



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



SADRŽAJ SPECIJALIZIRANIH METABOLITA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA ZAČINA

DIPLOMSKI RAD

Marko Brajer

Zagreb, rujan, 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Agroekologija: Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

SADRŽAJ SPECIJALIZIRANIH METABOLITA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA ZAČINA

DIPLOMSKI RAD

Marko Brajer

Mentor: doc.dr.sc. Jana Šic Žlabur

Zagreb, rujan, 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Marko Brajer**, JMBAG 27519735851, rođen/a 27.02.1993. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

SADRŽAJ SPECIJALIZIRANIH METABOLITA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA ZAČINA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19)

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Marka Brajera**, JMBAG 27519735851, naslova

SADRŽAJ SPECIJALIZIRANIH METABOLITA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA ZAČINA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | |
|----|----------------------------|--------|
| 1. | doc.dr.sc. Jana Šic Žlabur | mentor |
| 2. | doc.dr.sc. Nataša Hulak | član |
| 3. | prof.dr.sc. Sandra Voća | član |

Zahvala

Ovime zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Jani Šic Žlabur na korisnim savjetima, susretljivosti, pomoći pri odabiru teme i izradi rada. Zahvaljujem se docentici Nataši Hulak što mi je omogućila i značajno pomogla u izradi mikrobiološkog dijela rada. Također, zahvaljujem se tehničkoj suradnici Martini Krilčić i asistentici Sanji Kajić na pomoći prilikom izrade praktičnog dijela rada. Jedno veliko hvala Tomislavu Živku bez kojeg ovaj diplomski rad ne bi bio potpun. Hvala mu na pomoći prilikom prikupljanja uzoraka, savjetima, velikom strpljenju i neprestanoj podršci. Na kraju, hvala mojoj sestri, roditeljima i baki koji su mi uvijek pružali bezuvjetnu podršku.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj rada	2
2. Pregled literature	2
2.1. Upotreba i značaj začina.....	2
2.1.1. Antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje začina	4
2.1.2. Faktori koji utječu na sastav i primjenu začina.....	4
2.2. Morfološke i kemijske karakteristike pojedinih začina.....	5
2.2.1. Češnjak (<i>Allium sativum L. subsp. sativum</i>)	5
2.2.2. Đumbir (<i>Zingiber officinale L.</i>)	7
2.2.3 Kurkuma (<i>Curcuma longa L.</i>).....	9
2.3. Ekstrakcija	11
3. Materijali i metode	12
3.1. Materijal rada.....	12
3.2. Metode određivanja fizikalno-kemijskih parametara	16
3.2.1. Određivanje gustoće otopine.....	16
3.2.2. Određivanje elektroprovodljivosti	16
3.2.3. Određivanje topljive suhe tvari	16
3.2.4. Određivanje ukupne kiselosti.....	17
3.2.5. Određivanje pH vrijednosti.....	18
3.2.6. Određivanje boje ekstrakata začina CIELAB metodom.....	18
3.3. Metode određivanja specijaliziranih metabolita i antioksidacijskog kapaciteta	19
3.3.1. Određivanje sadržaja vitamina C	19
3.3.2. Određivanje ukupnih fenola.....	20
3.3.3. Određivanje flavonoida i neflavonoida.....	22
3.3.4. Određivanje ukupnih karotenoida	24
3.3.5. ABTS metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta.....	25
3.4. Metoda utvrđivanja antimikrobne aktivnosti.....	27
3.4.1. Priprema hranjivih podloga.....	27
3.4.2. Odabir i uzgoj patogenih sojeva	27
3.4.2. Praćenje rasta patogenih sojeva pri dodanoj koncentraciji ekstrakata.....	28
3.4.3. Određivanje brojnosti (CFU vrijednost)	28
3.5. Statistička obrada podataka	28

4. Rezultati i rasprava	29
4.1. Osnovni kemijski sastav i fizikalne karakteristike	29
4.2. Specijalizirani metaboliti i antioksidacijski kapacitet	37
4.2.1. Sadržaj vitamina C	37
4.2.2 Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida	38
4.2.3. Ukupni karotenoidi	41
4.2.4. Antioksidacijski kapacitet	42
4.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata začina	44
4.3.1. Rast patogenih sojeva pri dodanoj koncentraciji ekstrakata	44
5. Zaključak	46
6. Popis literature	47
7. Prilog	52
Životopis	55

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Marka Brajera**, naslova

SADRŽAJ SPECIJALIZIRANIH METABOLITA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA ZAČINA

Začini i općenito aromatično bilje, izvor su različitih specijaliziranih metabolita, bioaktivnih komponenata, posebice polifenolnih spojeva koji pokazuju značajno antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje. Izolacija navedenih spojeva iz aromatičnog bilja predstavlja velik izazov, ponajprije zbog postupaka koji često mogu uzrokovati i njihovu degradaciju. Stoga se danas sve više primjenjuju neinvazivne metode poput ultrazvukom potpomognute ekstrakcije koja omogućuje izolaciju relativno velike mase uzorka u kratkom vremenu. Cilj ovog rada bio je utvrditi fizikalno-kemijska svojstva i sadržaj specijaliziranih metabolita u ekstraktima začina praha češnjaka, kurkume i đumbira uspoređujući klasičnu i ultrazvučnu ekstrakciju pri tri različite temperature (21,7, 40 i 70 °C). Također, utvrditi antimikrobnu aktivnost navedenih ekstrakata prateći sposobnost preživljavanja patogenih sojeva *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*. Istraživanjem su određeni sljedeći fizikalno-kemijski parametri: gustoća otopine, elektroprovodljivost otopine, topljiva suha tvar (TST), ukupne kiseline, pH vrijednost, boja; specijalizirani metaboliti: sadržaj vitamina C, ukupnih fenola (flavonoida i neflavonoida), ukupnih karotenoida te antioksidacijski kapacitet i antimikrobna aktivnost ekstrakata začina. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da su ekstrakti češnjaka, đumbira i kurkume bogati sadržajem specijaliziranih metabolita, posebice fenolnim spojevima te visokog antioksidacijskog kapaciteta. Način ekstrakcije i upotreba viših temperatura utjecali su na parametre osnovnog fizikalno-kemijskog sastava i sadržaja specijaliziranih metabolita prilikom čega je primjena ultrazvučnog tretmana (35 kHz i 140 W) i viših temperatura (40 i 70 °C) u vremenskom razdoblju od 30 minuta dovela je do povećanja sadržaja topljive suhe tvari, fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, neflavonoida) i karotenoida u analiziranim uzorcima. S druge strane, ultrazvuk je pozitivno utjecao na sadržaj vitamina C u uzorcima, ali se pri višim temperaturama sadržaj istog reducirao. Dodana koncentracija ekstrakata đumbira i kurkume nije pokazala značajan antimikrobni učinak na odabrane patogene sojeve, dok je ekstrakt češnjaka pokazao potencijalni antimikrobni utjecaj na rast i brojnost formiranih kolonija bakterije *L. monocytogenes*.

Ključne riječi: začini, ekstrakcija, specijalizirani metaboliti, antioksidacijski kapacitet, antimikrobna aktivnost

Summary

Of the master's thesis - student **Marko Brajer**, entitled

CONTENT OF SPECIALIZED METABOLITES AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SPICES EXTRACTS

Spices and generally aromatic herbs are the source of various specialized metabolites, bioactive components, especially polyphenolic compounds, which have significant antioxidant and antimicrobial activity. The isolation of these compounds from plant material is a great challenge, primarily because of processes that can often cause their degradation. Therefore, non-invasive methods such as ultrasound assisted extraction, which enables the isolation of a relatively large sample mass in a short time, are increasingly being used today. The aim of this study was to determine the physico-chemical properties and content of specialized metabolites in garlic, turmeric and ginger spice extracts by comparing classical and ultrasonic extraction at three different temperatures (21.7 , 40 and 70 °C). Also, to determine the antimicrobial activity of these extracts by following the viability of pathogenic strains of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. The study determined the following physico-chemical parameters: solution density, solution conductivity, total soluble solids (TST), total acids, pH value, color; specialized metabolites: vitamin C content, total phenols (flavonoids and neflavonoids) content, total carotenoids, antioxidant capacity and antimicrobial activity of spice extracts. According to the obtained results, it can be concluded that garlic, ginger and turmeric extracts are rich in specialized metabolites, especially phenolic compounds and also exhibit a high antioxidant capacity. The extraction method and the use of higher temperatures influenced on the parameters of the basic physico-chemical composition and content of specialized spice metabolites whereby the application of ultrasonic treatment (35 kHz and 140 W) and higher temperatures (40 and 70 °C) in time interval of 30 minute had increased the content of TST, phenolic compounds (total phenols, flavonoids, neflavonoids) and carotenoids in the analyzed samples. On the other hand, ultrasound had a positive effect on the vitamin C content of the samples, but at higher temperatures the content significantly decreased. The added concentration of ginger and turmeric extracts did not show a significant antimicrobial effect on selected pathogenic strains, while garlic extract showed a potential antimicrobial effect on the growth and abundance of *L. monocytogenes* colonies formed.

Keywords: spices, extraction, specialized metabolites, antioxidant capacity, antimicrobial activity

1. Uvod

Začine i općenito aromatično bilje čovjek je od davnina iskorištavao u različite svrhe. Koliku su važnost imali začini kroz povijest govori nam činjenica da su se zbog njih organizirala daleka putovanja u nepoznato, vodili ratovi i uništavale cijele civilizacije (Kozarić, 2011).

Najveći broj začina su proizvodi biljnog porijekla, svojstvenog mirisa i okusa, koji se dodaju hrani ili prehrambenim proizvodima i pićima radi postizanja odgovarajućeg mirisa, okusa i boje. Ispoljavaju značajno antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje zbog čega se upotrebljavaju kao prirodni konzervansi (Silva i sur., 2013). Također, česti su sastojci kozmetičkih preparata i parfema zbog svog karakterističnog mirisa, ali i ljekovitih pripravaka dokazano povoljnog djelovanja na ljudsko zdravlje (Lesinger, 2012).

Kao začini koriste se dijelovi začinskih biljaka kao što su korijen, kora, list, cvjetni pupoljak, tučak, plod ili sjeme. Koriste se u svježem obliku, osušeni, usitnjeni, pretvoreni u prah i kao ekstrakti aromatičnih sastojaka (Josipović i sur., 2016). Ekstrakti začina su proizvodi koji su dobiveni različitim postupcima izolacije aromatičnih i drugih sastojaka iz začinskih biljaka, odnosno njihovih pojedinih dijelova.

Kemijski sastav začina je vrlo složen, a svaki začin posjeduje neki specifičan i dominantan sastojak, bioaktivnu tvar. Sastojci kemijskog sastava začina općenito uključuju proteine, škrob, šećere i veliki broj drugih organskih molekula. Među važnije komponente kemijskog sastava začina ubrajamo grupe hlapljivih komponenata (eterična ulja), smole, estere, fenole, terpene, alkohole, organske kiseline, alkaloide i spojeve sa sumporom. Specifična aroma začina potječe od eteričnih ulja, a oštar i ljut okus od alkaloida i glukozida te produkata njihove hidrolize. Antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje začina je različito i ovisi o koncentraciji i vrsti specijaliziranih metabolita poput fenola, flavonoida, prirodnih pigmenta i terpena (Josipović i sur., 2016).

Izolacija kemijskih spojeva iz začinskog bilja predstavlja velik izazov ponajprije zbog procesa koji izazivaju njihovu degradaciju. Danas postoji velik broj ekstrakcijskih metoda koje se koriste za izolaciju kemijskih komponenti iz začina. Metoda ultrazvučne ekstrakcije jedna je od novijih tehnika koja ima značajne prednosti nad klasičnom ekstrakcijom (Caili i sur., 2006). Karakterizira ju uporaba ultrazvučnih valova visokog intenziteta i nižih frekvencija, pri čemu uslijed djelovanja kavitacije dolazi do degradacije staničnih struktura poput stjenke i membrane, a time i posljedično do oslobađanja topljivih sastojaka u okolni medij (otapalo). Ultrazvučna ekstrakcija karakterizirana je kao brza i jednostavna metoda koja omogućuje ekstrakciju relativno velike mase uzorka u kratkom vremenu (Drmić, 2010). Osim u svrhu ekstrakcije, ultrazvuk je između ostalog pokazao i učinkovito djelovanje na inaktivaciju mikroorganizama, no u postupcima ultrazvučne sterilizacije postoje i brojna ograničenja, a koja prije svega uključuju potrebu kombinacije upotrebe ultrazvuka i topline, termosonifikaciju, kao efikasan tretman u redukciji mikroorganizama (Šic Žlabur, 2015).

1.1. Cilj rada

Utvrditi fizikalno-kemijska svojstva i sadržaj specijaliziranih metabolita u ekstraktima začina praha češnjaka, kurkume i đumbira. Također, utvrditi antimikrobnu aktivnost navedenih ekstrakata prateći sposobnost preživljavanja patogenih sojeva *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*.

2. Pregled literature

2.1. Upotreba i značaj začina

Začinsko bilje počelo se uzgajati prije više tisuća godina u Egiptu, Kini, Indiji, Arabiji, Perziji i Grčkoj. Stare civilizacije su već znale da korištenjem začina i biljnih vrsta mogu očuvati trajnost hrane. Danas se u svijetu koristi više od stotinu poznatih začina i različitih začinskih mješavina (Kozarić, 2011).

Začini se primjenjuju u manjim količinama, pa su i s time njihove prehrambene vrijednosti jako male ili zanemarive. No, izvor su različitih kemijskih komponenti koji u određenoj količini pridonose aromi, boji i očuvanju namirnica pa su zbog toga svoju primjenu našli prvenstveno u kulinarstvu i prehrambenoj industriji. Također, jedan veći dio začina primjenjuje se u kozmetici, proizvodnji parfema, medicini i zaštiti bilja. Poboljšavanje senzornih karakteristika hrane je jedna od glavnih primjena začina. Zbog porasta kulinarskih ideja i gastronomske ponude, danas je sve veća potražnja za začinama koji bi određenu hranu podigli na višu razinu. Gotovo svaki začin je zaslužan za kulinarski identitet u određenim regijama u svijetu. Tako je poznato da se u Meksiku koriste začini poput cimeta, vanilije i čilija. U Engleskoj se koriste đumbir, sjemenke gorušice, klinčić i korijandar. Francuska je pak poznata po različitim začinama kao što su estragon, ružmarin i timijan (De La Torre i sur., 2015). Indija, kao najveći svjetski proizvođač i potrošač začina, poznata je po kurkumi, đumbiru, kimu i kariju. U Hrvatskoj se najčešće koriste majčina dušica, kopar, ružmarin, lavanda, češnjak, kadulja, peršin, lovorov list, bosiljak i paprena metvica (Kamenjarin, 2002). Začini se mogu dodavati mesu, salatama, juhama, umacima, marinadama i drugim jelima. Veći dio njih praktičnije je prilikom kuhanja upotrebljavati u osušenom i usitnjenom obliku. Oni, osim što jelima daju ugodan miris i poboljšavaju okus, pospješuju i lučenje probavnih sokova i jačaju apetit. No, preintenzivno konzumiranje začina može imati i negativne posljedice na ljudski organizam (Grlić, 2005).

Primjena začina u prehrambenoj industriji temelji se na poboljšanju senzornih i teksturalnih svojstva konačnog proizvoda. Također, produžuje se trajnost namirnice zbog sadržaja specijaliziranih metabolita koji imaju dokazano antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje. Danas na tržištu postoji veliki broj proizvoda u kojima su začini jedni od glavnih sastojaka. To su najčešće mliječni i suhomesnati proizvodi, proizvodi od voća i povrća, različita pića i slastice.

Začini, tako imaju višestruku ulogu u tehnologiji suhomesnatih proizvoda. Eterična ulja iz začina daju mesnim prerađevinama karakterističan okus, a mnogi drugi spojevi djeluju antimikrobno i na taj način sprječavaju razvoj bakterija i kvarenje (Kozarić, 2011). Svaki tradicionalni suhomesnati proizvod zahtijeva određeni sastav začina čijom se kombinacijom dobiva karakterističan okus i miris konačnog proizvoda.

Tako se kod tradicionalne proizvodnje kulena usitnjenom mesu dodaje kuhinjska sol, slatka začinska paprika, ljuta začinska paprika i usitnjeni češnjak. Oni u konačnici utječu na razvoj okusa, aromu i boju proizvoda, a začini poput začinske paprike i češnjaka inhibiraju rast patogenih mikroorganizama, dok neki sastojci djeluju kao antioksidansi (Roca i sur., 1990). Začine i ekstrakte moguće je koristiti i u proizvodnji mliječnih proizvoda poput tvrdih sireva, svježeg sira, jogurta ili sirnih namaza (Josipović i sur., 2016).

Začini mogu ubrzati zrenje sireva, poboljšati senzorne karakteristike i inhibirati rast patogenih mikroorganizama, uzročnika kvarenja hrane. Hayaloglu i Fox (2008) utvrdili su da začini koji su dodani siru smanjuju pH vrijednost, povećavaju sadržaj ukupnih kiselina te na taj način stimuliraju rast bakterija mliječne kiseline prisutnih u sirovom mlijeku. Time se ubrzalo zrenje i utjecalo na senzorne karakteristike sira. Tako su i El-Aziz i sur. (2012) utvrdili da se dodatkom ekstrakta đumbira u meki sir smanjuje pH vrijednost sira što dovodi do povećanja *Lactococcus* bakterija i s time bržeg zrenja. Dodani ekstrakt đumbira inhibirao je rast kvasaca i plijesni te time produžio trajnost sira.

Zbog izvora različitih biljnih pigmenata, začini se u prehrambenoj industriji često koriste i kao prirodna bojila. Za boju, najviše su zaslužni karotenoidi kao što su beta karoten, lutein i neoksantin (Bartley i Scolnik, 1995). Začini koji se najčešće koriste kao prirodna bojila su paprika, kurkuma i đumbir.

Osim u kulinarstvu i prehrambenoj industriji, začini se mogu upotrebljavati u medicini. Bioaktivne komponente u nekim začinima mogu imati povoljan učinak na probavu, protuupalni efekt i upotrebljavati se kao analgetici. Također, poznata je i primjena eteričnih ulja u aromaterapiji (Peter i Shylaja, 2012).

Uloga začina u kozmetičkoj industriji i proizvodnji parfema temelji se na upotrebi eteričnih ulja različitih začina čime se postiže karakterističan i primamljiv miris parfema, sapuna, losiona, krema i dr. (Ravindran, 2017).

Određeni začini, također imaju potencijalno insekticidno djelovanje pa se koriste u zaštiti bilja. To su uglavnom kompleksi kemijski spojevi, male molekularne mase poput terpenoida. Nemaju negativan utjecaj na sisavce i okoliš, pa predstavljaju alternativna sredstva u suzbijanju bolesti i štetnika (De La Torre i sur., 2015).

2.1.1. Antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje začina

Kvarenje hrane danas je čest i ozbiljan problem, a predstavlja nepovratnu promjenu u hrani koja ju čini neprikladnom za konzumaciju. Uzroci takvih promjena mogu biti fizikalni poput temperature, svjetla ili kisika te biološki poput enzimatske aktivnosti ili mikrobnog rasta (Bukvicki i sur., 2016). Danas, prehrambena industrija koristi različite sintetske antioksidanse kako bi spriječila oksidaciju lipida, jedan od glavnih problema u kvarenju hrane. No, upotreba sintetskih antioksidansa upitne je sigurnosti za ljudsko zdravlje, pa potrošači sve više zahtijevaju prirodnije sastojke.

Antioksidacijska aktivnost začina pripisuje se različitim kemijskim komponentama, a posebice fenolnim spojevima, vitaminu C, vitaminu E i karotenoidima (Pricina i Karklina, 2014). Oni hvatanjem slobodnih radikala i njihovom neutralizacijom štite lipoproteine od oksidacije i pojačavaju aktivnost antioksidacijskih enzima što u konačnici produžuje trajnost namirnice (Rubio i sur., 2013).

Drugi glavni problem u sigurnosti i kvaliteti hrane predstavlja kvarenje hrane uzrokovane mikrobnim rastom. Namirnice koje su najpogodnije za rast patogenih mikroorganizama su mliječni i suhomesnati proizvodi. Meso i proizvodi od mesa često mogu biti kontaminirani patogenim mikroorganizama od koji su najčešći *Escherchia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* i *Yersinia enterocolitica* (De La Torre i sur., 2015). Poznato je da niz začina danas ima dokazan antimikrobni učinak koji se uglavnom pripisuje eteričnim uljima i nekim fenolnim spojevima. Najznačajniji sastojci eteričnih ulja su grupe cikličkih i ravnolančanih terpenskih ugljikovodika, monoterpenskih alkohola te monoterpenskih ugljikovodika (Josipović i sur., 2016). Mehanizmi djelovanja na mikroorganizme su različiti i uključuju: poremećaj membranskih funkcija i strukture, prekid sinteze RNA/DNA, indukciju koagulacije citoplazmatskih sastojaka i ometanje normalne funkcije stanica (Radulović i sur., 2013).

