

# Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na slobodne fenolne spojeve i antioksidacijsku aktivnost bučine pogače, heljde i prosa

---

**Braje, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:149675>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Martina Braje

742/PI



**UTJECAJ ULTRAZVUKA  
VISOKOG INTENZITETA NA  
SLOBODNE FENOLNE SPOJEVE I  
ANTIOKSIDACIJSKU  
AKTIVNOST BUČINE POGAČE,  
HELJDE I PROSA**



Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Nikoline Čukelj te uz pomoć asistentice Bojane Voučko, dip. ing. Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost: Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa (broj 3789).



*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Nikoline Čukelj na uloženom trudu i vremenu, iznimnoj susretljivosti, podršci te nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.*

*Najljepše se zahvaljujem asistentici Bojani Voučko, dip. ing. na pomoći, nesebičnom angažmanu i strpljenju pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.*

*Posebno hvala mojim roditeljima, sestri Katarini, bratu Karlu, dečku Martinu te ostalim članovima obitelji i prijateljima na podršci, razumijevanju i svemu što čine za mene.*





## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za kemiju i tehnologiju žitarica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA NA SLOBODNE FENOLNE SPOJEVE I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST BUČINE POGAČE, HELJDE I PROSA

*Martina Braje, 742/PI*

**Sažetak:** Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na učinkovitost oslobađanja fenolnih spojeva iz bučine pogače, heljde i prosa. Također je ispitivan i utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na antioksidacijski kapacitet navedenih sirovina. Tretman je proveden direktnim uranjanjem ultrazvučne sonde (promjera 22 mm, 400 W, 24 kHz) pri 100 % amplitudi, a vrijeme tretmana bilo je 5, 10 i 20 minuta. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva određivan je Folin-Ciocalteu metodom, antioksidacijski kapacitet spektrofotometrijski dok je rutin u heljdi određen tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Ultrazvuk visokog intenziteta je imao različiti utjecaj ovisno o vrsti tretiranog uzorka te vremenu tretmana. Najveći ekstrakcijski prinos ukupnih fenola i najveća antioksidacijska aktivnost za heljdu ostvarena je tretmanom od 10 minuta. Ultrazvuk visokog intenziteta je imao negativan ili neutralan utjecaj na ukupne fenole i antioksidacijsku aktivnost kod tretiranih uzorka bučine pogače i prosa te na sadržaj rutina. Iako je ultrazvuk visokog intenziteta netermalna metoda, njegov efekt zagrijavanja ima utjecaj na oslobađanje fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost.

**Ključne riječi:** bučina pogača, heljda, proso, ultrazvuk visokog intenziteta, ukupni fenolni spojevi, antioksidacijski kapacitet

**Rad sadrži:** 59 stranica, 23 slike, 7 tablica, 133 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Doc.dr.sc. Nikolina Čukelj

**Pomoć pri izradi:** Bojana Voučko, dip.ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak
2. Doc. dr.sc. Nikolina Čukelj
3. Izv. prof. dr. sc. Sandra Balbino
4. Doc. dr. sc. Klara Kraljić (zamjena)

**Datum obrane:** 20. srpnja 2017.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### **INFLUENCE OF HIGH INTENSITY ULTRASOUND TREATMENT ON FREE PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PUMPKINSEED CAKE, BUCKWHEAT AND MILLET**

*Martina Braje, 742/PI*

**Abstract:** This research aimed to investigate the effect of high intensity ultrasound on the release of phenolic compounds from buckwheat, millet and pumpkinseed cake, as well as to determine their antioxidant activity. The treatment was performed at the constant power of ultrasound (400 W) and the amplitude of 100%, while the extraction time was 5, 10 and 20 minutes. Phenolics were measured using the Folin-Ciocalteu method, the antioxidant activity was determined spectrometric, while rutin in buckwheat was determined by the high performance liquid chromatography. The ultrasound had a different effect depending on the type of the treated sample and treatment time. The highest total phenolics and antioxidant capacity of buckwheat was achieved after the 10 minute treatment. The ultrasound had a negative or neutral effect depends of treated material on total phenolics and antioxidant activity of millet and pumpkinseed cake and on the rutin content. The heating of the sample, which comes as a side effect of high intensity ultrasound had a significant effect on the release of phenolic compounds and antioxidant activity.

**Keywords:** pumpkinseed cake, buckwheat, millet, high intensity ultrasound, total phenolic, antioxidant activity

**Thesis contains:** 59 pages, 23 figures, 7 tables, 133 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Nikolina Čukelj, Assistant Professor

**Technical support and assistance:** Bojana Voučko, BSc

#### **Reviewers:**

1. PhD. Anet Režek Jambrak, Associate Professor
2. PhD. Nikolina Čukelj, Assistant Professor
3. PhD. Sandra Balbino, Associate Professor
4. PhD. Klara Kraljić, Assistant Professor.

**Thesis defended:** July 20, 2017.



# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. BUČA .....	3
2.2. PROSO .....	4
2.3. HELJDA .....	6
2.4. POLIFENOLNI SPOJEVI .....	8
2.4.1. Antioksidacijski učinak fenolnih spojeva .....	10
2.4.2. Fenolni spojevi bučine pogače .....	12
2.4.3. Fenolni spojevi prosa .....	13
2.4.4. Fenolni spojevi heljde .....	13
2.4.4.1. <i>Rutin</i> .....	12
2.5. ULTRAZVUČNI TRETMAN .....	14
2.5.1. Ultrazvuk .....	14
2.5.2 Princip ultrazvučnog tretmana .....	15
2.5.3. Ultrazvučna ekstrakcija i primjena ultrazvuka u poboljšanju antioksidacijskog kapaciteta .....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	17
3.1. MATERIJALI .....	18
3.1. 1. Uzorci .....	18
3.1.2. Kemikalije .....	18
3.1.2.1. <i>Priprema reagensa</i> .....	19
3.1.3. Aparatura i pribor .....	20
3.2. METODE RADA .....	21
3.2.1. Klasična i ultrazvučna ekstrakcija uzoraka .....	21
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola .....	22
3.2.2.1. <i>Priprema uzorka za ekstrakciju</i> .....	22
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta .....	24
3.2.3.1. <i>Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom</i> .....	24
3.2.3.2. <i>Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom</i> .....	26
3.2.4. Određivanje udjela rutina HPLC analizom .....	28
3.2.4.1. <i>Identifikacija i kvantifikacija spoja rutina</i> .....	29



3.2.5. Statistička obrada .....	30
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	32
4. 1. Udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost bučine pogače .....	34
4.2. Udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost prosa.....	37
4. 3. Udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost heljde.....	41
4.3.1. Udio rutina u etanolnom ekstraktu heljde .....	43
4.4. Dvostruko djelovanje ultrazvuka.....	45
4.5. Usporedba ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti bučine pogače, heljde i prosa .....	46
5. ZAKLJUČCI.....	47
6. LITERATURA.....	48





# 1. UVOD

Rastuća svijest ljudi o važnosti pravilne prehrane za održavanje zdravlja ističe i zdravstveno korisna svojstva fitokemikalija kao što su polifenolni spojevi. Iz istog razloga je i veliki broj istraživanja usmjeren identifikaciji novih izvora nutraceutika i drugih prirodnih i prehrambenih tvari s poželjnim funkcionalnim značajkama (Devi i sur., 2014).

Heljda je pseudožitarica koja se zbog sadržaja bioloških aktivnih komponenti, kao što su vitamini, antioksidansi i fitosteroli, smatra „funkcionalnom hranom“. Heljda je i bogat izvor rutina, flavonoida koji ima pozitivan utjecaj na zdravlje. Također, ona je bezglutenska pseudožitarica zbog čega ju mogu konzumirati i ljudi oboljeli od celijakije (Kreft i sur, 2006; Dziedzic i sur., 2015). Osim heljde, još jedna važna bezglutenska žitarica je proso, koji također ima pozitivan učinak na zdravlje, a koji se pripisuje polifenolima i vlaknima koje sadrži (Devi i sur., 2014).

Uslijed proizvodnje bučinog ulja nastaju velike količine nusproizvoda, bučine pogače, koja sadrži nezanemarljive količine zaostalog ulja, proteina, hranjivih tvari i minerala. Budući da ne sadrži antinutrijente, bučina pogača ima veliki potencijal kao hranjivi prehrambeni proizvod (Tamer i Čopur, 2014).

Prehrambena industrija danas pokazuje veliki interes za primjenu novih tehnika obrade hrane, a jedna od njih je upotreba ultrazvuka visokog intenziteta (UVI). Primjena ultrazvuka ranije je bila uglavnom ograničena na čišćenje i emulgiranje dok se danas otkrivaju prednosti uporabe ultrazvuka u različitim procesima, primjerice kristalizaciji, sušenju, ekstrakciji, filtraciji, zamrzavanju, homogenizaciji, sterilizaciji, degradaciji, itd. (Mason, 1992; Povey, 1998; Fairbanks, 2001). Tako se u ekstrakciji djelovanjem ultrazvuka visokog intenziteta poboljšava bioraspoloživost mikronutrijenata pri čemu se zadržavaju njihova izvorna svojstva (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Tijekom djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta, kavitacije uzrokuju bubrenje stanica i probijanje staničnih stijenki, što omogućuje visoke brzine difuzije kroz staničnu stjenku te omogućuje učinkovitije oslobađanje staničnog materijala (Vinatoru, 2001).

Stoga je cilj ovoga rada bio istražiti utjecaj tretmana ultrazvuka visokog intenziteta na učinkovitost oslobađanja slobodnih fenolnih spojeva iz bučine pogače, heljde i prosa primjenom ultrazvuka visokog intenziteta. Također je ispitivan i utjecaj UVI na antioksidacijski kapacitet navedenih sirovina. Tretman je proveden upotrebom ultrazvučne sonde promjera 22 mm, 24 kHz, snage 400 W i amplitude ultrazvuka visokog intenziteta od

100 %, a vrijeme tretmana bilo je 5, 10 ili 20 minuta. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) određivan je Folin-Ciocalteu metodom, antioksidacijski kapacitet određivan je DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) i FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metodom spektrofotometrijski, dok je sadržaj rutina u heljdi određivan tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV/Vis Photo Diode Array (PDA) detekciju.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BUČA

Buča, tikva ili bundeva pripada porodici *Cucurbitaceae* (rod *Cucurbita*) koja broji više od 825 vrsta. Između ostalih ovdje spadaju dinje, lubenice i krastavci (Henriques i sur., 2012). Bundeve se obično svrstavaju i kao povrće i originalno potječu iz Latinske Amerike. One su jednogodišnje biljke puzave stabljike ili loze. Jestivi su plodovi, cvjetovi i koštice bogate uljem (Yadav i sur., 2010). Prema teksturi i obliku stabljike dijele se na *Cucurbita pepo* (Slika 1), *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima* i *Cucurbita mixta* (Xanthopoulou, 2009).



**Slika 1.** Buča *Cucurbita pepo* (Anonymous, 2010)

Bundeve su bogate vodom, vitaminima, antioksidansima i karotenom (provitamin A) koji štiti tijelo i sprječava prerano starenje (Caniço i sur., 2005). Također, ovo je povrće poznato po svojstvima svojih sjemenki koje su bogate mastima, proteinom, tiaminom, niacinom i raznim mineralima (Almeida, 2006).

Bučine sjemenke i ulje imaju mnoge zdravstvene prednosti koje im se pripisuju zbog njihovih makro i mikro sastojaka. Oni su bogat prirodni izvor proteina, triterpena, lignana, fitosterola, višestruko nezasićenih masnih kiselina, antioksidacijskih fenolnih spojeva, karotenoida, tokoferola i minerala (Fu i sur., 2006). Jedna od najvažnijih zdravstvenih prednosti koje se pripisuje bučinom ulju jest djelovanje protiv benigne hiperplazije prostate.

Tablica 1 prikazuje kemijski sastav bučnih sjemenki.

**Tablica 1.** Kemijski sastav bučinih sjemenki (Milovanović i sur., 2014)

Sastav	Udio (%)
Vlaga	5,26
Pepeo	3,26
Proteini	24,46
Ulje	38,53
Vlakna	14,77
Škrob	13,72

Nakon mehaničkog prešanja sjemenki uljarica, kao nusprodukt nastaje pogača koja ima veliki potencijal za primjenu u prehrambenoj industriji jer sadrži znatne količine zaostalog ulja, bogata je proteinima, hranjivim tvarima i mineralima te ne sadrži organska otapala (Tamer i Čopur, 2014). Osim navedenog, ona sadrži fenolne spojeve (Ratz-Lyko i Arct, 2015). Pogaču bučinih koštica moguće je koristiti za prehranu stoke, ali zbog visoke nutritivne vrijednosti u posljednje vrijeme se plasira na tržište samljevena u obliku bučinog brašna. Ono je, za razliku od pšenice, bogato vlaknima, zbog čega poboljšava crijevnu funkciju i izaziva osjećaj sitosti, što je bitno u kontroli tjelesne težine. Osim toga, ono ne sadrži gluten zbog čega se preporuča bolesnicima koji ne podnose gluten, a pate od posljedice nedostatka mikronutrijenata sadržanih u buči kao što su kalcij, magnezij, cink, vitamini A,B i D (Wierdsma i sur., 2003; Almeida, 2006).

## 2.2. PROSO

Proso je jedno od najvažnijih usjeva koji su otporni na sušu i šesta po redu žitarica u smislu svjetske poljoprivredne proizvodnje. Također, proso je otporno na štetnike i bolesti, kratke je sezone rasta i vrlo je produktivan u uvjetima suše u usporedbi s glavnim žitaricama (Devi i sur., 2011). Najvažnije su vrste *Pennisetum glaucum*, *Eleusine coracana*, *Paspalum setaceum*, *Penicum miliaceum*, *Echinochloa utilis*. Proso je prihvaćeno kao funkcionalna hrana i nutraceutik jer sadrži prehrambena vlakna, proteine, energiju, minerale, vitamine i antioksidanse koji su pokazali brojne pozitivne utjecaje na ljudsko zdravlje (Saleh i sur., 2013).



**Slika 2.** *Proso millet* (Anonymous, 2015)

Prema FAO-listi iz 2012. godine, najveći je svjetski proizvođač prosa Indija s 334 500 tona godišnje, što iznosi 43,85% ukupne svjetske proizvodnje. Slijede je Niger, Nigerija, Senegal, Kina, Rusija i drugi. Trenutno, proso nije jedan od najvažnijih artikala u sjevernoameričkim i europskim košaricama, ali se ističe važnost prosa kao cjelovite žitarice i žitarice bez glutena. Osim toga, u mnogim afričkim i azijskim područjima proso služi kao glavni sastojak prehrane i raznih tradicionalnih oblika hrane i pića, kao što su kruh (fermentirani ili nefermentirani), kaša i snack hrana, posebno kod siromašnijeg stanovništva (Chandrasekara i Shahidi, 2011; Chandrasekara i sur., 2012). Također, proso se može koristiti i u proizvodnji bioetanola i biofilmova (Li i sur., 2008).

**Tablica 2.** Kemijski sastav vrste oljuštenog zrna običnog prosa (Bagdi i sur., 2011)

Sastav	Udio (%)
<b>Polisaharidi</b>	80,1
<b>Proteini</b>	11,58
<b>Masti</b>	4,9
<b>Vlakna</b>	0,7

Obično proso (engl. *proso millet*) (Slika 2) sadrži najveći udio i najkvalitetnije proteine u usporedbi s ostalim vrstama (Geervani i Eggum, 1989, FAO, 1995). Naime, kao što je to prikazano u Tablici 2, sadrži 11,58 % proteina. Ono je bogat izvor važnih aminokiselina (leucin, izoleucin metioninom) (Kalinova i Moudry, 2006), dok je sadržaj lizina limitiran te iznosi 1,4-4,3 (Dendy, 1995; FAO, 1995; Kalinova i Moudry, 2006). Najveći udio mineralnih komponenata nalazi se u perikarpu, aleuronskom sloju i klici. Obično proso je izrazito bogato kalijem, ali i željezom i magnezijem. Također, ono je dobar izvor cinka i bakra, ali je izrazito siromašan kalcijem (Kalinova, 2007). S druge strane, proso je bogato vitaminima B1 i B2 čiji

je iznos dva puta veći nego u pšenici i ječmu (Kalinova, 2007). Osim toga, proso ne sadrži gluten i stoga je preporučljiv za osobe oboljele od celijakije (Chandrasekara i Shahidi 2010). Međutim, proso također sadrži fitate (0,48%), polifenole, tanine (0,61%), inhibitore tripsina i prehrambenih vlakana, koji su nekad bili smatrani "antinutrijentima" zbog kelacije metala i inhibicije enzima (Thompson 1993), ali su danas oni nazvani neutraceuticima. Omotač prosa bogat je izvor fitokemikalije, kao što su prehrambena vlakna i polifenoli (0.2-3,0%) (Ramachandra i sur., 1977; Hadimani i Malleshi, 1993). Utvrđeno je da fitati, polifenoli i tanini mogu pridonijeti antioksidacijskoj aktivnosti prosa te su važni čimbenici u zdravlju, starenju i metaboličkim bolestima (Bravo, 1998).

Pored njegove nutritivne vrijednosti, proso ima nekoliko potencijalnih zdravstvenih prednosti, koristi se za sprečavanje raka i kardiovaskularnih bolesti, smanjenje pojava tumora, snižavanje krvnog tlaka, smanjenje rizika od bolesti srca, kolesterola i brzine apsorpcije masti te odgađanje pražnjenja želuca (Saleh i sur., 2013). Prije konzumacije i pripreme hrane, obično se prerađuje uobičajenim tradicionalnim tehnikama koje uključuju dekortiranje, proizvodnju slada, fermentaciju, prženje, ljuštenje i mljevenje kako bi se poboljšala prehrambena i senzorska svojstva (Saleh, 2013).

### **2.3. HELJDA**

Rod *Fagopyrum*, član obitelji *Polygonaceae*, sastoji se od 15 vrsta koje se uglavnom uzgajaju u sjevernoj temperaturnoj zoni. U Kini se javlja ukupno 10 vrsta i jedna podvrsta, uključujući tri važne vrste heljde: *Fagopyrum esculentum* (*F. esculentum*) Moench. (obična heljda), *Fagopyrum tataricum* (*F. tataricum*) (L.) Gaertn. (tatarska heljda) i *Fagopyrum dibotrys* (*F. dibotrys*) (D. Don) Hara (višegodišnja heljda) (Li, 2003).

