

Utjecaj uvjeta čuvanja likera od aronije na sadržaj fenolnih spojeva i kromatske parametre

Haus, Valentina

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:411826>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Valentina Haus
0058219200

**UTJECAJ UVJETA ČUVANJA LIKERA OD ARONIJE NA SADRŽAJ FENOLNIH
SPOJEVA I KROMATSKE PARAMETRE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Proizvodnja jakih alkoholnih pića

Mentor: prof. dr. sc. Damir Stanzer

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj uvjeta čuvanja likera od aronije na sadržaj fenolnih spojeva i kromatske parametre

Valentina Haus, 0058219200

Sažetak:

Liker od aronije je jako alkoholno piće proizvedeno maceracijom ploda biljke aronije u vodeno-alkoholnoj bazi. Karakteristične je crvene boje koja potječe od fenolnih spojeva prisutnih u bobicama aronije. Cilj ovog rada je definirati optimalne uvjete čuvanja likera od aronije pri kojima ne dolazi do značajnog smanjenja sadržaja fenolnih spojeva i gubitka karakteristične boje. Tijekom 6 mjeseci čuvanja likera od aronije određen je sadržaj fenolnih spojeva i kromatski parametri. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) određen je spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, a kromatski parametri pomoću CIELab sustava. Uvjeti čuvanja koji su ispitivani uključuju temperaturu, izloženost svjetlu te dodatak limunske kiseline. Statističkom analizom istraživanih uvjeta čuvanja utvrđeno je da dodatak limunske kiseline (8 g L^{-1}) značajno utječe na sadržaj fenolnih spojeva. Optimalni uvjeti čuvanja likera od aronije, pri kojima se postiže očuvanje fenolnih spojeva ekstrahiranih iz bobica aronije tijekom 6 mjeseci su: sobna temperatura ($20 \text{ }^{\circ}\text{C}$), potpuna tama, dodatak limunske kiseline.

Ključne riječi: liker, aronija, uvjeti čuvanja, fenolni spojevi, kromatski parametri

Rad sadrži: 34 stranice, 14 slika, 12 tablica, 41 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Damir Stanzer

Pomoć pri izradi: Karla Hanousek Čiča, dr.sc.

Datum obrane: 10. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

**Influence of storage conditions of chokeberry liqueur on the content of phenolic compounds
and chromatic parameters**

Valentina Haus, 0058219200

Abstract:

Chokeberry liqueur is an alcoholic beverage produced by macerating the fruit of the chokeberry plant in a water-alcohol base. It is characterized by a red colour that comes from the phenolic compounds present in the chokeberry berries. The aim of this study is to define the optimal storage conditions for chokeberry liqueur to prevent significant reduction in phenolic compound content and loss of its characteristic color. During six months of storage, the content of phenolic compounds and chromatic parameters of chokeberry liqueur were determined. The total phenolic content (TPC) was determined spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu reagent and the chromatic parameters were measured using the CIELab system. The storage conditions examined included temperature, light exposure, and the presence of citric acid. Statistical analysis of the storage conditions showed that the addition of citric acid (8 g L⁻¹) significantly affects the phenolic compound content. The optimal storage conditions for chokeberry liqueur, which ensure the preservation of phenolic compounds extracted from chokeberry berries over six months, are: room temperature (20 °C), complete darkness, and the presence of citric acid.

Keywords: liqueur, chokeberry, storage conditions, phenolic compounds, chromatic parameters

Thesis contains: 34 pages, 14 figures, 12 tables, 41 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Damir Stanzer, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Karla Hanousek Čiča, PhD

Thesis defended: July 10, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA	2
2.1.1. PODJELA JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA.....	2
2.1.2. LIKERI	3
2.1.3. MACERACIJA.....	4
2.2. FENOLNI SPOJEVI	5
2.3. ARONIJA.....	7
2.3.1. KEMIJSKI SASTAV BOBICA ARONIJE.....	8
2.3.2. UTJECAJ NA ZDRAVLJE.....	8
2.3.3. UPOTREBA	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.1. LIKER OD ARONIJE.....	10
3.1.2. KEMIKALIJE I REAGENSI	12
3.1.3. LABORATORIJSKA OPREMA I UREĐAJI	13
3.2. METODE	13
3.2.1. ODREĐIVANJE FENOLNIH SPOJEVA.....	13
3.2.2. ODREĐIVANJE KROMATSKIH PARAMETARA I UKUPNE RAZLIKE OBOJENOSTI	16
3.2.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA (TPC).....	19
4.2. KROMATSKI PARAMETRI.....	24
5. ZAKLJUČCI	30
6. POPIS LITERATURE	31

1. UVOD

Liker od aronije je jako alkoholno piće s najmanje 15 % v/v alkohola te najmanje 100 g L⁻¹ šećera. Proizvodi se maceracijom svježih ili suhih bobica aronije u vodeno-alkoholnoj bazi. Alkohol i voda apsorbiraju tvari arome, pigmente te ostale biološki aktivne spojeve biljnog materijala koji su u njima topivi. Popularnost likera u suvremenom društvu, posebno među ženskom populacijom, sve više raste. Konzumiraju se kao aperitivi te digestivi, ali i zbog zdravstvenih dobiti. Proizvodnja likera seže u daleku prošlost, kada se ljekovito bilje konzerviralo u alkoholu. Likeri su se smatrali eliksirima dugog života, koristilo ih se sa svrhom liječenja ili prevencije bolesti, a tek su kasnije postali uživala.

Aronija je bobičasto voće koje pripada porodici ruža (*Rosaceae*). Rijetko se konzumira u svježem obliku zbog svog trpkog okusa, stoga se najčešće prerađuje u sokove ili likere. U njezinom kemijskom sastavu ističe se visoka koncentracija fenolnih spojeva. Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da polifenoli u organizmu djeluju kao antioksidansi, stoga aroniju i sve njezine prerađevine čine poželjnima za konzumaciju. Od fenolnih spojeva u aroniji, u najvećoj koncentraciji, prisutni su flavonoidi (antocijani, flavanoli, flavonoli) te fenolne kiseline (Gao i sur., 2024). Antocijani su odgovorni za karakterističnu tamno crvenu boju plodova aronije, pa tako i likera od aronije (Veberic i sur., 2015). Na kvalitetu likera od aronije utječu brojni čimbenici, uključujući sortu, klimatske i okolišne uvjete uzgoja aronije, uvjeti maceracije te u konačnici uvjeti čuvanja samog likera.

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj čuvanja (svjetlost, temperatura te dodatak limunske kiseline) na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva i kromatske parametre likera od aronije. Nestabilnost polifenola pri različitim uvjetima čuvanja posljedica je njihove složene kemijske strukture zbog koje vrlo lako stupaju u reakcije s drugim prisutnim spojevima. S vremenom dolazi do njihove oksidacije što utječe na njihov sadržaj te kromatske parametre. Cilj ovog rada je definirati optimalne uvjete čuvanja likera od aronije, s obzirom na temperaturu, svjetlost te dodatak limunske kiseline, pri kojima ne dolazi do značajnog smanjenja sadržaja fenolnih spojeva i gubitka karakteristične boje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA

Prema Uredbi (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća jaka alkoholna pića su pića s posebnim organoleptičkim svojstvima, namijenjena za ljudsku potrošnju, a sadrže minimalno 15 % v/v alkohola. Mogu se proizvesti izravno ili miješanjem jakog alkoholnog pića s jednim ili više drugih jakih alkoholnih pića i/ili etilnim alkoholom odnosno destilatima poljoprivrednog podrijetla i/ili drugih prehrambenih proizvoda. Izravno se jaka alkoholna pića (JAP) mogu proizvesti destilacijom i/ili maceracijom i/ili dodavanjem aroma, bojila, sladila i/ili drugih poljoprivrednih odnosno prehrambenih proizvoda etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i/ili destilatima poljoprivrednog podrijetla i/ili jakim alkoholnim pićima. Najveća potrošnja jakih alkoholnih pića je upravo u Europi gdje ostvaruju oko 50 % prihoda od ukupne prodaje alkoholnih pića. Dakle, unatoč visokom sadržaju alkohola, njihova proizvodnja i prodaja je u porastu. Kroz povijest, kao i danas, pokazali su se kao sastavni dio ljudske prehrane te su ih mnogi koristili u ljekovite svrhe. Njihova konzumacija u različitim prigodama sastavni je dio tradicije mnogih zemalja, a u današnje vrijeme, ujedno i odraz profinjenosti odnosno društvenog statusa.

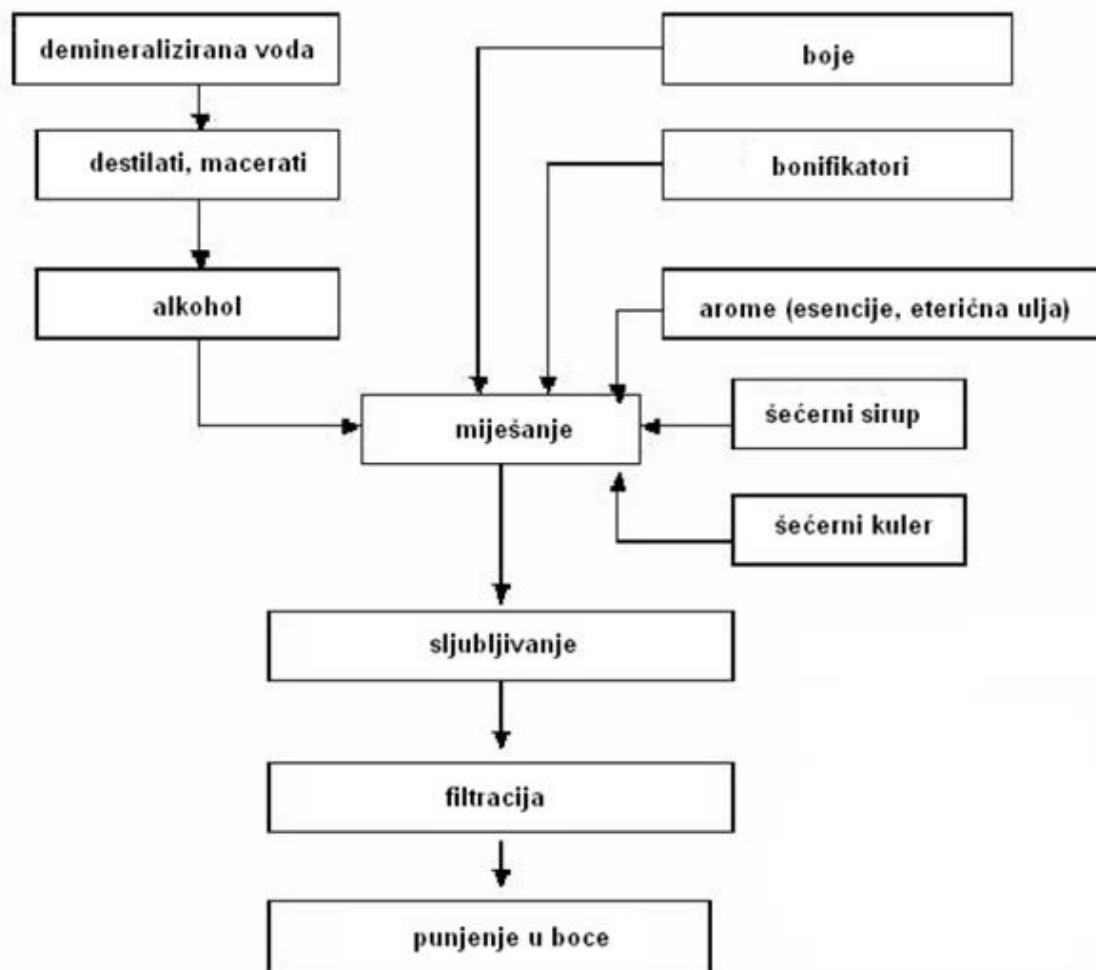
2.1.1. Podjela jakih alkoholnih pića

Ovisno o vrsti i načinu proizvodnje, jaka alkoholna pića mogu se podijeliti na prirodna (destilirana) jaka alkoholna pića te na likere i miješana jaka alkoholna pića (Mrvčić i sur., 2012). Destilirana pića se proizvode destilacijom prevrele žitne, voćne ili šećerne komine. Pri tome se kao konačni proizvod, nakon dodatne obrade destilata, dobivaju voćne rakije (npr. šljivovica, viljamovka), rakije od grožđa (vinjak, lozovača, komovica), šećerne rakije (rum) te žitne rakije (npr. whisky, gin, vodka). Sadrže između 30 i 50 % v/v alkohola. S druge strane, likeri se proizvode maceracijom voća, aromatskog te ljekovitog bilja ili začina u vodeno-alkoholnoj bazi. Sadrže minimalno 15 % v/v alkohola te minimalno 100 g L⁻¹ invertnog šećera, uz dvije iznimke. Iznimka su likeri od trešnje ili višnje kod kojih etilni alkohol proizlazi isključivo od rakije od trešnje tj. višnje (minimalno 70 g L⁻¹ šećera) te liker aromatiziran encijanom ili sličnom biljkom ili pelinom s minimalnom količinom šećera od 80 g L⁻¹. Uredba (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća definira uvjete koje pojedina jaka alkoholna pića moraju zadovoljiti prilikom kategorizacije te svrstava jaka alkoholna pića u 44 kategorije. Prvih 14 kategorija čine jaka alkoholna pića koja su proizvedena destilacijom prevrele voćne, žitne ili šećerne komine, primjerice, rum, whiskey, žitna rakija, rakija od vina, itd. Ne sadrže dodan

