Optimiranje ekstrakcije i inkapsulacija ekstrakata komine aronije

Lončar, Arijan

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:595313

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE I INKAPSULACIJA EKSTRAKATA KOMINE ARONIJE

DIPLOMSKI RAD

Arijan Lončar

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Hortikultura-Voćarstvo

OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE I INKAPSULACIJA EKSTRAKATA KOMINE ARONIJE

DIPLOMSKI RAD

Arijan Lončar

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković

Neposredni voditelj: Slaven Jurić, mag. nutr.

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Arijan Lončar**, JMBAG 0178099970, rođen 21.06.1995 u Sisku, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE I INKAPSULACIJA EKSTRAKTA KOMINE ARONIJE

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Arijana Lončara**, JMBAG 0178099970, naslova

OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE I INKAPSULACIJA EKSTRAKTA KOMINE ARONIJE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	Izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković	mentor	_____
2.	Doc. dr. sc. Nenad Jalšenjak	član	_____
3.	Prof. dr. sc. Boris Duralija	član	_____

Zahvala

Ovime zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Marku Vincekoviću i Slavenu Juriću, mag. nutr. na razumijevanju i velikoj pomoći prilikom istraživanja i izrade ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem i cijelom Zavodu za kemiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na ustupljenom prostoru laboratorija te pomoći pri radu.

Sadržaj

1. Uvod 1
   1.1. Cilj istraživanja 2
2. Materijali i metode 3
   2.1. Biljni materijal i priprema praha aronije 3
   2.2. Kemikalije i reagensi 3
   2.3. Priprema uzoraka za ultrazvučnu ekstrakciju 3
   2.4. Metode rada 4
      2.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola 5
      2.4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom 6
      2.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom 6
      2.4.4. Određivanje sadržaja antocijana 7
   2.5. Inkapsulacija 8
   2.6. Otpuštanje ukupnih polifenola iz suhih mikročestica 9
   2.7. Statistička obrada podataka 10
3. Rezultati i rasprava 11
   3.1. Optimizacija ekstrakcije 12
   3.2. Otpuštanje polifenola iz mikročestica 14
4. Zaključak 17
5. Popis literature 18
6. Prilog 21

Životopis 33

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Arijana Lončara**, naslova

OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE I INKAPSULACIJA EKSTRAKTA KOMINE ARONIJE

Crnoplodna aronija (*Aronia melanocarpa*) je u posljednje vrijeme postala veoma popularna zbog svojih zdravstvenih blagodati. Plod je bogat izvor bioaktivnih spojeva osjetljivih na okolišne čimbenike. Stoga je namjera ovog istraživanja utvrditi optimalne uvjete ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz krutog otpada aronije kako bi se isti mogli inkapsulirati te tako zadržati stabilnost njihove strukture. Metode koje su se koristile za optimiranje uvjeta ekstrakcije uključuju spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola i antocijana, određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata krutog otpada aronije ABTS i DPPH metodama te inkapsulaciju optimalnog ekstrakta provedenu metodom ionskog geliranja kako bi se dobile mikrosfere i mikrokapsule na bazi prirodnog materijala. S obzirom na kratko vrijeme ultrazvučne ekstrakcije i vode kao otapala, optimalni ekstrakt je imao visok sadržaj polifenola, antocijana te visoku vrijednost antioksidacijskog kapaciteta.

Ključne riječi: optimiranje ekstrakcije, ultrazvučna ekstrakcija, inkapsulacija, antioksidacijski kapacitet, antocijani

Summary

Of the master's thesis – student **Arijan Lončar,** entitled

OPTIMIZATION OF EXTRACTION AND ENCAPSULATION OF BLACK CHOKEBERRY POMACE EXTRACT

Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) lately became very popular fruit because of its recognized health benefits. Black chokeberry fruits are a very rich source of bioactive compounds which are sensitive to environmental factors. Therefore, the purpose of this research was to determine optimal conditions of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from the solid wastes of black chokeberry and to encapsulate extracted bioactives in order to maintain their structural stability. Methods that are used for the optimization of extraction conditions include spectrophotometric determination of total polyphenols and anthocyanin content, determination of the antioxidant capacity of extracts of solid wastes of chokeberry by ABTS and DPPH methods and encapsulation of optimal extract via ionic gelation method to get microspheres and microcapsules based on natural material. With regard to a short time of ultrasound-assisted extraction and the use of only water as a solvent still extracts had high total polyphenols, anthocyanin content and high antioxidant capacity.

Keywords: extraction optimization, ultrasound-assisted extraction, encapsulation, antioxidant capacity, anthocyanins

1. Uvod

Aronija (*Aronia melanocarpa*) je voćka koja pripada porodici ruža (Rosaceae) je listopadni grm porijeklom iz istočnog dijela Sjeverne Amerike (Persson i sur. 2004., Ochmian i sur. 2012., prema Tolić i sur. 2015.) gdje su je američki domoroci (Abnakians i Potawatomians) koristili za liječenje prehlade (Kokotkiewicz i sur. 2010.). Danas se aronija uzgaja i u istočnoj Europi i Rusiji (Kulling i Rawel 2008.), gdje se koristi za proizvodnju domaćih i komercijalnih sokova, džemova, voćnih čajeva, vina i prirodnih bojila za hranu (Ochmian i sur., 2012., Sueiro i sur., 2006., prema Tolić i sur. 2015.).

Budući da aronija pokazuje veliku otpornost cvijeta na mraz u kasno proljeće, na oštećenje biljke prilikom mehanizirane berbe te otpornost na oštećenje plodova tijekom transporta i skladištenja, postala je veoma popularna u posljednje vrijeme (Wawer, 2006., prema Tolić i sur. 2015.). Također, u posljednjih 10 godina, znanstvenici i proizvođači hrane pokazuju sve veći interes za polifenole, a glavni razlog je prepoznavanje antioksidativnih svojstava polifenola, njihova visoka prisutnost u ljudskoj prehrani, moguća uloga u prevenciji različitih bolesti povezanih s oksidativnim stresom kao što su rak, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Manach i sur. 2004.). Polifenoli kao sekundarni metaboliti biljaka služe za obranu protiv ultraljubičastog zračenja i napada patogena (Manach i sur. 2004.).

Međutim koncentracije polifenola koje pokazuju in vitro djelotvornost su općenito superiorne u odnosu na one in vivo. Zbog kratkog zadržavanja u želucu, slabe propustljivosti i topljivosti samo se mali dio molekula bioaktivnih spojeva koji se primjenjuju oralno apsorbira. Nestabilnost polifenola tijekom procesiranja hrane, distribucije ili skladištenja, ili u probavnom traktu limitira njihovu aktivnost, a time i potencijalne zdravstvene koristi. Nadalje, mnogi polifenolni spojevi su neugodnog okusa, zato bi prije nego se uključe u hranu ili lijekove za oralnu uporabu trebali biti prikriveni. Stoga korištenje polifenolnih spojeva zahtijeva stvaranje produkta koji može zadržati njihovu strukturu sve do konzumiranja ili neke druge primjene, prikriti njihov okus, pojačati topivost u vodi i povisiti biodostupnost (Munin i Edwards-Lévy 2011.).

Zheng i Wang (2003.) navode (prema Oszmiański i Wojdylo, 2005.) da je aronija imala značajno viši sadržaj antocijana, fenolnih komponenti te veći antioksidacijski kapacitet od borovnice, brusnice i europske brusnice, a u studiji gdje su analizirani polifenoli na 143 različita biljna uzorka najviši sadržaj tih komponenti je nađen u aroniji (Ovaskainen i sur. 2008.). Prema Pérez-Jiménez i sur. (2010.) plodovi crnoplodne aronije su rangirani prvi među voćem, a sedmi među hranom bogatom polifenolima. Polifenoli se dijele na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane, a flavonoidi dalje na flavonole, flavone, izoflavone, flavanone, antocijane i flavanole (Manach i sur. 2004., Pandey i sur. 2009.). Galván D'Alessandro i sur. 2014. (prema Wu i sur. 2004.) navode da su plodovi crnoplodne aronije među najbogatijim biljnim izvorima antocijana. Antocijani su

pigmenti topivi u vodi , a nalaze se u vakuolama epiderme i odgovorni su za ružičastu, crvenu, plavu ili ljubičastu boju (Manach i sur. 2004.). Poznato je da visoki sadržaj tih fenola korelira s antioksidativnom aktivnošću u plodovima aronije (Kähkönen i sur. 1999., prema Galván D'Alessandro i sur. 2014.).

Crnoplodna aronija je jedan od najbogatijih izvora polifenolnih spojeva, u kojima dominiraju antocijani, proantocijanidini, fenolne kiseline, flavanoli (Ćujić 2017.). Nakon proizvodnje soka aronije tiještenjem, mnogi fenolni spojevi, a osobito antocijani, su još uvijek prisutni u krutom otpadu (Lazarova i sur. 2016.). Osim problema zbrinjavanja otpada, komina aronije je još uvijek bogata biološki aktivnim tvarima koje se mogu iskoristiti u proizvodnji funkcionalne hrane.

U ovom radu će se provesti postupak optimiranja uvjeta ultrazvučne ekstrakcije (amplituda, vrijeme, masena koncentracija) krutog otpada (komine) aronije kako bi se postigao što veći prinos bioaktivnih komponenata. Nadalje, optimalni uvjeti će se primijeniti pri pripremi ekstrakta aronije koji će se stabilizirati metodom inkapsulacije te će se nakon inkapsulacije odrediti ukupni polifenoli dobiveni otpuštanjem iz suhih mikročestica.

1.1. Cilj istraživanja

Ovim će se radom optimirati uvjeti ultrazvučne ekstrakcije s ciljem dobivanja većeg iskorištenja bioaktivnih komponenata iz krutog otpada aronije uz pomoć vode kao otapala, a ekstrakti s najvećim prinosom će se inkapsulirati. Dobivene mikročestice će se osušiti te će se odrediti udio polifenola u istima te otpuštanje bioaktivnih tvari u vodeni medij.

2. Materijali i metode

2.1. Biljni materijal i priprema praha aronije

Nasad aronije se nalazi na parceli u Samoboru od cca 4000 m^2 s 800 grmova aronije koje su posađene u 5 redova. Razmak između redova je 4 m, a između grmova u redu 1 m. Posađena je crnoplodna aronija (*Aronia melanocarpa*) sorta Nero. Ovi grmovi čine trajni nasad. Berba se obavila u kolovozu 2018. kada je količina topljive suhe tvari u plodu iznosila 21 – 23 °Brixa, tako da kada su se svi plodovi izmiješali količina topljive suhe tvari nije bila ispod 18 °Brixa. Plodovi su se skladištili u vreće koje se slažu na palete i kao takve su se otpremile u hladnjaču na režim minus 20 °C.

Istraživanje se provelo u laboratorijima Zavoda za kemiju na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Kao predmet istraživanja je korištena komina (ostatak nakon prešanja plodova za sokove) aronije (Arya) koja je usitnjena uz pomoć laboratorijskog mlina u prah do veličine čestica manje od 450 µm, a kao ekstrahirajuće otapalo korištena je destilirana voda.

2.2. Kemikalije i reagensi

Folin-Ciocalteu reagens, Na_2CO_3, 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) reagens, kalijev persulfat, 96%-tni etanol, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal, metanol, natrijev alginat, $CaCl_2$, kitozan, CH_3COOH.

