

Jelena Vulić

**FUNKCIONALNE I ANTIOKSIDATIVNE OSOBINE TROPA
CVEKLE (*Beta vulgaris*)**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2012.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): Doktorska disertacija
VR

Ime i prezime autora: Jelena J. Vulić, dipl. ing.
AU

Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): dr Jasna Čanadanović-Brunet, red. prof., Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
MN

Naslov rada: Funkcionalne i antioksidativne osobine tropa cvekle (*Beta vulgaris*)
NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina
UGP

Godina: 2012.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
MA

Fizički opis rada: Broj poglavlja 6, stranica 154, slika 63, tabela 27, literaturnih navoda 407
FO

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo
NO

Naučna disciplina: Hemija hrane
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: Trop cvekle, antiradikalska aktivnost, antiproliferativna aktivnost, antimikrobna aktivnost, fenolna jedinjenja, betalaini, superoksid anjon radikali, hidroksil radikali, DPPH*, HPLC, ESR, SPE
PO

UDK

Čuva se:

ČU

Važna napomena:

VN

Izvod:

IZ

Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000
Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

nema

Etanolni ekstrakti tropa odabranih sorti cvekle (Detroit, Cardeal-F1, Egipatska, Bikor i Kestrel) prečišćeni su primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i betalaina u prečišćenim ekstraktima određeni su spektrofotometrijskim metodama. HPLC analizom utvrđen je kvalitativni i kvantitativni sastav fenolnih jedinjenja i betalaina ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle. ESR spektroskopijom ispitana je antiradikalska aktivnost ekstrakata topa cvekle na stabilne DPPH i reaktivne superoksid anjon i hidroksil radikale. Spektrofotometrijski je određena antioksidativna aktivnost na DPPH radikale i redukciona sposobnost po Oyaizu u ekstraktima odabranih sorti cvekle. Ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost frakcija ekstrakata, njihovim delovanjem na rast tri histološki različite humane ćelijske linije: MCF-7 (adenokarcinom dojke), HeLa (epitelni karcinom cerviksa) i MRC-5 (fetalni fibroblastni karcinom pluća). U završnoj fazi rada određena je antimikrobna aktivnost ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle.

03.06.2011.

**Datum prihvatanja
teme od strane NN**

veća:

DP

Datum odbrane:

DO

**Članovi komisije:
(ime i prezime / titula /
zvanje / naziv
organizacije / status)**

KO

predsednik: dr Sonja Đilas, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

član: dr Jasna Čanadanović-Brunet, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

član: dr Anamarija Mandić, naučni saradnik, Institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY

Key word documentation

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph documentation
DT

Type of record: Textual printed material
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Jelena Vulić, MSc
AU

Mentor: Jasna Čanadanović-Brunet, PhD., prof.
MN

Title: Functional and antioxidant characteristics of beetroot pomace (*Beta vulgaris*)
TI

Language of text: Serbian
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Country of publication: of Serbia
CP

Locality of publication: of AP Vojvodina
LP

Publication year: 2012
PY

Publisher: Author reprint
PU

Publication place: Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
PP

Physical description: Chapters 6, pages 154, figures 63, tables 27, ref. 407
PD

Scientific field: Technological engineering
SF

Scientific discipline: Food chemistry
SD

Subject, Key words: Beetroot pomace, antiradical activity, antiproliferative activity, antimicrobial activity, phenolic compounds, betalains, superoxide anion radicals, hydroxyl radicals, DPPH*, HPLC, ESR, SPE
SKW

UC

Holding data: Faculty of Technology (library),
HD 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

Note: None
N

Abstract: Beetroot (Detroit, Cardeal-F1, Egipatska, Bikor i Kestrel)
AB pomace ethanol extracts were purified using solid phase extraction (SPE). Contents of total phenols, flavonoids and betalains in purified extracts were determined by spectrophotometric methods. HPLC analysis were used for quantitative and qualitative characterization of phenolic compounds and betalains in investigated extracts. ESR spectroscopy was used for investigation of antiradical activity of beetroot pomace extracts on stable DPPH and reactive superoxide anion and hydroxyl radicals. Antioxidant activity was determined spectrophotometrically on DPPH radicals and reducing power according to Oyaizu in the beetroot pomace extracts. Antiproliferative activity of investigated extracts was determined in vitro, testing their influence on the growth of three histologically different human cell lines: MCF-7 (breast adenocarcinoma), HeLa (cervix epithelioid carcinoma) and MRC-5 (fetal lung). Also, antimicrobial activity of beetroot pomace extracts was determined.

Accepted on June 03rd 2011.
Scientific Board on:

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board: president: Dr Sonja Đilas, Professor, Faculty of Tecnology,
DB Novi Sad
member: Dr Jasna Čanadanović-Brunet, Professor, Faculty of Tecnology, Novi Sad
member: Dr Anamarija Mandić, Institute of Food Technology, Novi Sad

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2.0. OPŠTI DEO.....	3
2.1. Funkcionalna hrana, razvoj i uloga	3
2.2. Reaktivne kiseonikove vrste (ROS)	7
2.2.1. Superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$).....	9
2.2.2. Hidoksil radikali ($\cdot OH$).....	10
2.2.3. Vodonik-peroksid (H_2O_2)	11
2.2.4. Singlet kiseonik	11
2.2.5. Peroksil i alkoksil radikali.....	11
2.3. Antioksidanti u hrani.....	12
2.4. Fenolna jedinjenja	14
2.4.1. Fenolne kiseline	15
2.4.2. Flavonoidi	17
2.4.3. Biosinteza fenolnih jedinjenja	19
2.4.4. Primena fenolnih jedinjenja	21
2.5. Betalaini	25
2.5.1. Predstavnicu betalaina i njihova rasprostranjenost.....	26
2.5.2. Biosinteza betalaina	31
2.5.3. Uloga i bioraspoloživost betalaina u humanom organizmu.....	34
2.5.4. Primena betalaina u funkciji biljnih pigmenata.....	36
2.5.5. Stabilnost betalaina i faktori koji utiču na hemijsku stabilnost betalaina.....	38
2.6. Cvekla	43
2.6.1. Opis biljke, njen značaj i upotreba	43
2.6.2. Opšte i botaničke osobine	44
2.6.3. Značaj i upotreba cvekle.....	46
2.6.4. Nutritivne osobine cvekle.....	46
2.6.5. Antioksidativne osobine cvekle.....	47
2.7. Sporedni proizvodi prerade povrća – izvor fitonutrijenata	49
3.0. EKSPERIMENTALNI DEO	55
3.1. Dobijanje ekstrakata.....	56
3.2. Postupak prečišćavanja polaznih ekstrakata ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE)	56
3.3. Određivanje sadržaja vlage u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle....	57
3.4. Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle (metoda po Folin-Ciocalteu).....	58
3.5. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle (Metoda po Zhishenu)	59
3.6. Određivanje betalaina u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle	60
3.7. Određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle HPLC metodom	62
3.8. Određivanje sadržaja betalaina u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle HPLC metodom	63

3.9. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle	64
3.9.1. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala	65
3.9.2. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala	66
3.9.3. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na transformaciju DPPH radikala	67
3.10. Spektrofotometrijska analiza antiradikalske aktivnosti ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na DPPH radikale	68
3.11. Određivanje ukupne redukcionе sposobnosti ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle (<i>Metoda po Oyaizu</i>)	68
3.12. Određivanje površinske boje ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle	69
3.13. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle	70
3.14. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata tropa cvekle	73
3.14.1. Test mikroorganizmi	73
3.14.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	73
3.14.3. Ispitivanje osetljivosti test mikroorganizama na referentne antimikrobne supstance	74
3.15. Statistička obrada podataka	74
4.0. REZULTATI I DISKUSIJA	75
4.1. Ekstrakcija tropa odabranih sorti cvekle	75
4.2. Sadržaj vlage u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle	75
4.3. HPLC analiza ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle	78
4.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle	96
4.4.1. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala	96
4.4.2. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala	98
4.4.3. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na stvaranje i transformaciju DPPH radikala	100
4.5. Spektrofotometrijska analiza antiradikalske aktivnosti ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na DPPH radikale	106
4.6. Određivanje ukupne redukcionе sposobnosti ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle	107
4.7. Površinska boja ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle	108
4.8. Antimikrobna aktivnost ekstrakata tropa cvekle	109
4.9. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle	115
5.0. ZAKLJUČAK	120
6.0. LITERATURA	124

1. UVOD

Tokom tehnoloških postupaka prerade voća i povrća zaostaju velike količine sporednih proizvoda koji predstavljaju ekonomski deficit i ekološki problem, ali i značajan gubitak biomase i fitonutrijenata. Danas se u svetu ovi sporedni proizvodi koriste kao hrana za životinje, za proizvodnju prehrambenih vlakana i biogoriva, ali takođe ovi proizvodi predstavljaju značajan izvor bioaktivnih antioksidativnih jedinjenja i bojnih materija, koji bi mogli naći primenu u funkciji aditiva u prehrambenoj industriji.

Biološki aktivni sekundarni metaboliti, prisutni u voću i povrću, a koji se nalaze i u sporednim proizvodima prerade voća i povrća imaju pozitivnu ulogu u prevenciji različitih oboljenja, patoloških stanja, procesa starenja i drugih neželjenih promena u humanom organizmu izazvanih prekomernom produkcijom slobodnih radikala. Iako humani organizam ima kompleksni enzimski sistem zaštite od delovanja slobodnih radikala, u uslovima pojačane produkcije slobodnih radikala, neophodno je u organizam unositi i dodatne antioksidativne komponente kroz hranu, definisanu kao funkcionalna hrana, u cilju prevencije njihovog negativnog delovanja.

Prehrambeni proizvodi u svom sastavu sadrže različite aditive, tj. supstance koje se dodaju hrani u cilju postizanja određenih efekata, odnosno koriste se kao antioksidanti, konzervansi, zaslađivači, boje, arome i dr. Najveći deo danas primenjivanih aditiva (84%) još uvek je sintetičkog porekla. Mnoge naučno-istraživačke studije ukazuju na veću efikasnost i zdravstvenu bezbednost prirodnih aditiva izolovanih iz ekstrakata različitih biljaka, njihovih etarskih ulja, kao i biljnih otpadnih proizvoda. S obzirom da se i potrošači sve manje opredeljuju za hranu koja sadrži sintetičke aditive, funkcionalni i nutritivni sastojci iz prirodnih izvora su sve traženiji. Prirodni aditivi imaju različitu hemijsku strukturu koja uslovljava njihovo specifično ponašanje. U najznačajnije prirodne aditive ubrajaju se biljni sekundarni metaboliti kao što su fenolna jedinjenja, terpenoidi, betalaini, tokoferoli, glukozinolati, kao i jedinjenja koja sadrže sumpor.

Cvekla (*Beta vulgaris*) je povrće iz familije *Amaranthaceae* karakteristične crvene boje koje se koristi u kulinarstvu i ishrani. Ona je izvor prirodnih pigmenata betalaina crveno-ljubičastih betacijana i žuto-narandžastih betaksantina koji predstavljaju sigurnu prirodnu alternativu za neke sintetičke boje, koje se trenutno koriste. Pored prirodnih bojnih, cvekla sadrži i značajnu količinu antioksidativnih jedinjenja, pre svega fenolnih jedinjenja, koja imaju sposobnost uklanjanja reaktivnih kiseoničnih vrsta – uzročnika patoloških stanja humanog organizma.

Trop cvekle, oko 15 - 30% svežeg materijala (Otto i Sulc, 2001), se nakon prerađivanja u sok, iako bogat betalainima i fenolnim jedinjenjima, koristi kao stočna hrana ili đubrivo. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je najveći u ljusci (50%), gornjem delu ploda (37%) i mesu (13%). Ljuska sadrži najveći deo betalaina (54%), gornji deo (32%) i meso (14%) (Kujala i sar, 2000).

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je trop pet odabranih sorti (Detroit, Cardeal-F1, Egipatska, Bikor i Kestrel) cvekle (*Beta vulgaris*).

Rad na izvođenju ove doktorske disertacije podeljen je u sledeće faze:

1. Dobijanje tropa pet odabranih sorti cvekle;
2. Dobijanje ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle ekstrakcijom 50%-nim etanolom uz dodatak 0,5% sirćetne kiseline;
3. Prečišćavanje dobijenih ekstrakata primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE);
4. Određivanje sadržaja vlage u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle;
5. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja primenom Folin-Ciocalteu reagensa, flavonoida primenom metode po Zhishenu i betalaina po von Elbe-u u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle;
6. Kvalitativna i kvantitativna HPLC (visokopritisna tečna hromatografija) analiza biljnih fenolnih jedinjenja i betalaina ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle;
7. Definisavanje antiradikalske aktivnosti ispitivanjem uticaja različitih koncentracija svih dobijenih ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na reaktivne hidrok-sil i superoksid anjon radikale, kao i na stabilne 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikale (DPPH^{*}). Slobodni radikali, nastali u svim ispitivanim sistemima, detektovani su primenom najsavremenije analitičke tehnike za direktnu detekciju i karakterizaciju slobodnih radikala - elektron spin rezonentne (ESR) spektrometrije;
8. Korelaciona analiza između sadržaja fitohemikalija u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle i njihove antiradikalske aktivnosti;
9. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale i redukcione sposobnosti po Oyaizu u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle;
10. Određivanje površinske boje ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle;
11. Ispitivanje *in vitro* antiproliferativne aktivnosti ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle, njihovim delovanjem na rast tri histološki različite humane ćelijske linije: MCF7 (humani adenokarcinom dojke), HeLa (humani epitelni karcinom cerviksa) i MRC-5 (humani fetalni fibroblasti pluća);
12. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle.

2.0. OPŠTI DEO

2.1. FUNKCIONALNA HRANA, RAZVOJ I ULOGA

Pre mnogo godina kada hrane nije bilo u izobilju ona je imala zadatak da zadovolji glad, omogući pravilan rast i razvoj deteta, kasnije reprodukciju i održavanje u životu, odnosno obnovu i regeneraciju ćelija. Danas kada je ima u obilju, zahtevi savremene ishrane su veći i ona mora da zadovolji u pogledu kvaliteta i deluje u smislu sprečavanja nastanka hroničnih ne zaraznih bolesti, takozvanih civilizacijskih bolesti. Ona dakle treba da ima preventivnu funkciju i da obezbedi dug i kvalitetan život čoveka.

Hipokrat, „otac medicine“ je verovatno prva osoba koja je smatrala da je hrana lek i lek hrana i da je **medicina umetnost da odredi za koga je koja biljka najbolja**. Naimo on je verovao i pripovedao da priroda ima potencijal da leči bolesti. Hipokrat je često koristio ishranu i biljke kao osnov za tretiranje različitih bolesti. Biljke su sa nama od našeg postanka. Ljudi su godinama koristili biljke za lečenje različitih bolesti. Danas postoje brojni naučni dokazi da je ishrana u direktnoj vezi sa smanjenjem rizika od hroničnih nezazarnih bolesti i u vezi sa tim razvio se koncept funkcionalne hrane. Danas postoje naučni dokazi da neka hrana i komponente hrane, pored osnovnih nutritivnih, imaju i povoljne fiziološke efekte i pozitivno utiču na mentalno stanje pojedinca.

Koncept funkcionalne hrane datira još od sredine 1980-ih u Japanu i predstavlja hranu koja pored osnovne nutritivne vrednosti sadrži i sastojke koji poboljšavaju specifične funkcije organizma. Ministarstvo zdravlja Japana 1991. godine objavilo je zakonsku regulativu koja kategoriše ovu vrstu prehrambenih proizvoda kao FOSHU (Foods for Specific Health Use) (Arai, 1996). Uslov da bi proizvod dobio FOSHU status je postojanje naučnih dokaza o zdravstvenom ili fiziološkom dejstvu finalnog proizvoda. Japan je jedina država sa zakonom koji kategoriše funkcionalnu hranu i reguliše upotrebu zdravstvenih izjava za ovu grupu proizvoda (Burdock i sar., 2006). U ovom slučaju, funkcija je važnija u odnosu na ukus.

U SAD Federalna administracija za hranu i lekove (FDA) funkcionalnu hranu reguliše kao konvencionalnu hranu ili kao dijetetske suplemente (Dietary Supplement Health and Education Act). Ni u EU ne postoji harmonizovana regulativa za funkcionalnu hranu, a proizvodnja i promet pojedinih funkcionalnih namirnica reguliše se propisima za konvencionalnu hranu, nekonvencionalnu hranu (regulativa EC 258/97), hranu za posebne dijetetske namene (Direktiva 89/398/EC) i dopune (96/84/EC i 1999/41/EC) ili dijetetske suple-

mente (Direktiva 2000/0080). U Republici Srbiji, takođe, ne postoji posebna zakonska regulativa i nacionalni konsenzus za ovu grupu namirnica, niti propisi za zdravstvene izjave. Neke od ovih namirnica mogu se svrstati u dijetetske namirnice prema Pravilniku o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti dijetetskih namirnica koje se mogu stavljati u promet (Sl. List SFRJ br. 4/85).

Iako je termin „funkcionalna hrana“ više puta definisan (Roberfroid, 2002), do sada ne postoji jedna jedinstvena definicija za ovu grupu hrane (Alzamora i sar., 2005). U većini zemalja nema zakonskih propisa za ovaj termin, a nutricionisti i stručnjaci za hranu ne mogu da povuku granicu između konvencionalne i funkcionalne hrane.

Funkcionalna hrana sadrži jednu ili više bioaktivnih komponenti. To može biti makronutrijent, kao npr. omega-3 masne kiseline, ili mikronutrijenti (vitamin ili mineral), neesencijalni sastojak koji ima neku funkciju (likopen, konjugovana linolna kiselina-CLA, fito sterol) ili fitohemikalija (izoflavoni, bioflavonoidi, fitoestrogeni ili živi mikroorganizmi-probiotici). Biološki aktivna jedinjenja imaju dejstvo na određenu biohemijsku funkciju u organizmu i tako popravljaju funkciju određenog organa, sistema organa ili organizma u celini (npr. dijetetska vlakna ili probiotici u crevnom traktu). Takođe, funkcionalna namirnica je i ona kojoj je nešto dodato u smislu poboljšanja efekta (vitamini, minerali) ili joj je nešto oduzeto (zasićena mast, šećer, so). Postoje i namirnice koje su pravljene sa određenom funkcijom kao što su to sve prisutniji voćni jogurti, gde je voće bogato vitaminima i dijetetskim vlaknima pomešano sa žitaricama i probioticima, tj. prijateljskim bakterijama našeg digestivnog trakta.

Da bi za namirnicu mogli da kažemo da je funkcionalna, izjave u pogledu sastava i funkcije moraju da budu istinite i one ne moraju da budu odobrene od FDA (Food and Drug Administration), za razliku od zdravstvenih izjava koje moraju da imaju naučnu potvrdu i moraju da imaju atest FDA.

Akcijom Functional Food Science in Europe (FuFoSE), koordinisanom International Life Science Institute (ILSI), Evropska komisija je definisala funkcionalnu hranu: „prehrambeni proizvod se može smatrati funkcionalnom hranom samo ako sa osnovnom nutritivnom funkcijom ima povoljne efekte na jednu ili više funkcija ljudskog organizma, pa stoga poboljšava opšte i fizičke uslove ili/i smanjuje rizik od razvitka bolesti. Količina uzimanja i forma funkcionalne hrane treba da bude tolika koliko se normalno očekuje za dijetetski proizvod. Takođe, ne može da bude u formi pilule ili kapsule, već samo kao „normalni oblik hrane“ (Diplock i sar., 1999). Suprotno tome, od 2001. godine FOSHU proizvodi u Japanu mogu da budu u formi kapsule i tablete, iako je većina i dalje konvencionalne forme (Ohama i sar., 2006). Evropski zakoni ne smatraju funkcionalnu hranu kao specifičnu kategoriju, već kao koncept (Coppens i sar., 2006; Stanton i sar., 2005).

Tabela 1. Vrste funkcionalne hrane (Kotilainen i sar., 2006; Spence, 2006)

Vrsta funkcionalne hrane	Definicija	Primer
Pojačana hrana	Hrana koja je obogaćena dodatkom nutrijenata	Voćni sokovi obogaćeni sa vitaminom C
Obogaćena hrana	Hrana kojoj su dodati novi nutrijenti ili komponente koje nisu prisutne u toj hrani	Margarin sa dodatkom estara fitosterola, probiotika, prebiotika
Izmenjena hrana	Hrana iz koje su štetne komponente uklonjene, smanjene ili zamenjene drugom supstancom sa blagotvornim efektima	Prehrambena vlakna koja zamenjuju masti kod mesa
Poboljšan proizvod	Hrana kod koje je jedna od komponenti prirodno poboljšana specijalnim uzgojem, novim sastavom hraniva, genetskom modifikacijom ili na neki drugi način	Jaja sa povećanim sadržajem omega-3 masnih kiselina (efekat postignut izmenjenom ishranom pilića)

Najraniji razvoj funkcionalne hrane povezan je sa obogaćivanjem hrane dodatkom vitamina i/ili minerala, kao što je vitamin C, vitamin E, folna kiselina, cink, gvožđe i kalcijum (Sloan, 2000). Nakon toga, u funkcionalnu ishranu uključena je i hrana koja sadrži različite mikronutrijente pozitivnog uticaja na zdravlje ili pak smanjuju rizik od pojedinih bolesti, kao što su omega-3 masne kiseline, fitosteroli i rastvorljiva vlakna (Sloan, 2002). U skorije vreme, kompanije za proizvodnju hrane su otišle korak dalje i proizvele hranu koja pruža mnogobrojne nutritivne i zdravstvene pogodnosti samo u jednom proizvodu (Sloan, 2004).

Prema alternativnoj klasifikaciji funkcionalni proizvodi su dizajnirani sa ciljem da:

- zadovolje koncept „dodaj dobro u svoj život“ poboljšavaju funkciju stomaka i debelog creva (pre- i probiotici) ili „poboljšavaju život dece“ utičući na njihovu sposobnost učenja i ponašanja.
- smanje već postojeće zdravstvene probleme, kao što je visok holesterol ili visok krvni pritisak.
- „čine život lakšim“ (npr. proizvodi bez laktoze, glutena) (Mäkinen-Aakula, 2006; Kotilainen i sar.; 2006; Menrad, 2003).

Veliki deo funkcionalne hrane poseduje funkcionalne osobine zahvaljujući prisustvu jedne ili više komponenti, uglavnom, biološki aktivnih jedinjenja sa povoljnim fiziološkim efektima (Roberfroid, 2001). Biološki aktivno jedinjenje može biti makronutrijent (rezistentni skrob ili omega-3 masna kiselina), mikronutrijent (vitamin ili mineral), neesen-cijalni sastojak hrane koji poseduje određenu energetska vrednost (oligosaharidi, konju-govana linolna kiselina, biljni sterol, likopen). Funkcionalni sastojak može biti i neka fito-hemikalija (sulforafan, izoflavoni, fitoestrogeni) ili živi mikroorganizam (probiotici). Nakon konzumiranja funkcionalne namirnice u digestivnom traktu se oslobađa biološki aktivno jedinjenje, koje deluje na mestu oslobađanja (dijetno vlakno, probiotik) ili se resorbuje i distribuira do ciljnih tkiva, gde će ispoljiti povoljno dejstvo. Biološki aktivno jedinjenje mora biti prisutno u funkcionalnoj namirnici u količini za koju je pokazan povoljni efekat.

Tabela 2. Osnovne fitohemikalije hrane i njihova bioaktivnost (Gry i sar., 2007)

Osnovne fitohemikalije hrane i njihova bioaktivnost		
Fitohemikalije	Izvor	Bioaktivnost
Flavonoidi		
Flavoni	Celer, peršun	Antioksidativna, antiproliferativna, antihipertenzivna, antikancerogena, antitrombogena, inaktivacija enzima, LDL-oksidacije, poboljšanje vaskularnog tonusa
Flavononi	Citrusi	
Flavonoli	Luk, čaj, grašak, paradajz	
Flavan-3-oli	Čaj, kakao, jabuke, bobice, neke mahunarke	
Antocijani	Borovnica, kupina, jagoda	
Izoflavoni	Soja	
Fenolne kiseline	Kafa, žitarice, voće	Antiinflamatorna
Lignani	Lan, voće i povrće	Estrogena
Stilbeni	Grožđe, kikiriki	Antioksidativna, kardio zaštitna
Fitosteroli	Brašno	Smanjenje holesterola
Karotenoidi	Paradajz, šargarepa, paprika	Antioksidativna, antiinflamatorna, antikancerogena

2.2. REAKTIVNE KISEONIKOVE VRSTE (ROS)

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli sa jednim ili više nesparenih elektrona u strukturi. Produkuju se iz neradikala koji su po prirodi slabo reaktivni i imaju u orbitalama paran broj elektrona suprotnih spinova, što je energetski najpovoljnije i, stoga, najstabilnije stanje.

Gerschman i saradnici su 1954. godine prvi ukazali na činjenicu da se brojni hemijski procesi odvijaju putem formiranja slobodnih radikala (Gerschman i sar., 1954; Gerschman i sar., 2001; Guteridge i sar., 2000). Za razliku od neradikala, slobodni radikali poseduju jedan nesparesni elektron u spoljašnjoj orbitali, koji je odgovoran za njihovu nestabilnost i reaktivnost.

Neradikal se može konvertovati u slobodni radikal gubitkom ili primanjem jednog elektrona, pri čemu se drastično menjaju njegova fizička i hemijska svojstva. Jednom produkovan slobodni radikal može u fazi inicijacije da izazove niz lančanih reakcija, sa drugim manje reaktivnim vrstama.

Nesparesni elektron se može nalaziti na C-atomu, kao kod alkil radikala ($\text{CH}_3\cdot$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\cdot$), na O-atomu, kao kod alkoksil-, hidroksil-, peroksil-, superoksid anjon radikala ($\text{RO}\cdot$, $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$), ili na S-atomu, kao kod tiil radikala ($n\text{-C}_6\text{H}_9\text{S}\cdot$). Neretko, nesparesni elektron mogu imati i atomi halogena ($\text{Cl}\cdot$), alkalnih metala ($\text{Na}\cdot$), ali i joni nekih drugih metala: Cu^{2+} i Fe^{3+} .

Slobodni radikali spadaju u najreaktivnije hemijske vrste, ali i neradikaliski oblici su oksidacioni agensi, i lako se konvertuju u radikale (Halliwell i sar., 1992; Halliwell i sar., 1993a).

Zbog svoje visoke hemijske reaktivnosti slobodni radikali lako stupaju u reakciju, međusobno ili sa drugim molekulima, pri čemu nesparesni elektroni obrazuju hemijske veze, oslobađa se energija, a sistem prelazi u niže energetsko stanje.

U reakciji dva radikala dolazi do kombinacije njihovih nesparenih elektrona, pa oni formiraju kovalentnu vezu. Uz to, slobodni radikali mogu reagovati i sa drugim molekulima.

Slobodni radikali kao reaktivni, nestabilni molekuli veoma brzo reaguju sa molekulima u reakcijama: izdvajanja kiseonika, predaje elektrona i razmene elektrona (McCord i sar., 2000). Na primer, proces „hvatanja“ elektrona uključuje reakciju sa molekulom donorom, koji gubi elektron i pri tom se oksiduje (Halliwell i sar., 1993b). Oksidovani molekul donor ima kapacitet da oksiduje druge molekule usled čega dolazi do lančane reakcije.

U humanom organizmu, za odvijanje nekih biohemijskih metaboličkih reakcija neophodno je i prisustvo slobodnih radikala (Niki i sar., 1992; Niki i sar., 2001).

U biosistemima se produkcija slobodnih radikala dešava tokom sledećih procesa: apsorpcije radijacije; oksidativne fosforilacije u mitohondrijama; fagocitoze; biotransformacije egzogenih i endogenih supstrata u endoplazmatičnom retikulumu; metabolizma etanola; enzimskih reakcija koje katalizuju oksidaze; sinteze eikosanoida; oksidoredukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencom; lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina. Iako slobodni radikali imaju esencijalnu ulogu u ljudskom organizmu, oni mogu da reaguju sa DNA, proteinima ili lipidima ćelijske membrane i da izazovu oštećenja (Hawkins i sar., 2001).

U reaktivne kiseonikove vrste (ROS) ubrajaju se (Evans i sar., 1999; Halliwell i sar., 1994a; Halliwell i sar., 1994b; Rohrdanz i sar., 1991; Halliwell i sar., 2000):

1. Slobodni radikali: superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikal ($^{\bullet}OH$), hidroperoksil radikal (HO_2^{\bullet}), peroksil radikal (RO_2^{\bullet}), alkoksil radikal, (RO^{\bullet}), karbonatni radikal ($CO_3^{\bullet-}$), ugljendioksidni radikal ($CO_2^{\bullet-}$);

2. Neradikalni oblici: vodonik-peroksid (H_2O_2), hipobromna kiselina (HOBr), hipohlorna kiselina (HOCl), ozon (O_3), singletni kiseonik ($O_2^1\Delta_g$), organski peroksidi (ROOH), peroksinitrit ($ONOO^-$), peroksinitritna kiselina (ONOOH).

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) su nađene intracelularno i ekstracelularno i mogu biti proizvedene endogeno ili poticati iz egzogenih izvora (Sies i sar., 1985; Sies i sar., 1997). Važni izvori endogenih slobodnih radikala uključuju prooksidativne enzimske sisteme (npr. lipoksigenaze), lekove i njihove metabolite, polutante i druge hemikalije i toksine (Halliwell i sar., 1996; Spitteller i sar., 2001). Dok su neki od ovih direktno toksični, mnogi drugi primarni metaboliti stvaraju slobodne radikale tokom metaboličkih procesa. Spoljašnji izvori, kao što je sunčeva svetlost i drugi oblici radijacije, mogu da generišu endogene ROS, koji mogu da dovedu do velikog broja bolesti (Halliwell i sar., 1996; Stief i sar., 2003). ROS, takođe, mogu biti formirane u hrani lipidnom oksidacijom ili izlaganjem svetlosti fotosenzitivnih supstanci.

Reaktivne kiseonične vrste se neprestano stvaraju u telu čoveka, kao rezultat normalnog metaboličkog procesa (Halliwell i sar., 1999). Mitohondrija, koja koristi više od 90% kiseonika kod aerobnih organizama, glavni je izvor ROS i ostalih vrsta slobodnih radikala. Oko 1% do 5% kiseonika koji se nalazi u mitohondriji transformiše se u reaktivne oblike (Ames i sar., 1993; Halliwell i sar., 1991).

ROS izazivaju lipidnu oksidaciju, oksidaciju proteina, degradaciju DNK i modulaciju gena (Evans i sar., 1999; Halliwell i sar., 2000; Halliwell i sar., 1996; Halliwell i sar., 1994c; Halliwell i sar., 2002). ROS su uključene u mnoge bolesti, kao što su ateroskleroza, kancer, šlog, astma, artritis i druge bolesti koje su povezane sa starenjem (Halliwell i

sar., 2002; Cross i sar., 1987; Diaz i sar., 1997; Halliwell i sar., 2002; Cross i sar., 1992). Neka biološka oštećenja u ljudskom telu prikazana su na slici 1 (Lee i sar., 1994).

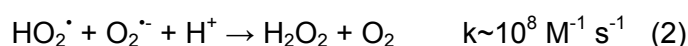
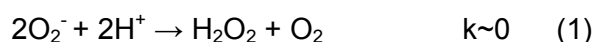


Slika 1. Biološka oštećenja u ljudskom telu

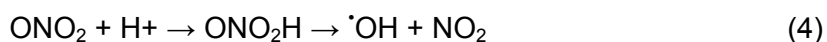
Antioksidativna zaštita ljudskog organizma nije potpuno efikasna, a povećano formiranje slobodnih radikala može da proizvede kontinuiran nivo oksidativnih oštećenja (Gutteridge i sar., 2000; Halliwell i sar., 1992; Halliwell i sar., 1996; Halliwell i sar., 1991; Halliwell i sar., 1994a; Halliwell i sar., 1994b; Halliwell i sar., 1996; Halliwell i sar., 1994c; Cross i sar., 1987; Cross i sar., 1992; Aruoma i sar., 1991; Spencer i sar., 1996; Halliwell i sar., 1995; Darsley-Usmar i sar., 1996). Oksidativni stres predstavlja značajno ometanje prooksidativno - antioksidativnog balansa u korist prooksidativnog, vodeći ka potencijalnom oštećenju (Sies i sar., 1997).

2.2.1. SUPEROKSID ANJON ($O_2^{\cdot-}$)

Superoksid anjon i vodonik-peroksid su glavne kiseonične vrste koje dovode do oksidacije ćelija i tkiva (Stief i sar., 2003; Harman i sar., 2001). Superoksid anjon sam po sebi nije snažan oksidant. Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), odnosno njegov protonovani oblik, perhidroksilni radikal ($HO_2^{\cdot-}$), nastaje jednoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika, a može se dobiti i jednoelektronskom oksidacijom vodonik-peroksida. Značajne količine proizvode se i u reakcijama katalizovanim nekim oksidazama (npr. ksantin oksidazom), kao i u procesu fagocitoze (Halliwell i sar. 1992; Halliwell i sar., 1993b; Stief i sar., 2003; Cross i sar., 1987).



Superoksid anjon može da reaguje sa azot oksidom i da formira peroksinitrit radikal (ONOO[•]). Konjugovana kiselina peroksinitrita, peroksinitritna kiselina, razlaganjem formira hidroksil radikal i azotdioksid (4) (Evans i sar., 1999; Knight i sar., 2000).

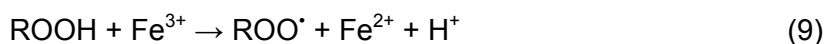
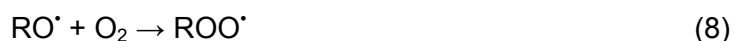


Superoksid može da redukuje Fe³⁺ u Fe²⁺. Reakcije 5 i 6 su poznate kao Haber-Weiss reakcije.



2.2.2. HIDOKSIL RADIKALI (•OH)

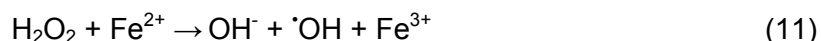
Hidroksil radikali su visoko reaktivni slobodni radikali, koji mogu da reaguju sa većinom biomolekula u živim organizmima (Lee i sar., 2004; Ashok i sar., 1999). Hidroksil radikali reaguju sa lipidima, polipeptidima, proteinima i DNA (Hawkins i sar., 2001; Ashok i sar., 1999). Hidroksil radikali su visoko elektrofilni i mogu izdvojiti elektrone iz proteina i polinezasićenih masnih kiselina (Ashok i sar., 1999; Juurlink i sar., 1998; Halliwell i sar., 1996), formirajući ugljenikove slobodne radikale (R[•]) (7). Ugljenik centrirani slobodni radikal (R[•]) može da reaguje sa kiseonikom formirajući veoma reaktivne peroksil (ROO[•]) i alkoksil (RO[•]) radikale (8-10) (Juurlink i sar., 1998).



Tokom reakcije lipidne preroksidacije formirani hidroksil radikali mogu da oštete ćelijske membrane i lipoproteine. Lipidna peroksidacija je radikalska lančana reakcija, tj. jednom kada je započeta, širi se brzo i utiče na veliki broj lipidnih molekula (Gutteridge i sar., 2000; Aruoma i sar., 1991; Halliwell i sar., 1995; Pryor i sar., 1993). Oksidacijom linolne kiseline kao sastavne komponente glicerolipida i fosfolipida, ćelijske membrane gube svoju funkciju. Proteini oštećeni reaktivnim kiseoničnim vrstama, menjaju svoju strukturu što uslovljava gubitak enzimske aktivnosti. Oksidativna oštećenja DNA mogu da izazovu mutaciju DNA, cepanje vlakana i skraćenje hromozoma (Halliwell i sar., 2000; Halliwell i sar., 2001).

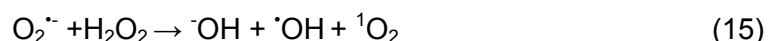
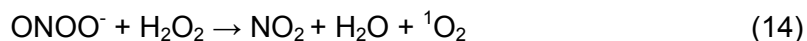
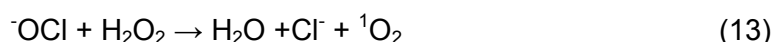
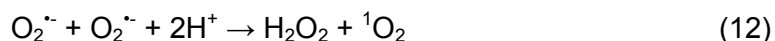
2.2.3. VODONIK-PEROKSID (H₂O₂)

Vodonik-peroksid može biti generisan reakcijama dismutacije superoksid anjona, superoksid dismutazom (Juurlink i sar., 1998). Monomerne oksidaze, koje se nalaze u spoljnoj membrani mitohondrija, kao oksidaze aminokiselina i ksantan oksidaze, takođe, proizvode H₂O₂ iz superoksid anjona (Evans i sar., 1999; Mezzetti i sar., 1990). Vodonik-peroksid je visoko difuzivan i lako prolazi kroz plazma membranu. Jednom proizveden H₂O₂ metabolisan je katalazom ili glutation peroksidazom, proizvodeći vodu i kiseonik (Evans i sar., 1999; Mezzetti i sar., 1990). Iako je vodonik-peroksid najmanje reaktivan molekul među kiseoničnim vrstama, veoma je štetan, jer lako prelazi u hidroksil radikal (Hawkins i sar., 2001). U prisustvu metala Fe²⁺ ili Cu²⁺, H₂O₂ daje hidroksil radikal Fentonovom reakcijom, gde gvožđe Fe²⁺ oksidovano u Fe³⁺ i H₂O₂, prelazi u [•]OH i OH⁻ (11).



2.2.4. SINGLET KISEONIK

Singlet kiseonik je neradikalna kiseonična vrsta. Singlet kiseonik može biti proizveden iz H₂O₂ tokom reakcije sa hipohloritom (OCl⁻) u ćelijama i tkivu (12) (Hawkins i sar., 2001; Stief i sar., 2003). Singlet kiseonik je slab toksin za tkivo sisara u poređenju sa drugim reaktivnim kiseoničnim vrstama (Stief i sar., 2003). Međutim, poznato je da je singlet kiseonik povezan sa oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina i inicijacijom lipidne peroksidacije (Spiteller i sar., 2001; Juurlink i sar., 1998).



2.2.5. PEROKSIL I ALKOKSIL RADIKALI

Peroksil radikali (ROO[•]) su formirani direktnom reakcijom kiseonika sa alkil radikalima (R[•]). Na primer, reakcija između lipidnih radikala i kiseonika (Lee i sar., 2004; Knight i sar., 2000). Raspadanje alkil peroksida (ROOH), takođe, može da da peroksil (ROO[•]) i alkoksil radikale (RO[•]) (Halliwell i sar., 1991; Evans i sar., 1999; Cross i sar., 1987; Halliwell i sar., 1996; Halliwell i sar., 1977). Peroksil i alkoksil radikali su uključeni u fazu propagacije lipidne peoksidacije.

2.3. ANTIOKSIDANTI U HRANI

Termin „antioksidant“ podrazumeva sve supstance koje, prisutne u manjoj koncentraciji u odnosu na supstrate koji se oksidišu, mogu da spreče ili značajno smanje njihovu oksidaciju (Halliwell, 1990). Generalno, značaj antioksidanata nesumnjivo je u tome što štite prehrambene proizvode od oksidativnih transformacija, a sa druge strane su podrška i dopuna *in vivo* postojećem antioksidativnom sistemu zaštite razvijenom kod svih aerobnih organizama (Namiki, 1990). Američka uprava za hranu i lekove (US FDA – United States Food and Drug Administration) definiše antioksidante kao prehrambene aditive, konzervanse, koji sprečavaju kvarenje hrane, odnosno užeglost masti i promenu boje proizvoda.

Aktivnost antioksidanata zavisi ne samo od njihove strukture, nego i od mnogih drugih faktora, kao što su koncentracija, temperatura, svetlost, tip substrata, fizičko stanje sistema, kao i prisustvo mikrokomponentata koje deluju kao prooksidanti ili sinergisti (Yanishlieva-Maslarova i sar., 2001). Neki važni faktori koji mogu da utiču na aktivnost antioksidanata u lipidnom sistemu su početna koncentracija primarnih proizvoda autooksidacije, i to hidroperoksida lipida i slobodnih masnih kiselina.

Konstituenti hrane, uključujući vodu, proteine, ugljene hidrate, vitamine, minerale i druge komponente hrane, su izloženi promenama. Ovo može da uzrokuje promene u aktivnosti antioksidanata u različitim sistemima hrane (Decker i sar., 2001). Antioksidanti su manje efikasni na povišenim temperaturama.

Niki i saradnici (1987) su antioksidante podelili u dve kategorije: preventivne antioksidante i antioksidante koji prekidaju lančane reakcije oksidacije primarnih metabolita. Preventivni antioksidanti (npr. glutation peroksidaze i katalaze) deaktiviraju aktivne kiseonikove vrste (npr. H_2O_2) ne formirajući nove slobodne radikale i takođe sprečavaju fazu inicijacije oksidacije. Antioksidanti koji prekidaju lančane reakcije oksidacije (chain-breaking) deluju kao „hvatači“ kiseonikovih radikala, transformišući ih u stabilne, neradikalske proizvode.

Antioksidanti sprečavaju reakciju oksidacije, čak i kada su prisutni u veoma malim količinama. Antioksidanti u biljkama deluju kao hvatači slobodnih radikala i pretvaraju radikale u manje reaktivne vrste. Antioksidativna aktivnost uključuje i enzimske i neenzimske sisteme. Neenzimski su askorbinska kiselina (vitamin C), α -tokoferol, karotenoidi, i dr., a enzimski sistemi uključuju superoksid dizmutaze (SOD), katalaze (CAT), peroksidaze (POX), askorbat peroksidaze (APX), glutation reduktaze (GR) i polifenol oksidaze (PPO). Funkcija ovog antioksidativnog sistema je da „uhvati“ toksične radikale proizvedene tokom oksidativnog stresa i da biljke opstanu kroz ove uslove.

Veliki interes za prirodne antioksidante rezultat je svetskog trenda minimiziranja upotrebe ili potpunog eliminisanja sintetičkih prehrambenih aditiva zbog njihovog potencijalnog štetnog dejstva. Fitohemikalije su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju potencijalan pozitivan efekat na zdravlje, a nisu esencijalni nutrijenti (Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute). Fitohemikalije sa najizraženijim antioksidativnim delovanjem su fenolna jedinjenja, askorbinska kiselina, betalaini, tokoferoli i karotenoidi.

Veliki broj eksperimenata, radova i studija ističe pozitivnu ulogu voća, povrća, žitarica i drugih jestivih biljaka, u preventivi i lečenju mnogih oboljenja kod čoveka (Moyer i sar., 2002). Takođe, rezultati dobijeni u poslednjih nekoliko godina ukazuju na visok sadržaj prirodnih antioksidanata u biljkama (Keli i sar., 1996; Croft, 1999; Lea i Leegod, 1999).

Začini i biljke u hrani kao lek postali su izuzetno interesantni, zbog unosa antioksidanata koji pozitivno utiču na zdravlje. Takođe, prirodni antioksidanti i drugi biološki materijali predstavljaju siguran i potencijalno nutritivan i terapijski efekat. Npr. potrebna su skupa testiranja aditiva za visoke standarde sigurnosti mesne industrije, pa su sintetički antioksidanti bili eliminisani iz upotrebe. Mediteranska ishrana, bogata prirodnim antioksidantima, smanjuje broj kardio i cerebrovaskularnih oboljenja kod konzumenata (Frei i sar., 1988). Poznato je da su komponente koje pripadaju različitim klasama fitohemikalija (fenolna jedinjenja, flavonoidi i karotenoidi) hvatači slobodnih radikala ($O_2^{\cdot-}$, $^{\cdot}OH$ ili lipidni peroksil LOO^{\cdot} radikali) (Gutteridge, 2000). Prirodni antioksidanti se javljaju u svim delovima biljke. Oni sprečavaju dejstvo kiseonika, hvataju slobodne radikale, razlažu perokside, sprečavaju dejstvo enzima i deluju sinergistički (Manach i sar., 1998). Vitamini C i E se koriste u uljima i hrani koja sadrži masti i ulja. Vitamin E, kao i neki sintetički antioksidanti dobro podnose visoke temperature.

2.4. FENOLNA JEDINJENJA

Fenolna jedinjenja obuhvata široku grupu supstanci koje u svojoj strukturi imaju aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Od nekoliko hiljada fenolnih jedinjenja većina je biljnog porekla (Strack, 1997). Biljna fenolna jedinjenja su klasifikovana prema strukturalnoj kompleksnosti i biosintetičkom poreklu, ali nijedan sistem njihove podele nije dovoljno precizan (Harborne i sar., 1999). Klasifikacija prirodnih fenolnih jedinjenja po Robards i saradnicima, prikazana je u tabeli 3.

Tabela 3. Podela fenolnih jedinjenja (Robards i sar., 2000)

Osnovni skelet	Klasa	Primer
C ₆	Prosti fenoli	Katehol, hidrohinon, rezorcinol
	Benzohinoni	
C ₆ -C ₁	Fenolne kiseline	<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina, salicilna kiselina
C ₆ -C ₂	Fenilsirćetne kiseline	<i>p</i> -Hidroksifenilsirćetna kiselina
C ₆ -C ₃	Cimetne kiseline	Kafena kiselina, ferulna kiselina
	Fenilpropeni	Eugenol, miristicin
	Kumarini	Umbeliferon, eskuletin, skopolin
	Hromoni	Eugenin
C ₆ -C ₄	Naftohinoni	Juglon
C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantoni	Mangostin, mangiferin
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbeni	Rezveratrol
	Antrahinoni	Emodin
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidi	
	Flavoni	Apigenin, luteolin, sinensetin, nobiletin, izosinensetin, tangeretin, diosmin
	Flavonoli	Kvercetin, kamferol
	Flavonol glikozidi	Rutin
	Flavanoli	Dihidrokvercetin i dihidrokamferol glikozidi
	Flavanoni	Hesperidin, naringenin
	Flavanon glikozidi	Hesperidin, neohesperidin, narirutin, naringin, eriocitrin
	Antocijanini	Glikozidi pelargonidina, peonidina, delfinidina, petunidina, cijanidina
	Flavanoli (katehini)	Katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin
	Halkoni	Floridžin, arbutin, halkonaringenin
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignini	Pinorezinol
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoidi	Agatisflavon, amentoflavon

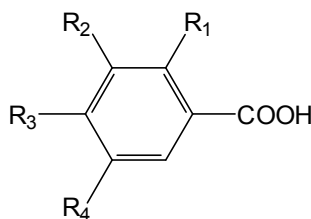
Većina fenolnih jedinjenja se prirodno javlja sa šećerom u glikolizovanom obliku i kao takvi su rastvorni u vodi i nalaze se u centralnoj vakuoli biljne ćelije (Harborne i sar., 1999). Druga fenolna jedinjenja su lipofilna sa velikim brojem o-metilovanih fenolnih grupa. Prisutni su u ćelijskoj citoplazmi ili na površini biljaka u voskovima ili pupoljcima (Harborne i sar., 1999). Strukture fenolnih jedinjenja viših biljaka, prisutne pretežno u lišću, su: flavonol glikozidi, konjugati hidroksi cinamata i kondenzovanih tanina, a antocijani se nalaze u laticama i voću (Strack, 1997).

Raspodela i akumuliranje fenolnih jedinjenja kod biljaka zavisi od uslova sredine i njihove funkcije u samoj biljci. Pozitivna veza između intenziteta solarne radijacije i količine fenolnih jedinjenja koje biljka proizvede je primer efekta spoljašnjih uslova (Waterman i Mole, 1994). Fenolna jedinjenja imaju mnogo važnih uloga kod biljaka. Ona su od velike važnosti kao materijali koji štite ćeliju i doprinose boji voća i povrća koja privlači životinje koje oprašuju i raznose semena (Strack, 1997; Parr i Bolwell, 2000). Najvažnija uloga fenolnih jedinjenja je u procesu u kome biljke štite same sebe protiv patogena i biljoždera predatora (Parr i Bolwell, 2000). Jedinjenja uključena u odbrani mogu biti sastavni deo toksina koji su preinfektivne komponente prisutne u zdravom tkivu u dovoljno visokim koncentracijama da odbrane napad, ili izazivaju fitoaleksine koji su jedinjenja niske molekulske mase formirani kao rezultat mikrobiološkog napada (Strack, 1997; Parr i Bolwell, 2000). Fenolna jedinjenja takođe mogu da izazovu alelopatiju među biljkama i deluju kao signalni molekuli, UV filteri i antioksidanti (Strack, 1997; Parr i Bolwell, 2000).

2.4.1. FENOLNE KISELINE

Fenolne kiseline se sastoje od fenolnog jezgra i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzojeve kiseline) ili tri (derivati cimetine kiseline) ugljenikova atoma (Tumbas, 2010). Fenolne kiseline obuhvataju hidroksi i druge funkcionalne derivate benzojeve i cimetine kiseline.

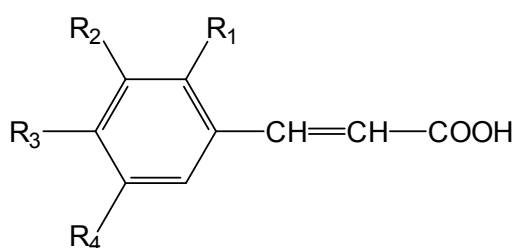
Derivati hidroksibenzojeve kiseline imaju C_6-C_1 strukturu:



Slika 2. Opšta strukturna formula derivata hidroksibenzojeve kiseline

Varijacije u strukturi derivata hidroksibenzo-eve kiseline nastaju hidroksilovanjem ili metilovanjem aromatičnog jezgra. U biljnom svetu se najčešće javljaju *p*-hidroksibenzo-eva ($R_1=R_2=R_4=H$; $R_3=OH$), vanilinska ($R_1=R_4=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=OH$), siringinska ($R_1=H$; $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=OH$) i protokatehinska kiselina ($R_1=R_4=H$, $R_2=R_3=OH$). One mogu biti prisutne u rastvornoj formi konjugovane šećerima ili organskim kiselinama, ili vezane za ćelijski zid, npr. u ligninima. Galna kiselina učestvuje u stvaranju hirolizujućih galotanina, a njenom kondenzacijom nastaje dimer - elaginska kiselina. Elaginska kiselina takođe ulazi u sastav elagitanina.

Derivati hidroksicimetne kiseline imaju C_6-C_3 strukturu:



Slika 3. Opšta strukturalna formula derivata hidroksicimetne kiseline

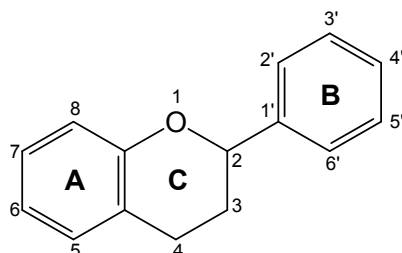
Najzastupljeniji derivati hidroksicimetne kiseline su: *p*-kumarinska ($R_1=R_2=R_4=H$; $R_3=OH$), kafena ($R_1=R_4=H$; $R_2=R_3=OH$), ferulna ($R_1=R_4=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=OH$) i sinapinska kiselina ($R_1=H$; $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=OH$). Derivati hidroksicimetne kiseline su prisutni u različitim konjugovanim formama. Konjugovane forme su estri hidroksikiselina kao što su hinska kiselina, šikimska kiselina i vinska kiselina, kao i njihovi glikozidi. Slobodne forme ukazuju na enzimsku hidrolizu u biljnom tkivu tokom ekstrakcije (Macheix i sar., 1990; Shahidi i Naczka, 1995). Derivati hidroksicimetne kiseline se prirodno javljaju u različitim konjugovanim oblicima, najčešće kao estri i amidi (Strack, 1997). Oni mogu da se jave konjugovani sa organskim kiselinama, ugljenim hidratima, proteinima, aminokiselinama, aminima, lipidima, terpenoidima, alkaloidima i flavonoidima (Harborne, 1980; Strack, 1997). Derivati hidroksicimetne kiseline mogu biti kovalentno vezani za ćelijski zid polisaharida ili esterifikovane sa ligninom biljaka (Meyer i sar., 1998a). Prirodni derivati cimetne kiseline su *trans* izomeri, ali ravnotežne smeše *trans* i *cis* izomera se formiraju u prisustvu svetlosti (Theander i Lundgren, 1989).

Derivati hidroksicimetne kiseline: *p*-kumarinska, kafena, ferulna i sinapinska kiselina su među najčešćim od svih fenolnih jedinjenja (Waterman i Mole, 1994). Jedna ili više od ovih derivata hidroksicimetne kiseline se javlja kod većine viših biljaka (Theander i Lundgren, 1989). U voću i povrću su široko rasprostranjeni estri glukoze i hidroksicimetne kiseline (Schuster i Herrmann, 1985). Istraživanje Wintera i Herrmann (1986) na estrima i

glikozidima hidroksicimne kiseline u povrću ukazuju da svaka vrsta ima sopstveni skup komponenti, a kod različitih sorti iste vrste, prisutne komponente ostaju iste, ali u različitim količinama. Derivati hidroksicimne kiseline su važne komponente (fizičke, hemijske i biološke) ćelijskog zida biljaka (Kroon i Williamson, 1999). Njihovi konjugati su takođe, od glavne važnosti među fenolnim toksinima i fitoaleksinima, jer doprinose mehanizmu otpornosti od bolesti biljaka (Strack, 1997). Kod kukuruza prisustvo derivata hidroksicimne kiseline je povezano sa zaštitom od fitopatogenih gljivica i pesticida (Sen i sar., 1994). Derivati hidroksicimne kiseline mogu da služe kao alelopatske komponente (Waterman i Mole, 1994; Strack, 1997).

2.4.2. FLAVONOIDI

Osnovni strukturni skelet flavonoida čine 15 atoma ugljenika u osnovnoj strukturi ($C_6-C_3-C_6$) od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A, kondenzovan sa piranskim prstenom C) (Cook i Samman, 1996).



