

**PROCJENA SADRŽAJA KAROTENOIDA PREMA
INTENZITETU BOJE ZRNA KUKURUZA****Kristina Kljak, D. Grbeša, D. Karolyi****Sažetak**

Boja žutanjaka jaja, kože ili mesa peradi važan je čimbenik percepcije kakvoće proizvoda za potrošače. Boja kože ili žutanjka povezana je s nakupljanjem pigmenata karotenoida, koji su važni za metabolizam rasta i plodnost peradi. Žuti kukuruz je jedina žitarica sa značajnom količinom karotenoida te je, kao najzastupljenije krmivo u hrani peradi u RH, za perad važan izvor pigmenta. Karotenoidi u kukuruзу su gotovo isključivo smješteni u endospermu zrna te određuju njegovu boju. Kemijsko određivanje sadržaja karotenoida je skupo i dugotrajno, a zbog toga u praksi i često neprimjenjivo. Cilj ovoga istraživanja bio je odrediti parametre boje endosperma kukuruza prema CIE Lab sustavu i njihovu povezanost sa sadržajem karotenoida u zrnu. U istraživanju je analizirano 18 Bc hibrida kukuruza. Karotenoidi iz zrna su ekstrahirani heksanom, a sadržaj je kvantificiran spektrofotometrijski pomoću apsorpcijskog koeficijenta β -karotena u heksanu. Boja endosperma je mjerena instrumentalno kolorimetrijskim uređajem (Chroma meter CR-410, Minolta, Japan). Prosječni sadržaj karotenoida u zrnu iznosio je 33,16 μg β -karotena/g (raspon od 22,13 do 47,47 $\mu\text{g/g}$). Srednje vrijednosti parametara boje L^* , a^* i b^* redom su iznosile 84,11 (od 78,81 do 87,29), 0,17 (od -1,30 do 2,62) i 34,83 (od 29,87 do 40,07). Od parametara boje endosperma jedino je parametar žutoće b^* bio vrlo visoko signifikantno ($P < 0,001$) pozitivno povezan ($r = 0,79$) sa sadržajem karotenoida u zrnu. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da intenzitet žutoće zrna kukuruza određen CIE Lab parametrom b^* dobro procjenjuje sadržaj ukupnih karotenoida u njemu (sadržaj ukupnih karotenoida ($\mu\text{g/g}$) = $-22,33 + 1,577xb^*$, $p < 0,001$, $R^2 = 0,63$).

Ključne riječi: zrno kukuruza, karotenoidi, boja

Kristina Kljak, dipl. ing. kemije, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za hranidbu domaćih životinja, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Republika Hrvatska, tel: ++385 (0) 1 2393-945, fax: ++385 (0) 1 2393-932, e-mail: kkljak@agr.hr
Darko Grbeša, Zavod za hranidbu domaćih životinja, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Danijel Karolyi, Zavod za opće stočarstvo, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Uvod

Kukuruz je najvažniji izvor energije i žuto-narančastih pigmenata karotenoida, od kojih su neki provitamini vitamina A, drugi bojila žutanjaka jaja, kože ili mesa peradi (Kopsell i Kopsell, 2006., Perez-Vendrell i sur., 2001., Breithaupt, 2007.), a svi su antioksidanti. Karotenoidi pridonose visokoj antioksidativnoj moći zrna kukuruza, najvišom među žitaricama, koja iznosi 181 μmol ekvivalenata vitamina C/g uzorka (Adom i Liu, 2002.). Karotenoidi u kukuruzu su gotovo isključivo (95-97%) smješteni u endospermu zrna, najviše u rožnatom (74-86%) (Blessin i sur., 1963.), te određuju njegovu boju. Kemijsko određivanje sadržaja karotenoida je skupo, dugotrajno i složeno, te zahtijeva kemičara, pa je u praksi neprimjereno jer industrija zahtijeva velik broj analiza određenih na jednostavan i pouzdan način u kratkom vremenu. Cilj ovoga rada je utvrditi u kojoj mjeri jednostavno mjerenje parametara boje pomoću kolorimetra može procijeniti sadržaj ukupnih karotenoida u uzorku zrna kukuruza.