alkohol, nisu aromatizirana ni zaslađena. U njihovoj proizvodnji dozvoljen je dodatak jedino karamela koji služi za korekciju boje. Jaka alkoholna pića koja spadaju u kategorije od 15. do 44. moraju biti proizvedena od poljoprivrednih sirovina, mogu sadržavati dodani etanol, aromatične tvari i pripravke, aromatizirane prehrambene proizvode, bojila te zaslađivače. U ove kategorije spadaju gin, jaka alkoholna pića aromatizirana borovicom, anisom ili kimom, likeri, itd. Ostala jaka alkoholna pića koja ne ispunjavaju zahtjeve utvrđene navedenim kategorijama (od 1. do 44.) kao svoj pravni naziv upotrebljavaju naziv „jako alkoholno piće“. Moraju biti proizvedena od poljoprivrednih sirovina i/ili prehrambenih proizvoda namijenjenih za ljudsku potrošnju, uz dozvoljen dodatak etanola, aroma, bojila i zaslađivača.

2.1.2. Likeri

Likeri su alkoholna pića s nižim postotkom alkohola (od 15 do 35 % v/v), a sadrže najmanje 100 g L⁻¹ šećera (Grba, 2010). Proizvode se aromatiziranjem i/ili miješanjem etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla i/ili destilata poljoprivrednog podrijetla sa šećerom, vodom, raznim voćem i voćnim prerađevinama, eteričnim uljima, biljnim maceratima, začinima te raznim dodacima poput mlijeka, jaja, kave ili čokolade (slika 1). Destilat poljoprivrednog podrijetla, prema Uredbi (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća, alkoholna je tekućina dobivena nakon alkoholne fermentacije destilacijom poljoprivrednih sirovina koja zadržava aromu i okus upotrijebljenih sirovina. Etilni alkohol poljoprivrednog podrijetla prema istoj Uredbi (EU) 2019/787 sadrži minimalno 96 % v/v alkohola te nema zamjetljivog okusa, osim po sirovinama korištenih u proizvodnji. Likeri se s obzirom na sastav, osnovna svojstva i način proizvodnje mogu podijeliti na voćne, biljne, gorke, aromatizirane te emulzijske (krem) likere. Voćne likere odlikuje karakteristični okus i miris voća od kojeg su proizvedeni. Proizvode se od voćnog soka ili macerata voća, alkohola i šećera. Biljni likeri se proizvode maceracijom različitih aromatskih i ljekovitih bilja i začina. Odabir i količinu aromatskog te ljekovitog bilja odabire sam proizvođač, a recepture su uglavnom tajne. Gorki likeri se proizvode ekstrakcijom aromatičnih i gorkih dijelova biljaka u rafiniranom alkoholu ili dodatkom prirodnih esencija koji su svojstveni za pojedinu vrstu likera (Grba, 2010). Aromatizirani likeri sadrže eterična ulja i/ili umjetne esencije i arome pomiješane sa šećerom, destiliranom vodom te etilnim alkoholom. Emulzijski (krem) likeri se proizvode miješanjem etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla s dodacima (jaja, kava, čokolada, lješnjak) koji su emulgirani s mlijekom ili vrhnjem.



Slika 1. Shematski prikaz proizvodnje likera (*ilustrator: D. Stanzer*)

Likeri se vrlo često konzumiraju kao aperitivi kod raznih prigoda, kao digestivi, sastojci su mnogih koktela, koriste se u kulinarstvu, tradicionalnoj medicini, itd. Osim što se često konzumiraju, vrlo često se i proizvode u kućanstvima. Mihaljević Žulj (2022) u svojem se članku dotaknuo sve češće proizvodnje likera iz razloga da se iskoristi „loša“ rakija. Mnogi tradicionalni proizvođači prvu frakciju destilacije (prvijenac) ne bacaju jer sadrži određenu koncentraciju etanola, međutim, ona sadrži mnoge nepoželjne spojeve oštrog i neugodnog mirisa, primjerice acetaldehid i metanol. Ističe kako je to pogrešno te da je osnova proizvodnje likera zdrav i kvalitetan destilat. Također ističe da pritom treba paziti na sljublivanje aroma voća koje se macerira i destilata odnosno da arome moraju biti kompatibilne.

2.1.3. Maceracija

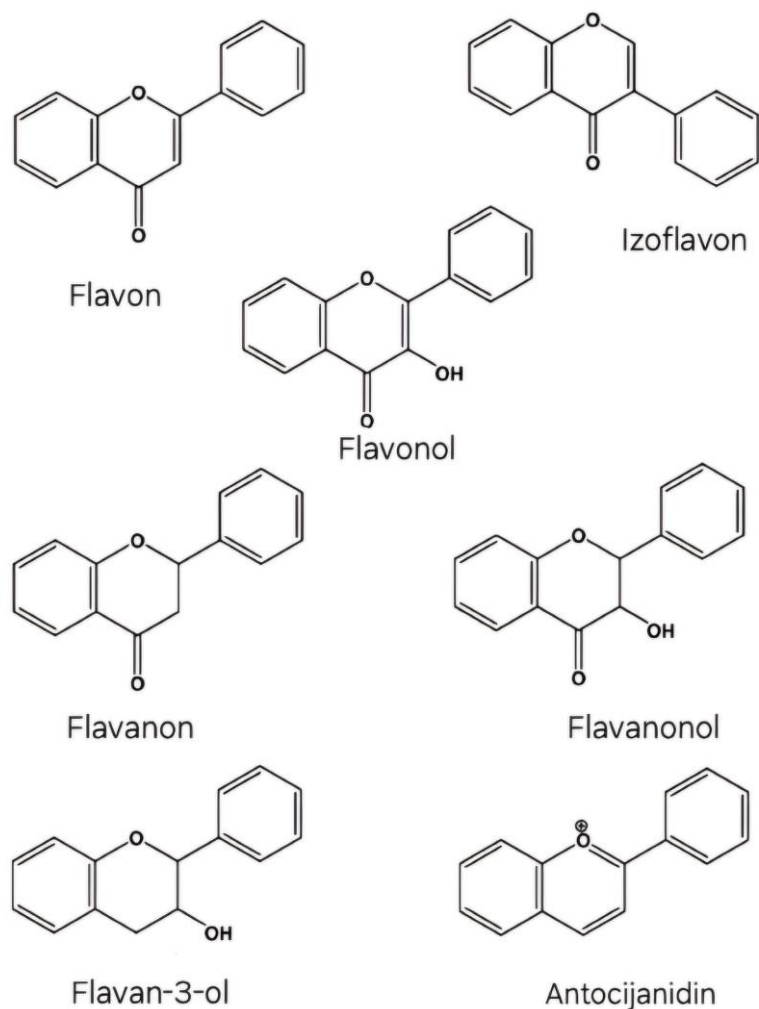
Maceracija je jedna od najstarijih i najčešće korištenih postupaka u proizvodnji jakih alkoholnih pića. Riječ je o tehnološkom postupku močenja odnosno potapanja voća ili bilja u

vodeno-alkoholnoj bazi prilikom čega dolazi do ekstrakcije i otapanja aromatskih te biološki aktivnih spojeva iz tog voća odnosno bilja. Oni su odgovorni za aromu te antioksidacijsko djelovanje likera. Preciznije, dolazi do njihove difuzije pod utjecajem gradijenta koncentracije te prelaze iz područja više (voće, bilje) u područje niže koncentracije (vodeno-alkoholna baza). Mnogo je dosadašnjih istraživanja koja to potvrđuju. Primjerice, Ali Shehat i sur. (2020) objavili su istraživanje u kojem su ekstrahirali antocijane, biološki aktivne spojeve, iz kore jabuka, borovnica i šljiva, maceracijom, koristeći etanol i klorovodičnu kiselinu kao otapala. Rezultati su pokazali da se najveća koncentracija antocijana nalazi u kori šljiva, a najmanja u kori jabuka. Također, određivali su antioksidacijsku aktivnost dobivenih macerata koja je pokazala da macerati šljive te borovnice imaju veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s maceratom jabuke tj. zaključili su da se tijekom maceracije ekstrahiraju antocijani, jedni od spojeva odgovornih za antioksidacijsku aktivnost. Nadalje, Hanousek Čiča i sur. (2020) proveli su karakterizaciju macerata rogača dobivenog maceracijom mahuna rogača u hidroalkoholnoj bazi pri različitim uvjetima maceracije. Navode da na koncentraciju bioaktivnih spojeva u maceratu, uz vrstu i kvalitetu bilja, utječe temperatura, vrijeme maceracije, postotak alkohola u vodeno-alkoholnoj bazi te izloženost svjetlu. Rezultati te studije također potvrđuju proces difuzije bioaktivnih spojeva, spojeva arome i šećera iz mahune rogača u hidroalkoholnu bazu. U nešto starijem istraživanju, Čujić i sur. (2016) zaključili su da je maceracija učinkovita i jednostavna tehnika za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz ploda aronije. Svrha posljednjih istraživanja jest pronaći metodu koja će što učinkovitije ekstrahirati spojeve arome i bioaktivne spojeve iz voćnog odnosno biljnog materijala. Istraživanja se temelje na unapređenju tradicionalne metode maceracije budući da se ona smatra učinkovitim, jednostavnim i jeftinom konvencionalnom tehnikom ekstrakcije. U istraživanju Nemetz (2024) cilj je bio procijeniti utjecaj ultrazvuka tijekom enzimske maceracije (UAEM) na ekstrakciju i stabilnost spojeva iz bobičastog voća. Dokazano je da UAEM u kombinaciji s poligalakturonazom povećava ekstrakciju antocijana te njihovu stabilnost tijekom skladištenja s obzirom na konvencionalni postupak maceracije. Sumarno, na kvalitetu macerata, odnosno ekstrakciju spojeva arome i biološki aktivnih spojeva, najveći utjecaj imaju vrsta i koncentracija otapala, odnos količine bilja odnosno voća i alkoholne baze, vrsta i trajanje postupka ekstrakcije te temperatura.

