УНИВЕРСИТЕТ ПО ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ

инж. ***Петко Недялков Денев***

Изследване на антиоксидантната активност на антоцианин-съдържащи плодове и функционални храни, получени от тях.

АВТОРЕФЕРАТ
на дисертация за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”

Научна специалност:

02.11.11 -Технология на биологично активните вещества

Научен ръководител:

доц. д-р Мария Георгиева Крачанова

Официални рецензенти:

проф. Албена Стоянова, дтн
проф. Фани Рибарова, дбн

***Пловдив*, 2011 г.**

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

TE	Trolox еквиваленти
GAE	еквиваленти галова киселина
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
HORAC	hydroxyl radical averting capacity
TRAP	total peroxyl radical averting capacity
Trolox	*6*-хидрокси-*2,5,7,8*-тетраметилхроман-*2*-карбоксилова киселина
TBARS	производни на тиобарбитурова киселина

ВЪВЕДЕНИЕ

В последните години все по-голямо значение се обръща на храната като източник на биологично активни вещества и средство за профилактика на болести. Поради тази причина познаването на храните и техните биологично активни компоненти е от особено важно значение. Интересът към една група биологично активни вещества – антиоксидантите непрекъснато нараства, не само от страна на широката публика, но и от лекари, химици, специалисти по хранене, технолози и др. В търсене на природни антиоксиданти плодовете, зеленчуците, зърнените храни и билките се явяват подходяща храна – източник на антиоксиданти. На фона на големия интерес към тези съединения в световен мащаб, данните за антиоксидантните свойства на българските суровини са непълни и оскъдни. Характеризирането на антиоксидантните свойства и компоненти на български плодове, зеленчуци и билки не само ще обогати знанието за състава и свойствата на суровините, растящи у нас, но и ще даде възможност да се разработят нови функционални храни, богати на естествени антиоксиданти. Предвид разнообразието на методи за определяне на антиоксидантна активност в литературата изборът на точен, надежден и биологично-приложим метод е особено необходим.

Антоцианин-съдържащите плодове заслужават по-задълбочено изследване, поради високото съдържание на биологично-активни вещества. Това е и причината голяма част от тези плодове да намират приложение в традиционната медицина и фитотерапията на различни заболявания. Чрез изследване на изменението на антиоксидантните свойства на плодовете по време на култивиране ще се обърне внимание на производителите към организиране на производство на плодове с високо съдържане на антиоксиданти. От друга страна проследяването на изменението на антиоксидантните свойства на плодовете по време на съхранение и технологична обработка ще доведе до създаване на нови подобрени технологии за функционални храни, богати на антиоксиданти. Оскъдната информация за антиоксидантната активност и съдържанието на антиоксиданти в български плодове, както и ограничения брой функционални храни на българския пазар доведоха до разработването на настоящата дисертация.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

С настоящото проучване си поставихме за цел да определим съдържанието на биологично-активни компоненти и антиоксидантната активност на антоцианин-съдържащи плодове, култивирани в България, с оглед използването им за получаване на функционални храни с висока антиоксидантна активност.

За постигане на тази цел си поставихме следните задачи:

1. **Избор на подходящ метод за определяне на антиоксидантна активност на растителни суровини.**
2. **Изследване на антиоксидантните свойства на български плодове: арония, къпина, червена боровинка, черна боровинка, бъз, ягода, малина, черен касис, вишна и дренка.**
3. **Характеризиране на посочените плодове по отношение съдържанието на флавоноиди (катехини, флавоноли и антоцианини), белтък, монозахариден състав, органични киселини, хранителни влакнини и минерален състав.**
4. **Изследване промените в съдържанието на биологично-активните компоненти на плодове от арония по време на зреене, съхранение и технологична преработка.**
5. **Създаване на лабораторни технологии за функционални храни, богати на естествени антиоксиданти.**
6. **Получаване на хранителни добавки, функционални и лечебни храни и изследване на техните антиоксидантни свойства. Приложение на получените функционални храни в храненето и медицината.**

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Растителни суровини: Използвани са 25 плодови суровини, от които 11 са антоцианин-съдържащи плодове, култивирани в България.

2. Препаративни методи

Използвани са следните препаративни методи за обработка и съхранение на растителни суровини: соло замразяване, блок замразяване, лиофилизация, сушене при стайна температура и сушене при 60ºС:

Екстракция на полифенолни съединения: Суровината се хомогенизира в лабораторен хомогенизатор, след което 2g от получената маса се екстахират двукратно с 80% ацетон в 0.5% CH_3COOH при хидромодул 10 в продължение на 1h при непрекъснато разбъркване на магнитна бъркачка.Получените екстракти се използват за анализиране на антиоксидантна активност, съдържание на общи полифенолни съединения, съдържание на антоцианини и HPLC определяне на индивидуални полифенолни съединения.

Получаване на водни екстракти: Приблизително 100 g плодове се хомогенизират с лабораторен блендер. 10 g се претеглят и се прехвърлят в колба със съответното количество вода и лимонена киселина. Екстракцията се извършва за 2h при зададената температура.

Екстракция на антоцианини за пречистване посредством твърдо фазна екстракция: 200 g от плодовата суровина се хомогенизира с лабораторен блендер. 50 g от получената маса се претеглят и се смесва със 150 ml 1% разтвор на лимонена киселина и екстрахира за 1h при 60°C.

Пречистване на антоцианини посредством твърдо-фазна екстракция: Твърдо-фазната екстракция е проведена на система SUPELCO VISIPER, свързана с вакуум помпа. Използвани са стъклени колони с обем 50 ml и пълнител Amberlite XAD7, предварително накиснат в дестилирана вода.

Получаване на алкохолно-неразтворима част (АНЧ) от суровината: АНЧ е получена съгласно процедурата, описана от Voragen et al., 1995.

Депротеинизиране на кръвна плазма**:** Депротеинизирането на кръвната плазма е извършено съгласно процедурата, описана от Prior et al., (2003).

2. Методи за анализ

Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC метод: Използван е модифициран метод на Ou et al., (2001).

Hyrdoxyl Radical Averting Capacity – HORAC метод: Използван е методът на Ou et al., (2002).

Total Peroxyl Radical Trapping Parameter: TRAP метод. Използваният метод е описан подробно от Čížová et al., (2004).

- Прехващане на NO: Капацитетът на дадена проба да улавя NO е измерена посредством система от три електрода както е описано от Hrbac et al. (2007).

Инхибиране на липидна пероксидация: Използван е методът, описан подробно от Slavíková et al., (1998).

Определяне на общо количество полифенолни вещества: Определянето се извършва по метода на Singleton & Rossi, (1965).

Определяне на общи антоцианини: Използван е pH-диференциален метод, описан от Lee, 2005.

Хроматографски методи:

Определяне на антоцианини: Използвана е HPLC система WATERS с UV детектор Waters 484, колона Bondapak C18, λ=520nm, елуент CH_3CN : 2%CH_3COOH (10:90), 0.5ml/min при 23ºC.

Определяне на флавоноли**:** Флавонолите се определят на HPLC система WATERS с UV детектор Waters 484, колона Bondapak C_{18}, λ=360nm, елуираща система CH_3OH : 0.01M лимонена киселина (52:48), 0.6ml/min при 22ºC.

Определяне на фенолни киселини**:** Използвана е хроматографска система WATERS с UV детектор Waters 484 и колона Bondapak C_{18}, елуент CH_3CN : 2%CH_3COOH (10:90), 0.8ml/min при 30ºC, λ=340nm.

Определяне на катехини**:** Катехин и епикатехин са определени на хроматографска система WATERS с UV детектор Waters 484 и колона Bondapak C_{18}. Като елуент е използвана система CH_3CN : 2%CH_3COOH (10:90), 0.5ml/min при 30ºC, λ=280nm.

Определяне на органични киселини**:** Използвана е HPLC-хроматографска система WATERS с UV детектор Waters 484 при дължина на вълната λ=215nm, колона Aminex HPX-87H (300 x 7.8mm), елуент 0.004M H_2SO_4 (0.5 ml/min) при 27ºC.

Определяне на монозахариден състав**:** Използване е HPLC-хроматографска система WATERS с рефрактометричен детектор Waters R401 и колона Aminex HPX – 87H column (300 x 7.8mm), елуент 0.004 mol/l H_2SO_4, скорост 0.5 ml/min при 23°C.

Определяне на имуностимулираща активност: Определянето на имуностимулираща активност се основава на принципа на имунната хемолиза, която се базира на колориметричното измерване на отделения хемоглобин от таргетни еритроцити по метода на Klerx et al., (1983).

Определяне на антимикробна активност. Определянето се извършва по метода на Cavanagh et al., 2003. Използвани са колекционни щамове от *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*, доставени от Национална банка за микроорганизми и клетъчни култури – София.

Определяне на минерален състав: За определяне съдържанието на микроелементи в суровините се прилага методиката описана в Bosscher et al. (2003).

Определяне на редуциращи захари: Използван е метода на Бертран (Люцканов и Иванова, 1985).

Определяне на белтък: Количеството белтък в суровините е определено по метода на Келдал (Люцканов и Иванова, 1985).

Определяне на хранителни влакнини: Използван е ензимно гравиметричен метод чрез ензимен кит BIOQUANT (Merck, Germany).

3. Статистическа обработка. Всички анализи са проведени най-малко в три повторности и резултати са представени като средна стойност. Достоверността на наблюдаваните разлики е определена посредством t-теста на Стюдънт. Корелационният коефициент на Пиърсън (r) е използван за изразяване на корелация между различни параметри. Статистическите величини са изчислени с програма SigmaPlot 2001.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Сравнение на различни методи за определяне на атиоксидантна активност на растителни суровини.

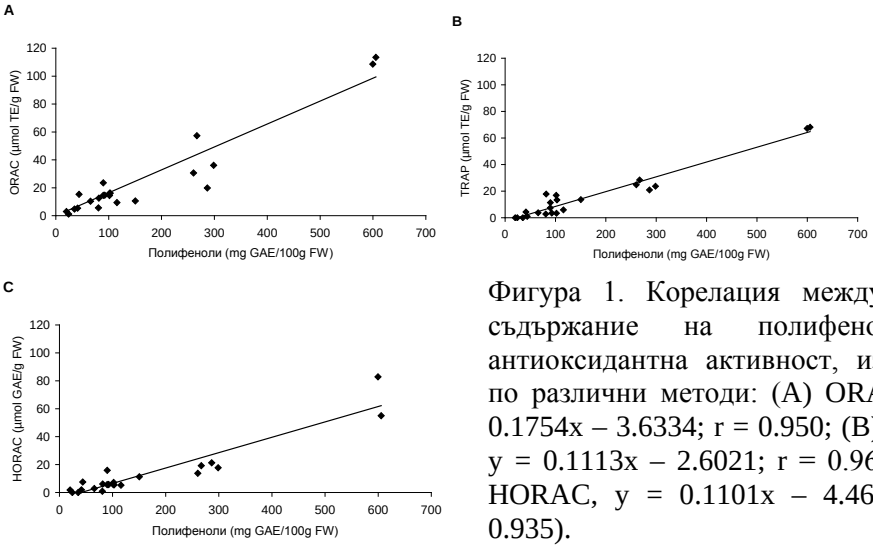
Първата стъпка от настоящото изследване бе избор на подходящ метод за определяне на антиоксидантна активност на растителни суровини. За сравнение на различните методи за определяне на антиоксидантна активност бяха използвани данните получени посредством три метода. TRAP, ORAC и HORAC при анализ на зеленчуци. Основният критерий при избор на използваните методи беше механизма им и тяхната биологична (физиологична) приложимост. В литературата са описани множество методи за определяне антиоксидантната активност на различни храни и биологични проби. Всеобщото разбиране е, че методите, базирани на трансфер на водороден атом (TBA), изразяват способността на даден антиоксидант да неутрализира пероксилни радикали по начин, по който това се извършва физиологически. От всички методи, базирани на TBA, TRAP и ORAC покриват повечето критерии за стандартизиране на метод за определяне на антиоксидантна активност. HORAC методът е показател за превантивното действие на антиоксидантите. Той отразява комплексообразуващите свойства на дадена проба в условията на реакция на Фентън и следователно способността да предпазва от образуване на хидроксилни радикали. Тъй като те са най-реактивоспособнита форма на кислорода, е от особено значение да се оцени способността на даден антиоксидант или проба да предотвратяват тяхното образуване. Резултатите от трите оценки, както и данни за полифенолното съдържание на суровините са представени в таблица 1.

Таблица 1. ORAC, TRAP и HORAC антиоксидантна активност и полифенолно съдържание на избрани зеленчуци.

Проба	ORAC, μmol TE /g	TRAP, μmol TE /g	HORAC, μmol GAE/g	Полифеноли, mg GAE/100g
Целина-листа	113.5	68.1	55.0	605.6
Магданоз	108.6	67.2	82.9	599.7
Девесил	57.3	28.4	19.2	267.0
Лютива чушка	36.1	23.7	17.7	298.6
Чорбаджийска чушка	30.6	24.8	13.7	260.5
Репичка	23.6	11.4	15.9	89.9
Гороглед	19.9	20.9	21.3	286.7
Патладжан	16.2	13.4	5.5	102.9
Броколи	16.1	3.4	7.2	102.1
Целина-корен	15.3	1.0	7.5	43.8
Зелен лук	14.7	3.5	5.7	92.7
Бамя	14.6	7.4	5.7	89.8
Зелен фасул	14.5	16.9	5.7	101.5
Червено цвекло	12.6	17.9	6.1	81.5
Копър	10.5	13.7	11.3	150.4
Картоф	10.3	3.8	2.9	65.5
Червена чушка	9.3	5.9	5.3	115.7
Зелена чушка	5.6	2.8	0.9	80.7
Домат	5.4	4.4	1.9	41.3
Морков	4.8	n.d.	n.d.	35.2
Тиквичка	2.9	n.d.	1.8	20.0
Краставица	1.2	n.d.	n.d.	24.2

n.d. – не е намерено

Установи се добра линейна зависимост между полифенолното съдържание и ORAC, TRAP и HORAC стойностите с коефициент на корелация, съответно r = 0.95, r = 0.97 и r = 0.94 (Фигура 1). В сложни смеси от антиоксиданти, каквито са растителните екстракти, в които присъстват множество индивидуални полифенолни съединения, може да се очаква несъответствие между тяхното съдържание и антиоксидантните свойства. Въпреки това резултатите недвусмислено показаха, че ORAC, TRAP и HORAC стойностите на изследваните суровини са силно зависими от полифенолното съдържание (съответно r = 0.95, r = 0.97 и r = 0.94).