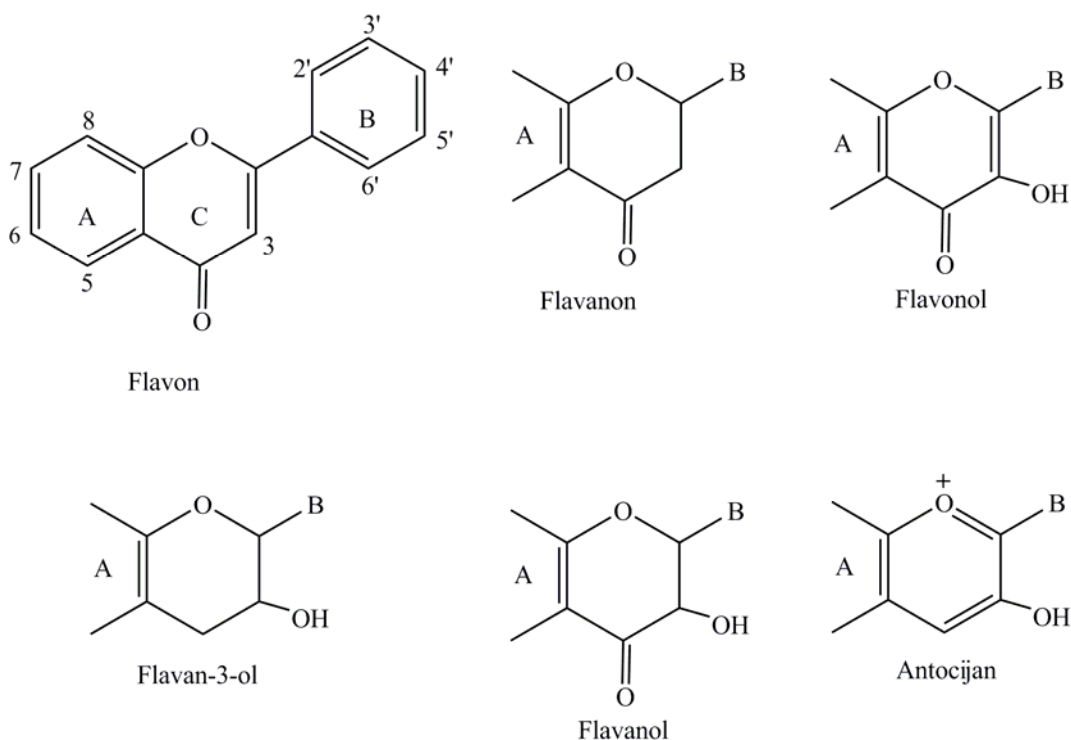
Slika 4. Opšta strukturna formula flavonoida

Ostalih šest C-atoma čine benzenski prsten (B) povezan sa benzopiranskim prstenom na poziciji dva (flavoni, dihidroflavoni, flavonoli, katehini, flavani i antocijanidini), tri (izoflavonoidi) i četiri (4-fenil-kumarini) (slika 4). Sistem koji čine A i C prsten naziva se benzo-1-piran-4-hinon.

Do danas je poznato oko 3000 flavonoida koji su, u zavisnosti od stepena oksidacije centralnog piranskog prstena, kao i pozicije B prstena, podeljeni u jedanaest klasa (Harborne, 1988; Hodnick i sar., 1986; Bors i sar., 1990).

Dalja strukturna raznolikost flavonoida se javlja kao gubitak supstituenata kiseonika, dalje oksidacije na različitim ugljenicima, metilovanje, dimerizacija, formiranje bisulfata i glikolizacija (Markham, 1982; Waterman i Mole, 1994). Aglikoni flavonoida su klasifikovani prema oksidacionom stanju centralnog prstena pirana. Strukture osnovnih prstena šest najčešćih tipova flavonoida (flavanoni, flavanoli, flavoni, flavonoli, flavan-3-oli i antocijanidini) su dati na slici 5 (Waterman i Mole, 1994).

Većina flavonoida se javlja prirodno u konjugovanoj formi, najčešće vezani za šećer (pre kao flavonoid O-glikozid nego kao flavonoid C-glikozid), ali konjugacija sa neorganskim sulfatom ili organskom kiselinom nije neobična (Markham, 1982; Harborne, 1986). Mono-, di-, tri- i čak tetrasaharidi se spajaju sa flavonoidima (Markham, 1982). Šećeri su često dalje zamenjeni sa acil ostatkom, kao što je malonat, 4-kumarat, kafeat i ferulat (Hahlbrock, 1981).



Slika 5. Strukture osnovnih prstena šest najčešćih tipova flavonoida (Waterman i Mole, 1994)

Flavonoidi su najveća grupa fenolnih jedinjenja; oko polovina fenolnih jedinjenja koja se javlja kod biljaka su flavonoidi (Harborne i sar., 1999). U 1999. godini objavljena je lista od 6467 poznatih struktura flavonoida (Harborne i Williams, 2000). Flavonoidi su veoma rasprostranjeni i često se javljaju u biljnom carstvu, od najprimitivnijih biljaka (zelene alge, *Nitella hookeri* (Characeae)) do viših biljaka (Iwashina, 2000). Često se nalaze i u tkivu mladih biljaka (Strube i sar., 1992). Flavonoidi se javljaju u svim delovima biljaka, uključujući listove, koren, drvo, koru, polen, nektar, cveće, bobice i semenke (Markham, 1982; Harborne, 1989). Generalno, flavonoidi su prisutni kao glikozidi u vakuolama cveća, lišća, stabljici ili korenu (Iwashina, 2000). Aglikoni flavonoida, posebno jednostavni i polimetilovani flavonoidi, javljaju se kao brašnasti sekreti ili vosak na lišću, stabljici ili pupoljku (Iwashina, 2000).

Biljke koje su taksonomski povezane proizvode slične tipove flavonoida (Markham, 1982). Npr., flavonoli i flavoni se uglavnom javljaju u lišću i spoljnim delovima biljaka, sa izuzetkom kod luka, jer je njihovo formiranje povezano sa svetlošću (Strube i sar., 1992).

Flavonoidi imaju značajnu ulogu kod biljaka. Antocijani, kao jedini intenzivno obojeni flavonoidi, doprinose zajedno sa flavonima i flavonolima kao kopigmenti boji cveća, voća i drugom tkivu biljaka, ali se retko javljaju u drveću (Harborne, 1989; Strack, 1997). Iako su antocijani široko rasprostranjeni kod viših biljaka, oni nisu prisutni kod biljaka koje proizvode betalaine, familije *Caryophyllales* (Steglich i Strack, 1990; Iwashina, 2000). Antocijani cveća i voća se menjaju kao rezultat adaptacije biljke na specifične oprašivače (Iwashina, 2000). Cveće koje oprašuju ptice je često crveno zahvaljujući prisustvu antocijana, dok je cveće koje oprašuju insekti često žuto kao rezultat akumuliranja flavonoida (ili karotenoida) (Parr i Bolwell, 2000). Plava boja cveća je karakteristična za više evolutivne angiosperm biljne familije i posledica je prisustva antocijana baziranog na delfinidinu zajedno sa kopigmentom flavona i ponekad sa jednim ili više metalnih katjona (Harborne i Williams, 2000).

Postoji dokaz da flavonoidi, naročito kada se nalaze na gornjoj površini lista ili u epidermalnim ćelijama, imaju ulogu u fiziološkom preživljavanju biljaka (Harborne i Williams, 2000). Flavonoidi, naročito flavoni i flavonoli, štite biljke od oštećenja UV radijacijom. Oni se pojavljuju u najvećoj količini u delu biljke koji je izložen jakoj svetlosti (Harborne i Williams, 2000; Parr i Bolwell, 2000).

Dokazano je da flavonoidi doprinose otpornosti od bolesti, bilo kao gradivini antifungalni agensi ili kao fitoaleksini (Harborne i Williams, 2000). Danas je generalno prihvaćeno da flavonoidi, kao i svi druga fenolna jedinjenja, imaju ulogu u zaštiti biljaka od insekata i sisara biljojeda (Harborne i Williams, 2000). Na primer, flavanon glikozid naringin koji se nalazi u grejpfrutu (*Citrus paradisi*) ima neprivlačan ukus zbog svog intenzivnog kiselog ukusa (Parr i Bolwell, 2000).

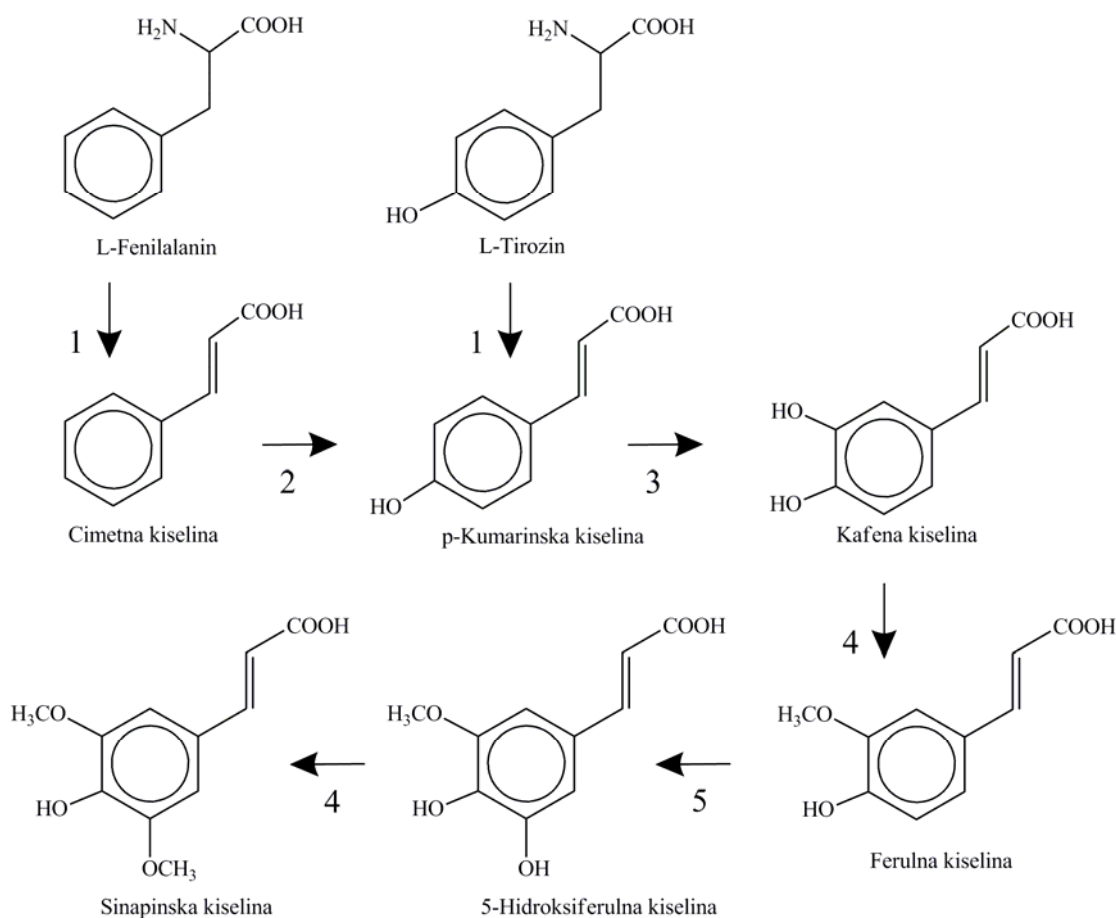
2.4.3. BIOSINTEZA FENOLNIH JEDINJENJA

Tri različita biosintetička puta (šikimski, acetatni i mevalonski put) vode ka biljnim fenolnim jedinjenjima, a šikimski i acetatni putevi su češći. Biosintetički putevi se ne mogu ispitivati u izolovanim uslovima, jer mnogi tipovi sekundarnih metabolita nastaju kombinacijom više načina. Derivati hidrosicimetne kiseline nastaju samo šikimskim putem, dok flavonoidi nastaju kombinacijom šikimskog i acetatnog puta (Waterman i Mole, 1994; Strack, 1997).

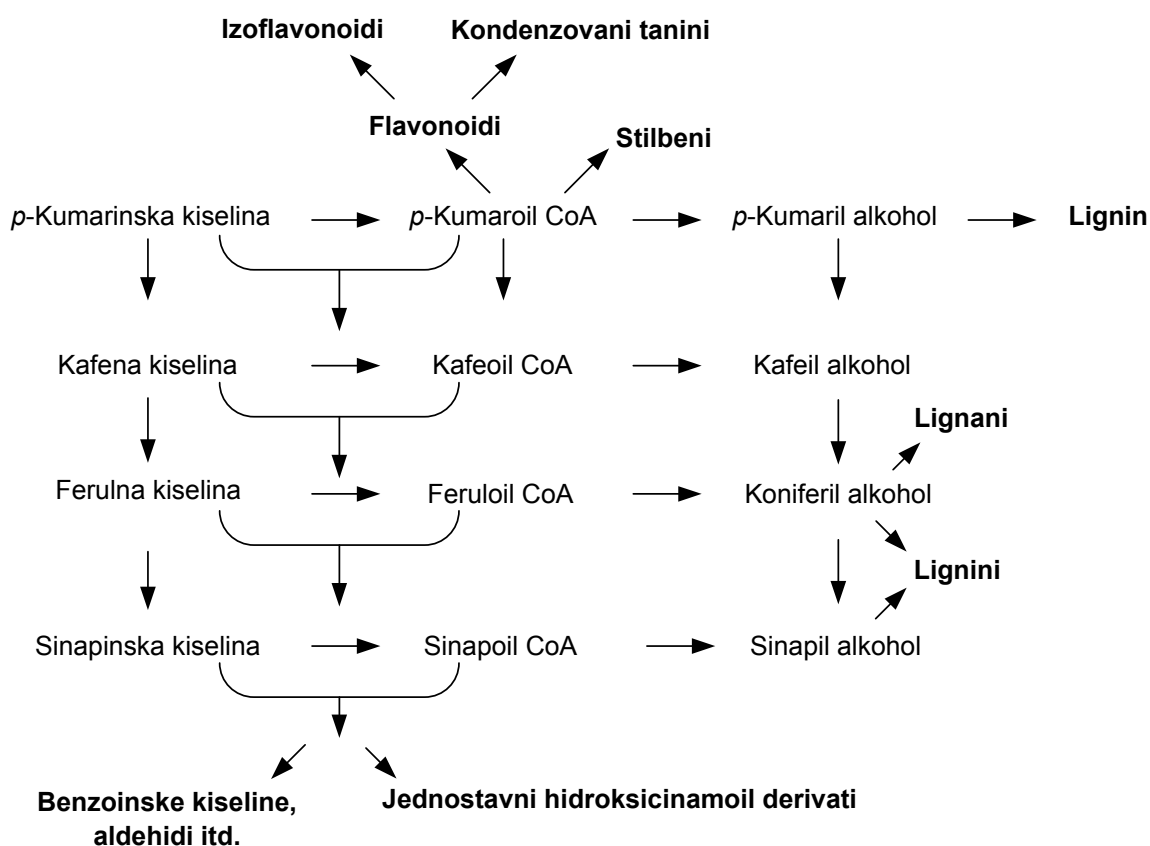
Kompleksnost biosintetičkog puta mnogih fenolnih jedinjenja, zajedno sa činjenicom da različita, ali blisko vezana jedinjenja mogu biti sintetisana u različitim tipovima ćelija i tokom različitih faza razvoja biljke, ukazuje da je akumuliranje fenolnih jedinjenja u biljkama kompleksno (Par i Bolwell, 2000).

Karakteristike skeleta ugljenika derivata hidroksicimetne kiseline poreklom je od aromatične aminokiseline L-fenilalanina. Fenilalanin amonijum-liaza (PAL) enzim katališe dezaminaciju fenilalanina u cimetnu kiselinu. Različiti enzimi su uključeni u kasnije reakcije hidroksilovanja i metilovanja, koji vode do različitih derivata hidroksicimetne kiseline (Slika 6). Kod nekih biljaka i gljiva, PAL može da deluje na tirozin, koji direktno proizvodi *p*-kumarinsku kiselinu (Gross, 1981; Waterman i Mole, 1994; Strack, 1997).

Formiranje derivata hidroksicimetne kiseline zahteva formiranje hidroksicinamat-CoAs katalisani hidroksicinamoil-CoA ligaza ili delovanjem hidroksicinamat O-glukozil-transferaze (Strack, 1997). Centralna pozicija derivata hidroksicimetne kiseline u biosintezi različitih fenolnih jedinjenja je prikazana na slici 6.



Slika 6. Formiranje derivata hidroksicimetne kiseline uzastopnim reakcijama hidroksilovanja i metilovanja. 1. fenilalanin amonijum-liaza, 2. cimet 4-hidroksilaza, 3. 4-kumarat 3-hidroksilaza, 4. kafeat/5-hidroksiferulat metiltransferaza, 5. ferulat 5-hidroksilaza (Gross, 1981; Strack, 1997)



Slika 7. Fenolna jedinjenja dobijena iz derivata hidroksicimetne kiseline

2.4.4. PRIMENA FENOLNIH JEDINJENJA

Zajedno sa ostalim sekundarnim komponentama biljaka, fenolna jedinjenja su od izuzetnog značaja za ljude (Strack, 1997). Fenolna jedinjenja (najčešće jednostavna fenolna jedinjenja i fenolne kiseline, derivati hidroksicimetne kiseline i flavonoidi) su svuda prisutna u biljnoj hrani i zbog toga se značajne količine nalaze u svakodnevnoj ishrani (Ho, 1992; Decker, 1995). Količina fenolnih jedinjenja u ljudskoj ishrani zavisi od različitih faktora uključujući uslove gajenja, zrelosti biljke i navikama u ishrani (Strube i sar., 1992; Clifford, 1999), pa je teško odrediti tačnu količinu koju čovek konzumira. Vinson i saradnici (1998) su se bavili ovim problemom i ispitivali 23 najčešće korišćenih vrsta povrća u Americi. Ustanovili su da je pasulj imao najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ali je bio najmanje korišćen po glavi stanovnika. Parr i Bolvell (2000) su utvrdili prisustvo fenolnih jedinjenja u nekim namirnicima: hlorogenska kiselina u kafi, ferulna kiselina u žitaricama, cvekli i monokotiledonom povrću, flavoni i flavonoli u luku i zelenom povrću, katehini i drugi flavan-3-oli u čaju i voću (jabuka, grožđe) i izoflavonoide u mahunarkama.

Fenolna jedinjenja utiču na kvalitet, prihvatljivost i stabilnost hrane, tako što deluju kao boje, arome i antioksidanti (Decker, 1995). Oni su i značajni parametri za organoleptičke (boja, ukus i aroma) i nutritivne karakteristike prehrambenih proizvoda biljnog porekla (Fleuriet i sar., 1996). Uticaj fenolnih jedinjenja na kvalitet prehrambenim proizvodima moraju se uzeti u obzir prilikom tehnoloških procesa njihove proizvodnje (Ho, 1992). Na primer, reakcije tamnjenja fenolnih jedinjenja katalisane polifenoloksidazama su od velikog značaja za preradu voća i povrća, zbog mogućnosti formiranja nepoželjnih komponentata, aroma i gubitka nutrijenata. Takođe, oksidativne promene fenolnih jedinjenja tokom tehnološke prerade su važne za razvoj željene boje i arome određenih namirnica, kao što su kakao i čaj.

Vekovima su laici i lekari koristili fenolna jedinjenja za lečenje različitih bolesti kao što su prehlada, diabetes mellitus, alergija, glavobolja, paradontoza, upale, infekcije virusom i rak (Havsteen, 1983). Fenolna jedinjenja, naročito flavonoidi, poseduju mnoge biološke aktivnosti, uključujući antioksidativnu, antialergijsku, antiinflamatornu, antikancerogenu, antibakterijsku, antiproliferativnu i vaskularnu (Hollman i sar., 1996; Harborne i Williams, 2000). Poslednjih decenija naglo je povećano interesovanje za istraživanjem fenolnih jedinjenja, jer oni pored svoje antioksidativne aktivnosti imaju i pozitivan uticaj na zdravlje čoveka (Croft, 1998).

Delovanje fenolnih jedinjenja zasniva se na njihovoj sposobnosti da: deluju kao „hvatači“ slobodnih radikala; daju elektrone; razgrađuju hidroperokside lipida koji su nastali u fazi propagacije; eliminišu dejstvo singletnih oblika kiseonika; inhibiraju neke enzime; pokazuju sinergetske efekte; redukuju neka jedinjenja (Halliwell, 1994).

Najvažnija dejstva fenolnih jedinjenja u humanom organizmu su: modulacija enzima koji učestvuju u detoksifikaciji; sprečavanje agregacije trombocita; promene u metabolizmu holesterola; kontrola koncentracije steroidnih hormona i endokrinog metabolizma; redukcija krvnog pritiska; antibakterijsko i antivirusno dejstvo.

Uprkos napretku određivanja *in vitro* antioksidativne aktivnosti fenolnih jedinjenja, urađen je mali broj *in vivo* istraživanja koja definišu njihovu absorpciju, bioraspoloživost i antioksidativnu aktivnost (Croft, 1998).

Uticaj nekog antioksidanta na zdravlje zavisi od toga koliko ga dobro organizam adsorbuje i koji su putevi njegovog metabolizma (Parr i Bolwell, 2000).

Začini su se do 1950-ih koristili za aromu i produžavanje trajanja namirnica, a potom kao antioksidanti (Pratt, 1992). U skorije vreme posebna pažnja posvećena je ekstrakciji antioksidanata iz jeftinih i sporednih proizvoda poljoprivredne industrije. Zamena sintetičkih antioksidanata prirodnim ima pozitivan uticaj na zdravlje i funkcionalnost, kao što je dobra rastvorljivost u vodi i ulju, i dobre karakteristike u postupku prženja (Fisher,

1992; Moure i sar., 2001). Ne postoji samo pozitivna uloga prirodnih antioksidanata. Neki odaju svoju boju, aromu ili imaju nepoželjne reakcije sa nutrijentima u proizvodu (Pratt, 1992). Količina aktivnog sastojka u antioksidativnom ekstraktu varira u zavisnosti od izvora i metode ekstrakcije, nekada i troškovi ekstrakcije mogu biti previsoki ili antioksidanti nestabilni (Pratt, 1992; Moure i sar., 2001). Takođe i prirodni antioksidanti moraju biti testirani na sigurnost. Važno je proučiti mogućnost prekidanja veza fenolnih antioksidanata, interakciju između sekundarnih proizvoda degradacije i samih antioksidanata (Kim i Pratt, 1992).

Treba naglasiti da kvalitet i kvantitet fenolnih jedinjenja u biljkama i prirodnim ekstraktima, pa i njihov efekat na hranu i zdravlje, zavisi ne samo od kvaliteta biljke (npr. genetske razlike i zrelost biljke), već i od uslova uzgoja i klimatskih uslova (fotoperiod, svetlost, vreme branja i skladištenje), kao i drugih klimatskih i tehnoloških faktora (rastvarač i temperatura) (Strube i sar., 1992; Parr i Bolwell, 2000; Moure i sar., 2001).

Derivati hidroksicimetne kiseline su važne komponente (fizičke, hemijske i biološke) ćelijskih zidova mnogih biljaka u hrani. Zbog toga su privukle mnogo pažnje kao komponente ljudske ishrane i u proizvodnji hrane. U poslednjih deset godina poraslo je interesovanje naučnika za ove kiseline (Kroon i Williamson, 1999).

Količina derivata hidroksicimetne kiseline u hrani i piću nije potpuno poznata i varira, kao i ishrana (Clifford, 1999). Na primer, procenjeno je da u Velikoj Britaniji stanovnici konzumiraju 25-1000 mg derivata hidroksicimetne kiseline dnevno u zavisnosti od unete količine kafe, mekinja i citrusa (Clifford, 1999).

Derivati hidroksicimetne kiseline se mogu koristiti u različitim oblastima prehrambene industrije. Tokom sazrevanja, prerade i skladištenja voća i povrća, ovi derivati mogu biti potencijalni prekursori različitih vinil fenola koji doprinose poželjnoj aromi prehrambenih proizvoda (Naim i sar., 1992).

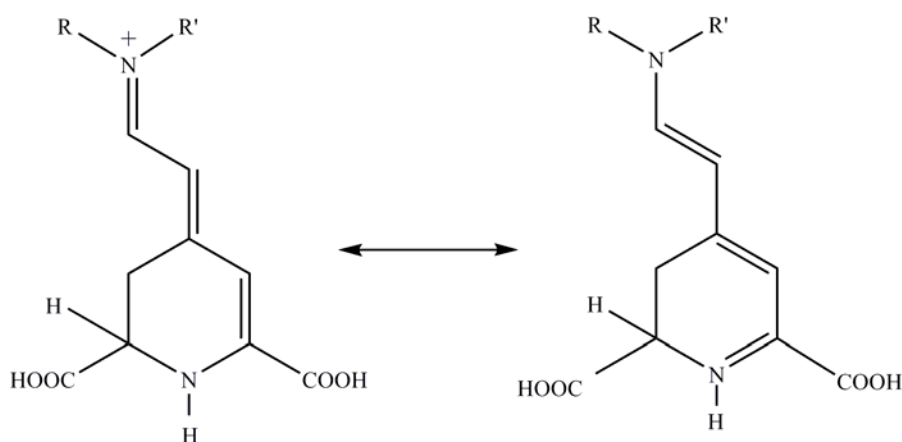
Flavonoidi su najšire istražena grupa fenolnih jedinjenja (Dillard i German, 2000). Voće i povrće je najčešći izvor flavonoida, ali, takođe ih ima i u pićima. Čaj, kafa, kakao, voćni sokovi, vino (naročito crveno vino) i pivo su važan izvor flavonoida i čine 25-30 % totalnog unosa flavonoida (Strube i sar., 1992). Podaci o biorasploživosti flavonoida kod ljudi su oskudni, ali postoje dokazi da se ove komponente absorbuju u značajnim količinama (Croft, 1998). Na primer, kvercetin može biti absorbovan i kao slobodan aglikon i kao glikozid i detektovan je i u krvi i u urinu (Croft, 1998).

In vitro antioksidativna aktivnost flavonoida je poznata decenijama (Harborne i Williams, 2000). Flavonoidi mogu da deluju kao antioksidanti na više načina, a najvažniji je kao hvatači slobodnih radikala (Croft, 1998). Primeri hidroksilacije i alkoksilacije A i B prstena flavonoida intenzivno variraju (slika 4) i od velike su važnosti za određivanje anti-

oksidativne aktivnosti flavonoida (Larson, 1997). Najznačajniji elementi za antioksidativno delovanje flavonoida su: broj hidroksilnih grupa u B prstenu, *o*-dihidroksilne grupe B prstena, 2,3-dvostruka veza piranskog prstena u konjugaciji sa keto-grupom na C₄-atomu (zbog delokalizacije), hidroksilne grupe na položajima C₃ i C₅ kao „hvatači“ slobodnih radikala, i njihova sposobnost stvaranja vodoničnih veza sa keto grupom.

2.5. BETALAINI

Betalaini su klasa azotnih, u vodi rastvornih, biljnih pigmenata, koji se mogu opisati kao protonovani 1,7-diazoheptametin sistem (slika 8) (Jackman i Smith, 1996). Betalaini predstavljaju azotne derivate betalaminske kiseline i obuhvataju dve strukturne grupe, u zavisnosti od strukture R-N-R': žute betaksantine (latinski *beta* cvekla i grčki *xanthos* žuto) i crveno-ljubičaste betacijane (*kyanos*, plava boja) (Delgrado-Vargas i sar., 2000).

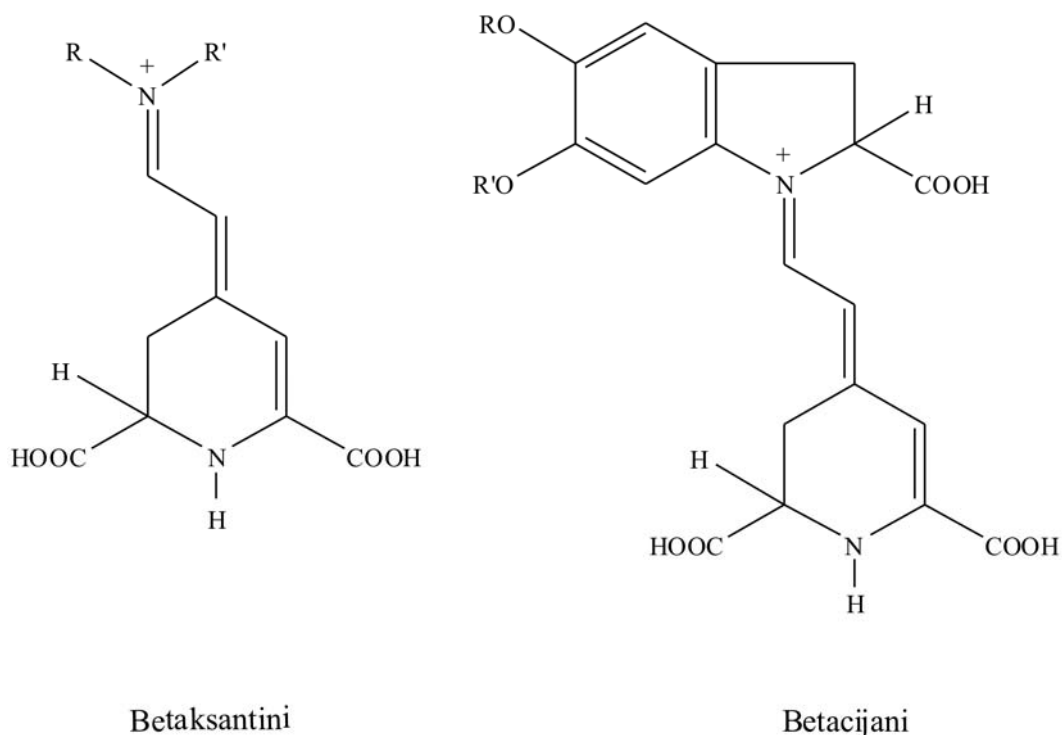


Slika 8. Transformacija strukture 1,7-diazoheptametin sistema betalain hromofora (Jackman i Smith, 1996)

Betaksantini imaju R i R' grupe koje ometaju konjugaciju 1,7-diazoheptametin sistema (slika 8) (Jackman i Smith, 1996). Oni se sastoje se od različitih proteinskih i neproteinskih aminokiselina, kao i biogenih amina i betalaminske kiseline. Više od 200 aminokiselina koje se nalaze u biljkama mogu formirati betaksantin strukture (Delgrado-Vargas i sar., 2000). R grupa betaksantina je najčešće vodonik, dok su R' supstituent mogu biti: tirozin, glicin, glutamin, glutaminska kiselina, metionin sulfoksid, aspartanska kiselina, dopamin, tiramin, L-DOPA, hidroksinorvalin, ibotenska kiselina, stizolobin i histidin (Jackman i Smith, 1996). Betaksantini imaju absorpcioni maksimum na oko 480 nm (Piattelli, 1981).

Ako konjugacija, gde su R i R' grupe 1,7-diazoheptametin sistema sadrži supstituisan aromatični prsten (ciklodopa), hromofor (1,7-diazoheptametin) je crven i karakterisan kao betacijan (slika 9) (Piattelli 1981; Jackman i Smith, 1996). Crveno-ljubičasti betacijani imaju absorpcioni maksimum na 540 nm (Piattelli, 1981). Svi betacijani su glikolizovani i dobijeni iz aglikona betanidina ili njegovog C₁₅ epimera izobetanidina (Jackman i Smith, 1996). Većina betacijana su 5-O-glukozidi, ali mogu biti i 6-O-glukozidi, kao što su

gomfremini (Heuer i sar., 1992). Šećeri koji su prisutni kod betacijana su monosaharidi, disaharidi i trisaharidi (Piattelli, 1981), a najčešći je glukoza (Jackman i Smith, 1996). Acilovanje betacijana jednom ili više vrsta neorganskih ili organskih kiselina (Piattelli, 1981) može se takođe javiti kada je acil grupa vezana preko estarske veze za šećer (Jackman i Smith, 1996). Najsloženije strukture betacijana poznate su kao poliacilovani poliglukozidi izolovani iz listova *Bougainvillea glabra*, kao i 6-O-tetraglukozidi betanidina acetilovanog sa 4-kumarinskom i kafenom kiselinom i njenim derivatima (Heuer i sar., 1994).



Slika 9. Opšte strukturne formule betaksantina i betacijana

2.5.1. PREDSTAVNICI BETALAINA I NJIHOVA RASPROSTRANJENOST

Termin betalaini (lat. *beta*, beet) usvojen je 1968. za žute i crvene N-heterociklične pigmente kaktusa i cvekle, koji su do tada greškom zvanii flavocijani (betaksantini, grčki: xanthos-žuto) i azotni antocijani (betacijani, grčki: kyaneous-plavo). 1963. i 1964. godine, betanin i indiksantin su bili prvi betacijanin i betaksantin čija je struktura određena iz cvekle (*Beta vulgaris* L.) i kaktusa (*Opuntia ficus indica* L. Mill).

Pedesetih godina betalaini su bili nađeni samo u crveno-ljubičasto, narandžasto i žuto-narandžasto obojenim biljnim delovima koje pripadaju bliskim predstavnicima familije *Caryophyllaceae* (nekada *Centrospermae*) (Stafford, 1994; Jackman i Smith, 1996). U ovoj grupi biljaka koje proizvode betalaine nalaze se predstavnici trinaest familija: *Achato-*

carpaceae, *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodaceae*, *Didie-reaceae*, *Halophytaceae*, *Hectorellaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae* (uključujući *Stegnospermaceae*) i *Portulacaceae* (Jackman i Smit, 1996). Za sada betacijani su nađeni samo u familiji *Phytolaccaceae*, dok sve druge vrste sadrže betaksantine (Stafford, 1994). Betalaini su nađeni i kod gljiva. Muskapurpurin i muskaaurin-I i -II, su tipični pigmenti nađeni u mesu pečuraka, *Amanita muscaria* i *Hygrocybe* spp. (Harborne i sar., 1999). Ovako često pojavljivanje betaksantina kod gljiva *Basidiomycete*, koje nemaju filogenetske veze sa biljkama iz reda *Caryophyllales*, objašnjava se kao primer hemijske konvergencije nastale pod evolutivnim uticajem (Piattelli, 1981). Takođe, Stenglich i Strack su 1990. godine opisali različite specifične familije kod kojih preovlađuju betalaini (npr. amarantin kod familije *Amaranthaceae*).

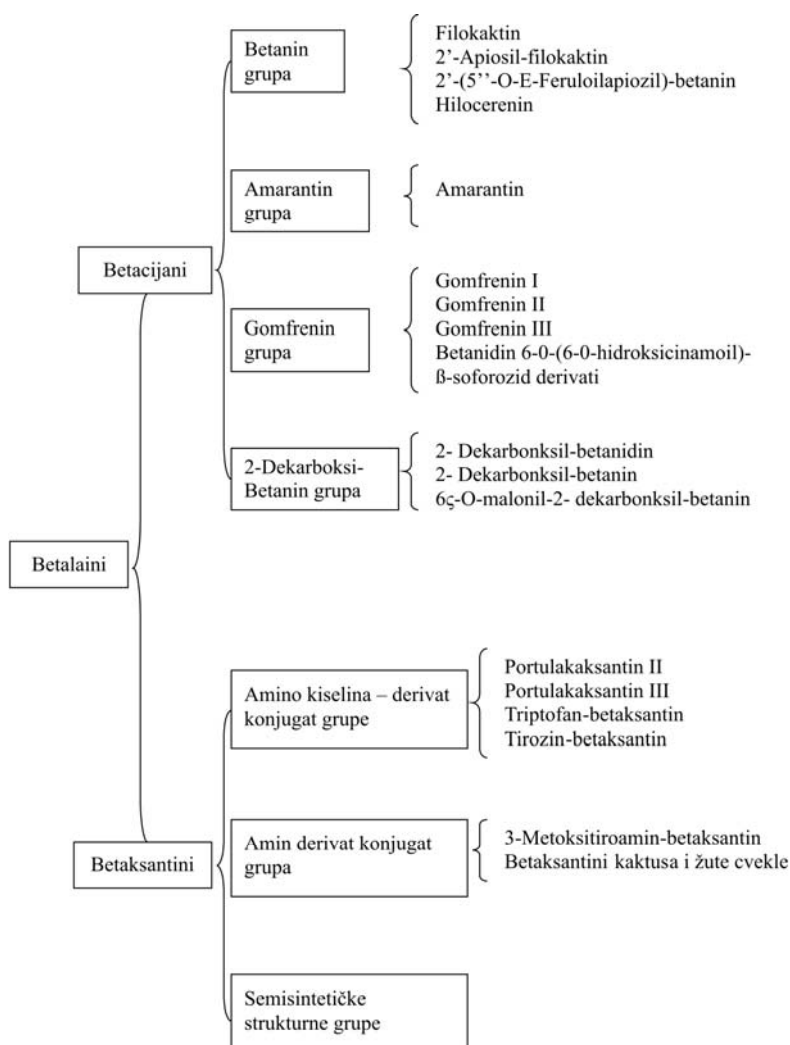
Betalaini se akumuliraju u vakuolama cveća, voća i lišća biljaka koje ih sintetišu, uglavnom u epidermalnom i subepidermalnom tkivu (Jackman i Smith, 1996). Prema istraživanjima Kobayashi i saradnika (2000) na delovima Božićnog kaktusa (*Christmas cactus*) nađen je veći sadržaj betacijana u tučku i prašnicima, nego u laticama. Betalaini se često akumuliraju u stablima biljaka (Mabry, 1980). Visok sadržaj betalaina u podzemom delu cvekle se pripisuje radu selekcionista tokom srednjeg veka ili može biti povezano sa skladištenjem ugljenih hidrata, kao posledica fiziološkog odgovora na prirodne stresne uslove (Delgrado-Vargas i sar., 2000). Betalaini su prisutni i u laticama, semenkama i plodovima voća i povrća u određenim fazama razvoja, a njihovo prisustvo u vegetativnim tkivima regulisano je uslovima životne sredine (Stafford, 1994).

Uloga betalaina kod biljaka nije tačno definisana. Betalaini prisutni u cveću ili plodovima voća, svojom bojom privlače oprašivače ili životinje da raznose seme (Piattelli, 1981). Oni takođe, štite biljke od oštećenja uzrokovanog truljenjem i bakterijskom infiltracijom, kao na primer kod *Beta vulgaris* (Sepulveda-Jimenez i sar., 2004) ili od UV zraka kao kod *Mesembryanthemum crystallinum* (Vogt i sar., 1999a). Međutim, njihovo prisustvo u drugim delovima biljaka, kao što je lišće, drška ili koren nema određenu funkciju (Piattelli, 1981). Oštećenje biljaka iz reda *Caryophyllales* može da uzrokuje akumuliranje betalaina u tkivu u kome inače nema ovih pigmentata, ukazujući da ove komponente imaju i zaštitnu ulogu od virusnih infekcija (Mabry, 1980). Takođe, ukazano je i na ulogu betalaina kao fotoreceptora i filtera (Stafford, 1994).

Iako su odgovorni za atraktivnu boju cveća, voća i ponekad vegetativnog tkiva, betalaini, za razliku od antocijana, su prisutni samo u 13 familija iz reda *Caryophyllales* i kod nekih viših gljiva (*Amanita muscaria*) (Steglich i Strack, 1990; Strack i sar., 2003; Grotewold, 2006; Moreno i sar., 2008).

Zanimljivo je da betalaini i antocijani nikada nisu nađeni u istoj biljci (Mabry i Dreiding, 1968; Kimler i sar., 1970; Clement i Mabry, 1996; Lee i Collins, 2001; Strack i sar., 2003; Stintzing i Carle, 2004a; Cai i sar., 2005; Grotewold, 2006; Moreno i sar., 2008), a razlog tome je i dalje nepoznat.

Betacijani su podeljeni u četiri podgrupe, a betaksantini u tri (Strack i sar., 2003) (slika 10). Svaka podgrupa sadrži nekoliko predstavnika, osim amarantin podgrupe beta-cijana u koju spada samo amarantin.



Slika 10. Osnovni predstavnici betalaina

Vogt (1999) je izneo dokaz da su se betalaini pojavili posle antocijana na skali evolucije. Ove činjenice ukazuju na to da antocijani i betalaini zamenjuju jedni druge u određenim funkcijama u biljnom tkivu kao što su polarno privlačenje, antioksidativni potencijal i zaštita od ultravioletne (UV) svetlosti. Obe klase pigmenata tokom biosinteze imaju put šikimske kiseline, vodeći do tirozina (betalaini) ili fenilalanina (antocijani).

Tabela 4. Biljne vrste reda Caryophyllales^a koje proizvode betalaine

Familija	Vrsta	Narodni naziv	Betalaini	Reference
Achatocarpaceae				Clement i Mabry (1996)
Aizoaceae	Lampranthus Productus		Dopaksantin Betanidin	Kluger i sar. (2004); Gandia-Herrero i sar. (2005b), (2007);
	Mesembryanthemum crystallinum		Betacijani i mesebriantin	Vogt i sar. (1999b)
Basellaceae				Clement i Mabry (1996)
Cactaceae	Hylocereus polyrhizus	Crvena pitaja (Dragon fruit)	Betacijani (10 različitih)	Kluger i sar. (2006), Stintzing i sar. (2002a), (2002b), Wybraniec i sar. (2001)
	H. purpusii, H. costaricensis, H. Undatus, H. Sp.(hybrids)		Betacijani hilocerenin, izohilocerenin, malo apiofuranozil betacijana	Wybraniec i Mizrahi (2002), Wybraniec i sar. (2007)
	Opuntia ficus-indica	Kaktus, opuncija		
	Schlumbergera x buckleyi	Božični kaktus	Filokaktin, apiofuranozil betacijani, diacilovani betacijani	Kobayashi i sar. (2000)
	Myrtillocactus geometrizans, M. cochal		Betaksantin	Reynoso i sar. (1997), Barrera i sar. (1998)
	Selenicereus megalanthus	Žuta pitaja	Betaksantini	Kluger i sar. (2006)
Amaranthaceae	Amaranthus spinosus	Bodljikavi štir	Amarantin, izoamarantin	Stintzing i sar. (2004b)
	Gomphrena globosa		Betaksantini i nekoliko betacijana	Kluger i sar. (2007)
	Celosia argentea (var. plumosa i var. cristata)	Petlova kresta	Amarantin i betalaminska kiselina, betacijani dopamina	Schliemann i sar. (2001)
Chenopodiaceae	Beta vulgaris	Cvekla	Vulgaksantin (I, II), indiksantin, betanin, prebetanin, izobetanin, neobetanin, betalaminska kiselina	Kujala i sar. (2001), (2002)
	Swiss chard	Švajcarska blitva	Betaksantini (20), Betacijani (9)	Kluger i sar. (2004)
	Suaeda salsa	Slanjača	Betacijani	Wang i sar. (2007)
Didiereaceae				Clement i Mabry (1996)
Halophytaceae				
Hectorellaceae				
Phytolaccaceae				Clement i Mabry (1996)
Nyctaginaceae	Boerhavia erecta	Berhavija	Betanin, izobetanin, neobetanin	Stintzing i sar., 2004b
	Bougainvillea sp.	Bogunvilija	Betaksantini i nekoliko betacijana	Kluger i sar. (2007)
Portulacaceae	Portulaca grandiflora	Rezančić, prkos	Dopaksantin, Vulgaksantin I, Portulakaksantin II, Miraksantin V, Indikaksantin	Gandia-Herrero i sar. (2005b)
Stenospermaceae				

^a Chenopodiinae, proizvode betalaine; Caryophyllinae, proizvode antocijane, uključujući Caryophyllaceae i Molluginaceae (Clement i Mabry, 1996)

Boja antocijana je od narandžaste (pelargonidin), crvene (cijanidin) do plave (delfinidin), a betalaini se mogu podeliti u žuto-narandžaste (betaksantini) i crveno-ljubičaste strukture (betacijani). Takođe, biljke koje sadrže betalaine mogu sadržati i leu-

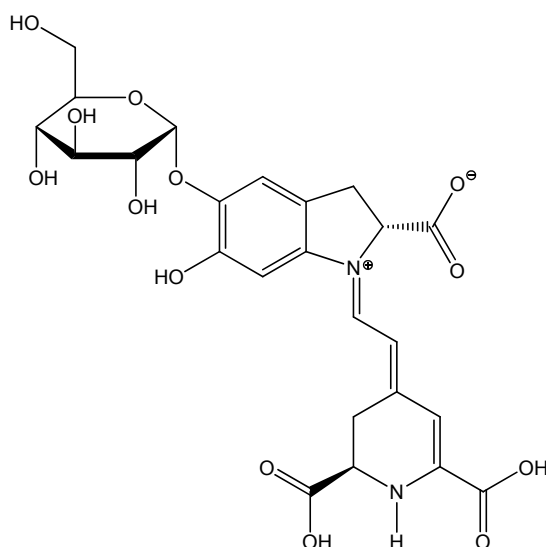
koantocijane i proantocijane, ali uz nedostatak enzimske mogućnosti da generišu 3-hidroksi-antocijane.



Slika 11. Biljke koje sadrže betalaine. A - *Amanita muscaria*, B - *Phytolacca americana*, C - *Optunia ficus-indica*, D - *Sueda salsa*, E - *Beta vulgaris*, F - *Portulacca grandiflora*

Prema Nilsson (1970) i Piattelli (1976) najpoznatiji pigment iz grupe betacijana je betanin, pigment izolovan iz cvekle (*Beta vulgaris* var. *cicla*) davne 1918. godine. Danas se koristi kao prirodna crvena boja za hranu (E162) odobrena od Evropske Unije.

Betanin (2,6-piridinedikarboksilna kiselina, $C_{24}H_{27}N_2O_{13}$) je derivat betalaminske kiseline. Aglikonski deo betanina čini piridinski betanidin, na koji je vezan glikon-šećer glu-koza (betanidin-5-O-glukozid). Molekulska masa mu iznosi 551,48 g/mol.



Slika 12. Molekul betanina

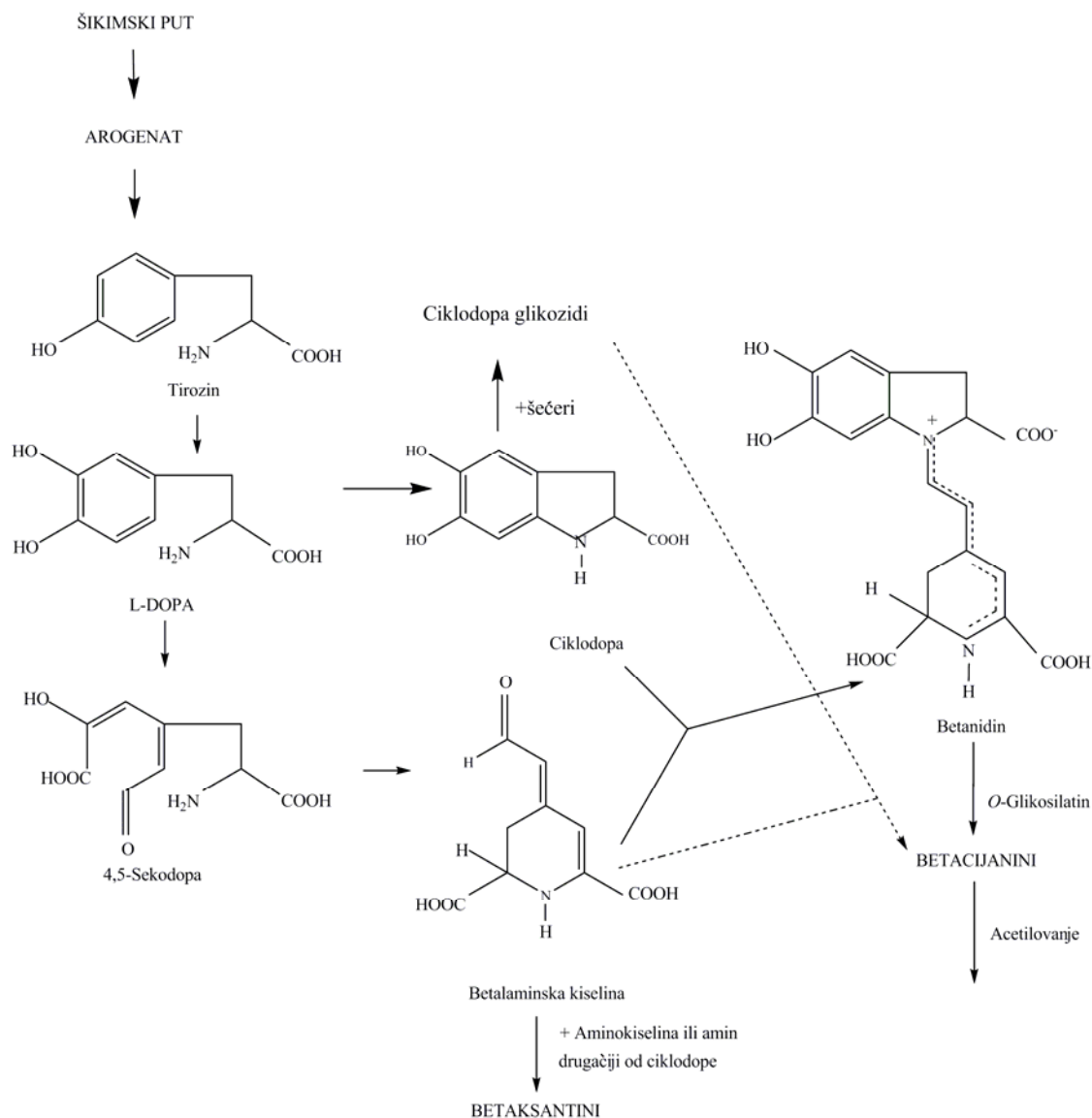
2.5.2. BIOSINTEZA BETALAINA

Na slici 13 prikazan je predloženi biogenetski put sinteze betalaina (Stenglich i Strack, 1990; Jackman i Smith, 1996; Hempel i Böhm, 1997; Delgado-Vargas i sar., 2000). Biosinteza betalaina počinje od arogenat šikimskog puta. Enzim arogenat dehidrogenaze konvertuje arogenate u tirozin (Jensen, 1986), koji se dalje transformiše u 3-hidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA). Utvrđeno je da je formiranje L-DOPA katalizovano enzimom tirozinazom (Mueller i sar., 1996; Steiner i sar., 1999). Tirozinaza (ili polifenol oksidaza, PPO) je bifunkcionalni enzim koji spada u red enzima koje sadrže bakrov jon. Katalizuje hidroksilaciju fenola u *o*-difenole (EC 1.14.18.1, monofenol: monooksigenaza), te u sledećem koraku, oksidaciju difenola u odgovarajuće *o*-hinone (EC 1.10.3.1, *o*-difenol: kiseonik oksidoreduktaza) (Kaim i Rall, 1996; Strack i sar., 2003).

Osnovna reakcija formiranja betalaina je konverzija L-DOPA putem 4,5-ekstradiol oksidativnog cepanja i reciklizacije u betalaminsku kiselinu (Terradas i Wyler, 1991). Kod gljiva L-DOPA prolazi kroz 2,3-ekstradiol cepanje i formira muskaflavin (Steglich i Starch, 1990). Konverzija L-DOPA u betalaminsku kiselinu je katalizovano DOPA dioksigenazom. Girod i Zrijd (1991) su izolovali DOPA 4,5-dioksigenazu iz gljive *Amanita muscaria* kao prvi enzim uključen u biosintezu betalaina. Uprkos mnogobrojnim eksperimentima, ovaj enzim nije detektovan kod ćelija koje proizvode betaksantine (Hempel i Böhm, 1997). Objavljeno je da su enzimi uključeni u biosintezu betalaina kod gljiva i biljaka različite strukture i reaktivnosti i najverovatnije ne dele zajedničko evolutivno poreklo (Mueller i sar., 1997a; Mueller i sar., 1997b).

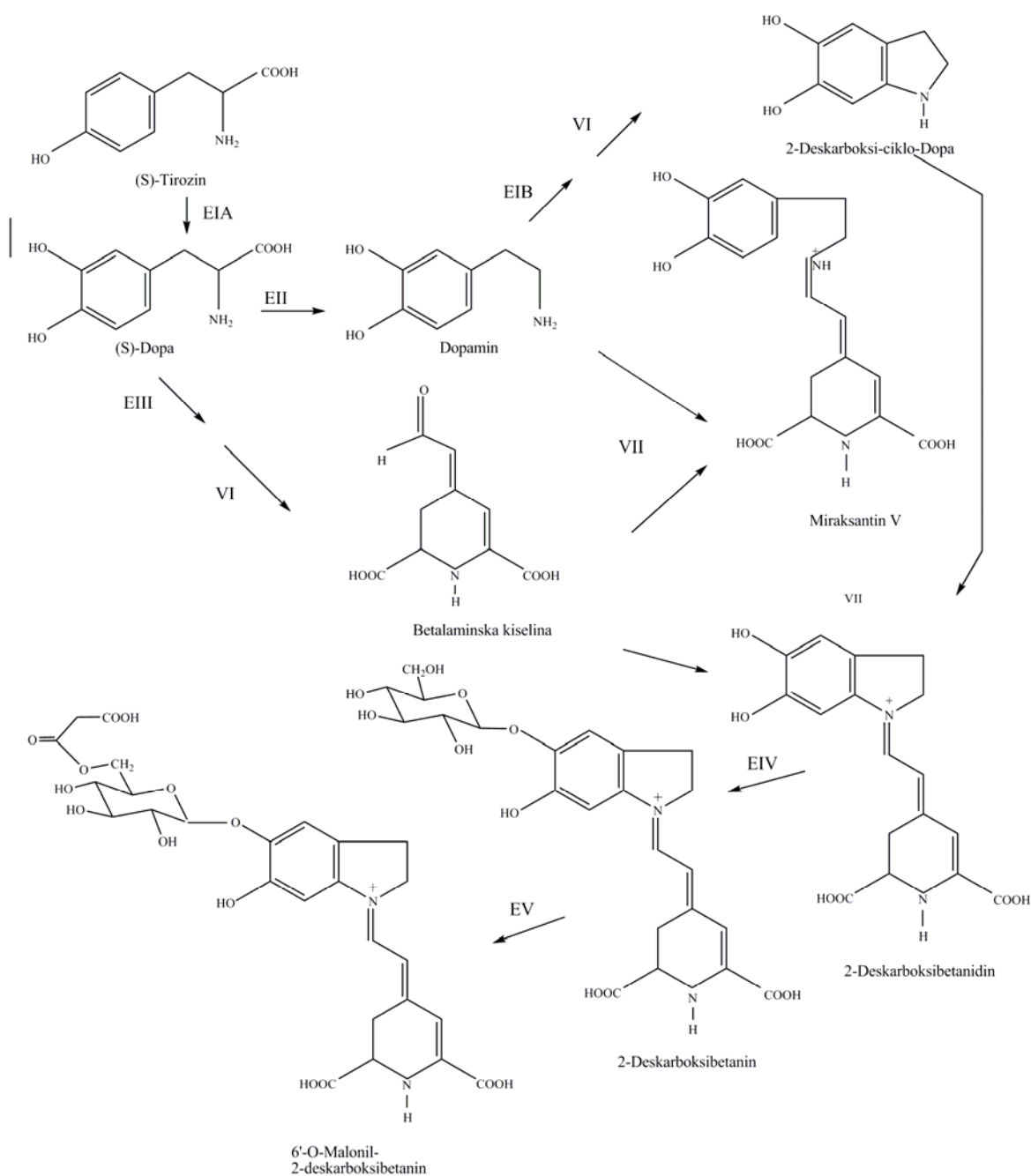
Presudan korak u sintezi betalaina, veza betalaminske kiseline sa ciklo-DOPA/ ciklo-DOPA glikozidom ili aminokiselinom/aminom, je utvrđeno da je spontan i neenzimatski proces (Hempel i Böhm, 1997; Schliemann i sar., 1999). Betalaminska kiselina kao prekursor betalaina se akumulira kao prirodni konstituent samo u biljkama koje proizvode betaksantine (Steglich i Starck, 1990).