2.3. Priprema uzoraka za ultrazvučnu ekstrakciju

Uz pomoć programa DesignExpert v7.0.0. određeni su parametri ultrazvučne ekstrakcije uređajem Ultrasonics Processor UP200St – Sonotrode S26d14 (Heilscher Ultrasonics GmbH, Njemačka). Preliminarnim rezultatima za optimizaciju ultrazvučne ekstrakcije određen je raspon masene koncentracije koji je iznosio od 10-30 g/L suhe tvari praha komine aronije. Određena masa praha aronije je odvagana i prelivena s destiliranom vodom temperature 24,5 °C. Pripremljeni uzorci potom su odmah podvrgnuti ultrazvučnom tretmanu pri različitim amplitudama od 25%, 50% i 75% te različitim vremenima ekstrakcije (1 – 3 min), kao što je prikazano u tablici 2.3.1. Nakon provedenog ultrazvučnog tretmana uzorci su odmah profiltrirani kroz muslin (kako bi se uklonile veće čestice), a zatim kroz Whatman No.4 filter. Dobiveni ekstrakti

su prebačeni u odmjernu tikvicu i dopunjeni otapalom do oznake. Takvi ekstrakti koristili su se za daljnje kemijske analize.

Tablica 2.3.1. Optimiranje uvjeta ekstrakcije (DesignExpert v7.0.0.) uz pomoć metode odzivne površine

Uzorak	Redoslijed	Amplituda (%)	Koncentracija (g/L)	Vrijeme (minuta)
8	1	75	20	3
17	2	50	20	2
7	3	25	20	3
11	4	50	10	3
16	5	50	20	2
12	6	50	30	3
2	7	75	10	2
13	8	50	20	2
9	9	50	10	1
10	10	50	30	1
15	11	50	20	2
6	12	75	20	1
14	13	50	20	2
3	14	25	30	2
1	15	25	10	2
4	16	75	30	2
5	17	25	20	1

2.4. Metode rada

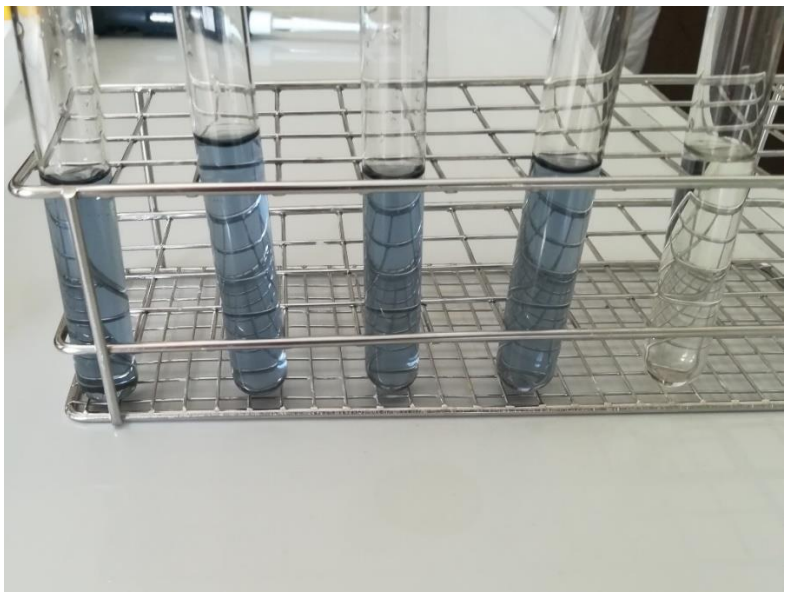
Metode koje su se koristile za optimiranje uvjeta ekstrakcije uključuju spektrofotometrijsko (Schimadzu UV/Vis 1700) određivanje ukupnih polifenola i antocijana. Također, određivao se i antioksidacijski kapacitet ekstrakata aronije ABTS i DPPH metodama. Inkapsulacija ekstrakta se provela metodom ionskog geliranja uz pomoć inkapsulatora (Büchi - Encapsulator B-390, BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska). Provela se fizikalno-kemijska analiza dobivenih mikročestica u smislu inkapsulacijske učinkovitosti, kapaciteta ispune, bubrenja čestica te morfologije. Također, određeno je i kumulativno otpuštanje polifenola iz mikročestica.

2.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola određen je na temelju kolorimetrijske reakcije Folin-Ciocalteu reagensa s polifenolnim spojevima (reducirajućim reagensom). Folin-Ciocalteu reagens, koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, reagira s fenoksid-ionom, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida. Reakcija se odvija na sobnoj temperaturi kroz 2 sata. Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 765 nm.

Postupak rada uključuje dodavanje 0,1 mL uzorka u epruvetu, te 7,9 mL destilirane vode, 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) i 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata (dodatkom otopine natrijevog karbonata započinje reakcija). Potom se sadržaj epruvete dobro promiješa na vorteksu te se tako pripremljeni uzorci ostave stajati 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga se mjeri apsorbancija plavog obojenja na 765 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba je pripremljena na isti način kao i ispitivani uzorci samo se umjesto uzorka dodaje isti volumen destilirane vode (Vojvodić i sur. 2014.).

Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija galne kiseline, izradi se baždarni pravac prema čijoj se jednadžbi pravca izračunava koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima za izmjerene vrijednosti apsorbancija, a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (EGK) po L ekstrakta (mg EGK/L).



Slika 2.4.1.1. Uzorci netom prije mjerenja udjela ukupnih polifenola

2.4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Metoda se bazira na oksido-redukcijskoj reakciji „gašenja“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji nastaje oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Praćenjem promjene apsorbancije ABTS radikala na 734 nm, određuje se antioksidacijski kapacitet ispitivanog uzorka u odnosu na 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilnu kiselinu (Trolox), pri istim uvjetima (Re i sur. 1999).

Otopina ABTS+ radikala pripremi se oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa sa 140 mM kalijevim peroksodisulfatom do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksodisulfata od 2,45 mM. Budući da ABTS i kalijev peroksodisulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 2:1 neće doći do potpune oksidacije, stoga je potrebno pripremljenu otopinu skladištiti u mraku i ostaviti da stoji preko noći na sobnoj temperaturi. Na dan analize pripremi se 1%-tna (v/v) otopina ABTS+ radikala razrjeđenjem s 96%-tnim etanolom, tako da apsorbancija te otopine pri 734 nm iznosi 0,70 ± 0,02. Alikvot od 40 µL uzorka se pomiješa s 4 mL otopine ABTS+ radikala te se mjeri apsorbancija pri 734 nm nakon točno 6 minuta. Voda je korištena kao slijepa proba (Jatoi i sur. 2017.).

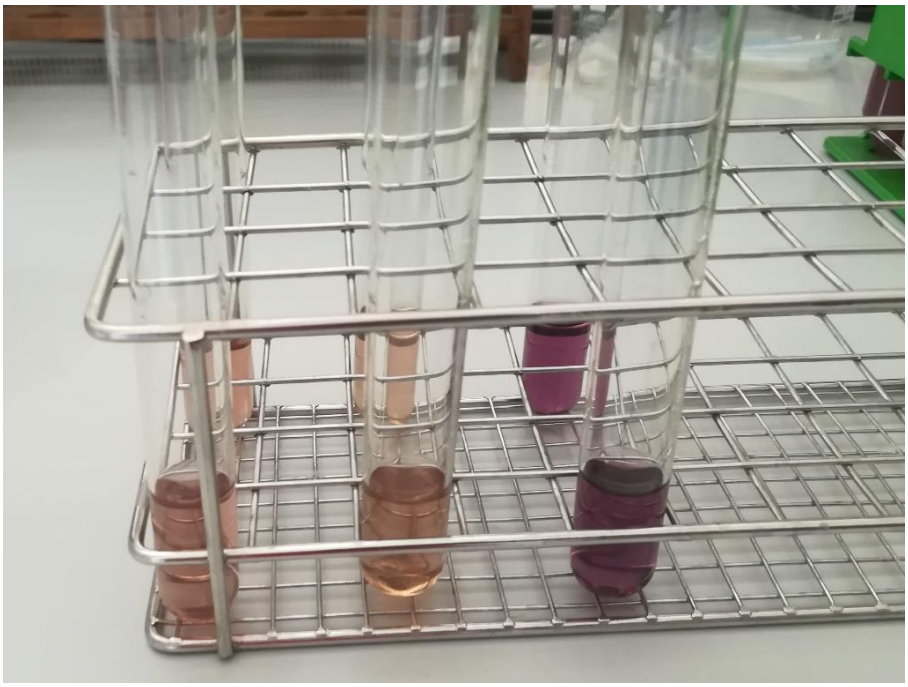
Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a, izradi se baždarni pravac. Koristeći jednadžbu baždarnog pravca vrijednosti se preračunaju kao ekvivalenti Trolox-a. Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenata Trolox-a po L ekstrakta (mmol ET/L).

2.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Ova metoda temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u otopini metanola (Brand-Willimas i sur. 1995).

Postupak rada uključuje pripremu 0,094 mM otopine 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala u metanolu. U epruvetu se dodaje 100 µL uzorka te se doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH i vorteksira. Reakcija se odvija 30 minuta u mraku nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema na isti način kao i ispitivani uzorci, ali se umjesto uzorka dodaje isti volumen metanola (Jatoi i sur. 2017.).

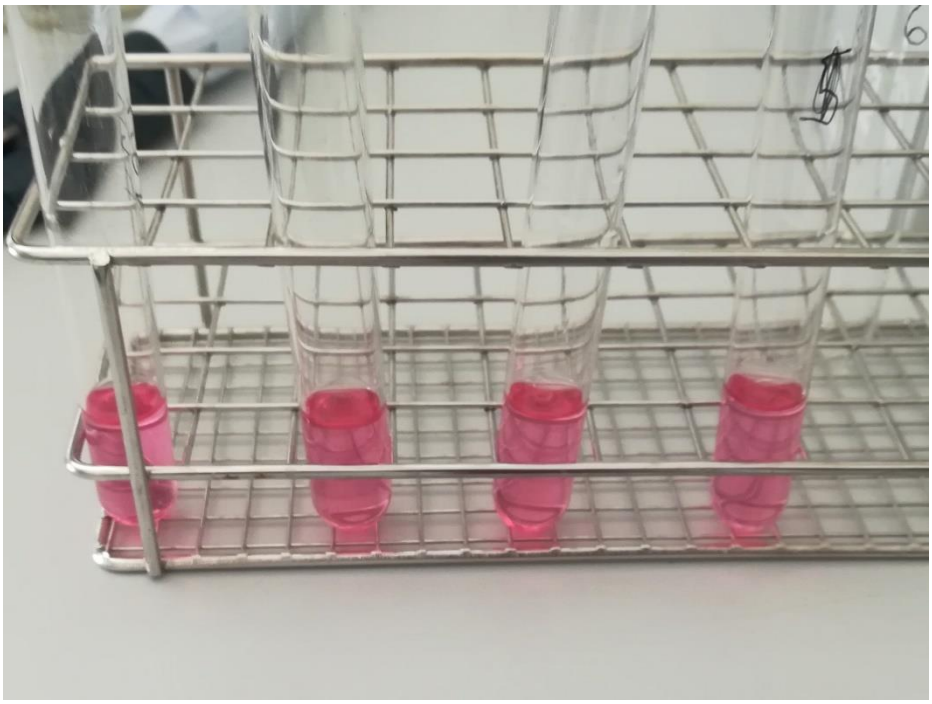
Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih koncentracija Trolox-a, izradi se baždarni pravac. Koristeći jednadžbu baždarnog pravca rezultati se računaju kao ekvivalenti Trolox-a kojom se postiže isti reakcijski učinak. Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenata Trolox-a po L ekstrakta (mmol ET/L).



