Vlakna jabuke kao nositelji fenolnih i hlapljivih komponenata soka kupine

Nosić, Mario

Professional thesis / Završni specijalistički

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:343048

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna

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

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Mario Nosić

VLAKNA JABUKE KAO NOSITELJI FENOLNIH I HLAPLJIVIH KOMPONENATA SOKA KUPINE

SPECIJALISTIČKI RAD

Osijek, travanj, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

SPECIJALISTIČKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Poslijediplomski specijalistički studij Nutricionizam
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za tehnologiju voća i povrća
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam
Nastavni predmet: Nutricionist i nove tehnologije
Tema rada je prihvaćena na IV. (četvrtoj) redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek za akademsku godinu 2020./2021. održanoj 29. 01. 2021. godine.
Mentor: prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Vlakna jabuke kao nositelji fenolnih i hlapljivih komponenata soka kupine

Mario Nosić, 0113013495 107-N/2019

Sažetak:
U radu je ispitivana mogućnost primjene vlakana jabuke kao nositelja fenolnih i hlapljivih komponenti soka kupine. Prilikom pripreme kompleksa, udio vlakna se je mijenjao (1 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 % i 10 %) dok je udio soka kupine bio konstantan. Na dobivenim kompleksima određeni su fenoli, antocijani, antioksidacijska aktivnost, parametri boje, hlapljive kompnente te su snimljeni IR spektri. S povećanjem udjela vlakna jabuke došlo je do smanjenja adsorpcije fenolnih komponenata a isti trend je utvrđen za vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Udio ukupnih terpena se je smanjivao a udio ukupnih karbonilnih spojeva povećavao s povećanjem udjela vlakna. Ujedno je ispitivan utjecaj dodatka disaharida prilikom kompleksiranja vlakana i soka kupine na adsorpciju fenolnih i hlapljivih komponenti. Korišteni su saharoza i trehaloza u omjeru vlakna:disaharid 1:0,5, 1:1 i 1:2. Adsorpcija ukupnih fenola na vlakna se je smanjila dodatkom disaharida u odnosu na vlakna bez dodatka disaharida. Pozitivan utjecaj dodatka disaharida utvrđen je za hlapljive komponente s time da je trehaloza imala veći učinak u odnosu na saharozu. Na temelju rezultata ovog istraživanja dokazano je da se vlakna jabuke mogu koristiti kao nositelji fenolnih i hlapljivih komponenti soka kupine te da se tako dobiveni kompleksi mogu koristiti kao dodatci hrani.

Ključne riječi: vlakna jabuke, fenoli, hlapljive komponente, sok kupine, disaharidi

Rad sadrži: 95 stranica
17 slika
16 tablica
0 priloga
156 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu specijalističkog rada:

1.	prof. dr. sc. Daniela Čačić Kenjerić	predsjednik
2.	prof. dr. sc. Mirela Kopjar	član - mentor
3.	izv. prof. dr.sc. Anita Pichler	član
4.	prof. dr. sc. Ivica Strelec	zamjena člana

Datum obrane: 7. travnja 2021.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek te u elektroničkom (pdf format) obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

POSTGRADUATE SPECIALIST THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Postgraduate specialist study Nutrition
Department of food technologies
Subdepartment of fruits and vegetables technology
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Nutrition science
Course title: Nutritionist and New Technologies
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IV (four) held on January, 29, 2021.
Mentor: Mirela Kopjar, PhD, prof.

Apple fibers as delivery systems of phenolic and volatile compounds of blackberry juice

Mario Nosić, 0113013495 107-N/2019

Summary:
The aim of this work was to explore possibility of application of apple fibres as delivery systems of phenolics and volatile compounds of blackberry juice. Throughout preparation of complexes, amount of fibres varied (1%, 2%, 4%, 6%, 8% and 10%) and amount of blackberry juice was constant. Obtained complexes were evaluated for phenolics, anthocyanins, antioxidant activity, colour parameters and amount of volatiles. IR spectra were recorded as well. With the increase of apple fibres decrease of phenolic compounds was observed and antioxidant activity values followed the same trend. Total amount of terpenes decreased while total amount of carbonyls increased with the increase of amount of apple fibres during complexation. In addition, investigation of the effect of disaccharides throughout complexation of fibres and blackberry juice on adsorption of phenolics and volatiles was conducted. Sucrose and trehalose were used in ratio fibre:disaccharide 1:0.5, 1:1 and 1:2. Adsorption of total phenolics decreased with the addition of disaccharides in comparison to fibre without disaccharides. Positive effect of disaccharides were recorded for volatiles with trehalose having higher positive effect than sucrose. Results of this research showed that apple fibres can be used as delivery systems of phenolics and volatiles of blackberry juice and obtained complexes can be used as food additives.

Key words: apple fibers, phenolics, volatile compounds, blackberry juice, dissacharides

Thesis contains: 95 pages
17 figures
16 tables
0 supplements
156 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Daniela Čačić Kenjerić*, PhD, prof.	chair person
2.	*Mirela Kopjar*, PhD, prof.	supervisor
3.	*Anita Pichler*, PhD, associate prof.	member
4.	*Ivica strelec*, PhD, prof.	stand-in

Defense date: April 7th, 2021

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, and electronic version in Citing and University Library Osijek

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Mireli Kopjar na izrazitoj susretljivosti, pomoći i podršci tijekom izrade ovog specijalističkog rada.

Zahvaljujem se prijateljima na velikoj podršci, razumijevanju i pomoći koju su mi pružali tijekom poslijediplomskog specijalističkog studija, a posebno prijateljici Ivani Šuvak-Pirić.

Specijalistički rad je izrađen u sklopu projekta PZS-2019-02-1595.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 4

2.1. POLIFENOLI KUPINE 5

2.2. UTJECAJ POLIFENOLA KUPINA NA ZDRAVLJE 17

2.3. AROMATSKE KOMPONENTE KUPINE 19

2.4. PREHRAMBENA VLAKNA 20

2.4.1. Uloga prehrambenih vlakana u prevenciji i liječenju bolesti 21

2.4.2. Interakcije vlakana s fenolima 26

2.4.3. Primjena prehrambenih vlakana u razvoju novih proizvoda 32

2.5. ŠEĆERI 33

2.5.1. Saharoza 34

2.5.2. Trehaloza 35

3. EKSPERIMENTALNI DIO 41

3.1. ZADATAK 42

3.2. MATERIJALI I METODE 44

3.2.1. Materijali 44

3.2.2. Priprema bioaktivnih dodataka hrani 44

3.2.3. Metode 46

3.2.3.1. Ekstrakcija uzoraka 46

3.2.3.2. Određivanje ukupnih fenola 46

3.2.3.3. Određivanje proantocijanidina 46

3.2.3.4. Određivanje fenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti 47

3.2.3.5. Inhibicija α-amilaze 47

3.2.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti 48

3.2.3.7. Određivanje parametara boje 48

3.2.3.8. FTIR-ATR analiza 49

3.2.3.9. Određivanje hlapljivih komponenata 49

3.2.3.10. Statistička analiza podataka 50

4. REZULTATI I RASPRAVA 51

4.1. BIOAKTIVNI DODATCI HRANI NA BAZI VLAKNA JABUKE 52

4.2. BIOAKTIVNI DODATCI HRANI NA BAZI VLAKNA JABUKE I DISAHARIDA 62

5. ZAKLJUČCI 76

6. LITERATURA 80

1. UVOD

Zahtjevi potrošača za funkcionalnim prehrambenim proizvodima koji imaju odgovarajuću nutritivnu vrijednost ali i pozitivan učinak na zdravlje su jedan od rastućih trendova u svijetu. U cijelom svijetu od zdravstvenih problema najviše se ističu kardiovaskularne bolesti, karcinomi, neurodegenerativne bolesti i dijabetes. Drugi rastući trend je povećanje zahtjeva potrošača za prikladnim proizvodima koji pojednostavljuju pripremu obroka i njegovu konzumaciju i omogućuju „healthy snacking“ u i van kuće. Ovaj trend je posebice potaknut modernim i brzim načinom života, stoga se znanstvenici sve više fokusiraju na razvoj novih dodataka hrani s potencijalnim pozitivnim učinkom na zdravlje. S druge strane, potrebna su dodatna istraživanja usmjerena na utjecaj tih dodataka na kvalitetu proizvoda u koji se dodaju (Lila i sur., 2017, Bordenave i sur., 2014, Ozdal i sur., 2013).

Prehrambena vlakna i fenolni spojevi su komponente s prepoznatim pozitivnim djelovanjem na ljudsko zdravlje te se iz tog razloga sve više koriste kao dodatci za pripremu funkcionalnih proizvoda (Quirós-Sauceda i sur., 2014a). Prehrana bogata prehrambenim vlaknima pomaže u poboljšanju zdravlja gastrointestinalnog sustava kao i u prevenciji i terapiji pojednih kardiovaskularnih bolesti te nekih vrsta karcinoma. Također, prehrambena vlakna imaju i hipoglikemijski učinak, tj. pomažu u terapiji dijabetesa tipa 2 (Mandić i Nosić, 2009). Prehrana bogata fenolnim spojevima također pomaže u prevenciji karcinoma i nekih kroničnih bolesti, npr. kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tipa 2 (Quirós-Sauceda i sur., 2014a; Fraga i sur., 2019). Uočeno je da pozitivno djelovanje polifenolnih komponenata na zdravlje kardiovaskularnog sustava proizlazi i iz njihovog međudjelovanja sa ostalim bioaktivnim komponentama, a jedna od njih su i prehrambena vlakana (Fraga i sur., 2019). Prehrambena vlakna i fenolni spojevi su različite strukture te su se donedavno proučavali odvojeno. Kemijske interakcije između ovih komponenata i njihov utjecaj na kvalitetu proizvoda te bioraspoloživost fenola doprinose važnosti istraživanja ove tematike (Quirós-Sauceda i sur., 2014a), a novim spoznajama o interakciji vlakana i fenola teži se doprinijeti i ovim istraživanjem.

Cilj ovog specijalističkog rada bio je utvrditi mogućnost primjene vlakana jabuke kao nositelja polifenolnih komponenti soka kupine odnosno kreiranje bioaktivnih dodataka hrani na bazi vlakana jabuke. Istraživanje je podijeljeno u dva djela. U prvom dijelu pripremljeni su bioaktivni dodatci hrani na bazi vlakana jabuke i soka kupine odnosno kompleksi vlakna/kupina a u drugom dijelu bioaktivni dodatci hrani na bazi vlakana jabuke, disaharida i

soka kupine odnosno kompleksi vlakna/disaharid/kupina. Dobiveni kompleksi mogli bi se koristiti kao bioaktivni dodatci u prehrambene proizvode s ciljem pripreme funkcionalnih proizvoda odnosno obogaćivanja proizvoda fenolima, antocijanima odnosno komponentama s antioksidacijskim djelovanjem ali i vlaknima. Ujedno bi te komponente zbog svog antioksidacijskog potencijala mogle spriječiti određene degradacijske reakcije u proizvodu kao što su npr. reakcije oksidacije koje uzrokuju smanjenje kvalitete konačnog proizvoda. Navedeni izvor fenola odnosno sok kupine bogat je antocijanima, tako da bi dobiveni bioaktivni dodatci imali i utjecaj na boju proizvoda u koji su dodani. Sok kupine je bogat i hlapljivim komponentama odgovornima za aromu, te je pretpostavka da će se paralelno uz fenole na vlakna jabuke vezati i hlapljive komponente. Sveukupno gledajući, navedeni bioaktivni dodatci imali bi utjecaj i na nutritivnu vrijednost proizvoda ali i na senzorske karakteristike. Ujedno bi ovo istraživanje doprinijelo i proširenju znanja vezano za interakcije između vlakana i fenola odnosno vlakana, disaharida i fenola što bi moglo biti korisno u istraživanjima bioraspoloživosti fenola u probavnom sustavu.

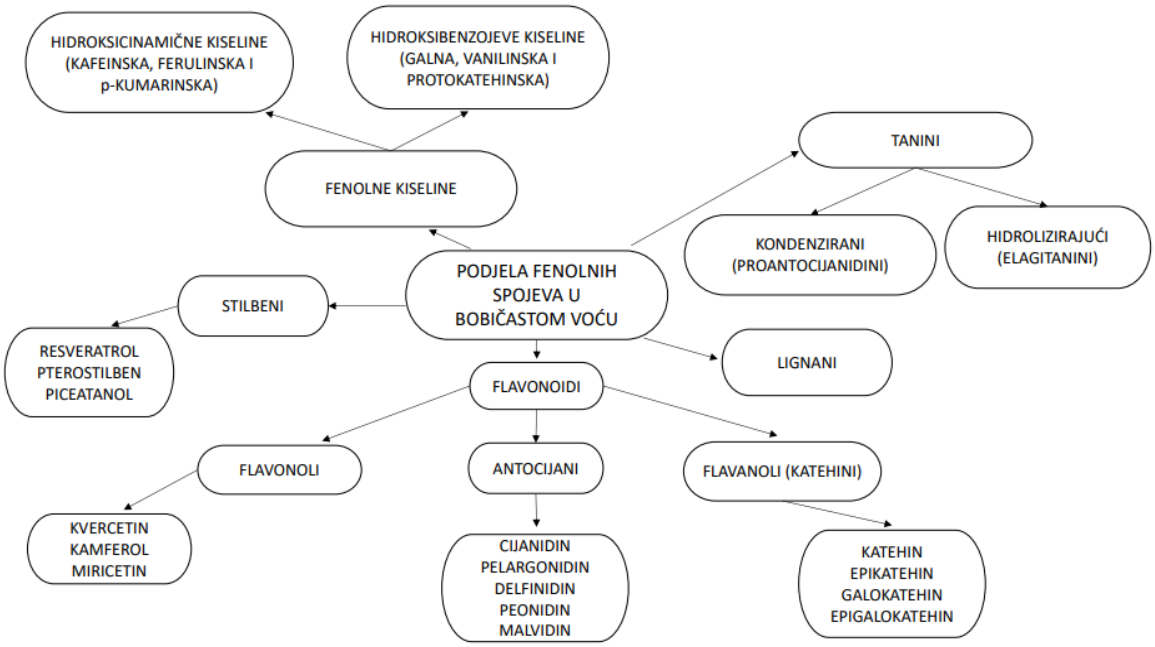
2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIFENOLI KUPINA

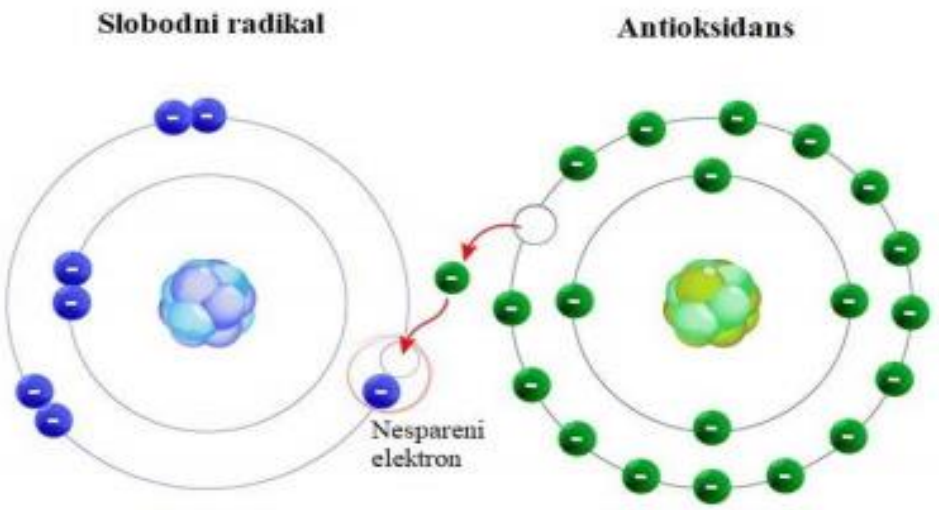
Kupine pripadaju porodici *Rosaceae* i rodu *Rubus*, a najpoznatijom vrstom se smatra *Rubus fruticosus* (Neilson i Ferruzzi, 2013). Plod kupine sadrži veliki broj organskih i anorganskih tvari koje mu daju veliku hranjivu, ljekovitu i zaštitnu vrijednost. Međutim sadržaj ovih tvari u plodu kupine može znatno varirati što ovisi o više čimbenika a naročito o nasljednim osobinama sorte, stupnju zrelosti plodova, ekološkim uvjetima područja, klimatskim prilikama po godinama, obilnosti uroda i drugo. Hranjiva vrijednost ploda kupine može se najbolje ocijeniti na temelju podataka o sadržaju važnijih kemijskih sastojaka u plodu većeg broja sorti iz različitih ekoloških uvjeta uzgoja. Kada se analiziraju podaci o kemijskom sastavu ploda kupine, može se zaključiti da je sadržaj hranjivih tvari u njima dosta visok. Plod kupine ima malu energetsku vrijednost. Utvrđeno je da energetska vrijednost 100 g svježih plodova kupine iznosi 43 kcal (Kaume i sur., 2012). Kemijski sastav kupine je prikazan u **Tablici 1**. Probavni metaboliti koji su porijeklom iz divljih kupina, u količinama koje se mogu pronaći u ljudskoj plazmi, mogu zaštititi živčane stanice od oksidacijskih oštećenja koja značajno doprinose neurodegenerativnim bolestima. Također mogu djelovati protuupalno, štititi od kardiovaskularnih bolesti te od različitih vrsta karcinoma. Biološki aktivni spojevi (**Slika 1**) koji se nalaze u značajnim količinama u kupinama (npr. fenolni spojevi, flavonoidi, flavonoli, antocijani, tanini i askorbinska kiselina) mogu se koristiti za pripremu dodatakta za proizvodnju funkcionalnih proizvoda kako bi se poboljšala njihova biološka vrijednost (Neilson i Ferruzzi, 2013; Skrovankova i sur., 2015). Poboljšanje biološke vrijednosti proizvoda proizlazi i iz činjenice što biološki aktivni spojevi mogu djelovati kao jaki antioksidansi. Biološki aktivni spojevi imaju veliko značenje za nutricioniste i prehrambene tehnologe jer se mogu koristiti kao funkcionalni sastojci hrane (Skrovankova i sur., 2015).

Tablica 1 Kemijski sastav kupina prema američkoj poljoprivrednoj bazi nutrijenata (Kaume i sur., 2012)

Energetska vrijednost	kcal	43,00
NUTRIJENT	**MJERNA JEDINICA**	**VRIJEDNOST**
Voda	g	88,20
Proteini	g	1,39
Ukupni lipidi	g	0,49
Pepeo	g	0,37
Ugljikohidrati	g	9,61
Ukupna prehrambena vlakna	g	5,30
Ukupni šećeri	g	4,88
Saharoza	g	0,07
Glukoza	g	2,31
Fruktoza	g	2,40
Maltoza	g	0,07
Galaktoza	g	0,03
Minerali		
Kalcij	mg	29,00
Željezo	mg	0,62
Magnezij	mg	20,00
Fosfor	mg	22,00
Kalij	mg	162,00
Natrij	mg	1,00
Cink	mg	0,53
Bakar	mg	0,17
Mangan	mg	0,65
Selen	mg	0,40
Vitamini		
Ukupna askorbinska kiselina	mg	21,00
Tiamin	mg	0,02
Riboflavin	mg	0,03
Niacin	mg	0,65
Pantotenska kiselina	mg	0,28
Vitamin B_6	mg	0,03
Ukupni folati	µg	25,00
Vitamin A	IU	214,00
α-tokoferol	mg	1,17
β-tokoferol	mg	0,04
ϒ-tokoferol	mg	1,34
δ-tokoferol	mg	0,90
Vitamin K	µg	19,80



Slika 1 Podjela fenolnih spojeva u bobičastom voću (Azofeifa, 2014)



Slika 2 Mehanizam djelovanja antioksidansa (Nanić, 2018)

Nastajanje reaktivnih vrsta kisika i oksidacijski stres su povezani s ozljedama tkiva i mnogim patološkim procesima, uključujući septički šok. To je dovelo do kliničkih pokušaja reguliranja stvaranja reaktivnih vrsta kisika i oksidacijskog stresa. Osnovna pretpostavka je da reaktivne vrste kisika napadaju slučajno i bez razlike važne kemijske puteve te uzrokuju degeneraciju stanice ili staničnu smrt, no postalo je jasno i to da reaktivne vrste kisika mogu djelovati i kao

važne signalne molekule pod raznim fiziološkim i patofiziološkim uvjetima. Iako su reaktivne vrste kisika vrlo toksične također su i esencijalni faktori u normalnom metabolizmu. U aerobnim organizmima gubitak elektrona se odvija na nosačima elektrona kao što je NAD^+ (nikotinamid adenin dinukleotid) i flavini koji se reduciraju u procesu primanja elektrona od ciljanih molekula i reoksidiraju doniranjem elektrona kisiku u oksidacijskoj fosforilaciji. Reaktivne vrste kisika nisu „pravi" radikali jer nemaju nesparene elektrone. Primjeri za reaktivne vrste kisika su vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloritna kiselina (HOCl), ozon (O_3), (Magder, 2006), superoksidni anion (O_2^-) i hidroksil radikal ($OH^\bullet$). Reaktivne vrste kisik se sastoje od radikalskih i neradikalskih vrsta kisika koje su nastale djelomičnim reduciranjem kisika. Kada reaktivne vrste kisika „preplave" stanični antioksidacijski obrambeni sustav bilo kroz porast razine reaktivnih vrsta kisika ili smanjenje staničnog antioksidacijskog kapaciteta pojavljuje se oksidacijski stres. Oksidacijski stres dovodi do oštećenja nukleinskih kiselina, lipida, proteina i lipida (Ray i sur., 2012), te je uključen u različite procese poput karcinogeneze (Ray i sur., 2012), neurodegeneracije (Ray i sur., 2012; Forrester i sur., 2018), aterosklerozu (Ray i sur., 2012; Forrester i sur., 2018), dijabetes (Ray i sur., 2012; Azofeifa i sur., 2016; Forrester i sur., 2018) i starenje (Ray i sur., 2012). Biološki antioksidansi se definiraju kao tvari koje su prisutne u niskim koncentracijama u usporedbi sa supstratom podložnim oksidaciji, i koje značajno štite i usporavaju oksidaciju suspstrata (Poljsak i sur., 2013). Slobodni radikali se mogu neutralizirati antioksidansima, odnosno spojevima koji mogu donirati elektrone i na taj način neutralizirati slobodne radikale u stanici (**Slika 2**) (Antolovich i sur., 2002).

Opći endogeni antioksidacijski sustav se sastoji od enzimskih antioksidansa (kao što je superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, tiredoksin), hidrofilnih antioksidansa (kao što su urat, askorbat, glutation i flavonoidi) i lipofilnih antioksidansa (kao što su tokoferol, karotenoidi i ubikvinol) (Webb, 2006). Antioksidansi se također mogu klasificirati i prema svom izvoru uključujući i endogenu sintezu na enzime, male molekule kao i egzogene tvari kao što su fenoli, flavonoidi, fenolne kiseline, karotenoidi, vitamini i minerali (He i sur., 2017).

Kupine imaju visoku antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ostalim voćem zbog visokog sadržaja fenolnih spojeva kao što su antocijani, elagična kiselina, tanini, elagitanini, cijanidini, kvercetin i galna kiselina. Reaktivne vrste kisika mogu uzrokovati oksidacijska oštećenja

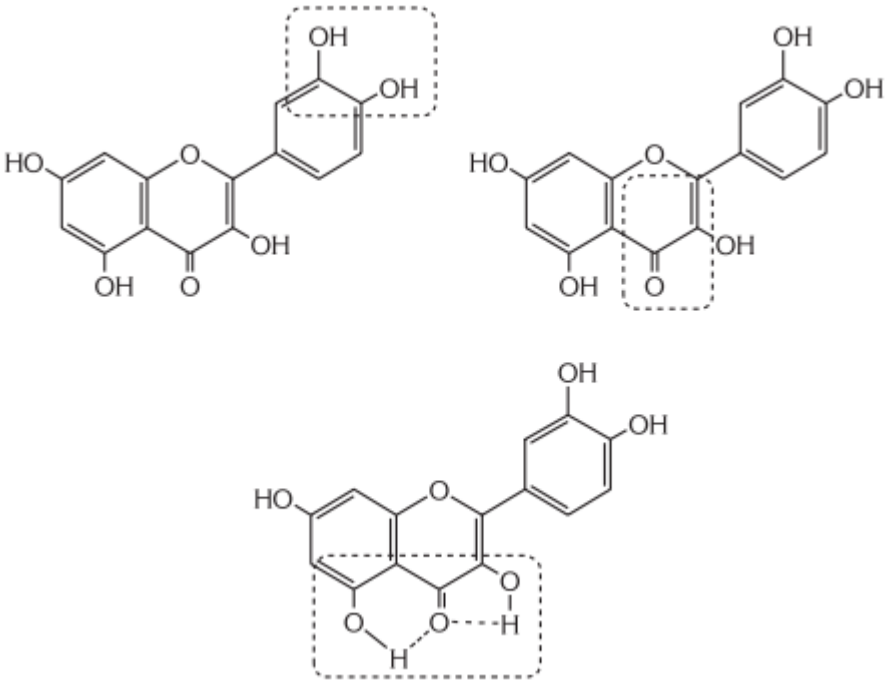
staničnih struktura i funkcionalnih molekula (npr. DNA, proteina i lipida). Kupine, zbog svoje izrazito visoke antioksidacijske aktivnosti (Sariburun i sur., 2010; Mitic i sur., 2014), mogu reducirati oksidacijski stres koji može dovesti do mnogih bolesti, a neke od njih su karcinom, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, Alzheimerova bolest kao i ostale neurodegenerativne bolesti. Mnogi antioksidansi imaju, u većoj ili manjoj mjeri, protuupalno, antiaterosklerotično, antiproliferativno, antitumorsko, antimutageno, antikancerogeno, antibakterijsko ili antivirusno djelovanje (Webb, 2006; Huang i sur., 2012). Uz fenolne spojeve za pozitivno djelovanje kupina na ljudsko zdravlje odgovorni su i vitamina C, vitamina K, folna kiselina, mangan i prehrambena vlakna (Huang i sur., 2012). Prema radikalnoj hipotezi kemoprevencije, kemopreventivne tvari (npr. polifenoli, selen) izazivaju oksidacijski stres koji navodi neoplastične (tj. maligno promijenjene) stanice i stanice tumora na apoptozu (tj. programiranu staničnu smrt) i stanica se raspada na fragmente okružene membranom. Oksidacijski stres je bitan kako bi došlo do kemoprevencije tako što se oslobađa citokrom c s membrane mitohondrija (Webb, 2006).

Već spomenuti fenolni spojevi čine široko rasprostranjenu heterogenu skupinu sekundarnih biljnih metabolita s fenolnom jezgrom u svojoj građi. Identificirano je više od 8000 ovih spojeva u biljkama. Fenolni spojevi su po svojoj strukturi vrlo različiti, od jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline do visokokondenziranih spojeva kao što su tanini. U prirodi, fenolni spojevi mogu biti slobodni ili u obliku glikozida. Glikozidi sadrže monosaharidne jedinice i aglikonski dio koji je zaslužan za biološku aktivnost polifenolnih spojeva (Pandey i Rizvi, 2009). Ova skupina spojeva je predmet mnogih istraživanja zbog svojih antioksidacijskih svojstava, velike zastupljenosti u prehrani te uloge u zaštiti od mnogih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom kao što su karcinom te neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti (Manach i sur., 2004).

Flavonoidi mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko mogućih načina. Najvažniji je kada djeluju kao „hvatači slobodnih radikala“ (**Slika 2 i 3**) i tako prekidaju lančanu reakciju slobodnog radikala (Kazazić, 2004; Azofeifa i sur., 2011). Glavne strukturne značajke flavonoida važne za sposobnost hvatanja radikala su (Kazazić, 2004):

1. *o*-hidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu koja daje stabilnost radikalu i omogućuje delokalizaciju elektrona;

2. 2,3 dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto-skupinom, što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B-prstena;
3. hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- koje osiguravaju vodikovu vezu s keto skupinom.

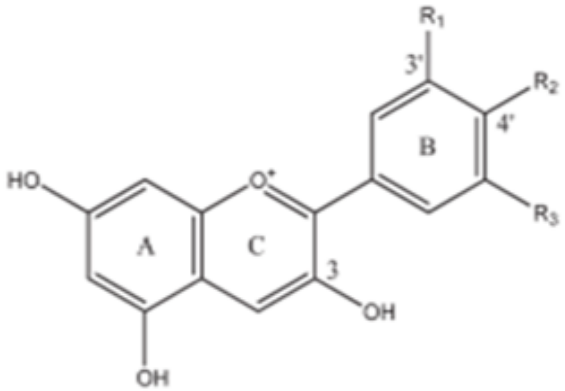


Slika 3 Strukturne skupine važne za hvatanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004)

U flavonoide ubrajamo antocijane, flavonole i flavanole (ili katehine) (Azofeifa, 2014). Antocijani su po kemijskoj strukturi polimetoksi i/ili polihidroksi flavilium soli koje se hidrolizom razgrađuju na antocijanidin (aglikon) i šećer (jedan ili više njih). U prirodi se javlja šest osnovnih tipova antocijanidina (pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin) koji se međusobno razlikuju prema broju i vrsti supstituenata na bočnom benzenskom prstenu (prstenu B) (**Slika 4**).

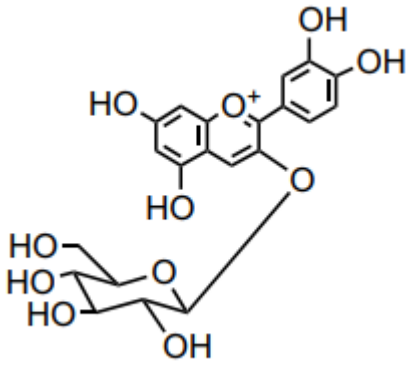
Šećerna komponenta antocijana je najčešće glukoza, ali može biti i galaktoza, ramnoza i ksiloza. Antocijani mogu biti acilirani, ali većina ih je neacilirana. Stabilnost antocijana se povećava aciliranjem, a sadržaj raste sa zrelošću kupina (De Man, 1999). Brojne studije su pokazale da se antocijani, u ljudima, apsorbiraju u svom glikoziliranom obliku. Osim voćem i povrćem značajan udio polifenolnih fitokemikalija (uključujući antocijane) unosi se i voćnim sokovima. U soku kupine pronađena je visoka koncentracija polifenola (1831 mg/L). HPLC metodom je utvrđeno da koncentracija cijanidin-3-glukozida u soku kupine iznosi 743,3

cijanidin-3-glukozid ekvivalenata mg/L (Jakobek i sur., 2007) pa se cijanidin-3-glukozid (**Slika 5**) smatra glavnim antocijanom u kupinama (Jakobek i sur., 2007; Lee, 2016).