*F. esculentum* (Slika 3) i *F. tataricum* dva su važna roda, a njihovo se sjeme konzumira kao "funkcionalna hrana" (Kim i sur., 2008; Inglett i sur., 2011), osobito zbog njihove visoke kvalitete proteina, fenolnih spojeva i dobro uravnoteženih esencijalnih aminokiselina i minerala (Wijngaardi i Arendt, 2006). Obična heljda ima industrijski značaj, dok se tatarska heljda uglavnom koristi kao stočna hrana (Dziedzic i sur., 2015).

Glavni su nedostaci kod uzgoja heljde niži prinos zrna, kao i činjenica da njezine sjemenke sazrijevaju nesinkronizirano te zbog toga nastaju mnogi problemi kod berbe u usporedbi s ostalim žitaricama (Ahmed i sur., 2014). Heljda je ekološki vrlo prilagodljiva, što joj omogućuje rast u gotovo svim vrstama ekstremnih okruženja (Li i Zhang, 2001). Glavna uzgojna područja nalaze se u Aziji, a posebno u jugoistočnoj Aziji (Ahmed i sur., 2014), dok su glavni svjetski proizvođači Rusija, Kina, Ukrajina, Francuska, Poljska i SAD. Prema FAO-

listi iz 2014. godine, Rusija je proizvela 661 764 tone, dok je proizvodnja heljde u Hrvatskoj izrazito mala sa svega 495 tona.



**Slika 3.** Slika heljde *F. esculentum* (Anonymous, 2012)

Heljda je izvor mnogih nutritivnih i bioaktivnih elemenata uključujući polifenole kao što je rutin; katehin (Watanabe, 1998); inozitol derivati, poznati kao fagopiritoli (Steadman i sur., 2000); proteini; škrob, topljiva vlakna, neki minerali, vitamini i druge bioaktivne komponente (Krkoskova i Mrazova, 2005). Ukupni sadržaj ovih komponenata ovisi o različitim čimbenicima, kao što su vrsta i okoliš (Barta i sur., 2004; Qin i sur., 2010). Važno je naglasiti kako vlakna heljde ne sadrže fitinsku kiselinu koja je glavni anti-nutritivni faktor kod pšenice (Steadman i sur., 2001). Također, heljda sadrži d-kiro-inozitol, sastavni posrednik inzulina, koji pridonosi regulaciji razine glukoze u krvi (Kawa i sur., 2003).

Heljda je izrazito bogata masnim kiselinama i to s 800 mg g<sup>-1</sup> nezasićenih masnih kiselina od kojih je 40 mg g<sup>-1</sup> polinezasićenih masnih kiselina (Steadman i sur., 2001). Osim toga, heljda je izrazito dobar izbor brojnih esencijalnih minerala. Naime, ona je izrazito bogata cinkom, bakrom i kalijem. Osim minerala, heljda sadrži visok udio vitamina B1 (tiamin), B2 (riboflavin), E (tokoferola) i B3 (niacin i niacinamid) u usporedbi s ostalim žitaricama. Generalno, *L. Tartaricum* heljda sadrži više vitamina B1, B2 i B3, ali manje vitamina E u usporedbi s *L. Esculentum* heljdom (Bonafaccia i sur., 2003; Ikeda i sur., 2006).

Heljdino brašno, dobiveno lomljenjem heljdinog zrna, samo u tragovima sadrži proteine kao što su glijadin i glutenin, i zbog toga ga ljudi koji boluju od celijakije mogu koristiti kao zamjenu za brašno. Brašno obične heljde je bogatije proteinima, lipidima, ukupnim i topljivim vlaknima te peplom u odnosu na brašno tatarske heljde ( Tablica 3) (Bonafaccia i Fabjan, 2003).

Heljda sadrži visoke razine vitamina B, uglavnom tiamina, dakle, vrijedan je dodatak prehrani, posebno za one ljude koji izbjegavaju mesne proizvode. Heljda je bogat izvor fitosterola (Dziedzic i sur., 2015). Konzumacijom heljдинih proizvoda smanjuje se apsorpcija



kolesterola u crijevima zbog sličnosti u molekularnoj strukturi između kolesterola i fitosterola sadržanih u heljdi (Christa i Soral-Šmietana, 2008; Ferretti i sur., 2010).

**Tablica 3.** Kemijski sastav heljdina brašna (izraženo u % na suhu tvar) (Bonafaccia i Fabjan, 2003)

Vrsta	Proteini	Pepeo	Lipidi	Topljiva vlakna	Netopljiva vlakna	Ukupna vlakna
Obična heljda	11	2,6	3,4	1,2	5,3	6,5
Tatarska heljda	10,3	1,8	2,5	0,5	5,8	6,3

## 2.4. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenolni su spojevi sekundarni biljni metaboliti prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. Danas je poznato više od 8 000 različitih polifenolnih spojeva, od jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline do složenijih struktura kao što su tanini (Slika 4). To su spojevi koji sadrže jedan ili više aromatskih prstena na koje su vezane jedna ili više hidroksilnih skupina (Dai i Mumper, 2010). Ovi spojevi mogu se svrstati u različite skupine, ovisno o broju fenolnih prstenova koji sadrže i strukturnih elemenata koji su vezani na prstenove (Manach i dr., 2004). Na slici 4. prikazana je osnovna podjela polifenola.



**Slika 4.** Podjela polifenola na temelju njihovih kemijskih struktura i primjeri (Tsao, 2010; Bašić i Vibovec, 2013)

Prvenstveno se pojavljuju u konjugiranim oblicima, s jednim ili više ostataka šećera povezanih s hidroksilnim skupinama, iako postoje i direktne veze šećera (polisaharida ili monosaharida) na aromatski ugljik. No, svi nastaju od zajedničkog intermedijera, fenilalanina, odnosno bliskog prekursora, šikiminske kiseline (Pandey i Rizvi, 2009). Njihov sadržaj ovisi o mnogim čimbenicima kao što su klimatski i agrotehnoški uvjeti u uzgoju i berbi, zrelost zrna, vrijeme žetve, uvjeti skladištenja, učinak genetskih čimbenika i sorta (Leskošek-Čukalović, 2002).

Polifenoli u biljkama pridonose pigmentaciji biljaka. Osim toga, oni djeluju kao antibiotici, prirodni pesticidi i signalne molekule, djeluju kao zaštitni agensi od UV-zračenja, privlače oprašivače i djeluju kao izolacijski materijal za stvaranje stanične strukture, dok u namirnicama pridonose gorčini, oštrini, boji, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti (Naczki i Shahidi, 2004).

Antioksidacijska aktivnost polifenola očituje se u sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, ali i inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres, odnosno indukciji “antioksidativnih” enzima (Escarpa i Gonzalez, 2001). Polifenoli ujedno imaju sposobnost keliranja metala (López-Cueto i sur., 2004) te vezanja ugljikohidrata i proteina s pomoću hidroksilnih skupina (Escarpa i Gonzalez, 2001).

#### 2.4.1. Antioksidacijski učinak fenolnih spojeva

Antioksidansi su molekule koje mogu donirati jedan elektron ili vodikov atom nekom reaktivnom, slobodnom radikalu. Vršu ulogu neutralizacije slobodnih radikala i na taj način štite ljudski organizam od mogućih bolesti, ali i usporavaju kvarenje hrane bogate lipidima (Pryor, 1991; Kinsellaisur., 1993). Kad se slobodni radikali ne bi uklanjali, to bi rezultiralo oksidacijskim stresom koji može uzrokovati teške metaboličke poremećaje i zbog toga je vrlo bitno da je uspostavljena ravnoteža između oštećenja koje radikali i oksidansi izazivaju na površinskim membranama i receptorima antioksidacijske reparacije (Kazazić, 2004).

Polifenoli su sekundarni metaboliti koje biljke proizvode kako bi se zaštitile od drugih organizama. Pokazano je da dijetetski polifenoli igraju važnu ulogu u ljudskom zdravlju. Visok unos voća, povrća i cjelovitih žitarica bogatih polifenolima povezan je s nižim rizicima mnogih kroničnih bolesti uključujući rak, kardiovaskularnu bolest, kroničnu upalu i mnoge degenerativne bolesti (Milner, 1994; Duthie i Brown, 1994). Polifenoli su izvrsni antioksidansi jer sadrže fenolnu skupinu koja može primiti elektron stvarajući pritom fenoksil-radikal koji je relativno stabilan radikal, a na taj se način prekida lančana reakcija oksidacije u staničnim komponentama (Kehrer i Smith, 1994). Također, zaustavljanje reakcije se pripisuje i hidroksilnim skupinama, osobito u 3'OH i 4'OH lancu (Goufo i Trindade, 2014). Naime, antioksidacijska aktivnost većine polifenolnih antioksidansa ovisi o rasporedu i ukupnom broju hidroksilnih skupina (Cao i sur., 1997; Burda i Oleszek, 2001).

Veću antioksidacijsku aktivnost imaju polifenoli koji sadrže kateholnu skupinu (aromatski prsten s dvije hidroksilne skupine u orto-položaju) nego polifenoli s jednostavnom fenolnom skupinom (Scalbert i sur., 2005).

Antioksidacijsko svojstvo danas se najčešće mjeri TEAC-vrijednošću (Trolox equivalent antioxidant activity) koja je definirana kao mmol dm<sup>-3</sup> koncentracija otopine, u vodi topljivog analoga vitamina E, troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), ekvivalentne antioksidacijske aktivnosti kao i 1 mmol dm<sup>-3</sup> otopina ispitivanog flavonoida (Miller i sur., 1993; Rice-Evans i Miller, 1994).

Flavonoidi mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko mogućih načina. Najvažniji je onaj u kojemu djeluju kao hvatači slobodnih radikala i tako prekidaju lančanu reakciju slobodnog radikala (Kazazić, 2004). Osim navedenog, oni imaju sposobnost helirati metalne ione, što pridonosi njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti.

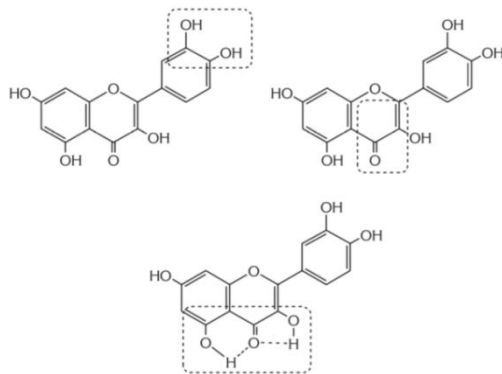
Prema Verstraeten i suradnicima (2003), flavanoli i procijanidina mogu reagirati s membranskim fosfolipidima preko vezanja vodikana polarne glavne skupine fosfolipida. Kao posljedica, ti se spojevi mogu akumulirati na površini membrane, kako izvan tako i unutar stanice. Kroz ovu vrstu interakcije, kao što sugeriraju, odabrani flavonoidi pomažu u održavanju integriteta membrana sprečavanjem pristupa štetnim molekulama preko hidrofobnog dvosloja, uključujući i one koji mogu utjecati na membransku reologiju i one koji induciraju oksidativna oštećenja membranskih komponenti. S druge strane, *in-vitro* studije pokazale su da flavonoidi mogu izravno ukloniti molekularne vrste aktivnog kisika: O<sub>2</sub>- superoksid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - hidrogen peroksid, OH- hidroksil radikal, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-kisik ili peroksil radikal. Njihovo antioksidacijsko djelovanje uglavnom se odražava na njihovoj sposobnosti da doniraju elektrone ili atome vodika (Arora i sur., 1998; Khan i sur., 2000; Sakihama i sur., 2000). Polifenoli posjeduju idealnu kemijsku strukturu za ovu aktivnost i pokazali su se *in-vitro* učinkovitijima od vitamina E i C na molekularnoj osnovi (Rice-Evans i sur., 1997). Kao što su opisali Bors i suradnici (1990), postoje tri strukturne značajke koje su važne odrednice za antioksidacijski potencijal flavonoida (Slika 5):

A) orto 3', 4'-dihidroksi struktura u B prstenu (npr. katehin, kvercetin)

B) 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-oksom skupinom u C prstenu (što omogućuje povezivanje između prstena A i B, ili delokalizacija elektrona)

C) prisutnost 3-OH skupine u prstenu C i 5-OH skupina u prstenu A.

Među njima je 3-OH skupina najznačajnija odrednica aktivnosti koja donosi elektrone. Glikozilirani flavonoidi gube svoju aktivnost u usporedbi s aglikonima (Rice-Evans i sur., 1996; Yamasaki i sur., 1997).



**Slika 5.** Strukturne skupine važne za hvatanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004)

#### 2.4.2. Fenolni spojevi bučine pogače

Tijekom proizvodnje ulja iz bučinih sjemenaka, kao nusprodukt nastaje bučina pogača koja sadrži aktivne komponente, uključujući polifenole. U svome su istraživanju Ratz-Łyko i Arct (2015) dokazali kako ekstrakti pogače *L. usitatissimum* i *C. pepo* imaju visoku antioksidacijsku aktivnost. Najveći je dio fenolnih spojeva prisutan u obliku glikozida i estera za koje je karakteristična niža antioksidacijska i antimikrobna aktivnost. Također, i njihova je bioraspoloživost niža u usporedbi s oblikom slobodnog aglikona. No, ekstrakcija aktivnih komponenata, pogotovo terpena, flavonoida i fenolnih kiselina, otežana je u tehnološkom smislu zbog činjenice da su neki aktivni spojevi povezani s ugljikohidratima (Ratz-Łyko i Arct, 2015).

Analizom pogače *C. pepo* pogače identificirani su sekoisolariciresinol, tirosola, vanilinska kiselina, kafeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, sinapinska kiselina, vanilin, luteolin, kvercetin, kempferol te velika količina glikozida (alfa i beta). Biološka svojstva polifenola i prisutnost proteina i ugljikohidrata u pogačama *L. usitatissimum* i *C. pepo* sugeriraju da se mogu koristiti kao vrijedan izvor funkcionalnih sastojaka hrane, na primjer kao dodatak kruhu, grickalicama, prehrambenim dodacima, životinjskoj hrani i likao kozmetički sastojak (Ratz-Łyko i Arct, 2015).

#### 2.4.3. Polifenolni spojevi prosa

Proso je bogat izvor fitokemikalija i mikronutrijenata. Fitokemikalije su fenoli, lignani,  $\beta$ -glukan, inulin, otporni škrob, fitati, steroli, tokoferoli, dijetalna vlakna (Devi i sur., 2011) i karotenoidi. Fenoli nisu podjednako raspoređeni u zrnu i uglavnom su koncentrirani u vanjskim slojevima. Naime, histokemijskim pregledom zrelog zrna dokazano je da je gotovo 60% polifenola u prosu koncentrirano u sjemenskom omotaču koji čini oko

12% mase sjemena. Oni postoje kao slobodni, topivi konjugati i netopljivi vezani oblici (Devi i sur., 2014). Obično proso sadrži 0,05-0,10 mg fenola na 100 g ekvivalenta katehina (Dendy, 1995). Glavni polifenoli su fenolne kiseline i tanini, dok su flavonoidi prisutni u malim količinama i oni djeluju kao antioksidanti i igraju mnoštvo uloga u imunološkom sustavu (ChandrasekaraiShahidi, 2010). Glavne su fenolne kiseline ferulinska kiselina (glavna vezana fenolna kiselina), *p*-kumarinska kiselina, dehidromeri ferulinske kiseline i topljiva klorogenska kiselina (Kalinova, 2007). Udio tanina iznosi 0,055-0,178% ekvivalenta katehina, tamno obojano zrno (crno i smeđe) sadrži znatno veći udio tanina u odnosu na svijetlo obojano zrno (Lorenz, 1983; Odumodu, 1992). Polifenoli u interakciji s proteinima čine tanin-protein kompleks (Salunkhe i sur., 1985) te na taj način smanjuju probavljivost proteina. Također, oni se vežu i na amilazu i na taj način blokiraju dehidraciju škroba (Kalinova, 2007). Kondenzirani tanini općenito su moćniji antioksidansi od svojih odgovarajućih monomera (Devi i sur., 2014).

#### 2.4.4. Fenolni spojevi heljde

Sjeme i ljuska heljde sadrže sastojke koji imaju biološku aktivnost, tj. flavonoide i flavone, fenolne kiseline, kondenzirane tanine, fitosterole, fagopirine, dijetalna vlakna, lignane, biljne sterole, vitamine i minerale (Ahmed i sur., 2014). Hung i Morita (2008) su otkrili da heljda sadrži većinu fenolnih spojeva prisutnih u slobodnom obliku koji se distribuira u cijelom zrnu. Tako brašno, ljuska i ekstrakti cijele heljde pokazuju visoku antioksidacijsku aktivnost (Quettier-Deleu i sur., 2000; Holasova i sur., 2002). Primarni antioksidansi u heljdi su rutin, kvercetin, hiperin i katehini (Morishita i sur., 2007). Cijela heljda drži 2-5 puta više fenolnih spojeva od zobi ili ječma, dok mekinje od heljde i njezina ljuska imaju 2-7 puta veću antioksidacijsku aktivnost od ječma, tritikala i zobi (Holasova i sur., 2002; Zdunczyk i sur., 2006). Tatarska heljda sadrži veću koncentraciju flavonoida (19,02 mg g<sup>-1</sup>) u usporedbi s običnom heljdom (28 mg g<sup>-1</sup>) (Jiang i sur., 2007). Sadržaj i sastav flavonoida u sjemenu variraju između različitih vrsta heljde i faza razvoja. Flavonoidni sadržaj u *F. tataricum* je općenito veći od onog u *F. esculentum*. U *F. tataricum* sjemenke sadrže oko 40 mg g<sup>-1</sup> flavonoida dok je sjemenke *F. esculentum* oko 10 mg g<sup>-1</sup> (Li i Zhang, 2001).

