

ANTIMIKROBNA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST CIJEĐENOG SOKA ARONIA MELANOCARPA

Devčić, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:719449>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Luka Devčić

ANTIMIKROBNO I ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE CIJEĐENOG SOKA *ARONIA*
MELANOCARPA

Završni rad

Rijeka, 2021. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Luka Devčić

ANTIMIKROBNO I ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE CIJEĐENOG SOKA *ARONIA*
MELANOCARPA

Završni rad

Rijeka, 2021. godina

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Dalibor Broznić

Završni rad obranjen je dana 22. rujna 2021. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin

2. Izv. prof. dr. sc. Marin Tota

3. Izv. prof. dr. sc. Dalibor Broznić

Rad sadrži 40 stranica, 16 slika, 7 tablica, 31 literaturni navod.

Zahvala:

Zahvalu upućujem mentoru, izv. prof. dr. sc. Daliboru Brozniću te izv. prof. dr. sc. Ivani Gobin na pruženoj mogućnosti izvršavanja ovog rada i savjetima pri izvedbi koji su mi iznimno pomogli. Zahvaljujem i svojim roditeljima, Đurđici i Nenadu Devčiću, na uzorcima potrebnim za rad.

SAŽETAK

Aronia melanocarpa je bobičasto voće čiji sok je poznat po jakim antioksidativnim, gastro-i hepatoprotektivnim svojstvima. Ovim istraživanjem proučavano je antioksidativno djelovanje dvaju različitih uzoraka soka aronije: „Biofructus“ proizveden u Slavoniji hladnim prešanjem i pasterizacijom i „Rabenhorst“ kupljen u slobodnoj prodaji. Također proučavano je i njihovo antimikrobno djelovanje te potencijalni sinergistički učinci soka aronije s probiotičkom bakterijom *Lactobacillus plantarum* B u smjesi s patogenom *Listeria monocytogenes*.

Antioksidativnim istraživanjem kvantificiran je antioksidativni potencijal soka aronije uz primjenu DPPH• i TROLOX metode. Antimikrobni dio istraživanja provodio se na nekoliko bakterija: *L.monocytogenes*, *L.plantarum* B, *Staphylococcus aureus*.

Uzorak „Rabenhorst“ i uzorak „Biofructus“ pokazali su visoki antioksidativni potencijal, s time da je uzorak „Rabenhorst“ dao bržu reakciju s DPPH radikalom. Na bakterijama *L. monocytogenes* i *S. aureus* dokazane su različite razine inhibicije rasta, dok kod *L. plantarum* B sok aronije nije uzrokovao inhibiciju bakterija. Zbog skoro potpune inhibicije rasta *L. monocytogenes* i slabog utjecaja uzorka na *L. plantarum* B ispitana je i sinergijski učinak u takvoj smjesi. Ovisno o omjerima smjesa, uočen je inhibitorni učinak na patogenu bakteriju *L. monocytogenes*, a aktivacijski na probiotičku *L. plantarum* B

Ovim istraživanjem dokazana su antimikrobna svojstva soka aronije prema bakteriji *L. monocytogenesi* poticanje rasta *L. plantarum* B. Antioksidativnom analizom otkriveno je postojanje razlike između vrsta antioksidanasa u uzorcima „Biofructus“ i „Rabenhorst“.

Ključne riječi: aronija, DPPH radikal, TEAC metoda, antioksidans, bakterijska inhibicija, sinergizam

SUMMARY

Aronia melanocarpa is a berry fruit whose juice is known for its strong antioxidant, gastro- and hepatoprotective properties. This study examined the antioxidant activity of the two different samples of chokeberry juice: "Biofructus" produced in Slavonia by cold pressing and pasteurization and "Rabenhorst" purchased on the market. Antimicrobial activity and synergistic effects of chokeberry juice in a mixture with the pathogen bacteria *Listeria monocytogenes* and the probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* B were also studied.

The antioxidant activity of chokeberry juice was quantified using the DPPH[·] and TROLOX methods. The while antimicrobial activity of chokeberry juice was conducted on several bacteria: *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum* B and *Staphylococcus aureus*.

Both chokeberry juices, the "Rabenhorst" and the "Biofructus" showed a high antioxidant potential, with the "Rabenhorst" juice giving a faster reaction with the DPPH radical. Different levels of inhibition have been demonstrated in *L. monocytogenes* and *S. aureus*, while *L. plantarum* B chokeberry juice did not show bacterial inhibition. Due to the almost complete growth *L. monocytogenes* inhibition and the weak inhibition of the *L. plantarum* B, the synergistic effect in that mixture was also examined. Depending on the mixture ratios, an inhibitory effect on the pathogenic bacterium *L. monocytogenes* was observed and activation effect on the probiotic *L. plantarum* B.

This study proved the antimicrobial properties of *Aronia melanocarpa* chokeberry juice against *L. monocytogenes* and growth stimulation on *L. plantarum* B. Antioxidant analysis revealed the existence of different types of antioxidants in the "Biofructus" and "Rabenhorst" samples.

Keywords: chokeberry, DPPH radical, TEAC method, antioxidant, bacterial inhibition, synergism

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. ARONIJA	1
1.1.1. KEMIJSKI SASTAV I ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL ARONIJE	1
1.2. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE SOKOVA BOBIČASTOG VOĆA	2
1.2.1. <i>Lactobacillus</i> spp	3
1.2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	3
1.2.3. <i>Lactobacillus reuteri</i>	4
1.2.4. <i>Streptococcus salivarius K12</i>	4
1.2.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.2.6. <i>Listeria monocytogenes</i>	5
1.2.7. HRANJIVE PODLOGE	6
1.3. ANTIOKSIDANSI	8
1.4. SLOBODNI RADIKALI	10
1.4.1. DPPH·	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. UZORCI ARONIJE	12
3.2. KEMIKALIJE	13
3.3. HRANJIVE PODLOGE	13
3.4. BAKTERIJE	13
3.5. INSTRUMENTI	14
3.6. METODE RADA	15
3.6.1 DPPH· ANALIZA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI UZORAKA SOKA ARONIJE	15
3.6.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA UZORKA TEAC METODOM	16
3.6.3. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE UZORAKA SOKA ARONIJE	17
3.6.5. DJELOVANJE UZORAKA SOKA ARONIJE NA SMJESU <i>L. plantarum</i> B i <i>L. monocytogenes</i>	18
3.7. Statistička analiza	19
4. REZULTATI	19
4.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST UZORAKA SOKA ARONIJE (DPPH· ANALIZA)	19

4.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST UZORAKA SOKA ARONIJE (TEAC ANALIZA)	21
4.3. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE UZORAKA SOKA ARONIJE NA <i>S. aureus</i> , <i>S. salivarius</i> i <i>L. monocytogenes</i>	22
4.3.1. DJELOVANJE UZORAKA SOKA ARONIJE NA <i>L. plantarum</i> B	25
4.4. SINERGISTIČKO DJELOVANJE UZORAKA SOKA ARONIJE U SMJESI <i>L. plantarum</i> B i <i>L. monocytogenes</i>	27
5. RASPRAVA.....	30
6. ZAKLJUČAK	33
7. LITERATURA.....	34
8. POPIS SLIKA	38
9. POPIS TABLICA.....	39
10. ŽIVOTOPIS	40

1.UVOD

1.1. ARONIJA

Aronia melanocarpa je grm porodice ružavki porijeklom iz Sjeverne Amerike. Kultivacija u Europi, za prehrambenu industriju, započela je u Rusiji početkom 20.-og stoljeća u Sibiru. Do sredine 20.-og stoljeća uzgoj aronije se proširio na veliki broj istočno europskih zemalja (oko 1600 ha Poljske pokrivaju grmovi aronije). Iako aronija može rasti i u divljini, uzgajani oblici daju veće i slađe plodove.

S obzirom na povećani trend prevencije kroničnih bolesti prirodnim tretmanima, povećao se i interes za bobičasto voće poput aronije zbog njihovih antioksidativnih, gastroprotektivnih, hepatoprotektivnih i antiproliferativnih ljekovitih svojstava. Aronija je bogata bioaktivnim spojevima koji se koriste kao prirodne boje i poboljšavaju zdravstveno stanje. U bioaktivne spojeve ubrajaju se antioksidansi kao što su fenolne komponente, antocijani slično te vitamini (vitamin C i E), minerali, karotenoidi, pektini, organske kiseline i ugljikohidratu manjim količinama. Zbog toga što aronija obiluje navedenim spojevima, ona se ubraja u jednu od najefikasnijih bobičastih voćnih vrsta u prevenciji kroničnih bolesti (pogotovo kardiovaskularnih).

Plod aronije sazrijeva između srpnja i rujna, a najčešće se bere krajem kolovoza ili početkom rujna da bi se dobile što teže bobice s visokim udjelom antocijana.

Okus bobica aronije varira, ovisno o udjelima šećera i tanina, između slatkog i trpkog. Zbog količine tanina, time i trpkog okusa, konzumacija sirovih bobica aronije nije popularna. Aronija se stoga uglavnom koristi u prerađenim oblicima, bilo kao sok ili dodatak u drugoj hrani. [1]

1.1.1. KEMIJSKI SASTAV I ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL ARONIJE

Aronija je izvor mnogih bioaktivnih komponenti širokog spektra ljekovitih učinaka. Iako se sirove bobice rijetko koriste u prehrani zbog često trpkog i intenzivnog okusa, koriste se razne prehrambene prerađevine poput sokova, sirupa, džemova, pekmeza, vina, čajeva i slično.

Polifenoli su biofaktori koji određuju bioaktivnost aronije, a bobice su jedan od najbogatijih izvora antocijana, proantocijana, flavonola, flavanola, proantocijanidina i fenolne kiseline. Bobice aronije imaju veliki antioksidativni potencijal i pozitivan učinak na ljudsko zdravlje zbog smanjenja prisutnosti slobodnih radikala. Neka istraživanja ukazuju na obećavajuću mogućnost sinergističkog djelovanja komponenti plodova aronije s drugim prehranbenim namirnicama. Tako dizajnirana hrana sadržavala bi viši antioksidativni potencijal.

Plodovi aronije su poznati po snažnim antioksidativnim svojstvima i uobičajeno višeg antioksidativnog potencijala od drugih biljaka ispitanih sa sličnim ciljem. Uz kupine, crni ribiz, borovnice i bobice bazge, aronija je jedna od biljaka bogatija antocijanima.