Antocijanidin	R_1	R_2	R_3
Cijanidin	OH	OH	H
Pelargonidin	H	OH	H
Malvidin	OCH_3	OH	OCH_3

Slika 4 Kemijske strukture antocijanidina u kupinama (Kaume i sur., 2012)



Slika 5 Kemijska struktura cijanidin-*O*-3 glukozida (Ludwig, 2015)

Visoka antioksidacijska aktivnost kupina je najvjerojatnije povezana s visokim sadržajem fenolnih kiselina i flavonoida (kao što su antocijani), koji su pokazali jaku antioksidacijsku aktivnost u različitim modelnim sustavima (Pellegrini i sur., 2003) zbog svoje sposobnosti donacije elektrone i stabilizacije slobodnih radikala (Fidelis i sur., 2017). Od ukupnih

polifenolnih komponenata u soku kupine antocijani imaju znatan udio (40%) (Jakobek i sur., 2007). Sadržaj antocijana se kreće u rasponu od 28 do 366 mg/100 g za svježe kupine, od 975 do 1039 mg/100 g (suhe tvari) za sušene kupine i od 12 do 107 mg/100 mL u soku kupine (Lee, 2016). Ukupan sadržaj antocijana je različit u različitim stadijima zrenja kupina i povećava se od 2 do 4 puta u rasponu od nezrelog do prezrelog stadija kupina ali kvalitativno ima isti kemijski profil. Sadržaj antocijana (cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-rutionizid, cijanidin-3-arabinozid, pelargonidin-3-glukozid i peonidin-3-glukozid) je za oko 7 puta veći u potpuno zrelim kupinama. U konzerviranim proizvodima (kupine konzervirane u vodi ili u sirupu) značajne količine antocijana prelaze iz samih kupina u okolnu otopinu (od 21 % do 33 %) tijekom procesiranja i skladištenja (Skrovankova i sur., 2015). Proizvodi od kupine obično sadrže od 3 do 5 antocijana: cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3 rutinozid, cijanidin-3-ksilozid, cijanidin-3-malonil glukozid i cijanidin-3-dioksalil glukozid (a moguće i cijanidin-3-hidroksimetil-glutaroil glukozid) (Lee, 2016).

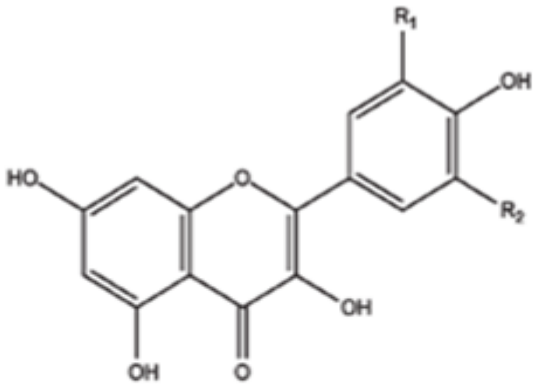
Neizbistreni i izbistreni sokovi kupine imaju gotovo jednak sadržaj antocijana dok je sadržaj elagitanina bio veći za 38,6 % u neizbistrenim sokovima (Sapers i sur., 1986; Fan-Chiang i Wrolstad, 2005; Hager i sur., 2008; Gancel i sur., 2011; Kopjar i Piližota, 2016). Sok kupine ima viši postotak cijanidin-3-*O*-glikozida (80 % do 91 % totalnih antocijanina) nego cijanidin-3-*O*-malonil glikozida, cijanidin-3-*O*-ksilozida i cijanidin-3-O-rutinozida (Serraino i sur., 2003; Jakobek i sur., 2007; Hassimotto i sur., 2008; Hager i sur., 2008; Gancel i sur., 2011; Acosta i sur., 2014; Kopjar i Piližota, 2016). Cijanidin-3-*O*-glikozid, kao najbrojniji cijanidin u soku kupine je utvrđen sa 90 mg/kg (Gancel i sur., 2011; Kopjar i Piližota, 2016). Istraživanje utjecaja faza procesiranja na bioaktivne komponente soka kupine pokazuje da sok kupine u odnosu na plod kupine ima manji sadržaj bioaktivnih komponenata. Tijekom proizvodnje soka kupine dolazi do smanjenja sadržaja ukupnih fenola (oko 45 %), elagitanina (70 % do 82 %) i antocijana (oko 67 %) (Hager i sur., 2008; 2010; Gancel i sur., 2011, Kopjar i Piližota, 2016). Praćenjem degradacije najvažnijih bioaktivnih komponenata soka kupine, kroz cjelokupan proces proizvodnje, sadržaj cijanidin-3-*O*-glikozida i cijanidin-3-*O*-malonil glikozida se smanjuje za 52 % i 64 %, a sadržaj lambertianina C i sanguina H-6 je smanjen za 80 % i 50 % (Gancel i sur., 2011; Kopjar i Piližota, 2016). Općenito se smatra da temperature iznad 60 °C mogu dovesti do gubitka fenolnih spojeva (Eskicioglu i sur., 2015). Konvencionalna toplinska obrada voćnih sokova uzrokuje značajnu redukciju sadržaja

antocijana, ali prevencija toplinske degradacije antocijana može se postići dodatkom šećera naročito trehaloze i glukoze (Kopjar i Piližota, 2011) te biljnih ekstrakata (Kopjar i sur., 2011).

Tablica 2 Pregled antocijanina, flavonola i elagitanina u kupinama (Kaume i sur., 2012)

Antocijani	Flavonoli	Elagitanini
Cijanidin-3-galaktozid	Kvercetin 3-galaktozid	Sanguin H-6
Cijanidin-3-glukozid	Kvercetin 3-glikozid	Lambertianin C
Cijanidin-3-arabinozid	Kvercetin 3-rutinozid	Pedunkulagin
Cijanidin-3-ksilozid	Kvercetin 3-ksilozilglukuronid	Lambertianin D
Mlavidin-3-arabinozid	Kvercetin 3-glikozilpentozid	Galolil-bis-HHDP glukoza
Pealrgonidin-3-glikozid	Kamferol 3-glukuronid	Sanguin H-10 izomer (2)
Cijanidin-3-rutinozid	Kamferol 3-glikozid	Sanguin H-6 bez galne kiseline
Cijanidin-3-soforozid	Kamferol 3-galaktozid	Lambertianin C bez elagične kiseline (4)
Cijanidin-3-glikozilrutinozid	Kamferol 3-ksilozilglukuronid	Galoil-HHDP glukoza
Cijanidin3-(3-malonil)glikozid	Kvercetin 3-glukuronid	Sanguin H-2
Cijanidin3-(6-malonil)glikozid	Kvercetin3-*O*-[6-(3-hidroksi-3-metil-glutaroil)-β-D-galaktozid miricetin]	Sanguin H-6 sa galnom kiselinom
	Kvercetin 3-metoksiheksozid	Kastalagin/veskalagin
	Kvercetin 3-oksalilpentozid	Elagična kiselina
		Konjugat metilelagične kiseline i pentoza (2)

Flavonoli **(Slika 6 i Tablica 2)** su gradivne jedinice proantocijana. Najproučavaniji flavonoli su kamferol, kvercetin, miricetin i fisetin (Panche i sur., 2016). Sadrže dvostruku vezu između drugog i trećeg ugljikovog atoma, hidroksilnu skupinu na trećem ugljikovom atomu. Najčešći flavonoli u bobičastom voću su kvercetin, miricetin i kamferol. Glavna razlika je broj hidroksilnih skupina na trećem i petom ugljikovom atomu. Šećeri, koji se obično nalaze vezani na trećem ugljikovom atomu, su glukoza i galaktoza, ali arabinoza, ramnoza, rutinoza i ksiloza se također mogu pojaviti. Flavonoli se u kupinama javljaju uglavnom u glikoziliranom obliku. Kupine imaju složeni profil flavonola zbog pojave 9 kvercetinskih i 3 kamferolna derivata kao i zbog dva acilirana spoja dobivena od kvercetina (Kaume i sur., 2012). Količina flavonola se smanjuje za polovicu u potpuno zrelim kupinama u usporedbi s nezrelim kupinama (Skrovankova i sur., 2015).



Flavonol	R_1	R_2
Kvercetin	OH	H
Kamferol	H	H
Miricetin	OH	OH

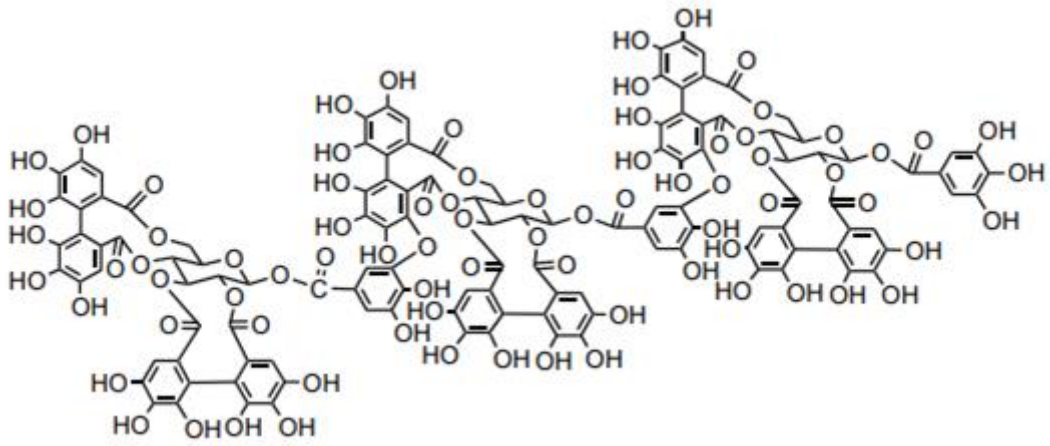
Slika 6 Kemijske strukture flavonola u kupinama (Kaume i sur., 2012)

Flavanoli (ili katehini) su jedina skupina flavonoida koja se prirodno ne javlja u obliku glikozida. Flavanolni monomeri, kao što su katehin i epikatehin, su relativno malo zastupljeni u bobičastom voću (0 - 25 mg/100 g) te se u puno većim količinama javljaju u kakau i zelenom čaju (34 - 564 mg/jedinica serviranja). U kupinama je koncentracija katehina manja od 1 mg/100 g, ali epikatehin se javlja u većoj koncentraciji od 1 do 18 mg/100 g (Azofeifa, 2014).

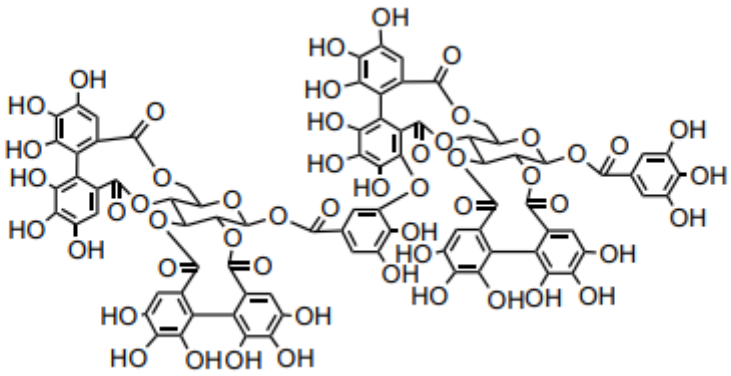
Fenolne kiseline u kupinama su uglavnom hidroksibenzojeve i hidroksicinamične kiseline. Te kiseline se javljaju u obliku estera i rijetko su slobodne. U ukupnom sadržaju fenolnih kiselina esteri čine 53,1 %, glikozidi 43,6 %, a slobodne kiseline 3,3 %. Derivati hidroksibenzojeve i hidroksicinamične kiseline, iz kupina, se mogu klasificirati kao: klorogena kiselina, neoklorogena kiselina, glukozni esteri kafeinske kiseline, *p*-kumarinska kiselina, ferulna kiselina, galna kiselina, protokatehinska kiselina kao i β-D-glikozidi *p*-kumarinske i *p*-hidroksibenzojeve kiseline (Kaume i sur., 2012; Le Bourvellec i Renard, 2012).

Tanini se mogu podjeliti u dvije skupine, a to su hidrolizirani i nehidrolizirani (tj. kondenzirani) tanini koji se još nazivaju i proantocijanidini (De Man, 1999). Hidrolizirani tanini se sastoje od fenolnih kiselina i šećera i mogu se razgraditi djelovanjem lužina, ili enzimskom hidrolizom. Hidrolizirani tanini su poliesteri koji su građeni od galne kiseline i/ili heksahidroksidifenolne kiseline. Obično je prisutan šećer glukoza, a relativne molekularne

mase su u rasponu od 500 do 2800. Galotanini oslobađaju galnu kiselinu, a elagitanini elagičnu kiselinu. Elagična kiselina je laktonski oblik heksahidroksidifenolne kiseline koja je svojstvena taninima (De Man, 1999). Sok kupine je dobar izvor elagitanina (**Tablica 2**), pogotovo lambertianina C (**Slika 7**) i sanguina H-6 (**Slika 8**). Lambertianin C se nalazi u većoj koncentraciji od sanguina H-6 (Hassimotto i sur., 2008; Hager i sur., 2010; Gancel i sur., 2011; Acosta i sur., 2014; Kopjar i Piližota, 2016).



Slika 7 Kemijska struktura lambertianina C (Ludwig, 2015)



Slika 8 Kemijska struktura sanguina H-6 (Ludwig, 2015)

Nehidrolizirani (tj. kondenzirani) tanini odnosno proantocijanidini su polimeri flavan-3-ola s flavanskim vezama koje su obično između C4 i C8 ili C6 ugljikovih atoma (De Man, 1999). Stupanj polimerizacije proantocijanidina može biti od 3 do 11. U tim polimerima su osnovne jedinice flavan-3-oli povezai s C-C i ponekad C-O-C vezama. Zagrijavanjem u kiselom mediju

pronatocijanidini daju antocijane (Rauf i sur., 2019). Dvije glavne skupine proantocijanidina, koje se mogu pronaći u bobičastom voću, su procijanidini, koji se sastoje isključivo od epikatehinskih jedinica i propelargonidini koji se sastoje isključivo od epiafzelehinskih jedinica. Kupine sadrže isključivo procijanidine. U kupinama se proantocijanidini nalaze u koncentraciji od 27 mg/100 g (Azofeifa, 2014). Procesiranje kupina (npr. prilikom pravljenja sirupa, pirea ili sokova) kao i skladištenje odgovorni su za značajne gubitke procijanidina (Skrovankova i sur., 2015). Mnoge biljke sadrže tanine koji su polimeri (+)-katehina ili (-)-epikatehina. To su hidrogenizirani oblici flavonoida ili antocijanidina. Ostali monomeri, koji se mogu pronaći u kondenziranim taninima, imaju trihidroksiliranje u B-prstenu, a to su (+)-galokatehin i (-)-epigalokatehin. Oligomerni i polimerni procijanidini se stvaraju adicijom više flavan-3-ol jedinica što dovodi do stvaranja uzvojite (tj. helikalne) strukture, a te strukture mogu stvoriti vezu s proteinima (De Man, 1999).

Lignani su polifenoli koji pripadaju skupini fitoestrogena. Pinoresionol je dimer koniferilnog alkohola. U malim koncentracijama se javljaju u širokom spektru namirnica (Beltz et al., 2009). Secoizolariciresinol i matairesinol su glavni lignani koji se moogu pronaći u biljkama. Kupine sadrže 3,72 mg/100 g suhe tvari secoisolariciresinola. Matairesinol se u kupinama nalazi u koncentraciji manjoj od 0,01 mg/100 g suhe tvari (Azofeifa, 2014). Struktura stilbena je karakterizirana s dva aromatična prstena povezana dvostrukom vezom. U bobičastom voću se mogu pronaći kao monomeri, dimeri i puno složeniji oligomeri (Blaszczyk i sur., 2019).

Kao što je navedeno na **Slici 1**, u stilbene ubrajamo resveratrol, pterostilben i piceatanol. Stilbeni su jedna od važnih skupina polifenola, a resveratrol (trans-3,5,4′-trihidroksistilben) je jedan od glavnih stilbenskih fitoaleksina (Shrikanta i sur., 2015). Resveratrol se obično može pronaći u grožđu, crvenom vinu i bobičastom voću (Fraga i sur., 2019). Resveratrol (trans-3,5,4′-trihidroksistilben) je fenolni spoj koji pripada fitoaleksinima. Fitoaleksini su benzo-Ɣ-piron derivati prisutni u stanicama koje vrše fotosintezu. Resveratrol može postojati u cis- i trans- formi, a u prirodi je trans-forma puno češća zbog nestabilnosti cis-izomera (Melzoch i sur., 2001; Shrikanta i sur., 2015).

2.2. UTJECAJ POLIFENOLA KUPINE NA ZDRAVLJE

Provedena su brojna istraživanja vezana uz utjecaj komponenata kupine na zdravlje ljudi. Crveni voćni sokovi (koji sadrže 40 % soka grožđa, 20 % soka kupine i 15 % soka višnje) smanjuju oksidacijska oštećenja stanica. Kod pacijenata na hemodijalizi pokazalo se je da je uzimanje takvih kombinacija sokova dovelo do značajnog smanjenja oksidacijskih oštećenja DNA (i povećanja apoptoze oštećenih stanica) kao i do smanjenja oksidacijskih oštećenja proteina i smanjenja lipidne peroksidacije. Pozitivno djelovanje soka kupine na antioksidacijski status *in vivo* može biti u poboljšanju biokemijskih poremećaja uzrokovanih dijabetesom kao što su hiperglikemija i hiperlipidemija (Spormann i sur., 2008; Kopjar i Piližota, 2016; Azofeifa i sur., 2016). Fizikalna interakcija između polifenola i transportnih proteina može se povezati s hipoglikemijskim i hipolipidemijskim utjecajem (Azofeifa i sur., 2016). Pozitivni utjecaj soka kupine na zdravlje se pripisuju visokom sadržaju antocijana i polifenola te njihova konzumacija može dovesti do prevencije kroničnih bolesti poput tumora i kardiovaskularnih bolesti u pacijenata koji su izloženi pojačanom oksidacijskom stresu (Yang i sur., 2014; Kopjar i Piližota, 2016). Predloženo je nekoliko različitih mehanizama kojima bi se moglo objasniti preventivno djelovanje polifenola na stvaranje stanica karcinoma. Neki polifenoli mijenjaju ekspresiju enzima citokoroma P450 koji je uključen u proces aktiviranja prokancerogena u kancerogen. Drugi polifenoli inhibiraju proliferaciju stanica *in vitro* tako što zaustavljaju aktivnost enzima ornitin dekarboksilaze koji je jedan od čimbenika rasta tumora jer inhibira nastajanje poliamina. Posljednji mehanizam kojim polifenoli preventivno djeluju na stvaranje stanica karcinoma je taj što polifenoli spječavaju DNA oksidaciju koja je povezana s rizikom od nastajanja karcinoma. Osim toga, neki polifenoli mogu pojačati antiproliferativno djelovanje lijekova koji se koriste u liječenju karcinoma (Scalbert i sur., 2005). Konzumacija pića na bazi kupine ima veliki potencijal za poboljšanje stanja uzrokovanih dijabetesom zbog povećanja antioksidacijskog kapaciteta seruma, smanjenja lipidne peroksidacije, smanjenja hiperglikemije i smanjenja hiperlipidemije (Azofeifa i sur., 2011). Utvrđeno je da cijanidin-3 glukozid i elagitanini inhibiraju enzime, crijevnu α-glukozidazu i pankreasnu α-amilazu. Ekstrakti bobičastog voća bogati antocijanima (sastavljeni uglavnom od derivata cijanidina), utječu na postprandijalnu glikemiju smanjenjem (genomske) ekspresije glukoznih transportera (Scalbert i sur., 2005; Azofeifa i sur., 2016). Osim inhibicije apsorpcije glukoze u tankom crijevu polifenoli mogu i

ograničiti resorpciju glukoze u nefronima (Scalbert i sur., 2005). Primjena soka kupine, u proizvodnji funkcionalne hrane, može dovesti do značajne redukcije porasta *Listerie monocytogenes, Salmonelle typhymurium* i *Escherichie coli* kao i do povećanog stimuliranja porasta bakterija roda *Lactobacillus* (Yang i sur., 2014; Kopjar i Piližota, 2016). Hepatične lezije uzrokovane ugljikovim tetrakloridom mogu se značajno reducirati uz uporabu soka kupine (Hassan i Yousef, 2009; Kopjar i Piližota, 2016). Osim antibakterijskog, polifenoli imaju i antivirusno i antifungalno djelovanje (Scalbert i sur., 2005). Kupine, poput još nekih botaničkih vrsta, štite od UVB zračenja (Calvo-Castro i sur., 2013; Kopjar i Piližota, 2016). Sok kupine može potisnuti mutagenezu, ali stupanj potiskivanja ovisi o ispitivanoj vrsti (Tate i sur., 2003; Kopjar i Piližota, 2016). Polifenoli smanjuju i oštećenja tkiva koja su uzrokovana aterosklerozom tako što inhibiraju oksidaciju lipoproteina LDL-a u krvi *in vitro* koji ima glavnu ulogu u nastajanju ateroskleroze (Scalbert i sur., 2015). U slučaju katehina i kvercetina utvrđeno je da su polifenoli učinkovitiji u sinergiji. Osim toga smanjuju i stvaranje tromba, a time i rizik od moždanog i srčanog udara. Imaju antiartritično i antiupalno djelovanje pa smanjuju poteškoće kod osoba oboljelih od reumatoidnog artritisa (Shivashankara i Acharya, 2010).

Djelovanje polifenola na zdravlje čovjeka uvelike ovisi o njihovoj bioraspoloživosti. Za razliku od ostalih flavonoida (tj. flavonola i flavanola, **Slika 1**) antocijani mogu biti apsorbirani u „nedirnutom“ glikozidnim obliku ili u obliku nekoliko metabolita antocijana kao što su metilirani glikozidi, glukuronidi antocijanidina, sulfokonjugati cijanidina i antocijanidini. Unatoč tome uočeno je da je apsorpcija antocijana kupina unesenih putem hrane niska i često između 0,02 i 1,8 % (Azofeifa i sur., 2018). Antioksidacijska aktivnost polifenola *in vitro* nije jedaka antioksidacijskoj aktivnosti *in vivo*. Bobičasto voće bogato antocijanima (npr. borovnice) ima visoku učinkovitost u liječenju raznih demencija (npr. Alzheimerova i Parkinsonova bolest) jer su uzrokovane oksidacijskim stresom. U preventivnom smislu kao i u smislu liječenja treba koristiti niske koncentracije polifenola i na taj način onemogućiti njihovo toksično djelovanje (Scalbert i sur., 2005).

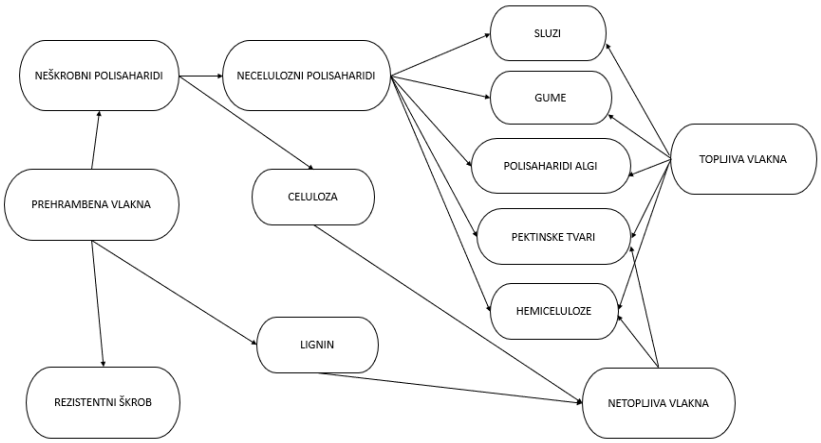
2.3. AROMATSKE KOMPONENTE KUPINE

Aroma kupine i ostalog bobičastog voća je raznolika. Većina hlapljivih komponenata bobičastog voća se može klasificirati u estere, terpenoide, karbonilne spojeve, alkohole, laktone, furanone i sumporne spojeve. Neke hlapljive komponente su kombinirane i sa šećerima i udružene u bezmirisne glikozide u voću i mnogim drugim biljnim tkivima te služe kao prekursori arome. Tijekom sazrijevanja enzimske reakcije cijepaju glikozide u njihove šećere i hlapljive komponente čineći voće slađim i aromatičnijim (Du, 2009). Do danas je u kupinama otkriveno oko 150 hlapljivih komponenata i niti jedna od njih se ne smatra specifičnom samo za kupine (Christensen i sur., 2007). Kao glavne komponenata arome kupine identificirani su: 2-heptanol, *p*-cimen-8-ol, 2-heptanon, 1-heksanol, α-terpineol, pulegon, 1-oktanol, izoborneol, mirtenol, 4-terpineol, karvon, elemicin i nonanal. Postoji nekoliko načina formiranja hlapljivih komponenata arome, a to su metabolizam masnih kiselina, metabolizam aminokiselina, metabolizam terpena i karotenoidni put. Masne kiseline su glavni prekusor hlapljivih komponenata arome u većini voća. Iz masnih kiselina mogu nastati ravnolančani alkoholi, aldehidi, ketoni, organske kiseline, esteri i laktoni (od C_1 do C_{10}) (El Hadi i sur., 2013). Ove komponente uglavnom nastaju β-oksidacijom masnih kiselina. β-oksidacija masnih kiselina je glavni put biosinteze koji dovodi do nastajanja alkohola i acil-konezima A potrebnih za formiranje estera. U ciklusu β-oksidacije zasićene masne kiseline se enzimima metaboliziraju i gube dva ugljikova atoma po reakciji. Acil-konezim A reagira s alkoholima koji se pretvaraju u estere pomoću alkohol acil tranferaze (Du, 2009). U metabolizmu aminokiselina, aminokiseline alanin, valin, leucin, izoleucin, fenilalanin i asparaginska kiselina su direktni prekursori u biosintezi arome a njihov metabolizam je zaslužan za dobivanje velikog broja spojeva uključujući alkohole, karbonilne spojeve, kiseline i estere. Aminokiseline mogu proći kroz deaminaciju ili transaminaciju pri čemu dolazi do nastajanja odgovarajućih α-ketokiselina. Nakon dekarboksilacije dolazi do redukcije, oksidacije i/ili esterifikacije te do nastajanja aldehida, kiselina, alkohola i estera. U terpenoidnom putu se nalaze terpenoidi koji predstavljaju veliku skupinu biljnih metabolita (El Hadi i sur., 2013). Biosinteza terpena počinje sa acetil-CoA. Mevalonska kiselina se smatra prekursorom terpena. Biosinteza mevalonske kiseline počinje od acetata i smatra se da za su za sintezu jedne molekule mevalonske kiseline potrebni tri acetata i enzimi acetil-CoA acetil transferaza, hidroksimetil glutaril-CoA sintetaza i hidroksimetilglutaril-CoA reduktaza u

reakcijama kojima je potreban NADPH (Du, 2009). U karotenoidnom putu su prisutni karotenoidi koji su izoprenoidne molekule važne za primarni i sekundarni metabolizam biljaka i ostalih živih organizama. Apokarotenoidne hlapljive komponente arome se sintetiziraju samo u posljednjem stadiju sazrijevanja iako su karotenoidne dioksigenaze prisutne u čitavom periodu sazrijevanja voća (El Hadi i sur., 2013). Iako ih je puno pronađeno u prirodi samo se deset produkata degradacije karotenoida smatra važnim za aromu različitog voća i povrća. Spojevi poput α-ionona, β-ionona i β-damascenona se smatraju od iznimne važnosti za aromu voća, čajeva, vina i duhana (Du, 2009).

2.4. PREHRAMBENA VLAKNA

Prema definiciji Američkog udruženja kemičara žitarica iz 2001. godine prehrambena vlakna su jestivi dijelovi biljaka ili analogni ugljikohidrati koji su rezistentni na probavu i apsorpciju u ljudskom tankom crijevu, s potpunom ili djelomičnom fermentacijom u debelom crijevu. Prehrambena vlakna uključuju polisaharide, oligosaharide, lignin kao i s njima povezane biljne tvari. Prehrambena vlakna imaju blagotvorno fiziološko djelovanje uključujući djelovanje na peristaltiku (tj. rad) crijeva, i/ili snižavanje razine kolesterola, i/ili snižavanje razine glukoze u krvi (Sharma i sur., 2013; Stephen i sur., 2017). Prehrambena vlakna se, prema topljivosti, mogu podijeliti na topljiva i netopljiva. Podjela prehrambenih vlakana je bazirana na njihovoj topljivosti u toploj vodi (Akre i sur., 2009; Gropper i Smith, 2013), a prikazana je na **Slici 9.**



Slika 9 Klasifikacija prehrambenih vlakana prema topljivosti u vodi (Mandić, 2007; Mandić i Nosić, 2009)

Netopljiva prehrambena vlakna prolaze probavnim sustavom bez razgradnje uz jedan mali dio koji se razgrađuje fermentacijom pomoću bakterija u debelom crijevu, a imaju mogućnost vezanja velike količine vode pa bubrenjem mogu povećati svoju masu čak i do 15 puta, čine stolicu voluminoznom, sprječavaju opstipaciju te potiču peristaltiku crijeva (Barasi, 2003; Ivanova i sur., 2013). Netopljiva prehrambena vlakna se obično nalaze u posijama, žitaricama koje imaju cjelovito zrno te u kori voća, dok se u manjim količinama mogu naći u samom voću, povrću i mahunarkama. Netopljiva i topljiva prehrambena vlakana se bitno razlikuju prema viskoznosti (Mandić i Nosić, 2009; Krešić, 2012). Topljiva prehrambena vlakna smanjuju postprandijalnu glikemiju i potrebu za inzulinom, a dovode i do snižavanja razine triacilglicerola u serumu kao i ukupnog i LDL kolesterola u krvi i jetri (Mandić, 2014). Otapaju se tijekom probave te pri tome stvaraju viskoznu masu koja nalikuje gelu, podliježu fermentaciji u debelom crijevu pri čemu nastaju kratkolančane masne kiseline koje imaju energetsku funkciju i organizam ih koristi u tu svrhu (Barasi, 2003; Myrie i Jones, 2011). Fermentiranjem u debelom crijevu produciraju GLP-1 i peptid YY (PYY), a to su dva hormona koja induciraju sitost (Lattimer i Haub, 2010). Fiziološka karakteristika im je smanjenje kolesterola, triacilglicerola i glukoze u krvi. Također i usporavaju resorpciju glukoze iz tankog crijeva. U skladu s tim osobinama imaju djelotvornost pri zaštiti od kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa. Izvori topljivih prehrambenih vlakana su voće, povrće, zob i zrno riže (Krešić, 2012).

2.4.1. Uloga prehrambenih vlakana u prevenciji i liječenju bolesti

Prehrambena vlakna se općenito mogu povezati s prevencijom i liječenjem slijedećih skupina bolesti: kardiovaskularnih bolesti (hipertenzija, hiperlipidemija, dijabetes tipa 2, pretilost (unos energije i apetit), gastrointestinalnih bolesti (konstipacija, divertikuloza, rak jednjaka, rak želuca, kolorektalni adenom, kolorektalni rak) i neoplastičnih bolesti koje nisu povezane s gastrointestinalnim sustavom (karcinom dojki, endometrija, prostate, gušterače, rjajnika i bubrega) (Stephen i sur., 2017).

