do 73,1 µmol TE/g s.tv., što su znatno niže vrijednosti od dobivenih u ovom radu. Jara-Palacios i sur. (2018) su analizirali antioksidacijski kapacitet ABTS metodom i udio antocijana u kominama borovnice, maline, crvenog ribizla i kupine. Najveći antioksidacijski kapacitet izmjeren je u uzorku komine crvenog ribizla (61 mmol TE/100 g s.tv.), zatim u komini maline (29,75 mmol TE/100 g s.tv.), potom u komini borovnice (26,98 mmol TE/100 g s.tv.), te na kraju u komini kupine (22,54 mmol TE/100 g s.tv.). U usporedbi s dobivenim vrijednostima u našem radu, uzorak komine crvenog ribizla pokazuje veći antioksidacijski kapacitet, dok ostali uzorci pokazuju niži antioksidacijski kapacitet. Heffels i sur. (2015) su istražili utjecaj ubrzane ekstrakcije otapalom (ASE) na koncentraciju antocijana u uzorcima obične borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.), divlje borovnice (*Vaccinium angustifolium* Ait.) i američke brusnice (*Vaccinium macrocarpon* Ait.).

Raspon koncentracija antocijana u običnoj borovnici iznosio je od 15,9 do 200,1 mg/g s.tv., u divljoj borovnici od 4,5 do 26,2 mg/g s.tv., a u američkoj brusnici 1,51 do 2,20 mg/g s.tv (Heffels i sur., 2015). Obzirom na rezultate dobivene u ovom radu, vrijednosti su najbližije podacima za američku brusnicu.

U usporedbi s navedenim literarnim podacima zaključuje se da ispitivani uzorak borovnice ima visoku koncentraciju ukupnih fenola, antocijana, te visok antioksidacijski potencijal što ju čini visokokvalitetnom namirnicom i bogatim izvorom bioaktivnih komponenti koji mogu imati korisne učinke na ljudski organizam.

Tablica 7. Utjecaj parametara ASE ekstrakcije na koncentraciju ukupnih fenola i antocijana te na antioksidacijski kapacitet ekstrakata komine borovnice.

Izvor varijacije	N	Ukupni fenoli (mg GAE/ g s.tv.)	Antocijani (mg/ g s.tv.)	FRAP ($\mu\text{mol TE/ g s.tv.}$)	ABTS ($\mu\text{mol TE/ g s.tv.}$)
Omjer uzorak:otapalo (g/mL)					
1:20	12	p=1 48,06 \pm 1,47 ^a	p=0,26 2,44 \pm 0,42 ^a	p=0,72 254,47 \pm 13,15 ^a	p<0,01* 362,40 \pm 11,82 ^a
1:40	12	45,57 \pm 4,38 ^a	2,26 \pm 0,41 ^a	247,16 \pm 22,11 ^a	425,96 \pm 35,91 ^a
1:60	12	45,80 \pm 0,80 ^a	2,38 \pm 0,38 ^a	312,93 \pm 68,21 ^a	492,47 \pm 23,90 ^b
Temperatura (°C)					
100	12	p=0,05 45,35 \pm 1,15 ^a	p<0,01* 3,86 \pm 0,22 ^c	p<0,01* 310,43 \pm 12,31 ^b	p=0,10 415,09 \pm 19,56 ^a
125	12	42,30 \pm 3,35 ^a	2,24 \pm 0,24 ^b	285,45 \pm 7,44 ^{a,b}	379,67 \pm 26,45 ^a
150	12	51,78 \pm 2,34 ^a	0,99 \pm 0,09 ^a	218,67 \pm 21,00 ^a	486,07 \pm 3,96 ^a
Statičko vrijeme (min)					
5	18	p=0,51 46,39 \pm 2,91 ^a	p=0,07 2,77 \pm 0,35 ^a	p=0,51 306,76 \pm 42,00 ^a	p=0,73 420,94 \pm 15,18 ^a
10	18	46,56 \pm 1,07 ^a	1,95 \pm 0,26 ^a	236,27 \pm 22,01 ^a	432,94 \pm 30,98 ^a
Prosječna vrijednost	36	46,47	2,36	271,52	426,94

*statistički značajan čimbenik. Vrijednosti unutar ćelije označene različitim slovom su statistički značajne kod $p \leq 0,05$. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti \pm standardna pogreška

Analizirajući tablicu 7 statističke analize utjecaja temperature (100, 125, 150 °C), vremena (5, 10 min), omjera uzorak:otapalo (1:20, 1:40, 1:60 g/mL), na koncentraciju ukupnih fenola i antocijana u uzorcima komine borovnice te na antioksidacijski kapacitet (FRAP, ABTS) u uzorcima komine borovnice može se zaključiti da se najveće vrijednosti uz najveću ekonomičnost u smislu potrošnje materijala i energije postižu pri sljedećim uvjetima: omjer uzorak:otapalo 1:60, temperatura 100 °C i statičko vrijeme 5 min. U nastavku je

raspravljen pojedinačan utjecaj svakog od parametara ekstrakcije na ispitivane zavisne varijable.

4.1. UTJECAJ TEMPERATURE NA UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTOCIJANA

Utjecaj temperature je važan faktor jer temperatura pridonosi nizu procesa koji smanjuju viskoznost otapala što pridonosi poboljšanju prinosa ekstrakcije, kao što je objašnjeno u teorijskom dijelu ovog rada. Obzirom na navedeni utjecaj temperature, važno je u obzir uzeti različite temperature ekstrakcije te definirati one pri kojima se može postići maksimalna efikasnost uz minimalan utrošak energije.

