

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Anamarija Gudelj

926/PI

**UTJECAJ ULTRAZVUKA
VISOKOG INTENZITETA NA
BIOAKTIVNE SPOJEVE POSIJA
PROSA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Nikoline Čukelj Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

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

Najljepše se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Nikolini Čukelj na uloženom trudu i vremenu, iznimnoj susretljivosti, podršci te nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.

Neizmjerno hvala mom najdražem Florijanu na tehničkoj i moralnoj podršci, znanstvenim savjetima i strpljenju.

Posebno hvala mojim roditeljima, bratu Marku te ostalim članovima obitelji i prijateljima na podršci, razumijevanju i svemu što čine za mene

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA NA BIOAKTIVNE SPOJEVE POSIJA PROSA

Anamarija Gudelj, 926/PI

Sažetak: *Posije su nusproizvod procesa mljevenja žitarica i važan izvor vlakana, mikronutrijenata i fitokemikalija te im se pripisuju brojni povoljni učinci na zdravlje. U ovom radu ispitan je utjecaj tretmana ultrazvuka visokog intenziteta (UVI) (400 W, 24 kHz) na učinkovitost oslobađanja bioaktivnih spojeva posija prosa i na njihov antioksidacijski kapacitet. Vodena suspenzija posija tretirana je 5, 12,5 ili 20 minuta direktno uronjenom ultrazvučnom sondom ($d = 22$ mm) pri 60 %, 80 % ili 100 % amplitude, prema složenom centalnom planu pokusa. Ukupni slobodni polifenolni spojevi određeni su Folin-Ciocalteu, a antioksidacijska aktivnost ABTS, DPPH i FRAP metodama. U odnosu na kontrolni uzorak najviši udio ukupnih slobodnih polifenola i najveća antioksidacijska aktivnost određena je u posijama tretiranim 12,5 minuta pri 80 % amplitude, pri čemu je zabilježen porast od 25 % za ukupne fenole i 27 % za FRAP antioksidacijsku aktivnost. Optimizacija procesa pokazala je da UVI ovisi o vremenu tretmana, ali ne i o amplitudi.*

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, polifenoli, posije, proso, ultrazvuk visokog intenziteta

Rad sadrži: 48 stranice, 16 slika, 5 tablica, 100 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Nikolina Čukelj, doc.dr.sc.

Pomoć pri izradi: Lidija Drobac, univ. bacc. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni
2. doc. dr. sc. Nikolina Čukelj
3. izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak
4. doc. prof. dr. sc. Klara Kraljić (zamjena)

Datum obrane: 19. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF HIGH INTENSITY ULTRASOUND TREATMENT ON THE BIOACTIVE COMPOUNDS OF THE MILLET BRAN

Anamarija Gudelj 926/PI

Abstract: *Bran is a by-product of milling industry and an important source of dietary fibre, micronutrients, phytochemicals with numerous beneficial health effects. This study explored the effect of high intensity ultrasound (HIU) (400 W, 24 kHz) on the release of free bioactive compounds and antioxidant activity of the millet bran. Water suspension of bran was treated for 5, 12,5 and 20 minutes by direct immersion of the ultrasound probe (d = 22 mm) and amplitude of 60 %, 80 % and 100 %, following a central composite design. The total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu and antioxidant activity using ABTS, DPPH and FRAP methods. In comparison to the control sample, the highest total phenolics and antioxidant capacity of millet bran was achieved after the 12,5 minute and amplitude of 80 %, resulting in 25 % increase of total free phenolic content and 27 % increase of FRAP antioxidant activity. Optimization of the process showed that UVI depends on the treatment time, but not on the amplitude.*

Keywords: antioxidant capacity, bran, millet, polyphenols, high intensity ultrasound

Thesis contains: 48 pages, 16 figures, 5 tables, 100 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Nikolina Čukelj, Assistant Professor

Technical support and assistance: Lidija Drobac, univ. bacc. ing.

Reviewers:

1. PhD. Dubravka Novotni, Associate Professor
2. PhD. Nikolina Čukelj, Assistant professor
3. PhD. Anet Režek Jambrak, Associate Professor
4. PhD. Klara Kraljić, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: July 19, 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Proso	3
2.1.1. Kemijski sastav prosa	4
2.1.2. Posije prosa.....	5
2.2. Ultrazvuk	7
2.2.1. Princip rada ultrazvuka	7
2.2.2. Podjela i primjena ultrazvuka	9
2.2.3. Učinci ultrazvuka.....	9
2.3. Polifenolni spojevi	10
2.3.1. Podjela	10
2.3.2. Antioksidacijski učinak	12
2.3.3. Fenolni spojevi prosa.....	12
3. EKPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Uzorci	14
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Tretman posija prosa ultrazvukom visokog intenziteta	14
3.2.2. Ekstrakcija	16
3.2.3. Priprema uzorka za ekstrakciju.....	16
3.2.4. Ekstrakcija slobodnih spojeva	16
3.2.5. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola	16
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta	19
3.2.6.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	19
3.2.6.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	21
3.2.6.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	23
3.2.7. Statistička analiza	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Bioaktivni profil posija prosa i oljuštenog zrna.....	27
4.2. Promjene temperature tijekom UVI tretmana posija prosa	28
4.3. Utjecaj UVI na slobodne polifenolne spojeve i antioksidacijsku aktivnost posija prosa	31
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA	39

1. UVOD

U današnje vrijeme način hranjenja se sve više mijenja. U prošlosti je bilo najvažnije zadovoljenje gladi, održavanje zdravlja i odsutnost štetnih učinaka na zdravlje, a trenutni naglasak je na hrani koja obećava poboljšanje zdravstvenog stanja i pomaže u smanjenju rizika od oboljenja (Rao i sur., 2011). Navedenom opisu odgovara pojam funkcionalne hrana koja se definira kao hrana koja sadrži (u odgovarajućim koncentracijama) jednu ili više tvari koje imaju pozitivan fiziološki učinak, odnosno hrana kojoj su dodane (bio)aktivne tvari (Roberfroid, 2000).

Proso je žitarica koja se uzgaja širom svijeta i poznato je više od 14 vrsta prosa od kojih su u Europi najznačajnije: obično proso (*Panicum miliaceum* L.), biserno proso (*Pennisetum glaucum* L.), prstasto proso (*Eleusine coracana* L.), indijsko proso (*Paspalum setaceum* L.), talijansko proso (*Setaria italica* L.), sitno proso (*Panicum sumatrense* L.) i japansko proso (*Echinochloa utilis* L.) (Rachie, 1975; Bouis, 2000; Wen i sur., 2014). Ono se uglavnom koristi kao ptičja i stočna hrana, iako ima visoku hranjivu vrijednost (Yang i sur., 2012). Također, proso je jedinstvena žitarica zbog visokog udjela kalcija, željeza, kalija, magnezija, cinka, fosfora, prehrambenih vlakana, polifenola i proteina (Hulse i sur., 1980; Devi i sur., 2014; Gupta i sur., 2014), otporno je na štetnike i bolesti, kratke je sezone rasta i vrlo je produktivno u uvjetima suše u usporedbi s glavnim žitaricama (Devi i sur., 2014).

Prije mljevenja ili proizvodnje kaše, prosu se uklanja ljuska kako bi mu se poboljšala senzorska svojstva, ali time se smanjuje udio vlakana, minerala, ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost prosa (Saleh i sur., 2013). Nadalje, proces mljevenja dodatno osiromašuje proso i kao nusprodukt nastaje značajna količina posija. Posije su važan izvor vlakana, vitamina, minerala i fitokemikalija, a njihov sastav se razlikuje ovisno o veličini i obliku zrna, vrsti žitarica, debljini perikarpa, postupku mljevenja, metodama obrade žitarica prije mljevenja te o trajanju i uvjetima skladištenja (Prückler i sur., 2014; Ushakumari i sur., 2004; Zitterman, 2003). Nusprodukti proizvodnje hrane i njihove obrade sve više se koriste kao potencijalni izvor bioaktivnih spojeva.

Razdvajanje bioaktivnih spojeva iz nusprodukata zahtijeva učinkovite i ekološki prihvatljive tehnike (Tao i sur., 2014). Najširu primjenu u prehrambenoj industriji ima ultrazvuk visokog intenziteta koji se koristi za homogenizaciju, emulgiranje, ekstrakciju, pasterizaciju,

kristalizaciju, ubrzavanje reakcija, sterilizaciju itd. (Bosiljkov i sur., 2011). Obrada ultrazvukom povećava udjel slobodnih bioaktivnih spojeva u posijama jer se oštećuje stanična stijenka što dovodi do njihovog oslobađanja (Esmaeilzadeh Kenari i sur., 2014; Coda i sur., 2015).

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija ima niz primjena u izolaciji polifenola iz različitih biljnih matrica (Esclapez i sur., 2011; Chemat i Khan, 2011; Tao i sur., 2014), ali u znanstvenoj literaturi nema podataka o tretmanu posija prosa primjenom ultrazvuka visokog intenziteta s ciljem povećanja ekstraktibilnosti i potencijalne bioraspoloživosti fenolnih spojeva. Stoga je u ovom radu suspenzija posija prosa u vodi bila tretirana ultrazvukom visokog intenziteta, a nakon toga je u posijama ispitan sadržaj ukupnih polifenolnih spojeva (TPC) Folin-Ciocalteu metodom te antioksidacijska aktivnosti ABTS, DPPH i FRAP metoda. U istraživanju je kao disperzno sredstvo korištena voda (za razliku od uobičajenih organskih otapala), jer je cilj bio dobiti dezintegrirane posije s oslobođenim bioaktivnim spojevima koje se kasnije mogu koristiti u pekarskoj industriji, a ne čiste ekstrakte.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Proso

Proso je jednogodišnja biljka koja pripada porodici trava (*Poaceae*), a uzgaja se zbog svojih sjemenki koje su bogate škrobom. U cijelom svijetu postoji oko 20 različitih rodova i najmanje 14 vrsta prosa koje se koriste za prehranu, ishranu te proizvodnju krmiva i goriva. (Rachie, 1975). Na temelju svjetske proizvodnje najčešće vrste su: obično proso (*Panicum miliaceum* L.), biserno proso (*Pennisetum glaucum* L.), prstasto proso (*Eleusine coracana* L.), talijansko proso (*Setaria italica* L.) (FAO, 2011), a također se uzgajaju i indijsko proso (*Paspalum setaceum* L.), sitno proso (*Panicum sumatrense* L.) i japansko proso (*Echinochloa utilis* L.) (Bouis, 2000; Wen i sur., 2014) (Slika 1). Prema FAO-listi iz 2016. godine., proso je šesta žitarica u svijetu po proizvodnji (28 milijuna tona) (FAO, 2017). Povijest uzgoja prosa pretpostavlja se da počinje prije 10 000 godina u istočnoj Aziji (Lu i sur., 2009).



Slika 1. Vrste prosa (Anonymous, 2018)

U Aziji i Africi (a posebice u Indiji i Nigeriji) proso je važna kultura, dok u zemljama u razvoju čini čak 97 % proizvodnje (McDonough i sur., 2000). U Europi i na Mediteranu veće značenje imaju vrste: obično proso (*Panicum miliaceum* L.), talijansko proso (*Setaria italica* L.) i njemačko proso (*Panicum germanicum* L.) (Martin i sur., 2006). Važnost prosa je u tome što može rasti na suhim tlima, otporno je na bolesti i štetnike te ima kratku vegetaciju (Devi i sur., 2014). U prehrani ljudi se upotrebljava kao kaša pripravljena od oljuštenog zrna, dok neoljušteno zrno služi za ptičju

i stočnu hranu, a cijela biljka se koristi kao sijeno (Anonymous, 2017). Prednost prosa očituje se i u poboljšanju sljedećih zdravstvenih stanja: prevenciji raka i kardiovaskularnih bolesti, smanjenje pojave tumora, snižavanje krvnog tlaka, rizika od srčanih oboljenja, kolesterola i brzine apsorpcije masti, odgađanju pražnjenja želuca i dr. (Truswell, 2002; Gupta i sur., 2012). Obrada prosa u hranu i pića sa dodanom vrijednošću ima veliki potencijal za zemlje u razvoju. Još jedna prednost prosa je u tome što ne sadrži gluten pa ga mogu koristiti ljudi oboljeli od celijakije (Chandrsekara i Shahidi 2010). U usporedbi s rižom, konzumacijom prosa dolazi do sporijeg oslobađanja glukoze tijekom određenog vremenskog razdoblja, tj. proso ima nizak glikemijski indeks (GI) te njegov uobičajeni unos smanjuje rizik od dijabetesa tipa 2 (Passi, 2014).

2.1.1. Kemijski sastav prosa

Proso sadrži 60 – 70 % ugljikohidrata, 7 – 11 % proteina, 1,5 – 5 % masti i 2 – 7 % vlakana, bogato je vitaminima i mineralima (Tablica 1.). Izvrstan je izvor vitamina B, Mg i antioksidansa te drugih prehrambenih minerala poput Mn, P i Fe (Singh i sur., 2012).

Tablica 1. Kemijski sastav različitih vrsta prosa (na 100 g) u usporedbi s pšenicom i rižom (Saha i sur., 2016; Ravindran, 1991 (u zagradi))

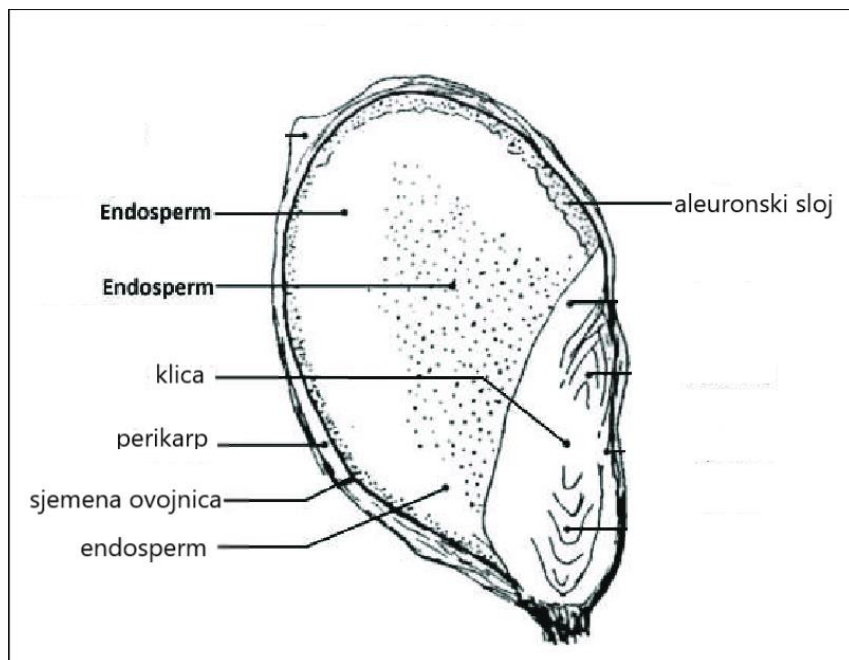
Vrsta žitarice	Proteini (g)	UH (g)	Masti (g)	Prehramb. vlakna (g)	Minerali (g)	Ca (mg)	P (mg)	Fe (mg)
Obično proso	12,50	70,40	3,10	14,20 (2,20)	1,90	14,00	206	10,00
Prstasto proso	7,30	72,00	1,30	18,80 (3,60)	2,70	344,00	283	3,90
Indijsko proso	8,30	65,00	1,40	15,00 (9,00)	2,60	27,00	188	12,00
Talijansko proso	12,30	60,90	4,30	14,00 (8,00)	3,30	31,00	290	5,00 (2,80)
Sitno proso	7,70	67,00	4,70	12,20 (7,60)	1,50	17,00	220	6,00
Japansko proso	6,20 (11,20)	65,50	2,20	13,70 (10,10)	4,40	11,00	280	15,00 (15,20)
Biserno proso	10,60	-	-	1,30	2,30	38,00	-	16,90
Pšenica	11,80	71,20	1,50	12,90 (1,20)	1,50	41,00	306	3,50 (5,30)
Riža	6,80	-	-	0,20	0,60	10,00	-	-