##### 2.4.4.1. Rutin

Rutin (kvercetin-3-rutinozid) je flavonol glikozid koji je sintetiziran u višim biljkama kao zaštitnik protiv ultraljubičastog zračenja i bolesti (Gaberščik i sur., 2002;

Rozema i sur., 2002). On je široko prisutan u biljkama, ali se relativno rijetko nalazi u jestivim dijelovima, a prvi je put detektiran u ruti (*Ruta graveolens*) (Chen i sur., 2001). Između voća, povrća i žitarica, grožđe i heljda sunajvažnije namirnice koje sadrže rutin. Osim u heljdi, rutin nije pronađen u drugim žitaricama ili pseudožitaricama, koje se mogu koristiti kao dobar izvor dijetalnog rutina (Bonafaccia i sur., 2003).

Sadržaj rutina ovisi o genotipu heljde, uvjetima rasta, fazi rasta, dijelu biljke i godini žetve (Lachmann i Adachi, 1990). Različite sorte heljde mogu imati različiti sadržaj rutina (Ohsawa i Tsutsumi, 1995). Najviše se rutin akumulira tijekom cvjetanja (iznad 0,12 mg g<sup>-1</sup> s. tv.), u stabljici (0,004-0,01 mg g<sup>-1</sup> s.tv.), u gornjim listovima (0,08-0,10 mg g<sup>-1</sup> s. tv.) (Hagels, 1999) i 0,12-0,36 mg g<sup>-1</sup> s.tv. u zrnu, ovisno o vrsti i uvjetima rasta (Kitabayashi i sur., 1995; Brunori i sur., 2010; Park i sur. 2011). Najveća količina rutina nalazi se u listovima neposredno prije cvjetanja (Michalova i sur., 1998). Na temelju istraživanja koje su proveli Park i sur. (2004), pronađeno je da je sadržaj rutina u sjemenu i dijelovima biljke tatarske heljde veći od onog u *F. esculentum* i *F. Cymosum*.

Također, rutin pruža zaštitu od oštećenja probavnog sustava, poboljšava vid i sluh, štiti od UV-svjetla, snižava kolesterol u plazmi, štiti od oksidativnog stresa (Gong i sur., 2010), uzrokuje hipertrofiju mišića (Gaberščik i sur., 2002), a također smanjuje formiranje žučnih kamenaca i razinu kolesterola (Kuntić i sur. 2011). Guo i sur. (2007) zaključili su da je dodavanje rutina u smjesu brašna izazvalo značajan porast u probavljivosti pepsina.

## **2.5. ULTRAZVUČNI TRETMAN**

Prehrambeni proizvodi, kao što su voće i povrće, masti i ulja, šećer, mliječni proizvodi, meso, kava i kakao te brašno složeni su od mješavine vitamina, šećera, proteina i lipida, vlakana, aroma, pigmenata, antioksidansa i drugih organskih i mineralnih spojeva. Prije nego što se takvi proizvodi komercijaliziraju, oni moraju biti obrađeni i konzervirani (Chemat i sur., 2011). Zbog negativnih posljedica koji se javljaju uslijed primjene konvencionalnih metoda, pribjegava se primjeni novih tehnika, a jedna od takvih je primjena ultrazvučne obrade

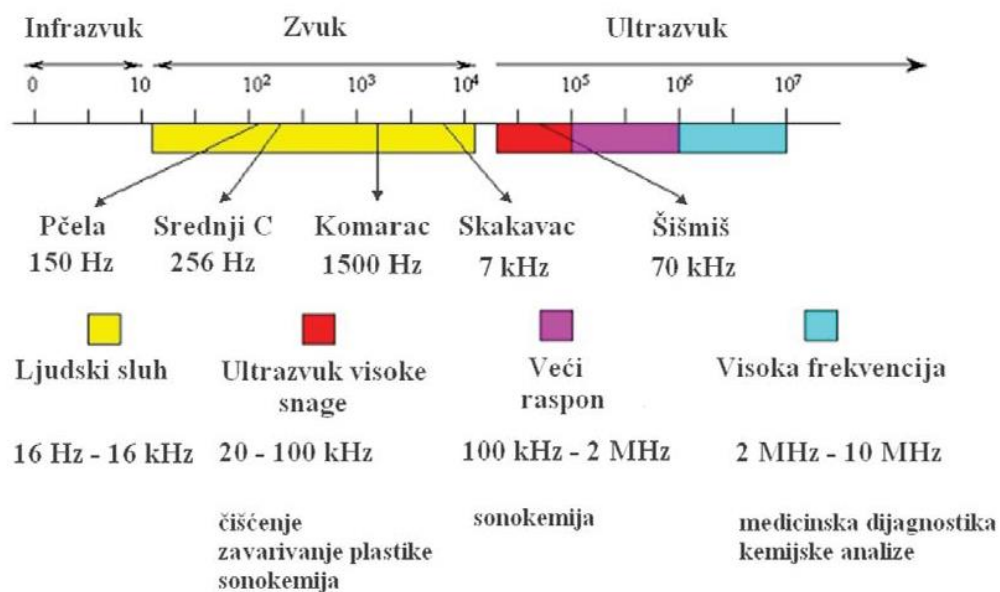
### **2.5.1. Ultrazvuk**

Upotreba ultrazvuka u prehrambenoj industriji predmet je istraživanja i razvoja nekoliko desetaka godina te se upotrijebljeni rasponi zvuka mogu općenito podijeliti na:

1. Dijagnostički ultrazvuk (raspon u MHz) - ultrazvučni valovi niskog intenziteta
2. Ultrazvuk visoke snage (raspon u kHz) - ultrazvučni valovi visokog intenziteta.

S obzirom na različite frekvencije, oni imaju različitu primjenu i razinu snagu ( Slika 6).

Ultrazvučne valove niskog intenziteta karakterizira visoka frekvencija (1-10 MHz) te male razine snage (manje od 1 W/ cm<sup>2</sup>). Oni ne uzrokuju fizikalna i kemijska oštećenja materijala kroz koje prolaze, a mogu se rabiti u analitičke svrhe za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane te za površinsko čišćenje hrane, utjecaj na enzime, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, kristalizaciju, emulgiranje, filtraciju, procese sušenjai smrzavanja, kao i za omekšavanje mesa. Za razliku od toga, ultrazvučne valove visokog intenziteta karakterizira niska frekvencija (20 do 100 kHz) te visoka razina snage (10 do 1000 W/ cm<sup>2</sup>). Takvi valovi, zbog velike snage kojom djeluju na materijal, uzrokuju fizička oštećenja tkiva kao i određene kemijske reakcije. Ultrazvuk visokog intenziteta, tijekom prolaska kroz materijal, uzrokuje ubrzavanje kemijskih reakcija, povećavanje brzine difuzije, dispergiranje agregata, ali i uništenje enzima i mikroorganizama (Herceg i sur., 2009).



**Slika 6.** Područje podjele zvuka prema frekvencijama (Mason, 1998; Režek Jambrak, 2008)

U prehrambenoj industriji najznačajniju primjenu ima ultrazvuk frekvencije više od 20 kHz.

### 2.5.2. Princip ultrazvučnog tretmana

Prolaskom ultrazvučnih valova visoke snage kroz medij, dolazi do nastanka longitudinalnih valova, što pak dovodi do stvaranja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Sala i sur., 1995; Povey i Mason, 1998; Wang i Weller, 2006). Dolazi do formiranja milijuna mikroskopskih mjehurića (šupljina), koji se proširuju pod utjecajem



negativnog tlaka, a potom naglo implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka. Formiranje i nastanak mjehurića poznat je kao kavitacija (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Molekule oko mjehurića snažno se sudaraju jedna s drugom, stvarajući mikropodručja s ekstremno visokom temperaturom (5500 °C) i visokim tlakom ( $10^4$ -  $10^5$  kPa). Taj je fenomen poznat kao „kratkotrajna ili prijezna kavitacija“ (Herceg i sur., 2009).

### 2.5.3. Ultrazvučna ekstrakcija i primjena ultrazvuka visokog intenziteta u poboljšanju antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidacijski kapacitet tvari uobičajeno se određuje iz njihovih ekstrakata. Poboljšanje ekstrakcije korištenjem ultrazvuka visokog intenziteta uglavnom je pripisano učincima akustične kavitacije proizvedene u otapalu prolazom ultrazvučnog vala. Pri tome nastaju kavitacijski mjehurići koji se prilikom toga komprimiraju. Uslijed negativnog tlaka i povećanja temperature nastaje kolaps nastalih mjehurića koji uzrokuje „šok-val“ koji prolazi kroz otapalo i pri tome dolazi do miješanja. Ultrazvuk visokog intenziteta također djeluje mehanički, omogućujući veći prodor otapala u uzorku, povećavajući kontaktnu površinu između krute tvari i tekuće faze, a kao rezultat se otapalo brzo raspršuje od čvrste faze do otapala (Rostagno i sur., 2003). Osim toga, ultrazvuk visokog intenziteta može povećati bubrenje i hidrataciju što uzrokuje povećanje pora na staničnim stijenkama. Na taj se način povećava difuzija i stoga se povećava maseni transport (Vinator, 2001). Uz mehanički učinak ultrazvuka visokog intenziteta, postoji i toplinski indeks ultrazvuka koji se definira kao omjer akustičke snage proizvedene u ultrazvučnom pretvorniku i snage potrebne za zagrijavanje materijala koji se obrađuje za 1°C (Režek Jambrak, 2008; Zinoviadou i sur., 2015).

S druge strane, ekstremno visoka temperatura i tlak nastali kolapsom mjehurića mogu voditi do disocijacije vodene pare u  $H^*$  i  $OH^*$  radikale (Herceg i sur., 2009). Hidroksilni radikali su visoko reaktivne prirode te difundiraju od kavitacijskog mjehurića kroz medij za sonifikaciju. Njima nije moguće upravljati te ulaze u reakcije sa tvarima koje se sonificiraju, pa tako mogu dovesti do degradacije polimera, oksidacije lipida itd. Jedna od metoda određivanja je kvantificirati pomoću joda. Istraživanja pokazuju da se nepoželjne reakcije između ultrazvučno generiranih radikala i sastojaka hrane mogu minimalizirati korištenjem nižih frekvencija ultrazvuka visokog intenziteta prilikom obrade hrane. Ipak, ultrazvuk visokih frekvencija se također može koristiti za obradu hrane, ukoliko su u otopini prisutni odgovarajući antioksidansi. Potencijal sonokemijske hidroksilacije fenolnih komponenti može

se koristiti kao efikasan način poboljšavanja antioksidacijskih svojstava određenog materijala (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Prednosti korištenja ultrazvuka visokog intenziteta za preradu hrane uključuju: učinkovitije miješanje i mikromiksanje, brži prijenos energije i mase, redukciju toplinskog i koncentracijskog gradijenta, smanjenje temperature, selektivnu ekstrakciju, smanjenu veličinu opreme, brže pokretanje samog procesa, povećanje proizvodnje i uklanjanje koraka u procesu (Chemat i sur., 2011).

## 3.EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1. 1. Uzorci

Za provođenje ovog istraživanja korišteni su uzorci bučine pogače, heljde i proso. Bučina pogača i heljde nabavljeni su u suradnji s uljarom „Poljo Posavec“ iz Dunjkovca dok je proso proizvođača K- Bio kupljen u trgovačkog lancu Kaufland, a zemlja podrijetla istog je Njemačka. Uzorci su usitnjeni pomoću električnog mlina tipa CT 193 Cyclotec™ FOSS u fini prah, a u Tablici 4 prikazan je njihov kemijski sastav.

**Tablica 4.** Kemijski sastav korištenih sirovina (izraženo u % na suhu tvar)

SIROVINA	SUHA TVAR	PROTEINI	PEPEO	MASTI	UKUPNI REDUCIRAJUĆI ŠEĆERI
BUČINA POGAČA	98,55	50,9	9,65	22,15	1,93
PROSO	87,25	11,2	1,33	4,29	0,55
HELJDA	87,3	15,5	2,12	3,01	1,30

#### 3.1.2. Kemikalije

*Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p. a.) ili HPLC čistoće.*

##### Ultrazvučna (UVI) ekstrakcija

- 96% etilni alkohol, Kefo (Ljubljana, Slovenija)
- Destilirana voda

##### Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP i DPPH METODOM

- Etil acetat, ≥ 99,9 %, Carlo Erba (Val de Reuil Cedex, Francuska)
- Metanol, apsolutni, HPLC grade, J. T. Baker (Deventer, Nizozemska)
- Octena kiselina, ledena, 99,5 %, Macron (Center Valley, USA)
- DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- 40 mM otopina klorovodične kiseline (37 %-tne), Carlo Erba (Val de Reuil Cedex, Francuska)

- 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ), Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Njemačka)
- 20 mM otopina željezo(III)-klorid-heksahidrata, Gram-mol d.o.o (Zagreb, Hrvatska)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Natrijev acetat-trihidrat, Iach- Ner (Neratovice, Češka)
- 2% octena kiselina, Macron (Center Valley, USA)
- Destilirana voda

#### Određivanje udjela ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Anhidrid natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) Gram-mol d.o.o (Zagreb, Hrvatska)
- Destilirana voda

#### Određivanje udjela rutina HPLC analizom

- 2% octena kiselina, Macron (Center Valley, USA)
- Metanolapsolutni, HPLC čistoće, J. T. Baker (Deventer, Nizozemska)
- Acetonitril, HPLC čistoće, J. T. Baker (Deventer, Nizozemska)
- 3,5-dikloro-4-hidroksibenzojeva kiselina, 97 %, Sigma- Aldrich (St. Louis, USA) (HPLC interni standard)
- Rutin hidrat, Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)

#### *3.1.2.1. Priprema reagensa*

##### Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP i DPPH metodom

Za pripremu 500 mL acetatnog pufera koncentracije 300 mM otopljeno je 0,93 g bezvodnog natrijevog acetata trihidrata u vodi i dodano 8 mL ledene octene kiseline. 20 mM otopina željezo(III)-klorid-heksahidrata priprema se otapanjem 0,0541 g  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  u 10 mL destilirane vode, a 10 mM otopina željezova-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) priprema se otapanjem 0,0312 g TPTZ u 10 mL 40 mM HCl. FRAP reagens pripremljen je miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ-a i 2,5 mL  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  te zagrijava na 37 °C.

Za pripremu 0,06 mM DPPH potrebno je otopiti 0,00236 g DPPH u odmjerne tikvici od 100 mL s metanolom i nadopuniti do oznake

### Određivanje udjela ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu metodom

Za pripremu 20%-tne otopine natrijevog karbonata otopljeno je 200 g anhidrida  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 800 mL vruće destilirane vode u odmjernoj tikvici od 1000 mL, zatim se ohladi na sobnu temperaturu te se odmjerna tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina mora stajati 24 sata te se nakon toga toga profiltrira kroz filter papir.

### Udio rutina HPLC analizom

Kod pripreme internog standarda potrebno je odvagati 0,0138 g 3,5-dikloro-4-hidroksibenzojeve kiseline direktno u odmjernu tikvicu od 10 mL te dopuniti s metanolom do oznake. Dobivena otopina, koncentracije  $1,038 \text{ mg mL}^{-1}$ , se razrijedi 10 puta. 30  $\mu\text{l}$  internog standarda dodaje se uzorku.

#### 3.1.3. Aparatura i pribor

##### Ultrazvučna (UVI) ekstrakcija

- Ultrazvuk, UP 400 St, Hielscher (Njemačka)
- Digitalni termometar, Oregon Scientific (USA)
- Uparivačdušikom, Reacti-Therm Dry Block + Reacti-Vap Evaporator (Pierce, SAD)

##### Spektrofotometrijske analize

- Mikropipete
- Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- Spektrofotometar, Specord 50 Plus (Njemačka)
- Analitička vaga, Kern ALS 200-4N (Njemačka)
- Vorteks miješalica, IKA MS3 basic, SAF
- Magnetska miješalica, IKA C-MAG HS-7 (SAD)
- Centrifuga, Thermo Scientific Micro Cl 21 (Njemačka)
- Mikrofilteri veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$ , Filter-Bio (Kina)

##### HPLC analiza

- Mikrofilteri veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$ , Filter-Bio (Kina)
- HPLC vijale s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies, (Kalifornija, SAD)

- HPLC kolona Fortis UniverSil HS C-18 (250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m), Agilent Technologies, (Kalifornija, SAD)
- HPLC predkolona C 18, Phenomenex (Torrance, USA)
- HPLC-PDA sustav Agilent 1200 Series (tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti s PDA („Photo Diode Array“) detekcijom), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)

### 3.2. METODE RADA

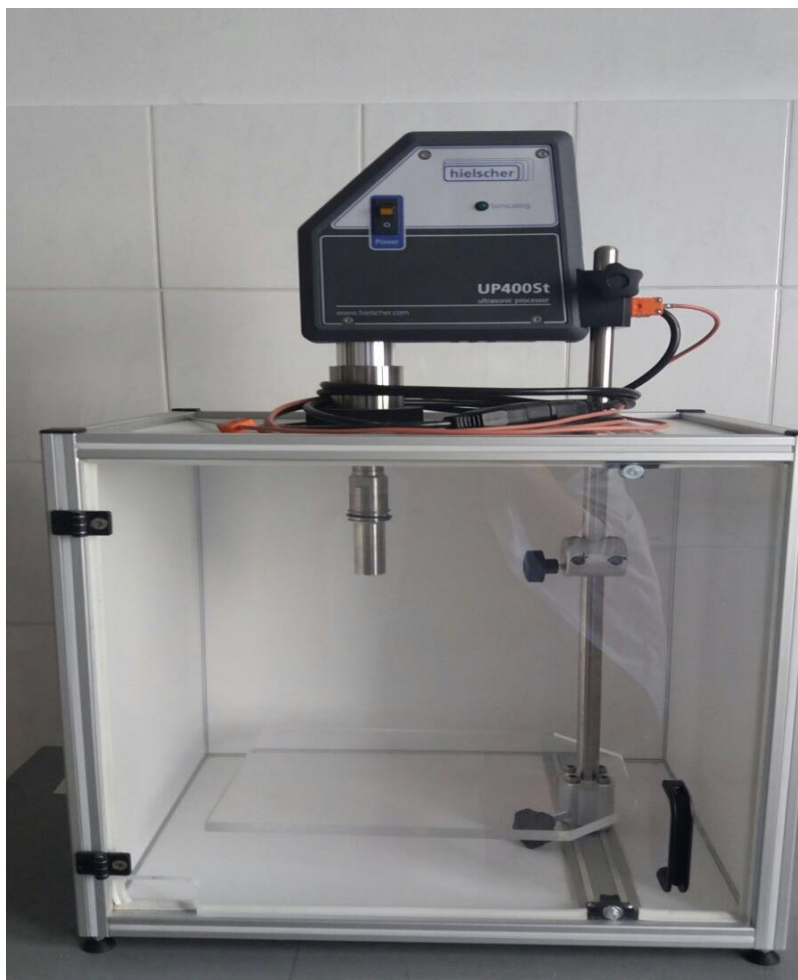
#### 3.2.1. Klasična i ultrazvučna ekstrakcija uzoraka

Za ekstrakciju odvagano je po 45 g uzorka, a kao otapalo je korišten 48%-tni etanol za koji su Inglett i sur. (2011) svojim istraživanjem dokazali da je bolji u usporedbi s vodom i apsolutnim etanolom. Smjese otapala i uzorka su bile izložene djelovanju ultrazvuka visokog intenziteta kroz 5, 10, i 20 minuta pri amplitudi od 100 % te je provedena ekstrakcija na uređaju s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom promjera 22 mm (oznake: UVI, 5 min, 10 min, 20 min) (Slika 7). Zbog definiranja utjecaja temperature koja poraste pri tretmanu od 20 min kod tretiranja uzorka heljde, provedena je i ekstrakcija na način da je čaša sa uzorkom uronjena u čašu s ledom kako bi se temperatura snizila (oznaka: H, UVI, 20 MIN, HL). Također, uzorak je prije tretmana pomoću leda ohlađen na temperaturu od 11 °C.