2.1.2. Faktori koji utječu na sastav i primjenu začina

Kemijski sastav, a time i primjena začina ovise o kvaliteti začina, odnosno kvaliteti biljke. Na kvalitetu začina može se utjecati pravilnim načinom uzgoja. Povoljna klima, tlo i stručno znanje mogu dati najbolje rezultate. Nadalje, začinsko bilje potrebno je oprezno brati, kako ne bi došlo do smanjenog učinka djelatnih tvari. Također, veliku ulogu ima pravilna dorada (najčešće sušenjem) i skladištenje. Tako, zbog načina sušenja na otvorenom ili u zatvorenim sušnicama pri temperaturi od 40 °C, začini često mogu biti kontaminirani mikroorganizmima što smanjuje njihov antimikrobni učinak (Škrinjar i Tešanović, 2007). S druge strane, ekstrakti začina imaju manji broj mikroorganizama pa je njihova primjena češća. Kako bi se očuvale arome začini se moraju pravilno skladištiti u suhim prostorijama, s dobrim provjetranjem, te tijekom transporta biti pravilno pakirani i odvojeni od direktnog djelovanja sunčeve svjetlosti (Lesinger, 2012). Svi ovi parametri utjecat će u konačnici na sastav začina, njegovo djelovanje i okus.

2.2 Morfološke i kemijske karakteristike pojedinih začina

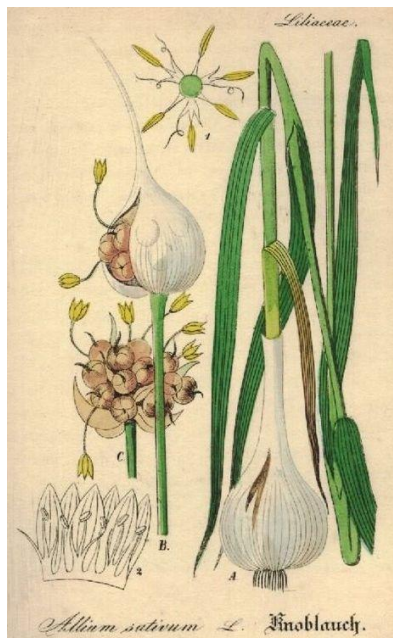
2.2.1. Češnjak (*Allium sativum* L. subsp. *sativum*)

Češnjak je biljka iz porodice Alliaceae koja potječe iz središnje Azije. Detaljna botanička pripadnost vrste češnjaka prikazana je u Tablici 1. Uzgaja se gotovo svuda, a osobito u južnoj Europi, našim krajevima, Tajvanu, Kini i SAD-u.

Tablica 1. Sistematika češnjaka (Parađiković, 2009)

CARSTVO	Plantae
PODCARSTVO	Magnoliophyta
RAZRED	Liliopsida
RED	Asparagales
PORODICA	Alliaceae
ROD	<i>Allium</i>
VRSTA	<i>Allium sativum</i> L.

Zeljasta je trajnica koja može narasti do 70 cm visine. Razmnožava se režnjevima lukovice iz kojeg u proljeće izraste okrugla duga stabljika. Na vrhu stabljike razvijaju se crvenkasto bijeli cvjetovi tvoreći štitasti cvat, iz kojeg se razvijaju rasplodne lučice. Listovi su plosnati i široki, plavkasto zelene boje (Kolovrat, 2006). Podzemna lukovica sastavljena je od manjih češnjeva obavijenih ovojnicom. Kao začim upotrebljava se lukovica. (Borovac, 2005, Kozarić, 2011).



Slika 1. Morfologija češnjaka (www.luminescents.net)

Utvrđeno je da češnjak sadrži više od 200 aktivnih tvari u koncentriranom obliku, a najviše ih ima u lukovici. Bogat je vitaminima, mineralnima i metabolitima poput adenzina, alicina, biljnih vlakana i masti, vitamina A, vitamina B1 i B2, vitamina C, željeza, enzima, eteričnih ulja, joda, kalcija, selena, sumpora i fosfata (Parađiković, 2009). Izvor je različitih specijaliziranih metabolita, odnosno tvari koje se sintetiziraju sekundarnim reakcijama iz primarnih metabolita biljke. Najvažniji sekundarni metaboliti su fenolni spojevi, terpeni i aldehidi.

Fenolni spojevi su najbrojnija skupina sekundarnih metabolita i prema strukturi spojeva dijele se na fenolne kiseline, flavonoide i neflavonoide. Oni su važni zbog svog antioksidacijskog djelovanja i sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Balasundram i sur., 2006). Od fenolnih kiselina u češnjaku su najzastupljenije p-kumarinska, ferulinska, sinapinska i kafeinska kiselina. Od flavonoida utvrđeni su mirecetin, apigenin, kemferol i apigenin (Gorinestein i sur., 2008).

Karakterističan miris i okus češnjaka potječe od alina, alicina, ajoena i drugih organskih sumpornih spojeva (Tiwari, 2011). Alicin je ujedno odgovoran za antimikrobno djelovanje češnjaka. Nastaje hidrolizom alina, a može savladati barijeru gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, kvasaca i plijesni, ući u stanicu i inhibirati njen rast. Za djelovanje alicina odgovornim se smatraju njegove reakcije sa cisteinom, te nekim enzimima sa tiolnom skupinom. (Josipović i sur., 2016). Dokazano je da su različiti ekstrakti češnjaka, kao i prah djelotvorniji u suzbijanju mikroorganizama od svježeg češnjaka. Ekstrakti češnjaka pokazali su se pouzdani u suzbijanju gram pozitivnih bakterija *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pneumoniae* i gram negativnih bakterija *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* (Rainy i sur., 2014).

2.2.2. Đumbir (*Zingiber officinale* L.)

Đumbir je trajnica iz porodice Zingiberaceae (Tablica 2) i smatra se da potječe s Bismarckova otočja. Najviše se uzgaja na Jamajci, Indiji i u zapadnoj Africi (Kozarić, 2011).

Tablica 2. Sistematika đumbira (Plantea, 2019.)

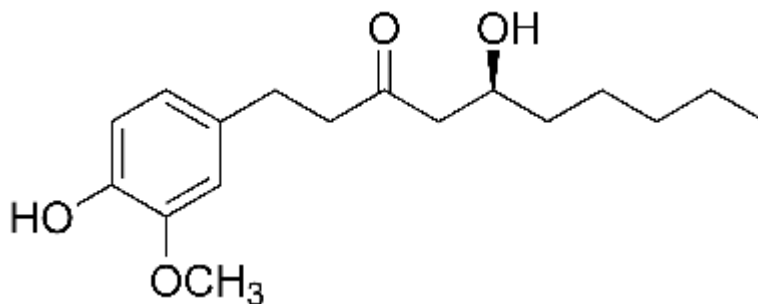
CARSTVO	Plantae
PODCARSTVO	Magnoliophyta
RAZRED	Liliopsida
RED	Zingiberales
PORODICA	Zingiberaceae
ROD	<i>Zingiber</i>
VRSTA	<i>Zingiber officinale</i> L.

U tlu se nalazi kao debeo, dugačak, vodoravno položen i često razgranat podanak. Iz podanaka izbijaju visoke stabljike do 1 m s kopljastim zelenim listovima. Na vrhu stabljike nalazi se cvat koji je sastavljen od žutih ljevkastih cvjetova. Ispod cvata nalaze se izduženi zeleni ili žuti listovi (Kozarić, 2011). Plod je kapsula koja je podijeljena na tri dijela te sadrži brojne sjemenke. Razmnožava se dijeljenjem podanaka (rizoma) u proljeće. Kao začim koriste se članci podanaka koji se prvo kuhaju, a nakon toga suše na suncu (Plantea, 2016).



Slika 2. Morfologija đumbira (www.pinterest.com)

Đumbir sadrži preko 400 različitih kemijskih spojeva, od kojih su glavnih sadržani u rizomu i to ugljikohidrati, lipidi, terpeni i fenolni spojevi (Grzanna i sur., 2005). Najzastupljeniji polifenoli u đumbiru, ujedno odgovorni za aromatičan i ljut okus đumbira su gingeroli (Slika 3), paradoli, shogali i zingeroni. Također, utvrđeni su vitamini poput nikotinske kiseline, vitamina A, vitamina C kao i različitih minerala (Prasad i Tyagi, 2015).



Slika 3. Struktura gingerola (www.scienceofcooking.com)

Osim što pridonose aromi, fenolni spojevi u đumbiru pokazuju značajno antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje. Shogalu se tako pripisuje značajan antioksidacijski učinak, dok se paradolu, zingeronu pripisuje antimikrobni i antioksidacijski učinak (Chung i sur., 2001; Masuda i sur., 2004; Park i sur., 2006; Manjunatha i sur., 2013). Brojna istraživanja potvrđuju antimikrobni učinak đumbira na patogene mikroorganizme, uzročnike kvarenja hrane (Thongson i sur., 2005; Grace Santo i sur., 2017; Njobdi i sur., 2018). No, utvrđeno je da viša temperatura, koncentracija ekstrakta đumbira i vrsta otapala ima značajan utjecaj na antimikrobnu aktivnost fenolnih spojeva đumbira. Tako su Nas i sur. (2018) prateći zonu inhibicije ekstrakta đumbira na *Salmonella typhi*, *Shigella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* utvrdili puno manju inhibiciju pri manjim koncentracijama u usporedbi s većim koncentracijama ekstrakta. Također, utvrđeno je da se kao ekstrakcijsko otapalo najbolje pokazao heksan, dok najlošije destilirana voda. Pankaj i sur. (2012) utvrdili su da ekstrakti đumbira gube svoju antimikrobnu aktivnost nakon tretmana višim temperaturama.

2.2.3 Kurkuma (*Curcuma longa* L.)

Kurkuma je višegodišnja biljka, po izgledu slična đumbiru. Pripada u porodicu Zingiberaeae (Tablica 3). Pronađena je u Indiji, a u Europu je dospjela još u srednjem vijeku. Danas raste i uzgaja se u Indiji, Kini, Tajvanu, Indoneziji, Filipinima i Vijetnamu (Kozarić, 2011).

Tablica 3. Sistematika kurkume (Plantea, 2016)

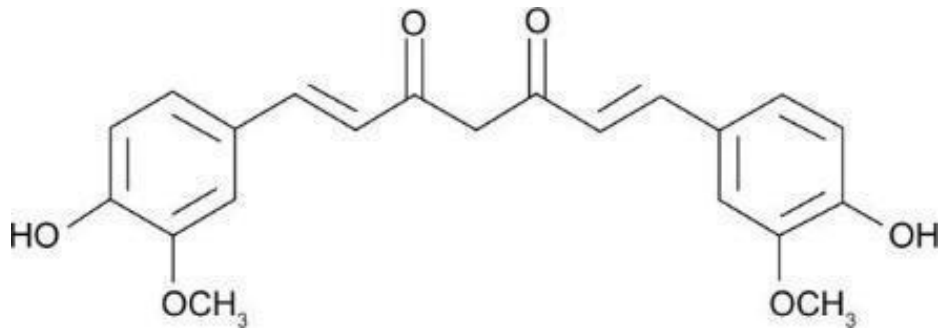
CARSTVO	Plantae
PODCARSTVO	Magnoliophyta
RAZRED	Liliopsida
RED	Zingiberales
PORODICA	Zingiberaceae
ROD	<i>Curcuma</i>
VRSTA	<i>Curcuma longa</i> L.

Biljka je zeljaste stabljike koja može doseći visinu od 1 m. Listovi izbijaju iz podanka i naizmjenično su raspoređeni u dva reda, duljine i do dva metra. U njenom središnjem dijelu nalazi se žuto-bijeli obojeni cvat sastavljen od mnoštva cvjetova na 10 do 15 cm dugim cvjetnim stapkama. Podanak je cilindričnog oblika, žuto-narančaste boje i završava sa čupavim korijenjem. Kao začin koristi se osušeni podanak (Car, 2018).



Slika 4. Morfologija kurkume (www.pinterest.com)

U kemijskom sastavu podanka kurkume nalaze se ugljikohidrati, proteini i masti. Od vitamina dominira provitamin A iz skupine karotenoida, vitamin C, vitamin B6 te minerali: magnezij, kalij, natrij i željezo (Car, 2018). Dva najvažnija specijalizirana metabolita kurkume su fenolni kurkuminoidi i eterična ulja. Kurkuminoidi su zaslužni za žutu boju rizoma kurkume, dok su eterična ulja zaslužna za aromu i okus (Stanojević i sur., 2015). Najpoznatiji kurkuminoidi su kurkumin (Slika 5), demetoksikurkumin i bisdemeteoksikurkumin (Niranjan i Prakash, 2008).



Slika 5. Struktura kurkumina (izvor: Farazuddin i sur. 2014)

Kurkuminoidi pokazuju značajna antioksidacijska svojstva mehanizmom hvatanja slobodnih radikala i inhibicijom lipidne peroksidacije (Sreejayan i sur., 1997). Osim antioksidacijih svojstva, kurkuminoidi pokazuju i antimikrobni učinak koji se najčešće pripisuje kurkuminu (Naz i sur., 2010). Tako su Niamsa i Sittiwet (2009) istraživali antimikrobnu aktivnost vodenog ekstrakta kurkume na sojeve gram pozitivnih bakterija *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus plantarum* i sojeve gram negativnih bakterija *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salomonella typhimurium*. Utvrdili su zonu inhibicije, ali samo kod većih koncentracija ekstrakta, dok kod manjih koncentracija ekstrakta nije utvrđena inhibicijska zona. I ostali autori utvrdili su antimikrobnu aktivnost ekstrakta kurkume pri većim koncentracijama (Kim i sur., 2005; Gul i Bakht, 2015).

2.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je proces izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese pomoću prikladnog otapala u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od ostalih sastojaka smjese (Lovrić, 2003). Ekstrakcijom se mogu izolirati kemijske komponente iz svih dijelova biljaka u određenom vremenu. Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o topljivosti komponente u otapalu, temperaturi ekstrakcije, viskoznosti i volumnom protoku otapala te površini tvari izloženoj otapalu (Drmić, 2010). Ekstrakcijska otapala koja se najviše primjenjuju su voda, etanol, metanol, aceton i biljna ulja. Izbor otapala će ovisiti o polarnosti kemijskih komponenata koje se žele izolirati. Viša temperatura može poboljšati topljivost komponente i brzinu difuzije u otapalu, no previsoke temperature mogu uzrokovati degradaciju ili ekstrakciju nepoželjnih komponenti. Cilj svake ekstrakcije je skratiti vrijeme trajanja, povećati prinos i smanjiti degradaciju izoliranih komponenata. Iako su se klasične metode ekstrakcije pokazale učinkovite, danas se sve više primjenjuju relativno novije metode ekstrakcije, poput primjene ultrazvuka.

Metoda ultrazvučne ekstrakcije nastoji smanjiti upotrebu otapala, ograničiti povišenje temperature tijekom tretmana te u konačnici dobiti veći prinos ekstrahiranih tvari. Mehanizam djelovanja ultrazvučne ekstrakcije temelji se na primjeni ultrazvuka visokog intenziteta od 1 W/cm^2 i frekvencija između 18 i 100 kHz. Ultrazvuk visokog intenziteta smatra se snažnim ultrazvukom jer uzrokuje pojavu prijelazne kavitacije. Kavitacija uključuje nastajanje, rast i nagli raspad mjehurića u tekućini. Uslijed djelovanja kavitacije na stanicu, dolazi do pucanja stanične stijenke što potiče oslobađanje topljivih sastojaka iz uzorka u otapalo. Na taj način se ubrzava ekstrakcija i povećava njena efikasnost (Drmić, 2010).

3. Materijali i metode

3.1. Materijal rada

Za ovo istraživanje korišteni su prah češnjak iz ekološkog uzgoja u blizini Zagreba te prah đumbira i kurkume iz specijalizirane trgovine začinskog bilja u Zagrebu. Korišteni češnjak posađen je u rujnu 2015. godine, a berba je obavljena početkom kolovoza 2016. godine. Odmah nakon berbe, češnjak je s imanja dostavljen u Zavod za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje je očišćen te nožem ručno narezan na tanke ploške. Sušen je konvekcijskim postupkom u laboratorijskom sušioniku „INKO“ ST40 (Hrvatska) na temperaturi od 60 °C do postizanja konstantnog sadržaja suhe tvari od 89,8 %. Osušeni češnjak usitnjen je laboratorijskim mlinom „IKA“ MF-10 (Njemačka) do praškaste konzistencije te skladišten u staklenoj ambalaži.

Prahovi đumbira i kurkume su odmah nakon kupnje u svibnju 2019. dostavljeni na Zavod za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport Agronomskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Prah đumbira porijeklom je iz Pakistana, dok prah kurkume iz Indije.

Ekstrakti su pripremani na način da je na analitičkoj vagi „Sartorius“ BP221S odvagano prah češnjaka, đumbira i kurkume u količini od 4 g, te je prah stavljen u laboratorijsku čašu volumena 300 mL. U čašu je zatim kao otapalo dodano 250 mL destilirane vode sobne temperature (21,7 °C), te ugrijane na 40 °C i 70 °C. Dizajn eksperimenta klasične i ultrazvučne ekstrakcije prikazan je u Tablici 4.



Slika 6. Odvagani uzorci praha češnjaka, đumbira i kurkume

Tablica 4. Dizajn eksperimenta klasične i ultrazvučne ekstrakcije praha češnjaka

Način ekstrakcije	Otapalo	Volumen otapala (mL)	Vrijeme	Temperatura (°C)	Ultrazvučna kupelj	Uzorak
Klasična	dH ₂ O	250	30 min	21,7	-	ČK1
Klasična	dH ₂ O	250	30 min	40	-	ČK2
Klasična	dH ₂ O	250	30 min	70	-	ČK3
Klasična	dH ₂ O	250	30 min	21,7	-	ĐK1
Klasična	dH ₂ O	250	30 min	40	-	ĐK2
Klasična	dH ₂ O	250	30 min	70	-	ĐK3
Klasična	dH ₂ O	250	30 min	21,7	-	KK1
Klasična	dH ₂ O	250	30 min	40	-	KK2
Klasična	dH ₂ O	250	30 min	70	-	KK3
UZV	dH ₂ O	250	30 min	21,7	35 kHz 140 W	ČU1
UZV	dH ₂ O	250	30 min	40	35 kHz 140 W	ČU2
UZV	dH ₂ O	250	30 min	70	35 kHz 140 W	ČU3
UZV	dH ₂ O	250	30 min	21,7	35 kHz 140 W	ĐU1
UZV	dH ₂ O	250	30 min	40	35 kHz 140 W	ĐU2
UZV	dH ₂ O	250	30 min	70	35 kHz 140 W	ĐU3
UZV	dH ₂ O	250	30 min	21,7	35 kHz 140 W	KU1
UZV	dH ₂ O	250	30 min	40	35 kHz 140 W	KU2
UZV	dH ₂ O	250	30 min	70	35 kHz 140 W	KU3

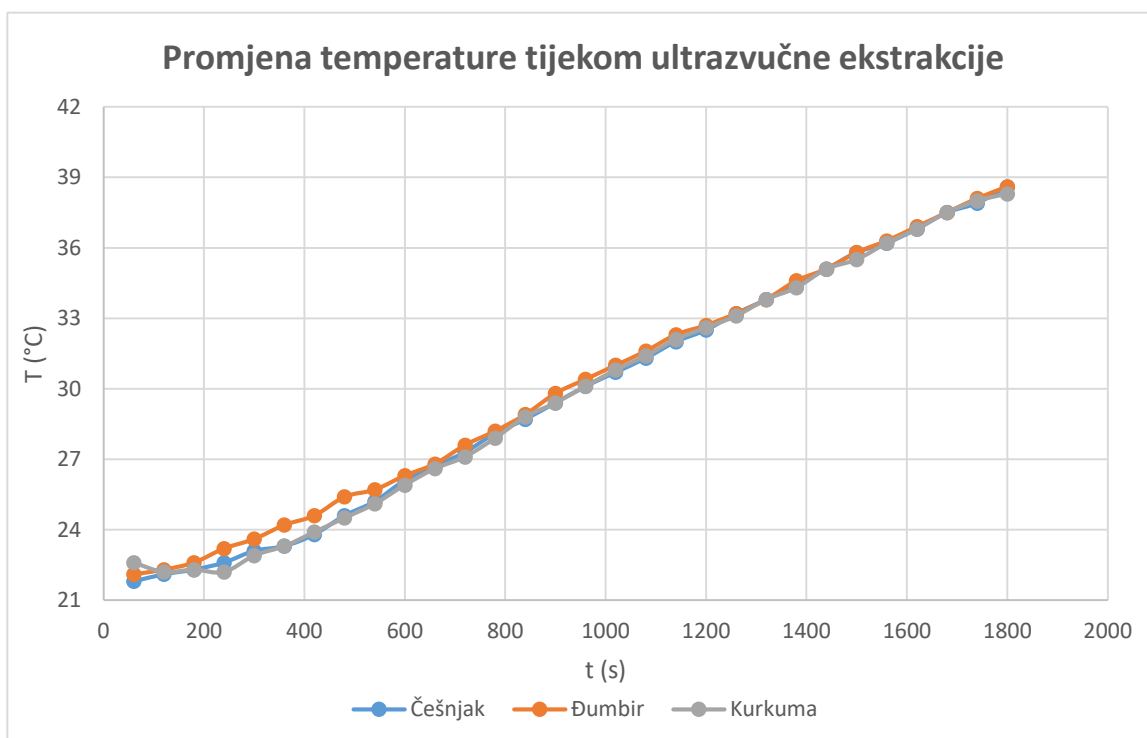
Uzorci ekstrahirani klasičnom ekstrakcijom ostavljeni su stajati uz povremeno miješanje pri variranim temperaturama (sobnoj 21,7, 40 i 70 °C) u vremenskom razdoblju od 30 minuta. Nakon 30 minuta svi uzorci su profiltrirani preko običnog, Whatmanovog filter papira kako bi se odvojila kruta faza i dobio tekući ekstrakt začina.