Materijal i metode

U istraživanju je određen sadržaj ukupnih karotenoida i boja zrna 18 Bc hibrida kukuruza. Hibridi kukuruza roda 2008 uzgajani su pri istim agroekološkim uvjetima na testnom polju 'Bc Instituta d.o.o' u Rugvici. Svaki hibrid je zasijan na jednoj pokusnoj parceli, a nasumično je uzeto pet klipova hibrida iz središnjih redova pokusne parcele koji su spojeni u skupni uzorak. Zrno hibrida je samljeveno i homogenizirano na mlinu Cyclotec (Tecator, Švedska) sa veličinom čestica do 0,75 mm. Samljeveni uzorci su čuvani na +4° C, zaštićeni od svjetla.

Karotenoidi su ekstrahirani heksanom. 0,5 g samljevenog i homogeniziranog uzorka hidratizirano je 30 minuta sa 2 mL ultračiste vode. Dodano je 4 mL acetona, te je smjesa ultrasonificirana 5 minuta (Sonorex TK52, Bandelin, Njemačka). Nakon ultrasonifikacije dodano je 2 mL heksana, te je smjesa vorteksirana 30 sekundi (37600 Mixer, Barnstead Thermolyne, UK). Nakon centrifugiranja (Centric 322A, Tehtnica, Slovenija; 4000 rpm, 5 minuta) odvojen je heksanski sloj. Postupak je ponovljen do obezbojenja heksanskog sloja. Odvojeni heksanski slojevi su sakupljeni tako da im ukupni volumen bude 10 mL. Apsorbancija heksanskog ekstrakta je mjerena u rasponu 400-480 nm UV/Vis spektrofotometrom Helios γ (Thermo Electron

Corporation, UK), a za kvantifikaciju je uzeta apsorbancija u piku. Sadržaj ukupnih karotenoida uzorka hibrida izražen je kao $\mu\text{g } \beta\text{-karotena/g}$ uzorka koristeći apsorpcijski koeficijent $\beta\text{-karotena}$ u heksanu (= 2550) (Olson, 1996.). Svaki hibrid analiziran je u triplicatu, a analiza je izvedena u najkraćem mogućem vremenu od mljevenja uzorka.

Boja u samljevenim uzorcima određena je prema CIELab sustavu (CIE, 1976) mjerenjem kolorimetrom Chroma meter CR-410 (Minolta, Japan). Prema CIELab skali parametar L^* je mjera svjetline (0=crno do 100=bijelo), a^* je mjera crvenosti (+a=crveno do -a=zeleno), dok je b^* mjera žutosti (+b=žuto do -b=plavo). Uzorci su mjereni u triplicatu.

Rezultati analiza su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Povezanost sadržaja ukupnih karotenoida i parametara boje L^* , a^* i b^* analizirana je izračunom koeficijenta korelacije (r) po Pearsonu te regresijskom analizom. Korišten je računalni paket SAS 9.1. (SAS, 2003.).

Rezultati i rasprava

Sadržaj ukupnih karotenoida određen je u zrnu 18 Bc hibrida kukuruza, a rezultati istraživanja su prikazani u Tablici 1. Hibridi se razlikuju prema sadržaju ukupnih karotenoida, što se slaže sa rezultatima Egesela i sur. (2003.), Hulshofa i sur. (2003.), te Kurilicha i Juvika (1999.). Najveće razlike u sadržaju ukupnih karotenoida su između Bc 394 i Bc 678 te iznose 22,13 i 47,47 $\mu\text{g } \beta\text{-karotena/g}$ uzorka. Tako visoke razlike u sadržaju karotenoida uzrokovane su vjerojatno genotipom (hibridom) koji, prema Kurilichu i Juviku (1999.), objašnjava 88-97% varijacija, dok preostale varijacije uzrokuju vremenske prilike i lokacija.