4.1.1. Utjecaj temperature na udio ukupnih fenola

Obzirom da temperatura nije statistički značajno utjecala na udio ukupnih fenolnih spojeva, a s ciljem postizanja maksimalnog udjela uz manju potrošnju materijala kao optimalna može se odabrati najniža temperatura (100°C). U pravilu, u tradicionalnim tehnikama ekstrakcije, ukupni sadržaj fenola je najveći na temperaturi ekstrakcije od 60 do 80 °C, dok u slučaju inovativnih tehnika ekstrakcije, poput ekstrakcije subkritičnom vodom, zabilježene su temperature čak od 100 do 200 °C (Antony i Farid, 2022). U našem istraživanju, nije uočen negativan utjecaj povišene temperature, pa se uzimajući u obzir ekonomičnost izabrala najniža temperatura kao optimalna.

U istraživanju Ghafoor i sur. (2019) u uzorcima šljive i rašeljke je došlo do smanjenja udjela fenolnih komponenti zagrijavanjem, tj. primjećen je negativan utjecaj visoke temperature na ukupne fenole. Zagrijavanje se provodilo na 60, 80, 90, 110 i 130 °C prilikom čega je utvrđeno da je najveće smanjenje ukupnog sadržaja fenola na temperaturi od 130 °C (Ghafoor i sur., 2019), dok je najveća koncentracija fenola određena u uzorku šljive pri temperaturi od 80 °C, a u uzorku rašeljke pri temperaturi od 60 °C. Istu povezanost smanjenja koncentracije polifenola povišenjem temperature pokazalo je i istraživanje Michalska i sur. (2017) provođenjem konvekcijskog sušenja uzoraka koline crnog ribiza.

Wanderley i sur. (2023) su istraživali utjecaj temperature sušenja (50 °C, 60 °C, 70 °C) na fenolne komponente u uzorku brašna od kore i sjemenki nara, te je najveća koncentracija ukupnih fenola određena u uzorcima sušenim pri 60 °C zbog čega se smatra optimalnom temperaturom sušenja. Pri temperaturi sušenja od 70 °C primjećeni su značajno veći gubici fenolnih spojeva, dok temperatura od 50 °C zahtjeva dulje vrijeme sušenja, što pridonosi većoj degradaciji fenola kao termolabilnih spojeva. Toplinska degradacija najčešći je mehanizam koji se koristi za objašnjenje pada prinosa polifenola tijekom visokotemperaturnih ekstrakcija (Antony i Farid, 2022). Smanjenje sadržaja polifenola povećanjem temperature može se pripisati oksidativnim procesima koji se odvijaju za vrijeme

sušenja, razaranjem određenih staničnih struktura pod utjecajem visokih temperatura i dugog vremena sušenja, te hlapljivošću pojedinih spojeva i njihovoj sposobnosti otapanja u vodenom mediju (Alean i sur., 2016). I u istraživanju Paiva i sur. (2023) optimalna temperatura za proizvodnju prahova iz mješavine tropskog crvenog voća, kao što su acerola, guava i pitanga sa visokim sadržajem bioaktivnih komponenti bila je 60 °C.

Postoje i studije koje istražuju nove, alternativne netermalne tehnologije za poboljšanje nutritivne kvalitete proizvoda, smanjenje aktivnosti enzima i mikroba te povećanje koncentracije bioaktivnih komponenti i antioksidativnog kapaciteta. Kombinacija HHP i TS može se koristiti kao nova alternativna netermalna tehnologija za poboljšanje nutritivne kvalitete voćnih sokova.

4.1.2. Utjecaj temperature na udio antocijana

Povećanjem temperature dolazi do statistički značajnog pada udjela antocijana gdje je najviši udio zabilježen pri 100 °C, a najniži pri temperaturi 150 °C. Stoga je temperatura statistički značajan parametar koji utječe na udio antocijana.

Slične rezultate, koji pokazuju smanjenje udjela antocijana povećanjem temperature pokazalo je i istraživanje Liu i sur. (2018) koji su proučavali stabilnost antocijana u uzorku borovnice u ovisnosti o pH i temperaturi. Pri pH 6, udio antocijana smanjio se sa 78,8 % na 38,1 % kada je temperatura povećana sa 60 °C na 80 °C (Liu i sur., 2018). Zaključeno je također da, pri pH 3 koji je približno jednak pH otapala korištenom u ovom radu, zagrijavanjem 10 sati ispod 60 °C, udio očuvanih antocijana iznosi oko 95 %, što pokazuje da se u ovakvim uvjetima može očuvati velika količina antocijana. U ovom radu, primjena visoke temperature u kombinaciji s kiselim otapalom nije rezultirala očuvanjem antocijana.

Buckow i sur. (2010) su istraživali kinetiku razgradnje ukupnih antocijana u soku borovnice tijekom termičke obrade na temperaturama od 60-121 °C te u kombinaciji sa visokim tlakom i temperaturom (100-700 MPa, 40-121 °C). Rezultati su pokazali da se u soku borovnice udio antocijana značajno smanjio povišenjem temperature. Nakon 20 minuta zagrijavanja na 100 °C i atmosferskom tlaku uočeno je smanjenje udjela antocijana za 32 %, dok se udio ukupnih antocijana u soku smanjio za oko 50 % obradom na 100 °C i 600 MPa (Buckow i sur., 2010).

Smatra se da je razgradnja antocijana uzrokovana oksidacijom, cijepanjem kovalentnih veza ili većim brojem oksidacijskih reakcija uslijed toplinske obrade. Vjerojatno tijekom toplinske obrade, antocijanini ili njihovi konjugirani šećeri se razgrađuju na male molekule kao što su aldehidi i derivati benzojeve kiseline ili njihovi odgovarajući antocijanidini (Zorić i sur., 2014). Mnogi istraživači istražuju mogući odnos njihove kemijske strukture i toplinske stabilnosti, kao što je broj hidroksilnih skupina ili stupanj glikozilacije ili acilirani oblik. Vrsta šećera vezana na anocijanidin značajno utječe na stabilnost antocijana. Tako na

primjer, smatra se da su toplinski stabilniji antocijani na koje je vezana galaktoza nego glukoza što se može pripisati učinku matriksa i/ili različitog pH (pH 4 ili niži u slučaju soka). Veća stabilnost antocijana vezanih na glukozu i galaktozu u usporedbi s arabinozom vjerojatno je zbog steričkih prepreka, koje su veće za heksozne šećere (Fracassetti i sur., 2013).