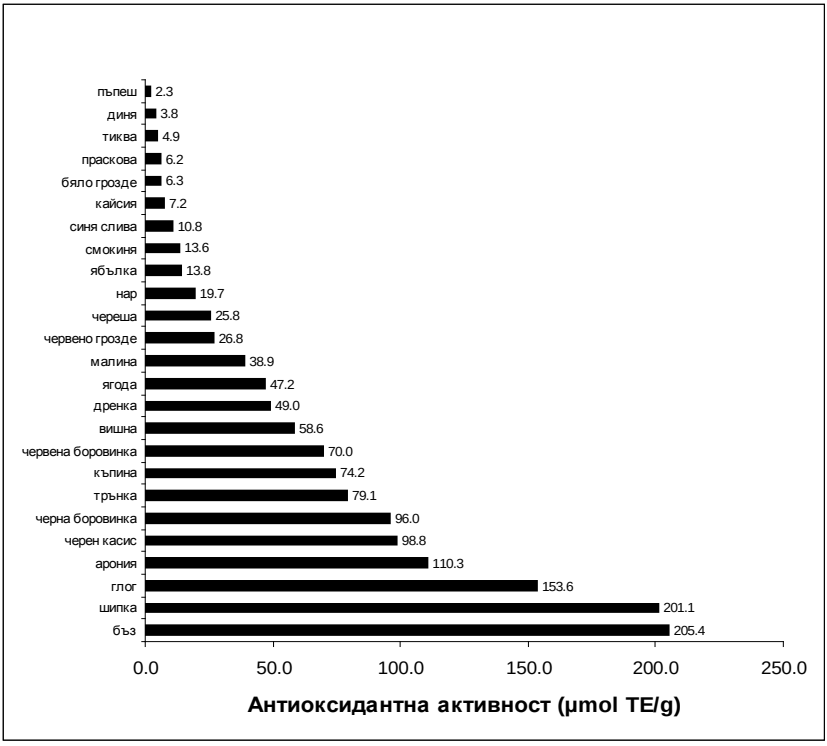
Фигура 1. Корелация между общо съдържание на полифеноли и антиоксидантна активност, измерена по различни методи: (A) ORAC, y = 0.1754x – 3.6334; r = 0.950; (B) TRAP, y = 0.1113x – 2.6021; r = 0.969 и (C) HORAC, y = 0.1101x – 4.4667; r = 0.935).

В нашето изследване посредством TRAP метода бе невъзможно да определим антиоксидантна активност в проби, в които количеството на полифенолните съединения е по-малко от 35 mg/100 g свежа суровина. ORAC методът се оказа по-чувствителен и отрази антиоксидантните свойства дори на проби с минимално количество полифенолни съединения. Основното предимство на метода е, че той съчетава едновременно времето на инхибиране на реакцията и процента на инхибиране, поради това че окислението на флуоресцеина протича докрай и за количествена оценка на антиоксидантната активност се използва площта под затихващата крива на флуоресценция, т.е отчита се индивидуалната кинетика на всяка проба.

В заключение може да отбележим, че предвид високата чувствителност на ORAC метода и неговите характерни особености е препоръчително той да бъде използван за измерване на антиоксидантно действие срещу пероксилни радикали по механизма на ТВА. ORAC методът и определянето на полифенолни съединения чрез метода на Фолин–Чиокалтеу дават една добра оценка на антиоксидантните свойства на изследваните храни. Все пак за една по задълбочена и детайлна оценка е препоръчително да се използват повече от един метод за определяне на антиоксидантна активност, което съвпада с мнението на други автори.

2. Определяне на антиоксидантна активност на български плодове.

Посредством ORAC бяха изследвани антиоксидантните свойства на 25 плода (фиг. 2). От изследваните плодове, тези на бъза се характеризират с най-висока антиоксидантна активност – 205.4 μmol TE/g, следвани от шипката с 201.1 μmol TE/g, глога и аронията. С най-ниски антиоксидантни свойства се характеризират тиквата, пъпеша и динята. Резултатите са представени на база свежа суровина.



Фиг. 2 ORAC антиоксидантна активност на български плодове.

От изследваните суровини една група плодове се характеризираше с по-висока антиоксидантна активност и по-високо полифенолно съдържание от останалите плодове. Единадесет от първите 13 плода с най-висока антиоксидантна активност, са плодове с високо съдържание на антоцианини. Това провокира нашия интерес да проведем по-задълбочени изследвания с тях с оглед на получаване на функционални храни, богати на естествени антиоксиданти.

3. Химична характеристика на антоцианин-съдържащи плодове.

3.1 Определяне на антоцианини, флавоноли, катехини и полифенолни киселини.

В таблица 2 са представени данните за съдържанието на общото количество антоцианини, флавоноли, катехини и полифенолни киселини в изследваните плодове, определени посредством HPLC.

Таблица 2. Съдържание на антоцианини, флавоноли, катехини и полифенолни киселини в свежи плодове [a]

	Антоцианни, mg/100g	Флавоноли, mg/100g	Катехини, mg/100g	Полифенолни киселини, mg/100g	Общо полифеноли, mg/100g	ORAC, μmolTE/g
Арония	397.96	0.52	684.90	411.53	1494.91	110.3
Вишна	213.18	4.55	424.11	229.97	871.81	58.6
Дренка	121.23	3.33	21.25	61.90	207.71	49.0
Касис	520.26	0.08	505.56	216.73	1242.63	98.8
Къпина	276.83	2.83	68.53	150.09	498.28	74.2
Малина	146.95	-	169.56	158.63	475.14	38.9
Червена боровинка	83.96	78.42	323.23	207.70	693.31	70.0
Черен бъз	1066.96	0.94	126.69	572.68	1767.27	205.4
Черна боровинка	264.17	0.46	450.14	194.70	909.47	96.0
Ягода	125.37	-	96.25	149.47	371.09	47.2

[a] Посочените количества представляват сбор от количествата на индивидуалните представители.

Интересът към определянето на тези вещества бе провокиран от наличната информация за тяхната роля при превенция и лечение на различни заболявания. Установено е, че голяма част от тези ефекти се дължат на антиоксидантното действие на полифенолите. Интересно бе да се изследва връзката между антиоксидантната активност на суровините и съдържанието на индивидуални полифенолни съединения в тях. В литературата има множество съобщения за съдържанието на индивидуални полифенолни компоненти в различни храни, но за български суровини тези данни са оскъдни. Публикуваните резултати се различават значително, което може да се обясни с различия в използваните суровини, условията, при които са култивирани, пробоподготовката и т.н. Установено е, че натрупването на флавоноиди в растенията зависи от редица фактори като: сорт, сезон, климатични особености, наторяване, растителна защита,

експозицията на светлина и особено на ултравиолетови лъчи. Това определя необходимостта от изследване на български суровини, култивирани при нашите климатични особености, още повече, че част от тях са диворастящи, т.е култивирани при органични условия. Познаването на полифенолния състав на тези суровини ще даде възможност за по-задълбочена преценка на техните качества, за разработване на нови технологични производства и обмяна на данни на национално и международно ниво.

Изследваните от нас плодове съдържат различни количества антоцианини – от 83.96 до 1066.96 mg/100g свежа суровина. Най-високо е тяхното съдържание в черния бъз – 1066.96 mg/100g, следван от касиса 520.26 mg/100g и аронията 397.96 mg/100g. Флавонолите присъстват в сравнително голямо количество – 78.42 mg/100g в червената боровинка. Тяхното количество в останалите суровини е незначително (от 0.08 до 4.55 mg/100g свежа суровина). Съдържанието на катехини в изследваните суровини е значително като в арония, вишна и червена боровинка, то е по-високо от съдържанието на антоцианини. Най-високо е тяхното количество при аронията – 684.90 mg/100g, следват касиса и червената боровинка, а най-ниско е при дренката. Изследваните плодове се характеризират с високо съдържание на полифенолни киселини. Тяхното количество е най-високо при черния бъз – 572.68 mg/100g, следван от аронията – 411.53 mg, вишната – 229.97 mg и касиса – 216.73 mg/100g, а най-ниско в дренката – 61.90 mg/100g. Общото количество полифенолни компоненти в плодовите суровини, определени посредством HPLC, е най-високо при плодовете на черния бъз 1767.27 mg/100g, аронията 1494.91 mg/100g и касиса 1242.63 mg/100g, а най-ниско при дренката 207.71 mg/100g. От таблица 2 е видно, че съществува корелация между съдържанието на полифенолни компоненти и антиоксидантната активност на изследваните суровини. Плодовете на бъза, които се характеризират с най-висока антиоксиданта активност, се отличават и с най-високо количество антоцианини и полифенолни киселини. Плодовете на аронията, които се характеризират с втората най-висока антиоксидантна активност от 110.3 μmol TE/g, съдържат най-голямо количество катехини, на второ място са по общо съдържание на полифенолни компоненти и полифенолни киселини. Антиоксидантната активност на касиса е 98.8 μmol TE/g и е в добра корелация със съдържанието на антоцианини, катехини и общо съдържание на полифенолни компоненти.

3.1.1. Определяне на индивидуални антоцианини.

Плодовете съдържат различно количество антоцианини (таблица 3). Качественият им състав също се различава в изследваните суровини.

Гликозидите на цианидина (3-галактозид, 3-глюкозид, 3-арабинозид и 3,5-диглюкозид) доминират във всички суровини и са единствени при аронията, вишната, къпината, малината и черния бъз. Черната боровинка е единствената суровина, в която е открит малвидин. В нейните плодове количество на делфинидина, пеларгонидина и малвидина е близко до количеството на цианидина.

Таблица 3. Състав и количество на антоцианини в свежи плодове

Суровина	Цианидинови гликозиди, mg/100g			Гликозиди на Делфинидин, mg/100g	Гликозиди на Пеларгонидин, mg/100g	Гликозиди на Малвидин, mg/100g
	Cy-3-Glc Cy-3-Gal	Cy-3-Arab	Cy-3,5-di-Glc			
Арония	169.39	185.71	42.86	-	-	-
Вишна	70.56	56.30	86.32	-	-	-
Дренка	66.53	11.09	8.32	22.18	13.12	-
Касис	255.29	-	40.62	224.35	-	-
Къпина	201.89	51.44	23.49	-	-	-
Малина	140.26	-	6.70	-	-	-
Червена боровинка	51.64	-	26.78	5.55	-	-
Черен бъз	732.42	168.26	166.28	-	-	-
Черна боровинка	125.54	-	-	118.36	5.02	15.24
Ягода	6.40	47.51	14.46	13.63	43.37	-

3.1.2.Определяне на флавоноли.

Съдържанието на флавоноли в плодовите суровини е представено в (Таблица 4).

Таблица 4. Съдържание на флавоноли в свежи плодове.

Суровина	Мирецетин, mg/100g	Кверцетин, mg/100g	Кемпферол, mg/100g
Арония	-	0.52	-
Вишна	3.30	0.27	0.98
Дренка	3.23	-	0.10
Касис	-	-	0.08
Къпина	2.41	0.43	-
Малина	-	-	-
Червена боровинка	78.42	-	-
Черен бъз	-	0.94	-
Черна боровинка	-	0.22	0.24
Ягода	-	-	-

С най-високо съдържание на кверцетин се отличават плодовете на черния бъз и аронията, съответно 0.94 mg/100g и 0.52 mg/100g свежа суровина. При аронията и черния бъз е открит само кверцетин. Единствено червената боровинка се отличава с относително по-високо съдържание на флавоноли, което се дължи изцяло на мирецитина.

3.1.3. Определяне на катехини.

Катехините са клас флавоноиди, които се отличават с високи антиоксидантни свойства и разнообразни терапевтични ефекти. Изследваните суровини се характеризират с относително по-високо съдържание на катехини (Таблица 5). Всички изследвани от нас суровини, с изключение на дренката и черния бъз, съдържат катехин и епикатехин. Аронията и касиса, които се характеризират с висока антиоксидантна активност, съдържат и най-големи количества катехини (катехин и епикатехин) съответно 684.90 mg/100g и 505.56 mg/100g свежа суровина.

Таблица 5. Съдържание на катехини в свежи плодове.

Суровина	Катехин, mg/100g	Епикатехин, mg/100g
Арония	154.29	530.61
Вишна	144.50	279.62
Дренка	-	21.25
Касис	66.53	439.03
Къпина	49.70	18.83
Малина	27.00	142.56
Червена боровинка	164.48	158.75
Черен бъз	126.69	-
Черна Боровинка	220.59	229.56
Ягода	54.32	41.93

3.1.4. Определяне на полифенолни киселини.

В таблица 6 е представен съставът и количеството на отделните полифенолни киселини в изследваните от нас плодове. В най-голямо количество присъства галовата киселина, следвана от елаговата, хлорогеновата и кафеената киселини. Количеството на галовата киселина е най-високо в черния бъз – 189.24 mg/100g, вишната – 171.33 mg/100g, червената боровинка – 138.09 mg/100g, малината – 114.30 mg/100g и аронията - 108.37 mg/100g. Около 33% от общото съдръжание на полифенолни киселини при плодовете на черния бъз и аронията се падат на елаговата киселина, която има доказано противораков ефект. В плодовете на

касиса също се установи високо съдържание на полифенолни киселини - галова, елагова, кафеена и хлорогенова киселини. Високото съдържание на полифенолни киселини в плодовете на черния бъз, аронията и касиса е един от факторите, с който може да се обясни тяхната високата антиоксидантна активност.

Таблица 6. Съдържание на полифенолни киселини в свежи плодове.

Суровина	Галова к-на, mg/100g	Хлорогенова к-на, mg/100g	Кафеена к-на, mg/100g	Кумарова к-на, mg/100g	Ферулова к-на, mg/100g	Елагова к-на, mg/100g	Сума mg/100g
Арония	108.37	73.47	45.51	-	9.08	135.10	371.53
Вишна	171.33	11.50	-	7.13	-	-	189.96
Дренка	14.78	5.17	1.94	-	-	-	21.89
Касис	74.85	11.57	24.56	-	-	65.76	176.74
Къпина	77.46	3.13	13.98	-	-	15.53	110.10
Малина	114.30	1.19	3.14	-	-	-	118.63
Червена боровинка	138.09	1.61	3.75	3.63	5.32	15.30	167.70
Черен бъз	189.24	118.77	33.85	-	0.39	190.43	532.68
Черна Боровинка	39.10	46.09	24.57	1.97	3.87	39.10	154.70
Ягода	82.62	6.40	-	14.05	-	6.40	109.47

3.2. Определяне на диетични влакнини, белтък, монозахариден състав и органични киселини.

Антоцианин-съдържащи плодове, показали най-висока антиоксидантна активност бяха охарактеризирани и по отношение на съдържание на хранителни влакнини, белтък, органични киселини и минерален състав. Тези компоненти нямат връзка с антиоксидантното действие на плодовете, но са от особено технологично значение при изработването на функционални храни и влияят върху техните органолептични свойства и физиологично въздействие.