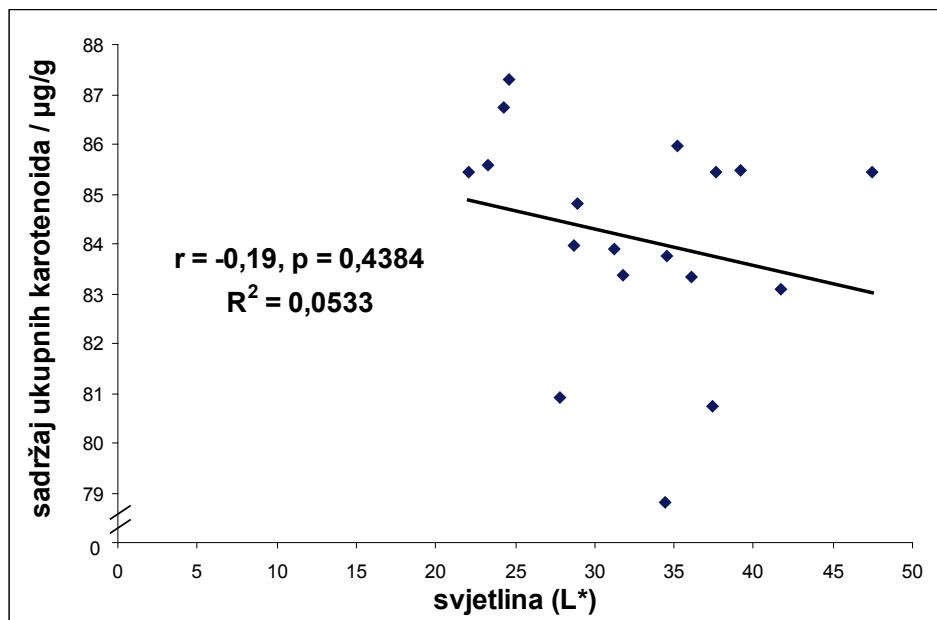
Tablica 1 – SREDNJE VRIJEDNOSTI I STANDARDNE DEVIJACIJE SADRŽAJA UKUPNIH KAROTENOIDA IZRAŽENE KAO $\mu\text{g } \beta\text{-KAROTENA/g}$ UZORKA I PARAMETARA BOJE L^* , a^* i b^* ZRNA 18 Bc HIBRIDA KUKURUZA

Hibrid <i>Hybrid</i>	Sadržaj karotenoida <i>Carotenoid content</i> ($\mu\text{g/g}$) ^a	L^*	a^*	b^*
Bc 244	34,57 ± 0,28	83,76 ± 0,39	-0,22 ± 0,07	39,30 ± 0,24
Bc 282	24,48 ± 0,16	78,81 ± 0,35	2,62 ± 0,07	33,68 ± 0,45
Bc 288 b	24,25 ± 0,49	86,72 ± 0,08	-1,29 ± 0,05	32,24 ± 0,21
Bc 304	28,75 ± 0,47	83,96 ± 0,10	0,09 ± 0,05	33,37 ± 0,68
Bc 354	27,77 ± 0,71	80,90 ± 0,26	2,30 ± 0,03	30,63 ± 0,32
Bc 394	22,13 ± 0,38	85,45 ± 0,14	-0,10 ± 0,05	31,91 ± 0,36
Bc 408 b	13,31 ± 0,47	85,58 ± 0,16	0,46 ± 0,10	29,89 ± 0,28
Bc 418 b	31,84 ± 0,82	83,36 ± 0,66	0,51 ± 0,13	33,06 ± 0,28
Bc 462	31,27 ± 0,63	83,91 ± 0,25	-1,16 ± 0,08	37,86 ± 0,51
Bc 462 b	36,04 ± 0,58	83,33 ± 0,27	0,81 ± 0,05	39,02 ± 0,65
Bc 4982	35,18 ± 0,22	85,97 ± 0,19	-1,19 ± 0,03	33,46 ± 0,66
Bc 566	28,92 ± 0,69	84,82 ± 0,09	0,27 ± 0,04	30,98 ± 0,11
Bc 572	41,70 ± 0,37	83,08 ± 0,37	1,12 ± 0,11	39,94 ± 0,65
Bc 5982	37,66 ± 0,35	85,43 ± 0,31	-1,08 ± 0,11	36,29 ± 0,68
Bc 666	39,14 ± 0,89	85,46 ± 0,17	-1,08 ± 0,13	34,49 ± 0,41
Bc 678	47,47 ± 2,18	85,44 ± 0,56	-0,29 ± 0,11	40,07 ± 0,57
Bc 778	24,63 ± 0,21	87,29 ± 0,36	-1,30 ± 0,08	32,21 ± 0,54
Pajdaš	27,45 ± 0,28	80,75 ± 0,25	2,54 ± 0,14	38,56 ± 0,18

^a Dobivene vrijednosti pri 100 % suhe tvari.