Antioksidativna moć aronije razlikuje se u sokovima, pekmezima, džemovima, kapsulama i prahovima. Zanemarujući razliku među proizvodima, antioksidativni potencijal ovisi o vremenu berbe i najviše o načinu prerade. Tijekom prerade najjači utjecaj imaju čimbenici poput temperature, otapala, načinu prešanja itd. Jačina antioksidativnog potencijala odgovara najvećim dijelom antocijanima (66,7%), pa proantocijanidima (25,1%), a zatim u manjoj mjeri drugim polifenolima. [2]

1.2. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE SOKOVA BOBIČASTOG VOĆA

Studije su pokazale da je rast nekih bakterija koje mogu uzrokovati gingivitis, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Pseudomonas aeruginosa*, inhibiran na pločama agara u *in vitro* uvjetima uslijed korištenja raznih sokova bobičastog voća poput crnog ribiza i vučjeg trna. Bakterijska inhibicija je mjerena kod koncentracije soka od 20% pri pH 4,1-5,4. Ovakvi rezultati mogu imati kliničke učinke za razvoj biofilma, umanjujući rizik kvarenja zubi i gingivitisa. [3]

Antibakterijsko djelovanje nije ograničeno samo na plodove aronije. Listovi također sadrže visoku količinu fenolnih spojeva. Ekstrakt iz lista djeluje bakteriostatski, smanjujući brzinu rasta i produžujući lag fazu mikroorganizama. Efenberger-Szmechtyk i suradnici u svom istraživanju koristili su gram negativne bakterije: *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas fragi*, *Enterobacter aerogenes* i *Moraxella osloensis* i gram pozitivne: *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus sakei*,

Staphylococcus aureus i *Enterococcus faecium* te dokazali da ekstrakt lista aronije ima antibakterijski učinak na navedene bakterije. To su bakterije koje često uzrokuju kvarenje mesa i mesnih proizvoda. [4]

1.2.1. *Lactobacillus* spp

Laktobacili su gram pozitivne, mikroaerofilne, štapičaste bakterije koje ne tvore spore. Sastoje se od preko 170 vrsta bakterija koje se ne mogu lagano razlikovati po fenotipu. Iako su dio gastrointestinalne i vaginalne mikrobne flore, mogu se u nekim slučajevima ponašati kao oportunistički patogeni. Često se koriste u probiotičkim preparatima kod infekcije *Clostridium difficile*. Laktobacili su otporni na niski pH i preživljavaju unos oralnim putem. [5]

Laktobacili su bitna komponenta ljudskog organizma jer tvore liniju obrane protiv patogena intestinalnog i vaginalnog sustava. Stvaraju biofilm koji im omogućuje preživljavanje u nepovoljnim uvjetima. Laktobacili mogu biti homofermentativni i heterofermentativni. Također, lučenjem vodikovog peroksida, inhibiraju rast gljivica poput *Candida albicans*. [6]

1.2.2. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum je homofermentativna bakterija koja proizvodi L i D izomere mliječne kiseline. Često ju nalazimo u mliječnim proizvodima, mesnim prerađevinama i ukiseljenom povrću.

Broj studija koji ukazuju na ljekovito djelovanje *L. plantarum* raste. *Lactobacillus plantarum* ima sposobnost proizvodnje bakteriocina, koji je antimikrobni peptid koji ima moguću primjenu kao konzervans hrane i kao agens sinergističkog djelovanja prema drugim antibioticima. [7]

1.2.3. *Lactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri je laktobacil kojeg često nalazimo u intestinalnom sustavu. Nema uočenih patogenih učinaka, a može imati pozitivno djelovanje na organizam. Izoliran je iz mnogih mesnih i mliječnih prerađevina, a nalazimo ga probavnom sustavu ljudi, ovaca, peradi, svinja i glodavaca.

L. reuteri više dobiva na značaju zbog mogućeg liječenja kronične konstipacije. Pokazao se pozitivan utjecaj *L. reuteri* na peristaltiku crijeva kod dojenčadi. Također ima pozitivan učinak na peristaltiku crijeva kod odraslih.[8]

1.2.4. *Streptococcus salivarius* K12

Streptococcus salivarius je gram pozitivna, katalaza i oksidaza negativna, fakultativno anaerobna bakterija koja često živi u gornjem dišnom sustavu i usnoj šupljini. Ovisno o hranjivoj podlozi, bakterija može biti s kapsulom ili bez. Ako hranjiva podloga sadrži saharozu, bakterija proizvodi kapsulu, a ako je umjesto saharoze prisutna glukoza, bakterija nije sposobna proizvesti kapsulu.

S. salivarius K12 je oralni probiotik koji luči dva lantibiotika (salivaricin A2 i salivaricin B) koji antagoniziraju rast *Streptococcus pyogenes* (uzročnik infekcija oralne i nosne šupljine). Prisutnost *S. salivarius* smanjuje incidenciju streptokoknih i virusnih infekcija kod djece.[9]

1.2.5. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je gram pozitivna komenzalna i patogena bakterija. To je kok koji tvori skupine nalik grozdovima promjera 0,5-1,5 µm. Oko 30% ljudske populacije je kolonizirano *S. aureusom*. Također je jedan od vodećih uzročnika kožnih, osteoartikularnih i pleuropulmonalnih infekcija. *S. Aureus* nije pokretan ni sporogen, a na hranjivoj podlozi raste sitnim, okruglim kolonijama karakteristične zlatno-žute boje.

S. aureus može uzrokovati brojne infekcije, od kožnih upala do smrtnih bolesti. Zbog lučenja toksina i učestale otpornosti na antibiotike čest je uzročnik bolničkih infekcija. Također, nalazimo ga u hrani gdje može dovesti do alimentarnih intoksikacija. Intoksikacije su češće ljeti zbog težeg održavanja hladnog lanca i češćeg zadržavanja u sladoledima i slasticama koje se više konzumiraju ljeti.

Kliconoše nose bakteriju na koži ili sluznici nosa te ju uglavnom prenose izravnim dodirima na hranu. Nakon konzumacije kontaminirane hrane javljaju se tipični simptomi stafilokoknog trovanja. Nekoliko sati poslije unosa javlja se mučnina i povraćanje, a bolest prolazi u roku 2 dana od pojave prvih simptoma.[10]

1.2.6. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je gram pozitivna, katalaza pozitivna, beta hemolitička patogena bakterija koja često uzrokuje bolesti povezane s prehrambenom industrijom. Otkriveno je 1981. da je *L. monocytogenes* bakterija koja se širi hranom i da je povezana s velikim brojem prehrambenih proizvoda. 1985. je izbila epidemija u kojoj je zabilježeno 142 slučaja, od kojih 28 smrtnih koji su bili povezani s proizvodnjom mekih sireva.

Faktori virulencije *L. monocytogenes* uključuju, ali nisu ograničeni, na njenu intracelularnu pokretnost i mogućnost replikacije na temperaturi od 4°C. Prenosi se fekalno-oralnim putem i najčešće pogađa nepasterizirane mliječne proizvode i mesne nereske.

L. monocytogenes je uglavnom bakterija koja uzrokuje probleme gastrointestinalnog sustava, ali moguć je i prijelaz intestinalne barijere te pojava sustavnih infekcija. Kod trudnica to može uzrokovati pobačaj, mrtvorodenost ili neurološka oštećenja ploda.

Infekcije *L. monocytogenes* mogu također biti sepsa, encefalitis, meningitis, groznica i samo limitirajući gastroenteritis. U rizične populacije ubrajaju se trudnice, dojenčad, imunokompromitirani i starija populacija. Širenje listerije se sprječava nadzorom procesa proizvodnje i transporta hrane. [11]

1.2.7. HRANJIVE PODLOGE

MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) agar je selektivna hranjiva podloga namijenjena povoljnom rastu laktobacila. Sadrži natrijev acetat koji inhibira rast mnogih drugih bakterija. MRS agar je tipično građen od: peptona, glukoze, goveđeg ekstrakta, ekstrakta kvasca, natrij acetata, agara i nekoliko tvari u manjim količinama. Ekstrakti pružaju izvor ugljika, dušika, aminokiselina i vitamina za rast bakterija, dok tvari u tragovima pomažu metabolizmu laktobacila.[12]



Slika 1. Porast kolonija na MRS agaru (Fotografija: Luka Devčić)

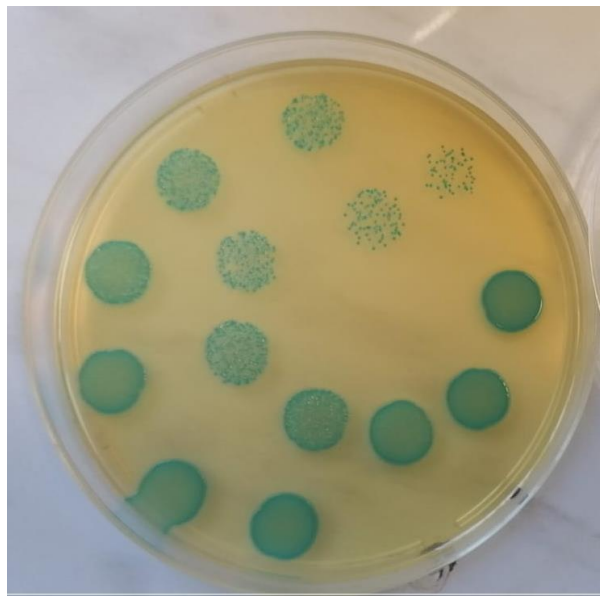
BHI (Brain heart infusion) bujon je hranjivi medij koji se može koristiti za rast širokog spektra mikroorganizama. Koristi ga se za uzgoj streptokoka, pneumokoka i meningokoka zbog bogatstva nutrijentima. BHI služi također za kontrolu sigurnosti vode i hrane. Koristi se i u istraživačke i kliničke svrhe.[13]

Mueller Hinton agar je neselektivna nediferencijalna hranjiva podloga koja se često koristi za antibiogramske analize. Zbog svojih svojstava skoro svi organizmi nasadeni na Mueller Hinton agar mogu serazmnožavati. Radi se od: 2,0 g goveđeg ekstrakta, 17,5 g hidrolizata kazeina, 1,5 g škroba, 17,0 g agara i 1 litre destilirane vode. [14]



Slika 2. Porast kolonija na Mueller Hinton agaru (Fotografija: Luka Devčić)

ALOA (Agar *Listeria* acc. to Ottaviani and Agosti) je selektivna diferencijalna hranjiva podloga za dokazivanje i izolaciju *Listeria* spp. Hranjiva podloga je selektivna zbog prisutnog litijeveg klorida, a diferencijalna zbog kromogene komponente X-glukozida u mediju koji je supstrat za zajednički enzim svih listerija. [15]



Slika 3. Porast kolonija na ALOA agaru (Fotografija: Luka Devčić)

1.3. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi sprječavaju formaciju slobodnih radikala i preveniraju reakcije kisikom i dušikom, koje oštećuju DNK, lipide, proteine i ostale biomolekule. Endogeni antioksidansi (superoksid dismutaze, enzimi koji uklanjaju H_2O_2 , proteini koji vežu metale) nisu dovoljni da potpuno spriječe oštećenja, tako da su potrebni antioksidansi koji se unose putem prehrane i imaju bitnu ulogu održavanja zdravlja. Antioksidansi uneseni putem prehrane također se nazivaju egzogenim enzimima. Egzogene enzime dijelimo najšire na hidrofilne i lipofilne ovisno o ulozi u organizmu. Hidrofilni enzimi uglavnom bolje djeluju u citosolu i krvnoj plazmi, a lipofilni štite stanične membrane. Taj učinak stvaraju pomoću 4 mehanizma djelovanja: 1. Antioksidativna donacija vodika, 2. Antioksidativna donacija elektrona, 3. Vežanje lipida na antioksidans, 4. Stvaranje kompleksa lipid- antioksidans.[16]

Tablica 1. Egzogeni antioksidansi i njihovi izvori [17]

Egzogeni antioksidansi	Izvor
Vitamin C (askorbinska kiselina)	Paprike, jagode, kivi, brokulice, brokula
Vitamin E (tokoferoli, tokotrienoli)	Biljna ulja, orašasti plodovi, sjemenke
Karotenoidi (alfa karoten, beta karoten, lutein, likopen itd.)	Narančasto i crveno povrće i voće (mrkve, rajčice, marelice, šljive), kelj, špinat
Polifenoli (flavonoli, flavanoli, antocijani, izoflavoni, fenolna kiselina)	Voće (jabuke, bobičasto voće, grožđe), Povrće (celer, kelj, luk), Leguminoze (grah, soja), Orašasti plodovi, vino, čaj, kava, kakao
Elementi u tragovima (selen, cink)	Morski plodovi, meso, cijele žitarice

Tablica 2. Endogeni antioksidansi [17]

Endogeni antioksidansi	Primjeri
Enzimi	Superoksid dismutaza Katalaza Glutation peroksidaza Paraoksanaza Glutation S-transferaza Glutation reduktaza Tioredoksin reduktaza Hem oksigenaza Aldehid dehidrogenaza 8- oksogvanin glikozilaza
Neenzimatske tvari	Glutation Bilirubin Melatonin Lipoična kiselina Mokraćna kiselina
Metal vezujućii proteini	Feritin Laktoferin Metalotionein Transferin Ceruloplasmin

