

Stabilnost fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta cvijeta trnine tijekom sušenja raspršivanjem

Lisica, Patricija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:375495>

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, rujan 2018.

Patricija Lisica 913/PI

**STABILNOST FENOLNIH
SPOJEVA U PRAHOVIMA
EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE
TIJEKOM SUŠENJA
RASPRŠIVANJEM**

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

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

Veliko hvala prof.dr.sc. Verici Dragović-Uzelac, mojoj mentorici, na ukazanom povjerenju, susretljivosti i suradnji. Od srca zahvaljujem dr.sc. Sandri Pedisić, doc.dr.sc. Zoranu Zoriću te doc.dr.sc. Ivoni Elez Garofulić na svoj pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela, izvedbe istraživanja te obrađivanja rezultata.

Najveće hvala mojim roditeljima, braći, baki, uji i ujni koji su sa mnom dijelili svaki uspjeh, svaki pad i bili uz mene tijekom cijelog studija. Hvala Vam na bezuvjetnoj podršci u svim trenucima u mom životu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

STABILNOST FENOLNIH SPOJEVA U PRAHOVIMA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE TIJEKOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

Patricija Lisica, 913/PI

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je primjenom sušenja raspršivanjem proizvesti prah ekstrakta cvijeta trnine te utvrditi utjecaj temperature (120, 150 i 180 °C), omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (0,5-2) te udjela inulina (0-0,5) na stabilnost fenolnih spojeva te antioksidacijski kapacitet. Ovim istraživanjem obuhvaćeno je određivanje ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola primjenom spektrofotometrijskih metoda, dok je antioksidacijski kapacitet određivan ORAC metodom. U odnosu na početni ekstrakt u prahovima dobivenim sušenjem ekstrakta cvijeta trnine zadržavanje fenolnih spojeva, ovisno o primjenjenim uvjetima, određeno je u rasponu od 25,12 do 71,75 %. Najveća koncentracija ukupnih fenola određena je u uzorku sušenom pri temperaturi od 120 °C, omjeru maltodekstrina i suhe tvari ekstrakta 2:1 te udjelu inulina 0,25, dok su najveće koncentracije ukupnih flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola kao i najveći antioksidacijski kapacitet određeni u uzorku sušenom pri temperaturi od 180 °C, omjeru maltodekstrina i suhe tvari ekstrakta 1:1 te udjelu inulina 0,5. Na temelju provedene MANOVA ($p \leq 0,05$) utvrđeno je da temperatura statistički značajno utječe na zadržavanje svih skupina fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet te da je veći dodatak inulina (0,5 %) i omjera nosača i suhe tvari (2:1) imao pozitivan utjecaj na zadržavanje svih fenolnih spojeva i na antioksidacijski kapacitet prahova cvijeta trnine.

Ključne riječi: *trnina, prah ekstrakta cvijeta trnine, fenolni spojevi, sušenje raspršivanjem, antioksidacijski kapacitet*

Rad sadrži: 51 stranica, 15 slika, 4 tablice, 91 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: *doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić i dr. sc. Sandra Pedisić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. *Doc.dr.sc. Zoran Zorić (predsjednik)*
2. *Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac (mentor)*
3. *Prof.dr.sc. Branka Levaj (član)*
4. *Prof.dr.sc. Zoran Herceg (zamjena)*

Datum obrane: 24. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

STABILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN BLACKTHORN FLOWER EXTRACTS POWDERS PRODUCED BY SPRAY DRYING

Patricija Lisica 913/PI

Abstract: The aim of this study was to produce powder from blackthorn flower extract by spray drying and to determine the effect of temperature (120, 150 and 180 °C), carrier:solid content ratio (0.5-2) and inulin proportion (0-0.5) on the stability of phenolic compounds and antioxidant capacity. Total phenolics, flavonoids, hydroxycinnamate acids and flavonols were analyzed by spectrophotometric methods and antioxidant capacity by the ORAC method, respectively. Compared to the initial flower extract, the retention of phenolic compounds in powders, depending on the drying conditions applied, was in the range from 25.12 to 71.75 %. The highest concentration of total phenolics was in a sample spray-dried at 120 °C, the ratio of maltodextrin and dry matter extract 2:1 and inulin proportion 0.25. The highest concentrations of total flavonoids, hydroxycinnamic acids and flavonols and the antioxidant capacity were determined in a sample dried at 180 °C, the ratio of maltodextrin and dry matter extract 1:1 and the proportion of inulin 0.5, respectively. MANOVA ($p \leq 0.05$) showed that temperature has a statistically significant effect on the retention of all groups of phenolic compounds and antioxidant capacity. Positive effect on the retention of all phenolic compounds and antioxidant capacity of blackthorn flower powders had also higher proportion of inulin (0.5 %) and carrier:solid content ratio (2:1).

Key words: *blackthorn, blackthorn flower extract powder, phenolic compounds, spray drying, antioxidant capacity*

Thesis contains: 51 pages, 15 figures, 4 tables, 91 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. Verica Dragović Uzelac, Full Professor*

Technical support and assistance: *PhD. Ivona Elez Garofulić Assistant Professor, PhD. Sandra Pedisić*

Reviewers:

1. *PhD. Zoran Zorić, Assistant Profesor (president)*
2. *PhD. Verica Dragović-Uzelac (mentor)*
3. *PhD. Branka Levaj, Full Professor*
4. *PhD. Zoran Herceg, Full Professor (substitute)*

Thesis defended: 24 September 2018

Sadržaj:

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. TRNINA (<i>Prunus spinosa</i> L.) | 2 |
| 2.1.1. Osnovne karakteristike i kemijski sastav biljke | 2 |
| 2.1.2. Fenolni spojevi trnine | 4 |
| 2.1.3. Upotreba trnine i utjecaj na zdravlje | 7 |
| 2.1.4. Biljni ekstrakti | 7 |
| 2.2. SUŠENJE BILJNIH EKSTRAKTA | 8 |
| 2.2.1. Sušenje raspršivanjem | 8 |
| 2.2.1.1. Proces sušenja raspršivanjem | 9 |
| 2.2.2. <i>Primjena nosača pri sušenju raspršivanjem</i> | 11 |
| 2.2.2.1. Odabir nosača za sušenje raspršivanjem | 12 |
| 2.2.3. <i>Utjecaj nosača i temperature na zadržavanje fenolnih spojeva</i> | 13 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 15 |
| 3.1. MATERIJALI | 15 |
| 3.1.1. Uzorak cvijeta trnine | 15 |
| 3.1.2. Kemikalije | 15 |
| 3.1.3. Aparatura i pribor | 18 |
| 3.2. METODE RADA | 19 |
| 3.2.1. Ekstrakcija cvijeta trnine vodom u ultrazvučnoj kupelji | 19 |
| 3.2.2. Određivanje ukupne suhe tvari | 19 |
| 3.2.3. Proizvodnja praha ekstrakta cvijeta trnine primjenom sušenja raspršivanjem ... | 20 |
| 3.2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz prahova ekstrakta cvijeta trnine | 23 |
| 3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenolnih spojeva | 23 |
| 3.2.6. Određivanje ukupnih flavonoida | 25 |
| 3.2.7. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola | 26 |
| 3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom | 29 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 31 |
| 4.1. Utjecaj parametara sušenja na koncentracije fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta cvijeta trnine | 31 |
| 4.2. Utjecaj parametara sušenja na antioksidacijski kapacitet u prahovima ekstrakta cvijeta trnine | 39 |

| | |
|----------------------------|-----------|
| 5. ZAKLJUČCI | 42 |
| 6. LITERATURA | 43 |

1. UVOD

Gospodarski i industrijski razvoj utjecali su na promjene potrošačkih navika s obzirom na kvalitetu hrane koju konzumiraju, zastupljenosti bioaktivnih komponenti te njihovim potencijalnim pozitivnim učincima na zdravlje. Sukladno tome raste zanimanje za ljekovitim vrstama biljaka koje postaju predmet mnogobrojnih istraživanja sa svrhom njihove primjene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je divlja vrsta roda *Prunus* koja raste na obroncima neobrađenih područja u gotovo cijeloj Europi, Zapadnoj Aziji i Sjevero-Zapadnoj Africi. Gotovo svi dijelovi ove biljke pokazuju ljekovita svojstva zbog prisutnosti fenolnih spojeva, vitamina i minerala, međutim, cvijet i plod su najvrjedniji izvori bioaktivnih komponenti. Zbog prisustva različitih skupina fenolnih spojeva, cvijet trnine pokazuje određene zdravstvene benefite kao što su: eliminacija štetnih tvari i viška natrijevih iona iz metabolizma, pročišćavanje krvi i pluća, jačanje želuca, smanjenje propusnosti krvnih žila te laksativno i diuretičko djelovanje (Sikora i sur., 2013). Bioaktivne komponente iz ljekovitog bilja najčešće se ekstrahiraju primjenom različitih postupaka ekstrakcije, a dobiveni ekstrakti se mogu koristiti u tekućem obliku ili prevoditi u stabilniju formu praha.

Ključan korak pri izolaciji bioaktivnih komponenti je ekstrakcija otapalom pri čemu dolazi do izdvajanja i koncentriranja sastojaka iz homogenih smjesa biljnih tkiva u tekuću fazu. Tekući ekstrakti se često podvrgavaju različitim postupcima sušenja, kako bi se ekstrakt preveo u stabilniju formu praha poželjnih fizikalno-kemijskih osobina uz maksimalno zadržavanje bioaktivnih komponenti. Najčešće korištena metoda sušenja za sušenje ekstrakata koji sadrže termolabilne bioaktivne molekule je sušenje raspršivanjem, pri čemu se tekuća namirnica raspršuje u struji vrućeg plina, najčešće zraka. Prije sušenja se u tekući ekstrakt dodaju nosači, i to najčešće maltodekstrin i arapska guma, kako bi poboljšali proces sušenja, zaštitili bioaktivne komponente od utjecaja temperature te kako bi nastao prah što boljih svojstava.

U ovom istraživanju cilj je bio primjenom sušenja raspršivanjem proizvesti prah ekstrakta cvijeta trnine te utvrditi utjecaj temperature (120, 150 i 180 °C), omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (0,5-2) te udjela inulina u nosaču (0-0,5) na zadržavanje ukupnih fenola, flavonoida, hidrokisicimernih kiselina i flavonola. Također, cilj je bio u dobivenim prahovima odrediti antioksidacijski kapacitet.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRNINA (*Prunus spinosa* L.)

2.1.1. Osnovne karakteristike i kemijski sastav biljke

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je višegodišnja biljka iz roda *Prunus*, obitelji *Rosaceae* koja raste kao grm na obroncima divljih neobrađenih područja čineći debelu trnovitu masu sa crveno-smeđom korom i gustim, trnovitim, tvrdim granama. Najčešće raste na rubovima šuma i otvorenim dijelovima kao dio biljne zajednice, a može se naći i na sunčanim kamenitim padinama, riječnim dolinama, livadama i pašnjacima, u šikarama koje se nalaze između šuma i travnatih površina. Često se susreće pod nazivima crni trn, trnula ili trnjina (Idžojtić, 2013). Za rast joj pogoduje umjerena klima s mnogo sunca te umjereno vlažna i suha tla (Rejniak i Zielinski, 2010; Ruiz-Rodriguez i sur., 2014). Specifična je za područje zapadne Azije uključujući Tursku, Iran, Kavkaz te za područje Europe. Najviše je pronađena u Turskoj i to uglavnom divljeg rasta. Vrste trnine se mogu naći u Sjeverozapadnoj Africi, na Novom Zelandu i Sjevernoj Americi gdje je uvezena i lokalno uzgajana (Popescu i Caudullo, 2016). U Hrvatskoj je vrlo rasprostranjena, najčešće raste uz rubove šuma, na vapnenačkom tlu.

Biljka raste u obliku listopadnog grma ili manjeg drva od 1 do 3 metara u visinu, a u pogodnim klimatskim uvjetima može doseći i do 5 metara visine (Yuksel, 2015). Kora trnine je crveno-smeđe boje koja kasnije postaje tamnosiva s blagim utorima, a listovi trnine s peteljkom su ovalnog oblika i nazubljeni. Bijeli cvjetovi koji se pojavljuju neposredno prije listanja imaju po pet bijelih latica i pojavljuju se pojedinačno ili po dva-tri zajedno (slika 1). Trnina cvjeta od ožujka do svibnja, a plodovi sazrijevaju u kasno ljeto i jesen te se ponekad mogu pronaći na biljci i tijekom zimskog razdoblja. Plodovi su koštunice okrugla oblika i veličine do 1,5 cm, tamnoplave boje (Őzbek, 1978) a meso im je zelenkasto, trpkasto i kiselo te se teško odvaja od koštice. Okus plodova ovisi o klimatskim uvjetima tijekom rasta i o vremenu berbe, zrenjem okus postaje slatkasto-kiselkast (Yuksel, 2015).



Slika 1. Cvijet trnine (*Prunus spinosa*) (Maky Orel, 2017)

Kemijski sastav plodova trnine razlikuje se ovisno o klimatskim uvjetima, geografskom podrijetlu i korištenim analitičkim metodama (Barros i sur., 2010). Plodovi divlje vrste trnine sa juga Poljske sadržavali su: 18,11 % suhe tvari, 0,8 % proteina, 0,37 % masti, 5,52 % šećera, 5,79 % vlakana i 0,69 % pepela (Sikora i sur., 2013). Prema istraživanju Maraköglu i sur. (2005) suha tvar plodova divlje vrste trnine turskog podrijetla iznosila je 30,63 %. Udio vode u plodovima divlje vrste trnine španjolskog podrijetla iznosio je 48,64 % odnosno 60,86 % (Barros i sur., 2010; Ganhao i sur. 2010). Voće koje raste u zemljama tople i suhe klime karakterizira niži sadržaj vode (Sikora i sur., 2013). Također, udio proteina varira ovisno o geografskom području uzgoja. Tako na primjer, udio proteina gotovo je dvostruko veći u plodovima trnine uzgajane na području Španjolske nego na području Portugala ($2,86 \text{ g } 10^{-2} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$) (Barros i sur., 2010; Ganhao i sur. 2010). Prema istraživanju Barros i sur. (2010) udio šećera u suhoj tvari ploda trnine iznosi 37,06 %, od kojih prevladava glukoza ($29,84 \text{ g } 10^{-2} \text{ g}^{-1}$). Plodovi trnine predstavljaju dobar izvor minerala, od kojih su najzastupljeniji K, Ca,

P, Mg, Na, B i Al (Maraköglu i sur., 2005). U istraživanju Sikora i sur. (2013) dokazana je prisutnost vitamina C ($23,84 \text{ mg } 10^{-2} \text{ g}^{-1}$ plodova), β -karotena ($0,04 \text{ mg } 10^{-2} \text{ g}^{-1}$ ploda) te tokoferola od kojih je najzastupljeniji α -tokoferol ($7,18 \text{ mg } 10^{-2} \text{ g}^{-1}$ s.tv).

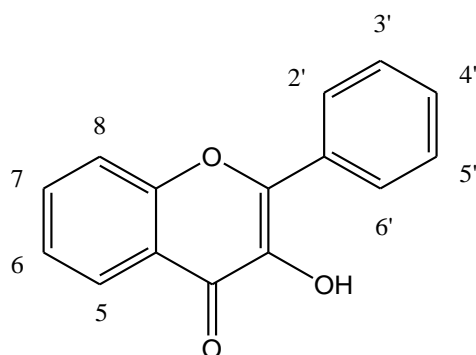
2.1.2. Fenolni spojevi trnine

Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti prisutni u velikom broju biljnih vrsta u značajnim količinama, poznato ih je oko 8000 te čine jednu od najbrojnijih skupina spojeva u prirodi (Spanos i sur., 1990). Osnovnu kemijsku strukturu fenolnih spojeva čine dva aromatska prstena povezanih pomoću tri atoma ugljika, tvoreći tako treći prsten C, na koje može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, koje mogu biti metoksilirane i glikozidirane s monosaharidima, oligosaharidima, a često sadržavaju i acilne skupine, te imaju veliku sklonost umrežavanju i polimerizaciji (Kazazić, 2004; Ignat i sur., 2011). Prema kemijskoj strukturi dijelimo ih na flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi se dijele na flavonole, flavone, flavanone, antocijanidine, izoflavone i flavane (Whale i sur., 2010). U skupinu neflavonoidnih spojeva ubrajamo fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), kumarine, tanine te stilbene.