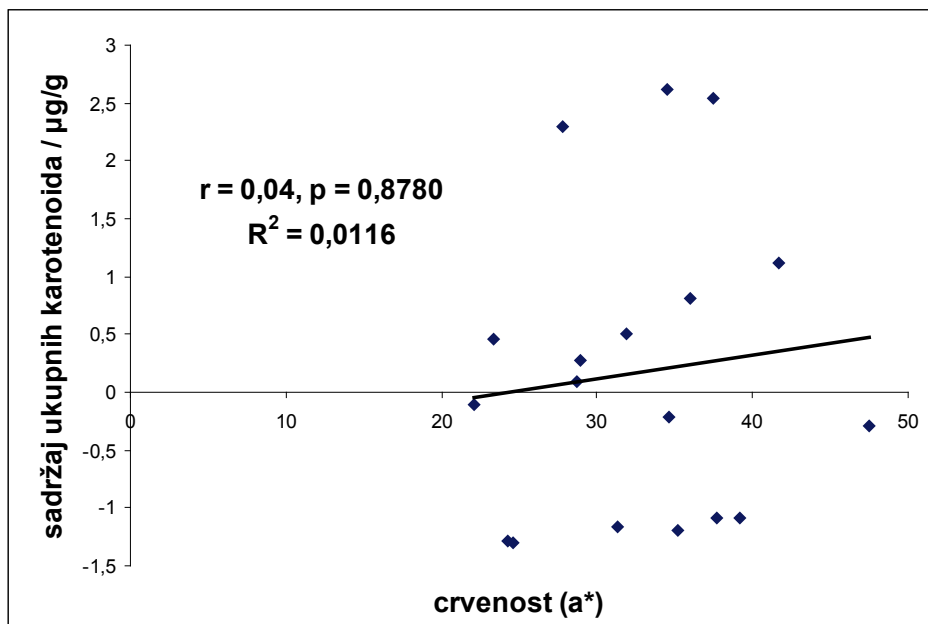
Vrijednosti parametara boje zrna 18 Bc hibrida kukuruza prikazani su u Tablici 1. Vrijednosti svjetline (L^*) 18 Bc hibrida iznosile su od 78,81 (Bc 282) do 87,29 (Bc 778). Dobiveni rezultati se slažu s rezultatima Lozano-Alejo i sur. (2007.). Nije pronađena signifikantna korelacija između sadržaja ukupnih karotenoida i svjetline zrna hibrida kukuruza (grafički prikaz na slici 1).

Slika 1 – OVISNOST SADRŽAJA UKUPNIH KAROTENOIDA IZRAŽENIH KAO $\mu\text{g } \beta\text{-KAROTENA/g}$ UZORKA I SVJETLINE (L^*) ZA 18 ANALIZIRANIH Bc HIBRIDA



Raspon dobivenih vrijednosti crvenosti (a^*) je iznosio od -1,3 (Bc 778) do 2,62 (Bc 282). Veće vrijednosti crvenosti daju hibridi crvenog perikarpa. Osim navedenog Bc 282 to su još hibridi Bc 354 i Pajdaš. Nije pronađena signifikantna korelacija između sadržaja ukupnih karotenoida i crvenosti zrna hibrida kukuruza (grafički prikaz na slici 2).