Budući da kondenzacija betalaminske kiseline sa ciklo-DOPA ili njegovim derivatima vodi ka betacijanima, formiranje ciklo-DOPA je esencijalno za biosintezu betacijana: L-DOPA se prvo transformiše u DOPA-hinon, koji spontano prelazi u ciklodopa. Ista specifična tirozinaza koja katališe formiranje L-DOPA, takođe, katališe formiranje ciklo-DOPA (Steiner i sar., 1999). Glikolizacija betacijanidina se može javiti kasnije tokom biosintetičkog puta, pomoću uridin-5-fosfata vezanog za šećer, praćeno nukleozid-difosfat-šećer-zavisnom glukozil transferazom (Jackman i Smith, 1996). Na drugi način, glikolizacija se javlja na ciklo-DOPA pre kondenzacije sa betalaminskom kiselinom (Wyler i sar., 1984). Iako putevi mogu varirati, čini se da se glikolizacija odvija sa ciklo-DOPA (Steglich i Strack, 1990).



Slika 13. Predloženi biosintetički put betalaina (Steglich i Strack, 1990; Jackman i Smith, 1996; Hempel i Bohm, 1997; Delgado-Vargas i sar., 2000)

Do skoro, jedini izuzetak ciklo-DOPA-derivatima betacijana je bio dopamin-derivat-2-dekarboksibetanin. Piattelli i Impelizeri (1970) originalno su izolovali i identifikovali ove komponente iz cveta *Carpobrotus acinaciformis*. Nedavno su, takođe, identifikovane i u korenu žute cvekle i u žutim cvetovima *Celosia cristata* (Schliemann i sar., 2001). Derivat 2-dekarboksibetanina, 6'-O-malonil, je takođe, identifikovan u korenu žute cvekle (Kobayaschi i sar., 2001). Kobayaschi i saradnici su 2001. godine nakon eksperimenata na sadnicama stočne repe objavili da je odlučujući korak reakcija kondenzacija između 2-dekarboksi-ciklo-DOPA i betalaminske kiseline, praćen glikolizacijom i acilovanjem. Bazirano na ovome, biosintetički put za betalain derivate dopamina je prikazan na slici 14.



Slika 14. Predloženi biosintetički put do betalain derivata dopamina *Beta vulgaris*. Koraci katalisani enzimima: EIA, hidrosilovana aktivnost tirozina; EIB, oksidativna aktivnost tirozinaze; EII, Dopa dekarboksilaza; EIII, Dopa 4,5-dioksigenaza; EIV, glukoziltransferaza; EV, maloniltransferaza. Spontane reakcije: VI, reakcija ciklizacije; VII, reakcija kondenzacije (formiranje aldimina) (Kobayashi i sar., 2001)

Sinteza betalaina zavisi od mnogobrojnih spoljnih faktora, kao što su svetlost, temperatura, regulatori rasta biljke i nutrienti (Leathers i sar., 1992; Jackman i Smith, 1996; Delgado-Vargas i sar., 2000). Uticaj svetlosti na biosintezu betalaina zavisi od

vrste, dok je svetlost neophodna za sintezu betalaina kod nekih biljaka (*Amaranthus* i *Phytolacca*), dok za neke nije (*Beta vulgaris*) (Jackman i Smith, 1996). Vogt i saradnici (1999) su izveli pozitivnu korelaciju između intenziteta svetlosti i formiranja betacijana u epidermalnim ćelijama necvetajućih mladih biljaka (6 - 10 nedelja starih) *Mesebryanthemum crystallinum*.

2.5.3. ULOGA I BIORASPOLOŽIVOST BETALAINA U HUMANOM ORGANIZMU

Betalaini kao prehrambeni aditivi, iz prirodnih izvora, ne samo da poboljšavaju izgled proizvoda, nego i pozitivno utiču na zdravlje potrošača. Objavljeno je da su betalaini klasa jedinjenja sa antioksidativnim i antiradikalnim karakteristikama (Escribano i sar., 1998; Pedreno i Escribano, 2000; Kanner i sar., 2001). Escribano i saradnici su 1998. godine prvi objavili naučne rezultate iz ove oblasti. Njihova istraživanja su pokazala da glavni pigmenti cvekle pokazuju antiradikalnu aktivnost na ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) slobodne radikale. Antiradikalna aktivnost betacijana je bila veća od betaksantina i povećavala se porastom pH. Međutim, Zakharova i Petrova (1998) su, tokom istraživanja antioksidativne aktivnosti devet betalaina u model sistemu lipidne peroksidacije, utvrdili da betaksantini imaju veću antioksidativnu aktivnost.

Betalaini mogu da spreče oksidativne procese, doprinesu sprečavanju nekoliko degenerativnih bolesti i štite od nekih poremećaja kod ljudi, izazvanih oksidativnim stresom (Kanner i sar., 2001; Tesoriere i sar., 2004a; Sembries i sar., 2006). Betalaini izolovani iz biljaka *Amaranthus spinosus* L. i *Boerhaavia erecta* L. imaju antimalarijsku aktivnost (Hilou i sar., 2006).

Takođe, veoma male koncentracije betanina iz grupe betacijana dovele su do smanjenja tumora kože i jetre kod miševa (Kapadia i sar., 2003). Treba dodati i da je koncentracija ovih komponenata u plazmi nakon varenja dovoljna da izazove njihovo ugrađivanje u LDL i crvena krvna zrnca, koja su potom zaštićena od oksidativnih oštećenja i hemolize kod ljudi (Tesoriere i sar., 2003).

Najvažniji predstavnik betacijana, betanin, ima visok antioksidativni potencijal (Zakharova i Petrova, 1998; Kanner i sar., 2001; Gentile i sar., 2004; Sreekanth i sar., 2007), antiviralna, te antimikrobna svojstva (Strack i sar., 2003). Naučni radovi su pokazali kako obogaćenje ljudskih lipoproteina betaninom povećava rezistentnost ka štetnim oksidacijama ćelijskih membrana (Tesoriere i sar., 2003). Betanin, takođe, pomaže u hemo prevenciji plućnog i kožnog raka (Kapadia i sar., 1996), te je pokazano da inhibira proliferaciju ljudskih tumorskih ćelija u već razvijenim tumorima (Muntha-Reddy i sar., 2005). Nedavna istraživanja pokazala su da betanin izolovan iz vrste *Optunia ficus-indica* uzro-

kuje apoptozu ćelija ljudske hronične mijeloidne leukemije, linije K562 (Sreekanth i sar., 2007). Takodje, štiti organizam od degenerativnih bolesti i bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom (Kanner i sar., 2001; Tesoriere i sar., 2004; Sembries i sar., 2006).

Bioraspoloživost je količina unete komponente koja se absorbovala u organizmu. Brojna *in vitro* i *ex vivo* istraživanja ukazuju da prečišćeni betakasantini i betacijani poseduju antioksidativnu aktivnost u biološkom okruženju, a imaju i antiproliferativni efekat na linije ćelija raka ljudi.

Studije o bioraspoloživosti betalaina u humanom organizmu ukazuju na visoku bioiskoristivost indiksantina i betanina kaktusa i betanina prisutnog u cvekli (Tesorier i sar., 2008). Istraživanja antioksidativnog potencijala varenja hrane bogate betalainima su pokazale da konzumiranje kaktusa kao deo redovne ishrane može obezbediti zaštitu protiv oksidativnog stresa (Tesorier i sar., 2004b). Stepem degradacije betalaina iz kaktusa je bio 24 - 29% u stomaku, 20 - 26% u tankom crevu i 26 - 29% u debelom crevu (Reynoso i sar., 1999). Betacijani su se ispoljili kao veoma snažni antioksidanti u različitim model sistemima i njihov zaštitni efekat naročito je evidentan tokom oksidacije lipida u biološkim membranama (Kanner i sar., 2001). Literaturni podaci ukazuju na nizak nivo absorpcije betalaina i kritične koncentracije bioaktivnosti ovih komponenti u ljudskoj plazmi. Toksikološke studije ukazuju da betanin, glavna komponenta cvekle, ne pokazuje alergijski potencijal (Pourrat i sar., 1987), mutageni ili hepatokancerogeni efekat (Schwartz i sar., 1983; Von Elbe i Schwartz, 1981). Visok nivo folne kiseline je značajna nutritivna karakteristika cvekle (Wang i Goldman, 1997).

Sprovedena je velika studija o stepenu bubrežne eliminacije betalaina nakon konzumiranja soka cvekle. Urin je prikupljan od ispitanika u intervalima od po 24 časa posle konzumiranja soka cvekle. Rezultati su ukazivali ili da je bioraspoloživost betalaina niska ili da je bubrežno čišćenje sporedni put sistematske eliminacije ovih komponenti. Urinarno izlučivanja nemetabolisanih betalaina je bilo brzo i monoeksponecijalno. Za postizanje kompletnije slike o farmakokinetici i zdravstvenoj ulozi hrane od cvekle, ispitivanje bioraspoloživost betalaina uključila su i merenje metabolita u plazmi, urinu i žuči, kao i nepromenjenih komponenti (Frank i sar., 2005).

Urađena su istraživanja uticaja absorbovanih betalaina na crvena krvna zrnca ljudi nakon unosa kaktusa. Rezultati ukazuju da se betalaini ugrađuju u crvena krvna zrnca i da ove fitohemikalije pružaju antioksidativnu zaštitu ljudskoj ćeliji. Takođe, nakon unosa kaktusa, betanin i indiksantin pokazuju bioraspoloživost u ljudskom organizmu, povezuju se sa holesterolom male gustine (LDL) i snižavaju nivo plazma markera oksidativnog stresa (Tesoriere, 2005). Antikancerogena svojstva betalaina su povezana sa betacijanima (Pátkai i sar., 1997) i postoje nastojanja za korišćenje ekstrakata cvekle za hemoprevenciju raka pluća i kože (Kapadia i sar., 1996).

2.5.4. PRIMENA BETALAINA U FUNKCIJI BILJNIH PIGMENATA

Upotreba betalaina kao prehrambene boje datira još iz 19-og veka, kada je sok bobica koje sadrže betanin, bio dodavan u vino, da bi se postigla željena crvena boja (Jackman i Smith, 1996). Betalaini, najčešće iz cvekle, predstavljaju sigurnu prirodnu alternativu za neke sintetičke boje, koje se trenutno koriste. Naučne studije sprovedene na glodarima, su pokazale bezbedni efekat crvene boje cvekle (Francis, 1996). Intenzitet crvene boje betalaina cvekle omogućava upotrebu minimalne količine boje u hrani. Količina boje cvekle konzumirana kao prehrambeni aditiv je mala u poređenju sa količinom koja se konzumira kao konstituent povrća (Henry, 1996).

Danas, crvena boja cvekle predstavlja glavni komercijalni izvor betalaina. Crvena boja cvekle (poznata kao E162, cvekla crvena ili betanin) je široko prihvaćena kao sastojak hrane (Henry, 1996; Delgrado-Vargas i sar., 2000). Pigmenti cvekle koji se koriste kao prehrambeni aditivi pripremaju se u vidu koncentrata soka ili u obliku praškastih proizvoda. Sveža cvekla se prerađuje u sok primenom difuzionih tehnika ili presovanjem, a dobijeni sok se zatim centrifugira, pasterizuje i koncentriše. Procesom liofilizacije ili raspršivanjem sok se prevodi u praškasti proizvod (Henry, 1996; Delgrado-Vargas i sar., 2000). Komercijalna boja cvekle obično sadrži 0,4 - 1,0% pigmenta (izraženog na betanin), 80% šećera, 8% pepela i 10% proteina (Jackman i Smith, 1996). Kvalitet crvene boje cvekle je regulisan zakonom. EU je 1995. godine predložila da komercijalna boja cvekle, bilo u tečnom ili u praškastom stanju, minimalno treba da sadrži 0,4% betanina (Henry, 1996).

Tokom 70-ih i 80-ih godina prošlog veka, pigmenti cvekle su bili primarno izučavani sa ciljem odabira što kvalitetnije sirovine za njihovu izolaciju, kao i procenjivanja njihovog uticaja na kvalitet finalnog proizvoda. Sapers i Hornstein (1979) analizirali su 48 kultura cvekle i ustanovili veliku razliku u procentualnom sadržaju pigmenata, kao i u proporciji odnosa betacijana i betaksantina. Prosečan sadržaj pigmenata cvekle iznosio je 130mg/100g svežeg materijala. Delgrado-Vargas i saradnici (2000) kultivisali su nove genotipove cvekle sa sadržajem pigmenata 450 do 500 mg/100g svežeg materijala. Genotipovi cvekle koje se koriste za komercijalno pripremanje pigmenata pokazuju raznolikost boja, u zavisnosti od odnosa crvenih i žutih pigmenata, a njihovi ekstrakti imaju miris i aromu cvekle (Jackman i Smith, 1996).

Stabilnost ovog pigmenta zavisi od količine šećera, svetla i kiseonika, od pH vrednosti okoline u kojoj se nalazi, te od temperature i aktivnosti vode (Girod i Zryd, 1987; Delgado-Vargas i sar., 2000; Nayak i sar., 2006). Zbog razgradnje pod uticajem svetlosti, toplote i kiseonika, koristi se u smrznutim proizvodima, proizvodima kratkog veka trajanja

ili suvim proizvodima. Ukoliko proizvod sadrži veliku količinu šećera, betanin se ne razgrađuje tokom procesa pasterizacije. Betanin je osetljiv na proces oksidacije u prisustvu vode i metalnih jona (cink i bakar), stoga je u proizvode koji ga sadrže potrebno dodavati antioksidativna sredstva poput askorbinske kiseline ili sekvestranta. Zavisno od pH vrednosti sredine betanin ima različite boje. Pri kiselim vrednostima pH betanin je crveno-ljubičaste boje. Pri porastu vrednosti pH betanin poprima plavo-ljubičastu boju. Visoka tačka topljenja betanina u vodenim rastvorima čine ovaj pigment stabilnim tokom tehnoloških procesa obrade hrane u prehrambenoj industriji.

Lišće biljaka iz familije *Amaranthaceae* se koristi za prehrambene boje u Boliviji, u severozapadnoj Argentini za alkoholna pića, u Meksiku i severozapadnoj Americi kao boja za kukruznu kašu, u Ekvadoru za različite vrste hrane (Guzmán-Maldonado i Paredes-López, 1998; Teutonico i Knorr, 1985). U Kini, ovo lišće se zvanično koristi za proizvodnju prirodne boje (Cai i sar., 1998). U Kini je 1996. godine proučavano 388 genotipova 37 vrsta iz 8 rodova (Cai i sar., 2005). Uzgajane vrste pokazuju veći sadržaj boje od divljih vrsta (46 do 199 mg/100g svežeg biljnog materijala) (Cai i sar., 2001a; Cai i sar., 1998). Biljke iz familije *Amaranthaceae* su predložene kao novi izvor boje zbog veće sposobnosti adaptacije u odnosu na cveklu. Ali, količina saponina od 0,1% po suvom ostatku i 6 mg/g svežeg materijala ukazuje na neophodnost pažljive njihove primene u prehrambenoj industriji (Guzmán-Maldonado i Paredes-López, 1998; Oleszek sar., 1999; Schlie-mann i sar., 2001).

Od 1998. godine, proizvodnja boje betalaina je fokusirana na boju kaktusa (*Opuntia sp.*), jer cvekla ima uzak opseg boje (Stintzing i sar., 1999; Stintzing i sar., 2001; Stintzing i sar., 2003). Hromatografske karakteristike *Opuntia ficus-indica* cv. „Rossa“ mogu se porediti sa crvenom bojom cvekle (Stintzing i sar., 2003).

O. ficus-indica cv. „Gialla“ je korišćena za proizvodnju žuto-narandžastog liofilizovanog praha i koncentrata za bojenje. Ustanovljena je proizvodnja crveno-ljubičaste kaktus boje, dok je tamno crveni koncentrat *Opuntia stricta* u nivou sa košinel, cveklom i ekstraktima antocijana. Sadašnji prinos pigmenata je 15 do 80 mg/100 g voća, a novi hibridi obećavaju prinos od 100 mg/100 g voća (Stintzing i sar., 2003; Castellar i sar., 2003). U budućnosti će boje kaktusa, ljubičasta, crvena i žuto-narandžasta imati veću primenu.

Povećan je trend korišćenja biljaka za dobijanje pigmenata koji se koriste u prehrambenoj industriji. Do sada se kao jedini izvor betanina koristila cvekla. Količina betanina u cvekli može doseći 300 - 600 mg/kg cvekle, ali količina može varirati. Za potrebe sve više rastuće prehrambene industrije treba optimizirati proizvodnju betanina u smislu brzine rasta biljke-izvora, te pojeftinjenja ekstrakcije betanina. Jedan od načina je uspostavljanje kultura transformiranih ćelija (tumorskih ćelija) *in vitro* koje bi dodatkom

biotskih ili abiotskih faktora, te određenih hemijskih dodataka proizvodile veću količinu betanina nego što se dobija iz cvekle. Na taj način izbegli bi se dosadašnji problemi u proizvodnji betanina. Kao prvo, cvekla kao poljoprivredna i prehrambena kultura zahteva mnogo rada oko uzgajanja, a samim time proizvodnja postaje skuplja. Drugo, poljoprivredni uzgoj cvekle uveliko zavisi od klimatskih promena, što znači da postoje velike fluktuacije u prinosu. Na kraju, kao i sve poljoprivredne kulture, cvekla je podložna raznim oblicima biljnih bolesti uzrokovanim bakterijama ili virusima, a često su i meta raznih kukaca i drugih štetočina.

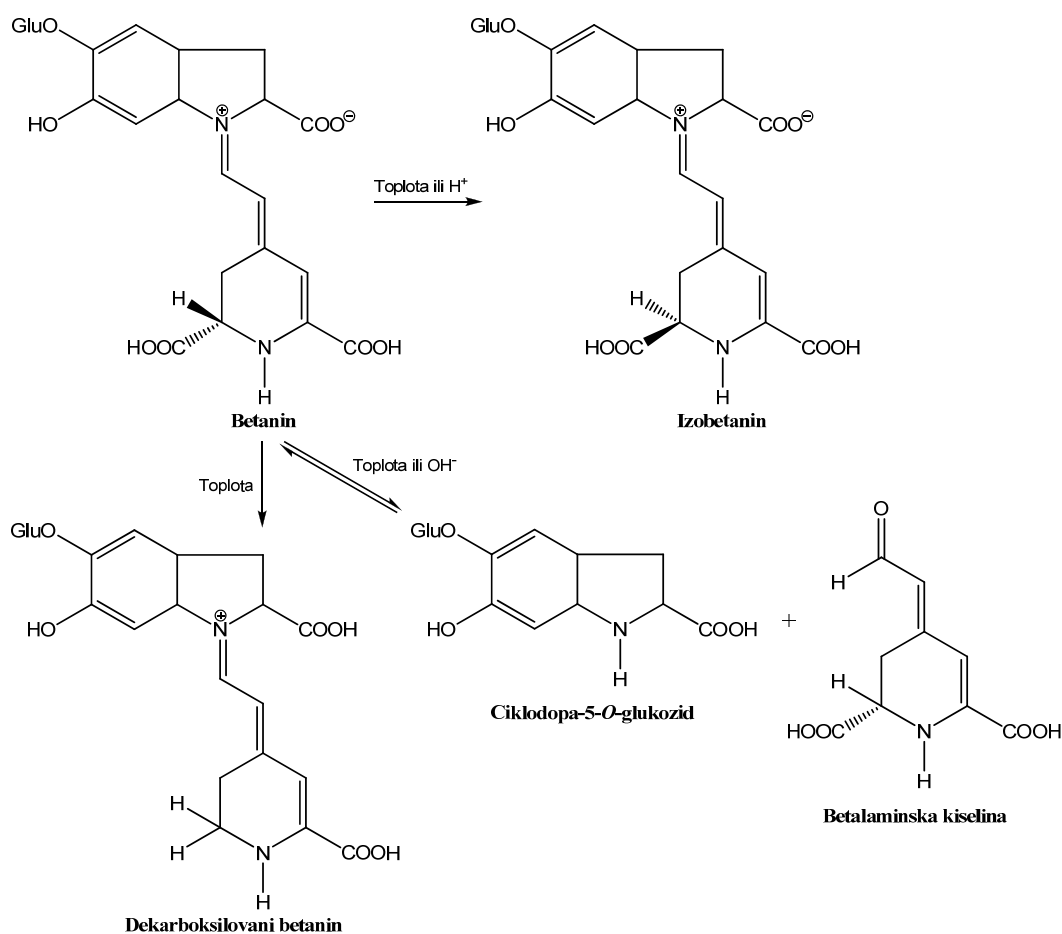
Do sada su naučnici uspeali da uspostave nekoliko ćelijskih kultura koje proizvode betanine. Za ispitivanje su korišćene vrste *Amaranthus tricolor*, *Beta vulgaris* (Leathers i sar., 1992; Akita i sar., 2000), *Chenopodium rubrum* (Berlin i sar., 1986), *Portulacca grandiflora* (Endress, 1976) i *Phytolacca americana* (Masaaki i sar., 1986). Takođe, naučnici se sve više okreću mogućnosti transformacija ćelija, kako bi proizvodile potrebni pigment.

2.5.5. STABILNOST BETALAINA I FAKTORI KOJI UTIČU NA HEMIJSKU STABILNOST BETALAINA

Mehanizam degradacije betanina, predstavnika grupe betacijana, je prikazan na slici 15 (von Elbe i sar., 1981; Schwartz i Elbe, 1983; Jackman i Smith, 1996). Betanin se lako izomerizuje u izobetanin tokom zagrevanja bez vizuelne promene boje (Schwartz i Elbe, 1983).

Betalaini se najbolje rastvaraju u vodi, iako su i slabije rastvorni u etanolu i metanolu. Betalaini su osetljivi na prisustvo metala, sumpor-dioksida, izloženosti svetlosti, visoku aktivnost vode, prisustvo antioksidanata, enzimsku aktivnost, pH i povišenu temperaturu.

pH vrednost. Betalaini su relativno stabilna jedinjenja u oblasti pH od 3 do 7 (Jackman i Smith, 1996), što omogućava njihovu primenu i iskoristivost u hrani niske pH vrednosti. Ispod pH 3,5, absorpcioni maksimum pomera se ka nižim pH vrednostima, a iznad pH 7 ka višim (Huang i von Elbe, 1985; Huang i von Elbe, 1987; Castellar i sar., 2003; Vaillant i sar., 2005). U baznoj sredini i na nižim pH vrednostima, betanin hidrolizuje u betalaminsku kiselinu, a u ciklodopa-5-O-glukozid pri zagrevanju (Schwartz i Elbe, 1983). Betaksantini su najstabilniji na pH 5 i 6 (Cai i sar., 2001b; Stintzing, 2002a), dok betalaminska kiselina ostaje nepromenjena na pH 9 (Von Elbe i sar., 1974; Von Elbe, 1975; Kimler i sar., 1971).



Slika 15. Mehanizam degradacije betanina (Jackman i Smith, 1996)

Svetlost. Različiti izvori zračenja utiču na degradaciju betalaina (Jackman i Smith, 1996). Von Elbe i saradnici (1974) su objavili da količina degradacije betanina (pH 7) raste $15,6 \pm 0,5\%$ nakon 6 dana izlaganja svetlosti na 15°C . Njihova istraživanja ukazuju da je efekat svetlosti i vazduha na degradaciju betanina kumulativan. Attoe i von Elbe (1981) su otkrili da na 25°C uticaj svetlosti na betanin postaje jači nego toplota.

Aktivnost vode (a_w) je faktor koji utiče na stabilnost i/ili boju prehrambenih proizvoda koji sadrže betalaine u funkciji pigmenata (Delgrado-Vargas i sar., 2000). Npr., Cohen i Saguy (1983) su objavili da aktivnost vode i sadržaj vlage imaju izražen eksponencijalni efekat na stabilnost pigmenata cvekle. S obzirom da se reakcija degradacije odvija u prisustvu vode, najveća stabilnost betalaina je u hrani sa niskim sadržajem vlage ili niskom vrednošću a_w (Delgrado-Vargas i sar., 2000).

Kearsley i Katsboxakis (1980) su objavili da smanjenje a_w ispod 0,63 poboljšava stabilnost betanina. Stabilnost betacijana u hrani raste nakon smanjenja aktivnosti vode, metodama koncentrisanja (Castellar i sar, 2006) i sušenja raspršivanjem (Cai i Corke, 2000).

Kiseonik uzrokuje tamnjenje proizvoda i gubitak boje u nekim dugotrajnim mlečnim proizvodima, naročito u proizvodima koji imaju visoku aktivnost vode (Henry, 1996; Delgado-Vargas i sar., 2000). Betalaini reaguju sa molekulima kiseonika (Attoe i Von Elbe, 1985). Skladištenje betanina pod uslovima niskog sadržaja kiseonika smanjenje njihovu degradaciju (Von Elbe i sar., 1974, Huang i von Elbe, 1987). Stabilnost betalaina se poboljšava u atmosferi azota (Attoe i von Elbe, 1982, 1985; Drunkler i sar., 2006) ili dodatkom antioksidanata (Attoe i von Elbe, 1985; Altamirano i sar., 1992; Han i sar., 1998).

Metali. Katjoni metala, naročito gvožđa, bakra, kalaja i aluminijuma povećavaju stepen degradacije betalaina (Pasch i von Elbe, 1979; Czapski, 1990; Reynoso i sar., 1997). Uklanjanje metalnih jona može značajno da poboljša stabilnost boje (Henry, 1996). Czapski je 1990. godine ukazao da joni metala imaju slabiji uticaj na sok cvekle nego na čist betanin, zbog prisustva helatacionih jedinjenja koji stvaraju metalne komplekse u soku. Limunska kiselina i EDTA stabilišu betanin i smanjuju degradaciju izazvanu metalima (Savolainen i Kuusi, 1978, Pasch i von Elbe, 1979, Attoe i von Elbe, 1984, Han i sar., 1998, Herbach i sar., 2006a, Herbach i sar., 2006b).

Antioksidanti. Neki prehrambeni antioksidanti, naročito askorbinska i izoaskorbinska kiselina, poboljšavaju stabilnost betalaina (Attoe i von Elbe, 1982, Cai i Corke, 1999, Máriássyová i Silhár, 2000, Herbach i sar, 2006a). Pasch i von Elbe su 1979. godine ustanovili prooksidativni efekat askorbinske kiseline pri koncentraciji od 1000 mg/kg. Neke studije pokazuju da izoaskorbinska ima bolji efekat na stabilnost betanina, nego askorbinska kiselina (Bilyk i Howard, 1982; Attoe i von Elbe, 1985; García Barrera i sar., 1998), dok rezultati Herbach i saradnika (2006a) ukazuju na duže zadržavanje boje pigmentata u prisustvu askorbinske, nego izoaskorbinske kiseline. U svojim istraživanjima Attoe i von Elbe (1985) ukazali su da su fenolni antioksidanti neefikasni u zaštiti betanina od procesa oksidacije. Isti autori su zaključili da najverovatnije mehanizam oksidacije betanina ne uključuje nastajanje slobodnih radikala.

Temperatura je najvažniji faktor koji utiče na stabilnost betalaina tokom prerade i skladištenja hrane. Neke studije ukazuju na povećanje degradacije betalaina povećanjem temperature (Saguy i sar., 1978; Havlíková i sar., 1983, García Barrera i sar., 1998). Termalna degradacija betacijana, i u soku cvekle i pitaje, odvija se po reakciji prvog reda (von Elbe i sar., 1974; Saguy i sar., 1978; Saguy, 1979; Herbach i sar., 2004b).

Tokom toplotne prerade prehrambenih proizvoda, betanin se degradira reakcijama izomeracije, dekarboksilacije ili cepanjem, dovodeći do postepene redukcije crvene boje i pojavljivanja svetlo braon boje (Huang i von Elbe, 1985; Drdák i Vallová, 1990).

Altamirano i saradnici su 1993. godine odredili termalnu degradaciju betanina u tri model sistema (voda/glicerol, voda/etilen glikol, voda/etanol), na temperaturama od

60°C do 86°C. Najmanja stabilnost betanina bila je u voda/etanol sistemu, jer prva faza degradacije betanina uključuje nukleofilni napad na aldimin vezu, a etanol ima najveću elektronsku gustinu na kiseonikovom atomu.

Betanin se može regenerisati iz svojih primarnih proizvoda degradacije, ukoliko se njegovi ekstrakti čuvaju na temperaturama ispod 10°C i pri pH 5 (Huang i von Elbe, 1985; Huang i von Elbe, 1987).

Enzimi. Specifični enzimi za dekoloraciju utiču i na stabilnost betalaina. Enzimski sistemi uključeni u ovu akciju su usko vezani za subcelularne komponente tkiva cvekle i najaktivniji su na temperaturi od 40°C i pH 3,4, dok je aktivnost inhibirana prisustvom NH₄NO₃, KNO₃, KCl ili NaCl (Shih i Wiley 1981; Jackman i Smith, 1996). Inaktivacija, srednjim termičkim tretmanom, može da bude preventivna ili da smanji slabljenje boje pigmenata ekstrakata katalisanih enzimima (Jackman i Smith, 1996). Međutim, istraživanje Parkin i Im-a (1990), je pokazalo da endogeni enzimi cvekle ostaju aktivni i nakon umerenih termalnih tretmana i pretpostavlja se da utiču na dekoloraciju termički tretiranih proizvoda.

Sumpor dioksid (SO₂) potpuno obezbojava pigmente cvekle i nije pogodan kao dodatak prehranbenim bojama izolovanim iz cvekle (Henry, 1996).

Patentirano je nekoliko metoda koje se primenjuju za stabilizaciju betalaina u prehranbenim proizvodima sa ciljem da se spreče destrukciju ili poboljša stabilnost pigmenata: degasiranje, dodatak antioksidanata i stabilizatora, kontrola pH i minimalni termički tretman (Delgrado-Vargas i sar., 2000). Međutim, osetljivost betalaina na spomenute faktore ukazuje na ograničenost upotrebe betalaina kao prehranbenih aditiva. Oni mogu biti korišćeni u hrani koja ima kratak rok trajanja, proizvedenoj uz minimalni termički tretman i pakovanoj i distribuiranoj u suvom stanju, pod uslovima smanjene svetlosti, kiseonika i vlažnosti (Delgrado-Vargas i sar., 2000). I pored toga, crvena boja cvekle se koristi kod mlečnih proizvoda (jogurt i sladoled), mesnih proizvoda (kobasice i šunkarica), zamena za meso, dresinga za salate, bezalkoholnih pića, sokova u prahu, ledenih pića, marcipana, pečenih jela, kremova za keks, bombona, voćnih žvaka, želea, voćnih koktela i grickalica (Henry, 1996; Jackman i Smith, 1996; Delgrado-Vargas i sar., 2000).

Za bojenje crvenom bojom pića i hrane u Boliviji, Argentini, Meksiku, SAD i Ekvadoru korišćeni su listovi Bodljikavog štira (uglavnom amarantin) (Teutonico i Knorr, 1985). Međutim, amarantin je manje stabilan od betanina u prisustvu kiseonika (Huang i von Elbe, 1986). U skorije vreme, *Amaranthus* biljke su privukle pažnju kao potencijalni alternativni izvor pigmenata betacijana jer neki genotipovi *Amaranthus*-a proizvode veću biomasu, sadrže više betacijana i mogu za razliku od cvekle da rastu u različitim uslovima (Cai i sar., 1998; Cai i sar., 2001a). Acilovani betacijani su pronađeni kod *Amaranthus*

biljaka, naročito kod uzgajanih vrsta (Cai i sar., 2001a). Schliemann i Strack (1998) objavili su da se smanjuje optička aktivnost i povećava stabilnost acetilovanih betacijana, u poređenju sa neacilovanim, kao rezultat intramolekulskog premeštanja acil ostataka. Objavljen je mali broj istraživanja na acetilovanim betacijanima o efektu acil grupa na stabilnost pigmenata betacijana (Cai i sar., 2001b). Reynoso i saradnici (1997) su predložili upotrebu pigmenata izolovanih iz *Myrtillocactus geometrizans* i drugih kaktusa kao alternativu cvekla crvenoj betalain boji, naročito za prehrambene proizvode koji ne zahtevaju preradu na visokoj temperaturi (mlečni proizvodi).

Istraživanja betacijana iz ćelija *Beta vulgaris* počela su 60-ih godina prošlog veka (Bokern i sar., 1991). Ćelije ove kulture su korišćene za izučavanje biosinteze betalaina, kao i metoda za proizvodnju betalaina. Leathers i saradnici (1992) su zabeležili da *in vitro* proizvodni sistemi nude nekoliko prednosti komercijalnim proizvođačima betalaina nad konvencionalnim tehnikama uzgoja i ekstrakcije (npr. nema formiranja geosmina; mogu se proizvoditi ili samo žuti ili samo ljubičasti betalaini).

2.6. CVEKLA

2.6.1. OPIS BILJKE, NJEN ZNAČAJ I UPOTREBA

Cvekla ima dugu tradiciju gajenja koja se proteže još od II milenijuma p.n.e. Najraniji pisani podaci datiraju iz VIII veka p.n.e. iz Mesopotamije. Ostaci cvekle su pronađeni u piramidama u Tebi i Egiptu, a i na lokalitetu iz perioda Neolita, u Holandiji. Rimski i jevrejski izvori iz I veka p.n.e. govore o tome da je cvekla, u tom periodu, gajena prvenstveno zbog listova.

Predak cvekle, koji se i danas koristi, je divlja vrsta *Beta vulgaris* subsp. *maritima* (*Beta maritima* Linn), koja raste duž obala Evrope, Severne Afrike i Azije, a pronađena je i u blatnjavim primorskim močvarama u Engleskoj. U početku, ljudi su isključivo jeli zelene delove cvekle, a ne njen koren. Prvi narodi koji su cveklu gajili zbog njenog korena, bili su stari Latini. Za širenje cvekle duž Severne Evrope zaslužna su plemena koja su osvajali Rimljani. Prvo je korišćena kao stočna hrana, a kasnije (XVI vek) se počela koristiti i u ljudskoj ishrani.

Posle 1830. godine cvekla je uvezena u Severnu Ameriku. Prva komercijalna proizvodnja je započeta 1879. godine na farmi u Alvarado-u (California). Zahvaljujući nemačkim doseljenicima, cvekla je 1850. godine dospela i u Čile (www.wikipedia.com).

Cvekla se najviše gaji u istočnoj i centralnoj Evropi. Najveći proizvođači u svetu su Rusija, Poljska, Francuska, Italija i SAD.



Slika 16. *Beta vulgaris* subsp. *maritima*

Taksonomska klasifikacija cvekle prikazana je u tabeli 5.

Tabela 5. Taksonomska klasifikacija *Beta vulgaris* L.

Carstvo	Plantae
Tip	Magnoliophyta
Klasa	Magnoliopsida
Red	Caryophyllales
Porodica	Amaranthaceae
Potporodica	Chenopodiaceae
Rod	Beta
Vrsta	<i>Beta vulgaris</i> L.
Varijetet	<i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>Vulgaris</i> var. <i>Vulgaris</i>



Slika 17. *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*

2.6.2. OPŠTE I BOTANIČKE OSOBINE

Cvekla je dvogodišnja, dikotiledona, zeljasta biljka, koja se gaji zbog zadebljalog korena i listova. Koren predstavlja najznačajniju sortnu oznaku. Osnovni pokazatelji determinacije su oblik, površina i krupnoća. Na osnovu oblika razlikuje se četiri tipa: pljosnata, pljosnato okrugla, sferična i konusoidna. Iako je oblik dosta stabilna sortna karak-

teristika, u nepovoljnim proizvodnim uslovima (zbijeno zemljište, loša obrada, vlažnost) često dolazi do pojave deformacija. U primarnoj građi korena, na poprečnom preseku, uočava se rizodermis, primarna kora i centralni cilindar (čine ga ksilem, floem i osnovno parenhimsko tkivo). Sekundarna građa nastaje sa pojavom pravih listova kada se u centralnom cilindru, ispod floema, formira kambijum. Kambijum prema centralnom delu stvara sekundarni ksilem, prema periferiji sekundarni floem, a između toga formira se parenhim. Krupnoća korena je različita. Koren može biti sitan (do 300g), srednje krupan (300 - 600g) i krupan (iznad 600g). Površina korena (plutno tkivo) može da bude glatka, mrežasta ili izbrazdana, crvene, ljubičaste ili kafene boje. Boju mesa korena (unutrašnjost) karakterišu unutrašnji koncentrični krugovi, pri čemu svetlije obojeni predstavljaju sprovodne snopiće, a tamnije obojeni parenhim. U zavisnosti od dužine vegetacije sorte cvekle se dele na: rane (do 100 dana), srednjestasne (100 - 130 dana) i kasne (iznad 130 dana vegetacije).

Tabela 6. Osnovne karakteristike nekih sorti cvekle (Lazić i sar., 1998)

Sorta	Koren-oblik	Koren-boja mesa	Dužina vegetacije	Namena
Egipatska	Pogačast	Crvena	Rana	Univerzalna
Detroitska	Okruglast	Crvena	Srednje rana	Univerzalna
Bicor	Okrugla	Crvena	Srednje rana	Industrija
Dweringa	Okrugla	Crvena	Srednje rana	Industrija
Erfurska	Cilindričan	Tamno crvena	Kasna	Sveža
Bordo	Okruglast	Tamno ljubičasta	Srednje rana	Univerzalna
Ruby queen	Okruglast	Crvena	Rana	Industrija
Ruby detroit	Okrugla	Tamno crvena	Srednje rana	Univerzalna
Nero detroit	Okrugla	Tamno crvena	Srednje rana	Univerzalna
Cylindra	Cilindričan	Tamno crvena	Kasna	Univerzalna

Cvekli je potrebno 12 - 16 nedelja da ostvari koren zadovoljavajućeg zrenja potrebnog za uspešno čuvanje. Krajnja veličina-masa je uslovljena hranidbenim prostorom, a ne stepenom zrelosti. Cvekla se dobro čuva tokom zime (u podrumima, skladištima, trapovima), što omogućava da se za ishranu koristi u svežem stanju tokom dužeg vremenskog perioda.

Najbolji uslovi za čuvanje cvekle su niska temperatura (0 - 5°C) i visoka relativna vlažnost (90 - 95%). Cvekla može uspešno da se čuva 3 - 5 meseci, ali i do 8 meseci, ako

je skladište hladno i raspolaže sistemom za ventilaciju. Visok sadržaj ugljendioksida (30 - 70%) u vazduhu kod cvekle povećava intenzitet disanja, što vodi ka intenzivnijem metabolizmu i može da proizvede gubitke tokom čuvanja cvekle. Gubitak u masi za vreme skladištenja iznosi 2 - 10%, a za to vreme dolazi i do gubitaka u kvalitetu (smanjuje se sadržaj askorbinske kiseline, karotena, skroba i proteina). Čuvanjem cvekle u podrumu, posle tri meseca, sadržaj betanina se neznatno smanjuje, oko 13%. Cvekla se kao vrsta odlikuje dosta visokim sadržajem nitrata i nitrita. Intenzitet nakupljanja nitrata zavisi od sorte, agroekoloških uslova, đubrenja i vremena berbe (Ilić i sar., 2009).

2.6.3. ZNAČAJ I UPOTREBA CVEKLE

Cvekla se može obariti i konzumirati kao salata sa uljem ili sirćetom ili u kombinaciji sa nekim drugim povrćem. Takođe, može se piti sveže ceđeni sok. U istočnom delu Evrope se priprema čorba Boršč. Listovi cvekle se mogu koristiti sveži u salati ili se mogu bariti i jesti kao prilog. U industriji se cvekla prerađuje u sok i koncentrat cvekle, pasterizovanu cveklu i sušenu cveklu. Trop koji zaostaje nakon prerade cvekle je nedovoljno iskorišćen. Kod osoba koje redovno konzumiraju cveklu, može se zapaziti crvena boja urina i stolice. U pitanju je stanje koje je neškodljivo i naziva se *beturia*.

Uprkos svim vrlinama cvekle, treba naglasiti i njeno nepovoljno delovanje. Cvekla nije prikladna za osobe koje imaju osetljiv stomak, problem sa gorušicom i nadimanjem. Pošto je bogata natrijumom, ne preporučuje se osobama kojima je propisana dijeta bez soli. Zbog velikog sadržaja oksalata, cvekla se ne preporučuje ni osobama koje su sklone stvaranju kamena u bubregu i onima koji pate od osteoporoze, zato što oksalati ometaju apsorpciju kalcijuma iz organizma.

2.6.4. NUTRITIVNE OSOBINE CVEKLE

Energetska vrednost cvekle je 318 cal/100g, sadržaj ukupnih ugljenih hidrata 73 g/100g, a ukupna dijetetska vlakna 13 g/100g, ukupnih šećera je 44 g/100g, od čega je najveći deo saharoza, glukoza, pa fruktoza, proteina 15,3 g/100g, ukupnih amino kiselina 4,9 g/100g, a ukupnih masnih kiselina 0,5g/100g. Količina vlage cvekle je 5 g/100g, a pepela 4 g/100g (Nemzer i sar., 2011).

Prisutni elementi u cvekli su bakar, kalcijum i magnezijum u većim koncentracijama, potom natrijum, gvožđe, aluminijum, barijum, mangan, bor, kalijum i cink. Cvekla sadrži vitamine B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₁₂ i vitamin C (Nemzer i sar., 2011).

Visokoj nutritivnoj vrednosti cvekle doprinosi sadržaj folne kiseline od 15,8 mg/g suvog ostatka (Wang i Goldman, 1997).

„Zemljani“ ukus cvekle potiče od prisutnog geosmina. Istraživači još nisu utvrdili da li ga cvekla sama proizvodi ili se stvara u simbiozi između cvekle i mikroorganizama iz tla koji žive u njoj. Različitim programima uzgoja cvekle, mogu se dobiti sorte sa niskim sadržajem geosmin-a i time prijatnijeg ukusa.



2.6.5. ANTIOKSIDATIVNE OSOBINE CVEKLE

Cvekla sadrži značajnu količinu fenolnih kiselina: ferulna, protokatehinska, vanilinska, *p*-kumarinska, *p*-hidroksibenzoeva, siringinska, 4-hidroksibenzoeva, kafena kiselina, katehin hidrat i epikatehin (Kujala i sar., 2000; Georgiev i sar., 2010). Sadržaj fenolnih jedinjenja je najveći u kori (15,5 mg galne kiseline/g suvog materijala), a zatim na vrhu (11,4 mg galne kiseline/g suvog materijala) i potom u mesu (4,2 mg galne kiseline/g suvog materijala) cvekle (Kujala i sar., 2000). Kora cvekle sadrži L-triptofan, *p*-kumarinsku i ferulnu kiselinu, kao i derivate ciklodopa (Kujala i sar., 2001).

Betalaini, osnovne komponente cvekle, imaju katjonsku strukturu sa pozitivnim azotom u sistemu poliena. Njihov ciklični amin pripada grupi molekula sa redukujućim osobinama. Dakle, ova grupa fitohemikalija (betacijani i betaksantini) imaju fenolnu i acilnu amino grupu, koje su odlični elektron donori i zbog toga mogu da stabilišu slobodne radikale (Kanner i Harel, 1985; Kanner i sar., 1996; Kanner i sar., 2001).

Betalaini ili biljke koje sadrže ove fitohemikalije pokazale su se kao dobri hvatači 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala (Cai i sar., 2003; Siriwardhana i Jeon, 2004; Pavlov i sar., 2005; Pavlov i sar., 2002). Destrukcija 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) postignuta je betalainima cvekle, ali više betacijanima, nego betaksantinima (Escribano i sar., 1998; Butera i sar., 2002; Gliszczyńska-Świgło i sar.,

2006; Stinzing i sar., 2005). Pozitivni rezultati antiradikalske aktivnosti betalaina utvrđeni su i u lipidnim hemijskim sistemima, primenom ORAC metode (Stinzing i sar., 2005; Zakharova i Petrova, 1998; Butera i sar., 2002; Siriwardhana i Jeon, 2004; Kanner i sar., 2001).

Mnogobrojni eksperimenti ukazali su na antioksidativnu aktivnost betalaina u *in vitro* biološkoj lipidnoj sredini, od ljudskih lipoproteina niske gustine (LDL) do ćelijskih membrana (Kanner i sar., 2001, Tesoriere i sar., 2003, 2005). Naročito su pokazali *in vitro* zaštitu protiv oksidativnog stresa na LDL i lipidima membrana i mieloperoksidazama (Kanner i sar., 2001, Tesoriere i sar., 2003, Allegra i sar., 2005). Ove fitohemikalije podstiču enzimске aktivnosti, naročito hinon reduktaze u hepatoma ćelijama (Wettasinghe i sar., 2002, Lee i sar., 2005) i sprečavaju ICAM-1 na endotelijalnim ćelijama (Gentile i sar., 2004).

Skorije studije ukazuju na *in vivo* aktivnost betalaina. Eksperiment na volonterima koji su konzumirali voćnu pulpu kaktus voća je ukazao na zaštitu LDL od oksidativnih promena (Tesoriere i sar., 2004b), dok je sok cvekle odložio LDL oksidaciju (Tesoriere i sar., 2004b; Sembries i sar., 2006).

2.7. SPOREDNI PROIZVODI PRERADE POVRĆA – IZVOR FITONUTRIJENATA

Prehrambena industrija u svetu iz dana u dan uvodi nove prirodne funkcionalno, biološko i zdravstveno više vredne fitonutrijente i aditive u cilju dobijanja funkcionalne hrane. S obzirom da sporedni proizvodi prehrambene industrije sadrže značajne količine fitohemikalija, njihovo iskorišćenje bilo bi nutritivno i ekonomski opravdano. Tokom tehnoloških postupaka proizvodnje i prerade voća i povrća zaostaju velike količine sekundarnih proizvoda koji predstavljaju ekonomski deficit i ekološki problem, ali i značajan gubitak biomase i fitonutritienata. Danas se u svetu sporedni proizvodi koriste kao hrana za životinje, za proizvodnju prehrambenih vlakana i biogoriva, a takođe su i izvori prirodnih aditiva prehrambenim proizvodima.

Prehrambeni proizvodi u svom sastavu sadrže različite aditive, tj. supstance koje se dodaju hrani u cilju postizanja određenih efekata, odnosno koriste se kao antioksidanti, konzervansi, zaslađivači, boje, arome i dr. Mogućnost korišćenja aditiva u proizvodnji hrane nameće i pitanje da li se opravdano koriste, te se ove supstance moraju kontrolisati kako bi se izbeglo njihovo eventualno štetno dejstvo po zdravlje čoveka.

Najveći deo danas primenjivanih aditiva (84%) još uvek su sintetičkog porekla. Mnoge naučno-istraživačke studije ukazuju na veću efikasnost i zdravstvenu bezbednost prirodnih aditiva izolovanih iz ekstrakata različitih biljaka, njihovih etarskih ulja, kao i biljnih otpadnih proizvoda. S obzirom da se i potrošači sve manje opredeljuju za hranu koja sadrži sintetičke aditive, funkcionalni i nutritivni sastojci iz prirodnih izvora su sve traženiji. Prirodni aditivi imaju različitu hemijsku strukturu koja uslovljava njihovo specifično ponašanje. U najznačajnije prirodne aditive ubrajaju se biljni sekundarni metaboliti kao što su fenolna jedinjenja, terpenoidi, tokoferoli, glukozinolati, kao i jedinjenja koja sadrže sumpor.

Biološki aktivni sekundarni metaboliti, prisutni u voću i povrću, a koji se nalaze i u sporednim proizvodima prerade voća i povrća imaju pozitivnu ulogu u prevenciji različitih oboljenja, patoloških stanja, procesa starenja i drugih neželjenih promena u humanom organizmu izazvanih prekomernom produkcijom slobodnih radikala.

Trop masline se koristi kao agens za kontrolu nematoda paradajza (Rodriguez-Kabana i sar., 1995), otpad citrusa se koristi u hortikulturi (Widmer i Montanari, 1995), a flavonoidi kore mandarine su zanimljivi zbog njihove fungistatične aktivnosti (Chkhikvishvili i Gogiya, 1995) što se može koristiti za prirodnu zaštitu povrća i voća od plesni. Limonoid komponente u kori i semenkama citrusa imaju važne farmakološke karakteris-

tike, kao i potencijal za upotrebu kao insekticid kod poljoprivrednih kultura (Manthey i Grohmann, 1996).

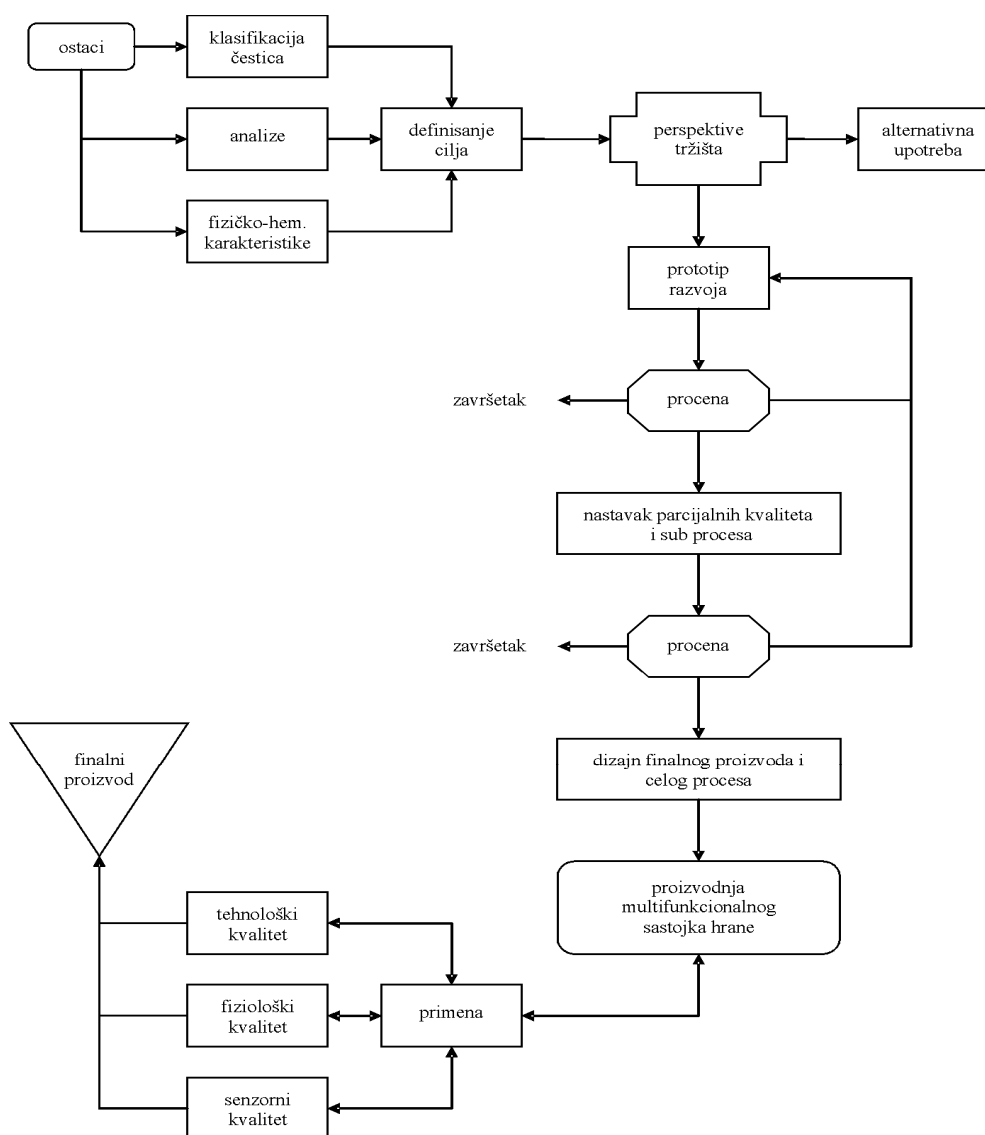
Tabela 7. Količine sporednih proizvoda u različitim zemljama

Država	Količina i tip sporednih proizvoda
Nemačka, 1997. (Henn, 1998)	380 000 t/a organskog otpada nakon prerade krompira, povrća i voća 1954000 t/a iskorišćenog slada i hmelja (pivarstvo) 1800000 t/a tropa grožđa (vinikultura) 3000000 t/a ostataka sirovih vlakana (proizvodnja šećera) 100000 t/a vlažnog tropa jabuke (25 000 t suvog tropa) zaostaje ako se 400 000 t jabuke preradi u sok (Henn i Kunz, 1996a)
Belgija, 1992. (Lucas i sar., 1997)	105000 t/a biološkog otpada 280000 t/a otpad iz domaćinstava
Tajland, 1993. (Prasertsan i Prasertsan, 1996) proizvodnja palminog ulja	386930 t/a kora voća 165830 t/a presovana palmina vlakna 110550 t/a čaura palme 1000000 t/a kasava pulpe (Sriroth i sar, 2000)
Španija, 1997. (Clemente i sar., 1997)	>250000 t/a tropa masline
EEC, 1996. (Dronnet i sar., 1998)	14000000 t/a tropa šećerne repe (suva materija)
Portugal, 1994. (Carvalho i sar., 1994)	14000000 t/a tropa paradajza
Jordan, 1999. (Haddadin i sar., 1999)	36000 t/a tropa maslina
Malezija, 1996. (Hussein i sar., 1996) proizvodnja palminog ulja	2520000 t/a vlakana mezokarpa palme 1440000 t/a čaura uljane palme 4140000 t/a kora voća
Australija, 1995. (Tran i Mitchell, 1995)	400000 t/a kore ananasa
Amerika	300000 t/a tropa grožđa, samo u Kaliforniji (1994) (Nakata, 1994) 9525 t/a tropa brusnice (1998) (Zheng i Shetty, 1998) 200000 t/a čaura badema (1997) (Toles i sar., 2000) 3.300000 t/a kore narandže u Floridi (1994) (Manthey i Grohmann, 1996)

Nusproizvodi povrća se sastoje većim delom od vode i celuloze i imaju loš mikrobiološki kvalitet zbog mnogih bakterija koje izazivaju kvarenje na površini, naročito ako je skladišteno u proizvodnoj jedinici pre upotrebe, jer se brzo izmeni na nekontrolisan način. Predtretman inokuliranja sa kiselo-mlečnim bakterijama može proizvesti stabilniji

substrat koji bi trebalo osušiti za dalje skladištenje. Alternativa za fermentaciju je zakišeljavanje sa kiselinama kao što su limunska, sirćetna ili askorbinska. Zbog senzornih karakteristika i zbog uticaja na stabilnost boje upotreba askorbinske kiseline bila bi najkorisnija za hranu.