Fenolni spojevi čine važnu skupinu bioaktivnih spojeva trnine čiji udio i zastupljenost ovise o dijelu biljke (cvijet, plod, list, kora), vrsti, agroekološkim uvjetima u kojima biljka uspijeva te korištenom otapalu za ekstrakciju (Pinacho i sur., 2015). U literaturi je dostupan mali broj istraživanja o fenolnim spojevima cvijeta trnine, a većina se odnosi na fenolni sastav i udjele fenola u plodu.

U uzorcima lišća, grana i plodova trnine sakupljenih u Španjolskoj (Navarra) prema Pinacho i sur. (2015) određen je udio ukupnih fenola, flavonoida i antocijanina. Najveći udio ukupnih fenola određen je u etanolnom ekstraktu grana trnine ($732,34 \text{ mg g}^{-1}$) dok je određen značajno manji udio ukupnih fenola u ekstraktima plodova i lišća ($359,11 \text{ mg g}^{-1}$, odnosno $228,56 \text{ mg g}^{-1}$). Također značajno manji udio je ukupnih flavonoida u ekstraktima lišća ($141,80 \text{ mg g}^{-1}$) nego u ekstraktima grana trnine ($554,82 \text{ mg g}^{-1}$). Ti rezultati potvrđuju dosadašnja literaturna izvješća koja ukazuju da su flavonoidi glavna skupina fenolnih spojeva trnine. U istom istraživanju utvrđena je korelacija između ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti (DPPH metoda) što potvrđuje činjenicu da su fenoli uglavnom odgovorni za antioksidacijsku aktivnost ekstrakata trnine.

Plodovi trnine su dobar izvor fenolnih kiselina (derivati neoklorogenske i kafeinske kiseline), zatim flavonol heterozida (kvercetin i kamferol), derivata kumarina (6,7-dihidroksikumarina, 7-hidroksikumarin, 7-hidroksi-6-metoksi-2H-1-benzopiran-2-on), antocijanina (cijanidin-3-O-glukozid, cijanidin-3-O-rutinozid, peonidin-3-O-glukozid) i proantocijanidina A (Ruiz-Rodriguez i sur., 2014; Veličković i sur., 2014). Ganhão i sur. (2010) su istaknuli da polifenolni sastav plodova trnine čine uglavnom procijanidini, katehini, derivati hidroksicimetnih kiselina i flavonola. Prema istraživanju Barros i sur. (2010) flavonoidi čine 1/10 polifenolnih spojeva ploda trnine. Na slikama 2 i 3 prikazane su kemijske strukture najvažnijih predstavnika fenolnih spojeva trnine.

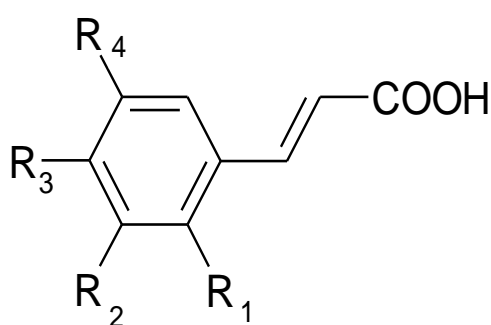


| FLAVONOLI |
|-----------------------|
| Kvercetin 5=7=4'=OH |
| Kamferol 5=7=3'=4'=OH |

Slika 2. Kemijska struktura kvercetina i kamferola (Ajila i sur., 2011)

Cvjetovi trnine imaju najsloženiji fenolni sastav sa gotovo 60 identificiranih fenolnih komponenti HPLC-PDA-ESI-MS³ analizom (Marchelak i sur., 2017) u usporedbi sa 25 identificiranih u lišću (Owczarek i sur., 2017), 26 u granama (Pinacho i sur., 2015) i 29 u plodovima trnine (Guimarães i sur., 2013). Prema dosadašnjim istraživanjima cvijet trnine sadrži visok maseni udio flavonoida, proantocijanidina tipa A i fenolnih kiselina (Kolodziej i sur., 1991). UHPLC-PDA-ESI-MS analizom identificirano je preko 50 fenolnih spojeva koji pripadaju trima glavnim grupama: flavonoida (38 identificiranih spojeva), derivata flavan-3-ola (katehini i proantocijanidini), (7 identificiranih spojeva) i fenolnih kiselina (12 identificiranih spojeva) (Marchelak i sur., 2017). Elez Garofulić i sur. (2018.) istraživali su fenolni sastav cvijeta trnine ubrane na području RH, primjenom UPLC MS/MS metode te identificirali ukupno 28 različitih fenolnih spojeva (hidroksicimetne kiseline, flavonol glikozidi i flavanoli) od kojih su najzastupljeniji spojevi bili derivati kaempferola i kvercetina. Flavonoidi se u cvjetovima trnine najčešće pojavljuju u obliku monoglikozida (Olszewska i

Wolbis, 2001), za razliku od listova koji su bogati disaharidima vezanim na aglikon, uglavnom kamferol-3,7-diramnozidom (Jabłońska-Ryś i sur., 2009). Od flavonoida u cvijetu trnine izolirani su: kamferol, kvercetin, kamferol-3-O- α -L-arabinofuranozid, kvercetin-3-O- α -L arabinofuranozid (Gey, 1990; Gey i sur., 1991). Kamferol i kvercetin nalaze se u cvjetovima u omjeru 1:1, dok je u lišću omjer 2,4:1 (Olszewska i sur., 2001). Istraživanja na cvjetovima trnine uzgojenih na području Poljske utvrdila su da se oko 2,7 % flavonoida nalazi u obliku aglikona, a 3,8 % u obliku glikozida (Olszewska i sur., 2001), dok je u trnini rumunjskog podrijetla trnine kvantificirano 1,2 % flavonoida u obliku aglikona (Tamas, 1985). Osim flavonoida dokazana je prisutnost fenolnih kiselina te su rezultati istraživanja Olszewke i Wolbisa (2000) pokazali kako je *p*-hidroksibenzojeva kiselina dominantna frakcija fenolnih kiselina u cvijetu trnine, uz klogrensku, *p*-kumarinsku i manje koncentracije ostalih hidroksicimetnih kiselina.

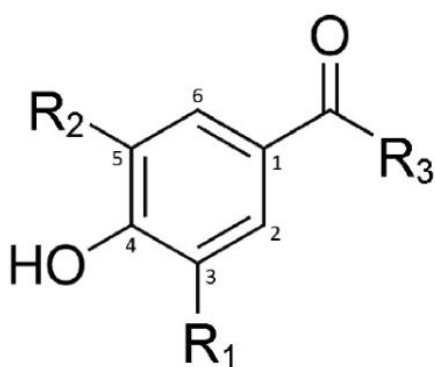


| HIDROKSICIMETNE KISELINE |
|--------------------------|
|--------------------------|

| |
|--------------------------------------|
| Kafeinska $R_1=R_2=H$; $R_3=R_4=OH$ |
|--------------------------------------|

| |
|---|
| Ferulinska $R_1=R_2=H$; $R_3=OH$; $R_4=OCH_3$ |
|---|

| |
|---|
| <i>p</i> -kumarinska $R_1=R_2=R_4=H$; $R_3=OH$ |
|---|



| HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE |
|----------------------------|
|----------------------------|

| |
|--|
| <i>p</i> -hidroksibenzojeva $R_1=R_2=H$; $R_3=OH$ |
|--|

| |
|--|
| Protokatehinska $R_1=R_3=OH$; $R_2=H$; |
|--|

| |
|------------------------|
| Galna $R_1=R_2=R_3=OH$ |
|------------------------|

Slika 3. Kemijske strukture hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Tsao, 2009)

2.1.3. Upotreba trnine i utjecaj na zdravlje

Prepoznat je pozitivan utjecaj trnine na zdravlje jer sadrži visoke koncentracije polifenolnih spojeva, vitamina, minerala kao i visok antioksidacijski kapacitet (Sikora i sur., 2013). Gotovo svi dijelovi ove biljke uključujući plodove, koru, korijen, lišće i cvijeće korišteni su od davnina za liječenje različitih bolesti.

Plodovi trnine se mogu jesti sirovi, unatoč trpkosti, ali se najčešće koriste u proizvodnji džemova i pekmeza, soka ili digestivnih pića (Yuksel, 2015). Listovi se koriste za proizvodnju čajeva, a plodovi i korijenje za proizvodnju boje (Komarov, 1970). Cvjetovi trnine, koji se obično prerađuju sušenjem i koriste kao čaj, sirup, svježi sok ili tinktura za liječenje raznih bolesti, imaju veliku potencijalnu primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Ekstrakti od svježih plodova su izvrstan izvor polifenolnih spojeva, koji kao čistači slobodnih radikala mogu značajno ublažiti njihov negativan učinak u organizmu. Stoga, polifenolni spojevi imaju važnu ulogu u prevenciji neurodegenerativnih bolesti, kardiovaskularnih bolesti i raka (Burits i Bučar, 2000). Cvjetovi trnine zbog prisustva flavonoida imaju diuretičko i laksativno djelovanje, mogu eliminirati štetne tvari i višak natrijevih iona iz metabolizma, mogu pomoći u smanjenju propusnosti krvnih žila te upala mokraćnog trakta. S druge strane, plodovi trnine mogu imati antibakterijsko i protuupalno djelovanje (Barros i sur., 2010; Pelc i sur., 2010; Morales i sur., 2013).

2.1.4. Biljni ekstrakti

Biljni ekstrakti se mogu definirati kao kompleksne smjese, tekuće, guste ili krute konzistencije, dobivene različitim postupcima ekstrakcije iz svježeg ili osušenog bilja ili dijelova biljaka kao što su: lišće, cvjetovi, sjemenke, korijen i kora. S obzirom na konačnu upotrebu ekstrakti se mogu dijeliti prema tipu otapala, konzistenciji te prema postupku ekstrakcije (Savić, 2014). Biljni ekstrakti sadrže mnogobrojne bioaktivne spojeve koji se mogu izolirati različitim metodama te se potom koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Robinson i Zhang, 2011).

Ekstrakcija je proces izdvajanja i koncentriranja bioaktivnih tvari iz homogenih smjesa biljnih tkiva uz pomoć otapala, pri čemu dolazi do prijenosa jednog ili više spojeva iz analiziranog uzorka u tekuću fazu. Biljni ekstrakti dobivaju se postupkom ekstrakcije uz primjenu vode, vodenih otopina, alkohola, organskih otapala i sl., a jedan od najčešće

korištenih postupaka ekstrakcije je konvencionalni postupak ekstrakcije pomoću otapala (voda ili vodene otopine alkohola) uz primjenu topline ili miješanja (Azmir i sur., 2013). Učinkovitost postupka ekstrakcije ovisi o vrsti i polarnosti otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije, omjeru količine uzorka i otapala te o kemijskim i fizikalnim svojstvima uzorka (Dai i Mumper, 2010). Posljednjih godina sve više se istražuju mogućnosti ekstrakcije modernim nekonvencionalnim tehnikama radi povećanja učinkovitosti izolacije ciljanih bioaktivnih spojeva te smanjene upotrebe otapala i vremena ekstrakcije.

2.2. SUŠENJE BILJNIH EKSTRAKTA

Sušenje je proces uklanjanja vode i vlage iz namirnica s ciljem očuvanja prirodnih i nutritivno vrijednih sastojaka hrane, sprečavanja mikrobioloških i kemijskih promjena, smanjenja mase i volumena hrane, uštede pri skladištenju, transportu, ambalaži te bolje kontrole procesa kako bi se postigla bolja kvaliteta proizvoda. Sušenje hrane podrazumijeva uklanjanje vode iz namirnice pri čemu ona ostaje u čvrstom obliku, a sadržaj vode je niži od 10 %. Glavni cilj sušenja je dobiti proizvod porozne strukture s dobrom sposobnošću rehidracije i dobro očuvanim senzorskim svojstvima (Herceg, 2009).

Tehnike sušenja se mogu podijeliti na prirodno sušenje na suncu prilikom kojeg se namirnica suši prirodnim strujanjem zraka te na tehnike sušenja pod kontroliranim uvjetima gdje spadaju sušenje raspršivanjem, sušenje zamrzavanjem, sušenje u fluidiziranom sloju, vakuum sušenje te sušenje osmozom (Lovrić, 2003). Izbor postupka sušenja i odgovarajuće opreme ovisi o tipu i svojstvima materijala koji se procesira i željenim svojstvima finalnog proizvoda.

2.2.1. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem je metoda sušenja koja se najčešće koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Singh i Dixit, 2004). Prvi uređaji za sušenje raspršivanjem proizvedeni su u SAD-u 1933., a od 1940. godine se uspješno primjenjuju u proizvodnji lijekova. U prehrambenoj industriji njihova primjena najprije počinje u mliječnoj industriji, i to u proizvodnji mlijeka u prahu, sirutke i dječjih formula. Krajem 1950. godine sušenje raspršivanjem se u prehrambenoj industriji počelo koristiti u svrhu enkapsulacije, zbog pružanja zaštite od degradacije i/ili oksidacije nutritivnih sastojaka hrane. Najveći razvoj ove

tehnologije bilježi se u razdoblju II. svjetskog rata zbog nastale potrebe za hranom dulje trajnosti te smanjenih troškova transporta i skladištenja (Patel i sur., 2009).

Sušenje raspršivanjem se široko koristi za proizvodnju prahova od biljnih ekstrakata sa ciljem brzog i efikasnog uklanjanje vode iz namirnice te dobivanja praha poželjnih fizikalno-kemijskih svojstava (Tonon i sur., 2008). Kratko vrijeme procesa te relativno niska temperatura proizvoda u odnosu na relativno visoku temperaturu ulaznog zraka, prilikom čega namirnica koja se dehidratira ne dolazi u kontakt sa zagrijanom metalnom površinom, čini sušenje raspršivanjem pogodnim za proizvode osjetljive na toplinu, zadržavajući okus, boju i hranjive tvari (Lovrić, 2003). Sirovina za sušenje može biti otopina, suspenzija, disperzija ili emulzija, koja se raspršuje u struji vrućeg plina, najčešće se koristi zrak, a rjeđe inertni plin kao što je dušik. Ovisno o karakteristikama sirovine i radnim uvjetima tijekom sušenja, sušenjem se dobije vrlo fini prah (10-50 μm) ili veće čestice (2-3 mm) (Gharsallaoui i sur., 2007). Tijek procesa sušenja raspršivanjem kao i kvaliteta krajnjeg proizvoda rezultat je parametara procesa, karakteristika uređaja te svojstava materijala koji se suši (Chegini i sur., 2008). Fizikalno-kemijska svojstva proizvoda prvenstveno ovise o temperaturi ulaznog zraka za sušenje, protoku zraka, protoku materijala koji se suši, brzini raspršivanja, vrsti nosača i njegovoj koncentraciji (Obón i sur., 2009).