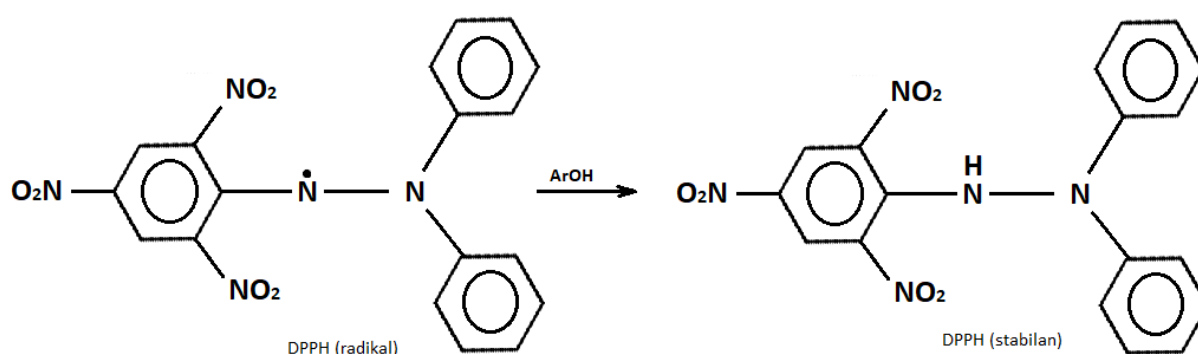
1.4. SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikali su sve molekule ili atomi sposobni za samostalno postojanje s nesparenim elektronom u orbitali. Prisutstvo nesparenog elektrona daje svim slobodnim radikalima slično svojstvo visoke reaktivnosti i nestabilnosti. Sposobni su donirati ili preuzeti elektron ostalih molekula, tako da se ponašaju ujedno kao oksidansi i reducensi. U najvažnije radikale ubrajaju se slobodni radikalikisika i slobodni radikalidušika. Te visoko reaktivne skupine slobodnih radikala doprinose oštećenju biološki važnih molekula (DNK, proteina, ugljikohidrata i lipida). [18]

1.4.1. DPPH·

DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) je stabilni slobodni radikal s kemijskom formulom $C_{18}H_{12}N_5O_6$ kojemu je nespareni elektron delokaliziran u cijeloj molekuli. Ubrajamo ga u dušikove stabilne radikale, a zbog jedinstvenih svojstava pogodan je za antioksidativne analize. Metoda određivanja antioksidativnog potencijala pomoću DPPH radikala omogućuje jednostavno i brzo dobivanje rezultata primjenom spektrofotometrije. Tamno ljubičaste je boje s maksimumom apsorpcije u etanolu pri 520nm. U reakciji s antioksidansom gubi svoju boju i prima vodik. [19]

Slika 4 prikazuje reakciju slobodnog radikala DPPH s antioksidansom.



Slika 4. Redukcija DPPH radikala antioksidansom ArOH (nacrtano po uzoru na Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J Food Sci Technol. 2011)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Eko proizvodnja i zdrava prehrana su u kratkom vremenu postali znatan dio opće prehrane. Povećanim zanimanjem za osobno zdravlje i zdrav život koriste se namirnice koje su manje prerađene i često manje poznate. Iako mnoge namirnice imaju pozitivne učinke na organizam, odnosi različitih komponenata jedne ili više namirnica mogu biti sinergistički ili antagonistički.

Cilj ovog istraživanja je odrediti antioksidativnu vrijednost soka aronije i njen učinak na rast bakterija. Antioksidativna vrijednost soka aronije ispitana je na uzorcima sokova „Rabenhorst“ kupljenog u slobodnoj prodaji i „Biofructus“ proizvedenog u privatnoj radinosti hladnim prešanjem i pasterizacijom, a kvantificirana je TEAC i DPPH• metodama. Utjecaj soka aronije na rast bakterija ispitivan je u različitim koncentracijama soka u bujonu te kombinacijama patogenih i prebiotičkih bakterija u omjerima 1:1, 1:10 i 1:100.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. UZORCI ARONIJE

Eksperimenti su provedeni na dva uzorka cijedenog soka aronije (*Aronia melanocarpa*), „Rabenhorst“ i „Biofructus“. Sok „Rabenhorst“ je sok njemačke firme i kupljen je u slobodnoj prodaji. Sok „Biofructus“ proizveden je u Slavoniji od strane firme Biofructus d.o.o. Rijeka, a uslugu cijedenja soka izveo je PZ Voćko Pakrac hladnim prešanjem i pasterizacijom.

U radu uzorak Biofructus će se označavati kao uzorak A, a uzorak Rabenhorst će se označavati kao uzorak B.

Na slici 5 prikazani su uzorci cijedenog soka aronije korištenog u eksperimentima.



Slika 5. Uzorci cijedenog soka aronije (Fotografija: Luka Devčić)

3.2. KEMIKALIJE

1. Metanol (CH₃OH), HPLC Gradient Grade, J.T. Baker, Nizozemska
2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazil (DPPH[•]), Sigma-Aldrich, Njemačka
3. (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (TROLOX), Sigma-Aldrich, Njemačka

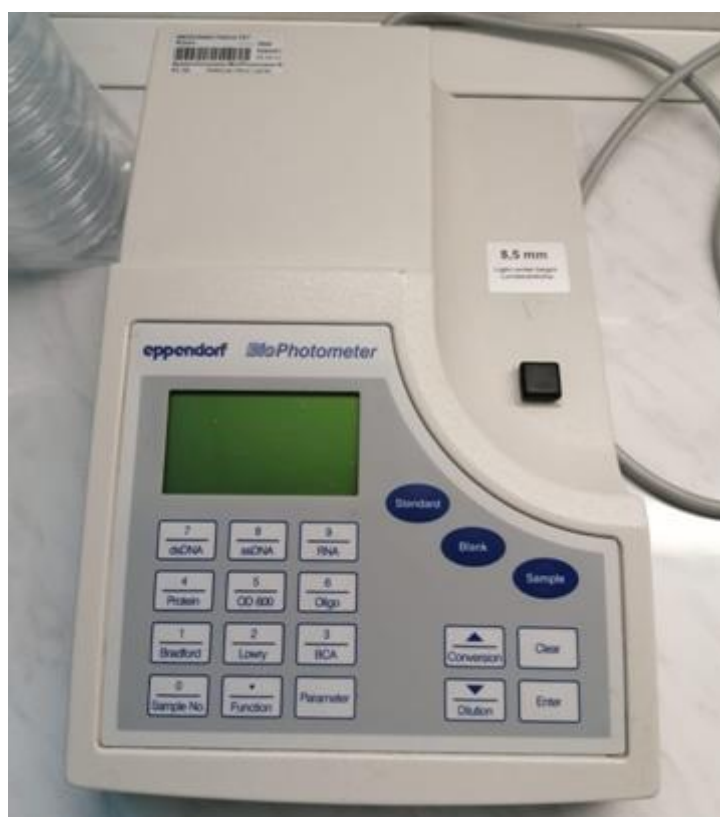
3.3. HRANJIVE PODLOGE

1. De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) bujon i agar, Biolife, Italija
2. Brain heart infusion (BHI) bujon, Biolife, Italija
3. Mueller-Hinton bujon i agar, Biolife, Italija
4. Agar *Listeria* acc. Ottaviani & Agosti (ALOA) agar, Biolife, Italija

3.4. BAKTERIJE

1. *Lactobacillus plantarum* B, Biolife, Italija
2. *Listeria monocytogenes*, Biolife, Italija
3. *Staphylococcus aureus* K12, Biolife, Italija

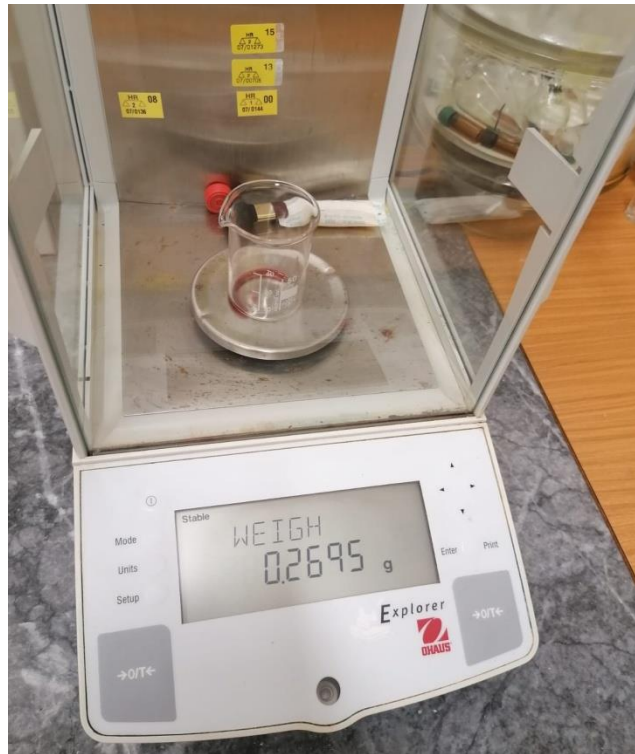
3.5. INSTRUMENTI



Slika 6. UV-VIS eppendorf BioPhotometer (Fotografija: Luka Devčić)



Slika 7. Cary 100 UV-VIS spektrofotometar (Fotografija: <https://www.biocompare.com/22960-Spectrophotometers-Single-Beam/1826986-Cary-100-UVVisible-Spectrophotometer/>)



Slika 8. Analitička vaga OHAUS Explorer (Fotografija: Luka Devčić)

3.6. METODE RADA

3.6.1 DPPH• ANALIZA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI UZORAKA SOKA ARONIJE

Ova metoda je razvijena 1958. s ciljem određivanja antioksidativne aktivnosti koristeći stabilni slobodni radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•; $C_{18}H_{12}N_5O_6$; $M=394,33$). Radikal se reducira primanjem jednog vodikovog atoma iz antioksidansa. [19]

DPPH• analizom su ispitana dva uzorka aronije: „Rabenhorst“ i „Biofructus“. Uzorci su pipetirani i izvagani. Izvagano je 0,2724 g uzorka B (Rabenhorst) i 0,2695 g uzorka A(Biofructus) prije prebacivanja u odmjernu tikvicu od 25mL koju se napuni do oznake metanolom.

DPPH• je izvagan i otopljen u metanolu. Reakcijom DPPH radikala s antioksidansom dolazi do dekoloracije otopine čime boja otopine prelazi iz ljubičaste u žućkastu.

Slijepa proba uzorka priprema se miješanjem 1 mL uzorka i 3 mL metanola, dok seslijepa proba DPPH• priprema miješanjem DPPH• i metanola također u omjeru 1:3. Smjese se homogeniziraju pomoću vortex uređaja 10 sekundi i prebacuju u kivetu od optičkog stakla. Kivete se stavljaju u spektrofotometar i mjeri im se apsorbancija pri valnoj duljini 515 nm.

Nakon određivanja apsorbancija slijepih proba, pripremaju se otopine uzorka i DPPH• u omjeru 1:3. Smjesa se homogenizira i mjeri se apsorbancija pri istoj valnoj duljini do postizanja ravnoteže.

Postotak gubitka DPPH• signala računa se jednadžbom 1:

$$\% \text{ gubitka signala} = [(A_{\text{DPPH}} + A_{\text{SP}} - A_{\text{UZ}}) / (A_{\text{DPPH}} + A_{\text{SP}})] \times 100 \quad (1)$$

U jednadžbi 1 su:

A_{DPPH} – apsorbancija slijepa probe DPPH radikala;

A_{SP} – apsorbancija slijepa probe otopine uzorka;

A_{UZ} – apsorbancija otopine DPPH• i uzorka.