3.2.1. Определяне на диетични влакнини.

Основните позитивни ефекти от приема на диетичните влакнини за здравето на човека са: лаксативен ефект, намаление на риска от рак на дебелото черво, намаление на холестерола в кръвта, регулиране на кръвната захар, активиране на имунната система и др. Поради тези биологични ефекти хранителните влакнини се дефинират като биологично активни

вещества. Количеството на хранителните влакнини в изследваните плодове варира от 1.48% във вишната до 8.35% при касиса и 8.10% при аронията. Резултатите са представени в таблица 7.

Таблица.7. Съдържание на хранителни влакнини и белтък в свежи плодове.

Суровина	Сухи вещества, %	Диетични влакнини, %	Белтък, %
Арония	28.97	8.10	0.90
Вишна	15.24	1.48	0.21
Дренка	23.03	2.83	0.76
Касис	20.68	8.35	0.29
Къпина	21.53	6.44	0.78
Малина	15.02	5.72	1.00
Червена боровинка	16.68	5.61	0.11
Черен бъз	21.12	5.42	0.29
Черна боровинка	13.63	4.56	1.09
Ягода	10.44	3.14	0.58

Изследваните плодови суровини се характеризират с ниско белтъчно съдържание, характерно за плодовете. С най-високо съдържание на белтък 1.09% са плодовете на черната боровинка, следвани от малината с 1.00%.

3.2.2 HPLC определяне на въглехидратен състав.

В таблица 8 са представени данните за въглехидратното съдържание на изследваните плодове. Сумарното количеството на въглехидратите варира от 6.50% при дренките до 24.9% при аронията. Сравнително ниско е то при касиса, малината и ягодата. За отбелязване е фактът, че всички изследвани плодове съдържат захароза и глюкоза наред с обичайната за плодовете фруктоза. При някои плодове (арония, вишна, малина и черна боровинка) съдържанието на фруктоза е под 40% от общото количество въглехидрати. Особен интерес заслужава фактът, че съдържанието на сорбитол в аронията е над 14% (60% от общите въглехидрати), във вишната 6.5% (40% от въглехидратите) и при черния бъз – 2.6% (около 22% от въглехидратите). Този факт може да послужи при създаване на плодови напитки, предназначени за диабетици без необходимост от добавяне на синтетични подсладители.

Таблица 8. Въглехидратен състав на избрани плодове.

Плодове	Сухи в-ва, %	Захароза, %	Глюкоза, %	Фруктоза, %	Сорбитол, %	Неидентифицирани захари, %		
						моно	ди	олиго
Арония	25.1	0.2	6.1	3.2	14.7	-	0.7	-
Вишна	15.7	0.2	5.4	3.8	6.5	-	-	-
Дренка	10.2	0.1	1.9	4.4	-	-	-	0.1
Касис	12.4	0.4	3.2	4.1	-	0.7	1.5	0.4
Къпина	13.0	-	4.4	5.8	-	-	0.2	-
Малина	11.3	0.3	2.8	3.0	-	-	1.0	0.3
Червена боровинка	14.8	0.5	6.0	6.4	2.6	-	-	-
Черен бъз	15.2	0.2	5.9	5.1	-	-	-	-
Черна боровинка	13.1	0.1	4.1	3.9	2.6	-	0.8	-
Ягода	8.7	0.1	2.5	3.4	0.6	-	0.4	0.4

3.2.3 Определяне на органичните киселини.

Природата и концентрацията на органичните киселини в плодовите суровини са от особен интерес, защото те влияят на органолептичните свойства на получените храни и напитки. Всяка суровина има свой уникален състав от органични киселини, който може да бъде използван за определяне на автентичността на техния сок. Наред с това те имат и важни биологично-активни свойства. В литературата се обръща внимание на лечебните свойства на янтърната и лимонената киселина наред с аскорбиновата киселина. Известно е също, че оксаловата и мравчената киселини проявяват силни антимикробни свойства. От таблица 9 е видно, че изследваните суровини се различават значително по количеството и състава на органичните киселини. Лимонената и аскорбиновата киселини доминират в процентно съотношение. Червената боровинка и черния касис са най-богати източници на органични киселини съответно с 1763.4 и 1580.1 mg%.

Таблица 9. Съдържание на органични киселини в свежи антоцианин-съдържащи плодове (mg/100g).

Суровина	Лимонена к-на	Аскорбинова к-на	Ябълчна к-на	Хинова к-на	Янтърна к-на	Шикимова к-на	Мравчена к-на	Оксалова к-на	Оцетна к-на	Сума mg/100g
Арония	189.8	81.6	136.7	-	-	34.7	-	-	-	442.9
Вишна	240.2	163.3	510.4	-	213.9	45.04	-	-	-	1172.9
Дренка	277.2	319.7	162.6	83.1	125.7	-	-	-	-	968.4
Касис	-	704.0	406.1	288.2	108.3	44.5	-	-	29.0	1580.1
Къпина	-	427.1	252.4	232.9	-	19.4	-	-	-	931.8
Малина	267.9	542.2	50.2	79.5	-	29.3	-	-	-	969.2
Червена боровинка	271.6	1159.0	177.9	-	66.9	22.9	65.0	-	-	1763.4
Черен бъз	-	239.5	-	473.1	296.9	-	-	56.8	-	1066.3
Черна боровинка	281.6	850.1	105.8	-	34.1	43.0	-	-	-	1314.5
Ягода	37.2	247.9	72.3	163.2	-	18.1	-	-	-	538.7

3.3. Определяне на минерален състав на изходните суровини

Определена е концентрацията на елементите Fe, Cu, Zn, Ca, Mg, Se, K, Na, Mn в изследваните плодове. Резултатите са показани в таблица 10. Касисът е с най-високо съдържание на 4 минерала – калий, калций, желязо и цинк. Къпините имат повече магнезий – 135.08 mg/kg в сравнение с останалите изследвани плодове и са на второ място по съдържание на манган, желязо и цинк. След касиса, аронията е вторият най-богат източник на калий и втори по съдържание на магнезий – 122.78 mg/kg свежа суровина след къпините. Също така ароniевите плодове са богати на калций – 37.03 mg/kg, желязо – 21.00 mg/kg и мед 0.68 mg/kg. Вишните съдържат най-много мед, а най-високо количество манган е открито в черните боровинки. Плодовете на бъза съдържат най-много натрий**.** От получените резултати е видно, че изследваните суровини са един много добър източник на минерали. Като се познава минералния състав на плодовете, при създаване на функционални плодови продукти – каши, сокове и др., може да се използват комбинация от плодове с цел осигуряване на необходимите дневни количества от различни минерали.

Таблица 10. Минерален състав на антоцианинови плодове.

Плод	Mn, mg/kg	Fe, mg/kg	Cu, mg/kg	Zn, mg/kg	K, mg/kg	Na, mg/kg	Ca, mg/kg	Mg, mg/kg	Se, mg/kg	Общо, mg/kg
Арония	7.43	21.00	0.68	1.45	2584.80	32.31	378.03	122.78	< 0.3	3148.48
Бъз	2.30	7.65	0.33	0.84	2333.86	42.09	241.04	101.39	< 0.3	2729.50
Вишна	3.38	14.65	0.87	0.72	1497.30	24.15	117.53	54.74	< 0.3	1713.34
Касис	6.22	34.71	0.67	1.87	3064.32	29.69	392.62	114.91	< 0.3	3645.01
Къпина	24.69	30.28	0.65	1.58	861.73	28.88	312.09	135.08	< 0.3	1394.98
Малина	2.64	5.69	0.35	1.26	975.84	22.77	91.49	65.06	< 0.3	1165.10
Черна боровинка	29.16	10.15	0.45	1.10	724.95	17.72	128.88	49.94	< 0.3	962.35
Ягода	6.78	18.97	0.37	1.00	758.80	16.80	170.73	77.24	< 0.3	1050.69

3.4. Определяне на имуностимулираща и антимикробна активност.

Като критерии за биологичната активност на изследваните плодове, освен тяхната антиоксидантна активност, бяха определени също имуностимулираща и антимикробна активности. Най-силно активиране на системата на комплемента по класическия и алтернативен път бе наблюдавано при касис, ягода, къпина и вишна. При касис, ягода и къпина, бе наблюдавано активиране на комплемента по класическия път. При другите продукти или не бе отчетен активиращ ефект или е бил по-слаб

(Таблица 11). Системата на комлемента е свързана с естествената резистентност на животните (в частност на човека) и се включва в най-ранните етапи на защита срещу бактериални инфекции. Това е важна възможност за профилактика на инфекциите, а от тук и средство за избягване на употребата на антибиотици и развитие на резистентност към антимикробните средства.

Таблица 11. Имуностимулираща активност на плодови сокове от антоцианин-съдържащи плодове.

Вид проба	АКТИВИРАНЕ НА КОМПЛЕМЕНТА ПО	
	КЛАСИЧЕСКИ ПЪТ, (% на инхибиране на хемолизата на сенсибилизирани овнешки еритроцити)	АЛТЕРНАТИВЕН ПЪТ, (% на инхибиране на хемолизата на заешки еритроцити)
Арония	21.3 ±1.9	0
Бъз	57.8±12.4	15.9 ±4.5
Вишна	52.1 ±8.5	61.6 ± 22.1
Дренки	54.6±14.6	0
Касис	89.1 ± 18.1	83.9 ± 29.5
Къпина	66.2 ± 21.2	75.7 ± 21.3
Малина	44.5 ± 12.7	45.3 ± 8.8
Червена боровинка	18.5±6.8	0
Черна боровинка	60.1 ±12.3	0
Ягода	66.7 ± 8.8	88.6 ± 24.8
Контрола-лентинан (1,25mg/ml)	46.2 ± 6.4	63.8 ± 11.9

Резултатите за антимикробната активност на плодовете са представени в таблица 12. Отчетен бе силен антибактериален ефект спрямо *Pseudomonas aeruginosa* на малина – 100% инхибиране при трите разреждания на пробата и на касис при разреждане 1:2 и 1:4. При другите микроорганизми антимикробният ефект е твърде слаб (само при разреждане 1:2) или липсва. Получените резултати са интересни от една страна с възможността за подобряване на качеството на прясно консумирани хранителни продукти, като се увеличава срокът на тяхната трайност поради антибактериалните качества на изследваните продукти. Тези качества са важни и за предотвратяване на инфекции, предавани по хранителен път.

Таблица 12. Антимикробна активност на сокове от антоцианин-съдържащи плодове.

Вид проба	Инхибиране на микроорганизмите, (%)								
	Staphylococcus aureus			*Pseudomonas aeruginosa*			*Candida albicans*		
разреждане	1:2	1:4	1:10	1:2	1:4	1:10	1:2	1:4	1:10
Арония	11	0	0	15	0	0	9	0	0
Боровинка	10	0	0	8	0	0	10	0	0
Вишна	0	0	0	7	0	0	10	0	0
Касис	13	0	0	100	100	20	15	0	0
Къпина	0	0	0	8	0	0	13	0	0
Малина	0	0	0	100	100	100	13	0	0
Ягода	0	0	0	11	0	0	10	0	0

4. Изследвания с плодовете на арония (*Aronia melanocarpa*).

От антоцианин-съдържащите плодове, аронията е все още малко познат плод в България. Поради стипчивия и горчив вкус плодовете на аронията се възприемат трудно при директна консумация, но са подходяща суровина за производство на плодови консерви и други функционални храни. Най-често се използват за плодови сокове и нектари и то в комбинация с други плодове (грозде, касис, ябълки и др.). Плодовете на аронията се използват в свеж, замразен и сух вид. От тях се приготвят сокове, нектари, конфитюри, сиропи, мармалади и вина. Фирма "ВИТАНЕА" ООД, Университетът по хранителни технологии – Пловдив и Лабораторията по биологично активни вещества при Института по органична химия с център по фитохимия към БАН създадоха продукти - плодови нектари и сиропи, на базата на свежи и замразени плодове арония. Предвид високата антиоксидантна активност, данните за лечебното действие на аронията и приложимостта, и при производство на функционални храни решихме да проведем по-задълбочени изследвания върху факторите, които оказват влияние на антиоксидантните компоненти на плодовете по време на култивиране и технологична преработка.

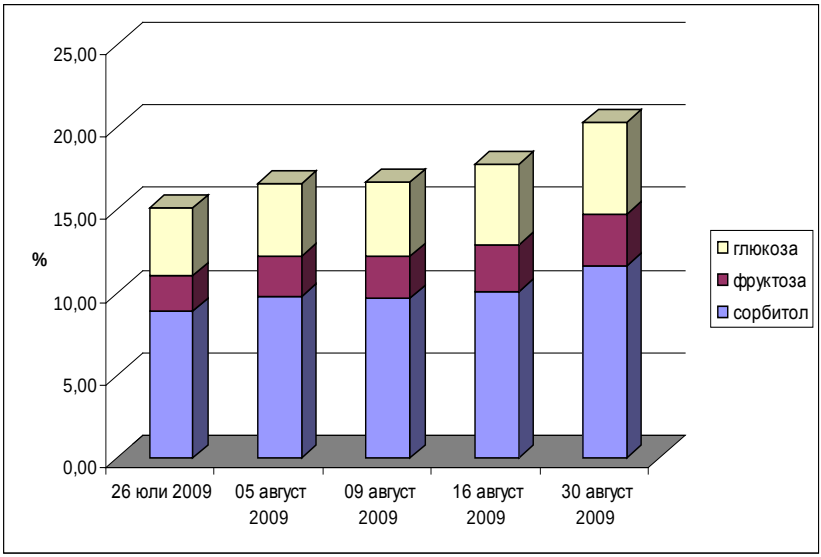
4.1. Влияние на степента на зрялост върху химичния състав и антиоксидантната активност на плодовете на арония.

Има редица данни, че химичният състав на плодовите суровини се променя по време на зреене. При производство на функционални храни е от особена важност използваните суровини да са с постоянно качество и

сходен химичен състав. Това провокира и нашия интерес да изследваме промените в химичния състав и антиоксидантните свойства на плодове на арония по време на узряване на плодовете. За тази цел организирахме събиране на пет партиди плодове от едни и същи храсти в продължение на 35 дни в периода 26 юли - 30 август 2009. След бране плодовете бяха замразени и съхранявани при -18ºС.

4.1.1. Влияние върху натрупването на първични метаболити (захари и органични киселини).