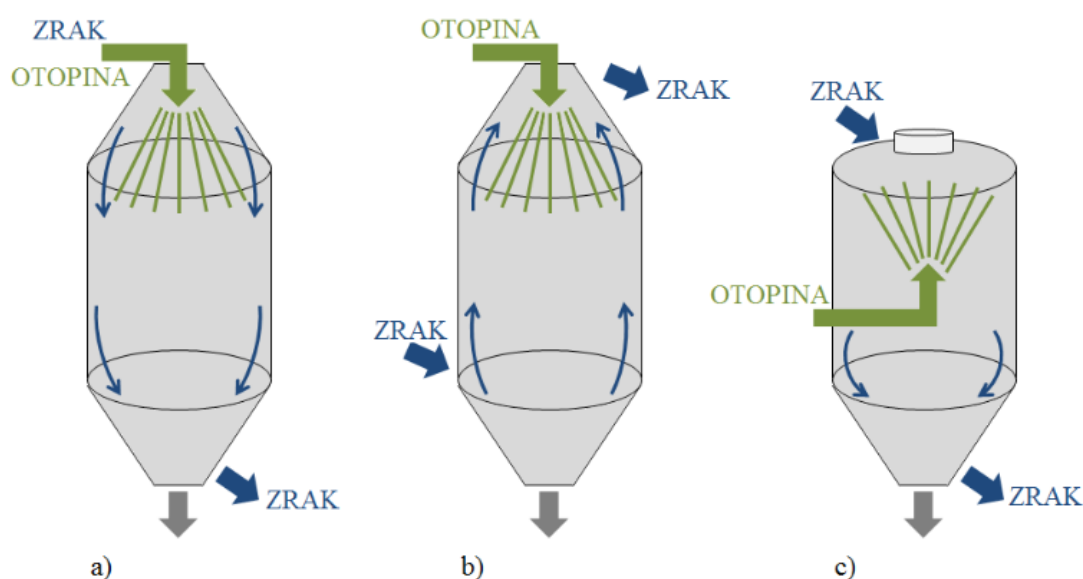
2.2.1.1. Proces sušenja raspršivanjem

Proces sušenja raspršivanjem podrazumijeva četiri osnovne faze: raspršivanje namirnice (atomizacija), ostvarivanje kontakta raspršene namirnice sa zrakom kojim se vrši sušenje, isparavanje vode iz raspršenih kapljica i odvajanje osušenog praha od izlazećeg zraka (Lovrić, 2003).

Tekuća namirnica za sušenje uvodi se u raspršivač pomoću pumpe gdje dolazi do atomizacije ili raspršivanja tekućine kroz mlaznicu u oblik aerosola sastavljenog od velikog broja kapljica. Veličina mlaznice se razlikuje ovisno o veličini raspršivača, a veličina kapljica kreće se od 20-180 μm i ovisi o veličini mlaznice. To je proces prevođenja otopine u kapljice optimalne veličine (Patel i sur., 2009). Formiranjem kapljica iste veličine, stvara se maksimalna površina za prijenos topline između vrućeg zraka i tekućine, čime se povećava brzina prijensa mase i topline, a time i brzina sušenja (Gharsallaoui i sur., 2007). Odabir vrste raspršivača ovisi o prirodi i viskoznosti smjese za sušenje te o željenim karakteristikama

gotovog proizvoda (veličina i raspodjela veličine čestica) (Patel i sur., 2009). Najčešće se koriste raspršivači sa sapnicama (mirujući ili rotirajući), rotirajući diskovi te dvostruki, centrifugalni i pneumatski raspršivači (Lovrić, 2003).

Tekuća namirnica raspršuje se izravno u komoru za sušenje, u struju vrućeg zraka i počinje proces sušenja. Zrak se zagrijava pomoću grijaćeg elementa koji se nalazi prije ulaska u komoru na unaprijed određenu temperaturu, ovisno o karakteristikama tekućine. Postoje različite izvedbe komora za sušenje ovisno o načinu na koji se ostvaruje kontakt materijala koji se suši i zraka : istosmjerne (slika 4a), protusmjerne (slika 4b) i kombinirane (slika 4c).



Slika 4. Miješanje otopine koja se suši i struje vrućeg zraka: a) istosmjerni tok, b) protusmjerni tok, c) miješani tok (prema Elez Garofulić, 2015)

Vrijeme kontakta vrućeg zraka i kapljica je samo nekoliko sekundi, mlaznica povećava kontaktnu površinu kapljice i utjecaj toplog zraka u prijenosu topline između kapljice i vrućeg zraka. Vrući zrak isparava sadržaj vlage u kapljici i prevodi ju u oblik praha. U istosmjernom procesu sušenja tekućina se raspršuje u istom smjeru kao protok toplog zraka kroz uređaj, ulazna temperatura je obično 150-220 °C, isparavanje se događa trenutno, nakon čega je suhi prah izložen temperaturi od 50-80 °C što ograničava toplinsku razgradnju praha. U protustrujnom sušenju tekućina se raspršuje u suprotnom smjeru od protoka vrućeg zraka kod procesa u kojima se koriste visoke temperature. Protustrujno sušenje nije pogodno za toplinski osjetljive namirnice zbog primjene visoke temperature, ali je proces ekonomičniji u

smislu potrošnje energije (Gharsallaoui i sur., 2007; Patel i sur., 2009; Murugesan i Orsat, 2011). Kombinirani postupak sušenja pogodniji je za sušenje toplinski osjetljivih namirnica jer se kapljice ne zadržavaju dugo u vrućoj zoni (Masters, 1985).

Sušenje se odvija u komorama konusnog oblika, a njihova veličina izravno određuje vrijeme sušenja namirnice. Proces sušenja odvija se u 2 faze. Prva faza je faza konstantne brzine sušenja gdje dolazi do isparavanja vlage s površine kapljice (Gharsallaoui i sur., 2007). To se odvija sve dok je dotok vode na površinu materijala takav da se održava konstantna temperatura na površini (Herceg, 2009). Stupanj difuzije vode iz unutrašnjosti kapljice prema površini je konstantan i jednak stupnju isparavanja vode s površine kapljice. Kada sadržaj vode u kapljici dosegne kritičnu vrijednost, dolazi do formiranja zaštitnog sloja (kore) na površini te nastupa faza padajuće brzine sušenja u kojoj se oslobađa vezana voda. Sušenje je završeno kada temperatura čestice praha postane jednaka temperaturi zraka (Goula i sur., 2004; Lovrić, 2003).

Zadnji korak u procesu sušenja raspršivanjem je odvajanje osušenog praha iz struje zraka na dnu komore za sušenje ili u ciklonima. Odvajanje većih čestica zraka odvija se na dnu komore za sušenje, dok se za izdvajanje sitnih čestica praha koriste cikloni. Zrak i čestice uvode se u ciklon pod kutom što uzrokuje rotacijsko gibanje, nastaje vrtlog, a centrifugalna sila nosi čvrste čestice koje se skupljaju u boci za prah (Sollohub i Cal, 2010).

2.2.2. Primjena nosača pri sušenju raspršivanjem

Prilikom sušenja raspršivanjem zbog prisutnosti šećera i organskih kiselina male molekulske mase te zbog adhezivnih svojstava namirnice koju sušimo može doći do povećanja higroskopnosti, stvaranja aglomerata i njihovog ljepljenja za površinu uređaja te taloženja. To dovodi do termalne razgradnje proizvoda, neispravnog rada uređaja za sušenje te niskog prinosa. Niska temperatura staklastog prijelaza (T_g), visoka higroskopnost, niska točka topljenja i visoka topljivost suhe tvari u vodi daje vrlo ljepljive proizvode. Ovi problemi se više javljaju kod voćnih sokova dok su manje prisutni kod sušenja biljnih ekstrakata (Elez Garofulić i sur., 2016).

Biljni ekstrakti u značajnoj mjeri sadrže organske kiseline, lipide i smole te u manjoj mjeri šećere koji mogu stvarati probleme tijekom sušenja, stoga se u otopinu ekstrakta dodaju nosači koji mogu poboljšati učinak sušenja i tehnološka svojstva gotovog proizvoda (Souza i

Oliveira, 2006). Oni povećavaju Tg praha odnosno temperaturu pri kojoj se amorfni sustav mijenja od staklastog do gumoznog stanja (Truong i sur., 2005), smanjuju ljepljivost i higroskopsnost. Nosači moraju biti topljivi u otapalu koje se koristi u procesu, imati adekvatnu sposobnost stvaranja filmova i stvarati nisko viskozne otopine. Za proces sušenja raspršivanjem nosači moraju imati veliku molekularnu masu i visoku temperaturu staklastog prijelaza kako bi se u konačnici spriječilo lijepljenje praha. Nosači bi trebali štiti osjetljive spojeve od topline, kisika, svjetlosti i vlage (Desai i Park, 2005), trebali bi imati dobra emulgirajuća svojstva i sposobnost formiranja membrane oko aktivne tvari te visoku učinkovitost. Nosači koji se koriste u prehrambenoj industriji moraju imati GRAS status („generally recognized as safe“- „općenito prepoznati kao neškodljivi“) te biti jestivi i biorazgradivi.

2.2.2.1. Odabir nosača za sušenje raspršivanjem

Najvažniji kriteriji za odabir nosača su: funkcionalnost konačnog proizvoda, koncentracija nosača, tip otpuštanja bioaktivnih spojeva, zahtjevi stabilnosti i ograničenja troškova. Prednost se daje prirodnim, netoksičnim i biorazgradivim polimernim materijalima kao što su razni derivati škroba, proteini, biljni ekstrakti i hidrokoloide. U prehrambenoj industriji se najčešće koriste škrob i njegovi derivati, celuloza, biljne izlučevine i ekstrakti, proteini i lipidi (Nedović i sur., 2011). Najčešće korišteni nosači su maltodekstrini (MD) i arapska guma.

Maltodekstrini su topljivi hidrolizati škroba proizvedeni djelomičnom kiselinskom ili enzimatskom hidrolizom škroba. Vrijednost dekstroznog ekvivalenta škroba (DE) se kreće u rasponu od 3-20 i što je DE veći, veća je topivost i osjećaj slatkoće, a otpornost na toplinu je manja. Oni su prikladni za primjenu u prehrambenoj industriji zbog niske cijene, neutralnog okusa i mirisa, neobojenosti, topljivosti u vodi, niske viskoznosti pri visokim koncentracijama krute tvari i dobre zaštite arome od oksidacije. Imaju sposobnost nakupljanja i stvaranja filma, vezanja okusa i masti, a koriste se i za smanjenje ljepljivosti i ostalih aglomeracijskih problema prilikom sušenja (Gallegos-Infante i sur., 2013). Nedostaci upotrebe maltodekstrina su slaba emulgirajuća svojstva te mala mogućnost zadržavanja hlapivih spojeva.

Arapska guma je biljna izlučevina dobivena iz stabla akacije te se sastoji od smjese kompleksnih heteropolisaharida. Jedina je guma korištenja u prehrambenim proizvodima, a

ima dobru topljivost, nisku viskoznost, dobra emulgirajuća svojstva te sposobnost zadržavanja fenolnih spojeva. Najveći nedostatak je cijena i dostupnost materijala, stoga se često koristi kombinacija maltodekstrina i arapske gume (Madene i sur., 2006).

U novije vrijeme sve više istraživanja je usmjereno na upotrebu inulina kao nosača u sušenju raspršivanjem bioaktivnih spojeva koji su osjetljivi na promjene ili degradaciju duž ljudskog probavnog trakta, budući da se njihovo otpuštanje odvija samo u crijevima, gdje se i apsorbira. Inulin je smjesa oligomera i polimera glukopiranozil-fruktofuranozil fruktoze i fruktopiranozil-fruktofuranozil-fruktoze koji se međusobno razlikuju prema stupnju polimerizacije (Vitali-Čepo i Vedrina Dragojević, 2012). Inulin proizveden iz korijena cikorije obično ima stupanj polimerizacije 3-60.

2.2.3. Utjecaj nosača i temperature na zadržavanje fenolnih spojeva

Fenolni spojevi su prilikom sušenja raspršivanjem u najvećoj mjeri izloženi degradaciji uslijed povišenih temperatura, te je stoga važno odabrati temperaturu sušenja pri kojoj će degradacija fenolnih spojeva biti najniža. Temperature ulaznog zraka koje se koriste u procesu sušenja kreću se u rasponu 120 do 200 °C (Fang i Bhandari, 2011; Ferrari i sur., 2012; Kha i sur., 2010). Ispravan odabir vrste i koncentracije nosača dobrog zaštitnog utjecaja može smanjiti utjecaj temperature sušenja na svojstva praha. Naime, dodatak nosača ima zaštitno djelovanje na fenolne spojeve djelujući kao mikrokapsulirajući agens, stvarajući čvrstu opnu i na taj način umanjujući djelovanje visokih temperatura. Tehnika mikrokapsuliranja pri sušenju raspršivanjem je djelotvoran način zaštite bioaktivnih komponenti, čuva njihovu stabilnost tijekom obrade i skladištenja, kontrolira oslobađanje željenih sastojaka i sprječava neželjene interakcije s matriksom hrane kako nebi došlo do propadanja i nestabilnih gubitaka (Isailović i sur., 2012).

U istraživanju koje su proveli Chong i Wong (2017) proučavan je utjecaj ulazne temperature (140, 160, 180, 200, 220 °C) i koncentracije maltodekstrina DE 10-12 (10, 20, 30, 40 i 50 %) na boju i sadržaj ukupnih fenola Sapodilla praha (*Manikara zapota*) pri sušenju raspršivanjem. Sadržaj ukupnih fenola se znatno povećava povećanjem temperature sa 140 do 220 °C. Vidljivo smanjenje u sadržaju ukupnih fenola se dogodilo pri povećanju koncentracije maltodekstrina (MD) od 10 do 20 % dok povećanje koncentracije MD sa 20 do 50 % nije dovelo do velike razlike u sadržaju ukupnih fenola. Ovi rezultati su u skladu

istraživanjem koje su proveli Vidović i sur. (2014) na ekstraktu primorskog vriska (*Satureja montana*) sušenog raspršivanjem pri temperaturi od 135 do 140 °C gdje je ispitan utjecaj udjela MD kao nosača. Najveći udio ukupnih fenola, flavonoida te najveću antioksidacijsku aktivnost su pokazali ekstrakti sa 10 % MD.

Udio ukupnih fenola se povećava povećanjem temperature zbog bržeg sušenja na većim temperaturama što uzrokuje kraće vrijeme ekspozicije i time manju degradaciju toplinski osjetljivih fenolnih spojeva (Demarchi i sur., 2013). Međutim, povećanje udjela ukupnih fenola može biti uzrokovano polimerizacijom kao i sintezom polifenola pri višim temperaturama (Mishra i sur., 2014). Dodavanje MD u visokoj koncentraciji nije poželjno jer dovodi do povećanja ukupnog sadržaja krute tvari i razrjeđivanja hranjivih tvari iz proizvoda (Quek i sur., 2007). Također nije poželjno dodati MD u količini od 10 % zbog malog prinosa i ljepljivosti (Chong i Wong, 2015).

Krishnaiah i sur. (2012) su optimizirali postupak sušenja raspršivanjem noni ekstrakta pri čemu su ispitali utjecaj omjera suhe tvari ekstrakta i nosača (1 do 0,25) te temperature sušenja od 90 do 140 °C. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva je rastao s porastom udjela ekstrakta u prahu te se zatim smanjio pri najvećem udjelu, tako da je omjer ekstrakta i nosača 0,85 odabran kao optimalan pri nižim temperaturama. Pri višim temperaturama, poželjan je veći udio nosača te je kao optimalan omjer ekstrakta i nosača odabran omjer 0,55. Pri nižim udjelima nosača, temperatura je značajno utjecala na smanjenje ukupnih fenola.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak cvijeta trnine

U ovom istraživanju korišten je osušeni uzorak cvijeta trnine *Pruni spinosae flos* (Suban d.o.o., Serija 6346 rok trajanja 30.06.2019., Hrvatska), (Slika 5).