Slika 2.4.3.1. Uzorci pripremljeni DPPH metodom nakon 30 minuta stajanja u mraku

2.4.4. Određivanje sadržaja antocijana

Postupak određivanja sadržaja antocijana provodi se tako da se uzorak pomiješa s otopinom etanola (C_2H_5OH), destilirane vode (H_2O) i klorovodične kiseline (HCl) u omjeru 70 : 30 : 1. Spektrofotometrom se pri valnoj duljini od 525 nm određuje sadržaj antocijana prema jednadžbi: $Ukupni\ antocijani\ \left(\frac{mg}{L}\right) = \frac{A \times relativna\ molekulska\ masa\ Malvidin-3-glukozida \times 1000}{\varepsilon \times 5}$ gdje je ε molarni apsorpcijski koeficijent. Ako je apsorbancija manja od 0,3 i veća od 0,6 uzorak je potrebno razrijediti u takvom omjeru da apsorbancija iznosi $0,3 < A < 0,6$.



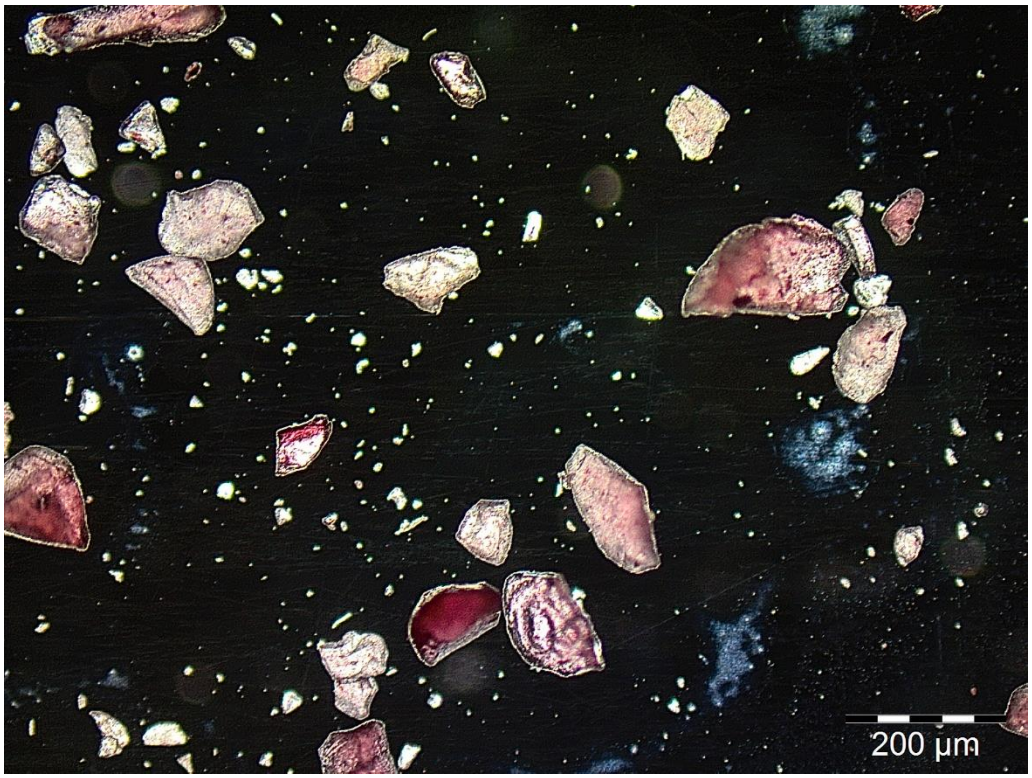
Slika 2.4.4.1. Uzroci netom prije određivanja sadržaja antocijana

2.5. Inkapsulacija

Nakon provođenja optimizacije ekstrakcije komine aronije, u smislu biološki aktivnih tvari, pri optimalnim uvjetima pripremaju se ekstrakti za proces inkapsulacije. U dio pripremljenog ekstrakta dodaje se natrijev alginat (1.5% w/v), a u drugi dio $CaCl_2$ (1% w/v). Tako pripremljene otopine se koriste za inkapsulaciju na Büchi - Encapsulator B-390 uređaju. Dokapavanjem otopine nosača (natrijev alginat) u otopinu koja sadrži divalentni kation (Ca^{2+}) gotovo trenutno nastaju mikročestice (mikrosfere). Uvjeti inkapsulacije podešeni su tako da nastavak za dokapavanje iznosi 300 µm, pri frekvenciji od 600 Hz, tlaku od 0,3 – 0,5 bar i protoku od 5,5 – 7 mL/min. Nakon inkapsulacije, mikrosfere se skladište preko noći u otopini ekstrakta i $CaCl_2$ kako bi čestice dodatno očvrsnule. Dio mikrosfera se zatim dodaje u 0,5%-tnu (w/v) otopinu kitozana (u 1% CH_3COOH (v/v)) kako bi se stvorio dodatni omotač oko mikročestica (mikrokapsule).

2.6. Otpuštanje ukupnih polifenola iz suhih mikročestica

Nakon inkapsulacije uzorak se u vrlo tankom sloju razmaže preko površine Petrijeve zdjelice te se suši u sušioniku pri 50 °C kroz 6 sati. Odvaže se 3 g suhih mikročestica u staklenu čašu od 100 mL te se započne s postupkom praćenja otpuštanja biološki aktivnih tvari (polifenola) iz mikročestica (mikrosfera i mikrokapsula). Čim se uzorak stavi na magnetsku miješalicu i započne miješanje, dodaje se 50 mL destilirane vode temperature 24 °C. Po 100 µL uzorka se uzima nakon 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 480 i 1440 minuta miješanja u epruvete te se određuje udio ukupnih polifenola kao što je prethodno opisano u poglavlju 2.4.1.



Slika 2.6.1. Prikaz suhih mikročestica (mikrosfera) kalcijevog alginata ispunjenih ekstraktom aronije

2.7. Statistička obrada podataka

Sva mjerenja izvršena su u multiplikatima te su rezultati izraženi kao srednje vrijednosti ($\bar{x}$) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i$$

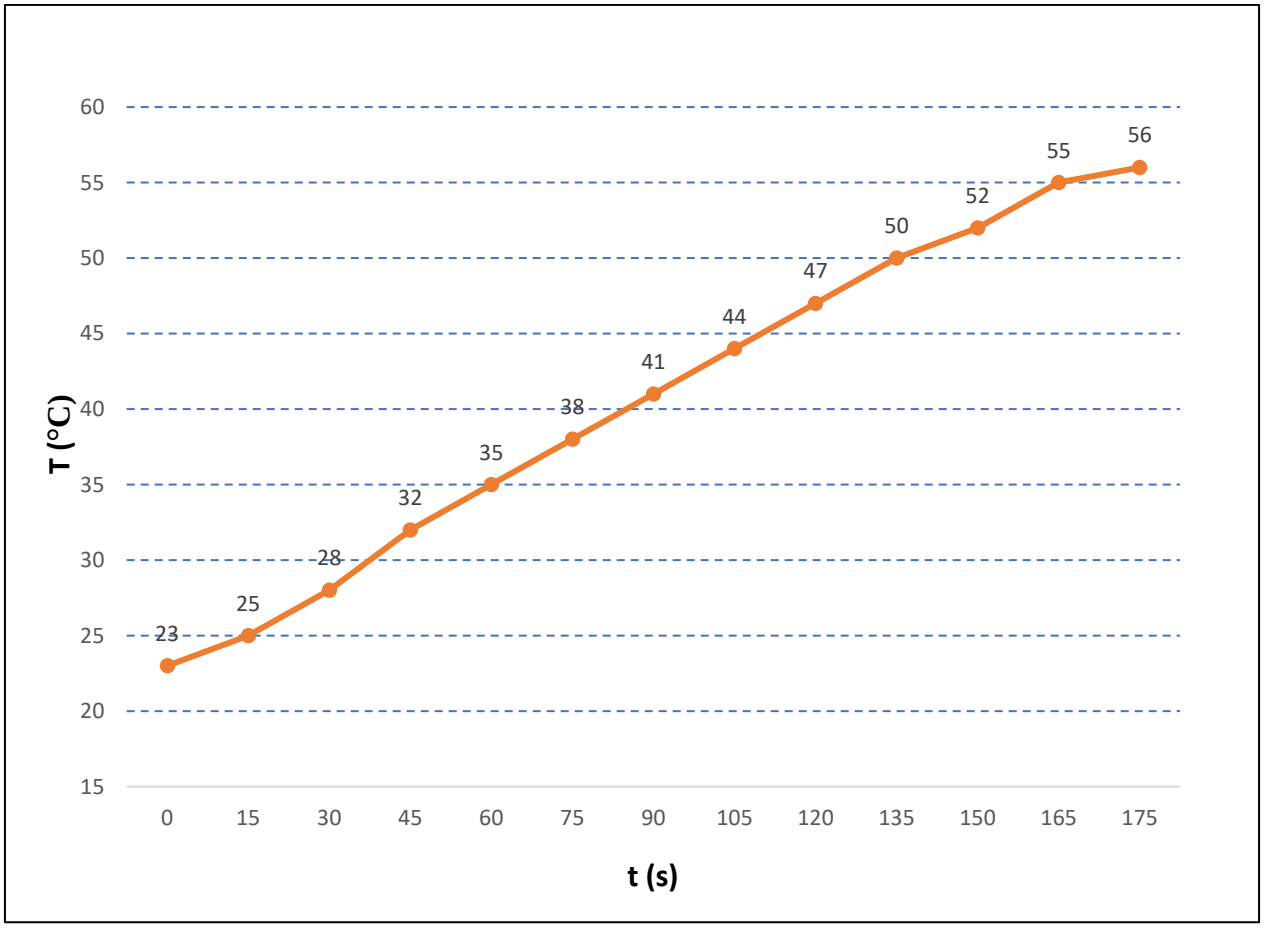
s pripadajućim standardnim greškama $S_{\bar{x}}$

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

izračunate iz pojedinačne vrijednosti uzoraka x_i i ukupnog broja uzoraka N. Rezultati su obrađeni uz pomoć DesignExpert v7.0.0. programa, a statistička obrada podataka (ANOVA i posthoc t-test s Bonferonijevom korekcijom) obavljena je u Microsoft Office Excel 2016 programu s XLSTAT dodatkom.

3. Rezultati i rasprava

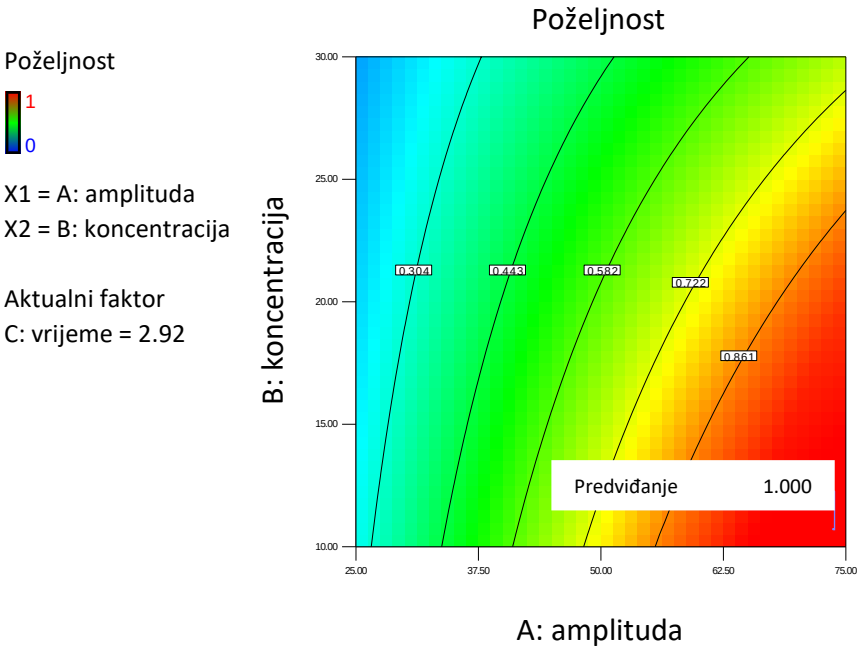
Rezultati ovog istraživanja obuhvaćali su određivanje udjela ukupnih polifenola u ekstraktima komine aronije, određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta komine aronije ABTS i DPPH metodom te određivanje sadržaja antocijana u ekstraktu komine aronije. Drugi dio obuhvaćao je stabilizaciju dobivenih optimalnih ekstrakata inkapsulacijskom metodom ionskog geliranja u biopolimerne nosače te praćenje otpuštanja biološki aktivnih tvari (polifenola) iz suhih mikročestica (mikrosfera/mikrokapsula).