4.2. UTJECAJ OMJERA UZORKA I OTAPALA NA UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTOCIJANA

Utjecaj omjera uzorka i otapala je još jedan ključan čimbenik u ekstrakcijskim metodama jer prevelik omjer znači i utrošak veće količine otapala, što samim time zahtjeva i veći utrošak vremena, unatoč tome što veći omjer najčešće znači veće prinose. Tijekom ASE ekstrakcije, u ovom radu volumen otapala je u svim slučajevima bio isti, mijenjala se samo masa uzorka. Stoga je poželjnije da je omjer uzorak otapalo veći, jer je u tom slučaju masa uzorka, a time i potrošnja je manja.

Obradom rezultata dobivenih u ovom radu, pokazalo se kako omjer uzorka i otapala nije statistički značajno utjecao na udio ukupnih fenolnih spojeva, kao ni na udio antocijana, a s ciljem postizanja maksimalnog udjela uz manju potrošnju materijala kao optimalan omjer uzorak:otapalo može se odabrati najveći udio (1:60) pri čemu je za proizvodnju ekstrakta utrošeno 0,83 g uzorka komine. Prema Pinelo i sur. (2005), koji su ekstrahirali kominu grožđa, što je veći omjer otapala i uzorka, to je i veći udio koncentracija komponenti ekstrahiranih iz uzorka unatoč korištenom otapalu, što je u skladu s načelima prijenosa mase; pokretačka sila za vrijeme prijenosa mase je koncentracijski gradijent između otapala i uzorka, koja je veća kad je i taj omjer veći. U dostupnoj literaturi, manji omjeri otapala i uzorka nego u ovom radu većinom su se pokazali optimalnima. Primjerice, Aliaño-González i sur. (2020) su u uzorku borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) odredili da su optimalni uvjeti za ekstrakciju antocijana omjer uzorak:otapalo 1:40 prilikom čega je 0,5 g uzorka ekstrahirano sa 20 mL otapala. Kao otapalo je korišten 74,6 %-tni metanol. Celli i sur. (2015) su analizirajući uzorak sibirske borovnice ekstrahiran primjenom 80 % etanola sa 1 % mravlje kiseline utvrdili da se viši prinosi antocijana postižu pri optimalnom omjeru uzorka i otapala 1:25 (g/mL). Boue i sur. (2019) su u svom istraživanju obogaćivali pšenično brašno i mekinje polifenolima borovnice. Rezultati su pokazali da su najveće koncentracije polifenola (18,6 mg/g) i antocijana (9,11 mg/g) postignuti kada je omjer komine borovnice i otapala 1:20 pri čemu otapalo predstavlja voda i pufer limunske kiseline (Boue i sur., 2019). Također, slične rezultate je pokazalo istraživanje Rezaei i sur. (2012) u kojem je tijekom ekstrakcije polifenola iz komine jabuke primjenom mikrovalova optimalni omjer uzorka i otapala bio 1:20. Otapalo predstavlja etanol i voda u omjeru 35:65. U ovom radu se vrijednosti dobivene pri

omjerima uzorak:otapalo 1:20, 1:40 i 1:60 nisu statistički značajno razlikovale te su stoga rezultati u smislu prinosa u skladu s literaturnim podacima. U navedenim radovima korištene su različite tehnike gdje je cilj smanjiti potrošnju otapala te je u njihovom slučaju bilo poželjno da su omjeri uzorka i otapala manji. U slučaju ASE ekstrakcije gdje je volumen otapala fiksna, tj. utrošak otapala je isti za sve uzorke, cilj je potrošiti što manje uzorka komine i postići što veći prinos te je stoga optimalni omjer otapala i uzorka u ovom radu veći nego u literaturi.

Objašnjenje utjecaja otapala na koncentraciju antocijana i fenola proučavali su Lapornik i sur. (2005) koristeći tri otapala: metanol, etanol i vodu. Unatoč tome što su antocijani polarnije molekule za očekivati je da je njihova topljivost veća u vodi kao najpolarnijem otapalu. Međutim, pokazalo se da je najveća topljivost ovih spojeva ostvarena u metanolu, potom u etanolu i naposljetku u vodi. U usporedbi s vodom, etanol i metanol manje polarni, stoga su više učinkoviti u razgradnji staničnih stijenki koje imaju nepolaran karakter, te na taj način uzrokuju otpuštanje antocijana i fenola iz stanice (Lapornik i sur., 2005). Topljivost antocijana ovisi o broju, vrsti i položaju molekula šećera (Lapornik i sur., 2005). Ovisno o sposobnosti otapala za razgradnju komponenti stanične stijenke i otapanje ciljanih spojeva, u ovom slučaju antocijana, može i varirati količina potrebnog otapala što objašnjava razlike među rezultatima istraživanja.

4.3. UTJECAJ STATIČKOG VREMENA NA UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTOCIJANA

Statičko vrijeme je također jedan od važnih parametara u istraživanju jer povišenje statičkog vremena praćeno povišenjem temperature omogućava otapanje analita u otapalu, stoga je cilj za što kraće vrijeme dobiti što veću koncentraciju uzorka. Rezultati statističke obrade rezultata pokazuju da statičko vrijeme nije statistički značajno utjecalo na udio ukupnih fenolnih spojeva, i antocijana. S ciljem postizanja maksimalnog udjela uz manju potrošnju energije kao optimalno vrijeme može se odabrati 5 minuta.