Skoro svaki proces recikliranja počinje sa predtretmanom, sušenjem, smanjenjem veličine i frakcionisanjem. Rezultat je finalni proizvod, koji je optimizovan, multifunkcionalni sastojak hrane. Na slici 18 prikazana je Strategija razvoja multifunkcionalnih sastojaka hrane od ostataka povrća (modifikovano Henn, 1998).



Slika 18. Strategija razvoja multifunkcionalnih sastojaka hrane od ostataka povrća (modifikovano Henn, 1998)

Multifunkcionalni sastojak hrane mora biti prirodan sastojak koji preuzima funkcije aditiva tokom procesa i/ili poboljšava finalni proizvod.

Tabela 8. Kvalitet i karakteristike hrane pod uticajem multifunkcionalnog sastojka hrane od ostataka povrća (Laufenberg i sar., 1996)

Kvalitet i karakteristike hrane na koje utiče multifunkcionalni sastojak hrane od ostataka povrća
Nutritivni i zdravstveni kvalitet hrane, npr. sadržaj vitamina, dijetalnih vlakana
Struktura prehrambenog proizvoda, npr. poroznost, struktura mreže
Senzorne karakteristike, npr. tekstura/struktura, osećaj u ustima, svežina
Fizičke karakteristike, npr. gustina, viskozitet
Karakteristike prerade, npr. sposobnost vezivanja vode, formiranja emulzije

Svež materijal koji se najčešće koristi za dobijanje multifunkcionalnih aditiva je trop šargarepe (Filipini i Hogg, 1997; Henn i Kunz, 1996b; Henn, 1998; Lucas i sar., 1997; Ohsawa i sar., 1994; Ohsawa i sar., 1995; Laufenberg i sar., 1996), ostaci prerade citrusa (Sreenath i sar., 1995; Widmer i Montanari, 1995), trop grožđa i jabuke (Borycka, 1996; Carson i sar., 1994; Lucas i sar., 1997; Saura-Calixto, 1998; Masoodi i Chauhan, 1998), trop šećerne repe (Broughton i sar., 1995a,b; Köksel i Özboy, 1999), kora narandže, manga i jabuke (Larrauri i sar., 1999), aroma semenki manga (Arogba, 1999), ljuska krompira (Toma i sar., 1979), pulpa šećerne trske (Clarke, 1995) ili mešavina ovasa, pirinča, ljuska kukuruza i mahuna graška (Inglett, 1998). Dobijeni prirodni aditivi koriste se kod filova za pite (Carson i sar., 1994), u proizvodnji krepera (Carson i sar., 1994, Joshi i Sandhu, 1996), hleba (Filipini i Hogg, 1997; Lucas i sar., 1997; Ohsawa i sar., 1994; Clarke, 1995), slatkog keksa (Clarke, 1995, Köksel i Özboy, 1999), sokova (Henn i Kunz, 1996b; Henn, 1998; Laufenberg i sar., 1996; Sreenath i sar., 1995), džemova (Grigelmo-Miguel i Martin-Belloso, 1999) i za torte, dresinge i marinade (Ohsawa i sar., 1995). Sporedni proizvodi prerade voća i povrća takođe su i značajni izvor prehrambenih vlakana.

U tabeli 9 prikazan je sadržaj značajnih komponenti sporednih proizvoda prerade povrća.

Tabela 9. Sadržaj značajnih komponenti sporednih proizvoda prerade povrća (Al-Wandawi i sar., 1985; Clemente i sar., 1997; Henn, 1998; Larrauri i sar., 1999; Lu i Foo, 1997; Saura-Calixto, 1998)

Sporedni proizvodi	Biljni fenoli (flavonoidi, fenol karboksilne kiseline)	
	Bezbojni	Obojeni
Trop jabuke	0,724% ^a (Lu i Foo, 1997) 350,6 mg/kg ^b , FK 8,0 mg/kg ^b (Lucarini i sar., 1999)	
Trop šargarepe		β- karoten ^a 3 mg/kg
Trop aronije		Antocijani 9,1 g/kg (Máriássyová i sar., 1999b)
Kora kokosa	Tanini 3,1% ^a	Leukoantocijanidini (Nambudiri i Shivashankar, 1985)
Trop zove		Antocijani 16,6 g/kg (Máriássyová i sar., 1999b)
Trop grožđa	2% ^a , 11,7% ^a (Zeller, 1999)	Antocijani
Opna grožđa	25 - 35% ^a (Anon, 1999)	Antocijani
Kora grejpfruta	Naringin 0,07-1,7% ^b	Karotenoidi
Zeleni čaj	10,1-21,6% ^{a,c}	Antocijani
Kora manga	5,5% ^a	Karotenoidi
Pogača nakon presovanja maslina	0,3% ^b	Antocijani
Kora narandže	Hesperidin 1,3 - 2,4% ^b /1,7 - 2% ^a (Manthey i Grohmann, 1996) Nobiletin ^d 32% (Manthey i Grohmann, 1996)	Karotenoidi
Trop cvekle		Betain 414,3 mg/kg ^b (Máriássyová i sar., 1999a)
Trop šećerne repe	FK 0,36% ^a (Couteau i Mathaly, 1998)/ 8 g kg ^a (Thibault i sar., 1998)	
Pokožica paradajza	210,8 mg/kg ^b FK 3,7 mg/kg ^b (Lucarini i sar., 1999)	Likopen ^b 120 mg/kg (Al-Wandawi i sar., 1985), 80 mg/kg ^b (Lucarini i sar., 1999)

FK-ferulna kiselina

a-suva materija

b-svež plod

c-zavis od vrste čaja i sezonskih promena

d-ulje narandžine kore (ekstrakcija heksanom)

U Zapadnoj Evropi proizvodi se godišnje preko 200 000 tona cvekle (*Beta vulgaris* L. ssp. *Vulgaris*) od čega se 90% konzumira kao povrće. Ostatak se prerađuje u sok, prehrambene proizvode i boju, kasnije poznatu kao cvekla crveno (Henry, 1996). Trop cvekle se nakon prerade cvekle u sok, iako bogat betalainima, oko 15 - 30% svežeg materijala (Otto i Sulc, 2001), koristi kao stočna hrana ili đubrivo. Obojeni deo cvekle je od 0,4 - 2 % suve materije, u zavisnosti od vrste, ekoloških faktora, zemljišta i tretmana nakon branja (Stintzing i sar., 2000). Cvekla je među 10 vrsta povrća sa snažnim

antioksidativnim kapacitetom, a ukupni sadržaj fenola je 50 - 60 $\mu\text{mol/g}$ suve materije (Cao i sar., 1996; Kähkönen i sar., 1999; Vinson i sar., 1998). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je najveći u ljusci (50%), gornjem delu ploda (37%) i mesu (13%). Ljuska sadrži najveći deo betalaina (54%), gornji deo (32%) i meso (14%) (Kujala i sar., 2000). Obojena frakcija se sastoji od betacijana i betaksantina, a ljuska cvekle sadrži L-triptofan, *p*-kumarinsku i ferulnu kiselinu, kao i derivate ciklodopa glikozida (Kujala i sar., 2001). Objavljeni su radovi o *in vitro* antiradikalnoj aktivnosti betanina i betanidina sa fenolnom hidroksilnom grupom (Escribano i sar., 1998; Pedreno i Escribano, 2000), koji su efikasniji od vulgaksantina I i II (Escribano i sar., 1998). Toksikološke studije pokazuju da betanin nema alergijski potencijal (Pourrat i sar., 1987), nije mutagen ni hepatokancerogen (Schwartz i sar., 1983; Von Elbe i Schwartz, 1981). Cvekla ima 15,8 $\mu\text{g/g}$ folne kiseline (Wang i Goldman, 1997), što je čini nutritivno značajnom, jer spada u jedan od 10 esencijalnih vitamina kod ljudi.

3.0. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama: Odeljenja za Organsku hemiju i Odeljenja za Mikrobiologiju Tehnološkog Fakulteta Novi Sad Univeziteta u Novom Sadu, Instituta za prehrambene tehnologije, Novi Sad i Zavoda za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici.

Svi reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće. Etanol, natrijumkarbonat, sirćetna kiselina, aluminijum(III)-hlorid, proizvedeni su u „Zorki”, Šabac.

Folin-Ciocalteu reagens, katehin, epikatehin, rutin, apigenin, miricetin, protokatehinska, galna, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, hlorogenska, ferulna, sinapinska, ruzmarinska, vanilinska i kafena kiselina, gvožđe(II)-hlorid, gvožđe(III)-hlorid, 5,5-dimetil-1-pirrolin-N-oksid (DMPO), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]), kalijumsuperoksid, 2-*tert*-butil-4-hidroksianizol (BHA), trihlorsirćetna kiselina su proizvedeni u Sigma Chemical Company, SAD.

Vodonik-peroksid, acetonitril, metanol, mravlja kiselina, dimetilformamid (DMF), dimetilsulfoniloksid (DMSO), kao i Chromabond C18 kolone za SPE proizvedeni su u J.T.Baker, Deventer, Holandija.

Kalijum-fericijanid proizveden je u Lach-Ner, Brno, Češka.

Na₂HPO₄·2H₂O proizveden je u Merck-Alkaloid, Skoplje, Makedonija.

Natrijumnitrit, natrijumhidroksid, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ proizvedeni su u Centrohem, Stara Pazova, Srbija.

AlCl₃·6H₂O je proizveden u „Kemika“, Zagreb, Hrvatska, a kraunetar je proizveden u Merck, Darmstadt, Germany.

Kao biljni materijal korišćen je trop pet sorti cvekle (Detroit, Cardeal-F1, Egipatska, Bikor i Kestrel), koje su dobijene sa Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad.

3.1. DOBIJANJE EKSTRAKATA

Cvekla (*Beta vulgaris*) je oprana, isečena na komade i odvojen je sok sokovnikom Neo SK-400. Trop cvekle je odložen u zamrzivač na -20 °C. Trop cvekle (100 g) maceriran je 50% etanolom (1000 ml), uz dodatak 0,5% glacijalne sirćetne kiseline, na ultrazvučnom kupatilu 30 min. Macerat je profiltriran. Dobijeni ekstrakti su koncentrovani na rotacionom vakuum uparivaču do suva, pri čemu su izmerene mase suvih ostataka iznosile:

Cvekla Detroit: $m = 8,5658 \pm 0,4283$ g;

Cvekla Cardeal-F1: $m = 8,6661 \pm 0,43331$ g;

Cvekla Egipatska: $m = 4,2010 \pm 0,1021$ g;

Cvekla Bikor: $m = 13,9936 \pm 0,6994$ g;

Cvekla Kestrel: $m = 5,7497 \pm 0,2874$ g.

Dobijeni ekstrakti prečišćeni su primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE).

3.2. POSTUPAK PREČIŠĆAVANJA POLAZNIH EKSTRAKATA EKSTRAKCIJOM NA ČVRSTOJ FAZI (SPE)

Za uklanjanje organskih kiselina, ostataka šećera, aminokiselina, proteina, vitamina C i drugih interferirajućih komponenti, kao i za prevođenje fenolnih jedinjenja iz vodenog u metanolni rastvor, kao čvrsta faza korišćena je CHROMABOND C18 kolona.



Slika 19. SPE manifold i kertridži

Postupak se sastojao od sledećih faza:

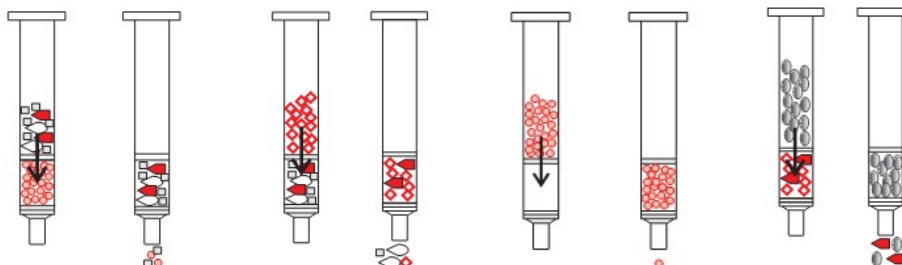
Priprema uzorka: Suvi ostatak polaznog ekstrakta je rastvoren u 0,5 M H_2SO_4 .

Kondicioniranje kolone: 8 ml metanola i 20 ml 5mM H_2SO_4 .

Retencija uzorka: Propuštanje uzorka kroz kolonu pod vakuumom. Nakon izlaska iz kolone uzorak je aplikovan na kolonu za frakcionisanje fenolnih jedinjenja.

Ispiranje: 8 ml 5 mM H₂SO₄.

Eluiranje: 8 ml metanola i 20 ml destilovane dejonizovane vode.



Legenda: □ matriks, ◀ analit, ◂ nečistoće, ● rastvor za kondicioniranje, ◆ rastvor za ispiranje, ○ rastvor za eluiranje

Slika 20. Faze prečišćavanja ekstrakata tropa cvekle primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi (redom: kondicioniranje, retencija, ispiranje, eluiranje)

Dobijeni ekstrakti su koncentrovani na rotacionom vakuum uparivaču do suva, pri čemu su dobijene sledeće mase suvih ostataka:

Cvekla Detroit: $m = 0,1622 \pm 0,0080$ g;

Cvekla Cardeal-F1: $m = 0,1109 \pm 0,0055$ g;

Cvekla Egipatska: $m = 0,1085 \pm 0,0052$ g;

Cvekla Bikor: $m = 0,2111 \pm 0,0106$ g;

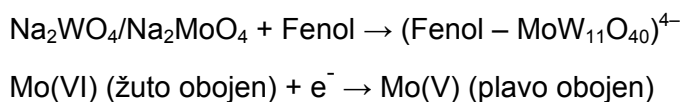
Cvekla Kestrel: $m = 0,0885 \pm 0,0043$ g.

3.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VLAGE U EKSTRAKTIMA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

Sadržaj vlage u ekstraktima tropa cvekle sorti Detroit, Cardeal-F1, Egipatska, Bikor i Kestrel određen je po Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća (Sl. list SFRJ, br. 29/83).

3.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH JEDINJENJA U EKSTRAKTIMA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE (METODA PO FOLIN-CIOCALTEU)

Metoda po Folin-Ciocalteu (Singleton i sar., 1999) je zasnovana na merenju redukujućeg kapaciteta fenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon. Nastali fenoksidni anjon redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (Fenol – MoW₁₁O₄₀)⁴⁻:



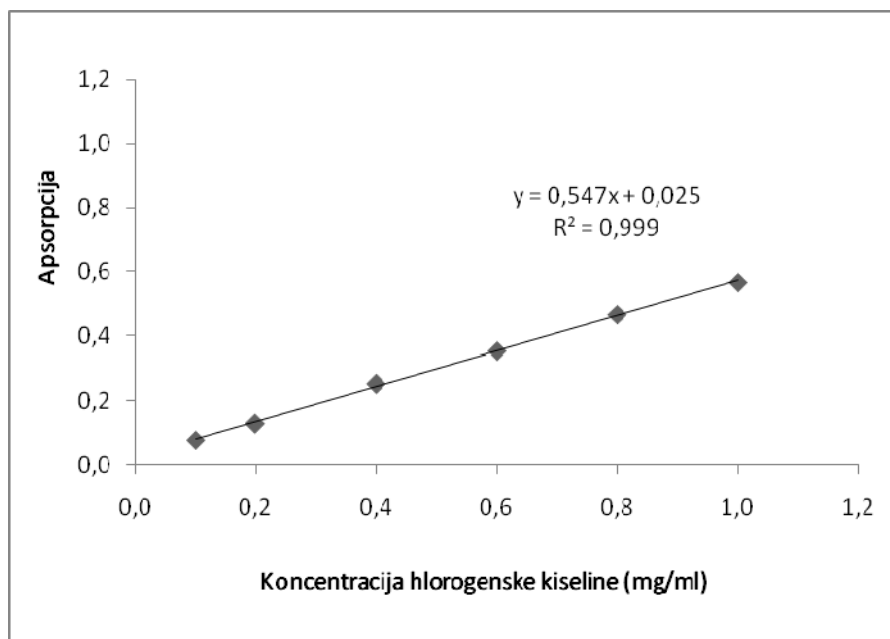
Rastvori i reagensi:

1. 20% rastvor Na₂CO₃,
20 g Na₂CO₃ rastvoreno je u 80 ml vode, uz zagrevanje (70°C);
2. Folin-Ciocalteu reagens;
3. Standardni rastvor hlorogenske kiseline,
50 mg hlorogenske kiseline rastvoreno je u 500 ml destilovane vode.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Reakciona smeša pripravljena je mešanjem 0,1 ml prečišćenog ekstrakta, 7,9 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% rastvora Na₂CO₃. Uporedo je pripravljena i slepa proba: 8 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% rastvora Na₂CO₃. Nakon 2 h izmerene su apsorbance na 750 nm (Shimadzu, Kyoto, Japan).

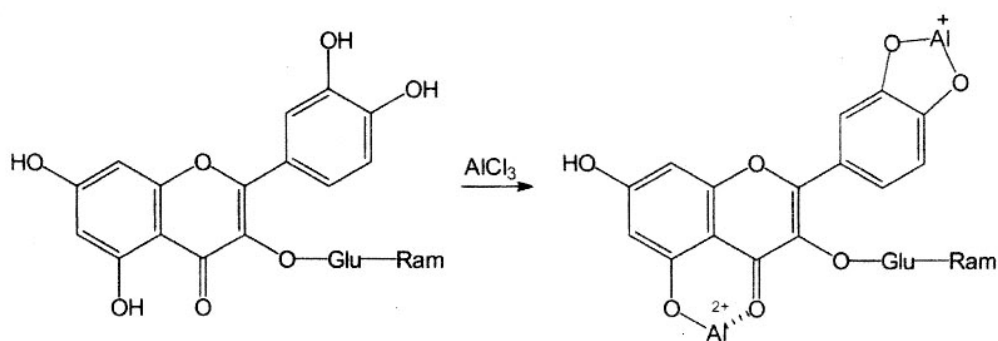
Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora hlorogenske kiseline (slika 21) očitana je koncentracija (mg/ml) fenolnih jedinjenja, a zatim je sadržaj fenolnih jedinjenja u prečišćenom ekstraktu izražen kao ekvivalent hlorogenske kiseline (mg hlorogenske kiseline/g suvog ekstrakta).



Slika 21. Kalibraciona kriva standardnog rastvora hlorogenske kiseline

3.5. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA U ESTRAKTIMA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE (METODA PO ZHISHENU)

Metoda po Zhishenu (Zhishen i sar., 1999) zasnovana je na osobini flavonoida i flavonglikozida iz biljnog materijala da sa metalima grade odgovarajuće metalo-komplekse. Naročito je značajan kompleks sa Al^{3+} .



Slika 22. Struktura rutina i njegov kompleks sa aluminijumom

Rastvori i reagensi:

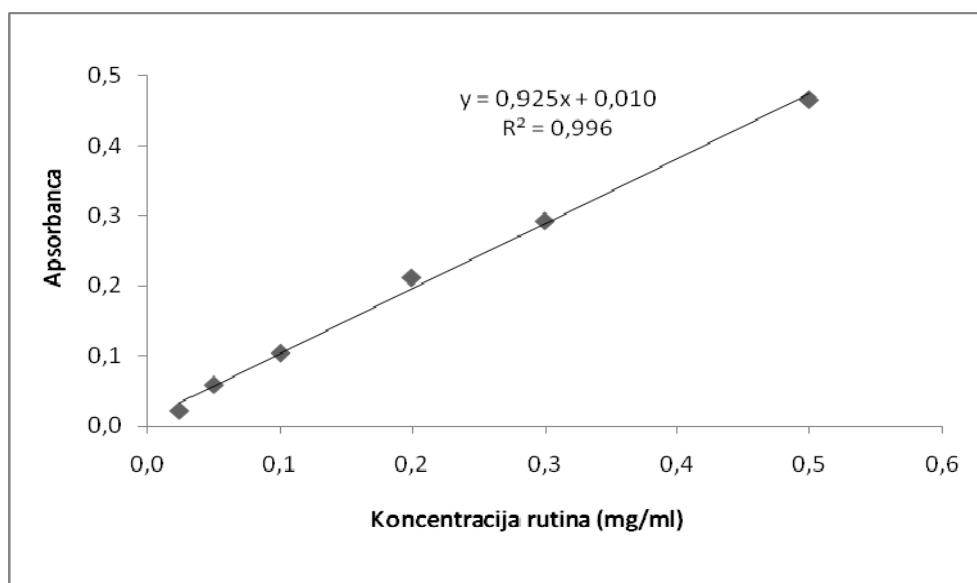
1. 5% rastvor Na-nitrita (NaNO_2),
0,5 g NaNO_2 rastvoreno je u 10 ml destilovane vode;
2. 10% rastvor AlCl_3 ,
1,7 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ rastvoreno je u 10 ml destilovane vode;

3. 1 mol/l rastvor NaOH,
2 g NaOH rastvoreno je u 50 ml destilovane vode;
4. Standardni rastvor rutina,
2,5 mg rutina rastvoreno je u 5 ml destilovane vode.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Reakciona smeša pripremljena je mešanjem 1 ml prečišćenog ekstrakta u 4 ml vode i 0,3 ml NaNO₂. Slepa proba je sadržala 5 ml vode i 0,3 ml NaNO₂. Nakon 5 minuta na sobnoj temperaturi, u smešu je dodato 0,3 ml rastvora AlCl₃. Nakon 6 minuta rastvor je požuteo i dodato je 2 ml NaOH. Rastvor je pocrveneo i dodato je vode do ukupne zapremine 10 ml. Apsorbance smeše su merene na 510 nm (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora rutina očitana je koncentracija (mg/ml) ukupnih flavonoida, a zatim je sadržaj ukupnih flavonoida u prečišćenim ekstraktima izražen kao ekvivalent rutina (mg rutina/g suvog ekstrakta).



Slika 23. Kalibraciona kriva standardnog rastvora rutina

3.6. ODREĐIVANJE BETALAINA U EKSTRAKTIMA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja betalaina je zasnovano na određivanju sadržaja betanina i vulgaksantina-I kao glavnih predstavnika betacijana i betaksantina (von Elbe, 2003).

Sadržaji betanina i vulgaksantina-I se izračunavaju pomoću koeficijenta apsorpcije $A^{1\%}$ koji predstavlja vrednost apsorpcije 1% rastvora (1 g/100 ml) i za betanin iznosi 1120, a za vulgaksantin-I 750.

Apsorpcioni maksimum, betanin ima na talasnoj dužini od 538 nm, a vulgaksantin-I na 476 nm. Međutim, betanin apsorbuje svetlost i na 476 nm što doprinosi izmerenoj vrednosti apsorpcije na ovoj talasnoj dužini i zbog toga je neophodna korekcija njene vrednosti, za iznos koji apsorbuje betanin. Apsorpcija betanina na 476 nm nije konstantna, zavisi od koncentracije, tako da se za izračunavanje koristi odnos A_{476}/A_{538} . U proračunima se uzima da je vrednost ovog odnosa 3,1 kada je pH reakcije smeše 6,5.

Sadržaj betanina je određen direktno, merenjem apsorpcije na 538 nm i korekcijom ove vrednosti za iznos apsorpcije merene na 600 nm (na ovoj talasnoj dužini se određuje apsorpcija obojenih nečistoća). Kada je apsorpcija rastvora na 538 nm između 0,4 i 0,5 AU, vrednost odnosa A_{538}/A_{600} uzima se da je 11,5. Zbog toga se rastvori pripremaju tako da im je apsorpcija u ovom opsegu.

Rastvori i reagensi:

0,05 M fosfatni pufer, pH 6,5,

0,3333 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ je rastvoreno u 30 ml destilovane vode i pomešano sa rastvorom KH_2PO_4 koji je dobijen rastvaranjem 0,4741 g KH_2PO_4 u 70 ml destilovane vode.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Odmerena je zapremina od 0,15 ml rastvora prečišćenih ekstrakata i dodata u odmerni sud od 15 ml, koji je zatim dopunjen fosfatnim puferom pH 6,5. Dobijenom rastvoru su merene apsorbanse na 538, 476 i 600 nm (Shimadzu, Kyoto, Japan). Kao slepa proba koristi se fosfatni pufer.

Tačne vrednosti apsorpcija betanina i vulgaksantina-I izračunate su prema sledećim formulama:

$$x = 1,095 \cdot (a - c)$$

$$y = b - z - x/3,1$$

$$z = a - x$$

gde su:

a - apsorpcija ekstrakta na 538 nm

b - apsorpcija ekstrakta na 476 nm

c - apsorpcija ekstrakta na 600 nm

x - apsorpcija betanina umanjena za vrednost apsorpcije obojenih nečistoća

y - apsorpcija vulgaksantina-I korigovana za vrednost apsorpcije betanina i obojenih nečistoća

z - apsorpcija nečistoća.

Koncentracije betanina i vulgaksantina-I u prečišćenim ekstraktima cvekle određene su prema formuli:

$$C \text{ (mg|100 ml)} = \frac{x \cdot F \cdot 1000}{A^{1\%}}$$

gde su:

F - faktor razblaženja (F=300)

A^{1%} - koeficijent apsorpcije (za betanin 1120, za vulgaksantin-I 750).

3.7. ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA U EKSTRAKTIMA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE HPLC METODOM

Sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle određen je tehnikom tečne hromatografije visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na aparatu HPLC Agilent 1200 serije (Agilent Technologies, USA). Korišćena je kolona Agilent, Eclipse XDB-C18, 1,8 µm, 4,6 x 50 mm. Detekcija razdvojenih pikova izvršena je primenom detektora sa serijom dioda (Diode Array Detector, DAD) na 280, 330 i 350 nm, a apsorpcioni spektri komponenata su snimljeni u opsegu od 190 do 400 nm, R 500/100 nm.

Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A – metanol HPLC čistoće i B – 1% mravlja kiselina u ultračistoj vodi (v/v). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0 – 6,2 min, 85% B; 6,2 - 8 min, 75% B; 8 - 15 min, 61% B; 15 - 20 min, 40% B; 20 - 25 min, 0% B. Završetak analize, odnosno „stop time“ je podešen na 25 min, nakon čega je koloni ostavljeno vreme da se uravnoteži na početne uslove 10% A, tako što je „posttime“ podešen na 10 min. Protok mobilne faze iznosio je 1 ml/min. Injektovano je 5 µl ekstrakta uzorka, automatski, korišćenjem autosamplera. Kolona je termostatirana na temperaturi 30°C. Za HPLC određivanja su korišćeni metanolni ekstrakti tropa cvekle. Analizirani su ekstrakti pripremljeni rastvaranjem u smeši metanola i 1% mravlja kiselina u vodi u odnosu 50:50. Dobijeni ekstrakti su pre injektovanja u aparat profiltrirani kroz filtere sa porama veličine 0,45 µm (Agilent, regenerisana celuloza). Fenolne komponente prisutne u ekstraktima tropa cvekle su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i

spektrum standarda za svaku komponentu. Korišćeni su standardi katehina, epikatehina, rutina, apigenina, miricetina, protokatehinske, galne, *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, hlorogenske, ferulne, sinapinske, ruzmarinske, vanilinske i kafene kiseline. Za potvrdu identifikacije komponente utvrđena je i čistoća pika. Kvantifikacija komponenata je izvršena metodom spoljašnjeg standarda. Za svaki pojedinačni standard je pripremljen metanolni rastvor standarda masene koncentracije 1,0 mg/ml. Od ovog rastvora je pripremljena serija razblaženih rastvora standarda masenih koncentracija u opsegu 0,002 - 0,030 mg/ml. Na osnovu dobijenih površina pikova u zavisnosti od koncentracije standarda konstruisana je kalibraciona kriva za svaki standard. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti koncentracije i površine pika izračunate su koncentracije pojedinih fenonih jedinjenja u ispitivanim uzorcima. Sve analize su izvršene u tri ponavljanja.

3.8. ODREĐIVANJE SADRŽAJA BETALAINA U EKSTRAKTIMA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE HPLC METODOM

Priprema standarda

Ekstrakcija. Cvekla (*Beta vulgaris*) je oprana, isečena na komade i odvojen je sok sokovnikom Neo SK-400. Trop cvekle (50 g) maceriran je 50% metanolom (100 ml) na ultrazvučnom kupatilu (30 min). Macerat je profiltriran. Postupak ekstrakcije je ponovljen sa 50 ml vode. Dobijeni ekstrakti su sjedinjeni i koncentrovani na rotacionom vakuum uparivaču dok nije uparen metanol na temperaturi ispod 30°C.

Hromatografija na papiru. Na papir za hromatografiju naneto je 1 ml rastvora ekstrakta tropa cvekle. Hromatogram je razvijen u kadici sa mobilnom fazom izopropanol-etanol-voda-sirćetna kiselina (6:7:6:1) (Sherma i Fried, 2003; Trejo-Trapia i sar., 2008).

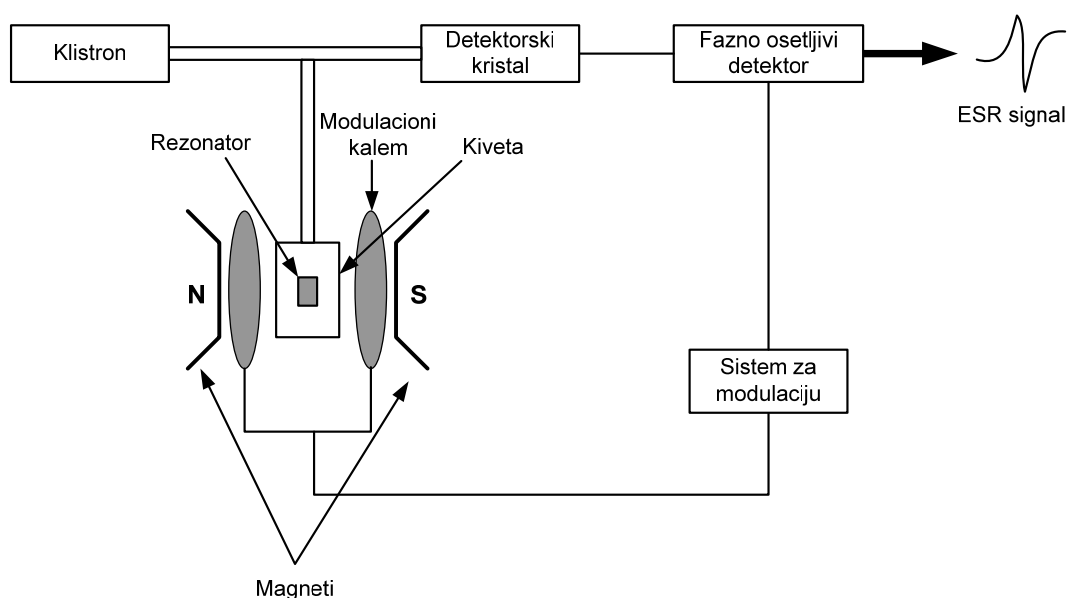
Betalaini u prečišćenim ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle određeni su tehnikom tečne hromatografije visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle određen je tehnikom tečne hromatografije visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na aparatu HPLC Agilent 1200 serije (Agilent Technologies, USA). Korišćena je kolona Agilent, Eclipse XDB-C18, 1,8 µm, 4,6 x 50 mm. Detekcija razdvojenih pikova izvršena je primenom detektora sa serijom dioda (Diode Array Detector, DAD) na 538 nm i 477 nm.

Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A – acetonitril HPLC čistoće i B– 0,5 % mravlja kiselina u ultračistoj vodi (v/v). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0 – 3 min, 100 % B; 3 – 30 min, 25 % B; 30 - 35 min,

100 % B. Završetak analize, odnosno „stop time“ je podešen na 35 min, „posttime“ podešen je na 5 min. Protok mobilne faze iznosio je 0,5 ml/min. Injektovano je 5 μ l ekstrakta uzorka, automatski, korišćenjem autosamplera. Kolona je termostatorirana na temperaturi 30 °C. Za HPLC određivanja su korišćeni vodeni ekstrakti tropa cvekle. Dobijeni ekstrakti su pre injektovanja u aparat profiltrirani kroz filtere sa porama veličine 0,45 μ m (Agilent, regenerisana celuloza). Betalaini (betacijani i betaksantini) prisutni u ekstraktima odabranih sorti cvekle su identifikovani poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom pripremljenog standarda ekstrakta tropa cvekle. Iz površine pika izračunate su koncentracije pojedinih betacijana i betaksantina u ispitivanim uzorcima. Sve analize su izvršene u tri ponavljanja.

3.9. ISPITIVANJE ANTIRADIKALSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

Antiradikalska aktivnost prečišćenih ekstrakata tropa cvekle određena je elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom. Blok šema ESR spektrometra prikazana je na slici 24.



Slika 24. Blok šema ESR spektrometra

3.9.1. ESR SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU SUPEROKSID ANJON RADIKALA

Superoksid anjon radikali su pripremljeni rastvaranjem KO_2 /kraunetar (10 mM/20 mM) u osušenom DMSO. Reakciona smeša se sastojala od 5 μl ove smeše, 0,5 ml osušnog DMSO i 5 μl rastvora DMPO u DMSO (2 M). Uticaj ekstrakata na formiranje i transformaciju njihovih DMPO-OOH „spin adukata“ ispitana je dodavanjem dimetilformamidnih rastvora ekstrakata tropa cvekle koncentracije 10 mg/ml, u reakcionu sistem u opsegu koncentracija:

- Cvekla Detroit: 0,05 – 2,0 mg/ml;
- Cvekla Cardeal-F1: 0,25 – 1,5 mg/ml;
- Cvekla Egipatska: 0,05 – 1,5 mg/ml;
- Cvekla Bikor: 0,025 – 1,25 mg/ml;
- Cvekla Kestrel: 0,05 – 1,25 mg/ml.

Paralelno je ispitan i uticaj sintetičkog antioksidanta BHA na transformaciju superoksid anjon radikala, u opsegu koncentracija 0,1 – 3,0 mg/ml.

Reakcione smeše su prenete u Bruker ER-160FC kvarcnu kivetu. ESR spektri su snimani na sobnoj temperaturi na ESR spektrometru Bruker 300E (Rheinstetten, Germany), pri sledećim uslovima:

- frekvencija modulacije 100 kHz
- amplituda modulacije 4,00 G
- vremenska konstanta 40,96 ms
- vremenski opseg merenja 327,68 ms
- centar polja 3440,00 G
- ukupan opseg merenja 100,00 G
- frekvencija mikrotalasnog područja 9,64 GHz
- jačina struje $1,00 \times 10^4$
- snaga mikrotalasnog područja 20 mW
- temperatura merenja 23°C.

Antiradikalna aktivnost ($AA_{\text{O}_2\cdot-}$) ekstrakata tropa cvekle definisana je izrazom:

$$AA_{\text{O}_2\cdot-} = (h_0 - h_x)/h_0 \times 100 (\%)$$

gde je:

h_0 – visina drugog pika ESR signala slepe probe;

h_x – visina drugog pika ESR signala uzorka sa ekstraktom ili sa BHA.

3.9.2. ESR SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU HIDROKSIL RADIKALA

Hidroksil radikali dobijeni su u Fentonovoj reakciji i detektovani „spin trapping“ metodom u sistemu koji se sastojao od: 0,2 ml H₂O₂ (2 mM), 0,2 ml FeCl₂ (0,3 mM), 0,2 ml N,N-dimetilformamida (DMF) i 0,2 ml DMPO (112 mM) kao „spin trapa“ (slepa proba). Uticaj ekstrakata tropa cvekle na koncentraciju „spin adukata“ hidroksil radikala ispitan je dodavanjem njihovih dimetilformamidnih rastvora ekstrakata tropa cvekle koncentracije 10 mg/ml, u reakcionu sistem u opsegu koncentracija:

- Cvekla Detroit: 0,01 – 0,25 mg/ml;
- Cvekla Cardeal-F1: 0,025 – 1,0 mg/ml;
- Cvekla Egipatska: 0,01 – 0,5 mg/ml;
- Cvekla Bikor: 0,0025 – 0,15 mg/ml;
- Cvekla Kestrel: 0,01 – 0,25 mg/ml.

Paralelno je ispitan i uticaj sintetičkog antioksidanta BHA na transformaciju „spin adukata“ hidroksil radikala, u opsegu koncentracija 0,1 – 3,0 mg/ml.

Smeša je intezivno mešana u toku 2,5 minuta i prenetu u Bruker ER-160 FC kvarcnu kivetu. ESR spektri su snimani na sobnoj temperaturi na ESR spektrometru Bruker 300E pri sledećim uslovima:

- frekvencija modulacije 100 kHz
- amplituda modulacije 0,226 G
- vremenska konstanta 80,72 ms
- vremenski opseg merenja 327,68 ms
- centar polja 3440,00 G
- ukupan opseg merenja 100,00 G
- frekvencija mikrotalasnog područja 9,64 GHz
- jačina struje 5,00 x 10⁵
- snaga mikrotalasnog područja 20 mW
- temperatura merenja 23°C.

Antiradikalska aktivnost (AA_{·OH}) ekstrakata tropa cvekle definisana je izrazom:

$$AA_{\cdot OH} = (h_o - h_x)/h_o \times 100 (\%)$$

gde je:

h_o – visina drugog pika ESR signala slepe probe;

h_x – visina drugog pika ESR signala uzorka sa ekstraktom ili sa BHA.

3.9.3. ESR SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE NA TRANSFORMACIJU DPPH[•] RADIKALA

Stabilni DPPH slobodni radikali ispitivani su u reakcionoj smeši koja je dobijena mešanjem 0,2 ml N,N-dimetilformamida (DMF) i 0,4 ml 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH[•] (slepa proba). Uticaj ekstrakata tropa cvekle na transformaciju DPPH[•] analiziran je u rastvoru koji je dobijen mešanjem: x ml dimetilformamidnog rastvora ekstrakata tropa cvekle koncentracije 10 mg/ml, (0,2 - x) ml DMF i 0,4 ml 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH[•]. Finalne koncentracije ispitivanih ekstrakata bile su u opsegu:

- Cvekla Detroit: 0,005 – 0,3 mg/ml;
- Cvekla Cardeal-F1: 0,025 – 1,0 mg/ml;
- Cvekla Egipatska: 0,05 – 1,0 mg/ml;
- Cvekla Bikor: 0,05 - 1,0 mg/ml;
- Cvekla Kestrel: 0,1 – 1,0 mg/ml.

Paralelno je ispitan i uticaj sintetičkog antioksidanta BHA na transformaciju DPPH[•], pri koncentracijama 0,005 - 0,2 mg/ml.

Smeša je intezivno mešana u toku 2 minuta i prenetu u Bruker ER-160 FC kvarcnu kivetu. ESR spektri su snimani na sobnoj temperaturi na ESR spektrometru Bruker 300E pri sledećim uslovima:

- frekvencija modulacije 100 kHz
- amplituda modulacije 0,256 G
- vremenska konstanta 40,96 ms
- vremenski opseg merenja 335,544 ms
- ukupan opseg merenja 100,00 G
- centar polja 3442,00 G
- frekvencija mikrotalasnog područja 9,45 GHz
- snaga mikrotalasnog područja 7,96 mW
- temperatura merenja 23°C.

Antiradikalska aktivnost ($AA_{DPPH^{\bullet}}$) ekstrakata tropa cvekle definisana je izrazom:

$$AA_{DPPH^{\bullet}} = (h_0 - h_x)/h_0 \times 100 (\%)$$

gde je :

h_0 - visina drugog pika ESR signala slepe probe;

h_x - visina drugog pika signala uzorka sa ekstraktom ili sa BHA.

3.10. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA ANTIRADIKALSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE NA DPPH RADIKALE

Uticaj ispitanih ekstrakata na sadržaj DPPH[•] određena je po modifikovanoj metodi Yen i Chen (1995). Radna proba je pripremljena mešanjem 1 ml rastvora 95% metanola sa ekstraktom tropa cvekle, 3 ml 95% metanola i 1 ml 90 µM DPPH[•] (18 mg u 50 ml 95% metanola sveže pripremljenog svakog dana). Slepa proba je sadržala sve komponente sem radikale. Reakciona smeša je izmešana vorteks-om 1 minut i ostavljena na tamnom mestu, na sobnoj temperaturi, 10 min. Opseg ispitivanih koncentracija ekstrakata tropa cvekle je bio 0,002 – 0,008 mg/ml. Kao referentna supstanca korišćen je metanolni rastvor sintetičkog antioksidanta BHA. Apsorbanca je merena na 517 nm (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Rastvori i reagensi:

1. 95% metanol;
2. 18 mg DPPH[•] rastvoreno je u 50 ml 95% metanola.

Antiradikalska aktivnost na DPPH[•] ($AA_{DPPH\cdot}$) određena je na osnovu jednačine:

$$AA_{DPPH\cdot} (\%) = (A_{kontrola} - A_{uzorak})/A_{kontrola} \times 100$$

gde su:

A_{uz} - apsorbanca uzorka (u prisustvu ekstrakta)

A_{kont} - apsorbanca kontrole (sadrži sve reagense sem ekstrakta).

EC₅₀ vrednost definisana je kao koncentracija ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50% DPPH radikala u uslovima koje definiše metoda, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije (Espin i sar., 2000).

3.11. ODREĐIVANJE UKUPNE REDUKCIONE SPOSOBNOSTI EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE (METODA PO OYAIZU)

Redukciona sposobnost ekstrakata određuje se metodom po Oyaizu (Oyaizu, 1986), koja se zasniva na praćenju apsorbanca na talasnoj dužini od 700 nm u zavisnosti od koncentracije ekstrakta. Kao referentna supstanca korišćen je rastvor sintetičkog antioksidanta BHA.

Rastvori i reagensi:

1. 1% kalijum-fericijanid ($K_3[Fe(CN)_6]$),
2. 10% trihlorsirćetna kiselina (m/V),
3. 0,1% ferihlorid ($FeCl_3$),
4. 200 mmol/l Na-fosfatni pufer pH 6,6;

Na-fosfatni pufer pH 6,6 dobijen je mešanjem 62,5 ml rastvora A i 37,5 ml rastvora B:

rastvor A: 200 mmol/l NaH_2PO_4 (6 g NaH_2PO_4 rastvoreno je u 250 ml destilovane vode)

rastvor B: 200 mmol/l Na_2HPO_4 (7,1 g Na_2HPO_4 rastvoreno je u 250 ml destilovane vode).

Spektrofotometrijsko određivanje:

Prečišćeni ekstrakti razblaženi su vodom kako bi se dobile serije razblaženja ekstrakata, masenih koncentracija 0,05 - 1,0 mg/ml. Kao kontrola je korišćen vodeni rastvor BHA, koji je pripremljen u seriji rastvora masene koncentracije 0,01 - 0,1 mg/ml. 1 ml ispitivanog ekstrakta je dodato u 1 ml vode, 1 ml fosfatnog pufera i 1 ml rastvora $K_3[Fe(CN)_6]$. Slepa proba je sadržala 2 ml vode, 1 ml fosfatnog pufera i 1 ml rastvora $K_3[Fe(CN)_6]$. Sadržaj smeše je inkubiran 20 min na $50^\circ C$ u vodenom kupatilu. Nakon hlađenja, u smešu je dodato 1 ml trihlorsirćetne kiseline.

Zatim je smeša centrifugirana 10 minuta na 3 000 obrtaja/min. i 2 ml supernatanta pomešano sa 2 ml destilovane vode i 0,4 ml rastvora $FeCl_3$. Apsorbanca smeše je merena na 700 nm (Shimadzu, Kyoto, Japan). Za svaki ispitani uzorak konstruisana je kriva zavisnosti između dobijenih vrednosti A_{700} nm i koncentracije rastvora ekstrakta (Oyaizu, 1986; Juntachote i Berghofer, 2005).

EC_{50} vrednost definisana je kao koncentracija pri kojoj je vrednost A_{700} nm jednaka 0,500, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije.

3.12. ODREĐIVANJE POVRŠINSKE BOJE EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

Površinska boja ekstrakata tropa cvekle je određena upotrebom hromometra MINOLTA, Chroma Meter CR-400 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan) sa D-65 osvetljenjem, 2° standardnim uglom posmatranja i 8-mm otvorom u glavi merenja. Rezultati su izraženi kao svetloća (L^*), udeo crvene boje (a^*) i žute boje (b^*), prema CIE $L^*a^*b^*$ sistemu (CIE, 1976).

Varijacija u boji je određena pomoću sledeće jednačine (Jaros i Rohm, 2001):

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

Boja ekstrakata tropa cvekle je izmerena na površini svakog uzorka ekstrakata tropa cvekle. Merenje boje je izvršeno u 3 ponavljanja.

3.13. ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

Određivanje citotoksičnog efekta na rast ćelijskih linija

Ćelijske linije. Ćelijske linije MCF7 (humani adenokarcinom dojke), HeLa (humani epitelni karcinom cerviksa) i MRC-5 (humani fetalni fibroblasti pluća) kultivisane su u DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) (PAA, Pashing, Austrija), sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (FCS) (PAA, Pashing, Austrija), 100 µg/ml streptomicina i 100 IU/ml penicilina (Galenika, Srbija) u Kartel (Kartel, Švajcarska) 25 cm² flaskovima, na 37°C u atmosferi 95% vazduha i 5% CO₂, pri visokoj relativnoj vlažnosti vazduha. Sve ćelijske linije su adherentne (tabela 1), a subkultivisane su dva puta nedeljno upotrebom 0,1% tripsina (Sigma, SAD) u 0,04% EDTA i tretirane u logaritamskoj fazi rasta.

Suspenzije ćelija gustine 4-5x10³ ćelija/180µl/otvoru, zavisno od vremena udvajanja (tabela 10), inokulisane su u Corning (Corning, SAD) mikrotitar ploče sa 96 otvora i preinkubirane 24h (pre dodavanja uzoraka).

Nakon preinkubacije od 24h ćelije su tokom tretmana inkubirane još 48h, što je adekvatno vremenu od 2-3 generacije ćelija u kontroli (tabela 10).

Dizajn eksperimenta. Za analizu ćelijskog rasta pripremljena su serijska razblaženja uzoraka u 0,9% NaCl. Uzorci su filtrirani 0,22 µm špric mikrofilterima. Ćelije u kulturi su bile izložene delovanju ispitanih uzoraka u trajanju od 48h, nakon čega su dobijeni efekti kvantifikovani sulforodamin B (SRB) kolorimetrijskim testom. Finalne koncentracije dobijene su dodavanjem 20 µl uzorka u 180 µl medijuma za kulturu ćelijskih linija sa 5% fetalnog telećeg seruma (FCS). Finalne koncentracije bile su u opsegu 1,95 - 1000 µg/ml. Kontrola ćelija dobijena je dodavanjem 20 µl 0,9 % NaCl (rastvarača).

Za sve eksperimente pripremljene su dve kontrole - kontrola medijuma koja je sadržala medijum za kulturu ćelija i kontrola ćelija koja je sadržala ćelije u medijumu za kulturu ćelija.

Tabela 10. Osnovne karakteristike ćelijskih linija

Ćelijska linija	Kataloški broj	Vrsta (Species)	Organ	Histološki tip/obolenje	Afinitet za podlogu	Vreme udvajanja [h] *
MCF7	ECACC** 86012803	Homo sapiens (čovjek)	dojka	Epitelne/ adenokarcinom dojke	adherentne	35
HeLa	ECACC** 93021013		grlić materice	Epitelne/ karcinom grlića materice		21
MRC-5	ECACC** 05090501		pluća	Fetalni fibroblasti/ zdravo tkivo		27

*Vreme potrebno da se broj ćelija uveća dva puta

**European Collection of Cell Cultures

Sulforodamin B (SRB) test

Ukupna količina proteina merena je sulforodamin B kvantitativnim kolorimetrijskim testom po Skehan-u (Skehan i sar., 1990). Sulforodamin B ($C_{27}H_{29}N_2O_7T_2Na$) (Sigma, SAD) je anjonska boja koja se u blago kiseloj sredini elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina. U blago baznoj sredini SRB je moguće rastvoriti, kvantitativno ekstrahovati iz ćelije i optički izmeriti da bi se utvrdio relativni ćelijski rast.

Postupak. Ćelije su fiksirane *in situ* hladnom 50% trihlorsirćetnom kiselinom (TCA) (50 μ l/otvoru 96 well ploče) 1h na temperaturi od 4°C. Ploče su isprane destilovanom vodom (4 puta) automatski (Wellwash 4, Labsystems) da bi se uklonila TCA, medijum, niskomolekularni metaboliti i proteini seruma. Nakon sušenja ploče su bojene 0,4% sulforodaminom B (0,4% u 1% sirćetnoj kiselini) (v/v) (75 μ l/otvoru), 30 minuta, na sobnoj temperturi. Boja je isprana (4 puta) 1% sirćetnom kiselinom automatski, a ploče ponovo osušene. Vezana boja ekstrahovana je 10mM TRIS (tris (hydroxymethyl) aminomethane) bazom (200 μ l/otvoru).

Fotometrijsko očitavanje

Pribor i aparatura. *Multiscan Ascent* je filter fotometar sa jednocanalnim, vertikalnim izvorom svetlosti za izvođenje standardnih fotometrijskih merenja. *Multiscan Ascent* koristi koncept vertikalne fotometrije pri kome snop svetlosti prolazi kroz ceo uzorak. Izvor svetlosti je kvarc-halogen lamp. Talasna dužina vrši se izborom jednog od osam filtera interferencije. Kvarcno optičko vlakno i sočiva daju visoko fokusiran svetlosni snop, koji prolazi kroz kivetu do detektora. Detektorsko kućište sastoji se od silikonskog fotodetektora, amplifikatora i optičkih sočiva.

U vertikalnoj fotometriji apsorpcija svetlosti proporcionalna je količini supstance u otvoru. ApSORBANCA (A) se izražava kao:

$$A = a/S \times m,$$

a = molarna apsorpcija supstance

S = poprečni presek površine upravne na izvor svetlosti

m = masa ispitivane supstance

Postupak

Mikrotitar ploče su očitane na talasnim dužinama:

$\lambda_1=540$ nm (test talasna dužina; oblast zelene svetlosti 500-580 nm) i

$\lambda_2=690$ nm (referentna talasna dužina za uklanjanje absorbance pozadine; oblast crvene svetlosti 620-750 nm).

Apsorbanca je dobijena kao $A=A_{540} - A_{690}$.

Procenat ćelijskog rasta je izražen kao procenat od kontrole (%K) i izračunat u odnosu na kontrolu, po formuli:

$$\% K = (A_x/A_0) \times 100$$

A_x = apsorbanca test otvora

A_0 = apsorbanca kontrolnog otvora

Statistička obrada podataka

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost (SD) dva nezavisna eksperimenta izvedena u kvadriplikatu (n=8). Razlike između kontrolnih i eksperimentalnih grupa određene su upotrebom jednostrane analize varijanse (one-way ANOVA) na nivou značajnosti od najmanje 0,05 ($p < 0,05$) i 0,01 ($p < 0,01$). EC_{50} vrednosti antiproliferativnih aktivnosti frakcija ispitivanih ekstrakata (koncentracije koje izazivaju inhibiciju rasta ćelija za 50%) određene su programom Calcsyn for Windows (Verzija 1.1.0.0.; Biosoft).

3.14. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKTA TROPA CVEKLE

Uzorak za ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Ispitana je antimikrobna aktivnost ekstrakta tropa cvekles rastvorenog u destilovanoj vodi u koncentraciji 100 mg/ml.

3.14.1. TEST MIKROORGANIZMI

Test mikroorganizmi za ispitivanje antimikrobne aktivnosti bili su referentne kulture i divlji izolati iz hrane i vode. Ispitani su sledeći mikroorganizmi: Gram-negativne bakterije: *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 10536) i divlji izolati: *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter youngae* i *Enterobacter cloacae*; Gram-pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) i divlji izolati: *Bacillus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii* spp. *cohnii*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus cohnii* spp. *urealyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus sciuri* i *Listeria monocytogenes*; kvasci: *Saccharomyces cerevisiae* (112, Hefebank Weihenstephan) i *Candida albicans* (ATCC 10231) i plesni: *Aspergillus niger* (ATCC 16404) and *Penicillium aurantiogriseum* (divlji izolat) koji je identifikovan prema Samson i saradnicima (2004). Divlji bakterijski izolati identifikovani su pomoću Vitek[®]2 Compact System-a (bioMérieux, France).

3.14.2. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Antimikrobna aktivnost ispitana je disk-difuzionom metodom (Kavanagh, 1972) i metodom „bunarčića“ (Mayo i sar., 1998). Test mikroorganizmi čuvaju su u tečnom azotu na predmetu Mikrobiologija Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Priprema test mikroorganizama za ispitivanja podrazumevala je njihovo dvostruko pasažiranje, pri čemu su bakterijske kulture presejavane na kosi Müller–Hinton agar (MHA; Himedia, Mumbai, India), a kvasci i plesni na kosi Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol agar (DRBC; Biokar diagnostics, Beauvais, France). Bakterijske kulture inkubirane su na 37 °C tokom 24h, kvasci na 25°C tokom 24h a plesni na 25°C tokom 7 dana. Nakon druge pasaže ćelije i spore su suspendovane u sterilnom fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl). 2 ml

suspenzije za inokulaciju (gustine 1×10^6 ćelija/ml, procenjeno Mc Farlandovim nefelometrom) homogenizovano je sa 18 ml otopljene i na 45 °C ohlađene hranljive podloge (MHA ili DRBC) i razliveno u Petri ploče.

Disk-difuziona metoda: nakon želiranja na inokulisanu podlogu su naneti sterilni diskovi prečnika 6 mm (Himedia, Mumbai, India) i impregnirani sa 15 µl uzorka (rastvora ekstrakta tropa cvekle).

Metoda „bunarčića“: nakon želiranja u inokulisanu podlogu su napravljeni „bunarčići“ prečnika 9 mm, staklenom sterilnom cevčicom uz pomoć vakuum pumpe. U „bunarčiće“ je mikropipetom naneto po 50 µl i 100 µl uzorka.

Za obe metode, nakon nanošenja uzorka Petri ploče su ostavljene u frižider na 8°C tokom 1 h da bi ekstrakt difundovao u podlogu i nakon toga inkubirane na 37°C tokom 24 h (bakterije), odnosno na 25°C tokom 48 h (kvasci) ili 72 h (plesni).

Ogled je urađen u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost prečnika zone inhibicije rasta (u mm) uz standardnu devijaciju.