U istraživanjima koja su, u ranim sedamdesetim godinama prošloga stoljeća, započeli Burkitt i Trowell (1974) utvrđeno je kako se prehrana siromašna prehrambenim vlaknima može povezati sa lošijim zdravljem. Prvo se proučavao utjecaj prehrambenih vlakana na debelo

crijevo te njihovo djelovanje na glikemiju i reguliranje kolesterola u krvi. Nakon toga su se prehrambena vlakna počela povezivati s raznim vrstama karcinoma i kardiovaskularnim bolestima, naročito tijekom posljednjeg desetljeća (Stephen i sur., 2017). Osim topljivih prehrambenih vlakana, i netopljiva prehrambena vlakna imaju pozitivno djelovanje na kardiovaskularne bolesti. U epidemiološkim istraživanjima koja su obuhvaćala više od 158 000 ispitanika utvrđeno je da je prevalencija od kardiovaskularnih bolesti značajno manja (29 %) kod osoba koje imaju visoki dnevni unos prehrambenih vlakana (Anderson i sur., 2009). Svaki porast ukupnih prehrambenih vlakana u dnevnoj prehrani od 10 g smanjuje ukupni rizik od infarkta miokarda (Mirmiran i sur., 2016). Hrvatska pripada državama s visokim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, a smanjenje koncentracije ukupnog kolesterola i LDL kolesterola ima važnu ulogu u prevenciji tih bolesti. Topljiva prehrambena vlakna mogu smanjivati kolesterol na tri načina. Prvi način se odnosi na sprječavanje ponovne apsorpcije žučnih soli iz tankog crijeva pri čemu dolazi do izlučivanja viška tih soli putem fecesa. U jetrenim stanicama dolazi do razgradnje kolesterola kako bi se mogle nadoknaditi žučne kiseline. Nastaju LDL-C receptori i dolazi do povećanog unosa LDL-kolesterola iz krvotoka što dovodi do snižavanja njegovog nivoa u krvi. Drugi način se odnosi na smanjenje razine inzulina što doprinosi inhibiciji HMG-CoA reduktaze (3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A reduktaze), a posljedica je smanjenje sinteze kolesterola. Prehrambena vlakna odgađaju pražnjenjenje želuca i miješanje s probavnim enzimima što dovodi do smanjenja apsorpcije glukoze, a samim tim i razine inzulina. Treći način se ostvaruje tako što prehrambena vlakna u debelom crijevu fermentiraju pomoću bakterija. Pri fermentaciji dolazi do nastajanja propionata, butirata i acetata. Propionat inhibira metabolizam jetrenog kolesterola i na taj način iscrpljuje kolesterol (Gunness i Gidley, 2010). Prehrana koja je bogata nerafiniranim žitaricama, a time i netopljivim prehrambenim vlaknima, štiti od srčanih bolesti. Visoki unos prehrambenih vlakana je povezan sa snižavanjem krvnog tlaka kod hipertenzičara. Postoji obrnuto proporcionalni odnos između unosa voća i povrća (naročito ako je veći od 5 puta dnevno) i srčanog infarkta (Lovergrove, 2011; Grooper i Smith, 2013). Jedna od glavnih komponenti, za koju se smatra da ima ulogu u prevenciji od kardiovaskularnih bolesti, su upravo neprobavljivi ugljikohidrati ili prehrambena vlakna (ILSI, 2006).

Viskozni gelovi koji nastaju unosom topljivih prehrambenih vlakana dovode do poboljšanja glikemijske kontrole najvećim djelom zbog redukcije apsorpcije glukoze i inzulinske sekrecije

kao i zbog povećane inzulinske osjetljivosti (Grooper i Smith, 2013). Viskozni gelovi usporavaju vrijeme prolaska hrane kroz crijeva te na taj način dovode do potpunije probave i apsorpcije hranjivih tvari. Različite vrste topljivih prehrambenih vlakana drugačije djeluju na viskoznost i apsorpciju hranjivih tvari. Pokazalo se da guar ima najveću viskoznost a ujedno i najveći utjecaj na snižavanje postprandijalne razine glukoze u krvi. Zato je moguće pretpostaviti da će povišene razine topljivih prehrambenih vlakana imati utjecaj na smanjenje rizika od nastanka dijabetesa. Većina istaživanja pokazuje da netopljiva prehrambena vlakna također imaju takvo djelovanje (Lattimer i Haub, 2010). Koristi od uzimanja prehrambenih vlakana imati će oni bolesnici čija dnevna doza inzulina ne prelazi 40 „jedinica“, a hrana sadrži visok udio prehrambenih vlakana te dobar odnos ugljikohidrata, bjelančevina i masti. Povećani unos prehrambenih vlakana (40 – 50 g) mogao bi poboljšati zdravstveno stanje dijabetičara, ali se ne može postići svakodnevnom prehranom. Pokazalo se da hrana koja ima visoki udio ugljikohidrata, a niski udio prehrambenih vlakana ne regulira dobro razinu glukoze u krvi (Mandić, 2014). Kliničke studije rađene na žitaricama za doručak su utvrdile da viskozna prehrambena vlakna (naročito β-glukani) imaju dobar hipoglikemijski učinak. Za zdrave osobe doza od 4,0 g β-glukana reducira glukozu u krvi za 0,7 mmol/L. Za ljude koji boluju od dijabetesa tipa II za doze β-glukana od 4,0; 6,0 i 8,4 g redukcija glukoze u krvi je bila 1,2; 2,2 i 2,3 mmol/L (Mandić i Nosić, 2009). Prehrambena vlakna se u probavnom traktu zadržavaju puno duže od jednostavnih šećera pa je porast glukoze u krvi puno manji i sporiji uslijed čega hrana bogata prehrambenim vlaknima doprinosi gubitku tjelesne mase (Wang, 2010). Ujedno reducira rizik od pojave kroničnih bolesti, kao što su diabetes mellitus tipa 2 i kardiovaskularne bolesti. Što je hrana bogatija mastima i prehrambenim vlaknima vrijeme za probavu se produljuje, a prijelaz hrane iz želuca u tanko crijevo je usporen što dovodi do smanjenja glikemijskog indeksa. Procesiranje i kuhanje hrane također utječu na glikemijski indeks zbog povećanja probavljivosti (Titchenal i sur., 2018).

Hrana bogata prehrambenim vlaknima ima nižu energetsku gustoću i veći volumen što može dovesti do sitosti i reduciranja gladi jer dolazi do odgađanja pražnjenja želuca (Grooper i Smith, 2013). Prehrana koja je siromašna na pojedinim hranjivim tvarima, a ujedno je i vrlo slana ili dimljena povezana je s reduciranim rizikom od pojave karcinoma želuca, ako se konzumira s većim količinama svježeg voća, povrća i mliječnih proizvoda (Scarpignato i Bianchi Porro, 2004). Istraživanja pokazuju da se debljina može prevenirati na način da se

uvede prehrana s niskim udjelom masti i višim udjelom netopljivih prehrambenih vlakana (ILSI, 2003; Mandić, 2014). Važno je naglasiti utjecaj prehrane i životnog stila na razvoj ovog kroničnog stanja koje je povezano s nizom bolesti (Banjari i sur., 2013). Hormoni GLP-1 (glukagonu sličan peptid 1) i inzulinotropni polipeptid ovisan o glukozi (GIP) imaju povoljno djelovanje na snižavanje razine glukoze u krvi kao i na redukciju tjelesne težine. GLP-1 djeluje na smanjenje apetita, a GIP na sporije nakupljanje masti u tkivu i na sporije gastrično pražnjenje. Bez obzira na dobru regulaciju razine glukoze u krvi djelovanje hormona GLP-1 i GIP je smanjeno (Poropat i Jurišić-Eržen, 2019). Fermentacija prehrambenih vlakana dovodi do povećanog izlučivanja GLP-1 i kratkolančanih masnih kiselina što ima povoljan utjecaj pri terapiji pretilosti (Byrne i sur., 2015).

Prehrambena vlakna su najčešće povezana s nekoliko gastrointestinalnih poremećaja u koje ubrajamo divertikulozu, konstipaciju i karcinom debelog crijeva. Divertikuloza je uglavnom povezana s prehranom koja je siromašna prehrambenim vlaknima i pacijentima se savjetuje pojačani unos netopljivih prehrambenih vlakana. Sposobnost prehrambenih vlakana da povećaju volumen stolice kao i ubrzavaju vrijeme prolaska hrane kroz crijeva djeluje blagotvorno na konstipaciju. Netopljiva prehrambena vlakna vežu karcinogene i na taj način smanjuju mogućnost interakcije karcinogena sa sluznicom debelog crijeva (Grooper i Smith, 2013). Stvaranjem kratkolančanih masnih kiselina prilikom fermentacije prehrambenih vlakana smanjuje se pH unutar crijeva što dovodi do smanjenja pretvorbe primarnih žučnih kiselina u sekundarne žučne kiseline koje imaju kancerogena svojstva. Butirat djeluje antineoplastično jer iniciranjem apoptoze zaustavlja širenje stanica karcinoma (McRae, 2018). Izgleda da je učestalost karcinoma debelog crijeva povezana s količinom mesa koju prosječna osoba konzumira. Prehrana obilata mesom usporava prolaz hrane kroz debelo crijevo, povećavajući izloženost crijevne sluznice probavnom otpadu. Pojava raka debelog crijeva je 8 puta veća u SAD-u nego u nerazvijenim zemljama u kojima je unos prehrambenih vlakana viši. U meta-analizi, koja pokriva 15 originalnih studija, pokazalo se da proizvodi od cjelovitog zrna reduciraju rizik od pojave karcinoma debelog crijeva i želuca (Mandić i Nosić, 2009). U debelom crijevu se prehrambena vlakna i ostali neprobavljivi ugljikohidrati djelomično razgrađuju uz pomoć bakterija te nastaju kratkolančane masne kiseline i plinovi. Preostala prehrambena vlakna se izlučuju putem fecesa (Titchenal i sur., 2018). U pet epidemioloških istraživanja je utvrđeno statistički značajno smanjenje raka želuca, jednjaka i

gušterače. Prehrambena vlakna mogu eliminirati preteče kancerogenih *N*-nitrozamina, nitrite, koji su povezani s karcinomom želuca jer uzrokuju oštećenja na DNK. Provedena su i epidemiološka istraživanja vezana za karcinom dojke i endometrija i utvrđena su statistički značajna smanjenja (od 7 do 15 %) za karcinom dojke i smanjenje od 29 % za karcinom endometrija kada se usporede s velikim i vrlo malim unosom prehrambenih vlakana (McRae, 2018).

Ima rijetkih slučajeva kada je zbog prevelikog unosa netopljivih prehrambenih vlakana došlo do opstrukcije crijeva što se moglo riješiti samo kirurškom operacijom. Zato je potrebna umjerenost u uzimanju prehrambenih vlakana. Pedesetogodišnji muškarac je s mlijekom pojeo dvije velike zdjele žitnih posija i stvorio se veliki čep posija u probavnom traktu (Živković, 2000). Topljiva i netopljiva prehrambena vlakna na različite načine utječu na sindrom iritabilnog crijeva. Netopljiva prehrambena vlakna su kod nekih ispitanika izazvala pogoršanje simptoma dok su topljiva prehrambena vlakna djelovala na opće poboljšanje simptoma (Bijkerk i sur., 2004). Prehrana bogata prehrambenim vlaknima se preporučuje osobama oboljelim od divertikuloze. Takvom prehranom se može spriječiti nastajanje novih divertikula (Slavin, 2008). U prebiotike ubrajamo i prehrambena vlakna. Prebiotici su 1995. godine definirani kao „neprobavljivi sastojci hrane koji korisno djeluju na domaćina pomoću selektivne stimulacije rasta i/ili aktivnosti jedne bakterijske vrste ili ograničenog broja bakterijskih vrsta i tako poboljšavaju ljudsko zdravlje“. Najčešće korišteni prebiotici su inulin ili frukto-oligosaharidi (Mandić i Nosić, 2009).

Preporuke za unos prehrambenih vlakana se kreću od 20 - 35 g/dan. Djeca starija od dvije godine trebaju povećati unos prehrambenih vlakana u količini koja je jednaka ili veća od zbroja njihovih godina + 5 grama dnevno. Ako se unosi previše prehrambenih vlakana može doći do smanjenja apsorpcije nekih vitamina, minerala i proteina. Dobar orijentacijski omjer je 15 grama ugljikohidrata na 3 grama prehrambenih vlakana (VishWanath, 2003; Mandić, 2007; Mandić i Nosić, 2009; Gibney i sur., 2009).

Energetska vrijednost prehrambenih vlakana iznosi oko 2 kcal po gramu (Mandić i Nosić, 2009; Titchenal i sur., 2018). Ova vrijednost prehrambenih vlakana jako ovisi o vrsti prehrambenih vlakana i smatra se da topljiva prehrambena vlakna i rezistentni škrob daju više energije od netopljivih prehrambenih vlakana (Titchenal i sur., 2018).

Žitarice su glavni izvor prehrambenih vlakana i predstavljaju 50 % ukupnog unosa u zapadnim zemljama. Od 30 – 40 % unosa prehrambenih vlakana dolazi od povrća, a oko 16 % od voća. Ostatak potječe iz drugih manje značajnih izvora (Katalinić, 2011). U izvore celuloze u hrani ubrajamo leguminoze, orahe, korjenasto povrće (npr. mrkva), povrće iz porodice kupusnjača, celer, prokulice i jabuke dok cjelovite žitarice, orahe i mahunarke smatramo izvorima hemiceluloza. Od izvora lignina u hrani treba spomenuti cjelovite žitarice, korjenasto povrće (npr. mrkva), jagode i prokulice, dok se citrusi, jagode, jabuke, leguminoze, neke vrste povrća (npr. mrkva) i zobeni proizvodi smatraju dobrim izvorima pektina. Kada govorimo o gumama u hrani kao dobar izvor mogu poslužiti zobeni proizvodi i leguminoze. Zobeni proizvodi mogu, kao i neke vrste gljiva, poslužiti i kao izvori β-glukana. U izvore rezistentnog škroba ubrajamo djelomično mljeveno brašno, nezrele (tj. zelene) banane, leguminoze, sirovi krumpir, rižu i tjesteninu. Izvorima fruktana u hrani smatramo cikoriju, šparoge, češnjak, artičoke, rajčice, banane i raž dok izvori hitozana i hitina u hrani mogu biti oklopi rakova, škampi i jastoga (Gropper i Smith, 2013).

2.4.2. Interakcije vlakana s fenolima

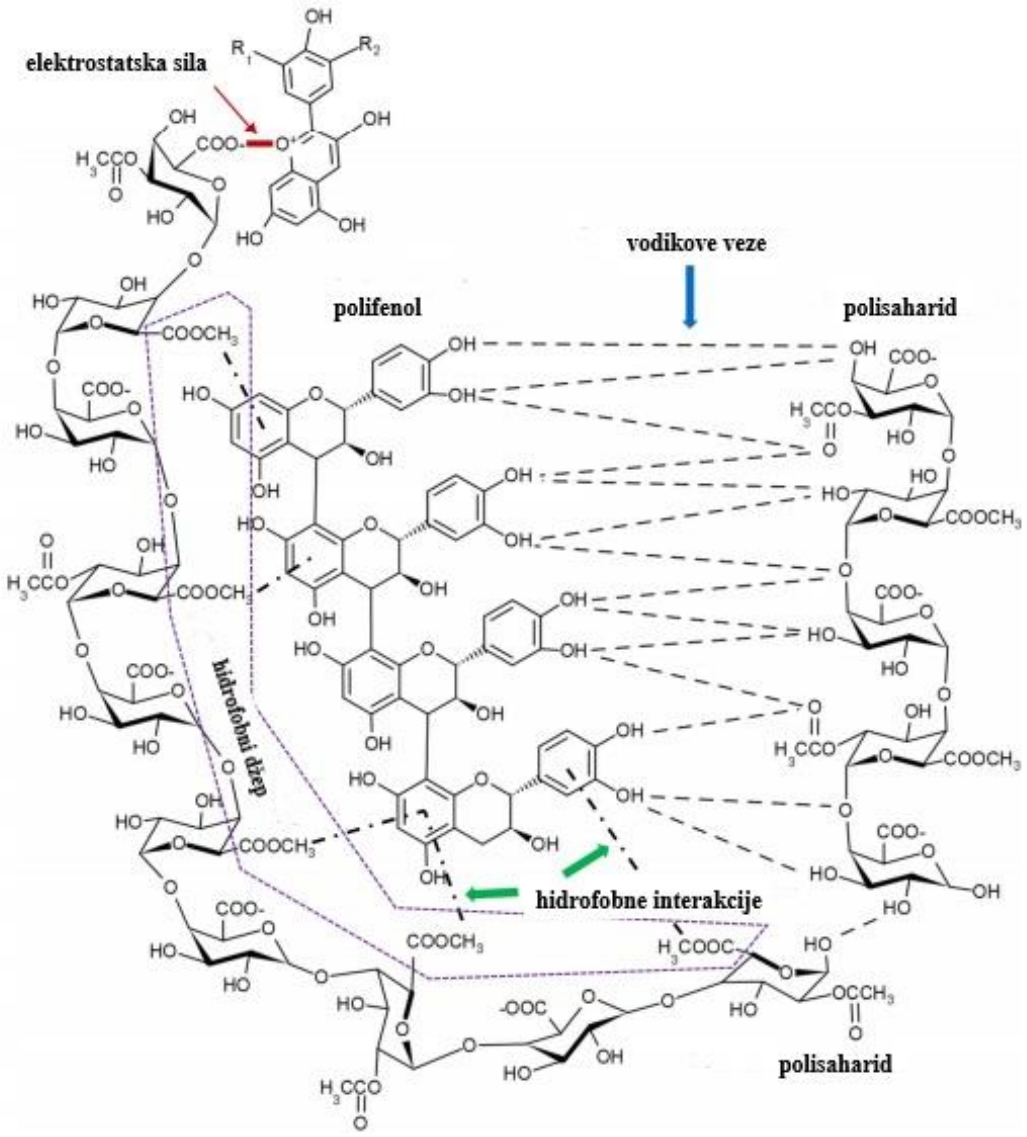
Na bioraspoloživost fenolnih spojeva se može utjecati na različite načine, a jedan od njih je vezanje fenolnih spojeva s matriksom hrane, a naročito s prehrambenim vlaknima. Poznato je da su namirnice biljnog porijekla izvrstan izvor kako fenolnih spojeva tako i prehrambenih vlakana. Procjenjeno je da je oko 2,5 % prehrambenih vlakana u voću povezano s fenolnim spojevima. Prehrambena vlakna i fenolni spojevi su se dugo vremena proučavali odvojeno zbog različitosti u svojoj kemijskoj strukturi, fizikalno-kemijskim i biološkim svojstvima te metaboličkim putevima (Saura-Calixto, 2011). Međutim, postoje znanstveni dokazi koji tvrde da se neprobavljive komponente prehrambenih vlakana (polisaharidi) mogu povezivati s drugim komponentama hrane, kao što su to fenolni spojevi te je utvrđeno da prehrambena vlakna povezana sa fenolnim spojevima imaju izniman biološki antioksidacijski kapacitet (Quirós-Sauceda i sur., 2014a). Interakcije prehrambenih vlakana i fenolnih spojeva uključuju stvaranje vodikove veze između hidroksilne skupine fenolnih spojeva i kisikovog atoma polisaharida (**Slika 10**). Također dolazi i do hidrofobnih interakcija kao i do nastajanja kovalentnih veza (npr. esterskih veza) između fenolnih spojeva i polisaharida. Fenolni spojevi imaju hidrofobne aromatične prstenove i hidrofilne hidroksilne skupine sa sposobnošću

povezivanja s polisaharidima (tj. prehrambenim vlaknima) i proteinima na različitim stranama stanične stijenke (Saura-Calixto, 2011). Fenolni spojevi (tj. antioksidacijske molekule) su „zarobljeni“ unutar prehrambenih vlakana i kao takvi mogu dosegnuti debelo crijevo te kažemo da je apsorpcija fenolnih spojeva usporena. Crijevna mikrobiota debeloga crijeva fermentira prehrambena vlakna i na taj način se fenolni spojevi postupno oslobađaju u crijevni lumen (sadržaj) i apsorbiraju epitelnim stanicama. Iz tog razloga uveden je koncept „antioksidacijska prehrambena vlakna“. „Antioksidacijska prehrambena vlakna“ se definiraju kao koncentrati prehrambenih vlakana koji sadrže znatne količine prirodnih antioksidansa (uglavnom fenolnih spojeva) povezanih s neprobavljivim tvarima. Općenito možemo zaključiti da interakcije fenolnih spojeva s prehrambenim vlaknima utječu na oslobađanje fenolnih spojeva tijekom probave kao i da mogu utjecati na njihovu apsorpciju tijekom probave (Quirós-Sauceda i sur., 2014a).

Posljednjih godina je jako porastao interes istraživača za prehrambenim proizvodima koji u sebi sadrže prehrambena vlakna s određenim sadržajem prirodnih antioksidansa (Quirós-Sauceda i sur., 2014a), naročito zbog toga što hrana bogata prehrambenim vlaknima uglavnom ima zanemariv antioksidacijski kapacitet (Eskicioglu i sur., 2015). Ovakvi fenolno-polisaharidni kompleksi su u dosadašnjim radovima (do 2014.) podcjenjivani uglavnom zbog analitičkih problema, no s druge strane puno obećavaju kako s nutricionističkog tako i s proizvodnog stajališta (Quirós-Sauceda i sur., 2014a).

Polifenoli (tj. fenolni spojevi) mogu biti „nošeni“ prehrambenim vlaknima i tako doći do debelog crijeva u kojem se mogu osloboditi djelovanjem bakterija. „Nošenje“ polifenolnih spojeva prehrambenim vlaknima, u donje djelove probavnog sustava, bi mogla biti jedna od glavnih funkcija prehrambenih vlakana (Jakobek i Matić, 2019). Oligomerni i polimerni procijanidini imaju sposobnost nekovalentnog vezanja za staničnu stijenku jabuke u vodenom puferu. Količina procijanidina vezanih za stanične stijenke raste s porastom koncentracije procijanidina, stupnjem polimerizacije i postotkom galoilat iona. Konstanta privlačenja između procijanidina i polisaharida opada kako slijedi: pektini > ksiloglukan > škrob > celuloza. Veći afinitet se postiže s pektinom, polisaharidom koji ima sposobnost stvaranja gel strukture, tako što nastaju hidrofobni džepovi da bi se enkapsulirali procijanidini. Suprotno tome „filamentozni“ i „globularni“ polisaharidi poput celuloze i

ksiloglukana slabo vežu procijanidine. Ksiloglukan nema značajnije djelovanje na procijanidine s višim stupnjem polimerizacije (Zhang i sur., 2013; Jakobek, 2015).



Slika 10 Vrste interakcija između fenolnih spojeva i prehrambenih vlakana (Liu i sur., 2020)

U vinima su značajne količine fenola povezane s topljivim prehrambenim vlaknima što znači da su kompleksi prehrambena vlakna/fenoli sadržani u koncentraciji od 1,5 do 2,3 g/L u crvenim vinima i od 0,4 do 0,6 g/L u bijelim vinima. Ovi kompleksi obuhvaćaju od 35 do 60 % kompleksa prehrambena vlakna/fenoli u crvenim vinima i oko 9 % u bijelim vinima (Saura-Calixto i Diaz-Rubio, 2007). Hidofobna svojstva pronatocijanidina se pojačavaju sa stupnjem polimerizacije i „galoilacije“. Što se tiče nekovalentnih interakcija visoki afinitet je uočen

između visoko metiliranih homogalakturonana (lanac galakturonske kiseline iz pektina) i visoko polimeriziranih procijanidina zbog hidrofobnih interakcija. Pretpostavlja se da do hidrofobnih interakcija dolazi između metilnih skupina pektinske frakcije i dihidropiranskog heterocikličkog C-prstena. Polisaharidi u prisutnosti proantocijanidina stvaraju ili gube oligomere ili mikrogelove koji su manje zbijeni od pojedinačnih polisaharidnih uzvojnica. Takvi kompleski ostaju stabilni čak i nakon ultracentrifugiranja. Kovalentne interakcije je moguće samo pretpostaviti zbog postojanja ireverzibilnih stabilnih kompleksa između polifenola i polisaharida (Renard i sur., 2017). Polisaharidi ne mogu spriječiti inicijalno nakupljanje tanina, ali utječu na porast veličine čestica. Afinitet tanina i galotanina u odnosu na celulozu je u pozitivnoj korelaciji s njihovom molekularnom masom, brojem galoilnih skupina i njihovom hidrofobnošću. To daje naslutiti da je galoilna skupina polifenola funkcionalna skupina u interakcijama između tanina i celuloze. Elagitanini su puno slabije povezani s celulozom od galotanina iako imaju sličnu molekularnu masu, isti broj galoilnih skupina i isti broj fenolno hidroksilnih skupina. Iz tog razloga kažemo da reakcije jako ovise o fleksibilnosti galoilnih skupina. Kada galotanini imaju više od dvije galoilne skupine dominantne su hidrofobne interakcije. Kod elagitanina intergaloilne veze jako smanjuju fleksibilnost galoilnih skupina reducirajući hidrofobne interakcije. Kada je broj intergaloilnih veza povećan hidrofobne interakcije su značajno smanjene (Tang i sur., 2003). Veličina molekula polifenola kao i njihova konformacijska fleksibilnost su dva jednako važna čimbenika koja utječu na jačinu interakcija između polifenola i polisaharida. Među različitim vrstama polifenola prisutnim u jabukama (hidroksicinamične kiseline i flavonoidi) samo se procijanidini mogu vezati za staničnu stijenku. Na stvaranje kompleksa između procijanidina i stanične stijenke ne utječe pH ako je u rasponu od 2,2 do 7. Elektrostatske ili ionske interakcije ne utječu na interakcije između procijanidina i stanične stijenke izolirane iz jabuke. Adsorpcija se povećava s porastom ionske jakosti sugerirajući na prisutnost hidrofobnih interakcija, a smanjuje se s porastom temperature i time ukazuje na prisutnost vodikovih veza. To znači da je u adsorpcijski mehanizam uključeno nastajanje slabih energetskih veza odnosno kombinacija vodikovih veza i hidrofobnih interakcija (Renard i sur., 2001, Le Bourvellec i sur., 2004). Adsorpcija procijanidina na staničnu stijenku izoliranu iz jabuke ovisi o njihovoj stereokemiji, konformacijskoj fleksibilnosti i molekularnoj masi. Čini se da elektrostatičke i ionske sile, u kojima općenito sudjeluju nabijene molekule, nemaju ulogu u interakcijama između polifenola i polisaharida budući da polifenoli imaju zanemariv

negativan naboj u slabo kiseloj do kiseloj sredini (Le Bourvellec i Renard, 2012). Flavonoidno-polisaharidne nakupine mogu dovesti do nastajanja nepoželjnih netopljivih nakupina u tekućoj fazi (Bordenave i sur., 2014). Fenoli se mogu vezati za celulozna vlakna. Adsorpcija procijanidina B2, floridzina i epikatehina na celulozu prati opadajući redoslijed procijanidin B2 > floridzin > epikatehin (Liu i sur., 2017). Ferulna kiselina, galna kiselina, katehin i cijanidin-3-glukozid vežu se za celulozna vlakna bolje od klorogenske kiseline (Phan i sur., 2016). Hemiceluloza (npr. ksilan, glukuronoksilan, arabinoksilan, glukomanan i ksiloglukan) se sastoji od nekoliko različitih monomera, a polifenoli se vežu za njih (Bhaskar i sur., 2012). Procijanidini su pokazali veliki afinitet prema pektinima koji su jedna od glavnih komponenti stanične stijenke (Jakobek i Matić, 2019). Polifenoli i prehrambena vlakna imaju puno OH-skupina koje daju mogućnost za nastajanje vodikovih veza. Van der Waalsove sile su također moguće budući da polifenoli i prehrambena vlakna imaju funkcionalne skupine koje mogu stvarati polarizirane molekule (Liu i sur., 2017). Ako prvo dođe do nastajanja vodikovih veza udaljenost između molekula polifenola i prehrambenih vlakana postaje manja i samim tim omogućuje stvaranja Van der Waalsovih veza (Wu i sur., 2011). Hidrofobne interakcije su interakcije između vode i u vodi netopljivih ili slabo topljivih molekula kao što su nepolarne molekule. One mogu formirati nakupine kako bi što manje bile u dodiru s vodom. Neka prehrambena vlakna i polifenoli nisu topljivi u vodi što im daje mogućnost stvaranja nakupina, a to su hidrofobne interakcije. Također, polifenoli imaju hidrofobne aromatične prstenove koji pomažu hidrofobne interakcije (Saura-Calixto, 2011). Okolišni uvjeti, kao što su ionska jakost, temperatura ili pH su važni za vezanje molekula. Količina vezanih polifenola i prehrambenih vlakana može rasti ili opadati ovisno o ionskoj jakosti. Ako udruživanje molekula raste s porastom ionske jakosti onda do hidrofobnih interakcija gotovo da i neće dolaziti (Le Bourvellec i sur., 2004; Wu i sur., 2011; Zhang i sur., 2017). Temperatura je također važna za stvaranje veza (Le Bourvellec i sur., 2004). Nastajanje vodikovih veza je egzoterman proces u kojem dolazi do oslobađanja energije dok su hidrofobne interakcije endoterman proces koji troši energiju (Nguela i sur., 2016). Stoga se može zaključiti da akoporastom temperature dolazi do pojačanog nastajanja nakupina vjerojatnije su hidrofobne interakcije. S druge strane, ako povišenje temperature dovodi do smanjenog stvaranja nakupina vjerojatnije su vodikove veze (Le Bourvellec i sur., 2004). Obično se javljaju obje vrste interakcija, ali njihov omjer ovisi o okolišnim uvjetima. Temperaturni rasponi (4 – 37 °C) mogu različito djelovati na vezanje pojedinih polifenola na celulozu. Tako

je adsorpcija cijanidin-3 glukozida bila najbolja na 4 °C, ferulinske kiseline na 20 °C dok na adsorpciju (+/-)-katehina temperatura nije imala utjecaja. pH također utječe na stabilnost polifenola (Phan i sur., 2016). Utvrđeno je da se različiti fenoli ponašaju različito pri različitim pH vrijednostima (pH = 3 - 11). Kafeinska, klorogenska i galna kiselina su bile puno stabilnije pri nižem pH, a promjene koje su im se dogodile pri višem pH nisu bile reverzibilne dok su (-)-katehin i (-)- epigalokatehin, ferulinska kiselina i rutin bili otporniji na pH - degradaciju (Friedman i Juergens, 2000). pH može utjecati i na molekule prehrambenih vlakana. Utjecaj pH na molekule polifenola ili prehrambenih vlakna bi se mogao objasniti količinom protoniranih i deprotoniranih funkcionalnih skupina ili omjerom protoniranih i deprotoniranih molekula. S porastom pH omjer između protoniranih i deprotoniranih funkcionalnih skupina (A^-/A) također raste. To može dovesti do različitih odbojnih i privlačnih sila među molekulama i samim time utjecati na interakcije između prehrambenih vlakana i fenolnih spojeva (Liu i sur., 2013). U strukturne osobine polifenola koje mogu utjecati na vezanje s drugim spojevima (npr. prehrambenim vlaknima) općenito ubrajamo hidroksiliranje, glikoziliranje, metiliranje, metoksiliranje, galoiliranje, fleksibilnost i broj fenolnih prstena, veličina molekule i prostorna konfiguracija (Jakobek i Matić, 2019). Prisutnost galata u proantocijanidinima je povećala afinitet prema visoko metiliranim pektinima (Mamet i sur., 2018). Isto tako procijanidini s visokim udjelom galoilat iona mogu povećati afinitet vezanja za staničnu stijenku izoliranu iz jabuke (Le Bourvellec i sur., 2004). Iz tog razloga je predloženo da se u svrhu pospješivanja vezivanja treba uvoditi više galatnih jedinica kako bi se osiguralo više hidroksilnih skupina koje pospješuju vezivanje (Mamet i sur., 2018). Procijanidini su pokazali veliki afinitet prema pektinima koji su jedna od glavnih komponenti stanične stijenke (Jakobek i Matić, 2019). Fenolne komponente koje imaju više aromatičnih prstenova se bolje vežu na celulozu. Veće molekule se mogu više vezati na prehrambena vlakna (Phan i sur., 2016). Mala molekula (npr. epikatehin) u manjoj mjeri veže za celulozu od velikih molekula (npr. procijanidin B2) (Liu i sur., 2017). Procijanidini s većim stupnjem polimerizacije se bolje vežu za staničnu stijenku izoliranu iz jabuke od onih s manjim stupnjem polimerizacije (Le Bourvellec i sur., 2004). Prostorna konfiguracija molekule također utječe na vezanje pa je tako utvrđeno da je u interakciji tanina i pektina proantocijanidin A-tipa imao veći afinitet vezanja za pektin s obzirom da mu je struktura „izdužena“ pa ima više dodirnih mjesta s molekulom pektina (Mamet i sur., 2018). Hidrofilni fenolni spojevi će reagirati s hidrofilnim prehrambenim vlaknima, a hidrofobni fenolni

spojevi s hidrofobnim prehrambenim vlaknima. iz tog razloga prehrambena vlakna koja imaju hidrofobni karakter vežu hidrofobne fenolne spojeve (Liu i sur., 2013). Kod prehrambenih vlakana, isto kao kod fenolnih spojeva, je teško utvrditi svojstva koje su važna za vezanje s ostalim spojevima (npr. fenolnim spojevima), no ipak bi se mogao izdvojiti broj OH- skupina, stupanj stvaranja nakupina prehrambenih vlakana, različiti čimbenici koji utječu na nakupljanje, veličina i stabilnost nakupina te stukturna i konformacijska organizacija vlakana (Le Bourvellec i Renard, 2005; Liu i sur., 2017). Prehrambena vlakna imaju veliki broj OH-skupina zbog molekula šećera u svojoj strukturi što im daje mogućnost stvaranja vodikovih veza i nastajanja Van der Waalsovih sila pa je i predloženo da bi broj OH-skupina mogao utjecati na interakciju između fenola i celuloze (Liu i sur., 2017). Prehrambena vlakna mogu biti ravne (tj. linearne) ili razgranate molekule, imati šupljine kao i različite veličine pora. Polifenolni spojevi mogu ući u te pore i pretpostavlja se da do toga dolazi u interakciji između procijanidina i pektina kao i u interakciji između polifenola i β-glukana dok molekule veće od pora uglavnom ne bi mogle ući (Le Bourvellec i Renard, 2005).