Slika 5. Uzorak cvijeta trnine (vlastita fotografija)

3.1.2. Kemikalije

- Deionizirana voda
- Maltodekstrin DE 4-7, (Sigma-Aldrich, SAD)
- Inulin, (Orafti HPX, Belgija)
- Kvarcni pijesak (sitno zrnat), (Gram-mol, Zagreb)

Kemikalije za ekstrakciju fenolnih spojeva

- 80 %-tna otopina metanola

Reagensi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenolnih spojeva, flavonoida, HCK i flavonola

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)
Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 ml vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 ml i nakon 24 h filtrira.
- Standard galne kiseline
Priprema: Odvaži se 0,0019 g galne kiseline. Odvaga se otopi u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Etanol, 96 %-tni
- Metanol, 100 %-tni
- Aluminijev klorid, 10 %-tni
Priprema: 1 g aluminijevog klorida (aluminijski klorid-heksahidrat, p.a.) otopi se u 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom
- Kalijev acetat, 1 M
Priprema: 9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom
- Standard kvercetin (130 mg L⁻¹)
Priprema: Odvaži se 0,0013 g standarda kvercetin u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.
- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 %
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g L⁻¹ HCl (u 96 % etanolu)
Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96 %) do oznake
- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g L⁻¹ HCl
Priprema: 0,545 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake
- Standard kafeinske kiseline (190 mg L⁻¹)

Priprema: Odvaži se 0,019 g standarda kafeinske kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 5 mL 80 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

Reagensi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

- 75 mM fosfatni pufer (pH 7,0)
- Natrijev fluorescein (70,3 nM),
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), (SigmaAldrich, Njemačka)
- AAPH (2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)- dihidroklorid), (SigmaAldrich, Njemačka)
- Fosfatni pufer (75 mM, pH 7,0)

Priprema: Odvaži se 6,242 g natrijevog fosfata dihidrata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i otopi u 200 mL destilirane vode, te se u istoj količini vode otopi i 5,687 g dinatrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4). U novoj tikvici od 200 mL se pomiješa 61 mL 0,2 M otopine Na_2HPO_4 i 39 mL 0,2 M otopine $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake. U odmjernu tikvicu od 100 mL se doda 37,5 mL 0,2M otopine fosfatnog pufera te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake. Svaki dan je potrebno pripremiti svježu otopinu.

- Fluorescein (70,3 nM)
- Otopina 1

Priprema: Otopi se 22,5 mg fluoresceina u 50 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH 7,0)

- Otopina 2

Priprema: Od otopine 1 se uzme 24,5 μL te se nadopuni s 250 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH 7,0). Svaki dan se pripravlja svježa razrjeđenja otopina fluoresceina.

- AAPH (240 mM)

Priprema: Otopi se 0,651 g AAPH u 10 mL 75 mM fosfatnog pufera. Svaki dan se priprema svježi reagens.

- Otopina standarda - Trolox

Priprema: Početna ("stock") otopina trolox, početne koncentracije 103,99 μM se pripraviotapanjem 2,6 mg trolox u 100 mL 75 mM fosfatnog pufera. Iz pripremljene početne otopine trolox pripremi se 6 razrjeđenja (3,12 – 103,99 μM).

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex)
- uređaj za sušenje raspršivanjem SD 06, (LabPlant, Velika Britanija)
- Magnetska miješalica (HSC Ceramic Hot Top-Plate Stirrer, Velp, Italija)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, SAD)
- Centrifuga (ROTOFIX 32, Hettich Zentrifugen, Njemačka)
- Vodena kupelj (Büchi Heating Bath B-490, Švicarska)
- Laboratorijski sušionik (ST-01/02, INSTRUMENTARIA)
- Eksikator
- Clariostar spektrofluorimetar, (BMG LABTECH, Offenburg, Njemačka)

Pribor:

- Pipeta od 5 ml; 10 mL
- Staklene čaše
- Falconice volumena 50 mL
- Staklene epruvete
- Stakleni lijevak
- Graduirani cilindar
- Plastične lađice za vaganje
- Aluminijske posudice
- Stakleni štapić
- Automatske mikropipete volumena 10-100 μ L, 100-1000 μ L
- Menzura volumena 100 mL
- Odmjerne tikvice volumena 10, 100, 250 i 1000 mL
- Eppendorf epruvete volumena 2,5 mL
- Mikrolitarska pločica sa 96 jažica (Greiner, Sigma-Aldrich, Njemačka)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Ekstrakcija cvijeta trnine vodom u ultrazvučnoj kupelji

U čašu od 1000 mL odvaži se 75 g cvijeta trnine te se doda 500 mL destilirane vode. Uzorak se ekstrahira 20 minuta na 50 °C. Nakon ekstrakcije slijedi filtracija kroz filter papir te centrifugiranje. Postupak se ponavlja dok se ne dobije oko 4 L ekstrakta.

3.2.2. Određivanje ukupne suhe tvari

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda, koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Svaka sirovina se sastoji od djela vode i suhe tvari. U suhoj tvari sadržani su svi oni parametri koji čine prehranbenu vrijednost neke namirnice. Određivanjem ukupne suhe tvari proizvoda (topljive i netopljive) sušenjem na 105 °C određuje se ostatak nakon sušenja na 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1984). Ukupna suha tvar se određivala u početnom ekstraktu kao i u prahovima cvijeta trnine dobivenim sušenjem raspršivanjem.

Priprema uzorka:

Početni ekstrakt/uzorke praha potrebno je prije samog mjerenja homogenizirati.

Postupak određivanja:

U osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi se oko 1 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić, te se suši u sušioniku pri 105 °C oko dva sata sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja posudica se zatvori poklopcem te hladi u eksikatoru, a zatim se izvaži s točnošću $\pm 0,0002$ g. U ohlađenu i izvaganu posudicu s pijeskom stavi se oko 2 mL ekstrakta (kod određivanja ukupne suhe tvari ekstrakta) ili 1 g praha (kod određivanja ukupne tvari prahova ekstrakta nakon sušenja) i dobro izmiješa pomoću staklenog štapića. Sve zajedno se važe s točnošću od $\pm 0,0002$ g. Aluminijska posudica s pijeskom i ispitivanom količinom uzorka stavi se u laboratorijski sušionik, prethodno zagrijan na $105 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$, te se zagrijava jedan sat sa zaklopljenim poklopcem. Nakon hlađenja i vaganja sušenje se nastavlja toliko dugo dok razlika između dva uzastopna sušenja, u razmaku od pola sata, ne bude manja od 0,001 g. Važe se ponovno s točnošću $\pm 0,0002$ g.

Ukupna suha tvar izračuna se prema slijedećoj formuli:

$$\text{ukupna suha tvar (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100$$

gdje je:

m_0 – masa posudice i pomoćnog materijala (pijesak, stakleni štapić, poklopac) (g),

m_1 – masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja (g),

m_2 – masa posudice s ostatkom nakon sušenja (g).

3.2.3. Proizvodnja praha ekstrakta cvijeta trnine primjenom sušenja raspršivanjem

Postupak sušenja raspršivanjem proveden je u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva u Zadru, pomoću uređaja za sušenje raspršivanjem SD 06 (LabPlant, Velika Britanija) (Slika 6). U tablici 1 navedene su specifikacije sušionika s raspršivanjem SD 06.



Slika 6. Uređaj za sušenje raspršivanjem (vlastita fotografija)

Tablica 1. Specifikacije sušionika s raspršivanjem SD 06

| | |
|-------------------------------|--|
| Raspršivač | Promjer mlaznice 1mm, istosmjerni |
| Kapacitet sušenja | 1000-1500 mL h ⁻¹ |
| Temperaturni raspon | 50-250 °C |
| Protok zraka | 15-30 m ³ h ⁻¹ |
| Kompresor | 2 m ³ h ⁻¹ pri 2 bara – 1,7 m ³ h ⁻¹ pri 4 bar |
| Grijač | 3 kW |
| Pumpa | Peristaltička, podesive brzine |
| Igla za deblokiranje mlaznica | Automatska, 3 brzine |
| Dimenzije | 1110 x 825 x 600 mm |
| Težina | 80 kg |

Parametri koji su tijekom procesa sušenja bili konstantni su: protok zraka 10 m s⁻¹, srednja brzina deblokiranja mlaznice, protok ulaznog materijala 485 mL h⁻¹ te temperatura izlaznog zraka u rasponu od 65-85 °C.

Sukladno postavljenom cilju rada koji je bio proizvesti prah ekstrakta cvijeta trnine primjenom sušenja raspršivanjem te utvrditi utjecaj temperature (120, 150 i 180 °C), omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (0,5-2) i udjela IN u nosaču (0-0,5) na koncentraciju ukupnih fenola, flavonoida, hidrokisicimetnih kiselina i flavonola te antioksidacijski kapacitet definiran je plan eksperimenta.

Plan i eksperimentalni dizajn pokusa naveden je u tablici 2. Prema punom faktorijalnom dizajnu proizvedeno je 27 prahova na različitim temperaturama (120, 150 i 180 °C) sa različitim omjerom nosača i suhe tvari ekstrakta (0,5:1, 1:1 i 2:1) gdje su varirani udjeli IN u nosaču (0, 0,25 i 0,5).

Tablica 2. Plan i eksperimentalni dizajn pokusa sušenja raspršivanjem primjenom različitog omjera nosača i suhe tvari ekstrakta te različite temperature uz različit maseni udio inulina u nosaču

| Pokus br. | Nosač : suha tvari ekstrakta | Maseni udio inulina u nosaču | Temperatura (°C) |
|-----------|------------------------------|------------------------------|------------------|
| 1 | 0,5:1 | 0 | 120 |
| 2 | 0,5:1 | 0 | 150 |
| 3 | 0,5:1 | 0 | 180 |
| 4 | 1:1 | 0 | 120 |
| 5 | 1:1 | 0 | 150 |
| 6 | 1:1 | 0 | 180 |
| 7 | 2:1 | 0 | 120 |
| 8 | 2:1 | 0 | 150 |
| 9 | 2:1 | 0 | 180 |
| 10 | 0,5:1 | 0,25 | 120 |
| 11 | 0,5:1 | 0,25 | 150 |
| 12 | 0,5:1 | 0,25 | 180 |
| 13 | 1:1 | 0,25 | 120 |
| 14 | 1:1 | 0,25 | 150 |
| 15 | 1:1 | 0,25 | 180 |
| 16 | 2:1 | 0,25 | 120 |
| 17 | 2:1 | 0,25 | 150 |
| 18 | 2:1 | 0,25 | 180 |
| 19 | 0,5:1 | 0,5 | 120 |
| 20 | 0,5:1 | 0,5 | 150 |
| 21 | 0,5:1 | 0,5 | 180 |
| 22 | 1:1 | 0,5 | 120 |
| 23 | 1:1 | 0,5 | 150 |
| 24 | 1:1 | 0,5 | 180 |
| 25 | 2:1 | 0,5 | 120 |
| 26 | 2:1 | 0,5 | 150 |
| 27 | 2:1 | 0,5 | 180 |

Za proizvodnju prahova korištene su dvije vrste nosača u različitim omjerima, maltodekstrin (MD) 4-7 DE i inulin (IN). Potrebna masa nosača određena je na temelju suhe tvari ekstrakta trnine (2,97 %). Neposredno prije procesa sušenja, ekstrakt trnine promiješan

je s nosačem na magnetskoj miješalici pri 50 °C kako bi uzorak za raspršivanje bio što homogeniji odnosno kako bi se nosač otopio i ravnomjerno raspodijelio. Nakon provedenog procesa sušenja, proizvedeni prahovi skladišteni su u hermetički zatvorenim Falcon plastičnim kivetama do provođenja daljnjih analiza.

3.2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz prahova ekstrakta cvijeta trnine

Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je primjenom 80 %-tne vodene otopine metanola. Postupak se provodio 20 minuta pri konstantnoj temperaturi od 50 °C.

Postupak ekstrakcije:

U staklenu epruvetu odvaži se 1 g praha te se doda 10 mL 80 %-tnog metanola. Uzorak se ekstrahira 20 minuta na ultrazvučnoj kupelji pri 50 °C. Ekstrakt se profiltrira kroz obični filter papir i prebaci u čistu Falcon kivetu. Pripremljeni ekstrakti skladište se na +4 °C do daljnje analize.

3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenolnih spojeva

Princip metode:

Određivanje ukupnih fenola provodi se u metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Priprema uzorka:

Za određivanje ukupnih fenola ekstrakti uzorka se razrjeđuju 10 puta.

Postupak određivanja:

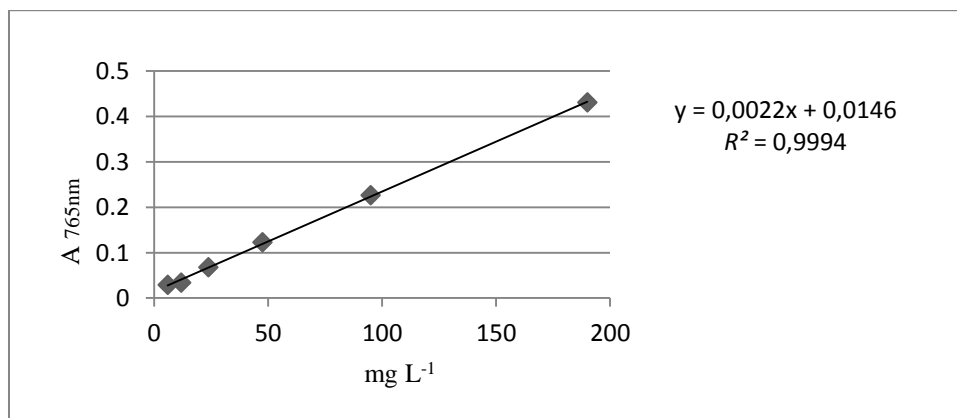
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 µL ekstrakta, 200 µL Folin Cioclteu reagensu i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T = 50°C (u kupelji od rotavapora).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

Izračunavanje:

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,019 g galne kiseline. Odvaga se otopi u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Iz te otopine galne kiseline potrebno je napraviti razrjeđenja: 95, 47,5, 23,75, 11,88 i 5,94 mg L⁻¹. U staklene epruvete otpipetira se 100 μL standarda, potom se dodaje redom 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T = 50°C (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode umjesto standarda. Nakon toga se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine pri valnoj duljini od 765 nm).

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apcisi nanese koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (slika 7).



Slika 7. Jednadžba pravca za izračunavanje koncentracije ukupnih fenola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0022x + 0,0146$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 765 nm

x- koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

Dobivene masene koncentracije (mg GAE L^{-1}) ukupnih fenola prvo su preračunate na masu praha, a zatim su na temelju suhe tvari ekstrakta cvijeta trnine (2,97 %) preračunate na masu suhe tvari ekstrakta ($\text{mg GAE } 10^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ s. tv. e.}$)

3.2.6. Određivanje ukupnih flavonoida

Princip metode:

Metoda se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju intenziteta obojenja pri 415 nm.

Priprema uzorka:

Za određivanje ukupnih flavonoida ekstrakti uzoraka se razrjeđuju 10 puta.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijeveg acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

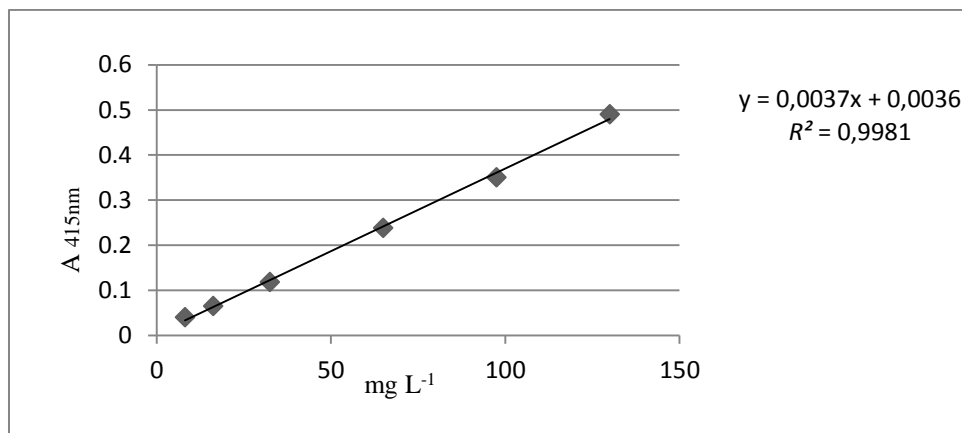
Izračunavanje:

Izrada baždarnog pravca

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 130 mg L^{-1} . Iz te otopine standarda potrebno je prirediti razrjeđenja: 130, 65, 32,5, 16,25, 8,13 mg L^{-1} . U staklenu tikvicu otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijeveg acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg L^{-1}), a na ordinati

izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (slika 8).