Gotovo identične rezultate je pokazalo i istraživanje Aliaño-González i sur. (2020) koji su promatrali utjecaj različitih ekstrakcijskih vremena (2, 5, 10, 15, 20 i 25 min) na udio antocijana i ukupnih fenola prilikom čega su pokazali da je maksimalna koncentracija antocijana (10,18 mg/g) postignuta nakon 5 min ekstrakcije, iako nisu primijećene statistički značajne razlike u usporedbi s ekstrakcijom od 10 minuta; dok je maksimalna koncentracija ukupnih fenola (32,18 mg/g) postignuta s ekstrakcijskim vremenom od 15 min (Aliaño-González i sur., 2020). Ryu i sur. (2019) su u svojem istraživanju također dobili slične rezultate. Naime, istraživali su optimalne uvjete vremena ekstrakcije (10, 35 i 60 min) za antioksidacijsku aktivnost, udio ukupnih fenola i antocijana u uzorku grejpa. Kao optimalno

statičko vrijeme se pokazalo najkraće vrijeme od 10 minuta.

Lapornik i sur. (2005) su zaključili ispitivajući uzorke komine grožđa i crnog ribiza da se koncentracija polifenola u vodenim ekstraktima smanjuje s vremenom, dok se u metanolnim i etanolnim ekstraktima s vremenom povećava, međutim kod crvenog ribiza nije bilo značajne razlike. Pinelo i sur. (2005) su u svom radu utvrdili da je vrijeme ekstrakcije značajna varijabla kada se koriste otapala poput etanola i metanola, što ukazuje na progresivno oslobađanje otopljene tvari iz matriksa u otapalo tijekom zadanog vremenskog intervala ekstrakcije.

4.4. UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Utjecaj parametara ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet promatran je jer postoje brojni dokazi kako koncentracija polifenola i antocijana utječe na antioksidacijski kapacitet uzorka, tj. utvrđena je proporcionalna povezanost ovih varijabli. Također, objašnjeno je kako parametri temperature, vremena, omjera uzorka i otapala mogu utjecati na koncentraciju polifenola, i antocijana.

Prilikom određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom, omjer uzorka i otapala i statičko vrijeme nisu imali statistički značajan utjecaj na rezultat, stoga je optimalan omjer uzorak:otapalo 1:60, a statičko vrijeme 5 minuta. Za razliku od rezultata u ovom radu, Briones-Labarca i sur. (2019) su uočili da se antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom značajno povećao za 16,3, 16,9 i 19,7 %, proporcionalno povećanju ekstrakcijskog vremena za 5, 10 i 15 minuta. U drugim istraživanjima pokazalo se i kako omjer uzorka i otapala može utjecati na antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom, omjeri uzorka i otapala koji su se pokazali optimalnima bili su manji nego u ovom radu. Primjerice, Michiels i sur. (2012) su proučavali utjecaj ekstrakcijskih parametara, među kojim se nalazi i omjer uzorak:otapalo na antioksidacijski kapacitet u različitim biljnim vrstama. Omjeri su varirani od 1:2 do 1:100 (g/mL), a najveći antioksidacijski kapacitet je određen u ekstraktima pri omjeru uzorak:otapalo 1:40. Nadalje, Guine i sur. (2020) su određivali antioksidacijski kapacitet ekstrahirajući uzorke jagode gdje su omjeri uzorak:otapalo varirani od 1:5 do 1:20 (g/mL), te je u uzorcima gdje je omjer uzorak:otapalo 1:20 (g/mL) određen najveći antioksidacijski kapacitet.

Za razliku od druga dva varirana parametra, temperatura je imala statistički značajan utjecaj, prilikom čega se pokazalo da je najviši antioksidacijski kapacitet pri 100 °C, a najniži pri 150 °C. Također, iz prethodno dobivenih rezultata u ovom radu je zaključeno da povećanjem temperature dolazi do statistički značajnog pada udjela antocijana gdje je najviši udio zabilježen pri 100 °C, a najniži pri temperaturi 150 °C. Iz ovoga se može zaključiti da su

za antioksidacijski kapacitet borovnice najviše zaslužni antocijani. Odnos tih dviju varijabli je proporcionalan—što je veća koncentracija antocijana u uzorku, to je veći antioksidacijski kapacitet uzorka. I u istraživanju Yang i Zhai (2010) je primijećena pozitivna korelacija između srednjih vrijednosti ukupnog udjela antocijana i FRAP antioksidacijskog kapaciteta, što implicira da antocijanini mogu reducirati željezove ione.

Temperatura i statičko vrijeme nisu imali statistički značaj utjecaj na rezultate antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom, stoga je optimalna temperatura 100 °C, a vrijeme 5 min dok se omjer uzorka i otapala pokazao kao statistički značajan parametar. Optimalan omjer uzorka i otapala je 1:60.

Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određene ABTS i FRAP metodom međusobno su se razlikovale, što je primijećeno i u istraživanju Rodrigues i sur. (2011) koji su mjerili antioksidacijski kapacitet različitih sorti borovnice (*Vaccinium* sp.) uzgajanih u Brazilu. Prosječne vrijednosti dobivene FRAP metodom iznosile su 1214,20 $\mu\text{Mol TE}/100\text{ g s.tv.}$, a prosječne vrijednosti dobivene ABTS metodom su iznosile 1850,83 $\mu\text{Mol TE} / 100\text{ g s.tv.}$ Za razliku od njih, Thaipong i sur. (2006) su u svom istraživanju dokazali da je bila vrlo visoka korelacija (97 %) u rezultatima mjerenja antioksidativnog kapaciteta FRAP i ABTS metodom. Navedene razlike u rezultatima FRAP i ABTS antioksidacijskog kapaciteta su vjerojatno zbog različitih mehanizama metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta te različitih fenolnih spojeva koji različito reagiraju s primjenjenim reagensom za određivanje antioksidativnog kapaciteta. Tako je u našem istraživanju vrijednost antioksidacijskog kapaciteta mjerenog ABTS metodom (426,94 $\mu\text{mol TE}/\text{g s.tv.}$) viša od onog mjerenog FRAP metodom (271,52 $\mu\text{mol TE}/\text{g s.tv.}$). Faria i sur. (2005) su pokazali kako se antioksidacijski kapacitet povećava sa strukturnom složenošću pigmenata iz antocijana i sa sadržajem polifenola u uzorcima *Vaccinium myrtillus* ekstrakata. Što se strukturne složenosti tiče, na antioksidativnost najviše utječu *o*-dihidroksilne grupe u B prstenu i hidroksilne grupe u C prstenu, te one strukture koje su najbogatije ovakvim grupama pokazuju i najveći antioksidacijski kapacitet. Ovisno o strukturi antocijana, i kemijske reakcije s ABTS i FRAP reagensima mogu biti drugačije zbog različitih mehanizama. Tako je nekoliko studija pokazalo linearnu povezanost između koncentracije flavonoida i aktivnosti redukcije ABTS radikala, pa tako vrste s većom koncentracijom flavonoida pokazuju veći antioksidacijski kapacitet mjeren ABTS metodom (Wang i sur., 2017; Lee i sur., 2016; Cai i sur., 2014). Za FRAP metodu je specifično što se provodi u kiselim uvjetima (pH 3,6) (Proestos i Komaitis, 2009). Proestos i Komaitis (2009) su pomoću kromatografske metode analizirali ekstrakte u kojima je određen antioksidacijski kapacitet FRAP metodom. Rezultati su pokazali najveću koncentraciju flavonola kempferola i kvercetina, zatim ferulinske kiseline te potom flavan-3-ola katehina. Također, u istraživanju koje su proveli Choi i sur. (2010) primijećene su razlike u antioksidacijskom kapacitetu ekstrakata antocijana iz pokožice grožđa određivane ABTS i

DPPH metodom ovisno o individualnom sastavu antocijana u ekstraktima, što potvrđuje da razlike između rezultata različitih metoda proizlaze iz interakcije antocijana s različitim reagensima.

5. ZAKLJUČCI

1. U uzorku komine borovnice prosječna koncentracija ukupnih fenola iznosila je 46,47 mg GAE/g suhe tvari, dok je prosječna koncentracija antocijana iznosila 2,36 mg ekvivalent cijanidin-3-glukozida/g suhe tvari.
2. Prosječni antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom (426,94 μ mol TE/g suhe tvari) bio je viši od antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom (271,52 μ mol TE/g suhe tvari) .
3. Temperatura ekstrakcije iznad 100 °C značajno je smanjila udio antocijana i antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom, a značajno veći ABTS antioksidacijski kapacitet određen je pri omjeru uzorka i otapala 1:60. Statičko vrijeme nije značajno utjecalo na udio ukupnih fenolnih spojeva i antocijana kao ni na antioksidacijski kapacitet.
4. Optimalni uvjeti pri kojima su postignute najveće vrijednosti udjela fenola, antocijana te antioksidacijskog kapaciteta uz najmanji utrošak materijala i energije su: omjer uzorak:otapalo 1:60, temperatura 100 °C, te statičko vrijeme 5 min.
5. Komina borovnice je bogat izvor polifenolnih spojeva i antocijana koji pokazuju antioksidacijsko djelovanje te kao takva ima visok potencijal primjene u području prehrambene tehnologije, nutricionizma, farmacije i medicine.

6. LITERATURA

- Alean J, Chejne F, Rojano B (2016) Degradation of polyphenols during the cocoa drying process. *J Food Eng* **189**, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.026>
- Aliaño-González MJ, Jarillo JA, Carrera C, Ferreiro-González M, Álvarez JA, Palma M (2020) Optimization of a Novel Method Based on Ultrasound-Assisted Extraction for the Quantification of Anthocyanins and Total Phenolic Compounds in Blueberry Samples (*Vaccinium corymbosum* L.). *Foods* **9**, 1763. <https://doi.org/10.3390/foods9121763>
- Antony A i Farid M (2022) Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. *Appl Sci* **12**, 2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>
- Barros F, Dykes L, Awika JM, Rooney LW (2013) Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. *J Cereal Sci* **58**, 305-312. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.05.011>
- Bener M, Shen Y, Apak R, Finley JW, Xu Z (2013) Release and degradation of anthocyanins and phenolics from blueberry pomace during thermal acid hydrolysis and dry heating. *J Agric Food Chem* **61**, 6643–6649. <https://doi.org/10.1021/jf401983c>
- Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem* **29**, 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6)
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* **239**, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Boespflug EL, Eliassen JC, Dudley JA, Shidler MD, Kalt W, Summer SS i sur. (2018) Enhanced neural activation with blueberry supplementation in mild cognitive impairment. *Nutr Neurosci* **21**, 297–305. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1287833>
- Briones-Labarca V, Giovagnoli-Vicuña C, Chacana-Ojeda M (2019) High pressure extraction increases the antioxidant potential and *in vitro* bio-accessibility of bioactive compounds from discarded blueberries. *CYTA - J Food* **17**, 622-631. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1624622>
- Boue SM, Daigle K, Beaulieu JC, Heiman M (2019) Rice Flour and Bran Enriched with Blueberry Polyphenols Increases Storage Stability and Decreases Arsenic Content in Bran. *Foods* **8**, 276. <https://doi.org/10.3390/foods8070276>
- Buckow R, Kastell A, Terefe NS, Versteeg C (2010) Pressure and Temperature Effects on Degradation Kinetics and Storage Stability of Total Anthocyanins in Blueberry Juice. *J Agric Food Chem* **58**, 10076–10084. <https://doi.org/10.1021/jf1015347>
- Buljeta I, Nosić M, Pichler A, Ivić I, Šimunović J, Kopjar M (2022) Apple Fibers as Carriers of Blackberry Juice Polyphenols: Development of Natural Functional Food Additives. *Molecules* **27**, 3029. <https://doi.org/10.3390/molecules27093029>
- Bursać Kovačević D, Gajdoš Kljusurić J, Putnik P, Vukušić T, Herceg Z, Dragović Uzelac, V (2016) Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase Plasma. *Food Chem* **212**, 323-331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.192>

- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* **17**, 2157-2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>
- Cassidy A, Minihane AM (2017) The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr* **105**,10–22. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.136051>
- Castañeda-Ovando A, Galán-Vidal CA, Contreras-López E, Páez-Hernández ME (2014) Purification of anthocyanins with o-dihydroxy arrangement by sorption in cationic resins charged with Fe(III). *J Chem*, **2014** 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/367236>
- Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández ML, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem* **113**, 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Celli GB, Ghanem A, Brooks MSL (2015) Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) using Response Surface Methodology. *Ultrason Sonochem* **27**, 449-455. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.06.014>
- Cheng Y, Wu T, Chu X, Tang S, Cao W, Liang F i sur. (2020) Fermented blueberry pomace with antioxidant properties improves fecal microbiota community structure and short chain fatty acids production in an in vitro mode. *LWT* **125**, 109260. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109260>
- Choi JY, Lee SJ, Lee SJ, Park S, Lee JH, Shim JH i sur. (2010) Analysis and tentative structure elucidation of new anthocyanins in fruit peel of *Vitis coignetiae* Pulliat (meoru) using LC-MS/MS: Contribution to the overall antioxidant activity. *J Sep Sci* **33**, 1192-1197. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900748>
- Correa-Betanzo J, Allen-Vercoe E, McDonald J, Schroeter K, Corredig M, Paliyath G (2014) Anthocyanins Inhibit Nuclear Factor-κB Activation in Monocytes and Reduce Plasma Concentrations of Pro-Inflammatory Mediators in Healthy Adults. *Food Chem* **137**, 1951-1954. <https://doi.org/10.1093/jn/137.8.1951>
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH (2002) Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem* **50**, 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Du J, Leng J, Zhang L, Bai G, Yang D, Lin H i sur. (2016) Angiotensin II-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells was inhibited by blueberry anthocyanin through Bax- and Caspase 3-dependent pathways. *Med Sci Monit* **22**, 3223–3228. <https://doi.org/10.12659/msm.896916>
- Faria A, Oliveira J, Neves P, Gameiro P, Santos-buelga C, De Freitas V (2005) Antioxidant Properties of Prepared Blueberry(*Vaccinium myrtillus*) Extracts. *J Agric Food Chem* **53**, 6896–6902. <https://doi.org/10.1021/jf0511300>
- Felgus-Lavefve L, Howard L, Adams SH, Baum JI (2022) The Effects of Blueberry Phytochemicals on Cell Models of Inflammation and Oxidative Stress. *Adv Nutr* **13**, 1279-1309. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab137>

Fernandes SS, Coelho MS, Salas-Mellado MM (2019) Bioactive Compounds as Ingredients of Functional Foods: Polyphenols, Carotenoids, Peptides From Animal and Plant Sources New. U: Campos MRS (ured.) Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications, 1.izd., Woodhead Publishing, Cambridge, str. 204-215. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.08.006>

Fracassetti D, Del Bo C, Simonetti P, Gardana C, Klimis-Zacas D, Ciappellano S (2013) Effect of Time and Storage Temperature on Anthocyanin Decay and Antioxidant Activity in Wild Blueberry (*Vaccinium angustifolium*) Powder. *J Agric Food Chem* **61**, 2999–3005. <https://doi.org/10.1021/jf3048884>

Ghafoor K, Ahmed IAM, Doğu S, Uslu N, Fadimu GJ, Al Juhaimi F i sur. (2019) The Effect of Heating Temperature on Total Phenolic Content, Antioxidant Activity, and Phenolic Compounds of Plum and Mahaleb Fruits. *Int J Food Eng* **15**, 20170302. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2017-0302>

Giergielewicz-Możajska H, Dąbrowski L, Namieśnik J (2010) Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples — Some Aspects of Theory and Practice. *Crit Rev Anal Chem* **31**, 149-165. <https://doi.org/10.1080/20014091076712>

Gonçalves AC, Nunes AR, Flores-Félix JD, Alves G, Silva LR (2022) Cherries and Blueberries-Based Beverages: Functional Foods with Antidiabetic and Immune Booster Properties. *Molecules* **27**, 3294. <https://doi.org/10.3390/molecules27103294>

Guiné RPF, Correia PMR, Ferrão AC, Gonçalves F, Lerat C, El-Idrissi T i sur. (2020) Evaluation of phenolic and antioxidant properties of strawberry as a function of extraction conditions. *Braz J Food Technol* **23**, 1-11. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.14219>

Heffels P, Weber F, Schieber A (2015) Influence of Accelerated Solvent Extraction and Ultrasound-Assisted Extraction on the Anthocyanin Profile of Different *Vaccinium* Species in the Context of Statistical Models for Authentication. *J Agric Food Chem* **63**, 7532–7538. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02255>

Hernández-Rodríguez P, Baquero LP, Larrota HR (2019) Flavonoids: Potential Therapeutic Agents by Their Antioxidant Capacity. U: Campos MRS (ured.) Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications, 1. Izd, Woodhead Publishing, Cambridge, str. 265-288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00014-1>

Huang W, Zhu Y, Li C, Sui Z, Min W (2016) Effect of blueberry anthocyanins malvidin and glycosides on the antioxidant properties in endothelial cells. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/1591803>