Grafikon 3.1. Promjena temperature (°C) optimalnog ekstrakta tijekom ultrazvučne ekstrakcije u intervalima od 15 sekundi

3.1. Optimizacija ekstrakcije

Dobiveni su rezultati opisani i obrađeni uz pomoć metode odzivne površine (Grafikon 3.1.1. i grafikoni u prilogu 6.1. – 6.12. te Tablica 6.1.). Ovim radom je dokazano da se najviše bioaktivnih komponenata krutog otpada aronije može ekstrahirati pomoću ultrazvuka pri uvjetima gdje se uzima masa od 1,1523 g praha komine aronije, amplitudi 72,18% od 2 minute i 55 sekundi. Optimalna ekstrakcija dobivena je analizom uvjeta ekstrakcije: amplituda ultrazvuka, masena koncentracija praha komine aronije i vrijeme ekstrakcije. Iz Grafikona 3.1.1. je vidljivo da se pri većoj amplitudi i s duljim vremenom (a time i pri višim temperaturama) ultrazvučne ekstrakcije može ekstrahirati veća koncentracija bioaktivnih komponenata. Općenito, temperatura ima pozitivan efekt na ekstrakciju polifenola iz biljnih izvora, jer što je veća topljivost polifenola u otapalu, viša je difuzivnost ekstrahirajućih molekula te je poboljšan prijenos masa pri višim temperaturama (Galvan d'Alessandro i sur. 2012.). Ipak, u ovom istraživanju je ultrazvučna ekstrakcija provođena do maksimalno 3 minute i pri maksimalnoj temperaturi od 56 °C. Povećanjem vremena ekstrakcije iznad 3 minute, temperatura se povećava preko 60 °C što može dovesti do raspada nekih bioaktivnih komponenti.



Grafikon 3.1.1. Odzivna površina i poželjni uvjeti ultrazvučne ekstrakcije s predviđanjem optimalnog iskorištenja

Tablica 3.1.1. Optimalne varijable ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz praha komine aronije

Varijable	Amplituda (%)	Koncentracija (g/L)	Vrijeme (min)	Poželjnost
Optimalne vrijednosti	72,18	11,52	2 min 55 s	1,000

Prema grafikonu 3.1.1. i grafikonima u prilogu 6.1. – 6.12., dobivene su odzivne površine iz kojih su određeni optimalni uvjeti ekstrakcije. Izmjereni sadržaj ukupnih polifenola u optimalnom ekstraktu je bio 15,1243 mg EGK/g suhe tvari, dok je očekivani optimalni rezultat bio 15,1348 mg EGK/g suhe tvari što je samo 0,07% relativne pogreške. Izmjereni sadržaj antocijana u optimalnom uzorku je iznosio 0,9987 mg EM-3-g/g suhe tvari, dok je očekivani optimalni rezultat iznosio 1,0845 mg EM-3-g/g suhe tvari te je relativna pogreška iznosila 7,91%. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom iznosio je 0,0786 mmol ET/g suhe tvari, a očekivani optimalni rezultat je iznosio 0,0796 mmol ET/g suhe tvari s relativnom pogreškom od 1,22%. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom iznosio je 0,0666 mmol ET/g suhe tvari dok je očekivani optimalni rezultat iznosio 0,0696 mmol ET/g suhe tvari s relativnom pogreškom od 4,27%. Na osnovu dobivenih rezultata (Tablica 3.1.2.), može se reći da se optimalni predviđeni uvjeti podudaraju s dobivenim eksperimentalnim s relativno malom pogreškom. Galvan d'Alessandro i sur. (2014.) navode viši sadržaj ukupnih polifenola i antocijana u krutom otpadu crnoplodne aronije. Iako je isto voda korištena kao otapalo, maksimalni sadržaj polifenola je iznosio 43,17 mg EGK/g, antocijana 8,50 mg ECG[1]/g, a antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom je iznosio 219,51 μmol ET/g. Prema Dandena i sur. (2014.) sadržaj ukupnih polifenola u krutom otpadu crnoplodne aronije je iznosio 60 mg EGK/g, a antocijana 4594 mg ECG/L (4,595 mg ECG/g), međutim kao otapalo se koristio 40 i 50%-tni etanol. Značajno niži rezultati u ovom istraživanju mogu ukazivati na različite uvjete uzgoja, ali osim toga priprema i način ekstrakcije su se razlikovali u odnosu na ovo istraživanje. Slične rezultate sadržaja polifenola navode Rop i sur. (2010.). Maksimalni sadržaj polifenola je iznosio 12,85 g EGK/kg svježe mase, a antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom je iznosio 15,96 g EAK[2]/kg svježe mase. Samo što su ti rezultati dobiveni iz soka svježeg ploda aronije u metanolu kao otapalu bez provođenja ultrazvučne ekstrakcije. Prema Oszmianski i Wojdylo (2005.) komina aronije je sadržavala 105,83 mg EGK/g suhe tvari polifenola, a antioksidacijski kapacitet komine aronije izmjeren DPPH metodom iznosio je 3,02 μM ET/g suhe tvari, a izmjeren ABTS metodom 7,79 μM ET/g suhe tvari, a kao otapalo je korišten

[1] Ekvivalenata cijanidin-3-glukozida
[2] Ekvivalenata askorbinske kiseline

metanol. Lazarova i sur. (2016.) su iz krutog otpada aronije izmjerili 7700 mg EGK/L polifenola, a kao otapalo je korišten 50%-tni etanol bez ultrazvučne ekstrakcije.

Tablica 3.1.2. Očekivani optimalni i stvarni eksperimentalni rezultati

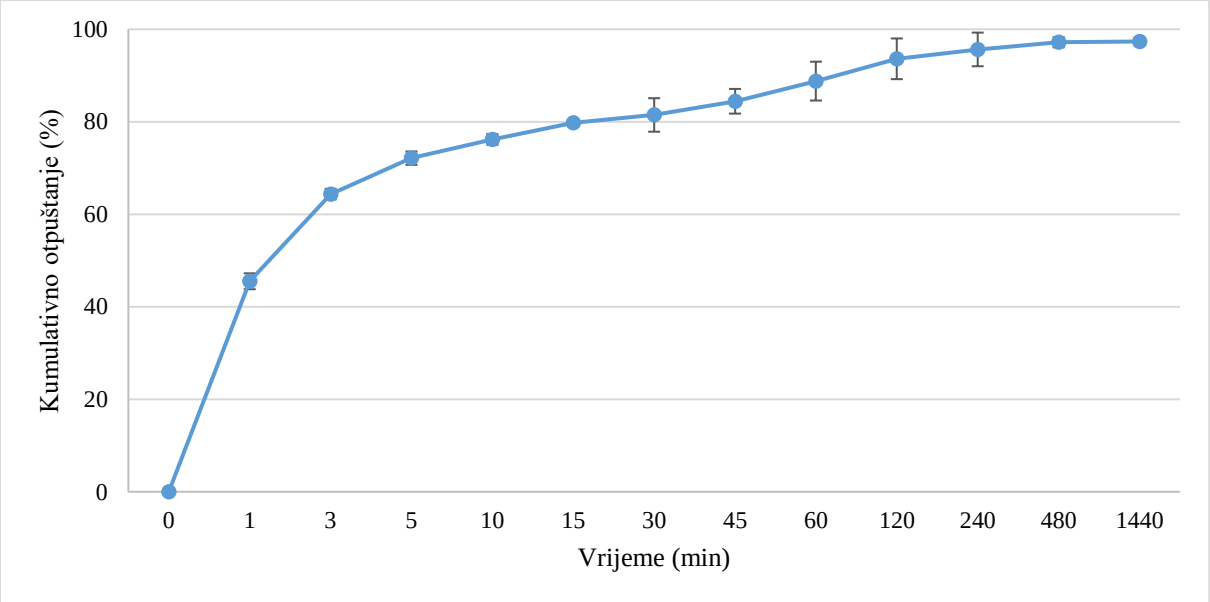
Bioaktivni spojevi/metode određivanja antioksaidacijskog kapaciteta	TPC (mg EGK/g suhe tvari)	Antocijani (mg EM-3-g/g suhe tvari)	ABTS (mmol ET/g suhe tvari)	DPPH (mmol ET/g suhe tvari)
Očekivani optimalni rezultati	15,1348	1,0845	0,0796	0,0696
Stvarni eksperimentalni rezultati	15,1243	0,9987	0,0786	0,0666
Relativna pogreška (%)	0,0694	7,9132	1,2175	4,2679

TPC- total phenolic content; EGK- ekvivalenata galne kiseline; EM-3-g- ekvivalenata malvidin-3-glukozida; ET- ekvivalenata Trolox-a

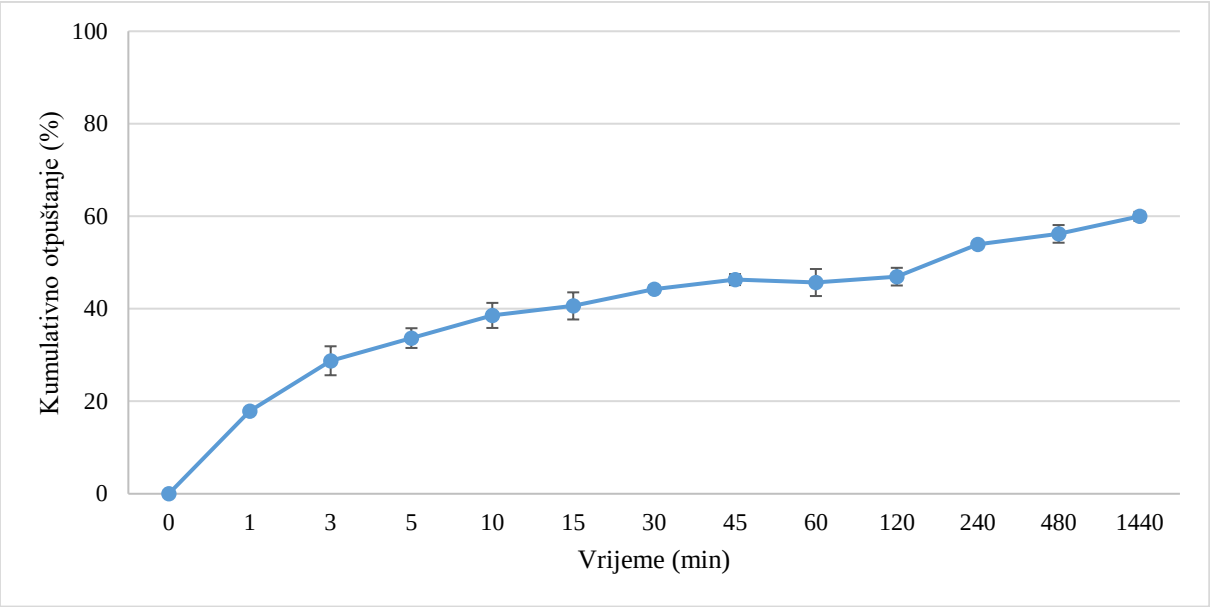
3.2. Otpuštanje polifenola iz mikročestica