Uzorci ekstrahirani ultrazvučnom ekstrakcijom pripremani su na isti način kao i uzorci kod klasične ekstrakcije. Odmah nakon dodatka otapala uzorci su uronjeni u ultrazvučnu kupelj („Bandelin“ RK 103H, Njemačka) frekvencije 35 kHz i nominalne maksimalne snage uređaja od 140 W (Slika 7). Ultrazvučna ekstrakcija provodila se u ultrazvučnoj kupelji, a tijekom koje se infracrvenim termometrom („Uni-trend technology,“ UT 3000C, Kina) svakih 30 sekundi od početka ekstrakcije mjerila temperatura uzoraka. Vrijeme trajanja ultrazvučnog tretmana bilo je isto kao i kod klasične ekstrakcije, 30 minuta. Uzorci su također profiltrirani preko Whatmanovog filter papira.

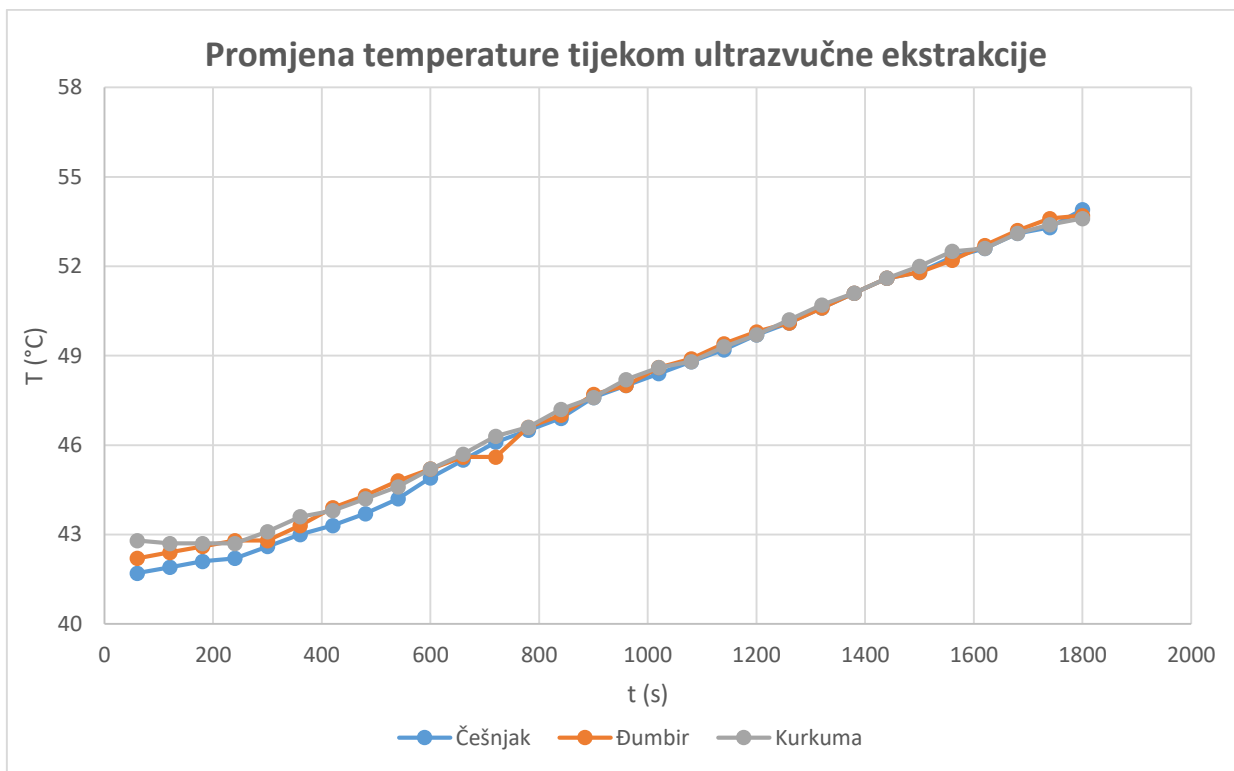


Slika 7. Ultrazvučna kupelj (foto: Brajer, 2019)

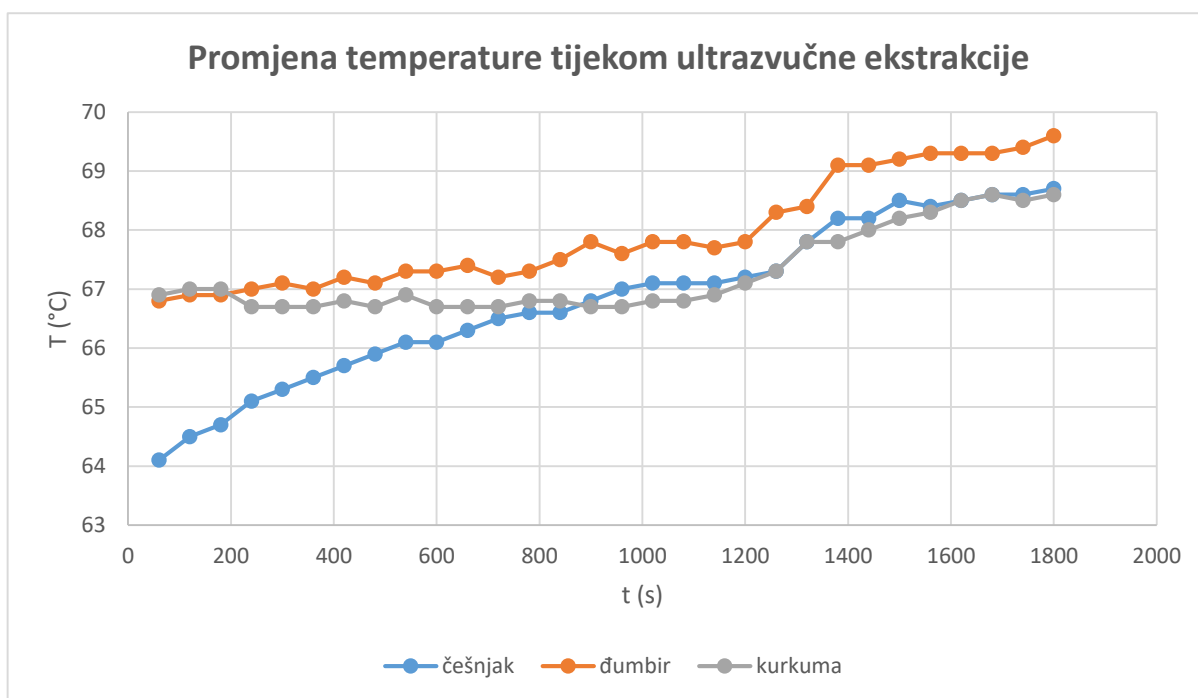
Promjene temperature uzoraka praha začina za vrijeme ultrazvučnog tretmana prikazane su u Grafikonima 1-3.



Grafikon 1. Promjena temperature (°C) ekstrakata praha češnjaka, kurkume i đumbira tijekom ultrazvučnog tretmana od 30 minuta pri početnoj temperaturi od 21,7 °C



Grafikon 2. Promjena temperature (°C) uzoraka ekstrakata praša češnjaka, kurkume i đumbira tijekom ultrazvučnog tretmana od 30 minuta pri početnoj temperaturi od 40 °C



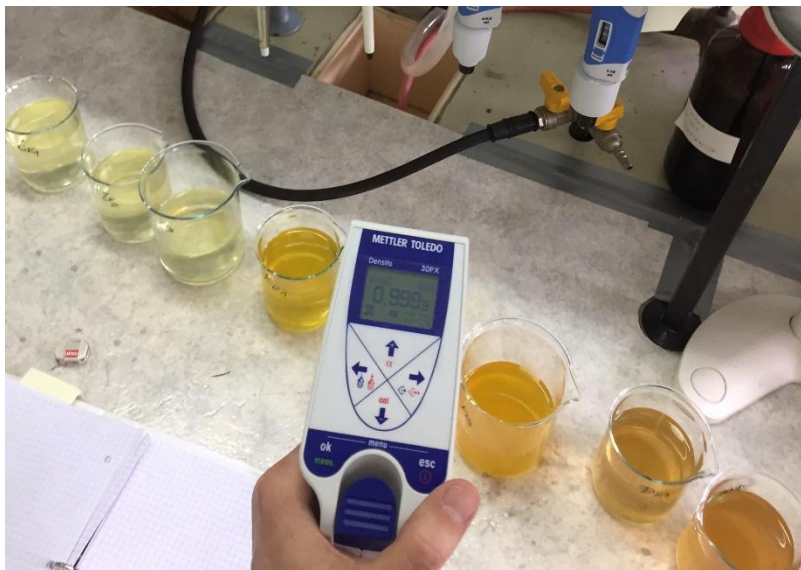
Grafikon 3. Promjena temperature (°C) uzoraka ekstrakata praša češnjaka, kurkume i đumbira tijekom ultrazvučnog tretmana od 30 minuta pri početnoj temperaturi od 70 °C

3.2. Metode određivanja fizikalno-kemijskih parametara

Istraživanjem su se odredili sljedeći fizikalno-kemijski parametri: gustoća otopine, elektroprovodljivost otopine, topljiva suha tvar (TST), ukupne kiseline, pH vrijednost i boja.

3.2.1. Određivanje gustoće otopine

Gustoća otopine (g/cm^3) istraživanih ekstrakata začina određena je digitalnim denziometrom (Mettler Toledo, Densito 30PX, Švicarska) direktnim očitanjem na prethodno baždarenom uređaju.



Slika 8. digitalni denziometar (foto: Brajer, 2019.)

3.2.2. Određivanje elektroprovodljivosti

Elektroprovodljivost uzoraka određena je uređajem za mjerenje elektroprovodljivosti „Mettler Toledo“ SevenEasy Conductivity (Švicarska).

3.2.3. Određivanje topljive suhe tvari

Sadržaj topljive suhe tvari (%) određen je pomoću digitalnog refraktometra (Mettler Toledo, Refracto 30PX, Švicarska) izravnim očitanjem s uređaja.

3.2.4. Određivanje ukupne kiselosti

Ova metoda temelji se na potenciometrijskoj titraciji otopinom natrijeva hidroksida, a primjenjuje se za određivanje ukupne kiselosti u voću i povrću te njihovim proizvodima (AOAC, 1995).

Aparatura i pribor:

- Graduirana pipeta, volumena 25 mL i 100 mL
- Odmjerna tikvica, volumena 250 mL
- Analitička vaga (Sartorius)
- Potencijometar sa staklenom elektrodom (Mettler Toledo, SevenMulti)
- Bireta, volumena 100 mL
- Filter papir

Reagensi:

- Natrijev hidroksid, otopina c (NaOH)=0,1 mol/L
- Puferna otopina poznate pH vrijednosti

Priprema uzoraka:

Uzorak se homogenizira i odvagane se 10 g. Uzorak se prenese u odmjernu tikvicu volumena 250 mL, tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Sadržaj tikvice dobro se promućka i profiltrira. Potencijometar se baždari pomoću puferne otopine. Ovisno o očekivanoj kiselosti otpipetira se 20 mL uzorka i prenese u čašu s magnetom koji pospješuje miješanje. Mješalica se pusti u rad te se iz birete dodaje otopina natrijevog hidroksida dok se ne postigne pH od oko 7,9 – 8,1.

Formula:
$$\text{Ukupna kiselost (\%)} = \frac{V \times F \times G}{D} \times 100$$

Gdje je:

V (mL) – volumen utrošene NaOH pri titraciji

F – faktor otopine NaOH

G (g/mL) – faktor najzastupljenije kiseline u uzorku

D (g) – masa uzorka u tekućini

3.2.5. Određivanje pH vrijednosti

Mjerenje pH vrijednosti određuje se pH-metrom, uranjanjem kombinirane elektrode u homogenizirani uzorak i očitanjem vrijednosti (AOAC, 1995).

Aparatura i pribor:

- Čaša, volumena 25 mL
- Magneti za miješanje
- Magnetska miješalica (MM-510)
- pH-metar (Mettler Toledo, SevenMulti)
- Analitička vaga (Sartorius)

Priprema uzoraka:

Homogenizirani uzorak se izvaže, prenese u odmjernu tikvicu, nadopuni destiliranom vodom te profiltrira.

Postupak određivanja:

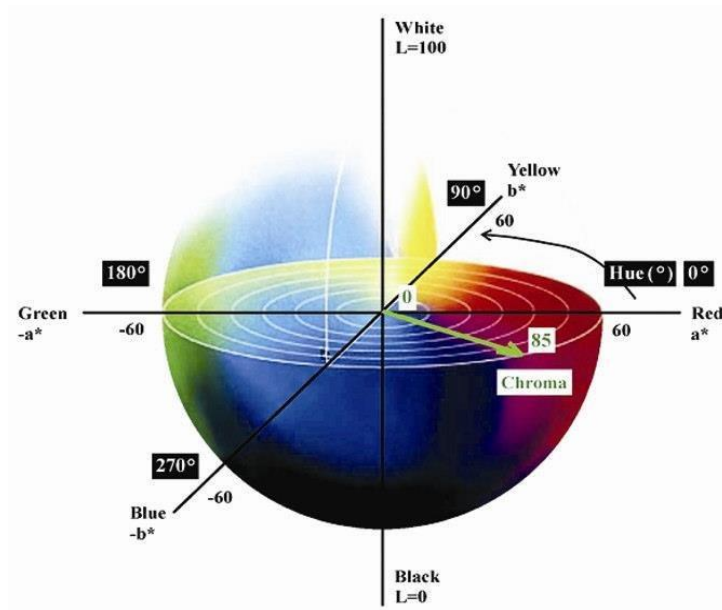
pH-metar se prije mjerenja baždari pufernom otopinom poznate pH vrijednosti pri sobnoj temperaturi. Određivanje pH vrijednosti vrši se direktnim uranjanjem elektrode u ispitivani uzorak.

3.2.6. Određivanje boje ekstrakata začina CIELAB metodom

Intenzitet boje utvrđivao se pomoću ColorTec PCM+ kolorimetra, odnosno CIELAB metodom. Ovom metodom se energija iz uzorka pomoću filtera pretvara u psihofizikalno funkciju, odnosno boju. Kolorimetar je fotolektrični tristimulusni uređaj što znači da se boje na njemu opisuju pomoću tri bročane vrijednosti: L^* , a^* i b^* .

Vrijednost L^* označava intenzitet svjetla ili tame. Ako je vrijednost $L^* = 0$ tada nema refleksije što upućuje na prisutnost crne boje, a ako je $L^* = 100$ tada se radi o bijeloj boji i refleksija je najveća. Vrijednost a^* označava intenzitet crvene ili zelene boje, stoga negativne vrijednosti ($-a^*$) ukazuju na prisutnost zelene boje, a pozitivne vrijednosti ($+a^*$) ukazuju na prisutnost crvene boje. Vrijednost b^* označava intenzitet žute ili plave boje, stoga negativne vrijednosti ($-b^*$) ukazuju na prisutnost plave boje, a pozitivne vrijednosti ($+b^*$) ukazuju na prisutnost žute boje.

Na kromatskom dijagramu (Slika 9) se može očitati H^* vrijednost (vizualni doživljaj, ton boje) i C vrijednost (zasićenost boje) preko očitanih vrijednosti a^* i b^* na Hunterovom kolorimetru.



Slika 9. Kromatski dijagram (Kulcu, 2018)

3.3. Metode određivanja specijaliziranih metabolita i antioksidacijskog kapaciteta

Istraživanjem je određen sadržaj sljedećih specijaliziranih metabolita: sadržaj vitamina C, sadržaj ukupnih fenola (flavonoida i neflavonoida), sadržaj ukupnih karotenoida i antioksidacijski kapacitet.

3.3.1. Određivanje sadržaja vitamina C

2,6-p-diklorindofenol oksidira L-askorbinsku kiselinu u dehidroaskorbinsku kiselinu, dok boja reagensa ne prijeđe u bezbojnu leukobazu, pa istovremeno služi i kao indikator ove redoks reakcije. Ova se metoda primjenjuje za određivanje sadržaja askorbinske kiseline u proizvodima od voća i povrća (AOAC, 2002).

Aparatura i pribor:

2. Homogenizator (Zepter International)
3. Analitička vaga (Sartorius)
4. Odmjerna tikvica, volumena 100 mL
5. Čaše, volumena 100 mL
6. Bireta, volumena 50 mL

Reagensi:

- 2,6-p-diklorindofenol
- 2%-tna oksalna kiselina

Priprema uzoraka:

Na tehničkoj vagi odvažuje se 2,5 g uzorka. Uzorak se kvantitativno uz dodatak 2%-tne otopine oksalne kiseline prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, te se oksalnom kiselinom nadopuni do oznake.

Postupak određivanja:

Pripremljeni se uzorak profiltrira te se otpipetira 10 mL za potrebe analize. Uzorak se titrira otopinom 2,6-p-diklorindofenola do pojave ružičaste boje, postojane minimalno pet sekundi. Nakon titracije izračuna se količina L-askorbinske kiseline koja se izražava u mg/100 g svježih mase.

$$\text{Formula: Vitamin C (mg/100 g)} = \frac{V \times F}{D} \times 100$$

Gdje je:

V (mL) – volumen 2,6-p-diklorindofenola utrošenog titracijom

F – faktor normaliteta 2,6-p-diklorindofenola

D (g) – masa uzorka u tekućini

3.3.2. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određuju se spektrofotometrijski u etanolnom ekstraktu uzorka mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 750 nm. Metoda se osniva na bojanoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline. Kod oksidacije fenolnih spojeva ove se kiseline reduciraju u plavo obojeni volfram oksid i molibden oksid (Ough i Amerine, 1988).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (Schimadzu UV 1650 PC)
- Tehnička vaga
- Odmjerne tikvice, volumena 50 mL i 100 mL
- Tikvica s okruglim dnom, volumena 100 mL

- Pipete
- Kivete
- Stakleni lijevci
- Filter papir
- Povratno hladilo

Kemikalije:

- 80% etanol
- Folin-Ciocalteu reagens
- Zasićena otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Priprema uzoraka:

Na tehničkoj vagi odvažuje se 10 g uzorka sa točnošću $\pm 0,01$ g te se homogenizira sa 40 mL 80%-tnog etanola. Homogena smjesa kuha se 10 minuta uz povratno hladilo, a zatim se dobiveni ekstrakt filtrira u odmjernu tikvicu volumena 100 mL. Zaostali talog zajedno s filter papirom ponovno se prebaci u tikvicu sa šlifom, u koju se dodaje 50 mL 80%-tnog etanola i dodatno se kuha uz povratno hladilo još 10 minuta. Dobiveni ekstrakt spoji se s prethodnim ekstraktom i nadopuni 80%-tnim etanolom do oznake.

Postupak određivanja:

U odmjernu tikvicu volumena 50 mL otpipetira se 0,5 mL ekstrakta te se redom dodaje: 30 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog vodom u omjeru 1:2) i 7,5 mL otopine zasićenog natrijevog karbonata. Sadržaj tikvice zatim se dobro promućka i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Nakon što su uzorci odstajali 2 sata na sobnoj temperaturi izmjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.



Slika 10. uzorci ekstrakata spremni na mjerenje apsorbancije (foto: Brajer, 2019)

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca potrebno je odvagati 500 mg galne kiseline i otopiti je u 80%-tnom etanolu, zatim nadopuniti odmjernu tikvicu volumena 100 mL do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline pripreme se razrijeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL, na način da se otpipetira redom 0, 1, 2, 3, 5 i 10 mL standarda („stock“ otopina) u svaku tikvicu koje se potom nadopunjavaju do oznake 80%-tnim etanolom. Koncentracije galne kiseline u tikvicama iznose 0, 50, 150, 250 i 500 mg/L.

U odmjerne tikvice od 50 mL zatim se otpipetira 0,5 mL uzorka iz tikvica i dodaje se 30 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i nakon 3 minute 7,5 mL otopine zasićenog natrijevog karbonata. Sadržaj tikvica dobro se promiješa, nadopuni do oznake te ostavi 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon što su uzorci odstajali izmjeri se apsorbancija otopine spektrofotometrom pri valnoj duljini 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Iz izmjerenih vrijednosti nacrtava se baždarni pravac tako da na apscisi budu koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbance.

Račun:

Baždarni pravac nacrtava se na računaru u programu Microsoft Excel, te se izračuna jednadžba pravca prema kojoj se izračuna koncentracija ukupnih fenola.