3.14.3. ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI TEST MIKROORGANIZAMA NA REFERENTNE ANTIMIKROBNE SUPSTANCE

Osetljivost test mikroorganizama na referentne antimikrobne supstance ispitana je disk-difuzionom metodom. Za ispitivanje osetljivosti bakterija korišćen je kombinovani antibiotik (cefotaxime 30 µg/clavulanic acid 10 µg discs, Bioanalyse®, Ankara, Turkey) a za ispitivanje osetljivosti kvasaca i plesni korišćen je rastvor aktidiona (cycloheximide; Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, USA). Postupak pripreme test mikroorganizama i razlivanje u Petri ploče je identičan kao kod ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata tropa cvekle. Nakon želiranja na unokulisanu podlogu naneti su komercijalni diskovi sa kombinovanim antibiotikom i sterilni prazni diskovi prečnika 6 mm (Himedia, Mumbai, India) na koje je naneto 15 µl rastvora aktidiona koncentracije 0,03 g/ml.

Ogled je urađen u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost prečnika zone inhibicije rasta (u mm) uz standardnu devijaciju.

3.15. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja \pm standardna greška, osim ako nije naznačeno drugačije. Podaci su obrađeni primenom softverskog paketa Microsoft Excel for Windows, Origin 7.0. (OriginLab Corporation, Northampton, USA, 1991-2002) i STATISTICA (StatSoft, Inc. (2011) data analysis software system, version 10.0. www.statsoft.com).

4.0. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. EKSTRAKCIJA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

Količina fenolnih jedinjenja u ekstraktu, kao i sastav ekstrakta, u velikoj meri zavise od načina ekstrakcije, kao i od vrste i polarnosti rastvarača (Moller i sar., 1999). Jedinjenja iz klase fenola se veoma razlikuju po svojoj kiselosti i polarnosti (hidrofobni i hidrofilni).

Za ekstrakciju fenolnih jedinjenja koriste se rastvarači različite polarnosti: metanol, etanol, aceton, kao i njihovi procentualno različiti vodeni rastvori. Za ekstrakciju aktivnih jedinjenja iz cvekle, u literaturi, se najčešće preporučuju etanol (Georgiev i sar., 2010; Pavlov i sar., 2002) i voda (Kujala i sar., 2000; Herbach, 2006c).

Pored metode ekstrakcije, i drugi faktori utiču na sastav biljnih ekstrakata: tretmani biljke nakon vađenja iz zemlje i faktori koji uslovljavaju različite intraspecifične razlike kod biljaka (starost, fenološko stanje, oboljenja, i drugo) (Waterman i Mole, 1994). Objavljeni su radovi u kojima je utvrđeno da stabilnost boje ekstrakata cvekle zavisi od aktivnosti enzima polifenolaze prisutnog u svežoj cvekli i od temperaturnih uslova ekstrakcije. Stabilnost betalaina je najveća u opsegu pH od 4 do 5, pa je objavljena studija o efikasnosti dodatka 0,05% limunske i 0,01% askorbinske kiseline tokom ekstrakcije (Abeysakere, 1990).

Na osnovu rezultata dobijenih tokom preliminarnih istraživanja uticaja rastvarača na efikasnost ekstrakcije, kao i na osnovu literaturnih podataka, kao rastvarač za ekstrakciju u ovom radu, izabrana je smeša etanol:voda (50:50, v/v), uz dodatak 0,5% sirćetne kiseline.

4.2. SADRŽAJ VLAGE U EKSTRAKTIMA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

Sadržaj vlage u ekstraktima tropa cvekle sorti Detroit, Cardeal-F1, Egipatska, Bikor i Kestrel prikazan je u tabeli 11.

Tabela 11. Sadržaj vlage u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle

Trop cvekle	Sadržaj vlage (%)
Detroit	83,21
Cardeal-F1	88,72
Egipatska	72,46
Bikor	80,06
Kestrel	91,02

4.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE FENOLNIH JEDINJENJA I BETALAINA U EKSTRAKTIMA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

U tabelama 12 i 13 prikazani su rezultati spektrofotometrijskih određivanja fenolnih jedinjenja u prečišćenim ekstraktima tropa ispitivanih sorti cvekle.

Tabela 12. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u prečišćenim ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle određen spektrofotometrijskim metodama

TROP CVEKLE	UKUPNA FENOLNA JEDINJENJA		UKUPNI FLAVONOIDI	
	mg ekvivalenata hlorogenske kiseline/g suvog ekstrakta	mg ekvivalenata hlorogenske kiseline/g suvog tropa	mg ekvivalenata rutina /g suvog ekstrakta	mg ekvivalenata rutina /g suvog tropa
Detroit	730,61 ± 36,52 ^a	7,06 ± 0,35 ^a	368,07 ± 18,40 ^a	3,56 ± 0,16 ^a
Cardeal-F1	565,28 ± 28,25 ^b	5,55 ± 0,26 ^b	278,92 ± 13,94 ^b	2,74 ± 0,13 ^b
Egipatska	396,61 ± 19,82 ^c	1,56 ± 0,07 ^c	196,20 ± 9,81 ^c	0,77 ± 0,03 ^c
Bikor	942,33 ± 47,10 ^d	9,98 ± 0,48 ^d	461,03 ± 23,05 ^d	4,88 ± 0,23 ^d
Kestrel	695,93 ± 34,78 ^a	6,86 ± 0,34 ^a	419,95 ± 20,98 ^d	4,14 ± 0,20 ^e

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška. Vrednosti u koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Rezultati spektrofotometrijskih ispitivanja ukazuju da je najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida utvrđen u ekstraktu tropa cvekle sorte Bikor.

Georgiev i saradnici (2010) su objavili da se sadržaj fenolnih jedinjenja u vodenom ekstraktu cvekle sorte Detroit kreće u opsegu od 47 do 944 mg ekvivalenta ferulne kiseline/g suvog ekstrakta. Dok su Kujala i saradnici objavili da sadržaj ovih jedinjenja varira od 4,2 do 15,5 mg ekvivalenta galne kiseline/g suvog materijala u zavisnosti koji deo biljke je korišćen za ekstrakciju.

Saopšteno je da na sadržaj fenolnih jedinjenja utiču genotip, mesto i tehnika gajenja, kao i razlike u zrelosti biljke (Orhan i sar., 2007). Takođe, spoljašnji faktori poput svetlosti, temperature, prisustva hranljivih materija u zemljištu mogu uticati na fenilpropionidni metabolizam (Dixon i Paiva, 1995).

Veliki broj istraživanja ukazuje da uslovi gajenja i kasnijeg tretiranja biljnih sirovina u značajnoj meri utiču na sadržaj flavonoida. Dokazano je da je sadržaj flavonoida direktno zavisno od UV zračenja i koncentracije ugljendioksida (Daniel i sar., 1999; Caldwell i sar., 2005).

Tabela 13. Sadržaj betalaina u prečišćenim ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle određen spektrofotometrijskim metodama

TROP CVEKLE	SADRŽAJ BETALAINA				Odnos Bc:Bx
	Betacijani		Betaksantini		
	mg betanina / g suvog ekstrakta	mg betanina / g suvog tropa	mg vulgaksantina I / g suvog ekstrakta	mg vulgaksantina I / g suvog tropa	
Detroit	220,56 ± 11,02 ^a	2,13 ± 0,11 ^a	69,52 ± 3,47 ^a	0,67 ± 0,03 ^a	1 : 0,31
Cardeal-F1	127,40 ± 6,36 ^b	1,25 ± 0,06 ^c	75,06 ± 3,75 ^a	0,74 ± 0,04 ^a	1 : 0,59
Egipatska	117,96 ± 5,88 ^c	0,46 ± 0,02 ^b	72,66 ± 3,63 ^a	0,29 ± 0,01 ^b	1 : 0,63
Bikor	187,71 ± 9,38 ^d	1,99 ± 0,09 ^a	165,93 ± 8,29 ^b	1,76 ± 0,08 ^c	1 : 0,88
Kestrel	62,75 ± 3,13 ^d	0,62 ± 0,03 ^d	46,59 ± 2,32 ^c	0,46 ± 0,02 ^d	1 : 0,74

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška. Vrednosti u koloni označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Nemzer i saradnici (2011) su ispitivali odnos ljubičastih i žutih pigmenata cvekle (Bc:Bx), i utvrdili da se taj odnos se kretao od 1:0,33 do 1:0,85. Koncentracija betacijana je bila od 0,18 do 23 mg, dok betaksantina od 0,12 do 18,1 mg/g suvog ekstrakta. Sadržaj ukupnih betalaina u istraživanjima Georgiev i saradnika (2010) bio je od 39,76 do 47,11 mg/g suvog ekstrakta.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja izmeren metodom po Folin-Ciocalteu ne pruža kompletnu sliku o kvantitetu i kvalitetu fenolnih jedinjenja u ekstraktima, zbog mogućeg prisustva interferirajućih jedinjenja (šećeri, aromatični amini, sumpor-dioksid, vitamin C,

organske kiseline, i druge supstance koje nisu fenolnog porekla) koja utiču na nerealno povećanje rezultata (Singleton i sar., 1999).

U eksperimentalnom radu ove doktorske disertacije interferirajuće supstance poput šećera, organskih kiselina i polarnih jedinjenja su uklonjene primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi, tzv. prečišćavanjem ekstrakta. Ali se na osnovu visokih dobijenih vrednosti za sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima tropa ispitivanih sorti cvekle, u odnosu na literaturne podatke, pretpostavlja da je deo interferirajućih jedinjenja koja reaguju sa Folin-Ciocalteu reagensom i dalje ostao prisutan. Zbog toga je kompletna kvalitativna i kvantitativna identifikacija fenolnih jedinjenja, kao i betalaina ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle izvršena primenom HPLC metode.

4.3. HPLC ANALIZA EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

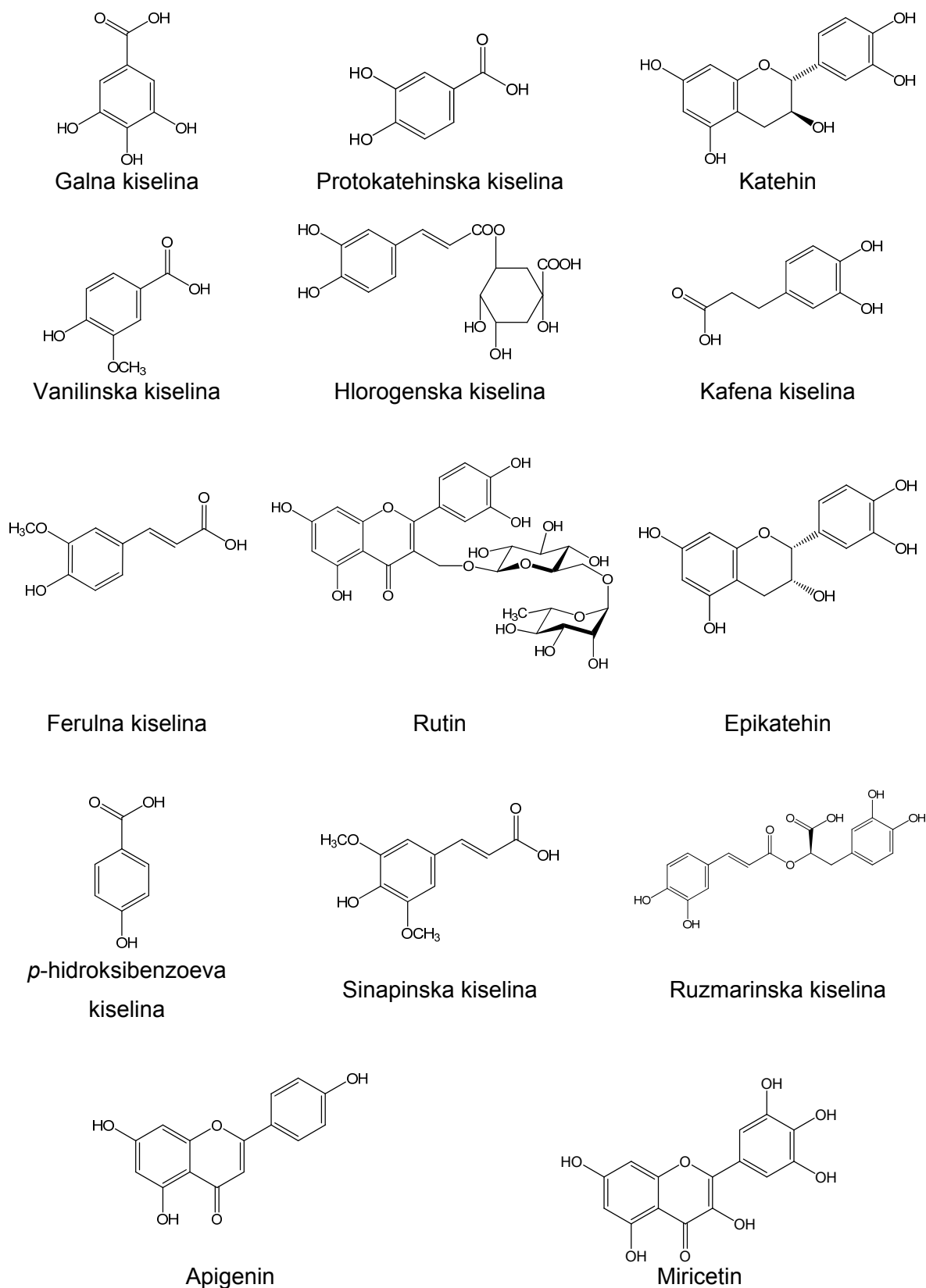
Sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima tropa odabranih sorti cvekle određen je tehnikom tačne hromatografije visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Detekcija razdvojenih pikova izvršena je na 280, 330 i 350 nm. Korišćeni su standardi katehina, epikatehina, rutina, apigenina, miricetina, protokatehinske, galne, *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, hlorogenske, ferulne, sinapinske, ruzmarinske, vanilinske i kafene kiseline.

U tabeli 14 prikazani su rezultati HPLC analize dobijenih ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle.

Kvantitativnom HPLC analizom sastava fenolnih jedinjenja ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle određeno je prisustvo katehina, epikatehina, rutina, apigenina, miricetina, protokatehinske, galne, *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, hlorogenske, ferulne, sinapinske, ruzmarinske, vanilinske i kafene kiseline. U svih pet ekstrakata tropa cvekle su identifikovane i kvantifikovani katehin, protokatehinska i ferulna kiselina. Kod ekstrakata tropa cvekle sorti Egipatska, Bikor, Detroit i Kestrel identifikovana je i kvantifikovana hlorogenska kiselina. Kod sorti Detroit i Kestrel galna kiselina. Vanilinska kiselina kod sorti Cardeal-F1 i Kestrel. Kafena kiselina kod sorti Cardeal-F1 i Egipatska. Sinapinska kiselina kod sorti Cardeal-F1 i Bikor. *P*-hidroksibenzoeva kiselina kod sorti Bikor i Kestrel. Sinapinska kod sorti Cardeal-F1 i Bikor. Rutin, glikozid flavonoida kvercetin, kod sorti Cardeal-F1, Bikor i Kestrel. Flavon, apigenin i flavonol, miricetin kod sorte Cardeal-F1. Hemijske strukture identifikovanih jedinjenja prikazane su na slici 25.

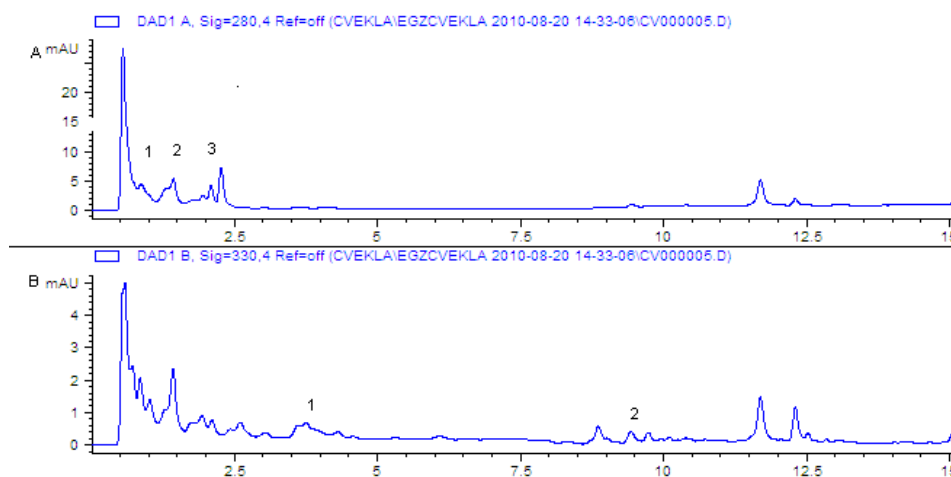
Tabela 14. Kvalitativan i kvantitativan sastav ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle

Trop cvekle	Jedinjenja	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta)
Detroit	Galna kiselina	0,63 ± 0,02
	Protokatehinska kiselina	5,80 ± 0,25
	Katehin	35,68 ± 1,75
	Hlorogenska kiselina	0,47 ± 0,02
	Ferulna kiselina	0,87 ± 0,03
Ukupno		43,45
Cardeal-F1	Protokatehinska kiselina	0,60 ± 0,03
	Katehin	37,50 ± 1,87
	Vanilinska kiselina	1,21 ± 0,06
	Kafena kiselina	0,21 ± 0,01
	Ferulna kiselina	0,32 ± 0,02
	Sinapinska kiselina	0,18 ± 0,01
	Ruzmarinska kiselina	0,52 ± 0,03
	Apigenin	0,17 ± 0,01
	Rutin	0,15 ± 0,01
	Miricetin	0,20 ± 0,01
Ukupno		41,06
Egipatska	Protokatehinska kiselina	0,29 ± 0,01
	Katehin	30,06 ± 1,50
	Epikatehin	0,17 ± 0,01
	Kafena kiselina	0,16 ± 0,01
	Hlorogenska kiselina	0,14 ± 0,01
	Ferulna kiselina	0,16 ± 0,01
Ukupno		30,98
Bikor	Protokatehinska kiselina	5,21 ± 0,26
	Katehin	68,71 ± 3,43
	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	1,15 ± 0,05
	Epikatehin	0,56 ± 0,02
	Hlorogenska kiselina	1,83 ± 0,09
	Ferulna kiselina	0,38 ± 0,02
	Sinapinska kiselina	0,18 ± 0,01
	Ruzmarinska kiselina	0,29 ± 0,01
	Rutin	0,37 ± 0,02
Ukupno		78,68
Kestrel	Galna kiselina	1,04 ± 0,05
	Protokatehinska kiselina	2,68 ± 0,13
	Katehin	24,39 ± 1,21
	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,64 ± 0,03
	Vanilinska kiselina	0,71 ± 0,03
	Hlorogenska kiselina	0,67 ± 0,03
	Ferulna kiselina	0,13 ± 0,01
	Rutin	0,15 ± 0,01
Ukupno		30,41



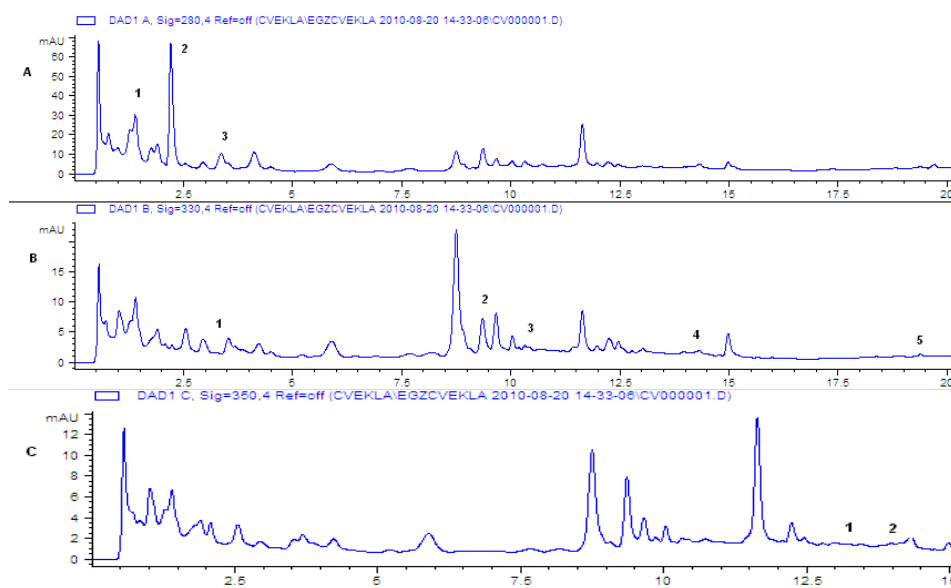
Slika 25. Hemijske strukture fenolnih jedinjenja identifikovanih u isitivanim ekstraktima tropa različitih sorti cvekle

Na slici 26 prikazani su hromatogrami ekstrakta tropa cvekle sorte Detroit. Pod opisanim hromatografskim uslovima (3.7), komponente su eluirale prema sledećem rasporedu: galna kiselina (1), protokatehinska kiselina (2) i katehin (3) na 280 nm, hlorogenska (1) i ferulna kiselina (2) na 330 nm.



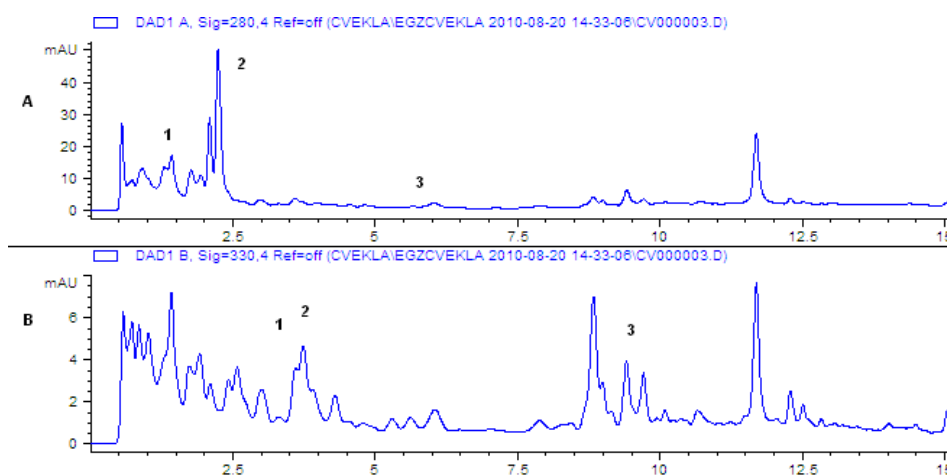
Slika 26. Hromatogram ekstrakta tropa cvekle sorte Detroit: A - na 280 nm i B – na 330 nm

Hromatogrami ekstrakta tropa cvekle sorte Cardeal-F1 prikazani su na slici 27. Identifikovane su i kvantifikovane protokatehinska kiselina (1), katehin (2) i vanilinska kiselina (3) na 280 nm, kafena (1), ferulna (2), sinapinska (3), ruzmarinska kiselina i apigenin na 330 nm, a rutin (1) i miricetin (2) na 350 nm.



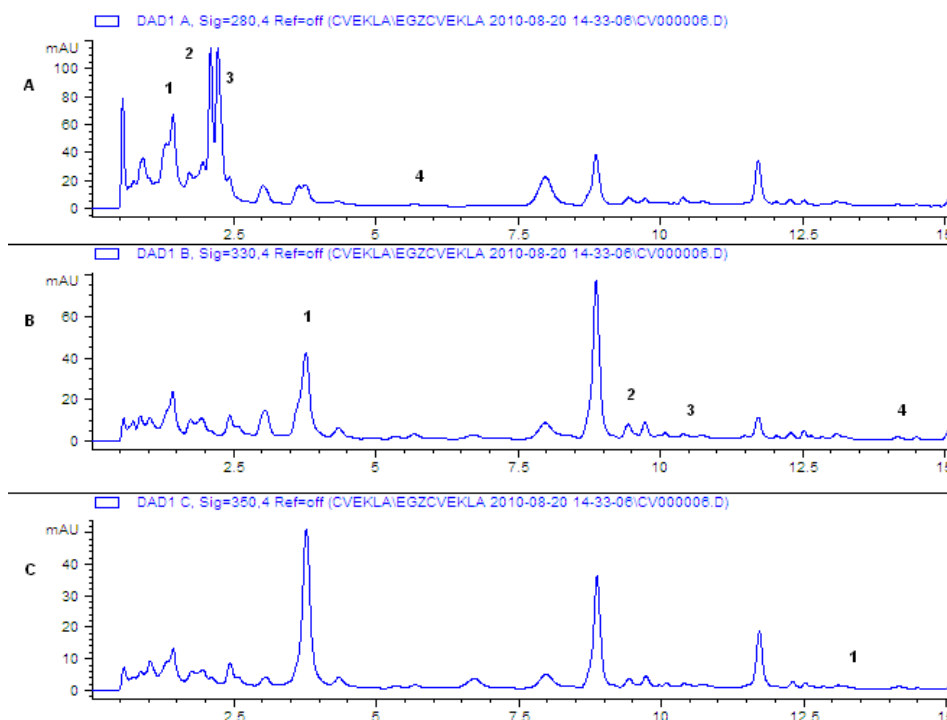
Slika 27. Hromatogram ekstrakta tropa cvekle sorte Cardeal-F1: A - na 280 nm, B – na 330 nm i C – 350 nm

Na slici 28 prikazani su hromatogrami ekstrakta tropa cvekle sorte Egipatska. Pod opisanim hromatografskim uslovima (3.7), identifikovane i kvantifikovane komponente su eluirale prema sledećem rasporedu: protokatehinska kiselina (1), katehin (2) i epikatehin (3) na 280 nm i kafena (1), hlorogenska (2) i ferulna kiselina (3) na 330 nm.



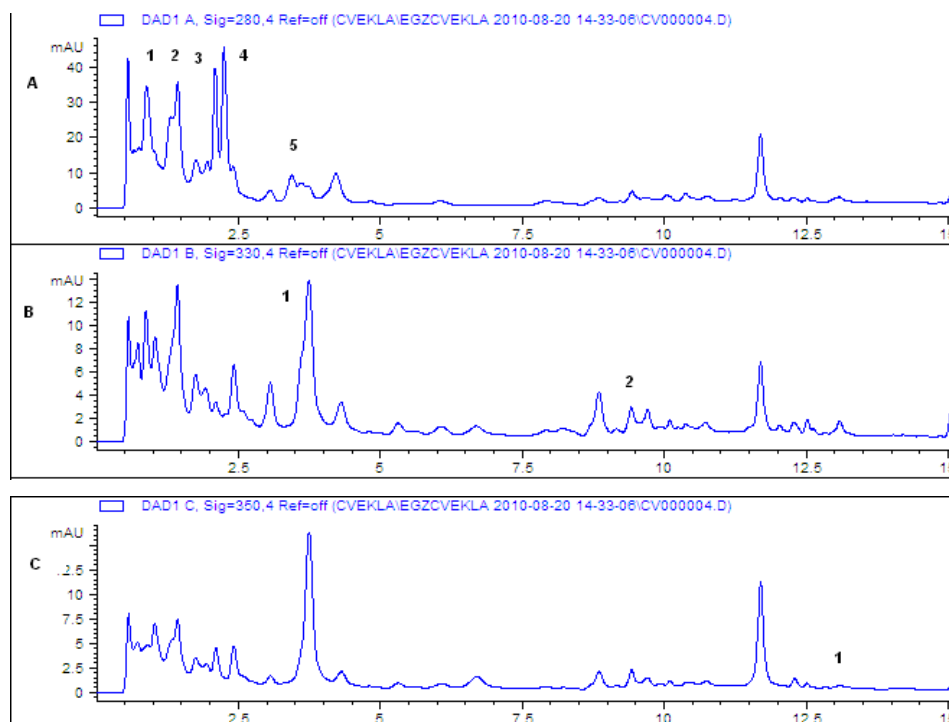
Slika 28. Hromatogram ekstrakta tropa cvekle sorte Egipatska: A - na 280 nm i B – na 330 nm

Hromatogrami ekstrakta tropa cvekle sorte Bikor prikazani su na slici 29. Identifikovane su i kvantifikovane protokatehinska kiselina (1), katehin (2), *p*-hidroksibenzoeva kiselina (3) i epikatehin (4) na 280 nm, hlorogenska (1), ferulna (2), sinapinska (3) i ruzmarinska kiselina (4) na 330 nm, a rutin (1) na 350 nm.



Slika 29. Hromatogram ekstrakta tropa cvekle sorte Bikor: A - na 280 nm, B – na 330 nm i C – 350 nm

Na slici 30 prikazani su hromatogrami ekstrakta tropa cvekle sorte Kestrel. Pod opisanim hromatografskim uslovima (3.7), komponente su eluirale prema sledećem rasporedu: galna kiselina (1), protokatehinska kiselina (2), katehin(3), *p*-hidroksibenzoeva kiselina (4) i vanilinska kiselina (5) na 280 nm (A), hlorogenska (1) i ferulna kiselina (2) na 330 nm (B), a rutin (1) na 350 nm (C).



Slika 30. Hromatogram ekstrakta tropa cvekle sorte Kestrel: A - na 280 nm, B – na 330 nm i C – 350 nm

Kujala i saradnici (2001) su identifikovali *p*-kumarinsku i ferulnu kiselinu u ekstraktu kore cvekle, a Georgiev i saradnici (2010) *p*-hidroksibenzoevu (0,012 - 0,396 mg/g suvog ekstrakta), hlorogensku (0,018 mg/g suvog ekstrakta), kafenu kiselinu (0,037 - 0,203) mg/g suvog ekstrakta), katehin hidrat (0,047 - 0,372 mg/g suvog ekstrakta), epikatehin (0,032 - 0,857 mg/g suvog ekstrakta) i rutin (1,096 mg/g suvog ekstrakta) u ekstraktima tropa cvekle sorte Detroit HPLC metodom.

Rezultati HPLC analize pokazali su da je najzastupljenije jedinjenje fenolne strukture katehin, i to u svim ispitivanim ekstraktima tropa različitih sorti cvekle. Najveći sadržaj je određen kod ekstrakta tropa cvekle sorte Bikor i iznosio je $68,71 \pm 3,43$ mg/g suvog ekstrakta, što je 87,33% ukupnih fenolnih jedinjenja u tom ekstraktu. Georgiev i saradnici (2010) identifikovali su katehin hidrat u ekstraktima cvekle (0,047 – 0,372 mg/g suvog ekstrakta). Katehin je identifikovan u svim ekstraktima tropa cvekle u značajno većim količinama, što ukazuje na bogat sadržaj ovog fenolnog jedinjenja u tropu.

Takođe, u svim ekstraktima tropa cvekle identifikovana je protokatehinska kiselina, a cvekle Detroit, Bikor i Kestrel imale su visok sadržaj ovog jedinjenja. Ekstrakt tropa

cvekle sorte Bikor pokazao je visok sadržaj *p*-hidroksibenzojeve kiseline ($1,15 \pm 0,05$ mg/g suvog ekstrakta), dok su Georgiev i saradnici objavili da je sadržaj u ekstraktima cvekle bio 0,012 - 0,396 mg/g suvog ekstrakta. Ekstrakt tropa cvekle sorte Bikor sadržao je $1,83 \pm 0,09$ mg/g suvog ekstrakta hlorogenske kiseline, a ekstrakt cvekle Georgiev i saradnika (2010) nižu vrednost, 0,018 mg/g suvog ekstrakta. Do sada nije objavljen ni jedan rad o fenolnom sastavu tropa cvekle. Bogat sastav fenolnih jedinjenja u ekstraktima tropa cvekle ukazuje da je trop cvekle dobar izvor fenolnih jedinjenja.

Vrednosti koje su dobijene za sadržaj ukupnih rastvorljivih fenola primenom spektrofotometrijske metode znatno su veće od vrednosti dobijene HPLC metodom (tabele 11 i 13). Ovako dobijeni rezultati u skladu su sa rezultatima Georgiev i saradnika (2010).

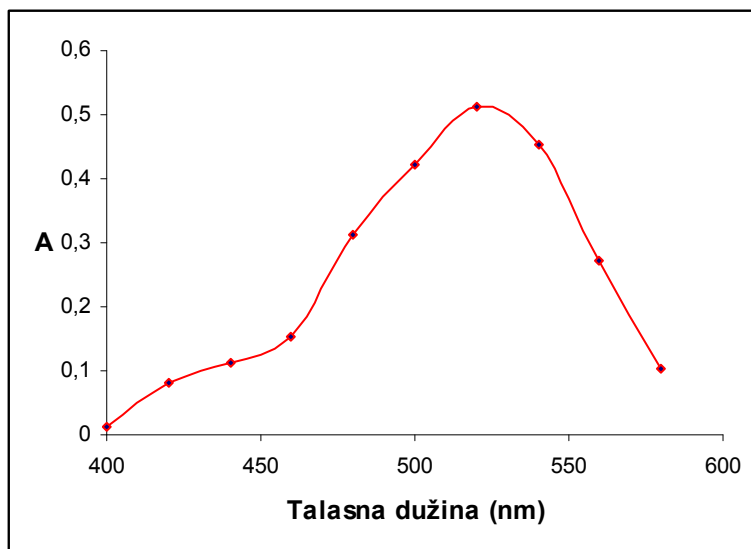
Uočljive razlike su posledica primene različitih metoda za određivanje fenolnih jedinjenja. Folin-Ciocalteu metoda za određivanje sadržaja ukupnih rastvorljivih fenolnih jedinjenja je relativno nespecifična i nejednako osetljiva prema prisustvu različitih fenolnih jedinjenja i flavonoida, ali i prisustvo mnogih interferirajućih jedinjenja u uzorku (šećeri i vitamin C), mogu uticati na sadržaj fenolnih jedinjenja.

Utvrđena je vrlo dobra korelacija za ukupne sadržaje fenolnih jedinjenja određenih Folin-Ciocalteu metodom i HPLC metodom ($r=0,805$).

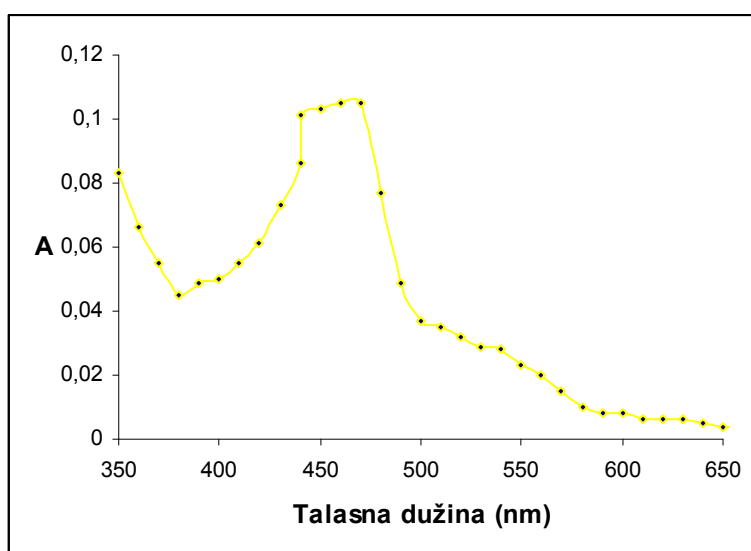
Betalaini se sastoje od betalaminske kiseline, koja sa cyclo-DOPA formira crvene betacijane (absorbanca od 530 do 545 nm), a sa različitim aminokiselinama i aminima žute betaksantine (absorbanca od 475 do 485 nm) (Strack i sar., 2003; Castellar i sar., 2003). Betalaini, prehrambene boje, u vodi su rastvorni, nije im potrebna hemijska modifikacija za široku primenu kod prehrambenih proizvoda i ne utiču negativno na aromu hrane. Takođe, betaksantini mogu biti dobar izvor esencijalnih aminokiselina u hrani (Delgado-Vargas i sar., 2000).

Usled nedostatka komercijalnih standarda betalaina za HPLC analizu betalaina pripremani su standardi iz ekstrakta tropa cvekle.

Urađena je hromatografska metoda, hromatografija na papiru, i dobijene su crvena i žuta frakcija betalaina ekstrakta tropa cvekle. Nakon razvijanja hromatograma dobijene su R_f vrednosti. R_f vrednost crvene frakcije (betacijani) iznosila je $R_{f1}=0,36$, a žute frakcije (betaksantini) $R_{f2}=0,44$. Spektrofotometrijski su određeni absorpcioni spektri crvene i žute frakcije (slika 31 i 32).



Slika 31. Spektrofotometrijski određen spektar crvene frakcije

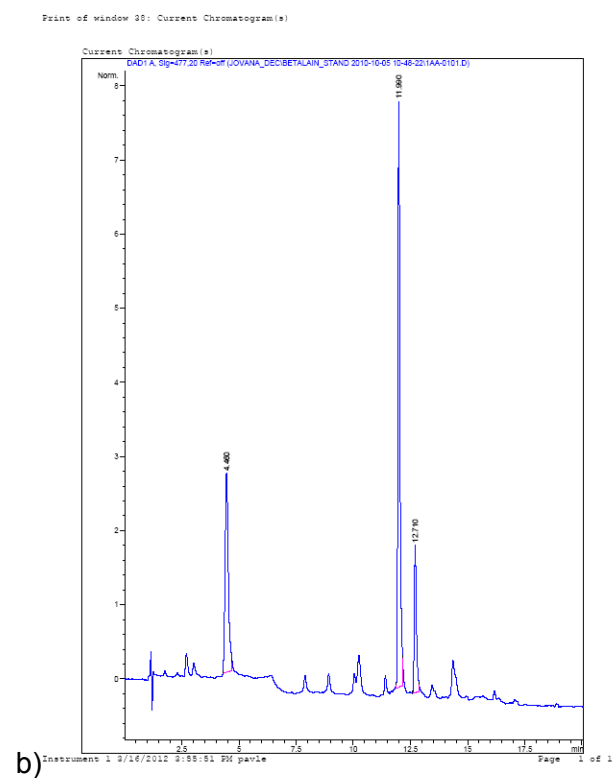
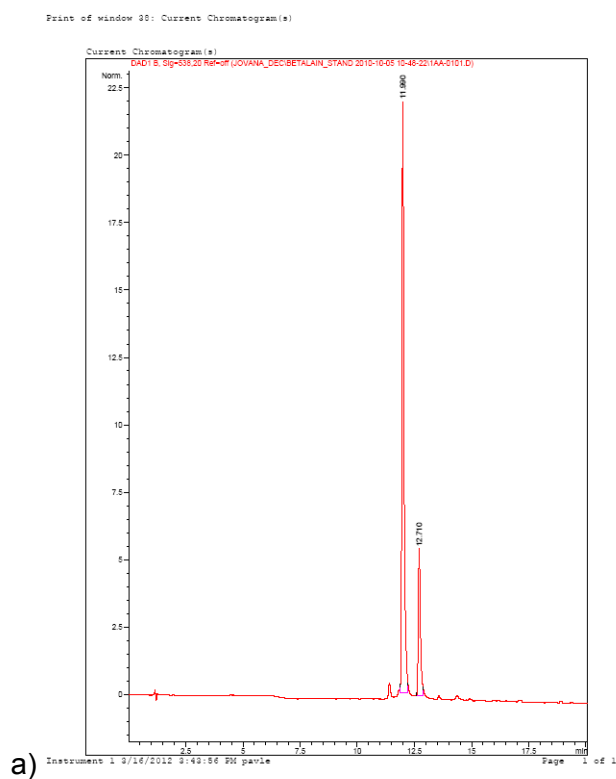


Slika 32. Spektrofotometrijski određen spektar žute frakcije

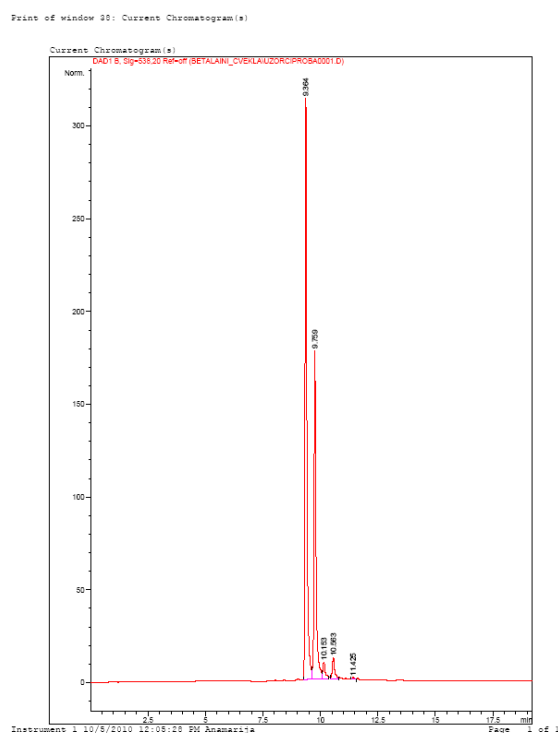
Viloria-Matos i saradnici (2001) odredili su R_f vrednosti crvene i žute frakcije betalaina *Opuntia boldinghii*. R_f vrednost crvene frakcije iznosila je 0,55, a žute 0,72. Takođe, snimljen je i UV spektar *Beta vulgaris* i *Opuntia boldinghii*, koji odgovara ovde prikazanom spektru crvene frakcije.

Takođe, urađena je HPLC analiza TLC frakcije ekstrakta tropa cvekle na 538 nm i 477 nm, koji je korišćen kao standard betalaina. Dobijeni su hromatogrami betacijana na 538 nm (11,990 min i 12,710 min) i betaksantina na 477 nm (4,460 min). Hromatogrami su prikazani na slici 33.

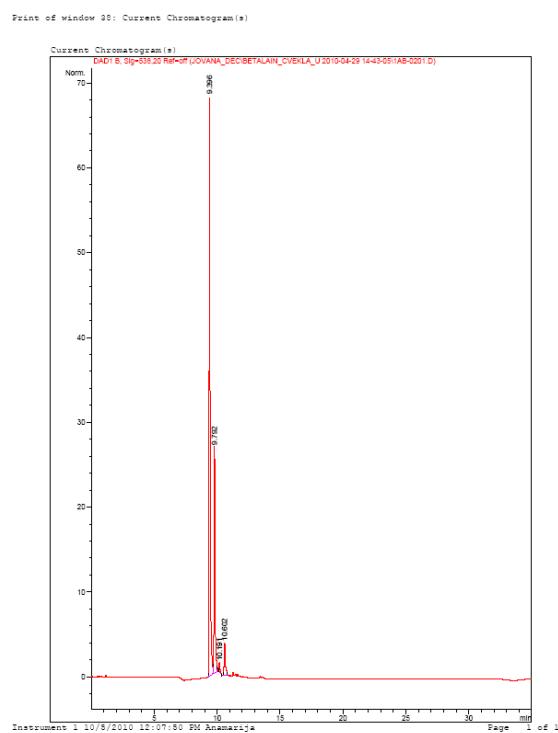
Na osnovu preparativno dobijenih standarda i pikova na hromatogramima pripremljenih standarda izračunata je koncentracija razdvojenih jedinjenja.



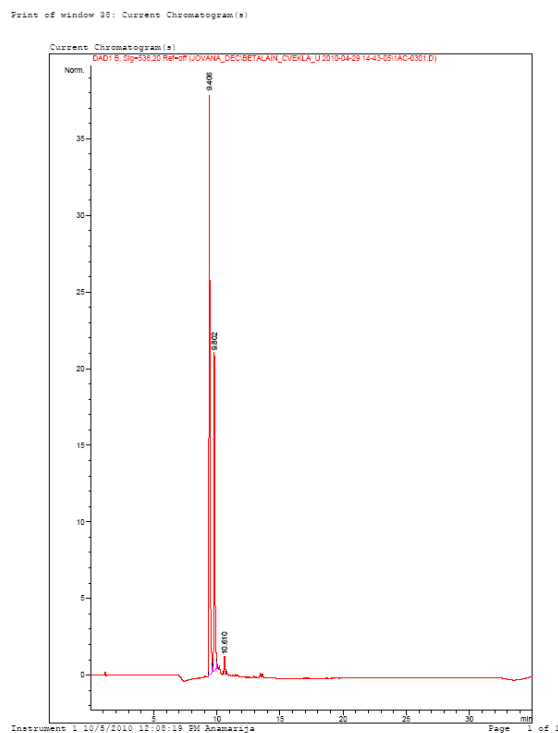
Slika 33. HPLC hromatogram betalaina standarda cvekle na a) 538 nm i b) 477 nm



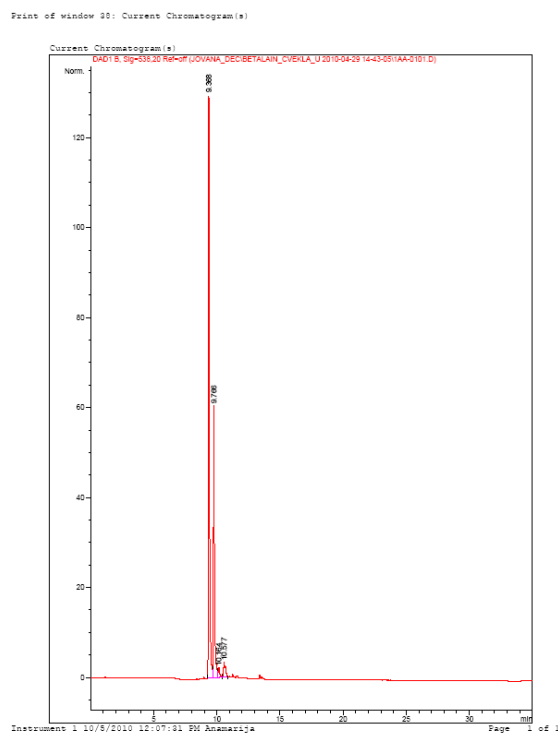
Slika 34. HPLC hromatogram identifikovanih betacijana na 538 nm u ekstrakturopa cvekle sorte Detroit



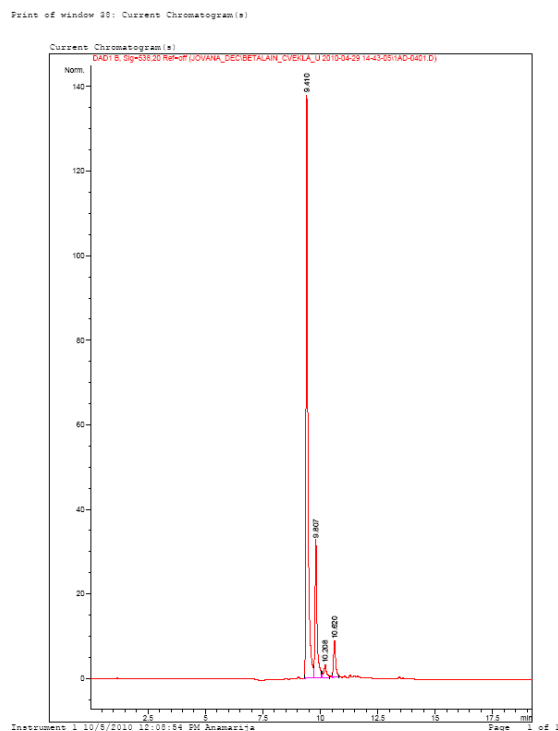
Slika 35. HPLC hromatogram identifikovanih betacijana na 538 nm u ekstrakturopa cvekle sorte Cardeal-F1



Slika 36. HPLC hromatogram identifikovanih betacijana na 538 nm u ekstraktu tropa cvekle sorte Egipatske



Slika 37. HPLC hromatogram identifikovanih betacijana na 538 nm u ekstraktu tropa cvekle sorte Bikor



Slika 38. HPLC hromatogram identifikovanih betacijana na 538 nm u ekstraktu tropa cvekle sorte Kestrel

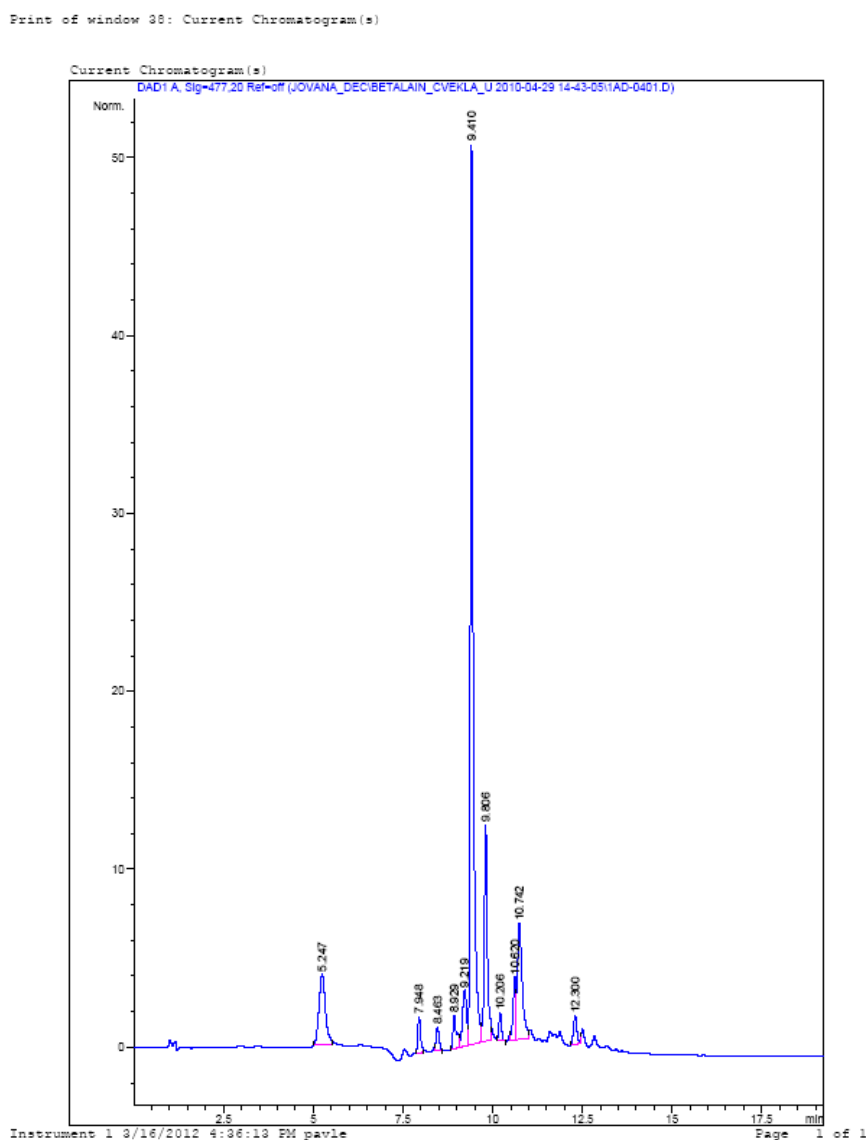
U tabeli 15 su dati sadržaji betacijana identifikovanih i kvantifikovanih HPLC analizom primenom pripremljenog standarda cvekle.

Tabela 15. Rezultati HPLC analize betacijana tropa odabranih sorti cvekle

Trop odabrane sorte cvekle	Sadržaj betacijana (mg/g suvog ekstrakta)	
	Jedinjenja	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta)
Detroit	Betanin	81,45 ± 4,05
	Izobetanin	50,36 ± 2,50
	Ukupno	131,81
Cardeal-F1	Betanin	17,80 ± 0,87
	Izobetanin	6,99 ± 0,32
	Ukupno	24,79
Egipatska	Betanin	9,72 ± 0,47
	Izobetanin	5,28 ± 0,24
	Ukupno	15,00
Bikor	Betanin	34,20 ± 1,69
	Izobetanin	16,71 ± 0,82
	Ukupno	50,91
Kestrel	Betanin	37,30 ± 1,84
	Izobetanin	9,47 ± 0,45
	Ukupno	46,77

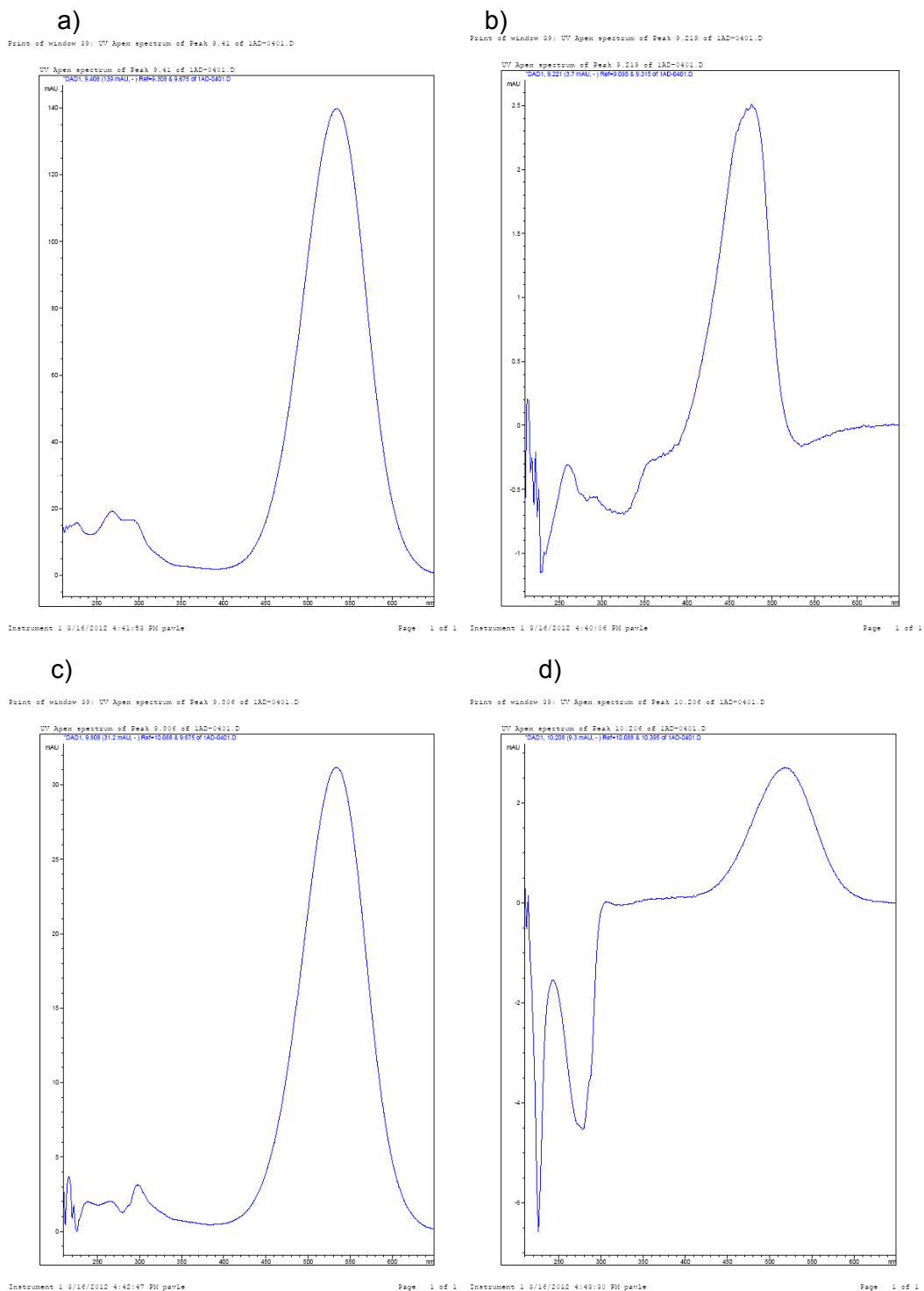
Rezultati HPLC analize betacijana ukazuju da ekstrakt tropa cvekle sorte Detroit ima najveći sadržaj betanina ($81,45 \pm 4,05$ mg/g suvog ekstrakta) i izobetanina ($50,36 \pm 2,50$ mg/g suvog ekstrakta), što je u saglasnosti sa rezultatima određivanja betalaina spektrofotometrijskom metodom.