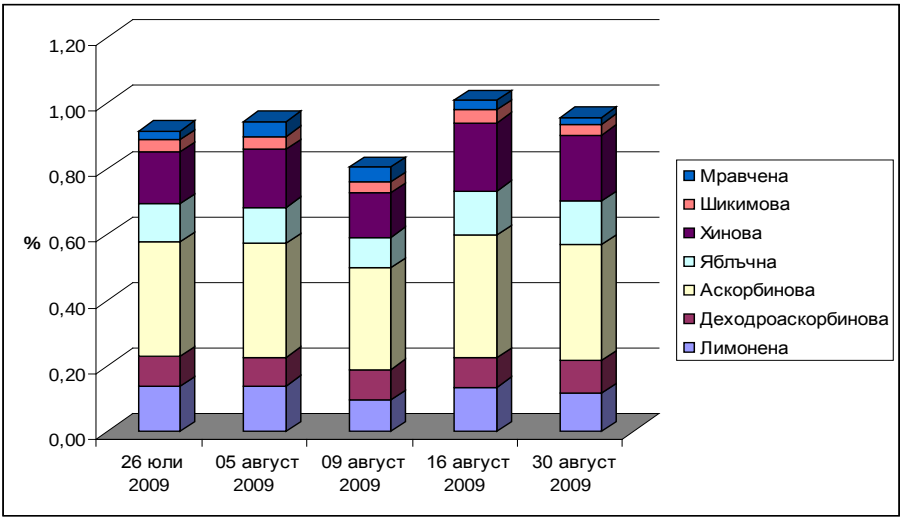
Захарите, които бяха открити в плодовете на аронията от всички партиди, бяха сорбитол, фруктоза и глюкоза. Беше наблюдавано постоянно повишаване на количествата на всички захари. Така сумарното количество от всички захари беше 15.12% в първата партида и нарасна до 20.34% в края на периода на зреене. Резултатите са изразени на база свежа суровина (Фигура 3).



Фиг. 3. Промяна в монозахаридния състав на арония по време на зреене.

Органичните киселини, които бяха открити в плодовете по време на зреене бяха: лимонена, дехидроаскорбинова, аскорбинова, ябълчна, хинова, шикимова и мравчена. Количеството на изследваните киселини се запази относително постоянно през целия период на наблюдение. Единствено при

партидата от 9 август бе наблюдавано статистически по-ниско количество органични киселини (Фигура 4).



Фиг. 4. Промяна в количеството органични киселини в плодове на арония по време на зреене.

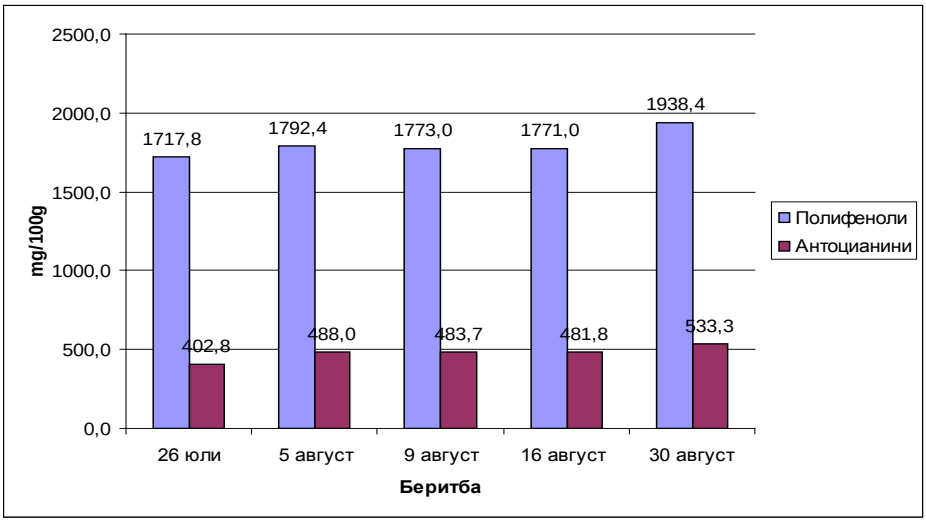
В таблица 13 са представени данни за изменението на сухите вещества на плодовете по време на зреене. Прави впечатление, че сухите вещества, измерени тегловно нарастват през целия период на зреене. При разтворимите сухи вещества, измерени рефрактометрично, бе наблюдавано едно изключение от тенденцията на нарастване. Отново при партида 3 (беритба - 9 август 2009) бе наблюдавано по-ниско количество киселини в сравнение с предходната партида.

Таблица 13. Промяна в сухите вещества на плодовете на плодове на арония по време на зреене.

Беритба	Сухи в-ва тегловно, %	Сухи в-ва рефрактометрично		Неразтворим остатък, g	Тегло на един плод, g
		Сок, %	Плод, %		
26 юли 2009	23.1	17.5	15.5	7.60	1.09
5 август 2009	24.2	19.5	16.95	7.25	1.20
9 август 2009	24.2	18.2	18.5	5.70	1.25
16 август 2009	24.7	21	19.5	5.20	1.16
30 август 2009	28.7	23.5	20.65	8.05	1.16

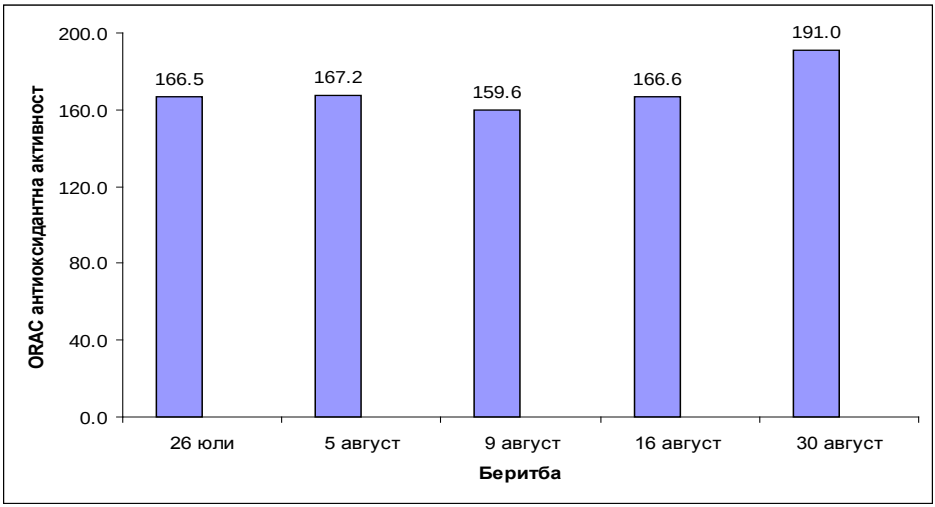
4.1.2 Влияние върху натрупването на вторични метаболити (антоцианини и полифеноли) и върху антиоксидантната активност на изследваните проби.

По подобие на промяната на захарите и органичните киселини в плодовете, проследихме и промяната в натрупването на антоцианини и полифеноли, и съответно промените в антиоксидантната активност през периода. Първоначалното количество на полифенолите и антоцианините в плодовете бе съответно 1717.8 и 402.8 mg/100g свежа суровина. При партиди 2, 3 и 4 количествата антоцианини и полифеноли не претърпяха статистически значими различия. В края на наблюдавания период измерените количества нараснаха до 1938.4 и 533.3 mg/100g, което представлява съответно 12.8% и 32% увеличение спрямо първата партида (Фигура 5). За отбелязване е и факта, че засушаването на плодовете не е съпроводено с деградация на антоцианините и полифенолните съединения.



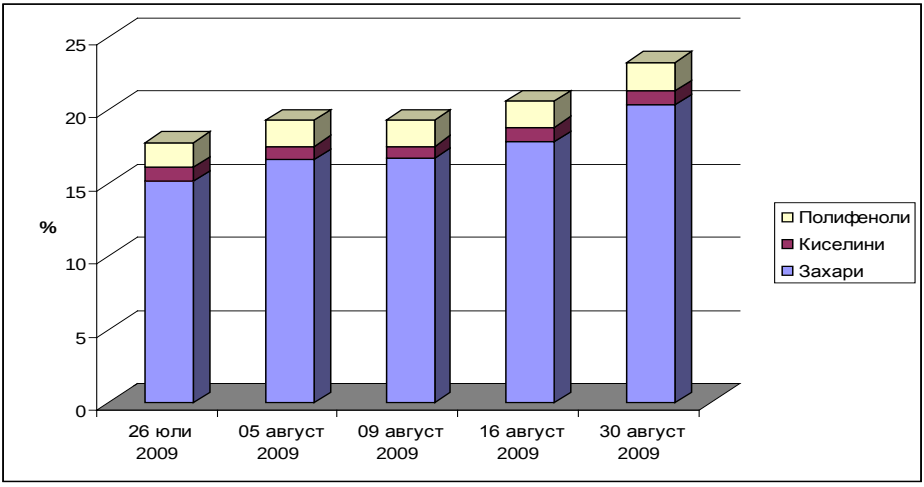
Фиг. 5. Промяна в количеството на полифенолните компоненти и антоцианините в плодове на арония по време на зреене.

На фигура 6 е представено изменението на ORAC антиоксидантната активност на плодовете по време на зреене. Изменението на антиоксидантната активност следва същата тенденция както при полифенолните съединения. Нарастването в ORAC стойностите, измерени за първата и последната партида е 14.7%



Фиг. 6 Промяна в ORAC антиоксидантната активност на плодове на арония по време на зреене.

На фигура 7 е представено сумарното изменение в химичния състав на плодовете по време на зреене, като е отразено изменението на захари, органични киселини и полифенолни съединения.



Фиг. 7. Промяна в химичния състав на арония по време на зреене.

В заключение можем да обобщим, че сухите вещества са удобен параметър за следене зрелостта на плодове от арония. От направеното

изследване е видно, че антоцианините, полифенолните компоненти и антиоксидантната активност не намаляват със зреенето на плодовете. В партидата със сухи вещества на плодовия сок – 23.5% бе наблюдавано най-високо количество от анализираните вещества. Това изследване заедно с предишни наши наблюдения ни насочиха да приемем 23-25% сухи вещества на сока като показател за оптимална технологична зрелост на плодовете. Такива плодове съчетават в себе си високо съдържание на сухи вещества и оптимално съдържание на антоцианини, полифеноли и антиоксидантна активност като критерий за тяхната биологична активност.

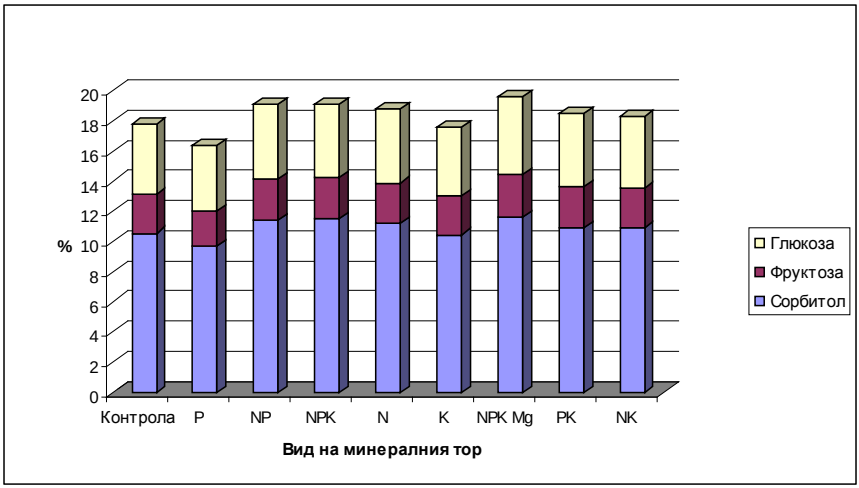
4.2. Влияние на наторяването с различни минерални торове върху химичния състав и антиоксидантната активност на плодове на арония.

Друг фактор, който може да повлияе химичния състав на плодовете е наторяването. Това провокира и нашия интерес да изследваме ефектът от наторяването с различни минерални торове върху химичния състав и антиоксидантната активност на плодовете. Бяха използвани 8 различни тора и една контрола, която не бе наторявана.

4.2.1. Влияние върху натрупването на първични метаболити (захари и органични киселини).

На фигура 8 са представени данните за съдържанието на захари (глюкоза, фруктоза и сорбитол) в плодове от арония, определени посредством HPLC.

От резултатите е видно, че в зависимост от използвания тор се наблюдават различия в съдържанието на захари. При всички проби, освен проби P и K, е налице повишаване в количеството на всички изследвани захари спрямо контролата. С най-високо съдържание на глюкоза (51.74 mg/g), фруктоза (28.84 mg/g) и сорбитол (115.86 mg/g) се характеризира проба NPK Mg. Общото количество натрупани захари при тази проба – 196.44 mg/g е с 10.22% по-високо от захарите при контролната проба. На второ място е проба NPK с общо количество захари 191.49 mg/g, а на трето проба NP със 190.77 mg/g захари.



Фиг. 8. Влияние на наторяването с различни минерални торове върху монозахаридния състав на плодове на арония.

В таблица 14 са представени данните за съдържанието на органични киселини в изследваните проби. По подобие на натрупването на захари, във всички проби, освен проба P се наблюдава по-високо общо количество киселини от контролата. Всички изследвани киселини са открити в най-високи количества в проба N, която е и с най-високо общо съдържание на органични киселини -11.09 mg/g, следвана от проба NPK – 9.42 mg/g.

Таблица 14. Влияние на наторяването с различни минерални торове върху съдържанието на органични киселини в плодове на арония.

Проба	Лимонена, mg/g	Дехидроаскорбинова, mg/g	Аскорбинова, mg/g	Ябълчна, mg/g	Хинова, mg/g	Шикимова, mg/g	Мравчена, mg/g	Общо mg/g
Контрола	0.82	1.05	2.44	1.65	1.40	0.36	0.17	7.90
P	0.81	0.98	2.11	1.84	1.33	0.30	0.13	7.50
NP	0.90	1.10	2.52	1.89	1.56	0.39	0.17	8.53
NPK	0.98	1.11	2.58	2.13	1.90	0.44	0.28	9.42
N	1.00	1.33	2.91	2.59	2.33	0.54	0.38	11.09
K	0.75	1.22	2.44	1.87	1.48	0.37	0.09	8.21
NPK Mg	0.79	0.95	2.32	1.71	1.74	0.35	0.21	8.06
PK	0.77	0.98	2.35	1.99	1.79	0.39	0.25	8.52
NK	0.80	0.91	2.39	1.83	1.75	0.39	0.34	8.42

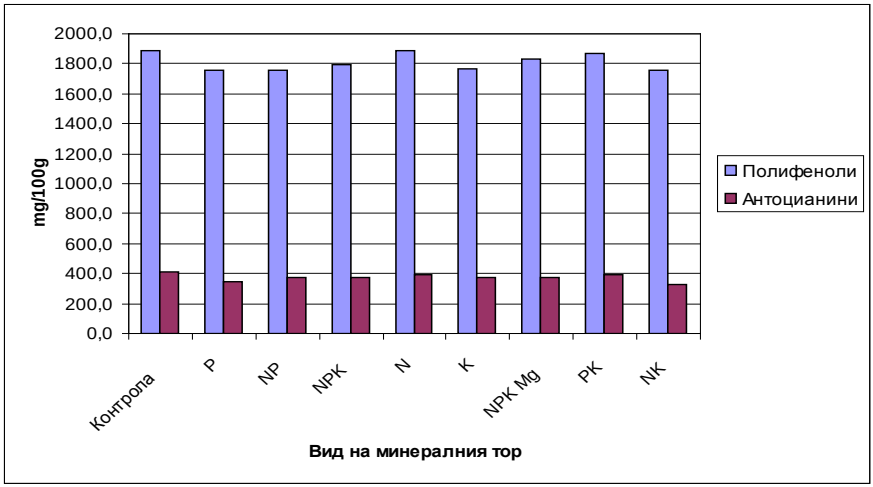
Данните за количеството на сухите вещества в изследваните проби корелират с резултатите за съдържание на захари. С най-високо съдържание на разтворими сухи вещества са проби NPK Mg, NPK, PK и NK. Най-голямо количество неразтворим остатък (целулоза, лигнин и др.) са акумулирали плодовете от контролната проба (Таблица 15).