Prosječan sadržaj proteina običnog, prstastog i talijanskog prosa iznosi 14,4 %, 9,8 % i 15,9 %. Sadržaj prehrambenih vlakana prosa kreće se u rasponu od 3,2 do 4,7 %. Općenito, sadržaj mineralnih tvari je visok u usporedbi s onima ostalih žitarica. Značajna je visoka razina kalcija (0,24 %), dok visoki sadržaj fitinske kiseline (0,50 - 0,70 %) predstavlja razlog za zabrinutost zbog interferencije s nekim mineralima. Sadržaj oksalata (21 - 29 mg / 100 g suhe mase) prosa je nizak (Ravidran, 1991). Proteini prosa dobar su izvor esencijalnih aminokiselina osim lizina i treonina, ali imaju relativno visoki udio metionina. Također bogati su fitokemikalijama i mikronutrijentima (Mal i sur., 2010; Singh i sur., 2012). Količina bjelančevina prosa (11,6 % suhe tvari) slična je kao kod pšenice, ali proso je bogatije esencijalnim aminokiselinama (leucin, izoleucin i metionin) (Kalinová i Moudrý, 2006). Neke esencijalne masne kiseline kao što su linoleinska, oleinska i palmitinska kiselina pronađene su u slobodnom obliku, a monogalaktoza, diacilglicerol, digalaktozildiacilglicerol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin i fosfatidilkolin u vezanom obliku (Bagdi i sur., 2011). Druge masne kiseline, tj. arahidinska kiselina, beheninska kiselina i eruka kiselina nalaze se u tragovima. Ulje od prosa može biti dobar izvor linoleinske kiseline i tokoferola (Amadou i sur., 2011).

2.1.2. Posije prosa

Žitarice imaju tri glavna anatomska dijela: vanjski omotač (perikarp), tkivo za skladištenje (endosperm) i vegetativno tkivo (klica) (Slika 2). Fenolni spojevi se raspoređuju nejednoliko u ta tri anatomska dijela. Bilo koji oblik obrade koji mijenja strukturu i dovodi do uklanjanja dijela zrna žitarica mijenja njihov fenolni sadržaj (Duodu, 2014). Konvencionalnom preradom žitarica (mljevenjem i ljuštenjem) nastaje značajna količina nusprodukata, odnosno posija (mekinja). Iako su posije koje zaostaju nakon proizvodnje mlinskih proizvoda važan izvor prehrambenih vlakana, visokovrijednih proteina, esencijalnih masnih kiselina, mineralnih tvari i vitamina te bioaktivnih spojeva poput lignana, polifenola i fitosterola, još uvijek primarno koriste kao stočna hrana, a samo mali dio u prehrambene svrhe (Prückler i sur., 2014). Dokazano je da posije narušavaju tehnološku i senzorsku kvalitetu pekarskih i brašneno-konditorskih proizvoda, a dodatan razlog njihove niske učestalosti u prehrani je i opasnost od teških metala, pesticida i mikroorganizma koji na njima zaostaju (Hemdane i sur., 2015; Hemery, 2007).

Sastav posija čine: perikarp, sjemena ovojnica (testa), aleuronski sloj koji je smješten u endospermu i klica (Lebesi i Tzia, 2012). Ljuska i posije zajedno čine 26 % prosa (Ushakumari i sur., 2004), za razliku od pšenice gdje posije čine 15 % zrna i riže kod koje je to samo 8 % (Zitterman, 2003).



Slika 2. Dijelovi zrna prosa (prema Dayakar Rao i sur., 2017)

Kemijski sastav posija prosa čine ugljikohidrati 56 %, proteini 11,5 %, pepeo 10,5 % i masti 8 %, prehrambena vlakana (lignin, celuloza i hemiceluloza), minerali te vitamini (B i E) (Chinma i sur., 2015; Elleuch i sur., 2011; Patel, 2012). Sastav posija razlikuje se ovisno o veličini i obliku zrna, vrsti žitarica, debljini perikarpa, postupku mljevenja, metodama obrade žitarica prije mljevenja, vrsti brašna koje se želi proizvesti te o trajanju i uvjetima skladištenja (Zitterman, 2003). Posije su važan izvor fenolnih spojeva male molekulske mase, među kojima je ferulinska kiselina najzastupljenija i jedna od najzanimljivijih, jer pokazuje brojne potencijalne biološke aktivnosti: antioksidacijske, antimikrobne i antiupalne (Graf, 1992). Praktična primjena posija je kao dodatak u brašno za kruh u procesu predfermentacije s ciljem poboljšanja kvalitete pečenog proizvoda. Razvoj inovativnih procesa je nužan kako bi se poboljšala vrijednost i upotreba ove hranjive namirnice, poboljšavajući biodostupnost nutritivno vrijednih spojeva i smanjujući negativne tehnološke utjecaje. Složenu strukturu posija čine višestruki slojevi u kojima arabinoksilani i beta-glukani čine najveći udio kao polisaharidi stanične stijenke. Količina i veličina perikarpa,

aleuronskog sloja i debljine stanične stijenke te količina beta-glukana variraju ovisno o vrsti žitarica (Kamal Eldin i sur., 2009). Niska biodostupnost bioaktivnih spojeva kao što su prehrambena vlakna i fenolne kiseline očituje se u njihovoj zarobljenosti unutar čvrstih struktura staničnih stijenki koje su otporne na konvencionalno mljevenje (Delcour i sur., 2015). Prema Dykes i Rooney (2007) količina fenolnih kiselina razlikuje se ovisno o vrsti žitarica, ali njihova koncentracija u posijama je tri puta viša nego u drugim dijelovima zrna.

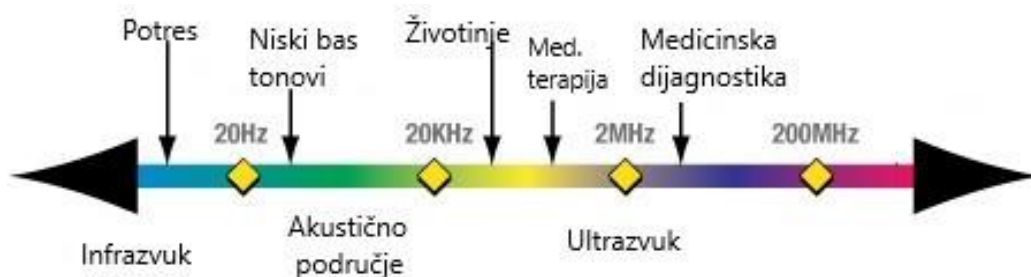
2.2. Ultrazvuk

Tradicionalne metode kao što su frakcijska destilacija, vrenje i ekstrakcija po Soxhletu, zahtijevaju puno vremena te imaju nisku učinkovitost zbog oksidacije, hidrolize i ionizacije. Primjenom novih tehnologija ti nedostaci se mogu smanjiti/istisnuti (Tao i sur., 2014).

Prema Mason i sur. (2011) ultrazvuk ima nekoliko svojstava koja mogu povećati učinkovitost ekstrakcije otapalima kao što su: veća difuzija, bolji prijenos mase i prodor otapala te kapilarni učinci ultrazvuka.

2.2.1. Princip rada ultrazvuka

Zvučni val je longitudinalni val koji nastaje mehaničkim titranjem čestica u određenom mediju (plin, voda, krutina). Ovisno o frekvenciji, zvučni valovi se dijele u nekoliko područja (Slika 3). Ultrazvuk je oblik energije proizveden pomoću zvučnih valova, frekvencija iznad 16 kHz (ljudsko uho ih ne može čuti) (Cravotto i Cintas, 2012).

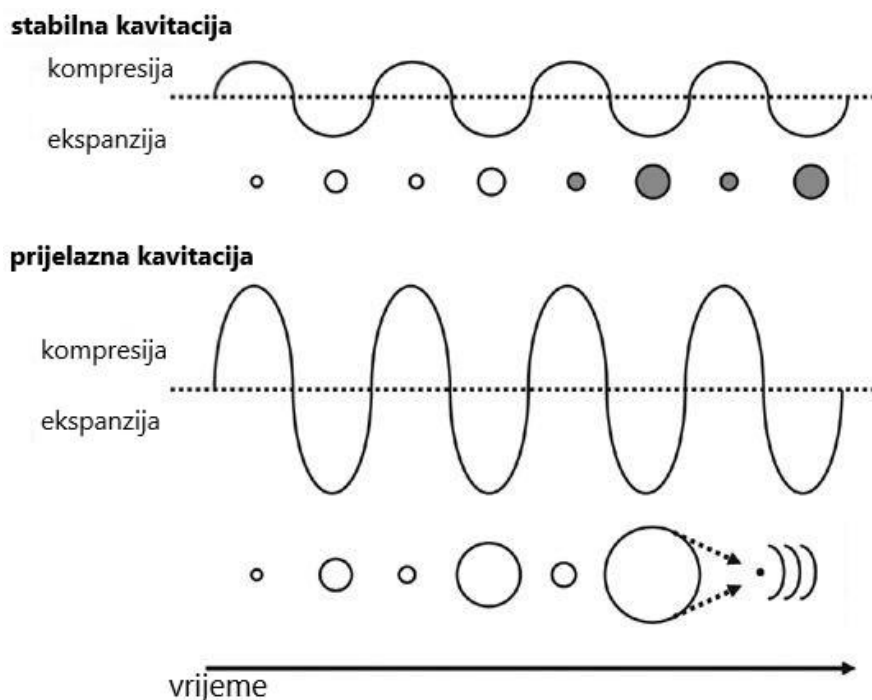


Slika 3. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Sapkota, 2016)

U kontaktu s namirnicom ultrazvučni valovi stvaraju silu koja uzrokuje (ovisno o smjeru djelovanja) kompresiju ili smicanje valova koji putuju kroz namirnicu. Dolazi do promjena u tlaku i temperaturi materijala, odnosno do kavitacije (Lelas, 2006). Kavitacija je fenomen formiranja milijuna mikroskopskih mjehurića koji se proširuju pod utjecajem negativnog tlaka te potom zbog

utjecaja pozitivnog tlaka naglo implodiraju (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Pojava kavitacije te raspad nastalih mjehurića ovisi o: frekvenciji i intenzitetu ultrazvuka, karakteristikama otapala, tlaku, otopljenim plinovima i temperaturi (Horst, 2007). Postoje dva osnovna oblika kavitacije: stabilna i prijelazna (Wu i sur., 2013) (Slika 4). Djelovanjem ultrazvuka niskog intenziteta (visokih frekvencija, niske amplitude pri tlakovima od 1-100 kPa) nastaje stabilna kavitacija; veličina mjehurića lagao oscilira tijekom tisuća vrtloga (Hughes i Nyborg, 1962; Mason i Lorimer, 2002). Snažne oscilacije veličine mjehurića nastaju primjenom ultrazvuka visokog intenziteta na tekući medij (McClements, 1995; Brnčić, 2006; Brnčić i sur., 2009a).

Zbog velikog broja ciklusa kompresije i ekspanzije mjehurići postižu kritičnu veličinu te u narednom ciklusu kompresije dolazi do implodije mjehurića. Molekule oko mjehurića se snažno sudaraju jedna s drugom stvarajući ekstremno visoke temperaturne točke (do 5500 °C) i visoke tlakove (104 – 105 kPa). Taj fenomen poznat je kao prijelazna kavitacija (Suslick, 1988).



Slika 4. Stabilna i prijelazna kavitacija (Newman i Bettinger, 2007)

2.2.2. Podjela i primjena ultrazvuka

Ultrazvučni valovi dijele se ovisno o količini energije koju generira zvučno polje karakterizirano snagom zvuka (W), intenzitetom zvuka ($W\ m^{-2}$) ili gustoćom energije zvuka ($W\ s\ m^{-3}$) (Kentish i Ashokkumar, 2011). Ultrazvuk koji se koristi u prehrambenoj industriji (u procesima obrade hrane, analizi te kontroli kvalitete hrane), ovisno o primjenjenoj frekvenciji, dijeli se na ultrazvuk niskog i ultrazvuk visokog intenziteta (Awad i sur., 2012). Dijagnostički, odnosno ultrazvuk niskog intenziteta ($0,1 - 10\ W\ cm^{-2}$) karakterizira visoka frekvencija ($1 - 10\ MHz$) i mala razina snage (Kentish i Ashokkumar, 2011), uslijed čega ne dolazi do oštećenja materijala i zbog toga se dijagnostički ultrazvuk koristi kao analitička metoda (Lorimer i sur., 1995), za određivanje sastava, strukture, ili viskoznosti hrane te za površinsko čišćenje hrane, utjecaj na enzime, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, emulgiranje, filtraciju, kristalizaciju, procese sušenja i smrzavanja te za omekšavanje mesa. Ultrazvuk visokog intenziteta (UVI) ($10\ do\ 1000\ W\ cm^{-2}$) karakterizira niska frekvencija ($20\ do\ 100\ kHz$) (Herceg i sur., 2009), koja uzrokuje fizičke, mehaničke, kemijske i biokemijske promjene te se primjenjuje u procesima proizvodnje, konzerviranja i sigurnosti hrane (Awad i sur., 2012). UVI se sve više koristi, a najčešće kao dopuna klasičnim tehnikama pri obradi hrane zbog unaprijeđenja proizvodnog procesa u smislu dobivanja proizvoda boljih senzorskih svojstava i veće nutritivne vrijednosti, a istovremeno dolazi do uštede energije i skraćivanja trajanja samog procesa proizvodnje (Brnčić i sur., 2009b). Neki od procesa u kojima se upotrebljava ultrazvuk visokog intenziteta su procesi soljenja (salamurenja), maceracije, inaktivacije mikroorganizama i enzima, smrzavanja, ekstrakcije, rezanja hrane, priprema emulzija, procesi fermentacije i dr. (Esclapez i sur., 2011).