Formula: $y = 0,001x + 0,0436$

Gdje je:

y – apsorbancija na 750 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg/L)

3.3.3 Određivanje flavonoida i neflavonoida

Za taloženje flavonoidnih fenolnih spojeva preporuča se upotreba formaldehida. Formaldehid reagira s C-6 ili C-8 pozicijom na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojevima isto na C-6 ili C-8 poziciji. Pri tome nastaju kondenzirane molekule koje se uklone filtriranjem. Ostatak neflavonoidnih fenola određuje se po metodi za ukupne fenole (Ough i Amerine, 1988). Razlika ukupnih fenola i neflavonoida daje količinu flavonoida.

Aparatura i pribor:

- Analitička vaga
- Spektrofotometar (Schimadzu UV 1650 PC)

- Kivete
- Filter papir
- Erlenmeyer-ova tikvica sa šlifom i čepom, volumena 25 mL
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Stakleni lijevci

Kemikalije:

- Klorovodična kiselina, HCl 1:4 (koncentracija HCl razrijedi se s vodom u omjeru 1:4)
- Formaldehid (13 mL 37%-tnog formaldehida u 100 mL vode)
- Dušik za propuhivanje uzoraka
- Zasićena otopina natrijeva karbonata
- Folin-Ciocalteu reagens
- 80% etanol

Priprema uzoraka:

Ekstrakt ukupnih fenola (opisan u poglavlju 3.2.7.) koristi se i za određivanje flavonoida i neflavonoida.

Postupak određivanja:

U tikvicu volumena 25 mL otpipetira se 10 mL uzorka te doda 5 mL otopine HCl (1:4) i 5 mL formaldehida. Smjesa se zatim propuše dušikom, zatvori i ostavi u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon 24 sata uzorak se profiltrira i zatim slijedi isti postupak kao kod određivanja ukupnih fenola.

Račun:

Koncentracija neflavonoida izračunava se na način jednak izračunavanju koncentracije ukupnih fenola uzimajući u obzir dodatna razrijeđenja. Količina ukupnih flavonoida odredi se izračunom razlike količine ukupnih fenola i neflavonoida.

3.3.4. Određivanje ukupnih karotenoida

U ovoj vježbi prirodni pigmenti (ukupni karotenoidi) određivat će se spektrofotometrijski metodom po Holmu (1954) i Weststainu (1957). Cilj ove metode je odrediti koncentraciju pigmenta u acetonском ekstraktu biljnog materijala, te preračunati koncentracije na mg/g svježe tvari.

Aparatura i pribor:

- Vaga, tarionik i pistil
- Büchnerov lijevak
- Erlenmeyerova tikvica (300 mL)
- vakuum pumpa na vodeni mlaz
- odmjerna tikvica od 25 mL
- spektrofotometar (Shimadzu UV 1650 PC)

Kemikalije:

- aceton (p.a.)
- magnezijev karbonat ($MgCO_3$)
- kvarcni pijesak

Postupak određivanja:

Postupak ekstrakcije i određivanja pigmenta treba izvoditi brzo, u zamračenim uvjetima. Odvagati uzorak voća ili povrća mase 6 g i prenijeti u tarionik. Na uzorak dodati oko pola žličice kvarcnog pijeska, pola žličice praha $MgCO_3$ (zbog neutralizacije kiselosti) i 10 mL acetona. Smjesu usitniti tučkom u tarioniku, te kvantitativno acetonom prenijeti na Büchnerov lijevak. Uzorak ekstrahiran acetonom filtrirati preko vakuuma. Nakon što se macerat profiltrira filtrat kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 25 mL, koja se nadopuni do oznake acetonom. Spektrofotometrom očitati apsorbancu u dobivenom filtratu pri valnim duljinama 662, 644 i 440 nm koristeći aceton kao slijepu probu.

Dobivene vrijednosti apsorpcije (A_{662} , A_{644} i A_{440}) uvrstiti u Holm- Weststainove jednadžbe za izračunavanje koncentracije pigmenta u mg/dm^3 :

$$\text{klorofil } a = 9,786 \times A_{662} - 0,990 \times A_{644} \text{ [mg/dm}^3\text{]}$$

$$\text{klorofil } b = 21,426 \times A_{644} - 4,65 \times A_{662} \text{ [mg/dm}^3\text{]}$$

$$\text{ukupni klorofil} = 5,134 \times A_{662} + 20,436 \times A_{644} \text{ [mg/dm}^3\text{]}$$

$$\text{ukupni karotenoidi} = 4,695 \times A_{440} - 0,268 \times (\text{ukupni klorofil}) \text{ [mg/dm}^3\text{]}$$

Brojevi u jednadžbama su molarni apsorpcijski koeficijenti po Holmu i Wetstteinu. Formula za izračunavanje koncentracije pigmenata na mg/g svježe tvari ploda glasi:

$$c \text{ (mg/g)} = C_1 \times V \times m$$

Gdje je:

c – masena koncentracija pigmenata izražena u mg/g svježe tvari ploda

c_1 – masena koncentracija pigmenata izražena u mg/L

V – volumen filtrata (odmjerne tikvice) mL

m – masa uzorka izražena u mg

3.3.5. ABTS metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Metoda se temelji na gašenju stabilnog plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsa kiselina) (ABTS + radikal-kationa) koji se oblikuje bilo kemijskom ili enzimatskom oksidacijom otopine ABTS-a čiji je karakterističan adsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 734 nm. U prisutnosti antioksidansa ABTS+ kation se reducira u ABTS, s reakcija se očituje obezbojenjem plavo-zelene otopine. Udio uklonjenih ABTS radikala koji „gase“ različiti antioksidansi mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) pri istim uvjetima (Miller i sur., 1993; Re i sur., 1999).

Priprema reagensa:

1. dan:

140 mM otopine kalijeva persulfata, $K_2S_2O_8$ (0,1892 g $K_2S_2O_8$ izvaže se i otopi u 5 mL destilirane vode u odmjerne tikvici od 10 mL)

7 mM ABTS otopina (0,0192 g ABTS reagensa otopi se u 5 mL destilirane vode u odmjerne tikvici od 10 mL)

Stabilna ABTS+ otopina (88 μ L $K_2S_2O_8$ otopine (140 mM) prenese se u tikvicu u kojoj se nalazi 5 mL otopine ABTS-a. Sadržaj tikvice se dobro promiješa, zatvori, obloži aluminijskom folijom i ostavi stajati 12-16 sati na sobnoj temperaturi. Stajanjem intenzitet plavo-zelene boje se pojačava).

2. dan:

Na dan provođenja svih analiza priprema se 1%-tna otopina ABTS+ (1 mL ABTS+ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 96%-tnim etanolom do oznake). Nakon toga mjeri se apsorbanca 1%-tne otopine ABTS+ pri 734 nm koja mora iznositi $0,70 \pm 0,02$. Ako apsorbanca otopine ne iznosi 0,734 onda ju je potrebno namjestiti, odnosno ako je apsorbanca premala u tikvicu od 100 mL pripremljene 1%-tne otopine ABTS+ treba dodati još par kapi stabilne

ABTS+ otopine, a ako je apsorbanca prevelika onda treba razrijediti odnosno u tikvicu od 100 mL dodati još 96%-tnog etanola.

Postupak određivanja (spektrofotometrijski):

160 μ L uzoraka pomiješa se sa 2 mL 1 %- tne otopine ABTS+ te se nakon 5 minuta mjeri apsorbanca pri 734 nm. Za slijepu probu se koristi 96%-tni etanol.

Izrada umjernog (kalibracijskog) pravca:

Za izradu umjernog (kalibracijskog) pravca u ATBS metodi koristi se Trolox koji uzrokuje smanjenje boje ABTS+ otopine. Točke određene za izradu baždarnog pravca su sljedeće: 0, 100, 200, 400, 1000, 2000 i 2500 mol/dm³. Najprije se pripremi stock otopina i to tako da se u odmjerneju tikvici od 25 mL izvaže 0,0156 Trolox-a, a tikvica se 80%-tnim etanolom nadopuni do oznake. Iz stock otopine uzimaju se sljedeći volumni Trolox-a za pripremu daljnjih razrjeđenja koja se pripremaju u odmjernim tikvicama od 25 mL;

0 → 0 mL Troloxa (samo EtOH)

100 → 0,4 mL

200 → 0,8 mL

400 → 1,6 mL

1000 → 4 mL

2000 → 8 mL

2500 → 10 mL

Nakon pripreme navedenih koncentracija Trolox-a iz svake tikvice u kojoj je navedena koncentracija Trolox-a uzima se 160 μ L otopine Trolox-a i dodaje 2 mL 1%-tne ABTS+ otopine podešene apsorbanca (0,70 \pm 0,02). Nakon što pomiješamo dodanu koncentraciju Trolox-a i 1%-tne ABTS+ otopine izmjeri se apsorbanca pri 734 nm. I tako za svaku točku koncentracije Trolox-a. Temeljem izmjerenih vrijednosti apsorbanca za svaku točku izradi se umjerni (kalibracijski) pravac.

3.4. Metoda utvrđivanja antimikrobne aktivnosti

Ovom metodom determinirana je sposobnost preživljavanja patogenih mikroorganizama *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* u bogatom tekućem mediju (BHI) koji je sadržavao određene koncentraciju ekstrakata češnjaka, đumbira i kurkume. Utvrđuje se brojnost mikroorganizama (CFU) na čvrstim hranjivim podlogama kao i validan broj kolonija.

Aparatura i pribor:

- Petrijeve zdjelice
- Epruvete
- Pipete
- Ependorfice
- Falcon posudice od 50 ml
- Stalci za ependorfice
- Sterilne kuglice
- L štapić
- Sterilna plastična eza
- Vorteks

Kemikalije:

- Agar (Biolife, Italija)
- 70 % etanol

3.4.1. Priprema hranjivih podloga

BHI tekuća hranjiva podloga (Biolife, Italija) pripremljena je otapanjem 37 g podloge u 1 L destilirane vode, pH reakcija podloge je $7,4 \pm 0,2$. Sterilizacija je izvršena u autoklavu na 121°C kroz 15 minuta.

BHI kruta hranjiva podloga pripremljena je otapanjem BHI (Biolife, Italija) kruta podloga je pripremljena otapanjem 37 g BHI podloge i 15 g agara (Biolife, Italija) u 1 L destilirane vode. Podloga ima pH reakciju $7,4 \pm 0,2$. Sterilizirana je autoklaviranjem na 121°C kroz 15 minuta.

3.4.2. Odabir i uzgoj patogenih sojeva

U istraživanju korišteni su izolati *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*, prethodno identificirani i karakterizirani na temelju molekularno-bioloških metoda. Uzgojeni su na krvnom agaru i za dugotrajno čuvanje pohranjeni na temperaturi od -20°C uz dodatak sterilne otopine glicerola. Kulture su potom precijepljene na krute BHI podloge i inkubirane 48 h pri 30°C . Izrasle kolonije korištene su za ispitivanje rasta u dodanim koncentracijama različitih vrsta ekstrakta začina.

3.4.2. Praćenje rasta patogenih sojeva pri dodanoj koncentraciji ekstrakata

Za praćenje rasta patogenih sojeva u koncentraciji ekstrakata češnjaka, đumbira i kurkume korištena je tekuća BHI podloga kojoj je dodano 5 mL ekstrakta. Iz smjese je zatim pipetirano 1 mL te je sadržaj epruvete vorteksiran, nakon čega je u inokulum uronjena sterilna eza pomoću kojeg je kultura svakog patogenog soja nanescena u smjesu. Također, korištene su i pozitivna i negativna kontrola, pozitivna kontrola sadržavala je bakterijski soj sa tekućom hranjivom podlogom bez ekstrakta, a negativnu kontrola predstavljala je smjesu ekstrakta i tekuće hranjive podloge bez bakterijskog soja. Uzorci su inkubirani 24 sata na temperaturi od 37 °C, nakon čega je praćen rast (zamućenje).

3.4.3 Određivanje brojnosti (CFU vrijednost)

Iz svakog uzorka je pipetirano 100 µL i nanesceno na krute BHI podloge koje su anaerobno inkubirane 48 sati pri temperaturi od 30 °C. Nakon toga utvrđena je CFU vrijednost i vizualno je praćena inhibicija usporedbom s pozitivnom i negativnom kontrolom. Broj mikroorganizama koji formiraju kolonije (CFU/mL ili g) je izračunat prema formuli:

$$CFU = \frac{\text{broj kolonija}}{V \text{ (upotrijebljenog uzorka)}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrijeđenja}$$

3.5. Statistička obrada podataka

Podaci istraživanja statistički su obrađeni u programskom sustavu SAS, verzija 9.3 (SAS/STAT, 2010). Sve laboratorijske analize klasične i ultrazvučne ekstrakcije uzoraka s dodanim prahom češnjaka, đumbira i kurkume provedene su u tri ponavljanja. Rezultati su podvrgnuti jednosmjernoj analizi varijance (ANOVA). Srednje su vrijednosti uspoređene t-testom (LSD) i smatraju se značajno različitim pri $p \leq 0,0001$. U tablicama uz rezultate prikazani su eksponenti različitih slova koja označavaju grupe uzoraka. Također, uz rezultate i eksponente u tablicama izražena je i standardna devijacija (s) kojom je prikazano prosječno odstupanje rezultata od srednje vrijednosti za pojedini kemijski parametar.

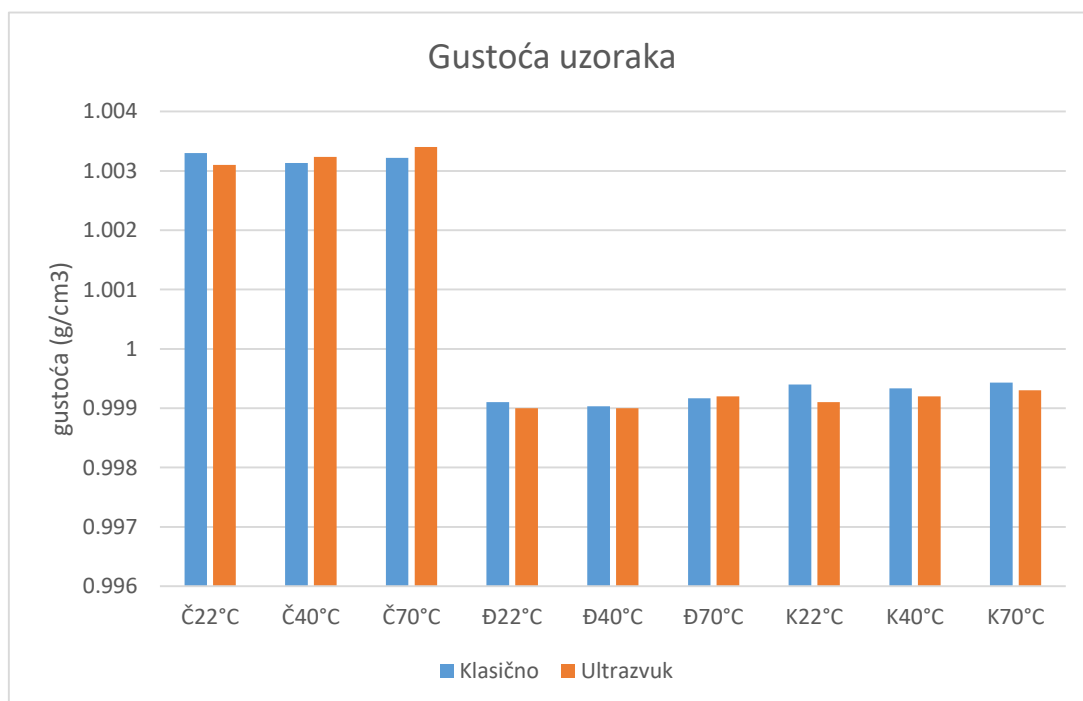
4. Rezultati i rasprava

4.1. Osnovni kemijski sastav i fizikalne karakteristike

U Tablici 5 (Prilog rada) prikazani su rezultati fizikalno-kemijskih svojstava ekstrakata začina, a obuhvaćaju: gustoću otopine (g/cm^3), elektroprovodljivost ($\mu\text{S/cm}$), sadržaj topljive suhe tvari (%), sadržaj ukupnih kiselina (%), pH vrijednost i boju. Statističkom obradom podataka utvrđene su visoko signifikantne razlike ($p \leq 0,0001$) za sve analizirane parametre između svih analiziranih uzoraka.

Vrijednosti gustoće ekstrakata začina (Grafikon 4) tretiranih klasično kretale su se ovisno o temperaturi u rasponu od $0,9990 \text{ g/cm}^3$ (uzorak ĐK2) do $1,0035 \text{ g/cm}^3$ (uzorak ČK3). Tako su veće vrijednosti utvrđene pri višoj temperaturi ekstrakcije od $70 \text{ }^\circ\text{C}$, dok su niže vrijednosti utvrđene kod $40 \text{ }^\circ\text{C}$ i $21,7 \text{ }^\circ\text{C}$. Također, kod uzoraka koji su ekstrahirani ultrazvukom, utvrđen je porast vrijednosti gustoće uzoraka s povećanjem temperature. Tako se povećanjem temperature povećavala i gustoća otopina kod svih vrsta začina, pa je najviša utvrđena vrijednost gustoće pri temperaturi od $70 \text{ }^\circ\text{C}$ iznosila $1,0354 \text{ g/cm}^3$ (uzorak ČU3), dok je najniža vrijednost od $0,9990 \text{ g/cm}^3$ utvrđena pri temperaturama od $21,7 \text{ }^\circ\text{C}$ i $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (uzorak ĐU1 i ĐU2).

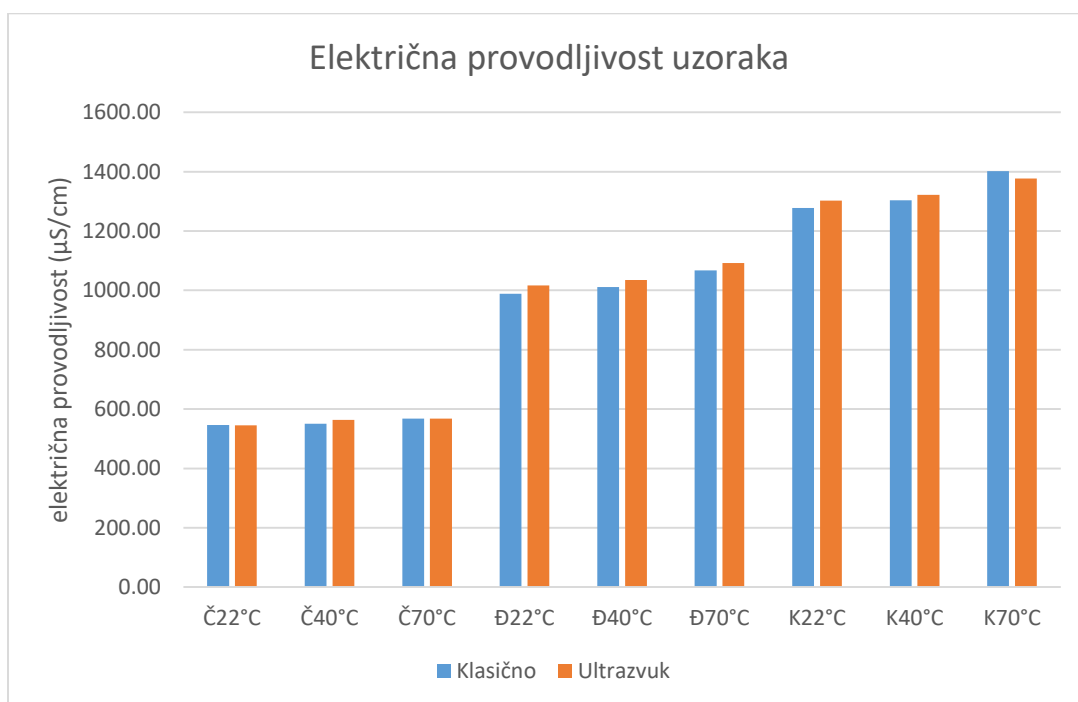
Vrijednosti gustoće ekstrakata utvrđene klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom nisu se značajno statistički razlikovale. Može se zaključiti da pri višoj temperaturi ekstrakcije, i tijekom klasičnog i ultrazvučnog tretmana gustoća uzoraka je bila viša, a što je i očekivano s obzirom na istraživanu fizikalnu veličinu.



Grafikon 4. Gustoća analiziranih uzoraka začina (g/cm^3) klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturama od $21,7$, 40 i $70 \text{ }^\circ\text{C}$

Električna provodljivost uzoraka (Grafikon 5) ekstrahiranih klasično, povećavala se s porastom temperature. Tako je najveća vrijednost od 1402,33 $\mu\text{S}/\text{cm}$ kod uzoraka praha kurkume pripremljenog klasično utvrđena pri temperaturi ekstrakcije od 70 °C (uzorak KK3), dok je pri temperaturi od 21,7 °C utvrđena najniža vrijednost od 1277,76 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (uzorak KK1). Električna provodljivost neke otopine prije svega ovisi o udjelu mineralnih tvari, a s obzirom da su dobri vodiči električne struje upravo disocirane kiseline i minerali, povećanjem temperature medija ioni dobivaju veću kinetičku energiju kako bi prevladali međumolekularne sile i lakše se kretali (Lazaridou i sur., 2004).