Radi bolje procjene utjecaja ultrazvuka visokog intenziteta na ekstrakciju polifenolnih spojeva, ekstrakcija uzoraka se provodila i bez ultrazvuka visokog intenziteta pri sobnoj temperaturi (25 °C) uz miješanje uzorka pomoću magnetske miješalice kroz 20 minuta (oznake: B, NULA, 20 MIN; P, NULA, 20 MIN; H, NULA, 20 MIN). Također, ekstrakcija je provedena i uz grijanje uzoraka na 50 °C uz miješanje uz pomoć magnetske miješalice kroz 20 minuta (oznake: B, NULA, GR, 20 MIN; P, NULA, GR, 20 MIN; H, NULA, GR, 20 MIN).

Nakon provedene ekstrakcije tretiranim uzorcima izmjerena je temperatura pomoću termometra te su, nakon hlađenja, centrifugirani na 10000 o/min u trajanju od 15 minuta. Supernatant dobiven centrifugiranjem je odekantira od nastalog taloga te je prebačen u čašu od 100 mL (urinarka). Supernatant bučine pogače je bilo potrebno dodatno profiltrirati kroz filter Whatman (br .1) zbog velikog udjela masti (20%) (Ratz-Lyko i Arct, 2015). Odvojeni talog je sušen na 60 °C kroz 1-2 sata. Uzorci i osušeni talog sučuvani na temperaturi od -18 °C u zamrzivaču do analize. Osušeni talog se koristio za ekstrakciju masti po Soxhletu, a

supernatant je služio za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, ukupnih polifenola te udjela rutina u uzorcima.



**Slika 7.** Ultrazvučni sustav sa direktno uronjenom sondom

### 3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

#### 3.2.2.1. Priprema uzorka za ekstrakciju

Nakon centrifugiranja, cca 5 mL supernatanta je filtrirano preko najlonskoj filtera te je izuzeto 2 mL filtriranog uzorka. U uzorke se dodaje 30  $\mu$ L internog standarda (3,4-dikloro-4-hidroksibenzojeva) i 2 mL 2% octene kiseline, a zatim je sve skupa vorteksirano. Potom je u suspenziju dodano 3 mL etil acetata, sve skupa je provorteksirano 30 sekundi i centrifugirano 15 min na 4000 rpm. Etilacetatna frakcija je odvojena pipetiranjem u Eppendorf viala i stavljena na upravljanje pod struju dušikom uz grijanje pri 40 °C. Ekstrakcija je ponovljena još 2 puta, s po 2 mL etil acetata. Uparene uzorke je bilo potrebno spremi u frižider na -20 °C do analize. Prije kromatografske analize upareni ekstrakti otopljeni su u metanolu prema Tablici

5 za spektrofotometrijske metode, dok su za analizu na HPLC-u, uzorci otoljeni u 100  $\mu\text{l}$  metanola te su isti vorteksirani 15 sekundi.

**Tablica 5.** Potrebni volumen metanola za određenu sirovinu za DPPH, FRAP i TPC metode.

Uzorak	Volumen metanola [ $\mu\text{L}$ ]
Bučina pogača	800
Heljda	1200
Proso	400

*Princip metode:*

Određivanje ukupnih fenola (TPC) se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s ekstraktima ukupnih fenola i fenolnih kiselina, prema Čukelj i sur. (2015), a sam postupak ekstrakcije opisan je u poglavlju 3.2.3.1. Folin Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline, gdje pri reakciji s fenolnim spojevima, hidroksidne grupe fenolnih spojeva oksidiraju, dok se kiseline reduciraju u plavo obojeni volframov oksid i molibdenov oksid. Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeren je pri valnoj duljini od 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u  $\text{mg g}^{-1}$ .

*Postupak metode:*

30  $\mu\text{l}$  metanolni ekstrakt doda se u kivetu za spektrofotometrijsko mjerenje (4 mL) koja sadrži 400  $\mu\text{L}$  vode. U otopinu je potom dodano 100  $\mu\text{l}$  Folin-Ciocalteu reagensa te nakon 3 minute dodano 300  $\mu\text{L}$  20 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i 1,16 mL vode. Nakon 2 sata u mraku na sobnoj temperaturi, mjeri se apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru, pri 765 nm, u usporedbi sa slijepom probom (čisti metanol). Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Sva mjerenja se provode u tri paralele.

Udio ukupnih fenola određen je uz pomoć baždarnog pravca (Slika 8) i izražava kao mg ekvivalenta galne kiseline na g suhog uzorka. Za izradu baždarne krivulje korišteno je šest koncentracija galne kiseline. Iz baždarne krivulje dobije se jednadžba pravca prema kojoj se izračunava koncentracija ukupnih fenola. Koncentracija ukupnih fenola izražava se kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u  $\text{mg mL}^{-1}$ . Jednadžba baždarne krivulje glasi [1]:

$$y=2,145x+0,009$$

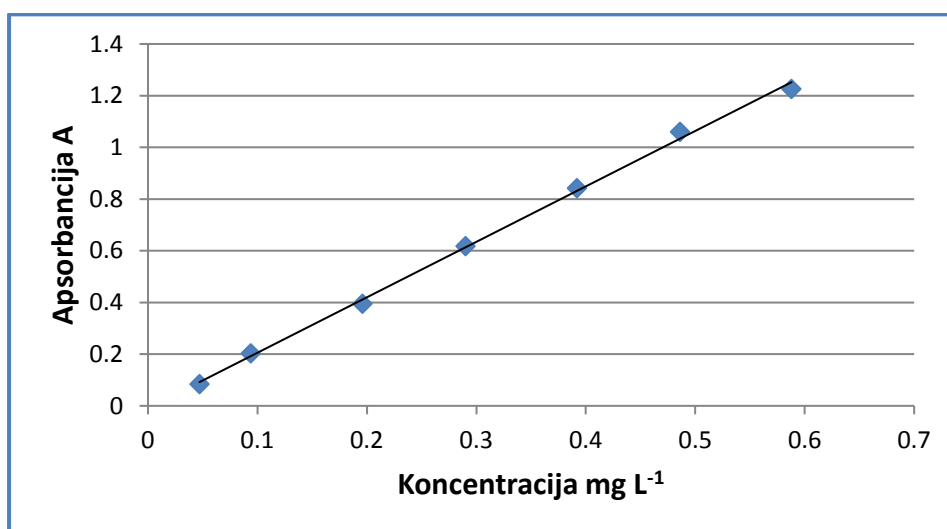
$$R^2=0,998$$



Gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola ( $\text{mg mL}^{-1}$ )

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm



**Slika 8.** Baždarna krivulja za ukupne fenolne spojeve

### 3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

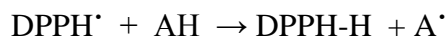
Određivanje antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih spojeva provedeno je korištenjem DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) i FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metode.

#### 3.2.3.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

*Princip metode:*

Metoda se zasniva na redukciji slobodnih radikala DPPH\* (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) antioksidansom koji služi kao donor vodika ili elektrona. Reakcija je praćena smanjenjem apsorbancije. Naime, DPPH radikal zbog nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorbanciju u vidljivom dijelu spektra pri 515 nm, ali nakon redukcije pomoću antioksidansa (AH) ili radikalne vrste ( $R^{\bullet}$ ), apsorpcija nestaje (Brand-Williams i sur., 1995), odnosno dolazi do obezbojenja koje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona. Također,

prilikom reakcije dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu boju što se mjeri spektrofotometrijski.



*Postupak rada:*

U kivetu za spektrofotometrijsko mjerenje otpipetirano je 25 µl metanolnog ekstrakta, dodano 950 µl 0,06 mMDPPH otopine te promućkano. Kao slijepa proba se koristi čisti metanol, a kao kontrolni uzorak čine 25 µl metanol umjesto uzorka i 950 µl DPPH. Nakon 30 min stajanja u mraku izmjerena je apsorbancija koja se mjeri na UV/VIS spektrofotometru, pri 517 nm, u usporedbi s slijepom probom. Za svaki uzorak provedena su tri paralelna mjerenja.

Sposobnost ekstrahiranih spojeva da hvataju DPPH slobodne radikale gleda se u odnosu na obezbojenje otopine koja označava smanjenje DPPH radikala, a računa se prema sljedećoj jednadžbi [2]:

$$\% \text{ vezanih radikala} = \frac{A_k - A_u}{A_k} \frac{A_k - A_u}{A_k} \times 100$$

[2]

Gdje su:

Au – apsorbancija uzorka

Ak – apsorbancija kontrolnog uzorka

Sposobnost 'gašenja' slobodnih radikala izražava se kao µmol vezanih DPPH radikala na masu uzorka (Zhou i Yu, 2004) ili preko baždarne krivulje šest različitih koncentracija Troloksa (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) u metanolu (Čukelj i sur., 2015).

Iz jednadžbe baždarne krivulje ( Slika 9) konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost % vezanih radikala o koncentraciji standarda (mmol L<sup>-1</sup>), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Jednadžba baždarne krivulje glasi [3]:

$$y=69,13x+1,727$$

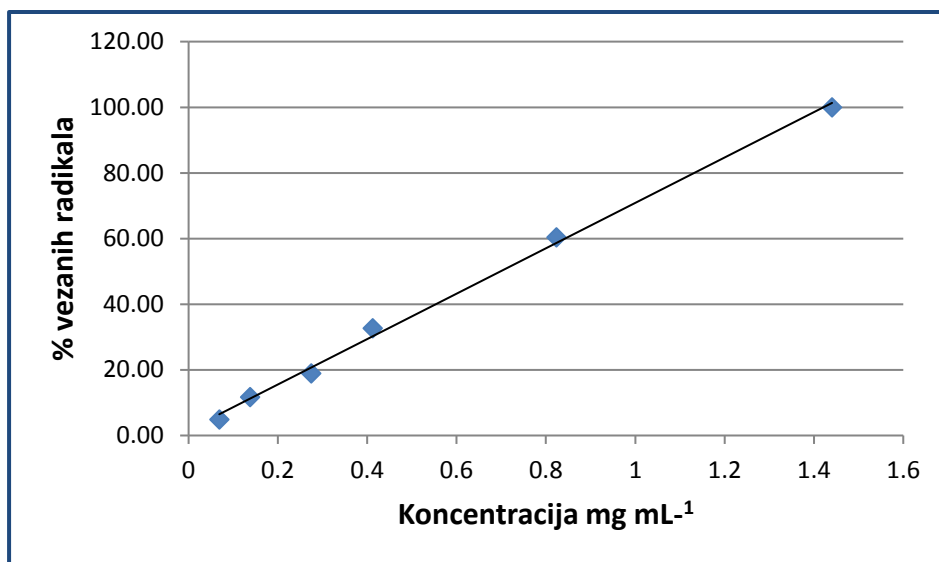
$$R^2=0,997$$

[3]

Gdje su:

x - koncentracija standarda otopine Trolox-a ( $\text{mg mL}^{-1}$ )

y - % vezanih radikala



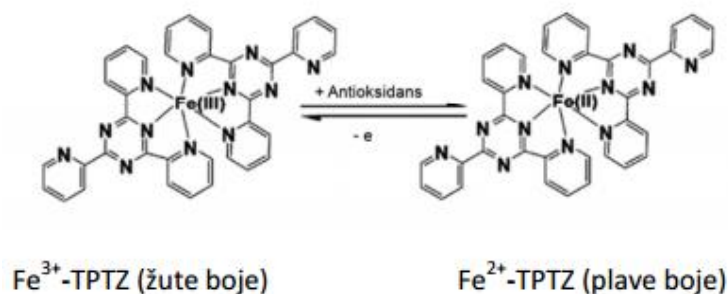
**Slika 9.** Baždarna krivulja za DPPH

Rezultati su izraženi kao  $\mu\text{mol trolox ekvivalenata g}^{-1}$  suhe tvari uzorka.

### 3.2.3.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

*Princip metode:*

Metoda se temelji na redukciji žuto obojenog kompleksa Fe(III)-TPTZ u intenzivno plavi kompleks Fe(II)-TPTZ pri niskom pH (Slika 10) Reakcija se odvija u prisutnosti antioksidansa koji donira elektron te se spektrofotometrijski mjeri na valnoj duljini od 593 nm na kojoj kompleks pokazuje intenzivno obojenje (Benzie i Strain, 1996, Ou i sur., 2002). Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa.



**Slika 10.** FRAP reakcija (Huang i sur., 2005)

*Postupak metode:*

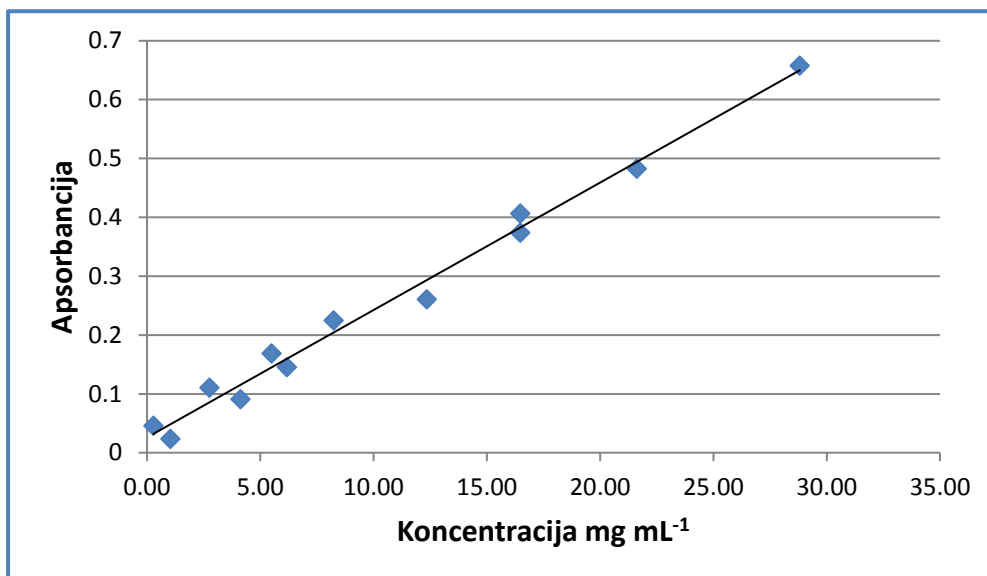
U mikrokiveti pomiješa se 15  $\mu\text{L}$  mikrofiltriranog ekstrakta heljde ili 20  $\mu\text{L}$  mikrofiltriranog ekstrakta bučine pogače ili 25  $\mu\text{L}$  mikrofiltriranog ekstrakta prosa i 1 mL FRAP reagensa te se nakon 4 minute izmjeri apsorbancija pri 593 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepu probu čini čisti metanol. Za izradu baždarnog pravca (Slika 11) pripremljena je otopina Troloksa (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) u metanolu u jedanaest različitih koncentracija u rasponu 0,01372– 1,4406  $\text{mg mL}^{-1}$  (Benzie i Strain, 1996; Čukelj i sur., 2015). Rezultati izraženi kao  $\mu\text{mol}$  Troloksa  $\text{g}^{-1}$  suhe tvari uzorka. Jednadžbe baždarne krivulje glase [4]:

$y=0,021x+0,025$ $R^2=0,987$	[4]
------------------------------	-----

Gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm



**Slika 11.** Baždarna krivulja za FRAP

#### 3.2.4. Određivanje udjela rutina HPLC analizom

Određivanje udjela rutina u uzorku heljde provedeno je tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz PDA detektor ( Slika 12), a sam postupak ekstrakcije je opisan u poglavlju 3.2.2.1., ekstrahirani uzorak se otopi u 100  $\mu\text{L}$  metanola te je profiltriran kroz celulozno-acetatne mikrofiltere veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$ .

Metoda za određivanje fenolnih spojeva primjenom HPLC analize se temelji na odvajanju fenolnih spojeva primjenom gradijentnog eluiranja. Određivanje je provedeno na Agilent HPLC sustavu koji se sastoji od: kromatografske kolone, pumpe, injektora, detektora, integratora i kompjuterske stanice. Analiza je provedena prema prema dolje navedenim uvjetima.