2.4.3. Primjena prehrambenih vlakana u razvoju novih proizvoda

U proizvodnji kruha, žitarica za doručak, tjestenine, pekarskih proizvoda i ekstrudiranih snack proizvoda mogu se koristiti sirovine bogate prehrambenim vlakinima. Mesnim, ribljim i mliječnim proizvodima uključujući fermentirana pića mogu se dodavati izolirana i pročišćena prehrambena vlakna na netradicionalnim nosačima prehrambenih vlakana sa svrhom obogaćivanja proizvoda. U proizvodnji restrukturiranih mesnih i ribljih proizvoda, kruha i ekstrudiranih snack proizvoda može se koristiti otpad pri proizvodnji hrane bogat prehrambenim vlaknima kako bi se poboljšale formulacije proizvoda. Što se tiče žitarica, u razvoju novih prozvoda se mogu koristiti posije pšenice, riže, kukuruza, zobi i dr. Kod voća u obzir dolaze nusproizvodi prerade naranči, limuna, limete, breskvi i dr. Od povrća u obzir dolaze nusproizvodi pri preradi maslina, krumpira, mrkve, cvjetače, soje, graha i dr. Od ostalih sirovina mogle bi se koristiti šećerna repa i šećerna trska (Li i Komarek, 2017). Dodatak topljivih prehrambenih vlakana u pića povećava viskoznost i stabilnost. Topljiva prehrambena vlakana se više koriste od netopljivih jer su disperzivnija u vodi (Mandić i Nosić, 2009; Dhingra i sur., 2012). Kao primjer mogu poslužiti topljiva vlakna žitarica i raznog voća. Prehrambena vlakna se mogu dodavati i u proizvodnji dijetalnih pića kako bi se pomoglo

ljudima s posebnim prehrambenim potrebama kao i s ciljem redukcije tjelesne mase te kao zamjena pojedinih dnevnih obroka (Dhingra i sur., 2012). Potrošači su jako dobro prihvatili jogurt obogaćen s 1,3 % vlakana jabuke, pšenice, inulina i bambusa (Staffolo i sur., 2004). U pokušaju proizvodnje pilećih medaljona koji sadrže malo soli i masnoće te visoki udio prehrambenih vlakana između ostalih su korištena i vlakna pulpe jabuke. Od ostalih prehrambenih vlakana su korištena ona iz graška i tikvica (Verma i sur., 2009).

Interakcije između ugljikohidrata i polifenola mogu se koristiti za mikroenkapsulaciju što podrazumijeva da je aktivna tvar na određeni način „zarobljena“ u okolnoj tvari (Jakobek, 2015). Naši kompleksi bi se mogli koristiti u proizvodnji sladoleda kako bi povećali antioksidacijsku stabilnost kao i inhibitornu aktivnost u odnosu na α-glukozidazu. Također bi se mogli koristiti i u jogurtima jer je primjećena viša antioksidacijska aktivnost u jogurtima s dodanim mikroenkapsuliranim ekstraktima (u usporedbi s ekstraktima, dodanim u jogurt, bez mikroenkapsulacije). U usporedbi s običnim jogurtima primjećena je viša koncentracija fenolnih spojeva i antocijana u jogurtima koji sadrže mikroenkapsulirane ekstrakte. Naši mikroenkapsulati bi se mogli koristiti i za izradu „zdravih“ žvakaćih guma, a slične žvakaće gume su već rađene uz uporabu kazeina i inulina. Također bi se mogle izrađivati i male aromatizirane kockice šećera za zaslađivanje čajnih napitaka (Dias i sur. 2015). Naši kompleksi bi se mogli koristiti i u proizvodnji izotoničnih bezalkoholnih pića. Antocijani se inače koriste za bojanje hrane i pića jer imaju veliku sposobnost bojanja, nisku toksičnost i jako dobru topljivost u vodi. Međutim ovi pigmenti su nestabilni i mogli bi se razgraditi u bezbojne spojeve pod utjecajem pH, temperature, svjetlosti, kisika ili nekog drugog čimbenika. Stoga bi se mikroenkapsulacija mogla upotrijebiti za povećanje stabilnosti ovih pigmenata (Peanparkdee i sur., 2016). Ovdje bi naši mikroenkapsulati, tj. kompleksi također mogli naći svoju primjenu.

2.5. ŠEĆERI

Ugljikohidrati imaju glavnu ulogu u metabolizmu životinja i biljaka. Predstavljaju jedan od glavnih nutrijenata i količinski su najvažniji izvor energije. Energetska vrijednost jednog grama ugljikohidrata iznosi 4 kcal ili 17 kJ (Belitz i sur., 2009).

Ugljikohidrati se prema stupnju polimerizacije djele na monosaharide, oligosaharide i polisaharide. „Glikemijski ugljikohidrati“ (ili ugljikohidrati s glikemijskim indeksom) se u probavnom traktu mogu hidrolizirati enzimima u monosaharide te apsorbirati u krvotok i metabolizirati. „Neglikemijski ugljikohidrati“ (ili ugljikohidrati bez glikemijskog indeksa) u različitim stupnjevima fermentiraju u debelom crijevu do kratko-lančanih masnih kiselina, ugljikovog(IV)-oksida, vodika i metana. Apsorbirane kratko-lančane masne kiseline se apsorbiraju u epitelu debelog crijeva, jetrenim stanicama i mišićnim stanicama. Unos različitih vrsta ugljikohidrata je povezan s pozitivnim utjecajima na zdravlje zbog utjecaja na ravnotežu energije, probavni trakt, kontrolu glukoze u krvi kao i za druge rizične čimbenike za pojedine kronične bolesti (Gibney i sur., 2009).

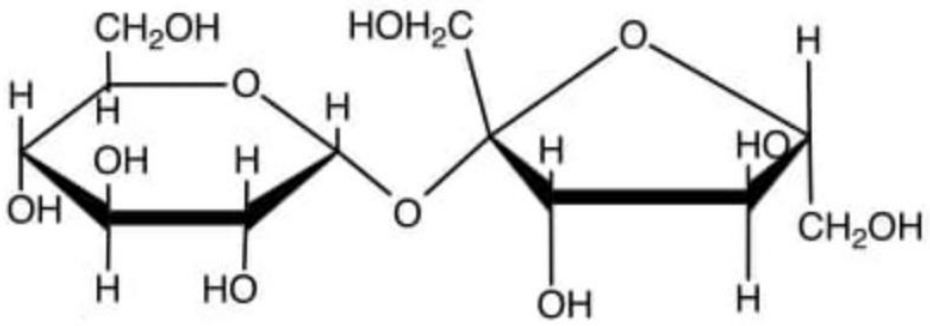
Hrana koja ima visoki glikemijski indeks uzrokuje nagle i visoke poraste razine glukoze u krvi dok ona sa niskim glikemijskim indeksom uzrokuje male promjene razine glukoze u krvi. Hrana s niskim glikemijskim indeksom ima niz zdravstvenih prednosti zato što su „skokovi“ glukoze u krvi i proizvodnja inzulina svedeni na minimum (Liu i sur., 2012).

2.5.1. Saharoza

Saharoza (**Slika 11**) je najzastupljeniji disaharid u prirodi. Građena je od jedne jedinice glukoze i jedne jedinice fruktoze. Njezina molekularna masa (342,31). Glikozidna veza je između anomernog C-1 atoma glukoze i anomernog C-2 atoma fruktoze i upravo ta neraspoloživost anomernih C-atoma sprječava saharozu da sudjeluje u Maillard-ovim reakcijama sa aminokiselinama iz proteina, tj. budući da aldehidne i keto skupine nisu kemijski reaktivne, za saharozu možemo reći da je nereducirajući šećer. Međutim, saharoza ipak može sudjelovati u Maillard-ovim reakcijama ako se prvo hidrolizira do glukoze i fruktoze do čega dolazi ako se produkti (čak i ako su blago kiseli) zagrijavaju. Saharoza ima molekularnu formulu $C_{12}H_{22}O_{11}$ i sintetizira se u citosolu stanica lista (Featherstone, 2015; BeMiller, 2019).

Hidroliza saharoze dovodi do nastajanja jednakih količina D-glukoze i D-fruktoze i tako dobiveni šećer se naziva „invertni šećer“ budući da je došlo do promjene smjera rotacije tijekom hidrolize. U saharozi je rotacija pozitivna dok je negativna u hidrolizatu. Saharoza je dobro topljiva u širokom temperaturnom rasponu i to svojstvo ju čini izvrsnim sastojkom za

sirupe kao i ostale namirnice koje imaju sadržane šećere (npr. sokove) (De Man, 1999; Belitz i sur., 2009).

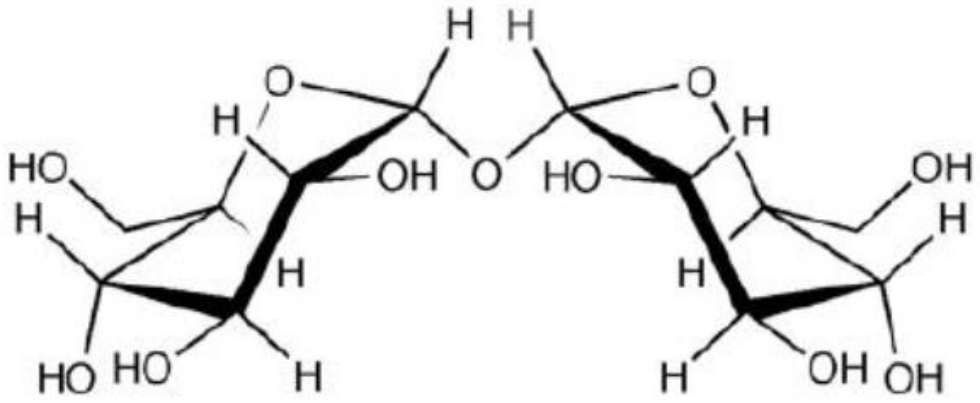


Slika 11 Struktura saharoze (https://biologydictionary.net/sucrose/)

2.5.2. Trehaloza

Trahaloza (**Slika 12**) je nereducirajući disaharid koji se sastoji od dvije glukozne jedinice koje su međusobno povezane α (1→1) glikozidnom vezom. Još je poznata pod nazivima mikoza i tremaloza te ima molekularnu formulu $C_{12}H_{22}O_{11}$. Budući da je jedan reducirajući kraj glikozilnog ostatka povezan s drugim, trehaloza nema reducirajuću sposobnost pa zato ne može sudjelovati u Maillard-ovim reakcijama sa amino-spojevima (poput aminokiselina i proteina) do kojih bi inače dolazilo u proizvodima kao što su voćni sokovi. Zato trehaloza ima široko područje primjene u industriji hrane i pića te joj je područje primjene puno veće nego prije. Osim u proizvodnji sokova trehaloza se može koristiti i u proizvodnji pekarskih proizvoda jer sprječava razgradnju škroba, te ujedno može spriječiti i apsorpciju vlage kod sušenih (dehidratiranih) proizvoda kao što su žitarice za doručak, riža i rezanci (Elbein i sur., 2003). Trehaloza ima istu relativnu molekularnu masu i kemijsku formulu kao saharoza.

Relativna slatkoća trehaloze iznosi 45 % od saharoze. Trehaloza je termostabilna i ima visok raspon prihvatljivih pH vrijednosti. Iz tog razloga se smatra jednim od najstabilnijih ugljikohidrata. Zagrijavanjem 4 %-tna otopina trehaloze, različitih pH vrijednosti (od 3,5 do 10) na 100 °C tijekom 24 sata niti u jednom slučaju nije došlo do degradacije trehaloze. Trehaloza ima značajnu ulogu u zaštiti organizma od različitih okolišnih stresova, npr. dehidracije, topline, hladnoće i oksidacije. Do sada su poznata 3 različita puta biosinteze trehaloze. Trehaloza se u prehrambenoj industriji koristi kao sladilo (Higashiyama, 2002).



Slika 12 Struktura trehaloze (Elbein, 2003)

Trehaloza je bila sastavni dio ljudske prehrane još od pradavnih vremena te ima veći hidracijski kapacitet od saharoze (Kopjar i sur., 2016). Ograničena je samo na jednu stabilnu konformaciju koja oblikom podsjeća na školjku. „Otvorena“ strana školjke (tzv. „dno“) je hidratiziran, a „zglobni dio“ školjke (tzv. „vrh“) je manje hidratiziran. Trehaloza može stupiti u interakcije i s hidrofilnim i s hidrofobnim molekulama. Za očekivati je da će doći do stvaranja trehaloza-benzen kompleksa u vodenim otopinama, a benzenske molekule bi bile smještene samo na „vršnom“ djelu trehaloze. Postoje jasni dokazi o stvaranju kompleksa trehaloze i benzena kao i *p*-krezola zato što su nezasićene veze u benzenu slične *cis* dvostrukim vezama. Molekula benzena prvo prilazi „vršnom“ djelu trehaloze i dolazi do interakcije pomoću van der Waalsovih sila, a na „otvorenom“ dijelu trehaloze dolazi do nastajanja vodikovih veza između molekula vode i -OH skupina molekule trehaloze. Ovakvi kompleksi se ne stvaraju između ostalih disaharida i benzena jer kod ostalih disaharida dolazi do stvaranja konformacijskih promjena oko glikozidnih veza što uzrokuje neprestane promjene orijentacije hidrofobnih „džepova“ koje onemogućuju nastajanje kompleksa s molekulama poput benzena (Skakakura i sur., 2011).

U posljednje vrijeme se u prehrambenoj industriji trehalozi pridaje sve više pažnje zbog njezinog pozitivnog djelovanja na kvalitetu gotovog proizvoda (Zlatic i sur., 2017). Istraživanja su pokazala da trehaloza, u usporedbi sa saharozom, značajno doprinosi smanjivanju rizika od nastanka karijesa. Bakterije *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus* proizvode manje mliječne kiseline iz trehaloze nego iz saharoze pa kažemo da je trehaloza manje kariogena od saharoze (Neta i sur., 2000). Nedavna istraživanja su pokazala

da se trehaloza probavlja puno sporije od saharoze te da ima niži glikemijski indeks i da dovodi do manjeg oslobađanja inzulina, za razliku od saharoze (Van Can i sur., 2012). Budući da se samo djelomično razgrađuje u probavnom traktu ljudi smatra se „dijetetskim šećerom“ (Rai i Bai, 2015). Postprandijalni „skokovi“ glukoze mogu uzrokovati oštećenja krhkih krvnih žila u srcu, mozgu, bubrezima, očima i stopalima. Trehaloza može pomoći u prevenciji od ovih rizika budući da ne podiže razinu glukoze u krvi naglo, ali potrebna je evaluacija prije potencijalne uporabe trehaloze, kao zaslađivača, u dijabetičara (Yoshizane i sur., 2017). Glikemijski indeks glukoze je 100, a trehaloze 67 (Jentjens i Jeukendrup, 2003). Enzim trehalaza različito djeluje kod različitih pojedinaca i razina glukoze u krvi sporije raste kod pojedinaca sa smanjenom aktivnošću trehalaze. Hipoglikemija je malo vjerojatna čak i ako pojedinac konzumira veliku količinu trehaloze budući da se trehaloza apsorbira u krv sporo i kontinuirano te dovodi do blagog inzulinskog odgovora. Stoga je manje vjerojatno da će doći do inhibiranja lipidne oksidacije što dovodi do očuvanja ugljikohidrata te se zato njen unos preporučuje prije duljih sportskih vježbi (Wadazumi i sur., 2019). Predložen je model prema kojem trehaloza sprječava preveliku apsorpciju glukoze u tankom crijevu jer inhibira glukozne transportere (GLUT) (Yoshizane i sur., 2017). Trehaloza može blokirati steatozu uzrokovanu prehranom ili genetički (Higgins, 2018).

Razine trehaloze mogu biti vrlo raznolike u različitim stanicama što ovisi o stupnju razvoja, nutritivnom statusu organizma ili stanice i okolišnim uvjetima koji prevladavaju u vrijeme mjerenja razine. Kod insekata je trehaloza glavni šećer u hemolimfi i mišićima grudnog koša i insekti ga koriste tijekom letenja (Becker i sur., 1996). Stanice kvasaca i spore gljivica imaju sposobnost preživljavanja u odsustvu vode što je u jakoj korelaciji sa sintezom trehaloze. Ova sposobnost preživljavanja u prisutnosti trehaloze je neovisna o fazi rasta u kojoj se nalaze mikroorganizmi te ako su mikroorganizmi podvrgnuti toplinskom šoku u logaritamskoj fazi rasta ubrzano počinju sintetiziraju trehalozu i stvaraju sposobnost preživljavanja dehidracije (Hottinger i sur., 1987). Ova uporaba trehaloze za preživljavanje dehidracije (kao i drugih stresnih uvjeta) je primjećena čak i u arheobakterija koje akumuliraju trehalozu kao odgovor na stres. Većina organizama više preferira trehalozu u odnosu na saharozu jer trehaloza ima manju sklonost formiranja kristala u odnosu na saharozu (Nicolaus i sur., 1988). Najmanje dvije podjedinice kompleksa trehaloza-6-P sintaze iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* se aktivno sintetiziraju za vrijeme toplinskog šoka (Bell i sur., 1992). Fiziološke koncentracije

trehaloze (do 0,5 M) štite enzime kvasaca i ostalih organizama od inaktivacije toplinom. Trehaloza također reducira nastajanje proteinskih nakupina (tj. agregata) te ima bolje stabilizirajuće djelovanje na proteine od otopljenih tvari kao što su polioli, šećeri i aminokiseline (DeVirgilio i sur., 1994). Slijedeća uloga trehaloze je zaštita stanica od radikala kisika (tj. reaktivnih vrsta kisika). Izlaganje kvasca *Saccharomyces cerevisiae* srednje jakim toplinskim šokovima ili inhibitoru proteosoma dovelo je do akumulacije trehaloze i izrazito povećalo održivost stanica prema djelovanju slobodnih radikala (tj. reaktivnih vrsta kisika) (H_2O_2/Fe). Drugim riječima, visoka koncentracija trehaloze u stanici je spriječila da reaktivne vrste kisika oštete aminokiseline u staničnim proteinima. Zato se trehaloza smatra „hvatačem slobodnih radikala“. Saharoza nema tu sposobnost (Benaroudj i sur., 2001). Soj *Escherichie coli* za koji je utvrđeno da ne može producirati trehalozu ugibao je na 4 °C puno brže od „divljeg“ soja. Dodatnim istraživanjem da se sniženjem temperature s 37 °C na 16 °C nivo trehaloze se povećao za osam puta. Egzogena trehaloza može zaštititi razne organizme od smrzavanja, ali najveća zaštita se postiže kada je trehaloza prisutna s obje strane membrane (Kandror i sur., 2002). Trehaloza i povezani metaboliti mogu djelovati kao regulatori biljnog rasta i razvoja. Ovo djelovanje bi moglo biti slično djelovanju trehaloze-6-fosfata na heksokinaze i glikolizu u kvascima (Muller i sur., 1999). Najpoznatiji i najdetaljnije proučavani trehalozni lipid je lipid stanične stijenke bakterije *Mycobacterium tuberculosis* koji sadrži masnu kiselinu koja se naziva mikolična kiselina. Ova kiselina je esterificirana na šestoj hidroksilnoj skupini svake glukoze pri čemu nastaje trehaloza-dimikolat. Taj lipid se smatra jednom od najtoksičnijih komponenata stanične stjenke i također je u velikoj mjeri odgovoran za nisku propusnost stanične stjenke mikobakterija koja dovodi do znatne otpornosti (tj. rezistencije) prema lijekovima u mikobakterija. U nekim bakterijama, naročito aktinomicetama, trehaloza je temeljna komponenta različitih glikolipida koji se nalaze u staničnoj stijenci (Brennan i Nikaido, 1995). Ovaj šećer je pokazao pozitivno djelovanje na očuvanje komponenti poput polifenola (Lončarić i sur., 2016). U mnogim slučajevima je dokazano da trehaloza ima stabilizirajuće djelovanje na fenole i antocijane (Kopjar i sur., 2017). Vjerojatno vrlo važnu ulogu u utjecaju trehaloze na fenolne spojeve ima primijenjena metoda procesiranja te uvjeti tijekom procesiranja (visoka temperatura, sušenje zamrzavanjem i zamrzavanje), dodavanje određenih sastojaka kao i profil fenolnih spojeva (Kopjar i sur., 2016). Komponente koje imaju nezasićene veze se u vodenim otopinama mogu povezivat sa trehalozom, ali ne i sa drugim disaharidima. Na taj način bi se moglo objasniti

stabilizirajuće djelovanje trehaloze na fenole jer se aromatski prstenovi pričvršćuju u dehidratiranim, hidrofobnim džepovima trehaloze stvarajući kompleks (Sakakura i sur., 2011). Trehaloza može formirati stabilne intramolekularne komplekse s nezasićenim spojevima koji sadrže cis dvostruke veze (Oku i sur., 2003).

Trehaloza može „zarobiti“ hlapljive tvari na puno djelotvorniji način od saharoze, ali nema dovoljno senzornih dokaza koji bi mogli dovoljno poduprijeti razliku između ova dva disaharida (Galmarini i sur., 2011). Tekstura, boja, okus i svojstva koja se zadržavaju tijekom kuhanja širokog spektra namirnica ostaju očuvana ako im se prije sušenja dodala trehaloza. Voćni pirei kojima je dodana trehaloza se lakše suše i dobivaju se stabilni suhi prašci. Ako se voćnom prašku koji sadrži trehalozu dodaje voda vraćaju se viskoznost i tekstura svježeg pirea te nakon kratkog vremena proizvod dobiva jedinstvenu aromu po svježem voću. Ako se sušio prašak kojemu nije dodana trehaloza proizvod se puno teže rekonstituira i gubi dosta od svoje arome. Uz primjenu standardnih metoda sušenja, bez dodatka tehaloze, proizvodi gube mnoga od svojih svojstava arome. Kriške banane sušene bez trehaloze postaju smeđe i hrskave i ne mogu se rehidrirati, ali to se ne događa u slučaju s kriškama banane koje su se sušile uz dodatak trehaloze jer se dobivaju mekane voćne kriške s bojom i teksturom svježe banane. Bilje sušeno bez dodatka trehaloze je postajalo smeđe i drvenasto i izgubilo svu aromu tijekom skladištenja (Mathlouthi, 1994). Trehaloza tvori četiri vodikove veze s dvije molekule vode (Roser, 1991). Trehaloza je hidrofilna i zato se šećerno staklo trehaloze ne miješa sa ili nije propusno za hidrofobne hlapljive aromatične komponente kao što su esteri. Šećerna stakla se dobivaju hlađenjem šećerne tekućine dovoljno brzo da atomi ne stignu formirati kristalnu rešetku. Zbog te nekompatibilnosti aromatične komponente su „zarobljene“ (tj. „uhvaćene“) u šećernom staklu i mogu se (ponovno) osloboditi samo rekonstitucijom. Šećerna stakla podrijetlom od drugih šećera postaju porozna i propusna za hlapljive aromatične komponente te dovode do gubitka arome proizvoda tijekom vremena. Trehaloza ima sposobnost suzbijanja neugodnih mirisa koji potječu od npr. riba i mesa (kao i od ljudi) a također i sposobnost zadržavanja poželjnog izgleda i kvalitete procesirane hrane (Ohtake i Wang, 2011). Općenito vrijedi da oslobađanje arome ovisi o velikom broju promjenjivih parametara među kojima su najvažniji hidrofobnost, topljivost u vodi te prisutnost i smještaj funkcionalnih skupina, a također i o velikom broju interakcija koje se mogu pojaviti između spojeva (Branca i sur., 1999; Patist i Zoerb, 2005). Trehaloza ima veću

djelotvornost kao donor vodikovih veza od ostalih disaharida što dovodi do stabiliziranja biomolekula tijekom dehidracije (Branca i sur., 1999).

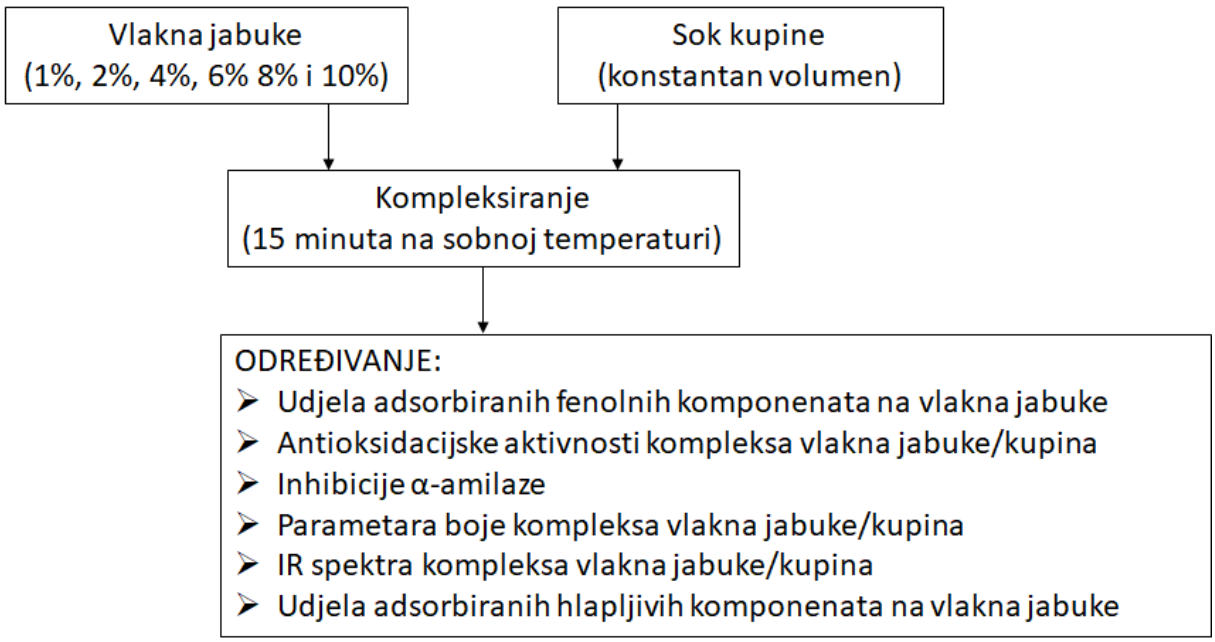
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog specijalističkog rada podijeljen je u dva dijela. Prvi dio obuhvaća pripremu bioaktivnih dodataka hrani na bazi vlakna jabuke i njihovu karakterizaciju, a drugi dio obuhvaća pripremu bioaktivnih dodataka hrani na bazi vlakna jabuke i disaharida i njihovu karakterizaciju.

Priprema bioaktivnih dodataka hrani na bazi vlakna jabuke i njihova karakterizacija:

- Priprema kompleksa vlakna jabuke/kupina u obliku suhog praha (vlakna jabuke su korištena u različitim udjelima dok je količina soka kupine bila konstantna);
- Određivanje adsorbiranih ukupnih fenola kupine na vlakna jabuke;
- Određivanje adsorbiranih ukupnih proantocijanidina kupine na vlakna jabuke;
- Određivanje adsorbiranih antocijana kupine na vlakna jabuke;
- Određivanje antioksidacijske aktivnosti kompleksa vlakna jabuke/kupina (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode);
- Određivanje inhibicije α-amilaze;
- Određivanje parametara boje kompleksa vlakna jabuke/kupina (L*, a*, b*, °h, C*, ΔE);
- Određivanje strukturnih promjena kompleksa vlakna jabuke/kupina u odnosu na vlakna jabuke;
- Određivanje hlapljivih komponenata na kompleksima vlakna jabuke/kupina;
- Utvrđivanje utjecaja različite količine vlakana jabuke na ispitivane parametre.