Slika 8. Jednadžba pravca za izračunavanje koncentracije ukupnih flavonoida

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0037x + 0,0036$$

Gdje je:

y- apsorbancija pri 415 nm

x- koncentracija kvercetina (mg L⁻¹)

Dobivene masene koncentracije (mg GAE L⁻¹) ukupnih flavonoida prvo su preračunate na masu praha, a zatim su na temelju suhe tvari ekstrakta cvijeta trnine (2,97 %) preračunate na masu suhe tvari ekstrakta (mg GAE 10⁻¹ g⁻¹ s. tv. e.)

3.2.7. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Princip metode:

Metoda se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju intenziteta obojenja pri 320 i 360 nm.

Priprema uzorka:

Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola ekstrakti uzoraka se razrjeđuju 10 puta.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μL ekstrakta, 250 μL 1 g L^{-1} HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavanola apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izračunavanje:

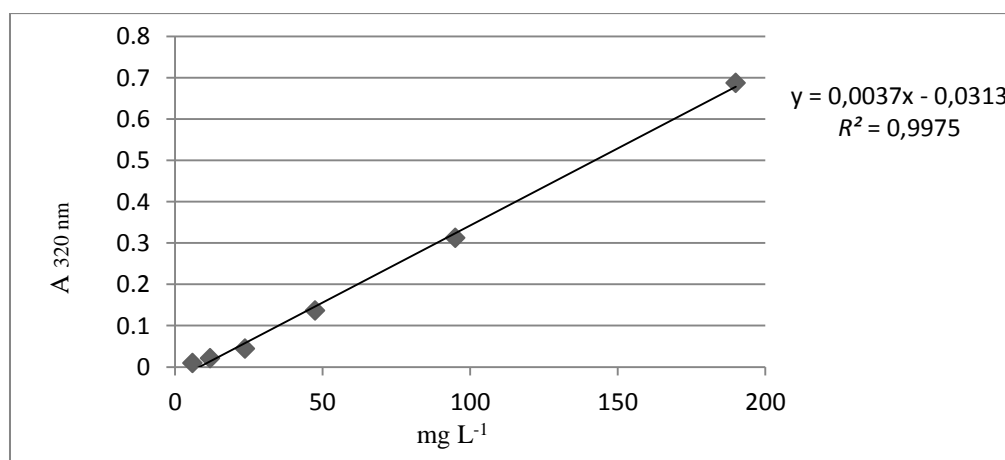
Izrada baždarnog pravca

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu, dok se kvantifikacija ukupnih flavanola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin.

Kafeinska kiselina

Iz alikvotne otopine standarda 190 mg L^{-1} potrebno je prirediti razrjeđenja: 95, 47,5, 23,75, 11,88, 5,94 mg L^{-1} . U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μL otopine standarda, 250 μL 1 g HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80 %-tni metanol. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kafeinske kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 320 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 9. Jednadžba pravca za izračunavanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0037 x - 0,0313$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 765 nm

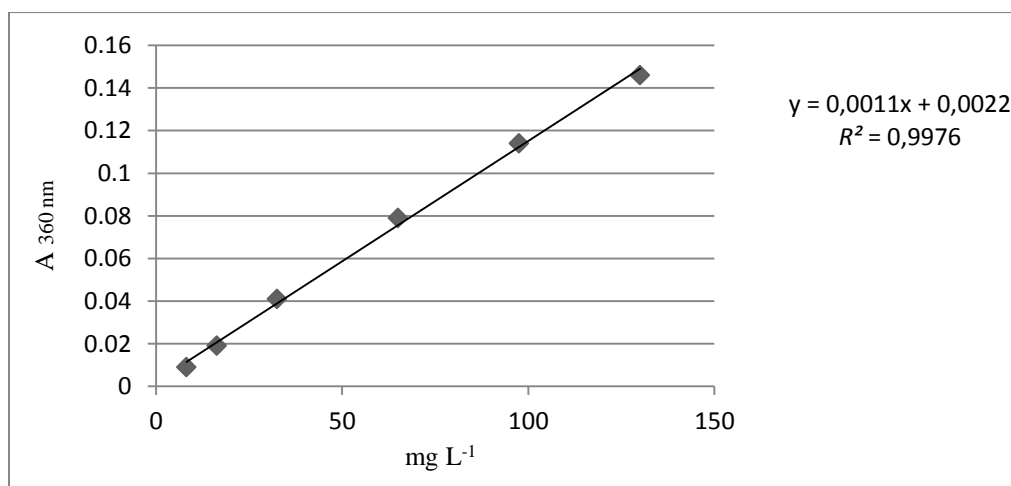
x- koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})

Dobivene masene koncentracije (mg GAE L^{-1}) ukupnih hidroksicimetnih kiselina prvo su preračunate na masu praha, a zatim su na temelju suhe tvari ekstrakta cvijeta trnine (2,97 %) preračunate na masu suhe tvari ekstrakta ($\text{mg GAE } 10^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ s. tv. e.}$)

Kvercetin

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 130 mg L^{-1} . Iz te otopine standarda potrebno je prirediti razrjeđenja: 130, 65, 32,5, 16,25, 8,13 mg L^{-1} . U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μL otopine standarda, 250 μL 1 g HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80 %-tni metanol. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kafeinske kiseline (mg L^{-1}), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 320 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 10. Jednadžba pravca za izračunavanje ukupnih flavonola

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0011 x + 0,0022$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 765 nm

x- koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})

Dobivene masene koncentracije (mg GAE L^{-1}) ukupnih flavonola prvo su preračunate na masu praha, a zatim su na temelju suhe tvari ekstrakta cvijeta trnine (2,97 %) preračunate na masu suhe tvari ekstrakta ($\text{mg GAE } 10^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ s. tv. e.}$)

3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Princip metode:

ORAC metoda (engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity) prema mehanizmu djelovanja spada u HAT (engl. Hydrogen Atom Transfer) metodu koja se temelji na prijenosu atoma vodika, a mjeri se inhibicija peroksil radikala koji nastaje uslijed raspadanja azo-spoja, 2,2'-azobis(2- amidinoproionamid)-dihidroklorid (AAPH), pri stalnoj brzini na 37 °C. Ova metoda je klasičan primjer antioksidacijske aktivnosti sprječavanjem lančanih reakcija radikala (Prior, 2015).

Priprema uzoraka:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka ORAC metodom, pripreme se odgovarajuća razrjeđenja uzoraka (od 100 do 400 puta).

Postupak određivanja:

U jažicu mikrolitarske pločice otpipetira se 150 μL otopine fluorescina i 25 μL uzorka (75 mM fosfatnog pufera za slijepu probu ili otopine standarda Troloksa za izradu baždarnog pravca). Pločica s jažicama se inkubira u čitaču mikroploča 30 minuta / 37 °C prije početka mjerenja.

Nakon inkubacije, mjeri se fluorescencija ($\lambda \text{ eks. } 485 \text{ nm}$ i $\lambda \text{ em. } 520 \text{ nm}$) svakih 90 sekundi kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon 3 ciklusa, 25 μL svježe pripremljenog 240 mM AAPH je injektirano softverski pomoću unutarnjeg ubrizgavača. Mjerenje intenziteta fluorescencije traje do 120 minuta.

Mjerenje se provodi spektrofluorimetrijski pri temperaturi od 37 °C uz λ eks. 485 nm i λ em. 520 nm. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-ugljična kiselina) služi kao standard i za izradu baždarnog pravca, ispituje se antioksidacijski kapacitet otopine trolox različitih koncentracija (3,12 – 103,99 μ M).

MARS softver (MARS 2.0 software, BMG LABTECH, Offenburg, Germany) za analizu podataka omogućuje automatsku evaluaciju. Mjerenje je provedeno u duplikatu, te su rezultati prosječne vrijednosti dvaju mjerenja iskazani zajedno sa standardnom devijacijom. ORAC vrijednosti izražavaju se kao mikromol trolox ekvivalenta po litri (μ mol TE L⁻¹), odnosno preračunato na 100 g suhe tvari ekstrakta kao mikromol trolox ekvivalenta na 100 g suhe tvari ekstrakta (μ mol TE 10⁻² g⁻¹ s.tv.e.).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Provedbom procesa sušenja raspršivanjem ekstrakta cvijeta trnine, proizvedeno je 27 prahova. Suha tvar ekstrakta prije sušenja iznosila je 2,97 %. Rezultati utjecaja parametara sušenja (omjer nosača i suhe tvari ekstrakta, udio inulina u nosaču te temperatura) na koncentraciju ukupnih fenola, flavonoida, hidrokscimetnih kiselina i flavonola te na antioksidacijski kapacitet (ORAC) u prahovima dobivenim sušenjem raspršivanjem prikazani su na slikama 11-15. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja.

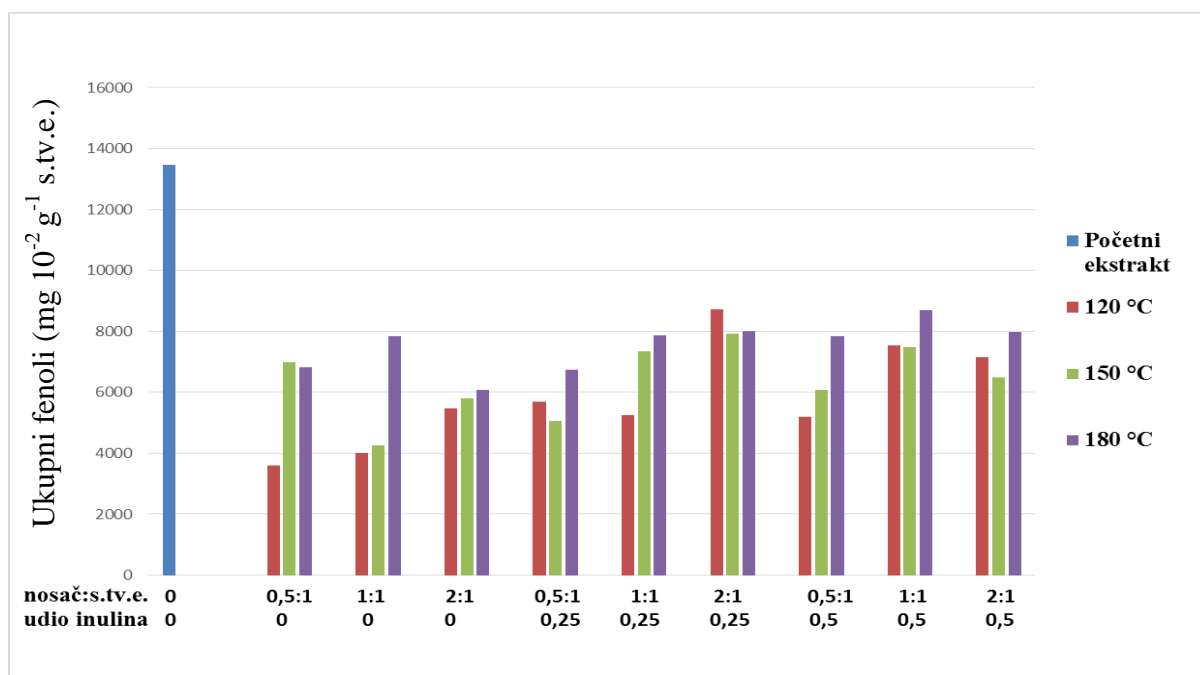
Multivarijantna analiza varijance (MANOVA) korištena je kako bi se utvrdila signifikantnost utjecaja pojedinih varijabli sušenja raspršivanjem na promatrane parametre, a rezultati su prikazani u tablici 3 i 4.

4.1. Utjecaj parametara sušenja na koncentracije fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta cvijeta trnine

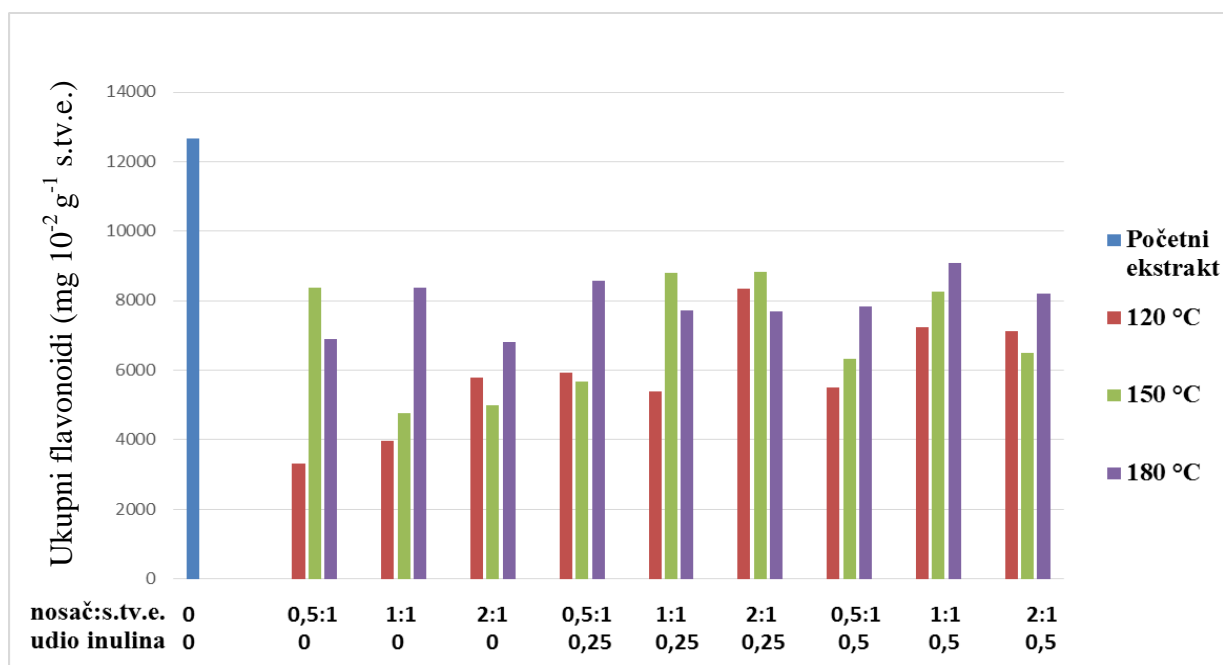
U ekstraktu cvijeta trnine prije te nakon provedbe procesa sušenja prema eksperimentalnom dizajnu spektrofotometrijski su određene različite skupine fenolnih spojeva.

U početnom ekstraktu određena je koncentracija ukupnih fenola (13474,14 mg GAE 10^{-2} g⁻¹ s.tv.), ukupnih flavonoida (12666,06 mg kvercetina 10^{-2} g⁻¹ s.tv.), ukupnih hidrokscimetnih kiselina (6562,02 mg kafeinske kiseline 10^{-2} g⁻¹ s.tv.) i flavonola (5691,14 mg kvercetina 10^{-2} g⁻¹ s.tv.). Prema dobivenim podacima vidljivo je da su flavonoidi najzastupljeniji spojevi u ekstraktu cvijeta trnine.