Na slici 39 prikazan je HPLC hromatogram ekstrakta tropa cvekle sorte Kestrel na 477 nm.

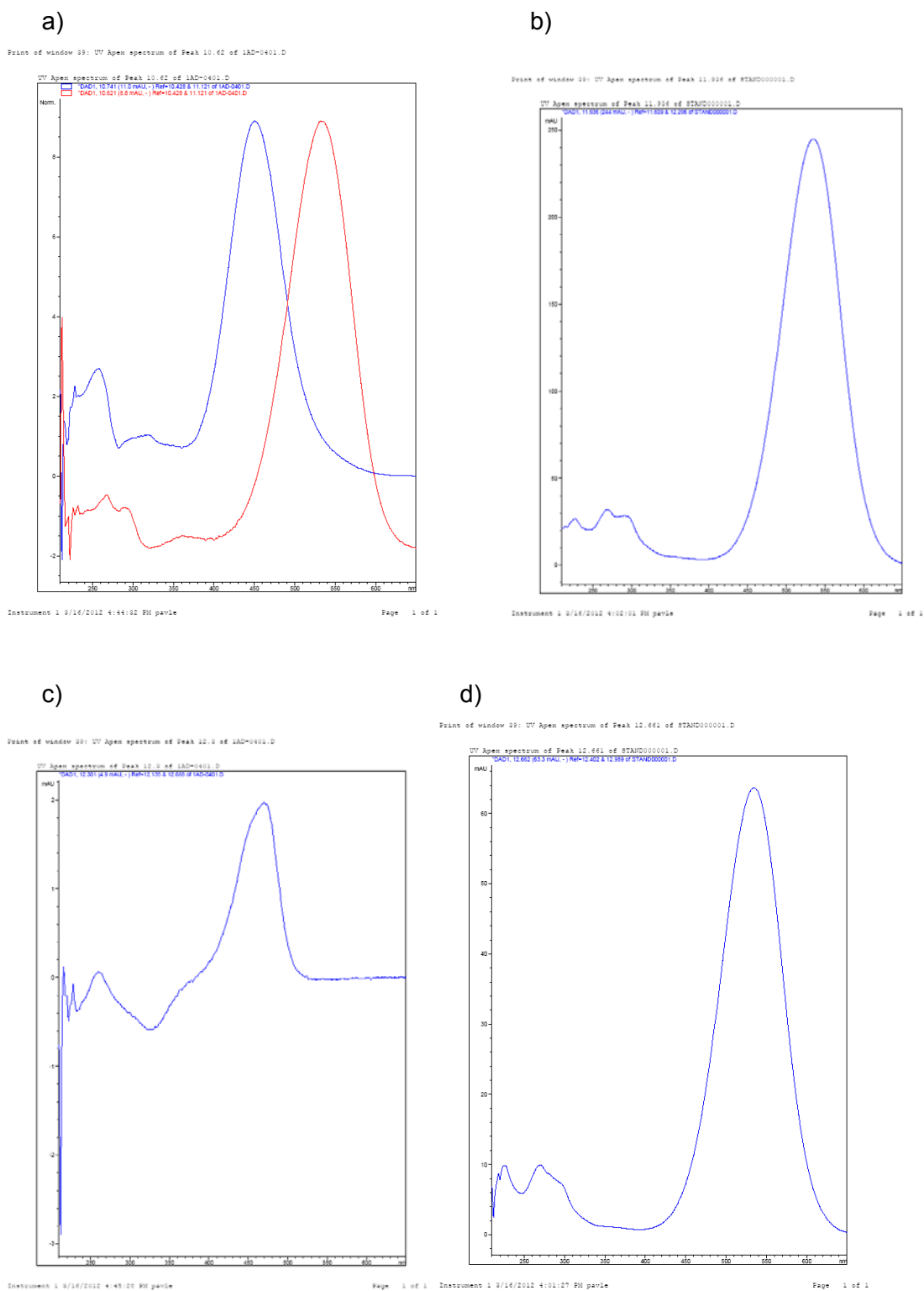


Slika 39. HPLC hromatogram ekstrakta tropa cvekle sorte Kestrel na 477 nm

Na slikama 40 - 42 su predstavljeni absorpcioni spektri svih pikova HPLC hromatograma ekstrakta tropa cvekle sorte Kestrel.

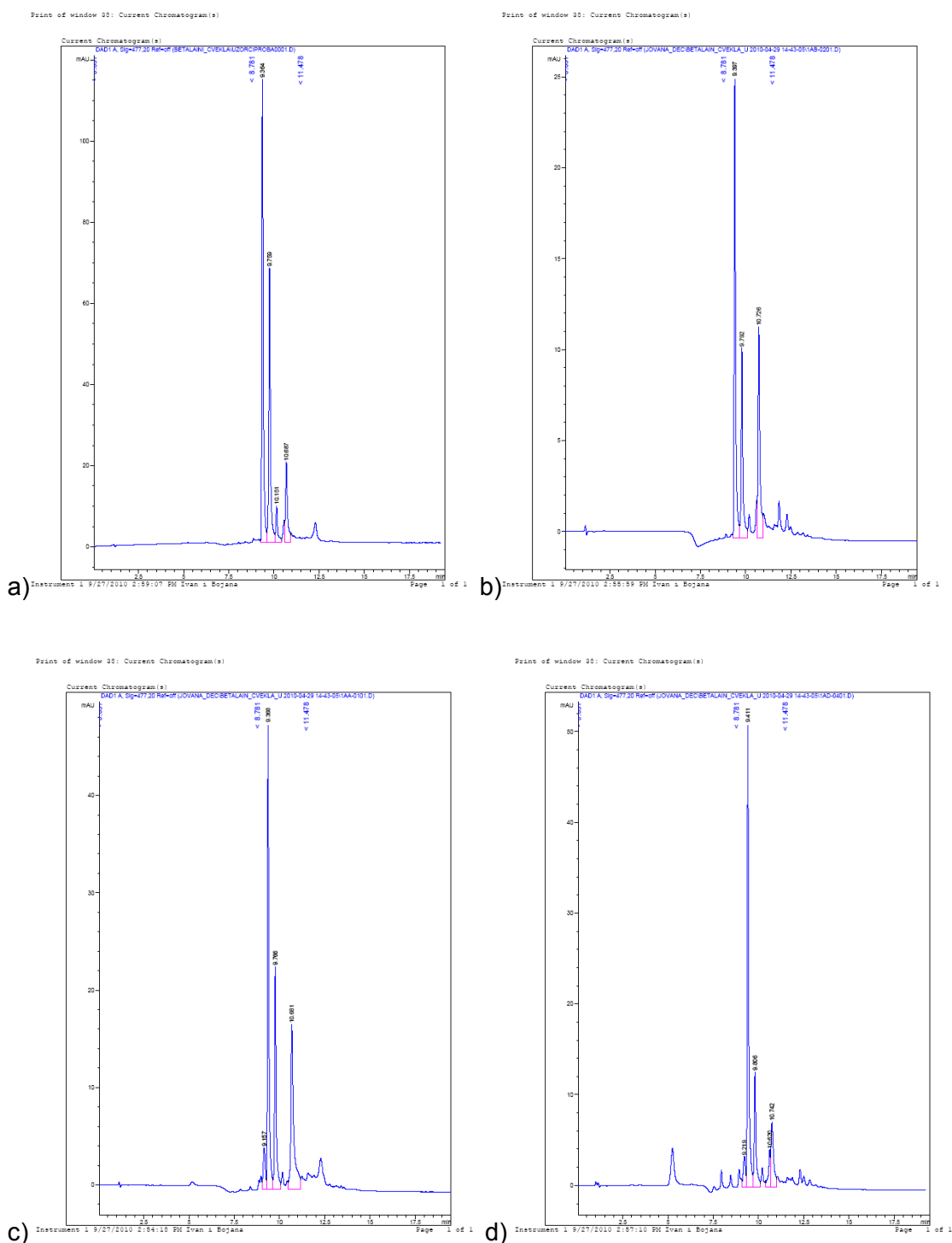


Slika 41. Absorpcioni spektri pikova HPLC hromatograma ekstrakta tropa cvekles sorte Kestrel na retencionom vremenu a) 9,219 min (betacijan); b) 9,410 min (betacijan); c) 9,806 min (betacijan); d) 10,206 min (betacijan)



Slika 42. Absorpcioni spektri pikova HPLC hromatograma ekstrakta tropa cvekle sorte Kestrel na retencionom vremenu a) 10,620 min (betacijan) i 10,742 min (betaksantin) b) 11,936 min (betacijan); c) 12,301 min (betaksantin); d) 12,662 min (betacijan)

Na slici 43 prikazani su HPLC hromatogrami ekstrakata tropa cvekle sorti Detroit, Cardeal-F1, Bikor i Kestrel na 477 nm.



Slika 43. HPLC hromatogram ekstrakta tropa cvekle sorte a) Detroit b) Cardeal-F1 c) Bikor d) Kestrel na 477 nm

U tabeli 16 su dati sadržaji betaksantina identifikovanih i kvantifikovanih HPLC analizom primenom pripremljenog standarda cvekle.

Tabela 16. Rezultati HPLC analize betaksantina ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle

Trop odabrane sorte cvekle	Sadržaj betaksantina (mg/g suvog ekstrakta)	
	Jedinjenja	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta)
Detroit	Vulgaksantin I	0,71 ± 0,03
Cardeal-F1	Vulgaksantin I	nd
Egipatska	Vulgaksantin I	0,71 ± 0,03
Bikor	Vulgaksantin I	0,70 ± 0,02
Kestrel	Vulgaksantin I	0,38 ± 0,01

Rezultati HPLC analize betaksantina ukazuju da ekstrakti tropa cvekle sorti Detroit i Egipatska imaju sadržaj vulgaksantina I 0,71, ekstrakt tropa cvekle sorte Bikor 0,70, a ekstrakt tropa cvekle sorte Kestrel 0,38 mg/g suvog ekstrakta. U ekstraktu tropa cvekle sorte Cardeal-F1 nisu identifikovani betaksantini.

Sadržaj betalaina u cvekli varira u zavisnosti od dela biljke koji je uzet za ispitivanje. Kujala i saradnici (2002) su utvrdili da je sadržaj betanina u ljuski od 3,8 do 7,6 mg/g suvog materijala, izobetanina od 1,2 do 3,1 mg/g suvog materijala i vulgaksantina I i II od 1,4 do 4,3 mg/g suvog materijala, a betanina u mesu cvekle od 2,9 do 5,2 mg/g suvog materijala, izobetanina 0,02 do 0,4 mg/g suvog materijala i vulgaksantina I i II od 1,5 do 4,0 mg/g suvog materijala.

Nemzer i saradnici (2011) HPLC metodom na identifikovali su betanin i izobetanin na 538 nm u ekstraktima cvekle. Kim i saradnici (2011) HPLC metodom su identifikovali betanin, izobetanin i ostale prisutne betalaine u crvenoj i beloj pitaji. Takođe, Kugler i saradnici (2004) su identifikovali betacijane na 538 nm i betaksantine na 470 nm u različito obojenim Švajcarskim blitvama (Swiss Chard).

U ekstraktu tropa cvekle sorte Detroit određen je najveći sadržaj betanina (81,45 ± 4,05 mg/g suvog ekstrakta), dok je objavljeni sadržaj u ljuski cvekle (3,8 – 7,6 mg/g suvog materijala) i mesu cvekle (2,0 – 5,2 mg/g suvog materijala) (Kujala i sar., 2002), niži nego u dobijeni rezultatima za trop cvekle. Sadržaj izobetanina takođe je bio najviši u ekstraktu tropa cvekle sorte Detroit (50,36 mg/g suvog ekstrakta), a Kujala i saradnici (2002) objavili su niži sadržaj u ljuski i mesu cvekle. Ekstrakti tropa cvekli Detroit i Egipatska imali su sadržaj 0,71 mg/g suvog ekstrakta vulgaksantina I, dok su sadržaji vulgaksantina I i II u ljuski i mesu cvekle bili viši (Kujala i sar., 2002). Ekstrakti tropa odabranih sorti cvekle pokazali su visok sadržaj betacijana i nešto niži sadržaj betaksantina od objavljenih rezultata. Na osnovu ovoga se može zaključiti da trop cvekle, bogat betacijanima, predstavlja dobru mogućnost korišćenja kao prehrambena, zdravstveno bezbedna boja.

Takođe, profil i sadržaj betalaina, varira kod različitih sorti ili genotipova cvekle (Esquivel i sar., 2007). Pored ovoga, betalaini su vrlo osetljivi na svetlost, toplotu i kiseonik. Oni nisu stabilni pod svim uslovima skladištenja, ali i sadržaj betalaina varira u različitim delovima cvekle.

4.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

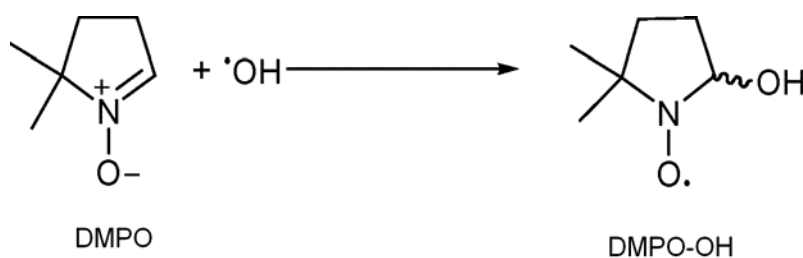
Elektron spin rezonantna (ESR) spektroskopija je instrumentalna metoda koja omogućava direktnu detekciju slobodnih radikala. Iako je osetljivost ove metode veoma visoka (10^{-10} M), detekcija kratkoživećih, relativno nestabilnih, reaktivnih slobodnoradikal-skih vrsta, poput superoksid anjon i hidroksil radikala nije moguća zbog njihovog kratkog vremena života. Jedna od metoda koja omogućava njihovu detekciju je „spin trapping“ metoda kojom se nestabilni slobodni radikali „hvataju“ pomoću određenih organskih jedinjenja tzv. „spin trapova“ i nastaju stabilni radikali tzv. „spin adukti“ koji se mogu detektovati ESR spektroskopijom (Čanadanović-Brunet, 1998).

4.4.1. ESR SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU HIDROKSIL RADIKALA

Za određivanje antiradikalne aktivnosti ekstrakata tropa ispitivanih sorti cvekle na reaktivne $\cdot\text{OH}$ korišćen je Fentonov model sistem. Reaktivni hidroksil radikali generisani su sledećim reakcionim mehanizmom:

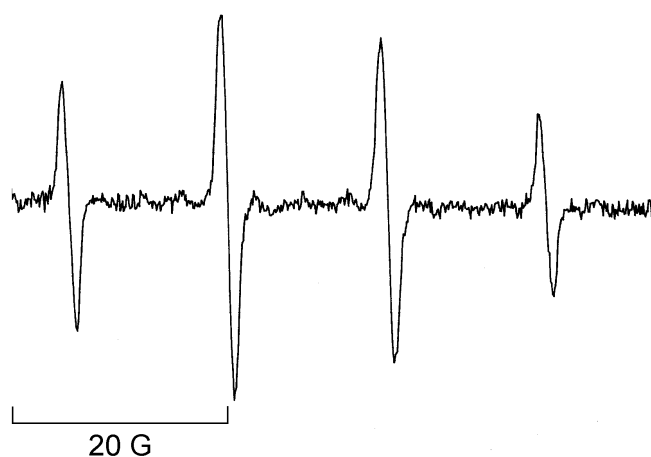


Nastali reaktivni $\cdot\text{OH}$ radikali u prisustvu „spin trapa“ DMPO formiraju stabilne nitroksid radikale, odnosno DMPO-OH „spin adukte“:



Ovaj antiradikalni test daje informaciju ne samo o antiradikalnoj aktivnosti ekstrakata na slobodne hidroksil radikale već i o sposobnosti aktivnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima da stvaraju komplekse sa jonima gvožđa i da na taj način sprečavaju stvaranje hidroksil radikala Fentonovom reakcijom.

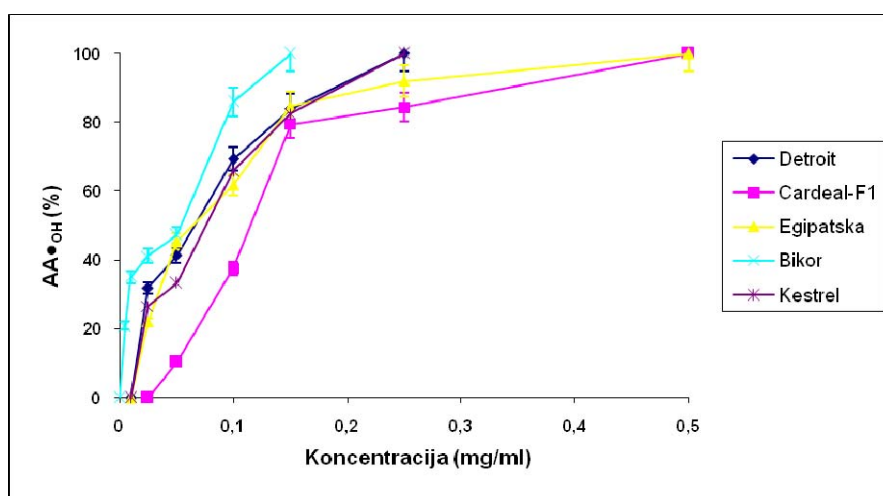
Na slici 44 je prikazan ESR spektar DMPO-OH „spin adukata“ nastalih u Fentonovom model sistemu.



Slika 44. ESR spektar DMPO-OH „spin adukata“ nastalih u Fentonovom model sistemu (slepa proba)

Hiperfina struktura ovog ESR spektra je predstavljena sa četiri linije relativnog intenziteta 1:2:2:1 i istih konstanti hiperfinog cepanja za jedan ^{14}N -atom ($I = 1$) $a_{\text{N}} = 14,9$ G, i za jedan ^1H -atom ($I = 1/2$) $a_{\text{H}} = 14,9$ G.

Na slici 45 prikazane su antiradikalne aktivnosti (AA_{OH}) ekstrakata tropa ispitivanih sorti cvekle na hidroksil radikale u Fentonovom model sistemu.



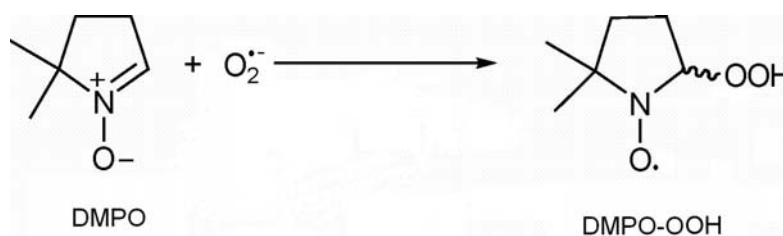
Slika 45. Uticaj ekstrakata tropa ispitivanih sorti cvekle na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala

AA_{OH} je zavisila od sorte cvekle iz koje je ekstrakt tropa dobijen i koncentracije primenjeng ekstrakta tropa u Fentonovom model sistemu. Ekstrakt tropa cvekle sorte Bikor pokazao je najizrazitije delovanje, dok je najmanju antiradikalisku aktivnost pokazao ekstrakt tropa cvekle Cardeal-F1 u celom opsegu ispitivanih koncentracija. Ekstrakt tropa cvekle Bikor pri koncentraciji od 0,15 mg/ml postigao je antiradikalisku aktivnost od 100%, ekstrakti tropa cvekle sorti Detroit i Kestrel pri koncentraciji od 0,25 mg/ml, ekstrakt tropa cvekle sorte Egipatska pri 0,5 mg/ml, a ekstrakt tropa cvekle Cardeal-F1 pri koncentraciji od 1,0 mg/ml.

Na osnovu rezultata ESR ispitivanja antiradikaliske aktivnosti ekstrakta tropa različitih sorti cvekle utvrđen je sledeći redosled njihovog uticaja na reaktivne hidroksil radikale: Bikor>Egipatska>Detroit>Kestrel>Cardeal-F1.

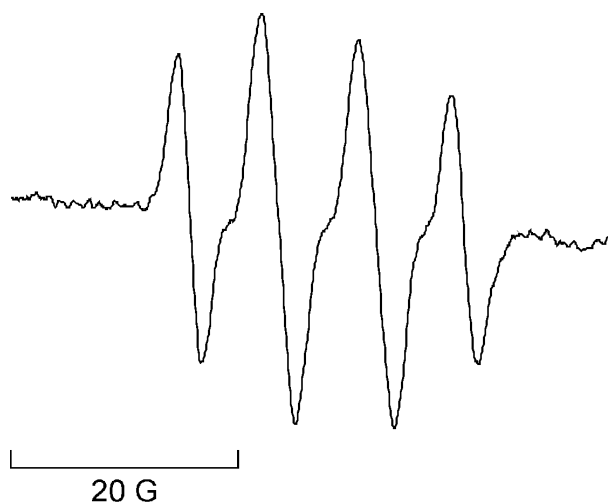
4.4.2. ESR SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU SUPEROKSID ANJON RADIKALA

Iako je superoksid anjon radikal slab oksidacioni agens, on je prekursor u stvaranju vrlo reaktivnih hidroksil radikala i singlet kiseonika. Superoksid anjon radikal se može generisati enzimatski, sistemom ksantin/ksantin oksidaza ili hemijskim putem, sa smešom kalijum superoksida i kraunetra. Prednost hemijskog generisanja superoksid anjon radikala za određivanje antiradikaliske aktivnosti je jednoznačnost interpretiranih rezultata. Naime, jedinjenja prisutna u ekstraktima mogu imati i inhibitorno dejstvo na enzimski sistem ksantin/ksantin oksidaza, pored antiradikaliske aktivnosti. Ovaj problem je prevaziđen kada je izvor superoksid anjon radikala hemijski sistem. ESR spektralna određivanja slobodnih superoksid anjon radikala u navedenom model sistemu izvršena su „spin trapping“ metodom upotrebom DMPO kao „spin trap“ jedinjenja, sledećim mehanizmom:



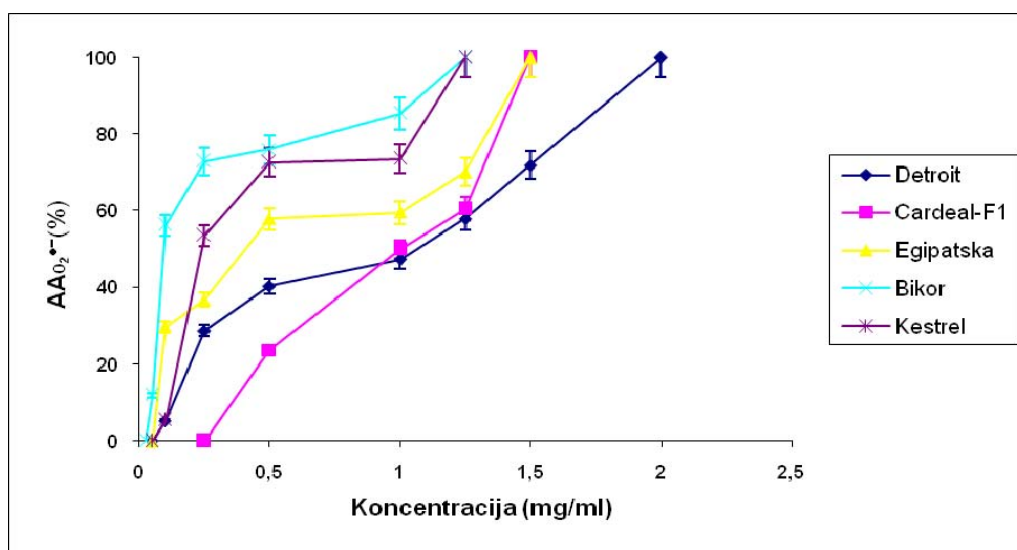
Hiperfina struktura ESR signala stabilizovanih superoksid anjon radikala, odnosno DMPO-OOH „spin adukata“ (slika 46) sastoji se od četiri linije, a konstante cepanja imaju vrednost $a_N = 12,65$ G, $a_{H\beta} = 10,4$ G i $a_{HY} = 1,3$ G.

Na slici 46 prikazan je ESR spektar DMPO-OOH „spin adukata“ superoksid anjon radikala u hemijskom sistemu.



Slika 46. ESR spektar DMPO-OOH „spin adukata“ superoksid anjon radikala (slepa proba)

Na slici 47 prikazan je uticaj ekstrakata tropa ispitivanih sorti cvekle na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala.



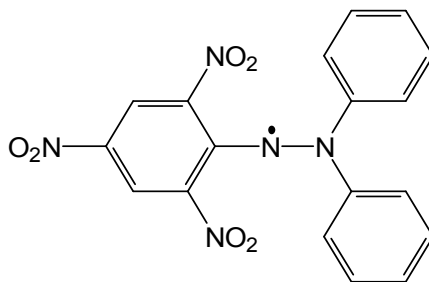
Slika 47. Uticaj ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Ekstrakti tropa svih ispitivanih sorti cvekle efikasno su uticali na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala. Ekstrakti tropa cvekle sorti Bikor i Kestrel potpuno su uklonili superoksid anjon radikale iz reakcione smeše ($AA_{O_2^-} = 100\%$) pri istoj primenjenoj koncentraciji od 0,25 mg/ml, a ekstrakt tropa cvekle i sorte Egipatska i sorte Cardeal-F1 pri koncentraciji od 1,5 mg/ml, a ekstrakt tropa sorte Detroit pri koncentraciji od 2,0 mg/ml.

ESR spektralna analiza antiradikalske aktivnosti ekstrakta tropa svih pet ispitivanih sorti cvekle na superoksid anjon radikale ukazuje na zavisnost aktivnosti od sorte cvekle i koncentracije ekstrakata tropa. Dobijen je sledeći redosled njihovog uticaja: Bikor > Kestrel > Egipatska > Cardeal-F1 > Detroit.

4.4.3. ESR SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU DPPH RADIKALA

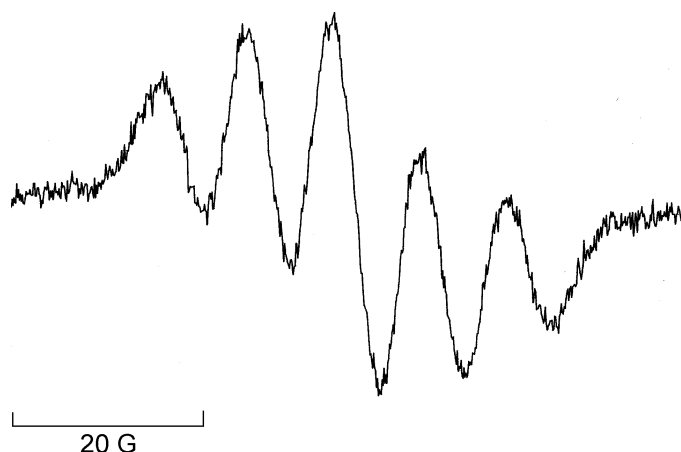
Slobodni DPPH radikali se najčešće upotrebljavaju u antradikalskim testovima za određivanje sposobnosti prirodnih sekundarnih metabolita prisutnih u ekstraktima da predaju labilan vodonikov atom slobodnim radikalima. Ovaj mehanizam predstavlja najčešći i najjednostavniji mehanizam antioksidativne zaštite ($\text{DPPH}^{\cdot} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^{\cdot}$) (Goupy i sar., 2003). DPPH radikal je stabilan slobodni radikal i ima sledeću hemijsku strukturu:



Slika 48. Hemijska struktura DPPH radikala

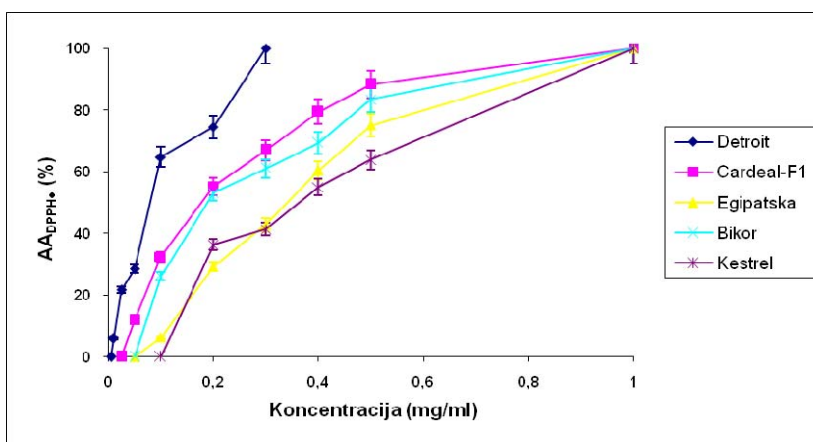
Nespareni elektron nalazi se na azotovom atomu. Zbog nesparenog elektrona DPPH^{\cdot} apsorbuje svetlost u vidljivom delu spektra, na talasnoj dužini od 517 nm (jarko ljubičasta boja). Kada se ovaj elektron spari u prisustvu antioksidanata, apsorbanca na ovoj talasnoj dužini opada. Ova promena se može pratiti i ESR spektrometrijski, direktnim praćenjem promene koncentracije DPPH radikala. Transformacija boje iz ljubičaste u žutu, i sniženje ESR signala je stehiometrijski proporcionalna broju elektrona koji su predati.

Hiperfina struktura ESR spektra stabilnih DPPH radikala potiče od interakcije nesparenog elektrona i dva ^{14}N atoma ($I = 1$). Sastoji se od pet linija relativnog intenziteta 1:2:3:2:1. Konstanta hiperfinog cepanja ima vrednost $a_N = 9,03\text{G}$. Na slici 49 prikazan je ESR spektar stabilnih DPPH slobodnih radikala slepe probe (0,4 mM metanolni rastvor DPPH^{\cdot}).



Slika 49. ESR spektar DPPH radikala (slepa proba)

Uticaj različitih koncentracija ekstrakata tropa ispitivanih sorti cvekle na transformaciju DPPH[•] prikazan je na slici 50.



Slika 50. Uticaj ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na transformaciju DPPH[•]

ESR spektralnom analizom utvrđeno je da su ekstrakti tropa cvekle svih ispitivanih sorti uticali na transformaciju DPPH radikala u zavisnosti od koncentracije i vrste primenjenog ekstrakta. Ekstrakti tropa cvekle sorti Cardeal-F1, Egipatska, Bikor i Kestrel potpuno su uklonili DPPH radikale iz reakcione smeše ($AA_{DPPH\cdot} = 100\%$) pri istoj primenjenoj koncentraciji od 1,0 mg/ml, a ekstrakt tropa cvekle sorte Detroit pri koncentraciji od 0,3 mg/ml.

Antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale zavisi od sorte cvekle od koje su ekstrakti tropa dobijeni i raste prema sledećj zavisnosti: Detroit > Cardeal-F1 > Bikor > Egipatska > Kestrel.

U tabeli 17 prikazane su EC_{50} vrednosti ekstrakata tropa ispitivanih sorti cvekle i sintetičkog antioksidanta BHA dobijenih u sva tri ispitivana model sistema.

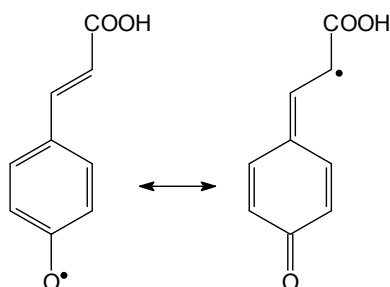
Tabela 17. EC₅₀ vrednosti ekstrakata tropa ispitivanih sorti cvekle i sintetičkog antioksidanta BHA

	EC ₅₀ ^{•OH} (mg/ml)	EC ₅₀ ^{O₂^{-•}}	EC ₅₀ ^{DPPH[•]} (mg/ml)
Detroit	0,060 ± 0,001	0,795 ± 0,025	0,075 ± 0,002
Cardeal-F1	0,114 ± 0,005	1,000 ± 0,045	0,181 ± 0,008
Egipatska	0,063 ± 0,002	0,502 ± 0,023	0,332 ± 0,015
Bikor	0,042 ± 0,001	0,110 ± 0,004	0,220 ± 0,009
Kestrel	0,069 ± 0,002	0,265 ± 0,012	0,354 ± 0,015
BHA	1,505 ± 0,062	2,680 ± 0,125	0,180 ± 0,008

Na osnovu prikazanih EC₅₀ vrednosti u tabeli 17 evidentno je da su ekstrakti tropa svih ispitivanih sorti cvekle pokazali veću antiradikalnu aktivnost na hidroksil i superoksid anjon radikale od sintetičkog antioksidanta BHA. Dok su samo ekstrakti tropa cvekle sorti Detroit i Cardeal-F1 imali veću antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale od sintetičkog antioksidanta BHA.

Fenolna jedinjenja se smatraju antioksidantima koji imaju sposobnost terminacije slobodnoradikalnih reakcija. Njihova aktivnost zavisi od mnogih faktora kao što su energija disocijacije veze O-H, mogućnost delokalizacije i rezonantne stabilizacije nesparenog elektrona slobodnog radikala fenolnog jedinjenja i sternih smetnji voluminoznih grupa vezanih za aromatični prsten (Shahidi i Naczk, 1995a). Konstante brzina reakcija fenolnih jedinjenja sa slobodnim radikalima određuju njihovu antioksidativnu efikasnost (Sánchez-Moreno i sar., 1998). Rice-Evans i saradnici (1996) su dokazali da inhibitorni efekat fenolnih kiselina zavisi od broja hidroksilnih grupa u molekulu. Identifikovane fenolne kiseline u ispitivanim ekstraktima sa *o*-dihidroksi grupama, hlorogenska, kafena i protokatehinska doprinose višim vrednostima AA_{•OH}.

U većini testova se pokazalo da su derivati cimetine kiseline značajno efikasniji antioksidanti od derivata benzojeve kiseline, verovatno zbog mogućnosti stabilizacije slobodnoradikalnih formi konjugacijom u bočnom lancu (Marinova i Yanishlieva, 1992). Po analogiji sa drugim fenolnim jedinjenjima, povećanjem broja elektron-donorskih supstituentata odnosno hidroksi grupa, povećava se i antioksidativna aktivnost fenolne kiseline. Faktor koji takođe utiče na efikasnost je sposobnost stabilizacije molekula rezonancijom (slika 51) (Larson, 1997).



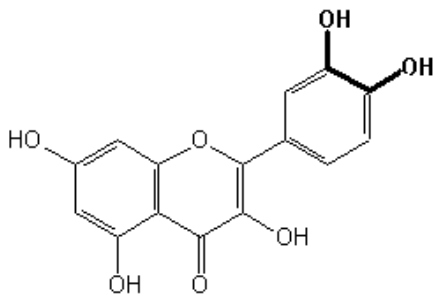
Slika 51. Rezonancija kod kafene kiseline

Fenolne kiseline koje u svojoj strukturi imaju hidroksilne grupe u *orto* položaju imaju sposobnost stvaranja kompleksa sa prelaznim metalima. Rice-Evans i saradnici (1996) su dokazali da inhibitorni efekat fenolnih kiselina zavisi od broja hidroksilnih grupa u molekulu. Fenolne kiseline sa *o*-dihidroksi grupama, kao što su hlorogenska i kafena, doprinose višim vrednostima AA_{OH} . Visokim AA_{OH} vrednostima ovih kiselina sigurno doprinosi i velika stabilnost nastalih aroksil radikala (Bors i sar., 1990).

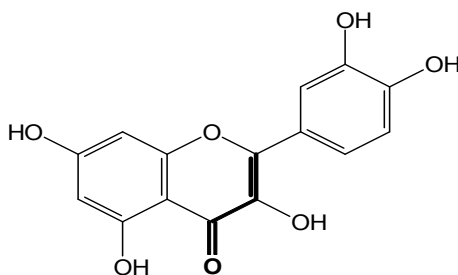
Od strukturnih elemenata koje su značajne za antiradikalnu aktivnost flavonoida, hidroksilne grupe imaju najveći značaj (Cotelle, 2001; Yang i sar., 2001; Heim i sar., 2002; Amić i sar., 2003). Utvrđeno je da položaj hidroksilnih grupa ima mnogo veći uticaj na aktivnost nego njihov broj. Hidroksilne grupe utiču na antioksidativnu aktivnost kinetičkim ili termodinamičkim svojstvima: (1) kao izvori vodonikovih atoma potrebnih za neutralizaciju slobodnih radikala i (2) mogućnošću povećanja stabilnosti radikala flavonoida otpuštanjem još jednog vodonikovog atoma iz druge hidroksilne grupe. Različita fenolna jedinjenja imaju različite odgovore u antiradikalnim testovima. Razlike u antioksidativnoj aktivnosti polifenola mogu biti posledica: (1) različitog sadržaja i (2) različite reaktivnosti prisutnih jedinjenja (Espinoza i sar., 2009). Pored toga, efikasnost antioksidanata u značajnoj meri zavisi od oksidacionih uslova sistema u kojem se ispituje antiradikalna aktivnost. Različiti antiradikalni testovi pružaju različite mogućnosti antioksidantima da ispolje svoju aktivnost.

Najznačajniji elementi za antioksidativno delovanje flavonoida su:

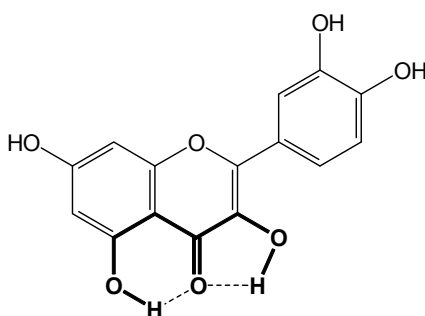
- broj hidroksilnih grupa u B prstenu,
- *o*-dihidroksilne grupe B prstena,



- 2,3-dvostruka veza piranskog prstena u konjugaciji sa keto-grupom na C₄-atomu (zbog delokalizacije),



- Hidroksilne grupe na položajima C₃ i C₅ kao „hvatači“ slobodnih radikala, i njihova sposobnost stvaranja vodoničnih veza sa keto grupom.



Flavonoidi sa *o*-dihidroksi strukturom u B prstenu i 3- i/ili 5-OH grupama sa 4-okso funkcionalnom grupom u A i C prstenu flavonola, i fenolnim kiselinama sa *o*-dihidroksi grupama mogu ispoljiti svoju antioksidativnu aktivnost heliranjem jona metala u toku Fentonove reakcije (Morel i sar., 1994).

Antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata tropa ispitivanih sorti cevekle doprinosi i prisustvo betalaina. Cai i saradnici (2003) su utvrdili da je antioksidativna aktivnost betalaina uslovljena njihovim strukturnim karakteristikama. U molekulu betaksantina antiradikalna aktivnost uslovljena je brojem i položajem hidroksilnih grupa (-OH) i prisustvom imino ostataka (= NH) u molekulu. U molekulu betacijana prisustvo glikozil grupe smanjuju, dok uvođenje acil ostatka povećavaju antioksidativnu aktivnost. Isti autori utvrdili su da 6-O-glikozil betacijani u poređenju sa 5-O-glikozil betacijanima imaju jaču antiradikalnu aktivnost. Takođe Kanner i saradnici (2001) tvrde da su betalaini veoma dobri elektron donori, a da položaj hidroksil grupe u molekulu i stepen glikolizacije aglikonskog dela utiču na antiradikalnu aktivnost.

Biljni ekstrakti su kompleksne smeše prirodnih jedinjenja i da njihova antiradikalna aktivnost nije rezultat aktivnosti samo jedne komponente. Vrlo često prisutna jedinjenja pokazuju sinergističke efekte. Sinergizam je definisao Uri (1961) kao „fenomen kod kojeg veći broj komponenata prisutnih u istom sistemu ima veći efekat (izražajnije dejstvo) nego zbir efekata pojedinačnih komponenata“. Ovo ukazuje na činjenicu da ukupan profil

fitohemikalija određuje funkcionalnost hrane kao rezultat sinergističkog dejstva pojedinačnih konstituenata (Vattem i sar., 2005).

Korelacionom analizom određena je zavisnost između antioksidativnih aktivnosti (antiradikalska aktivnost na $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ i DPPH, izraženih kao EC_{50} vrednosti) i sadržaja fitohemikalija (ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida, ukupnih betalaina, fenolnih jedinjenja određenih HPLC metodom) ekstrakata tropa ispitivanih sorti cvekle, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 18.

Tabela 18. Koeficijenti korelacije antioksidativnih aktivnosti i sadržaja fitohemikalija

JEDINJENJE	KOEFIKIJENT KORELACIJE		
	$r^{\cdot\text{OH}}$	$r^{\cdot\text{O}_2^-}$	$r^{\cdot\text{DPPH}}$
Ukupna fenolna jedinjenja	0,505	0,493	0,341
Ukupna fenolna jedinjenja HPLC	0,463	0,425	0,335
Ukupni flavonoidi	0,471	0,567	0,150
Ukupni betacijani	0,370	0,181	0,855
Ukupni betaksantini	0,490	0,476	0,188
Ukupni betalaini (betacijani + betaksantini)	0,482	0,114	0,651
Protokatehinska kiseina	0,467	0,308	0,982
Katehin	0,426	0,393	0,309
Hlorogenska kiselina	0,855	0,712	0,165
Ferulna kiselina	0,122	0,145	0,091
Rutin	0,224	0,573	0,085

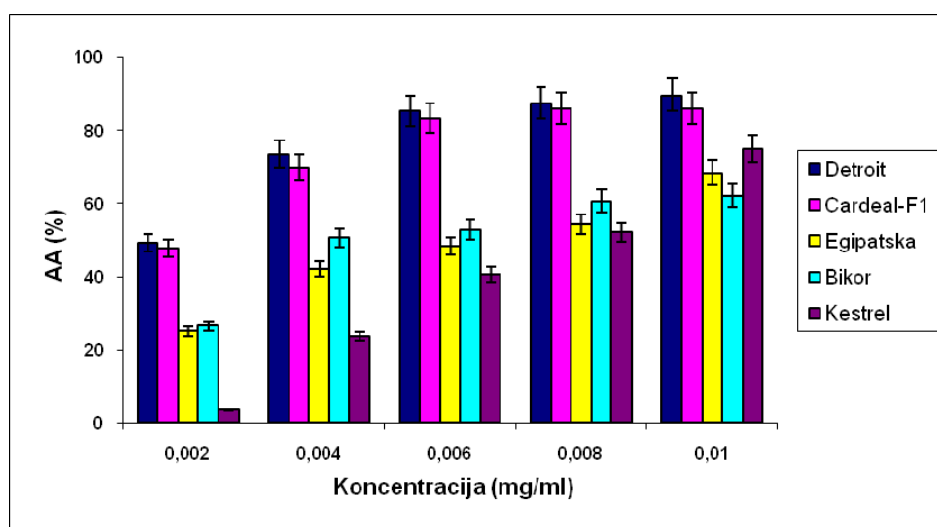
Vrlo dobra korelacija ($r > 0,8$) utvrđena je između sadržaja ukupnih betacijana i protokatehinske kiseline sa antiradikalnim aktivnostima na DPPH radikale, kao i hlorogenske kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale. Dobra korelacija ($r > 0,5$) zabeležena je između ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i $\text{AA}_{\cdot\text{OH}}$, sadržaja ukupnih flavonoida i rutina na $\text{AA}_{\text{O}_2^{\cdot-}}$, kao i totalnih betalaina na $\text{AA}_{\text{DPPH}\cdot}$.

Ostali korelacioni koeficijenti ukazali su na osrednju ($r < 0,5$) ili slabu ($r < 0,3$), ali pozitivnu uzajamnu zavisnost između sadržaja antioksidanata i antiradikalne aktivnosti.

Rezultata korelacione analize prikazani u tabeli 18 ukazuju na to da antiradikalna aktivnost nije obavezno u korelaciji sa sadržajem fenolnih jedinjenja pa je zbog toga prilikom razmatranja antioksidativnog potencijala uzorka neophodno analiziranje rezultata i sadržaja svih prisutnih aktivnih komponenta i antiradikalne aktivnosti.

4.5. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA ANTIRADIKALSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKTA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE NA DPPH RADIKALE

Za određivanje antioksidativne aktivnosti na stabilne DPPH radikale korišćena je spektrofotometrijska metoda, koja se zasniva na merenju sposobnosti neutralizacije DPPH radikala u reakciji sa prisutnim antioksidantima. Kod DPPH testa ljubičasto obojeni stabilni DPPH radikal se transformiše u žuto obojenu formu DPPH-H. Promenjen intenzitet boje je srazmerna broju stabilizovanih (uhvaćenih) radikala. Na slici 52 prikazana je antiradikalska aktivnost ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na DPPH radikale.



Slika 52. Antiradikalska aktivnost ekstrakata tropa odabranih sorticvekle na DPPH radikale

U tabeli 19 su prikazane EC_{50}^{DPPH} vrednosti koje su dobijene merenjem apsorbanci za uzorke i slepu probu primenom spektrofotometra (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Tabela 19. EC_{50}^{DPPH} vrednosti ekstrakata tropa pet sorti cvekle i sintetičkog antioksidanta BHA

Trop cvekle	EC_{50}^{DPPH} ($\mu\text{g/ml}$)
Detroit	2,064
Cardeal-F1	2,214
Egipatska	3,429
Bikor	3,942
Kestrel	7,626
BHA	28,213

Na osnovu vrednosti prikazanih u tabeli 19 može se zaključiti da najjače delovanje pokazuje ekstrakt tropa cvekle sorte Detroit, a najslabije ekstrakt tropa sorte Kestrel.

Svi ekstrakti tropa odabranih sorti cvekle pokazali su bolju antiradikalnu aktivnost od sintetičkog antioksidanta BHA. Redosled aktivnosti ispitivanih ekstrakata tropa podudaraju sa redosledom antioksidativne aktivnosti određene ESR metodom.

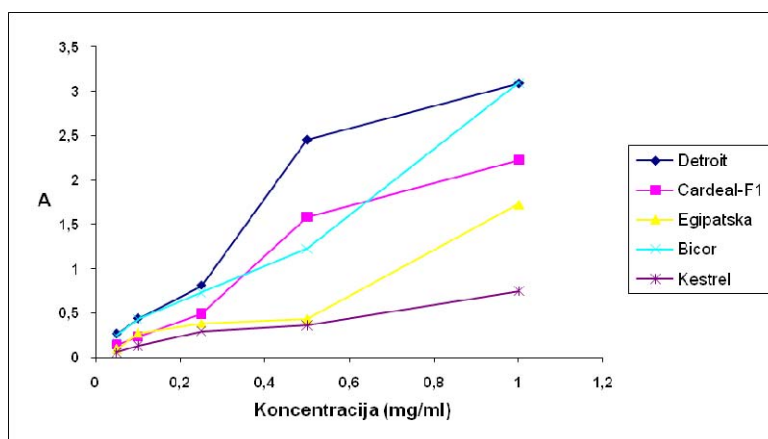
Pavlov i saradnici (2002) su ispitivali antiradikalnu aktivnost ekstrakata Detroit, Egipatske, Bordo i Detroit Dark Red sorte cvekle, primenom spektrofotometrijske metode. Ekstrakt Detroit Dark Red je pokazao najjaču antiradikalnu aktivnost od 83% inhibicije stabilnih DPPH radikala. Skevindžing aktivnost betalainskog ekstrakta cvekle Detroit bila je šest puta veća od Detroit cvekle vlasastog korena ($90,7 \pm 1,6\%$ inhibicije DPPH radikala, $EC_{50}=0,11\text{mg/g}$ suvog ekstrakta i $14,2\% \pm 0,7\%$ inhibicije DPPH radikala $EC_{50}=0,70\text{ mg/g}$ suvog ekstrakta).

4.6. ODREĐIVANJE UKUPNE REDUKCIONE SPOSOBNOSTI EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

Za određivanje ukupne redukcionne sposobnosti korišćena je metoda po Oyaizu, koja se zasniva na praćenju apsorbance u zavisnosti od koncentracije rastvora ekstrakata tropa cvekle. Prisustvo redukujućih agenasa, odnosno antioksidanata iz cvekle, izaziva redukciju Fe^{3+} do Fe^{2+} jona. Redukciona sposobnost povezana je sa antioksidativnom aktivnošću i može da služi kao značajan indikator antioksidativne aktivnosti (Oktay i sar., 2003).

Antioksidativna aktivnost antioksidanata se pripisuje različitim mehanizmima, među kojima su sprečavanje lančanih reakcija, povezivanje prelaska katalizatora metalnih jona, raspadanje peroksida, sprečavanje odvajanja vodonika, redukujući kapacitet i hvatanje slobodnih radikala (Diplock 1997; Yıldırım i sar., 2000).

Na slici 53 je prikazana redukciona sposobnost pet ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle koja raste sa porastom koncentracije.



Slika 53. Redukciona sposobnost pet ekstrakata tropa cvekle

U cilju poređenja rezultata izračunate su $RS_{0,5}$ vrednosti (koncentracija ekstrakta pri apsorbananci 0,5) za sve ekstrakte tropa cvekle i sintetičkog antioksidanta BHA, a rezultati su predstavljeni u tabeli 20.

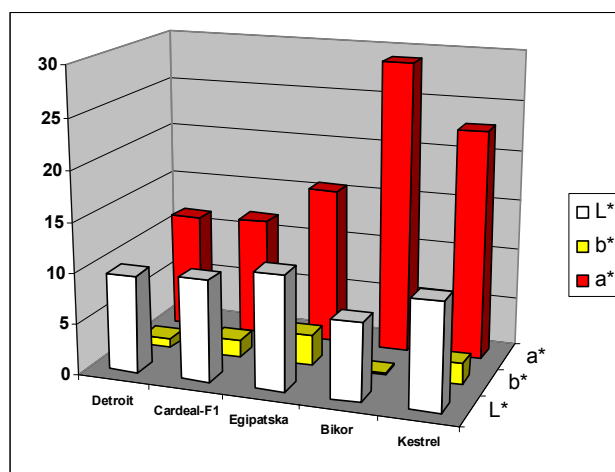
Tabela 20. $RS_{0,5}$ vrednosti ekstrakata tropa pet sorti cvekle i sintetičkog antioksidanta BHA

Trop cvekle	$RS_{0,5}$ (mg/ml)
Detroit	0,123
Cardeal-F1	0,251
Egipatska	0,693
Bikor	0,465
Kestrel	0,542
BHA	0,029

Na osnovu vrednosti iz tabele 20 može se zaključiti da ekstrakti imaju neznatno slabiju redukcionu sposobnost od BHA. Najjaču redukcionu sposobnost pokazao je ekstrakt tropa cvekle sorte Detroit, a najslabiju ekstrakt tropa cvekle sorte Egipatska.

4.7. POVRŠINSKA BOJA EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

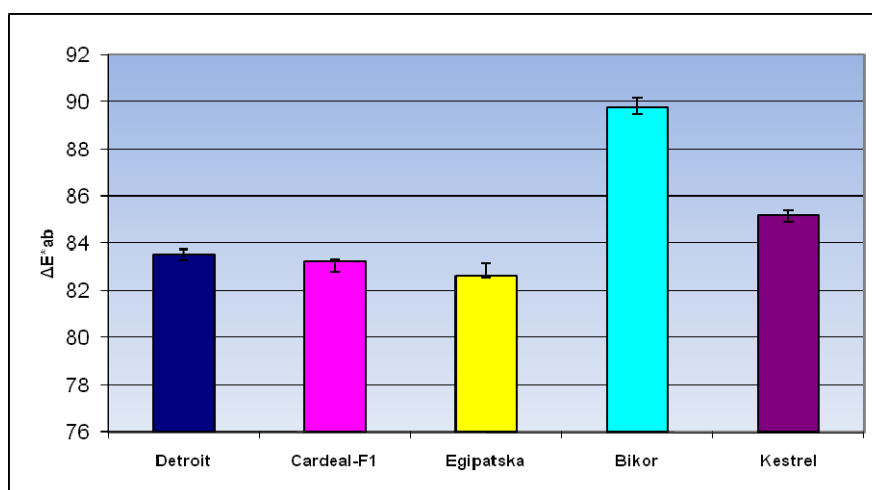
Boja proizvoda je značajan faktor u inicijalnoj prihvatljivosti proizvoda od strane potrošača. Učešće pojedinih tonova boje i svetloća površine ekstrakata tropa izražena je u vrednostima a^* , b^* i L^* , određenim na tristimulusnom fotokolorimetru. Rezultati određivanja površinske boje ekstrakata tropa ispitivanih sorti cvekle prikazani su na slici 54.



Slika 54. Instrumentalna merila boje

Svetloća površine ekstrakta (L^*) najmanja je kod ekstrakta tropa cvekle sorte Bikor. Učešće crvenog tona (a^*) u boji površine znatno je veća kod ekstrakta sorte Bikor u odnosu na sve ostale ekstrakte. Učešće žutog tona (b^*) u boji površine neznatno varira, ali je najveće kod sorte Egipatska. Razlike u b^* vrednostima najmanje su izražene u poređenju sa druga dva pokazatelja boje (L^* i a^*).

Boje ekstrakata su bile veoma dobro izražene, na šta ukazuju visoke vrednosti parametra za razliku boje ΔE^*ab (CIELab) (slika 55).



Slika 55. Razlika boje ΔE^*ab (CIELab) ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle

Poredeći dobijene rezultate za razliku boje ΔE^*ab (slika 55) površine ispitivanih ekstrakata i sadržaj betalaina (tabela 13), može se zaključiti da postoji usaglašenost dobijenih rezultata.

Rezultati karakteristika boje CIE $L^*C^*h^\circ$ betalainskih ekstrakata švajcarske blitve (Swiss chard) ukazuju da postoji veliki potencijal betalainskih ekstrakata za bojenje hrane (Kugler i sar., 2004). Takođe određena boja tajvanske biljke Djulis (*Chenopodium formosanum*) potvrđuje da betacijani, pored svoje antioksidativne aktivnosti, svojom bojom doprinose upotrebi u prehrambenoj industriji (Tsai i sar., 2010).

4.8. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKTA TROPA CVEKLE

Prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakta tropa cvekle korišćene su dve difuzione metode, disk difuziona metoda i metoda bunarčića. U tabeli 21 su prikazani rezultati antibakterijske aktivnosti ekstrakta tropa cvekle.