2.2.3. Učinci ultrazvuka

Ovisno o frekvenciji i amplitudi primijenjenog zvučnog vala nastaju fizički, kemijski i biokemijski učinci zbog kojih ultrazvuk ima široku primjenu (Demirdoven i Baysal, 2009). Pri nižim frekvencijama (u rasponu $20-100\ kHz$) prevladavaju fizički učinci koji se mogu objasniti povećanjem turbulencije u mediju koja je rezultat prijelazne kavitacije, tj. raspada kavitacijskih mjehurića (Kentish i Ashokkumar, 2011). Mehanički i fizikalni učinci ultrazvuka koriste se u poboljšavanju čišćenja površina (Crawford, 1963) te u ekstrakciji otapalima značajno ju ubrzavajući i povećavajući njezinu efikasnost i iskorištenje (Brnčić i sur., 2009b).. Primjenom srednjih frekvencija (između $200-500\ kHz$) kemijski učinci su dominantniji zbog povećanja broja

aktivnih mjehurića. Raspadom mjehurića dolazi do povećanja temperature i stvaranja reaktivnih radikala koji se koriste u kemijskim reakcijama sinteze polimera, nanomaterijala i degradacije organskih zagađivača (Ashokkumar, 2011). Na mjestu raspada kavitacijskih mjehurića dolazi do nastanka visoke temperature i tlaka koji mogu uzrokovati kemijske promjene ili u plinskoj fazi unutar kavitacijskog mjehurića ili u mediju u njegovoj blizini (Kentish i Ashokkumar, 2011). Učinak ultrazvuka u homogenim i heterogenim medijima nije jednak. U heterogenim medijima dolazi do mehaničkih učinaka, a u homogenim medijima dolazi do nastanka novih kemijskih spojeva tijekom kavitacije (Wu i sur., 2013).

2.3. Polifenolni spojevi

Bioaktivne tvari imaju različite definicije u znanstvenoj literaturi, ali općenito to su nenutritivni sastojci koji se najvećim dijelom nalaze u biljkama (voće, povrće, žitarice) i imaju korisnu ulogu u očuvanju ljudskog zdravlja i prevenciji bolesti (Anson i sur., 2012; Amiot i Coxam, 2012). Žitarice su bogate fenolnim spojevima, karotenoidima, fitosterolima, fitatima, beta-glukanom, betainom i kolinom (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2007).

Polifenolni spojevi su jedni od najvažnijih vrlo razgranatih skupina fitokemikalija koje se nalaze u svim biljkama (Miller i sur., 2000). To su aromatski sekundarni metaboliti koji sadrže aromatski prsten na kojem se nalazi jedna ili više hidroksilnih skupina (-OH) (Bravo, 1998). Polifenoli koji se nalaze u hrani pokazuju korisna biokemijska svojstva kao što su uklanjanje slobodnih radikala, keliranje metala i inhibicija lipidne peroksidacije. Jestivi spojevi s anti-mikrobiološkom aktivnošću mogu imati nutraceutsku vrijednost i služiti kao farmakonutrijenti niske cijene, kao i komponente lijekova (Middleton i Kandaswami, 1994). Osim toga polifenoli imaju ulogu u usporavanju propadanja zuba, ublažavanju alergije i sprječavanju gihta (Sakanaka i sur., 1989).

2.3.1. Podjela

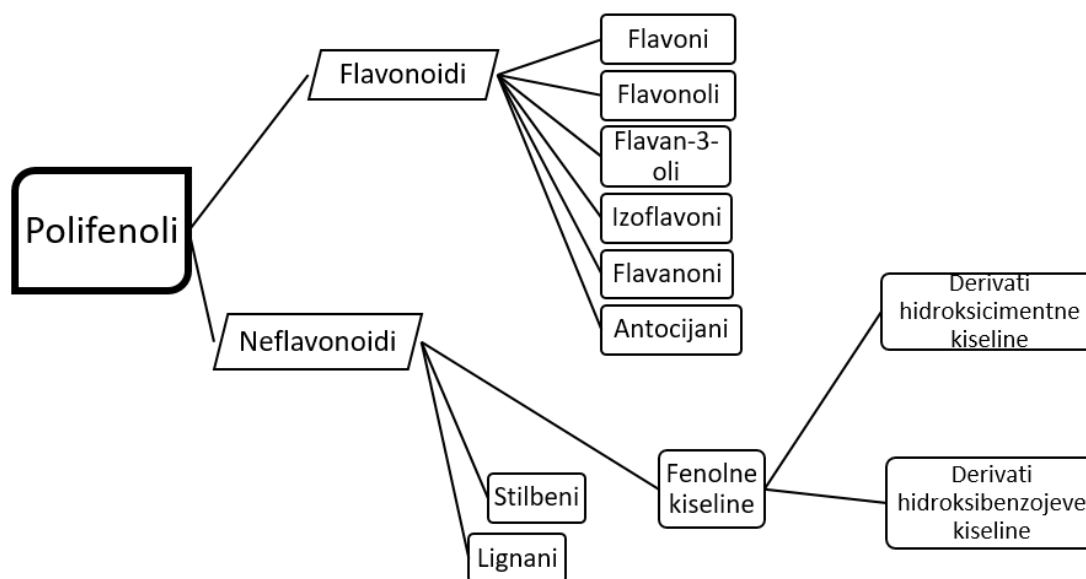
Fenolni spojevi obuhvaćaju oko 8000 spojeva, a fenolna struktura, tj. aromatski prsten koji posjeduje najmanje jedan hidroksilni supstituent, im je svima zajednička osobina.

Polifenoli su složeniji fenolni spojevi koji posjeduju najmanje dvije fenolne podjedinice, dok oni jednostavni imaju samo jednu. Postoje različiti načini kategorizacije tih spojeva kao na primjer klasifikacija prema podrijetlu, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi. Prema osnovnoj kemijskoj

strukturi, polifenoli se mogu podijeliti na flavonoide i neflavonoide (Katalinić i sur., 2010) (Slika 5).

Flavonoidi su spojevi male molekulske mase koji obuhvaćaju petnaest ugljikovih atoma raspoređenih unutar dva aromatska prstena međusobno povezana piranskim prstenom (Balasundram i sur., 2005). Glavne podskupine unutar skupine flavonoida su flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, izoflavoni, flavanoni i antocijani. Ostale skupine flavonoida koji se u hrani nalaze u vrlo malim količinama su halkoni, dihidrohalkoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini i auronni (Pandey i Rizvi, 2009; Manach i sur., 2004).

Neflavonoidi su spojevi jednostavnije građe od flavonoida i u ovu skupinu polifenolnih spojeva ubrajamo: fenolne kiseline, stilbene i lignane (Tsao, 2010). Fenolne kiseline su po strukturi jednostavni fenolni spojevi, a dijele se na derivate benzojeve i derivate cimetine kiseline. Hidroksicimetine kiseline su spojevi strukture C6-C3 i najčešće dolaze u različitim konjugiranim oblicima te kao esteri (Balasundram i sur., 2006), a hidroksibenzojeve kiseline imaju zahedničku C6 - C1 strukturu te su prisutne u slobodnom i vezanom obliku (Pandey i Rizvi, 2009; Manach i sur., 2004). Navedene razlike u strukturi između hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina posljedica su stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Robbins, 2003).



Slika 5. Podjela polifenola na temelju njihovih kemijskih struktura (Tsao, 2010)

2.3.2. Antioksidacijski učinak

Antioksidacijski učinak spoja očituje se u sposobnosti stabilizacije slobodnih radikala i sprječavanju lančanih reakcija radikala s drugim molekulama u reaktivnom mediju. Radikali se stabiliziraju delokalizacijom nesparenog elektrona te stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza jer tada radikal više nema dovoljno energije za oksidacijske reakcije. Fenolni spojevi (posebice flavonoidi) su zbog svoje kemijske strukture vrlo učinkoviti antioksidansi jer imaju sposobnost „hvatanja“ elektrona slobodnih radikala, keliranja metala, aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004). Polifenolni spojevi imaju višestruko pozitivno djelovanje: antioksidacijsko, antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno (Berna i sur., 2001).

Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva ovisi o:

- položaju i broju –OH skupina u odnosu na –COOH funkcionalnu skupinu
- stupnju hidroksilacije spoja
- supstituciji hidroksilnih grupa na 3- i 5- položaju s metoksilnim skupinama (Balasundram i sur., 2005).

2.3.3. Fenolni spojevi prosa

Proso uglavnom sadrži i slobodne i konjugirane fenolne kiseline te flavonoide kao što su: antocijanidi, flavonoli, flavoni, flavanoni, kalkoni i amino fenolni spojevi. Fenolne kiseline i flavonoidi se nalaze u različitim dijelovima zrna, a i njihov sastav te količina ovise o vrsti prosa (Chandrasekara i Shahidi, 2011a; Shirley, 1998). Najvažnije fenolne kiseline u prosu su: ferulinska, *p*-kumarinska i cimetna (McDonough i Rooney, 2000; McDonough i sur., 1986).

Nema mnogo podataka o količinama fenolnih kiselina prosa u literaturi. U tablici 2. prikazani su najvažnijih fenolnih kiselina različitih vrsta prosa.

Tablica 2. Fenolne kiseline ($\mu\text{g g}^{-1}$ odmašćenog obroka) različitih vrsta prosa (Chandrasekara i Shahidi, 2011c)

Fenolne kiseline	Indijsko p.	Prstasto p.	Talijansko p.	Obično p.	Sitno p.	Biserno p.
Galna	1,8	5	4,5	6,2	2,1	5,4
Protokatehinska	70,5	119,8	11,8	72	48,8	1,6
<i>p</i>-hidroksibenzojeva	31,2	6,3	21,8	126	32,6	47,9
Vanilinska	98,1	-	118,7	168,6	162,4	16
Siringinska	141,4	25,1	17,4	6,2	23,4	6,3
Klorogenska	3,6	-	-	19	-	-
Genistinska	-	-	16,8	8,3	-	-
Kavska	324,4	15,9	38,3	339,2	30,9	30,4
Cimetna	37,4	-	-	-	-	-
<i>p</i>-kumarinska	802	41,9	942,7	1235,2	1085,2	91,9
Sinapinska	53,2	0,8	16,2	18,9	55,4	12,8
<i>trans</i>-ferulinska	2209,5	358,4	856,5	4444,6	355,3	812,3

Tijekom procesa mljevenja postoji mogućnost da fenolni spojevi koncentrirani u posijama degradiraju (Tian i sur., 2004).

3. EKPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

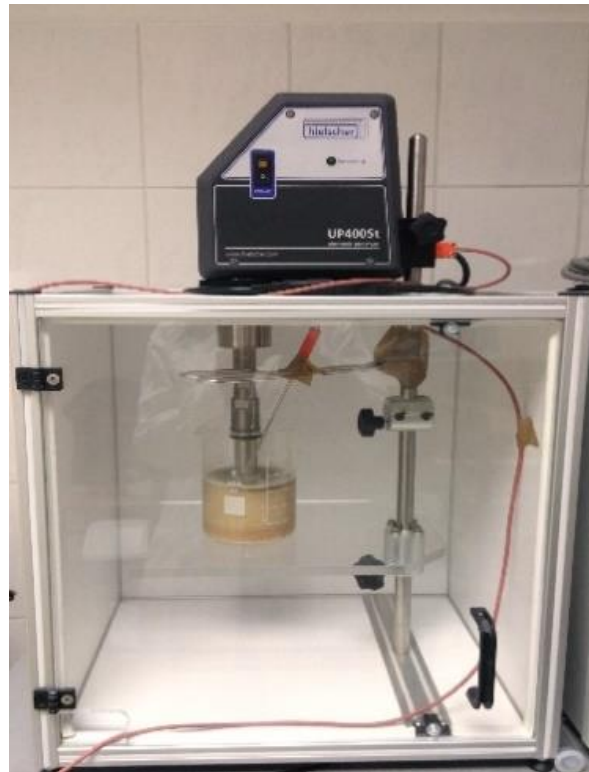
3.1.1. Uzorci

Za provedbu ovog istraživanja korištena je frakcija posija običnog prosa sorte Sonček (*Panicum miliaceum*) uzgojenog 2017. god. i uzetog iz industrijske prerade tvrtke Mlinopek (Murska Sobota, Slovenija), a koja je sadržavala čestice manje od 500 μm .

3.2. Metode

3.2.1. Tretman posija prosa ultrazvukom visokog intenziteta

Uzorci su tretirani na uređaju Hielscher GmbH, Ultraschallprozessor UP 400s (Slika 6), ukupne snage procesora 400 W i frekvencije 24 kHz, te sondom od titanija promjera 22 mm (H22D).



Slika 6. Ultrazvučni procesor, sonda i izolacijska kutija korišteni za tretman posija prosa

Tretmani posija provedeni su prema složenom centralnom planu pokusa (eng. Central Composite Design = CCD) korištenjem programa Design Expert 10 (StatEase, SAD). Centralni

plan pokusa uključivao je dvije nezavisne varijable; amplitudu (%) i vrijeme tretmana UVI (min). Centralna točka (80 %, 12,5 min) je imala pet ponavljanja, što je u konačnici rezultiralo s 13 pokusa. Plan pokusa je prikazan u Tablici 3. Amplituda ultrazvučnog tretmana bila je 60 %, 80 % i 100 %, a vrijeme tretmana u 5 min., 12,5 min. ili 20 min.

Tablica 3. Složeni centralni plan pokusa tretmana posija prosa UVI, stvarne i kodirane vrijednosti

Oznaka uzorka	Amplituda (%)	Kod	Vrijeme (min)	Kod
60 % - 12,5 min.	60	-1	12,5	0
100 % - 20 min.	100	+1	20	+1
100 % - 5 min.	100	+1	5	-1
80 % - 5 min.	80	0	5	-1
80 % - 12,5 min. *	80	0	12,5	0
100 % - 12,5 min.	100	+1	12,5	0
80 % - 12,5 min. *	80	0	12,5	0
80 % - 12,5 min. *	80	0	12,5	0
80 % - 12,5 min. *	80	0	12,5	0
60 % - 20 min.	60	-1	20	+1
60 % - 5 min.	60	-1	5	-1
80 % - 20 min.	80	0	20	+1
80 % - 12,5 min. *	80	0	12,5	0

*centralna točka

Tretman posija prosa UVI proveden je na 45 g uzorka suspendiranog u 300 ml vode destilirane vode u čaši volumena 600 ml. Suspenzije su izložene djelovanju UVI uranjanjem sonde 1 cm u suspenziju (Voučko, 2018). Prije i nakon tretmana UVI izmjerena je temperatura uzorka koja je očitana na ekranu ultrazvučnog procesora.

Osim tretmana prema centralnom planu pokusa, jedan uzorak je pripremljen na isti način kao i oni tretirani ultrazvukom, ali je miješan na magnetnoj mješalici na sobnoj temperaturi u trajanju 20 min. Ovaj uzorak služio je kao kontrolni uzorak.

Također, u radu je ispitan i sastav ukupnih polifenola i antioksidansa oljuštenog zrna prosa, kao uobičajenog oblika konzumacije prosa, a s ciljem usporedbe s posijama prosa.

3.2.2. Ekstrakcija

3.2.3. Priprema uzorka za ekstrakciju

Nakon UVI tretmana posija prosa, uzorak je odekantiran u plastične posudice u debljini sloja 1-2 cm te smrznut na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do liofilizacije. Prije procesa liofilizacije uzorci su dodatno bili smrznuti na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sam proces liofilizacije (Alpha 1-4 LSC Plus, Christ, Njemačka) trajao je oko 30-48 h, odnosno do trenutka dok temperatura uzorka nije postigla sobnu temperaturu. Osušeni uzorak je potom homogeniziran te korišten za ekstrakciju ukupnih polifenolnih spojeva i određivanje antioksidacijskog kapaciteta UVI tretiranih posija prosa. Osušenim uzorcima je dodatno određena vlaga, sušenjem 2 g uzorka na $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju 90 min., odnosno do postizanja konstantne mase.