Praćenje otpuštanja ukupnih polifenola iz mikročestica provedeno je do 1440. miniute. Iz Grafikona 3.2.1. vidljivo je da nakon 480. minute dolazi do gotovo 100%-tnog otpuštanja polifenola (97,35%) iz mikrosfera. Dodatni omotač (kitozan) statistički je značajno ($p<0,001$) usporio otpuštanje biološki aktivnih tvari iz mikrokapsula, a iz Grafikona 3.2.2. se može vidjeti da se postiže maksimum od 59,98% kumulativno otpuštenih ukupnih polifenola nakon 1440. minute. Nadalje već nakon 1 minute, iz mikrosfera se otpušta gotovo 50% ukupnih polifenola dok se kod mikrokapsula značajno usporava otpuštanje te nakon 1 minute dostiže se vrijednost manja od 20%, iako je i dalje vidljiv nagli početni porast otpuštanja polifenola u obje varijante. Dakle kinetika otpuštanja se može podijeliti u dvije faze: prva – nagli porast otpuštanja polifenola u prvih nekoliko minuta; druga – sporo (obje varijante) i kontinuirano (samo mikrosfere) otpuštanje nakon prvih nekoliko minuta. Početno ubrzano otpuštanje se može objasniti polifenolima koji se nalaze na površini mikročestica. S obzirom na to da polifenoli spadaju u kisele spojeve, mogu biti ionizirani u anione pri neutralnom i lužnatom pH te će im topljivost biti značajno poboljšana (Liang

i sur. 2011.). S druge strane kasnije, sporo otpuštanje polifenola je rezultat difuzije. Propusnost mreže gela Ca-alginat omogućava difuzijsko otpuštanje polifenola za vrijeme dugotrajnog boravka u tekućem mediju (Belščak-Cvitanović i sur. 2016.). Prema Zhu i sur. (2009.) sporo otpuštanje se događa, jer je preostali sadržaj polifenola u mikročesticama daleko od površine kalcijevog alginata odnosno kitozana, a povećana koncentracija polimera (1,5%-tni natrijev alginat) formira deblji polimerski zid koji efikasno onemogućava otpuštanje polifenola koji se nalaze daleko od površine. Stoga debeli sloj gela usporava daljnje otpuštanje polifenola u okolni medij odnosno vodu. Za vrijeme otpuštanja polifenola došlo je do bubrenja mikročestica zbog hidratacije hidrofilnih skupina alginata i kitozana (slobodna voda prodire u unutrašnjost mikročestica da popuni inertne šupljine među lancima polimera) (Hoffman 2002., prema Pasparakis i Bouropoluos, 2006.). Mikrokapsule u prosjeku bubre značajnije od mikrosfera kalcijevog alginata (Tablica 3.2.1.). Dobivenim rezultatima možemo povezati da je otpuštanje polifenola usporeno kod mikročestica koje više bubre. Takvo dugotrajno otpuštanje bioaktivnih spojeva obloženih kitozanom je od ključne važnosti za moguću primjenu u prehrambenim proizvodima (Belščak-Cvitanović i sur. 2011.). U slučaju da je potrebno brže otpuštanje polifenola iz suhih mikročestica inkapsulacija bi se trebala obaviti samo pomoću kalcijevog alginata bez dodatka kitozana.



Grafikon 3.2.1. Kumulativno otpuštanje ukupnih polifenola iz suhih mikrosfera kalcijevog alginata ispunjenih ekstraktom komine aronije



Grafikon 3.2.2. Kumulativno otpuštanje ukupnih polifenola iz suhih mikrokapsula kalcijevog alginata i kitozana ispunjenih ekstraktom komine aronije

Tablica 3.2.1. Usporedba stupnja bubrenja mikročestica – mikrosfera i mikrokapsula

Mikročestice		Prosjek (%)	Standardna dev. (%)
Mikrosfere (bez kitozana)	Kalcijev-alginat	60,11142	18,0184
Mikrokapsule (s kitozanom)	Kalcijev-alginat/kitozan	82,14158	16,2589

4. Zaključak

Za postizanje optimalnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije, iz kojega je ekstrahirano najviše bioaktivnih komponenata krutog otpada aronije, potrebno je uzeti masu od 1,1523 g praha komine aronije amplitude ultrazvuka 72,18% te postaviti vrijeme ekstrakcije na 2 minute i 55 sekundi.

Budući da je kumulativno otpuštanje ukupnih polifenola iz suhih mikrosfera kalcijevog alginata ispunjenih ekstraktom komine aronije bilo značajno više za razliku od otpuštanja ukupnih polifenola iz suhih mikrokapsula kalcijevog alginata i kitozana (97,35% nakon 480 minuta u odnosu na 59,98% nakon 1440 minuta), može se zaključiti da kalcijev alginat bez kitozana omogućava znatno brže otpuštanje ukupnih polifenola.

Iz rezultata ovog istraživanja proizlazi da je kruti otpad aronije bogat izvor bioaktivnih komponenti kao što su polifenoli, a posebno antocijana te je visokog antioksidacijskog kapaciteta. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije se provodila s vodom kao zelenim otapalom kako bi se uklonila potreba korištenja organskih otapala. Iako se pomoću nekih organskih otapala može izvući više bioaktivnih komponenata iz krutog otpada aronije, voda je ipak kao otapalo ekološki i ekonomski najprihvatljivija te je sigurna za rukovati tijekom provođenja pokusa. Niska koncentracija uzorka potrebna za optimalnu ekstrakciju bioaktivnih komponenti u kratkom vremenu dovodi do zaključka da kruti otpad aronije još uvijek ima visok sadržaj istih. Nadalje, dobiveni optimalni ekstrakti stabilizirani su metodom inkapsulacije kako bi sačuvali stabilnost, bioaktivnost i biodostupnost aktivnih sastojaka. Inkapsulacijom su dobivene dvije vrste mikročestica na bazi prirodnog materijala – mikrosfere (bez kitozana) i mikrokapsule (s kitozanom). Ovako zarobljene molekule polifenola mogu sačuvati svoju strukturu, prikriti njihov neugodan okus, pojačati topivost u vodi te biodostupnost sve do konzumacije ili neke druge primjene u prehrambenoj farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji, ali i u nekim poljoprivrednim proizvodima, veterinarskoj medicini, industriji kemikalija, itd. S obzirom na dobivene rezultate mjerenja sadržaja bioaktivnih komponenti, nisku potrošnje energije, kratkog vremena potrebnog za ekstrakciju i inkapsulaciju, uporabu niske koncentracije praha komine aronije te uporabu ekološki i ekonomski prihvatljivog otapala može se zaključiti da je ultrazvučna ekstrakcija i metoda inkapsulacije vrlo efikasna.

5. Popis literature

1. Belščak-Cvitanović A., Stojanović R., Manojlović V., Komes D., Cindrić I. J., Nedović V., Bugarski B. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. Food Research International. 44(4): 1094 – 1101

2. Belščak-Cvitanović A., Jurić S., Đorđević V., Barišić L., Komes D., Ježek D., Bugarski B., Nedović V. (2016). Chemometric evaluation of binary mixtures of alginate and polysaccharide biopolymers as carriers for microencapsulation of green tea polyphenols. International Journal of Food Properties. 20(9): 1971 – 1986

3. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. LWT - Food Science and Technology. 28(1): 25 – 30

4. Ćujić N. M. (2017). Optimizacija ekstrakcije ploda aronije, Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott, mikroinkapsulacija ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenjem raspršivanjem. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet. Beograd

5. Dandena A., Zuka L., Kostova M. (2014). Natural antioxidants in black chokeberry marc extracts depending on the extraction method. U: 9th Baltic Conference on Food Science and Technology "Food for Consumer Well-Being", 08. – 09.05.2014., Latvia University of Agriculture Faculty of Food Technology, 324 – 326

6. Galvan d'Alessandro L., Kriaa K., Nikov I., Dimitrov K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. Separation and Purification Technology. 93: 42 – 47

7. Galván D'Alessandro L., Dimitrov K., Vauchel P., Nikov I. (2014). Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from Aronia melanocarpa (black chokeberry) wastes. Chemical Engineering Research and Design. 92(10): 1818 – 1826

8. Jatoi, M. A., Jurić, S., Vidrih, R., Vinceković, M., Vuković, M., Jemrić, T. (2017). The effect of postharvest application of lecithin on improving storage potential and quality of fresh goji (Lycium barbarum L.) berries. Food Chemistry. 230: 241-249

9. Kokotkiewicz A., Jaremicz Z., Luczkiewicz M. (2010). Aronia Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. Journal of Medicinal Food. 13: 255 – 269

10. Kulling S. E., Rawel H. M. (2008). Chokeberry (Aronia melanocarpa) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. Planta Medica. 74(13): 1625 – 1634

11. Lazarova M. P., Dimitrov K. I., Nikov I. S., Dzhonova D. B. (2016). Polyphenols extraction from black chokeberry wastes. Bulgarian Chemical Communications. 48: 442 – 445

12. Liang J., Li F., Fang Y., Yang W., An X., Zhao L., Hu Q. (2011). Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 82(2); 297 – 301

13. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition. 79(5): 727 – 747

14. Munin A., Edwards-Lévy F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. Pharmaceutics. 3(4): 793 – 829

15. Oszmiański J., Wojdylo A. (2005). Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. European Food Research and Technology. 221: 809 – 813

16. Ovaskainen M. L., Törrönen R., Koponen J. M., Sinkko H., Hellström J., Reinivuo H., Matilla P. (2008). Dietary Intake and Major Food Sources of Polyphenols in Finnish Adults[1-3]. The Journal of Nutrition. 138(3): 562 – 566

17. Pandey K. B., Rizvi S. I. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2(5): 270 – 278

18. Pasparakis G., Bouropoulos N. (2006). Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. International Journal of Pharmaceutics. 323(1 – 2): 34 – 42

19. Pérez-Jiménez J., Neveu V., Vos F., Scalbert A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. European Journal of Clinical Nutrition. 64(S3): S112 – S120

20. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine. 26(9 – 10): 1231 – 1237

21. Rop O., Mlček J., Juríková T., Valšíková M., Sochor J., Řezníček V., Kramářová D. (2010). Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (Aronia melanocarpa (Michx.) Elliot) cultivars. Journals of Medicinal Plants Research. 4: 2431 – 2437

22. Tolić M. T., Landeka Jurčević I., Panjkota Krbavčić I., Marković K., Vahčić N. (2015). Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Quality of Chokeberry (Aronia melanocarpa) Products. Food Technology & Biotechnology. 53(2): 171 – 179

23. Vojvodić A., Komes D., Jurić S., Nutrizio M., Belščak-Cvitanović A., Bušić A. (2014). The Potential of Agro-industrial Waste as a Source of Dietary Functional Components. U: Proceedings of the 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, (Frece, J., ur.) Baltazar d.o.o., Koprivnica, 36 – 41