Tabela 21. Antibakterijska aktivnost ekstrakta tropa cvekle i kontrola (prečnici inhibicionih zona (mm) uključujući disk (6mm) ili bunarčić (9 mm) ± standardna devijacija)

GRUPA	Mikroorganizam	Metoda			Kontrole (antibiotik/ antimikotik)
		Disk difuziona	Metoda bunarčića		
		15µl	50 µl	100 µl	
G – bakterije	<i>Escherichia coli</i>	nd	nd	13,33 ± 0,58**	35,5 ± 0,7*
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	nd	nd	13,33 ± 0,58**	15,33 ± 0,58*
	<i>Citrobacter freundii</i>	nd	20,33 ± 0,58**	20,33 ± 0,58**	31,67 ± 1,52*
	<i>Citrobacter youngae</i>	nd	nd	10,67 ± 0,6**	23,0 ± 1,0*
	<i>Enterobacter cloacae</i>	nd	nd	12,0 ± 0,0**	31,0 ± 1,5*
	<i>Salmonella typhimurium</i>	8,0 ± 0,0**	16,0 ± 0,0**	25,0 ± 1,0**	34,5 ± 0,5*
G + bakterije	<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5 ± 0,55**	16,0 ± 0,0*	20,0 ± 1,0*	37,0 ± 2,0*
	<i>Bacillus cereus</i>	10,67 ± 1,03**	17,0 ± 1,0**	20,33 ± 0,58*	34,0 ± 2,0*
	<i>Enterococcus faecalis</i>	nd	nd	nd	14,33 ± 0,58*
	<i>Listeria monocytogenes</i>	nd	nd	nd	11,0 ± 0,0*
G + bakterije	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC	nd	nd	nd	35,67 ± 0,58*
	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefacians/atrophaeus</i> (D6 4/2)	nd	nd	nd	42,33 ± 0,58*
G + bakterije	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	nd	nd	20,00 ± 0,0**	26,0 ± 0,5*
	<i>Staphylococcus equorum</i>	nd	20,33 ± 0,58**	20,33 ± 0,58**	20,33 ± 1,0*
	<i>Staphylococcus cohnii</i> spp. <i>urealyticus</i> (99)	nd	nd	nd	25,33 ± 0,58*
	<i>Staphylococcus cohnii</i> spp. <i>cohnii</i> (111)	nd	nd	nd	23,0 ± 1,0**
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (67N)	nd	nd	nd	31,33 ± 0,58*
	<i>Staphylococcus auricularis</i> (60N)	nd	nd	nd	25,0 ± 1,0*
	<i>Staphylococcus sciuri</i> (70N)	nd	nd	12,33 ± 0,58*	27,33 ± 0,58*
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (108)	nd	nd	13,33 ± 0,58*	42,67 ± 0,58*

nd – nije detektovana zona inhibicije

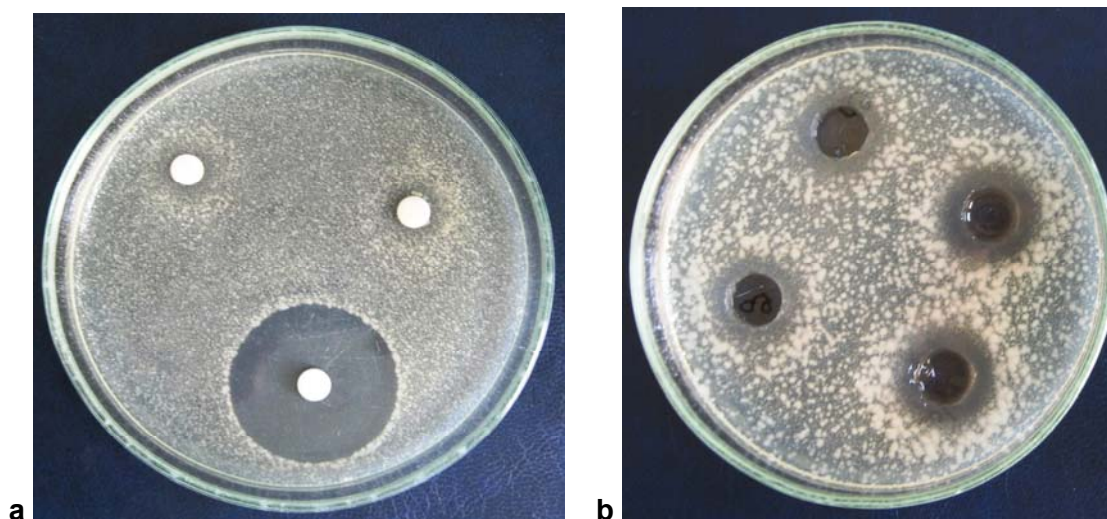
* - čista zona oko diska/bunarčića

** - zona redukovanog rasta

Iz tabele 21 se može uočiti da je ekstrakt tropa cvekle pokazao znatno slabiji efekat korišćenjem disk difuzione metode, u odnosu na drugu korišćenu metodu. To se može objasniti time da je u ovoj metodi korišćena manja zapremina ispitivanog ekstrakta (15 µl), pa je samim tim ekstrakt pokazao slabiju aktivnost. Oko diskova postavljenih na površinu agara nije uočeno postojanje inhibicione zone kod većine ispitivanih bakterija, tačnije zone sa redukovanim rastom uočene su samo kod Gram negativnih bakterija *Salmonella typhimurium* i *Citrobacter freundii*, i kod Gram pozitivnim bakterija, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri* i *Bacillus cereus*. Kod nekih testiranih Gram pozitivnih bakterija (*Bacillus* sp., *Enterococcus faecalis* i *Listeria monocytogenes*) testirani ekstrakt tropa cvekle nije pokazao aktivnost.

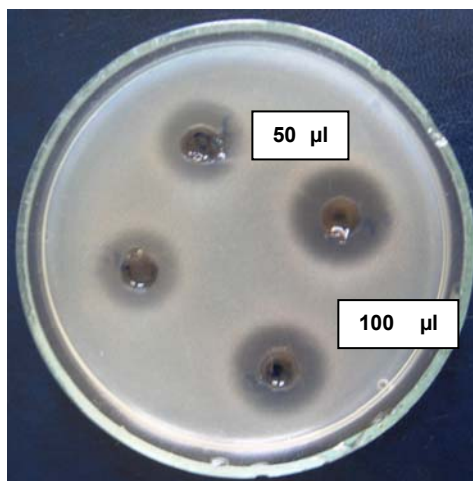
Oko kontrolnih diskova koji su impregnirani antibioticima (cefotaxim 30 µg/ clavulanic acid 10 µg diskovi) pojavile su se „čiste” (bez ikakvog vidljivog rasta) zone u slučaju svih testiranih bakterija. Najveća aktivnost zabeležena je prema bakterijama *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* (prečnici veći od 30 mm), a najmanji prečnici u slučaju Gram-pozitivnih bakterija *Listeria monocytogenes* i *Enterococcus faecalis* (prečnici manji od 15 mm).

Na slici 56 prikazane su Petri ploče na kojima se može uočiti prisustvo inhibicionih zona oko diskova ili bunarčića, odnosno antibakterijska aktivnost ekstrakta cvekle protiv bakterije *Bacillus cereus*.



Slika 56. Antibakterijska aktivnost ekstrakta tropa cvekle protiv bakterije *Bacillus cereus* a-disk difuzioni metod; b-metoda bunarčića

Na slici 57 prikazana je antibakterijska aktivnost protiv *Staphylococcus aureus*, korišćenjem metode bunarčića.



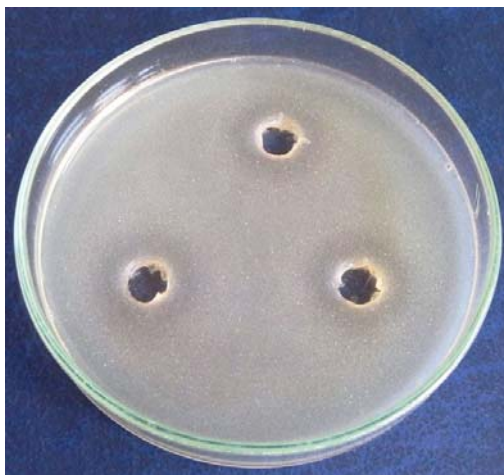
Slika 57. Antibakterijska aktivnost ekstrakta tropa cvekle (metoda bunarčića) - *Staphylococcus aureus*

Na slici 57 se vidi da je ekstrakt tropa cvekle pokazao mnogo bolju aktivnost protiv *Staphylococcus aureus* kada je u bunarčiće aplikovano 100 µl ekstrakta. U slučaju *Escherichia coli* aplikovanjem 50 µl ekstrakta nije uočena inhibiciona zona oko bunarčića. Veća zapremina ekstrakta ne mora uvek da pokaže bolje rezultate, jer veće zapremine pored većih količina aktivnih materija mogu da sadrže i veće količine drugih materija koje mogu da dovedu do antagonističkih efekata, odnosno mogu da umanje efekat aktivnih materija.

Gram-negativne bakterije su zbog prisustva lipopolisaharidne spoljašnje membrane manje osetljive na antibiotike u odnosu na Gram-pozitivne bakterije.

Antimikrobna aktivnost ekstrakta tropa cvekle, ispitana je prema nizu sojeva koji pripadaju rodovima *Staphylococcus* i *Bacillus*. U tabeli 21 su dati rezultati antibakterijske aktivnosti ekstrakta tropa cvekle prema ispitivanim Gram-pozitivnim bakterijama.

Na osnovu podataka iz tabele 21, upotrebom disk difuzione metode nije uočena antibakterijska aktivnost ekstrakta cvekle protiv testiranih Gram-pozitivnih bakterija. Takođe, sve testirane vrste roda *Bacillus* pokazale su rezistentnost prema ekstraktu cvekle korišćenjem i disk difuzione i metode bunarčića. Izvesna antibakterijska aktivnost zabeležena je protiv bakterije *Staphylococcus saprophyticus* (prečnik zone sa redukovanim rastom 20 mm) aplikovanjem 100 µl ekstrakta u bunarčić. Čista zona oko bunarčića zabeležena je upotrebom 100 µl ekstrakta protiv bakterija *Staphylococcus sciuri* (70N) (12,33 mm) i *Staphylococcus epidermitis* (108) (13,33 mm). Najveću aktivnost ekstrakt je ispoljio prema *Staphylococcus equorum*, gde su zabeležene zone sa redukovanim rastom prilikom aplikovanja 50 i 100 µl ekstrakta.



Slika 58. Antibakterijska aktivnost ekstrakta tropa cvekle protiv bakterije *Staphylococcus equorum*, korišćenjem metode bunarčića

Kontrolni diskovi impregnirani antibiotikom pokazali su aktivnost u različitoj meri (prečnici zona 20,33 - 42,67 mm). Aktivnost nije zabeležena prema bakteriji *Bacillus cereus/ thuringiensis/ mycoides* (II/6-2).

Ispitan je i uticaj ekstrakta tropa cvekle na predstavnike eukariotskih mikroorganizama. U tabeli 25 su prikazani rezultati antimikrobne aktivnosti ekstrakta cvekle prema plesnima i kvascima. U ovom slučaju kao kontrolni diskovi u disk difuzionoj metodi koristili su se diskovi impregnirani sa 15 μ l antimikotika aktidion (rastvor cycloheximide koncentracije 0,03 g/ml).

Tabela 25. Antimikrobna aktivnost ekstrakta tropa cvekle (prečnici inhibicionih zona (mm) uključujući disk (6 mm) ili bunarčić (9 mm) \pm standardna devijacija)

GRUPA	Mikroorganizam	Metoda			Kontrole (antibiotik/ antimikotik)
		Disk difuziona	Metoda bunarčića		
		15 μ l	50 μ l	100 μ l	
Kvasci	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	nd	nd	nd	> 37*
	<i>Candida albicans</i>	nd	nd	nd	15,33 \pm 0,58**
Plesni	<i>Aspergillus niger</i>	nd	nd	nd	27,67 \pm 0,58*
	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	nd	nd	nd	31,33 \pm 0,58*

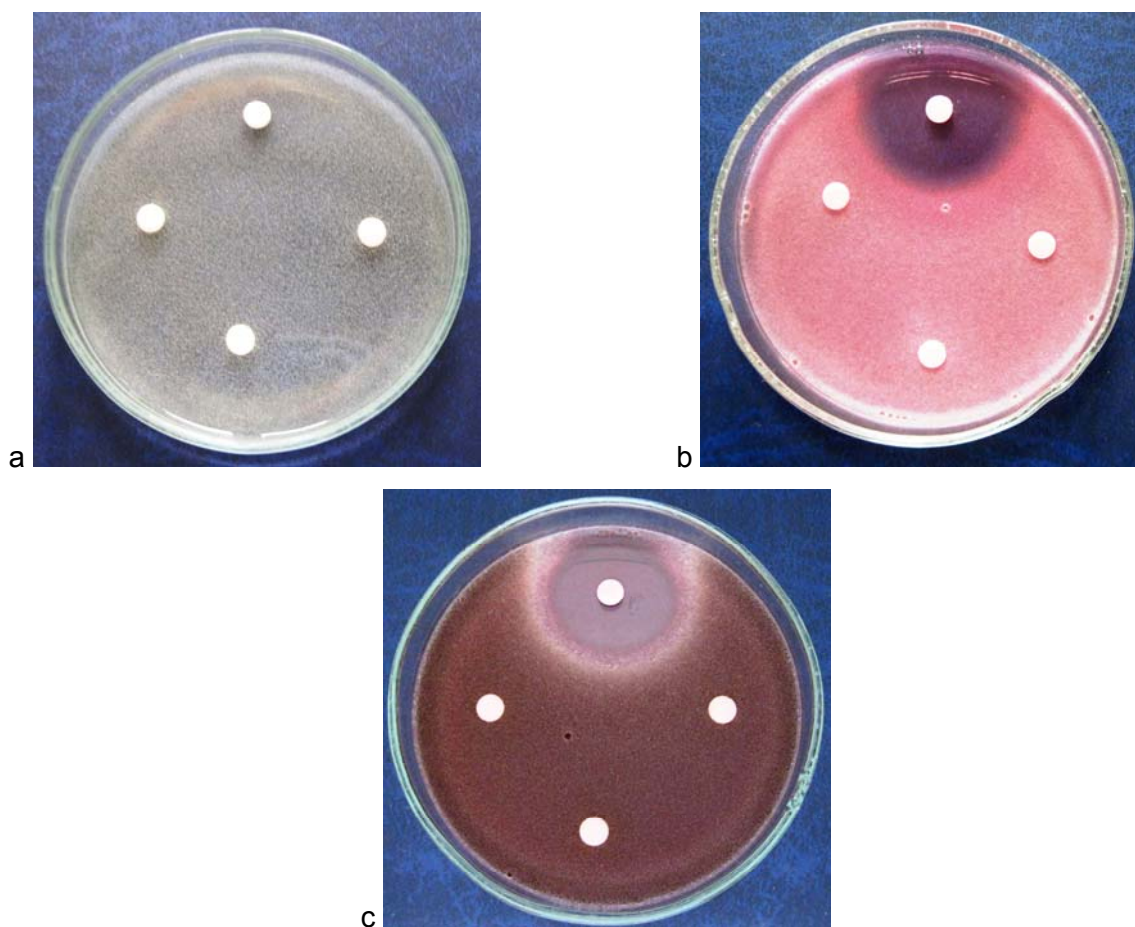
nd – nije detektovana zona inhibicije

* - čista zona oko diska/bunarčića

** - zona redukovano rasta

Prema rezultatima u tabeli 25 ekstrakt tropa cvekle nije pokazao aktivnost na mikroorganizme sa eukariotskim tipom ćelija (kvasci i plesni). *Candida albicans* je najrezistentnija testirana eukariotska vrsta, jer je kontrolni antifungalni agens (rastvor cycloheximide) pokazao samo zonu smanjenog rasta, dok druge eukariotske vrste su pokazale halo zonu od 27 mm ili više. Ipak, odsustvo antibakterijske aktivnosti ili prisustvo blage aktivnosti u slučaju nekih bakterija, kvasaca i plesni nisu pokazali prisustvo bioaktivnih komponentata, ali ni neaktivnost ekstrakta tropa cvekle. Odnosno, aktivne komponente mogu da budu prisutne u nedovoljnim količinama da spreče rast ćelija. Odsustvo aktivnosti može biti dokazano korišćenjem većih doza. Takođe, primenom većih količina ekstrakta, neki drugi sastojci mogu pokazati antagonističke efekte ili negirati pozitivne efekte bioaktivnih agenasa (Parekh i Chanda, 2008).

Na slici 59 prikazane su Petri ploče (disk difuziona metoda) na kojima se vidi da ekstrakt tropa cvekle nije pokazao antimikrobnu aktivnost protiv kvasaca *Candida albicans* i plesni *Aspergillus niger* i *Penicillium aurantiogriseum*.



Slika 59. Antimikrobna aktivnost ekstrakta tropa cvekle protiv (a) *Candida albicans*; (b) *Penicillium aurantiogriseum*; (c) *Aspergillus niger*

Rezultati prikazani u tabeli 25 pokazuju da je korišćeni antimikotik u disk difuzionoj metodi pokazao dobru aktivnost, obrazujući čiste zone oko diskova prema vrstama *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium aurantiogriseum* i *Aspergillus niger*, odnosno zonu sa redukovanim rastom prema vrsti *Candida albicans*.

Koockfak i saradnici (2010) su testirali antibakterijsku aktivnost ekstrakta tropa cvekle na 10 kliničkih bakterijskih izolata, disk difuzionom metodom koristeći 50 µl rastvora ekstrakta. Sve testirane koncentracije (50, 100, 200 i 400 mg/ml) ekstrakata nisu pokazale značajnu inhibitornu aktivnost na Gram negativne bakterije. Među Gram pozitivnim bakterijama najrezistentnije su bile *Listeria monocytogenes* i *Bacillus cereus*, dok je značajna antimikrobna aktivnost bila na *Staphylococcus epidermidis*. Rauha i saradnici (2000) su testirali antimikrobnu aktivnost metanolnog ekstrakta cvekle cilindar difuzionom metodom (500 µl ekstrakta, 1 mg/ml). Kao i kod ekstrakta tropa cvekle, nije bilo aktivnosti na eukariote (*Aspergillus niger* i *Candida albicans*), koje su potvrdile njihovu veću rezistentnost u odnosu na bakterije. Samo je dokazana blaga antibakterijska aktivnost *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, najverovatnije zbog upotrebe male koncentracije ekstrakta tropa cvekle (1 mg/ml). Testirajući 100 µl vodenog ekstrakta lista (disk difuzionom metodom), Parekh i Chanda (2008) su postigli blagu inhibitornu aktivnost na *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*, dok je etanolni ekstrakt lista (agar well difuzionom metoda) inhibirao rast *Staphylococcus subfava*.

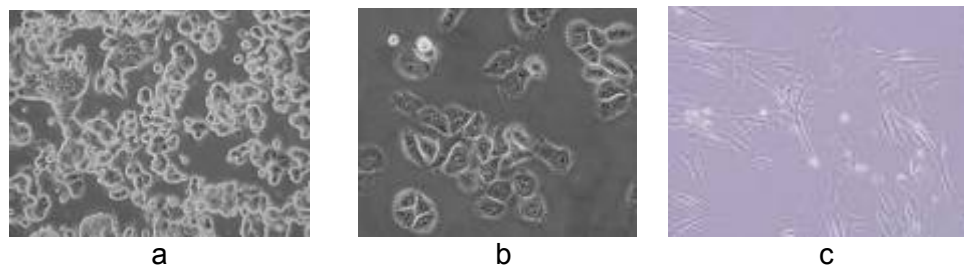
Razlike u rezultatima primenom difuzionih metoda se mogu javiti najverovatnije kao posledica niza faktora kao što su: veličina inokoluma, faza razmnožavanja u kojoj se nalazi ispitivani mikroorganizam, prečnik diska/bunarčića, stabilnost antimikrobnog agensa, itd. Takođe, na rezultate može uticati različit sastav i količina aktivnih komponenata ekstrahovanih iz testiranog materijala, kao i uticaj geografskog porekla uzorka.

4.9. ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPA ODABRANIH SORTI CVEKLE

Multi-endpoint bioeseji na humanim ćelijskim linijama koji se baziraju na odgovoru cele ćelije predstavljaju snažan indikator metaboličkih, biohemijskih i genetskih promena koje nastaju delovanjem ispitivanih supstanci.

Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle ispitana je *in vitro*, njihovim delovanjem na rast tri histološki različite humane ćelijske linije: MCF7 (humani adenokarcinom dojke), HeLa (humani epitelni karcinom cerviksa) i MRC-5 (humani karcinom pluća) u opsegu koncentracija koje su iznosile 1,95 - 1000 µg/ml. Ispitivani

ekstrakti tropa odabranih sorti cvekle uticali su na rast tumorskih ćelija u zavisnosti od primenjene koncentracije i vrste ćelijske linije. U tabeli 26 su date EC_{50} vrednosti ispitanih ekstrakata tropa cvekle.



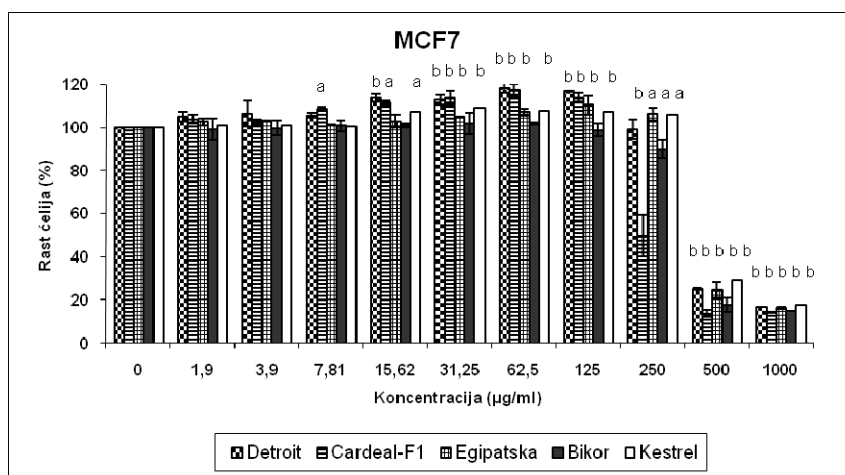
Slika 60. Humane ćelijske linije: a) MCF7 (humani adenokarcinom dojke); b) HeLa (humani epitelni karcinom cerviksa); c) MRC-5 (humani karcinom pluća)

Tabela 26. EC_{50} vrednosti ekstrakata tropa ispitivanih sorti cvekle

Trop cvekle	EC_{50} [$\mu\text{g/ml}$] ^a		
	MCF7	HeLa	MRC-5
Detroit	577,13	755,36	503,53
Cardeal-F1	383,00	427,78	362,48
Egipatska	573,28	697,49	370,29
Bikor	460,00	646,79	455,77
Kestrel	587,88	665,53	393,83

^a U Opsegu koncentracija od 1,95 do 1000 $\mu\text{g/ml}$

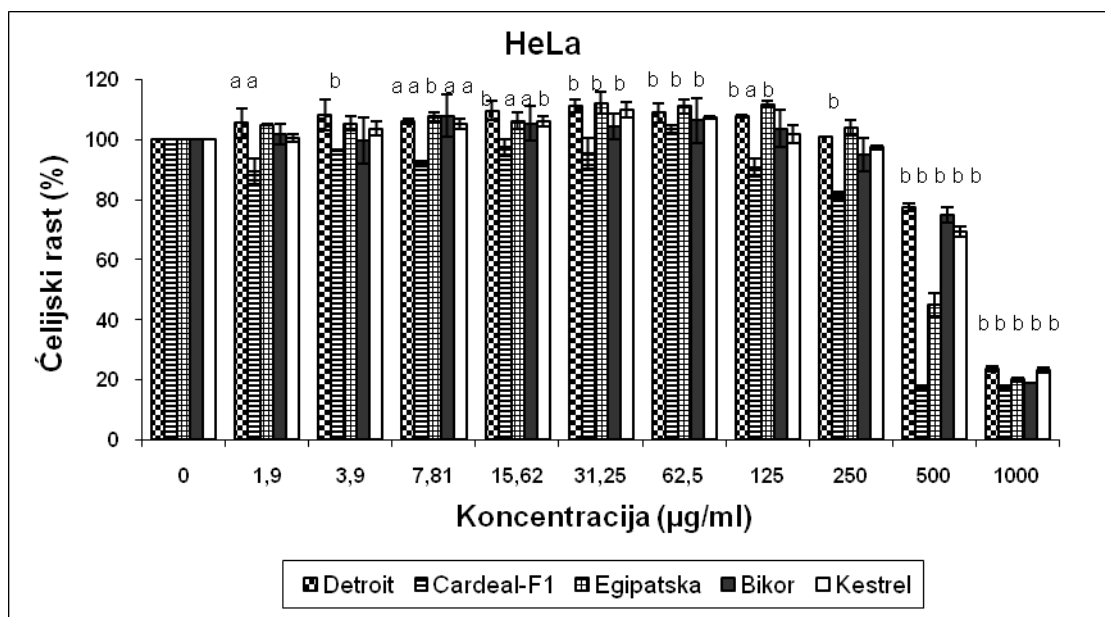
Na slici 61 prikazane su inhibitorne aktivnosti ekstrakata tropa cvekle sorti Detroit, Cardeal-F1, Egipatske, Bikor i Kestrel cvekle na rast ćelija adenokarcinoma dojke, odnosno MCF7 ćelijske linije.



Slika 61. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa cvekle sorti Detroit, Cardeal-F1, Egipatske, Bikor i Kestrel na rast MCF7 ćelijske linije (**a**- $p < 0.05$, **b**- $p < 0.01$; one-way ANOVA). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD dva nezavisna eksperimenta, izvedena u kvadrilikatu

Na MCF7 ćelijskoj liniji antiproliferativni efekti su uočeni na najvišim ispitivanim koncentracijama ($\geq 250 \mu\text{g/ml}$) (slika 61). Najveću antiproliferativnu aktivnost pokazali su ekstrakti tropa cvekle sorti Cardeal-F1 ($EC_{50}=383 \mu\text{g/ml}$) i Bikor ($EC_{50}=460 \mu\text{g/ml}$) (tabela 50), dok su EC_{50} vrednosti (koncentracije koje su inhibirale rast za 50%) ostalih ekstrakata tropa bile u rasponu od $573,28 - 587,88 \mu\text{g/ml}$ (tabela 26). Pored uočenih inhibitornih efekata na rast na višim koncentracijama, u opsegu koncentracija od $7,81 - 125 \mu\text{g/ml}$ ekstrakti tropa cvekli sorti Detroit, Kestrel, Egipatska i Cardeal-F1 su izazvali statistički značajnu ($p < 0,01$) stimulaciju rasta MCF7 ćelijske linije (slika 61). Ekstrakt tropa cvekle sorte Bikor jedini nije izazvao stimulaciju rasta MCF7 ćelijske linije.

Na slici 62 prikazane su inhibitorne aktivnosti ekstrakata tropa cvekle sorti Detroit, Cardeal-F1, Egipatske, Bikor i Kestrel na rast ćelija humanog epitelnog karcinoma cerviksa, odnosno HeLa ćelijske linije.

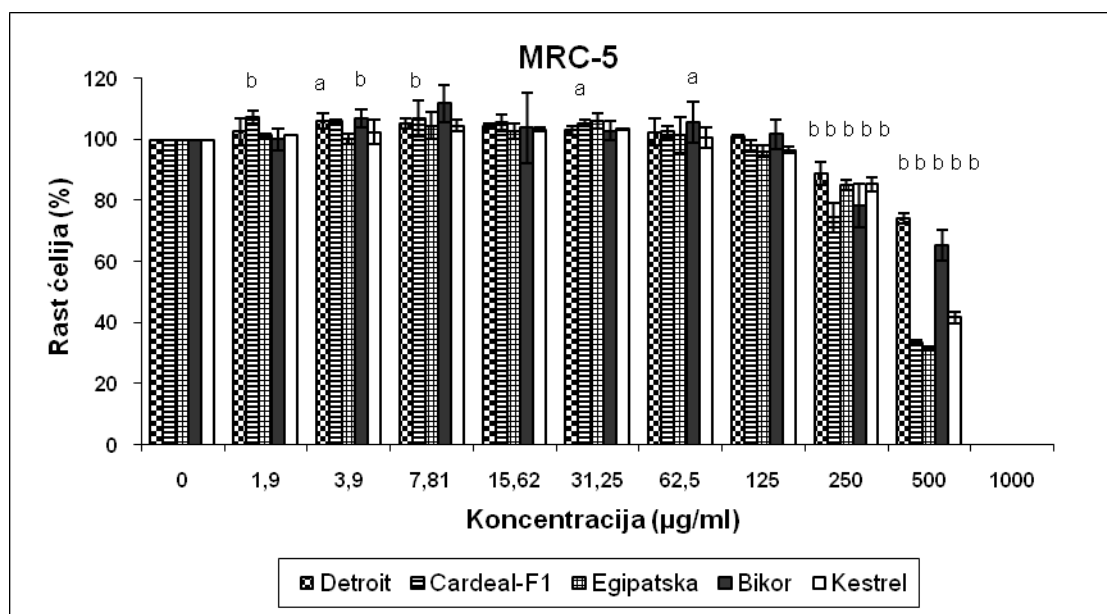


Slika 62. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa cvekle sorti Detroit, Cardeal-F1, Egipatske, Bikor i Kestrel cvekle na rast HeLa ćelijske linije (**a**- $p < 0,05$, **b**- $p < 0,01$; one-way ANOVA). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD dva nezavisna eksperimenta, izvedena u kvadrilikatu.

I na HeLa ćelijskoj liniji antiproliferativni efekti su uočeni na najvišim ispitivanim koncentracijama ($\geq 250 \mu\text{g/ml}$) (slika 62). Najveću antiproliferativnu aktivnost pokazao je ekstrakt tropa cvekle sorte Cardeal-F1 ($EC_{50}=427,78 \mu\text{g/ml}$) (tabela 26), dok su EC_{50} vrednosti (koncentracije koje su inhibirale rast za 50%) ostalih ekstrakata bile su u rasponu od $646,79 - 755,36 \mu\text{g/ml}$ (tabela 26). Pored uočenih inhibitornih efekata na rast na višim

koncentracijama, u opsegu koncentracija od 3,91 - 250 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakti tropa cvekle sorti Detroit, Kestrel i Egipatska su izazvali statistički značajnu ($p < 0,01$) stimulaciju rasta HeLa ćelijske linije (slika 62).

Na slici 63 prikazane su inhibitorne aktivnosti ekstrakata tropa cvekle sorti Detroit, Cardeal-F1, Egipatske, Bikor i Kestrel na rast ćelija humanog karcinoma pluća, odnosno MRC-5 ćelijske linije.



Slika 63. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa cvekle sorti Detroit, Cardeal-F1, Egipatske, Bikor i Kestrel cvekle na rast MRC-5 ćelijske linije (**a**- $p < 0,05$, **b**- $p < 0,01$; one-way ANOVA). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD dva nezavisna eksperimenta, izvedena u kvadrilikatu.

Na MRC-5 ćelijskoj liniji antiproliferativni efekti su uočeni takođe na najvišim ispitivanim koncentracijama ($\geq 250 \mu\text{g/ml}$) (slika 63). Najveću antiproliferativnu aktivnost pokazali su ekstrakti tropa cvekle sorti Cardeal-F1 ($EC_{50} = 362,48 \mu\text{g/ml}$) i Egipatska ($EC_{50} = 370,29 \mu\text{g/ml}$) (tabela 26), dok su EC_{50} vrednosti (koncentracije koje su inhibirale rast za 50%) ostalih ekstrakata bile su u rasponu od 393,83 - 503,53 $\mu\text{g/ml}$ (tabela 26). Pored uočenih inhibitornih efekata na rast na višim koncentracijama, u opsegu koncentracija od 1,95 - 7,81 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakti tropa cvekle sorti Bikor i Cardeal-F1 su izazvali statistički značajnu ($p < 0,01$) stimulaciju rasta MRC-5 ćelijske linije (slika 63).

Kannan je 2011. godine testirao antiproliferativnu aktivnost soka cvekle na ćelijskoj liniji raka debelog creva HCT-116 koja poseduje aktivan gen za reparaciju genetskih oštećenja (p53 +/+), ali i na njenoj genetskoj modifikaciji koja je sadržala neaktivan gen (p53 -/-). Sok cvekle je inhibirao rast ćelija i doveo do povećane ćelijske smrti (apoptoze)

ćelija koje poseduju aktivan mehanizam za reparaciju genetskih oštećenja (p53 +/+), u poređenju sa p53 -/- ćelijskom linijom gde je ovaj mehanizam neaktivan. Ovo istraživanje ističe veliki potencijal aktivnih materija prisutnih u cvekli u lečenju rezistentnih tumora debelog creva.

Aktivne materije cvekle smanjuju sposobnost rasta ćelija raka prostate, debelog creva, dojke, jetre (Chavez-Santoscoy, 2009) i melanoma (Wu, 2006). Kao aktivne materije izdvajaju se fenolna jedinjenja, betacijani, betaksantini i flavonoidi (miricetin, baikalein, galna kiselina). Ukazano je da prisustvo C₂-C₃ dvostruke veze i o-dihidroksifenil struktura A i B prstena flavonoida doprinosi boljoj antiproliferativnoj aktivnosti flavonoida (Martinez, 2003).

U tabeli 27 su dati rezultati korelacione analize antiproliferativne aktivnosti i rezultata ESR spektroskopije ekstrakata tropa cvekle.

Tabela 27. Korelacija rezultata antiproliferativne aktivnosti i rezultata ESR spektroskopije ekstrakata tropa cvekle

	$r^{\cdot\text{OH}}$	$r^{\cdot\text{O}_2^-}$	$r^{\text{DPPH}\cdot}$
MCF	0,598	0,207	0,373
HeLa	0,861	0,250	0,058
MRC-5	0,573	0,148	0,689

Vrlo dobra korelacija ($r > 0,8$) utvrđena je između antiproliferativne aktivnosti na HeLa ćelijske linije sa antiradikalnom aktivnosti na hidrosil radikale. Dobra korelacija ($r > 0,5$) zabeležena je između antiproliferativne aktivnosti na MRC-5 i AA_{DPPH·}, kao i AA_{·OH}, ali i MCF na AA_{·OH}.

Ostali korelacioni koeficijenti ukazali su na osrednju ($r < 0,5$) ili slabu ($r < 0,3$), ali pozitivnu uzajamnu zavisnost između antiproliferativne i antiradikalne aktivnosti.

5.0. ZAKLJUČAK

U radu su ispitani hemijski sastav, antiradikalska, antiproliferativna i antimikrobna aktivnost ekstrakata tropa odabranih sorti (Detroit, Cardeal-F1, Egipatska, Bikor i Kestrel) cvekle (*Beta vulgaris*).

Ispitivanja hemijskog sastava ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle obuhvatila su spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i betalaina, kao i HPLC analizu fenolnih jedinjenja i betalaina.

Rezultati spektrofotometrijskih ispitivanja ukazuju da je najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (942,33 mg/g) i flavonoida (461,03 mg/g) u ekstraktu tropa cvekle sorte Bikor, betacijana kod ekstrakta tropa cvekle sorte Detroit (220,56 mg/g), a betaksantina kod ekstrakta tropa cvekle sorte Bikor (165,93 mg/g).

Rezultati HPLC analize fenolnih jedinjenja pokazali su da je najzastupljenije jedinjenje fenolne strukture katehin, i to u svim ispitivanim ekstraktima tropa različitih sorti cvekle. Najveći sadržaj je određen kod ekstrakta tropa cvekle sorte Bikor i iznosio je 68,71 mg/g suvog ekstrakta, što je 87,33% ukupnih fenolnih jedinjenja u tom ekstraktu.

Rezultati HPLC analize betacijana ukazuju da trop cvekle sorte Detroit ima najveći sadržaj betanina (81,45 mg/g suvog ekstrakta) i izobetanina (50,36 mg/g suvog ekstrakta), što je u saglasnosti sa rezultatima određivanja betalaina spektrofotometrijskom metodom. Rezultati HPLC analize betaksantina ukazuju da ekstrakti tropa cvekle sorti Detroit i Egipatska imaju sadržaj vulgaksantina I 0,71, ekstrakt tropa cvekle sorte Bikor 0,70, a ekstrakt tropa cvekle sorte Kestrel 0,38 mg/g suvog ekstrakta. U ekstraktu tropa cvekle sorte Cardeal-F1 nisu identifikovani betaksantini.

Primenom ESR spektroskopije određena je antiradikalska aktivnost ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle na reaktivne superoksid anjon i hidroksli radikale, kao i na stabilne DPPH radikale.

Ekstrakt tropa cvekle sorte Bikor pokazao je najizrazitije delovanje na hidroksil radikale ($EC_{50}^{\cdot OH}=0,042$ mg/ml), dok je najmanju antiradikalsku aktivnost pokazao ekstrakt tropa cvekle sorte Cardeal-F1 u celom opsegu ispitivanih koncentracija. Ekstrakt tropa cvekle sorte Bikor postigao je antiradikalsku aktivnost od 100% pri koncentraciji od 0,15 mg/ml, ekstrakti tropa cvekle sorti Detroit i Kestrel pri koncentraciji od 0,25 mg/ml, ekstrakt tropa cvekle sorte Egipatska pri 0,5 mg/ml, a ekstrakt tropa cvekle Cardeal-F1 pri koncentraciji od 1,0 mg/ml.

Ekstrakt tropa cvekle sorte Bikor pokazao je najizrazitije delovanje na superoksid anjon radikale ($EC_{50}^{O_2^{\cdot-}}=0,110$ mg/ml), dok je najmanju antiradikalnu aktivnost pokazao ekstrakt tropa cvekle sorte Cardeal-F1 u celom opsegu ispitivanih koncentracija. Ekstrakti tropa cvekle sorti Bikor i Kestrel potpuno su uklonili superoksid anjon radikale iz reakcione smeše ($AA_{O_2^{\cdot-}} = 100\%$) pri istoj primenjenoj koncentraciji od 0,25 mg/ml, a ekstrakti tropa cvekle sorti Egipatska i Cardeal-F1 pri koncentraciji od 1,5 mg/ml, a ekstrakt tropa sorte Detroit pri koncentraciji od 2,0 mg/ml.

Ekstrakt tropa cvekle sorte Detroit pokazao je najizrazitije delovanje na DPPH radikale ($EC_{50}^{DPPH^{\cdot}}=0,075$ mg/ml), dok je najmanju antiradikalnu aktivnost pokazao ekstrakt tropa cvekle sorte Kestrel u celom opsegu ispitivanih koncentracija. Ekstrakti tropa cvekle sorti Cardeal-F1, Egipatska, Bikor i Kestrel potpuno su uklonili DPPH radikale iz reakcione smeše ($AA_{DPPH^{\cdot}}=100\%$) pri istoj primenjenoj koncentraciji od 1,0 mg/ml, a ekstrakt tropa cvekle sorte Detroit pri koncentraciji od 0,3 mg/ml.

Na osnovu EC_{50} vrednosti evidentno je da su ekstrakti tropa svih ispitivanih sorti cvekle pokazali veću antiradikalnu aktivnost na hidrosil i superoksid anjon radikale od sintetičkog antioksidanta BHA. Ekstrakti tropa cvekle sorti Detroit i Cardeal-F1 su imali veću antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale od sintetičkog antioksidanta BHA.

Korelacionom analizom određena je zavisnost između antioksidativnih aktivnosti (antiradikalna aktivnost na $\cdot OH$, $O_2^{\cdot-}$ i DPPH \cdot , izraženih kao EC_{50} vrednosti) i sadržaja fitohemikalija (ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida, ukupnih betalaina, fenolnih jedinjenja određenih HPLC metodom) ekstrakata tropa ispitivanih sorti cvekle.

Vrlo dobra korelacija ($r > 0,8$) utvrđena je između sadržaja ukupnih betacijana i protokatehinske kiseline sa antiradikalnom aktivnostima na DPPH radikale, kao i hlorogenske kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale. Dobra korelacija ($r > 0,5$) zabeležena je između ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i $AA_{OH^{\cdot}}$, sadržaja ukupnih flavonoida i rutina na $AA_{O_2^{\cdot-}}$, kao i totalnih betalaina na $AA_{DPPH^{\cdot}}$.

Određena je antioksidativna aktivnost na stabilne DPPH radikale i spektrofotometrijskom metodom. Na osnovu EC_{50} vrednosti može se zaključiti da najjače delovanje pokazuje ekstrakt tropa cvekle sorte Detroit ($EC_{50}^{DPPH^{\cdot}}=2,064$ $\mu g/ml$), a najslabije ekstrakt tropa sorte Kestrel. Svi ekstrakti tropa cvekle pokazali su bolju antiradikalnu aktivnost od sintetičkog antioksidanta BHA. Redosled aktivnosti ispitivanih ekstrakata tropa cvekle podudaraju se sa redosledom antioksidativne aktivnosti određene ESR metodom.

Ispitana je redukciona sposobnost ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle. Najjaču redukcionu sposobnost pokazao je ekstrakt tropa cvekle sorte Detroit ($RS_{0,5}=0,123$ mg/ml), a najslabiju ekstrakt tropa cvekle sorte Egipatska. Svi ekstrakti imali su neznatno slabiju redukcionu sposobnost od BHA.

Rezultati površinske boje ekstrakata ukazuju da je svetloća površine ekstrakta (L^*) najmanja kod ekstrakta tropa cvekle sorte Bikor. Učešće crvenog tona (a^*) u boji površine znatno je veća kod ekstrakta sorte Bikor u odnosu na sve ostale ekstrakte. Učešće žutog tona (b^*) u boji površine neznatno varira, ali je najveće kod sorte Egipatska. Razlike u b^* vrednostima najmanje su izražene u poređenju sa druga dva pokazatelja boje (L^* i a^*). Boje ekstrakata su bile veoma dobro izražene, na šta ukazuju visoke vrednosti parametra za razliku boje ΔE^*ab (CIELab).

Prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakta tropa cvekle korišćene su dve metode, disk difuziona metoda i metoda bunarčića. Antimikrobna aktivnost određena disk difuzionom metodom bila je manja od antimikrobne aktivnosti određene drugom ispitivanom metodom.

Oko kontrolnih diskova koji su impregnirani antibioticima (cefotaxim 30 μg / clavulanic acid 10 μg diskovi) pojavile su se „čiste“ (bez ikakvog vidljivog rasta) zone u slučaju svih testiranih bakterija. Najveća aktivnost zabeležena je prema bakterijama *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* (prečnici veći od 30 mm), a najmanji prečnici u slučaju Gram-pozitivnih bakterija *Listeria monocytogenes* i *Enterococcus faecalis* (prečnici manji od 15 mm).

Upotrebom disk difuzione metode nije uočena antibakterijska aktivnost ekstrakta cvekle protiv testiranih Gram-pozitivnih bakterija. Takođe, sve testirane vrste roda *Bacillus* pokazale su rezistentnost prema ekstraktu cvekle korišćenjem i disk difuzione i metode bunarčića. Izvesna antibakterijska aktivnost određena metodom bunarčića zabeležena je na bakterije *Staphylococcus*. Čista zona oko bunarčića zabeležena je upotrebom 100 μl ekstrakta na bakterije *Staphylococcus sciuri* i *Staphylococcus epidermitis*. Najveću aktivnost ekstrakt tropa cvekle je ispoljio prema *Staphylococcus equorum* prilikom aplikovanja 50 i 100 μl ekstrakta.

Ispitan je i uticaj ekstrakta tropa cvekle na predstavnike eukariotskih mikroorganizama. Ekstrakt tropa cvekle nije pokazao aktivnost na mikroorganizme sa eukariotskim tipom ćelija (kvasci i plesni). *Candida albicans* je najrezistentnija testirana eukariotska vrsta, dok druge eukariotske vrste su pokazale halo zonu od 27 mm ili više.

Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa odabranih sorti cvekle ispitana je *in vitro*, njihovim delovanjem na rast tri histološki različite humane ćelijske linije: MCF7 (humani adenokarcinom dojke), HeLa (humani epitelni karcinom cerviksa) i MRC-5 (humani karcinom pluća) u opsegu koncentracija koje su iznosile 1,95 - 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ispitivani ekstrakti tropa odabranih sorti cvekle uticali su na rast tumorskih ćelija u zavisnosti od primenjene koncentracije i vrste ćelijske linije.

Na MCF7 ćelijskoj liniji antiproliferativni efekti su uočeni na najvišim ispitivanim koncentracijama (≥ 250 $\mu\text{g/ml}$). Najveću antiproliferativnu aktivnost pokazali su ekstrakti tropa cveklike sorti Cardeal-F1 ($EC_{50}=383$ $\mu\text{g/ml}$) i Bikor ($EC_{50}=460$ $\mu\text{g/ml}$), dok su EC_{50} vrednosti ostalih ekstrakata tropa bile u rasponu od 573,28 - 587,88 $\mu\text{g/ml}$. Pored uočenih inhibitorynih efekata na rast, na višim koncentracijama, u opsegu koncentracija od 7,81 - 125 $\mu\text{g/ml}$ ekstrakti tropa cveklike sorti Detroit, Kestrel, Egipatska i Cardeal-F1 su izazvali statistički značajnu ($p < 0,01$) stimulaciju rasta MCF7 ćelijske linije, dok ekstrakt tropa cveklike sorte Bikor nije pokazao tu aktivnost.

I na HeLa ćelijskoj liniji antiproliferativni efekti su uočeni na najvišim ispitivanim koncentracijama (≥ 250 $\mu\text{g/ml}$). Najveću antiproliferativnu aktivnost pokazao je ekstrakt tropa cveklike sorte Cardeal-F1 ($EC_{50}=427,78$ $\mu\text{g/ml}$), dok su EC_{50} vrednosti ostalih ekstrakata bile u rasponu od 646,79 - 755,36 $\mu\text{g/ml}$.

Na MRC-5 ćelijskoj liniji antiproliferativni efekti su uočeni takođe na najvišim ispitivanim koncentracijama (≥ 250 $\mu\text{g/ml}$). Najveću antiproliferativnu aktivnost pokazali su ekstrakti tropa cveklike sorti Cardeal-F1 ($EC_{50}=362,48$ $\mu\text{g/ml}$) i Egipatska ($EC_{50}=370,29$ $\mu\text{g/ml}$), dok su EC_{50} vrednosti ostalih ekstrakata bile su u rasponu od 393,83 - 503,53 $\mu\text{g/ml}$.

Pored uočenih inhibitorynih efekata na rast, ekstrakti tropa cveklike sorti Detroit, Kestrel i Egipatska su izazvali statistički značajnu ($p < 0,01$) stimulaciju rasta HeLa ćelijske linije u opsegu koncentracija od 3,91 - 250 $\mu\text{g/ml}$. Takođe, ekstrakti tropa cveklike sorti Bikor i Cardeal-F1, u opsegu koncentracija od 1,95 - 7,81 $\mu\text{g/ml}$ su izazvali statistički značajnu ($p < 0,01$) stimulaciju rasta MRC-5 ćelijske linije.

Vrlo dobra korelacija ($r > 0,8$) utvrđena je između antiproliferativne aktivnosti na HeLa ćelijske linije sa antiradikalnom aktivnosti na hidrosil radikale. Dobra korelacija ($r > 0,5$) zabeležena je između antiproliferativne aktivnosti na MRC-5 i $AA_{DPPH\cdot}$, kao i $AA\cdot OH$, ali i antiproliferativne aktivnosti na MCF i $AA\cdot OH$.

6.0. LITERATURA

- Abeyssekere, M., Samnpathu, S. R., Shankaranarayana, M. L. Studies on different methods of extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *Journal of Food Science and Technology*, 27, 6, 336-339, 1990.
- Akita, T., Hina, Y., Nishi, T. Production of betacyanins by a cell culture of table beet (*Beta vulgaris* L.), *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 64, 9, 1807-1812, 2000.
- Allegra, M., Furtmüller, P.G., Jantschko, W., Zederbauer, M., Tesoriere, L., Livrea, M.A., Obinger, C. Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332, 837–844, 2005.
- Altamirano, R.C., Drdák, M., Simon, P., Smelík, A., Simko, P. Stability of red beet pigment concentrate in maize starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58, 595–596, 1992.
- Alzamora, S.M., Salvatori, D., Tapia, S.M., López-Malo, A., Welti-Chanes, J., Fito, P. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *Journal of Food Engineering*, 67, 205–214, 2005.
- Al-Wandawi, H., Abdul-Rahman, M., Al-Shaikhly, K. Tomato processing wastes as essential raw material source. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 33, 804–807, 1985.
- Ames, B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915- 7922, 1993.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., Trinajstić, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids, *Croatian Chemical Acta*, 76, 55-61, 2003.
- A Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on the approximation of the laws of the Member States relating to Food Supplements 2000/0080, text with EEA relevance, 2000.
- Arai, S. Studies on functional foods in Japan. State of the art. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60, 9-15, 1996.
- Arogba, S.S. The performance of processed mango (*Mangifera indica*) kernel flour in a model food system. *Bioresource Technology*, 70, 277–281, 1999.
- Aruoma, O.I., Smith C., Cecchini R., Evans P.J., Halliwell B. Free radical scavenging and inhibition of lipid peroxidation by beta-blockers and by agents that interfere with

- calcium metabolism. A physiologically significant process? *Biochemical Pharmacology*, 42, 735-743, 1991.
- Ashok, B.T., Ali, R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Experimental Gerontology*, 34, 293-303, 1999.
- Askar, A., Treptow, H. Nebenprodukte bei der Verarbeitung tropischer Früchte. *Industrielle Obst- und Gemüseverwertung*, 83, 7–13, 1998.
- Assunta Dessi, M., Aeschbach, R. Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5181–5187, 1998.
- Attoe, E.L., von Elbe, J.H. Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. *Journal of Food Science*, 46, 1934-1937, 1981.
- Attoe, E.L., von Elbe, J.H. Degradation kinetics of betanine in solutions as influenced by oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 708–712, 1982.
- Attoe, E.L., von Elbe, J.H. Oxygen involvement in betanin degradation. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und – Forschung A*, 179, 232–236, 1984.
- Attoe, E.L., von Elbe, J.H. Oxygen involvement in betanine degradation: effect of antioxidants. *Journal of Food Science*, 50, 106–110, 1985.
- Avelino, A., Avelino, H.T., Roseiro, J.C., Collaco, M.T.A. Saccharification of tomato pomace for the production of biomass. *Bioresource Technology*, 61, 159–162, 1997.
- Barrera, F.A.G., Reynoso, C.R., Gonzalez de Mejia, E. Stability of betalains extracted from garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food Science Technology International*, 4, 115–120, 1998.
- Baysal, T., Ersus, S., Starmans, D.A.J. Supercritical CO₂ extraction of β-carotene and lycopene from tomato paste waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5507–5511, 2000.
- Berlin, J., Sieg, S., Strack, D., Borenn, B., Harms, H. Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L., *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 5, 163-174, 1986.
- BgVV. BgVV empfiehlt Rauchern auf Beta-Carotin-haltige Präparate zu verzichten. Press Release, 30 January, 1998.
- Bhullar, J.K., Sogi, D.S. Shelf life studies and refining of tomato seed oil. *Journal of Food Science and Technology India*, 37, 542–544, 2000.
- Böhm, V., Tiemeni, B., Otto, K. Tomato marc - a good source of the efficient antioxidant lycopene? In *Nutritionists meet food scientists and technologists*. Abstract book, 26, Porto, Portugal, 12–14 April, 2000.

- Bilyk, A., Howard, M. Reversibility of thermal degradation of betacyanins under the influence of isoascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 906-908, 1982.
- Bokern, M., Heuer, S., Wray, V., Witte, L., Macek, T., Vanek, T., Strack, D. Ferulic acid conjugates and betacyanins from cell cultures of *Beta vulgaris*, *Phytochemistry*, 30, 3261-3265, 1991.
- Bokern, M., Heuer, S., Strack, D. Hydroxycinnamic acid transferases in the biosynthesis of acylated betacyanins: purification and characterization from cell cultures of *Chenopodium rubrum* and occurrence in some other members of the Caryophyllales, *Botanical Acta*, 105, 146-151, 1992.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical-Scavenging Efficiencies, *Methods in Enzymology*, 186, 343-355, 1990.
- Borycka, B. Fruit pomace in new dietary fiber compositions. *Przemysl-Fermentacyjny-i-Owocowo Warzywny (Poland)* 40, 12, 37-39, 1996.
- Burdock, G.A., Carabin, I.G., Griffiths, J.C. The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. *Toxicology*, 221, 17-27, 2006.
- Butera, D., Tesoriere, L., di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., Kohen, R., Livrea, M. A. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6895-6901, 2002.
- Broughton, N.W., Dalton, C.C., Jones, G.C., Williams, E.L. Adding value to sugar beet pulp. *Hoehere Erloese aus Zuckerruebenschnitzeln. Zuckerindustrie* 120, 5, 411-416, 1995a.
- Broughton, N.W., Dalton, C.C., Jones, G.C., Williams, E.L. Adding value to sugar beet pulp. *International Sugar Journal*, 97, 1154, 57-60, 93-95, 1995b.
- Cai, Y., Sun, M., Wu, H., Huang, R., Corke, H. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2063-2070, 1998.
- Cai, Y., Sun, M., Corke, H. Colorant properties and stability of *Amaranthus* pigments, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4491, 1998.
- Cai, Y., Corke, H. *Amaranthus* betacyanin pigments applied in model food systems. *Journal of Food Science*, 64, 869-873, 1999.
- Cai, Y.Z., Corke, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, 65, 6, 1248-1252, 2000.

- Cai, Y., Sun, M., Corke, H. Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the Amaranthaceae, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1971-1978, 2001a.
- Cai, Y., Sun M., Schliemann, W., Corke, H. Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4429, 2001b.
- Cai, Y., Sun, M., Corke, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2288-2294, 2003.
- Cai, Y., Sun, M., Corke, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends Food Science Technology*, 16, 370, 2005.
- Cai, Y., Sun, M., Corke, H. Antioxidant activity of betalains from plants of Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2288-2294, 2003.
- Caldwell, C. R., Britz, S. J., Mirecki R. M. Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) grown in controlled environments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1125-1129, 2005.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3426–3431, 1996.
- Carson, K.J., Collins, J.L., Penfield, M.P. Unrefined, dried apple pomace as a potential food ingredient. *Journal of Food Science* 59, 6, 1213–1215, 1994.
- Carvalho, F., Roseiro, J.C., Collaco, M.T.A. Biological conversion of tomato pomace by pure and mixed fungal cultures. *Process biochemistry*, 29, 7, 601–605, 1994.
- Castellar, M.R., Obón, J. M., Alacid, M. Fernández-López, J.A. Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2772-2776, 2003.
- Castellar, R., Obon, J.M., Fernández-López, J.A. The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 122–128, 2006.
- Chavez-Santoscoy, R.A., Gutierrez-Urbe, J.A., Serna-Saldívar, S.O. Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine prickly pears (*Opuntia* spp.) juices. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 2, 146-152, 2009.
- Chen, B.H., Tang, Y.C. Processing and stability of carotenoid powder from carrot pulp waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2312–2318, 1998.
- CIE. International Commission on Illumination, Colorimetry: Official Recommendation of the International Commission on Illumination. Publication CIE No. (E-1.31) Bureau Central de la CIE, Paris, France, 1976.