*Postupak analize:*

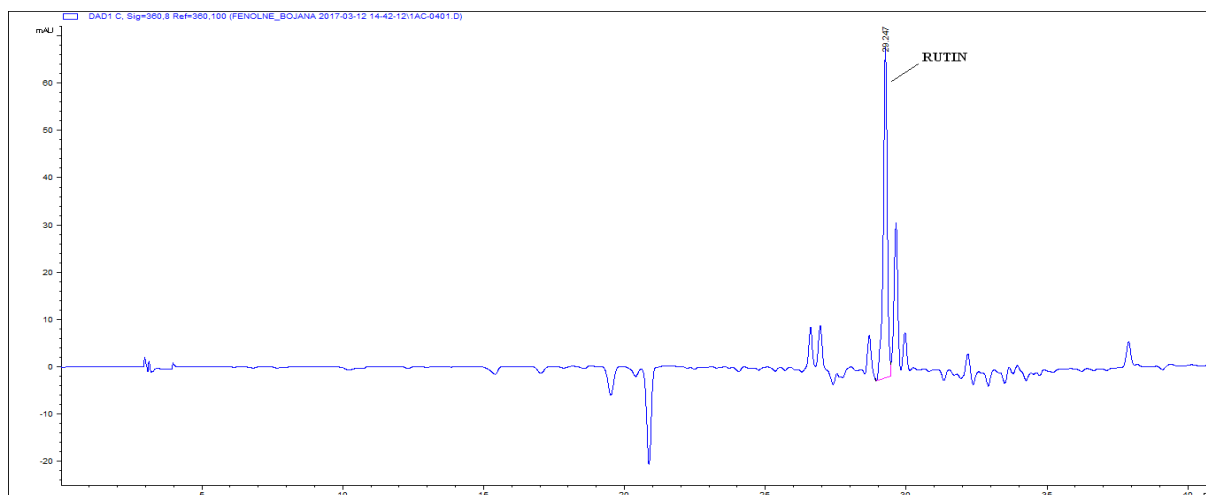
#### **Parametri kromatografske analize:**

<i>Kolona:</i>	HPLC kolona Fortis UniverSil HS C-18 (250 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )
<i>Mobilne faze:</i>	Otapalo A – 2% octena kiselina Otapalo B – Metanol: Acetonitril (1:1, v/v)
<i>Protok:</i>	1 mL min <sup>-1</sup>
<i>Volumen injektiranja:</i>	20 $\mu\text{L}$
<i>Eluiranje:</i>	gradijentno

<i>Gradijent:</i>	prikazan u Tablici 6
<i>Detekcija:</i>	UV/VIS Photo Diode Array ( $\lambda=360$ nm)
<i>Temperatura kolone:</i>	sobna
<i>Vrijeme uravnoteženja:</i>	10 min
<i>Vrijeme trajanja analize:</i>	30 min
<i>Post Time:</i>	10 min
<i>Maksimalni tlak:</i>	350 atm
<i>Minimalni tlak:</i>	2 atm

**Tablica 6.** Gradijent otapala za HPLC analizu

t [min]	Otapalo A [%]	Otapalo B [%]
0	96	4
15	85	15
35	50	50
40	50	50



**Slika 12.** Kromatogram uzorka heljde

### 3.2.4.1. Identifikacija i kvantifikacija spoja rutina

Za UV detekciju polifenola rutina korišten je Photo Diode Array (PDA) detektora, a snimanjem eluata na 360 nm dobiven je karakterističan kromatogram uzorka (Slika 12). Identifikacija spoja provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenog spoja ( $R_t$ ) s vremenima zadržavanja standarda te usporedbom s UV-spektrima standarda (oblik spektra,

površina pika i apsorpcijski maksimumi). Kvantifikacija se provodi pomoću baždarne krivulje standarda (Slika 13) koja je napravljena od pet različitih koncentracija standarda rutina. Naime, početna koncentracija rutina je razrijeđena i dobiven je raspon koncentracija 0,5-2 mg mL<sup>-1</sup>. Jednadžba baždarnih pravaca je [5] :

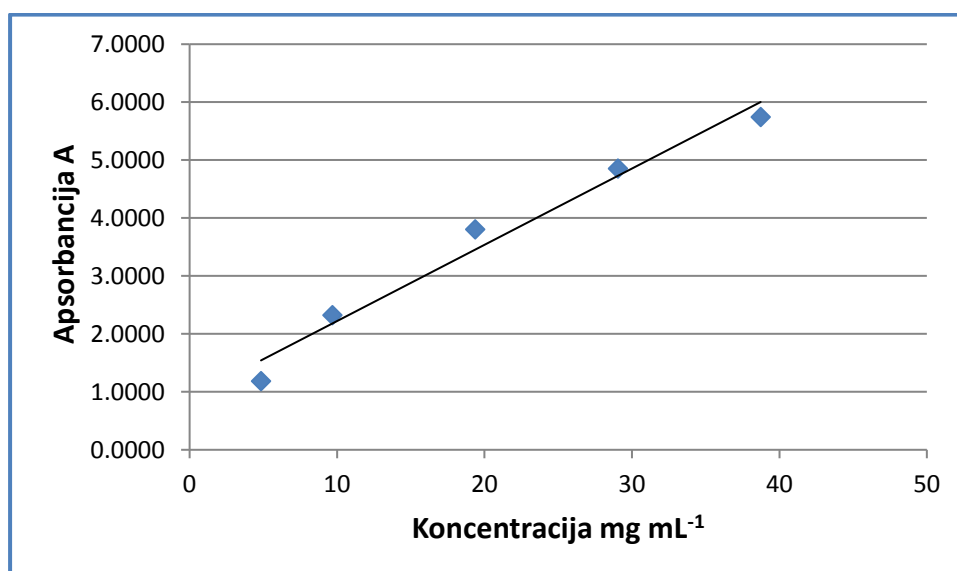
$$y=0,131x+0,905$$

$$R^2=0,974$$
[5]

Gdje su:

x – udjel spoja rutina (mg mL<sup>-1</sup>)

y – izmjerena površina/ interni standard



**Slika 13.** Baždarna krivulja za rutin

HPLC analize provedene su u dvije paralelne probe, a rezultati su izraženi kao mg/g uzorka te su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

### 3.2.5. Statistička obrada

Za statističku analizu i izradu grafičkih prikaza eksperimentalnih podataka korišteni su Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD) i Microsoft Office Excel 2007. Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom, a za usporedbu uzoraka

korištena je analiza varijance (ANOVA), s Tukey post-hoc testom. Kao granica statističke značajnosti postavljena je vrijednost za  $p \leq 0,05$ .



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Iako je djelovanje ultrazvuka visokog intenziteta proučavano na više od stotinu biljnih vrsta, pregledom baza podataka znanstvenih radova uočeno je da učinak djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta na bioaktivni profil heljde, prosa i bučine pogače do sada nije uopće ili je rijetko istraživano.

U ovome je radu ispitan utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta visoke frekvencije na slobodne bioaktivne spojeve i antioksidanse heljde, bučine pogače i prosa. Poznato je da se fitokemikalije žitarica većinski nalaze vezane esterskim i glikozidnim vezama za polimere staničnih stijenki (Fardet i sur., 2008; Čukelj i sur., 2010), a isto je dokazano i kod uljarica (Shahidi i Yeo, 2016). Iako je neosporan zdravstveni utjecaj cjelovitih žitarica na zdravlje, zahvaljujući sinergiji njihovih vlakana i različitih bioaktivnih spojeva, još uvijek je u potpunosti nerazjašnjeno *in vivo* djelovanje slobodnih, konjugiranih i vezanih oblika. Pretpostavka je da je zbog vezanog oblika većina bioaktivnih spojeva žitarica otporna na uvjete probavnog sustava te da glavni utjecaj i antioksidacijsko djelovanje imaju u debelom crijevu (Shahidi i Yeo, 2016), za razliku od antioksidansa iz voća i povrća čiji je najveći dio u slobodnom obliku te vjerojatno glavno djelovanje imaju u tankom crijevu (Fardet i sur., 2008). Stoga je pitanje bi li oslobađanje vezanih oblika povećalo bioaktivni i antioksidacijski potencijal žitarica i uljarica, te bi li takvi spojevi mogli imati ulogu u oksidativnoj zaštiti proizvoda iz žitarica i produljenju trajnosti. Vezani oblici bioaktivnih spojeva mogu se osloboditi postupcima hidrolize, no kemijski tretman često ne dozvoljava kasniju ljudsku konzumaciju. Iz tog razloga je ultrazvuk odabran kao tehnologija koja se prethodno pokazala kao uspješna u razaranju staničnih stijenki biljnih materijala, čime se mehanički otvara pristup bioaktivnim spojevima (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Bučina pogača odabrana je kao nusproizvod uljarske industrije visoke prehrambene vrijednosti s potencijalom iskorištavanja u ljudskoj prehrani (Tamer i Çopur, 2014), a heljda i proso kao sirovine koje su od sve većeg interesa industriji i potrošačima kao visokovrijedne bezglutenske žitarice (Saleh i sur., 2013; Ahmed i sur., 2014; Dziedzic i sur., 2015).

Rezultati dobiveni spektrofotometrijskom analizom ekstrakata nakon ultrazvučnog tretmanaprikazuju ukupnu količinu fenolnih spojeva (TPC) i antioksidacijsku aktivnost u navedenih uzorcima. Ukupna količina fenolnih spojeva određena je pomoću Folin-Ciocalteu reagensa dok je antioksidacijska aktivnost određena pomoću DPPH i FRAP metode. Dobiveni

rezultati za TPC prikazani su kao mg GAE po g uzorka dok su rezultati za antioksidacijsku aktivnost prikazani kao  $\mu\text{mol}$  Troloksa po g uzorka.

Nakon provedene UV/Vis PDA analize, HPLC metodom je određenu udio rutina u ekstraktu heljde koji je prikazan kao  $\text{mg g}^{-1}$  uzorka. Osim toga, tijekom tretmana UVI mjerena je temperatura na početku i na kraju tretmana (Tablica 7) te je uočeno povećanje temperature za otprilike  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$  nakon svakog tretmana. Naime, prolaskom ultrazvuka visokog intenziteta kroz materijal, osim kavitacije dolazi i do zagrijavanja. Kao rezultat snažnog sudaranja molekula oko mjehurića nastaju tzv. „mikropodručja“ s ekstremno visokim temperaturama i visokim tlakom te dolazi do pojave selektivnog povišenja temperature (Herceg i sur., 2009).

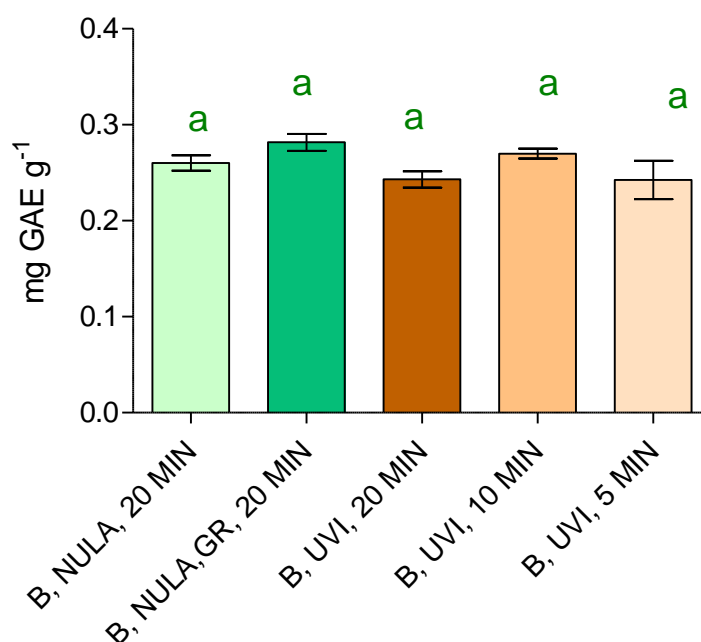
**Tablica 7.** Prikaz izmjerenih temperatura prije i nakon UVI tretmana

<b>Tretman</b>	<b>Temperatura prije tretmana (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>Temperatura nakon tretmana (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>
<b>H, NULA, 20 MIN</b>	28,6	28
<b>H, NULA GR, 20 MIN</b>	30,05	56
<b>H, UVI, 20 MIN</b>	26,5	68,5
<b>H, UVI, 20 MIN, HL</b>	11	47
<b>H, UVI, 10 MIN</b>	25,85	53,85
<b>H, UVI, 5 MIN</b>	26,1	46,65
<b>P, NULA, 20 MIN</b>	29,9	27,75
<b>P, NULA GR, 20 MIN</b>	30,3	55,25
<b>P, UVI, 20 MIN</b>	26,5	70,05
<b>P, UVI, 10 MIN</b>	26,5	60
<b>P, UVI, 5 MIN</b>	28	48
<b>B, NULA, 20 MIN</b>	29,25	27,05
<b>B, NULA GR, 20 MIN</b>	29,7	54,65
<b>B, UVI, 20 MIN</b>	27	73
<b>B, UVI, 10 MIN</b>	26	60
<b>B, UVI, 5 MIN</b>	27,5	48

#### 4. 1. UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST BUČINE POGAČE

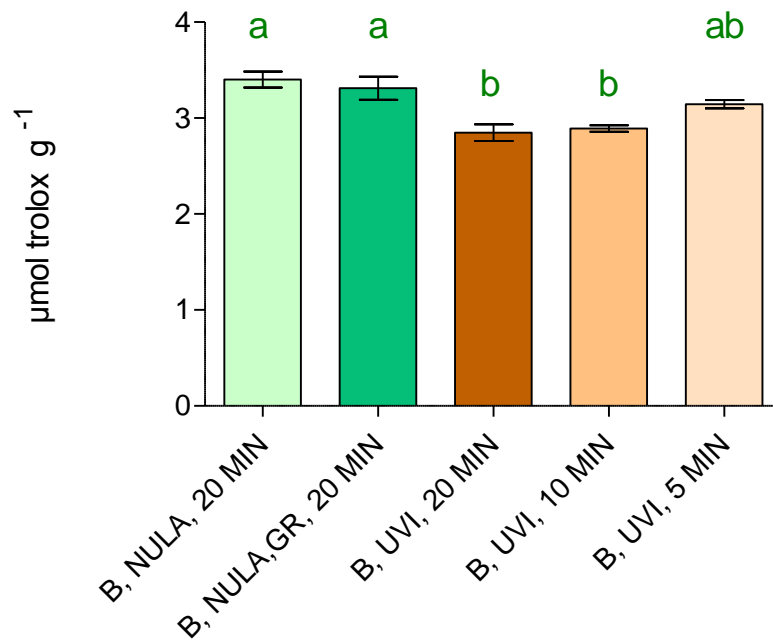
Na sljedećim slikama prikazani su rezultati ukupnih fenola te DPPH i FRAP antioksidacijske aktivnosti bučine pogače.

Na slici 14. prikazan je sadržaj ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu UVI tretirane i netretirane bučine pogače koji je određen uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa.

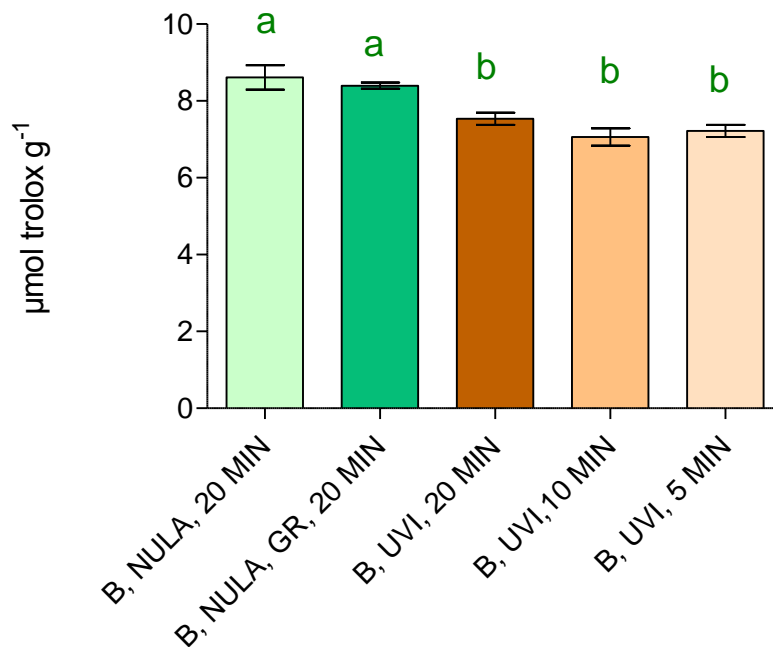


**Slika 14.** Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u bučinoj pogači tretiranoj i netretiranoj UVI. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ).

Dobiveni rezultati ukazuju da tretman ultrazvukom visokog intenziteta nema djelovanje na proces oslobađanja slobodnih ukupnih fenolnih spojeva. Između rezultata prije i poslije tretmana ultrazvukom visokog intenziteta nema statističke razlike, što je utvrđeno ANOVA testom ( $p > 0,05$ ).



**Slika 15.** Antioksidacijski kapacitet UVI tretirane i netretirane bučine pogače određen DPPH metodom. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ).



**Slika 16.** Antioksidacijski kapacitet UVI tretirane i netretirane bučine pogače određen FRAP metodom. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ).

Također, slično kao kod ukupnih fenolnih spojeva izmjerena antioksidacijska aktivnosti DPPH (Slika 15) i FRAP (Slika 16) metodom isto pokazuju kako UVI tretman ima negativan učinak na antioksidacijsku aktivnost budući da su izmjerene vrijednosti bile nešto veće u netretiranim uzorcima.

Iako se i FRAP i DPPH metodama određuje antioksidacijska aktivnost, ti testovi baziraju se na različitim kemijskim načelima te je stoga preporučljivo provesti više testova čime se pokriva širi raspon prisutnih antioksidansa hrane (Apak i sur., 2013).