Таблица 15. Влияние на наторяването с различни минерални торове върху съдържанието на сухи вещества плодове на арония.

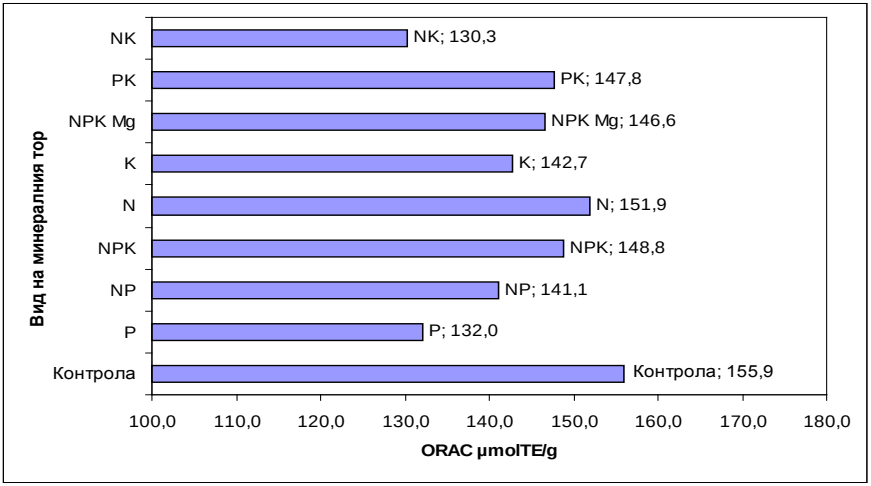
	Сухи вещества тегловно, %	Сухи вещества рефрактометрично		Неразтворим остатък, g
		Сок, %	Плод, %	
Контрола	28.3	23.0	20.0	8.3
P	29.0	24.0	21.5	7.5
NP	28.0	24.6	22.0	6.0
NPK	30.5	25.9	22.5	8.0
N	29.0	24.7	22.0	7.0
K	28.8	24.3	21.5	7.3
NPK Mg	30.4	24.2	22.5	7.9
PK	29.8	24.0	22.5	7.3
NK	29.8	24.0	22.5	7.3

4.2.2. Влияние върху натрупването на вторични метаболити (антоцианини и полифенили) и върху антиоксидантната активност на изследваните проби.

На фигура 9 и фигура 10 са представени данни за съдържанието на полифеноли, антоцианини и антиоксидантната активност на изследваните проби. Резултатите за съдържанието на вторичните метаболити и антиоксидантната активност се различават значително от наблюдаваното при захарите и органичните киселини. По трите показатели контролната проба е на първо място, следвана от проба N. Полифенолите изпълняват редица функции в растенията, една от които е защитна. Те предпазват растенията от вирусни и бактериални инфекции. Установено е, че растения, които растат в дивата природа или са отгледани при органични условия, акумулират по-големи количества полифеноли в тъканите си в сравнение с тези, огледани при конвенционално земеделие. Вероятно и поради тази причина контролната проба в нашето изследване показа и най-високо съдържание на антоцианини и полифеноли, и съответно антиоксидантна активност.

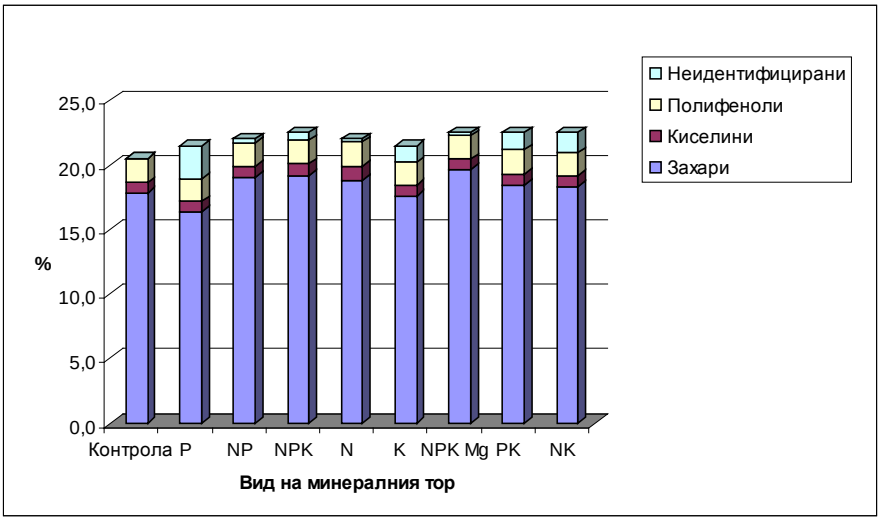


Фиг. 9. Влияние на наторяването с различни минерални торове върху съдържанието на полифеноли и антоцианини в плодове на арония.



Фиг. 10. Влияние на наторяването с различни минерални торове върху ORAC антиоксидантна активност на изследваните проби.

На фиг. 11 е представена обобщена информация за съдържанието на захари, органични киселини и полифенолни съединения в изследваните проби.



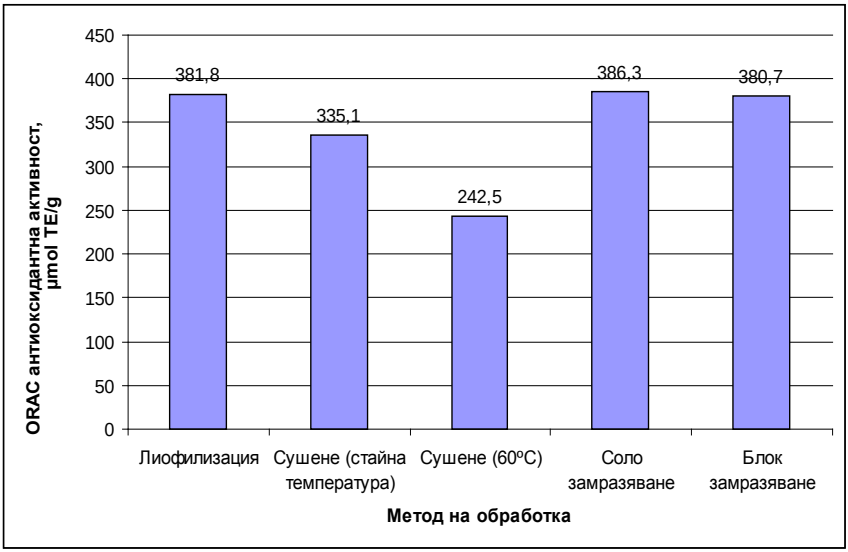
Фиг. 11.Съдържание на захари, органични киселини и полифенолни съединения.

В заключение можем да обобщим, че наторяването с различни минерални торове води до повишено натрупване на сухи вещества и захари в плодовете, но намалява тяхното съдържание на полифеноли и антоцианини, както и техните антиоксидантни свойства.

5. Технологични и други приложни изследвания.

5.1. Изследване на различни методи и условия за съхранение на плодовите суровини.

При производство на функционални храни е от голямо значение осигуряването на суровини, които да бъдат съхранени целогодишно по начин, осигуряващ запазване на техните биологично активни вещества през целия период. С цел да се изясни влиянието на метода на съхранение върху биологичната активност на суровините бяха изпробвани пет различни начина на обработка на плод арония: лиофилизиране, сушене при стайна температура, сушене при 60ºC, соло замразяване и блок замразяване. На фигура 12 са представени данните за антиоксидантната активност на плод арония в зависимост от метода на обработка. За да могат да бъдат сравнени, данните са преизчислени за 100% сухо вещество.



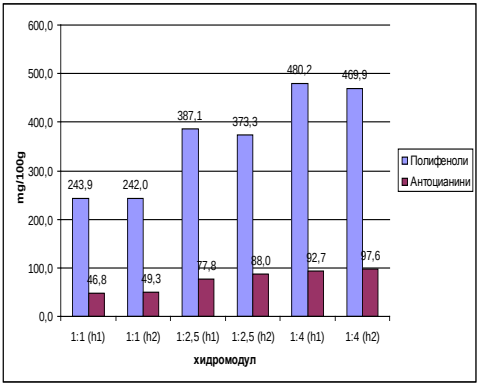
Фиг. 12. Влияние на метода на обработка върху антиоксидантната активност на плодове арония.

От графиката се вижда, че методът на обработка оказва съществено влияние върху антиоксидантната активност на суровината. При лиофилизиране, соло- и блок-замразяване се получават близки стойности за антиоксидантните свойства на плодовете. И в трите случая антиоксидантната активност е между 380.7 и 386.3 единици. При сушене на суровината на стайна температура, което отнема около един месец, се наблюдава 12% намаление в антиоксидантната активност. Това най-вероятно се дължи на ензимното разграждане на полифенолните съединения, които определят антиоксидантните свойства на аронията. При сушене при 60ºC изменението на антиоксидантната активност е още по-голямо ≈ 37 %, въпреки значителното редуциране на времето на сушене (около 96 h).

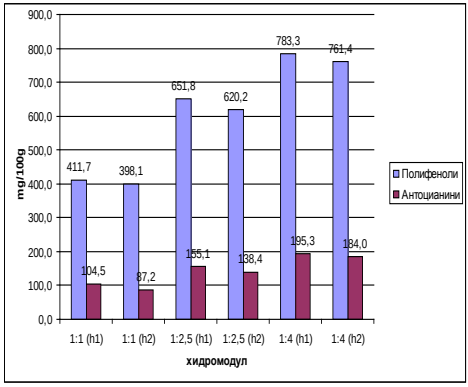
Така обработените суровини бяха съхранявани в продължение на седем месеца и беше проследено изменението на антиоксидантните им свойства. Установено бе, че по време на седем–месечно съхранение, независимо от метода на обработка, не се наблюдават статистически значими различия в антиоксидантната активност на суровината. След направените изследвания бе избрано, след приемане плодовите суровини да се подлагат на соло-замразяване и съхранение при – 18ºC.

5.2. Изследване на влиянието на хидромодул, pH и температура върху екстракцията на антоцианини и полифеноли от плодове на арония.

Натрупването на флавоноидите в растенията е светлинно-зависим процес и затова те се откриват главно в листата и кората на растенията, и в ципата и кората на плодовете и зеленчуците. Поради тази причина те се извличат по-трудно от плодовете, а при пресоване голяма част от тях остават в плодовата маса. Това ни подтикна да изследваме влиянието на различни фактори върху екстракцията на антиоксидантните компоненти от плодовете. Обикновено, в промишлени условия, екстракцията се извършва при съотношение плодова маса:вода от 1:1 до 1:4, нагряване до 70°C и присъствие на киселина (до 1.5%), която най-често е лимонена. Това ни помогна да изберем границите на вариране на всеки фактор. На фиг. 13-17 са представени резултатите от опитите, свързани с изясняване на влиянието на концентрацията на лимонена киселина, времетраенето, хидромодула и температурата, върху количеството на екстрахираните полифенолни съединения и антоцианини от арониеви плодове.



Фиг.13. Екстракция на полифенолни съединения и антоцианини от плодове на арония при 20°C, различен хидромодул без добавена киселина.

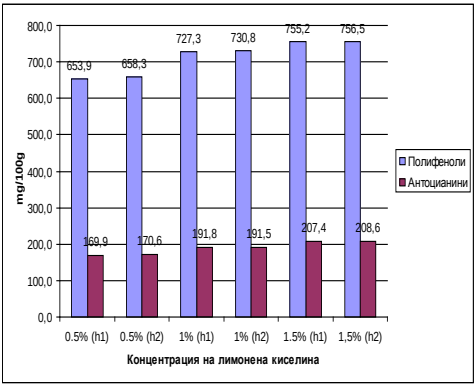


Фиг. 14. Екстракция на полифенолни съединения и антоцианини от плодове на арония при 60°C, различен хидромодул без добавена киселина.

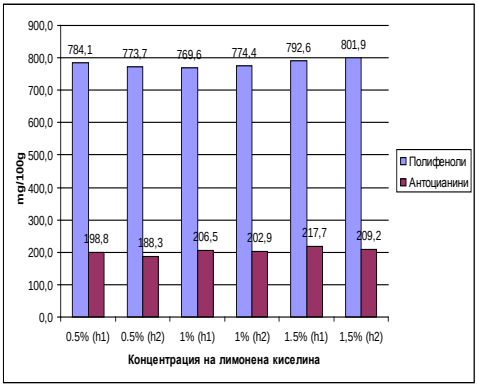
Хидромодулът оказа съществено влияние върху екстракцията на антоцианини и полифеноли и при двете изследвани температури 20°C и 60°C, съответно фигура 13 и фигура 14. И в двата случая с нарастване на хидромодула бе наблюдавано увеличаване на екстрахируемостта на

антоцианините и полифенолите. Най-добри резултати бяха постигнати при съотношение плодова маса:екстрагент 4:1.

В следващата серия от експерименти бе изследвано влиянието на концентрацията на лимонена киселина и температурата. Установено бе, че температурата оказва най-силно влияние върху екстракцията на полифеноли и антоцианини от плодовата маса. Така например извлечените антоцианини и полифеноли при хидромодул 1:4 и температура 20°C са средно 92.65 mg/g и 480.2mg/g, а при 60°C са съответно 195.3 mg/g и 783.3 mg/g.