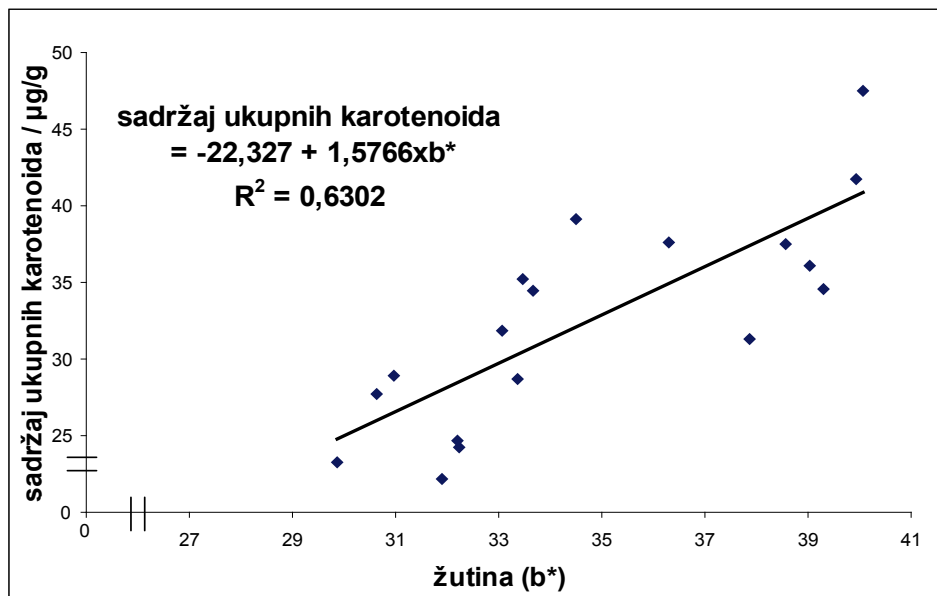
Slika 2 – OVISNOST SADRŽAJA UKUPNIH KAROTENOIDA IZRAŽENIH KAO $\mu\text{g } \beta\text{-KAROTENA/g}$ UZORKA I CRVENOSTI (a^*) ZA 18 ANALIZIRANIH Bc HIBRIDA



Vrijednosti intenziteta žutosti razlikuju se za 18 Bc hibrida, a raspon dobivenih vrijednosti analiziranih hibrida iznosio je od 29,87 (Bc 408 b) do 40,07 (Bc 678). Vrijednosti žutine signifikantno ($P < 0,001$) i pozitivno koreliraju sa sadržajem ukupnih karotenoida ($r = 0,79$). Naime, žuti lutein i zeaksantin najviše određuju boju jer su najzastupljeniji (78,16%) karotenoidi u zrnu kukuruza (Brenna i Berardo, 2004.).

Pozitivna korelacija se slaže s istraživanjem Lozano-Aleje i sur. (2007.). Na temelju dobivene pozitivne korelacije može se zaključiti da se prema intenzitetu žutoće određenom prema CIELab može procijeniti sadržaj ukupnih karotenoida u zrnu hibrida kukuruza. Ovisnost sadržaja ukupnih karotenoida o žutosti može se opisati regresijskim pravcem: sadržaj ukupnih karotenoida ($\mu\text{g/g}$) = $-22,33 + 1,577 \times b^*$ ($p < 0,001$, $R^2 = 0,63$), a regresijski pravac je prikazan slikom 3.

Slika 3 – OVISNOST SADRŽAJA UKUPNIH KAROTENOIDA IZRAŽENIH KAO $\mu\text{g } \beta\text{-KAROTENA/g}$ UZORKA I ŽUTINE (b^*) ZA 18 ANALIZIRANIH Bc HIBRIDA



Zaključak

Žuta boja zrna kukuruza povezana je sa sadržajem karotenoida – pigmentata koje perad koristi za pigmentaciju ali i očuvanje zdravlja. Intenzitet žutine zrna kukuruza, određen prema CIELab sustavu, uporabom kolorimetra može dobro procijeniti sadržaj ukupnih karotenoida. Primjenom ovog mjerenja u praksi na jednostavan i jeftin način može se odrediti koji je hibrid kukuruza prikladniji kao izvor karotenoidnih pigmentata za perad.