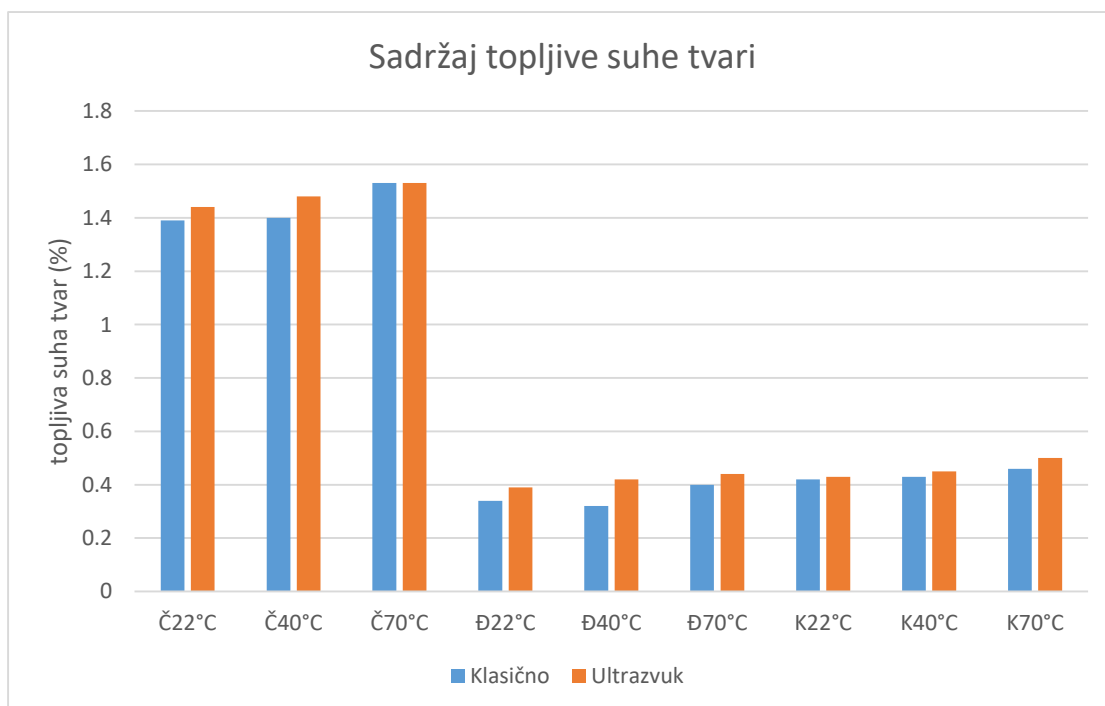
Kod uzoraka ekstrahiranih ultrazvukom, vrijednosti električne provodljivosti također su rasle s porastom temperature sustava. Međutim, u usporedbi s uzorcima ekstrahiranim klasično utvrđene su veće vrijednosti električne provodljivosti kod svih uzoraka ekstrahiranih ultrazvukom. To se može pripisati oslobađanju minerala i ostalih iona koji su ultrazvučnom ekstrakcijom značajno brže oslobođeni iz biljnih stanica ili koloidnih čestica uslijed djelovanja kavitacije na stanične strukture (Zou i sur., 2016).



Grafikon 5. Električna provodljivost ekstrakata začina ($\mu\text{S}/\text{cm}$) tretiranih klasično i ultrazvukom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

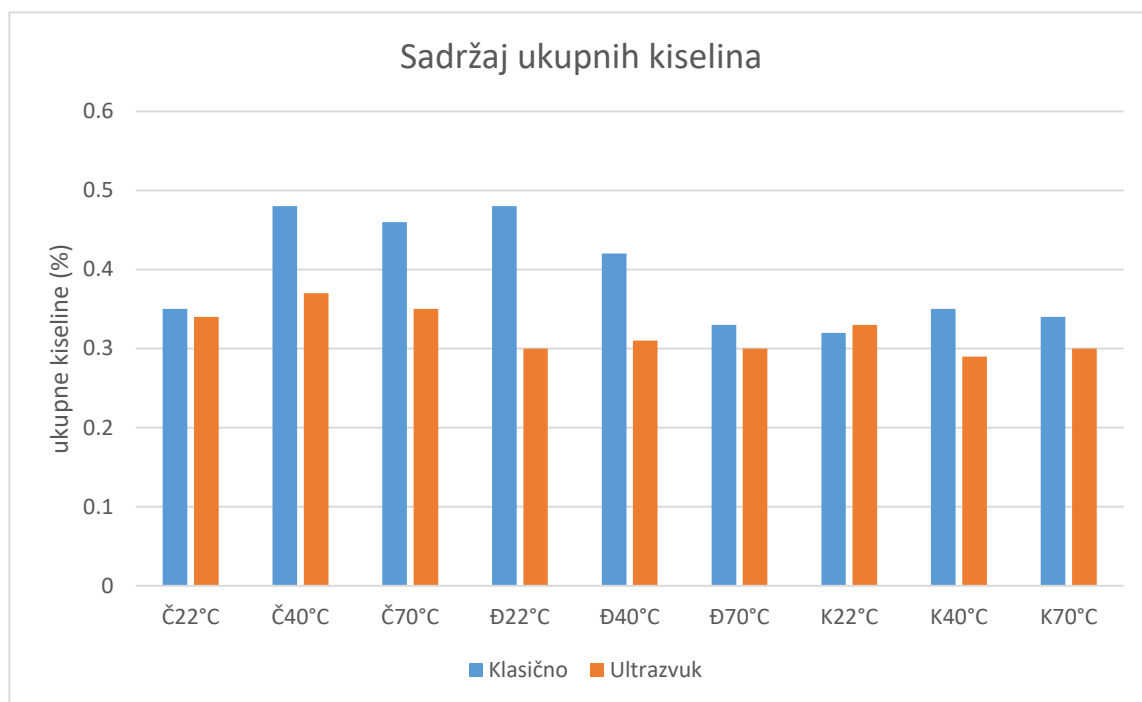
Na sadržaj topljive suhe tvari, TST (Grafikon 6) značajno je utjecala viša temperatura (40 i 70 °C), način ekstrakcije i vrsta začina. Usporedbom uzoraka češnjaka, đumbira i kurkume ekstrahiranih klasično pri sobnoj temperaturi najveći sadržaj TST utvrđen je za ekstrakt češnjaka i iznosio je 1,39 % (uzorak ČK1), dok je najmanji sadržaj utvrđen za ekstrakt đumbira i iznosio je 0,34 % (uzorak ĐK1).

Pri oba načina ekstrakcije povećanjem temperature s 21,7 na 70 °C povećao se sadržaj TST i to kod klasične ekstrakcije češnjaka za 0,14% , ultrazvučne za 0,09 % , đumbira za 0,06 % kod klasične te 0,05 % kod ultrazvuka i kurkume za 0,04 % klasičnom te za 0,07 % ultrazvučnom ekstrakcijom. Također, utvrđene su veće vrijednosti sadržaja TST svih uzoraka začina kod tretmana ultrazvukom pri 21,7 °C. Tako se sadržaj TST ekstrakta češnjaka i đumbira u usporedbi s utvrđenim vrijednostima klasične ekstrakcije povećao za 0,05 % i kurkume za 0,01 %. Veći sadržaj TST prilikom ultrazvučne ekstrakcije u usporedbi s klasičnom utvrdili su i Fonteles i sur. (2012). Naime, prilikom djelovanja ultrazvuka na stanicu, dolazi do razaranja struktura stanične stjenke i membrane, te topljiva suha tvar koju čine ugljikohidrati lakše probija u okolni medij (Zou i sur., 2016).



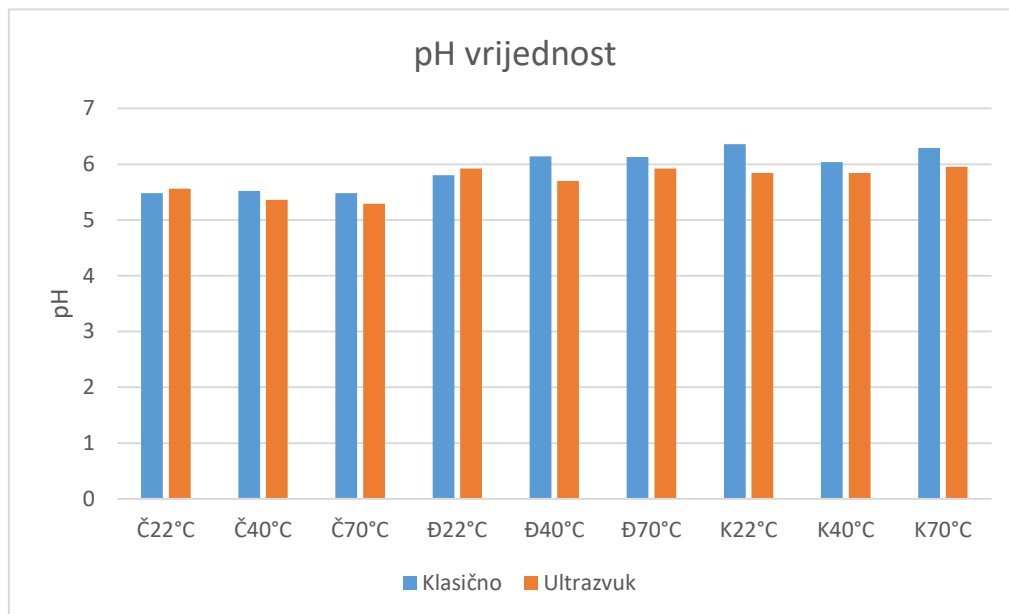
Grafikon 6. Sadržaj topljive suhe tvari (%) analiziranih uzoraka začina klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

Na sadržaj ukupnih kiselina (Grafikon 7), način ekstrakcije i temperatura nisu imali značajan utjecaj. Vrijednosti su se kretale u rasponu od 0,29 do 0,48 %, a uspoređujući ekstrakte različitih začina ekstrahirane klasično pri sobnoj temperaturi (21,7 °C), najveći sadržaj ukupnih kiselina (0,48 %) utvrđen je kod đumbira (uzorak ĐK1), dok je najmanji sadržaj (0,33 %) utvrđen kod praha kurkume (uzorak KK1).



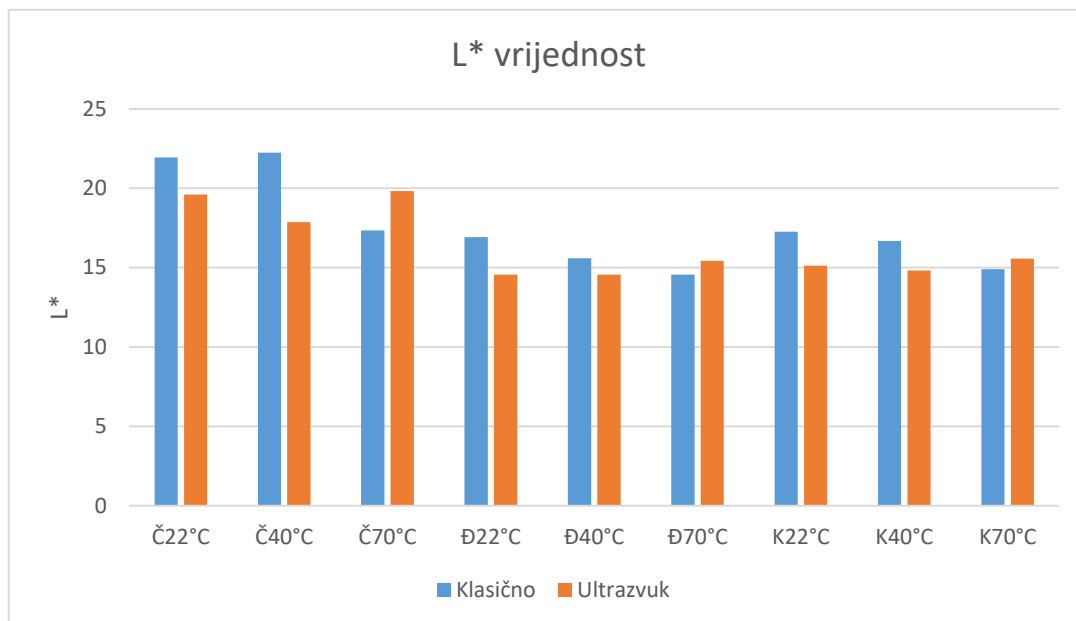
Grafikon 7. Sadržaj ukupnih kiselina (%) analiziranih uzoraka začina klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

Utvrđene pH vrijednosti (Grafikon 8) ekstrakata začina kretale su se u rasponu od 5,29 do 6,36. Nije utvrđena značajna razlika u pH vrijednostima dobivenim klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom. Najvišu utvrđenu pH vrijednost (6,36) klasično ekstrahiranih začina pri sobnoj temperaturi imao je prah kurkume, dok najnižu (5,48) prah češnjaka. Utvrđene više pH vrijednosti, od blago kiselog do lužnatog područja su očekivane i u skladu s nižim sadržajem ukupnih kiselina u svim ekstraktima začina.



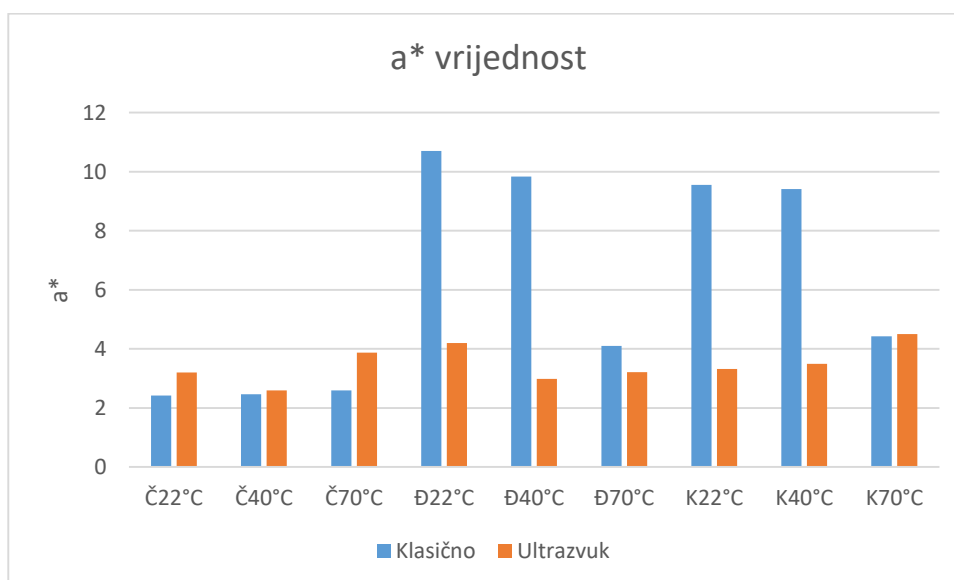
Grafikon 8. pH vrijednost analiziranih uzoraka začina klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

Mjereni kromatski parametri ekstrakata začina prema CIELAB sustavu prikazani su u Tablici 6 (Prilog rada). Prema rezultatima klasične ekstrakcije utvrđeno je smanjenje L^* vrijednosti (Grafikon 9) pri višim temperaturama (40 i 70 °C) kod svih ekstrakata začina, što ukazuje na povećanje crne boje. Ultrazvučnom ekstrakcijom utvrđeno je suprotno, veće L^* vrijednosti pri višim temperaturama, što ukazuje na porast svjetline uzoraka. Može se zaključiti da se pri klasičnoj ekstrakciji i porastom temperature povećava udio crne boje, odnosno uzorci svih analiziranih vrsta začina su potamnili, dok se ultrazvučnom ekstrakcijom i porastom temperature povećava udio bijele boje, odnosno uzorci su bili svjetliji.



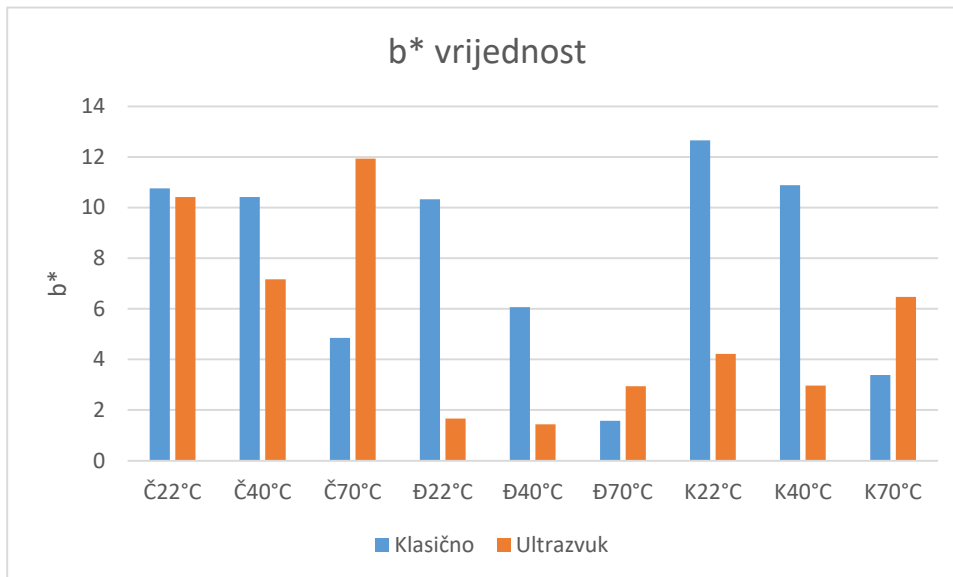
Grafikon 9. L* vrijednosti uzoraka analiziranih uzoraka začina klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

Sve utvrđene a* vrijednosti (Grafikon 10) su pozitivne što ukazuje na veće prisustvo crvene boje u odnosu na zelenu. Za nedostatak zelene boje u uzorcima odgovoran je manjak klorofila, pošto su za ekstrakciju korišteni prah češnjaka dobiven iz lukovice, prah đumbira i kurkume dobiven iz rizoma. Više a* vrijednosti za prah đumbira i kurkume utvrđene su kod klasične ekstrakcije, što ukazuje na veći porast crvene boje u odnosu na vrijednosti dobivene kod ultrazvučne ekstrakcije. Kod praha češnjaka utvrđeno je suprotno, više a* vrijednosti kod ultrazvučne ekstrakcije pri istim temperaturama.



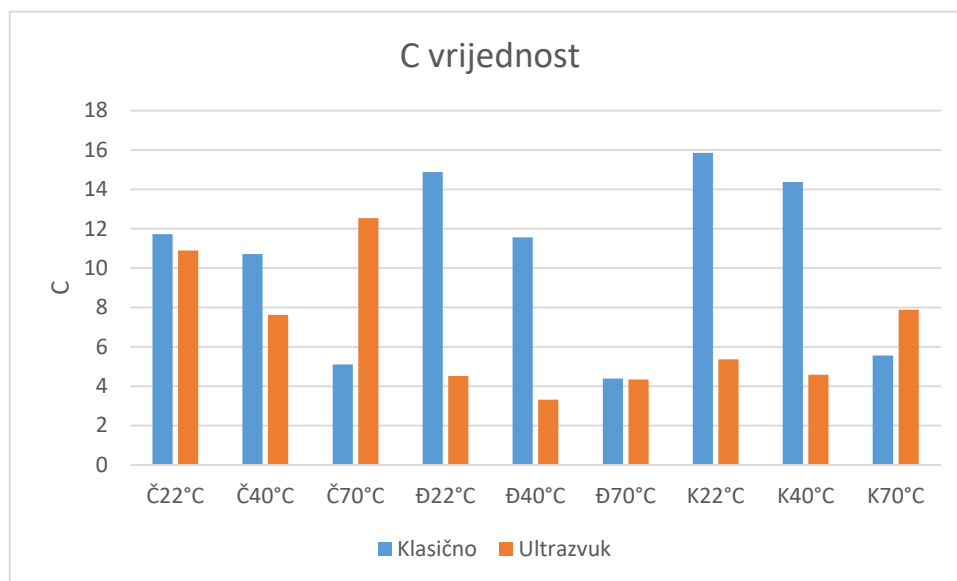
Grafikon 10. a* vrijednosti analiziranih uzoraka začina klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

Kod klasične ekstrakcije svih uzoraka začina utvrđeno je smanjenje b^* vrijednosti s porastom temperature sustava, što ukazuje na smanjenje žute boje. Slično, kod ultrazvučne ekstrakcije utvrđeno je da se b^* vrijednosti smanjuju pri temperaturi od 40 °C, no pri temperaturi od 70 °C b^* vrijednost počinje rasti i postiže puno veću vrijednost od vrijednosti utvrđenih pri sobnoj temperaturi. Za žutu boju kod kurkume i đumbira zaslužni su kurkuminoidi iz skupine fenolnih spojeva.