Upravo ta razlika između testova vidljiva je u izmjerenim vrijednostima za FRAP metodu, kod koje je uočen negativan pad, i kod vrijednosti za DPPH metodu kod koje su rezultati nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta od 5 minuta niži nego kod netretiranih uzorka, ali statistički neznajno ( $p > 0,05$ ). Budući da se testovi za određivanje antioksidacijske aktivnosti međusobno trebaju nadopunjavati, zanimalo nas je kolika je korelacija između pojedinih testova. Tako je koeficijent korelacije DPPH i TPC vrijednosti za bučinu pogaču iznosio  $r = 0,176$  ( $p > 0,05$ ), dok je korelacija TPC vrijednosti sa vrijednostima izmjerenima FRAP metodom iznosila  $r = 0,323$  ( $p > 0,05$ ). Analiza korelacije pokazuje da ne postoji značajna korelacija izmjerenih ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti, što dovodi do zaključka da su vjerojatno i neki drugi spojevi (npr. steroli, tokoferoli) koji nisu obuhvaćeni Folin-Ciocalteu metodom uključeni u antioksidacijske reakcije. S druge strane korelacija između vrijednosti dobivenih DPPH i FRAP metodom je srednje jaka, odnosno  $r = 0,739$  ( $p \leq 0,05$ ).

DPPH metoda temelji se na mehanizmu prijenosa elektrona, ali također i na prijenosu vodikog atoma što ju čini boljom metodom za antioksidacijski kapacitet (Pérez-Jiménez i sur., 2008). Povećanjem koncentracije ili stupnja hidroksilacije fenolnih spojeva, aktivnost uklanjanja DPPH radikala također se povećava, čime je i definirana antioksidacijska aktivnost (Zhou i Yu 2004). S druge strane, FRAP test obično se koristi za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta hidrofilnih spojeva (Pérez-Jiménez i sur., 2008). Osim toga, utvrđeno je da metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti koja se temelji na uklanjanju radikala, kao što je DPPH •, ne koristi biološki relevantan radikal (Apak i sur, 2013), dok FRAP koristi kelirani željezni ion kao oksidacijsko sredstvo (Čukelj i sur., 2015).

Ovakav negativan ishod primjene ultrazvuka visokog intenziteta može se pripisati procesu stvaranja radikala iz vodenog medija koji se događa tijekom sonokemijskog procesa. Naime,

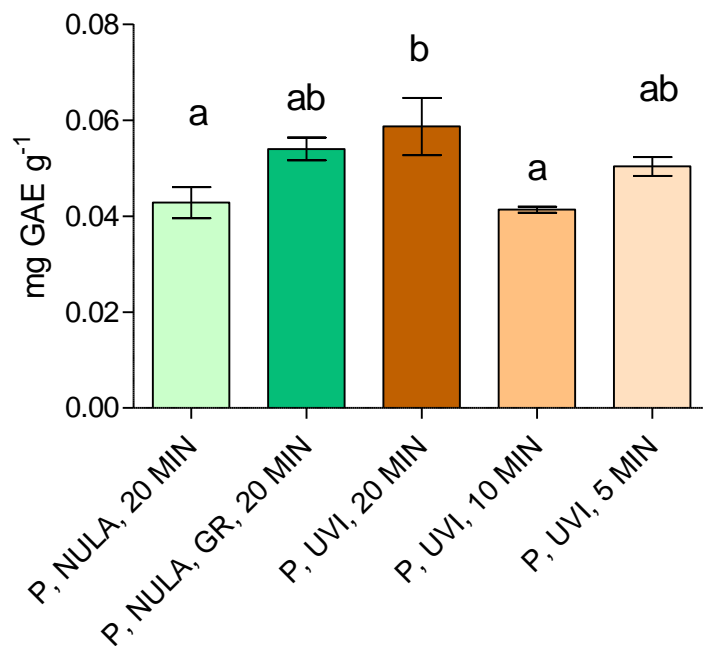
kako to i navodi Ashokkumar i sur. (2008), korištenje ultrazvuka može pogoršati kvalitetu sastojaka hrane zbog nastajanja hidroksilnih radikala koji se zatim ugrađuju u fenolne spojeve. Oni su dokazali kako se povećanjem snage ultrazvuka, smanjuje količina fenolnih spojeva, kao i količina radikala nastalih prilikom UVI tretmana, a s druge strane se povećava količina konvertiranih fenola. Otkrili su direktnu povezanost između konvertiranih fenola i količine OH\* radikala. U slučaju bučine pogače očitom dominiraju proizvedeni OH\* radikali koji reagiraju s fenolnim spojevima. Dodatno, smanjenje količine slobodnih fenolnih spojeva i antioksidanasa bučine pogače može biti uzrokovano povećanom „izloženosti“ fenolnih spojeva valovima ultrazvuka visokog intenziteta i proizvedenim radikalima. Naime, u procesu mehaničke ekstrakcije ulja, odnosno prešanja, stanice bučinih koštica se otvaraju pri čemu dolazi do oštećenja istih kao dodatna posljedica, fenolni spojevi su manje zaštićeni staničnim strukturama.

Obzirom na troškove i trajanje procesa možemo zaključiti da se UVI tretmanom ne postiže značajno povoljan učinak na oslobađanje bioaktivnih spojeva bučine pogače, odnosno postoji potencijal njihovog uništavanja tretmanom UVI, stoga UVI nije preporučljiva metoda za tretman bučine pogače ukoliko je svrha povećanje slobodnih antioksidanasa i fenolnih spojeva.

#### **4.2. UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST PROSA**

Na sljedećim slikama prikazani su rezultati mjerenja ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodama.

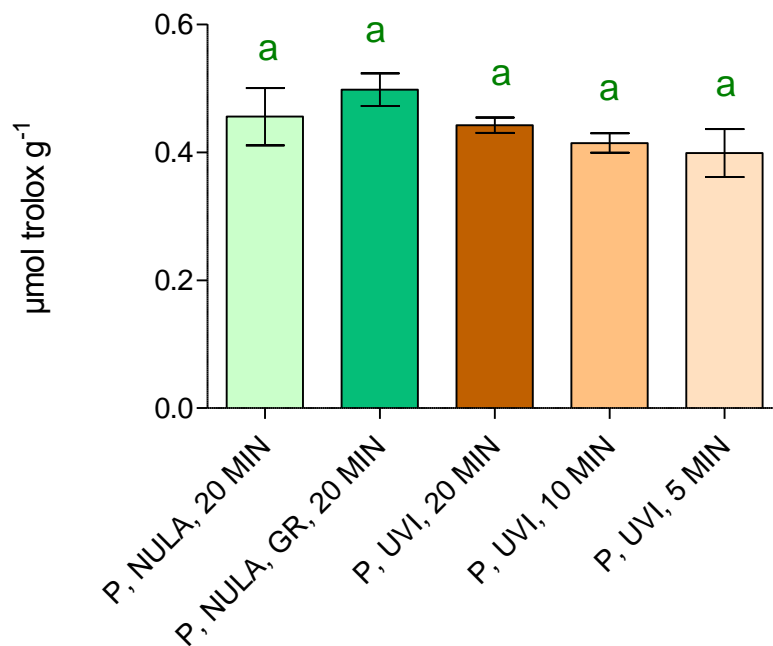
Na slici 17. prikazan je sadržaj ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu prosa koji je određen uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa.



**Slika 17.** Sadržaj ukupnih slobodnih fenolnih spojeva u prosu netretiranom i tretiranom UVI. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ).

Dobiveni rezultati za sadržaj ukupnih fenola prosa ukazuju da je najbolji učinak oslobađanja ukupnih fenolnih spojeva postignut nakon ultrazvučnog tretmana od 20 min, zatim 5 min te 10 min. Iako je 20 min tretman UVI pokazao najviše vrijednosti, dobivene podatke treba uzeti s oprezom budući da je koeficijent varijacije bio viši od 22%, do čega je došlo vjerojatno zbog eksperimentalne greške.

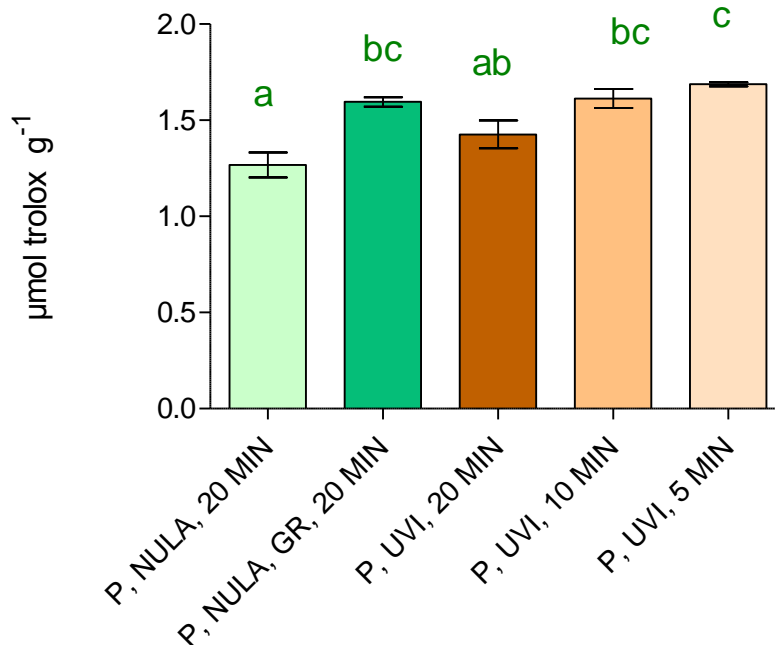
Na slikama 18 i 19 prikazan je antioksidacijski kapacitet etanolnog ekstrakta prosa određenog DPPH i FRAP metodom.



**Slika 18.** Antioksidacijski kapacitet prosa netretiranog i tretiranog UVI određen DPPH metodom. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ).

Iz prikazanih rezultata za antioksidacijsku aktivnosti vidljivo je da utrazvuk ima negativan učinak na antioksidacijsku aktivnost koja se upotrebom utrazvuka smanjivala duljim vremenom tretmana. Međutim analiza varijance pokazuje kako nema značajne statistične razlike između dobivenih vrijednosti. Niske vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva u prosu, koje su u usporedbi s heljdom (Slika 20) bile oko 27 puta niže možemo pripisati činjenici da je korišteno i analizirano proso bilo oljušteno, odnosno određeni sadržaj vlakana je bio niži od 3% (rezultati nisu prikazani). Rezultati su u skladu s Chandrasekara i sur. (2012) koji su u svojem istraživanju dokazali da oljušteni proso ima punu nižu antioksidacijsku aktivnost, ali i TPC. Naime, kod žitarica polifenoli se uglavnom nalaze u omotaču zrna.





**Slika 19.** Antioksidacijski kapacitet prosa netretiranog i tretiranog UVI određen FRAP metodom. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ).

Iz rezultata dobivenih FRAP metodom (Slika 19) možemo uočiti kako je najveća antioksidacijska aktivnost postignuta kod tretmana ultrazvukom visokog intenziteta nakon 5 minuta te vrijednost kod tog tretmana iznosi  $1,687 \mu\text{mol Troloksa g}^{-1}$ .

Budući da je najveća antioksidacijska aktivnost koja je izmjerena FRAP metodom bila nakon UVI tretmana od 5 minuta, baš kao i rezultati dobiveni Folin-Ciocalteu reagensom (ukoliko uzmemo u obzir visoke varijacije rezultata dobivenih nakon 20 minutnog tretmana), a rezultati dobiveni DPPH metodom (Slika 18) ne pokazuju značajno povećanje, odnosno usporedivi su s rezultatima uzorka koji je bio samo zagrijavan (bez UVI tretmana), možemo zaključiti da tretman ultrazvukom visokog intenziteta ne utječe značajno pozitivno na ekstrakciju polifenolnih spojeva i antioksidansa, odnosno da se isti učinak može postići i običnim zagrijavanjem.

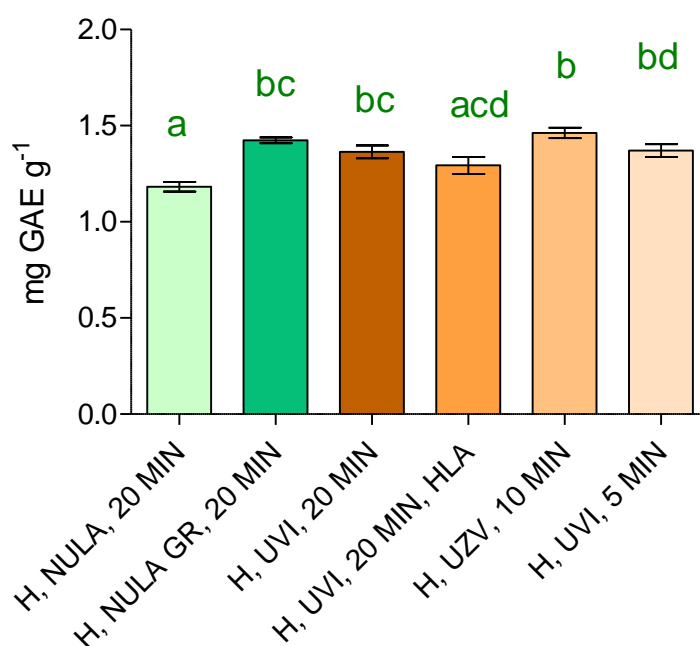
Za razliku od bučine pogače koeficijent korelacije DPPH i TPC vrijednosti bio je  $r = 0,411$  ( $p > 0,5$ ), dok je korelacija TPC vrijednosti sa vrijednostima izmjerenima FRAP metodom iznosila  $r = 0,374$  ( $p > 0,5$ ). S druge strane korelacija između vrijednosti dobivenih DPPH i FRAP metodom bila je  $r = 0,083$  ( $p > 0,05$ ). Ovi podaci ukazuju da ne postoji korelacija

između korištenih testova, što se može objasniti raznolikošću spojeva koji su različito reagirali s korištenim reagensima.

#### 4.3. UDIO UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST HELJDE

Na sljedećim slikama prikazani su rezultati mjerenje ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti heljde DPPH i FRAP metodama.

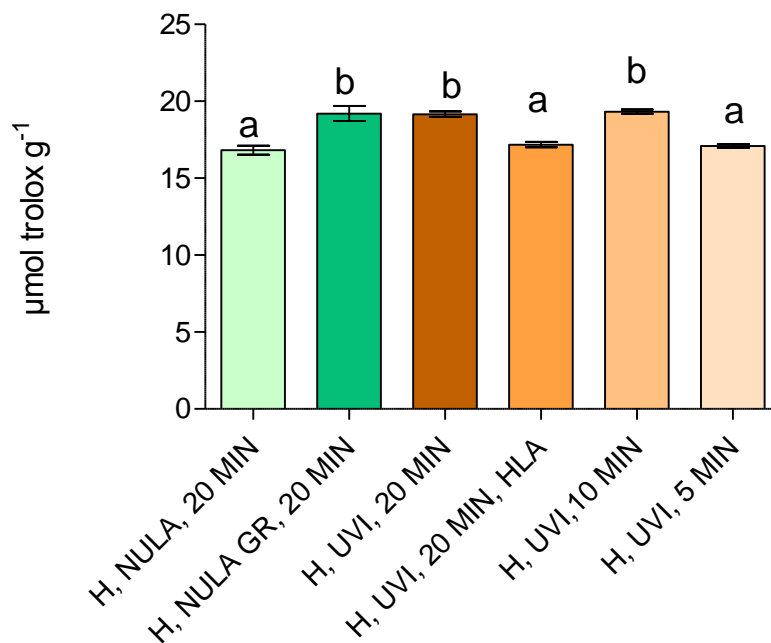
Na slici 20. prikazan je sadržaj ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu heljde koji je određen uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa.



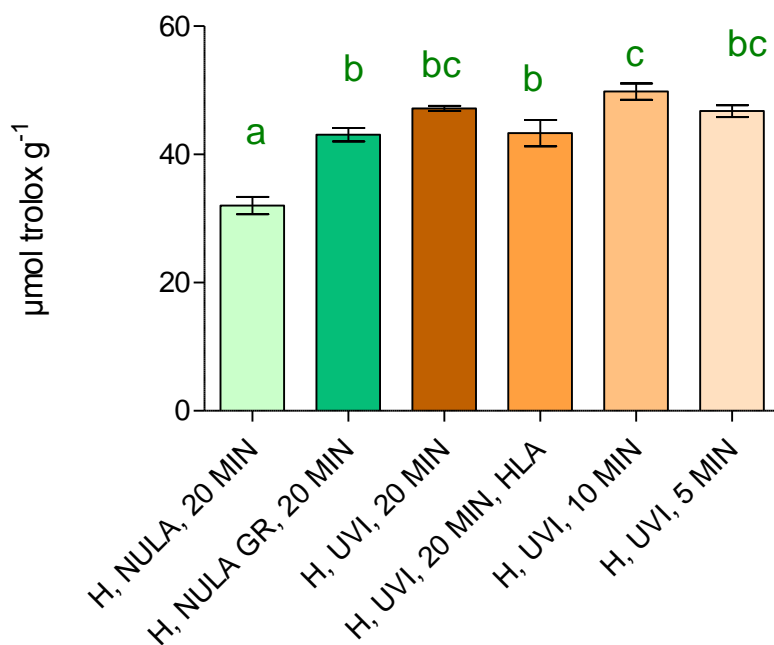
**Slika 20.** Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u heljdi tretiranoj i netretiranoj UVI. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ).

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti kako je ultrazvuk visokog intenziteta imao pozitivan učinak na količinu TPC u odnosu na netretirani i nezagrijavani uzorak, a najbolji rezultat je postignut pri tretmanu ultrazvuka u trajanju od 10 minuta pri čemu je koncentracija TPC iznosila 1,462 mg GAE g<sup>-1</sup> uzorka (s.tv.).

Na slikama 21 i 22 prikazan je antioksidacijski kapacitet etanolnog ekstrakta heljde određen DPPH i FRAP metodama.



**Slika 21.** Antioksidacijski kapacitet UVI tretirane i netretirane heljde određen DPPH metodom. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ).



**Slika 22.** Antioksidacijski kapacitet UVI tretirane i netretirane heljde određen FRAP metodom. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ).