- Clarke, S. Eat bagasse. *Sugar Journal* 58, 12, 1995.
- Clement, J.S., Mabry, T.J. Pigment evolution in the Caryophyllales: A systematic overview. *Botanical Acta*, 109, 360–367, 1996.
- Clemente, A., Sanchez-Vioque, R., Vioque, J., Bautista, J., Millan, F. Chemical composition of extracted dried olive pomaces containing two and three phases. *Food-Biotechnology*, 11, 3, 273–291, 1997.
- Clifford, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science the Food and Agriculture* 79, 362-372, 1999.
- Cohen, E., Saguy, I. Effect of water activity and moisture content on the stability of beet powder pigments, *Journal of Food Science*, 48, 703-707, 1983.
- Constabel, F., Haala G. Recherches sur la formation de pigments dans les tissus de etterave fourragère cultivés in vitro, *Coll. Nat. CNRS*, 223-229, 1968.
- Constabel, F., Nassif-Makki, H. Betalainbildung in Beta-callus, *Kulturen Ber. Deutsch Botanische Gesellschafts*, 84, 629-636, 1971.
- Cook, N.C., Samman, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76, 1996.
- Coppens, P., Fernandes Da Silva, M., Pettman, S. European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: A framework based on safety. *Toxicology*, 221, 59–74, 2006.
- Cotelle, N. Role of flavonoids in oxidative stress, *Current Topics of Medicinal Chemistry*, 1, 569-590, 2001.
- Council Directive 89/398/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to foodstuffs intended for particular nutritional uses. *Official Journal of the European Communities*, L 186, 27, 1989.
- Croft, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 435-442, 1998.
- Croft, K.D. Antioxidant Effects of Plant Phenolic Compounds, *Antioxidants in Human Health*, Basu, T. K., Temple, N. J., Garg, M. L. (Eds.), CAB International, 1999.
- Cross, C.E., Halliwell, B. Borish E.T., Pryor W.A., Ames B.N., Saul R.L., McCord J.M., Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 107, 526-545, 1987.
- Cross, C.E., Reznick A.Z., Packer L., Davis P.A., Suzuki Y.J., Halliwell, B. Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. *Free Radical Research Communications*, 15, 347-352, 1992.
- Czapski, J., Heat stability of betacyanins in red beet juice and in betanin solutions, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 191, 275-278, 1990.

- Čanadanović-Brunet, J.M. Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidanti, Zadužbina Andrejević, Beograd, 36, 1998.
- Čanadanović-Brunet, J.M. Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1997.
- Daniel, O., Meier, M.S., Schlatter, J., Frischknecht, P. Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 107, 109-114, 1999.
- Darley-Usmar, V., Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmaceutical Research*, 13, 649-662, 1996.
- Decker, E.A., Welch, B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 674-677, 1990.
- Decker, E.A. The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutrition Reviews* 53, 49-58, 1995.
- Delgado-Vargas F., Jimenez A.R., Lopez O.P. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins and betalains characteristics, biosynthesis processing and stability, *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 40, 3, 173-289, 2000.
- Diaz, M.N., Frei B., Vita J.A., Keaney, J.F. Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England Journal of Medicine*, 337, 408-416, 1997.
- Dillard, C.J., German, J.B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science the Food and Agriculture*, 80, 1744-1756, 2000.
- Diplock, A.T. Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Radical Research*, 27, 511–532, 1997.
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., Roberfroid, M.B. Scientific concepts of functional foods in Europe: Concensus document. *British Journal of Nutrition*, 81 (suppl. 1), 1–27, 1999.
- Directive 2009/39/EC of the European Parliament and of the Council on foodstuffs intended for particular nutritional uses. *Official Journal of the European Union* L 124, 21-29, 20 May 2009.
- Directive 96/84/EC of the European Parliament and of the Council amending Directive 89/398/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to foodstuffs intended for particular nutritional uses. *Official Journal of the European Communities*, L 48, 20, 1997.
- Directive 1999/41/EC of the European Parliament and of the Council amending Directive 89/398/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to

- foodstuffs intended for particular nutritional uses. Official Journal of the European Communities, L 172, 38, 1999.
- Directive 2000/0080/COD Proposal for a DIRECTIVE OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements, Official Journal C 311 E, 31/10/2000 P. 0001 – 0004.
- Dixon, R.A., Paiva, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*, 7, 1085-1097, 1995.
- Drdák, M., Vallová, M. Kinetics of the thermal degradation of betanine. *Die Nahrung*, 34, 307-310, 1990.
- Dronnet, V.M., Axelos, M.A.V., Renard, C.M., Thibault, J.F. Improvement of the binding capacity of metal cations by sugarbeet pulp. 1. Impact of cross-linking treatments on composition, hydration and binding properties. *Carbohydrate polymers*, 35, 29– 37, 1998.
- Endress, R. Betacyanin-Akkumulation in Kallus von *Portulacca grandiflora* var. JR unter dem Einfluss von Phytohormonen und Cu-Ionen auf unterschiedlichen Grundmedien, *BBP*, 169, 87-98, 1976.
- Escribano, J., Pedreño, M.A., García-Carmona, F., Muñoz, R. Characterization of the anti-radical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochemical Analysis*, 9, 124-127, 1998.
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 648-656, 2000.
- Espinoza, M., Olea-Azar, C., Speisky, H., Rodríguez, J. Determination of reactions between free radicals and selected Chilean wines and transition metals by ESR and UV-vis technique, *Spectrochimica Acta Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71, 5, 1638-1643, 2009.
- Esquivel P., Stintzing F.C., Carle R. Phenolic compound profiles and their corresponding antioxidant capacity of purple pitaya (*Hylocereus* sp.) genotypes. *Z Naturforsch C* 62, 636–644, 2007.
- Evans, P., Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Science*, 884, 19-40, 1999.
- Fern, E. Marketing of functional foods: A point of view of the industry. International developments in science and health claims, ILSI international symposium on functional foods in Europe, 2007.

- Filipini, M., Hogg, T. Upgrading of vegetable wastes and applications in the food industry. In: 11 Forum for Applied Biotechnology. Gent (Belgium). 25–26 September 1997. Mededelingen-Faculteit-Landbouwkundige-en-Toegepaste-Biologische-Wetenschappen Universiteit-Gent, Belgium. 62, 4a, 1329–1331, 1997.
- Fisher, C. Phenolic compounds in species. In Phenolic Compounds in Food And Their Effects on Health I: Analysis, Occurrence and Chemistry; Ho, C.-T., Lee, C.Y., Huang, M.-T. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC, 118-129, 1992.
- Fleuriet, A., Uhel, C., Dedaldechamp, F. Phenolic compounds and the quality of plant-derived products for human consumption. *Acta Botanica Gallica*, 143, 493-500, 1996.
- Francis, F.J. Safety of food colorants. In Natural Food Colorants; Hedry, G.A.F., Houghton, J.D. Eds.; Chapman & Hall, London, UK, 120-125, 1996.
- Frank, T., Stintzing, F.C., Carle, R., Bitsch, I., Quaas, D., Strass, G., Bitsch, R., Netzel, M. Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans. *Pharmacological Research*, 52, 290–297, 2005.
- Frei, B., England, L., Ames, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human plasma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA*, 86, 6377-6381, 1989.
- Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., Escribano, J. Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 609–615, 2004.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F., Escribano, J. A new role for tyrosinase in the biosynthesis of the plant pigments betalains. *FEBS J* 272, 462, 2005a.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. *Planta*, 222, 586–593, 2005b.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. Betaxanthins as substrates for tyrosinase: an approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiology*, 138, 421–432, 2005c.
- Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., Escribano, J. Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phytochemical Analysis*, 17, 262–269, 2006.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1546–1551, 2007.

- Garcia Barrera, F.A., Reynoso, C.R., González de Mejia, E. Estabilidad de las betalainas extraídas del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food Science and Technology International*, 4, 115-120, 1998.
- Gasparri, R. Treatment of olive oil processing residues. *Oils & Fats International*, February, 32–33, 1999.
- Gentile C., Tessoriere, L., Allegra, M., Livrea, M.A., Alessio, P.D. Antioxidant betalains from Cactus pear (*O. ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression, *Annals of the New York Academy of Science*, 1028, 481-486, 2004.
- Georgiev, V.G., Weber, J., Kneschke, E., Denev, P.N., Bley, T., Pavlov, A.I. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Betalain Extracts from Intact Plants and Hairy Root Cultures of the Beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red, *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 2, 105-111, 2010.
- Gerschman, R., Fenn W.O. Ascorbic acid content of adrenal glands of rat in oxygen poisoning. *American Journal of Physiology*, 176, 6-8, 1954.
- Gerschman, R., Gilbert, D., Nye, S.W. Dwyer, P., Fenn, W.O. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. 1954. *Nutrition*, 17, 162, 2001.
- Girod P.A., Zrýd J.P. Clonal variability and light induction of betalain synthesis in red beet cell cultures, *Plant Cell Reports*, 6, 27-30, 1987.
- Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., Dangles, O. Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH Radical, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 615-622, 2003.
- Gliszczyńska-Świgło, A., Szymusiak, H., Malinowska, P. Betanin, the main pigment of red beet: molecular origin of its exceptionally free radical-scavenging activity. *Food Additives and Contaminants*, 23, 1079–1087, 2006.
- Gutteridge, J. M., Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Science*, 899, 136-147, 2000.
- Grigemo-Miguel, N., Martin-Belloso, O. Influence of fruit dietary fibre addition on physical and sensorial properties of strawberry jams. *Journal of Food Engineering* 41, 13–21, 1999.
- Gross, G.G. Phenolic acids. In *The Biochemistry of Plants*; Stumpf, P.K., Conn, E.E. Eds.; Academic Press, New York, 7, 301-316, 1981.
- Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review Plant Biology*, 57, 761–780, 2006.

- Gry, J., Black, L., Eriksen, F.D., Pilegaard, K., Plumb, J., Rhodes, M. EuroFIR-BASIS-a combined composition and biological activity database for bioactive compounds in plant-based foods. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 434-444, 2007.
- Guzmán-Maldonado, S.H., Paredes-López, O. Functional products of plants indigenous to Latin America: amaranth, quinoa, common beans, and botanicals, in *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*, Mazza, G., Ed., Technomic Publishing, Lancaster, PA, 293, 1998.
- Haddadin, M.S., Abdulrahim, S.M., Al-Kawaldeh, G.Y., Robinson, R.K. Solid state fermentation of waste pomace from olive processing. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74, 613–618, 1999.
- Haddadin, M.S.Y., Abu-Resh, I.M., Haddadin, F.A.S., Robinson, R.K. Utilisation of tomato pomace as a substrate for the production of vitamin B12 - a preliminary appraisal. *Bioresource Technology*, 78, 225–230, 2001.
- Hahlbrock, K. Flavonoids. In *The Biochemistry of Plants*; Stumpf, P.K., Conn, E.E. Eds.; Academic Press, New York, 7, 425-445, 1981.
- Halliwell, B. Generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals during the oxidation of dihydroxyfumaric acid by peroxidase. *Biochemical Journal*, 163, 441-448, 1977.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C. The antioxidants of human extracellular fluids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280, 1-8, 1990.
- Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicinal Sciences*, 91, 14-22, 1991.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M., Cross C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119, 598-620, 1992.
- Halliwell, B., Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715-724; discussion 724S-725S, 1993a.
- Halliwell, B. The chemistry of free radicals. *Toxicology and Industrial Health*, 9, 1-21, 1993b.
- Halliwell, B., Cross, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives*, 102, Supplements, 10, 5-12, 1994a.
- Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, 52, 253-265, 1994b.

- Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *The Lancet*, 344, 721-724, 1994c.
- Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma O. I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 7-20, 1995.
- Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*. 16, 33-50, 1996.
- Halliwell, B.G. JMC. Free Radicals In Biology And Medicine. In *Free Radicals In Biology and Medicine*, Oxford University Press, UK., 10-50, 1999.
- Halliwell, B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 1082-1087, 2000.
- Hawkins, C.L., Brown B.E., Davies M.J. Hypochlorite- and hypobromite-mediated radical formation and its role in cell lysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 395, 137-145, 2001.
- Halliwell, B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radical and Biology Medicine*, 32, 968-974, 2002.
- Han, D., Kim, S.J., Kim, D.M. Repeated regeneration of degraded red beet juice pigments in the presence of antioxidants. *Journal of Food Science*, 63, 69–72, 1998.
- Harborne, J.B. Nature, distribution, and function of plant flavonoids. In *Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-activity Relationships*; Cody, V., Middleton, Jr., E., Harborne, J. B. Eds.; Alan R. Liss, Inc., New York, USA, 15-24, 1986.
- Harborne, J.B. *The flavonoids: recent Advances, Plant Pigments*, Harborne, J. B., (Ed.), Academic Press Ltd., 1988.
- Harborne, J.B. Flavonoids. In *Natural Products of Woody Plants I*; Rowe, J.W. Ed.; Springer-Verlag, Berlin, Germany, 533-556, 1989.
- Harborne, J.B. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, Cambridge, UK, 1994.
- Harborne, J.B., Baxter, H., Moss, G.P. (Eds.) *Phytochemical Dictionary, A Hand Book of Bioactive compounds from plants*. Taylor and Francis Ltd, London, UK, 1999.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504, 2000.
- Harman, D. Aging: overview. *Annals of the New York Academy of Science*, 928, 1-21, 2001.

- Havlíková, L., Míková, K., Kyzlink, V. Heat stability of betacyanins. *Zeitschrift für lebensmittel-Untersuchung und – Forschung*, 177, 247-250, 1983.
- Havsteen, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacology*, 32, 1141-1148, 1983.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584, 2002.
- Hempel, J., Böhm, H. Betaxanthin pattern of hairy roots from *Beta vulgaris* var. *lutea* and its alteration by feeding of amino acids. *Phytochemistry*, 44, 847-852, 1997.
- Henn, T., Kunz, B. Zum Wegwerfen zu schade. *ZFL* 47 (1/2), 21–23, 1996a.
- Henn, T., Kunz, B. Pflanzliche Reststoffe zur Herstellung von Functional Drinks. *Flüssiges Obst.*, 63, 715–719, 1996b.
- Henn, T. Untersuchungen zur Entwicklung und Bewertung funktioneller Lebensmittelzutaten aus Reststoffen am Beispiel von Möhrentrestern und ihrer Anwendung in Getränken (Thesis Bonn/ D 1998) Cuvillier Verlag Göttingen, 1998.
- Henry, B.S. Natural food colours. In G. F. Hendry, J. D. Houghton (Eds.), *Natural food colorants* (2nd ed.), 40–79, London: Blackie Academic & Professional, 1996.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2379–2381, 1992.
- Heuer, S., Strack, D. Synthesis of betanin from betanidin and UDP-glucose by a protein preparation from cell cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* (Burm. f.) N. E. Br. *Planta* 186, 626-628, 1992.
- Heuer, S., Richter, S., Metzger, J.W., Wray, V., Nimtz, M., Strack, D. Betacyanins from bracts of *Bougainvillea glabra*. *Phytochemistry*, 37, 761-767, 1994.
- Herbach, K.M., Stintzing F.C., Carle R. Impact of thermal treatment on colour and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Sciences*, 69, C491-C498, 2004a.
- Herbach, K.M., Stintzing F.C., Carle R. Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton and Rose) Monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. *European Food Research and Technology*, 219, 377-385, 2004b.
- Herbach, K.M., Stintzing F.C., Carle, R. Betalain stability and degradation – Structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, 71, R41-R50, 2006a.
- Herbach, K.M., Rohe, M., Stintzing F.C., Carle R. Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton and Rose) betacyanins as

- affected by the juice matrix and selected additives. *Food Research International*, 39, 667-677, 2006b.
- Herbach, K.M., Stintzing F.C., Carle R. Stability and Color Changes of Thermally Treated Betanin, Phyllocactin, and Hylocerenin Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 390-398, 2006c.
- Hilliam, M. The market for functional foods. *International Dairy Journal*, 8, 349–353, 1998.
- Hilou, A., Nacoulma, O.G., Guiguemde, T.R. In vivo antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 236-240, 2006.
- Ho, C.-T., 1992. Phenolic compounds in food: an overview. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I: Analysis, Occurrence and Chemistry*; Ho, C.-T., Lee, C.Y., Huang, M.-T. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC, 2-7, 1992.
- Hodnick, W.F., Kung, F.S., Roettger, W.J., Bohmont, C.W., Pardini, R.S. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids, *Biochemical Pharmacology*, 14, 2345-2357, 1986.
- Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B., 1996. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57, 43-46.
- Hollman, P.C.H., van Trijp, J. M. P., Buysman, M. N.C.P., v.d.Gaag, M.S., Mengelers, M.J.B., de Vries, J.H.M., Katan, M.B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, 418, 152–156, 1997.
- Horiuchi, J.I., Yamauchi, N., Osugi, M., Kanno, T., Kobayashi, M., Kuriyama, H. Onion alcohol production by repeated batch process using flocculating yeast. *Bioresource Technology*, 75, 153–156, 2000.
- Huang, A.S., von Elbe, J.H. Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science*, 50, 1115-1120, 1129, 1985.
- Huang, A.S., von Elbe, J.H. Stability comparison of two betacyanine pigments – amarantin and betanine. *Journal of Food Science*, 51, 670-674, 1986.
- Huang, A.S., von Elbe, J.H. Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science*, 52, 1689-1693, 1987.
- Hussein, M.Z., Tarmizi, R.S.H., Zainal, Z., Ibrahim, R. Preparation and characterization of active carbons from oil palm shells. *Carbon* 34, 11, 1447–1454, 1996.
- Ilić Z., Fallik E., Dardić M., Berba, sortiranje, pakovanje i čuvanje povrće, Poljoprivredni fakultet Zubin potok, Novi Sad, 2009.
- Inglett, G.E. New cereal products with health benefits. *Food Ingredients Europe, Conference Proceedings*, 17–19, 1998.

- Iwashima, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113, 287-299, 2000.
- Jackman, R.L., Smith, J.L. Anthocyanins and betalains. *Natural Food Colorants*, 2nd ed., Hendry, G.F. and Houghton J., D., Eds., Blackie, London, 245, 1996.
- Jaros, D., Rohm, H. A research note identification of sensory color optima of strawberry yogurt. *Journal of Food Quality*, 24, 79-86, 2001.
- Jensen, R.A. Tyrosine and phenylalanine biosynthesis: relationship between alternative pathways, regulation and subcellular location. In *The Shikimic Acid pathway*; Conn, E. E. Ed.; Plenum, New York, 57-77, 1986.
- Joshi, V.K., Sandhu, D.K. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresource Technology* 56, 2/3, 251–255, 1996.
- Joy, R.W., Sugiyama, M., Fukuda, H., Komamine, A. Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*, *Plant Physiology*, 107, 1083-1089, 1995.
- Juntachote, T., Berghofer E. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. *Food Chemistry*, 92, 193-202, 2005.
- Juurlink, B.H., Paterson P.G. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *Journal of Spinal Cord Medicine*, 21, 309-334, 1998.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954–3962, 1999.
- Kaim W., Rall J. Kupferein modernes Bioelement, *Angewandte Chemie*, 108, 47-64, 1996.
- Kannan V. Extraction of Bioactive Compounds from Whole Red Cabbage and Beetroot using Pulsed Electric Fields and Evaluation of their Functionality, *Food Science and Technology Department Dissertations & Theses in Food Science and Technology*, University of Nebraska – Lincoln, 2011.
- Kanner, J., Harel, S. Initiation of membranal lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 237, 314–321, 1985.
- Kanner, J., Harel, S., Granit, R. Pharmaceutical compositions containing antioxidants betalains and a method for their preparation. Patent 119872 Israel, 1996.
- Kanner J., Harel S., Granit R. Betalains - a new class of dietary cationized antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 11, 5178-5185, 2001.

- Kapadia G.J., Tokuda H., Konoshima T., Nishino H. Chemoprevention of lung and skin cancer by *Beta vulgaris* (beet) root extract, *Cancer Letters*, 100, 211-214, 1996.
- Kapadia, G.J., Azuine M.A., Sridhar R., Okuda Y., Tsuruta A., Ichiishi E., Mukainake T., Takasaki M., Konoshima T., Nishino H., Tokuda H. Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacology Research*, 47, 2, 141-148, 2003.
- Kavanagh, F. *Analytical Microbiology*, 2, Academic Press, New York, 31-42, 1972.
- Kearsley, M.W., Katsaboxakis, K. Z. Stability and use of natural colours in foods. *Journal of Food Technology*, 15, 504-514, 1980.
- Kee, H.J., Ryu, G.H., Park, Y.K. Preparation and quality properties of extruded snack using onion pomace and onion. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 32, 578–583, 2000.
- Kee, H.J., Ryu, G.H., Park, Y.K. Physical properties of extruded snack made of dried onion and onion pomace. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 30, 64–69, 2001.
- Keli, S.O., Hertog, M.G., Feskens, E.J., Kromhout, D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study, *Archives of Internal Medicine*, 156, 637-642, 1996.
- Kim, M.-C., Pratt, D.E. Thermal degradation of phenolic antioxidants. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I: Analysis, Occurrence and Chemistry*; Ho, C.-T., Lee, C.Y., Huang, M.-T. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC, 200-218, 1992.
- Kimler, L., Mears, J., Mabry, T.J., Roesler H. On the question of the mutual exclusiveness of betalains and anthocyanins. *Taxonomy*, 19, 875–878, 1970.
- Kimler, L., Larson, R.A., Messenger, L., Moore, J.B., Mabry, T.J. Betalamic acid, a new naturally occurring pigment. *Journal of the Chemical Society and Chemical Communication*, 21, 1329–1330, 1971.
- Kluger, F., Stintzing, F.C., Carle R. Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] Alef. Cv. Bright Lights) by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2975–2981, 2004.
- Kluger, F., Graneis, S., Schreiter, P.P.Y., Stintzing, F.C., Carle, R. Determination of free amino compounds in betalainic fruits and vegetables by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4311–4318, 2006.

- Kluger, F., Stintzing, F.C., Carle, R. Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. By HPLC-DAD-ESI-MSn. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 637–648, 2007.
- Knight, J.A. The biochemistry of aging. *Advances in Clinical Chemistry*, 35, 1-62, 2000.
- Kobayashi, N., Schmidt, J., Nimtz, M., Wray, V., Schliemann, W. Betalains from christmas cactus. *Phytochemistry*, 54, 419-426, 2000.
- Kobayashi, N., Schmidt, J., Nimtz, M., Wray, V., Schliemann, W. Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *Phytochemistry*, 56, 429-436, 2001.
- Köksel, H., Özboy, Ö., 1999. Effects of sugar beet fiber on cookie quality Einfluß von Zuckerrübenfaserstoffen auf die Qualität von Cookie-Keksen. *Zuckerindustrie*, 124, 7, 542–544.
- Koockak, H., Seyyednejad, S.M., Motamedi, H. Preliminary study on the antimicrobial activity of some medicinal plants of Khuzestan (Iran). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3, 180-184, 2010.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., Pehu, E. Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. *Agriculture and Rural Development Discussion Paper 30*, 2006.
- Kugler, F., Stintzing, F.C., Carle, R. Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss Chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] Alef. Cv. bright lights) by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2975-2981, 2004.
- Kujala, T., S., Loponen, J., M., Klika, K., D., Pihlaja, K. Phenolics and Betacyanins in Red Beetroot (*Beta vulgaris*) Root: Distribution and Effect of Cold Storage on the Content of Total Phenolics and Three Individual Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5338-5342, 2000.
- Kujala, T.S., Loponen, J.M., Pihlaja, K. Betalains and Phenolics in Red Beetroot (*Beta vulgaris*) Peel Extracts: Extraction and Characterization. *Z. Naturforsch.*, 56c, 343-348, 2001.
- Kujala T.S., Vienola M.S., Klika K.D, Loponen J.M., Pihlaja K. Betalain and phenolic compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. *European Food Research Technology*, 214, 505-510, 2002.
- Kroon, P.A., Williamson, G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 79, 355-361, 1999.

- Larrauri, J.A., Sanchez-Moreno, C., Ruperez, P., Saura-Calixto, F. New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from food by-products. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 1, 3–8, 1999.
- Larson, A. Naturally occurring antioxidants, Lewis Publishers, New York, 1997.
- Laufenberg, G., Grüß, O., Kunz, B. Neue Konzepte der Reststoffverwertung in der Lebensmittelindustrie - Chancen für die Kartoffelstärkeindustrie. New concepts for the utilisation of residual products from food industry - Prospects for the potato starch industry. *Starch-Stärke*, 48, 315–321, 1996.
- Lazić B., Đurovka M., Markovic V. Povrtarstvo. Udžbenik, Novi Sad, 1998.
- Lea, P.J., Leegod, R.C. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd edition, John Wiley & Sons, Chichester, 1999.
- Leathers R.L., Davin C., Zryd J.P. Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L., *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 28P, 39-45, 1992.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 21-33, 2004.
- Lu, Y., Foo, L.Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*, 59, 2, 187–194, 1997.
- Lucarini, M. Carbonaro, M., Nicoli, S., Aguzzi, A., Cappelloni, M., Ruggeri, S., DiLullo, G., Gambelli, L., Carnovale, E. Endogenous markets for organic versus conventional plant products. In: Hägg, M. et al. (Eds.) *Agri-Food Quality II, Quality management of Fruits and Vegetables. Conference proceedings of a congress held on 22–25.04.1998 in Turku, Finland*. Royal society of Chemistry, Cambridge, UK, 306–310, 1999.
- Lucas, J., Filipini, M., Gruess, O., Kunz, B., Buitelaar, N., Fioretto, A., Groteaard, H., Hogg, T., Lieseens, B., Pina, C., Werstraete, W., Wind, R. D. Fermentative utilization of fruit and vegetable pomace (biowaste) for the production of novel types of products— results of an air project. In: *Proceedings of the eleventh forum for applied biotechnology, Gent, Belgium, 25–26 September, 1997, Part II. Mededelingen – Faculteit - Landbouwkundige-en-Toegepaste - Biologische-Wetenschappen, Universiteit-Gent*. 62, 4b, 1865–1867, 1997.
- Mabry, T.J., Dreiding A.S. The betalains. In: Mabry TJ, Alstom RE, Runeckles VC (eds) *Recent Advances in Phytochemistry*. Appleton-Centry-Crofts, NY, 1968.
- Mabry, T.J. Betalains. In *Encyclopedia of plant Physiology*, Bell, E. A., Charlwood, B. V. Eds.; Springer-Verlag, Berlin, Germany, Vol 8, 513-533, 1980.
- Macheix, J. Fleuriet, J., Billot, A. *Journal of Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.

- Mäkinen-Aakula, M. Trends in functional foods dairy market. In Proceedings of the third functional food net meeting, 2006.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747, 2004.
- Manthey, J.A., Grohmann, K. Concentrations of Hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 811–814, 1996.
- Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V. Inhibited oxidation of lipids. II. Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids, *Fat Science Technology*, 94, 428-432, 1992.
- Markham, K.R. Techniques of flavonoid identification. Academic Press, New York, 1-14, 1982.
- Markham, K.R., *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, 197-237, 1989.
- Martinez, C., Yanez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Lozano, J.A. Effects of several polyhydroxylated flavonoids on the growth of B16F10 melanoma and melana melanocyte cell lines: influence of the sequential oxidation state of the flavonoid skeleton. *Melanoma Research*, 13, 1, 3-9, 2003.
- Máriássyová, M. et al. Red beet as source of pigments. In: Hägg, M. et al. (Eds.) *Agri-Food Quality II, Quality management of Fruits and Vegetables. Conference Proceedings of a Congress held on 22–25.04.1998 in Turku, Finland*. Royal society of Chemistry, Cambridge, UK, 306–310, 1999a.
- Máriássyová, M., Šilhar, S., Kovác, M. New sources for anthocyanins. In: Hägg, M. et al. (Eds.) *Agri-Food Quality II, Quality management of Fruits and Vegetables. Conference Proceedings of a Congress held on 22–25.04.1998 in Turku, Finland*. Royal society of Chemistry, Cambridge, UK, 311–313, 1999b.
- Máriássyová, M., Šilhar, S. Conversion of betalains in the presence of antioxidants. *Czech journal of Food Sciences*, 18, 220-221, 2000.
- Masaaki, S., Takagi, T., Komamine A. Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L., *Journal of Plant Physiology*, 125, 337-343, 1986.
- Masoodi, F.A., Chauhan, G.S. Use of apple pomace as a source of dietary fiber in wheat bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, 22, 255–263, 1998.
- Mayo, W.J. Chemical methods of control: Antimicrobial drugs, in *Laboratory experiments in microbiology*. Eds. Johnson, T.R. and Case, C.L., The Benjamin/Cummings Publishing Company, San Francisco, 179–181, 1998.

- McCord, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicinal Sciences*, 108, 652-659, 2000.
- Menrad, K. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56, 181–188, 2003.
- Meyer, A.S., Donovan, J.L., Pearson, D.A., Waterhouse, A.L., Frankel, E.N. Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation, 1998a.
- Mezzetti, A., Di Ilio, C., Calafiore, A. M., Aceto, A., Marzio, L., Frederici, G., Cuccurullo, F. Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase activities in the human artery, vein and heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 22, 935-938, 1990.
- Moller, J.K.S., Madsen, H.L., Aaltonen, T., Skibsted, L.H. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry*, 64, 215-219, 1999.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, m.J., Parajó, J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171, 2001.
- Moreno Alvarez, M.J., Matos, A.V., Camacho, D.R.B. Betalains degradation in beet root (*Beta vulgaris*): kinetic studies. *Revista Científica Facultad Ciencias Veterinarias*, 12, 133–136, 2002.
- Moreno Alvarez, M.J., Medina, C., Antón, L., Garcia, D., Camacho, D.R.B. Uso de pulpa de tuna (*Opuntia boldinghii*) en la elaboración de bebidas cítricas fermentadas. *Interciencia*, 28, 539–543, 2003.
- Moreno, D.A., García-Viguera C., Gil, J.I., Gil-Izquierdo, A. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochemical Review*, 7, 261-280, 2008.
- Moyer, R.A., Hummer, K. E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad, R.E. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519-525, 2002.
- Mueller L.A., Hinz U., Zryd J.P. Characterization of tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry*, 45, 1309-1323, 1996.
- Mueller L.A., Hinz U., Zryd J.P. The formation of betalamic acid and muscaflavin by recombinant Dopadioxygenase from *Amanita*. *Phytochemistry*, 44, 567–569, 1997a.
- Mueller L.A., Hinz U., Uze M., Sautter C., Zryd J.P. Biochemical complementation in the betalain biosynthetic pathway in *Portulaca grandiflora* by a fungal 3,4-dihydroxyphenylalanine dioxygenase. *Planta*, 203, 260–263, 1997b.

- Mutha-Reddy, K., Ruby, A.L.L., Muraleedharan, G. N. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 23, 9268-9273, 2005.
- Naim, M., Zehavi, U., Nagy, S., Rouseff, R.L. Hydroxycinnamic acids as off-flavor precursors in citrus fruits and their products. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I: Analysis, Occurrence and Chemistry*; Ho, C.-T., Lee, C.Y., Huang, M.-T. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC, 180-191, 1992.
- Nakata, B. Recycling by-products on California vineyards. *Biocycle* 4, 61, 1994.
- Nambudiri, E.S., Shivashankar, S. Cocoa waste and its utilization. *Indian Cocoa, Arecanut and Spices Journal*, 8, 3, 78–80, 1985.
- Namiki, M. Antioxidants/antimutagens in food, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, 273-300, 1990.
- Nayak, C.A., Chethana, S., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S. Enhanced mass transfer during solid liquid extraction of gamma irradiated red beetroot, *Radiation Physics and Chemistry*, 75, 173-178, 2006.
- Nemzer, B., Pietrzowski, Z., Spórna, A., Stalica, P., Thresher, W., Michalowski, T., Wybraniec, S. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chemistry*, 127, 42-53, 2011.
- Niki, E. Lipid antioxidants: how they may act in biological systems. *British Journal of Cancer. Supplement*, 8, 153-157, 1987.
- Niki, E. Free radical pathology and antioxidants: overview. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology, Spec No.*, 538-540, 1992.
- Niki, E. Free Radicals in the 1900's: from in Vitro to in Vivo. *Free Radical Research*, 33, 693-704, 2001.
- Nilsson, T. Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rubra* L.), *Lanthbrukshog, Annual*, 36, 179-219, 1970.
- Ohama, H., Ikeda, H., Moriyama, H. Health foods and foods with health claims in Japan. *Toxicology*, 22, 95–111, 2006.
- Ohsawa, K., Chinen, C., Takanami, S., Kuribayashi, T., Kurokouchi, K. Studies on effective utilisation of carrot pomace. I. Effective utilisation to bread. *Research Report of the Nagano State Laboratory of Food Technology*, 22, 22–28, 1994.
- Ohsawa, K., Chinen, C., Takanami, S., Kuribayashi, T., Kurokouchi, K. Studies on effective utilisation of carrot pomace. II. Effective utilisation to cake, dressing and pick-

- les. Research Report of the Nagano State Laboratory of Food Technology, 23, 15–18, 1995.
- Oktaý M., Gulcin I., Kufrevioglu O.I. Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm. Wiss. Technol. Food Science and Technology*, 36, 263-271, 2003.
- Oleszek, W., Junkuszew, M., Stochmal, A. Determination and toxicity of saponins from *Amaranthus Cruentus* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3685, 1999.
- Orhan, D.D., Harteviođlu, A., Kùpeli, E., Yesilada, E. *In vivo* anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits, *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 394-400, 2007.
- Otto, K., Sulc, D. Herstellung von Gemùsesàften. In U. Schobinger (Ed.), *Frucht- und Gemùsesàfte*, 278–297, Stuttgart: Ulmer, 2001.
- Oyaizu, M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315, 1986.
- Pasch, J.H., von Elbe, J.H. Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants, or sequestrants. *Journal of Food Science*, 44, 72-74, 1979.
- Parekh, J, Chanda, V. Antibacterial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of 34 Indian Medicinal Plants against Some *Staphylococcus* Species. *Turkish Journal of Biology*, 32, 63-71, 2008.
- Parkin, K., Im, J-S. Chemical and Physical Changes in Beet (*Beta vulgaris* L.) Root Tissue During Simulated Processing–Relevance to the “Black Ring” Defect in Canned Beets, *Journal of Food Science*, 55, 4, 1039–1041, 1990.
- Parr, A.J., Bolwell, G.P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 80, 985-1012, 2000.
- Patkai, G., Barta, J., Varsanyi, I. Decomposition of anti-carcinogen factors of the beetroot during juice and nectar production. *Cancer Letters* 114, 105–106, 1997.
- Pavlov, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., Koleva, I., Ilieva, M. Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *Z Naturforsch C*, 57, 640–644, 2002.
- Pavlov, A., Kovatcheva, P., Tuneva, D., Ilieva, M., Bley, T. Radical scavenging activity and stability of betalains from *Beta vulgaris* hairy root culture in simulated

- conditions of human gastrointestinal tract. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60, 43–47, 2005.
- Pedreño M.A., Escribano J. Studying the oxidation and the antiradical activity of betalain from beetroot. *Journal of Biological Education*, 35, 49-51, 2000.
- Piattelli, M., Impellizzeri, G. 2-Descarboxybetanidin, a minor betacyanin from *Carpobrotus acinaciformis*. *Phytochemistry* 9, 2553-2556, 1970.
- Piattelli M. Betalains, *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, Goodwin T.W., Academic Press, London, 560-596, 1976.
- Piattelli, M. *The Biochemistry of Plants*. In Stumpf, P.K., Conn, E.E. (Eds.), *The betalains: structure, biosynthesis, and chemical taxonomy*, 557-575, New York: Academic Press, 1981.
- Pourrat, A., Lejeune, B., Grand, A., Bastide P., Bastide J. Propriétés du jus et des colorants de la betterave rouge. *Médecin et Nutrition*, 23, 166–172, 1987.
- Prasertsan, S., Prasertsan, P. Biomass residues from palm oil mills in Thailand: an overview on quantity and potential usage. *Biomass and Bioenergy*, 11, 5, 387–395, 1996.
- Pratt, D.E. Natural antioxidants from plant material. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II: Antioxidants and cancer prevention*; Huang, M.-T., Ho, C.-T., Lee, C.Y. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC, 54-71, 1992.
- Pravilnik o kvalitetu meda i drugih pčelinjih proizvoda i metodama za kontrolu kvaliteta meda i drugih pčelinjih proizvoda ("Službeni list SFRJ", br. 4/85 i "Službeni list SRJ", br. 7/92).
- Price, K.R., Rhodes, M.J.C. Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from auto-lysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 331–339, 1997.
- Pryor, W.A. Measurement of oxidative stress status in humans. *Cancer. Epidemiological Biomarkers Preview*, 2, 289-292, 1993.
- Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. Vuorela, P.: Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 3-12, 2000.
- Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council concerning novel foods and novel food ingredients. *Official Journal of the European Communities*, L 043, 1, 1997.

- Reynoso, R., Garci, F.A., Morales, D., Gonzalez de Mejia, E. Stability of betalain pigments from a Cactaceae fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2884–2889, 1997.
- Reynoso, R.C., Giner, T.V., Gonzalez De Mejia, E. Safety of a filtrate of fermented garambullo fruit: biotransformation and toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 825-830, 1999.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956, 1996.
- Robards, K., Prenzler, P., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66, 401-436, 1999.
- Robertfroid, M.B. Defining Functional Foods. In *Functional Foods-concept to products*. Ed. G. R. Gibson i C. M. Williams. CRC Press. Cambridge UK, 2001.
- Roberfroid, M.B. Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88, 133-138, 2002.
- Rodríguez-Kábana, R., Kokalis-Burelle, N., Robertson, D.G., Weaver, C.F., Wells, L. Effects of partridge peapeanut rotations on populations of *Meloidogyne arenaria*, incidence of *Sclerotium rolfsii*, and yield of peanut. *Nematropica*, 25, 27-34, 1995.
- Rohrdanz, E., Schmuck, G., Ohler, S., Kahl, R. The influence of oxidative stress on catalase and MnSOD gene transcription in astrocytes. *Brain Research*, 900, 128-136, 2001.
- Roy, B.C., Goto, M., Hirose, T. Temperature and pressure effects on supercritical CO₂ extraction of tomato seed oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 137–141, 1996.
- Saguy, I., Kopelman, I.J., Mizrahi, S. Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 360-362, 1978.
- Saguy, I. Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin I): influence of pH and temperature. *Journal of Food Science*, 44, 1554-1555, 1979.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, *Journal of Food Sciences and Agriculture*, 76, 270-276, 1998.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. Introduction to Food- and Airborne Fungi. Centraalbureau voor schimmelcultures – Utrecht, The Netherlands, 174-243, 2004.
- Sapers, G.M., Hornstein, J.S. Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. *Journal of Food Science*, 44, 1245-1248, 1979.

- Saura-Calixto, F. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 10, 4303–4306, 1998.
- Savolainen, K., Kuusi, T. The stability properties of golden beet and red beet pigments: influence of pH, temperature, and some stabilizers. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 166, 19-22, 1978.
- Schliemann, W., Strack D. Intramolecular stabilization of acylated betacyanins. *Phytochemistry* 49, 585-588, 1998.
- Schliemann, W., Kobayashi, N., Strack, D. The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant physiology*, 119, 1217-1232, 1999.
- Schliemann, W., Cai, Y., Degenkolb, T., Schmidt, J., Corke, H. Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry*, 58, 159–165, 2001.
- Schuster, B., Herrmann, K. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry*, 24, 2761-2764, 1985.
- Schwartz, S.J., von Elbe, J.H., Pariza, M.W., Goldsworthy, T., Pitot, H.C. Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 21, 531-535, 1983.
- Shkhikvishvili, I.D., Gogiya, N.N. Flavonoids of mandarin fruit wastes and their fungistatic effect on fungus *Thoma tracheiphila*. *Applied Microbiology and biochemistry*, New York, 31, 292-296, 1995.
- Shahidi, F., Naczki, M. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications*, Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, 1995a.
- Shahidi, F., Naczki, M. Food phenolics: an overview, *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*, Technomic Publishing Co, Pennsylvania, USA, 1-4, 1995b.
- Sies, H., Cadenas. E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological*, 311, 617-631, 1985.
- Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291-295, 1997.
- Sembries, S., Dongowski, G., Mehrländer, K., Will, F., Dietrich, H. Physiologische Wirkungen von Extraktions-säften aus Äpfeln, Weinbeeren und roten Beeren in vitro und am Menschen. *Deutsches Lebensmittel-Rundschau*, 102, 350-365, 2006.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Rueda-Benítez, P., Porta, H., and Rocha-Sosa, M. Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. - *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, 125–133, 2004.

- Sen, A., Bergvinson, D., Miller, S.S., Atkinson, J., Fulcher, R.G., Arnason, J.T. Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids, and phenolic acid amides in maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1879-1883, 1994.
- Sharma, S.K., Maguer, M.L. Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions. *Italian Journal of Food Science*, 2, 107–113, 1996.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. Methods in Enzymology, Oxidant and Antioxidants (Part A). In Packer L (Eds.). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, 152-178, Academic Press, San Diego, 1999.
- Sims, C.A., Balaban, M.O., Matthews, R.F. Optimization of carrot juice color and cloud stability. *Journal of Food Science*, 58, 1129–1131, 1993.
- Siriwardhana, N., Jeon, Y.J. Antioxidative effect of cactus pear fruit (*Opuntia ficus-indica*) extract on lipid peroxidation in oils and emulsion model systems. *European Food Research and Technology*, 219, 369–376, 2004.
- Sloan, A.E. The top ten functional food trends. *Food Technology*, 54, 33–62, 2000.
- Sloan, E. The top 10 functional food trends. The next generation. *Food Technology*, 56, 32–57, 2002.
- Sloan, A.E. The top ten functional food trends. *Food Technology*, 58, 28–51, 2004.
- Sl. List SFRJ br. 4/85, Pravilniku o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti dijetetskih namirnica koje se mogu stavljati u promet.
- Sl. list SFRJ", br. 29/83, Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća
- Sogi, D.S., Kiran, J., Bawa, A.S. Characterization and utilization of tomato seed oil from tomato processing waste. *Journal of Food Science and Technology India*, 36, 248–249, 1999.
- Spence, J.T. Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 4–6, 2006.
- Spencer, J.P., Jenner A., Butler J., Aruoma O.I., Dexter, D.T., Jenner, P., Halliwell, B. Evaluation of the pro-oxidant and antioxidant actions of LDOPA and dopamine in vitro: implications for Parkinson's disease. *Free Radical Research*, 24, 95-105, 1996.
- Spiteller, G. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Experimental Gerontology*, 36, 1425-1457, 2001.
- Sreekanth D., Arunasree M.K., Roy K.R., Reddy T.C., Reddy G.V., Reddanna P. Betanin a bethacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apop-

- tosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine*, 14, 739-746, 2007.
- Sreenath, K.H., Crandall, P.G., Baker, R.A. Utilization of citrus by-products and wastes as beverage clouding agents. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 2, 190–194, 1995.
- Sriroth, K., Wanlaphathit, S., Piyachomkwan, K., Oates, C.G. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. *Bioresource Technology* 71, 63–69, 2000.
- Stafford, H.A. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science*, 101, 91-98, 1994.
- Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Van Sinderen, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 198–203, 2005.
- Steglich, W., Strack, D. Betalains In: Brossi A. (Ed.), *The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology*, 39, 1-62, 1990.
- Steiner U., Schliemann W., Strack D. Assay for tyrosine hydroxylation activity of tyrosinase from betalain-forming plants and cell cultures, *Analytical Biochemistry*, 238, 72-75, 1996.
- Steiner U., Schliemann W., Bohm H., Strack, D. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta Medica*, 208, 114-124, 1999.
- Stief, T. W. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Medicinal Hypotheses*, 60, 567-572, 2003.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. Aminoacid composition and betaxanthin formation in fruits from *Opuntia-ficus indica*, *Planta Medica*, 65, 632, 1999.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. Rote Bete als färbendes Lebensmittel — eine Bestandsaufnahme. *Obst, Gemüse und Kartoffelverarbeitung (Fruit, Vegetable and Potato Processing)*, 85, 196–204, 2000.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *European Food Research and Technology*, 212, 396–407, 2001.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2302–2307, 2002a.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chemistry*, 77, 101–106, 2002b.

- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *European Food Research and Technology*, 216, 303–311, 2003.
- Stintzing, F.C., Conrad, J., Klaiber, I., Beifuss, U., Carle, R. Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochem* 65:415–422, 2004a.
- Stintzing, F.C., Kammerer, D., Schieber, A., Adama, H., Nacoulma, O.G., Carle, R. Betacyanins and phenolics compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L. *Z Naturforsch C–A J Biosci* 59, 1–8, 2004b.
- Stintzing, F.C., Herbach, K.M., Mosshammer, M.R., Carle, R., Yi W., Sellappan, S., Akoh, C.C., Bunch, R., Felker, P. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 442–451, 2005.
- Stintzing, F.C., Kluger, F., Carle, R., Conrad, J. First ¹³CNMR assignments of beta-xanthins. *Helvetica Chimica Acta* 89, 1008–1016, 2006.
- Stoll, T., Schieber, A., Carle, R. Carrot pomace-an underestimated by-product?. In W. Pfannhauser, G. R. Fenwick, & S. Khokhar (Eds.), *Biologically-active phytochemicals in food: analysis, metabolism, bioavailability and function*, 525–527, Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2001.
- Strack, D. Phenolic metabolism, U: *Plant Biochemistry*, Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), Academic Press, New York, 387–437, 1997.
- Strack D., Vogt T., Schliemann W. Recent advances in betalain research, *Phytochemistry*, 62, 247-269, 2003.
- Strube, M., Dragsted, L.O., Larsen, J.C. (Eds.), *Naturally occurring antimourigens I. Plant phenols*. The Nordic Council of Ministers, Copenhagen, 25-42, 1992.
- Tang, Y.C., Chen, B.H. Pigment change of freeze-dried carotenoid powder during storage. *Food Chemistry*, 69, 11–17, 2000.
- Terradas, F., Wyler, H. 13. 2,3- and 4,5-Secodopa, the biosynthetic intermediates generated from L-dopa by an enzym system extracted from the fly agaric, *Amanita muscaria* L., and their spontaneous conversion to muscaflavin and betalamic acid, respectively, and betalains. *Helvetica Chimica Acta* 74, 124-140, 1999.
- Tesoriere, L., Butera, D., D'Arpa, D., Di Gaudio, F., Allegra, M., Gentile C., Livrea, M. A. Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins, *Free Radical Research*, 37, 689–696, 2003.

- Tesoriere L., Allegra M., Butera D., Livrea M. A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans, *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 4, 941–945, 2004a.
- Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M., Livrea, M. A. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruits decreases oxidative stress in healthy humans. A comparative study with vitamin C. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 391–395, 2004b.
- Tesoriere L., Butera D., Allegra M. , Fazzari M., Livrea M.A. Distribution of Betalain Pigments in Red Blood Cells after Consumption of Cactus Pear Fruits and Increased Resistance of the Cells to ex Vivo Induced Oxidative Hemolysis in Humans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1266-1270, 2005.
- Tesoriere, L., Fazzari M., Angileri F., Genile C., Livrea M.A. In Vitro Digestion of Betalainic Foods. Stability and Bioaccessibility of Betaxanthins and Betacyanins and Antioxidative Potential of Food Digesta, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10487–10492, 2008.
- Teutonico, R.A., Knorr, D. Amaranth: Composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. *Food Technology*, 49-50, 52-54, 56, 58-59, 121, 1985.
- Theander, O., Lundgren, L.N. Monoaryl natural products. In *Natural Products of Woody Plants I*; Rowe, J.W. Ed.; Springer-Verlag, Berlin, Germany, 374, 1989.
- Thibault, J.-F., Asther, M., Colonna Ceccaldi, B., Couteau, D., Delattre, M., Cardoso Duarte, J., Faulds, C., Heldt-Hansen, H.-P., Kroon, P., Lesage-Meessen, L., Micard, V., Renard, C., Tuohy, M., Van Hulle, S., Williamson, G. Fungal bioconversion of agricultural byproducts to vanillin. *Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie*, 31, 530–536, 1998.
- Toma, R.B., Orr, P.H., D'Appolonia, B., Dintzis, F.R. Tabekhia, M.M. Physical and chemical properties of potato peel as a source of dietary fiber in bread. *Journal of Food Science*, 44, 1403–1407, 1417, 1979.
- Toles C.A., Marshall W.E., Johns, M.M., Wartelle L.H., McAloon, A. Acid-activated carbons from almond shells: physical, chemical and adsorptive properties and estimated cost of production. *Bioresource Technology*, 71, 87–92, 2000.
- Tran, C.T., Mitchell, D.A. Pineapple waste - a novel substrate for citric acid production by solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, 17, 10, 1107–1110, 1995.
- Tsai, P.T., Sheu, C.H., Wu, P.H., Sun, Y.F. Thermal and pH stability of Betacyanin Pigment of Djulis (*Chenopodium formosanum*) in Taiwan and their relation to antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1020-1025, 2010.

- Tumbas, V. Antiradikalska i antiproliferativna i aktivnost ekstrakata odabranih biljaka iz familija Rosaceae i Ericaceae. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2010.
- Uri, N. Mechanism of antioxidation. Autoxidation and Antioxidants, Lundberg, W.O. (Ed.), Wiley, New York, 133-169, 1961.
- Vaillant, F., Perez, A., Davila, I., Dornier, M., Reynes, M. Colourant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.) Fruits, 60, 1–10, 2005.
- Vattem, D.A., Ghaedian, R., Shetty, K. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 14, 2, 120-130, 2005.
- Viloria-Matos, A., Moreno-Alvarez, M.J., Hidalgo-Báez, D. Isolation and identification of betacyanin in *Opuntia boldinghii* Br. et R. by HPTLC. *Ciencia Tecnología Alimentaria*, 3, 140-143, 2001.
- Vinson, J.A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3630–3634, 1998.
- Visioli, F., Bellomo, G., Galli, C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247, 60–64, 1998.
- Visioli, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincierei, F. F., Galli, C. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3397–3401, 1999.
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., Caruso, D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*, 468, 159–160, 2000.
- Vitolo, S., Petarca, L., Bresci, B. Treatment of olive oil industry wastes. *Bioresource Technology*, 67, 129–137, 1999.
- Vogt, T., Grimm, R., Strack, D. Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-O-glucosyltransferase, a betanidin- and flavonoid-specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferases from the Solanaceae. *Plant Journal*, 19, 509-519, 1999a.
- Vogt, T., Ibdah, M., Schmidt, J., Wray, V., Nimtz, M., Strak, D. Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochemistry*, 52, 583–592, 1999b.
- von Elbe, J.H., Maing, I.-Y., Amundson, C.H. Color stability of betanin, *Journal of Food Science*, 39, 334, 1974.
- von Elbe, J.H., Stability of betalaines as foods colors, *Food Technology*, 29, 42, 1975.

- von Elbe, J.H. Schwartz, S.J. Absence of mutagenic activity and a short-term toxicity study of beet pigments as food colourants. *Archives of Toxicology*, 49, 93-98, 1981.
- von Elbe, J.H. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. In John Wiley & Sons, Inc. Betalains, Unit F3.1.1-F3.1.7, 2003.
- Waldron, K. Useful ingredients from onion waste. *Food Science and Technology*, 15, 38–39,41, 2001.
- Wang, M., Goldman, I.L. Transgressive segregation and reciprocal effect for free folic acid content in a red beet (*Beta vulgaris* L.) population. *Euphytica*, 96, 317–321, 1997.
- Wang, C.Q., Chen, M., Wang, B.S. Betacyanin accumulation in the leaves of C3 halophyte *Suaeda salsa* L. is induced by watering roots with H₂O₂. *Plant Science*, 172, 1–7, 2007.
- Waterman, P.G., Mole, S. (Eds.) Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994.
- Widmer, W., Montanari, A.M. Citrus waste streams as a source of phytochemicals. In: 107th Annual Meeting of the Florida State Horticultural Society, Orlando/Florida, USA, 107, 284–288, 1995.
- Winter, M., Herrmann, K. Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 616-620, 1986.
- Wu, L., Hsu, H., Chen, Y., Chiu, C., Lin, Y., Ho, J.A. Antioxidant and antiproliferative activities of red Pitaya. *Food Chemistry*, 95, 2, 319-327, 2006.
- www.wikipedia.com
- Wybraniec, S., Platzner, I., Geresh, S., Gottlieb, H.E., Haimberg, M., Mogilnitzki, M., Mizrahi, Y. Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. *Phytochemistry*, 58, 1209–1212, 2001.
- Wybraniec, S., Mizrahi, Y. Fruit flesh betacyanin pigments in *Hylocereus* cacti. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6086–6089, 2002.
- Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B., Mitka, K., Kowalski, P., Mizrahi, Y. Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. *Phytochemistry*, 68, 2, 251-9.
- Wyler, H., Meuer, U., Bauer, J. M., Stravs-Mombelli, L. Cyclodopa glucoside (= (2S)-5-(β-D-glucopyranosyloxy)-6-hydroxyindoline-2-carboxylic acid) and its occurrence in red beet (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.). *Helvetica Chimica Acta*, 67, 1348-1355, 1984.
- Xiao-Hong, H., Zhao-Jin, G., Xing-Guo, X. Enzymes and genes involved in the betalain biosynthesis in higher plants, *African Journal of Biotechnology*, 8, 6735-6744, 2009.

- Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials, *Annals of Science*, 17, 599-604, 2001.
- Yanishlieva, N.V. Inhibiting oxidation, *Antioxidants in food, Practical applications*, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 2001.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V. Inhibiting oxidation. *Antioxidants in Food*, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds.), CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 23-70, 2001.
- Yen, G.C., Chen H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27-32, 1995.
- Yıldırım, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A.A., Algur, O.F., Bilaloglu, V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argenta* Desf Ex DC), sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5030–5034, 2000.
- Zakharova N., Petrova T. Relationship between the structure and antioxidant activity of certain betalains, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 34, 182-185, 1998.
- Zeller, B.L. Development of porous carbohydrate food ingredients for the use in flavour encapsulation. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 11–12, 389–394, 1999.
- Zheng, Z., Shetty, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculant production. *Process Biochemistry*, 33, 3, 323–329, 1998.
- Zhishen, J., Mencheng, T., Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559, 1999.