3.6.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA UZORKA TEAC METODOM

TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) je metoda mjerenja antioksidativnog kapaciteta složenih smjesa pomoću Trolox standarda. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) je hidrosolubilni analog vitamina E. Mjerna jedinica antioksidativnog kapaciteta je mmol/kg uzorka te se još naziva Trolox ekvivalent. [20]

Baždarni pravac se izradi pripremanjem otopina Trolox-a različitih koncentracija. U ovom slučaju korištene su koncentracije 0,09 mM, 0,12 mM i 0,15 mM. Za svaku Trolox otopinu pripremi se slijepa proba miješanjem Trolox-a i metanola u omjeru 1:3. Nakon što se izmjeri apsorbancija slijepih proba, pripremaju se otopine Trolox i DPPH• u omjeru 1:3. Otopine se homogeniziraju 10 sekundi te im se mjeri apsorbancija pri 515 nm do postizanja ravnoteže.

Na ordinati baždarnog pravca prikazan je % gubitka signala DPPH radikala, a na apscisi koncentracije Trolox otopina. % gubitka signala dobiva se sljedećom jednadžbom:

$$\% \text{ gubitka signala} = [(A_{\text{DPPH}} + A_{\text{SP}} - A_{\text{UZ}}) / (A_{\text{DPPH}} + A_{\text{SP}})] \times 100 \quad (2)$$

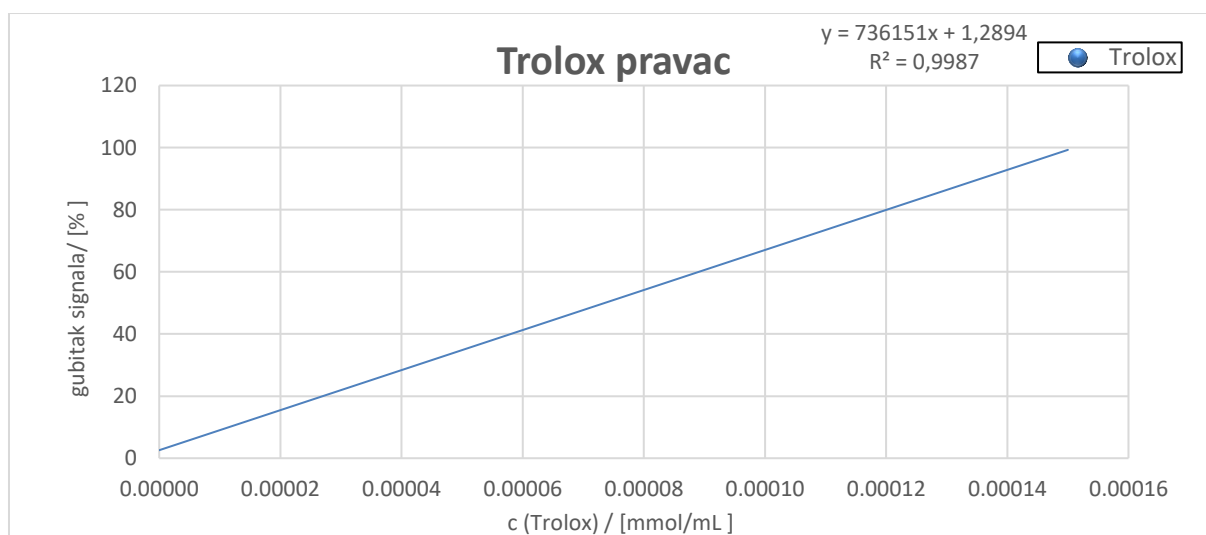
U jednadžbi 2 su:

A_{DPPH} – apsorbancija slijepe probe DPPH radikala;

A_{SP} – apsorbancija slijepe probe otopine Trolox;

A_{UZ} – apsorbancija otopine DPPH• i Troloxa.

Za kvantifikaciju antioksidativne aktivnosti uzoraka u jednadžbu baždarnog pravca uvrštavaju se postoci inhibicije DPPH• signala u uzorcima dobiveni jednadžbom 1. Dobivenu vrijednost u mmol/mL treba podijeliti s odvaganom masom uzorka i pomnožiti s 1000. Time se dobiva vrijednost u mmol/kg. Trolox pravac je prikazan na slici 9.



Slika 9. Baždarni pravac Trolox-a

3.6.3. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE UZORAKA SOKA ARONIJE

Antimikrobno djelovanje je mjereno Colony forming unit(CFU) metodom. CFU metodom, za razliku od nekih metoda (poput real time PCR-a), se broje samo žive bakterije i njihove kolonije. U nju uključujemo uzgajanje određenih bakterija u prikladnom bujonu i nasađivanje na prikladnu hranjivu podlogu. [21]

Bakterije su, svaka vrsta zasebno, zamiješane u bujon tako da je izmjerena vrijednost apsorbancije na spektrofotometru 0,1-0,3. Nakon što su bakterije pripremljene, pripremi se mikrotitar ploča tako da se u duplikatu pripremaju redovi s različitim razrjeđenjima uzorka soka aronije. U prvi stupac mikrotitar ploče pipetirano je 200 μ L, a u ostale jažice 100 μ L prikladnog bujona. Iz prvog stupca pipetira se 100 μ L uzorka u sljedeći stupac koji sadrži 100 μ L bujona, zamiješa se, te se isto ponovi za sljedeći stupac. Taj postupak se izvodi 3 puta kako bi se dobile smjese koncentracija uzorka u bujonu od; 100%, 50%, 25% i 12,5%. Nakon zadnjeg razrjeđenja uzorka preostalih 100 μ L nastavcima pipete se baca. Na kraju svakog korištenog reda mikrotitar ploče jedna jažica koristi se za slijepu probu te se u nju ne dodaje uzorak. U sve korištene jažice dodaje se 100 μ L suspenzije određene bakterije u bujonu te se stavlja u inkubator na 24 sata.

Nakon porasta bakterija priprema se nova mikrotitar ploča gdje se u prvi stupac dodaju porasle bakterije, a u sve ostale jažice se dodaje 180 μ L fiziološke otopine. Zatim se postupno deseterostruko razrjeđuju suspenzije bakterija prebacivanjem i miješanjem 20 μ L iz jedne jažice u drugu. Postupak se ponavlja do željenog broja razrjeđenja kako bi se mogao očitati porast nahranjivim podlogama.

Razrijeđene smjese bakterija u uzorku se nasađuju na prethodno pripremljene hranjive podloge pipetiranjem kapi od 10 μ L i stavljaju u inkubator na 24 sata da porastu kolonije bakterija. Porast se mjeri brojanjem prisutnih kolonija ili CFU.

3.6.5. DJELOVANJE UZORAKA SOKA ARONIJE NA SMJESU *L. plantarum* B i *L. monocytogenes*

Sinergistično djelovanje uzorka soka aronije s *L. plantarum* B u smjesi s *L. monocytogenes* ispitano je u smjesama uzorka 25% i 12,5% uvažavajući rezultate koji su dobiveni eksperimentima na samostalnim bakterijama. Pripremljene su 3 bakterijske suspenzije u omjerima *L. monocytogenes* i *L. plantarum* B od 1:1, 1:10 i 1:100. U epruvetama pripremljene su smjese bujona i uzoraka A i B od 25% i 12,5%. Tim smjesama dodane su smjese bakterija, a preostala suspenzija bez uzorka služi kao kontrolna skupina. Također su pripremljene smjese zasebnih bakterija *L. plantarum* B i *L. monocytogenes* prema prethodno

navedenom postupku. Nakon što su pripremljene smjese bakterija, nasađuju se na MRS i ALOA hranjive podloge kako bi se razlikovao porast laktobacila i listerije.

3.7. Statistička analiza

Svi grafovi u radu su izrađeni u programu *Microsoft® Office Excel2007*. Rezultati su prikazani u obliku srednjih vrijednosti od 4 mjerenja s pripadnim standardnim odstupanjima. Statistička testiranja provedena u programskoj podršci *NCSS 2021* uz uporabu statističkog testa ANOVA Tukey-Kramerovom metodom pri intervalu značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

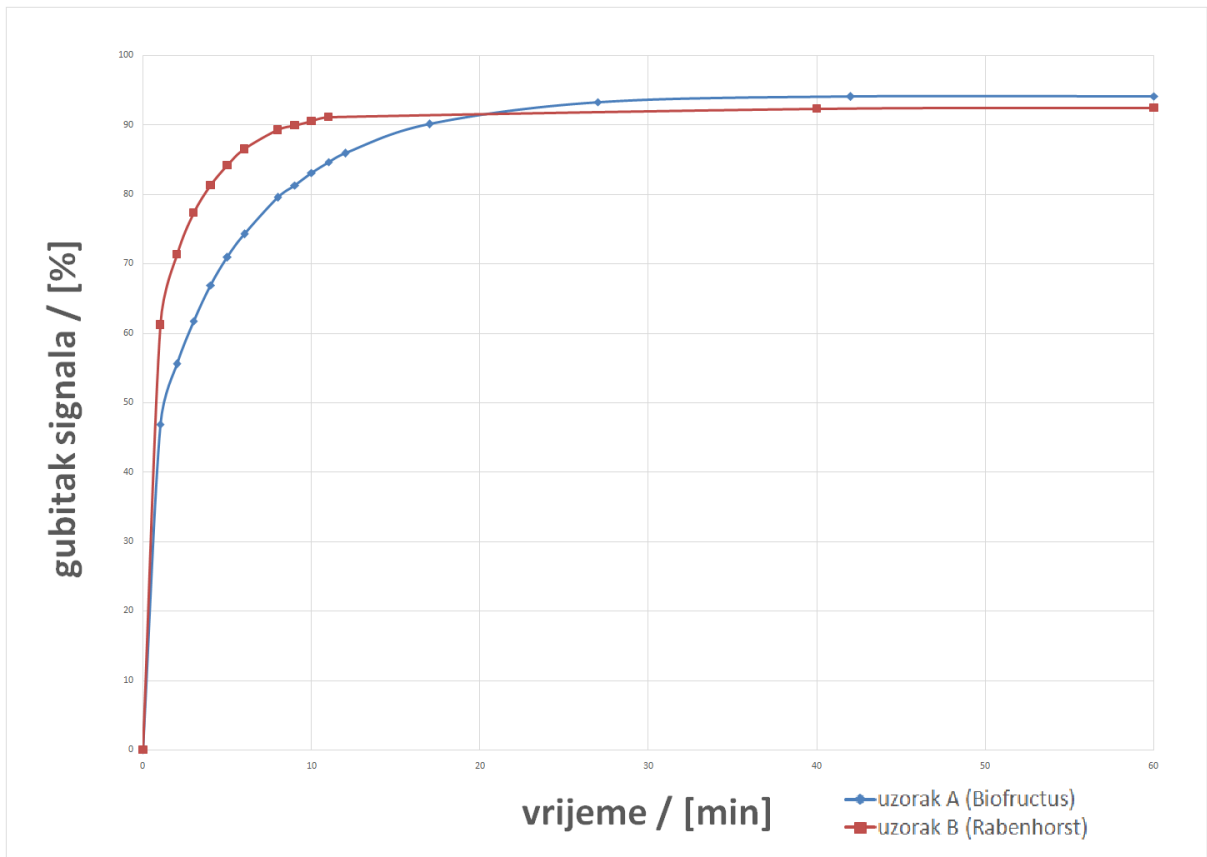
4.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST UZORAKA SOKA ARONIJE (DPPH ANALIZA)

Rezultati antioksidativne aktivnosti uzoraka soka aronije prikazani su grafički gdje x os prikazuje vrijeme (min), dok y os prikazuje gubitak signala radikala (%).