3.2.4. Ekstrakcija slobodnih spojeva

U plastične epruvete za centrifugu, volumena 1,5 mL, izvaže se 250 mg uzorka i doda 1 mL 80 %-tnog etanola (v/v). Uzorci se homogeniziraju na vorteks tresilici te stavljaju u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta. Po završetku ekstrakcije epruvete se vade iz kupelji i stavljaju u mikrocentrifugu 15 minuta na 8000 o min^{-1} . Dobiveni supernatant prelije se u nove plastične epruvete volumena 2 mL i stavi na uparavanje pod dušikom uz grijanje do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ekstrakcija se ponovi još dva puta, s 800 μL 80 %-tnog etanola. Supernatanti se nakon svakog centrifugiranja spajaju i stavljaju na uparavanje pod dušikom.

3.2.5. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Određivanje ukupnih polifenola (TPC) se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa s ekstraktima ukupnih polifenola i fenolnih kiselina, prema Čukelj i sur. (2015). Folin-Ciocalteau reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline koja pri reakciji s fenolnim spojevima uzrokuje oksidaciju fenolnih spojeva, a kiseline se reduciraju u plavo obojeni volframov oksid i molibdenov oksid (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Nakon dva sata reakcije, u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteau reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988), pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965). Vrijednost apsorbancije proporcionalna je vrijednosti nastale plave boje i koncentraciji antioksidansa.

Aparatura i pribor:

1. automatske mikropipete volumena 10-100 μL i 100-1000 μL
2. odmjerna tikvica, volumena 50 mL, 100 mL
3. analitička vaga , Kern ALS 200-4N (Njemačka)
4. vorteks miješalica, IKA MS3 basic, SAF
5. pipete, volumena 2 mL, 5 mL
6. lijevak
7. kivete
8. centrifuga, Thermo Scientific Micro Cl 21 (Njemačka)
9. spektrofotometar, Analytik Jena, Specord 50 Plus (Njemačka)

Reagensi

1. Folin-Ciocalteu reagens, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
2. Na_2CO_3 , 20 % (w/v), Gram-mol d.o.o (Zagreb, Hrvatska)

Priprema: 20 g anhidrida natrijeva karbonata se otopi u 80 mL vruće destilirane vode, u odmjernoj tikvici volumena 100 mL, a zatim ohladi na sobnu temperaturu te nadopuni destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina treba odstajati 24 sata te se nakon tog profiltrira.

3. Galna kiselina, Sigma - Aldrich (Steinheim, Njemačka)

Postupak određivanja:

U kivete za spektrofotometrijsko mjerenje otpipetira se 400 μL destilirane vode, 15 μL uzorka (ekstrakta prosa) i 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 minute doda se 300 μL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te 1170 μL destilirane vode te se dobro promućka. Nakon 2 sata što pripremljeni uzorci stoje u mraku na sobnoj temperaturi, mjeri se apsorbancija pri 765 nm. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto uzorka doda se isti volumen metanola. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg mL^{-1}), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku.

Izrada baždarne krivulje:

Za izradu baždarne krivulje (Slika 7) korišteno je šest koncentracija galne kiseline u rasponu od 0,157 do 1,255 mg ml⁻¹. Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je u 3 paralelne probe (n = 3), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalentima galne kiseline (GAE) na g suhe tvari uzorka (Yu i sur., 2002).

Na temelju podataka dobivenih u ovom radu jednadžba baždarne krivulje glasi:

$$y = 0,8884 x - 0,0196 \quad [1]$$

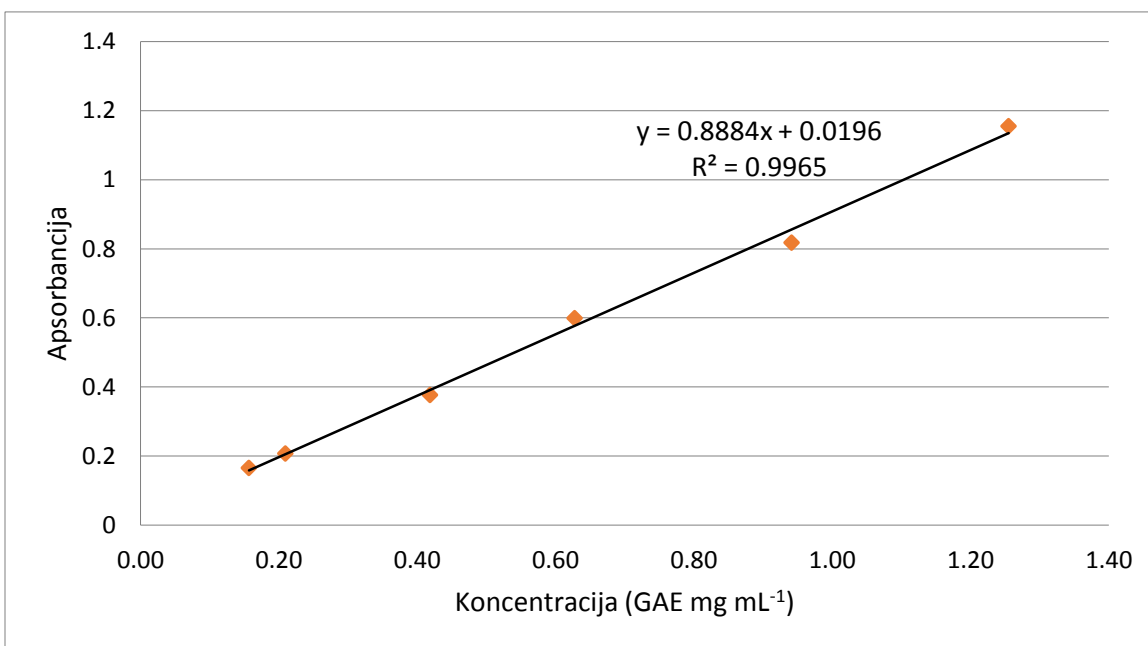
$$R^2 = 0,9965$$

gdje je:

y – apsorbanca pri 765 nm

x – koncentracija galne kiseline (mM)

R² – koeficijent određivanja



Slika 7. Baždarni dijagram za ukupne slobodne polifenolne spojeve

3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

3.2.6.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Metoda se temelji na redukciji žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-tirazin (Fe(III)-TPTZ) u intenzivno plavi kompleks Fe(II)-TPTZ u prisustvu antioksidansa (elektron donora). Promjena boje se mjeri spektrofotometrijski pri 593 nm. Reakcija se odvija pri niskom pH jer se time osigurava dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona (Benzie i Strain, 1996). Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa

Aparatura i pribor:

1. odmjerna tikvica, volumena 10 mL, 100 mL, 500 mL
2. automatske mikropipete volumena 10 -100 μ L i 100 - 1000 μ L
3. pipeta, volumena 5 mL, 20 mL
4. čaša, volumena 50 mL
5. analitička vaga, Kern ALS 200-4N (Njemačka)
6. kivete
7. spektrofotometar, Analytik Jena, Specord 50 PLUS (Njemačka)

Reagensi:

1. Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
2. FeCl₃ x 6H₂O, 20 mM, Gram-mol d.o.o (Zagreb, Hrvatska)
Priprema: 0,0541 g FeCl₃ x 6 H₂O otopi se u 10 mL destilirane vode, otopina se priprema svježa.
3. TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin), 10 mM, Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Njemačka)
Priprema: 0,0312 g TPTZ otopi se u odmjerne tikvici od 10 mL sa 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake. Otopina se uvijek priprema svježa tj. na dan određivanja

4. 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline, Carlo Erba (Val de Reuil Cedex, Francuska)
Priprema: 343,3 μL 11,65 M HCl (konc. HCl = 37 %) razrijedi se u odmjerne tikvici od 100 mL destiliranom vodom te nadopuni do oznake.
5. acetatni pufer, 300 mM, Iach- Ner (Neratovice, Češka)
Priprema: 0,93 g bezvodnog natrijevog acetata otopi se u 8 mL ledene octene kiseline u odmjerne tikvici od 500 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Priprema FRAP reagensa:

Pomiješa se 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL FeCl_3 (omjer 10:1:1).

Postupak određivanja:

FRAP reagens se neposredno prije upotrebe zagrije na temperaturu od 37 °C i pri toj temperaturi održava. U mikrokivetu se otpipetira 10 μL uzorka (ekstrakta prosa) i 1 mL FRAP reagens te se sve promiješa. Nakon 4 minute izmjeri se apsorbancija pri 593 nm. U slijepu probu otpipetira se sve osim uzorka, a umjesto njega, doda se isti volumen metanola. Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard troloksa, koja prikazuje ovisnost % vezanih radikala o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku.

Izrada baždarne krivulje:

Za izradu baždarne krivulje (Slika 8) korišten je u vodi topljiv analog vitamina E - Troloks (6- hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Sigma - Aldrich, Njemačka, čistoće >98 %). Otopine troloksa, pripremljene su u koncentracijama 0,050 – 0,998 mg mL^{-1} . Određivanje antioksidacijskog kapaciteta provedeno je u 3 paralelne probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, kao μmol ekvivalenta troloksa (TE) na g suhe tvari uzorka prema Čukelj i sur. (2015).

Na temelju podataka dobivenih u ovom radu jednadžba baždarne krivulje glasi:

$$y = 1,5851 x - 0,0142 \quad [2]$$

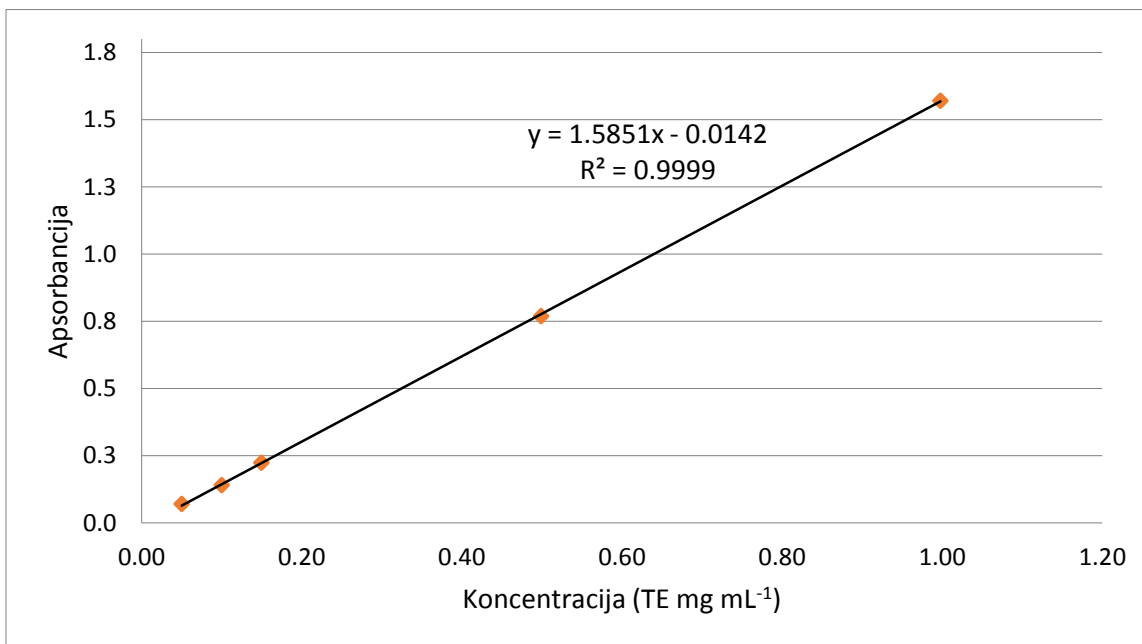
$$R^2 = 0,9999$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 593 nm

x – koncentracija standardne otopine troloksa (mg mL^{-1})

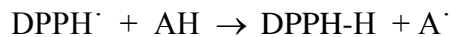
R^2 – koeficijent određivanja



Slika 8. Baždarni dijagram za FRAP

3.2.6.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Metoda se temelji na redukciji stabilnog radikala DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), koji zbog nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Sparivanjem elektronskog para stabilnog radikala DPPH[•] u prisutnosti elektron donora (AH-antioksidans, koji hvata slobodne radikale), ljubičasta boja otopine se mijenja u žutu. Nastali spoj ima smanjeni intezitet apsorpcije u vidljivom dijelu spektra, a rezultirajuće obezbojenje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Brand-Williams i sur., 1995).



Aparatura i pribor:

1. automatska mikropipeta, volumena 100 μL
2. odmjerna tikvica, volumena 50mL, 100 mL
3. analitička vaga, Kern ALS 200-4N (Njemačka)
4. lijevak
5. kivete
6. spektrofotometar , Analytik Jena, Specord 50 Plus (Njemačka)

Reagensi:

1.DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), 0.06 mM, Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

Priprema: 0.00236 g DPPH se otopi u odmjernoj tikvici od 100 mL s metanolom i nadopuni do oznake.

2. Metanol, apsolutni, HPLC grade, J. T. Baker (Deventer, Nizozemska)

3. Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)

Postupak određivanja:

U mikrokivetu se otpipetira 20 μL uzorka (ekstrakta prosa), 0,95 ml 0,06 mM otopine DPPH te se promućka. U drugu mikrokivetu se otpipetira 20 μL metanola i 0,95 mL 0,06 mM otopine DPPH koja predstavlja slijepu probu. Kivete stoje u mraku 30 minuta, nakon čega se izmjeri apsorbanacija pri 517 nm. Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Troloksa, koja prikazuje ovisnost % vezanih radikala o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku.

Izrada baždarne krivulje:

Za izradu baždarne krivulje (Slika 9) korišten je u vodi topljiv analog vitamina E - Troloks (6- hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Sigma - Aldrich, Njemačka, čistoće >98 %). Otopine troloksa, pripremljene su u koncentracijama 0,049 - 0,294 mg mL^{-1} . Određivanje antioksidacijskog kapaciteta provedeno je u 3 paralelene probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, kao μmol ekvivalenta troloksa (TE) na g suhe tvari uzorka prema Čukelj i sur. (2015).