2.2. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti prisutni u voću, bilju te začinima. Imaju ključnu ulogu u procesima razvoja, rasta te reprodukciji biljaka (Sharma i sur., 2019). Osim toga, pridonose njihovoj boji te senzorskim karakteristikama (Tazeddinova i sur., 2022; Boročov-Neori i sur., 2009). Dokazano je da sudjeluju u obrani biljaka i njihovih plodova

od patogena te abiotskog stresa, primjerice ultraljubičastog zračenja, ekstremnih temperatura, suše te visokog saliniteta (Zagoskina i sur., 2023; Dini i Grumetto, 2022; Shahidi i sur., 2019; Sharma i sur., 2019). Polifenoli su predmet mnogih istraživanja zbog njihovih korisnih učinaka na metabolizam biljaka, ali su također od velike značajnosti i u ljudskom organizmu. Preciznije, djeluju kao antioksidansi stoga su nezamjenjivi sastojci u mnogim farmaceutskim, nutraceutskim i kozmetičkim proizvodima (Khan i sur., 2021). Antioksidansi su molekule koje imaju antiradikalnu aktivnost. Neutraliziraju slobodne radikale predajući im svoje elektrone i na taj način ih stabiliziraju ili jednostavno sprečavaju njihovo nastajanje. Slobodni radikali su vrlo reaktivni i štetni za organizam budući da mogu oštetiti same stanice, proteine odnosno aminokiseline te još važnije, nukleinske kiseline. Prema Quideau i sur. (2011), u skupinu polifenola ubrajaju se molekule koje sadrže aromatske prstene s hidroksilnim skupinama, ali i molekule s jednim fenolnim prstenom, kao što su fenolne kiseline. Njihova podjela temelji se na kemijskoj strukturi odnosno topologiji fenolnog prstena i molekulama vezanih na njega. Mogu se podijeliti na fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne), flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani itd.), tanine (kondenzirani i hidrolizirani) te ostale polifenolne spojeve u koje se ubrajaju lignani i kumarini (Mrvčić, 2020). Rudrapal i sur. (2024) ističu prisutnost polifenola u raznim namirnicama, kao što su bobičasto voće (aronija, borovnica, kupina, itd.), jabuke, agrumi, špinat, kelj, kava, čaj i crno vino. U konačnici, konzumacija proizvoda biljnog podrijetla, ovisno o njihovoj koncentraciji antioksidansa, smanjuje rizik od razvoja kroničnih bolesti te poboljšava zdravlje ljudi. Što se tiče polifenola kao takvih, imaju velik potencijal kao terapijski modaliteti u različitim zdravstvenim paradigmatama. Navedena saznanja potkrepljuju i neka prijašnja istraživanja, primjerice, Khan i sur. (2021) objavili su istraživanje kojim su dokazali da flavonoidi, biološki aktivne komponente, iz voća i povrća mogu biti učinkoviti u prevenciji bolesti poput raka i kardiovaskularnih bolesti. Nisu ih tada identificirali, ali su donijeli zaključak da njihova aktivnost ovisi o farmakokinetičkom, metaboličkom i farmakodinamičkom profilu u ljudskom tijelu. Na temelju tog istraživanja, Rudrapal i sur. (2022), dokazali su antioksidacijsko djelovanje polifenola u različitim *in vitro* i *in vivo* modelima te zaključili da na njihovo djelovanje u organizmu uvelike utječe crijevna mikrobiota. Konkretnije, navode da u debelom crijevu flavonoidi, zajedno s prisutnim mikroorganizmima, sudjeluju u reakcijama biotransformacija koje dovode do nastanka metabolita snažne fiziološke aktivnosti. Navode da procesi kao što su deglikozilacija, cijepanje fenolnog prstena te demetilacija dovode do stvaranja biološki aktivnih spojeva koji imaju u konačnici antioksidacijsko i protuupalno djelovanje. Kemijske strukture glavnih skupina flavonoida prikazane su na slici 2.



Slika 2. Kemijska struktura glavnih skupina flavonoida (prema Shahidi i sur., 2019)

2.3. ARONIJA

Aronija je listopadni grm porijeklom iz Sjeverne Amerike, a uspješno se uzgaja i u drugim dijelovima svijeta, uključujući i Europu. Pripada carstvu biljka (*Plantae*) te porodici ruža (*Rosaceae*). Grmovi aronije mogu narasti do visine od 3 m, a u periodu od travnja do lipnja (ovisno o klimatskim uvjetima) stvaraju male cvjetove koji krajem ljeta ili početkom jeseni sazrijevaju do crvenih (*Aronia arbutifolia*), ljubičastih (*Aronia prunifolia*) ili crnih bobica (*Aronia melanocarpa*). Plodovi aronije (bobice) su jestivi te imaju iznimno visoku nutritivnu i antioksidacijsku vrijednost (Stipanović, 2017). Osim što se uzgaja za preradu tj. proizvodnju sokova, čajeva, vina, džemova, likera i slično, ljudi je često uzgajaju i kao ukrasnu biljku. U Hrvatskoj najčešće raste crna aronija (*Aronia melanocarpa*) koja je vrlo otporna na niske temperature i mraz te prilagođena rastu na različitim vrstama tla (Stipanović, 2017).

2.3.1. Kemijski sastav bobica aronije

Kemijski sastav aronije, a posljedično i njezinih prerađevina (likeri, sokovi, čajevi, džemovi, itd.) ovisi o sorti, gnojidbi, sazrijevanju bobica odnosno klimatskim i okolišnim uvjetima (Skupień i Oszmiański, 2007; Jeppsson i Johansson, 2000). Stoga se i literaturni podaci o kemijskom sastavu donekle razlikuju, međutim zajedničko im je da crna aronija (*Aronia melanocarpa*) sadrži veliku količinu polifenola koji su odgovorni za biološku aktivnost aronije (Gao i sur., 2024; Kulling i Rawel, 2008; Jakobek, 2007). Između različitih vrsta bobičastog voća (aronija, borovnica, ribiz, kupina, višnja, jagoda) upravo se aronija ističe po koncentraciji ukupnih fenola i antioksidacijskoj aktivnosti (Jakobek, 2007). Među prisutnim fenolnim spojevima u aroniji, najviše je flavanola, antocijana te fenolnih kiselina (Gao i sur., 2024; Kulling i Rawel, 2008). Gao i sur. (2024) ističu kako najveći udio fenola u bobicama crne aronije čine flavanoli u koje se ubrajaju (+) katehini te (-) epikatehini male molekulske mase te procijanidini. Procijanidini su glavna skupina polifenolnih spojeva u aroniji, a druga najzastupljenija skupina su antocijani (Gao i sur., 2024; Kulling i Rawel, 2008). Antocijani su skupina flavonoida odgovorna za boju bobica aronije. Glavne komponente antocijana su cijanidin 3-glukozid, cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-ksilozid te cijanidin-3-arabinozid (Veberic i sur., 2015; Kulling i Rawel, 2008). Među fenolnim kiselinama posebno se ističu klorogenska i neoklorogenska kiselina koje su obično prisutne u slobodnom obliku te su dobro topljive u vodi i mogu se apsorbirati u malim količinama u gastrointestinalnom traktu te ući u krv (Gao i sur., 2024). Jakobek (2007) ističe kako količina pojedinih grupa polifenola (antocijana, flavanola i fenolnih kiselina) nije najveća u aroniji u usporedbi s drugim ispitivanim bobičastim voćem, ali pokazuje daleko najveću antioksidacijsku aktivnost. Kao mogući razlog navodi prisutnost nekih drugih antioksidansa u aroniji, primjerice vitamina C. Prema Kulling i Rawel (2008) svježe cijeđeni sok od aronije sadrži 200 mg L⁻¹ vitamina C. Vitamini su neophodni za normalno funkcioniranje ljudskog organizma i potrebno ih je unositi u organizam kroz prehranu. Aronija osim što sadrži već spomenuti vitamin C, bogata je i vitaminima iz B skupine, mineralima i karotenoidima (Kulling i Rawel, 2008). Među vitaminima B skupine ističu se niacin (B3), pantotenska kiselina (B5), riboflavin (B2), piridoksin (B6) te tiamin (B1). Među prisutnim mineralima, posebno se po količini ističe kalij, u koncentraciji od 2850 mg L⁻¹ u svježe cijeđenom soku (Kulling i Rawel, 2008). Što se tiče karotenoida, najzastupljeniji su β-karoten, β-kriptoksantin te violaksantin, također snažni antioksidansi.

2.3.2. Utjecaj na zdravlje

Bobice crne aronije odlikuju se značajnim količinama polifenola, vitamina i minerala za koje je poznato da imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Kao što je već navedeno,

polifenoli djeluju kao antioksidansi odnosno pomažu kod neutralizacije slobodnih radikala. Vitamin C je važan za normalno funkcioniranje imunološkog sustava te također posjeduje antioksidacijska svojstva. Mujkić i sur., 2021 uočili su sinergističko antioksidativno djelovanje vitamina C s kurkuminom i kvercetinom (fenolnim spojevima) na inhibiciju stvaranja amiloidnih fibrila koji su uključeni u neurodegenerativne bolesti. Antioksidativni potencijal bobica crne aronije posljedično dovodi do različitih antikancerogenih i protuupalnih aktivnosti. Primjerice, fenolni spojevi bobica aronije mogu tvoriti stabilne komplekse s toksičnim metalima i na taj se način sprečava njihova apsorpcija i unošenje u tkiva (Ren i sur., 2022). Ren i sur. (2022) također navode da bobice aronije pokazuju potencijalnu aktivnost protiv gripe, a kliničkim istraživanjima potvrđen je potencijal kvercetina izoliranog iz bobica aronije u liječenju i prevenciji COVID-19 bolesti. Nadalje, navode kako bobice aronije ciljano djeluju na oksidativni stres i na taj način imaju terapijski učinak na maligne bolesti, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, infekcije te druge bolesti. Oksidativni stres je izazvan neravnotežom između količine slobodnih radikala i sposobnosti organizma da ih neutralizira antioksidansima. Nadalje, u nedavnom istraživanju, kombinirano liječenje staničnih linija raka debelog crijeva s ekstraktom bobica aronije te oligomernih proantocijanidina pokazalo je velik sinergistički antikancerogeni potencijal (Li i sur., 2024).

2.3.3. Upotreba

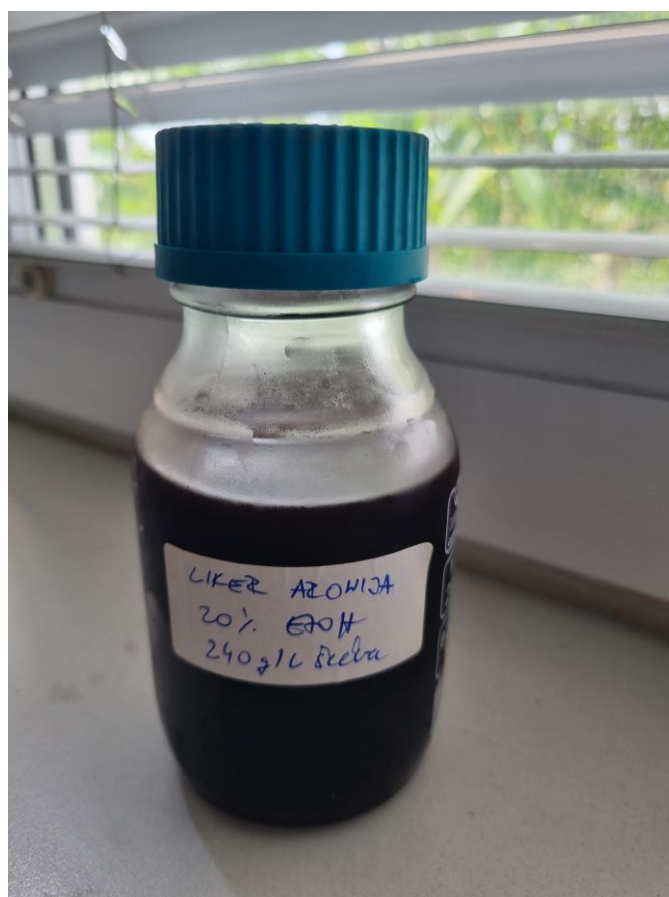
Bobice aronije vrlo su trpkog okusa, stoga se najčešće prerađuju u sokove, čajeve, vina, džemove i likere kako bi se iskoristili njihovi potencijalni zdravstveni učinci. Potrebno je obratiti pažnju na sprečavanje oksidativne degradacije fenolnih spojeva aronije tijekom proizvodnje i čuvanja njezinih proizvoda (Gao i sur., 2024). Primjerice, tijekom proizvodnje sokova od aronije ili džemova, provodi se pasterizacija kako bi se povećala njihova trajnost, međutim pojedini termolabilni spojevi se pritom degradiraju i na taj način se gube njihova vrijedna nutritivna svojstva. Prema Kulling i Rawel (2008), kako je već spomenuto, u svježe cijeđenom soku od aronije koncentracija vitamina C iznosi 200 mg L^{-1} , a u pasteriziranom 0 mg L^{-1} što pridonosi značajnom smanjenju antioksidacijske aktivnosti pasteriziranog soka.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Liker od aronije

Liker od aronije proizveden je maceracijom suhих bobica crne aronije s područja sjeverozapadne Hrvatske (slika 3). Alkoholna jakost dobivenog macerata bila je 40 % v/v. Koncentracija šećera nakon maceracije podešena je na 240 g L⁻¹, a alkoholna jakost na 20 % v/v, razrjeđivanjem s vodom. Osim šećera, dodan je i glicerol u koncentraciji od 2 mL L⁻¹. Glicerol je jedan od dozvoljenih aditiva za korekciju jakih alkoholnih pića. Radi se o slatkastoj, viskoznoj tekućini koja služi za nadopunu gustoće.