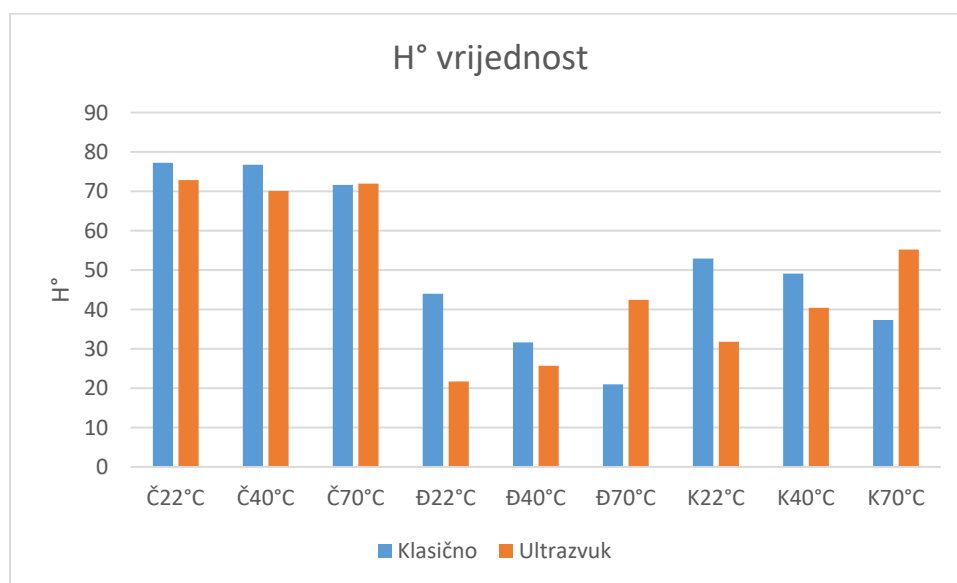
Grafikon 11. b^* vrijednosti analiziranih uzoraka začina klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

Usporedbom klasične i ultrazvučne ekstrakcije, vrijednosti C značajno veća kod svih uzoraka ekstrahiranim klasično. Vrijednost C označava zasićenost boje, a porast zasićenosti ukazuje na porast crne boje, može se zaključiti da klasičnom ekstrakcijom uzorci brže tamne. To možemo i potvrditi s rezultatima L^* vrijednosti za koje smo utvrdili smanjenje kod klasične ekstrakcije, a što označava porast crne boje, odnosno tamnije nijanse uzoraka.



Grafikon 12. C vrijednosti analiziranih uzoraka začina klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

Slično kao kod b^* vrijednosti, H vrijednost se kod klasične ekstrakcije svih uzoraka začina smanjuje s porastom temperature. To ukazuje na porast crvene boje. Kod ultrazvučne ekstrakcije H vrijednost se porastom temperature do 40 °C svih uzoraka začina smanjuje. No, pri temperaturi od 70°C H vrijednost počinje rasti i postiže puno veću vrijednost od vrijednosti pri sobnoj temperaturi, što ukazuje na smanjenje crvene boje.



Grafikon 13. H vrijednosti analiziranih uzoraka začina klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

4.2. Specijalizirani metaboliti i antioksidacijski kapacitet

U Tablici 7 (Prilog rada) prikazan je sadržaj analiziranih bioaktivnih komponenata, specijaliziranih metabolita i antioksidacijski kapacitet ekstrakata različitih začina tretiranih klasično i ultrazvukom. Za sve analizirane komponente utvrđene su visoko signifikantne statističke razlike ($p \leq 0,0001$) s obzirom na način ekstrakcije i primijenjenu temperaturu.

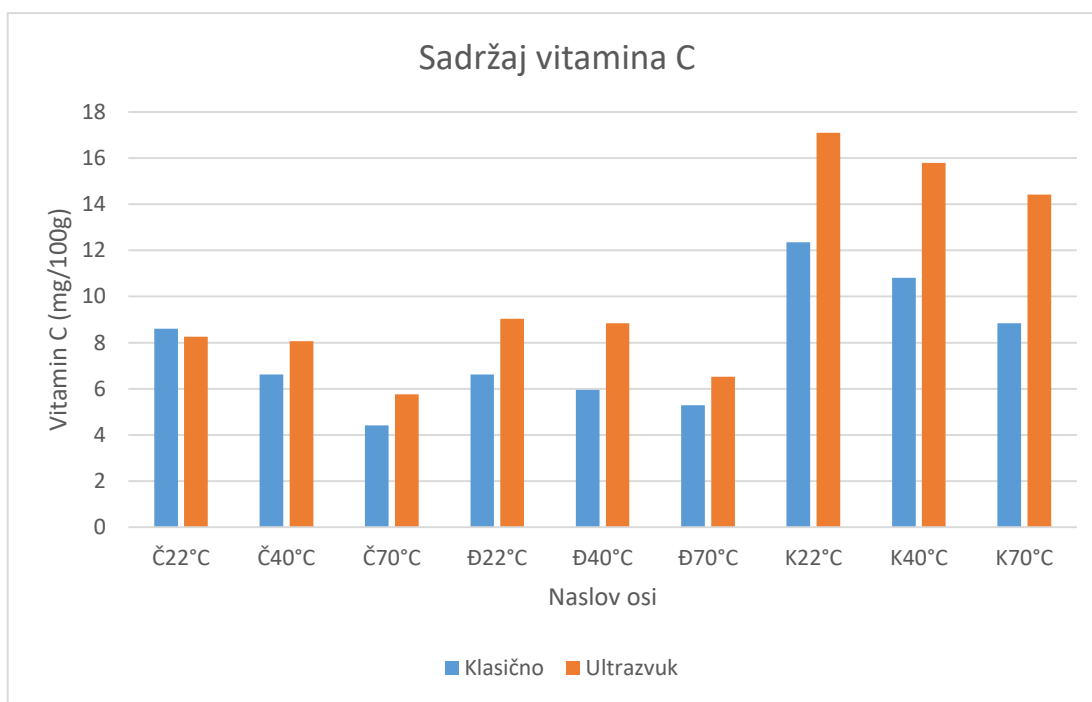
4.2.1. Sadržaj vitamina C

Sadržaj vitamina C varirao je ovisno o temperaturi, načinu ekstrakcije i vrsti začina (Grafikon 14). Usporedbom vrsta začina, odnosno ekstrakata praha češnjaka, đumbira i kurkume ekstrahiranih klasično pri sobnoj temperaturi (21,7 °C), najveći sadržaj vitamina C (12,35 mg/100 g) utvrđen je za ekstrakt kurkume (uzorak KK1), dok je najmanji sadržaj (6,62 mg/100 g) utvrđen za ekstrakt češnjaka (uzorak ČK1).

Nadalje, pri sobnoj temperaturi utvrđene su više vrijednosti vitamina C i kod klasične i ultrazvučne ekstrakcije za sve analizirane vrste začina. Pri višim temperaturama (40 i 70 °C) došlo je do degradacije vitamina C u svima analiziranim uzorcima začina. Tako je kod uzoraka praha češnjaka ekstrahiranih klasično pri temperaturi od 40 °C utvrđen pad sadržaja vitamina C za 23,1 %, kod đumbira za 9,9 % i kod kurkume za 12,46 %, dok je pri temperaturi od 70 °C utvrđena daljnja degradacija sadržaja i to kod praha češnjaka za čak 48,6 %, đumbira za 20 % i kod kurkume za 29,4 %.

Također, utvrđeno je da je upotreba ultrazvuka pogodovala ekstrakciji vitamina C kod nekih uzoraka začina, s obzirom da je veći sadržaj vitamina C kod uzoraka praha kurkume i đumbira utvrđen prilikom ultrazvučnog tretmana u usporedbi s klasičnim. Tako je na primjer u ekstraktu đumbira tretiranog ultrazvukom pri sobnoj temperaturi utvrđen porast sadržaja vitamina C za 26,6 %, dok kod kurkume za čak 38,4 % u usporedbi sa sadržajem utvrđenim kod klasične ekstrakcije pri istoj temperaturi. No, za razliku od ekstrakata đumbira i kurkume, kod ekstrakta češnjaka pri sobnoj temperaturi utvrđen je pad vrijednosti vitamina C za 4 % prilikom tretmana ultrazvukom.

Slične rezultate pozitivnog utjecaja ultrazvuka na sadržaj vitamina C utvrdili su i drugi autori. Šic Žlabur i sur. (2017) utvrdili su povećanje vitamina C jabučnog soka s dodatkom praha aronije za 49 % kod uzoraka tretiranih ultrazvukom u usporedbi s klasičnom ekstrakcijom, Aadil i sur. (2013) su također utvrdili povećanje sadržaja vitamina C jabučnog soka za 28,45 % prilikom primjene ultrazvuka. No također, suprotno, postoje i druga istraživanja u kojima je utvrđeno smanjenje sadržaja C vitamina prilikom tretmana ultrazvukom, a čemu kao moguć razlog navode utjecaj kavitacijskog mehanizma (Adekunte i sur., 2010; Dias i sur., 2015; Ordóñez-Santos i sur., 2017).

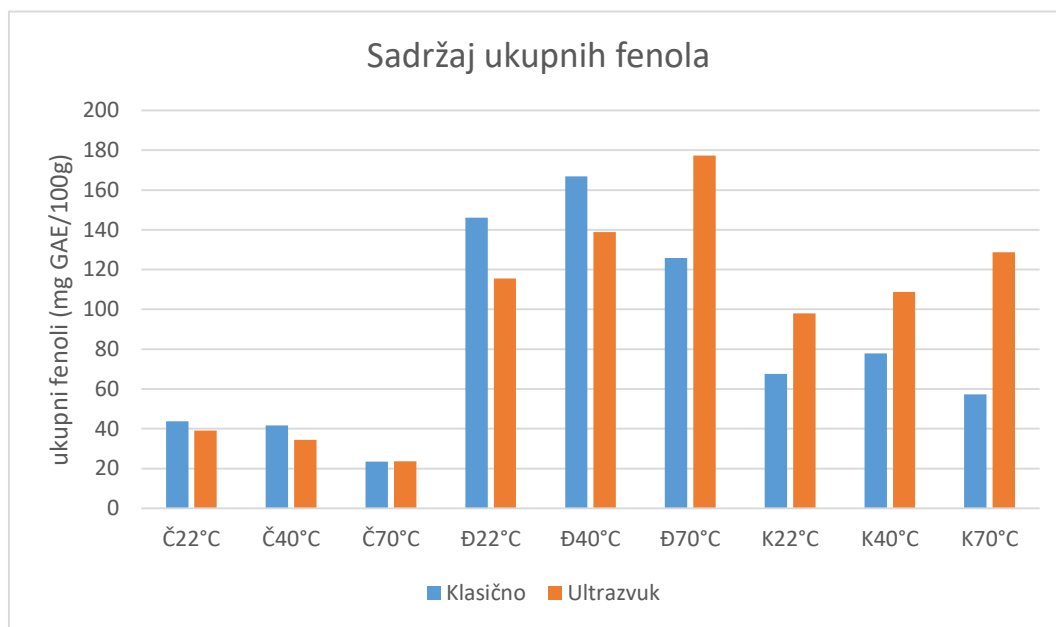


Grafikon 14. Sadržaj vitamina C (mg/100 g) analiziranih uzoraka začina klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

4.2.2 Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida

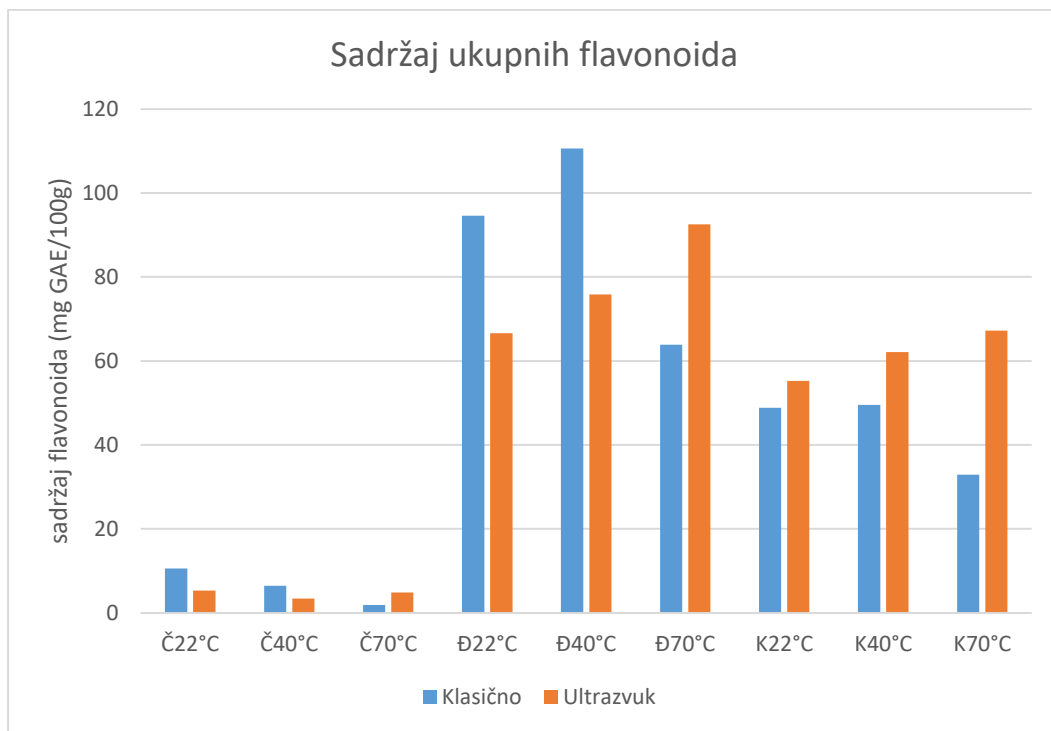
Najveći sadržaj ukupnih fenola (Grafikon 15) s obzirom na vrstu začina utvrđen je za ekstrakt đumbira (ĐK1) i iznosio je 146,02 mg GAE/100g, dok je najmanji sadržaj utvrđen za ekstrakt češnjaka (ČK1) i iznosio je 43,67 mg GAE/100 g. Nadalje, kod klasične ekstrakcije utvrđen je veći sadržaj ukupnih fenola pri temperaturi od 40 °C u usporedbi s ekstrakcijom pri sobnoj temperaturi (21,7 °C). Pri višoj temperaturi ekstrakcije (70 °C) sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu češnjaka smanjio se za 43,5 %, kod đumbira za 24,5 % i kod kurkume za 26,4 % u usporedbi sa sadržajem utvrđenim pri temperaturi od 40 °C. Slične rezultate utvrdili su Akowuah i sur. (2009) prateći utjecaj klasične ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola aromatične biljke *Gynura procumbens* pri temperaturama: 40, 50, 60, 70, 80 i 100 °C. U navedenom istraživanju, sadržaj ukupnih fenola povećavao se do temperature od 50 °C, nakon čega je utvrđen blagi pad vrijednosti (od 1 %), te nagli pad vrijednosti do čak 50 % pri temperaturama višim od 80 °C. Iako povećanje temperature sustava pogoduje ekstrakciji, na način da se povećava topljivost spoja u otapalu, fenolni spojevi podložni su hidrolizi i oksidaciji pri temperaturama višim od 60 °C (Spigno i De Faveri, 2007.) Iz toga razloga Tan i sur. (2013), Dent i sur. (2015) predlažu da temperatura ekstrakcije fenolnih spojeva ne bi trebala biti viša od 60 °C.

Ultrazvučnom ekstrakcijom također je utvrđen porast sadržaja ukupnih fenola pri temperaturi od 40 °C u usporedbi s uzorcima ekstrahiranih pri sobnoj temperaturi. Za razliku od klasične ekstrakcije, kod ultrazvučnog tretmana pri temperaturi od 70 °C nije utvrđen pad već porast vrijednosti ukupnih fenola i to kod đumbira za 21,6 % i kurkume za 15,4 % u usporedbi sa sadržajem utvrđenim pri temperaturi od 40 °C. Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti kako je kavitacija pogodovala bržem oslobađanju fenolnih spojeva u okolni medij.



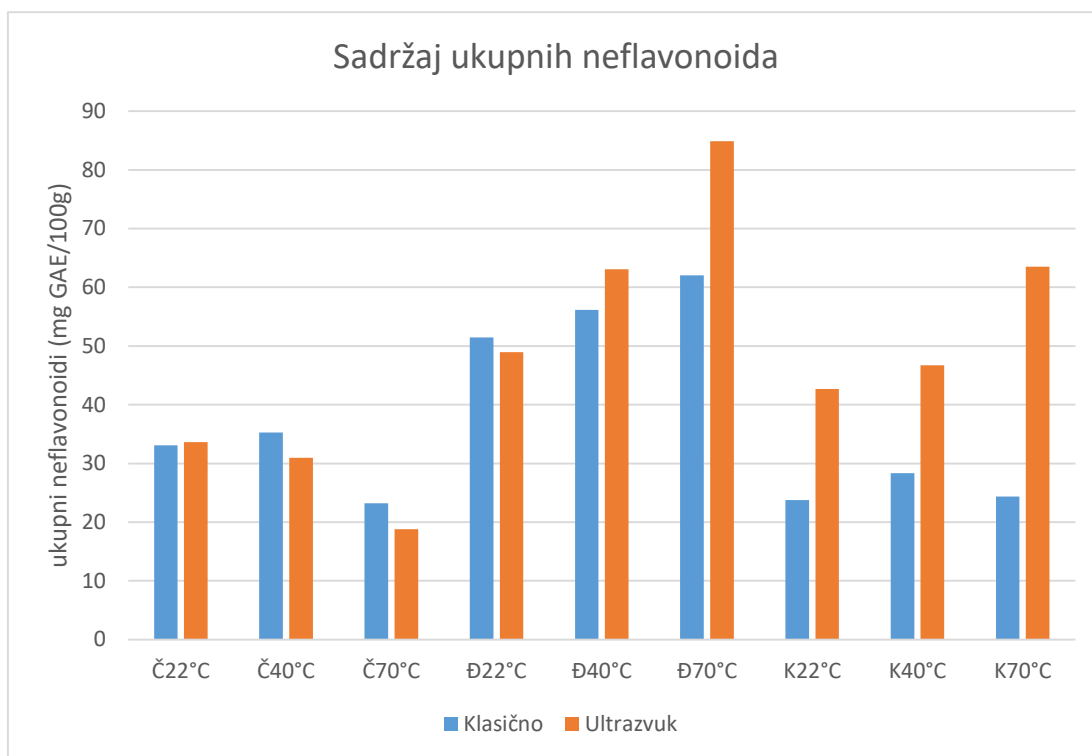
Grafikon 15. Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/100 g) ekstrakata začina tretiranih klasično i ultrazvukom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

Slični rezultati utvrđeni su i za sadržaj ukupnih flavonoida (Grafikon 16). Naime, i kod klasične i ultrazvučne ekstrakcije utvrđen je veći sadržaj ukupnih flavonoida pri temperaturi od 40 °C u usporedbi od onih ekstrahiranih pri sobnoj temperaturi. Pri temperaturi od 70 °C kod klasične ekstrakcije utvrđen je pad vrijednosti ukupnih flavonoida od 82,5 % u ekstraktu češnjaka, 32 % u ekstraktu đumbira i 32,6 % u ekstraktu kurkume. No, jednako kao kod sadržaja ukupnih fenola, ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturi od 70 °C utvrđen je porast sadržaja ukupnih flavonoida. Pa je tako kod praha češnjaka utvrđen porast ukupnih flavonoida od 30 % u usporedbi sa sadržajem utvrđenim pri temperaturi od 40 °C. Sadržaj flavonoida praha đumbira povećao se za 18 %, dok kod praha kurkume za 17,7%. Također, ultrazvučna ekstrakcija pri sobnoj temperaturi doprinijela je povećanju sadržaja ukupnih flavonoida kurkume za 11,67 % u usporedbi s uzorcima ekstrahiranim klasično.