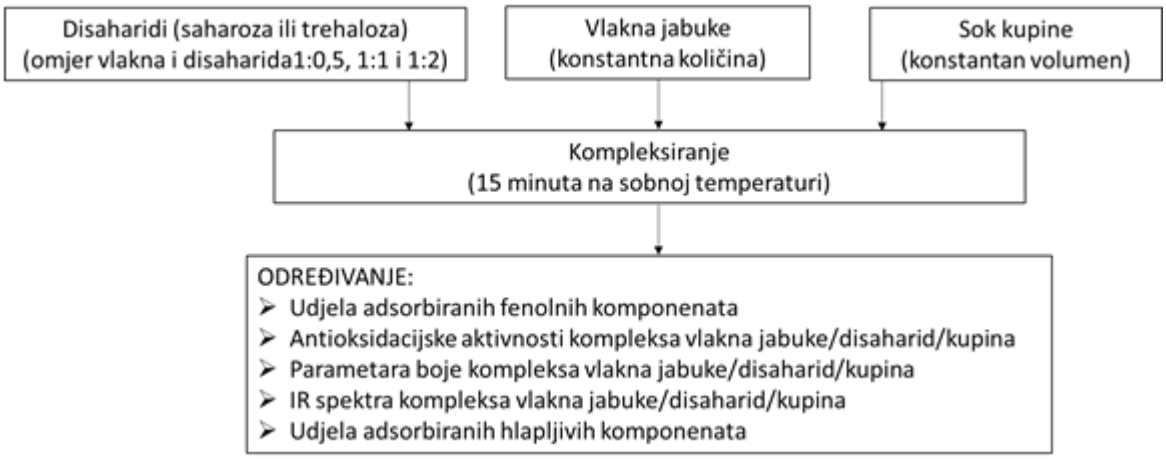


Slika 13 Shematski prikaz prvog dijela rada

Priprema bioaktivnih dodataka hrani na bazi vlakna jabuke/disaharid i njihova karakterizacija:

- Priprema kompleksa vlakna jabuke/disaharid/kupina u obliku suhog praha (kontrolni uzorak je bio kompleksa vlakna jabuke/kupina dok je za pripremu kompleksa sa dodatkom disaharida udio disaharida varirao a količina vlakna jabuke i količina soka kupine su bili konstantni; od disaharida su se koristili saharoza i trehaloza a omjer vlakna i disaharida bio je 1:0,5, 1:1 i 1:2);
- Određivanje adsorbiranih ukupnih fenola kupine na komplekse vlakna jabuke/disaharid;
- Određivanje adsorbiranih ukupnih proantocijanidina kupine na komplekse vlakna jabuke/disaharid;
- Određivanje adsorbiranih antocijana kupine na komplekse vlakna jabuke/disaharid;
- Određivanje antioksidacijske aktivnosti kompleksa vlakna jabuke/disaharid/kupine (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metode);
- Određivanje parametara boje kompleksa vlakna jabuke/disaharid/kupine (L*, a*, b*, °h, C*, ΔE);
- Određivanje strukturnih promjena kompleksa vlakna jabuke/disaharid/kupine u odnosu na vlakna jabuke;

- Određivanje hlapljivih komponenata na kompleksima vlakna jabuke/kupina;
- Utvrđivanje utjecaja tipa disaharida i različitih omjera vlakna jabuke i disaharida na ispitivane parametre.



Slika 14 Shematski prikaz drugog dijela rada

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

Kalij klorid, natrij acetat, klorovodična kiselina, octena kiselina, metanol, natrij karbonat, željezo klorid, amonij acetat Folin-Ciocalteu reagens, saharoza su nabavljeni od proizvođača Kemika (Zagreb). Trolox je nabavljen od proizvođača Sigma (Njemačka). 2,2'-azinobis (3-etilbenztiozolin-sulfonska kiselina) (ABTS) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) su nabavljeni od proizvođača Fluka (Njemačka). 2,4,6,-tri(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), galna kiselina, procijanidin B2 su nabavljeni od proizvođača Sigma, Njemačka. Neokuproin, bakar klorid su proizvodi Gram-mola (Hrvatska). Trehaloza je dovivena od kompanije Hayashibara doo (Japan), a vlakna jabuke od kompanije Biesterfeld AG (Zagreb, Croatia).

3.2.2 Priprema bioaktivnih dodataka hrani

Bioaktivni dodatci hrani na bazi vlakana pripremljeni su kompleksiranjem vlakana jabuka i soka kupine. Sok kupine pripremljen je prešanjem zrelih plodova kupine te zbog uklanjanja

krutih dijelova filtracijom kroz gazu. Tako pripremljeni sok termički je obrađen na 90 °C 3 minute radi inaktivacije enzima.

Za pripremu kompleksa vlakna jabuke/kupina, vlakna jabuke i sok kupine miješani su 15 minuta na magnetskoj miješalici (600 rpm) na sobnoj temperaturi u odgovarajućim omjerima (**Tablica 3**). Nakon toga, dobivena smjesa je centrifugirana 15 minuta pri 4000 rpm. Centrifugiranjem se je odvojio kruti od tekućeg dijela te je mokri kruti dio odvojen kako bi se upotrijebio za pripremu suhog praha odnosno suhog kompleksa vlakna jabuke/kupina. Suhi kompleksi vlakna jabuke/kupina su dobiveni liofilizacijom. Prije postupka liofilizacije, mokri kruti dio dobiven centrifugiranjem je zamrznut na -18 °C 24 sata, a liofilizacija je provedena u liofilizatoru (Christ Freeze Dryer, Alpha 1-4, Germany). Uvjeti liofilizacije podešeni su tako da je temperatura zamrzavanja bila -55 °C, temperatura sublimacije od -35 °C do 0 °C pod vakuumom od 0,220 mbar te u završnoj fazi temperatura izotermne desorpcije od 0 °C do 22 °C pod vakuumom od 0,060 mbar. Cijeli proces liofilizacije trajao je 12 sati.

Tablica 3 Kemijski sastav kompleksa vlakna jabuke/kupina (prvi set uzoraka)

Oznaka uzoraka	Vlakna jabuke (g)	Sok kupine (mL)
VJ_1%_K	0,5	50
VJ_2%_K	1	50
VJ_4%_K	2	50
VJ_6%_K	3	50
VJ_8%_K	4	50
VJ_10%_K	5	50

(VJ – vlakna jabuke; 1 – 10 % - udio vlakana prilikom pripreme kompleksa)

Za pripremu kompleksa vlakna jabuke/disaharid/kupina, vlakna jabuke, šećer i sok kupine miješani su 15 minuta na magnetskoj miješalici (600 rpm) na sobnoj temperaturi. Od šećera korištena su dva disaharida, saharoza i trehaloza, u različitim omjerima u odnosu na vlakna jabuke (**Tablica 4**). Za ovaj set uzoraka kao kontrolni uzorak pripremljen je i kompleks vlakna jabuke/kupina. Nakon toga, dobivena smjesa je centrifugirana 15 minuta pri 4000 rpm. Centrifugiranjem se je odvojio kruti od tekućeg dijela te je mokri kruti dio odvojen kako bi se upotrijebio za pripremu suhog praha odnosno suhog kompleksa vlakna jabuke/kupina. Suhi kompleksi vlakna jabuke/kupina su dobiveni liofilizacijom. Prije postupka liofilizacije, mokri kruti dio dobiven centrifugiranjem je zamrznut na -18 °C 24 sata a liofilizacija je provedena u

liofilizatoru (Christ Freeze Dryer, Alpha 1-4, Germany). Uvjeti liofilizacije podešeni su tako da je temperatura zamrzavanja bila -55 °C, temperatura sublimacije od -35 °C do 0 °C pod vakuumom od 0,220 mbar te u završnoj fazi temperatura izotermne desorpcije od 0 °C do 22 °C pod vakuumom od 0,060 mbar. Cijeli proces liofilizacije trajao je 12 sati.

Tablica 4 Kemijski sastav kompleksa vlakna jabuke/disaharid/kupina (drugi set uzoraka)

Oznaka uzoraka	Vlakna jabuke (g)	Sok kupine (mL)	Saharoza (g)	Trehaloza (g)
VJ	3	50	-	-
S_1:0,5	3	50	1,5	-
S_1:1	3	50	3	-
S_1:2	3	50	6	-
T_1:0,5	3	50	-	1,5
T_1:1	3	50	-	3
T_1:2	3	50	-	6

(S – saharoza; T – trehaloza; 1:0,5 – omjer vlakna jabuke:disaharida = 1:0,5; 1:1 – omjer vlakna jabuke: disaharida = 1:1; 1:2 – omjer vlakna jabuke:disaharida = 1:2)

3.2.3. Metode

3.2.3.1. Ekstrakcija uzoraka

Za određivanje ukupnih fenola, proantocijanidina, monomernih antocijana i antioksidacijske aktivnosti uzorci su ekstrahirani s zakiseljenim metanolom (metanol:koncentrirana HCl 99:1). Nakon ekstrakcije, smjesa je profiltrirana i dobiveni ekstrakti su korišteni za daljnje analize.

3.2.3.2. Određivanje ukupnih fenola

Udio ukupnih fenola određen je Folin-Ciocalteu metodom. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje galne kiseline.

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka, 1,8 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu (1:10) reagensa i 8 mL otopine natrijevog karbonata u epruvetu, promućka se i ostavi stajati 2 sata na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija se određuje na spektrofotometru pri 765 nm. Slijepa proba se pripravi sa destiliranom vodom (2 mL). Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.3.3. Određivanje proantocijanidina

Postupak: otpipetira se 0,1 mL uzorka te se doda 1 mL otopine 4-dimetil-amino-cinamaldehida. Reakcijska smjesa se ostavi stajati 30 minuta te se mjeri apsorbancija na 640 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za procijanidin B2. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.3.4. Određivanje fenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Sadržaj antocijana, fenolnih kiselina i flavonola određen je koristeći HPLC sustav 1260 Infinity II (Agilent technology, Santa Clara, CA, USA). Navedeni sustav se sastoji od sljedećih dijelova: kvaterna pumpa, detektor s diodnim nizom i kolona Poroshell 120 EC-C 18 (4,6 x 100 mm, 2,7 μm). Korištena metoda je opisana u radu Ivić i sur. (2021) te prethodno validirana. Kao mobilne faze korišteni su 0,1 %-tna H_3PO_4 (A) i 100%-tni metanol (B). Količina injektiranog uzorka iznosila je 10 μL, a protok je bio postavljen na 1 mL/min. Za razdjeljivanje je upotrijebljen sljedeći gradijent: 0 min 5 % B, 3 min 30 % B, 15 min 35 % B, 22 min 37 % B, 30 min 41 % B, 32 min 45 % B, 40 min 49 % B, 45 min 80 % B, 48 min 80 % B, 50 min 5 % B, 53 min 5 % B. Za pripremu kalibracijskih krivulja, korištene su koncentrirane otopine standarda koje su se razrjeđivale s metanolom kako bi se dobile različite koncentracije (klorogenska kiselina 25 - 500 mg/L (r^2 = 0,9990), kvercetin-3-*O*-ramnozid 5 - 150 mg/L (r^2 = 0,9975) i cijanidin-3-glukozid 10 - 300 mg/L (r^2 = 0,9991)). Kromatogrami su snimani u području od 190 do 600 nm. Antocijani su identificirani na 520 nm, hidroksicimetne kiseline na 320 nm, a flavonoli na 360 nm. Uzorci su analizirani u paralelama.

3.2.3.5. Inhibicija α-amilaze

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka te se pomiješa s 0,4 mL otopine α-amilaze (1 mg/mL). Smjesa se inkubira 10 minuta na 37 °C. Nakon toga se doda 0,2 mL otopine škroba (1 %) te se smjesa inkubira daljnjih 10 minuta na 37 °C. Zatim se doda 1 mL 3,5-dinitrosalicilne kiseline i smjesa se stavi u kipuću vodenu kupelj 5 minuta kako bi se zaustavila reakcija. Nakon toga se smjesa stavi u ledenu vodenu kupelj kako bi se ohladila na sobnu temperaturu i doda se 10 mL destilirane vode. Absorbanca se mjeri na 540 nm. Za svaki uzorak je određena kontrola

odnosno neinhibirana reakcija i slijepa proba odnosno uzorak bez dodanog enzima. Postotak inhibicije α-amilaze izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = (A_{inh} - A_{kon})/A_{sp} \times 100$$

A_{inh} – absorbanca inhibirane reakcije, A_{kon} – absorbanca neihnibirane reakcije, A_{sp} – absorbanca slijepe probe.

Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje mjerenje antioksidacijske aktivnosti korištene su četiri metode; DPPH, ABTS, CUPRAC i FRAP.

DPPH metoda

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka, 3 mL otopine DPPH, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 15 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

ABTS metoda

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka te se doda 3,2 mL otopine ABTS, dobro promiješa i smjesa se ostavi reagirati 1h i 35 min u mraku. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 734 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

CUPRAC metoda

Postupak: otpipetira se 1 mL otopine bakar klorida, 1 mL otopine neokuproina, 1 mL amonij acetata, 0,2 mL uzorka te 0,9 mL vode. Smjesa se homogenizira te ostavi stajati 30 minuta. Nakon inkubacije mjeri se absorbanca na 450 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

FRAP metoda

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka, 3 mL FRAP otopine, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 30 minuta. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.3.7. Određivanje parametara boje

Mjerenje boje kao i promjena boje praćeni su kromametrom (Minolta CR-400). Ovaj tip kromametra mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Svjetlost se reflektira, te takvu

svjetlost mjeri šest jako osjetljivih silikonskih fotoćelija. Podatke zapisuje računalo i izražava ih u pet različitih sustava (X, Y, Z; Yxy; LCH; Lab; Hunter Lab). U radu je korišten Lab sustav koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko.

Pomoću L* vrijednosti određuje se je li neki predmet taman ili svijetao. Ako je L* = 0 tada je predmet taman, a ako je L* = 100 predmet je svijetao. a* vrijednost određuje je li neki predmet crvene ili zelene boje. Ako je a* pozitivan predmet je crvene boje, a ako je a* negativan predmet je zelen. b* vrijednost određuje je li neki predmet žute ili plave boje. Ako je b* pozitivan predmet je žute boje, a ako je b* negativan predmet je plav.

Osim L*, a* i b* vrijednosti na kromametru su određeni i zasićenje (C*) i ton boje (°h). Ton boje (°h) definira vizualni doživljaj na temelju kojeg točno definiramo pojedinu boju npr. crvenu, plavu, zelenu itd. ovisno o dominantnoj valnoj duljini. Zasićenje (C*) definira udio čiste boje u ukupnom vizualnom doživljaju boje tj. udio pojedinih valnih duljina u ukupnom tonu boje. Svjetlina (L*) opisuje sličnost boje s nizom akromatskih boja od crne preko sive do bijele odnosno udio crne u nekom tonu boje.

Udaljenost između dvije točke u koordinatnom sustavu boje se izražava kao promjena boje odnosno ΔE. Promjena boje izračunava se na temelju L*, a* i b* vrijednosti prema slijedećoj formuli:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5}$$

$\Delta L^* = L^*_k - L^*_u$

$\Delta a^* = a^*_k - a^*_u$

$\Delta b^* = b^*_k - b^*_u$

(k – kontrolni uzorak; u – uspoređivani uzorak)

3.2.3.8. FTIR-ATR analiza

FTIR-ATR analizom utvrđene su strukturne promjene na vlaknima nakon kompleksiranja s fenolima soka kupine. Snimanje FTIR spektra provedeno je od 4000 do 600 cm^{-1} pomoću Cary 630 FTIR spektrometra.

3.2.3.9. Određivanje hlapljivih komponenata

Za određivanje hlapljivih komponenata korišten je plinski kromatoraf s masenim detektorom (GC-MS). Za pripremu uzorka korištena je tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME) za

koju je neophodna SPME aparatura. Polimerna stacionarna faza (unutar igle) bila je polidimetilsiloksana-divinilbenzen. U bočicu od 10 mL odvaže se 5 g uzorka te doda 1 g natrij klorida. U bočicu se ubaci magnet te se hermetički zatvori teflonskim čepom. Bočica se postavi u posudu s vodom te se, uz stalno miješanje uzorka magnetskom miješalicom, hlapljivi sastojci adsorbiraju na polimernu stacionarnu fazu. Prije samog ispuštanja igle u nadprostor uzorka, uzorak se 10 minuta miješa na vodenoj kupelji (40 °C) radi zasićenja nadprostora sa svrhom što bolje adsorpcije aromatičnih sastojaka. Adsorpcija se provodi na temperaturi od 40 °C (vodena kupelj) u trajanju od 45 minuta. Po završetku adsorpcije igla s adsorbiranim sastojcima odmah se stavlja u injektor plinskog kromatografa te slijedi njihova toplinska desorpcija. Određivanje kvantitativnog udjela hlapljivih sastojaka uzoraka provedeno je primjenom instrumentalne plinske kromatografije. U radu je korišten plinski kromatograf Agilent 7890B s masenim spektrometrom Agilent 5977A (Agilent Technologies, CA, USA)

Uvjeti uzorkovanja SPME metodom:

- vlakno divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS), 50/30 µm, Supelco, USA;
- adsorpcija: 45 min, 40 °C, 300 rpm;
- desorpcija: 7 min, 250 °C, splitless mod.

Uvjeti plinskog kromatografa i masenog spektrometra:

- kolona: HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm);
- temperature: od 40 °C (10 min) do 120 °C (3 °C/min), zatim do 250 °C (10 °C/min);
- plin nosioc: helij (čistoće 5.0), protok 1 mL/min;
- temperatura injektora: 250 °C;
- temperatura detektora: 280 °C;
- *m/z*: 40 do 400, 70 eV.

Količina hlapljivih komponenata je izražena preko mirtenola kao internog standarda.

3.2.3.10. Statistička analiza podataka

Statistička analiza rezultata je provedena pomoću ANOVA testa uz statističku značajnost od $P< 0,5$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Nekovalentne interakcije između polifenola i vlakana mogu značajno utjecati na fizikalno-kemijska i nutritivna svojstva hrane. Znanja o tim interakcijama mogu se koristiti za razvoj različitih vrsta funkcionalnih proizvoda budući da polifenoli i vlakna jabuke mogu doprinijeti smanjuju učestalosti različitih kroničnih bolesti. U prvom dijelu ovog istraživanja pripremljeni su bioaktivni dodaci hrane na bazi vlakana jabuke i soka kupine kako bi se utvrdila učinkovitost adsorpcije fenola soka kupine na vlakna jabuke. U drugom dijelu istraživanja željelo se je utvrditi da li se dodatkom disaharida (saharoze i trehaloze) prilikom kompleksiranja može poboljšati adsorpcija fenola soka kupine na vlakna.

4.1. BIOAKTIVNI DODATCI HRANI NA BAZI VLAKNA JABUKE

Udio fenola i proantocijanidina na kompleksima vlakna jabuke/kupina

U **Tablici 5** prikazan je udio adsorbiranih ukupnih fenola i proantocijandina na vlakna jabuke ovisno o udjelu vlakna jabuke korištenog prilikom pripreme kompleksa. Iz rezultata je vidljivo da je povećanjem dodatka vlakna jabuke prilikom pripreme kompleksa došlo do smanjenja adsorpcije ukupnih fenola. Najveći udio adsorbiranih ukupnih fenola imao je kompleks VJ_1%_K (1,823 g GAE/100 g). Povećanjem udjela vlakna jabuke utvrđeno je linearno smanjenje adsorpcije ukupnih fenola (koeficijent korelacije 0,9155), te je kompleks VJ_10%_K imao 1,183 g GAE/100 g ukupnih fenola. Smanjenje ukupnih fenola na kompleksima u odnosu na kompleks VJ_1%_K iznosilo je 1,88 %, 17,94 %, 29,65 %, 31,62 % i 35,09 % za komplekse VJ_2%_K, VJ_4%_K, VJ_6%_K, VJ_8%_K i VJ_10%_K. Proantocijanidini su imali drugačiji trend adsorpcije. Kao i u slučaju ukupnih fenola, najveći udio proantocijanidina imali su kompleksi VJ_1%_K (98,85 mg PB2/100 g) i VJ_2%_K (93,51 mg PB2/100 g). Kompleksi VJ_4%_K i VJ_6%_K imali su jednaku količinu proantocijanidina (oko 87 mg PB2/g), dok su preostala dva kompleksa imala znatno niže vrijednosti (73,47 mg PB2/100 g i 57,43 mg PB2/100 g za komplekse VJ_8%_K i VJ_10%_K). Inhibicija α-amilaze pomoću dobivenih kompleksa nije pratila trend dobiven za ukupne fenole i proantocijanidine. Za komplekse VJ_1%_K, VJ_2%_K i VJ_4%_K utvrđeno je povećanje inhibicije α-amilaze s povećanjem udjela vlakna (33,05 %, 35,90 % i 37,53 %). Daljnjim povećanjem udjela vlakna jabuke došlo je do smanjenja inhibicije α-amilaze na 33,3 % za VJ_6%_K i VJ_8%_K te čak na 22,10% za VJ_10%_K.

Tablica 5 Udio adsorbiranih polifenola i proantocijanidina na vlakna jabuke, te postotak inhibicije α-amilaze

Uzorci	Ukupni fenoli (g GAE/ 100 g)	Proantocijanidini (mg PB2/100 g)	% inhibicije α-amilaze
VJ_1%_K	1,823±0,002[a]	98,85±1,35[a]	33,05±0,67[c]
VJ_2%_K	1,789±0,011[b]	93,51±2,93[a]	35,90±0,37[b]
VJ_4%_K	1,496±0,014[c]	88,56±0,47[b]	37,53±0,10[a]
VJ_6%_K	1,282±0,017[d]	85,39±2,68[b]	33,14±0,23[c]
VJ_8%_K	1,246±0,010[e]	73,47±1,96[c]	33,56±0,29[c]
VJ_10%_K	1,183±0,008[f]	57,43±2,71[d]	22,10±0,21[d]

VJ – vlakna jabuke; K – sok kupine; 1% - 10% - udio vlakna jabuke prilikom kompleksiranja.
Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

Tablica 6 Udio (mg/100 g) adsorbiranih flavanola, antocijana i fenolnih kiselina na vlakna jabuke

Komponente	**Udio vlakna**					
	1%	**2%**	**4%**	**6%**	**8%**	**10%**
Flavonoli	*109,03*	*121,62*	*119,13*	*125,11*	*123,73*	*126,02*
K-3-*O*-ga	53,43±0,39[a]	51,23±0,30[b]	38,40±0,18[c]	35,24±0,04[d]	29,59±0,35[e]	29,20±0,02[e]
K	55,60±0,41[f]	70,39±0,88[e]	80,73±0,67[d]	89,87±0,87[c]	94,14±0,26[b]	96,82±0,55[a]
Antocijani						
C-3-g	254,68±1,94[b]	269,74±3,78[a]	188,78±2,93[c]	162,42±0,55[d]	135,53±1,28[e]	128,15±0,01[f]
Fenolne kiseline	*51,88*	*53,96*	*56,44*	*59,32*	*59,00*	*60,58*
Klo	17,42±0,05[f]	19,60±0,02[e]	21,84±0,18[d]	23,99±0,01[c]	24,65±0,28[b]	26,07±0,08[a]
HC - 1	18,00±0,16[b]	18,14±0,16[b]	18,26±0,01[b]	18,73±0,10[a]	18,25±0,08[b]	18,41±0,02[a]
HC - 2	16,46±0,04[b]	16,22±0,33[b,c]	16,34±0,04[b]	16,60±0,02[a]	16,10±0,03[c]	16,10±0,00[c]

K-3-*O*-ga - kvercetin-3-*O*-galaktozid; K – kvercetin; C-3-g - cijanidin-3-glukozid; Klo – klorogenska kiselina; HC - 1 i HC - 2 - derivati hidroksicimetne kiseline.
Vrijednosti u istom redu označene različitim slovima su statistički različite.

U **Tablici 6** prikazan je udio pojedinačnih identificiranih fenolnih komponenti. Od antocijana je identificiran cijanidin-3-glukozid. Najveći udio adsorbiranog cijanidin-3-glukozida utvrđen je za komplekse VJ_1%_K, VJ_2%_K (254,68 mg/100 g i 269,74 mg/100 g). Daljnjim povećanjem udjela vlakana udio cijanidin-3-glukozida se je smanjio (188,78 mg/100 g, 162,42 mg/100 g, 135,53 mg/100 g i 128,15 mg/100 g za VJ_4%_K, VJ_6%_K, VJ_8%_K i VJ_10%_K). Od flavanola identificirani su kvercetin i kvercetin-3-*O*-galaktozid. Udio kvercetina se je smanjio s povećanjem udjela vlakana prilikom kompleksiranja dok je za kvercetin-3-*O*-galaktozid utvrđen obrnuti trend odnosno s povećanjem udjela vlakana prilikom kompleksiranja udio kvercetin-3-*O*-galaktozid se je smanjio. Od fenolnih kiselina identificirane su klorogenska kiselina i dva derivata hidroksicimetne kiseline. Udio

adsorbirane fenolne kiseline na vlakna jabuke se je povećavao s povećanjem udjela vlakna prilikom kompleksiranja. Što se tiče derivata hidroksicimetne kiseline, njihova adsorpcija na vlakna nije ovisila o udjelu vlakana prilikom kompleksiranja. Iz rezultata je vidljivo da se inhibicija α-amilaze ne može direktno povezati s ukupnim fenolima ili proantocijanidinima već s pojedinačnim fenolnim komponentama odnosno njihovom udjelu, njihovim omjerima i njihovoj učinkovitosti u inhibiciji ovog enzima.

Antioksidacijska aktivnost kompleksa vlakna jabuke/kupina

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištene su 4 metode: DPPH, ABTS, CUPRAC i FRAP. Navedene metode imaju široku primjenu za utvrđivanje antioksidacijske aktivnosti proizvoda na bazi voća. Metode se međusobno razlikuju po mehanizmu djelovanja. DPPH i ABTS metode se baziraju na slobodnim radikalima odnosno reakciji $DPPH^{\cdot}$ i $ABTS^{+\cdot}$ slobodnih radikala s antioksidansima u uzorku, dok se CUPRAC i FRAP metoda baziraju na interakciji metala bakra i željeza s antioksidansima u uzorku. Obzirom na profil antioksidanasa u uzorku dobivaju se različiti rezultati primjenom ove četiri metode. Antioksidacijska aktivnost kompleksa vlakna jabuke/kupina prikazana je u **Tablici 7**. Primjenom svih metoda utvrđeno je da najveću antioksidacijsku aktivnost imao kompleks VJ_1%_K te da povećanjem količine vlakna dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti. Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom za kompleks VJ_1%_K iznosila je 109,693 μmol TE/100 g. Smanjenje antioksidacijske aktivnosti s povećanjem količine vlakna slijedilo je linearni trend sa srednjim koeficijentom korelacije 0,8696. Kompleksi VJ_2%_K, VJ_4%_K i VJ_6%_K su imali najsličnije vrijednosti antioksidacijske aktivnosti (101,006 μmol TE/100 g, 100,452 μmol TE/100 g i 98,813 μmol TE/100 g). Daljnjim povećanjem količine vlakna antioksidacijska aktivnost se je značajnije smanjila (95,584 μmol TE/100 g i 88,897 μmol TE/100 g). Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom su bile nešto niže u odnosu na vrijednosti dobivene DPPH metodom. Antioksidacijska aktivnost za kompleks VJ_1%_K iznosila je 106,860 μmol TE/100 g. Smanjenje antioksidacijske aktivnosti s povećanjem količine vlakna je linearno ali s nešto manjim koeficijentom korelacije u odnosu na DPPH metodu (0,8517). Dvostrukim povećanjem količine vlakna antioksidacijska aktivnost se je smanjila na 95,848 μmol TE/100 g. Kompleksi VJ_4%_K i VJ_6%_K su imali jednaku antioksidacijsku aktivnost (oko 82,5 μmol TE/100 g), a preostala dva kompleksa znatno niže vrijednosti 77,624 μmol TE/100 g i 73,738 μmol TE/100 g. Antioksidacijska aktivnost

određena FRAP metodom za kompleks VJ_1%_K iznosila je 13,194 µmol TE/100 g. Smanjenje antioksidacijske aktivnosti s povećanjem količine vlakna slijedilo je linearni trend s koeficijentom korelacije 0,9409. Kompleks VJ_2%_K imao je antioksidacijsku aktivnost 11,813µmol TE/100 g, kompleks VJ_4%_K 11,460 µmol TE/100 g, kompleks VJ_6%_K 10,697 µmol TE/100 g, kompleks VJ_8%_K 10,253 µmol TE/100 g i kompleks VJ_10%_K najmanju vrijednost odnosno 9,041 µmol TE/100 g. Između kompleksa VJ_2%_K i VJ_4%_K nije postojala statistički značajna razlika, isto kao i između kompleksa VJ_6%_K i VJ_8%_K. Primjenom CUPRAC metode dobivene su znatno više vrijednosti, ali trend linearne ovisnosti smanjenja antioksidacijske aktivnosti s povećanjem količine vlakna se je zadržao (koeficijent korelacije 0,9269). Kompleks VJ_1%_K imao je antioksidacijsku aktivnost 964,00 µmol TE/100 g, kompleks VJ_2%_K 888,65 µmol TE/100 g, kompleks VJ_4%_K 848,27 µmol TE/100 g, kompleks VJ_6%_K 830,95 µmol TE/100 g, kompleks VJ_8%_K 790,74 µmol TE/100 g i kompleks VJ_10%_K najmanju vrijednost odnosno 687,97 µmol TE/100 g.

Tablica 7 Antioksidacijska aktivnost (µmol TE/100 g) kompleksa vlakna jabuke/kupina

Uzorci	DPPH	ABTS	FRAP	CUPRAC
VJ_1%_K	109,639±0,115^{a}	106,860±0,119^{a}	13,194±0,107^{a}	964,00±3,08^{a}
VJ_2%_K	101,006±0,173^{b}	95,848±0,793^{b}	11,813±0,142^{b}	888,65±3,76^{b}
VJ_4%_K	100,452±0,639^{b,c}	82,768±0,419^{c}	11,460±0,104^{b}	848,27±2,93^{c}
VJ_6%_K	98,813±0,555^{c}	82,268±0,467^{c}	10,697±0,176^{c}	830,95±2,68^{d}
VJ_8%_K	95,584±0,833^{d}	77,624±0,310^{d}	10,253±0,124^{c}	790,74±2,52^{e}
VJ_10%_K	88,897±0,445^{e}	73,738±0,860^{e}	9,041±0,046^{d}	687,97±2,15^{f}

VJ – vlakna jabuke; K – sok kupine; 1% - 10% - udio vlakna jabuke prilikom kompleksiranja.
Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

Ovisnost antioksidacijske aktivnosti o fenolnim komponentama

Obzirom na profil antioksidanasa u uzorku dobivaju se različiti rezultati primjenom ove četiri metode odnosno struktura antioksidanasa definira ili jaču sposobnost inaktivacije odnosno blokiranja slobodnih radikala ili veći afinitet prema inaktivaciji metala. Što je koeficijent korelacije veći to je jača veza između pojedinih fenolnih skupina i antioksidacijske aktivnosti (**Tablica 8**). Ukupni fenoli imaju koeficijent korelacije s DPPH - antioksidacijskom aktivnosti 0,8566. S ABTS - antioksidacijskom aktivnosti koeficijent korelacije je viši, 0,9213. S druge dvije metode koeficijent korelacije je također dobar, 0,9318 i 0,8501 za FRAP i CUPRAC - antioksidacijsku aktivnost. Ovi rezultati indiciraju da ukupni fenoli imaju afinitet prema

blokiranju slobodnih radikala i interakciji s metalima. Proantocijanidini kao jedna od skupina fenola imaju visoki koeficijent korelacije i s FRAP i CUPRAC antioksidacijskom aktivnosti (0,9054 i 0,9496) a nešto niži s preostale dvije metode (0,9851 i 0,7241 za DPPH i ABTS). Visoki koeficijenti korelacije su naznaka da proantocijanidini imaju veći afinitet prema interakciji s metalima a nešto slabiji prema blokiranju slobodnih radikala.