Slika 3. Liker od aronije (vlastita fotografija)

Uzorci likera čuvani pri različitim uvjetima

Liker od aronije raspodijeljen je u 8 prethodno označenih bočica za čuvanje od 100 mL pomoću menzure. Uzorci su čuvani pri različitim temperaturama i različitoj izloženosti svjetlu, s odnosno bez dodatka limunske kiseline. Radi jednostavnosti, označeni su brojevima od 1 do 3, a detaljniji opis uvjeta čuvanja naveden je u tablici 1.

Tablica 1. Uvjeti čuvanja likera od aronije s pripadajućim oznakama

Oznaka uzorka	Uvjeti čuvanja
1aL/1a	Temperatura: 20-25 °C Direktna izloženost dnevnom svjetlu Svijetla bočica
1bL/1b	Temperatura: 20-25 °C Direktna izloženost dnevnom svjetlu Tamna bočica
2L/2	Temperatura: 20 °C Tama
3L/3	Temperatura: 4 °C Hladnjak

L- uzorci u koje je dodana limunska kiselina u koncentraciji od 8 g L⁻¹



Uzorci 1a i 1b- čuvani na sobnoj temperaturi, u svijetloj i tamnoj bočici s/bez dodatka limunske kiseline



Uzorci 2- čuvani na sobnoj temperaturi, u tami, s/bez dodatka limunske kiseline



Uzorci 3- čuvani u hladnjaku, s/bez dodatka limunske kiseline

Slika 4. Prikaz različitih uvjeta čuvanja likera od aronije (vlastita fotografija)

3.1.2. Kemikalije i reagensi

Za eksperimentalni dio rada korištene su sljedeće kemikalije i reagensi:

- destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Hrvatska)
- galna kiselina, analitički standard (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- natrijev karbonat, Na_2CO_3 (Gram-mol, Hrvatska)
- limunska kiselina (E330; Šafram, Hrvatska)

3.1.3. Laboratorijska oprema i uređaji

- kivete (staklene i plastične)
- laboratorijske čaše
- menzura
- odmjerne tikvice od 10 mL i pripadni čepovi
- pipetmani P1000 i P3000 te pripadni nastavci
- stakleni štapić
- stalak za odmjerne tikvice
- tehnička vaga KB 1200-2N (Kern, Njemačka)
- UV/VIS spektrofotometar Specord 50 plus (Analytik Jena, Jena, Njemačka)
- vodena kupelj (Memmert, Njemačka)

3.2. Metode

Uzorci likera od aronije čuvani pri različitim uvjetima analizirani su svakih mjesec dana, tijekom 6 mjeseci. Parametri koji su pritom određeni su koncentracija ukupnih fenolnih spojeva te kromatski parametri.

3.2.1. Određivanje fenolnih spojeva

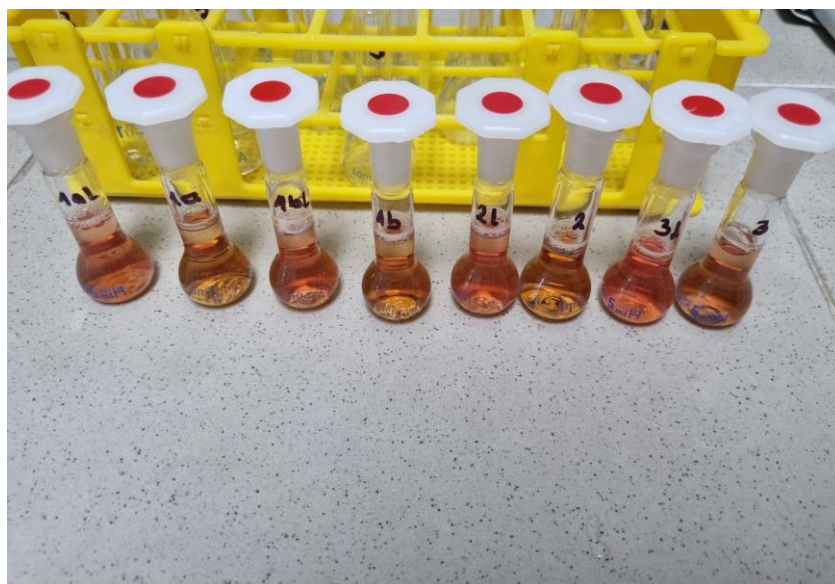
Princip i opis metode

Ukupni sadržaj fenola (TPC) određen je spektrofotometrijski uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa, modificiranom metodom prema Singleton i Rossi (1965). Folin-Ciocalteu reagens se sastoji od fosfomolibdene i fosfovolframove kiseline. U reakciji s fenolima dolazi do oksido-redukcijske reakcije. Naime, fenoli djeluju kao redukcijsko sredstvo odnosno reduciraju ove kiseline u molibdenov oksid i volframov oksid koji su plavo obojeni. Osnovno načelo ove metode je da nastali plavo obojeni spojevi apsorbiraju svjetlost pri specifičnoj valnoj duljini od 760 nm. Radi se o valnoj duljini pri kojoj fenoli maksimalno apsorbiraju svjetlost. Intenzitet obojenja proporcionalan je izmjerenoj apsorbanciji jer što je veća koncentracija obojenih spojeva, jači je intenzitet obojenja, a posljedično, više je svjetlosti apsorbirano odnosno apsorbancija je veća. Koncentracija obojenih spojeva proporcionalna je koncentraciji fenola u uzorku, jer što je njihova koncentracija veća, oksido-redukcijskih reakcija će biti više odnosno nastati će više obojenih spojeva. Dakle, može se zaključiti da je izmjerena apsorbancija direktno proporcionalna koncentraciji fenola u nekom uzorku i to je osnovni princip ove metode. Važno je napomenuti da to vrijedi do granice linearnosti. Odnosno, uzorke je zbog područja linearnosti metode potrebno razrijediti, a dobiveni rezultat se onda pomnoži s

faktorom razrjeđenja. Važno je obratiti pozornost na to da i korišteni reagensi mogu apsorbirati svjetlost, stoga se pripremaju slijepe probe čiju vrijednost apsorbancije spektrofotometar automatski oduzima od apsorbancije uzorka. Kao takva, ova metoda je vrlo jednostavna, brza i relativno jeftina u odnosu na druge metode određivanja fenolnih spojeva, primjerice HPLC-om. Nedostatak je taj da Folin-Ciocalteu reagens nije specifičan samo za fenole tj. može reagirati i s nekim drugim spojevima prisutnima u uzorku. Osjetljivost metode je vrlo dobra odnosno može identificirati i male količine fenolnih spojeva, a ono što je također bitno, uzorak pritom ostaje sačuvan.

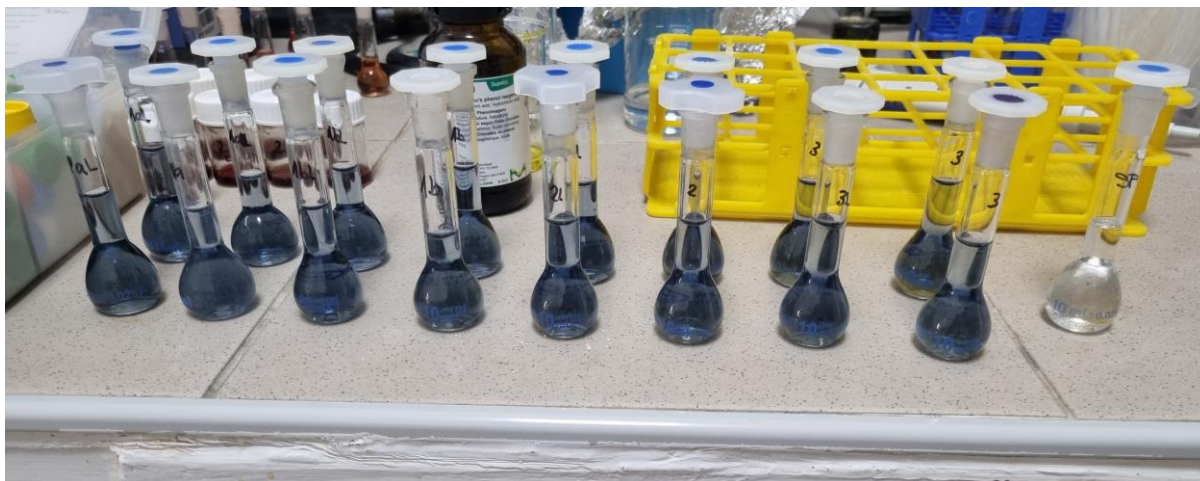
Priprema uzoraka

Najprije su pripremljeni 10 puta razrijeđeni uzorci, tako da je u odmjernu tikvicu od 5 mL otpipetirano 500 μ L uzorka te je zatim tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Pripremljeni razrijeđeni uzorci prikazani su na slici 5.



Slika 5. Prikaz razrijeđenih uzoraka (vlastita fotografija)

Zatim se u odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetira 300 μ L razrijeđenog uzorka, 500 μ L Folin-Ciocalteu reagensa te 6 mL destilirane vode. Sastojci se u odmjernoj tikvici promiješaju i ostave stajati 5 minuta. Nakon toga se dodaje 1,5 mL natrijevog karbonata te se odmjerna tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake (slika 6). Svaki uzorak se priprema u 2 paralele. Slijepe probe se priprema na isti način kao i uzorci, jedina razlika je ta da se umjesto 300 μ L uzorka dodaje 300 μ L destilirane vode.

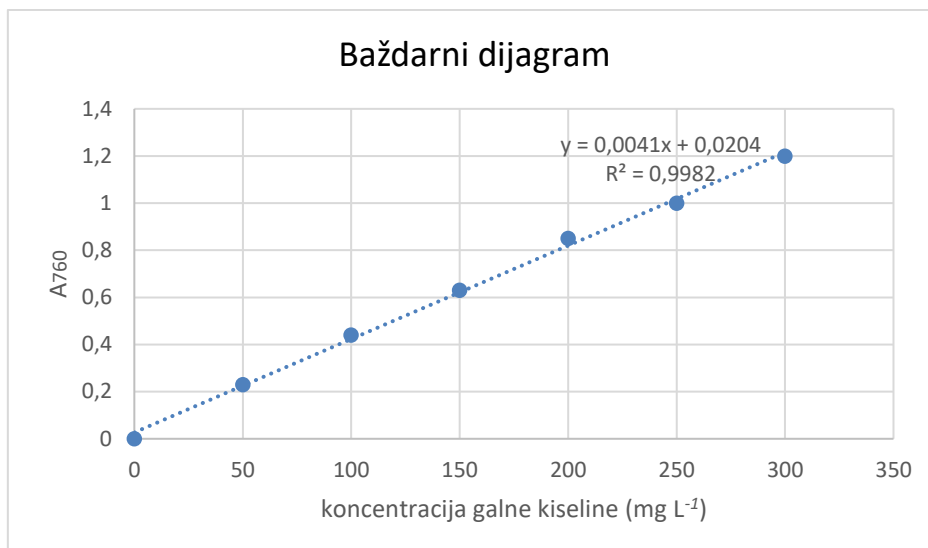


Slika 6. Prikaz uzoraka nakon dodatka Folin-Ciocalteu reagensa (vlastita fotografija)

Kao što je vidljivo na slici 6, svi uzorci su postali plavo obojeni, kako je i očekivano, budući da sadrže fenolne spojeve. Iznimka je slijepa proba (krajnji desni uzorak na slici 6), što je također očekivano, budući da ona ne sadrži fenole. Uzorci se zatim stave na inkubaciju u vodenu kupelj zagrijanu na 50 °C, tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije, izmjerena je apsorbancija uzoraka pri 760 nm, na spektrofotometru Specord 50 plus (Analytik Jena, Njemačka).