Grafikon 16. Sadržaj ukupnih flavonoida (mg GAE/100g) ekstrakata začina tretiranih klasično i ultrazvukom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

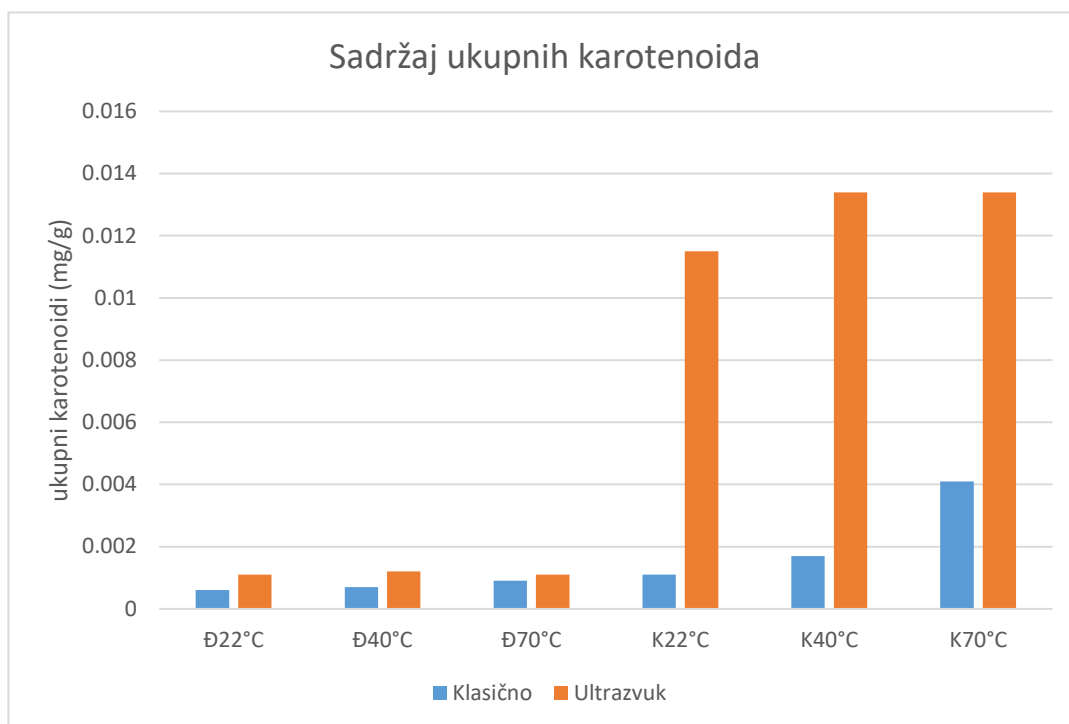
Sadržaj ukupnih neflavonoida prikazan je u Grafikonu 17. Kao i za sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, povišena temperatura sustava od 40 °C pozitivno je pogodovala ekstrakciji te su utvrđene više vrijednosti ukupnih neflavonoida u usporedbi sa sobnom temperaturom. Pri temperaturi od 70 °C utvrđen je pad vrijednosti ukupnih neflavonoida praha češnjaka za 34,5 % i kurkume 13,9 %. Iznimka je ekstrakt đumbira u kojem je utvrđen blagi porast vrijednosti od 9,44 %. Za razliku od klasične, ultrazvučnom ekstrakcijom utvrđen je porast sadržaja ukupnih neflavonoida pri višim temperaturama. Tako su najveće utvrđene vrijednosti neflavonoida u ekstraktim đumbira i kurkume utvrđene ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturi od 70 °C (uzorak DU3 i KU3). Iznimka je češnjak gdje se sadržaj ukupnih neflavonoida porastom temperature blago smanjivao.



Grafikon 17. Sadržaj ukupnih neflavonoida (mg GAE/100g) ekstrakata začina tretiranih klasično i ultrazvukom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

4.2.3. Ukupni karotenoidi

Rezultati sadržaja ukupnih karotenoida prikazani su u Grafikonu 18. Kod ekstrakata češnjaka nije analiziran sadržaj karotenoida s obzirom da navedena povrtna kultura nije karakteristična po sadržaju navedenih pigmenata. Najmanji sadržaj ukupnih karotenoida pri sobnoj temperaturi utvrđen je kod đumbira, dok najveći kod kurkume. Također, dobiveni rezultati istraživanja su pokazali da se pri višim temperaturama ekstrakcije (40 i 70 °C) neovisno o načinu ekstrakcije (klasično i ultrazvukom), sadržaj ukupnih karotenoida povećava. Tako su najveće vrijednosti ukupnih karotenoida praha đumbira i kurkume utvrđene pri temperaturi od 70 °C. Također, utvrđeno je da ultrazvuk značajno pozitivno utječe na ekstrakciju ukupnih karotenoida. Tako su uzorci praha đumbira ekstrahirani pri temperaturi od 70 °C imali 18,1 % veći sadržaj ukupnih karotenoida od uzoraka ekstrahiranih klasično pri istoj temperaturi, dok uzorci praha kurkume i do 69,4 % veći pri navedenoj temperaturi. Porast ukupnog sadržaja karotenoida ultrazvučnim tretmanom utvrdili su i drugi autori (Zou i sur., 2010; Abid i sur., 2013).



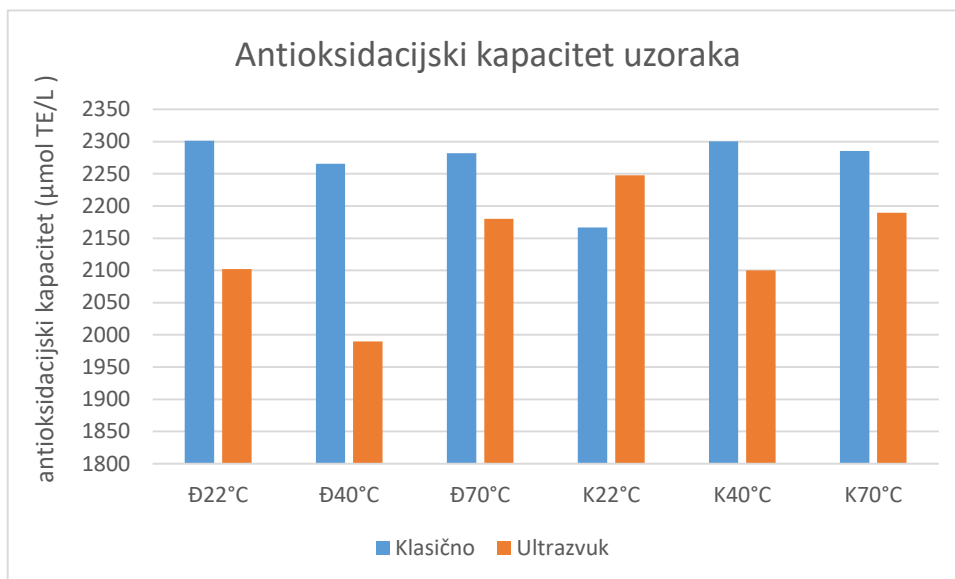
Grafikon 18. Sadržaj ukupnih karotenoida (mg/g) ekstrakata đumbira i kurkume tretiranih klasično i ultrazvukom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

4.2.4. Antioksidacijski kapacitet

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata đumbira i kurkume prikazan je na Grafikonu 19, dok antioksidacijski kapacitet ekstrakta češnjaka nije determiniran. Đumbir, koji je imao utvrđen najveći sadržaj ukupnih fenola, ujedno je i imao najveći antioksidacijski kapacitet.

Nadalje, utvrđeno je da se kod klasične ekstrakcije pri temperaturi od 40 °C antioksidacijski kapacitet praha kurkume povećavao za 5,8 % u usporedbi s uzorcima ekstrahiranim pri sobnoj temperaturi. To se može pripisati većem sadržaju fenola zbog povećane topljivosti i većeg koeficijenta difuzije pri temperaturi od 40 °C (Dvorackova i sur., 2015). Pri temperaturi od 70 °C, antioksidacijski kapacitet praha kurkume smanjio se za 0,66 %, a čemu je pak razlog hidroliza i oksidacija fenolnih spojeva pri temperaturama višim od 60 °C (Spigno i De Faveri, 2007.)

Kod ultrazvučne ekstrakcije pri 70 °C antioksidacijski kapacitet se kod uzoraka praha đumbira povećao za 8,76 % i kurkume za 4 % u odnosu na vrijednosti utvrđene pri temperaturi od 40 °C, a što je i očekivano s obzirom da su pri navedenoj temperaturi u ultrazvučnoj ekstrakciji utvrđene i više vrijednosti ukupnih fenola.



Grafikon 19. Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol TE/L}$) ekstrakata začina tretiranih klasično i ultrazvukom pri temperaturama od 21,7, 40 i 70 °C

4.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata začina

4.3.1. Rast patogenih sojeva pri dodanoj koncentraciji ekstrakata

U svim uzorcima, nakon inkubacije (osim negativne kontrole) uočen je gotovo jednak rast (zamućenje) u usporedbi s pozitivnom kontrolom. Jedina iznimka su uzorci patogenog soja *Listeria monocytogenes* koji su rasli s dodanim ekstraktom češnjaka ekstrahiranim ultrazvukom gdje je uočen slabiji rast u usporedbi s pozitivnim kontrolom.

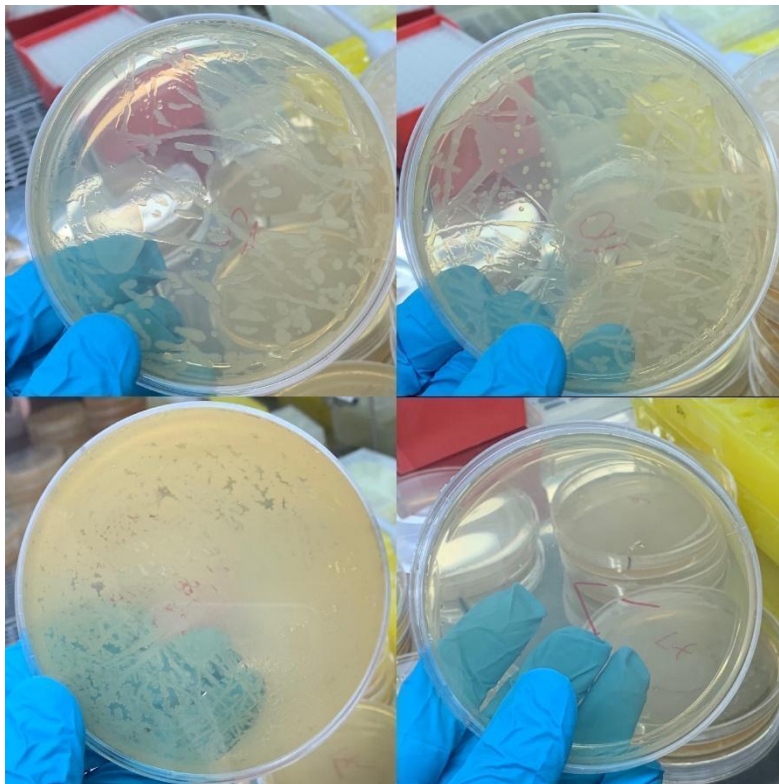
4.3.2. Brojnost (CFU vrijednost)

CFU vrijednost svih uzoraka bila je veća od 300 tako da validan broj kolonija patogenih sojeva *Salmonella*, *L.monocytogenes* i *S. aureus* nije bilo moguće odrediti.

Dodana koncentracija ekstrakata đumbira i kurkume nije značajno utjecala na smanjenje brojnosti odabranih patogenih mikroorganizama. Slične rezultate za kurkumu utvrdili su Lourenco i sur. (2013) prateći antimikrobni učinak kurkume na brojnost bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* u pilećem mesu. Rezultati nisu pokazali nikakvu značajnu redukciju patogenih sojeva dodatkom kurkume. S druge strane Bader i sur. (2016) utvrdili su antimikrobnu aktivnost kurkume na patogene sojeve *S.aureus* i *L.monocytogenes* ali koristeći drugačiju metodologiju (metodu minimalne inhibitorne koncentracije) i veće koncentracije ekstrakata u rasponu od 5 do 30 mg/mL. Za đumbir, slične rezultate utvrdili su Tagoe i Gbadgo (2009) koristeći metodu minimalne inhibitorne koncentracije. Prvi svim dodanim koncentracijama (50-500 mg/mL) nisu utvrdili antimikrobnu aktivnost đumbira na patogene sojeve *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* i *Shigella*. Slično, Nas i sur. (2018) utvrdili su puno manju inhibiciju patogenih sojeva pri manjim koncentracijama ekstrakta đumbira. S druge strane Khazal i sur. (2014) utvrdili su visoku antimikrobnu aktivnost ekstrakata đumbira na gram pozitivne i gram negativne bakterije među kojima su bili i patogeni sojevi *S.aureus* i *Salmonella*. Nadalje, utvrđeno je da ekstrakti đumbira gube svoju antimikrobnu aktivnost pri višim temperaturama, te da sadržaj antimikrobnih komponenata u ekstraktu ovisi i o vrsti otapala. Tako se kao najbolje otapalo pokazalo heksan, dok najlošije destilirana voda (Pankaj i sur., 2012). Može se zaključiti da na antimikrobna svojstva kurkume i đumbira značajno utječe sama priprema ekstrakata te dodana koncentracija začina.

Dodana koncentracija ekstrakata češnjaka također nije pokazala značajan antimikrobni učinak na patogene sojeve *Salmonella* i *S. aureus*. No, za razliku od ekstrakta kurkume i đumbira uočen je slabiji rast kolonija bakterije *Listeria monocytogenes* koja je prethodno rasla zajedno s ekstraktom češnjaka ekstrahiranim ultrazvukom pri temperaturi od 21,7 °C i 40 °C u usporedbi s pozitivnom i negativnom kontrolom (Slika 11). Dodana koncentracija praha češnjaka nije bila dovoljna da više ili potpuno inhibira patogeni soj kako bi se mogao odrediti validan broj formiranih kolonija. Slične rezultate utvrdili su Yetgin i sur. (2018) prateći antimikrobni učinak dva različita uzorka češnjaka na odabrane patogene sojeve. Koristeći metodu disk difuzije, dodatkom 303,75 µg jednog od uzorka češnjaka u diskove, nisu utvrdili zonu inhibicije na patogene sojeve *Salmonella* i *Staphylococcus aureus*, dok su za drugi uzorak češnjaka utvrdili inhibicijsku zonu i antimikrobno djelovanje na patogeni soj *Listeria monocytogenes*. Povećanjem količine ekstrakta u diskove (607,5 µg - 1155 µg) utvrdili su i veću inhibiciju na sva tri patogena soja.

Prema Josipoviću i sur. (2016) glavni spoj odgovoran za antimikrobnu aktivnost češnjaka je alicin. Kao organska komponenta, alicin je podložan degradaciji pri višim temperaturama. Tako su Mathialagan i sur. (2017) utvrdili optimalnu temperaturu ekstrakcije alicina pri 25 °C. Također, utvrdili su da je tretman ultrazvukom značajno povećao ekstrakciju alicina iz češnjaka. Antimikrobni učinak češnjaka potvrdili su Jolly i Menon (2015) prateći učinak ekstrakta češnjaka na rast bakterije *L.monocytogenes*. Utvrdili su da se povećanjem koncentracije ekstrakta povećava i inhibicija. Slične rezultate utvrdili su i Yehia i sur. (1993) prateći nekoliko ekstrakta začina, među kojima je bio i prah češnjaka.



Slika 11. formirane kolonije bakterije *Listeria monocytogenes* koja je prethodno rasla zajedno sa ekstraktom češnjaka ekstrahiranim ultrazvukom pri temperaturi od 21,7 °C (gore desno) i 40 °C (gore lijevo), pozitivna kontrola (dolje lijevo), negativna kontrola (dolje desno)

5. Zaključak

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da su ekstrakti češnjaka, đumbira i kurkume bogati specijaliziranim metabolitima, odnosno bioaktivnim komponentama.

Također, temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da su način ekstrakcije i upotreba viših temperatura utjecali na parametre osnovnog fizikalno-kemijskog sastava i sadržaja bioaktivnih komponenti začina. Vrijednosti gustoće i električne provodljivosti uzoraka povećavale su se s porastom temperature neovisno o načinu ekstrakcije. Također, povećanje temperature sustava kao i primjena ultrazvuka utjecali su na povećanje sadržaja topljive suhe tvari u ekstraktima svih analiziranih vrsta začina. Porastom temperature i klasičnom ekstrakcijom uzorci svih analiziranih vrsta začina su potamnili, dok su ultrazvučnom ekstrakcijom i porastom temperature uzorci bili svjetliji. Kod svih uzoraka ekstrakata začina utvrđene su pozitivne a^* vrijednosti što ukazuje na veće prisustvo crvene u odnosu na zelenu boju. Ultrazvučnim tretmanom pri višim temperaturama u uzorcima kurkume i đumbira utvrđen je porast b^* vrijednost, što ukazuje na veći udio žute boje, koja potječe od fenolnih spojeva kurkuminoida.

Od analiziranih začina, kurkuma sadrži najviše vitamina C, dok češnjak najmanje. Također, ultrazvučna ekstrakcija doprinijela je povećanju sadržaja vitamina C, dok je povišena temperatura negativno utjecala na sadržaj istog. Najveći sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida utvrđen je u ekstraktu đumbira. Također, temperatura od 40 °C pogodovala je ekstrakciji fenolnih spojeva svih uzoraka začina te je utvrđen pozitivan utjecaj ultrazvuka i pri temperaturi od 70 °C na sadržaj istih.

Od pigmentnih spojeva utvrđen je sadržaj karotenoida đumbira i kurkume koji se pod utjecajem viših temperatura povećavao. Također, utvrđen je pozitivan utjecaj ultrazvuka na sadržaj ukupnih karotenoida u uzorcima.

Najveći antioksidacijski kapacitet utvrđen je u ekstraktu đumbira koji se pod utjecajem temperature od 70 °C i ultrazvučnim tretmanom povećavao.

Dodana koncentracija ekstrakata đumbira i kurkume nije pokazala značajan antimikrobni učinak na odabrane patogene sojeve. Za razliku od đumbira i kurkume, dodana koncentracija ekstrakta češnjaka ipak je utjecala na rast i brojnost formiranih kolonija bakterije *L. monocytogenes*, ali nije bila dovoljna da više ili potpuno inhibira patogeni soj kako bi se mogao odrediti validan broj formiranih kolonija. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako je potrebna veća koncentracija začina u ekstraktu kako bi antimikrobna aktivnost bila zadovoljavajuća.

Dobiveni rezultati ovog istraživanja dobar su temelj za daljnja istraživanja utjecaja ultrazvučne ekstrakcije i temperature na prinos dobivenih specijaliziranih metabolita začina, posebice spojeva koji pokazuju antioksidacijski i antimikrobni učinak.

6. Popis literature

1. Aadil R.M., Zeng X.A., Han Z., Sun D.W. (2013). Effect of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141: 3201-3206.
2. Abid M., Jabbar S., Wu T., Hashim M. M., Hu B., Lei S., Zhang X., Zeng X. (2013). Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5): 1182-1187.
3. Adekunle A.O., Tiwari B.K., Cullen P.J., Scannell A.G.M., O'Donnell C.P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122(3): 500-507.
4. Akowuah G., Mariam, A., Chin J. (2009). The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. *Pharmacognosy Magazine*, 5(17): 81-85.
5. AOAC (1995). *Official methods of Analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of official Analytical chemists.
6. AOAC (2002). *Official methods of Analysis* (17th ed.). Washington, DC: Association of official Analytical chemists.
7. Bader A., Fattah Abdel A.A. (2016). Antimicrobial activity of raw and nano tumeric powder extracts, *Middle East Journal of Applied Sciences*, (6): 787-796.
8. Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006.) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by product: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.
9. Bartley G. E., Scolnik P. A. (1995). Plant carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health, *Plant Cell*, 7(7): 1027-1038.
10. Borovac M. (2005). *Začini i začinsko bilje, Mozaik knjiga, Zagreb.*
11. Bukvicki D., Gottardi D., Prasad S., Tyagi KS. (2016). Beneficial Effects of Spices in Food Preservation and Safety. *Front Microbiology*, 7: 1394.
12. Caili F., Tian H., Li Q., Cai T., Du W. (2006). Ultrasound-assisted extraction of xyloglucan from apple pomace. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(6): 511-516.
13. Car H. (2018). Kurkuma – zlatni začini indije, *Matka* 27,106: 84-85.
14. Chung W., Jung Y.J., Surh Y.J., Lee S.S., Park K.K. (2001). Antioxidative and antitumor promoting effects of (6)-paradol and its homologs. *Mutation Research*, 496:199–206.
15. De La Torre J.E., Kouassi A.P., Gassara F., Kaur Brar S., Belkacemi K. (2015). Spice Use in Food: Properties and Benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6): 1078-1088.
16. Dent M., Dragović Uzelac V., Garofulić E., Bosiljkov T., Ježek D., Brnčić M. (2015). Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(3): 475–484.
17. Dias d.D.R.C., Barros Z.M.P., de Carvalho C.B.O., Honorato F.A., Guerra N.B., Azoubel P.M. (2015). Effect of sonication on soursop juice quality. *LWT - Food Science and Technology*, 62: 883-889.

18. Drmić A., Jambrak A.R. (2010). Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2(2): 22-33.
19. Dvorackova E., Snoblova M., Chromcova L., Hrdlicka P. (2015). Effects of extraction methods on the phenolic compounds contents and antioxidant capacities of cinnamon extracts. *Food Science and Biotechnology*, 24(4): 1201-1207.
20. El-Aziz M.A., Mohamed S.H.S., Seleet F.L. (2012). Production and Evaluation of Soft Cheese Fortified with Ginger Extract as a Functional Dairy Food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62 (2): 77-83.
21. Farazuddin M., Khan A., Joshi B., Zia Q. (2014). Chemotherapeutic potential of curcumin-bearing microcells against hepatocellular carcinoma in model animals. *International Journal of Nanomedicine*, 9: 1139-1152.
22. Fonteles T.V., Costa M.G.M., Jesus A.L.T., Miranda M.R.A., Fernandes F.A.N., Rodrigues S. (2012). Power ultrasound processing of cantaloupe melon juice: Effects on quality parameter. *Food Research International*, 48(1): 41-48.
23. Gorinstein S., Leontowicz H., Leontowicz M., Namiesnik J., Najman K., Drzewiecki J., Cvikrová M., Martinčová O., Katrich E., Trakhtenberg S. (2008). Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after Treatment Protocols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 4418-4426.
24. Grace Santo U., Sankari M., Gopi. (2017). Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of *Zingiber Officinale* – An in vitro study. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(9):1417-1419.
25. Grlić LJ. (2005). Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, Ex Libris, Rijeka.
26. Grzanna R., Lindmark L., Frondoza C.G. (2005). Ginger - an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *Journal of Medicinal Food*, 8: 125 – 132.
27. Gul P., Bakht J. (2013). Antimicrobial activity of turmeric extract and its potential use in food industry. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4): 2272-2279.
28. Hayaloglu A.A., Fox P.F. (2008). Cheeses of Turkey: 3. Varieties containing herbs or spices. *Dairy Science Technology*, 88: 245-256.
29. Holm G. (1954). Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 4: 457-471.
30. Jolly D., Menon K. (2015). Antibacterial effect of garlic and ginger extracts on *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Applied And Pure Science and Agriculture*, 1(2): 111-118.
31. Josipović R., Markov K., Frece J., Stanzer D., Cvitković A., Mrvčić J. (2016). Upotreba začina u proizvodnji tradicionalnih sireva. *Mljekarstvo*, 66 (1): 12-25.
32. Kamenjarin J. (2002). Uzgoj bilja. Interna skripta, Fakultet prirodno-matematičkih znanosti i odgojnih područja Sveučilišta u Splitu, Split.
33. Khazal N., Hindi K., Khudhur Z.A., Al-Mahdi A., Chabuck A.G. (2014). Antibacterial activity of the aquatic extract of fresh, dry powder ginger, apple vinegar extract of fresh ginger and crude oil of ginger (*Zingiber officinale*) against different types of bacteria in hilla city. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5): 414-417.