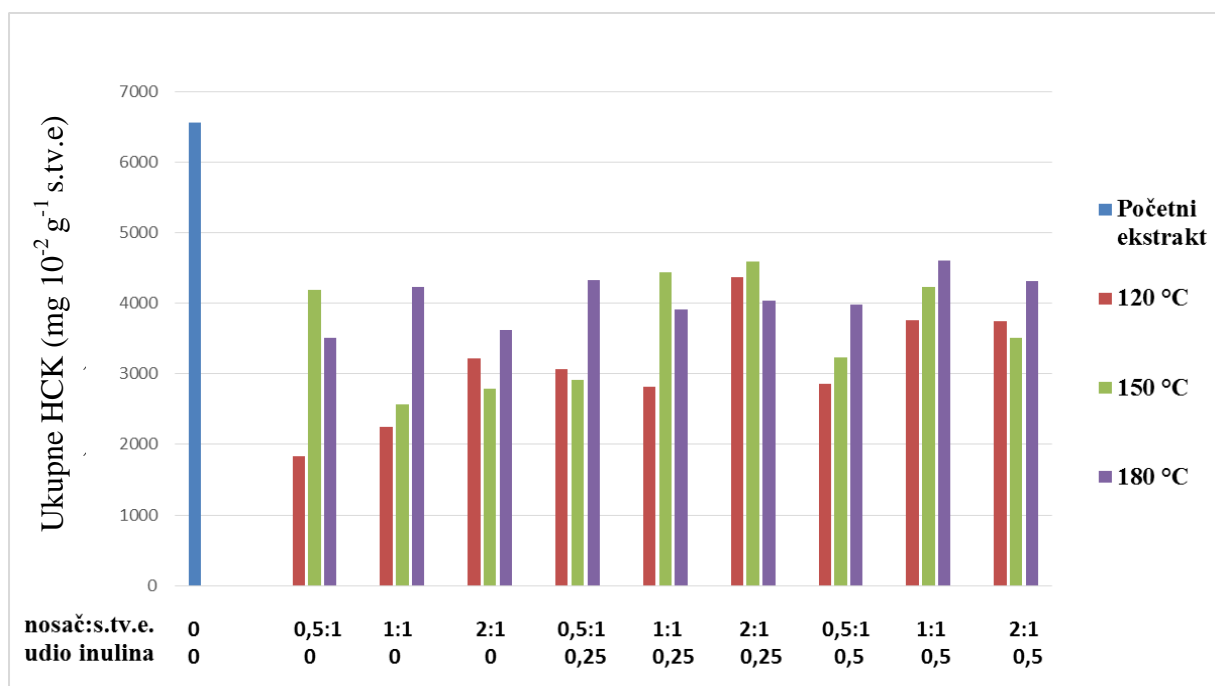
Rezultati utjecaja parametara sušenja (omjer nosača maltodekstrina i suhe tvari ekstrakta cvijeta trnine, udio inulina u nosaču te temperatura) na koncentracije fenolnih spojeva u prahovima dobivenim sušenjem raspršivanjem prikazani su na slikama 11-15.



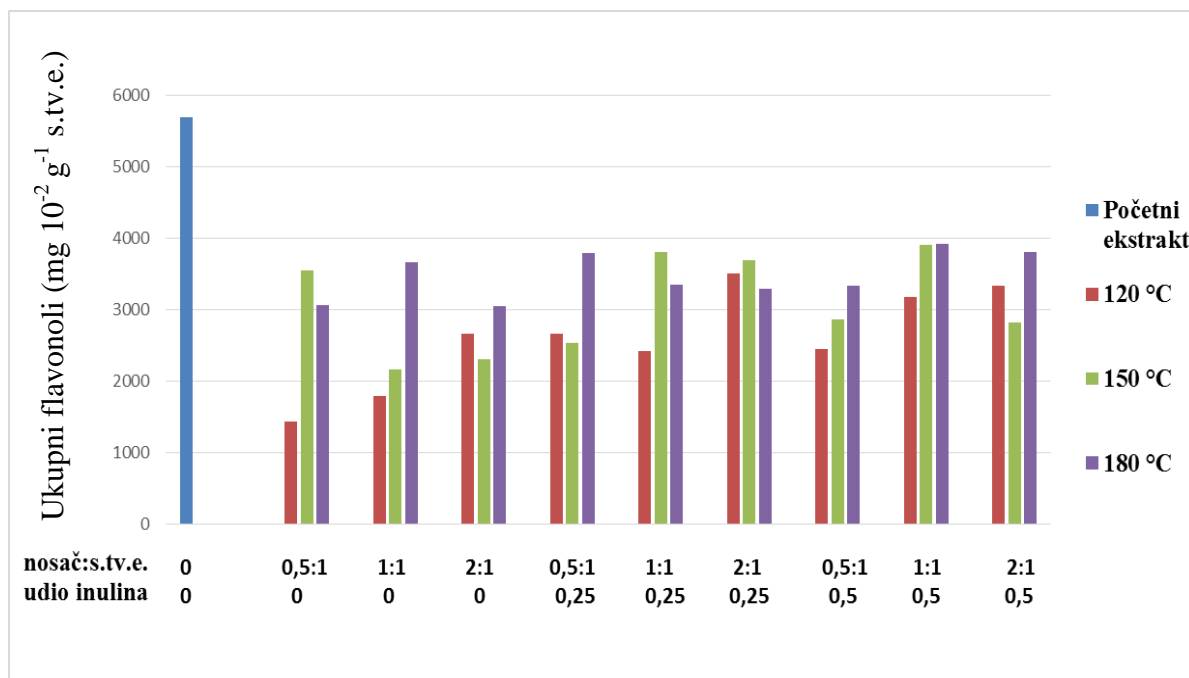
Slika 11. Utjecaj parametara sušenja na koncentracije ukupnih fenola ($\text{mg GAE } 10^{-2} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ekstrakta) u prahovima ekstrakta cvijeta trine



Slika 12. Utjecaj parametara sušenja na koncentracije ukupnih flavonoida ($\text{mg kvercetin } 10^{-2} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.}$ ekstrakta) u prahovima ekstrakta cvijeta trine



Slika 13. Utjecaj parametara sušenja na koncentracije ukupnih hidroksicimernih kiselina (mg kafeinske kiseline 10^{-2} g^{-1} s.tv. ekstrakta) u prahovima ekstrakta cvijeta trnine.



Slika 14. Utjecaj parametara sušenja na koncentracije ukupnih flavonola (mg kvercetina 10^{-2} g^{-1} s.tv. ekstrakta) u prahovima ekstrakta cvijeta trnine

U prahovima nastalim sušenjem ekstrakta cvijeta trnine koncentracije ukupnih fenola (UF) bile su u rasponu od 3601,20 do 8717,50 mg GAE 10^{-2} g^{-1} s.tv. ekstrakta (e), ukupnih flavonoida (UFL) u rasponu od 3307,15 do 9088,07 mg kvercetina 10^{-2} g^{-1} s.tv.e., ukupnih hidroksicimetnih kiselina (UHCK) u rasponu od 1828,02 do 4601,27 mg kafeinske kiseline 10^{-2} g^{-1} s.tv.e. te ukupnih flavonola (UFlav) u rasponu od 1429,55 do 3915,95 mg kvercetina 10^{-2} g^{-1} s.tv.e (slika 11-14).

U odnosu na početni ekstrakt zadržavanje fenolnih spojeva u prahovima dobivenim sušenjem ekstrakta cvijeta trnine iznosilo je kako slijedi: UF u rasponu od 26,73 do 64,70 %, UFL od 26,11 do 71,75 %, UHCK od 27,86 do 70,12 % te UFlav od 25,12 do 68,81 %.

Najviše koncentracije UF određene su u uzorku sušenom pri temperaturi od 120 °C, s omjerom nosača i suhe tvari 2:1 te udjelu inulina (IN) 0,25 %, te u uzorku sušenom pri 180 °C, s omjerom MD i suhe tvari ekstrakta 1:1 te udjelom IN 0,5 %. U navedenim uzorcima koncentracije ukupnih fenola iznosile su (8717,50 te 8707,35 mg GAE 10^{-2} g^{-1} s.tv.e.). Pri istim uvjetima sušenja određene su najviše vrijednosti UFL, UHCK te UFlav (slika 12, 13, 14).

Najniža koncentracija UF određena je pri uvjetima sušenja 120 °C, omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1 te bez dodatka inulina. Također, pri istim uvjetima sušenja određene su i najniže vrijednosti UFL, UHCK te UFlav (slika 12, 13, 14). Općenito, prahovi koji su imali veći omjer nosača i s.tv.e. imali su veće koncentracije fenolnih spojeva. Ovakvi rezultati mogu se objasniti činjenicom da dodani nosači utječu na obuhvaćanje aktivne tvari u polimernoj matrici čime je štite od nepovoljnih uvjeta okoline (Bhusari i Kumar, 2014). Stoga, niska koncentracija nosača slabo štiti enkapsulirani materijal pri sušenju raspršivanjem i posljedično u takvim uzorcima slabije je zadržavanje fenolnih spojeva.

Ekstrakti cvijeta trnine sušeni s omjerom nosača i s.tv.e. 1:1 te masenim udjelom inulina 0,5 imali su najveće vrijednosti UF, UFL, UHCK te UFlav. Kod svih prahova s jednakim udjelom inulina (0,5) uočeno je da koncentracija UFL, UHCK te UFlav je veća pri omjeru nosača i s.tv.e. 1:1, dok pri omjeru 2:1 ona opada. Istraživanje Toluna i sur. (2016) je također pokazalo da se koncentracija fenolnih spojeva značajno smanjila povećanjem omjera nosača i suhe tvari ekstrakta sa 1:1 na 2:1, što su objasnili kao posljedicu povećanja koncentracije nosača u smjesi nosača i ekstrakta.

Dobiveni rezultati su u skladu i sa istraživanjem Elez-Garofulić i sur. (2012) gdje je povećanje koncentracije MD DE 4-7 utjecalo na smanjenje koncentracije UF u prahovima dobivenim sušenjem raspršivanjem soka višnje Maraske. Također, povećanjem koncentracije maltodekstrina prilikom sušenja ekstrakta komine grožđa, ekstrakta planinskog čaja (*Sideritis stricta*) te ruja (*Rhus coriaria L.*) raspršivanjem, smanjen je sadržaj UF (Boonchu i Utamaang, 2015; Nadeem i sur., 2011; Caliskan i sur., 2013).

Međutim, rezultati istraživanja Bhusari i Kumar, (2014) pokazuju da su veći sadržaj fenolnih spojeva imali prahovi dobivenim sušenjem raspršivanjem pulpe ploda tamarinda pri većim koncentracijama nosača. Isti trend s većim dodatkom nosača zabilježen je u istraživanju Ahmed i sur. (2010) koje ukazuje da povećanje ukupnog fenolnog sadržaja može biti posljedica interferencije nosača s fenolnim spojevima. Vjerojatno veća koncentracija nosača pozitivno utječe na zadržavanje fenolnih spojeva pri sušenju raspršivanjem jer dolazi do stvaranja matrice u kojoj polimer čini trodimenzionalnu mrežu koja sadrži enkapsulirani materijal (Tonon i sur., 2010).

Dodatak inulina pozitivno je utjecao na zadržavanje UF, što je dokazano i u istraživanju Paim i sur. (2016) gdje su prahovi palminog soka koji su sadržavali samo MD imali niži udio UF nego prahovi u kombinaciji MD i IN. To ukazuje na bolju zaštitu fenolnih spojeva kad se koristi kombinacija MD i IN tijekom sušenja raspršivanjem.

Dobiveni rezultati su u skladu sa istraživanjem Paim i sur. (2016) gdje je prah dobiven sušenjem raspršivanjem Jusarra palminog soka imao najveći sadržaj UF i antocijana kad se kao nosač koristila mješavina 50 % MD i 50 % IN. Istraživanjem Lacerda i sur. (2006) na prahovima pulpe palme *Euterpe Edulis Martius* je dokazano da je kombinacijom MD i IN moguće postići bolje zadržavanje bioaktivnih komponenti nego upotrebom svakog nosača zasebno. Jedan nosač nema sve potrebne osobine za učinkovitu enkapsulaciju, stoga je kombinacija dvaju ili više nosača bolji izbor za učinkovitiju zaštitu enkapsuliranih spojeva (Gharsallaoui i sur., 2007). Također su istraživanja Pérez-Alonso i sur. (2003) te Tolun i sur. (2016) dokazala da je bolje zadržavanje fenolnih spojeva kad se pri sušenju raspršivanjem koristi kombinacija nosača, u njihovom slučaju MD i arapske gume (AG).

U prahovima ekstrakta cvijeta trnine sa jednakim omjerom nosača i s.tv.e. i udjelom IN došlo je do povećanja koncentracije UF povećanjem temperature sušenja. Isti trend povećanja koncentracije povećanjem temperature sušenja uočen je za ukupne flavonoide,

hidroksicimetne kiseline i flavonole (slika 12, 13, 14). U istraživanju Haidonga i sur. (2012) najviša učinkovitost mikroenkapsulacije ekstrakta ginkgo lišća sušenjem raspršivanjem dobivena je pri 181 °C, a oksidacija polifenola je pri tim uvjetima usporena zbog mikroenkapsulacijskog učinka nosača.

Rezultati istraživanja Chong i Wong (2017) također ukazuju da povećanje temperature sušenja povoljno utječe na sadržaj fenolnih spojeva. Vjerojatno pri većim temperaturama je sušenje brže što uzrokuje kraće vrijeme ekspozicije, a time i manju degradaciju termolabilnih fenolnih spojeva (Kha i sur., 2010; Demarchi i sur., 2013). U istraživanju Elez Garofulić i sur. (2017) sušenjem raspršivanjem soka višnje maraske najbolje zadržavanje antocijana i fenolnih kiselina postignuto pri temperaturi od 200 °C, a flavonol glikozida pri temperaturi sušenja od 180 °C. Povišenje temperature ulaznog i izlaznog zraka sa 160/80 na 180/90 °C pri sušenju raspršivanjem ekstrakta plodova mirisavog ruja uzrokovalo je pad koncentracije ukupnih fenola u prahovima za 15 %, dok je povišenje temperature na 200/100 °C uzrokovalo porast koncentracije ukupnih fenola za 16 % (Caliskan i sur., 2013).

Tablica 3. Multivarijantna analiza varijance pojedinačnih utjecaja udjela inulina, omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (MD:s.tv.), i temperature sušenja na fenolne spojeve i antioksidacijski kapacitet prahova ekstrakta cvijeta trnine, na 95 %-tnom nivou vjerojatnosti

| Inulin (%) | Ukupni fenoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoidi (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupne HCK (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | ORAC (μmol TE 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) |
|-------------|---|---|--|--|---|
| 0 | 5588,15 ± 111,73 ^a | 5811,60 ± 117,77 ^a | 3088,45 ± 66,67 ^a | 2596,85 ± 68,46 ^a | 86628,50 ± 1897,64 ^a |
| 0,25 | 7014,19 ± 111,73 ^b | 7531,08 ± 117,77 ^b | 3864,57 ± 66,67 ^b | 3253,66 ± 68,46 ^b | 101685,60 ± 1897,64 ^b |
| 0,5 | 7209,80 ± 111,73 ^b | 7403,32 ± 117,77 ^b | 3836,04 ± 66,67 ^b | 3314,70 ± 68,46 ^b | 199768,70 ± 1897,64 ^c |
| MD : s. tv. | Ukupni fenoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoidi (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupne HCK (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | ORAC (μmol TE 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) |
| 0,5 | 6027,13 ± 105,52 ^a | 6528,17 ± 111,22 ^a | 3348,44 ± 62,95 ^a | 2883,23 ± 64,65 ^a | 92485,50 ± 1792,13 ^a |
| 1 | 6712,13 ± 119,04 ^b | 7073,92 ± 125,47 ^b | 3641,72 ± 71,02 ^b | 3118,93 ± 72,94 ^{a,b} | 111868,20 ± 2021,80 ^b |
| 2 | 7072,87 ± 110,21 ^b | 7143,91 ± 116,16 ^b | 3798,90 ± 65,75 ^b | 3163,04 ± 67,53 ^b | 183729,00 ± 1871,82 ^c |
| Temperatura | Ukupni fenoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoidi (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupne HCK (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | ORAC (μmol TE 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) |
| 120 °C | 5851,29 ± 110,21 ^a | 5845,95 ± 116,16 ^a | 3101,54 ± 65,75 ^a | 2602,71 ± 67,53 ^a | 135333,70 ± 1871,82 ^a |
| 150 °C | 6416,47 ± 114,71 ^b | 6990,60 ± 120,91 ^b | 3629,02 ± 68,43 ^b | 3089,71 ± 70,28 ^{a,b} | 123045,80 ± 1948,25 ^b |
| 180 °C | 7544,37 ± 110,21 ^c | 7909,45 ± 116,16 ^b | 4058,50 ± 65,75 ^b | 3472,78 ± 67,53 ^b | 129703,20 ± 1871,82 ^c |

Tablica 4. Multivarijantna analiza varijance kombiniranih utjecaja udjela inulina i omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (MD:s.tv.), udjela inulina i temperature (T) te omjera MD:s.tv. i T sušenja na fenolne spojeve i antioksidativni kapacitet prahova ekstrakta cvijeta trnine, na 95%-tnom nivou vjerojatnosti.