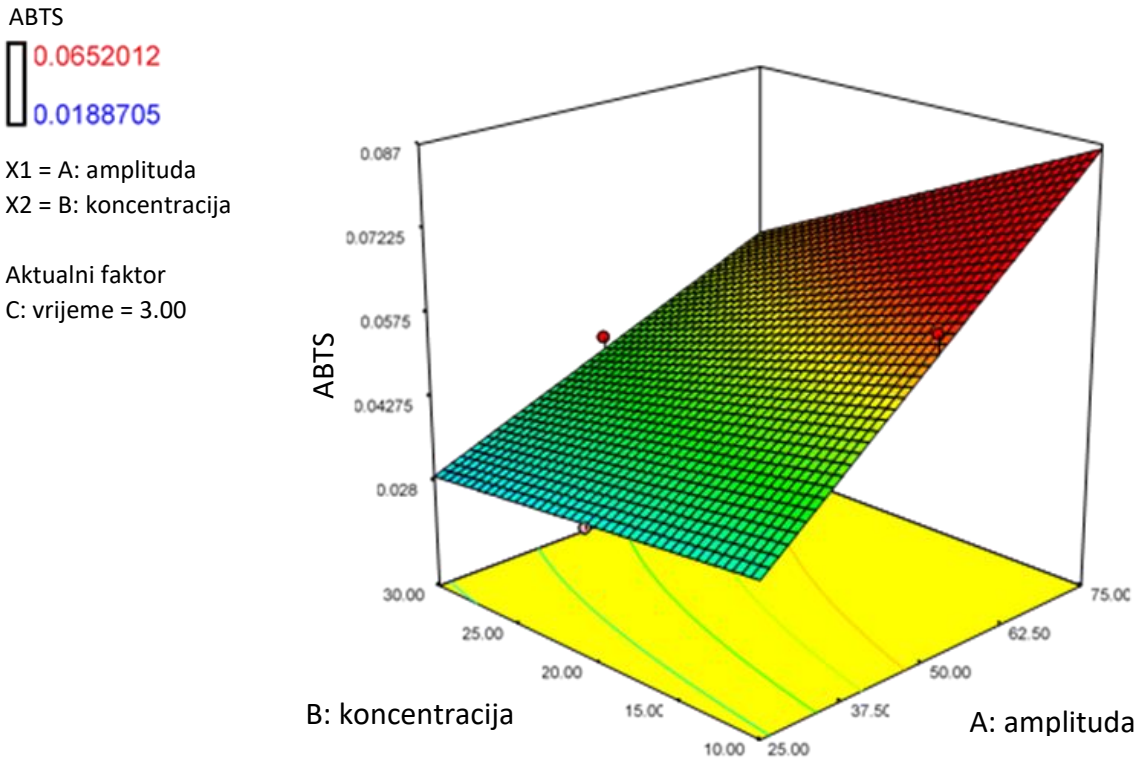
24. Zhu L., Ma J., Jia N., Zhao Y., Shen H. (2009). Chitosan-coated magnetic nanoparticles as carriers of 5-Fluorouracil: Preparation, characterization and cytotoxicity studies. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 68(1): 1 – 6

6. Prilog

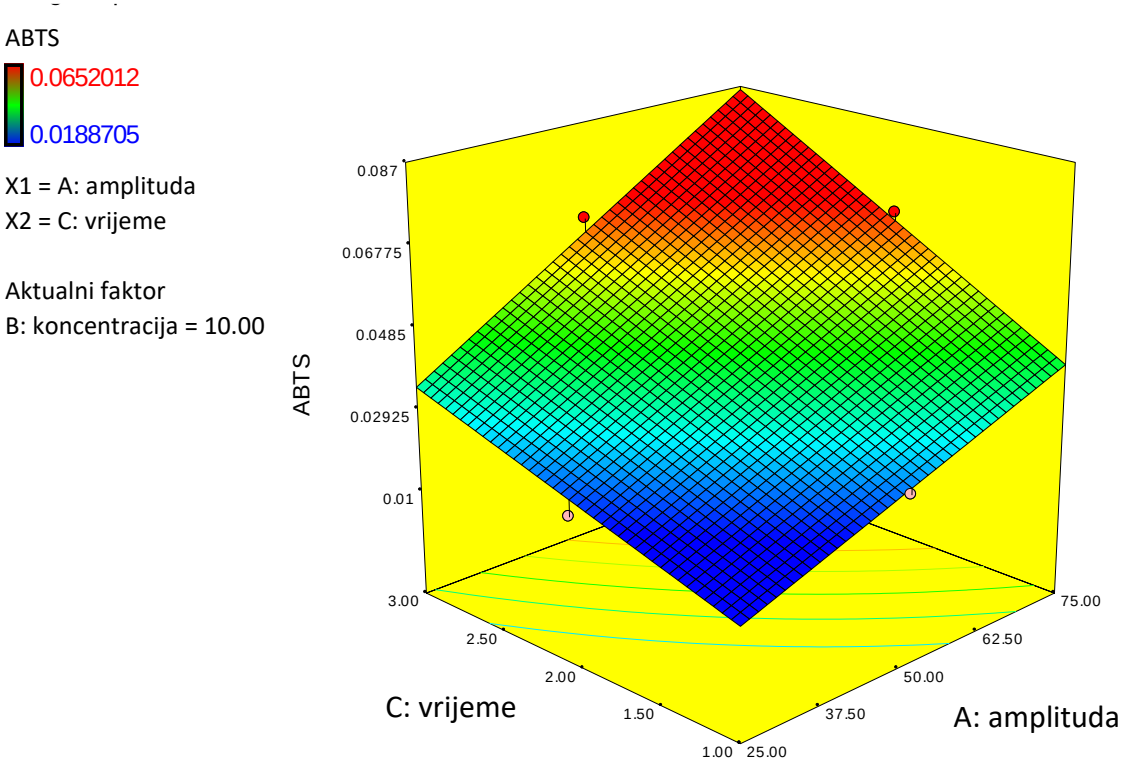
Tablica 6.1. Modeli dobiveni uz pomoć DesignExpert v7.0.0. programa

Odgovor	Izvor	Suma kvadrata	Stupanj slobode	Kvadrat srednje vrijednosti	F vrijednost	p-vrijednost (vjerojatnost > F)
TPC	2FI vs Linear	18,09	3	6,03	12,75	0,0009
ABTS	2FI vs Linear	3,264E-004	3	1,088E-004	6,33	0,0111
DPPH	2FI vs Linear	2,463E-004	3	8,210E-005	5,46	0,0175
Antocijani	2FI vs Linear	0,11	3	0,036	65,83	< 0,0001

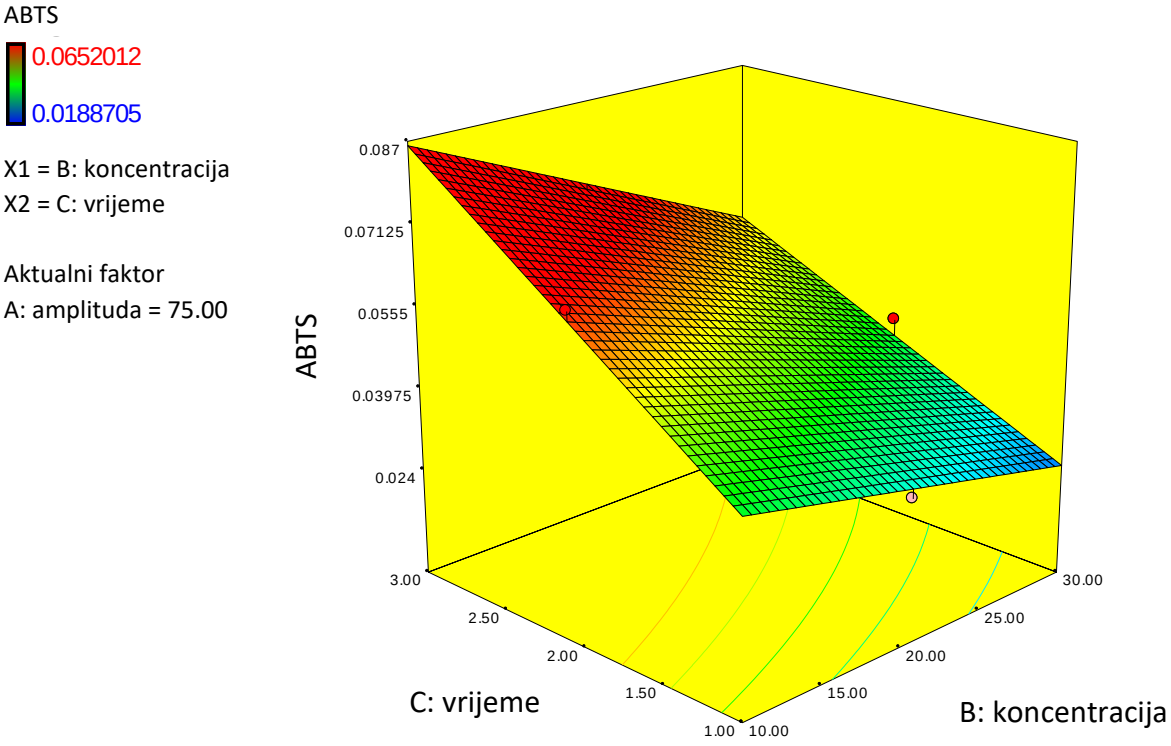
2FI- dvo-faktorska interakcija



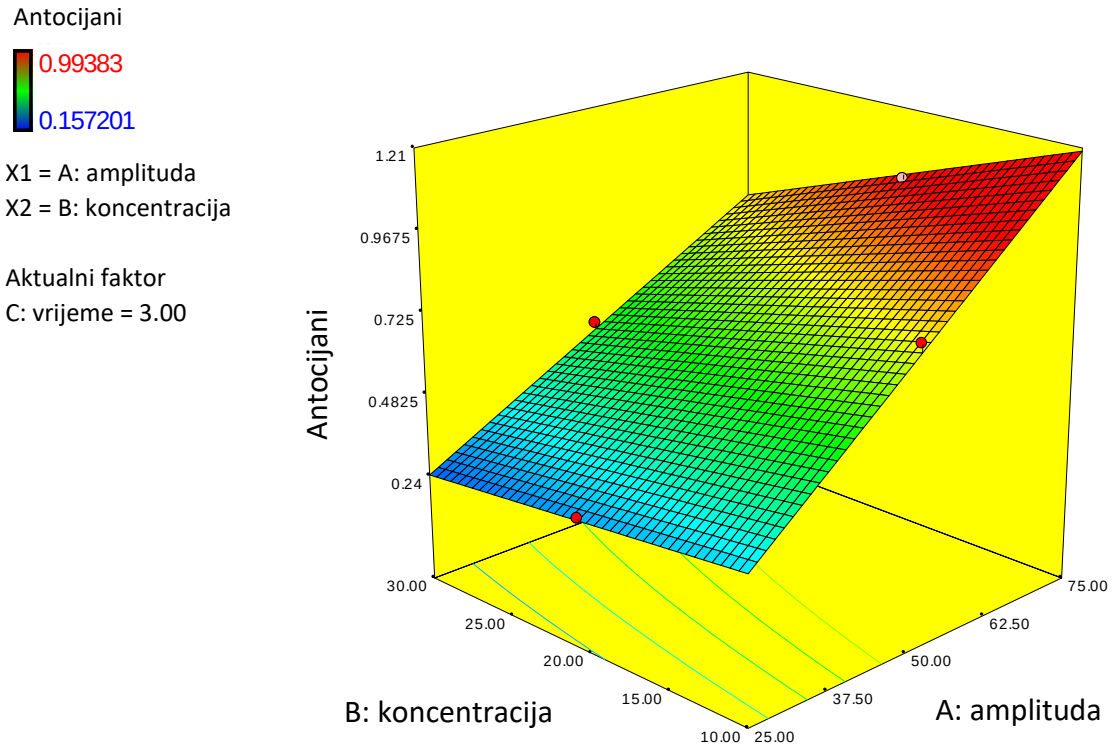
Grafikon 6.1. Promjena antioksidacijskog kapaciteta određivanog ABTS metodom u vremenu od 3 minute pri različitim koncentracijama i amplitudama