Uzorak A prikazuje Biofructus sok aronije kojem u 60-oj minuti reakcije gubitak signala iznosi 94%, a u prvoj minuti 46,8%.

Uzorak B prikazuje Rabenhorst sok aronije kojem u 60-oj minuti reakcije gubitak signala iznosi 92%, a u prvoj minuti 61%.

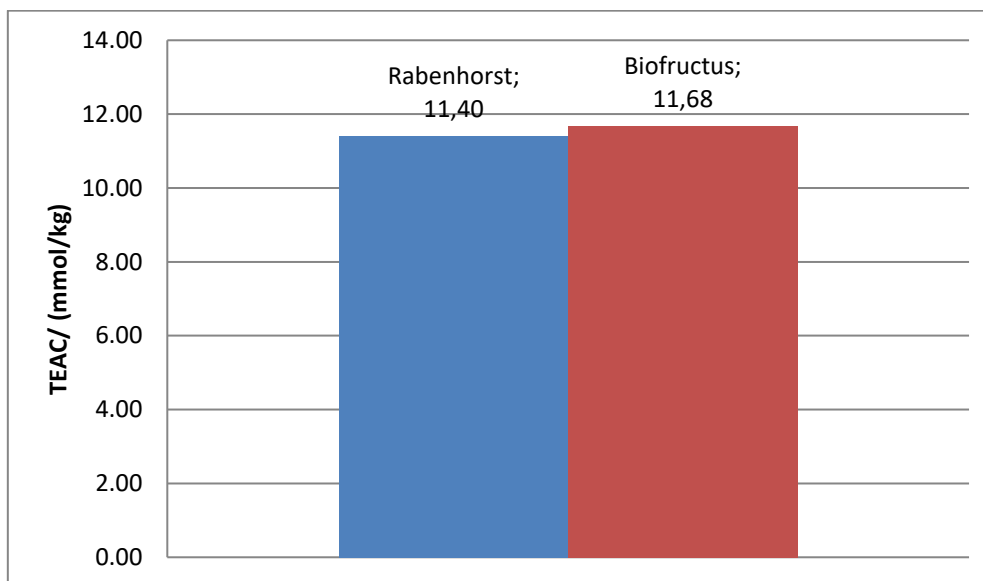
Usporedbom gubitka signala uzoraka A i B, prema dobivenim rezultatima, vidi se brža reakcija uzorka B postizanjem gubitka signala od 80% u petoj minuti, dok uzorak A postiže gubitak signala od 80% u devetoj minuti. Uzorak A ima viši maksimalni gubitak DPPH signala s 94% od maksimalnog gubitka signala uzorka B koji iznosi 92% (Slika 10).



Slika 10. Usporedba gubitaka signala DPPH radikala u uzorcima soka aronije Biofructus (Uzorak A) i Rabenhorst (Uzorak B)

4.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST UZORAKA SOKA ARONIJE (TEAC ANALIZA)

TEAC metodom koncentracije su izražene u mmol/kg čime je u račun uključena početna izvagana masa uzorka. Statističkom analizom rezultata TEAC metode nije dokazana značajna razlika ($p > 0.05$) između uzorka soka Rabenhorst i Biofructus, što se vidi na slici 11.

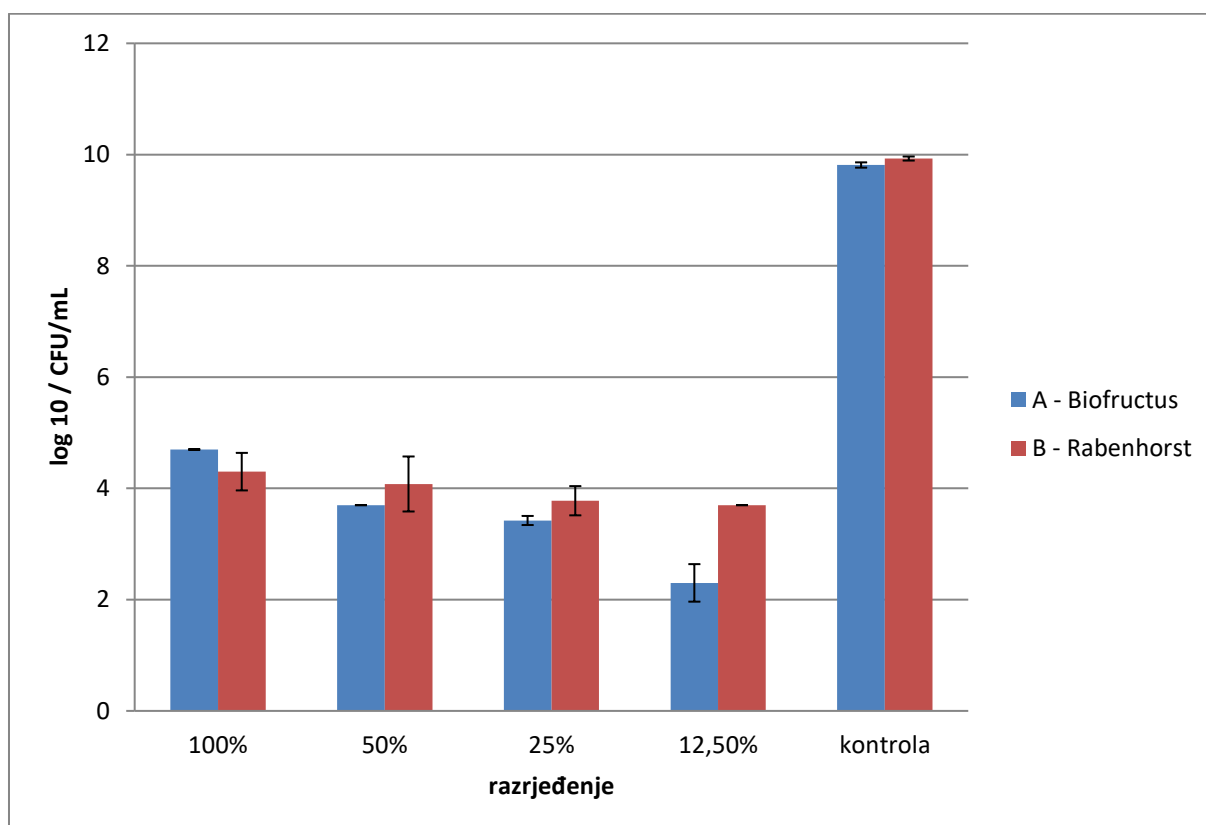


Slika 11. Grafički prikaz koncentracije TEAC za uzorke soka aronije Biofructus i Rabenhorst u mmol/kg

4.3. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE UZORAKA SOKA ARONIJENA *S. aureus*, *S. salivarius* i *L. monocytogenes*

Prethodno nasađene hranjive podloge, nakon 24 sata, uzimaju se iz inkubatora i određuje im se CFU/mL brojanjem bakterija koje su porasle u tom vremenu. Bakterije koje su korištene su *S. aureus*, *S. salivarius* i *L. monocytogenes*.

Utjecaj sokova aronije u bujonu bakterije *S. aureus* ukazuje na učinak inhibicije rasta bakterije u svim koncentracijama u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 12). Najjače inhibicijsko djelovanje kod oba soka postignuto je kod smjese od 12,5%. Uspoređujući inhibicije rasta bakterije između smjesa uočava se da je u smjesi „100%“, gdje je suspenzija bakterije dodana u čisti sok, inhibicija veća kod uzorka soka B. Suprotno tome, smjese „50%“, „25%“ i „12,5%“ ukazuju na najjaču inhibiciju kod uzorka soka A. Rezultati statističke analize vrijednosti \log_{10} / (CFU/mL) pojedinih smjesa oba soka aronije prikazani su u Tablici 3. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) postignuta je između svih smjesa i kontrolnih skupina kod oba soka aronije. Uspoređujući p vrijednosti uzorka A za različite smjese postignute su statistički značajne razlike između svih skupina osim između 50 i 25%-ne smjese. p vrijednosti uzorka B pokazuju da nema statistički značajnih razlika između svih analiziranih skupina.



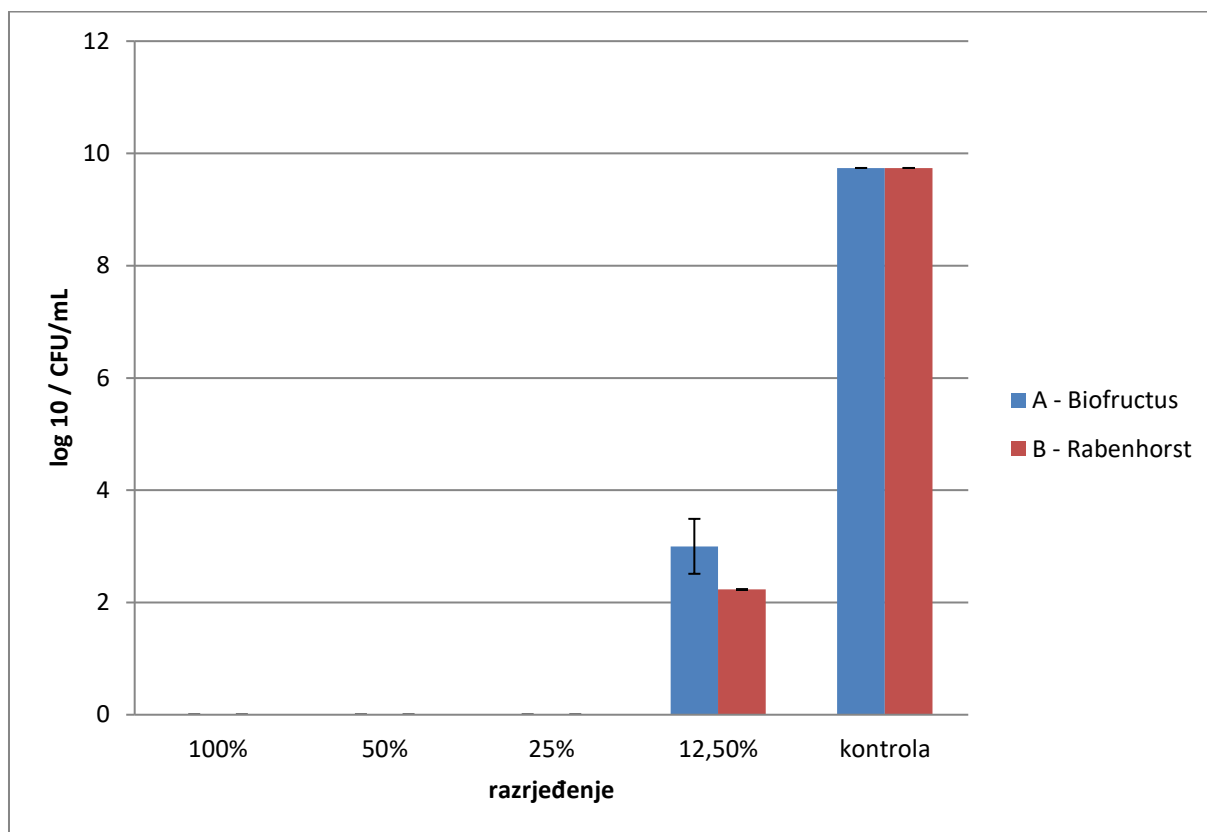
Slika 12. Graf rasta bakterije *S.aureus* ovisno orazrjeđenju uzoraka soka *Aronia Melanocarpa*

Uzorak A										
Razrjeđenja	100%/50%	100%/25%	100%/12,5%	100%/K	50%/25%	50%/12,5%	50%/K	25%/12,5%	25%/K	12,5%/K
p vrijednost	0,0074	0,0024	0,00010	0,00	0,47	0,0013	0,00	0,0035	0,00	0,00
Uzorak B										
Razrjeđenja	100%/50%	100%/25%	100%/12,5%	100%/K	50%/25%	50%/12,5%	50%/K	25%/12,5%	25%/K	12,5%/K
p vrijednost	0,83	0,38	0,41	0,00001	0,87	0,87	0,00	0,99	0,00	0,00

Tablica 3. Statističke razlike između pojedinih skupina sokova *AroniaMelanocarpaza* bakteriju *S. aureus*

Najbolji rezultat, od patogenih bakterija, dala je reakcija uzoraka i bakterije *L.monocytogenes*. U smjesama „100%“, „50%“ i „25%“ nema porasta bakterije. Uzorci sokova djeluju bakteriocidno ili kao snažni bakteriostatici na *L. monocytogenes*. Porast se može vidjeti jedino u smjesama „12,5%“ koji također pokazuju visoki stupanj inhibicije. (Slika 14)

Statističkom analizom *p* vrijednosti utvrđena je statistički značajna razlika između svih smjesa uzorka A i B u odnosu na kontrolnu skupinu kao što je prikazano u tablici 4. Smjese „100%“, „50%“ i „25%“ kod oba uzorka pokazuju potpunu inhibiciju rasta bakterija. Smjesa „12,5%“ pokazuje nepotpunu inhibiciju porasta bakterija koja se statistički značajno razlikuje od prvetri smjese, ali i od kontrolne skupine. Porast bakterija smjese „12,5%“ uzorka A je oko 3 puta manji u odnosu na kontrolnu skupinu, a od uzorka B oko 4 puta.