Na temelju podataka dobivenih u ovom radu jednadžba baždarne krivulje glasi:

$$y = 314,41 x - 3,5734 \quad [3]$$

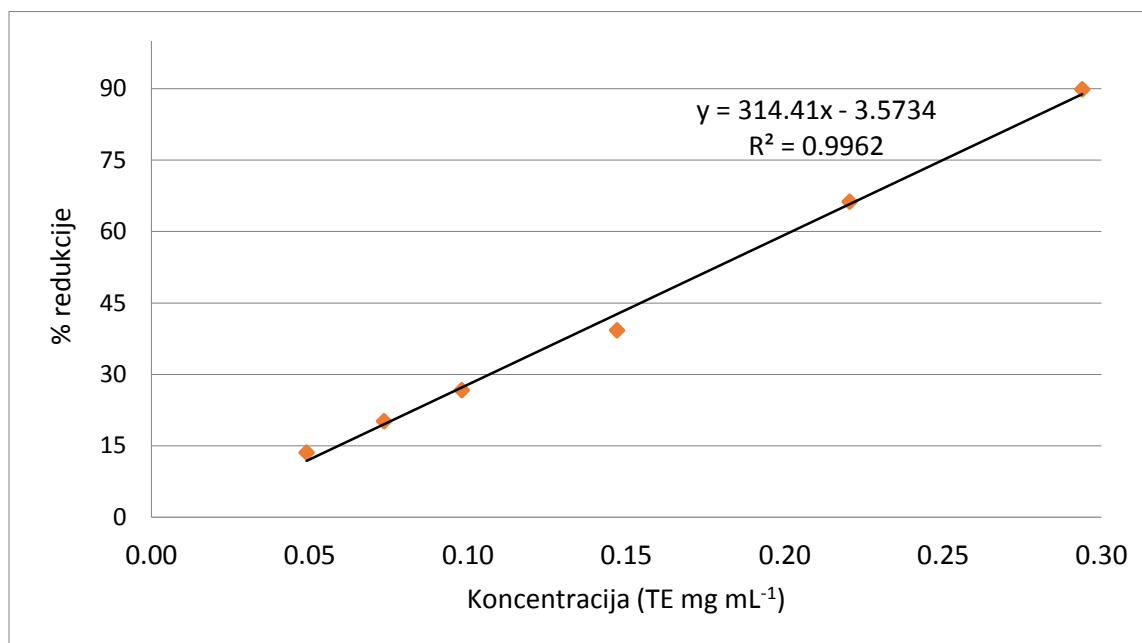
$$R^2 = 0,9962$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 517 nm

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

R^2 – koeficijent određivanja



Slika 9. Baždarni dijagram za DPPH

3.2.6.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline (ABTS radikal-kationa), koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijeveg persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8- tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Troloks), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Aparatura i pribor:

1. automatska mikropipeta, volumena 100 μL
2. odmjerna tikvica, volumena 50 mL, 100 mL
3. analitička vaga, Kern ALS 200-4N (Njemačka)
4. pipeta 10 mL
5. lijevak
6. kivete
7. spektrofotometar, Analytik Jena, Specord 50 Plus (Njemačka)

Reagensi

1. 7mM otopina ABTS⁺ (m/v), $M = 548,68 \text{ g mol}^{-1}$, Sigma - Aldrich (Steinheim, Njemačka)

Priprema: 0,0384 g ABTS⁺ (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) otopi se u odmjernoj tikvici od 10 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

2. 140 mM otopina kalijeva persulfata (m/v), $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ $M=270,322 \text{ g mol}^{-1}$, Fluka (Steinheim, Njemačka)

Priprema: 0,37846 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ otopi se u odmjernoj tikvici od 10 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

3. Etanol (96 %), Carlo Erba (Italija)

Postupak određivanja:

Pomiješa se 88 μL kalijeva persulfata, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ i ABTS reagensa (7mM) do volumena 5 mL (količina ABTS = 4912 μL) pa konačna koncentracija kalijeva persulfata iznosi 2,45 mmol L^{-1} . Tikvica se obloži aluminijskom folijom i čuva u mraku 12 -16 sati na sobnoj temperaturi. Tako pripremljen reagens stabilan je 2 dana. Drugi dan se provodi određivanje na uzorcima.

Na dan analize potrebno je pripremiti 1 % -tnu otopinu od otopine pripremljene dan prije (početna otopina se uzima kao 100 % otopina), tako da se 1000 μL ABTS⁺ otopi u 96 % etanolu i nadopuni istim etanolom do oznake u odmjernoj tikvici od 100 mL te je potrebno postići, daljnjim dodavanjem ABTS⁺ ili 96 % etanola, da apsorpcija pri 734 nm iznosi $0,700 \pm 0,02$.

U kivetu se otpipetira 20 μL uzorka (ekstrakta) i doda se 2 mL otopine ABTS⁺ te se promućka. ApSORBANCija se mjeri nakon 6 minuta uz slijepu probu pri 734 nm. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto uzorka doda se isti volumen

metanola. Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard troloksa, koja prikazuje ovisnost % vezanih radikala o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku.

Izrada baždarne krivulje:

Za izradu baždarne krivulje (Slika 10) korišten je u vodi topljiv analog vitamina E - Troloks (6- hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Sigma–Aldrich, Njemačka, čistoće >98 %). Otopine troloksa, pripremljene su u koncentracijama $0,053 - 0,422 \text{ mg mL}^{-1}$. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta provedeno je u 3 paralelne probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, kao μmol ekvivalenta troloksa (TE) na g suhe tvari uzorka prema Čukelj i sur. (2015).

Na temelju podataka dobivenih u ovom radu jednadžba baždarne krivulje glasi:

$$y = 1,238 x - 0,0025 \quad [4]$$

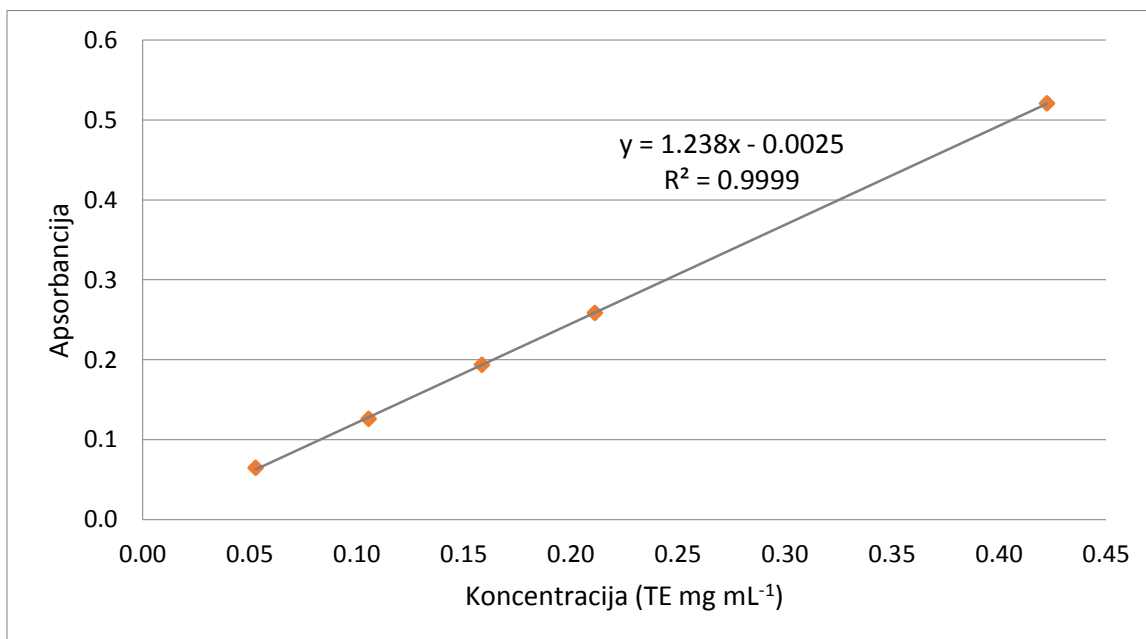
$$R^2 = 0,9999$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 734 nm

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

R^2 – koeficijent određivanja



Slika 10. Baždarni dijagram za ABTS

3.2.7. Statistička analiza

Za obradu eksperimentalnih podataka, analizu i izrada grafova korišteni su Microsoft Office Excel 2010 i Design Expert 10 (State-Ease, USA). Analiza varijance s Tukey post-hoc testom, kao i analiza korelacije su provedene u programu Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Dobiveni rezultati mjerenja prikazani su kao srednja vrijednost i standardna devijacija, izraženo na suhu tvar uzorka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Bioaktivni profil posija prosa i oljuštenog zrna

Proso je žitarica koja ima veliki potencijal jer sadrži najveći udio kalcija od svih žitarica (Devi i sur., 2014), bogato je polifenolima, prehrambenim vlaknima i antioksidansima (Saleh i sur., 2013) te ga mogu koristiti ljudi oboljeli od celijakije budući da ne sadrži gluten (Chandrasekara i Shahidi, 2010). Uobičajeno se zrnju prosa kod obrade uklanja ljuska kako bi mu se poboljšala senzorska svojstva, osigurala viša zdravstvena ispravnost i skratilo vrijeme kuhanja. Uklanjanjem ljuske nastaju posije kao nusproizvod. Iako se tim procesom udio proteina i masti u zrnju prosa značajno ne mijenja, dolazi do smanjenja udjela vlakana, mineralnih tvari, ukupnih polifenola te antioksidacijske aktivnosti (Saleh i sur., 2013).

Da oljušteno zrno prosa ima puno niži udio bioaktivnih spojeva dokazano je i u sklopu ovog diplomskog rada. Osim u posijama, količina slobodnih fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet određen je i oljuštenom zrnju prosa, odnosno onom obliku koje se uobičajeno konzumira. Ovom usporedbom želio se utvrditi značaj posija kao izvora fenolnih spojeva i antioksidansa.

Rezultati su pokazali da oljušteno proso ima puno niži udio ukupnih slobodnih polifenolnih spojeva ($0,16 \text{ mg GAE g}^{-1}$ suhe tvari) od cijelog zrna prosa ($1,59 \text{ mg GAE g}^{-1}$ suhe tvari) budući da polifenolni spojevi nisu ravnomjerno raspodijeljeni u zrnju već se uglavnom nalaze u vanjskim slojevima zrna. Gotovo 60 % polifenola u prosu se nalazi u sjemenoj ovojnici koja čini 12 % mase zrna (Devi i sur., 2014). Dobiveni rezultati visokih udjela ukupnih polifenola u tretiranim posijama slažu se s prethodnim istraživanjima gdje je utvrđeni raspon polifenola u prosu bio $2,69 - 3,74 \text{ mg g}^{-1}$ uzorka i $0,55 - 16,2 \text{ } \mu\text{mol FAE (ekvivalent ferulinske kiseline) g}^{-1}$ uzorka. (Hag i sur., 2002; Chandrasekara i Shadidi, 2011). Izmjereni antioksidacijski kapacitet oljuštenog zrna prosa bio je $0,86 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{mol TE g}^{-1}$ za ABTS; $0,52 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{mol TE g}^{-1}$ DPPH; i $0,72 \pm 0,08 \text{ } \mu\text{mol TE g}^{-1}$ za FRAP metodu, što je za oko tri puta manji antioksidacijski kapacitet od posija. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima (Hassimotto i sur., 2005; Barros i sur., 2008). Međutim, iako su posije značajno bogatije na bioaktivnim spojevima od oljuštenog zrna, polifenolni spojevi posija imaju nisku biološku raspoloživost jer se nalaze u kompleksima vezani s drugim ugljikohidratima (Slavin, 2004). Primjena ultrazvuka visokog intenziteta ima potencijal povećanja njihove bioraspoloživosti.

Naime, pregledom znanstvenih radova uočeno je da se ultrazvučna predobrada koristi za poboljšanje hidrolize nekih biljnih materijala (Li i sur., 2018; Chen i sur., 2011) kao i za povećanje antioksidacijske aktivnosti različitih proteina (Xue i sur., 2016b; Zou i sur., 2017). Wang i sur. (2007) istraživali su utjecaj ultrazvučne ekstrakcije na fenolne spojeve pšeničnih posija i ustanovili su da su optimalni rezultati dobiven korištenjem etanola kao otapala (64 %-tna otopina etanola) pri 60 °C u trajanju od 25 min. Također su primjetili kako je vrijeme ekstrakcije imalo najznačajniji utjecaj na proces. Prema Banerjee i sur. (2012) upotreba polarnih otapala sa sniženim pH dala je najbolje rezultate ekstrakcije posija prosa. Istraživanja su pokazala da ultrazvučni tretman visokog intenziteta može inducirati promjene u sekundarnim i tercijarnim strukturama proteina, što ukazuje da ultrazvučni tretman dovodi do djelomičnog odmatanja proteina (Gülseren i sur., 2007; Güzey i sur., 2006; Xue i sur., 2017a). Ultrazvuk se pokazao kao uspješna metoda razaranja staničnih stijenki biljnih materijala, čime se mehanički otvara pristup bioaktivnim spojevima (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

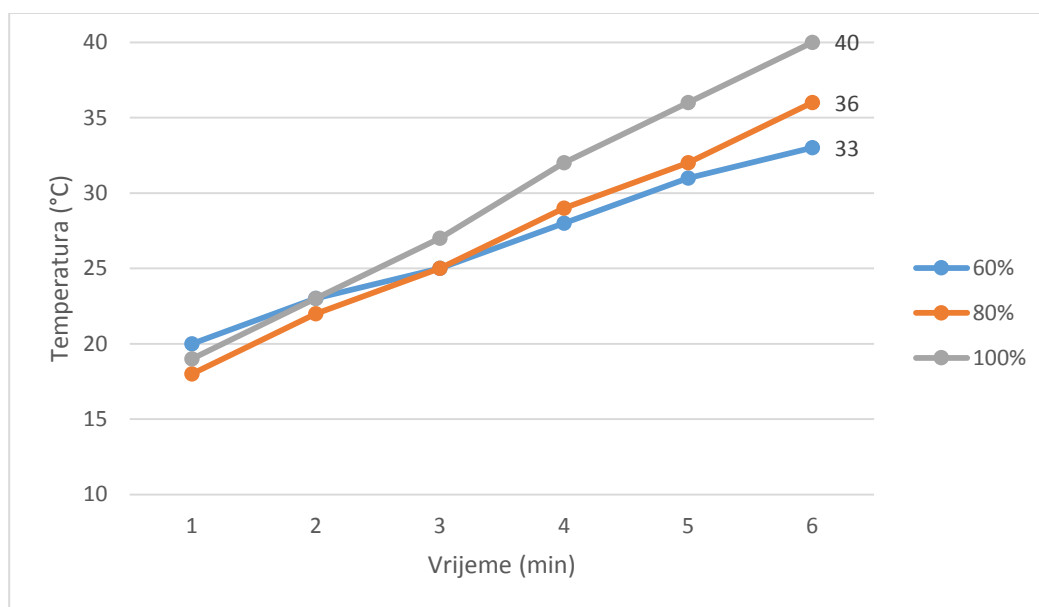
Stoga je u ovom radu istražen utjecaj UVI na razbijanje stanične strukture i oslobađanje slobodnih bioaktivnih spojeva posija prosa. Za razliku od većine prijašnjih radova, ultrazvuk u ovom radu nije korišten kao pomoć u ekstrakciji, nego se njime tretirala vodena suspenzija posija, čija je daljnja primjena namijenjena proizvodnji pekarskih proizvoda. Ukupna količina polifenolnih spojeva određena je nakon UVI tretmana i liofilizacije posija pomoću Folin-Ciocalteau reagensa, dok je antioksidacijska aktivnost određena pomoću ABTS, DPPH i FRAP metoda.

4.2. Promjene temperature tijekom UVI tretmana posija prosa

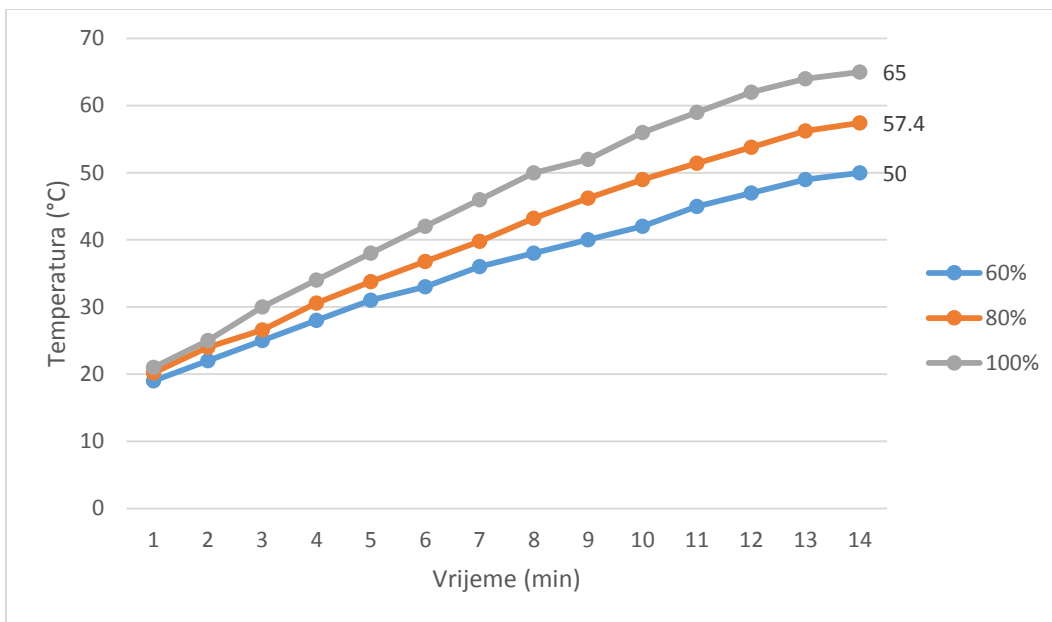
Ultrazvuk visokog intenziteta je netermalna tehnologija, ali njegovo djelovanje uključuje i kavitaciju i utjecaj topline koja nastaje za vrijeme ultrazvučnog tretmana. Zbog toga se promatra utjecaj amplitude i vremena UVI tretmana te porast temperature tijekom tretmana.