Hurtado-Romero A, Zepeda-Hernandez A, Uribe-Velazquez T, Rosales-De la Cruz MF, Raygoza-Murguía LV, Garcia-Amezquita LE i sur. (2023) Utilization of blueberry-based ingredients for formulating a synbiotic Petit Suisse cheese: Physicochemical, microbiological, sensory, and functional characterization during cold storage. *LWT* **183**, 114955. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114955>

Irigoytia MB, Irigoytia K, Sosa N, Pla ME, Genevois C (2022) Blueberry by-product as a novel food ingredient: physicochemical characterization and study of its application in a bakery product. *J Sci Food Agric* **102**, 4551-4560. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11812>

Jara-Palacios MJ, Santisteban A, Gordillo B, Hernanz D, Heredia FJ, Escudero-Gilete ML (2018) Comparative study of red berry pomaces (blueberry, red raspberry, red currant and blackberry) as source of antioxidants and pigments. *Eur Food Res Technol* **245**,

1–9. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3135-z>

Kaderides K, Goula AM, Adamopoulos KG (2015) A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. *IFSET* **31**, 204-215. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.08.006>

Kalt W, Cassidy A, Howard LR, Krikorian R, Stull AJ, Tremblay F i sur. (2020) Recent Research on the Health Benefits of Blueberries and Their Anthocyanins. *Adv Nutr* **11**, 224-236. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz065>

Kalt W, Lawand C, Ryan DAJ, McDonald JE, Donner H, Forney CF (2003) Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. *J Am Soc Hortic Sci* **128**, 917–923. <https://doi.org/10.21273/JASHS.128.6.0917>

Kalt W, McDonald JE, Donner H (2000) Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity of Processed Lowbush Blueberry Products. *J Food Sci* **65**, 390-393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16013.x>

Karlsen A, Retterstol L, Laake P, Paur I, Kjolsrud-Bohn S, Sandvik L i sur. (2007) Anthocyanins inhibit, Nuclear Factor kappa B-activation in monocytes and reduce plasma concentration of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr* **137**,1951-1954. <https://doi.org/10.1093/jn/137.8.1951>

Konczak I, Zhang W (2004) Anthocyanins-more than nature's colours. *J Biomed Biotechnol* **2004**, 239–240. <https://doi.org/10.1155/S1110724304407013>

Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem* **64**, 923–933. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2)

Lapornik B, Prošek M, Wondra AG (2004) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng* **71**, 214-222. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036>

Lee J, Wrolstad RE (2004) Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste. *J Food Sci* **69**, 564–573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13651.x>

Lee LS, Choi EJ, Kim CH, Sung JM, Kim YB, Seo DH i sur. (2016) Contribution of flavonoids to the antioxidant properties of common and tartary buckwheat. *J Cereal Sci* **68**, 181-186. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.005>

Liu Y, Liu Y, Tao C, Liu M, Pan Y, Lv Z (2018) Effect of temperature and pH on stability of anthocyanin obtained from blueberry. *J Food Meas Charact* **12**, 1744–1753. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9789-1>

M'hiri N, Ioannou I, Ghoul M, Boudhrioua NM (2014). Extraction Methods of Citrus Peel Phenolic Compounds. *Food Rev Int* **30**, 265–290. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.924139>

Michalska A, Łysiak G (2015) Bioactive Compounds of Blueberries: Post-Harvest Factors Influencing the Nutritional Value of Products. *Int J Mol Sci* **16**, 18642-18663. <https://doi.org/10.3390/ijms160818642>

- Michalska A, Wojdyła A, Lech K, Łysiak GP, Figiel A (2017) Effect of different drying techniques on physical properties, total polyphenols and antioxidant capacity of blackcurrant pomace powders. *LWT* **78**, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.008>
- Michiels JA, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J (2012) Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chem* **130**, 986-993. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.117>
- Mottaleb MA, Sarker SD (2012) Accelerated solvent extraction for natural products isolation. U: Sarker SD, Nahar L (ured.) *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology*, 3 izd, Springer, New York/ Dordrecht/ Heidelberg/ London, str. 75-87. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_4
- Nayak B, Dahmoune F, Moussi K, Remini H, Dairi S, Aoun O i sur. (2015) Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels, *Food Chem* **187**, 507-516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.081>
- Neto CC (2007) Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res* **51**, 652 – 664. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600279>
- Padmanabhan P, Correa-Betanzo J, Paliyath G (2016) Berries and Related Fruits. U: Caballero B, Finglas P, Toldra F (ured.) *Encyclopedia of Food and Health*, 1.izd., Academic Press, London, str. 364-371. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00060-X>
- Patthamakanokporn O, Puwastien P, Nitithamyong A, Sirichakwal PP (2008) Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J Food Compos Anal* **21**, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.10.002>
- Paiva YF, Figueirêdo RMF, Queiroz AJM, Amadeu LTS, Reis CG, Santos FS, i sur. (2023) Tropical red fruit blend foam mat drying: Effect of combination of additives and drying temperatures. *Foods* **12**, 2508–2519. <https://doi.org/10.3390/foods12132508>
- Perez C, Tagliani C, Arcia P, Cozzano S, Curutchet A (2017) Blueberry by-product used as an ingredient in the development of functional cookies. *FSTI* **24**, 301-308. <https://doi.org/10.1177/1082013217748729>
- Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J, Núñez MJ (2005) Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. *J Agric Food Chem* **53**, 2111–2117. <https://doi.org/10.1021/jf0488110>
- Proestos C, Komaitis M (2009) Antioxidant Capacity of Hops. U: Preedy VR (ured.) *Beer in Health and Disease Prevention*, 1.izd., Academic Press, London, str. 467-474. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00045-6>
- Putnik P, Bursać Kovačević D, Penić M, Fegeš, M, Dragović-Uzelac V (2016) Microwave-assisted extraction (MAE) of Dalmatian sage leaves for the optimal yield of polyphenols: HPLC-DAD identification and quantification, *Food Anal Method* **9**, 2385-2394. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0428-3>
- Rezaei S, Rezaei K, Haghghi M, Labbafi M (2013) Solvent and Solvent to Sample Ratio as Main Parameters in the Microwave-assisted Extraction of Polyphenolic Compounds from Apple Pomace. *Food Sci Biotechnol* **22**, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0212-8>

Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C (1996) Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Anal Chem* **68**, 1033-1039. <https://doi.org/10.1021/ac9508199>

Riihinen K, Jaakola L, Kärenlampi S, Hohtola A (2008) Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chem* **110**, 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.057>

Rodrigues E, Poerner N, Rockenbach II, Gonzaga LV, Mendes CR, Fett R (2011) Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. *Food Sci Technol* **31**, 911-917. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000400013>

Ryu D, Park HM, Koh E (2020) Effects of Solid-Liquid Ratio, Time, and Temperature on Water Extraction of Anthocyanin from Campbell Early Grape. *Food Anal Methods* **13**, 637–646. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01688-0>

Said KAM, Ismail AF, Karima ZA, Abdullaha MS, Hafeez A (2021) A review of technologies for the phenolic compounds recovery and phenol removal from wastewater. *PSEP* **151**, 257-289. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.05.015>

Saura-Calixto F (1998). Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *J Agric Food Chem* **46**, 4303-4306. <https://doi.org/10.1021/jf9803841>

Schmidt BM, Erdman JW, Lila MA (2005) Effects of Food Processing on Blueberry Antiproliferation and Antioxidant Activity. *J Food Sci* **70**, 389–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11461.x>

Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>

Szajdek A, Borowska EJ (2008) Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods Hum Nutr* **63**, 147–156. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0097-5>

Španić I (2016) Izolacija bioaktivnih spojeva iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (diplomski rad) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Tailor S, Bykova NV, Igamberdiev AU, Debnath SC (2017) Structural pattern and genetic diversity in blueberry (*Vaccinium*) clones and cultivars using EST-PCR and microsatellite markers. *J Genet Resour* **64**, 2071–2082. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0497-1>

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal* **19**, 669-675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>

Tsao R (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutr* **2**, 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>

- Tsuda T, Ueno Y, Yoshikawa T, Kojo H, Osawa T (2006) Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochem Pharmacol* **71**, 1184-1197. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.042>
- USDA (2019) FoodData Central Search Results, <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171711/nutrients>. Pristupljeno 29.lipnja 2024.
- Vander Kloet SP (1988) The genus *Vaccinium* in North America, 1. izd., Agriculture Canada Research Branch, Ottawa
- Vander Kloet SP, Dickinson TA (2009) A subgeneric classification of the genus *Vaccinium* and the metamorphosis of *V.* section *Bracteata* Nakai: more terrestrial and less epiphytic habit, more continental and less insular in distribution. *J Plant Res* **122**, 253–26. <https://doi.org/10.1007/s10265-008-0211-7>
- Villaño D, García-Viguera C, Mena P (2016) Colors: Health Effects. U: Caballero B, Finglas P, Toldra F (ured.) *Encyclopedia of Food and Health*, 1.izd., Academic Press, London, str. 265-272. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00190-2>
- Wanderley ROS, Figueirêdo RMF, Queiroz AJM, Santos FS, Silva APF, Paiva YF i sur. (2023) Effect of drying temperature on antioxidant activity, phenolic compound profile and hygroscopic behavior of pomegranate peel and seed flours. *LWT* **189**, 115514. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115514>
- Wang X, Wang M, Cao J, Wu Y, Xiao J, Wang Q (2017) Analysis of flavonoids and antioxidants in extracts of ferns from Tianmu Mountain in Zhejiang Province (China). *Ind Crops Prod* **97**, 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.013>
- Yang, H., Comstock, K., Lopez, L (2014) Comparison of soxhlet and accelerated solvent extraction for leachable and extractable analysis of packing material. *Thermo Scientific Application Note* **1108**, 1-9.
- Yang W, Guo Y, Liu M, Chen X, Xiao X, Wang S i sur. (2022) Structure and function of blueberry anthocyanins: A review of recent advances. *Food Chem* **88**, 104864. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104864>
- Yang Z, Zhai W (2010) Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *IFSET* **11**, 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.012>
- Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D (2007) Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res* **51**, 675 – 683. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700002>
- Zhang QW, Lin LG, Ye WC (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med* **13**, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Zhang X, Wang S, Wu Q, Battino M, Giampieri F, Bai W i sur. (2022) Recovering high value-added anthocyanins from blueberry pomace with ultrasound-assisted extraction. *Food Chem* **16**, 100476. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100476>
- Zhang Y, Liu W, Wei Z, Yin B, Man C, Jiang J (2021) Enhancement of functional characteristics of blueberry juice fermented by *Lactobacillus plantarum*. *LWT* **139**, 110590. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110590>

Zhang Z, Li X, Sang S, McClements DJ, Chen L, Long J i sur. (2022) Polyphenols as Plant-Based Nutraceuticals: Health Effects, Encapsulation, Nano-Delivery, and Application. *Foods* **11**, 2189. <https://doi.org/10.3390/foods11152189>

Zoratt L, Klemettilä H, Jaakola L (2016) Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Ecotypes. U: Simmonds M, Preedy VR (ured.) *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*, 1. izd., Academic Press, London, str. 83-99. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00004-0>

Zorić Z, Dragović- Uzelac V, Pedišić S, Kurtanjek Ž, Elez Garofulić E (2014) Kinetics of Anthocyanins, Phenolic Acids and Flavonols Degradation During Heat Treatments of Freeze-dried Sour Cherry *Marasca* Paste *Food technol biotech* **52**, 101-80.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Matea Rukavina izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Rukavina Matea

Vlastoručni potpis