Slika 13. Graf rasta *L.monocytogenes* ovisno o smjesi uzorka soka *Aronia Melanocarpa*

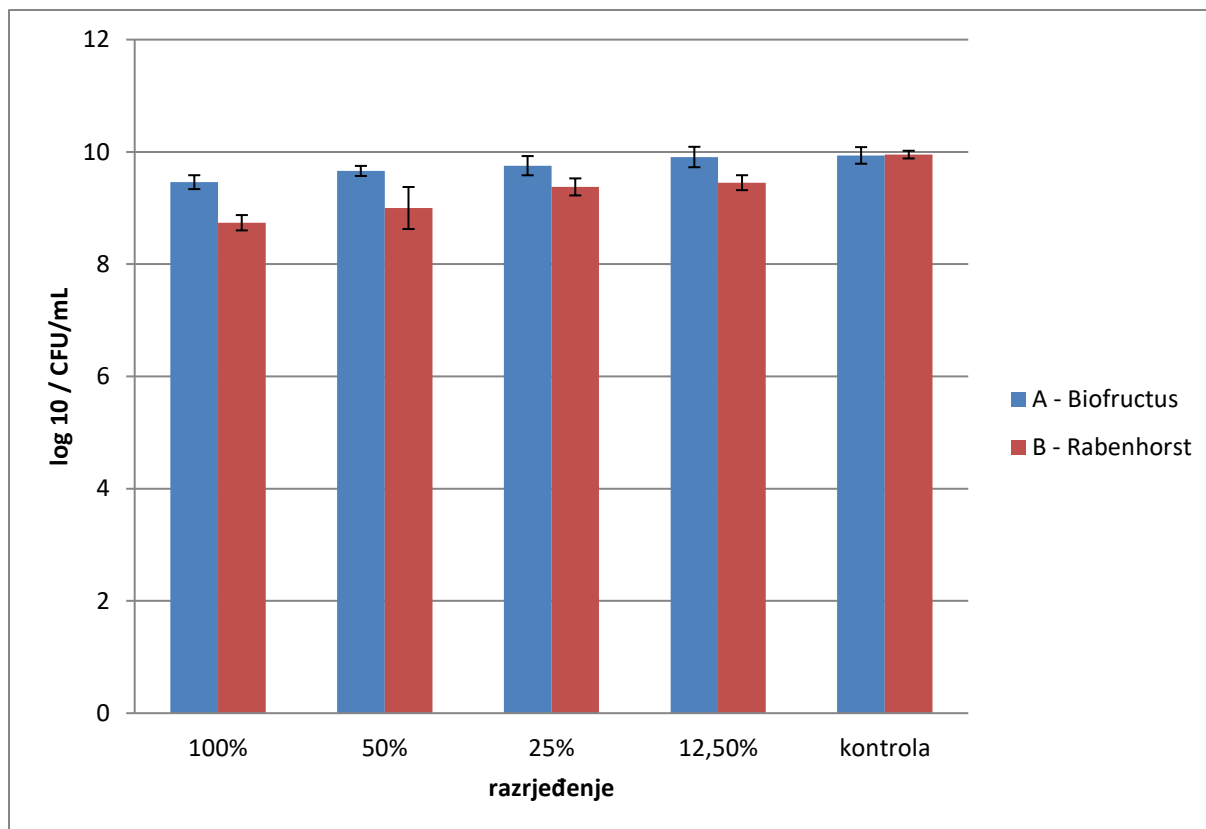
Uzorak A										
Razrjeđenja	100%/50%	100%/25%	100%/12,5%	100%/K	50%/25%	50%/12,5%	50%/K	25%/12,5%	25%/K	12,5%/K
p vrijednost	x	x	x	0,00	x	x	0,00	x	0,00	0,00032
Uzorak B										
Razrjeđenja	100%/50%	100%/25%	100%/12,5%	100%/K	50%/25%	50%/12,5%	50%/K	25%/12,5%	25%/K	12,5%/K
p vrijednost	x	x	x	0,00	x	x	0,00	x	0,00	0,00

Tablica 4. Statističke razlike između pojedinih skupina sokova *Aronia Melanocarpa* za bakteriju *L.monocytogenes*

4.3.1. DJELOVANJE UZORAKA SOKA ARONIJE NA *L. plantarum* B

Tijekom ispitivanja djelovanja soka aronije na probiotičku bakteriju *Lactobacillus plantarum* B, nije došlo do značajne inhibicije rasta bakterije. U smjesi „100%“, gdje je suspenzija bakterija pipetirana u čisti sok aronije, prisutan je nizak, ali vidljiv stupanj inhibicije. (Slika 14).

Statističkom analizom uzorka A nije zabilježena značajna razlika u inhibiciji između smjesa nižih od 100% i kontrolne skupine. Također smjese „50%“, „25%“ i „12,5%“ se međusobno značajno ne razlikuju u inhibiciji bakterije. Smjesa „100%“ uzorka A se značajno razlikuje od smjese „12,5%“ i kontrolne skupine, što je vidljivo u tablici 5. Suprotno, analizom uzorka B, sve smjese statistički značajno uzrokuju inhibiciju bakterijeu odnosu nakontrolnuskupinu.



Slika 14. Graf rasta *L. plantarum* B ovisno o smjesi uzorka soka *Aronia Melanocarpa*

Uzorak A										
Razrjeđenja	100%/50%	100%/25%	100%/12,5%	100%/K	50%/25%	50%/12,5%	50%/K	25%/12,5%	25%/K	12,5%/K
p vrijednost	0,29	0,057	0,0027	0,0014	0,84	0,13	0,070	0,53	0,34	0,96
Uzorak B										
Razrjeđenja	100%/50%	100%/25%	100%/12,5%	100%/K	50%/25%	50%/12,5%	50%/K	25%/12,5%	25%/K	12,5%/K
p vrijednost	0,40	0,004	0,0014	0,00	0,12	0,047	0,00007	0,94	0,010	0,027

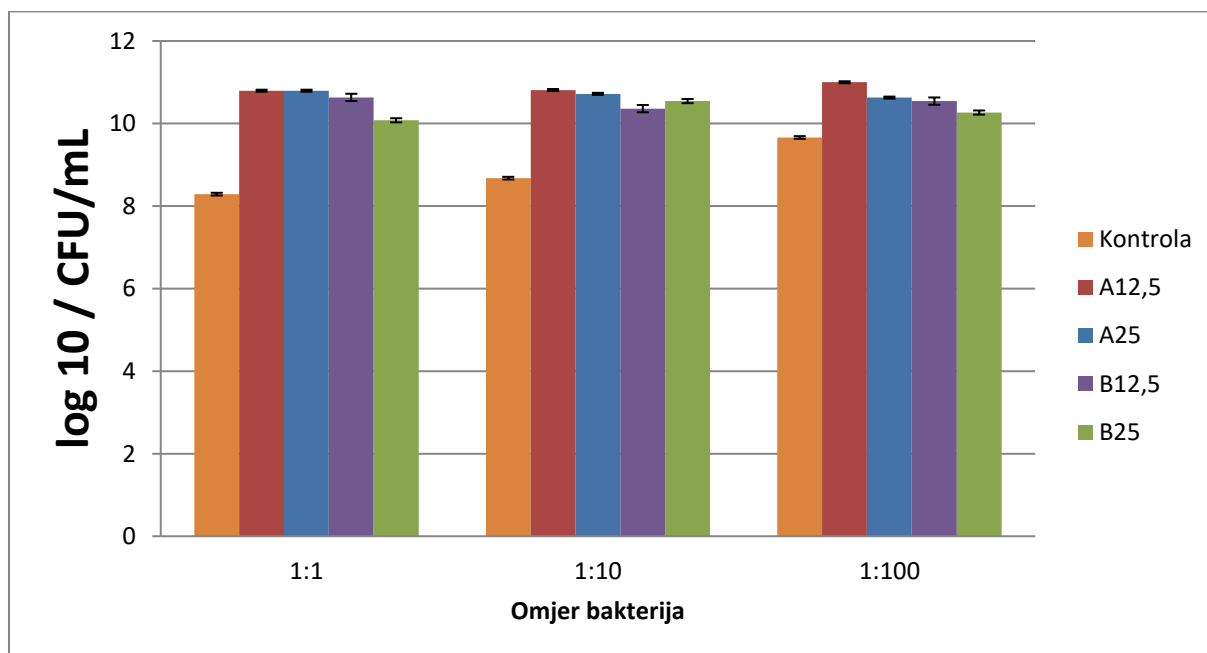
Tablica 5. Statističke razlike između pojedinih skupina sokova *Aronia Melanocarpa* za bakteriju *L. plantarum* B

4.4. SINERGISTIČKO DJELOVANJE UZORAKA SOKA ARONIJE U SMJESI *L. plantarum* B i *L. monocytogenes*

U ispitivanju sinergističkog djelovanja uzoraka soka aronije, zbog prethodno uočenih rezultata, korištene su smjese „25%“ i „12,5%“ kako bi se promatrao učinak što nižekonzentracije uzorka na smjesu bakterija. Na hranjive podloge su nasađene bakterije u nultom satu i nakon 24 sati rasta.

Nakon očitavanja ploča vidi se veći porast laktobacila kod smjesa s uzorkom za razliku od kontrolne skupine. Zadnja četiri stupca na grafu prikazuju porast laktobacila u različitim smjesama. Porast bakterija u oba uzorka soka aronije očitani su nakon 24 sata rasta. Prvi stupac prikazuje količinu bakterija nakon 24 sata rasta kontrolne smjese bez uzorka. Porast između smjesa uzoraka A i B se ne razlikuje značajno neovisno o smjesi. Razlika između kontrolnih skupina u grupama prisutna je zbog početnih deseterostruki razlika u smjesama. (Slika 18).

Statističkom analizom pojedinih smjesa, u različitim omjerima bakterija, dokazana je statistički značajna razlika između svih smjesa uzoraka A i B u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6). Također, kontrolne skupine različitih omjera se međusobno značajno razlikuju kao posljedica deseterostruki razlika početne doze.