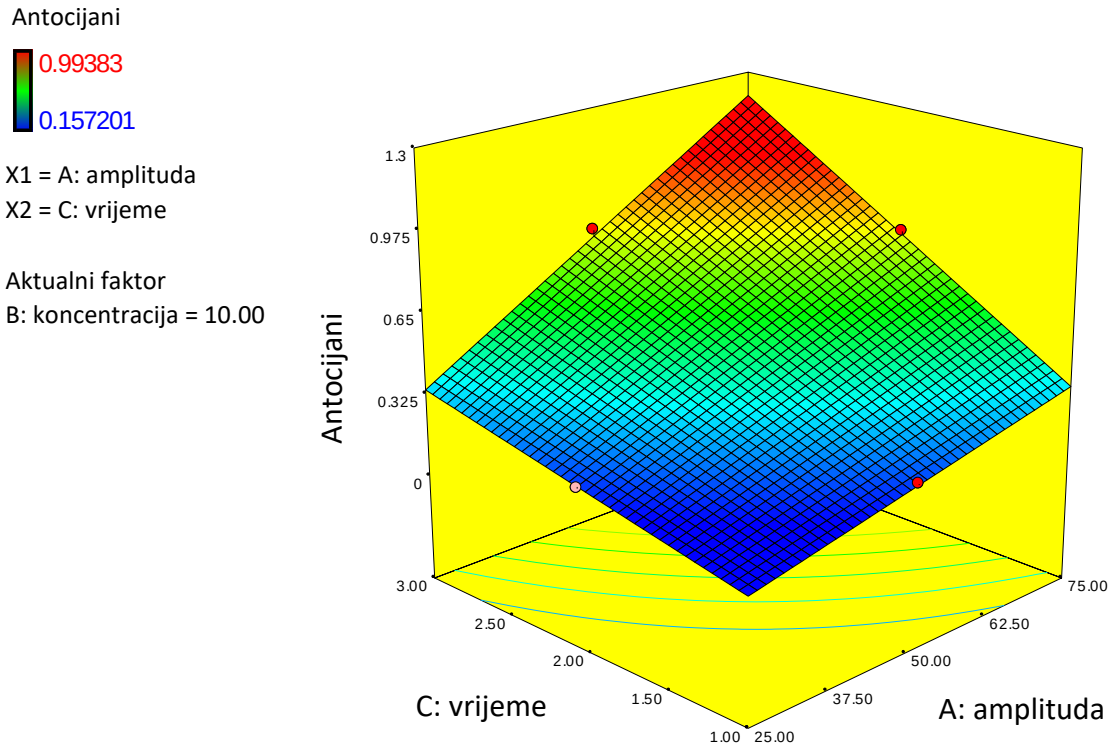
Grafikon 6.2. Promjena antioksidacijskog kapaciteta određivanog ABTS metodom pri koncentraciji od 10 g/L u različitom vremenu i amplitudama



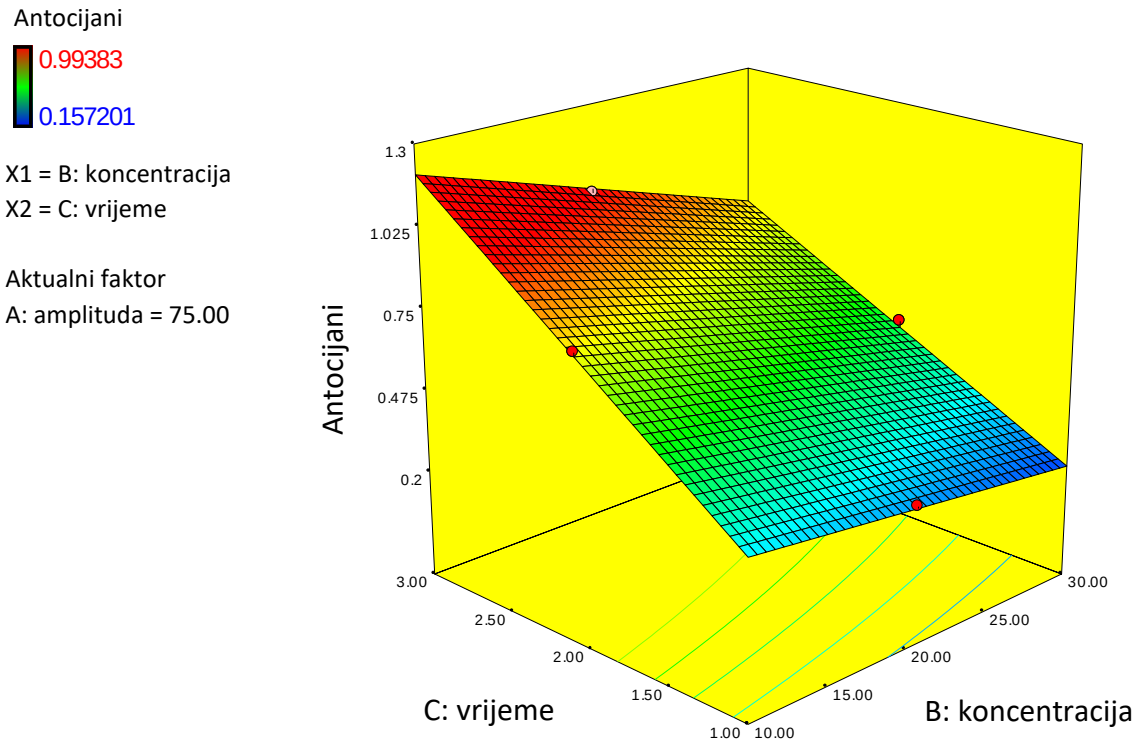
Grafikon 6.3. Promjena antioksidacijskog kapaciteta određivanog ABTS metodom pri amplitudi od 75% u različitom vremenu i pri različitim koncentracijama



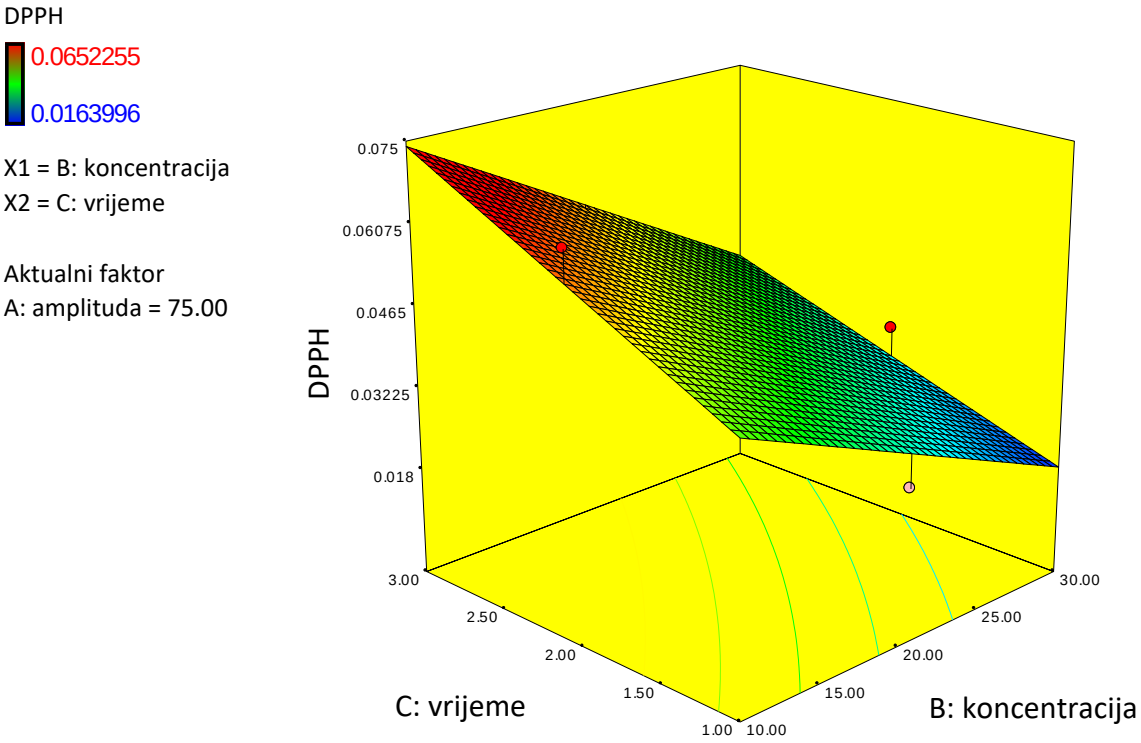
Grafikon 6.4. Promjena sadržaja antocijana u vremenu od 3 minute pri različitim koncentracijama i amplitudama



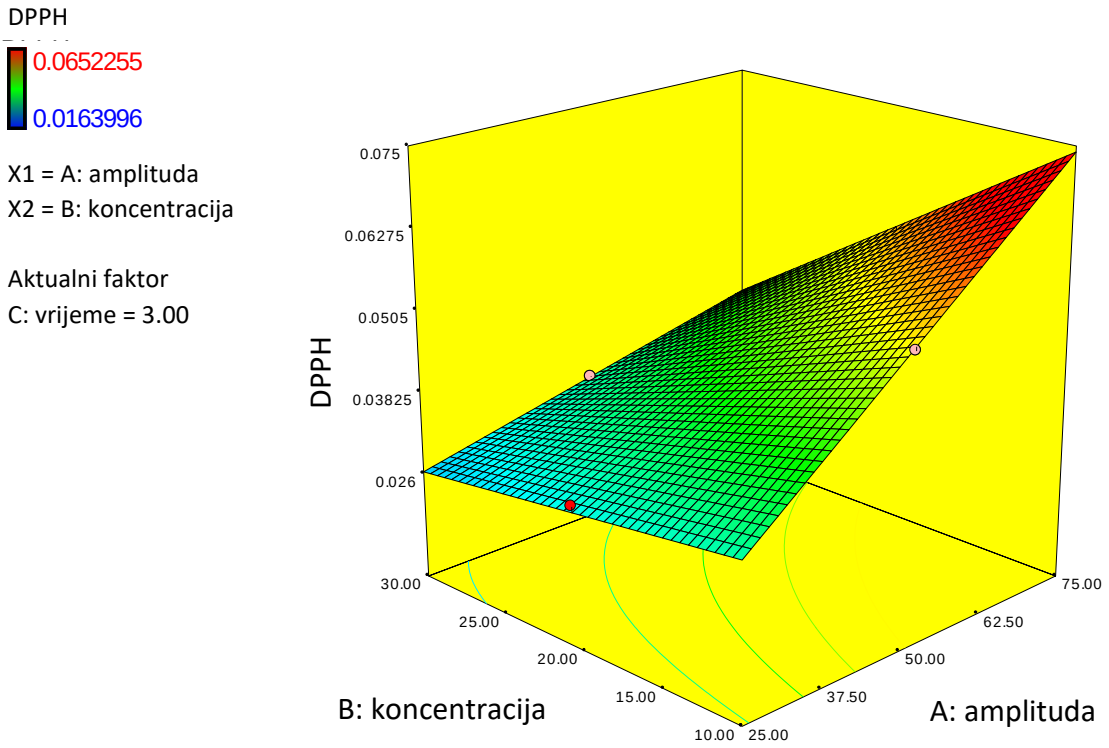
Grafikon 6.5. Promjena sadržaja antocijana pri koncentraciji uzorka od 10 g/L u različitom vremenu i amplitudama