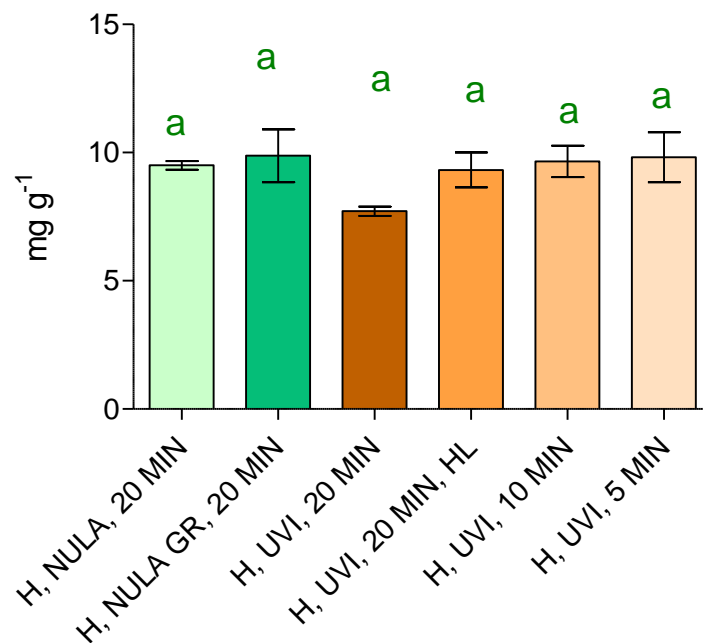
Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti kako je najveća antioksidacijska aktivnost postignuta kod tretmana ultrazvukom visokog intenziteta nakon 10 u odnosu na netretirani i nezagrijavani uzorak minuta. Najveća vrijednost kod mjerenja DPPH metodom iznosi 19,33  $\mu\text{mol}$  Troloksa po g uzorka (s.tv.), dok je najveća vrijednost kod mjerenja FRAP metodom iznosila 49,81  $\mu\text{mol}$  Troloksa  $\text{g}^{-1}$  uzorka (s.tv.). Iz dobivenog možemo uočiti linearnu koleraciju između sadržaja TPC i antioksidacijske aktivnosti. Naime pri većem udjelu TPC poveća se i antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom, pri čemu koeficijent korelacije DPPH i TPC vrijednosti,  $r = 0,687$  ( $p \leq 0,05$ ), dok je korelacija TPC vrijednosti sa vrijednostima izmerenima FRAP metodom nešto viša i iznosi  $r = 0,861$  ( $p \leq 0,05$ ). Korelacija između samih metoda za mjerenja antioksidacijske aktivnosti nije bila značajna, odnosno iznosila je  $r = 0,562$  ( $p = 0,057$ ).

Kratko vrijeme tretmana UVI (10 minuta) za postizanje maksimalnih vrijednosti analiziranih spojeva u heljdi vjerojatno proizlazi iz činjenice da su polifenoli u sjemenu heljde u velikom postotku prisutni u slobodnom obliku (Hung i Morita, 2008) pa je ultrazvuk visokog intenziteta dodatno poboljšao njihovo oslobađanje. Međutim, za razliku od bučine pogače gdje je dio spojeva već bio oslobođen iz staničnih stijenki prilikom ekstrakcije ulja te na taj način podložniji UVI degradaciji, kod heljde su ovi spojevi vjerojatno više djelomično mehanički zaštićeni matriksom te se u ispitivanom vremenu nije uspjelo doći do negativnog djelovanje UVI. Inače, za razliku od heljde, kao što je već rečeno, polifenoli drugih žitarica prvenstveno su vezani za komponente stanične stijenke pa se takvi kompleksi teško razgrađuju, a difuzija otapala u te materijale zahtijeva drastične uvjete ekstrakcije i dugo vrijeme ekstrakcije (Oniszcuk i sur., 2014).

#### **4.3.1. UDIO RUTINA U ETANOLNOM EKSTRAKTU HELJDE**

Između svih žitarica i pseudožitarica heljda je jedinstvena po tome što sadrži rutin, spoj iz skupine flavonodina kojemu se pripisuju brojni pozitivni učinci na zdravlje. Upravo je prisutnost rutina jedan od glavnih razloga iskorištavanje heljde u proizvodnji različitih vrsta prehrambenih proizvoda od heljde (Kreft i sur, 2006). Zbog značajnosti rutina, u ovom radu proučen je i utjecaj tretmana ultrazvukom visokog intenziteta na sadržaj rutina.

Na slici 23. prikaz je udio rutina u etanolnom ekstraktu heljde



**Slika 23.** Udio rutina u etanolnom ekstraktu heljde. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ( $p \leq 0,05$ ).

Dobiveni rezultati za sadržaj rutina u heljdi ukazuju na neutralan odnosno negativan učinak ultrazvuka visokog intenziteta na rutin, ovisno o vremenu tretmana. Na temelju ANOVA analize možemo uočiti kako nema značajne razlike u sadržaju rutina između uzoraka prije i nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta. Dobivene vrijednosti za rutin u skladu su s rezultatima koje su dobili Fabjan i sur. (2003) koji je dokazao kako sadržaj rutina ovisi o vrsti heljde i uvjetima uzgoja.

Za buduća istraživanja ostaje upitno bi li upotreba drugog otapala prilikom ultrazvučnog tretmana bila još efikasnija u oslobađanju rutina iz heljde. Naime, Peng i sur. (2013) u svom istraživanju tretirali heljdu ultrazvukom visokog intenziteta te uočili koleraciju između udjela metanola kao otapala i učinkovitosti ekstrakcije. Prilikom korištenja 10-50 % metanola, prinos rutina je bio izrazito manji u usporedbi kada je korišteni udio metanola bio iznad 50%, a kao mogući uzrok navode degradaciju rutina pri nižim vrijednostima metanola. Također, mogući razlog je i prisutnost veće hidrofilne šećerne skupine na kvercetinским dijelima molekule. Naime, u heljdi je rutin nekovalentnim vezama povezan na druge molekule i uključen je u staničnu strukturu biljke. Otapalo mora ući u stanične strukture kako bi se došlo do rutinskih molekula i kako bi se prekinule nekovalentne veze između rutinskih i drugih staničnih dijelova.

Sličan zaključak o važnosti vrste otapala su dobili i Yang i Zhang (2008) prilikom ekstrakcije rutina i kvercitina iz okriljene kurike (*E. Alatus (Thunb.)*), a koji su ispitivali različite koncentracije etanola (40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%). Njihovi su rezultati pokazali kako upotreba 70%-tne vodene otopine etanola daje najbolje rezultate.

#### **4.4. DVOSTRUKO DJELOVANJE ULTRAZVUKA**

Kako bi provjerili na koji način različiti efekti UVI, kavitacija i zagrijavanje, utječu na fenolne spojeve i antioksidanse, u slučaju heljde postavljen je još i pokus gdje je prilikom 20 min tretmana UVI uzorak bio hlađen na način da je čaša sa uzorkom uronjena u čašu s ledom te je postignuta temperatura od 47 °C (Tablica 7). Dobiveni su rezultati koji ukazuju na važan utjecaj temperature prilikom tretmana UVI na ispitivane spojeve. Naime, uslijed zagrijavanja uzorka bez primjene ultrazvuka visokog intenziteta (H, NULA GR, 20 MIN) uočeno je značajno povećanje sadržaja TPC i antioksidacijske aktivnosti (Slike 20, 21, 22), u odnosu na uzorak koji nije bio tretiran UVI i nije bio zagrijavan (H, NULA, 20 MIN). Razlog tome se može pripisati činjenici da povišena temperatura povećava topljivost slobodnih fenolnih spojeva i pomaže kod odvajanja funkcionalnih grupa fenolnih spojeva (Inglett i sur, 2011). Inglett i sur. (2009) svojim istraživanjem su također dobili iste rezultate, tj. potvrdili da povećanjem temperature dolazi do povećanja TPC. Da temperatura ima važan utjecaj na dobivene rezultate vidljivo je i iz rezultata gdje je uzorak tretiran UVI i istovremeno hlađen (H, UVI, 20 MIN, HL) imao niže izmjerene vrijednosti u kod sva tri testa u odnosu na UVI tretiran uzorak koji nije bio hlađen (H, UVI, 20 MIN). Povećanjem temperature ekstrakcijskog medija može se povećati difuzija otapala u stanice, a može se također poboljšati desorpcija i topljivost ciljnih spojeva stanica (Dong i sur., 2010). Međutim, kada temperatura ekstrakcije prelazi određeni prag (60 do 70 ° C), prinos ekstrakcije počinje se smanjivati. To se može pripisati smanjenom broju akustičnih kavitacijski mjehurića nastalih ultrazvukom i termičkoj degradaciji flavonoida (Zhang i sur., 2009; Esclapez i sur., 2011).

Iz dobivenih rezultata u ovom istraživanju vidljivo je kako je najveća količina spojeva kod heljde dobivena kod temperature oko 55 °C, koja je postignuta nakon tretmana ultrazvukom visokog intenziteta u trajanju 10 minuta. Ista temperatura je postignuta i bez tretmana ultrazvukom visokog intenziteta, samo grijanjem (H, NULA GR, 20 MIN) kada je postignut gotovo isti sadržaj i antioksidacijski kapacitet kao i nakon tretmana nakon 10

minuta. Između spomenuti rezultata nema značajne razlike, ali primjenom ultrazvuka visokog intenziteta isti rezultat je postignut u dvostruko kraćem vremenu. Ipak u budućim istraživanjima trebalo bi ispitati utjecaj samo zagrijavanja u kraćim vremenima (5 i 10 min) kako bi se dobio točniji uvid u dvostruki učinak ultrazvuka visokog intenziteta.

#### **4.5. USPOREDBA UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI BUČINE POGAČE, HELJDE I PROSA**

Na temelju dobivenih vrijednosti (Slika 20-22) može se zaključiti da je od istraživanih sirovina heljda najbogatija ukupnim fenolima (1,18 mg GAE g<sup>-1</sup>, s.tv.) i ima najveću antioksidacijsku aktivnost koja iznosi 16,82 μmol Troloks g<sup>-1</sup>, s.tv. (DPPH metoda) i 32,03 μmol Troloks g<sup>-1</sup>, s.tv. (FRAP metoda), a vrijednosti potkrepljuju brojni literaturni navodi (Watanabe, 1998; Wijngaardi i Arendt, 2006; Ratz-Łyko i Arct, 2015). No, i bučina pogača koja nastaje kao nusprodukt se pokazala kao izrazito vrijedna sirovina. Prema rezultatima prikazanih na Slikama 14-16, možemo uočiti da ona sadrži oko 4,5 puta manje ukupnih fenola (0,26 mg GAE g<sup>-1</sup>, s.tv) te ima oko 5 puta manju antioksidacijsku aktivnost mjerenu DPPH metodom (3,40 μmol Troloks g<sup>-1</sup>, s.tv), odnosno 4 puta manju antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom (8,61 μmol Troloks g<sup>-1</sup>, s.tv) u odnosu na heljdu. Prema rezultatima istraživanja Čukelj i sur. (2015), bučina pogača ima sličnu antioksidacijsku aktivnost kao kukuruz i zob. S druge strane, bučina pogača ima 7 puta više ukupnih fenolnih spojeva i veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na proso. Time možemo uočiti potencijal koji skriva ovaj nusprodukt za daljnu upotrebu.

Na temelju dobivenih vrijednosti (Slika 17-19) možemo zaključiti da je proso najsiromašniji ukupnim fenolima (0,04 mg GAE g<sup>-1</sup>, s.tv.) i ima najmanju antioksidacijsku aktivnost koja iznosi 0,46 μmol Troloks g<sup>-1</sup>, s.tv. (DPPH metoda) i 1,27 μmol Troloks g<sup>-1</sup>, s.tv. ukoliko (FRAP metoda). To su očekivani rezultati budući da se radi o oljuštenoj žitarici. Dodatno povećanje TPC i antioksidacijske aktivnosti (Slika 14-22) može se postići zagrijavanjem uzorka ili primjenom ultrazvuka visokog intenziteta. Interes za istraživanjem bučine pogače nije toliko izražen te do sada nije bilo objavljenih radova u kojima je tretirana bučina pogača. No, uvidjevši kakav potencijal skriva ova sirovina, za očekivati je da će se to u skorašnje vrijeme promijeniti.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata koji su dobiveni u okviru ovog istraživanja i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Ultrazvuk visokog intenziteta, snage 400 W pri 100% amplitudi i u vremenu djelovanja od 5, 10 ili 20 minuta imao je različiti utjecaj na oslobađanje ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost, ovisno o vrsti tretiranog uzorka (bučina pogača, heljda, proso) te vremenu trajanja tretmana.
2. U odnosu na netretiranu bučinu pogaču, ultrazvuk visokog intenziteta je imao negativan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost pogače izmjerenu DPPH i FRAP metodama, dok na udio slobodnih ukupnih fenolnih spojeva nije imao značajan utjecaj.
3. Ultrazvučni tretman nije imao utjecaj na udio slobodnih fenolnih spojeva i DPPH antioksidacijsku aktivnost ekstrakta prosa u odnosu na netretirani uzorak, ali je tretman u trajanju od 5 minuta za oko 33% povisio FRAP antioksidacijsku aktivnost u odnosu na netretirani uzorak.
4. Najveći utjecaj djelovanje ultrazvuka visokog intenziteta pokazao se na uzorcima mljevene heljde, kod koje je nakon 10 min uočeno povećanje i ukupnih slobodnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti, i to: 24% za ukupne fenolne spojeve, 15% za DPPH antioksidacijsku aktivnost i 56% za FRAP antioksidacijsku aktivnost
5. U odnosu na ukupne fenolne spojeve i antioksidacijsku aktivnost, ultrazvučni tretman heljde nije imao utjecaj na ekstrakciju najvažnijeg flavonoida heljde, rutina. Iako je uočeno vidljivo smanjenje količine rutina primjenom ultrazvuka u trajanju 20 min, ta razlika nije bila statistički značajna.
6. Ultrazvuk visokog intenziteta izaziva kavitaciju, ali i istovremeno zagrijava uzorak. U ovom istraživanju na primjeru heljde pokazano je da zagrijavanje ima važan utjecaj na oslobađanje fenolnih spojeva i antioksidansa, budući da su izmjerene vrijednosti dobivene nakon ultrazvučnog tretmana bile slične vrijednostima netretiranog, ali zagrijavanog uzorka. Ipak, ultrazvuk visokog intenziteta je taj učinak u većini slučajeva postigao u kraćem vremenu.



7. Bučina pogača se pokazala kao vrijedan izvor fenolnih spojeva i antioksidansa gdje su vrijednosti bile za 7 puta veće od prosa za TPC, DPPH i FRAP, a manje od heljde za 5puta. Ipak, ultrazvučni tretman nije prepoznat kao metoda za povećanje tih istih spojeva u bučinoj pogači jer nema značajan utjecaj ili dovodi do određenog stupnja degradacije.

## 6. LITERATURA

- Ahmed, A., Khalid, N., Ahmad, A., Abbasi, A., Latif, M. S. Z., Randhawa, M., A. (2014) Phytochemicals and biofunctional properties of buckwheat: a review. *J. Agr. Sci.* **152**, 349–369.
- Almeida, D. (2006) Manual de culturas hortícolas. Presença, Lisabon, str. 111.
- Anonymous (2010) Alternativa za Vas Prirodnim putem do zdravlja. <http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/zanimljivosti-o-bundevama>. Pristupljeno 13 srpnja 2017.
- Anonymous (2012) Lekovite biljke. <http://www.lekovitebiljke.com/zdrava-hrana/brasno-kore-hleb-caj-i-jastuk-od-heljde>. Pristupljeno 13 srpanj 2017.
- Anonymous (2015) Health benefits times. com., <https://www.healthbenefitstimes.com/millet/>. Pristupljeno 13 srpanj 2017.
- Apak, R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K.M., Özyürek M., Güçlü K. (2013) Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **85** (5), 957-998.
- Arora, A. Nair, M.G., Strasburg, G.M. (1998) Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1355.
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K. Versteeg, C. (2008) Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innov Food Sci. Emerg. Technol.* **9**, 155–160.
- Bagdi, A., Balázs, G., Schmidt, J., M. Szatmári, M., Schoenlechner, R., E. Berghofer, E., Tömöskö zia., S. (2011) Protein characterization and nutrient composition of Hungarian proso millet varieties and the effect of decortication. *Acta Aliment. Hung.* **40**, 128–141.
- Barta, J., Kalinova, J., Moudry, J., Curn, V. (2004). Effects of environmental factors on protein content and composition in buckwheat flour. *Cereal Res. Commun.* **32**, 541–548.
- Bašić, M., Vibovec, H. (2013) Usporedba učinkovitosti ekstrakcije antocijana i tanina iz pokožice grožđa sorte Plavac maliionskim tekućinama i klasičnim postupcima ekstrakcije. Prehrambeno biotehnološki fakultet, Disertacija, Zagreb.

- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (Frap) as a measure of “antioxidant power”: The frap assay. *Anal Biochem.* **239**, 70-76.
- Bonafaccia, G., Fabjan, N. (2003). Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. Research Reports, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana (Slovenia) **81**, 349–355.
- Bonafaccia, G. Marocchini, M., Kreft, I. (2003) Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chem.* **80**, 9-15.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. *Method Enzymol.* **186**, 343-55.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol.* **28**, 25-30.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev.* **56**, 317–333.
- Brunori, A., Baviello, G., Zannettino, C., Corsini, G., Sandor, G., Vegvari, G. (2010) The use of tartary Nutritional profile of buckwheat 363 buckwheat whole flour for bakery products: recent experience in Italy. Annals of the University Dunarea de Jos Galati Fascicle V1 – *Food Technol.* **34**, 33–38.
- Burda, S. i Oleszek, W. (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem.* **49**, 2774-2779.
- Caniço, F., Ramalho, M., Lima, G., Quedas, F. (2005) Estudo da evolucao da textura e cor da Curcubita spp. na pos-colheita e ao longo do tempo, 7<sup>o</sup> *Encontro da Quimica dos Alimentos*, str. 2.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med.* **22**,749-60.
- Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2010) Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* **58**, 6706–6714.
- Chandrasekara, A., Shahidi F. (2011) Determination of antioxidant activity in infree and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J. Funct. Food.* **3**, 144–58.
- Chandrasekara, A., Naczki, M., Shahidi, F. (2012) Effect of processing on the antioxidant activity of millet grains. *Food Chem.* **133**, 1–9.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M. K. (2011) Applications of ultrasound in food technology. *Ultrason. Sonochem.* **18**, 813–835.