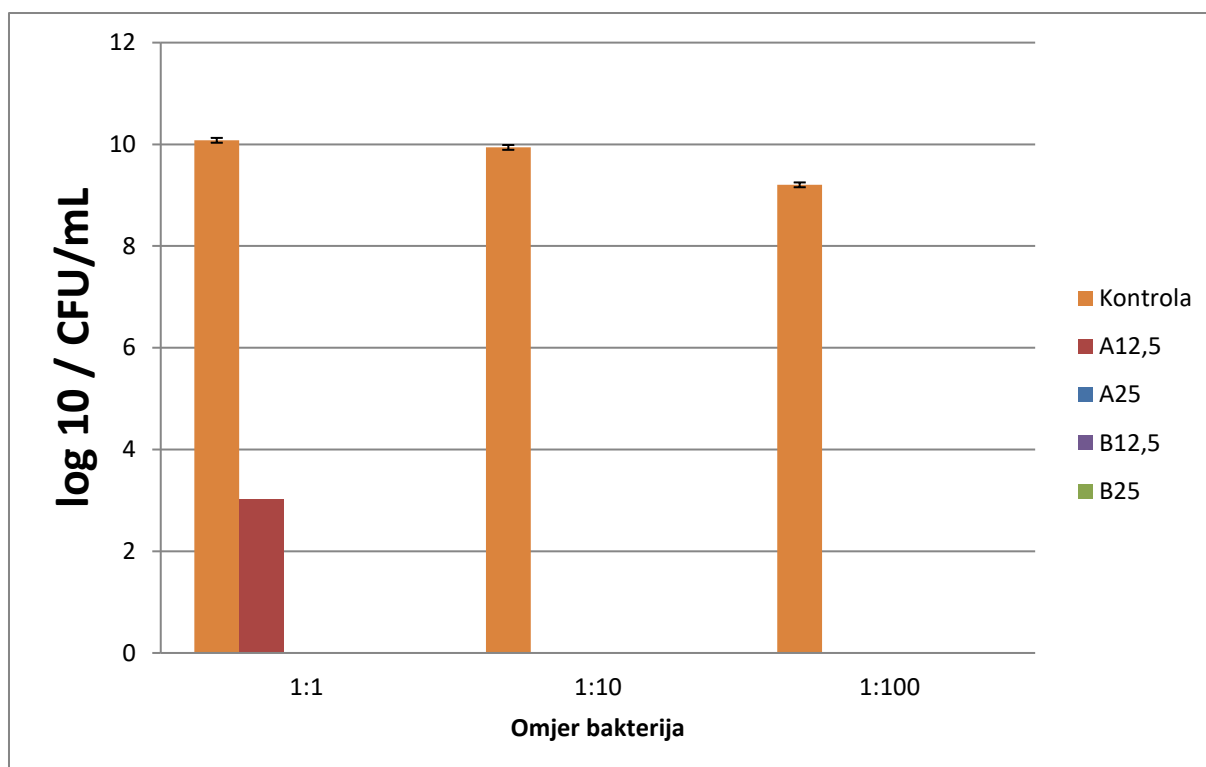
Slika 18. Graf porasta *L. plantarum* B na MRS agaru

1:1					1:10					1:100				
smjese	K/A12,5	K/A25	K/B12,5	K/B25	smjese	K/A12,5	K/A25	K/B12,5	K/B25	smjese	K/A12,5	K/A25	K/B12,5	K/B25
p vrijednost	0,00	0,00	0,00	0,047	p vrijednost	0,00	0,00	0,012	0,00	p vrijednost	0,00	0,00	0,00	0,014

Tablica 6. Statističke razlike porasta na MRS agaru između pojedinih skupina sokova *Aronia Melanocarpa* kontrolne skupine ovisno o omjeru bakterija *L. plantarum* i *L. Monocytogenes*

Porast *L.monocytogenes* je u smjesi sličan kao što je prethodno obrađeno za listeriju samostalno. U smjesama s omjerom listerije i laktobacila 1:10 i 1:100 nema porasta kod smjesa u kojima je uzorak bio prisutan. Smjesa omjera 1:1 prikazuje porast jedino kod smjese uzorka A od 12,5%. Porast listerije u nultom satu jednak je u sve tri skupine. On predstavlja količinu bakterija prvobitno dodane u smjesu. Razlike se vide u porastu *L. monocytogenes* nakon inkubacije 24 sata. Skupine „25%“, „12,5%“ uzorka B i skupina „25%“ uzorka A se međusobno statistički značajno ne razlikuju. Kontrolne skupine između omjera „1:1“, „1:10“, „1:100“ se statistički međusobno značajno razlikuju. Mogući uzrok razlike je kompeticija za nutrijentima. (Slika 19).

Statističkom analizom pojedinih smjesa, u različitim omjerima bakterija, dokazana je statistički značajna razlika među svim smjesama uzoraka A i B u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 7). Također, kontrolne skupine različitih omjera se međusobno značajno razlikuju kao posljedica viših koncentracija laktobacila.



Slika 19.Graf porasta *L. monocytogenes* na ALOA agaru

1:1					1:10					1:100				
smjese	K/A12,5	K/A25	K/B12,5	K/B25	smjese	K/A12,5	K/A25	K/B12,5	K/B25	smjese	K/A12,5	K/A25	K/B12,5	K/B25
p vrijednost	0,00	0,00	0,00	0,00	p vrijednost	0,00	0,00	0,00	0,00	p vrijednost	0,00	0,00	0,00	0,00

Tablica 7.Statističke razlike porasta na ALOA agaru između pojedinih skupina sokova *Aronia Melanocarpa* i kontrolne skupine ovisno o omjeru bakterija *L. plantarum* i *L. monocytogenes*

5. RASPRAVA

Znatan broj znanstvenih istraživanja proučava antioksidativna svojstva soka *Aronia melanocarpa* te je poznata i po mnogim *in vitro* analizama. Te analize uključuju inhibiciju oksidacije metil linoleata, „oxygen radical absorbance capacity“ (ORAC), „ferric ion reducing antioxidant power“ (FRAP) te metode korištene u ovom istraživanju, „trolox equivalence antioxidant capacity“ (TEAC) i DPPH• metoda. Kako svježe bobice aronije pokazuju višu razinu antioksidativne aktivnosti od ostalih bobica mjenjenih ORAC metodom, tako i cijedeni sok aronije ukazuje na najviši antioksidativni kapacitet među napitcima bogatim polifenolima analiziranim TEAC metodom. Rezultati TEAC metode pokazuju četverostruko viši antioksidativni kapacitet soka aronije od drugih sličnih napitaka [22]. Također, DPPH• metodom, je izmjeren viši antioksidativni kapacitet ekstrakta aronije u odnosu na butilirani hidroksianisol (BHA) i butilirani hidroksitoluen (BHT) koji se koriste u prehrambenoj industriji kao sintetički antioksidansi [23].

Različitim studijama (*in vivo* i *in vitro*) dokazana je veza između konzumacije aronije i poboljšanja hipertenzije, LDL oksidacija, lipidne peroksidacije, ukupnog plazmatskog antioksidativnog kapaciteta i dislipidemije. Mehanizmi kojima dolazi do ovih učinaka uključuju inhibiciju ekspresije upalnih procesa, regulaciju endotelne NO sintaze i opće smanjenje oksidativnog stresa [24]. U ovom istraživanju je viđena razlika u komponentama sokova aronije. Jedan je uzorak „brže“ antioksidativne naravi dok je drugi „sporije“, ali ukupno više. U drugim istraživanjima koji su detaljnije obradili složeni matriks soka aronije pokazalo se da su proantocijanidi glavni doprinosioci antioksidativne aktivnosti soka. Osim proantocijanida, najsnažniji antioksidansi prisutni su kvercetin i epikatehin [25].

Postojanje „brzih“ i „sporih“ antioksidansa dovodi do bifaznog modela kinetike. Istraživanjem antiradikalne aktivnosti soka aronije Jakobek i suradnici primjetili su dva perioda kemijskih reakcija. Prvi period od 10-30 minuta ukazuje na brzu reakciju i smanjenje signala DPPH radikala. Nakon prvog perioda slijedi reakcija sporijeg gubitka signala. Van den Beg i suradnici su također uočili prirodu bifazne reakcije i opisali ju kao vrijeme u kojem nastaje produkt koji sporije reagira u reakciji sa slobodnim radikalom. Sličnim istraživanjem, Broznić i suradnici su opisali dva koraka bifazne kinetike, gdje u prvoj fazi atom vodika prelazi s antioksidansa na slobodni radikal, a u drugoj fazi novo formirani radikal A• može ponovo stupiti u reakciju s preostalim radikalima.[26]

Antimikrobna svojstva bobičastog voća su manje istražena od antioksidativnih, a zbog visokog udjela antocijana oni su najčešća meta istraživanja. Količina antocijana u bobičastom voću varira od 7,5 mg/100 g svježih bobica u crvenom ribizu, do 460 mg/100 g svježih bobica u aroniji. Antocijani su uobičajeno efektivni protiv mnogih mikroba, iako gram pozitivne bakterije su češće osjetljivije na antocijane od gram negativnih. Antocijani utječu na membranske i unutarstanične odnose, ali zbog ispitivanja sa složenim smjesama (sokovima) koje sadrže veliki broj komponenti potrebna je dublja analiza antimikrobnih mehanizama djelovanja [27].

Istraživanjem koje su proveli Kranz i suradnici, također su utvrđena antimikrobna svojstva soka bobičastog voća. Iako nije korišten sok aronije, u eksperimentima su korišteni sokovi drugog bobičastog voća (crnog ribiza, crvenog ribiza, brusnica i malina) i njihov utjecaj na gram negativne i pozitivne bakterije (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus gordonii*, *Porphyromonas gingivalis* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Ispitivanje je provedeno s ciljem pronalaska alternativnog antimikrobnog agensa kao npr. klorheksidina, koji se često koristi u kontroli oralnog plaka. Antimikrobni agensi, poput navedenog, mogu dovesti do neželjenih nuspojava ili slabijeg učinka od željenog. Od navedenih voćnih vrsta, naj snažniju inhibiciju je pokazao sok od crnog ribiza, a najslabiju sok od malina. Kranz i suradnici su zaključili da je moguće koristiti ekstrakte prirodnih sokova u svrhu inhibicije oralnih patogena.[28]

Osim antibakterijskih, aronija je pokazala i antiviralne sposobnosti. Park i suradnici u svom istraživanju ispitivali su antivirusnu moć soka aronije, dobiveni su pozitivni rezultati u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Eksperiment se bazirao na visoko zaraznom virusu influenze koji uzrokuje 250 – 500 tisuća smrtnih slučajeva godišnje. Iako cjepivo protiv influenze postoji i koristi se, zbog mogućih mutacija i nepodudarnosti tipa cjepiva i virusa u pitanju, traže se rješenja šireg spektra. Aroniji se pripisuju antivirusna svojstva zbog prisutne elaginske kiseline i miricetina. U *in vivo* eksperimentima, aronija, elaginska kiselina i miricetin su spriječili smrtni ishod kod miševa. Zbog ovih rezultata predlaže se daljnje istraživanje antivirusnih sposobnosti soka aronije. [29]

Okretanjem proizvodnje prema ekološki osviještenim metodama, javlja se i potreba za novim ambalažnim materijalima. Zbog svojih antimikrobnih i antioksidativnih svojstava, Lee i suradnici su spojili svojstva aronije s materijalom zaštitnih folija polidimetilsiloksan

(PDMS). Bioelastomer je proizveden miješanjem PDMS-a u težinskim omjerima 1:2 i 1:4. Rezultati istraživanja su ukazali da materijal dobiven miješanjem komponenti u omjeru 1:4 nije ukazivao na značajne promjene fizičkih svojstava materijala, ali je ukazivao na značajne antimikrobne i antioksidativne promjene bioelastomera. [30]

Iako se mnoga istraživanja blagotvornog učinka aronije temelje na visoko rizičnim skupinama, aronija ima i pozitivan učinak na zdrave osobe. Ista i suradnici su ispitali učinke aronije u 66 nasumično odabranih zdravih muškaraca tijekom 12 tjedana. Nakon eksperimentalnog perioda ispitano je širenje arterija ovisno o protoku, tvrdoća arterija i krvni tlak, a sastav seruma ispitan je kromatografijom i masenom spektrometrijom. Rezultati eksperimenta ukazuju da su se kardiovaskularna svojstva značajno poboljšala. Iako nisu pronađene značajne razlike u raznolikosti crijevne flore, količine određenih vrsta (*Anaerostipes* kod konzumacije ekstrakta i *Bacteroides* kod konzumacije sirovih bobica) su bile povišene. Istraživači zaključuju da konzumacija soka u zdravih osoba dovodi do poboljšanja endotelne funkcije i održavanja kardiovaskularnog zdravlja u osoba s nižim rizikom oboljenja. [31]

6. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju rezultati ukazuju na visoku antioksidativnu sposobnost soka aronije te na sinergizam soka uz probiotičke bakterije. Smjese od 25% i 12,5% soka pokazale su se najdjelotvornije s obzirom na omjer koncentracije i učinka.