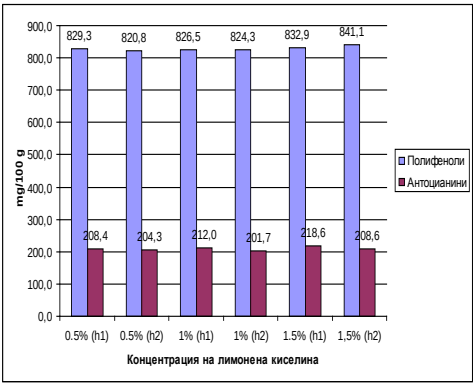
Фиг.15. Екстракция на полифенолни съединения и антоцианини от плодове на арония при 50°C, хидромодул 1:4 и добавена лимонена киселина с различни концентрации.



Фиг.16. Екстракция на полифенолни съединения и антоцианини от плодове на арония при 60°C, хидромодул 1:4 и добавена лимонена киселина с различни концентрации.

Повишаването на концентрацията на лимонена киселина също оказва интензифициращо влияние, като нейното въздействие зависеше от температурата на експеримента. Например, при 50°C повишената концентрация на киселина повлия значително върху добива на екстахираните полифеноли и антоцианини. Така завишението на тези два параметъра, при най-ниската (0,5%) и най-високата (1,5%) концентрация, бе съответно 17% при полифенолите и 25% при антоцианините При по-високите температури влиянието на концентрацията на лимонена киселина бе значително по-слабо. При 60°C увеличението в добива на антоциани и полифеноли бе съответно 8.7% и 1.8%, а при 70°C – 4.6% и 0.7%. По-високата концентрация на лимонена киселина оказа по-скоро

стабилизиращо действие на антоцианините и останалите полифеноли, когато екстракцията бе извършвана при по-висока температура. Така чрез оптимизиране на екстракцията се получи по-пълноценно усвояване на суровините, което е и предпоставка за разработване на храни с по-високо съдържание на биологично активни вещества и повишена антиоксидантна активност



Фиг.17. Екстракция на полифенолни съединения и антоцианини от плодове на арония при 70°C, хидромодул 1:4 и добавена лимонена киселина с различни концентрации.

Въз основа на резултатите, представени на фигири 13 – 17, бяха получени множествени регресионни модели, описващи влиянието на отделните фактори върху количеството на екстрахираните полифенолни съединения и антоцианини. Моделите бяха получени чрез обработка на експериментални данни чрез стандартна компютърна програма, използваща метода на най-малките квадрати за множествена регресия.

$X_5=464.2 + 52.61X_1 -5.744X_2 – 379.0X_3 + 6.003X_4$: Rm = 0.9877
$X_6=104.3 + 28.78X_1 -5.137X_2 – 91.52X_3 + 1.621X_4$: Rm = 0.9806
където:
X_1 – Концентрация на лимонена киселина, %
X_2 – Времетраене, h
X_3 –Хидромодул
X_4 –Температура, ºC
X_5 – Количество полифеноли, mg/100g
X_6 –Количество антоцианини, mg/100g

От двете получени уравнения, с коефициенти на множествена корелационна зависимост Rm=0.9806 и Rm=0.9877, се установи, че

температурата оказва най-съществено влияние при екстракцията на полифеноли и антоцианини.

5.3. Получаване на хранителни добавки и функционални храни от антоцианин-съдържащи плодове.

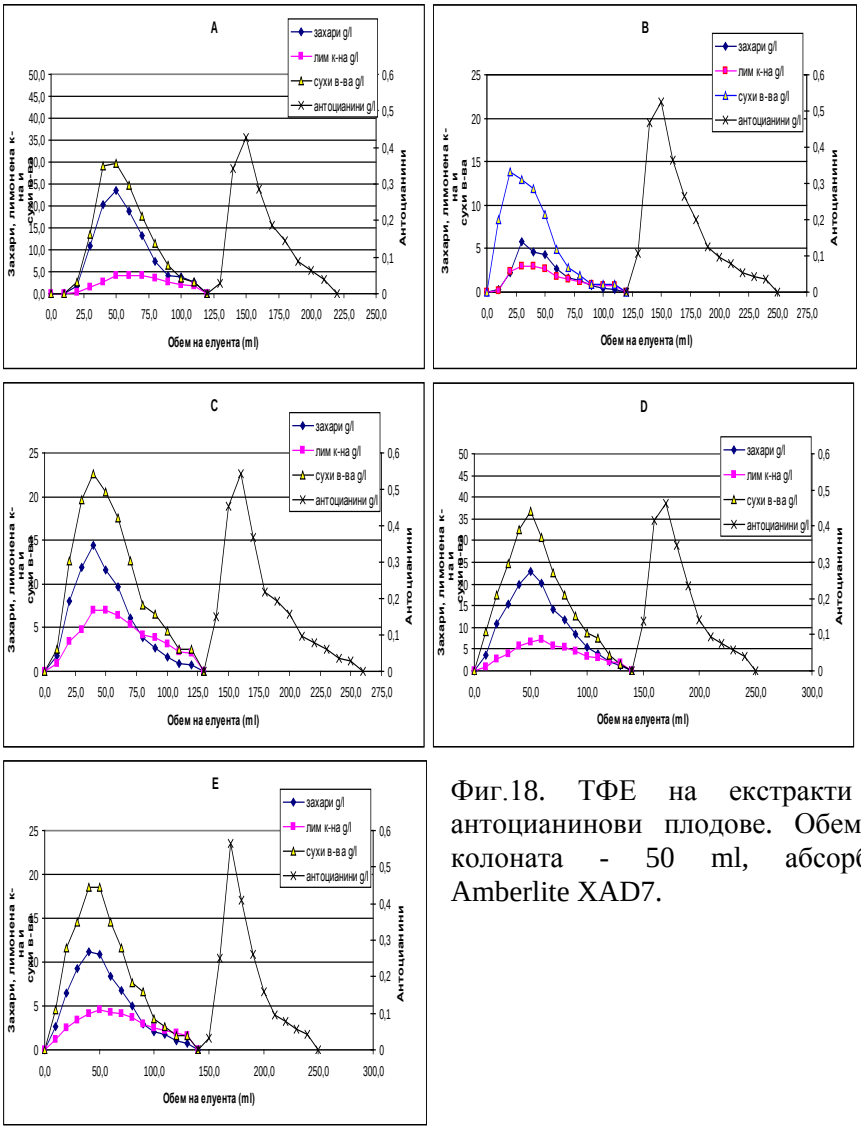
5.3.1 Получаване на пречистени антоцианинови екстракти посредством твърдо-фазна екстракция.

Сред всички плодове и зеленчуци, антоцианин-съдържащите плодове се характеризират с най-високо съдържание на антоцианини и антиоксидантни компоненти. Това ги прави подходяща суровина за екстракция на антоцианини, особено в големи мащаби. Използването на антоцианини като хранителни добавки изисква тяхното пречистване. Полярността на антоцианините определя тяхната разтворимост в редица полярни екстрагенти като метанол, етанол, ацетон и вода. Екстракцията на антоцианините от плодовете е първата стъпка преди тяхното разделяне и пречистване. Най-често използваните екстагенти са не-селективни и получените антоцианини са примесени с редица онечиствания като захари, органични киселини, алкохоли, аминокиселини, белтъци и др. Някои от тях подпомагат деградацията на антоцианините и причиняват затруднения в последващите етапи на пречистване, като разпрашително сушене или лиофилизация. Ниското количество на антоцианините в плодовете е допълнително препятствие пред тяхното промишлено получаване в големи мащаби. На пречистване чрез ТФЕ бяха подложени пет плодови екстракта: арония, бъз, касис, къпина и черна боровинка. Поради високото съдържание на антоцианини в тези плодове те бяха избрани като източник на антоцианини. С цел по-пълното извличане на антоцианините от използваните плодове те бяха подложени на екстракция. За екстракция на антоцианините от плодовите суровини използвахме 1% разтвор на лимонена киселина във вода при хидромодул 1:3. В таблица 16 е представена характеристика на получените екстракти от антоцианинови плодове. Получените екстракти се различават силно, както по отношение на количеството на захари, така и по антоцианиновото си съдържание. Количеството на антоцианините вариране от 0.45 g/l при екстракта от къпина до 1.69 g/l за екстракта от бъз. От данните е видно, че антоцианините представляват само една малка част от сухите вещества на получените екстракти - около 0.98 % при къпината, 1.26 % при аронията, 1.67 % при касиса, 1.77 % при черната боровинка и 3.52 % при екстракта от бъз. Всички екстракти съдържат фруктоза, глюкоза и захароза (с изключение на къпината). Аронията и черната боровинка съдържат и

сорбитол, като при аронията неговото количество е значително. Лимонена киселина и други органични киселини също присъстваха в екстрактите. Така получените екстракти бяха подложени на ТФЕ. Обемът на екстракта, който се вкарва в колоната, зависи от съдържанието на антоцианини в екстракта. Установихме, че при използваната колона количества антоцианини, по-високи от 25 mg довеждат до претоварването и. Това количество определи и обема от всеки екстракт, който подавахме в колоната. На фигура 18 са показани графиките на печистване на получените екстракти. Количеството на захарите е представено като сума от количествата на глюкоза фруктоза, захароза и сорбитол. Антоцианините се различават в своята полярност и често се налага използването на градиентно елуиране за тяхното разделяне. В резултат се получават няколко фракции с различна полярност. В нашето изследване беше наблюдавано отлично разделяне, във всички случаи, на антоцианините от захарите и органичните киселини. При избраните условия елуирането е бързо, антоцианиновите фракции са концентрирани и не се изисква градиентно елуиране. Чрез рефрактометричното измерване на разтворимите вещества в промивните води, процесът на пречистване се следи лесно и удобно.

Таблица 16. Характеристика на плодови екстракти след екстракция на 50 g плодове със 150 ml 1% разтвор на лимонена киселина.

Плод	Обем, ml	Сухи в-ва, %	Полифеноли, g/l	Антоцианини, g/l	Захари, g/l				Лимонена к-на, g/l	Киселинност, g/l	Отношение антоцианини/ сухи в-ва, %
					Захароза	Фруктоза	Глюкоза	Сорбитол			
Арония	175	5.7	2.60	0.72	0.16	9.58	6.29	20.08	10.5	13.2	1.26
Бъз	178	4.8	2.66	1.69	0.28	7.12	8.31	-	13.2	14.2	3.52
Касис	168	4.9	2.02	0.82	0.95	10.68	12.68	-	19.0	19.3	1.67
Къпина	170	4.6	1.57	0.45	-	14.04	14.27	-	11.9	13.3	0.98
Черна боровинка	164	3.5	1.37	0.62	0.04	6.64	7.90	1.94	10.5	12.4	1.77



Фиг.18. ТФЕ на екстракти от антоцианинови плодове. Обем на колоната - 50 ml, абсорбент Amberlite XAD7.

Получените антоцианинови фракции бяха събрани заедно, алкохолът бе изпарен, а остатъкът бе лиофилизиран до получаване на сухи прахообразни екстракти. В таблица 17 е дадена характеристика на тези екстракти.

Таблица 17. Характеристика на сухи антоцианинови екстракти след ТФЕ.

Плод	Добив, g	Полифеноли, mg/g	Антоцианини, mg/g	Добив на антоцианини, %	Захари, mg/g	Лимонена киселина, mg/ g
Арония	0.92	352.1	114.9	91.2	119.1	229.2
Бъз	1.17	282.5	245.8	95.6	123.6	288.5
Касис	0.81	239.1	158.3	93.1	87.2	420.8
Къпина	0.72	244.5	95.8	90.2	206.1	310.3
Черна боровинка	0.66	266.7	138.6	90.0	80.2	302.8

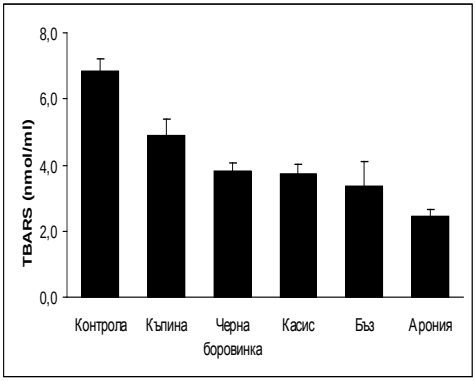
Съдържанието на антоцианини в получените сухи екстракти варираще от 9.6% при къпината до 24.6% при бъза. Бе наблюдавано и много добро пречистване от наличните захари. Количеството на отстранените захари варираще от 94.4% при екстракта от бъз до 98.1% при екстрактите от касис и черна боровинка. Подобно пречистване бе наблюдавано и при киселините – във всички случаи пречистването бе по-високо от 88.5%. Беше постигнат и много добър добив на антоцианини. Между 90% и 95.6% от антоцианините, присъстващи във водния екстракт, се запазиха в сухите екстракти след пречистване. Това показва, че избраните условия на ТФЕ са подходящи за разделяне на антоцианини, независимо от вида на агликоновата част в молекулата им.

С цел по-пълното охарактеризиране на антиоксидантните свойства на получените сухи екстракти и очакваната висока активност използвахме пет метода за измерването и: ORAC, TRAP, HORAC, NO scavenging и инхибиране на липидна пероксидация. Избраните методи обхващат различни аспекти от антиоксидантно действие и дават една по-пълна картина за антиоксидантния потенциал на получените екстракти. В таблица 18 са представени данни за антиоксидантните свойства на получените сухи антоцианинови екстракти, измерени посредством ORAC, TRAP и HORAC методите.

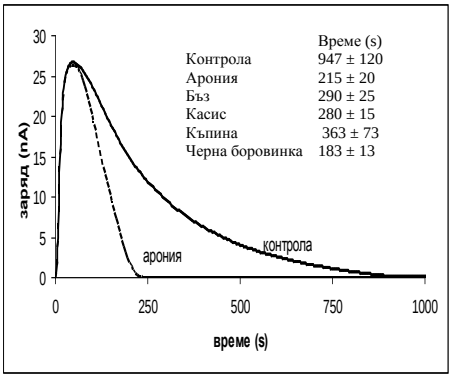
Таблица 18. ORAC, TRAP и HORAC антиоксидантна активност на сухи екстракти от антоцианин-съдържащи плодове.

Есктракт	ORAC, μmol TE/g	TRAP, μmol TE/g	HORAC, μmol GAE/g
Арония	5165.0	4050.6	1264.9
Бъз	5783.1	3230.4	1264.1
Касис	3949.1	2132.3	874.4
Къпина	4042.2	2771.3	834.4
Черна боровинка	5646.0	2859.8	1292.7

На фигура 19 са предоставени данните за инхибиране на липидната пероксидация от антоцианиновите екстракти в концентрация 2mg/ml. Резултатите са сравнени с контролна проба, в която липсва антиоксидант. Най-силен инхибиращ ефект – 75% спрямо контролната проба е наблюдаван при екстракта от арония. Следват екстрактите от бъз, черна боровинка и касис, които показват сходни резултати – около 40-50%. Най-ниска способност да предпазва от липидна пероксидация показа екстрактът от къпина. По отношение на способността си да предотвратяват липидна пероксидация изследваните екстракти се наредиха в следния ред: арония > бъз > касис > черна боровинка > къпина.