- Chen, C. C., Huang, Y. L., Huang, F. I., Wang, C. W., Ou, J. C. (2001) Water-soluble glycosides from *Ruta graveolens*. *J. Nat Prod.* **64**, 990–992.
- Christa, K. I Soral-Smietana, M. (2008) Buckwheat grains and buckwheat products- nutritional and prophylactic value of their components- a review. *Czech J. Food Sci.* **26**, 153–162.
- Čukelj, N., Ajredini, š., Krpan, M., Novotni, D., Voučko, B., Vrana Špoljarić, I., Hruškar, M., Ćurić, D. (2015) Bioactives in organic and conventional milled cereal products from Croatian market. *Croat. J. Food Sci. Technol. Biotechnol. Nutr.*, **10 (1-2)**, 23-30.
- Čukelj, N., Novotni, D., Ćurić, D. (2010) Antioxidant properties of whole grain cereals. *Croat. J. Food Sci. Technol. Biotechnol. Nutr.*, **5(1-2)**, 18-23.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* **15(10)**, 7313-7352.
- Dendy, D. A. V. (1995) Sorghum and Millets: Chemistry and Technology, AACC, St.Paul, Minesota, str. 406.
- Devi, P. B., Vijayabharathi, R., Sathyabama, S., Malleshi, N. G., Priyadarisini, V. B. (2011) Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana* L.) polyphenols and dietary fiber: A review. *J. Food Sci. Technol.* **51(6)**, 1021–1040.
- Dong, J., Liu, Y., Liang, Z., Wang, W. (2010) Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. *Ultrason. Sonochem.* **17**, 61–65.
- Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2 (2)**, 22-33.
- Duthie, G. G., Brown, K. M. (1994) Reducing the risk of cardiovascular disease. U: Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals (Goldberg, I., ured.), Chapman & Hall, New York, str. 19–38.
- Dziedzic, K., Górecka, D., Marques, A., Rudzińska, M., Podolska, G. (2015) Content of phytosterols in raw and roasted buckwheat groats and by-product. *Czech J. Food Sci.* **33**, 424–430.
- Escarpa, A., Gonzalez, M.C. (2001) An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Crit Rev Anal Chem.* **31**, 57-139.
- Esclapez, M. D., Garcia-Perez, J. V., Mulet, A., Carcel, J. A. (2011) Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Eng. Rev.* **3**, 108–120.

- Fabjan, N., Rode, J. Košir, I. Z., Wang, Z., Zhang, Z., Kreft, I. (2003) Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6452-6455.
- Fairbanks, H. V. (2001) Drying powdered coal with the aid of ultrasound, *Powder technol.* **40 (1-3)**, 257-264.
- FAO (1995) Sorghum and Millets in Human Nutrition, Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome, str. 484.
- FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations) (2014) Faostat. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- FAO (Food and Agricultural Organization) (2012). Economic and Social Department: The Statistical Division. Statistics Division 2012. Available from FAO. <http://www.fao.org/statistics/en/>
- Fardet, A., Rock, E., Rémésy, C. (2008) Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? *J. Cereal Sci.*, **48(2)**, 258-276.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S., Bicchiega, V. (2010) Effect of phytosterols on copper lipid peroxidation of human low-density lipoproteins. *Nutrition*, **26**, 296–304.
- Fu, C. L., Shi, H., Li, Q. H. (2006) A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods Hum. Nutr.* **61**, 73–80.
- Gaberščik, A., Vončina, M., Trošt, T., Germ, M., Björn, L. O. (2002) Growth and production of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) treated with reduced, ambient and enhanced UV-B radiation. *J. Photoch. Photobio. B.*, **66**, 30–36.
- Geervani, P., Eggum, B.O. (1989) Nutrient composition and protein quality of minor millet. *Plant Food Hum. Nutr.* **39**, 345-357.
- Gong, G., Qin, Y., Huang, W., Zhou, S., Yang, X., Li, D. (2010) Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **628**, 27-35.
- Goufo, P., Trindade, H. (2014) Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and phytic acid. *Food Science Nutrition*, **2**, 75-104,
- Guo, X., Yao, H., Chen, Z. (2007) Effect of heat, rutin and disulfide bond reduction on in vitro pepsin digestibility of Chinese tartary buckwheat protein fractions. *Food Chem.* **102**, 118–122.

- Hadimani, N. A. i Malleshi, N. G. (1993) Studies on milling, physicochemical properties, nutrient composition and dietary fiber content of millets. *J. Food Sci. Technol.* **30**, 17–20.
- Hagels, H. (1999) *Fagopyrum esculentum* Moench. Chemical review. U: Zbornik *BFUL* **73**, 29–38.
- Henriques, F., Guine, R. P. F., Barroca, M. J. (2012) Chemical Properties of Pumpkin Dried by Different Methods. *Croat. J. Food Sci. Technol. Biotechnol. Nutr.* **7(1-2)**, 98-105.
- Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Krešić, G. (2009) Procesiranje hrane ultrazvukom. U: *Procesi konzerviranja hrane: Novi postupci*, Tehnička knjiga, Zagreb, str. 53-67.
- Hilu, K. W., De Wet, J. M. J, Seigler, D. (1978) Flavonoid patterns and systematics in Eleusine. *Biochem. Syst. Ecol.* **6**, 247–249.
- Holasova, M., Fiedlerova, V., Smrcinova, H., Orsak, M., Lachman, J., Vavreinova, S. (2002) Buckwheat – The source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res. Int.*, **35**, 207–211.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 1841-1856.
- Hung, P.V. i Morita, N. (2008) Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities. *Food Chem.* **109**, 325–331.
- Ikeda, S., Yamashita, Y., Tomura, K., Kreft, I. (2006) Nutritional comparison in mineral characteristics between buckwheat and cereals. *Fagopyrum.* **23**, 61–65.
- Inglett, G.E., Chen, D., Berhow, M., Lee, S. (2011) Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Food Chem.* **125**, 923–929.
- Jiang, P., Burczynski, F., Campbell, C., Pierce, G., Austria, J.A., Briggs, C. J. (2007) Rutin and flavonoid contents in three Nutritional profile of buckwheat 365 buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Res. Int.* **40**, 356–364.
- Kalinová, J. (2007) Nutritionally important components of Proso millet (*Panicum miliaceum* L.) *Food.* **1 (1)**, 91-100.
- Kalinova, J., Moudry, J. (2006) Content and quality of protein in proso millet (*Panicum miliaceum* L.) varieties. *Plant Food Hum. Nutr.* **61**,45–49.

- Kawa, J. M., Taylor, C.G., Przybylski, R. (2003) Buckwheat concentrate reduces serum glucose in streptozotocind diabetic rats. *J. Agr Food Chem.* **51**, 7287–7291.
- Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida: a review. *Arh Hig Rada Toksikol.* **55**, 279-290.
- Kehrer, J. P., Smith, C.V. (1994) Free radicals in biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. U: Natural antioxidants, (Frei, B., ured.), Academic Press, San Diego, str. 25-62.
- Khan, A. G., Kuek, T. M., Chaudhury, T. M., Khoo, C.S., Hayes, W. J. (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere.* **41**, 197.
- Kim, S. J., Zaidul, I. S. M., Suzuki, T., Mukasa, Y., Hashimoto, N., Takigawa, S., Takahiro, N., Chie, M.-E., Hiroaki, Y. (2008) Comparison of phenolic compositions between common and tartary buckwheat (*Fagopyrum*) sprouts. *Food Chem.* **110**, 814–820.
- Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. (1993) Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.* **47**,(4), 85–89.
- Kitabayashi, H., Ujihara, A., Hirose, T., Minami, M. (1995) Varietal differences and heritability for rutin content in common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Jpn. J. Breed.* **45**, 75–79.
- Kreft, I., Fabjan, N., Yasumoto, K. (2006) Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chem.* **98**, 508–512.
- Krkoskova, B. i Mrazova, Z. (2005) Prophylactic components of buckwheat. *Food Res. Int.* **38**, 561–568.
- Kuntić, V., Filipović, I., Vujić, Z. (2011) Effects of rutin and hesperidin and their Al(III) and Cu(II) complexes on in vitro plasma coagulation assays. *Molecules.* **16**, 1378–1388.
- Lachmann, S. i Adachi, T. (1990) Studies on the influence of photoperiod and temperature on floral traits in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) under controlled stress conditions. *Plant Breeding.* **105**, 248–253.
- Leskošek-Čukalović I. (2002) *Tehnologija piva - slad i nesladovane sirovine*. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Li, A. R. (2003) “*Fagopyrum*”. U: Flora of China, (Zhengyi, W., Raven, P. H., ured.), Missouri Botanical Garden Press, Beijing, China.

- Li, J., Chen, Z., Guan, X., Liu, J., Zhang, M., Xu, B. (2008) Optimization of germination conditions to enhance hydroxyl radical inhibition by water soluble protein from stress millet. *J Cereal Sci.* **48**, 619–24.
- Li, S. Q. i Zhang, Q. H. (2001) Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Crit. Rev. Food Sci.* **41**, 451–464.
- López-Cueto, G., Ostra, M., Ubide, C., Zuriarrain, J. (2004) Fenton's reagent for kinetic determinations. *Anal Chim Acta.* **515**, 109-16.
- Lorenz, K. (1983) Tannins and phytate in proso millets (*Panicum miliaceum*). *Cereal chemistry.* **60**, 424-426.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79** (5), 727-747.
- Mason, T. J. (1992) Industrial sonochemistry: potential and practicality, *Ultrason. Sonochem.* **30** (3), 192-196.
- Mason, T. J. (1998) Power ultrasound in food processing- the way forward. U: *Ultrasound in Food Processing*. Povey, M. J. W. i Mason, T. J. ( Ured), Blackie Academic & Professional: London.
- Michalova, A., Dotlacil, L., Cejka, L. (1998). Evaluation of common buckwheat cultivars. *Rost. Vyroba.* **44**, 361–368.
- Miller, N. J , Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **84**, 407-12.
- Milner, J. A. (1994) Reducing the risk of cancer. U: *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals* (Goldberg, I., ured.), Chapman & Hall, New York, str. 39–70.
- Milovanović, M., M., Demin, M., A., Vucelić-Radović, B. V., Žarković, B. M., Stikić R. I. (2014) Evaluation of the nutritional quality of wheat bread prepared with quinoa, buckwhwat and pumpkin seed blends. *J. Agr. Sci.* **59** ( 3), 319-328.
- Morishita, T., Yamaguchi, H., Degi, K. (2007) The contribution of polyphenols to antioxidative activity in common buckwheat and tartary buckwheat grain. *Plant Prod. Sci.*, **10**, 99–104.
- Naczek, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A.* **1054**, 95-111.
- Odumodu, C. U. (1992) Antinutrients content of some locally available legumes and cereals in nigeria. *Trop. Geogr. Med.* **44**, 260-263.



- Ohsawa, R. i Tsutsumi, T. (1995) Inter-varietal variations of rutin content in common buckwheat flour (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Euphytica*. **86**, 183–189.
- Oniszczyk, A., Podgórski, R., Oniszczyk, T., Żukiewicz-Sobczak, W., Nowak, R., Waksmundzka-Hajnos, M. (2014) Extraction methods for the determination of phenolic compounds from *Equisetum arvense* L. herb. *Ind. Crop. Prod.* **61**, 377–381.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 3122-3128.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2(5)**, 270-278
- Park, B. J., Park, J. I., Chang, K. J., Park, C. H. (2004) Comparison in rutin content in seed and plant of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). U: Advances in buckwheat research: *Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat* (Faberová, I., Dvořáček, V., Čepková, P., Hon, I., Holubec, V., Stehno, Z., ured.), Research Institute of Crop Production, str. 626–629.
- Park, N. I., Li, X., Uddin, M.R., Park, S. U. (2011) Phenolic compound production by different morphological phenotypes in hairy root cultures of *Fagopyrum tataricum* gaertn. *Arch. Biol. Sci.* **63**, 193–198.
- Peng, L. X., Zou, L., Zhao, J. L., Xiang D. B. , Zhu, P., Zhao, G. (2013) Response surface modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of three flavonoids from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Pharmacogn. Mag.* **9**, 35.
- Pérez-Jiménez, J., S. Arranz, M. Taberner, M. E. Díaz-Rubio, J. Serrano, I. Goñi i sur. (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int.* **41**, 274–285.
- Povey, M. J .W. i Mason, T. J. (1998) *Ultrasound in Food Processing*, Blackie Academic & Professional, London.
- Pryor, W. A. (1991) The antioxidant nutrients and disease prevention - what do we know and what do we need to find out?. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 391–393.
- Qin, P., Wang, Q., Shan, F., Hou, Z., Ren, G. (2010) Nutritional composition and flavonoids content of flour from different buckwheat cultivars. *Int. J. Food Sci. Tech.* **45**, 951–958.

- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., i sur. (2000) Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.* **72**, 35–42.
- Ramachandra, G., Virupaksha, T. K., Shadaksharaswamy, M. (1977) Relationship between tannin levels and in vitro protein digestibility in finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn). *J Agric Food Chem.* **25**, 1101–1104.
- Ratz-Lyko A., Arct J. (2015) Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of enzymatically hydrolysed Cucurbita pepo and Linum usitatissimum seedcakes. *Food Sci. Biotechnol.* **24(5)**, 1789-1796.
- Režek Jambrak, A. (2008) Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke. Prehrambeno biotehnološki fakultet, Disertacija, Zagreb.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend Plant. Sci.* **2**, 152.
- Rice-Evans, C. i Miller, N. J. (1994) Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Method Enzymol.* **234**, 279-283.
- Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C. G. (2003). Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A.* **1012**, 119–128.
- Rozema, J., Björn, L. O., Bornmann, J. F., Gaberščik, A., Häder, D. P., Trošt, T. i sur (2002). The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems – an experimental and functional analysis of the evolution of UV-B absorbing compounds. *J. Photoch. Photobio. B.* **66**, 2–12.
- Sakihama, Y., Mano, J., Sano, S., Asada, K., Yamasaki, H. (2000) Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **279**, 949.
- Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: New methods of Food Preservation, (Gould, G.W., ured.), Blackie Academic & Professional, London.
- Saleh, A. S. M., Zhang, Q., Chen, J., Shen Q. (2013) Millet Grains: Nutritional Quality, Processing, and Potential Health Benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* **12**, 281-295.

- Salunkhe, D. K., Jadhav, S. J., Kadam, S. S., Chavan, J. K. (1985) Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *Plant Physiol.* **79**, 480-484.
- Scalbert, A., Manach, C., Moran, C., Remesy, C. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci.* **45**, 287-306.
- Shahidi, F., Yeo, J. D. (2016) Insoluble-bound phenolics in food: a review. *Molecules.* **21(9)**, 1216
- Steadman, K. J., Burgoon, M. S., Lewis, B. A., Edwardson, S. E., Obendorf, R. L. (2001) Buckwheat seed milling fractions: description, macronutrient composition and dietary fibre. *J. Cereal Sci.* **33**, 271–278.
- Steadman, K. J., Burgoon, M. S., Schuster, R. L., Lewis, B. A., Edwardson, S. E., Obendorf, R. L. (2000) Fagopyritols, D-chiro-inositol, other soluble carbohydrates in buckwheat seed milling fractions. *J. Agr. Food Chem.* **48**, 2843–2847.
- Tamer, C. E. i Çopur Ö. U. (2014) Development of Value-Added Products from Food Wastes. U: Food Processing Quality Assessment. (Malik, A., Erginkaya, Z., Ahmad, S., Erten, H., ured.), Springer , New York, str. 453-475.
- Thompson, L. U. (1993) Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Res Int.* **26**,131–149.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* **2**, 1231-1246.
- Verstraeten, S. V., Keen, C. L., Schmitz, H. H., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2003) Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biol. Med.* **34**, 84–92.
- Vinatoru, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrason. Sonochem.* **8**, 303-313.
- Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 300.
- Watanabe, M. (1998) Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. *J. Agr. Food Chem.* **46**, 839–845.
- Wierdsma, N. J., Van Bokhorst-de van der Schueren, M. A. E., Berkenpas, M., Mulder, C. J. J. Van Bodegraven, Ad. A. (2003) Vitamin and mineral deficiencies are highly prevalent in newly diagnosed celiac disease patients. *Nutrients.* **5(10)**, 3975-3992.
- Wijngaard, H.H. i Arendt, E.K. (2006) Buckwheat. *Cereal Chem.* **83**, 391–401.

- Xanthopoulou, M. N., Nomikos, T., Fragopoulou, E., Antonopoulou, S. (2009) Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. *Food Res. Int.* **42**, 641–646.
- Yadav, M., Jain, S., Tomar, R., Prasad, G. B. K. S., Yadav, H. (2010) Medicinal and biological potential of pumpkin: An updated review. *Nutr. Res. Rev.* **23**,184-190.
- Yamasaki, H., Sakihamay, Y., Ikehara, N. (1997) Flavonoid peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cell against H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> . *Plant Physiol.* **115**, 1405.
- Yang, N., Li, Y.M., Zhang, K., Jiao, R., Ma, K.Y., Zhang, R., Ren, G., Chen, Z. Y. (2014) Hypocholesterolemic activity of buckwheat flour is mediated by increasing sterol excretion and down-regulation of intestinal NPC1L1 and ACAT2. *J. Funct. Food.* **6**, 311–318.
- Zdunczyk, Z., Flis, M., Zielinski, H., Wroblewska, M.,Antoszkiewicz, Z., Juskiewicz, J. (2006) In vitro antioxidant activities of barley, husked oat, naked oat, triticale, and buckwheat wastes and their influence on the growth and biomarkers of antioxidant status in rats. *J. Agr. Food Chem.* **54**, 4168–4175.
- Zhang, H. F., Yang, X. H., Zhao, L. D., Wang, Y. (2009) Ultrasonic assisted extraction of epimedin C from fresh leaves of Epimedium and extraction mechanism. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **10**, 54-60.
- Zhou, K., Yu. L. (2004) Effects of extraction solvent on the wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT Food Sci. Technol.* **37**, 717–721.
- Zinoviadou, K. G., Galanakis, C. M, Brnčić, M., Grimi, N., Boussetta, N., Mota, M. J., Saraiva, J., Patras, A., Tiwari, B. K., Barba, F. J. (2015) Fruit juice sonication: Implications on food safety, physicochemical and nutritional properties. *Food Res. Int.* **77(4)**, 743-752.