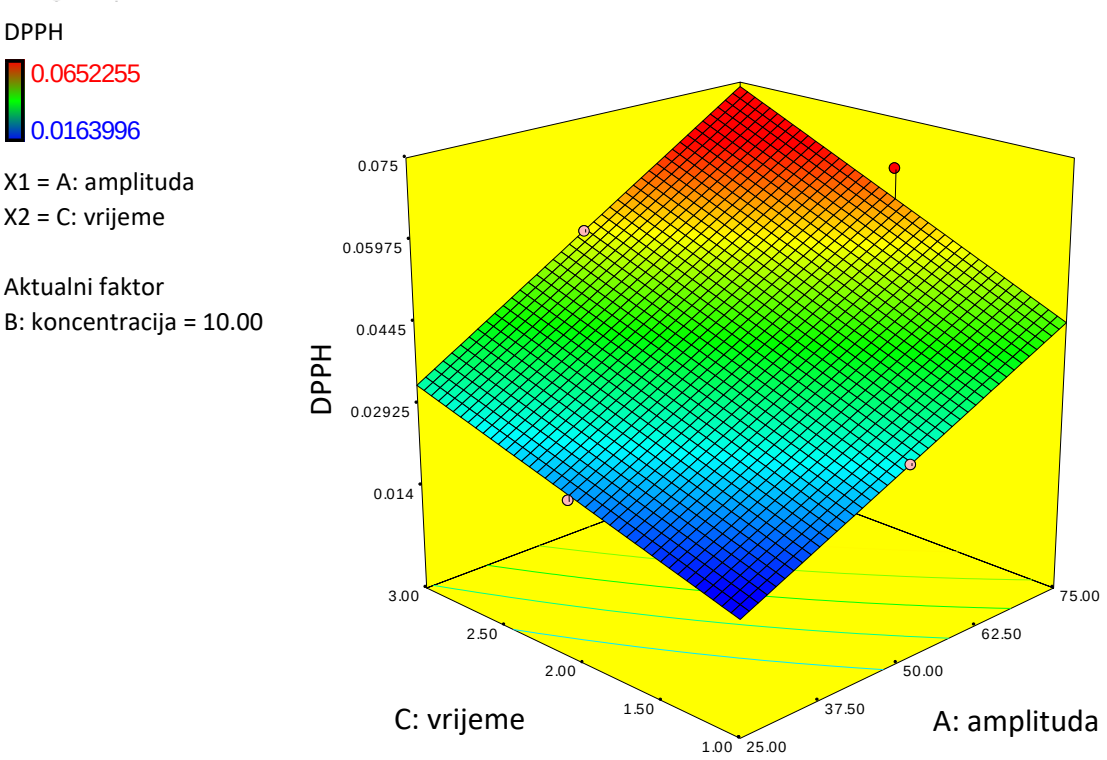
Grafikon 6.6. Promjena sadržaja antocijana pri amplitudi od 75% u različitom vremenu i pri različitim koncentracijama



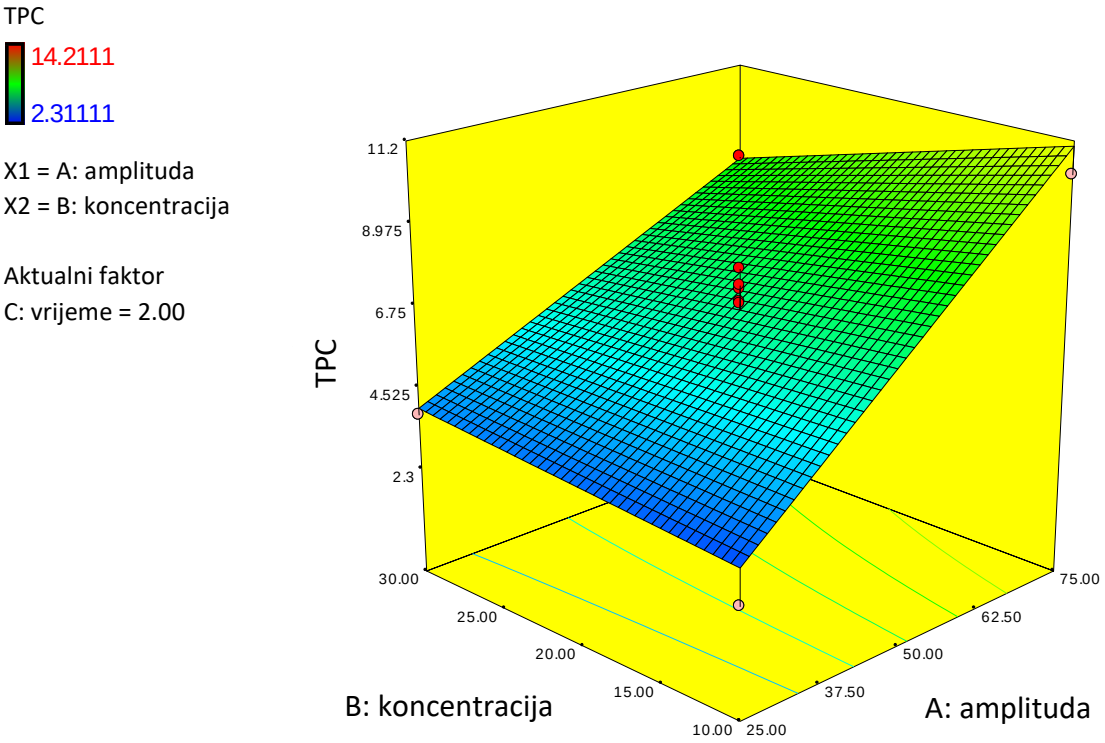
Grafikon 6.7. Promjena antioksidacijskog kapaciteta određivanog DPPH metodom pri amplitudi od 75% u različitom vremenu i pri različitim koncentracijama



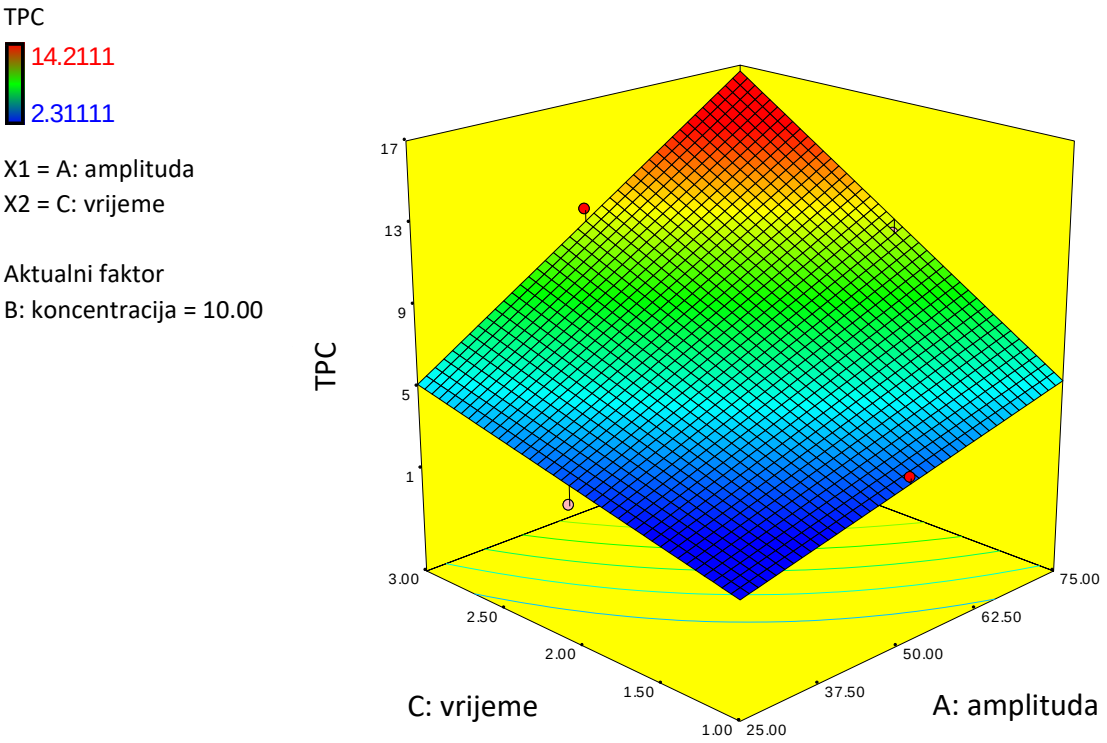
Grafikon 6.8. Promjena antioksidacijskog kapaciteta određivanog DPPH metodom u vremenu od 3 minute pri različitim koncentracijama i amplitudama



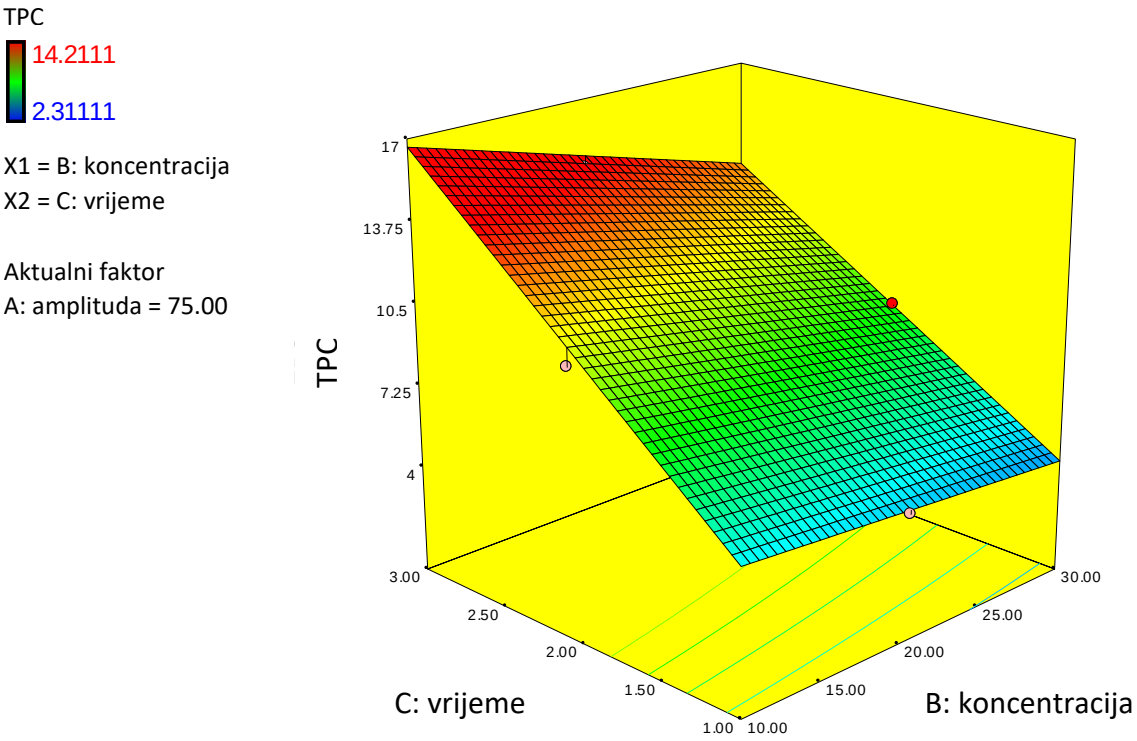
Grafikon 6.9. Promjena antioksidacijskog kapaciteta određivanog DPPH metodom pri koncentraciji od 10 g/L u različitom vremenu i amplitudama



Grafikon 6.10. Promjena udjela ukupnih polifenola u vremenu od 2 minute pri različitim koncentracijama i amplitudama



Grafikon 6.11. Promjerna udjela ukupnih polifenola pri koncentraciji od 10 g/L u različitom vremenu i amplitudama



Grafikon 6.12. Promjerna udjela ukupnih polifenola pri amplitudi od 75% u različitom vremenu i pri različitim koncentracijama

7. Životopis

Arijan Lončar rođen je 21. lipnja 1995. godine u Sisku. Osnovnu školu pohađao je od 2002. do 2010. godine, a gimnaziju od 2010. do 2014. godine u Sisku. Agronomski fakultet u Zagrebu upisao je 2014. godine. Završio je 2017. preddiplomski studij smjer Biljne znanosti.

Tijekom školovanja usvojio je dobra znanja engleskog i njemačkog jezika u govoru i pismu. Poznaje softver i rad na računalu.

2017. upisao je diplomski studij smjer Hortikultura-Voćarstvo.