Izrada baždarnog pravca

Kao standard za određivanje fenolnih spojeva koristi se galna kiselina (hidroksibenzojeva fenolna kiselina). Pripreme se otopine poznatih koncentracija galne kiseline, dakle standardne otopine od 100, 150, 200, 250 i 300 mg L⁻¹ galne kiseline u odmjernim tikvicama od 50 mL. One se pripreme tako da se najprije u odmjernu tikvicu od 50 mL izvaže 0,5 g galne kiseline te se tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake, a potom se od te ishodne otopine pripreme gore navedene standardne otopine. Npr., da bi se od ishodne otopine koja sadrži 10 g L⁻¹ galne kiseline dobila otopina koja sadrži 100 mg L⁻¹, u odmjernu tikvicu od 50 mL otpipetira se 500 µL ishodne otopine te se zatim nadopuni destiliranom vodom do oznake. Postupak pripreme uzoraka je isti, opisan je već u ovom poglavlju, kao i postupak inkubacije. Slijepa proba se također priprema na isti način. Na temelju izmjerenih apsorbancija na 760 nm konstruira se baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹) o apsorbanciji (slika 7).



Slika 7. Baždarni dijagram za određivanje fenolnih spojeva

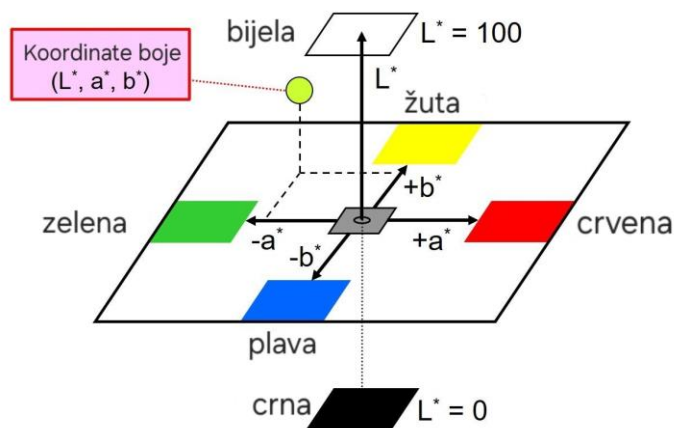
Na temelju jednadžbe baždarnog pravca izračuna se koncentracija ukupnih fenola u uzorku:

$$y = 0,0041x + 0,0204 \quad (R^2=0,9982) \quad (1)$$

U navedenoj jednadžbi y predstavlja vrijednost apsorbancije izmjerene pri 760 nm, x je nepoznata koncentracija fenola koju računamo, izražena u ekvivalentima galne kiseline (mg GAE L⁻¹), a R^2 je koeficijent determinacije. Na kraju se dobiveni rezultat pomnoži s 10 jer se metoda provodila s uzorcima koji su prethodno 10 puta razrijeđeni.

3.2.2. Određivanje kromatskih parametara i ukupne razlike obojenosti

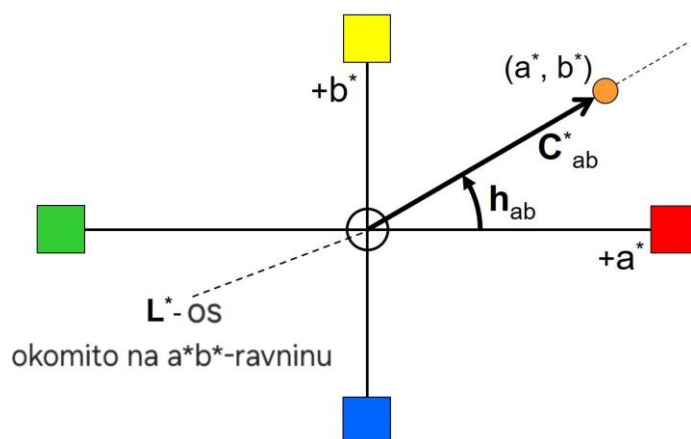
Kromatski parametri likera od aronije određeni su spektrofotometrijski prema CIELab sustavu (slika 8). Korišteni spektrofotometar je Specord 50 Plus (Analytik Jena, Njemačka), sa izvorom svjetlosti D65. Transmitancija uzoraka mjerena je svakih 10 nm u području valnih duljina od 380 do 780 nm. Za slijepu probu korištena je destilirana voda. Kao rezultat mjerenja, pomoću računalnog softvera, dobivene su L , a , b , C i h vrijednosti.



Slika 8. Trodimenzionalni CIELab prostor boja (prema Beetsma, 2024)

Interpretacija rezultata

Vrijednost L (engl. *Lightness*) predstavlja svjetloću boje, pri čemu više L vrijednosti ukazuju na slabiju obojenost tj. svjetlije osvjetljenje, a niže L vrijednosti na tamnije obojenje (OIV, 2014). Vrijednosti za ovaj parametar kreću se od 0 do 100 pri čemu 0 odgovara potpuno crnoj, a 100 bijeloj boji. Vrijednost a predstavlja odnos crvene i zelene komponente, a vrijednost b odnos žute i plave komponente. Negativna a vrijednost označava zelenu, a pozitivna a vrijednost crvenu boju. Negativna b vrijednost označava plavu, a pozitivna b vrijednost žutu boju. Vrijednost h (engl. *Hue angle*) predstavlja ton boje ili tonalnost. Radi se o osjetu koji je izazvan različitim dijelovima spektra uz jednaku svjetloću. Izražava se kao omjer crvene, zelene, žute te plave boje, u stupnjevima (slika 9). Vrijednosti za ovaj parametar se kreću od 0 do 360°. Raspon kuta tona boje počinje, po definiciji, na pozitivnoj strani osi a i ide u smjeru suprotnom od kazaljke na satu. To znači (vidljivo prema slici 9) da crvena boja ima kut nijanse od 0°.



Slika 9. Prikaz tona i zasićenosti boje u ravnini ab (prema Beetsma, 2024)

Vrijednost C (engl. *Chroma*) predstavlja intenzitet boje odnosno zasićenost boje. Niža C vrijednost ukazuje na nižu čistoću boje i takve boje su pastelnije, a one s višom C vrijednosti su jarkije. Na temelju slike 9 može se zaključiti da zasićenost boje u ravnini ab predstavlja udaljenost točke (boje) od ishodišta koje je u okomitoj osi L . Dakle, visokom se zasićenošću odlikuju jarke i čiste boje, bez primjesa. S druge strane, smanjenjem zasićenosti i približavanjem ishodištu raste udio sive boje (slika 8) stoga te boje djeluju pastelnije i blaže.

Ukupna razlika obojenosti (ΔE) matematička je mjera razlike između dviju boja. Koristi se za kvantifikaciju percepcije razlike u boji između dva uzorka. Dakle, u ovom radu predstavlja važan parametar budući da se prati razlika boje likera od aronije nakon 6 mjeseci u odnosu na ishodišni, kontrolni uzorak. Računa se iz svih triju dimenzija neke točke (boje) u odnosu na referentnu točku (boju) prema sljedećoj formuli:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (2)$$

gdje je: ΔL - razlika u vrijednosti parametra L (svjetloća), Δa - razlika u vrijednosti parametra a (udio crvene boje), Δb - razlika u vrijednosti parametra b (udio plave boje).

Vrijednost ΔE predstavlja ustvari najkraću udaljenost koja spaja dvije točke u jednoličnom prostoru boja, ne uzimajući pritom u obzir smjer i vrstu razlika. Ona je dakle isključivo mjera odstupanja ukupne razlike obojenosti, a ta razlika može biti kako u tonalnosti i zasićenosti, tako i u svjetlini. Što je ΔE veći, to je veća razlika u obojenosti između dva uzorka.

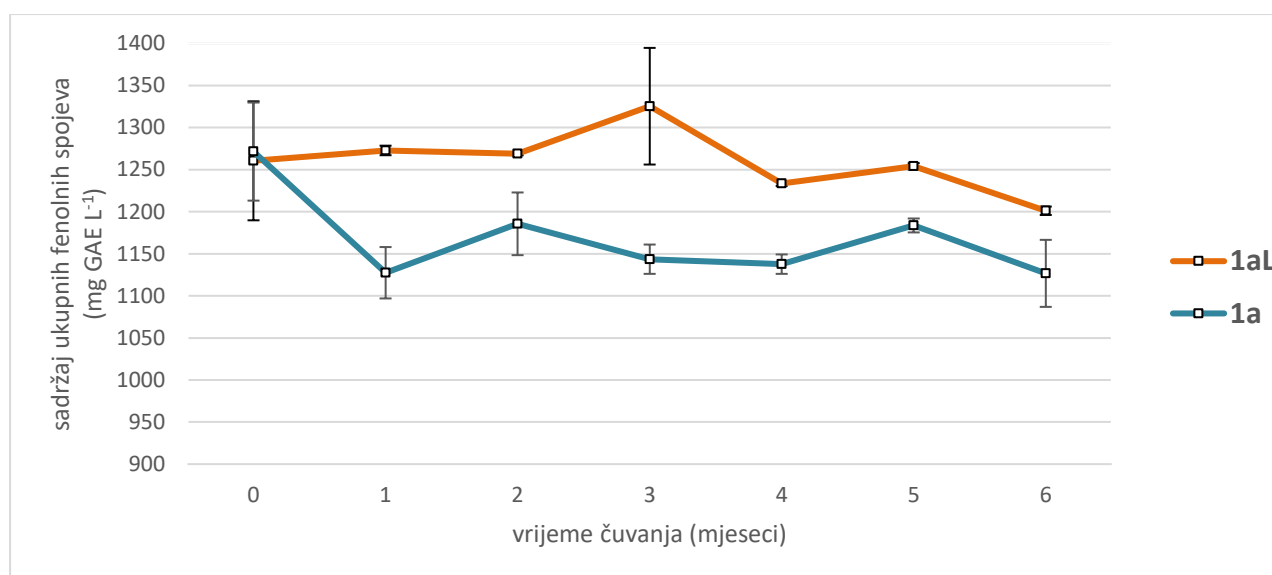
3.2.3. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu podataka korištena je jednofaktorska analiza varijance (ANOVA test) u programu Microsoft Excel. P-vrijednosti manje od 0,05 uzete su kao statistički značajne. Na taj način su određeni uvjeti čuvanja koji imaju statistički značajan utjecaj na sadržaj fenolnih spojeva te kromatske parametre likera od aronije. Određivanje koncentracije ukupnih fenola provedeno je u 2 paralele. Rezultati su prikazani grafički te su im izračunati sljedeći parametri deskriptivne statistike: srednja vrijednost i standardna devijacija.

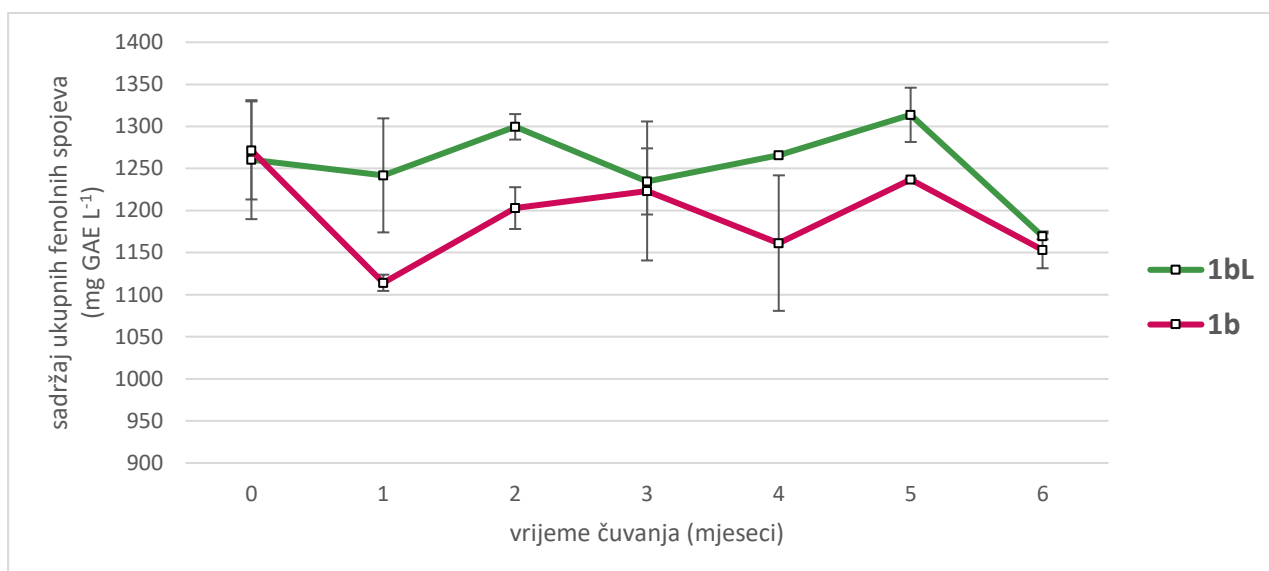
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC)