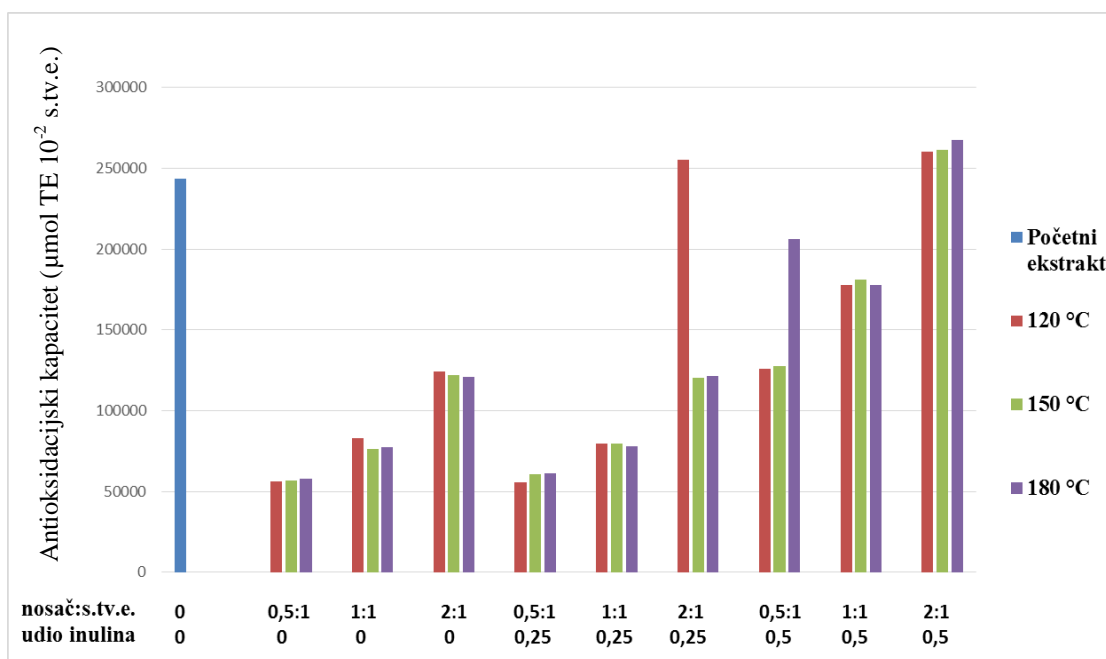
| Inulin | MD : s.tv. | N | Ukupni fenoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoidi (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupne HCK (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | ORAC (μmol TE 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) |
|------------|------------|----|---|---|--|--|---|
| 0 | 0,5 | 10 | 5556,32 ± 182,76 ^a | 5912,43 ± 192,64 ^{abc} | 3043,28 ± 109,03 ^a | 2549,36 ± 111,98 ^a | 58455,60 ± 3104,06 ^a |
| 0 | 1 | 8 | 5419,46 ± 206,18 ^a | 5657,33 ± 217,32 ^a | 3010,59 ± 123,01 ^a | 2565,17 ± 126,33 ^a | 79032,80 ± 3501,85 ^b |
| 0 | 2 | 9 | 5788,67 ± 190,89 ^{ab} | 5865,03 ± 201,20 ^a | 3211,47 ± 113,88 ^a | 2676,02 ± 116,96 ^a | 122396,90 ± 3242,08 ^c |
| 0,25 | 0,5 | 10 | 6053,49 ± 182,76 ^{abc} | 6982,71 ± 192,64 ^{bc} | 3581,09 ± 109,03 ^{ab} | 3124,70 ± 111,98 ^{abc} | 61083,60 ± 3104,06 ^a |
| 0,25 | 1 | 8 | 6769,57 ± 206,18 ^{cd} | 7322,39 ± 217,32 ^b | 3681,55 ± 123,01 ^{ab} | 3143,40 ± 126,33 ^{abc} | 78209,40 ± 3501,85 ^b |
| 0,25 | 2 | 9 | 8219,50 ± 190,89 ^f | 8288,14 ± 201,20 ^e | 4331,08 ± 113,88 ^c | 3492,89 ± 116,96 ^{bc} | 165763,90 ± 3242,08 ^{cd} |
| 0,5 | 0,5 | 10 | 6471,59 ± 182,76 ^{bcd} | 6689,37 ± 192,64 ^{abc} | 3420,95 ± 109,03 ^{ab} | 2975,65 ± 111,98 ^{ab} | 157917,30 ± 3104,06 ^c |
| 0,5 | 1 | 8 | 7947,36 ± 206,18 ^{ef} | 8242,03 ± 217,32 ^{de} | 4233,03 ± 123,01 ^c | 3648,21 ± 126,33 ^c | 178362,50 ± 3501,85 ^d |
| 0,5 | 2 | 9 | 7210,46 ± 190,89 ^{de} | 7278,55 ± 201,20 ^{bd} | 3854,15 ± 113,88 ^{bc} | 3320,23 ± 116,96 ^{bc} | 263026,20 ± 3242,08 ^f |
| Inulin | T | N | Ukupni fenoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoidi (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupne HCK (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | ORAC (μmol TE 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) |
| 0 | 120 °C | 9 | 4365,61 ± 190,89 ^a | 4361,31 ± 201,20 ^a | 2433,29 ± 113,88 ^a | 1961,94 ± 116,96 ^a | 87910,50 ± 3242,08 ^a |
| 0 | 150 °C | 9 | 5485,08 ± 198,68 ^b | 5716,70 ± 209,42 ^b | 3045,10 ± 118,53 ^b | 2569,05 ± 121,73 ^b | 86716,70 ± 3374,47 ^a |
| 0 | 180 °C | 9 | 6913,75 ± 190,89 ^{cd} | 7356,78 ± 201,20 ^{cde} | 3786,96 ± 113,88 ^{cde} | 3259,56 ± 116,96 ^{cde} | 85258,10 ± 3242,08 ^a |
| 0,25 | 120 °C | 9 | 6561,23 ± 190,89 ^{bc} | 6556,53 ± 201,20 ^{bc} | 3418,07 ± 113,88 ^{bc} | 2859,44 ± 116,96 ^{bc} | 130190,90 ± 3242,08 ^b |
| 0,25 | 150 °C | 9 | 6942,89 ± 198,68 ^{cd} | 8037,06 ± 209,42 ^{def} | 4086,50 ± 118,53 ^{de} | 3427,14 ± 121,73 ^{cde} | 88161,10 ± 3374,47 ^a |
| 0,25 | 180 °C | 9 | 7538,45 ± 190,89 ^{de} | 7999,65 ± 201,20 ^{ef} | 4089,15 ± 113,88 ^{de} | 3474,41 ± 116,96 ^{de} | 86704,80 ± 3242,08 ^{af} |
| 0,5 | 120 °C | 9 | 6627,03 ± 190,89 ^c | 6620,01 ± 201,20 ^{bc} | 3453,26 ± 113,88 ^{bc} | 2986,76 ± 116,96 ^{bc,d} | 187899,80 ± 3242,08 ^c |
| 0,5 | 150 °C | 9 | 6821,45 ± 198,68 ^{cd} | 7218,03 ± 209,42 ^{cd} | 3755,48 ± 118,53 ^{bcd} | 3272,95 ± 121,73 ^{bcd,e} | 194259,60 ± 3374,47 ^c |
| 0,5 | 180 °C | 9 | 8180,92 ± 190,89 ^e | 8371,90 ± 201,20 ^f | 4299,38 ± 113,88 ^e | 3684,37 ± 116,96 ^e | 217146,60 ± 3242,08 ^d |
| MD : s.tv. | T | N | Ukupni fenoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoidi (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupne HCK (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | Ukupni flavonoli (mg 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) | ORAC (μmol TE 10 ⁻² g ⁻¹ s.tv.e.) |
| 0,5 | 120 °C | 9 | 4836,09 ± 320,55 ^a | 4905,52 ± 410,67 ^a | 2583,70 ± 192,66 ^a | 2180,10 ± 196,44 ^a | 79268,20 ± 11778,61 ^a |
| 0,5 | 150 °C | 12 | 6106,65 ± 331,53 ^{bc} | 6913,50 ± 387,70 ^{bc} | 3522,69 ± 200,25 ^b | 3079,54 ± 197,51 ^c | 89924,00 ± 12092,80 ^a |
| 0,5 | 180 °C | 9 | 7138,66 ± 192,94 ^d | 7765,48 ± 250,46 ^{cd} | 3938,92 ± 123,96 ^{bc} | 3390,06 ± 118,19 ^{cd} | 108264,30 ± 24651,21 ^a |
| 1 | 120 °C | 9 | 5602,22 ± 518,45 ^{ab} | 5541,73 ± 473,74 ^a | 2943,20 ± 223,55 ^a | 2459,98 ± 208,86 ^{ab} | 113386,80 ± 16158,60 ^b |
| 1 | 150 °C | 9 | 6399,02 ± 642,15 ^{bcd} | 7287,41 ± 848,60 ^{bc} | 3735,63 ± 382,30 ^{bc} | 3252,24 ± 324,19 ^{cd} | 111317,10 ± 21726,05 ^b |
| 1 | 180 °C | 9 | 8135,15 ± 169,30 ^e | 8392,61 ± 202,28 ^d | 4246,33 ± 113,12 ^c | 3644,56 ± 98,31 ^d | 110900,80 ± 16723,23 ^b |
| 2 | 120 °C | 9 | 7115,56 ± 481,14 ^d | 7090,60 ± 371,16 ^{bc} | 3777,72 ± 178,16 ^{bc} | 3168,05 ± 140,11 ^{cd} | 213346,20 ± 22415,59 ^d |
| 2 | 150 °C | 9 | 6743,76 ± 330,02 ^{cd} | 6770,88 ± 566,89 ^b | 3628,74 ± 268,11 ^b | 2937,35 ± 216,27 ^{bc} | 167896,40 ± 23456,59 ^c |
| 2 | 180 °C | 9 | 7359,31 ± 335,70 ^{de} | 7570,25 ± 220,29 ^{bcd} | 3990,24 ± 115,37 ^{bc} | 3383,72 ± 117,24 ^{cd} | 169944,50 ± 24446,74 ^c |

Rezultati statističke analize pojedinačnih i kombiniranih utjecaja udjela inulina, omjera nosača i suhe tvari ekstrakta (MD:s.tv.), i temperature sušenja (T) na fenolne spojeve prikazani su u tablicama 3 i 4. Prema rezultatima multivarijantne analize varijance (MANOVA) temperatura je statistički značajno utjecala na koncentraciju UF (Tablica 3).

Kod kombiniranog djelovanja IN i omjera nosača i s.tv.e. MANOVA je pokazala da udio IN statistički značajno utječe na zadržavanje fenolnih spojeva odnosno što je veći udio IN to je značajnija razlika između koncentracija fenolnih spojeva. Ukoliko se prati kombinirani utjecaj IN i T, nema statistički značajnog utjecaja T na fenolne spojeve kad je dodan IN. Odnosno koncentracije fenolnih spojeva su podjednake u prahovima u kojima je dodan IN i kod temperatura sušenja od 120 i 150 °C. Kod kombiniranog utjecaja omjera nosača i suhe tvari ekstrakta i temperature, temperatura nema statistički značajan utjecaj na fenolne spojeve jer vjerojatno dodatak MD stvara zaštitni sloj te utječe na bolje zadržavanje fenolnih spojeva (tablica 4).

4.2. Utjecaj parametara sušenja na antioksidacijski kapacitet u prahovima ekstrakta cvijeta trnine

Rezultati utjecaja parametara sušenja (udio IN, temperatura, te omjer nosača i suhe tvari ekstrakta cvijeta trnine) na antioksidacijski kapacitet u prahovima dobivenim sušenjem raspršivanjem prikazani su grafički na slici 15.



Slika 15. Utjecaja parametara sušenja na antioksidacijski kapacitet (ORAC) u prahovima dobivenim sušenjem raspršivanjem

Antioksidacijski kapacitet (AK) početnog ekstrakta cvijeta trnine određen ORAC metodom prije sušenja je iznosio $243488,32 \mu\text{mol TE } 10^{-2} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.e.}$ U prahovima nakon sušenjem ekstrakta cvijeta trnine AK je bio u rasponu od $55621,90$ do $267614,86 \mu\text{mol TE } 10^{-2} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.e.}$

Povećanje udjela nosača u odnosu na s.tv.e. te povećanje udjela IN u nosaču dovelo je do povećanja AK za sve uzorke, pri čemu je najveći AK određen u prahu sušenom raspršivanjem pri temperaturi od $180 \text{ }^\circ\text{C}$ s najvećim omjerom nosača i s.tv.e. (2:1) te s najvećim udjelom IN u nosaču (0,5). Veći AK praha u odnosu na početni ekstrakt može biti posljedica hidrolize konjugata polifenola tijekom pripreme uzoraka ili tijekom procesa sušenja (Saénz i sur., 2009). Stoga, vjerojatno dolazi do polimerizacije i transformacije polifenola u spojeve sa većom antioksidativnom aktivnošću.

Naši rezultati su u skladu s istraživanjem koje su proveli Bhusari i Kumar (2014) na prahovima koji su dobiveni sušenjem raspršivanjem pulpe ploda tamarinde. AK kapacitet tih prahova je rastao povećanjem udjela nosača, za sve nosače (MD, guma arabika te koncentrat proteina sirutke). Sličan trend je primijećen i kod sušenja ljubičastog slatkog krumpira (Peng i

sur., 2013). U istraživanju Akkaya i sur. (2012) najveći AK je određen u prahovima melase rogača kad je korištena viša temperatura sušenja (210 °C) te omjer nosača i s.tv.e. 50:50.

Najniži AK određen je u uzorku praha sušenom pri temperaturi od 120 °C sa omjerom MD i suhe tvari ekstrakta 0,5:1 i udjelom IN 0,25. U istraživanju Elez-Garofulić i sur. (2012) u prahovima višnje maraske sušene raspršivanjem AK je bio najveći pri manjim koncentracijama MD, te pri optimalnoj temperaturi od 160 °C.

Prema Mishra i sur. (2013) visoke temperature nepovoljno utječu na strukturu fenolnih spojeva, uzrokujući razaranje strukture, što rezultira formiranjem različitih spojeva čime se smanjuje antioksidativna vrijednost. Međutim, kod sušenja raspršivanjem dolazi do stvaranja matrice u kojoj polimer čini trodimenzionalnu mrežu koja sadrži enkapsulirani materijal (Tonon i sur., 2010). Stoga, veća koncentracija nosača pruža bolju zaštitu enkapsuliranih fenola od utjecaja visoke temperature čime se očuva njihov AK.

Prema rezultatima multivarijantne analize varijance (MANOVA) utvrđeno je da pojedinačni utjecaj T, IN i omjer nosača i s.tv.e. je statistički značajno utjecao na AK prahova (tablica 3). Također statistički značajan utjecaj na AK imali su dodatak IN i omjer nosača i s.tv.e. (tablica 4).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Zadržavanje fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta cvijeta trnine proizvedenim postupkom sušenja raspršivanjem u odnosu na početni ekstrakt određeno je u rasponu od 25,12 do 71,75 %.
2. Najveće zadržavanje odnosno koncentracije svih istraživanih skupina fenolnih spojeva (UF, UFL, UHCK i Uflav) određene su u uzorcima sušenim pri temperaturi od 120 °C, s omjerom nosača i suhe tvari 2:1 te udjelu inulina 0,25 te u uzorcima sušenim pri temperaturi 180 °C, omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 1:1 te udjelu inulina 0,5.
3. Inulin kao nosač je imao značajan utjecaj na stabilnost fenolnih spojeva tijekom sušenja raspršivanjem te su u uzorcima bez dodanog inulina određene niže koncentracije fenolnih spojeva. Najniže koncentracije UF, UFL, UHC i UFlav određene su pri uvjetima sušenja 120 °C, omjeru nosača i suhe tvari ekstrakta 0,5:1 te bez dodatka inulina.
4. Veći omjer nosača i suhe tvari pri sušenju ekstrakta trnine je utjecao na povećanje koncentracija UF, UFL, UHCK te UFlav u prahovima, a u uzorcima sa jednakim omjerom nosača i suhe tvari ekstrakta i udjelom inulina koncentracije fenolnih spojeva su rasle sa povećanjem temperature sušenja.
5. Povećanje omjera nosača i suhe tvari ekstrakta te udjela inulina je utjecalo na povećanje AK u prahovima ekstrakta cvijeta trnine.
6. Na temelju provedene MANOVA pokazalo se da je temperatura sušenja značajno utjecala na koncentraciju UF, a na AK osim temperature sušenja značajno su utjecali omjer nosača i suhe tvari te udio inulina. Nadalje, dodatak inulina i povećanje omjera nosača i suhe tvari ekstrakta imao je pozitivan utjecaj na zadržavanje svih fenolnih spojeva i na AK.