Tablica 8 Koeficijent korelacije (R^2) koji prikazuje ovisnost udjela fenolnih komponenata i antioksidacijske aktivnosti

	DPPH	ABTS	FRAP	CUPRAC
Ukupni fenoli	0,8566	0,9213	0,9318	0,8501
Proantocijanidini	0,8951	0,7241	0,9054	0,9496

Boja kompleksa vlakna jabuke/kupina

Od parametara boje za vlakna jabuke i dobivene komplekse izmjereni su L*, a*, b*, °h i C* parametri a ujedno je i izračunata promjena boje (ΔE) kompleksa u odnosu na vlakna. Dobiveni rezultati su prikazani u **Tablici 9**. L* vrijednost za vlakna jabuke iznosila je 59,76. Adsorpcijom fenolnih komponenata kupine na vlakna došlo je do značajne promjene L* vrijednosti te se ona smanjuje odnosno kompleksi postaju tamniji. L* vrijednost je iznosila 45,90 za kompleks VJ_1%_K, 46,71 za kompleks VJ_2%_K, 47,89 za kompleks VJ_4%_K, 48,41 za kompleks VJ_6%_K, 49,30 za kompleks VJ_8%_K i 49,70 za kompleks VJ_10%_K. Povećanjem količine vlakna povećavala se je i vrijednost L* odnosno kompleksi su bili sve svjetliji. Vlakna su imala pozitivnu vrijednost parametra a* koji definira crveni ton uzorka, 7,89. Adsorpcijom antocijana kupine na vlakna, a* vrijednost se je značajno povećala te je iznosila između 18,03 i 19,41. U slučaju a* vrijednosti nije utvrđena ovisnost o količini vlakna, već je najmanju a* imao kompleks VJ_1%_K a najveću vrijednost kompleks VJ_4%_K. b* vrijednost definira žuti ton uzorka, a za vlakna ova vrijednost je iznosila 23,12. Adsorpcijom fenola kupine, b* vrijednost se je značajno smanjila što je bilo i za očekivati obzirom da se je povećala a* vrijednost odnosno kompleksi su poprimili crveno-ljubičastu boju te je žuto-smeđa boja čistog vlakna prikrivena. b* vrijednost je iznosila 8,77 za kompleks VJ_1%_K, 9,76 za kompleks VJ_2%_K, 10,93 za kompleks VJ_4%_K, 11,90 za kompleks VJ_6%_K, 12,76 za kompleks VJ_8%_K i 12,93 za kompleks VJ_10%_K. Povećanjem količine vlakna došlo je i do povećanja b* vrijednosti.

Na temelju izmjerenih L*, a* i b* vrijednosti izračunata je promjena boje kompleksa u odnosu na vlakno (ΔE). Najveća promjena boje utvrđena je za kompleks VJ_1%_K, 22,34, a daljnjim povećanjem količine vlakna promjena boje se je smanjivala. Promjena boje za kompleks VJ_2%_K iznosila je 21,76, 20,50 za kompleks VJ_4%_K, 19,59 za kompleks VJ_6%_K, 18,39 za kompleks VJ_8%_K i 17,76 za kompleks VJ_10%_K. Prema prikazu veze između izračunate promjene boje i ljudske percepcije boje u eksperimentalno dijelu, vidljivo je da je razlika u boji pripremljenih kompleksa u odnosu na vlakno vrlo vidljiva ljudskim okom. Obzirom da je kompleks VJ_1%_K imao najveći udio fenolnih komponenti i najveću antioksidacijsku aktivnost, boja ostalih kompleksa je uspoređena i s tim uzorkom, ΔE^1. Promjena boje u odnosu na kompleks VJ_1%_K, za kompleks VJ_2%_K iznosila je 1,71, za kompleks VJ_4%_K 3,25, za kompleks VJ_6%_K 4,22, za kompleks VJ_8%_K 5,33 i za kompleks VJ_10%_K 5,65. Prema prikazu veze između izračunate promjene boje i ljudske percepcije boje u eksperimentalnom dijelu, može se zaključiti da je razlika u boji kompleksa VJ_2%_K u odnosu na kompleks VJ_1%_K vidljiva a za preostale kompleks dobro vidljiva ljudskim okom.

Tablica 9 Parametri boje kompleksa vlakna jabuke/kupina

Uzorci	L*	a*	b*	ΔE	ΔE^1	°h	C*
VJ_100%	59,76±0,06	7,98±0,08	23,12±0,04			70,95±0,15	24,46±0,06
VJ_1%_K	45,90±0,09	18,03±0,08	8,77±0,01	22,34		25,92±0,07	20,01±0,11
VJ_2%_K	46,71±0,03	19,15±0,04	9,76±0,01	21,76	1,71	26,99±0,08	21,49±0,03
VJ_4%_K	47,89±0,02	19,41±0,01	10,93±0,02	20,50	3,25	29,38±0,03	22,27±0,02
VJ_6%_K	48,41±0,01	19,33±0,03	11,90±0,01	19,59	4,22	31,60±0,03	22,70±0,03
VJ_8%_K	49,30±0,02	18,99±0,03	12,76±0,03	18,39	5,33	33,89±0,10	22,88±0,02
VJ_10%_K	49,70±0,01	18,48±0,06	12,93±0,01	17,76	5,65	34,98±0,08	22,54±0,06

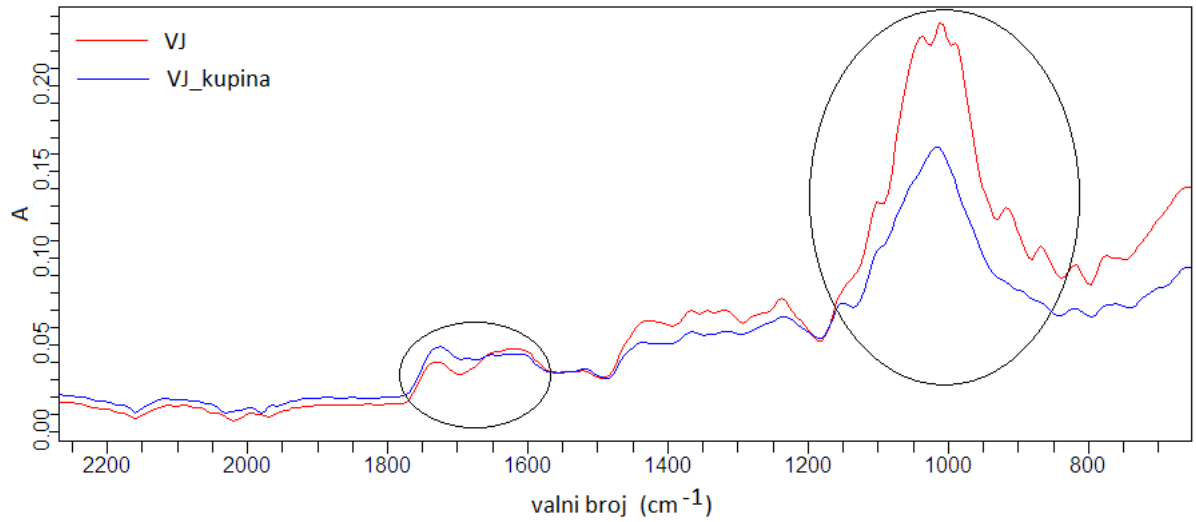
ΔE – promjena boje kompleksa u odnosu na vlakna; ΔE^1 – promjena boje kompleksa u odnosu na kompleks VJ_1%_K

Ton boje odnosno °h vrijednost za vlakno je iznosila 70,95 a adsorpcijom fenola kupine došlo je do značajne promjene tona boje. S povećanjem količine vlakna došlo je do povećanja °h vrijednosti. °h vrijednost je iznosila 25,92 za kompleks VJ_1%_K, 26,99 za kompleks VJ_2%_K, 29,38 za kompleks VJ_4%_K, 31,60 za kompleks VJ_6%_K, 33,89 za kompleks VJ_8%_K i 34,98 za kompleks VJ_10%_K. Zasićenje boje odnosno C* vrijednost za vlakno je iznosila 24,46. Adsorpcijom fenola kupine došlo je do smanjenja zasićenja i to najviše na

kompleksima VJ_1%_K i VJ_2%_K (20,01 i 21,49). Preostali kompleksi imali su zasićenje boje u rasponu od 22,27 i 22,88.

FTIR-ATR analiza

Primjenom FTIR-ATR-a snimljeni su IR spektri vlakna jabuke i dobivenih kompleksa vlakna jabuke/kupina. IR spektri uzoraka prikazani su na **Slici 15**. Iz dobivenih spektara vidljivo je da tijekom kompleksiranja vlakana jabuke sa sokom kupine dolazi do promjene u spektru u odnosu na čista vlakna. Navedene promjene definiraju promjenu u strukturi kompleksa u odnosu na vlakno zbog vezivanja komponenta iz kupine na vlakna. Vlakna jabuke imaju široku vrpcu s maksimumom na 3295 cm^{-1}. Navedena regija je karakteristična za O-H veze. Na kompleksima je utvrđena razlika u tom dijelu spektra u odnosu na vlakna, odnosno došlo je do pomicanja maksimuma vrpce na 3309,9 cm^{-1} što je indikator u promjeni O-H veza (npr. rastezanja veze, promjena simetričnosti veze). Slijedeća regija u kojoj su pronađene razlike između kompleksa i vlakna je od 1800 cm^{-1} do 1600 cm^{-1}. U toj regiji, tijekom kompleksiranja došlo do promjene vrpce na 1625 cm^{-1}, odnosno vrpca je manje izražena što definira promjene na C-C vezi (istezanje) fenilnog prstena. Ujedno su vidljive i promjene u omjeru vrpci na 1625 cm^{-1} i na 1729,5 cm^{-1} odnosno na čistom vlaknu vrpca na 1625 cm^{-1} je jačeg intenziteta od vrpce na 1729,5 cm^{-1}. Vrpca na 1729,5 cm^{-1} definira C=O veze a iz spektra je vidljivo da je kompleksiranje došlo do širenja navedene vrpce što znači i do promjene u C=O vezi. Velike promjene u strukturi vidljive su u regiji od 1200 cm^{-1} do 800 cm^{-1}. Vlakno ima jedan oštru vrpcu na 1013,8 cm^{-1} te dvije popratne vrpce, s lijeve i desne strane. Popratne vrpce tijekom kompleksiranja nestaju te ostaje samo dominantna vrpca na 1013,8 cm^{-1}. Regija od 1300 cm^{-1} do 1000 cm^{-1} je karakteristična za planarno savijanje CH veze, savijanje C-H veze koja je dio aromatskih prstenova, te za rastezanje C-H veze ugljikohidrata. Dodatno se tijekom kompleksiranja javlja i vrpca na 1145 cm^{-1} koja je vezana uz C-O vezu hidroksilnih skupina koje mogu ući u daljnje interakcije ili s istezanjem C-O veze. U regiji od 950 cm^{-1} do 850 cm^{-1} dvije vrpce nestaju na vlaknu tijekom kompleksiranja, a vezane su uz OCH_3 i C-C vezu polisaharida koje se mijenjaju vezivanjem fenola kupine na vlakno jabuke. Općenito, intenzitet vrpci kompleksa je niži u odnosu na čisto vlakno jabuke što indicira da su funkcionalne skupine na površini vlakana vezane s fenolima.



Slika 15 FTIR spektar vlakna jabuke (VJ) i kompleksa vlakna jabuke/kupina koji definira razlike nastale u strukturi vlakna jabuke nakon kompleksiranja vlakna jabuke sa sokom kupine

Udio hlapljivih komponenata na kompleksima vlakna jabuke/kupina

U **Tablici 10** dan je prikaz komponenata identificiranih u soku kupine, na vlaknima jabuke i na kompleksima vlakna jabuke/kupina. Sve hlapljive komponente grupirane su ovisno u strukturi u tri skupine: alkoholi, karbonilni spojevi i terpeni. U soku kupine identificirane su 32 hlapljive komponente, na vlaknima jabuke 27 a na dobivenim kompleksima 36 hlapljivih komponenata. Udio hlapljivih komponenata na kompleksima vlakna jabuke/kupina prikazan je u **Tablici 11**. Najveći udio hlapljivih komponenata identificiranih na kompleksima odnosi se na karbonilne spojeve zatim na terpene te je najmanji udio alkohola. Udio hlapljivih komponenata ovisio je o količini vlakna jabuke prilikom kompleksiranja. Ukupni udio karbonilnih spojeva se je povećavao s povećanjem udjela vlakana jabuke prilikom pripreme kompleksa. Udio heptanala, metil-heptenona i 2,4-heptadienala se je povećao s povećanjem udjela vlakana jabuke do 4 % a daljnjim povećanjem udjela vlakna došlo je do smanjenja udjela ovih komponenata. Udio 2-oktenala i nonanala se je povećao s povećanjem udjela vlakana jabuke do 6 % a daljnjim povećanjem udjela vlakna došlo je do smanjenja udjela ovih komponenata kao i kod prethodno navedenih. 2-heptenal, oktanal, 2-nonenal i dekanal imale su drugačiji trend. Njihov udio se je povećao s povećanjem udjela vlakna do 6 % te daljnjim povećanjem nije došlo do promjene udjela ovih komponenata.

Tablica 10. Prikaz komponenata identificiranih u soku kupine, na vlaknima jabuke i na kompleksima vlakna jabuke/kupina

Hlapljive komponente	Sok kupine	Vlakno jabuke	Kompleksi
Alkoholi			
1-butanol	14,08±0,17	-	+
2-etilheksanol	20,74±0,01	19,93±0,24	+
Benzil alkohol	-	-	+
1-oktanol	11,90±0,11	23,89±2,23	+
fenetil alkohol	47,39±0,48	-	+
Perilil alkohol	29,19±1,98	3,71±0,13	+
ukupno	*123,29*	*47,52*	
Karbonilni spojevi			
Heksanal	-	52,64±1,56	+
Heptanal	0,72±0,00	6,29±0,10	+
2-heptenal	-	335,93±9,71	+
1-octen-3-one	-	106,63±1,85	+
6-metil-5-hepten-2-on	-	-	+
2,4-heptadienal	-	-	+
Oktanal	-	-	+
2-oktenal	10,35±0,13	105,30±3,62	+
α-kamfolenal	27,64±0,96	-	-
2,6-nonadienal	-	-	+
2-nonenal	-	16,78±0,13	+
Dekanal	-	22,17±0,15	+
2,4-nonadienal	22,12±0,41	14,34±0,75	+
2-dekenal	11,38±0,25	32,53±1,71	+
4-propilbenzaldehid	4,13±0,27	-	+
2,4-dekadienal	5,65±0,15	10,48±0,27	+
geranilaceton	18,68±0,41	9,91±0,00	+
Lili aldehid	11,26±0,04	-	-
α-heksilcinamal	2,63±0,71	-	-
ukupno	*114,56±3,33*	*712,99±19,84*	
Terpeni			
D-limonen	7,37±0,13	64,90±1,15	+
Citronelal	1,85±0,02	24,40±0,46	+
Linalol oksid	62,27±1,54	-	-
Guaiakol	104,17±1,80	-	+
Linalol	23,39±0,42	80,92±4,45	+
Nonanal	17,85±0,23	37,95±2,04	+
Trans-verbenol	43,40±0,46	-	+
Mentol	13,86±0,28	-	+
Nerol	20,25±0,61	-	+
Cis-karveol	8,26±0,21	-	-
Citral	17,02±0,36	4,92±0,21	+
Vitispiran	28,34±1,15	-	-
Eugenol	31,19±0,01	-	+
α-kopan	-	7,10±0,15	-
β-damascenon	11,90±0,12	5,89±0,24	+
β-elemen	-	2,51±0,06	-
α-jonon	13,10±0,44	1,64±0,09	+
γ-jonon	4,18±0,43	4,24±0,19	+
β-jonon	2,58±0,11	5,46±0,43	+
α-murolen	-	6,32±0,11	-
β-bisabolen	-	9,34±0,08	-
ukupno	*420,75*	*260,98*	

Tablica 11. Udio hlapljivih komponenata na kompleksima vlakna jabuke/kupina

Hlapljive komponente	Količina vlakna jabuke prilikom kompleksiranja (%)					
	1	2	4	6	8	10
Alkoholi						
2-etilheksanol	6,71±0,38^{c}	8,34±0,12^{a}	8,63±0,14^{a}	6,74±0,09^{c}	6,00±0,15^{d}	7,23±0,31^{b}
Benzil alkohol	26,26±1,02^{a}	24,59±0,15^{a}	18,54±0,12^{b}	16,57±0,57^{c}	15,35±0,11^{d}	15,98±0,18^{c,d}
1-oktanol	44,42±0,56^{e}	52,41±1,90^{d}	93,35±2,18^{a}	94,08±1,27^{a}	74,09±0,23^{c}	86,56±0,45^{b}
Fenetil alkohol	17,35±0,19^{e}	22,45±0,33^{d}	23,67±0,35^{c}	26,92±0,19^{a}	26,06±0,08^{b}	27,55±0,19^{a}
Perilil alkohol	6,55±0,25^{e}	8,24±0,34^{d}	11,31±0,42^{c}	13,39±0,17^{b}	13,20±0,24^{b}	14,91±0,24^{a}
Ukupno	*101,28*	*116,03*	*155,49*	*157,71*	*137,70*	*152,24*
Karbonilni spojevi						
Heksanal	108,66±4,10^{e}	104,42±0,48^{e}	139,25±2,35^{d}	150,07±1,26^{c}	158,90±2,33^{b}	297,81±4,57^{a}
Heptanal	1,24±0,07^{e}	5,50±0,05^{c}	11,50±0,28^{a}	9,45±0,43^{b}	4,96±0,16^{d}	4,74±0,28^{d}
2-heptenal	791,25±13,38^{c}	734,65±8,01^{d}	1252,53±7,37^{b}	1412,70±46,47^{a}	1452,75±1,99^{a}	1456,35±3,01^{a}
1-octen-3-one	210,66±1,53^{e}	237,30±1,83^{d}	366,10±29,68^{c}	366,49±7,93^{c}	373,98±3,26^{b}	470,55±7,00^{a}
metil-heptenon	71,29±2,77^{c}	88,86±1,17^{a}	89,00±0,41^{a}	80,33±0,82^{b}	81,63±4,28^{b}	82,01±0,93^{b}
2,4-heptadienal	38,00±1,15^{c}	39,11±0,22^{c}	56,26±2,12^{a}	49,03±0,54^{b}	47,40±0,83^{b}	47,79±3,17^{b}
Oktanal	79,67±2,37^{e}	126,32±2,85^{d}	135,92±2,58^{c}	141,44±0,74^{b}	142,31±1,23^{a,b}	145,75±2,73^{a}
2-oktenal	301,62±11,37^{d}	391,79±21,97^{c}	634,65±46,57^{b}	748,43±3,67^{a}	725,79±16,84^{a}	732,36±8,80^{a}
Nonanal	92,35±0,51^{e}	113,00±1,07^{d}	167,88±1,45^{c}	199,50±3,14^{a}	171,56±0,28^{b}	174,04±1,60^{b}
2,6-nonadienal	5,79±0,14^{d}	7,26±0,14^{c}	7,29±0,06^{c}	8,42±0,18^{b}	8,47±0,11^{b}	9,05±0,16^{a}
2-nonenal	46,60±0,87^{f}	55,20±3,58^{e}	86,46±1,90^{d}	105,60±0,19^{b}	101,10±0,12^{c}	110,32±0,62^{a}
Dekanal	35,79±0,13^{d}	44,15±3,02^{c}	50,53±1,67^{b}	55,79±1,02^{a}	56,44±0,55^{a}	56,24±1,35^{a}
2,4-nonadienal	25,29±0,50^{c}	28,65±1,39^{c}	79,11±2,06^{b}	79,78±0,70^{b}	80,48±0,91^{b}	86,35±0,19^{a}
2-dekenal	180,51±1,73^{e}	219,85±1,60^{d}	437,48±6,61^{c}	608,70±14,60^{b}	629,12±18,32^{b}	772,34±53,57^{a}
4-propilbenzaldehid	21,19±0,16^{a}	18,08±0,04^{b}	17,30±0,23^{c}	17,48±0,25^{c}	17,64±0,05^{c}	17,91±0,41^{b,c}
2,4-dekadienal	17,49±0,44^{d}	28,16±1,49^{c}	40,45±1,07^{b}	50,03±1,06^{a}	50,16±3,64^{a}	54,42±0,69^{a}
geranilaceton	46,72±0,70^{a}	37,24±2,18^{b}	39,97±1,97^{b}	26,03±0,31^{c}	23,37±0,03^{d}	23,90±0,91^{d}
Ukupno	*2074,13*	*2279,54*	*3611,67*	*4109,28*	*4126,08*	*4541,94*
Terpeni						
D-limonen	749,94±40,04^{a}	363,70±27,55^{b}	130,46±1,65^{c}	105,86±6,34^{d}	80,18±4,75^{e}	85,96±0,97^{e}
Citronelal	49,87±1,30^{a,b}	51,20±0,49^{a}	47,85±0,03^{b}	41,38±0,84^{c}	41,71±1,03^{c}	41,83±1,03^{c}
Guajakol	18,26±0,10^{c}	19,97±0,03^{b}	19,33±0,45^{b}	22,06±0,04^{a}	21,88±0,08^{a}	21,66±0,40^{a}
Linalol	52,66±0,65^{d}	88,73±1,32^{c}	89,22±0,25^{c}	96,11±1,35^{a}	92,99±0,18^{b}	97,46±1,25^{a}
Trans-verbenol	2,43±0,04^{d}	2,97±0,03^{c}	3,39±0,34^{b}	4,22±0,08^{a}	4,42±0,06^{a}	3,66±0,02^{b}
Mentol	4,63±0,11^{e}	6,89±0,61^{d}	7,75±0,15^{d}	9,01±0,25^{c}	9,79±0,20^{b}	11,51±0,07^{a}
Nerol	-	3,38±0,11^{e}	7,70±0,06^{d}	13,18±0,01^{b}	12,52±0,17^{c}	15,46±0,07^{a}
Citral	3,90±0,11^{d}	8,79±0,15^{c}	8,41±0,15^{c}	10,01±0,05^{b}	9,87±0,59^{b}	10,91±0,66^{a}
Eugenol	7,98±0,14^{e}	10,14±0,27^{d}	12,27±0,14^{c}	15,82±0,02^{b}	15,86±0,44^{b}	17,48±0,68^{a}
β-damascenon	5,90±0,00^{d}	9,13±0,05^{c}	9,09±0,01^{c}	9,81±0,01^{b}	9,76±0,34^{b}	12,82±0,20^{a}
α-jonon	2,38±0,04^{d}	2,75±0,00^{c}	2,90±0,12^{c}	3,85±0,04^{b}	3,54±0,24^{b}	4,22±0,06^{a}
γ-jonon	6,21±0,04^{c}	5,73±0,10^{d}	8,17±0,35^{b}	10,85±0,09^{a}	10,86±0,55^{a}	10,39±0,03^{a}
β-jonon	9,10±0,13^{d}	10,08±0,06^{c}	10,25±0,01^{c}	12,12±0,10^{b}	11,75±0,11^{b}	12,81±0,19^{a}
Ukupno	*929,73*	*600,69*	*371,84*	*373,94*	*342,52*	*370,66*

Vrijednosti u istom redu označene različitim slovima su statistički različite.

Udio 4-propilbenzaldehida i geranilacetona se je smanjio s povećanjem udjela vlakana. Svi ostali karbonilni spojevi su imali jednaki trend, odnosno s povećanjem udjela vlakana došlo je i do povećanja udjela ovih karbonilnih spojeva. Udio terpena se je smanjivo s povećanjem udjela vlakna odnosno utvrđen je drugačiji trend u odnosu na karbonilne spojeve. Najveći udio terpena imao je kompleksa vlakna jabuke/kupina pripremljen s 1 % vlakna. Najzastupljeniji terpen na kompleksima bio je D-limonen i njegov se je udio smanjivao s povećanjem udjela vlakna. Linalol i citronelal su također terpeni koji su evaluirani u većoj količini u odnosu na ostale terpene. Udio linalola se je povećavao s povećanjem udjela vlakna, dok se je udio citronelala smanjio. Svi ostali terpeni su imali istu tendenciju odnosno

s povećanjem udjela vlakna došlo je i do povećanja udjela terpena. Iz skupine alkohola, udio 2-etilheksanola i 1-oktanola se je povećao s povećanjem vlakna jabuke do 4 %, a daljnjim povećanjem došlo je do smanjenja udjela ovih alkohola na vlaknima jabuke. Udio fenetil alkohola i perilil alkohola se je povećavao s povećanjem udjela vlakna dok se je udio benzil alkohola smanjio.

4.2. BIOAKTIVNI DODATCI HRANI NA BAZI VLAKNA JABUKE I DISAHARIDA

Udio fenola i proantocijanidina na kompleksima vlakna jabuke/disaharidi/kupina

U **Tablici 12** prikazan je udio adsorbiranih ukupnih fenola i proantocijandina na vlakna jabuke i kompleks vlakna jabuke/disaharid. Kompleks VJ_K služi kao kontrolni uzorak odnosno kao kompleks za usporedbu rezultata dobivenih za komplekse vlakna jabuke/disaharid. Od šećera su korišteni disaharidi, saharoza i trehaloza u različitim omjerima u odnosu na vlakna jabuke (omjeri vlakna:disaharid bili su 1:0,5, 1:1 i 1:2). Udio adsorbiranih ukupnih fenola na kompleks VJ_K iznosio je 1,352 g GAE/100 g. Primjenom disaharida prilikom kompleksiranja došlo je do promjene adsorpcije ukupnih fenola ovisno o tipu disaharida i omjeru vlakna i disaharida. Primjenom disaharida udio adsorbiranih ukupnih fenola se je smanjio. Za komplekse S_1:0,5, S_1:1 i S_1:2 udio ukupnih fenola iznosio je 1,292 g GAE/100 g, 1,152 g GAE/100 g i 0,946 g GAE/100 g. Za komplekse s trehalozom dobiveni su slični rezultati odnosno 1,246 g GAE/100 g, 1,154 g GAE/100 g i 1,020 g GAE/100 g za T_1:0,5, T_1:1 i T_1:2. Rezultati dobiveni za proantocijanidine također prate trend smanjenja adsorpcije s povećanjem udjela disaharida ali razlika između kompleksa sa saharozom i trehalozom je značajna. Na vlakna jabuke adsorbirano je 47,81 mg PB2/100 g proantocijanidina. Udio adsorbiranih proantocijanidina na komplekse s dodatkom saharoze bio je znatno manji, 26,42 mg PB2/100 g, 21,41 mg PB2/100 g i 12,98 mg PB2/100 g (za S_1:0,5, S_1:1 i S_1:2). Kompleksi s dodatkom trehaloze imali su znatno veću adsorpciju proantocijanidina, 42,99 mg PB2/100 g, 40,67 mg PB2/100 g i 39,88 mg PB2/100 g za T_1:0,5, T_1:1 i T_1:2.

U **Tablici 13** prikazan je udio adsorbiranih flavanola, antocijana i fenolnih kiselina na vlakna jabuke i na komplekse vlakna jabuke/disaharid. Dodatak saharoze i trehaloze imao je utjecaj na adsorpciju fenola, te se je dodatkom disaharida adsorpcija svih identificiranih fenola smanjila. Udio adsorbiranog kvercetina na vlakna jabuke iznosio je 92,96 mg/100 g. s povećanjem dodatka saharoze udio kvercetina je iznosio 81,72 mg/100 g, 75,99 mg/100 g i

62,93 mg/100 g za S_1:0,5, S_1:1 i S_1:2. Također se je udio adsorbiranog kvercetina smanjio i za komplekse pripremljene s trehalozom te je udio kvercetina iznosio 83,69 mg/100 g, 74,64 mg/100 g i 66,27 mg/100 g za T_1:0,5, T_1:1 i T_1:2. Udio adsorbiranog kvercetin-3-*O*-galaktozida na vlakna jabuke iznosio je 44,07 mg/100 g. Za komplekse S_1:0,5, S_1:1 i S_1:2 udio kvercetin-3-*O*-galaktozida iznosio je 38,49 mg/100 g, 38,29 mg/100 g i 34,11 mg/100 g, a za komplekse T_1:0,5, T_1:1 i T_1:2 41,14 mg/100 g, 37,23 mg/100 g i 37,15 mg/100 g. Na vlakna jabuke adsorbiralo se je 180,93 mg/100 g cijanidin-3-glukozid. Dodatkom saharoze udio ovog antocijana iznosio je 163,98 mg/100 g, 149,84 mg/100 g i 117,86 mg/100 g (za komplekse S_1:0,5, S_1:1 i S_1:2) a dodatkom trehaloze 167,09 mg/100 g, 140,45 mg/100 g i 130,65 mg/100 g (za komplekse T_1:0,5, T_1:1 i T_1:2). Na vlakna jabuke adsorbiralo se je 23,63 mg/100 g klorogenske kiseline. Za komplekse S_1:0,5 i S_1:1 udio adsorbirane klorogenske kiseline iznosio je 21,6 mg/100 g a za komplekse S_1:2 19,25 mg/100 g. Za komplekse T_1:0,5, T_1:1 i T_1:2 je povećanjem udjela trehaloze došlo do smanjenja adsorpcije klorogenske kiseline, 22,32 mg/100 g, 20,89 mg/100 g i 19,66 mg/100 g. Sličan trend je utvrđen i za derivata hidroksicimetne kiseline, odnosno njihova adsorpcija se je neznatno smanjila s dodatkom disaharida u odnosu na vlakna jabuke.

Tablica 12 Udio adsorbiranih polifenola i proantocijanidina na vlakna jabuke i kompleks vlakna jabuke/disaharid

Uzorci	Ukupni fenoli (g GAE/100 g)	Proantocijanidini (mg PB2/100 g)
VJ_K	1,352±0,011^{a}	47,81±0,12^{a}
S_1:0,5	1,292±0,012^{b}	26,42±0,36^{e}
S_1:1	1,152±0,006^{d}	21,41±0,18^{f}
S_1:2	0,946±0,012^{f}	12,98±0,59^{g}
T_1:0,5	1,246±0,011^{c}	42,99±0,60^{b}
T_1:1	1,154±0,011^{d}	40,67±0,39^{c}
T_1:2	1,020±0,008^{e}	39,88±0,07^{d}

VJ – vlakna jabuke; K – sok kupine; 1:0,5 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:0,5; 1:1 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:1; 1:2 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:2.
Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

Tablica 13 Udio (mg/100 g) adsorbiranih flavanola, antocijana i fenolnih kiselina na vlakna jabuke i kompleks vlakna jabuke/disaharid

		saharoza		
Komponente	**VJ**	**1:0,5**	**1:1**	**1:2**
Flavonoli	*137,03*	*120,21*	*114,28*	*97,03*
K-3-*O*-ga	44,07±0,01^{a}	38,49±0,10^{b}	38,29±0,50^{b}	34,11±0,09^{c}
K	92,96±1,14^{a}	81,72±0,36^{b}	75,99±1,02^{c}	62,93±0,12^{d}
Antocijani				
C-3-g	180,93±0,56^{a}	163,98±0,74^{b}	149,84±3,19^{c}	117,86±0,67^{d}
Fenolne kiseline	*62,69*	*57,78*	*58,74*	*53,16*
Klo	23,63±0,28^{a}	21,58±0,10^{b}	21,67±0,20^{b}	19,25±0,01^{c}
HC - 1	21,24±0,04^{a}	19,59±0,00^{b}	19,91±0,12^{b}	18,08±0,02^{c}
HC - 2	17,82±0,04^{a}	16,61±0,00^{c}	17,16±0,07^{b}	15,83±0,02^{d}
		trehaloza		
	VJ	**1:0,5**	**1:1**	**1:2**
Flavonoli	*137,03*	*124,83*	*111,87*	*105,42*
K-3-*O*-ga	44,07±0,01^{a}	41,14±0,27^{b}	37,23±1,24^{c}	37,15±0,68^{c}
K	92,96±1,14^{a}	83,69±0,00^{b}	74,64±1,19^{c}	68,27±1,44^{d}
Antocijani				
C-3-g	180,93±0,56^{a}	167,09±0,99^{b}	140,45±1,64^{c}	130,65±4,93^{d}
Fenolne kiseline	*62,69*	*60,37*	*57,60*	*55,30*
Klo	23,63±0,28^{a}	22,32±0,15^{b}	20,89±0,25^{c}	19,66±0,32^{d}
HC - 1	21,24±0,04^{a}	20,65±0,07^{b}	19,78±0,07^{c}	19,16±0,22^{d}
HC - 2	17,82±0,04^{a}	17,40±0,00^{b}	16,93±0,09^{c}	16,48±0,09^{d}

VJ – vlakna jabuke; 1:0,5 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:0,5; 1:1 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:1; 1:2 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:2
K-3-*O*-ga - kvercetin-3-*O*-galaktozid; K - kvercetin; C-3-g - cijanidin-3-glukozid; Klo – klorogenska kiselina; HC - 1 i HC - 2 - derivati hidroksicimetne kiseline
Vrijednosti u istom redu označene različitim slovima su statistički različite.