Povećanjem amplitude i vremena UVI tretmana temperatura se linearno povećava, kao što je vidljivo na Slikama 11, 12 i 13, dok je promjena temperature tijekom tretmana prikazana u tablici 4. Svi uzorci su na početku tretmana imali temperaturu 18, 19, 21 ili 21 °C. Temperatura je rasla s porastom vremena tretmana, nego s porastom amplitude (Tablica 4). Intenzitet kavitacije koja se događa u tekućem mediju ovisi o svojstvima medija (tlaku pare, gustoći,...). Također,

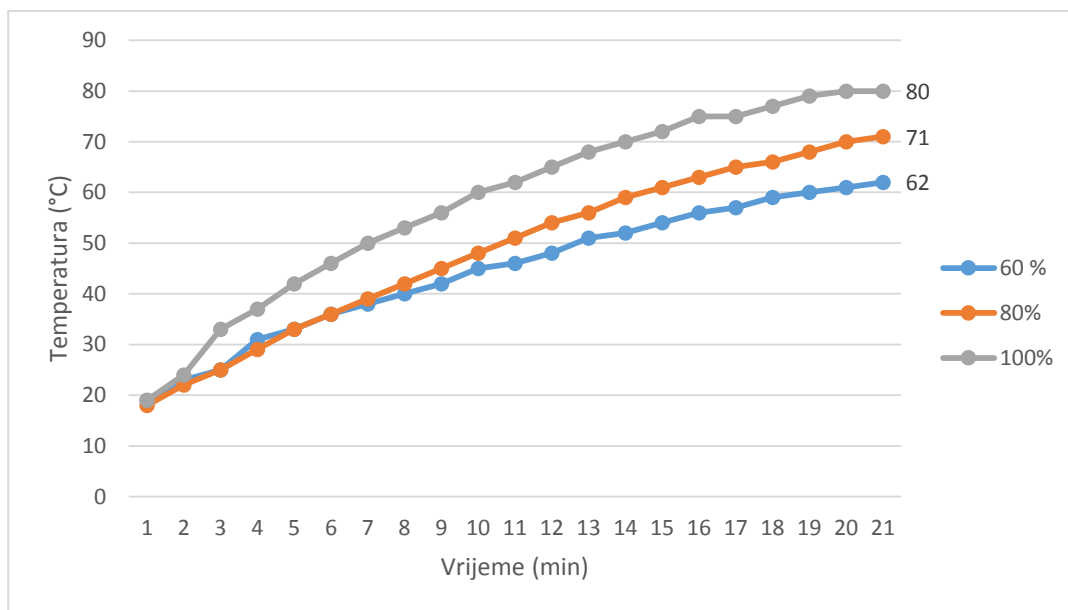
energija koja je potrebna za formiranje kavitacijskih mjehurića u tekućem mediju razmjerna je površinskoj napetosti i tlaku pare (Leighton, 2007). Do pojave kavitacije teško dolazi pri temperaturi okoliša, ali to nije uvijek tako jer svaka tekućina ima karakterističnu temperaturu pri kojoj kavitacija pokazuje najveću ovisnost (Drmić i Režek Jambrak, 2009). Međutim, Muthukumaran i sur. (2006) su zaključili kako je kavitacija uspješnija na nižim temperaturama te da je potrebno postići dobar odnos između temperature i kavitacije. Prema Voučko (2018) snižavanje temperature tijekom UVI tretmana nije potrebno provoditi ako temperatura uzorka nije viša od kritične temperature koja bi mogla negativno utjecati na spojeve koje se želi ekstrahirati.



Slika 11. Promjena temperature tijekom UVI tretmana ovisno o amplitudi tijekom 5 min.



Slika 12. Promjena temperature tijekom UVI tretmana ovisno o amplitudi tijekom 12,5 min.



Slika 13. Promjena temperature tijekom UVI tretmana ovisno o amplitudi tijekom 20 min.

4.3. Utjecaj UVI na slobodne polifenolne spojeve i antioksidacijsku aktivnost posija prosa

U tablici 4. prikazani su ukupni fenolni spojevi (TPC) i antioksidacijska aktivnost posija prosa izmjerene FRAP, ABTS i DPPH metodom. U ovom diplomskom radu analizirani su slobodni spojevi, kako bi se ispitaio potencijal mehaničkog oslobađanja bioaktivnih spojeva iz kompleksnih vlaknastih struktura posija prosa.

Tablica 4. Rezultati mjerenja izlaznih varijabli (promjena temperature - ΔT , ukupni polifenoli – TPC, antioksidacijska aktivnost – DPPH, ABTS, FRAP) prema CCD planu ovisno o uvjetima UVI tretmana, izraženo na suhu tvar (srednja vrijednost \pm standardna devijacija, $n=3$)

Uzorak	ΔT (°C)	TPC (mg GAE g ⁻¹)	DPPH ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)	ABTS ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)
Kontrolni uzorak	0	1,59 \pm 0,18	1,61 \pm 0,12	2,61 \pm 0,10	2,33 \pm 0,09
60 % - 5 min	13	1,69 \pm 0,08	1,60 \pm 0,04	2,94 \pm 0,12	2,55 \pm 0,31
60 % - 12,5 min	30	1,73 \pm 0,06	1,67 \pm 0,07	2,56 \pm 0,04	2,62 \pm 0,03
60 % - 20 min	43	1,79 \pm 0,08	1,57 \pm 0,06	2,90 \pm 0,12	2,64 \pm 0,02
80 % - 5 min	17	1,51 \pm 0,06	1,36 \pm 0,03*	2,32 \pm 0,01	2,01 \pm 0,05
80 % - 12.5 min (1)	36	1,98 \pm 0,05*	1,60 \pm 0,06	2,36 \pm 0,19	2,78 \pm 0,14*
80 % - 12.5 min (2)	37	1,82 \pm 0,03*	1,58 \pm 0,05	2,44 \pm 0,06	2,56 \pm 0,04
80 % - 12.5 min (3)	38	1,80 \pm 0,03	1,52 \pm 0,02	2,65 \pm 0,08	2,70 \pm 0,12
80 % - 12.5 min (4)	37	1,85 \pm 0,03*	1,61 \pm 0,09	2,88 \pm 0,12	2,93 \pm 0,09*
80 % - 12.5 min (5)	38	1,91 \pm 0,09*	1,63 \pm 0,01	3,29 \pm 0,13*	2,95 \pm 0,12*
80 % - 20 min	53	1,66 \pm 0,07	1,44 \pm 0,07	2,86 \pm 0,03	2,52 \pm 0,16
100 % - 5 min	22	1,69 \pm 0,09	1,61 \pm 0,06	2,39 \pm 0,24	2,25 \pm 0,23
100 % - 12.5 min	44	1,71 \pm 0,05	1,54 \pm 0,03	2,37 \pm 0,17	2,59 \pm 0,04
100 % - 20 min	61	1,54 \pm 0,06	1,50 \pm 0,07	2,62 \pm 0,11	2,13 \pm 0,16

* uzorci koji su statistički značajno različiti ($p \leq 0,05$) od kontrolnog uzorka. *Zeleno* su označene vrijednosti više od kontrolnog uzorka, a *crveno* vrijednosti niže od vrijednosti kontrolnog uzorka.

Rezultati pokazuju kako najviši udio ukupnih slobodnih polifenola imaju posije tretirane UVI s 80 % amplitude u trajanju od 12,5 minuta, pri čemu je koncentracija TPC u odnosu na kontrolni uzorak 25 % viša. U svim drugim uzorcima, osim za uzorke 80 % - 5 min i 100 % - 20 min, TPC je bio viši, no statistički neznačajno. Iz rezultata FRAP metode vidljivo je opet kako najveću antioksidacijsku aktivnost imaju posije prosa tretirane ultrazvukom amplitude 80 % u trajanju od 12,5 minuta, pri čemu postignuto povećanje od 27 % u odnosu na kontrolni uzorak. Najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena ABTS metodom dobivena je opet pri tretmanu prosa uz 80 % u trajanju od 12,5 minute, međutim koeficijent varijacije centralne točke tretmana kod ABTS-a je bio 13,7 % pri čemu su dvije točke bile ispod vrijednosti kontrolnog uzorka, a tri iznad vrijednosti kontrolnog uzorka. Kod ostalih testova je koeficijent varijacije centralne točke tretmana bio manji od 6 %. Za razliku od TPC i FRAP antioksidacijske aktivnosti, uvjeti tretmana 80 % amplitude i 12,5 minuta su kod DPPH antioksidacijske aktivnosti uzrokovali smanjenje u usporedni s kontrolni uzorkom i to maksimalno 15,5 %, dok pod drugim uvjetima tretmana nije došlo do značajnih promjena.

Razlike u rezultatima različitih metoda za određivanja antioksidacijske aktivnosti proizlaze iz činjenice da se testovi baziraju na različitim kemijskim načelima pa je preporučljivo provesti što više testova kako bi se pokrio širi raspon prisutnih antioksidanasa (Apak i sur., 2013). Analizom korelacije (Tablica 5) između testova za određivanje antioksidacijskog kapaciteta utvrđeno je da postoji jaka korelacija izmjerenih TPC i antioksidacijskog kapaciteta određena FRAP metodom te nešto slabija između TPC i FRAP te između DPPH i FRAP. Niti jedan od testova nije korelirao s promjenom temperature

Tablica 5. Pearsonovi koeficijenti korelacije (r) i p-vrijednosti između izlaznih varijabli tretmana UVI (promjena temperature - ΔT , ukupni polifenoli – TPC, antioksidacijska aktivnost – DPPH, ABTS, FRAP)

	TPC	DPPH	ABTS	FRAP
ΔT	0,038 <i>p = 0,902</i>	-0,147 <i>p = 0,632</i>	0,154 <i>p = 0,616</i>	0,119 <i>p = 0,699</i>
TPC		0,664 <i>p = 0,013</i>	0,278 <i>p = 0,358</i>	0,884 <i>p = 0,000</i>
DPPH			0,271 <i>p = 0,371</i>	0,637 <i>p = 0,019</i>
ABTS				0,541 <i>p = 0,056</i>

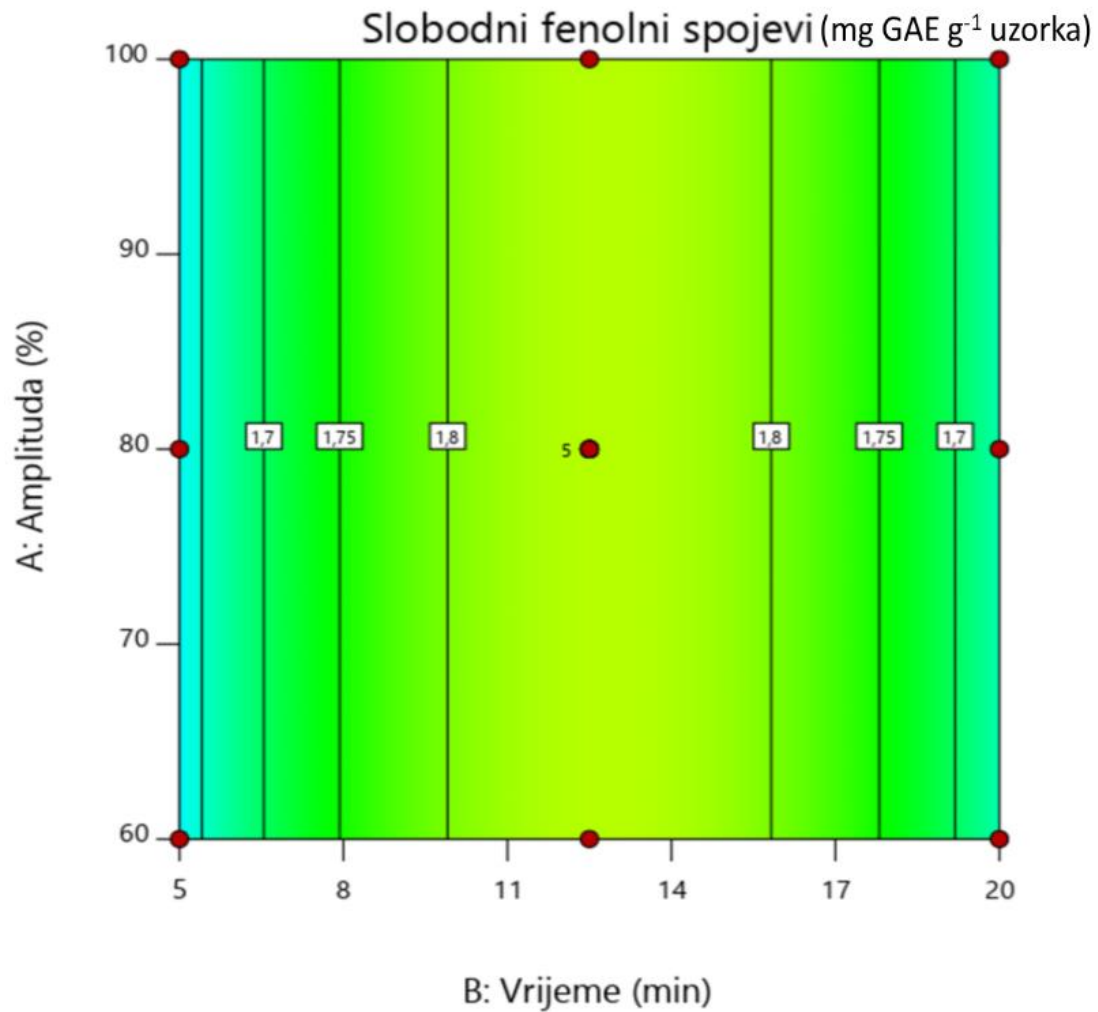
*Podebljane vrijednosti su statistički značajne ($p \leq 0,05$)

Na Slikama 14 i 15 prikazani su grafovi utjecaja amplitude i vremena tretmana na TPC, FRAP dobivene iz slijedećih jednadžbi modela za kodirane faktore ($p \leq 0,05$):