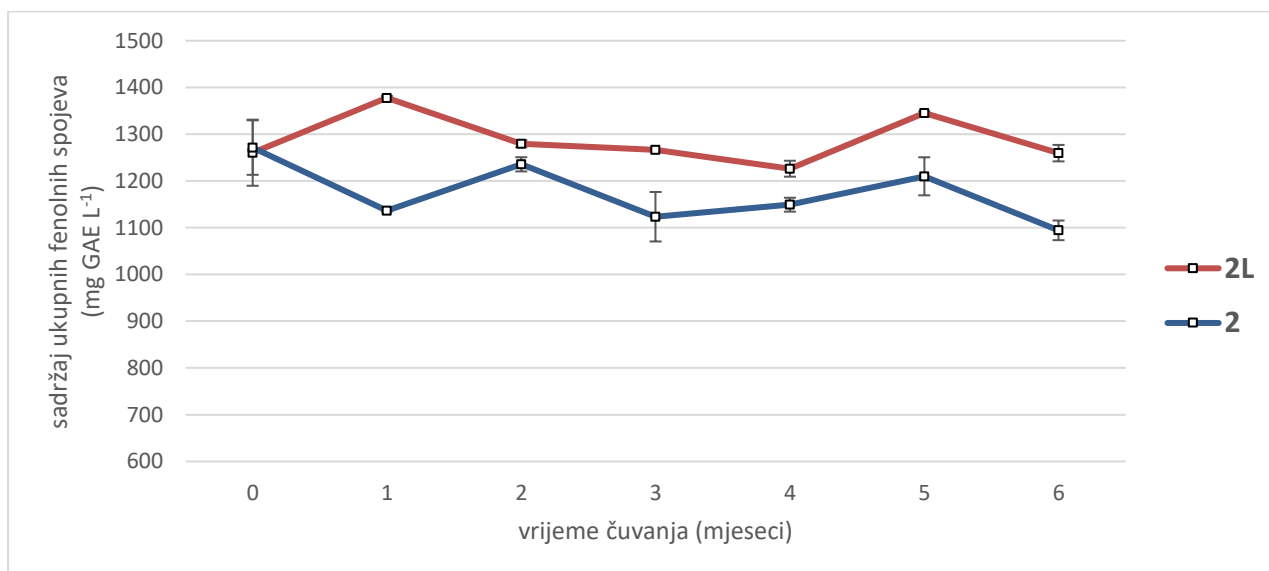
U ovom radu istraženi su optimalni uvjeti čuvanja likera od aronije s ciljem očuvanja sadržaja prisutnih fenolnih spojeva i karakteristične boje. Za istraživanje je pripremljeno 8 uzoraka koji su čuvani tijekom 6 mjeseci pri različitim temperaturama, različitoj izloženosti svjetlu te s i bez dodatka limunske kiseline (0 g L^{-1} te 8 g L^{-1}). Utjecaj navedenih uvjeta čuvanja na promjenu koncentracije ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE L^{-1}) prikazan je x-y dijagramima kao srednja vrijednost dvaju određivanja (slike 10-13).



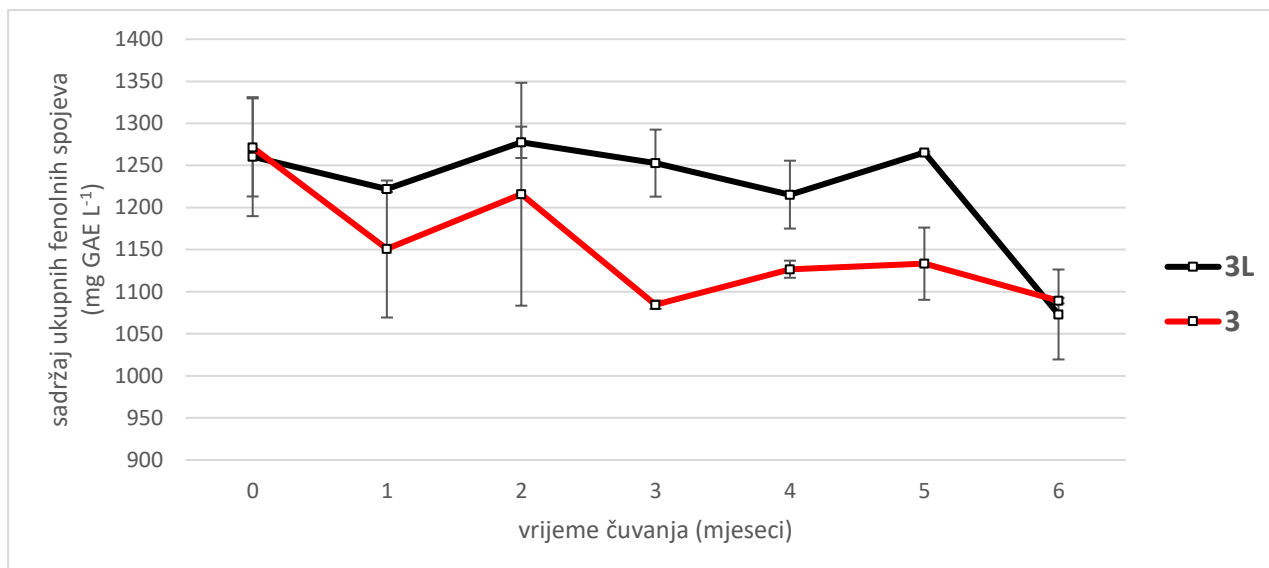
Slika 10. Promjena sadržaja fenolnih spojeva u uzorcima čuvanima na sobnoj temperaturi, direktno izloženima dnevnom svjetlu, u svijetloj bočici (1aL - s dodatkom limunske kiseline, 1a - bez dodatka limunske kiseline)



Slika 11. Promjena sadržaja fenolnih spojeva u uzorcima čuvanima na sobnoj temperaturi, direktno izloženima dnevnom svjetlu, u tamnoj bočici (1bL - s dodatkom limunske kiseline, 1b - bez dodatka limunske kiseline)



Slika 12. Promjena sadržaja fenolnih spojeva u uzorcima čuvanima na sobnoj temperaturi, u tami (2L - s dodatkom limunske kiseline, 2 - bez dodatka limunske kiseline)



Slika 13. Promjena sadržaja fenolnih spojeva u uzorcima čuvanima u hladnjaku (3L - s dodatkom limunske kiseline, 3 - bez dodatka limunske kiseline)

Jedan od parametara, čiji je utjecaj na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva i kromatske parametre tijekom čuvanja ispitan, jest dodatak limunske kiseline. U svih 8 uzoraka, tijekom čuvanja od 5 mjeseci, izmjerena je veća koncentracija fenolnih spojeva u uzorku s dodatkom limunske kiseline u odnosu na uzorak bez dodatka limunske kiseline pri istim uvjetima čuvanja. Posljednji mjesec je također izmjereno isto, uz iznimku za liker od aronije čuvan u hladnjaku kod kojeg je konačna koncentracija ukupnih fenola manja u uzorku s dodatkom limunske kiseline (slika 13). Statistička analiza je pokazala da postoji značajna statistička razlika između uzoraka s i bez dodatka limunske kiseline, pri sva 4 uvjeta čuvanja ($p < 0,05$). Limunska kiselina primjenjuje se kao regulator kiselosti odnosno djeluje tako da snižava pH medija u kojem se nalazi. U vodenom mediju disocira pri čemu se oslobađaju vodikovi ioni koji povećavaju kiselost medija. Istraživanja usmjerena na učinak limunske kiseline odnosno pH na sadržaj ukupnih fenola jakih alkoholnih pića tijekom čuvanja su ograničena. U literaturi je dostupno istraživanje čiji su predmet istraživanja bili polifenoli ekstrahirani iz zelenog čaja te se pokazalo da su stabilniji tijekom čuvanja što je pH niži (Zeng i sur., 2017). S druge strane, Khoo i sur. (2017) navode da stabilnost fenolnih spojeva pri određenim pH vrijednostima ovisi o njihovoj strukturi. U svojem istraživanju bazirali su se na antocijane te navode kako je većina visoko stabilna u kiselim uvjetima, ali da postoje i iznimke (npr. petanin). Osim antocijana, kako je navedeno u ovom radu, u plodovima aronije zastupljene su i fenolne kiseline. One su također stabilnije pri nižem pH budući da su kiseline i mogu reagirati s bazama tj. veća je tendencija da će promijeniti svoju strukturu u lužnatom mediju. Dakle, očekivano je da je

stabilnost polifenola u likeriu od aronije veća pri nižim vrijednostima pH tj. u uzorcima s dodatkom limunske kiseline. To je također utvrđeno ovim istraživanjem, iako se treba ograničiti na vrijeme čuvanja i uzeti u obzir ostale ispitivane parametre koji su usko povezani. Ovim istraživanjem je utvrđeno da je limunska kiselina u koncentraciji od 8 g L⁻¹ pozitivno utjecala na stabilnost fenola tijekom 6 mjeseci pri svim uvjetima čuvanja likera od aronije, osim kod likera čuvanog u hladnjaku kod kojeg se posljednji mjesec koncentracija ukupnih fenola uzoraka, s i bez limunske kiseline, izjednačila. Kao što pokazuju navedena literaturna istraživanja, trebalo bi provesti identifikaciju fenolnih spojeva prisutnih u ispitivanom likeriu aronije kako bi se utvrdilo o kojim se točno fenolima radi, kakva je njihova struktura i posljedično pri kojem pH su najstabilniji. Tada bi se na temelju tih detaljnih informacija moglo zaključiti koji fenolni spojevi se oksidiraju odnosno degradiraju tijekom čuvanja, osobito tijekom čuvanja duljeg od 5 mjeseci na temperaturi od 4 °C. Nadalje, trebalo bi provesti i utvrđivanje koncentracije limunske kiseline koja bi najbolje održala stabilnost fenola. Osim toga, učinak limunske kiseline na stabilnost polifenola može ovisiti i o samom mediju tj. ovim istraživanjem je utvrđeno da limunska kiselina (8 g L⁻¹) ima pozitivan učinak u likeriu od aronije koji je dobiven iz macerata s 40 % v/v alkohola.

Drugi ispitivani parametar jest temperatura. Na temelju dobivenih rezultata prikazanih na slikama 10-13, vidljivo je da su fenoli bili najstabilniji tijekom čuvanja u likerima od aronije koji su se nalazili na sobnoj temperaturi, u tami (slika 12). Što se tiče koncentracije ukupnih fenola nakon 6 mjeseci čuvanja, pri svakom od uvjeta čuvanja došlo je do smanjenja njihove koncentracije. Iznimka je upravo liker od aronije čuvan na sobnoj temperaturi, u tami, s dodatkom limunske kiseline (slika 12, uzorak 2L). Pri tim uvjetima čuvanja izmjerena koncentracija ukupnih fenola nakon 6 mjeseci jednaka je koncentraciji u početnom uzorku. Wang i sur. (2024) ispitali su utjecaj temperature čuvanja na stabilnost komponenti (polifenola i drugih biološki aktivnih sastojaka) likera dobivenog iz biljke orhideje. Njihovi su rezultati pokazali najveću antioksidacijsku aktivnost tijekom čuvanja na temperaturi od 4 °C, ali i degradaciju spojeva arome. Nasuprot tome, prilikom čuvanja na visokoj temperaturi (37 °C) smanjenja je koncentracija spojeva arome i funkcionalnih komponenti te antioksidacijska aktivnost. Zaključili su da je to jako alkoholno piće najbolje čuvati na sobnoj temperaturi (20 °C) pri kojoj je koncentracija spojeva arome i antioksidacijska aktivnost između vrijednosti izmjerenih na 4 °C i 37 °C. Vrlo slično istraživanje proveli su Hwang i Yeom (2019), ispitujući učinak temperature tijekom čuvanja na sadržaj biološki aktivnih spojeva i antioksidacijsko djelovanje ploda crne aronije. Utvrdili su da dugotrajno čuvanje bobica aronije na temperaturi hladnjaka (4 °C) smanjuje antioksidativno djelovanje aronije odnosno da na toj temperaturi dolazi do degradacije spojeva koji imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Rezultati

dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da je najveća nestabilnost ukupnih fenola primijećena upravo u uzorcima čuvanih u hladnjaku, pri temperaturi od 4 °C (slika 13). Tijekom 5 mjeseci čuvanja je koncentracija fenola bila veća u uzorku s limunskom kiselinom (3L), međutim posljednji je mjesec došlo do naglog pada i u konačnici, nakon 6 mjeseci, je koncentracija fenola veća u uzorku bez limunske kiseline (3). U uzorku bez limunske kiseline, nakon 3 mjeseci čuvanja zabilježena je najniža koncentracija fenola među svim uzorcima, dok je posljednjih 3 mjeseci koncentracija rasla. Potrebno je provesti dodatna istraživanja, primjerice određivanje antioksidacijske aktivnosti te pojedinih fenolnih spojeva odnosno spojeva arome u čuvanim uzorcima kako bi se mogli izvesti precizniji zaključci koji spojevi se degradiraju pri temperaturi od 4 °C.