6. LITERATURA

- Ahmed, M., Akter, M. S., Lee, J. C., Eun, J.B. (2010) Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT - Food Sci. Technol.* **43**, 1307-1312.
- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., Valero, J. R. (2011) Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Crit. Rev. Biotechnol.* **31** (3), 227-249.
- Akkaya, Z., Schröder, J., Tavman, S., Kumcuoglu, S., Schuchmann H. P., Gaukel V. (2012) Effects Of Spray Drying On Physical Properties, Total Phenolic Content And Antioxidant Activity Of Carob Molasses. *Int. J. Food Eng.* **8** (4), 1556-3758.
- AOAC (1984) Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 14. izd., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng.* **117**, 426-436.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., Ferreira, I. C. (2010) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* **120**, 247-254.
- Bhusari, S. N., Muzaffar, K., Kumar, P. (2014) Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. *Powder technol.* **266**, 354-364.
- Boonchu, T., Utama-ang, N. (2015) Optimization of extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red grape (*Vitis vinifera L.*) pomace. *J. Food. Sci. Technol.* **52**, 783.
- Burits, M., Bučar, F. (2000) Antioxidative activity of Nigella sativa essential oil. *Phytother. Res.* **14**, 323–328.
- Caliskan, G., Dirim, S. N. (2013) The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food Bioprod.Process.* **91**, 539-548.
- Chegini, R.G., Ghobadian, B. (2007) Spray dryer parameters for fruit juice drying. *World J. Agric. Sci.* **3**, 230-236.

- Chegini, R.G., Khazaei, J., Ghobadian, B. and Goudarzi, A.M. (2008) Prediction of process and product parameters in an orange juice spray dryer using artificial neural networks. *J. Food Eng.* **84**, 534–543
- Chong, S. Y., Wong, C. W. (2015) Production of spray-dried Sapodilla (*Manikara zapota*) powder from enzyme- aided liquefied puree. *J. Food Process. Pres.* **9**, 2604-2611.
- Chong, S. Y., Wong, C. W. (2017) Effect of spray dryer inlet temperature and maltodextrin concentration on colour profile and total phenolic content of Sapodilla (*Manilkara zapota*) powder. *Int. Food Res. J.* **24** (6), 2543-2548
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313-7352.
- Demarchi, S. M., Ruiz, N. A. Q., Concellon, A. (2013) Effect of temperature on hot-air drying rate and on retention of antioxidant capacity in apple leathers. *Food and Bioproducts Process.* **91**, 310-318.
- Desai, K.G.H., Park, H.J. (2005) Recent development in microencapsulation of foods ingredients. *Dry. Technol.* **23**, 1361–1394.
- Elez Garofulić, I., Kvakan, K., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V. (2012) Total phenolic content and antioxidant activity of spray-dried sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. *Marasca*) juice U: Nedović, V., Ilić, N., Tumbas, V., Kalušević, A. (ur.) *Proceedings of the 6th Central European Congress on Food*. Novi Sad, University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 308-311.
- Elez Garofulić, I. (2015) Optimiranje proizvodnje praha soka višnje maraske (*Prunus cerasus* var. *Marasca*) primjenom sušenja raspršivanjem. Doktorski rad, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V. (2016) Optimization of sour cherry juice spray drying as affected by carrier material and temperature. *Food technol. biotech.* **54**, 441-449.
- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V. (2017) Retention of polyphenols in encapsulated sour cherry juice in dependence of drying temperature and wall material. *Food Sci. Tech.* **83**, 110-117.

- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Brnčić, M., Dragović Uzelac, V. (2018) UPLC-MS2 profiling of blackthorn flower polyphenols isolated by ultrasound-assisted extraction. *J. Food Sci.*, in press
- Fang, Z., Bhandari, B. (2011) Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chem.* **129**, 1139-1147.
- Ferrari, C.C., Germer, S.P.M., de Aguirre, J.M. (2012) Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberrypowder. *Dry. Technol.* **30**, 154-163.
- Gallegos –Infante, J. A., Rocha –Guzmán, N. E., González –Laredo, R. F., Medina –Torres, L., Gomez –Aldapa, C. A., Ochoa –Martínez, L. A., Martínez –Sánchez, C. E., Hernández –Santos, B., Rodríguez –Ramírez, J. (2013) Physicochemical properties and antioxidant capacity of oak (*Quercus resinosa*) leaf infusions encapsulated by spray-drying. *Food Biosci.* **2**, 31-38.
- Ganhão R., Estévez M., Kylli P., Heinonen M., Morcuen-de D., (2010) Characterization of selected wild mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 8854-8861.
- Gey, K. F. (1990) The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease epidemiology and mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 1041–1045.
- Gey, K. F., Puska, P., Jordan, P., Moser, U. K. (1991) Total antioxidant capacity of plant foods. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 326–334.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* **40**, 1107-1121.
- Goula, A. M., Adamopoulos, K. G., Kazakis, N. A. (2004) Influence of spray drying conditions on tomato powder properties. *Dry. Technol.* **22**, 1129-1151.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C. (2013). Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chem.* **141**, 3721–3730.
- Haidong, L., Fang, Y., Zhihong, T., Huanwei, S., Tiehui, Z. (2012) Use of combinations of gum arabic, maltodextrin and soybean protein to microencapsulate

ginkgo leaf extracts and its inhibitory effect on skeletal muscle injury. *Carbohydr. Polym.* **88**, 435-440.

- Herceg, Z. (2009) Procesi konzerviranja hrane-Novi postupci, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835.
- Idžojić, M. (2013) Dendrologija -Cvijet, češer, plod, sjeme, Sveučilište u Zagrebu Šumarski fakultet, Zagreb.
- Isailović, B., Kalušević, A., Žuržul, N., Coelho, M. T., Đorđević, V., Alves, V. D., Sousa, I., MoldãoMartins, M., Bugarski, B., Nedović, V. A. (2012) Microencapsulation of natural antioxidants from *Pterospartum tridentatum* in different alginate and inulin systems. Proceedings of 6th Central European Congress On Food. Novi Sad, University of Novi Sad, Institute of Food Technology, Srbija, 1075-1061.
- Jabłońska-Ryś, E., Zalewska-Korona, M., Kalbarczyk J. (2009) Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits, *J. Fruit Ornament Plant Res.* **17**, 115–120.
- Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **55**, 279-290.
- Kha, T. C., Nguyen, M. H., Roach, P. D. (2010) Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *J. Food Eng.* **98**, 385–392.
- Kolodziej, H., Sakar, M. K., Burger, J. F., Engelshowe, R., Ferreira, D. (1991) A-type proanthocyanidins from *Prunus spinosa L.* *Phytochemistry.* **30**, 2041-2047.
- Komarov, V. L., Shishkin, B. K., Yuzepchuk, S. V., Fedorov, A. A., Kostina, K. F., Kovalev, N. V., Krishtofovich, A. N., Linchevskii, I. A., Poyarkova, A. I. (1970) Flora of the USSR-Volume X: Rosaceae-Rosoideae, Prunoideae.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2012) Microencapsulation of *Morinda citrifolia L.* extract by spray-drying. *Chem. Eng. Res. Des.* **90**, 622-632.
- Lacerda, E. C. Q., de Araújo Calado, V. M., Monteiro, M., Finotelli, P. V., Guedes Torres, A., Perrone, D. (2016) Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles. *Carbohydr Polym.* **151**, 500-510.

- Lovrić, T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb, str. 179-204.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. (2006) Flavour encapsulation and controlled release—a review. *Int. J. Food Sci. Tech.* **41**, 1-21.
- Maky Orel (2017) Prunus spinosa blackthorn spring flowers. Pixabay <<https://pixabay.com/en/prunus-spinosa-blackthorn-2308289>> Pristupljeno 17.8.2018.
- Maraköglu, T., Arslan, D., Özcan, M., Haciseferogullari, H. (2005) Proximate composition and technological properties of fresh blackthorn (*Prunus spinosa* L.) subsp dasyphylla (Schur.) fruits. *J. Food Eng.* **68**, 137-142.
- Marchelak, A., Owczarek, A., Matczak, M., Pawlak, A., Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowakand, P., Olszewska, M. A. (2017) Bioactivity Potential of *Prunus spinosa* L. Flower Extracts: Phytochemical Profiling, Cellular Safety, Pro-inflammatory Enzymes Inhibition and Protective Effects Against Oxidative Stress In Vitro. *Front Pharmacol.* **8**, 680
- Masters, K. (1985) Spray drying handbook, 4. izd., George Godwin Ltd., London.
- Mishra, P., Mishra, S., Mahanta, C. L. (2014) Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Embllica officinalis*) juice powder. *Food Bioprod. Process.* **92**, 252-258.
- Morales, M., Santos-Silva, J., Ribas, O. S. (2013) A new species of Mimosasect. *Mimosa* (*Leguminosae, Mimosoideae*) from Southern Brazil. *Brittonia* **65**, 148–153
- Murugesan, R. and Orsat, V. 2011. Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients-A Review. *Food Bioprocess Technol.* **8**, 1-12.
- Nadeem, H. Ş., Torun, M., Özdemir, F. (2011) Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT-Food Sci. Technol.* **44**, 1626-1635.
- Nedović, V., Kalusević, A., Manojlović, V., Lević, S., Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* **1**, 1806-1815.
- Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M. and Fernández-López, J.A. (2009) Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *J. Food Eng.* **90**,471–479.

- Olszewska, M., Wolbis, M. (2000) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Herba Polon. Pharm.* **46**, 249–234.
- Olszewska, M., Glowacki, R., Wolbis, M., Bald, E. (2001) Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta Polon. Pharm.* **58**, 199–203.
- Olszewska, M., Wolbis, M. (2001) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **58**, 367-372.
- Özbek, S. (1978) Special Fruits, Cukurova. *Univ. Agric. Fac. Publ.* **128**, 223-252.
- Owczarek, A., Magiera, A., Matczak, M., Piotrowska, D. G., Olszewska, M. A., and Marchelak, A. (2017) Optimisation of preparative HPLC separation of four isomeric kaempferol diglycosides from *Prunus spinosa* L. by application of the response surface methodology. *Phytochem. Lett.* **20**, 415–424.
- Paim, D. R. S. F., Costa, S. D. O., Walter, E.H.M., Tonon, R. V. (2016) Microencapsulation of probiotic jussara (*Euterpe edulis* M.) juice by spray drying. *LWT - Food Sci. Technol.* **74**, 21-25.
- Patel, R. P., Patel, M. P., Suthar, A.M. (2009) Spray drying technology: an overview. *Indian J. Sci. Technol.* **2**, 44-47.
- Pelc, M., Szalacha, E., Przybył, J., Angielczyk, M., Kwiecińska, D., Węglarz, Z. (2010) Genetic and chemical diversity of wild grown population of blackthorn fruits. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **12** (4), 365-372.
- Peng, Z., Li, J., Guan, Y., Zhao, G. (2013) Effect of carriers on physicochemical properties, antioxidant activities and biological components of spray-dried purple sweet potato flours. *LWT - Food Sci. Technol.* **51**, 348-355.
- Pérez-Alonso, C., Báez-González, J. G., Beristain, C. I., Vernon-Carter, E. J., Vizcarra-Mendoza, M. G. (2003) Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydr. Polym.* **53**, 197-203.
- Pinacho, R., Cavero, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., Calvo, M. I. (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *J. Funct. Foods* **19**, 49-62.

- Popescu, I., Caudullo, G. (2016) *Prunus spinosa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: European Atlas of Forest Tree Species, (San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A., ured.), Luxembourg, str.145.
- Prior, R. L. (2015) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J. Func. Foods*. **18**, 797–810.
- Quek, S. Y., Chok, N. K., Swedlund, P. (2007) The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chem. Eng. Process*. **46**, 386-392.
- Rejniak, J.M., Zielinski, R. (2010) Potential antiradical activity of *Prunus spinosa* extracts. U: Commodity Science in Research and Practice – Non-food products' quality and innovations. (Salerno-Kochan, R.) Polish Society of Commodity Science, Cracow, str. 139-149.
- Robinson, M. M., Zhang. X., (2011) The world medicine situation -Traditional medicine: global situation, issues and challenges, 3. izd., World Health Organization, Geneva.
- Ruiz-Rodríguez, B. M., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Fernández-Ruiz, V., de Cortes Sánchez-Mata, M., Cámara, M., Tardío, J. (2014) Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits* **69**, 61-73.
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. (2009) Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem*. **114**, 616-622.
- Savić, Lj. (2014) Metode ekstrakcije biljnih materijala: uporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd.
- Sikora, E., Bieniek, M. I., Borczak, B. (2013) Composition and antioxidant properties of fresh and frozen stored blackthorn fruits (*Prunus spinosa* L.). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*. **12**, 365-372.
- Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci*. **98** (4), 828-834.

- Singh S, Dixit D (2014) A review on spray drying: emerging technology in food industry. *Int J Appl Eng Technol* **4**, 1-8.
- Sollohub, K., Cal, K. (2010) Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. *J Pharm Sci.* **99**, 587-597.
- Souza, C. R., Oliveira, W. P. (2006) Powder properties and system behavior during spray drying of Bauhinia forficata Link extract. *Dry. Technol.* **24**, 735-749.
- Spanos, G. A., Wrolstad, R. E., Heatherbvell D. A. (1990) Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1572-1579.
- Tamas, M. (1985) Study of flavones *Prunus spinosa L.* flowers. *Farmacia* **33**, 181–186.
- Tolun, A., Altintas, Z., Artik, N. (2016) Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *J. Biotechnol.* **239**, 23-33.
- Tonon, R. V., Braber, C., Hubinger M. D. (2008) Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced by spray drying. *J. Food Eng.* **88** (3), 411-418.
- Tonon, R. V., Brabet, C., Hubinger, M. D. (2010) Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea Mart.*) juice produced with different carrier agents. *Food Res Int.* **43**, 907-914.
- Truong, V., Bhandari, B. R. and Howes, T. (2005) Moisture and glass optimization of co-current spray drying process of sugar rich foods: transition temperature profile during drying. *J. Food Eng.* **71**, 55–65.
- Tsao, R., McCallum, J. (2009) Chemistry of Flavonoids. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability (De la Rosa, L.A., AlvarezParrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., ured.), Blackwell Publishing, Ames, str. 131-153.
- Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović, G. S., Mitić, S. S., Mitić, M. N., Randelović, S. S., Đorđević, A. S. (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa L.* fruit. *Hem. Ind.* **68**, 297-303.

- Vidović, S. S., Vladić, J. Z., Vaštag, Ž. G., Zeković, Z. P., Popović, L. M. (2014) Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in Satureja montanadry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technol.* **258**, 209-215.
- Vitali Čepo, D., Vedrina Dragojvić I. (2012) Inulin i oligofruktoza u prehrani i prevenciji bolesti. *Hrana u zdravlju i bolesti* **1**, 36-43
- Whale, W. J. K., Brown, I., Rotondo, D., Heys, D.S. (2010) Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. U: *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors* (Giardi, M.T., Rea, G., Berra, B., ured.), Landes Bioscience, Austin, Texas.
- Yuksel, A. K. (2015) The effect of blackthorn (*Prunus spinosa L.*) addition on certain quality characteristics of ice cream. *J. Food Qualit Y* **38**, 413-421.

IZJAVA IZVORNOSTI

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



Patricija Lisica