Usporedbom eksperimentalnih podataka dobivenih DPPH• metodom, dokazane su razlike u prisustvu različitih vrsta antioksidanasa, tzv. brzih i sporih kod obaju sokova aronije. Jedna vrsta soka, u ovom slučaju „Rabenhorst“, može sadržavati više „brzih“ antioksidansa, a druga više „sporih“.

Antimikrobna svojstva soka pokazala su se izražena kod bakterija *L. monocytogenesi* i *S. aureus*. Ispitivanjem sinergizma soka aronije u smjesi s *L. monocytogenesi* i *L. plantarum* B, pokazalo se da sok aronije ima aktivacijski učinak na probiotičku bakteriju, a inhibira patogenu.

S obzirom na složenost matriksa soka aronije potrebna su dodatna istraživanja, koja bi s jedne strane identificirala razlike u vrstama antioksidanasa koji različito utječu na brzinu reakcije s radikalima. Nadalje, potrebno je istražiti i mehanizam mikrobne inhibicije uz djelovanje soka aronije kako bi se došlo do saznanja zbog čega je rast kod određenih bakterija potpuno inhibiran dok kod drugih nije.

7. LITERATURA

1. Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, et al. Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules*. 2017;22(6):944. Published 2017 Jun 7. doi:10.3390/molecules22060944. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6152740/>
2. Sidor A, Gramza-Michałowska A. Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* L.-A Qualitative Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential. *Molecules*. 2019;24(20):3710. Published 2019 Oct 15. doi:10.3390/molecules24203710. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31619015/>
3. Widén C, Renvert S, Persson GR. Antibacterial activity of berry juices, an in vitro study. *Acta Odontol Scand*. 2015;73(7):539-543. doi:10.3109/00016357.2014.887773. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25727734/>
4. Efenberger-Szmechtyk M, Nowak A, Czyżowska A, Kucharska AZ, Fecka I. Composition and Antibacterial Activity of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, *Cornus mas* L. and *Chaenomeles superba* Lindl. Leaf Extracts. *Molecules*. 2020;25(9):2011. Published 2020 Apr 25. doi:10.3390/molecules25092011. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7248868/>
5. Goldstein EJ, Tyrrell KL, Citron DM. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin Infect Dis*. 2015;60 Suppl 2:S98-S107. doi:10.1093/cid/civ072. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25922408/>
6. Vilela SF, Barbosa JO, Rossoni RD, et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence*. 2015;6(1):29-39. doi:10.4161/21505594.2014.981486 Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4603435/>
7. Seddik HA, Bendali F, Gancel F, Fliss I, Spano G, Drider D. *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2017;9(2):111-122. doi:10.1007/s12602-017-9264-z. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28271469/>

8. Ojetti V, Ianiro G, Tortora A, et al. The effect of *Lactobacillus reuteri* supplementation in adults with chronic functional constipation: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Gastrointest Liver Dis.* 2014;23(4):387-391. doi:10.15403/jgld.2014.1121.234.elr. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25531996/>
9. Di Pierro F, Colombo M, Zanvit A, Risso P, Rottoli AS. Use of *Streptococcus salivarius* K12 in the prevention of streptococcal and viral pharyngotonsillitis in children. *Drug Healthc Patient Saf.* 2014;6:15-20. Published 2014 Feb 13. doi:10.2147/DHPS.S59665. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3928062/>
10. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):603-661. doi:10.1128/CMR.00134-14. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451395/>
11. Rogalla D, Bomar PA. *Listeria Monocytogenes*. [Updated 2020 Jul 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534838/>
12. De MAN, J.C., ROGOSA, M. and SHARPE, M.E. (1960), A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
13. NEOGEN, BRAIN-HEART INFUSION BROTH (7116) Dostupno na: https://web.archive.org/web/20150204141009/http://www.neogen.com/Acumentia/pdf/ProdInfo/7116_PI.pdf
14. Global Salm-Surv. A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization Dostupno na : https://www.who.int/ihr/lyon/surveillance/ihr_astsalmonella_2010_en.pdf
15. AGAR LISTERIA ACC. TO OTTAVIANI & AGOSTI - ALOA® ALOA® ENRICHMENT-SELECTIVE SUPPLEMENTS Powder medium, selective and enrichment supplements and ready to use plates for the detection and enumeration of *L. monocytogenes*. Dostupno na: <http://www.biolifeit.com/public/cartellina-allegati-schede-certificazioni/schede-tecniche-inglese/TS-501605P.pdf>
16. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr.* 1996;16:33-50. doi:10.1146/annurev.nu.16.070196.000341. Dostupno na:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8839918/#:~:text=Abstract,%2C%20proteins%2C%20and%20other%20biomolecules.>
17. Da Costa LA, Badawi A, El-Sohemy A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Ann Nutr Metab.* 2012;60 Suppl 3:27-36. doi:10.1159/000337311. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22614816/>
 18. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118-126. doi:10.4103/0973-7847.70902. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249911/>
 19. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011;48(4):412-422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551182/>
 20. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 40634, Trolox. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trolox>
 21. Pathak S, Awuh JA, Leversen NA, Flo TH, Åsjø B (2012) Counting Mycobacteria in Infected Human Cells and Mouse Tissue: A Comparison between qPCR and CFU. *PLoS ONE* 7(4): e34931. Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034931>
 22. Kulling SE, Rawel HM. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med.* 2008;74(13):1625-1634. doi:10.1055/s-0028-1088306. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18937167/>
 23. Espín, J.C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H.J.; García-Viguera, C. Anthocyanin-Based Natural Colorants: A New Source of Antiradical Activity for Foodstuff. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1588–1592.
 24. Kasprzak-Drozd K, Oniszczyk T, Soja J, et al. The Efficacy of Black Chokeberry Fruits against Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6541. Published 2021 Jun 18. doi:10.3390/ijms22126541. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34207143/>
 25. Denev P, Číž M, Kratchanova M, Blazheva D. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food Chem.* 2019;284:108-117.

doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.108.

Dostupno

na:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30744834/>

26. E Mijatović, D Broznić, Antioksidativni sinergizam cijedenog soka aronije i mješavine crnog vina triju sorti grožđa spodručja Bujštine “, *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis* 57 (3), 290-298
27. Cisowska A, Wojnicz D, Hendrich AB. Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Nat Prod Commun.* 2011;6(1):149-156. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21366068/>
28. Kranz S, Guellmar A, Olschowsky P, et al. Antimicrobial Effect of Natural Berry Juices on Common Oral Pathogenic Bacteria. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(9):533. Published 2020 Aug 24. doi:10.3390/antibiotics9090533. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7557983/>
29. Park S, Kim JI, Lee I, et al. Aronia melanocarpa and its components demonstrate antiviral activity against influenza viruses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;440(1):14-19. doi:10.1016/j.bbrc.2013.08.090. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24012672/>
30. Lee KH, Chun Y, Jang YW, et al. Fabrication of Functional Bioelastomer for Food Packaging from Aronia (*Aronia melanocarpa*) Juice Processing By-Products. *Foods.* 2020;9(11):1565. Published 2020 Oct 28. doi:10.3390/foods9111565. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33126736/>
31. Istas G, Wood E, Le Sayec M, et al. Effects of aronia berry (poly)phenols on vascular function and gut microbiota: a double-blind randomized controlled trial in adult men. *Am J Clin Nutr.* 2019;110(2):316-329. doi:10.1093/ajcn/nqz075. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31152545/>

8. POPIS SLIKA

Slika 1. Porast kolonija na MRS agaru (Fotografija: Luka Devčić)

Slika 2. Porast kolonija na Mueller hinton agaru (Fotografija: Luka Devčić)

Slika 3. Porast kolonija na ALOA agaru (Fotografija: Luka Devčić)

Slika 4. Redukcija DPPH radikala antioksidansom ArOH (nacrtano po uzoru na Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J Food Sci Technol. 2011)

Slika 5. Uzorci cijedenog soka aronije (Fotografija: Luka Devčić)

Slika 6. UV-VIS eppendorf BioPhotometer (Fotografija: Luka Devčić)

Slika 7. Cary 100 UV-VIS spektrofotometar (Fotografija: <https://www.biocompare.com/22960-Spectrophotometers-Single-Beam/1826986-Cary-100-UVVisible-Spectrophotometer/>)

Slika 8. Analitička vaga OHAUS Explorer (Fotografija: Luka Devčić)

Slika 9. Baždarni pravac Trolox-a

Slika 10. Usporedba gubitaka signala DPPH radikala u uzorcima soka aronije Biofructus (Uzorak A) i Rabenhorst (Uzorak B)

Slika 11. Grafički prikaz koncentracije TEAC za oba uzorka u mmol/kg

Slika 12. Graf rasta *S.aureus* ovisno o smjesi uzorka

Slika 13. Graf rasta *L.monocytogenes* ovisno o smjesi uzorka

Slika 14. Graf rasta *L.plantarum* B ovisno o smjesi uzorka

Slika 15. Graf porasta *L. plantarum* B na MRS agaru

Slika 16. Graf porasta *L. monocytogenes* na ALOA agaru

9. POPIS TABLICA

Tablica 1. Egzogeni antioksidansi i njihovi izvori [11]

Tablica 2. Endogeni antioksidansi [11]

Tablica 3. Statističke razlike između pojedinih skupina sokova *Aronia Melanocarpa* za bakteriju *S. aureus*

Tablica 4. Statističke razlike između pojedinih skupina sokova *Aronia Melanocarpa* za bakteriju *L.monocytogenes*

Tablica 5. Statističke razlike između pojedinih skupina sokova *Aronia Melanocarpa* za bakteriju *L.plantarum* B

Tablica 6. Statističke razlike porasta na MRS agaru između pojedinih skupina sokova *Aronia Melanocarpa* i kontrolne skupine ovisno o omjeru bakterija *L. plantarum* i *L. monocytogenes*

Tablica 7. Statističke razlike porasta na ALOA agaru između pojedinih skupina sokova *Aronia Melanocarpa* i kontrolne skupine ovisno o omjeru bakterija *L. plantarum* i *L. monocytogenes*

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Luka Devčić

Spol: Muški

Datum i mjesto rođenja: 19.01.1999, Rijeka

Adresa: Ratka Petrovića 26, Rijeka 51000

Državljanstvo: Hrvatsko

OBRAZOVANJE

2017.- 2021. – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci – Preddiplomski sveučilišni studij
Sanitarno inženjerstvo

2013. - 2017. – Medicinska škola u Rijeci – Tehničar nutricionist