Фиг.19. Инхибиране на липидна пероксидация от сухи антоцианинови екстракти.



Фиг.20. Способност на анализираните екстракти да улавят NO.

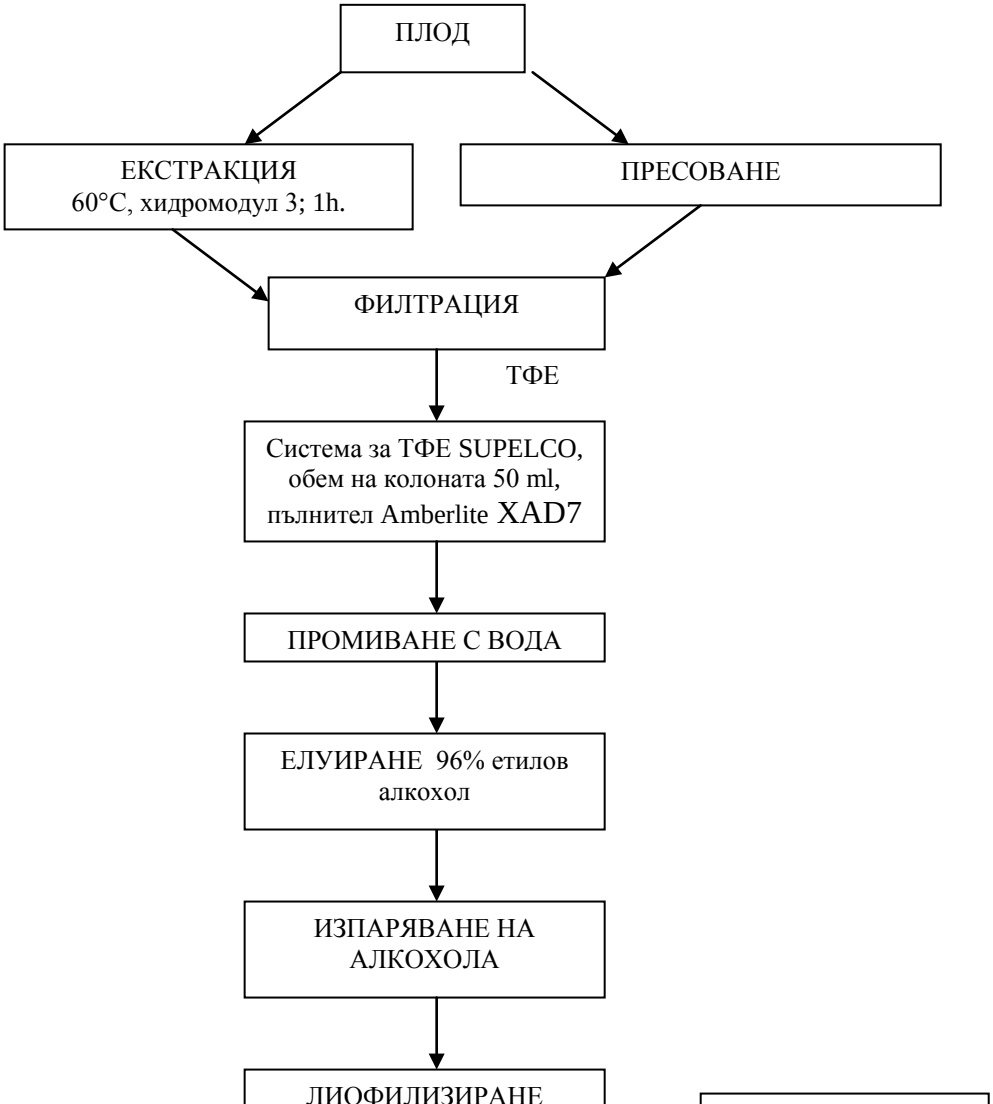
Много интересни резултати се получиха при изследване способността на сухите антоцианинови екстракти да улавят NO (Фигура 20). Даден е пример с екстракт от арония. Видно е, че в присъствие на екстракт, в концентрация 2 mg/ml, сигналът на кривата достига базова стойност за 250s, докато при контролната проба, в която няма добавен екстракт това време е 947s. По този метод екстрактите от черна боровинка и арония показаха най-високи антиоксидантни свойства. Резултатите са интересни и оригинални защото, доколкото сме информирани, в литературата липсват данни за способността на антоцианинови екстракти да улавят NO.

В заключение може да кажем, че твърдо-фазната екстракция (ТФЕ) с използване на абсорбент Amberlite XAD7 е бърз, лесен и надежден способ за пречистване на антоцианини от екстракти, съдържащи захари, киселини и др. Количеството на антоцианини в пречистените екстракти варираще от 9.6 – 24.6%, като над 94% от захарите на плодовете бяха отстранени.

Получените екстракти показаха и високи антиоксидантни свойства по всички пет използвани методи ORAC, TRAP, HORAC, NO-scavenging и инхибиране на липидна пероксидация. Това разкрива възможността за използването на тези екстракти като източници на антиоксиданти.

5.3.2. Лабораторна технология за получаване на сухи антоцианинови екстракти.

На фигура 21 е представена операционна схема за получаване на сухи антоцианинови екстракти от червени плодове.



Фиг.21. Операционна схема за получаване на лиофилизирани екстракти от антоцианин съдържащи плодове.

5.3.3. Получаване на функционални храни и напитки от антоцианин-съдържащи плодове.

Въз основа на данните за химическия състав и антиоксидантната активност на плодовете като най-перспективни суровини за промишлено получаване на функционални храни с висока антиоксидантна активност бяха избрани **бъз, арония и касис**. За отбелязване е фактът, че плодовете на касиса освен висока антиоксидантна активност се отличават и с високо съдържание на хранителни влакнини, и висока имуностимулираща активност.

5.3.3.1. Получаване на сокове от антоцианин-съдържащи плодове.

В лабораторни условия чрез пресоване бяха получени сокове от плодовете, които се характеризират с най-висока антиоксидантна активност: бъз, арония, касис, черна боровинка и къпина. В зависимост от предназначението на сока за подслаждане се използват захар, фруктоза или различни подсладители. От сок арония бе произведена и пробна партида в промишлени условия. След първична обработка (измиване, сортиране, инспекция и замразяване) плодове от арония бяха подложени на хомогенизация и пресоване на бюхер-преса. Сокът бе подсладен с 5% фруктоза. Сокът е предназначен за профилактика и лечение на диабет, и сърдечно-съдови заболявания. Произведената пробна партида от сок от арония с добавена фруктоза бе предоставена на Клиниката по ендокринология и Клиниката по кардиология към МУ – Пловдив за провеждане на медицински изследвания.

5.3.3.2.Получаване на плодови нектари.

Плодовите нектари бяха произведени от свежи или замразени плодове чрез екстракция на плодовата маса с гореща вода (60°C). Количеството на водата се определя в зависимост от желаното плодово съдържание на готовия продукт. В лабораторни условия бяха получени плодови нектари от черна и червена боровинка със захар и касис с добавен подсладител (ацесулфам К).

5.3.3.3.Получаване на плодови нектари с добавен пектин.

В лабораторни условия бяха получени и плодови нектари от ягода и арония с различно количество добавен пектин. За целта към предварително приготвените нектари бе добавяно съответното количество пектин. Бяха получени три плодови нектара с добавен пектин.

Нектар ягода с добавен подсладител и 0.5% пектин.
Нектар арония без добавен подсладител и 0.5% пектин.
Нектар портокал и арония със захар и 1.5% пектин

В промишлени условия бяха получени и две пробни партиди, съответно от н**ектар ягода с добавен подсладител и 0.5% пектин, и нектар арония без добавен подсладител и 0.5% пектин.**

Нектарите с пектин са предназначени за профилактика на онкологични заболявания, диабет и сърдечно-съдови заболявания.

В таблица 19 са представени данни за антиоксидантната активност и полифенолното съдържание на всички плодови функционални напитки, получени от антоцианинови плодове.

Таблица 19. Антиоксидантна активност и съдържание на полифеноли и антоцианини във функционални напитки от антоцианинови плодове.

Напитка	Плодово съдържание, %	ORAC, µmolTE/l	Полифеноли, mg/l	Антоцианини, mg/l
Сок черен бъз	100	75059	4970	1508
Сок арония с фруктоза	100	42188	2934	545
Сок касис	100	30246	3295	342
Сок черна боровинка	100	27415	2056	207
Сок къпина	100	24451	2834	314
Нектар черна боровинка със захар	35	15471	1199	342
Нектар червена боровинка със захар	35	12560	1122	95
Нектар касис с подсладител	35	19229	1119	94
Нектар черен бъз със захар	35	34346	2692	781
Нектар ягода с добавен подсладител и 0.5% пектин	35	5817	986	150
Нектар арония без добавен подсладител и 0.5% пектин	35	23299	1309	232

5.3.3.4.Получаване на плодови пюрета с пектин.

Плодовите пюрета се получават от замразени плодове. Използвани бяха замразени плодове от ягода, малина, къпина, дренка, касис и арония. В таблица 20 са представени данни за антиоксидантната активност и полифенолното съдържание на получените продукти. Плодовите пюрета с пектин са предназначени за профилактика на хора, застрашени от професионални заболявания, поради работа с тежки метали – от оловно-цинкови предприятия, АЕЦ, акумулаторни заводи, рудодобив и др.

Таблица 20. Антиоксидантна активност и полифенолно съдържание на плодови пюрета

Пюре	ORAC, μmol TE/g	Полифеноли, mg GAE/100g
арония	153.5	1130.8
дренки	55.8	512.2
касис	61.4	528.4
касис + ягода	41.3	346.5
къпина	65.3	379.4
къпина + дренки	54.5	447.7
малина	30.3	240.1
черна боровинка	88.5	756.4
ягода	40.5	314.4

5.3.4. Сравнение на антиоксидантната активност и съдържанието на общи антоцианини и полифеноли в сокове и нектари, произведени от антоцианин-съдържащи плодове.

Бе интересно да сравним антиоксидантните свойства на разработените от нас функционални напитки с тези на подобни продукти, предлагани на българския пазар. От направената сравнителна характеристика бе установено, че произведената партида сок от арония с добавена фруктоза значително превъзхожда други подобни плодови напитки по съдържанието на полифенолни съединения и антоцианини и е на първо място по антиоксидантна активност (Таблица 21).

Таблица 21. Сравнителна характеристика на сокове и нектари от антоцианинови плодове, предлагани на българския пазар

Напитка	Плодово съдържание, %	ORAC, μmolTE/l	Полифеноли,Антоцианини, mg/l	mg/l
Сок арония с фруктоза	100	42188	2934	545.2
VITANEAарония без захар	35	24253	1571	260.1
VITANEA арония със захар	35	24039	1378	234.5
VITANEA къпина без захар	35	21470	1280	220.1
VITANEA къпина и арония със захар	35	21089	1537	NM
VITANEA ягода без захар	35	18523	1030	173.2
VITANEA ягода и арония със захар	35	13108	1017	NM

Касис	NA	12501	1023	227.9
Горски плодове B+C+E	30	10707	702	24.7
Вишна	50	10619	856	9.18
Касис	20	10545	920	8.3
Касис	25	10028	877	86.2
Касис	25	9606	1106	57.4
Червена боровинка	30	9188	872	9.0
VITANEA малина и арония със захар	35	8154	821	NM
Вишна	20	8120	872	10.0
Червено грозде	50	8110	646	13.7
Касис	15	8086	733	95.1
VITANEA малина без захар	35	8026	522	34.3
Ананас, касис,слива	65	7891	911	7.3
Портокал, малина, морков, ацерола, касис	65	7506	1048	0.0
Вишна	35	7407	513	7.0
VITANEA портокал и арония със захар	35	7286	493	NM
Горски плодове	35	6878	610	13.4
Вишна	35	6446	528	3.3
Вишна	25	6195	439	17.7
Горски плодове	30	6143	381	60.1
Вишна	25	4802	360	8.3
Вишна	8	4627	347	10.4
Череша	15	4379	676	13.4
Вишна	10	3938	488	5.0
Нар	24	3900	394	2.7
Касис	25	3628	154	0.0
Касис	25	3514	232	16.7
Касис	17	2577	214	10.0
Червено грозде	15	2012	128	0.0
Ягода	NA	877	38	0.7
Череша	NA	867	24	3.3

NM – не е измерено; NA – няма информация

При направената литературна справка бе установено, че няма друг търговски продукт (нектар или сок), който да се характеризира с толкова висока антиоксидантна активност. Търговските марки не са посочени.

6. Медицински изследвания.

Много важен момент при разработването на функционални храни е изследване на тяхното въздействие върху човешкия организъм. Затова ние предоставихме някои от произведените от нас функционални храни за медицински изследвания в различни здравни заведения в страната.

6.1. Проучване влиянието на приема на натурален сок от арония с добавена фруктоза върху антиоксидантния капацитет на кръвна плазма при здрави индивиди без съпътстващи заболявания.

Това изследване бе проведено съвместно с Клиниката по ендокринология при МУ – Пловдив. В проучването участваха 10 здрави пациента (6 мъже и 4 жени на възраст 20-40 години) и контролна група от 10 човека (7 жени и 3 мъже на възраст 20-40 години). Първата група приемаше ежедневно еднократно сутрин на гладно 200 ml сок от арония, с добавена фруктоза, в продължение на 15 дни. Изходно, на 5-ти, 10-ти и 15-ти ден се вземаше сутрин на гладно кръв за определяне на антиоксидантния капацитет на плазмата. С цел да се оцени само влиянието на антиоксидантите, приети със сока от арония всички проби от кръвна плазма бяха депротеинизирани. Получените резултати от изследванията за двете групи са представени в таблица 22.

Таблица 22. Антиоксидантен капацитет на кръвна плазма, измерен посредством ORAC метод.

Ден	Антиоксидантен капацитет-изследвана група	Антиоксидантен капацитет-контролна група
Изходно	1777.49 ± 329.38	1796.91± 418.71
5-ти ден	1712.80 ± 301.38	
10-ти ден	2005.75 ± 252.21	1964.35 ± 329.38
15-ти ден	1828.18± 333.515	

Резултатите показват статистически значимо покачване на антиоксидантния капацитет на плазмата на 10-ти ден спрямо изходната стойност в групата с прием на сок от арония ($t= 0.629$; $p<0.05$), като този ефект намалява на 15-ти ден (статистически незначима разлика в стойностите на антиоксидантния капацитет спрямо изходните $p>0.05$). В групата без прием на сок не се отчитат статистически значими разлики изходно и на 10-ти ден ($p>0.05$). Получените резултати ни дават основание да заключим, че приемът на сок от арония с фруктоза води до статистически

значимо повишаване на антиоксидантния капацитет на плазмата след 10 дневен ежедневен прием на 200 ml.