Antioksidacijska aktivnost kompleksa vlakna jabuke/disaharidi/kupina

Antioksidacijska aktivnost kompleksa vlakna jabuke/kupina i kompleks vlakna jabuke/disaharid određena primjenom DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metoda prikazana je u **Tablici 14**. Primjenom DPPH metode kontrolni uzorka odnosno kompleks VJ_K imao je vrijednost antioksidacijske aktivnosti 53,18 µmol TE/100 g. Dodatkom šećera prilikom kompleksiranja došlo je do promjene antioksidacijske aktivnosti ovisno o tipu disaharida. S povećanjem udjela disaharida antioksidacijska aktivnost se je smanjila. Za komplekse S_1:0,5, S_1:1 i S_1:2 antioksidacijska aktivnost iznosila je 48,05 µmol TE/100 g, 47,80 µmol TE/100 g i 42,16 µmol TE/100 g, a za komplekse T_1:0,5, T_1:1 i T_1:2 51,23 µmol TE/100 g, 47,93 µmol TE/100 g i 45,55 µmol TE/100 g. Slični trendovi su postignuti i primjenom ostale

tri metode. Antioksidacijska aktivnost kontrolnog uzorka određena ABTS metodom iznosila je 65,65 µmol TE/100 g. Za komplekse su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti bile niže odnosno 55,98 µmol TE/100 g, 46,95 µmol TE/100 g i 41,74 µmol TE/100 g za komplekse S_1:0,5, S_1:1 i S_1:2 54,22 µmol TE/100 g, 51,51 µmol TE/100 g i 45,98 µmol TE/100 g za komplekse T_1:0,5, T_1:1 i T_1:2. Primjenom FRAP metode dobivene su najniže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Kontrolni uzorak imao je antioksidacijsku aktivnost 9,13 µmol TE/100 g, a kompleksi S_1:0,5, S_1:1 i S_1:2 7,55 µmol TE/100 g, 7,04 µmol TE/100 g i 5,98 µmol TE/100 g. Nešto veće vrijednosti su dobivene za komplekse s trehalozom odnosno 8,06 µmol TE/100 g, 7,65 µmol TE/100 g i 6,41 µmol TE/100 g za T_1:0,5, T_1:1 i T_1:2. Primjenom CUPRAC metode dobivene su najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Antioksidacijska aktivnost kontrolnog uzorka iznosila je 555,39 µmol TE/100 g. Za komplekse S_1:0,5, S_1:1 i S_1:2 antioksidacijska aktivnost je iznosila 494,75 µmol TE/100 g 451,29 µmol TE/100 g i 378,74 µmol TE/100 g, a za komplekse s trehalozom vrijednosti su bile više (551,79 µmol TE/100 g, 506,46 µmol TE/100 g i 449,94 µmol TE/100 g za T_1:0,5, T_1:1 i T_1:2).

Tablica 14 Antioksidacijska aktivnost kompleksa vlakna jabuke/kupina i kompleks vlakna jabuke/disaharid

Uzorci	DPPH (µmol TE/100 g)	ABTS (µmol TE/100 g)	FRAP (µmol TE/100 g)	CUPRAC (µmol TE/100 g)
VJ_K	53,18±0,02^{a}	65,65±0,32^{a}	9,13±0,66^{a}	555,39±4,24^{a}
S_1:0,5	48,05±1,01^{c}	55,98±0,57^{b}	7,55±0,78^{b}	494,75±7,29^{c}
S_1:1	47,80±0,35^{c}	46,95±0,98^{d}	7,04±0,53^{c}	451,29±7,21^{d}
S_1:2	42,16±0,51^{e}	41,74±0,74^{e}	5,98±0,41^{d}	378,74±6,85^{e}
T_1:0,5	51,23±0,01^{b}	54,22±0,92^{b}	8,06±0,58^{a}	551,79±7,77^{a}
T_1:1	47,93±1,42^{c,d}	51,51±0,35^{c}	7,65±0,69^{b}	506,46±0,38^{b}
T_1:2	45,55±0,72^{d}	45,98±0,25^{d}	6,41±0,43^{c}	449,94±1,42^{d}

VJ – vlakna jabuke; K – sok kupine; 1:0,5 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:0,5; 1:1 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:1; 1:2 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:2.
Vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovima su statistički različite.

Boja kompleksa vlakna jabuke/disaharidi/kupina

Dobiveni rezultati parametara boje prikazani su u **Tablici 15**. L* vrijednost za vlakna jabuke iznosila je 59,76, a adsorpcijom fenola na vlakna smanjila se je na 48,13. Kompleksi s disaharidom u omjeru 1:0,5 imali su nešto veću L* vrijednost u odnosu na VJ_K (48,73 i 48,67

za saharozu i trehalozu). Dodatnim povećanjem količine disaharida L* vrijednost se je povećala na 50,86 i 50,30 (za saharozu i trehalozu), a primjenom omjera 1:2 L* vrijednost je najviše porasla i u ovim slučaju postoji jasna razlika između saharoze i trehaloze. L* vrijednost je iznosila 52,75 i 55,14 (za saharozu i trehalozu). Kompleksiranjem vlakna s kupinom a* vrijednost je s 7,98 porasla na 19,06. Dodatak saharoze je izazvao povećanje a* vrijednosti od 20,08 do 20,37. U slučaju trehaloze, za komplekse T_1:0,5 i T_1:1 a* vrijednost je iznosila 19,46 i 19,63, dok je za kompleks T_1:2 vrijednost bila značajno niža, 17,98. Kompleksiranjem vlakna s kupinom b* vrijednost se je smanjila s 23,12 na 11,23. Dodatak saharoze je izazvao povećanje b* vrijednosti od 11,53 do 12,54. U slučaju trehaloze, za komplekse T_1:0,5 i T_1:1 b* vrijednost je iznosila 11,12 i 11,49, dok je za kompleks T_1:2 vrijednost bila značajno niža, 10,25. Na temelju izmjerenih L*, a* i b* vrijednosti izračunata je promjena boje svih kompleksa u odnosu na vlakno (ΔE) i kompleksa s disaharidima u odnosu na kompleks VJ_K odnosno kontrolni uzorak (ΔE^X). Promjena boje kompleksa VJ_K u odnosu na vlakno iznosila je 20,29. Dodatkom saharoze došlo je do smanjenja promjene boje (ΔE) s povećanjem dodane količine disaharida te je promjena boje iznosila 20,6, 18,83 i 17,74. Isti je trend uočen i s trehalozom samo što su vrijednosti niže, 19,96, 18,98 i 16,94. Promjena boje kompleksa s disaharidima u odnosu na kompleks VJ_K se je povećavala s povećanjem dodatka disaharida. Za saharozu je promjena boje iznosila 0,83, 2,84 i 4,87 za komplekse S_1:0,5, S_1:1 i S_1:2 odnosno promjena boje je bila vidljiva za komplekse S_1:1 i S_1:2. Za trehalozu je promjena boje iznosila 0,59, 2,19 i 7,26 za komplekse T_1:0,5, T_1:1 i T_1:2 odnosno promjena boje je bila vidljiva za komplekse T_1:1 i T_1:2 kao i za saharozu.

Kompleksiranjem vlakna s kupinom °h vrijednost se je smanjila s 70,95 na 29,81. Dodatak saharoze je izazvao povećanje °h vrijednosti na 30,40 i 31,62 za komplekse S_1:1 i S_1:2 dok je kompleks S_1:0,5 imao jednaku vrijednost kao i kompleks VJ_K. U slučaju trehaloze, za komplekse T_1:0,5 i T_1:2 °h vrijednost je iznosila 31,62 i 30,36, dok je za kompleks T_1:1 vrijednost bila kao i za kompleks VJ_K. Kompleksiranjem vlakna s kupinom C* vrijednost se je smanjila s 24,46 na 22,59. Dodatak saharoze je izazvao povećanje °h vrijednosti od 23,15 do 23,93 u odnosu na kontrolni uzorak, dok su za trehalozu vrijednosti bile niže. Za komplekse T_1:0,5 i T_1:1 C* vrijednost je iznosila 22,43 i 22,74, a za kompleks T_1:2 20,70.

Tablica 15 Parametri boje kompleksa vlakna jabuke/disaharidi/fenoli kupine

Uzorci	L*	a*	b*	ΔE	ΔE^X	°h	C*
VJ	59,76±0,06	7,98±0,08	23,12±0,04			70,95±0,15	24,46±0,06
VJ_K	48,13±0,01	19,06±0,07	11,23±0,02	20,29		29,81±0,07	22,59±0,07
S_1:0,5	48,73±0,06	20,08±0,06	11,53±0,02	20,06	0,83	29,88±0,10	23,15±0,04
S_1:1	50,86±0,03	20,11±0,05	11,80±0,03	18,83	2,84	30,40±0,10	23,32±0,03
S_1:2	52,75±0,04	20,37±0,02	12,54±0,04	17,74	4,87	31,62±0,11	23,93±0,01
T_1:0,5	48,69±0,03	19,46±0,02	11,12±0,03	19,96	0,59	29,73±0,04	22,43±0,03
T_1:1	50,30±0,07	19,63±0,02	11,49±0,01	18,98	2,19	30,36±0,02	22,74±0,01
T_1:2	55,14±0,04	17,98±0,02	10,25±0,05	16,94	7,26	29,69±0,11	20,70±0,03

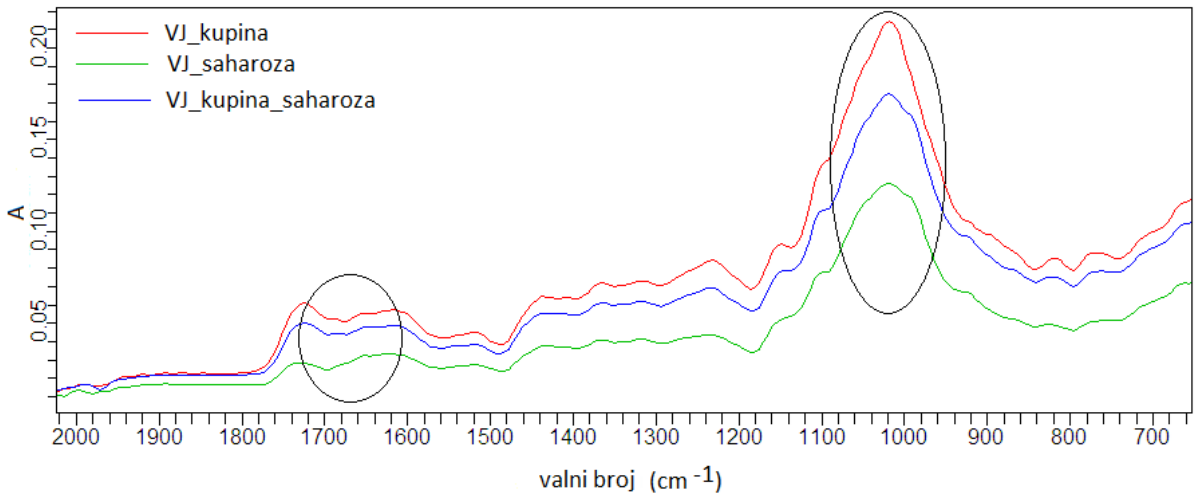
(VJ – vlakna jabuke; VJ_K – vlakna jabuke/kupina – kontrolni uzorak; S – saharoza; T – trehaloza; 1:0,5 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:0,5; 1:1 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:1; 1:2 – omjer vlakna jabuke:disaharidi = 1:2); ΔE – promjena boje u odnosu na čisto vlakno jabuke; ΔE^X – promjena boje u odnosu na kompleks vlakno jabuke/kupina

FTIR-ATR analiza

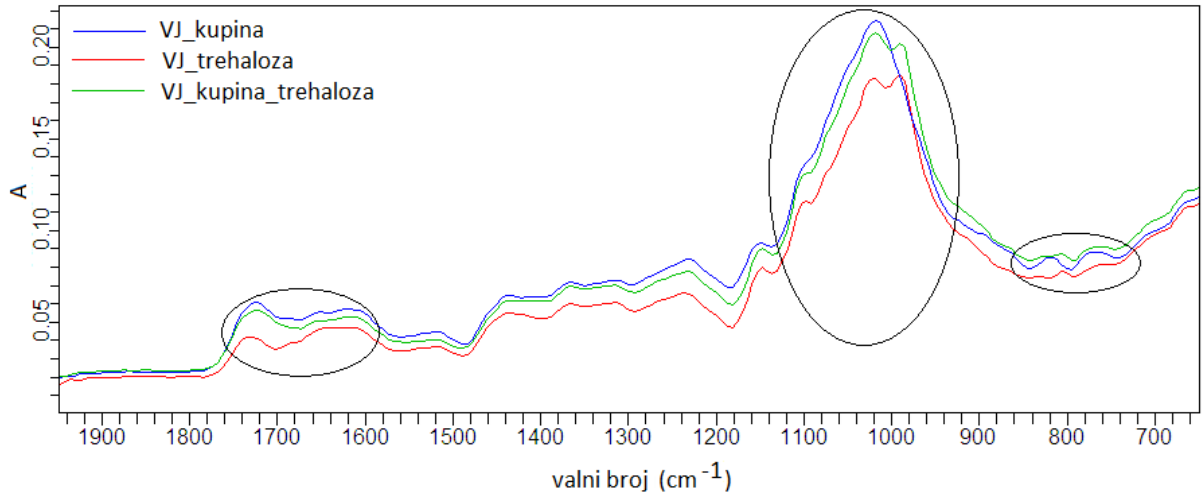
Kako bi se utvrdile promjene u strukturi kompleksa snimljeni su spektri kompleksa vlakna jabuke/saharoza i kompleksa vlakna jabuke/saharoza/kupina i uspoređeni su s kompleksom vlakna jabuke/kupina (**Slika 16**). Kompleks vlakna jabuke/kupina ima vrpcu na 1013,8 cm^{-1} dok je ta vrpca šira i s naznakom pojave još jedne vrpce na kompleksu vlakna jabuke/saharoza i kompleksu vlakna jabuke/saharoza/kupina te je navedena promjena posljedica vezivanja saharoze na vlakna. Ujedno je došlo i do pomicanja maksimuma vrpce na 1021,3 cm^{-1}. Druga važna razlika u IR spektrima je što kompleksa vlakna jabuke/saharoza ne posjeduje vrpcu na 1680 cm^{-1} a koja je uočena na kompleksima na koje su vezani fenoli kupine. Navedena vrpca je indikator vibracijskog istezanja C = O veze odnosno ove promjene mogu biti posljedica pucanja starih vodikovih veza i stvaranja novih vodikovih veza.

Kako bi se utvrdile promjene u strukturi kompleksa snimljeni su spektri kompleksa vlakna jabuke/trehaloza i kompleksa vlakna jabuke/trehaloza/kupina i uspoređeni su s kompleksom vlakna jabuke/kupina (**Slika 17**). Kompleks vlakna jabuke/kupina ima vrpcu na 1013,8 cm^{-1} dok se kod kompleksa vlakna jabuke/trehaloza i kompleksa vlakna jabuke/trehaloza/kupina kao posljedica vezivanja trehaloze na vlakna uz navedenu vrpcu stvara još jedna s maksimuma na 991,5 cm^{-1}. Osim ove promjene, kao i u slučaju kompleksa sa saharozom, uočena je promjena na 1680 cm^{-1} na kompleksima na koje su vezani fenoli kupine. Navedena vrpca je indikator vibracijskog istezanja C = O veze. U regiji od 860 cm^{-1} do 740 cm^{-1} na

kompleksima s kupinom utvrđene su dvije vrpce kojih nema na kompleksu vlakna jabuke/trehaloza.



Slika 16 FTIR spektar kompleksa vlakna jabuke/saharoza, kompleksa vlakna jabuke/kupina i kompleksa vlakna jabuke/saharoza/kupina koji definira razlike u strukturi sva tri tipa kompleksa



Slika 17 FTIR spektar kompleksa vlakna jabuke/trehaloza, kompleksa vlakna jabuke/kupina i kompleksa vlakna jabuke/trehaloza/kupina koji definira razlike u strukturi sva tri tipa kompleksa

Udio hlapljivih komponenata na kompleksima vlakna jabuke/disaharidi/kupina

U **Tablici 16** prikazan je udio hlapljivih komponenata na kompleksima vlakna jabuke/disaharidi/kupina odnosno dan je prikaz utjecaja dodatka disaharida (saharoze i trehaloze) u različitim omjerima u odnosu na vlakana jabuke. Iz rezultata je vidljivo da su i tip disaharida i količina imali utjecaj na adsorpciju hlapljivih komponenata. Uspoređujući udio hlapljivih komponenata s obzirom na skupine ukupni udio alkohola, kada su disaharidi dodani u omjeru vlakna:disaharidi 1:0,5 je bio jednak kao i za čisto vlakno. Povećanjem dodatka disaharida smanjio se je ukupni udio adsorbiranih alkohola s time da su kompleksi s dodatkom trehaloze imali veći udio alkohola u odnosu na uzorke s dodatkom saharoze. Udio 2-etilheksanola se je povećao s povećanjem količine dodanih disaharida, dok su svi ostali alkoholi imali jednaku tendenciju, odnosno s povećanjem količine dodanih disaharida smanjio se je njihov udio. Kod karbonilnih spojeva je utvrđen drugačiji trend. Kompleksi vlakna:disaharidi 1:0,5 imali su veći udio komponenata iz ove skupine u odnosu na čisto vlakno, a daljim povećanjem disaharida došlo je do smanjenja udjela ovih komponenata i u odnosu na komplekse vlakna:disaharidi 1:0,5 i čista vlakna. Kompleks vlakna:saharoza 1:0,5 imao je veći udio karbonilnih spojeva u odnosu na kompleks vlakna:trehaloza 1:0,5, dok je za preostale komplekse utvrđen obrnuti trend odnosno kompleksi s trehalozom su imali veći udio karbonilnih spojeva u odnosu na komplekse sa saharozom. Udio svih karbonilnih spojeva osim heksanala i heptanala, imali su jednaki trend odnosno s povećanjem količine dodanih disaharida smanjio se je njihov udio.

Udio ukupnih terpena na kompleksima vlakna:trehaloza 1:0,5 je bio neznatno viši u odnosu na čista vlakna a na kompleksima vlakna:saharoza 1:0,5 niži. Preostali kompleksi su imali manji udio ukupnih terpena u odnosu na vlakana jabuke s time da su kompleksi s dodatkom trehaloze imali veći udio ukupnih terpena. Na kompleksima vlakna:saharoza 1:0,5 i 1:1, udio D-limonena je bio jednak kao i na vlaknima jabuke te je daljnjim povećanjem saharoze utvrđeno smanjenje udjela ovog terpena. Uzorci s dodatkom trehaloze su imali drugačiji trend. Povećanjem dodatka trehaloze prilikom kompleksiranja utvrđen je veći udio D-limonena te je kompleks vlakna:trehaloza 1:2 imao najveći udio ovog terpena u odnosu na sve ostale komplekse. Citronelal, gvajakol, linalol, mentol, nerol, citral, β-damascenon, α-jonon i γ-jonon pokazuju slično ponašanje odnosno s povećanjem disaharida povećao se je udio ovih terpena. Kompleksi s dodatkom trehaloze imaju veći udio ovih terpena u odnosu

na komplekse s dodatkom saharoze. U slučaju β-jonona nema razlike između kompleksa s različitom količinom disaharida, ali i u ovom slučaju kompleksi s dodatkom trehaloze imaju veći udio ovog terpena.

Tablica 16. Udio hlapljivih komponenata na kompleksima vlakna jabuke/disaharidi/kupina

Komponente		saharoza			trehaloza		
	VJ	1:0,5	1:1	1:2	1:0,5	1:1	1:2
Alkoholi							
2-etilheksanol	6,19±0,20^{d}	6,59±0,01^{c}	7,86±0,12^{a}	7,98±0,86^{a}	6,40±0,01^{d}	6,74±0,07^{b}	8,17±0,02^{a}
Benzil alkohol	15,23±0,24^{a}	15,61±0,18^{a}	12,82±0,02^{b}	10,53±0,19^{c}	6,90±0,11^{d}	4,86±0,04^{e}	3,98±0,01^{f}
1-oktanol	80,36±1,92^{c}	83,37±0,40^{b}	54,15±0,91^{f}	52,28±1,10^{f}	90,61±0,27^{a}	69,09±0,68^{d}	62,18±1,55^{e}
fenetil alkohol	22,19±0,09^{a}	19,98±0,05^{b}	11,73±0,07^{f}	9,71±0,08^{h}	17,99±0,11^{c}	13,92±0,06^{d}	12,94±0,11^{e}
Perilil alkohol	10,20±0,25^{b}	10,51±0,00^{b}	9,01±0,05^{c}	8,08±0,11^{d}	11,13±0,15^{a}	9,06±0,03^{c}	8,86±0,16^{c}
Ukupno	*134,18*	*136,06*	*95,57*	*88,58*	*133,02*	*103,67*	*96,14*
Karbonilni spojevi							
Heksanal	41,75±0,23^{f}	69,16±3,28^{e}	125,91±0,19^{d}	138,37±0,65^{b}	70,55±0,71^{e}	136,82±0,44^{c}	143,68±0,47^{a}
Heptanal	0,81±0,00^{e}	5,80±0,01^{d}	6,87±0,06^{c}	7,74±0,09^{b}	7,74±0,04^{b}	7,57±0,12^{b}	9,04±0,63^{a}
2-heptenal	1430,6±10,9^{b}	1480,65±6,64^{a}	937,23±0,20^{d}	847,51±6,73^{e}	1416,78±1,50^{b}	1048,76±18,9^{c}	924,90±15,07^{d}
1-octen-3-one	371,79±12,11^{b}	426,32±12,56^{a}	257,64±5,62^{d}	243,14±2,94^{e}	390,20±23,61^{a,b}	299,10±3,16^{c}	265,63±6,56^{d}
metil-heptenon	79,75±0,11^{a}	68,96±0,05^{c}	67,75±0,38^{d}	62,84±0,20^{e}	76,99±0,42^{b}	51,51±0,23^{g}	48,54±0,48^{g}
2,4-heptadienal	60,96±0,22^{c}	70,50±0,40^{b}	51,85±1,19^{d}	46,49±2,39^{e}	73,49±0,26^{a}	49,22±0,98^{d}	49,45±0,17^{d}
Oktanal	144,52±1,71^{c}	158,48±0,06^{a}	102,15±0,82^{e}	90,97±0,61	149,40±0,78^{b}	116,13±1,39^{d}	101,46±4,04^{e}
2-oktenal	615,85±5,64^{b}	666,41±9,86^{a}	417,75±7,13^{e}	400,60±7,56^{f}	670,68±9,63^{a}	502,72±2,23^{c}	470,43±3,39^{d}
Nonanal	153,91±1,09^{c}	166,91±0,85^{b}	116,61±0,20^{f}	105,92±0,30^{g}	169,28±0,27^{a}	129,82±0,91^{d}	117,93±0,63^{e}
2,6-nonadienal	7,10±0,18^{c}	7,80±0,11^{b}	5,78±0,20^{e}	5,46±0,01^{e}	8,90±0,02^{a}	6,94±0,02^{c}	6,75±0,04^{d}
2-nonenal	73,99±2,31^{c}	78,19±0,36^{b}	50,05±0,36^{e}	50,50±0,42^{e}	82,06±0,21^{a}	65,59±0,26^{d}	63,00±1,49^{d}
Dekanal	49,43±0,30^{a}	46,12±0,98^{c}	27,65±1,50	31,13±1,39^{e}	48,12±0,13^{b}	37,14±1,29^{d}	35,46±0,27^{d}
2,4-nonadienal	48,22±0,91	50,20±0,29	26,84±0,38	32,29±0,26	54,51±0,28	42,63±0,02	42,69±0,57
2-dekenal	407,23±16,86^{a}	381,67±8,18^{b}	182,18±0,92^{e}	141,87±0,42^{f}	351,53±13,06^{c}	306,65±18,26^{d}	308,10±14,53^{d}
propilbenzaldehid	13,20±0,33^{c}	11,15±0,17^{d}	7,02±0,16^{e}	5,36±0,13^{f}	17,70±0,06^{a}	14,71±0,12^{b}	13,42±0,06^{c}
2,4-dekadienal	26,62±0,06^{b}	23,33±0,27^{c}	13,78±0,09^{e}	13,83±0,03^{e}	28,93±0,16^{a}	23,86±0,05^{c}	21,79±0,03^{d}
geranilaceton	24,97±0,09^{a}	13,60±0,05^{d}	12,14±0,01^{e}	11,74±0,11^{f}	19,30±0,14^{b}	18,86±0,18^{c}	18,37±0,16^{c}
Ukupno	*3350,73*	*3725,26*	*2409,20*	*2235,75*	*3636,17*	*2858,02*	*2640,65*
Terpeni							
D-limonen	115,62±2,11^{b}	117,08±0,45^{b}	115,37±0,75^{b}	88,22±0,47^{e}	96,25±1,24^{d}	119,33±1,33^{b}	154,68±0,95^{a}
Citronelal	54,67±0,66^{b}	54,61±0,66^{b}	44,95±0,10^{c}	40,47±1,07^{d}	67,03±0,47^{a}	35,74±0,60^{e}	35,19±0,55^{e}
Guajakol	14,99±0,22^{d}	16,51±0,14^{c}	14,45±0,05^{e}	12,53±0,00^{f}	21,73±0,31^{a}	18,14±0,07^{b}	16,94±0,06^{c}
Linalol	66,58±0,68^{b}	66,94±1,57^{b}	51,80±0,03^{d}	49,86±0,06^{e}	71,76±0,48^{a}	62,66±0,21^{c}	51,26±0,90^{d}
Trans-verbenol	2,97±0,01^{d}	3,16±0,14^{c}	3,64±0,06^{b}	4,29±0,04^{a}	4,30±0,05^{a}	4,27±0,04^{a}	4,28±0,03^{a}
Mentol	7,48±0,09^{a}	6,78±0,01^{b}	6,26±0,02^{c}	4,62±0,15^{e}	7,22±0,03^{a}	6,22±0,03^{c}	5,85±0,05^{d}
Nerol	10,21±0,23^{a}	10,01±0,13^{a}	6,38±0,09^{d}	3,40±0,05^{f}	8,79±0,27^{b}	6,75±0,02^{c}	6,12±0,04^{e}
Citral	13,53±0,07^{c}	13,97±0,13^{b}	9,76±0,10^{e}	9,43±0,10^{e}	16,92±0,46^{a}	13,00±0,17^{d}	13,49 ±0,06^{c}
Eugenol	3,19±0,16^{c}	3,56±0,13^{b}	2,15±0,02^{e}	2,75±0,01^{d}	4,19±0,30^{a}	2,85±0,03^{d}	3,17±0,19^{c}
β-damascenon	8,29±0,07^{a}	6,68±0,11^{c}	5,69±0,36^{e}	4,70±0,24^{f}	7,58±0,05^{b}	6,02±0,08^{d}	5,62±0,05^{e}
α-jonon	2,61±0,01^{b}	2,81±0,00^{a}	2,65±0,05^{b}	1,73±0,03	2,83±0,01^{a}	2,63±0,01^{b}	2,27±0,01^{c}
γ-jonon	9,62±0,14^{b}	7,99±0,19^{c}	6,26±0,08^{d}	4,58±0,21^{e}	10,30±0,06^{a}	8,18±0,02^{c}	6,55±0,04^{d}
β-jonon	10,68±0,13^{a}	5,55±0,04^{d}	5,12±0,04^{e}	5,09±0,10^{e}	7,33±0,12^{b}	7,02±0,03^{c}	7,34±0,04^{b}
Ukupno	*333,49*	*325,61*	*283,22*	*239,99*	*337,19*	*302,45*	*321,49*

Vrijednosti u istom redu označene različitim slovima su statistički različite.

Istraživanja su pokazala da učinkovitost mikroenkapsulacije fenolnih komponenti na nosač ovisi i o tipu i svojstvima fenola ali i o tipu i svojstvima samog nosača (Liu i sur., 2016; da Rosa i sur., 2014; Kalogeropoulos i sur., 2010; Phan i sur., 2017). Provedeno je istraživanje na nanočesticama škroba (voštani kukuruzni škrob – 2 % amiloze i 98 % amilopektina) kao

nosača katehina, epikatehina, epigalokatehin-3-galata i proantocijanidina s ciljem utvrđivanja stabilnosti dobivenih nanočestica škrob/fenoli pod različitim uvjetima. Autori su utvrdili da su slobodni fenoli osjetljiviji na ultraljubičasto zračenje i da se je njihova antioksidacijska aktivnost (DPPH metoda) smanjila pod djelovanjem ultraljubičastog zračenja za razliku od nanočesticama škrob/fenoli. Nanočestice škrob/epikatehin, škrob/epikatehin-3-galat su bile i stabilnije od čistog epikatehina i epigalokatehin-3 -galata u prisustvu NaCl-a, ultraljubičastog zračenje i termičkog tretiranja (Liu i sur., 2016). Autori su također vezivanje fenola na nanočestice škroba dokazali primjenom FTIR analize spektra ali i primjenom diferencijalne motridbene kalorimetrije. Istraživani su mikroenkapsulirani fenolni ekstrakti kupine dobiveni liofilizacijom s β-ciklodekstrinom, hitozanom i ksantanom te je utvrđeno da enkapsulacija fenola ovisi o samom materijalu na koji se enkapsulira odnosno o samom nosaču (da Rosa i sur., 2014). Galna kiselina i epikatehin su određeni u najvećoj količini u mikroenkapsulatima β-ciklodekstrina i ksantana. Također su autori potvrdili promjene u strukturi korištenih polimera termogravimetrijskom metodom (da Rosa i sur., 2014). Kalogeropoulos i sur. (2010) su također utvrdili da se sve fenolne komponente ne vežu jednako za β-ciklodekstrin, odnosno od sedam početnih flavonoida samo tri su se vezala za istraživani polimer, katehin (30 %), epikatehin (27,5 %) i kvercetin (35 %). Istraživanje na selektivnom vezanju fenola (ferulične kiseline, cijanidin-3-glukozida i katehina) na celulozu, polimere slične celulozi i komponente stanične stjenke jabuke pokazalo je da je za vezanje katehina dominantan polimer celuloza dok prisustvo hemiceluloze nije doprinijelo adsorpciji fenola. Ferulična kiselina i cijanidin-3-glukozid su imali veći afinitet za polimere slične celulozi i komponente stanične stjenke jabuke gdje su veliki utjecaj imale elektrostatske interakcije ali i mikrostruktura stanične stjenke jabuke. Negativno nabijeni pektini u sklopu stanične stjenke jabuke više su vezali pozitivno nabijeni cijanidin-3-glukozid nego negativno nabijenu feruličnu kiselinu (Phan i sur., 2017).