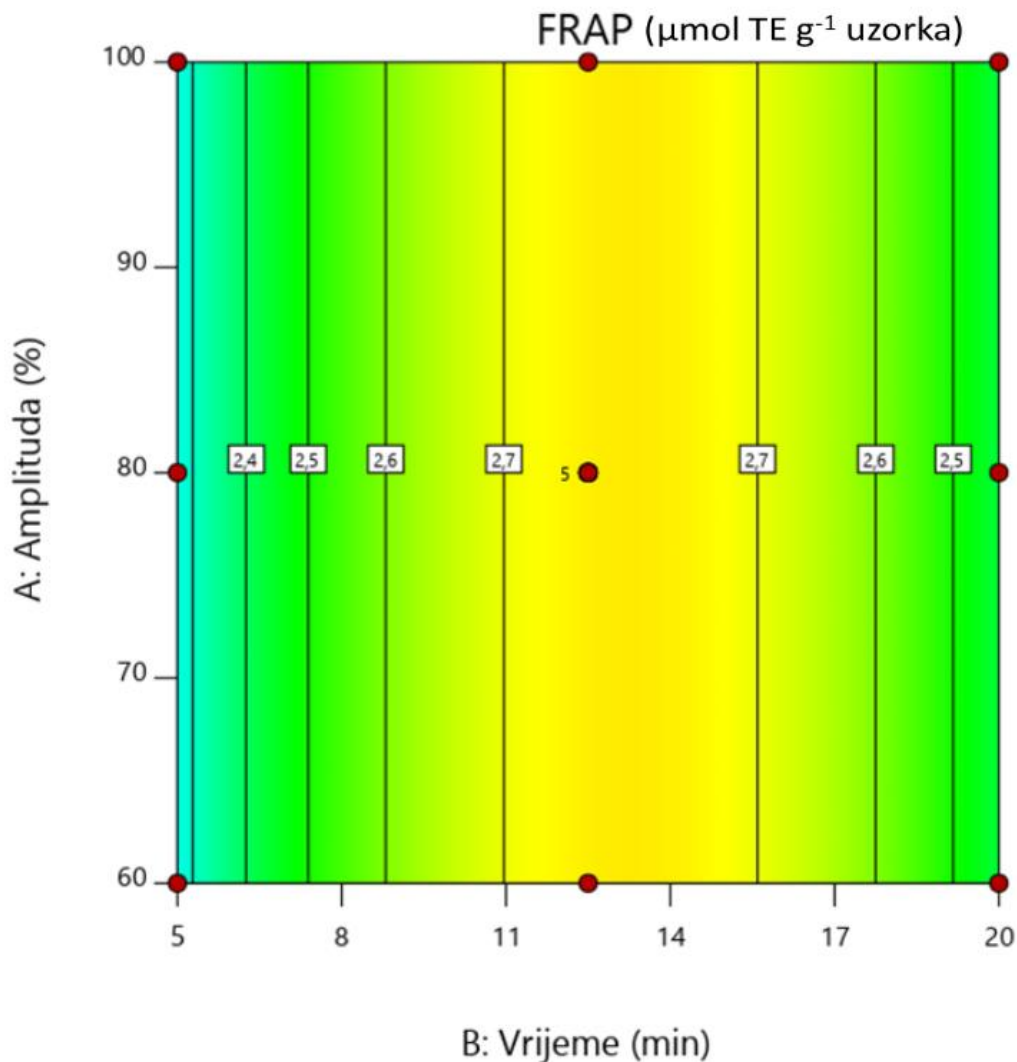
$$\text{Slobodni fenolni spojevi} = 1,83 - 0,18 * \text{Vrijeme}^2 \quad [5]$$

$$\text{FRAP} = 2,73 + 0,080 * \text{Vrijeme} - 0,38 * \text{Vrijeme}^2 \quad [6]$$

Za razliku od slobodnih fenolnih spojeva i FRAP antioksidacijske aktivnosti gdje je jedino vrijeme tretmana utjecalo na rezultate, modeli jednadžbi za DPPH i ABTS antioksidacijsku aktivnost su se pokazali neznačajnima ($p > 0,05$), odnosno niti amplituda niti vrijeme tretmana nisu imali značajan utjecaj na promjenu antioksidacijske aktivnosti.



Slika 14. Utjecaj vremena i amplitude UVI na slobodne TPC posija prosa (vrijednosti rastu od plave prema zeleno-žutoj boji)

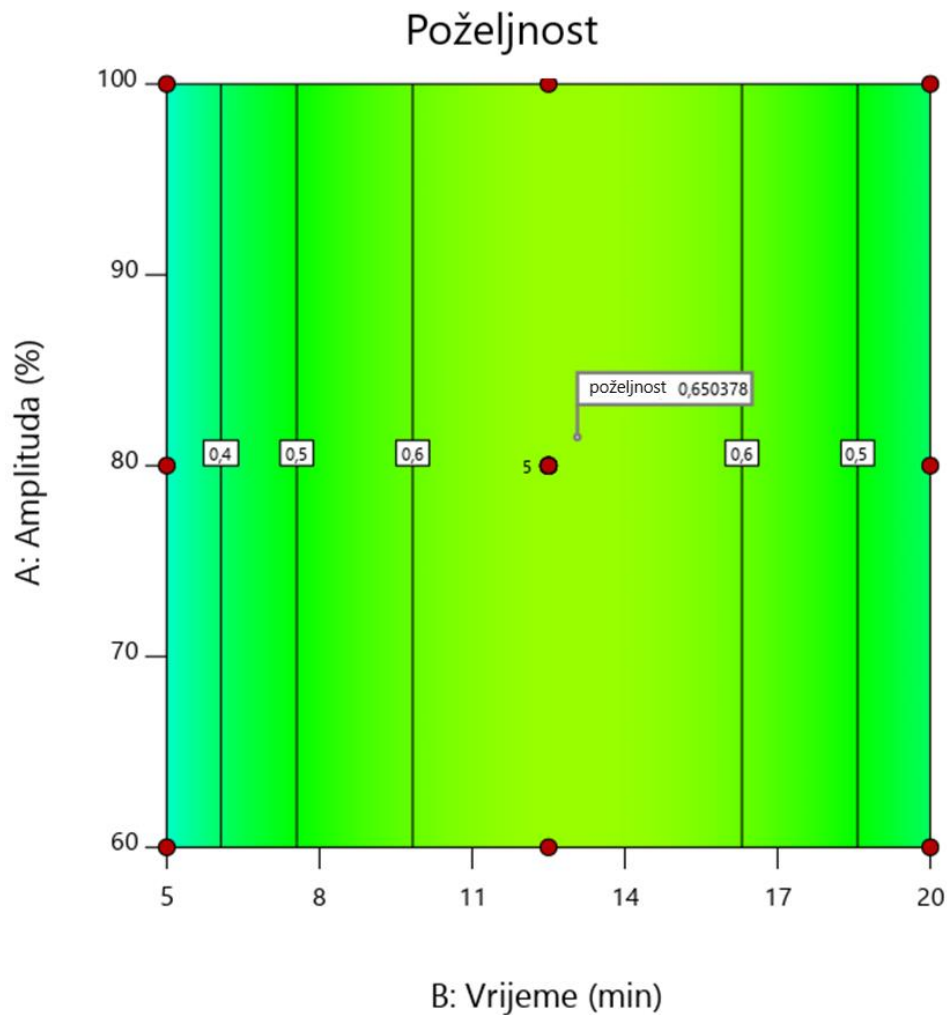


Slika 15. Utjecaj vremena i amplitude UVI na antioksidacijsku aktivnost posija prosa mjerenu FRAP metodom (vrijednosti rastu od plave prema narančastoj boji)

Kao što se vidi iz modela (Slika 14), tretman u trajanju od 11 do 14 minuta uzrokuje najveće povećanje udjela ukupnih polifenolnih spojeva u posijama prosa neovisno o primjenjenoj amplitudi. Također, najbolji rezultati FRAP metode mogli bi biti nakon tretmana od 12,5-14 minuta neovisno o amplitudi.

Nakon statističke obrade dobivenih podataka program je sugerirao najpoželjnije uvjete UVI tretmana (Slika 16), pri čemu su amplituda i vrijeme mogli varirati u ispitivanom rasponu, a vrijednosti fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti su maksimizirane, dok je važnost TPC i FRAP vrijednosti bila 3 (od 5), a ABTS i DPPH vrijednosti 1 (od 5). Rješenja koja je ponudio

program su bila u u rasponu amplituda 61 – 99 %, dok je optimalno vrijeme u svim slučajevima bilo 13 minuta. Prema predviđanjima programa, takvim bi uvjeti UVI tretmana rezultirali posijama koje imaju za 15 % više TPC, 17 % snažniju FRAP te 2 % snažniju ABTS antioksidacijsku aktivnost, dok bi se DPPH antioksidacijska aktivnost mogla smanjiti za 3 %.



Slika 16. Rezultati optimizacije UVI tretmana prikazani kao poželjnost (vrijednosti rastu od tamno plave prema zelenoj boji)

Kavitacija uzrokuje ekstremne uvjete uslijed formiranja, rasta i urušavanja mjehurića te dolazi do stvaranja radikala. U vodenom mediju nastaju $H\cdot$ i $\cdot OH$ radikali (Henglein, 1993). U prehrambenoj industriji upotreba ultrazvučne tehnologije stvara problem jer može doći do neželjenih reakcija koje mogu izazvati kavitacijom nastali hidroksilni radikali tijekom obrade hrane (Drmić i sur., 2010). Kemijski efekti kavitacije mogu predstavljati prednost ili nedostatak,

kao primjer, ·OH radikali koji nastaju tijekom ultrazvučne obrade mogu naštetiti kvaliteti nekih sastojaka hrane, ali mogu i poboljšati funkcionalnost određenih sastojaka hrane (fenola i antioksidanasa) (Bravo, 1998; Maleki i sur., 2007; Ashokkumar i sur., 2008). Ultrazvučnom tretmanom posija prosa u vodi, pri navedenim uvjetima, je došlo do blagih porasta fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti, no pozitivno je i to što nije došlo do značajnijih negativnih promjena.

Osim prikazanih parametara, tijekom UVI tretmana je primijećeno povećanje viskoznosti suspenzije i posmeđivanje tretiranih posija. Iako te promjene nisu instrumentalno mjerene u ovom diplomskom radu, za pretpostaviti je da su nastale kao posljedica želatinizacije škroba te aktivnosti enzima (polifenol oksidaze). Iako UVI ima potencijal inaktivirati enzime, pri ovim uvjetima tretmana je aktivnost enzima možda i bila povećana, budući da je temperatura tretmana bila u optimalnom temperaturnom rasponu enzima (20-60 °C), a i vrijeme tretmana nedovoljno dugo za potpunu inaktivaciju. Proso ima temperaturu želatinizacije sličnu riži (58 °C - 98 °C) (Burton i sur., 1972; Singh i sur., 2003), a tijekom UVI tretmana temperatura se kretala od 33 °C do 80 °C. Stoga bi buduća istraživanja trebala ispitati i ovaj aspekt promjena na posijama koje dolaze tijekom UVI tretmana, a koje bi mogle imati značajniji tehnološki utjecaj.

5. ZAKLJUČCI

1. Posije prosa bogat su izvor polifenolnih spojeva i antioksidansa. U usporedbi s uobičajeno konzumiranim oljuštenim zrnom prosa, posije sadrže 10 puta više ukupnih polifenolnih spojeva te imaju oko tri puta jaču antioksidacijsku aktivnost.
2. Ultrazvuk visokog intenziteta 400 W pri 60 %, 80 % i 100 % amplitude i u vremenu trajanja od 5, 12,5 ili 20 minuta nije imao značajan utjecaj na DPPH i ABTS antioksidacijsku aktivnost ekstrakta posija prosa u odnosu na netretirani uzorak, no pozitivno je utjecao na ukupne slobodne polifenolne spojeve i antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom.
3. Najveći udio ukupnih slobodnih polifenolnih spojeva dobiven je pri UVI tretmanu amplitude 80 % u trajanju od 12,5 minuta, pri čemu je došlo do 25 % povećanja u odnosu na oljušteno zrno prosa.
4. Najviša antioksidacijska aktivnost posija prosa izmjerena FRAP metodom dobivena je kod UVI tretmana amplitude 80 % u trajanju od 12,5 minuta, pri čemu je došlo do 27 % povećanja u odnosu na kontrolni uzorak.
5. Između ukupnih fenolnih spojeva i FRAP antioksidacijske aktivnosti utvrđena je jaka korelacija, dok je srednje jaka korelacija utvrđena između ukupnih fenolnih spojeva i DPPH antioksidacijske aktivnosti te FRAP i DPPH antioksidacijske aktivnosti.
6. Značajan utjecaj na polifenolne spojeve i antioksidacijsku aktivnost imalo je samo vrijeme UVI tretmana, dok se amplitudama u rasponu 60 - 100 % dobivaju slični rezultati. Optimalno vrijeme tretmana unutar ispitivanih raspona amplituda bilo bi 13 minuta.

6. LITERATURA

1. Amadou, I., Amza, T., Shi, Y. H., Le, G. W. (2011) Chemical analysis and antioxidant properties of foxtail millet bran extracts. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **33** (5), 509 - 515.
2. Anonymous (2014) Is Rice Bran Oil Healthy. [online] <<http://www.fitnessvsweightloss.com/is-rice-bran-oil-healthy/>>. Pristupljeno 20. svibnja. 2018.
3. Anonymous (2017) Proso. *Hrvatska enciklopedija Leksikografskog zavoda Miroslav Krleža*. [online] <<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=50701>>. Pristupljeno 24. svibnja 2018.
4. Anonymous (2018) Venus food basket. [online] <<https://venusfoodbasket.com>>. Pristupljeno 20. svibnja. 2018.
5. Anson, N. M., Hemery, Y. M., Bast, A., Haenen, G.R. (2012) Optimizing the bioactive potential of wheat bran by processing. *Food & function* **3** (4), 362 - 375.
6. Apak, R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K.M., Özyürek M., Güçlü K. (2013) Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **85** (5), 957 - 998.
7. Ashokkumar, M., (2011) The characterization of acoustic cavitation bubbles-An overview, *Ultrason Sonochem.* **18**, 864 - 872.
8. Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K., Versteeg, C. K. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innov. Food Sci. Emerg.* **9** (2), 155–160.
9. Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker, D., Youseff, M.M. (2012) Application of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review, *Food Res. Int.* **48** (2), 410 - 427.
10. Bagdi, A., Balázs, G., Schmidt, J., Szatmári, M., Schoenlechner, R., Berghofer, E., Tömösközia, S. (2011) Protein characterization and nutrient composition of Hungarian proso millet varieties and the effect of decortication. *Acta Aliment. Hung.* **40**, 128 - 141.

11. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2005) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.* **99**, 191 - 203.
12. Banerjee, S., Sanjay, K. R., Chethan, S., Malleshi, N. G. (2012) Finger millet (*Eleusine coracana*) polyphenols: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *African Journal of Food Scienc.* **6(13)**, 362-374.
13. Barros L., Falcao S., Baptista P., Freire C., Vilas-Boas M., Ferreira I. C. (2008) Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.* **111**, 61 – 66.
14. Berna, A., Cháfer, A., Montón, J. B. (2001) High-pressure solubility data of the system resveratrol (3) + ethanol (2) + CO₂ (1). *J. Supercrit. Fluids.* **19 (2)**, 133 - 139.
15. Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* **56 (11)**, 317 - 333.
16. Brnčić, M., Markučić, D., Omelić, M., Tripalo, B., Ježek, D. (2009a) Primjena ultrazvuka niskog intenziteta pri otkrivanju stranih tijela u prehrambenim sustavima. *Hrvat. Cas. Prehrambenu Tehnol. Biotehnol. Nutr.* **4**, 18-22.
17. Brnčić, M., Tripalo, B., Ježek, D., Semenski, D., Drvar, N., Ukrainczyk, M. (2006) Effect of twin-screw extrusion parameters on mechanical hardness of direct-expanded extrudates. *Sadhana-Acad.P.Eng.S.* **31(5)**, 527-536.
18. Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T., (2009b) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Croat. J. Food Technol. Biotech. Nutr.* **4**, 32 - 37.
19. Burton G. W., Wallace A. T., Rachie K. O. (1972) Chemical Composition and Nutritive Value of Pearl Millet (*Pennisetum typhoides* (Burm.) Stapf and E. C. Hubbard) Grain1. *Crop Sci.* **12**, 187.
20. Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2010) Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **58 (11)**, 6706 – 6714.

21. Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2011a) Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J. Funct. Foods.* **3**, 144 - 58.
22. Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2011b) Antioxidant phenolics of millet control lipid peroxidation in human ldl cholesterol and food systems. *J. Am. Oil Chem. Soci.* (objavljeno online 20. kolovoza 2012.) doi: 10.1007/s11746-011-1918-5.
23. Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2011c) Antiproliferative potential and DNA scission inhibitory activity of phenolics from whole millet grains. *J. Funct. Foods.* **3**, 159 - 170.
24. Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2012) Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. *J. Funct. Foods.* **4**, 226 - 37.
25. Chemat, F., Khan, M. K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.*, **18 (4)**, 813 - 835.
26. Chen, L., Chen, J., Ren, Zhao, M. (2011) Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *J. Agr. Food Chem.* **59(6)**, 2600 – 2609.
27. Čukelj, N., Ajredini, Š., Krpan, M., Novotni, D., Voučko, B., Vrana Špoljarić, I., Hruškar, M., Ćurić, D. (2015) Bioactives in organic and conventional milled cereal products from Croatian market. *Croat. J. Food Sci. Technol. Biotechnol. Nutr.*, **10 (1-2)**, 23 - 30.
28. Coda, R., Katina, K., Rizzello, C. G. (2015) Bran bioprocessing for enhanced functional properties. *Curr. Opin. Food Sci.* **1**, 50 - 55.
29. Cravotto, G., Cintas, P. (2012) Introduction to sonochemistry: A Historical and Conceptual Overview, U: Handbook on Applications of Ultrasound: Sonochemistry for Sustainability, (Cheng, D., Sharma, S.K., Mudhoo, A., ured.), Taylor and Francis Group, London - New York.
30. Delcour, J. A., Rouau, X., Courtin, C. M., Poutanen, K., Ranieri, R. (2012) Technologies for enhanced exploitation of the healthpromoting potential of cereals. *Trends. Food Sci. Technol.* **25 (2)**, 78 - 86.

31. Demirdöven, A., Baysal, T. (2009) The use of Ultrasound and Combined Technologies in Food Preservation, *Food Rev. Int.* **25**, 1 - 11.
32. Devi, P. B., Vijayabharathi, R., Sathyabama, S., Malleshi, N. G., Priyadarisini, V. B. (2014) Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana* L.) polyphenols and dietary fiber: A review. *J. Food Sci. Technol.* **51** (6), 1021 - 1040.
33. Duodu, K. G. (2014) Effects of processing on phenolic phytochemicals in cereals and legumes. *Cereal Foods World.* **59** (2), 64 -70.
34. Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22 - 33.
35. Dayakar Rao, B., Bhaskarachary, K., Arlene Christina, G. D., Sudha Devi, G., Vilas, A. T. (2017) Nutritional and health benefits of millets. ICAR-Indian Institute of Millets Research (IIMR) Rajendranagar, Hyderabad, 112.
36. Dykes L. i Rooney L. (2007) Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World.* **52**, 105 - 111.
37. Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., Amiri, Z. R. (2014) Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound- assisted extraction methods. *Food Sci. Nutr.* **2** (4), 426 - 435.
38. Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., Cárcel, J. A. (2011) Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Eng. Rev.* **3**, 108 - 120.
39. FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations) (2017) Faostat. [online] <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Pristupljeno 6. lipnja 2018.
40. Graf, E. (1992) Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Bio. Med.* **13** (4), 435 - 448.
41. Gupta, N., Srivastava, A. K., Pandey, V. N. (2012) Biodiversity and nutraceutical quality of some Indian millets. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: *Biol. Sci.* **82** (2), 265 - 273. (objavljeno *online* 30.svibnja 2012.).
42. Gülseren, I., Güzey, D., Bruce, B. D., Weiss, J. (2007) Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrason. Sonochem.* **14**, 173 - 183.

43. Güzey, D., Gülseren, I., Bruce, B., Weiss, J. (2006) Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin. *Food Hydrocolloid.* **20**, 669 - 677.
44. Hag, M. E. E., Tinay, A. H. E., Yousif, N. E. (2002) Effect of fermentation and dehulling on starch, total polyphenols, phytic acid content and in vitro protein digestibility of pearl millet. *Food Chem.* **77**, 193 - 196.
45. Hama, F., Icard-Verniere, C., Guyot, J. P., Picq, C., Diawara, B., Mouquet-Rivier, C. (2011) Changes in micro and macronutrient composition of pearl millet and white sorghum during in-field versus laboratory decortication. *J. Cereal Sci.* **54** (3), 425 - 433.
46. Henglein, A. (1993) Contributions to various aspects of cavitation chemistry. U: Advances in Sonochemistry, 3.izd. (Mason, T. J., ured.), JAI Press, London. str. 17 – 83.
47. Hassimotto N. M. A., Genovese M. I., Lajolo F. M. (2005) Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2928 – 2935.
48. Hemdane, S., Jacobs, P.J., Dornez, E., Verspreet, J., Delcour, J.A., Courtin, C.M. (2016) Wheat (*Triticum aestivum* L.) Bran in Bread Making: A Critical Review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **15**, 28 - 42.
49. Hemery Y., Rouau X., Lullien-Pellerin V., Barron C., Abecassis J. (2007) Dry processes to develop wheat fraction and products whit enhance nutritional quality. *J. Cereal Sci.* **46** (3), 327 - 347.
50. Herceg, Z., Brnčić, M., Režek-Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteza u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* **59**, 65 - 69.
51. Horst, C. (2007) Ultrasound Reactors, U: Modeling of Process Intensification, (Keil, T.J., ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KgaA, Weinheim, str. 193 – 227.
52. Hotz, C., Gibson, R. S. (2007) Traditional food-processing and preparation practices to enhance the bioavailability of micronutrients in plant-based diets. *J. Nutr.* **137** (4), 1097 – 1100.

53. Hughes, D. E., Nyborg, W. L. (1962) Cell disruption by ultrasound. *Science*. **138**, 108 - 114.
54. Kalinová, J., Moudrý, J. (2006) Content and quality of protein in proso millet (*Panicum miliaceum* L.) varieties. *Plant Food. Hum. Nutr.* **61**, 45 - 49.
55. Kamal-Eldin, A., Lærke, H. N., Knudsen, K. E. B., Lampi, A. M., Piironen, V., Adlercreutz, H., Katina, K., Poutanen, K., Åman, P. (2009) Physical, microscopic and chemical characterisation of industrial rye and wheat brans from the Nordic countries. *Food Nutr Res.* **53**, 1912.
56. Katalinić, V., Smole Možina, S., Skroza, D., Generalić, I., Abramovič, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., Boban, M. (2010) Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* **119**, 715 - 723.
57. Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **4 (55)**, 279 - 290.
58. Kentish, S., Ashokkumar, M. (2011) The Physical and Chemical Effects of Ultrasound, U: Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing, (Feng, H., ured.), Food Engineering Series, Springer Science, New York, str. 1 – 12.
59. Leighton, T. G. (2007) What is ultrasound?, *Prog.Biophys. Mol. Biol.* **93**, 3 – 83.
60. Lelas, V. (2006): Nove tehnike procesiranja hrane, *Dairy* **56 (4)**, 311 - 330.
61. Li M., Ge QH. (2012) Early millet use in northern China. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **109 (10)**, 3726 - 3730.
62. Liu, J., Tang, X., Zhang, Y., Zhao, W. (2012) Determination of the volatile composition in brown millet, milled millet and millet bran by gas chromatography/ mass spectrometry. *Molecules.* **17 (3)**, 2271 – 2282.
63. Liu, R. H. (2007) Whole Grain Phytochemicals and Health. *J. Cereal Sci.* **46 (3)**, 207 – 219.

64. Lorimer, J. P., Mason, T. J., Cuthbert, T. C., Brookfield, E. A. (1995) Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. *Ultrason. Sonochem.* **2**, S55 - S57.
65. Lu, H., Zhang, J., Liu, K. B., Wu, N., Li, Y., Zhou, K., Shen, L. (2009) Earliest domestication of common millet (*Panicum miliaceum*) in East Asia extended to 10,000 years ago. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **106 (18)**, 7367 - 7372.
66. Mal, B., Padulosi, S., Ravi, S. B. (2010) Minor millets in South Asia: learnings from IFAD-NUS Project in India and Nepal. Maccarese, Rome, Italy: Bioversity Intl and Chennai, India: M.S. Swaminathan Research Foundation. str. 1 – 185.
67. Maleki, A., Mahvi, A. H., Mesdaghinia, A., Naddafi, K. (2007) Degradation and toxicity reduction of phenol by ultrasound waves. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, **21**, 33 - 38.
68. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79 (5)**, 727 - 747.
69. Mason, T.J., Lorimer, J.P. (2002) Introduction to Applied Ultrasonic. U: Applied Sonochemistry: The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. str. 3 – 4.
70. McClements, D.J. (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing, *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 293 - 299.
71. McDonough, C. M., Rooney, L. W., Serna-Saldivar, S. O. (2000) The millets. U: Handbook of Cereal Science and Technology, 2.izd., (Kulp, K., Ponte, J.G. Jr., ured.), Marcel Dekker, Inc., New York. str. 177 – 202.
72. Middleton Jr, E., Kandaswami, C. (1994) Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol.* **48**, 115 – 119.
73. Miller, H. E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, R. D. A., Kanter, M. (2000) Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**, 312S - 319S.
74. Muthukumar S, Kentish SE, Stevens GW, Ashokkumar M (2006) Application of ultrasound in membrane separation processes: a review. *Rev. Chem. Eng.* **22**, 155 - 194.

75. Newman, C. M. H. i Bettinger, T. (2007) Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene therapy*. [online] **14** (6), 465, <<https://www.nature.com/articles/3302925>>. Pristupljeno 20. svibnja 2018.
76. Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2** (5), 270 - 278.
77. Prückler, M., Siebenhandl-Ehn, S., Apprich, S., Höltinger, S., Haas, C., Schmid, E., Kneifel, W. (2014) Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT- Food Sci. Technol.* **56** (2), 211 - 221.
78. Rachie, K. O. (1975). The millets: importance, utilization and outlook. *Int Crops Res Inst. Semi - Arid Tropics*. Hyderabad, India.
79. Radhika, G., Sathya, R. M., Ganesan, A., Saroja, R., Vijayalakshmi, P., Sudha, V., Mohan, V. (2011) Dietary profile of urban adult population in South India in the context of chronic disease epidemiology (CURES–68). *Public health nutrition*. **14** (4), 591 - 598.
80. Ravindran, G. (1991) Studies on millets: Proximate composition, mineral composition, and phytate and oxalate contents. *Food Chemistry*. **39**, 99 - 107.
81. Robbins, R.J. (2003) Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* **51** (10), 2866 - 2887.
82. Saha, D., Gowda, M. C., Arya, L., Verma, M., Bansal, K. C. (2016) Genetic and genomic resources of small millets. *Crit. Rev. Plant Sci.* **35**, 56 - 79.
83. Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., Yamamoto, T. (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*. **53** (9), 2307 - 2311.
84. Sapkota, B. (2016) Ocular Ultrasonography/ Ophthalmic Ultrasonography (Ocular USG/ Ophthalmic USG/ Ophthalmic Ultrasound/ Ocular Ultrasound). [online] <<https://www.slideshare.net/BikashSapkota/ultrasonography-64783277>>. Pristupljeno 21. svibnja 2018.

85. Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R. M. (1999a) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteau reagent. *Method. Enzymol.* **299**, 1179.
86. Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R. M. (1999b) Flavanoids and other polyphenols. *Method Enzymol.* **299**, 152.
87. Singh N., Singh J., Kaur L., Sodhi N. S., Gill B. S. (2003) Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chem.* **81**, 219 – 231.
88. Singh, K.P., Mishra, A., Mishra, H. N. (2012) Fuzzy analysis of sensory attributes of bread prepared from millet-based composite flours. *Food Sci. Technol.* **48**, 276 - 282.
89. Suslick, K. S. (1988) *Ultrasound: Its Chemical, Physical, and Biological Effects*, VCH Publishers, New York. str. 123 – 163.
90. Swaminaidu, N., Ghosh, S. K., Mallikarjuna, K. (2015) Millets, The miracle grains. *Int. J. Pharma. Bio. Sci.* **6 (4)**, 440 - 446.
91. Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q. A., Sun, D. W. (2014) Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: modeling, optimization and stability of extracts during storage. *Ultrason. Sonochem.* **21 (2)**, 706 - 715.
92. Truswell, AS. (2002) Cereal grain and coronary heart disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**, 1 – 4.
93. Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrient.* [online] **2**, 1231 - 1246, <<http://www.mdpi.com/2072-6643/2/12/1231/htm>>. Pristupljeno 20. svibnja 2018.
94. Ushakumari, S. R., Latha, S., Malleshi, N. G. (2004) The functional properties of popped, flaked, extruded and roller- dried foxtail millet (*Setaria italica*). *Int. J. Food Sci. Technol.* **39 (9)**, 907 - 915.
95. Voučko, B., (2018) Primjena nusproizvoda prehrambene industrije i inovativnih tehnologija u razvoju pekarskih proizvoda za oboljele od celijakije i šećerne bolesti (Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu).

96. Wu, T.Y., Guo, N., Teh, C.Y., Wen Hay, J.X. (2013) Advances in ultrasound technology for environmental remediation, Dordrecht, New York, Springer.
97. Yang, X., Wan, Z., Perry, L., Lu, H., Wang, Q., Hao, C., Li J, Xie F, Yu J, Cui T, Wang T, (2012) Early millet use in northern China. *P. Natl. Acad. Sci.USA*. **109(10)**, 3726 - 3730.
98. Xue, F., Wu, Z., Tong, J., Zheng, J., Li, C. (2017a) Effect of combination of high -intensity ultrasound treatment and dextran glycosylation on structural and interfacial properties of buckwheat protein isolates. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **81**, 1891 - 1898.
99. Xue, Y., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Ruan, S., Wang, Y., Huang, S., Ma, H. (2017b) Effects of ultrasound pretreatment with different frequencies and working modes on the enzymolysis and the structure characterization of rice protein. *Ultrason. Sonochem.* **38**, 19 - 28.
100. Zou, Y., Wang, W., Li, Q., Chen, Y., Zheng, D., Zou, Y., Zhang, M., Zhao, T., Mao, G., Feng, W. (2016) Physicochemical, functional properties and antioxidant activities of porcine cerebral hydrolysate peptides produced by ultrasound processing. *Process Biochem.* **51**, 431 - 443.