6.2. Проучване влиянието на приема на сок от арония, с добавена фруктоза, върху цялостния метаболитен контрол при пациенти със захарен диабет.

В проучването участваха 25 пациенти със захарен диабет тип 2 на перорално антидиабетно лечение. Бяха проследени промяната в нивата на кръвната захар на гладно и 2h след нахранване, общият холестерол, триглицеридите, HDL-холестеролът, микропротеинурията и артериалното кръвно налягане преди и на 1-ви месец след ежедневен прием на 200 ml сок от арония. Получените резултати са показани в таблица 23.

Таблица 23. Показатели на метаболитен контрол при пациенти със захарен диабет тип 2 изходни и на 1-ви месец след употреба на сок от арония.

ПОКАЗАТЕЛ	ИЗХОДНИ	1-ВИ МЕСЕЦ	p
	x ± Sx	x ± Sx	
Кръвна захар на гладно, mmol/l	7.25 ± 2.64	6.85 ± 2.75	p >0.05
HвA1c, %	7.35 ± 1.16	7.16 ± 1.45	p >0.05
Холестерол, mmol/l	6.65 ± 1.59	5.25 ± 0.21	p<0.001
Триглицериди, mmol/l	2.82 ± 2.15	1.87 ± 1.23	p <0.05
RR, mmHg	145/92	135/85	p >0.05
Кръвна захар 2h след нахранване, mmol/l	9.25 ± 2.55	8.86 ± 2.07	p >0.05
HDL- холестерол, mmol/l	0.88 ± 0.43	0.98 ± 0.32	p >0.05
Микропротеинурия, µg/min	16.7 ± 2.55	15.67 ± 3.07	p >0.05

Получените резултати показват, че кръвните захари на гладно, както и 2h след нахранване проявяват тенденция за редукция, макар и това снижение да не е статистически достоверно. Впечатление прави достоверното снижение на общия холестерол (p<0.001) и серумните триглицериди (p<0.05). Като извод можем да заключим, че приемът на сок от арония с добавена фруктоза, при пациентите със захарен диабет тип 2 води до подобряване на стойностите на кръвната захар и особено на стойностите на серумните липиди (холестерол и триглицериди) и се приема добре от пациентите като вкусови качества, и като още една възможност за разширяване на диетичния режим при тези пациенти.

6.3. Проучване на ефекта на сок от арония върху определени атерогенни биомаркери – рутинен липиден профил, аполипопротеини и оксидативен статус при асимптомна лека хиперхолестеролемия.

През периода Юни 2009 - Септември 2009, през кабинета по Превантивна Кардиология на Клиниката по Кардиология към МУ - Пловдив преминаха 85 пациента с лека хиперхолестеролемия. От тях 60 бяха включени в плацебо-контролироно проучване. При 30 пациента, които приемат сок от арония, са изследвани изходно и след 2 месец следните биохимични параметри – кръвна захар, общ холестерол, триглицериди, високо-плътностен холестерол, ниско-плътностен холестерол, аполипопротеин-А1, аполипопротеин-В. Установи се много добър толеранс на пациентите към приема на сок от арония с добавена фруктоза за период от 2 месеца. Установи се статистически значима редукция на ниско-плътностния холестерол ($p<0.05$), както и значимо повишаване на високо-плътностния холестерол и аполипопротеин-A_1 ($p<0.05$). В останалите параметри не се отчете статистически значима динамика (таблица 24).

Таблица 24. Влияние на приема на сок от арония върху някои биохимични параметри при пациенти с лека хиперхолестеролемия.

	Общ холестерол, (mmol/l)	Триглицериди, (mmol/l)	Високо-плътностен холестерол, (mmol/l)	Ниско-плътностен холестерол, (mmol/l)	Аполипопротеин-А1, (g/l)	Аполипопротеин-В, (g/l)
Изход	6.2±1.2	1.6±0.5	0.8±0.3	4.3±0.5	0.9±0.3	1.4±0.9
2 месец	6.0±0.9	1.5±0.5	1.0±0.2	3.3±0.4	1.4±0.2	1.3±0.7
p	> 0.05	> 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	> 0.05

6.4. Изследването на ефекта на прием на нектар от арония, обогатен с ябълков пектин върху канцерогенното действие на 1-,2-диметилхидразин (ДМХ) в интестиналния тракт на плъхове.

Третирането на плъховете от група 2 с нектар от арония в продължение на 8 месеца (самци) и 10 месеца (самки) не повлия съществено върху динамиката на телесното тегло на животните, което свидетелствува за липса на хронична токсичност. Третирането на плъховете с ДМХ индуцира тумори почти във всички животни. Неопластични лезии бяха установени в чревния тракт на 93.6% - 100.0% от животните, като честотата на туморите варираще в отделните сегменти на чревния тракт без съществени полови различия както следва: а) дебело черво – 93.1% - 96.6% от случаите; б) сляпо черво – 15.6% - 31.0%; в) тънко черво (илеум) – 6.3% - 10.4%; г) тънко черво

(иеунум) – 24.1% - 28.1% и д) дуоденум – 56.3% - 75.9%. В 28.0% - 32.6% от животните бяха установени доброкачествени тумори на интестиналния тракт (аденоми), докато в повечето случаи индуцираните тумори бяха аденокарциноми с различна степен на диференциация или недиференцирани карциноми. В 13.8% - 21.9% от третираните с ДМХ плъхове макроскопски бяха регистрирани метастази в лимфните възли и мезентериума. Същевременно, хистологичният анализ на индуцираните в интестиналния тракт тумори показа, че комбинираното третиране на животните с ДМХ и нектар от арония, обогатен с пектин доведе при мъжките, но не и при женските плъхове, до статистически значимо нарастване на относителния дял на доброкачествените новообразувания. Този протективен ефект бе наблюдаван преди всичко в дебелото черво. Интерес предизвика и фактът, че размерите на туморите в интестиналния тракт на мъжките плъхове третирани с нектар от арония, обогатен с пектин бе статистически значимо по-малък от този регистриран при самците получавали само ДМХ. животни. При женските животни не бе установено повлияване на размера на индуцираните с ДМХ чревни тумори, независимо от въздействието с нектар от арония с добавен пектин.

Получените в хода на настоящото изследване резултати показват, че нектарът от арония, обогатен с пектин оказва, макар и не силно изразено, протективно действие при модели на интестинална канцерогенеза, което се проявява най-добре в забавяне процесите на промоция на канцерогенезата и се изразява в нарастване на относителния дял на доброкачествените тумори и в намаляване размера на индуцираните неопластични лезии.

ИЗВОДИ

В резултат на направените изследвания върху състава и антиоксидантната активност на антоцианин-съдържащи плодове и функционални храни и напитки, получени от тях могат да бъдат направени следните изводи:

1. От използваните методи за определяне на антиоксидантна активност ORAC методът е най-чувствителен и се препоръчва за изследване на антиоксидантна активност на растителни суровини.
2. От изследваните 25 вида плодове с най-висока ORAC антиоксидантна активност се характеризират плодовете на бъза – 205.4 μmolTE/g свежа суровина.

3. Въз основа на данните за химическия състав и антиоксидантната активност плодовете на черения бъз, аронията и касиса бяха отличени като най-перспективни за производството на функционални храни с антиоксидантно действие.

5. Осъществените биологични тестове показаха, че плодовите сокове от касис, ягода, къпина и вишна имат изразена имуностимулираща активност, а сокове от малина и касис силен антибактериален ефект спрямо *Pseudomonas aeruginosa.*

6. Бе установено, че оптималното количество антоцианини, полифеноли и сухи вещества в плодовете на аронията се достига при съдържание на сухи вещества в плодовия сок 23-25%, при които се достига и оптимална технологична зрелост.

7. Установено е, че наторяването с минерални торове влияе положително върху натрупването на захари, органични киселини и сухи вещества в плодовете на аронията, но влияе негативно върху натрупването на вторични метаболити – антоцианини и полифеноли. За първи път е изследвана антиоксидантната активност на плодове арония като функция от наторяването на растението и е установено, че наторяването влияе негативно върху антиоксидантната активност на плодовете.

8. След изпитване на пет различни режима на съхранение на плодове на арония бе установено, че методът на обработка оказва съществено влияние върху антиоксидантната активност на плодовата суровина. За промишлено съхранение бе избрано соло-замразяване и съхранение при – 18ºС.

9. Установено е, че от изследваните технологични параметри (хидромодул, киселинност и температура) за получаване на плодов сок от арония, температурата оказва най-изявен ефект върху екстрахируемостта на антоцианините и полифенолните вещества. Получени са множествени регресионни модели, описващи влиянието на тези фактори върху количеството на екстрахираните полифенолни съединения и антоцианини.

10. Създадена е лабораторна технология за получаване на сухи антоцианинови екстракти посредством твърдо-фазна екстракция. Постигнато е много добро пречистване на антоцианините от пет плодови суровини, като са отстранени 94.4 % - 98.1% от захарите и над 88.5% от киселините, присъстващи в плодовите екстракти. Постигнат е и добър добив на антоцианини - между 90% и 95.6 % от антоцианините в плодовете се запазват в сухите екстракти след пречистване.

11. За пръв път са получени данни за TRAP, HORAC и NO scavenging антиоксидантна активност на обогатени на антоцианини плодови екстракти.

12. Получени са различни функционални храни и напитки от антоцианин-съдържащи плодове: сокове, нектари, вкл. с добавен пектин, пюрета и концентрати, на които е определена антиоксидантната активност по ORAC метода и съдържанието на антоцианини и полифеноли.

13. В промишлени условия съвместно с фирма "ВИТАНЕА" ООД – Пловдив бяха получени пробни партиди от: (1) Сок арония с добавена фруктоза; (2) Нектар ягода с добавен подсладител и 0.5% пектин; (3) Нектар арония без добавен подсладител и 0.5% пектин, предназначени за по-широки изпитания в болнични заведения и подходящи промишлени предприятия.

14. Бе установено, че сокът от арония с добавена фруктоза, разработен в настоящото изследване, значително превъзхожда други подобни плодови напитки, предлагани на българския пазар по съдържанието на полифенолни съединения и антоцианини и е на първо място по антиоксидантна активност.

15. При проведените медицински изследвания с получените функционални храни в Клиниката по ендокринология при МУ– Пловдив, Клиниката по Кардиология към МУ - Пловдив и Специализираната болница за активно лечение по онкология – София се установи:

- Статистически значимо покачване на антиоксидантния капацитет на кръвна плазма при здрави индивиди на 10-ти ден след ежедневен прием на сок от арония с добавена фруктоза

- Приемът на сок от арония с добавена фруктоза води до подобряване на стойностите на кръвната захар и особено на стойностите на серумните липиди - холестерол и триглицериди при пациенти със захарен диабет.

- След дву-месечен прием на сок от арония с добавена фруктоза се наблюдава статистически значима редукция на ниско-плътностния холестерол, както и повишаване на високо-плътностния холестерол и аполипопротеин-A_1 при пациенти с асимптомна лека хиперхолестеролемия.

- Нектарът от арония, обогатен с пектин оказва, макар и не силно изразено, протективно действие при модели на интестинална канцерогенеза, индуцирана чрез 1,2-диметилхидразин, което се проявява най-добре в забавяне процесите на промоция на канцерогенезата и се изразява в нарастване на относителния дял на доброкачествените тумори, и в намаляване размера на индуцираните неопластични лезии.

Публикувани материали по дисертацията:

1. **Денев П.**, Lojek A., Čížová H.,. Číž M, Гочева М., Крачанова М. (2008). Антиоксидантна активност и полифенолно съдържание на плодове, зеленчуци, гъби и билки, отглеждани в България – Сборник от 8ми Национален конгрес по хранене с международно участие – Варна 2007 "*Науката за хранене пред нови възможности и предизвикателства"* (под редакцията на проф. Божидар Попов), 185-190.
2. Kratchanova M., **Denev P.**, Kussovski V. (2008). Antioxidant and immune-stimulating activities of chosen anthocyanin-containing fruits. *Advances in Bulgarian Science*, **2-3**,24-30.
3. **Денев П.**, Янакиева И.. Крачанова М. (2009) Съдържание на някои полифенолни компоненти в състава на български червени плодове. *Научни трудове на УХТ* том LVI, свитък **1**, 456-462
4. Владимирова-Китова Л, **Денев П**, Крачанова М (2010) Ефект на *Aronia melanocarpa* като част от диетичния режим при асимптомни пациенти с лека хиперхолестеролемия. *Наука Диететика*, 1, 9-12
5. Číž M,. Čížová H, **Denev P**., Kratchanova M., Slavov A., Lojek A. (2010) Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables, *Food Control*, **21,** 518–523 (**IF - 2,463**).
6. **Denev P.**, Ciz M., Ambrozova G., Lojek A., Yanakieva I., Kratchanova M. (2010) Solid phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry* **123**, 1055-1061 (**IF – 3,146**).

Материали докладвани на конференции:

1. **P. Denev.** "Fluorescent methods for antioxidant activity determination" in English. Scientific forum of the Institute of Biophysics – ACCR, Department of free radical pathophysiology, Brno – Czech Republic, 16.10.2006. Lecture.
2. **П. Денев**, A. Lojek, H. Čížová, M. Číž,M. Гочева, М. Крачанова. "Антиоксидантна активност и полифенолно съдържание на плодове, зеленчуци, гъби и билки, отглеждани в България", VIII Национален конгрес по хранене с международно участие – Варна 2007, 16-19 май. Доклад.
3. **П. Денев,** М. Крачанова, В. Късовски. "Антиоксидантна и имуностимулираща активности на някои антоцианин-съдържащи

плодове” IV Национална конференция по хранене "Нови храни, хранителни добавки и медикаменти в превенция и лечение на съвременните болести" – София, 2008, 30-31 октомври. Доклад.

4. **П. Денев**, И. Янакиева. М. Крачанова. “Съдържание на някои полифенолни компоненти в състава на български червени плодове” Научна конференция с международно участие “Хранителна наука, техника и технология” – Пловдив, 23-24 октомври 2009г. Доклад.
5. М. Крачанова, **П. Денев,** Хр. Крачанов. “Нови функционални храни – източници на антиоксиданти” Следдипломен курс “Антиоксиданти – превенция и здравословно стареене” София, 11-13 ноември 2009. Доклад.
6. **П. Денев.** “Сравнение на различни методи за определяне на антиоксидантна активност в храни и биологични проби” *Следдипломен курс “Биоефикасност и безопасност от приема на биологично активни вещества”* София, 10-12 ноември 2010. Доклад.

Открити са 6 цитата в чужди списания на публикуваните по темата материали.