Treći ispitivani parametar jest izloženost svjetlu. Kao što je već navedeno, sadržaj fenolnih spojeva najbolje se očuvao, tijekom 6 mjeseci, u uzorku likera s dodatkom limunske kiseline, na sobnoj temperaturi, u tami (uzorak 2L). Tijekom ovog istraživanja također je ispitano kako boja bočice, tamna i svijetla, utječu na koncentraciju fenola tijekom čuvanja. Prema slikama 10 i 11 vidljiva je varijacija koncentracija ukupnih fenola tijekom čuvanja u oba uzorka, a navedeno je potvrđeno i statističkom analizom. Naime, ANOVA testom je utvrđeno da u oba slučaja, s i bez dodatka limunske kiseline, tamna (jantarna) odnosno svijetla (prozirna) bočica nisu imale statistički značajan utjecaj na koncentraciju fenola u liker od aronije (tablica 2). De Souza i sur. (2018) ispitali su učinak boje boce (zelene, jantarne i prozirne) na udio fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost crvenog te pjenušavog vina čuvanih tijekom 12 mjeseci. Navode kako su vina bila stabilna u odnosu na antioksidacijsku aktivnost neovisno o boji boce, a da se koncentracija nekih fenolnih spojeva promijenila, ali je ta promjena bila slična u bocama svih boja. S druge strane, Selli i sur. (2002) proučavali su utjecaj boje boce (prozirne, zelene i tamno smeđe) na posmeđivanje narančastog vina te se pokazalo da je ukupna promjena obojenosti, nakon 150 dana, manja u smeđim bocama. Shodno navedenim literaturnim navodima, kako bi se unaprijedilo ovo istraživanje, može se provesti čuvanje likera u tamnim bocama različitih nijansi te bi se tada mogli izvesti precizniji zaključci o utjecaju dnevnog svjetla na sadržaj fenolnih spojeva likera.

Tablica 2. Podaci dobiveni analizom varijance, uz varijabilni faktor izgled bočice (svijetla/tamna bočica).

UZORCI	ANOVA
1aL/1bL	F = 0,035559 p = 0,85358
1a/1b	F = 0,882611 p = 0,366014

4.2. Kromatski parametri

Kromatski parametri (L , a , b , C , h) određeni su spektrofotometrijski na spektrofotometru Specord 50 plus (Analytik Jena, Njemačka), primjenom CIELab sustava, svakih mjesec dana tijekom 6 mjeseci čuvanja likera od aronije. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablicama 3-10.

Tablica 3. Kromatski parametri (L , a , b , C , h) uzorka 1aL

Vrijeme čuvanja (mjeseci)	L	a	b	C	h
0	17,6514	48,3721	30,3633	57,112	0,5605
1	16,7114	46,8455	28,7516	54,9651	0,5505
2	18,7746	49,3163	32,288	58,9459	0,5797
3	15,8847	44,9159	27,3154	52,5696	0,5464
4	13,7997	38,1116	21,5256	43,7704	0,5141
5	16,93	44,8909	29,1131	53,5049	0,5753
6	12,7403	38,5221	21,9172	44,3206	0,5173

Tablica 4. Kromatski parametri (L , a , b , C , h) uzorka 1a

Vrijeme čuvanja (mjeseci)	L	a	b	C	h
0	16,1293	45,295	27,6373	53,0608	0,5479
1	16,4006	43,091	28,1972	51,4968	0,5794
2	17,0465	43,3777	29,317	52,3556	0,5943
3	17,3486	43,0801	29,8319	52,4007	0,6057
4	17,4502	42,7703	30,0084	52,2475	0,6118
5	17,7874	42,6067	30,5903	52,4509	0,6227
6	19,1292	43,8157	32,8925	54,788	0,644

Tablica 5. Kromatski parametri (L , a , b , C , h) uzorka 1bL

Vrijeme čuvanja (mjeseci)	L	a	b	C	h
0	17,6514	48,3721	30,3633	57,112	0,5605
1	16,814	46,9428	28,9268	55,1397	0,5523
2	19,0115	49,5742	32,7024	59,389	0,5831
3	14,8584	43,6814	25,5571	50,6086	0,5294
4	15,2219	43,6141	26,1743	50,8653	0,5405
5	16,3298	44,4951	28,0761	52,6126	0,5629
6	23,3249	52,2496	40,0845	65,8543	0,6544

Tablica 6. Kromatski parametri (L , a , b , C , h) uzorka 1b

Vrijeme čuvanja (mjeseci)	L	a	b	C	h
0	16,1293	45,295	27,6373	53,0608	0,5479
1	16,3099	42,8602	28,0426	51,219	0,5794
2	17,53	44,1006	30,1389	53,4155	0,5995
3	16,3676	42,0855	28,1299	50,621	0,5892
4	16,7853	42,3582	28,8607	51,2558	0,5981
5	16,6712	41,806	28,6891	50,7031	0,6014
6	18,9378	44,203	32,5451	54,8916	0,6347

Tablica 7. Kromatski parametri (L , a , b , C , h) uzorka 2L

Vrijeme čuvanja (mjeseci)	L	a	b	C	h
0	17,6514	48,3721	30,3633	57,112	0,5605
1	16,6941	46,8092	28,7103	54,9125	0,5502
2	17,8964	48,2274	30,783	57,2143	0,5681
3	17,0318	46,5519	29,3184	55,0149	0,562
4	16,2418	45,2034	27,9201	53,1308	0,5533
5	15,3861	43,6387	26,466	51,0371	0,5452
6	17,7061	45,8944	30,4509	55,0777	0,5858

Tablica 8. Kromatski parametri (L , a , b , C , h) uzorka 2

Vrijeme čuvanja (mjeseci)	L	a	b	C	h
0	16,1293	45,295	27,6373	53,0608	0,5479
1	16,4365	43,0508	28,265	51,5003	0,581
2	17,9658	44,547	30,9058	54,2181	0,6065
3	17,5495	43,4561	30,1786	52,9073	0,607
4	25,0857	19,2258	4,8024	19,8166	0,2448
5	17,3894	42,7387	29,9197	52,1707	0,6108
6	18,1291	43,2979	31,1804	53,3566	0,6241

Tablica 9. Kromatski parametri (L , a , b , C , h) uzorka 3L

Vrijeme čuvanja (mjeseci)	L	a	b	C	h
0	17,6514	48,3721	30,3633	57,112	0,5605
1	10,3678	38,1752	17,8468	42,1408	0,4373
2	20,5635	51,6324	35,3612	62,5805	0,6005
3	7,9896	34,7052	13,7085	37,3145	0,3762
4	7,3779	33,7197	12,6776	36,0241	0,3596
5	4,6624	26,4634	7,9983	27,6457	0,2935
6	24,1252	55,261	41,4211	69,0615	0,6432

Tablica 10. Kromatski parametri (L , a , b , C , h) uzorka 3

Vrijeme čuvanja (mjeseci)	L	a	b	C	h
0	16,1293	45,295	27,6373	53,0608	0,5479
1	12,0027	38,1495	20,6461	43,378	0,4961
2	12,1496	38,1206	20,8864	43,4674	0,5012
3	11,1154	36,7177	19,0903	41,3839	0,4795
4	9,0346	31,1109	14,1688	34,1854	0,4274
5	9,4735	34,696	16,2855	38,3279	0,4389
6	13,0019	38,9357	22,3485	44,8937	0,5211

Radi lakšeg uočavanja promjene kromatskih parametara u ovim uzorcima, izračunata je ukupna razlika obojenosti uzoraka nakon 6 mjeseci čuvanja u odnosu na početni uzorak (0. mjesec u tablicama 3-10). Rezultati su prikazani u tablicama 11 i 12.

Za vrijednosti ΔE vrijedi sljedeće: $\Delta E < 0,2$ razlika boja se ne vidi ; $\Delta E = (0,2 - 1)$ razlika boja se primjećuje ; $\Delta E = (1 - 3)$ razlika boja se vidi ; $\Delta E = (3 - 6)$ razlika boja se dobro vidi ; $\Delta E > 6$ očigledna odstupanja boja (Schläpfer, 1993).

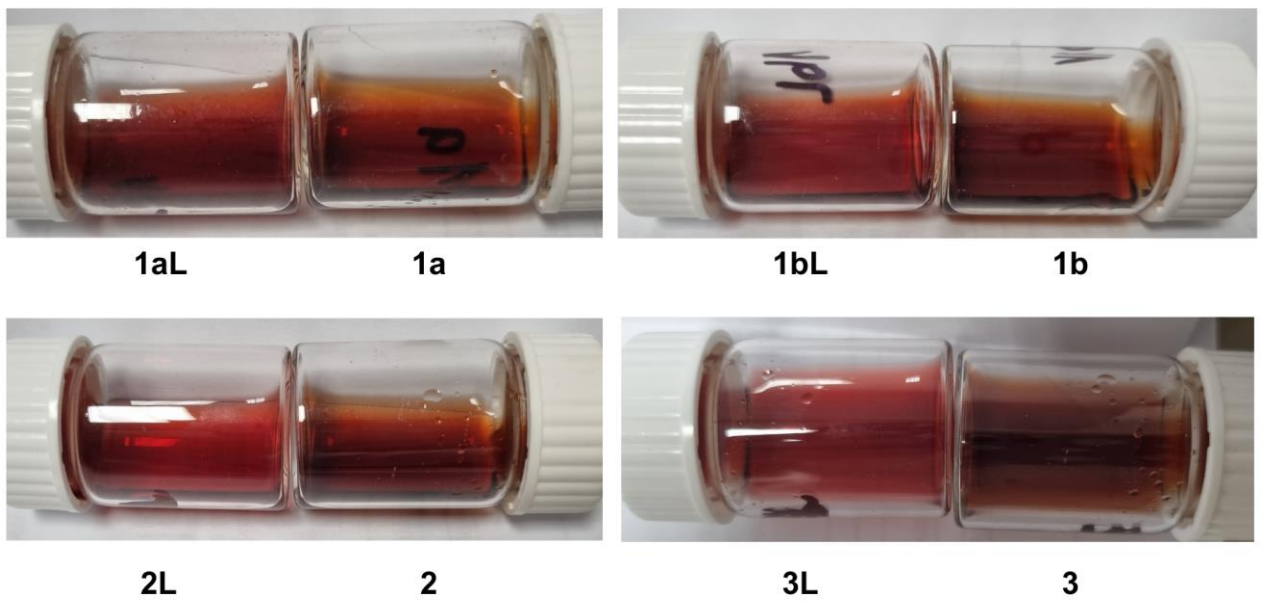
Tablica 11. Ukupna razlika obojenosti (ΔE) likera od aronije s dodatkom limunske kiseline, pri različitim uvjetima čuvanja, nakon 6 mjeseci

Uzorak	ΔE
1aL	13,87
1bL	11,90
2L	2,48
3L	14,55

Tablica 12. Ukupna razlika obojenosti (ΔE) likera od aronije **bez dodatka limunske kiseline**, pri različitim uvjetima čuvanja, nakon 6 mjeseci