34. Kim K.J., Yu H.H., Cha J.D., Seo S.J., Choi N.Y., You Y.O. (2005). Antibacterial activity of *Curcuma longa* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus*. *Phytotherapy Research*, 19 (7): 599-604.
35. Kolovrat M. (2006). Čudesni svijet magije – Češnjak. TTR Kolovrat, Zagreb.
36. Kozarić Z. (2011). Začini i aromatično bilje, *Gospodarski list*, Zagreb.
37. Kozarić Z. (2011). Najčešći začini za kobasice i salame, Agrokлуб
<https://www.agroklub.com/povrcarstvo/najcesci-zacini-za-kobasice-i-salame/5949/> - pristup 1.7.2019.
38. Kulcu R. (2018). Determination of the effects of different packaging methods and materials on storage time of dried apple Matter. *International Journal of Science and Technology*, 4: 238-255.
39. Lazaridou A., Biliaderis C.G., Bacandritsos N., Sabatini A. G. (2004). Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. *Journal of Food Engineering*, 64: 9-21.
40. Lesinger I. (2012). Priroda kao lijek, Adamić, Zagreb.
41. Lourenco T., Mendonca E., Nalevaiko P., Melo R., Silva P., Rossi D. (2013). Antimicrobial effect of turmeric (*Curcuma longa*) on chicken breast meat contamination. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 15(2): 79-82.
42. Lovrić T. (2003). *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva* Zagreb, HINUS Miramarska 13b, 299-300.
43. Manjunatha J.R., Bettadaiah B.K., Negi P.S., Srinivas P. (2013). Synthesis of quinoline derivatives of tetrahydrocurcumin and zingerone and evaluation of their antioxidant and antibacterial attributes. *Food Chemistry*, 136: 650–658.
44. Masuda Y., Kikuzaki H., Hisamoto M., Nakatani N. (2004). Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *Biofactors*, 21: 293–296.
45. Mathialagan R., Mansor N., Shamsuddin M., Uemura Y., Majeed Z. (2017) Optimisation of Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) of Allicin from Garlic (*Allium sativum* L.). *Chemical Engineering Transactions*, 56: 1747-1752.
46. Miller N. J., Diplock A. T., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V., Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4): 407- 412.
47. Nas F., M A., Ahmad A.M. (2018). In Vitro Antibacterial Activity of Different Extracts of Zingiber Officinale against Bacterial Isolates Responsible for Food Spoilage. *SOA Archives of Pharmacy & Pharmacology*, 1(1): 1-5.
48. Naz S., Jabeen S, Ilyas S., Manzoor F., Aslam F., Ali A. (2010). Antibacterial activity of curcuma longa varieties against different strains of bacteria. *Pakistan Journal of Botany*, 455-462.
49. Niamsa N., Sittiwet C. (2009). Antimicrobial Activity of *Curcuma longa* Aqueous Extract. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4: 173-77.
50. Niranjana A., Prakash D., (2008). Chemical constituents and biological activities of turmeric (*Curcuma longa* L.), *Journal of Food Science and Technology –Mysore*, 45(2): 109-116.
51. Ordoñez-Santos L.G., Martínez-Girón J., Arias-Jaramillo M.E. (2017). Effect of ultrasound treatment on visual color, vitamin C, total phenols, and carotenoids content in Cape gooseberry juice. *Food Chemistry*, 233:96-100.

52. Ough C. S., Amerine M. A. (1988). *Methods for analysis of musts and wines*, Washington, USA: John Wiley&Sons.
53. Pankaj S., Al-Tamimi B., Al-Nassri N., Al-Mamari R. (2012). Effect of temperature on antibiotic properties of garlic (*Allium sativum* L.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *African Journal of Biotechnology*, 11(95): 16192-16195.
54. Parađiković N. (2009). Opće i specijalno povrćarstvo. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 189-193.
55. Park Y., Wen J., Bang S., Park S., Song S. (2006) Gingerol induces cell cycle arrest and cell death of mutant p53-expressing pancreatic cancer cells. *Yonsei Med Journal*, 47: 688–697.
56. Peter K.V., Shylaja, M.R. (2012). Introduction to herbs and spices: definitions, trade and applications. In: *The Handbook of herbs and spices* Second edition Woodhead Publishing, 1-24.
57. Plantea (2016). Đumbir, <https://www.plantea.com.hr/dumbir/>, pristupljeno 2.7.2019
58. Plantea (2016). Kurkuma, <https://www.plantea.com.hr/kurkuma/>, pristupljeno 3.7.2019
59. Prasad S., Tyagi AK., (2015). *Ginger and Its Constituents: Role in Prevention and Treatment of Gastrointestinal Cancer*. Hindawi Publishing Corporation Gastroenterology Research and Practice, 2015:, 1-11 str.
60. Pricina L., Karklina D. (2014). Natural Antioxidant Changes in Fresh and Dried Spices and Vegetables. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 8(5): 492-496.
61. Radulović N.S., Blagojević P., Stojanović-Radić Z.Z., Stojanović N. (2013). Antimicrobial plant metabolites: Structural diversity and mechanism of action. *Current Medicinal Chemistry*, 20: 932-952.
62. Rainy G., Sharma A., Maina P., Shukla R.N. (2014). Study of chemical composition of garlic oil and comparative analysis of co trimoxazole in response to in vitro antibacterial activity. *International Research Journal of Pharmacy*, 5: 97-101.
63. Ravindran P.N. (2017). *The Encyclopedia of Herbs & Spices* Volume 1, CAB International, Wallingford, UK.
64. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
65. Rubio L., Motilva M. J., Romero M. P. (2013). Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53: 943–953.
66. Silva N., Alves S., Gonçalves A., Amaral J.S., Poeta P. (2013): Antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Science and Technology International*, 19(6): 503-510.
67. Spigno G., Tramelli L., De Faveri D. M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grapemarc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81: 200–208.
68. Sreejayan N., Rao M.N.A., Priyadarsini K.I., Devasagayam T.P.A. (1997). Inhibition of radiationinduced lipid peroxidation by curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*, 151: 127-130.

69. Stanojević J.S., Stanojević L.P., Cvetković D.J., Danilović B.R.(2015). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the turmeric essential oil (*Curcuma domestica* Val.). *Advanced technologies*, 4(2): 19–25.
70. Šic Žlabur J. (2015). Utjecaj bioaktivnih komponenata stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni) na kvalitetu voćnog soka. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
71. Šic Žlabur J., Dobričević N., Pliestić S., Galić A., Bilić D.P., Voća S. (2017). Antioxidant potential of fruit juice with added chokeberry powder (*Aronia melanocarpa*), *Molecules*, 22(12), 2158.
72. Škrinjar M., Tešanović D. (2007). Hrana u ugostiteljstvu i njeno čuvanje. Prirodoslovno matematički fakultet, Novi Sad.
73. Tagoe D., Gbadago F. (2009). A Comparison of the Antimicrobial Effectiveness of Aqueous Extracts of Garlic, Ginger and Lime and Two Conventional Antibiotics on *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp* and *Bacillus cereus*. *Internet Journal of Microbiology*, 8(2): 1-6.
74. Tan M.C., Tan C.P., Ho C.W. (2013) Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems, *International Food Research Journal*, 20(6): 3117-3123.
75. Tiwari R.K. (2011). Garlic as food, spice and medicine: as prospective. *Journal of Pharmacy Research*, 4(6): 1857-1860
76. Wettstein D. (1957). Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, 12: 427-443.
77. Yehia A.H., Sabah I.M., Elmer H.M. (1993). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to Selected Spices. *Journal of Food Protection*, 56(10): 876-878.
78. Yetgin A., Canlı, K., Altuner E.M. (2018). Comparison of Antimicrobial Activity of *Allium sativum* Cloves from China and Taşköprü, Turkey. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018(1b): 1-5.
79. Zou Y., Jiang A. (2016). Effect of ultrasound treatment on quality and microbial load of carrot juice. *Food Science and Technology*, 36(1): 111-115.

7. Prilog

Tablica 5. Osnovni kemijski sastav i fizikalne karakteristike ekstrakata praha češnjaka, đumbira i kurkume

UZORAK	GUSTOĆA (g/cm ³) p≤0,0001	EL. PROV. (μS/cm) p≤0,0001	TST (%) p≤0,0001	UK. KIS. (%) p≤0,0001	pH p≤0,0001
KLASIČNA EKSTRAKCIJA					
ČK1	1,0033 ^c ±0,01	546,66 ^o ±1,52	1,39 ^d ±0,01	0,35 ^{bdc} ±0,01	5,48 ^{ih} ±0,12
ČK2	1,0031 ^d ±0,01	550,66 ^o ±3,21	1,40 ^d ±0,01	0,48 ^a ± 0,10	5,52 ^{ih} ±0,03
ČK3	1,0035 ^a ±0,01	568,33 ^l ±0,57	1,53 ^a ±0,01	0,46 ^{ab} ±0,05	5,48 ^{ih} ±0,01
ĐK1	0,9991 ^{ij} ±0,01	988,33 ^k ±1,15	0,34 ^l ±0,02	0,48 ^a ±0,14	5,80 ^{ef} ±0,13
ĐK2	0,9990 ^{ki} ±0,01	1011,00 ⁱ ±4,00	0,32 ^l ±0,02	0,42 ^{abc} ±0,03	6,14 ^{bc} ±0,09
ĐK3	0,9992 ^{ih} ±0,01	1067,33 ^z ±1,15	0,40 ^{ki} ±0,01	0,33 ^{cd} ±0,02	6,13 ^{bc} ±0,05
KK1	0,9994 ^{fe} ±0,01	1277,67 ^e ±1,52	0,42 ^{ih} ±0,01	0,32 ^{cd} ±0,05	6,36 ^a ±0,08
KK2	0,9993 ^{fg} ±0,01	1303,33 ^d ±0,58	0,43 ^{ih} ±0,01	0,35 ^{bcd} ±0,01	6,04 ^{cd} ±0,06
KK3	0,9994 ^e ±0,01	1402,33 ^a ±1,15	0,46 ^f ±0,01	0,34 ^{bcd} ±0,01	6,29 ^{ab} ±0,03
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA					
ČU1	1,0031 ^d ±0,01	544,67 ^o ±0,57	1,44 ^c ±0,01	0,34 ^{bcd} ±0,01	5,56 ^{gh} ±0,14
ČU2	1,0032 ^b ±0,01	563,00 ^l ±0,01	1,48 ^b ±0,01	0,37 ^{abcd} ±0,03	5,36 ^{ij} ±0,06
ČU3	1,0034 ^b ±0,01	568,00 ^o ±0,01	1,53 ^a ±0,01	0,35 ^{bcd} ±0,05	5,29 ^j ±0,06
ĐU1	0,9990 ^k ±0,01	1016,66 ⁱ ±0,58	0,39 ^k ±0,01	0,30 ^{cd} ±0,03	5,92 ^{de} ±0,02
ĐU2	0,9990 ^k ±0,01	1035,00 ^h ±0,01	0,42 ^{ij} ±0,01	0,31 ^{cd} ±0,05	5,70 ^{fg} ±0,09
ĐU3	0,9992 ^h ±0,01	1092,66 ^f ±0,58	0,44 ^{gh} ±0,01	0,30 ^d ±0,05	5,92 ^{de} ±0,09
KU1	0,9991 ^{ij} ±0,01	1302,67 ^d ±0,58	0,43 ^{ih} ±0,01	0,33 ^{cd} ±0,02	5,84 ^{ef} ±0,02
KU2	0,9992 ^h ±0,01	1321,67 ^c ±0,57	0,45 ^{gf} ±0,01	0,29 ^d ±0,05	5,84 ^{ef} ±0,05
KU3	0,9993 ^g ±0,01	1377,33 ^b ±0,57	0,50 ^e ±0,01	0,30 ^d ±0,05	5,95 ^{de} ±0,12

EL. PROV. – elektroprovodljivost; TST – topljiva suha tvar; UK. KIS. – ukupne kiseline

Tablica 6. Parametri boje uzoraka ekstrakata praha češnjaka, đumbira i kurkume

UZORAK	L*	a*	b*	C	H°
	p≤0,0001	p≤0,0001	p≤0,0001	p≤0,0001	p≤0,0001
KLASIČNA EKSTRAKCIJA					
ČK1	21,95 ^b	2,42 ^q	10,76 ^d	11,72 ^e	77,30 ^a
ČK2	22,24 ^a	2,46 ^p	10,42 ^a	10,71 ^h	76,74 ^b
ČK3	17,34 ^f	2,59 ^o	4,85 ^k	5,11 ^m	71,63 ^e
ĐK1	16,93 ^h	10,70 ^a	10,33 ^g	14,88 ^b	43,99 ^j
ĐK2	15,60 ^j	9,84 ^b	6,06 ^j	11,56 ^f	31,64 ^o
ĐK3	14,57 ^p	4,10 ^h	1,58 ^q	4,39 ^p	21,01 ^r
KK1	17,27 ^g	9,55 ^c	12,65 ^a	15,85 ^a	52,93 ^h
KK2	16,67 ⁱ	9,41 ^d	10,88 ^c	14,38 ^c	49,14 ⁱ
KK3	14,90 ⁿ	4,43 ^f	3,38 ^m	5,157 ^k	37,31 ^m
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA					
ČU1	19,61 ^d	3,20 ^m	10,41 ^f	10,89 ^g	72,89 ^c
ČU2	17,88 ^e	2,59 ^o	7,17 ^h	7,62 ^j	70,14 ^f
ČU3	19,83 ^c	3,87 ⁱ	11,93 ^b	12,54 ^d	72,01 ^d
ĐU1	14,57 ^p	4,20 ^g	1,67 ^p	4,52 ^o	21,70 ^q
ĐU2	14,57 ^p	2,98 ⁿ	1,44 ^r	3,31 ^r	25,74 ^p
ĐU3	15,43 ^l	3,21 ^l	2,94 ^o	4,35 ^q	42,45 ^k
KU1	15,12 ^m	3,32 ^k	4,22 ^l	5,37 ^l	31,84 ⁿ
KU2	14,82 ^o	3,49 ^j	2,97 ⁿ	4,58 ⁿ	40,40 ^l
KU3	15,58 ^k	4,50 ^e	6,47 ⁱ	7,88 ⁱ	55,22 ^g

Tablica 7. Sadržaj bioaktivnih komponenti ekstrakata praha češnjaka, đumbira i kurkume

UZORAK	VITAMIN C (mg/100g) p≤0,0001	UK_FENOL (mgGAE /100 g) p≤0,0001	FLAV (mgGAE/10g) p≤0,0001	NFLV (mgGAE/10g) p≤0,0001	UK_KAR (mg/g) p≤0,0001	ANT_KAP (μmol TE/L) p≤0,0001
KLASIČNA EKSTRAKCIJA						
ČK1	8,61 ^e ±0,68	43,67 ^l ±4,24	10,54 ^k ±3,64	33,11 ⁱ ±0,57	ND	ND
ČK2	6,62 ^f	41,67 ^{lm} ±1,17	6,45 ^l ±0,96	35,24 ^h ±1,84	ND	ND
ČK3	4,42 ^h ±0,33	23,52 ^o ±1,91	1,84 ⁿ ±0,56	23,19 ^l ±0,42	ND	ND
ĐK1	6,62 ^f	146,02 ^c ±1,15	94,58 ^b ±0,98	51,44 ^d ±0,96	0,0006 ^k ±0,1	2301,31 ^a ±18,73
ĐK2	5,96 ^{fs} ±0,88	166,80 ^b ±0,50	110,58 ^a ±1,07	56,16 ^c ±0,51	0,0007 ⁱ ±0,1	2265,40 ^a ±53,52
ĐK3	5,29 ^{gh} ±0,01	125,86 ^c ±0,60	63,84 ^{ef} ±1,01	62,02 ^b ±0,65	0,0009 ^h ±0,1	2282,09 ^a ±15,14
KK1	12,35 ^c ±0,77	67,57 ^j ±0,50	48,81 ⁱ ±1,11	23,76 ^l ±0,61	0,0011 ^f ±0,1	2166,48 ^{cd} ±40,0
KK2	10,81 ^d ±0,38	77,86 ⁱ ±0,64	49,54 ^h ±0,43	28,32 ^k ±0,83	0,0017 ^d ±0,1	2300,54 ^a ±7,27
KK3	8,84 ^e ±0,33	57,24 ^k ±0,40	32,88 ^j ±0,15	24,37 ^l ±0,28	0,0041 ^c ±0,3	2285,24 ^a ±17,67
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA						
ČU1	8,26 ^e ±0,33	39,11 ^m ±0,74	5,32 ^{lm} ±0,68	33,61 ^{hi} ±0,48	ND	ND
ČU2	8,07 ^e	34,48 ⁿ ±0,80	3,41 ^{mn} ±1,04	30,95 ^j ±0,62	ND	ND
ČU3	5,76 ^{fg}	23,65 ^o ±0,99	4,87 ^{lm} ±1,06	18,79 ^m ±0,16	ND	ND
ĐU1	9,03 ^e ±0,33	115,51 ^f ±0,45	66,57 ^{de} ±0,46	48,94 ^e ±0,56	0,0011 ^f ±0,1	2102,00 ^d ±25,69
ĐU2	8,84 ^e ±0,33	138,93 ^d ±1,96	75,82 ^c ±1,99	63,10 ^b ±0,11	0,0012 ^e ±0,1	1989,69 ^e ±91,12
ĐU3	6,53 ^f ±0,67	177,32 ^a ±0,67	92,53 ^b ±0,61	84,88 ^a ±1,14	0,0011 ^f ±0,1	2180,28 ^{cd} ±27,7
KU1	17,10 ^a ±0,33	97,92 ^h ±1,15	55,26 ^g ±1,64	42,66 ^g ±0,77	0,0115 ^b ±0,1	2247,60 ^{ab} ±1,87
KU2	15,79 ^b ±0,33	108,79 ^g ±0,43	62,07 ^f ±0,47	46,73 ^f ±0,79	0,0134 ^a ±0,1	2099,90 ^d ±47,42
KU3	14,41 ^b ±0,58	128,67 ^e ±1,11	67,17 ^d ±0,22	63,50 ^b ±2,32	0,0134 ^a ±0,1	2189,42 ^{bc} ±19,3

UK_FENOL - ukupni fenoli; FLAV - flavonoidi; NFLV - ne flavonoidi; UK-KAR - ukupni karotenoidi; ANT_KAP - antioksidacijski kapacitet; ND - nije definirano

Životopis

Marko Brajer rođen je u Zagrebu 27.02.1993. godine. Od 2008. do 2011. pohađa Prvu Gimnaziju u Zagrebu. Nakon mature upisuje Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilišta u Zagrebu kojeg je pohađao do lipnja 2014. U rujnu 2014. upisuje Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, smjer Hortikultura. U rujnu 2017. nastavlja diplomski studij na istoimenom fakultetu, usmjerenje Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi. Pokazuje veliki interes za primjenjenu mikrobiologiju u poljoprivredi, mikrobiologiju namirnica, biljnu biotehnologiju te uzgoj, doradu i kvalitetu voća, povrća i ostalih hortikulturnih sirovina. Odrađivajući stručnu praksu u in vitro laboratoriju usavršio je metode oplemenjivanja i brzog vegetativnog razmnožavanja biljaka poput mikropropagacije. Paralelno uz fakultet već 4 godine radi na poziciji software testera u nekoliko različitih informatičkih tvrtki gdje je stekao osnovna znanja koja će mu pomoći u razvoju digitalizacije i boljem upravljanju poljoprivredom proizvodnjom. Govorna interakcija, produkcija i pisanje engleskog jezika mu je na razini B2, čitanje na B1, a slušanje na razini C1. Može razumjeti govore na njemačkom jeziku. U slobodno vrijeme voli boraviti u prirodi, trčati, planinariti i čitati.