LITERATURA

1. Adom K. K., R. H. Liu (2002.): Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6182-6187.
2. Blessin, C. W., J. D. Brecher, R. J. Dimler (1963.): Carotenoids of corn and sorghum V. Distribution of xanthophylls and carotenes in hand-dissected and dry-milled fractions of yellow-dent corn. *Cereal Chem.* 40, 582-586.
3. Breithaupt D. E. (2007.): Modern application of xanthophylls in animal feeding – a review. *Trends Food Sci. Tech.* 18, 501-506.
4. Brenna, O. V., N. Berardo (2004.): Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to the evaluation of carotenoids in content in maize. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5577-5582.
5. CIE (1976.): Supplement No.2 to CIE Publication No. 15 (E-1.3.1) 1978, 1971/(TC-1- 3). Recommendations on uniform color spaces-color difference equations, Psychrometric Color Terms. Commission Internationale de l'Éclairage, Pariz
6. Egesel C. O., J. C. Wong, R. J. Lambert, T. R. Rocheford (2003.): Combining ability of maize inbreds for carotenoids and tocopherols. *Crop. Sci.* 43, 818-823.
7. Hulshof P. J. M., T. Kosmeijer-Schuil, C. E. West, P. C. H. Hollman (2007.): Quick screening of maize kernels for provitamin A content. *J. Food Comp. Anal.* 20, 655-661.
8. Kopsell D. A., D. E. Kopsell (2006.): Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *Trends Plant. Sci.* 11, 499-507.
9. Kurilich A. C., J. J. Juvik (1999.): Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in Zea Mays. *J. Agric. Food Chem.* 47 1948-1955.
10. Lozano-Alejo N., G. Yazquez Carrillo, K. Pixley, N. Palacios-Rojas (2007.): Physical properties and carotenoid content of maize kernels and its nixtamalized snacks. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* 8, 385-389.
11. Olson J.A. (1996.): Biochemistry of vitamin A and carotenoids. 221-250. U: Vitamin A deficiency: health, survival and vision. Oxford University Press, New York, USA
12. Perez-Vendrell A. M., J. M. Hernandez, L. Llaurodo, J. Schierle, J. Brufau (2001.): Influence of source and ratio of xanthophyll pigments on broiler chicken pigmentation and performance. *Poult. Sci.* 80, 320-326.
13. SAS (2003.): OnlineDoc® Software Release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

ESTIMATION OF CAROTENOID CONTENT FROM COLOUR ANALYSIS OF CORN GRAINS

Summary

The colour of egg yolk and poultry skin or flesh is a very important factor influencing the consumers' quality perception. Carotenoid pigments which are associated with poultry growth metabolism and fertility are deposited in skin or egg yolk. Yellow corn is the only cereal with substantial carotenoid content. Also, yellow corn is the most important nutrient in poultry nutrition in Croatia and therefore an important source of pigments for poultry pigmentation. Carotenoids are located in the grain endosperm and they are responsible for the yellow colour of the grains. Chemical determination of carotenoids is often expensive and time-consuming and therefore inapplicable in practice. The aim of this research was to determine the relationship between the colour shade, according to the CIELab system, and the total carotenoid content in grains of 18 corn hybrids. Corn grain carotenoids were extracted with hexane and quantified using the extinction coefficient of β -carotene in hexane. The corn grain colour was measured with Chroma Meter Cr-410 (Minolta, Japan). The average carotenoid content was $33.16\mu\text{g } \beta\text{-carotene/g}$ (range from 22.13 to $47.47\mu\text{g/g}$). Average values of colour parameters L^* , a^* and b^* were 84.11 (78.81-87.29), 0.17 (-1.30-2.62) and 34.83 (29.87-40.07), respectively. Only yellowness (b^*) correlated significantly ($P < 0.001$) positive ($r = 0.79$) with the carotenoid content in corn grains. According to the given data, the intensity of yellowness of corn grain determined as CIELab parameter b^* could estimate its carotenoid content (carotenoid content ($\mu\text{g/g}$) = $-22.33 + 1.577b^*$, $p < 0.001$, $R^2 = 0.63$).

Key words: corn grain, carotenoids, colour

Primljeno: xx.x.xxxx.