Uzorak	ΔE
1a	6,23
1b	5,76
2	4,53
3	8,84

Na temelju izračunatih vrijednosti ΔE najmanja promjena obojenosti likera od aronije, tijekom 6 mjeseci čuvanja, očituje se u likerima (s i bez dodatka limunske kiseline) čuvanima na sobnoj temperaturi u tami (uzorci 2L i 2). U istraživanju Sant'Anna i sur. (2013) određeni su parametri boje prema CIELab sustavu i koncentracija biološki aktivnih spojeva u različitim namirnicama (crveno vino, sok od naranče, ekstrakt borovnice i grožđa itd.) te je pritom statistički analizirana njihova korelacija. Navodi se da je povećanje ukupne razlike obojenosti uzrokovano degradacijom pigmenata poput karotenoida i antocijana te da praćenje boje može poslužiti za neizravno određivanje količine tih pigmenata. Antocijani su polifenolni spojevi prisutni u likerima od aronije te su najzaslužniji za boju plodova aronije (Veberic i sur., 2015). Predstavljaju dominantne fenolne spojevi, po količini i po utjecaju na antioksidacijsku aktivnost (Jakobek, 2007). Njihova molekulska struktura ima ionsku prirodu te je stoga pH parametar koji utječe na njihovu stabilnost. Kod niskog pH antocijani su u formi flavilium kationa koji je crveno obojen (Enaru i sur., 2021). Njihova razgradnja dovodi do neenzimskog posmeđivanja te promjene boje samog likera. Na slici 14 prikazana je dobivena boja likera od aronije nakon 6 mjeseci čuvanja pri različitim uvjetima. Jasno je vidljivo tamnije obojenje odnosno posmeđenje uzoraka likera koji ne sadrže limunsku kiselinu (1a, 1b, 2, 3) u usporedbi s uzorcima koji sadrže limunsku kiselinu (1aL, 1bL, 2L, 3L). U konačnici, intenzitet obojenosti likera od aronije ovisi o koncentraciji antocijana na temelju čega se može zaključiti da likeri bez dodatka limunske kiseline sadrže manju koncentraciju antocijana odnosno fenolnih spojeva. Posljedično se može zaključiti da limunska kiselina sprečava njihovu degradaciju odnosno ima pozitivan učinak na stabilnost fenola u likerima i očuvanje kvalitete samog likera.



Slika 14. Prikaz boje uzoraka likera od aronije nakon 6 mjeseci čuvanja pri različitim uvjetima (vlastita fotografija)

5. ZAKLJUČCI

1. Optimalni uvjeti čuvanja likera od aronije, pri kojima se postiže očuvanje sadržaja fenolnih spojeva ekstrahiranih iz bobica aronije tijekom 6 mjeseci, su: sobna temperatura (20 °C), potpuna tama, dodatak limunske kiseline.

2. U likeru čuvanom na sobnoj temperaturi, u tami, uz dodatak limunske kiseline u koncentraciji 8 g L⁻¹, tijekom čuvanja od 6 mjeseci, nije se promijenila koncentracija ukupnih fenolnih spojeva.

3. Dodatak limunske kiseline, temperatura te izloženost svjetlu su parametri koji utječu na stabilnost fenolnih spojeva tijekom čuvanja.

4. Parametar boja boce (svijetla i jantarna) nema značajan utjecaj na stabilnost fenola tijekom čuvanja.

5. Kromatski parametri uzoraka odnosno izračunate ukupne razlike obojenosti potvrdili su optimalne uvjete čuvanja koji su prethodno predstavljeni kao optimalni na temelju određivanja ukupnih fenolnih spojeva.

6. Dobiveni rezultati i izvedeni zaključci potvrđuju hipotezu istraživanja da su fenolni spojevi, koji se tijekom maceracije ekstrahiraju u vodeno-alkoholnu bazu, različito stabilni pri različitim uvjetima čuvanja. Primjenom, u ovom radu utvrđenih, optimalnih uvjeta čuvanja moguće je zadržati početno prisutnu koncentraciju fenolnih spojeva odnosno očuvati kvalitetu likera od aronije najmanje 6 mjeseci.

6. POPIS LITERATURE

1. Ali Shehat W, Sohail Akh Md, Alam T (2020) Extraction and Estimation of Anthocyanin Content and Antioxidant Activity of Some Common Fruits. *Trends Appl Sci Res* **15**, 179–186. <https://doi.org/10.3923/tasr.2020.179.186>
2. Beetsma J (2024) The CIELAB System – the Method to Specify Colors of Coatings – UL Prospector. <https://www.ulprospector.com/knowledge/16423/pc-the-cielab-system-the-method-to-specify-colors-of-coatings/>. Pristupljeno 18. svibnja 2024.
3. Boročov-Neori H, Judeinstein S, Tripler E, Harari M, Greenberg A, Shomer I, i sur. (2009) Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Journal of Food Composition and Analysis* **22**, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.011>
4. Ćujić N, Šavikin K, Janković T, Pljevljakušić D, Zdunić G, Ibrić S (2016) Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem* **194**, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>
5. De Souza JF, Nascimento AM de S, Linhares MDSS, Dutra M da CP, Lima MDS, Pereira GE (2018) Evolution of Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Activity of Syrah Red and Sparkling Moscatel Wines Stored in Bottles of Different Colors. *Beverages* 2018, Vol 4, Page 89 **4**, 89. <https://doi.org/10.3390/BEVERAGES4040089>
6. Dini I, Grumetto L (2022) Recent Advances in Natural Polyphenol Research. *Molecules* 2022, Vol 27, Page 8777 **27**, 8777. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27248777>
7. Enaru B, Dreţcanu G, Pop TD, Stănilă A, Diaconeasa Z (2021) Anthocyanins: Factors Affecting Their Stability and Degradation. *Antioxidants* 2021, Vol 10, Page 1967 **10**, 1967. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10121967>
8. Gao N, Shu C, Wang Y, Tian J, Lang Y, Jin C, i sur. (2024) Polyphenol components in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) as clinically proven diseases control factors - An overview. *Food Science and Human Wellness* **13**, 1152–1167. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250096>
9. Grba S, Stehlik-Tomas V, Stanzer D, Mrvčić J, Marić V, Orlić S i sur. (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, Plejada, Zagreb, str. 229-264.
10. Hanousek Čiča K, Mrvčić J, Srećec S, Filipan K, Blažić M, Stanzer D (2020) Physicochemical and aromatic characterization of carob macerates produced by different maceration conditions. *Food Sci Nutr* **8**, 942–954. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1374>
11. Hwang ES, Yeom MS (2019) Effects of storage temperature on the bioactive compound content and antioxidant activity of aronia (*Aronia melanocarpa*) fruit. *Food Science and Preservation* **26**, 455–465. <https://doi.org/10.11002/KJFP.2019.26.5.455>

12. Jakobek L (2007) Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća (doktorski rad), Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Osijeku, Osijek.
13. Jeppsson N, Johansson R (2000) Changes in fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) during maturation. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **75**, 340–345. <https://doi.org/10.1080/14620316.2000.11511247>
14. Khan J, Deb PK, Priya S, Medina KD, Devi R, Walode SG, i sur. (2021) Dietary Flavonoids: Cardioprotective Potential with Antioxidant Effects and Their Pharmacokinetic, Toxicological and Therapeutic Concerns. *Molecules* 2021, Vol 26, Page 4021 **26**, 4021. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26134021>
15. Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM (2017) Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res* **61**. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
16. Kulling SE, Rawel HM (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med* 74:1625–1634.
17. Li Y, Xu C, Goel A (2024) Abstract 523: Aronia berry and oligomeric proanthocyanidins synergistically exhibit anticancer effects in colorectal cancer by inhibiting LMNB1. *Cancer Res* **84**, 523–523. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2024-523>
18. Mihaljević Žulj M (2022) Proizvodnja likera – Gospodarski list. <https://gospodarski.hr/rubrike/vocarstvo-rubrike/proizvodnja-likera/>. Pristupljeno 26. svibnja 2024.
19. Mrvčić J (2020) Likeri, travarice i miješana JAP – Merlin. <https://moodle.srce.hr/2022-2023/mod/resource/view.php?id=3112248>. Pristupljeno 18. svibnja 2024.
20. Mrvčić J, Posavec S, Kazazić S, Stanzer D, Peša A, Stehlik-Tomas V (2012) Spirit drinks: a source of dietary polyphenols. *Croat J Food Sci Technol* **4**, 102–111
21. Mujkić AJ, Žnidarič MT, Berbić S, Žerovnik E (2021) Synergy of the Inhibitory Action of Polyphenols Plus Vitamin C on Amyloid Fibril Formation: Case Study of Human Stefin B. *Antioxidants* 2021, Vol 10, Page 1471 **10**, 1471. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10091471>
22. Nemetz N J (2024) Ultrasound-assisted enzymatic maceration and valorization of by-products A contribution to sustainable production of berry juices (doktorski rad), Faculty of Agriculture, University of Bonn, Bonn.
23. OIV – Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivincultural Origin (2014) Determination of chromatic characteristics (OIV-MA-BS-27). International Organisation of Vine and Wine, Paris.

24. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységou L (2011) Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition* 50:586–621.
25. Ren Y, Frank T, Meyer G, Lei J, Grebenc JR, Slaughter R, i sur. (2022) Potential Benefits of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Fruits and Their Constituents in Improving Human Health. *Molecules* 27
26. Rudrapal M, Khairnar SJ, Khan J, Dukhyil A Bin, Ansari MA, Alomary MN, i sur. (2022) Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Front Pharmacol* 13, 806470. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.806470/BIBTEX>
27. Rudrapal M, Rakshit G, Singh RP, Garse S, Khan J, Chakraborty S (2024) Dietary Polyphenols: Review on Chemistry/Sources, Bioavailability/Metabolism, Antioxidant Effects, and Their Role in Disease Management. *Antioxidants* 2024, Vol 13, Page 429 13, 429. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX13040429>
28. Sant'Anna V, Gurak PD, Ferreira Marczak LD, Tessaro IC (2013) Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review. *Dyes and Pigments* 98:601–608.
29. Schlöpfer K (1993) Metamere Farbabweichungen im Mehrfarbendruck. *Die Farbe* 38, 17-30.
30. Selli S, Canbas A, Ünal Ü Effect of bottle colour and storage conditions on browning of orange wine
31. Shahidi F, Varatharajan V, Oh WY, Peng H (2019) Phenolic compounds in agri-food by-products, their bioavailability and health effects. *Journal of Food Bioactives* 5. <https://doi.org/10.31665/JFB.2019.5178>
32. Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B (2019) Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules* 2019, Vol 24, Page 2452 24, 2452. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24132452>
33. Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
34. Skupień K, Oszmiański J (2007) The effect of mineral fertilization on nutritive value and biological activity of chokeberry fruit. *Agricultural and Food Science* 16, 46–55. <https://doi.org/10.2137/145960607781635822>
35. Stipanović B (2017) Analiza opravdanosti ulaganja u plantaže aronije na području Dalmacije. U: Zbornik radova Međimurskog veleučilišta u Čakovcu, Čakovec, str. 85-88.

36. Tazeddinova D, Rahman MR, Hamdan S Bin, Matin MM, Bakri MK Bin, Rahman MM (2022) Plant Based Polyphenol Associations with Protein: A Prospective Review. *Bio-resources* **17**, 1–25. <https://doi.org/10.15376/BIORES.17.4.TAZEDDINOVA2>
37. Uredba (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća. Službeni list Europske unije, L 130, 1-54.
38. Veberic R, Slatnar A, Bizjak J, Stampar F, Mikulic-Petkovsek M (2015) Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT* **60**, 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.033>
39. Wang J, Liu Z, Jiang X, Zhang R, Cai F, Yu Q, i sur. (2024) Effect of storage temperature on the long term stability of *Dendrobium catenatum* Lindl. blended liquor. *Journal of Food Measurement and Characterization* **18**, 2618–2630. <https://doi.org/10.1007/S11694-023-02341-5/METRICS>
40. Zagorskina N V., Zubova MY, Nechaeva TL, Kazantseva V V., Goncharuk EA, Katan-skaya VM, i sur. (2023) Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 13874 **24**, 13874. <https://doi.org/10.3390/IJMS241813874>
41. Zeng L, Ma M, Li C, Luo L (2017) Stability of tea polyphenols solution with different pH at different temperatures. *Int J Food Prop* **20**, 1–18. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.983605>

Izjava o izvornosti

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

Haus Valentina
Vlastoručni potpis