Provedeno je istraživanje na kompleksiranju jednostavnih fenola prisutnih u maslinovom ulju (3,4-dihidroksifenilglikola i hidroksitirozola) s pektinima i po prvi put je dokazano postojanje kompleksa navedenih fenolnih komponenti s pektinom. Utvrđeno je da hidroksitirozol stvara vrlo jake komplekse s pektinom jer dolazi do stvaranja vodikovih veza zato što se na mnogim mjestima hidroksilne skupine pektina vežu vodikovim vezama s hidroksilnim skupinama fenola (Bermúdez-Oria i sur., 2017). Godinu poslije je provedeno još jedno istraživanje na

kompleksiranju jednostavnih fenola prisutnih u maslinovom ulju (3,4-dihidroksifenilglikola i hidroksitirozola) s pektinima i utvrđeno da dodatna hidroksilna skupina koju, za razliku od hidroksitirozola, ima 3,4-dihidroksifenilglikol, može doprinijeti nastajanju većeg broja vodikovih veza (Bermúdez-Oria i sur., 2018a). U istraživanju interakcija između polisaharida (pektina) i antocijana je utvrđeno da se delfinidin-3-*O*-glukozid, koji ima tri hidroksilne skupine, jače veže s pektinom u usporedbi s cijanidin-3-*O*-glukozidom koji ima dvije hidroksilne skupine. Također je utvrđeno da dolazi do stvaranja esterskih veza između karboksilne skupine (pektina) i hidroksilne skupine fenolnih spojeva (3,4-dihidroksifenilglikola) (Fernandes i sur., 2014). Celuloza u kontaktu s vodom ili vodenim otopinama može stvarati višestruke kompaktne snopove prehrambenih vlakana pomoću vodikovih veza između hidroksilnih skupina na različitim lancima glukoze. Na taj način neki fenolni spojevi se mogu vezati u tu strukturu što dovodi do redukcije njihove bioraspoloživosti. Utvrđeno je da celuloza ima veći afinitet za vezanje fenolnih spojeva od pektina (Quirós-Sauceda i sur., 2014b). Interakcijama povezivanja mogu doprinijeti i vodikove veze koja se stvaraju između hidroksilnih skupina fenolnih spojeva i kisikovog atoma polisaharidnih glikozidnih veza (Bermúdez-Oria i sur., 2018a). U istraživanjima je potvrđeno i nastajanje vodikovih veza između polifenola čaja i polisaharida β-glukana (Wu i sur., 2009). Utvrđeno je da je kombinacija nekovalentnih (vodikovih veza i elektrostatskih interakcija) i kovalentnih veza (esterskih veza) odgovorna za stvaranje jakih veza između fenola (hidroksitirozola i 3,4-dihidroksifenilglikola) i vlakana jagode (Bermúdez-Oria i sur., 2018b). Istraživanjima koja su provedena tijekom proizvodnje vina je utvrđeno da dolazi do nastajanja jakih hidrofobnih vodikovih veza između polisaharida (uglavnom pektina) i polifenola (Renard i sur., 2017). Također je utvrđeno da su važne elektrostatske interakcije između polifenola i celuloznih spojeva s vlaknima jabuke (Phan i sur., 2017). Utvrđeno je da dolazi do jakih interakcija između škroba i polifenola čaja (Zhang i sur., 2013). Van der Waalsove sile su također moguće interakcije budući da polifenoli i prehrambena vlakna imaju funkcionalne skupine koje mogu stvarati polarizirane molekule (Liu i sur., 2019). Neka prehrambena vlakna i polifenoli nisu topljivi u vodi što im daje mogućnost stvaranja nakupina, a to su hidrofobne interakcije (Saura-Calixto, 2011). Također polifenoli imaju hidrofobne aromatične prstenove koji pomažu hidrofobne interakcije. Provedeno je istraživanje prema kojem kondenzirane molekule (npr. proantocijanidin A) imaju veći afinitet vezanja za pektin (Mamet i sur., 2018). Prehrambena vlakna mogu biti ravne (tj. linearne) ili

razgranate molekule te imati šupljine kao i različite veličine pora. Polifenolni spojevi mogu ući u te pore i pretpostavlja se da do toga dolazi u interakciji između polifenola i β-glukana dok molekule veće od pora uglavnom ne mogu ući (Le Bourvellec i Renard, 2005). Male molekule (npr. epikatehin) se u manjoj mjeri vežu za celulozu od velikih molekula (npr. procijanidin B2) (Liu i sur., 2017). Provedeno je istraživanje adsorpcije epigalokatehin-3-galata iz čaja na β-glukane zobi. Utvrđeno je da dolazi do stvaranja vodikovih veza između kisikovih atoma β-glukana i fenolnih hidroksilnih skupina epigalokatehin-3-galata. Nakon nastajanja vodikovih veza udaljenost između aromatskih prstenova u epigalokatehin-3-galatu i prstenova u β-glukanu postaje sve manja dovodeći do stvaranja van der Waalsovih sila. Osim toga neki polisaharidi imaju sposobnost stvaranja sekundarne strukture u otopinama pri čemu dolazi do nastajanja „hidrofobnih džepova" koji mogu enkapsulirati i kompleksirati fenolne spojeve. Autori su utvrdili da su navedene interakcije uključene u adsorpciju epigalokatehin-3-galata na β-glukane zobi (Gao i sur., 2012). U istraživanju utjecaja molekularne strukture polifenola na nekovalentne interakcije s β-glukanima zobi utvrđeno je da esterifikacija značajno reducira adsorpciju galne kiseline na β-glukane zobi te da je adsorpcija polifenola na β-glukane zobi posljedica hidrofilne sile poput vodikovih veza (Wang i sur., 2013). U istraživanju interakcija između β-glukana ječma i polifenola tradicionalnih sorti jabuke utvrđeno je da je adsorpcija polifenola ovisna o njihovoj koncentraciji, odnosno da se polifenoli više adsorbiraju ako su prisutni u većoj količini te se pretpostavlja da do interakcija vjerojatno dolazi zbog van der Waalsovih sila i vodikovih veza (Jakobek i sur., 2020). Istraživanjem interakcija β-glukana (ječma i zobi) i fenolnih spojeva utvrđeno da β-glukani ječma i zobi adsorbiraju vanilin i ostale fenolne spojeve (Simonsen i sur., 2009).

Vlakna egipatskog krastavca se uglavnom sastoje od celuloze (60 %), hemiceluloze (30 %) i lignina (10 %). Na FTIR spektru za vlakna egipatskog krastavca i adsorbirane fenole određene su vrpce na 1625 cm^{-1} koje su povezane s C-C istezanjima aromatskih prstenova. Takva istezanja se mogu primijetiti i na FTIR spektru kompleksa vlakana jabuke/kupina u našem istraživanju. Na FTIR spektru za vlakna egipatskog krastavca i adsorbirne fenole se je pojavila i vrpca na 1145 cm^{-1} vjerojatno zbog C-O vibracijskih istezanja. Ti istraživači su utvrdili da FTIR spektar opada u odnosu na komplekse vlakna egipatski krastavac/adsorbirani fenoli u usporedbi s FTIR spektrom za čista vlakna egipatskog krastavca jer su se fenolni spojevi

adsorbirali i penetrirali u unutrašnji slojeviti prostor vlakana egipatskog krastavca. U našem istraživanju je došlo do istih promjena kada se usporedi FTIR spektar vlakana jabuke s FTIR spektrom vlakna jabuke i kupine odnosno došlo je do opadanja FTIR spektra vlakana jabuke i kupine u usporedbi s FTIR spektrom čistih vlakana. Abdelwahab i Amin (2013) su u svom radu utvrdili da su nakon adsorpcije pore adsorbenta „pokrivene" (tj. ispunjene) fenolima. Provedena su istraživanja kompleksa između linearnog polisaharida hitozana i fenola katehina. Te strukture su karakterizirane uz korištenje FTIR-a. Utvrđeno je da prah β-citozana ima vrpcu na 1095 cm^{-1} što odgovara C-O-C istezanjima. Intenzitet svih vrpca koje karakteriziraju povezanost između hitozana i fenola katehina je postajao slabiji s povišenjem udjela β-hitozana u kompleksu između hitozana i katehina (Zhang i sur., 2016). Provedeno je istraživanje na promjenama strukture i funkcionalnih svojstava kompleksa nastalih povezivanjem netopljivih prehrambenih vlakana s fenolnim spojevima. Autori su utvrdili da postoje jaki apsorpcijske vrpce u rasponu od 1400 do 1200 cm^{-1} u kojem su prisutna C-H vibracijska istezanja (Xu i sur., 2020). U istraživanju kompleksa između topljivih prehrambenih vlakana iz lotosovog korijena i polifenola (galna kiselina i katehin) došlo je do pojave apsorpcijskih vrpci u kompleksu topljiva prehrambena vlakna - katehin na 1623 cm^{-1} te u kompleksu topljiva prehrambena vlakna - galna kiselina na 1621 cm^{-1}. Obje vrpce na navedenim kompleksima su puno manje izražena nego u čistim topljivim prehrambenim vlaknima (Li i sur., 2020) odnosno, kao i u našem istraživanju, došlo je do promjena u FTIR spektru kompleksiranih vlakana u odnosu na čista vlakna zbog interakcija između vlakana i fenolnih spojeva. Provedeno je istraživanje na nusproizvodima brokule (koja sadrži prehrambena vlakna od 32,6 % do 36,5 %) koji bi poslužili kao nosači fenola epigalokatehin galata. U FTIR spektru je bilo vidljivo da je intenzitet spektra smanjen na 3300 cm^{-1} kada se usporede čista vlakna s kompleksima (Shi i sur., 2019). Istraživana je adsorpcija katehina na celulozu i uočene su razlike u FTIR spektru između čistog katehina i kompleksa celuloza/katehin. Široka apsorpcijska vrpca je utvrđena u rasponu od 3000 do 3600 cm^{-1} , a to je regija karakteristična za -OH veze, te u području od 1108 do 1285 cm^{-1} te je zaključeno da je intenzitet vrpci kompleksa katehin/celuloza niži u odnosu na čistu celulozu jer je došlo do nastajanja vodikovih veza između katehina i celuloze. Pretpostavlja se da bi –OH skupina benzenskog prstena katehina trebala biti glavna funkcionalna skupina za vezanje na celulozu (Liu i sur., 2018).

Provedeno je istraživanje interakcija između vlakana jabuke i kvercetina te vlakana luka i kvercetina putem FRAP metode te je utvrđeno da prisustvo vlakana jabuke ili vlakana luka uzrokuje opadanje antioksidacijske aktivnosti kvercetina te da je mogući uzrok tome vezanje kvercetina na netopljiva prehrambena vlakna stanične stjenke (Sun-Waterhouse i sur., 2008a; 2008b).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata u ovom specijalističkom radu mogu se izvesti slijedeći zaključci za prvi dio rada:

- Najveći udio adsorbiranih ukupnih fenola imao je kompleks VJ_1%_K. Povećanjem udjela vlakna jabuke prilikom kompleksiranja utvrđeno je smanjenje adsorpcije ukupnih fenola. Pronatocijanidini su imali drugačiji trend adsorpcije. Najveći udio proantocijanidina imali su kompleksi VJ_1%_K i VJ_2%_K. Kompleksi VJ_4%_K i VJ_6%_K imali su nešto manji udio proantocijanidina, dok su preostala dva kompleksa imala znatno niže vrijednosti proantocijanidina.

- Primjenom svih metoda (DPPH, ABTS, CUPRAC i FRAP) utvrđeno je da povećanjem količine vlakana jabuke dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti te da je najveću antioksidacijsku aktivnost imao kompleks VJ_1%_K.

- Inhibicija α-amilaze pomoću dobivenih kompleksa nije pratila trend dobiven za ukupne fenole i proantocijanidine. Za komplekse VJ_1%_K, VJ_2%_K i VJ_4%_K utvrđeno je povećanje inhibicije α-amilaze s povećanjem udjela vlakna dok je daljnjim povećanjem udjela vlakna jabuke došlo do smanjenja inhibicije α-amilaze.

- Adsorpcijom fenolnih komponenata kupine na vlakna došlo je do značajne promjene L* vrijednosti vlakna jabuke te se ona smanjuje odnosno kompleksi postaju tamniji. Povećanjem količine vlakna povećavala se je i vrijednost L* odnosno kompleksi su bili sve svjetliji. Adsorpcijom fenola kupine, b* vrijednost se je značajno smanjila a a* vrijednost se je povećala odnosno kompleksi su poprimili crveno-ljubičastu boju te je žuto-smeđa boja čistog vlakna na taj način prikrivena. Adsorpcijom fenola kupine došlo je do značajne promjene tona boje (°h).

- Tijekom kompleksiranja vlakana jabuke sa sokom kupine dolazi do promjene u IR spektru u odnosu na čista vlakna zbog vezivanja komponenata iz kupine na vlakna jabuke. Intenzitet vrpci kompleksa je niži u odnosu na čisto vlakno jabuke. Rezultati dobiveni usporedbom FTIR spektra vlakana jabuke i dobivenih kompleksa vlakna jabuke/kupina indiciraju da je došlo do promjene na -OH vezi, na C-C vezi (istezanje) fenilnog prstena, na C=O vezi te na C-H vezi.

- Adsorpcija karbonilnih spojeva se je povećavala s povećanjem udjela vlakna jabuke tijekom kompleksiranja dok se je udio terpena smanjivao.

Na temelju dobivenih rezultata u ovom specijalističkom radu mogu se izvesti slijedeći zaključci za drugi dio rada:

- Primjenom disaharida prilikom kompleksiranja došlo je do promjene adsorpcije ukupnih fenola ovisno o tipu disaharida i omjeru vlakna i disaharida. Primjenom disaharida udio adsorbiranih ukupnih fenola se je smanjio. Rezultati dobiveni za proantocijanidine također prate trend smanjenja adsorpcije s povećanjem udjela disaharida ali razlika između kompleksa sa saharozom i trehalozom je značajna. Udio adsorbiranih proantocijanidina na komplekse s dodatkom saharoze bio je znatno manji dok su kompleksi s dodatkom trehaloze imali su znatno veću adsorpciju proantocijanidina.

- Primjenom svih metoda (DPPH, ABTS, CUPRAC i FRAP) utvrđeno je da se s povećanjem udjela disaharida antioksidacijska aktivnost smanjila te da je najveću antioksidacijsku aktivnost imao kompleks vlakna jabuke/kupina.

- Dodatak disaharida i njihova koncentracija prilikom kompleksiranja imali su utjecaj i na parametre boje.

- Tijekom kompleksiranja disaharida (saharoze i trehaloze) s vlaknima jabuke i sokom kupine dolazi do promjena u IR spektru i zbog vezivanja vlakna jabuke i disaharida ali i zbog vezivanja komponenata soka kupine.

- Pozitivan utjecaj dodatka disaharida utvrđen je za hlapljive komponente s time da je trehaloza imala veći učinak u odnosu na saharozu.

Na temelju rezultata ovog istraživanja utvrđeno je da se vlakna jabuke mogu koristiti kao nositelji fenolnih i hlapljivih komponenti soka kupine te da se tako dobiveni kompleksi mogu koristiti kao dodatci hrani. Ujedno je utvrđeno da i dodatak disaharida (saharoze i trehaloze) ima utjecaj na adsorpciju fenolnih i hlapljivih komponenti soka kupine na vlakna. Buduća

istraživanja trebala bi biti usmjerena prema definiranju utjecaja dobivenih dodataka hrani (kompleksa) na boju, aromu, antioksidacijsku aktivnost proizvoda u koji su dodani.

6. LITERATURA

Abdelwahab O, Amin NK: Adsorption of phenol from aqueous solutions by *Luffa cylindrica* fibres: Kinetics, isotherm and thermodynamic studies. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 39:215-223, 2013.

Acosta O, Vaillant F, Perez AM, Dornier M: Potential of ultrafiltration for separation and purification of ellagitannins in blackberry (*Rubus adenotrichus* Schidtl.) juice. *Separation and Purification Technology* 125:120-125, 2014.

Akre B, Brainard J, Gray-Wilson N, Wilkin D: Biology, str. 870, FlexBook, CK 12 Foundation, 2009.

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K: Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127:183-198, 2002.

Azofeifa G, Quesada S, Perez AM: Effect of the microfiltration process on antioxidant activity and lipid peroxidation protection capacity of blackberry juice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21:829- 834, 2011.

Azofeifa G: Study of the health promoting properties of the tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos*) and the impact of digestion and pasteurization processes. *Disertacija*. Universite Montpellier, 2014.

Azofeifa G, Quesada S, Navarro L, Hidalgo O, Portet K, Perez AM, Vaillant F, Poucheret P, Michel A: Hypoglyacemic, hypolipidaemic and antioxidant effects of blackberry beverage consumption in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods* 26:330-33, 2016.

Azofeifa G, Quesada S, Perez AM, Vaillant F, Michel A: Effect of *In Vitro* digestion on the antioxidant capacity of a microfiltrated blackberry juice (*Rubus adenotrichus*). *Beverages* 4:1-12, 2018.

Banjari I, Bajraktarović-Labović S, Misir A, Huzjak B: Mediterranean diet and cardiovasular diseases. *Timočki medicinski glasnik* 38:196-202, 2013.

Barasi ME: *Human Nutrition - a health perspective.* 2nd ed. Hodder Arnold, London, 2003.

Becker A, Schloeder P, Steele JE, Wegener G: The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* 52:433-439, 1996.

Belitz HD, Grosch W, Schieberle P: Polyphenols. U *Food Chemistry*, str. 829- 837. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.

Bell W, Klaassen P, Ohnacker M. Boller T, Herweijer M, Schoppink P, van der Zee P, Wiemken A: Characterization of the 56 kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation. *European Journal of Biochemistry* 209:951-959, 1992.

Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL: Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. Journal of Biological Chemistry 276:24261-24267, 2001.

BeMiller J: Carbohydrate and Noncarbohydrate Sweeteners. U *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists,* str. 380- 381. Elsevier, Cambridge, MA, 2019.

Bermúdez-Oria A, Rodríguez-Gutiérrez G, Rubio-Senent F, Lama-Muñoz A, Fernández-Bolañoz J: Complexation of hydroxytyrosol and 3,4,-dihydroxyphenylglycol with pectin and their potential use for colon targeting. *Carbohydrate Polymers* 163:292-300, 2017.

Bermúdez-Oria A, Rodríguez-Gutiérrez G, Rodríguez-Juan E, González-Benjumea A, Fernández- Bolaños J: Molecular interactions between 3,4-dihyroxyphenylglycol and pectin and antioxidant capacity of this complex *in vitro*. *Carbohydrate Polymers* 197:260-268, 2018a.

Bermúdez-Oria A, Rodríguez-Gutiérrez G, Fernández-Prior Á, Vioque B, Fernández-Bolaños J: Strawberry dietary fiber functionalized with phenolic antioxidants from olives. Interactions between polysaccharides and phenolic compounds. *Food Chemistry* 280:310-320, 2018b.

Bhaskar JJ, Mahadevamma S, Chilkunda ND, Salimath PV: Banana (Musa sp. Var. elakki bale) flower and pseudostem: Dietary fiber and associated antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:427-432, 2012.

Bijkerk CJ, Muris JW, Knottnerus JA, Hoes AW, De Wit NJ: Systematic review: The role of different types of fibre in treatement of irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 19:245-251, 2004.

Biology Dictionary: Sucroze. https://biologydictionary.net/sucrose/ [20.11.2019.]

Blaszczyk A, Sady S, Sielicka M: The stilbene profile in edible berries. *Phytochemistry Reviews* 18:37-67, 2019.

Bordenave N, Hamaker BR, Ferruzzi MG: Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods. *Food and Function* 5:18–34, 2014.

Branca C, Faraone A, Magazu S, Maisano G, Migliardo F, Migliardo P, Villari V: Structural and dynamical properties of prehalose-water solutions: anomalous behaviour and molecular models. *Recent Research Developments in Physical Chemistry* 3:361-386, 1999.

Brennan PJ, Nikaido H: The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry* 64:29-63, 1995.

Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ, Frost G: The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *International Journal of Obesity* 39:1331-1338, 2015.

Calvo-Castro L, Syed DN, Chamcheu JC, Vilela FMP, Perez AM, Vaillant F, Rojas M, Mukhtar H: Protective effects of tropical highland blackberry juice (*Rubus adenotrichos* Schtltdl.) against UVB-mediated damage in human epidermal keratinocytes and in a reconstituted skin equvivalent model. *Photochemistry and Photobiology* 89:1199-1207, 2013.

Christensen PL, Edelenbos B, Kreutzmann S: Fruits and Vegetables of Moderate Climate. U *Flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability*, str. 157-164. Springer-Verlag, Berlin, 2007.

Da Rosa CG, Borges CD, Zambiazi RC, Rutz JK, da Luz SR, Krumreich FD, Benvenutti EV, Nunes MR: Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). *LWT - Food Science and Technology* 58:527-533, 2014.

De Man JM: Anthocyanins and flavonoids. Carbohydrates. U *Principles of food chemistry*, str. 252-261. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, 1999.

DeVirgilio C, Hottinger C, Dominiguez J, Boller T, Wiemken A: The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. *European Journal of Biochemistry* 219:179-186, 1994.

Dias MI, Ferreira ICFR, Barreiro MF: Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food and Function 6*:1035-1052, 2015.

Dhingra D, Michael M, Rajput H, Patil RT: Dietary fiber in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology* 49:255-266, 2012.

Du X: Aroma investigation of „Marion“ and Thornless blackberries in Pacific Northwest of America. *Disertacija*. Sveučilište u Oregonu, 2009.

Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D: New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13:17-27, 2003.

El Hadi MAM, Zhang FJ, Wu FF, Zhou CH, Tao J: Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules* 18:8200-8229, 2013.

Eskicioglu V, Kamiloglu S, Nilufer- Erdil D: Antioxidant dietary fibres: potential functional food ingredients from plant processing by-products. *Czech Journal of Food Sciences* 33:487-499, 2015.

Fan-Chiang HJ, Wrolstad RE: Anthocyanin pigment composition of balckberries. *Journal of Food Science* 70:C198-C202, 2005.

Featherstone S: Ingredients used in the preparation of canned foods. U *A complex course in canning and related processes*, str. 834-836. Woodhead Publishing, Amsterdam, 2015.

Fernandes A, Brás NF, Mateus N, Freitas V: Understanding the molecular mechanism of anthocyanin binding to pectin. *Langmuir* 30:8516-8527, 2014.

Fidelis M, Sousa Santos J, Coelho ALK, Rodionova OY, Pomerantsey AL, Granato D: Authentication of juices from antioxidant and chemical perspectives: A feasibility quality control study using chemometrics. *Food Control* 73:796-805, 2017.

Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandes MS, Xu Q, Griendling KK: Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation Research* 122:877-902, 2018.

Fraga CG, Croft KD, Keneddy DO, Tomas-Barberan FA: The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food and Function* 10:514-528, 2019.

Friedman M, Juergens HS: Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:2101- 2110, 2000.

Galmarini MV, Van Baren C, Zamora MC, Chirife J, Lira PDL, Bandoni A: Impact of trehalose, sucrose and/or maltodextrin additon on aroma retention in freeze dried strawberry puree. *International Journal of Food Science and Technology* 46:1337- 1345, 2011.

Gancel AL, Feneuil A, Acosta O, Perez AM, Vaillant F: Impact of industrial processing and storage of major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International* 44:2243-2251, 2011.

Gao R, Liu H, Peng Z, Wu Z, Wang Y i Zhao G: Adsorption of (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) onto oat β-glucan. *Food Chemistry* 132:1936-1943, 2012.

Gibney, JM, Lanham-New SA, Cassidy A, Vorster HH: *Introduction to human nutrition*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, Singapore, 2009.

Grooper SS, Smith JL: Fiber. U *Advanced nutrition and human metabolism*, str. 111-128. Wadsworth; Cengage Learning, Belmont, 2013.

Gunness P, Gidley MJ: Mechanisms underlying cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food and Function* 1:149-155, 2010.

Hager TJ, Howard LR, Prior RL: Processing and storage effects of monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:689-695, 2008.

Hager TJ, Howard LR, Priro RL: Processing and storage effects on the ellagitannins composition on processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:11749-11754, 2010.

Hassan HA, Yousef MI: Mitigating effects od antioxidant properties of blackberry juice on soduim floride induced hepatotoxicity and oxidative stres sin rats. *Food and Chemical Toxicology* 47:2332-2337, 2009.

Hassimotto NMA, Ponto MDS, Lajolo FM: Antioxidant status in humans after consumption ob blackberry (*Rubus fruticosus L*.) juices with and without defatted milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:11727-11733, 2008.

He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X: Antioxidant maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry* 44:532-553, 2017.

Higashiyama T: Novel functions and applications of trehalose. *Pure and Applied Chemistry* 74:1263-1269, 2002.

Higgins CB, Zhang Y, Mayer AL, Fujiwara H, Stothard AI, Graham MJ, Swarts BM, DeBosch BJ: Hepatocyte ALOXE3 is induced during adaptive fasting and enhances insulin sensitivity by activating hepatic PPARϒ. *The Journal of Clinical Investigation* 3:e120794, 2018.

Hottinger T, Boller T, Wiemken A: Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters* 220:113-115, 1987.

Huang W, Zhang H, Liu W, Li C: Survey of capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine and Biotechnology)* 13:94-102, 2012.

ILSI, International Life Siences Institute: *Institute Role of carbohydrates in health & disease*. ILSI, 2006. https://ilsisea-region.org/wp-content/uploads/sites/21/2016/06/ILSI-SEAR-Monograph-Carbohydrates.pdf [22.11.2019.]

ILSI, International Life Sciences Institute: *Carbohydrates: Nutritional and health aspects*. ILSI, 2003. https://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2016/06/C2003Carb_Nut.pdf [22.11.2019.]

Ivanova I, Iliev I, Haertle T, Chobert JM: *Food or Medicine? Future of Lactic Acid Bacteria*. Sofia University, Sofia, 2013.

Ivić I, Kopjar M, Jakobek L, Jukić V, Korbar S, Marić B, Mesić J, Pichler A: Influence of processing parameters on phenolic compounds and color of Cabernet Sauvignon red wine concentrates obtained by reverse osmosis and nanofiltration. *Processes* 9:89, 2021.

Jakobek L, Šeruga M, Medvidović-Kosanović M, Novak I: Anthocyanin content of various red fruit juices. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 103:58-64, 2007.

Jakobek L: Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry* 175:556-567, 2015.

Jakobek L, Matić P: Non-covalent dietary fiber-polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccesibility. *Trends in Food Science and Technology* 83:235-247, 2019.

Jakobek L, Matić P, Kraljević Š, Ukić Š, Benšić M, Barron AR: Adsorption between quercetin derivatives and β-glucan studied with a novel approach to medeling adsorption isotherms, *Applied Sciences* 10:1-16, 2020.

Jentjens RLPG, Jeukendrup AE: Effects of pre-excercise ingestion of trehalose, galactose and glucose on subsequent metabolism and cycling performance. *European Journal of Applied Physiology* 88:459-465, 2003.

Kalogeropoulos N, Yannakopoulou K, Gioxari A, Chiou A, Makris DP: Polyphenol characterization and encapsulation in b-cyclodextrin of a flavonoid rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. *Food Science and Technology* 43:882-889, 2010.

Kandror O, DeLeon A, Goldberg AL: Trehalose synthesis is induced upon exposure od Escherichia coli to cold and is essential for viability at low temperature. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:9727-9732, 2002.

Katalinić V: *Temeljno znanje o prehrani*. Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2011.

Kaume L, Howard LR, Devareddy L: The Blackberry Fruit: A Review on its composition and chemistry. Metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 60:5716-5727, 2012.

Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 55:279-290, 2004.

Kopjar M, Bilić B, Piližota V: Influence of different extracts addition on total phenols, anthocyanin content and antioxidant activity of blackberry juice during storage. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 3:9-15, 2011.

Kopjar M, Piližota V: Prevention of thermal degradation of anthocyanins in blackberry juice with addition of different sugars. *CyTA- Journal of Food* 9:237-242, 2011.

Kopjar M, Piližota V: Blackberry juice. U *Handbook of functional beverages and human health*. str. 135-145. Boca Raton: CRC Press.

Kopjar M, Lončarić A, Mikulinjak M, Šrajbek Ž, Šrajbek M, Pichler A: Evaluation of Antioxidant Interactions of Combined Model Systems of Phenolics in the Presence of Sugars. *Natural Product Communications* 11:1445-1448, 2016.

Kopjar M, Alilović D, Požrl T, Piližota V, Pichler A: Phenolics content and antioxidant activity of sour cherry extrycts with sugar addition. *Acta Alimentaria* 46:501-507, 2017.

Krešić G: *Trendovi u prehrani*. Fakultet za menadžment u turizmu i ugostiteljstvu, Opatija, 2012.

Lattimer JM, Haub MD: Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* 2:1266-1289, 2010.

Le Bourvellec CL, Guyot S, Renard CMGC: Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material Part 1: Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1672:192- 202, 2004.

Le Bourvellec CL, Renard CMGC: Non- covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part 2: Quantification and impact of cell wall drying. *Biochimica et Biophysica Acta* 1725:1-9, 2005.

Le Bourvellec CL, Renard CMGC: Interactions Between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52:213-248, 2012.

Lee J: Rosaceae products: Anthocyanin quality and comparisons between dietary supplements and food. *Nutrition & Food Science Journal* 4:1-8, 2016.

Li S, Junsheng L, Zhu Z, Cheng S, He J, Lamikanra O: Soluble dietary fiber and polyphenol complex in lotus root: preparation, interaction and identification. *Food Chemistry* 314:1-8, 2020.

Li YO, Komarek AR: Dietary fibre basics: Health, nutrition, analysis, and applications. *Food Quality and Safety* 1:47- 59, 2017.

Lila MA, Schneider M, Devlin A, Plundrich N, Laster S, Foegeding EA: Polyphenol-enriched berry extracts naturally modulate reactive proteins in model foods. *Food and Function* 8:4760–4767, 2017.

Liu AG, Most MM, Brashear MM, Johnson WD, Cefalu WT, Greenway FL: Reducing the glycemic index of carbohydrate content of mixed meals reduces postprandial glycemia and insulinemia over the entire day but does not affect satiety. *Diabetes Care* 35:1633–1637, 2012.

Liu C, Ge S, Yang J, Xu Y, Zhao M, Xiong L, Sun Q: Adsorption mechanism of polyphenols onto starch nanoparticles and enhanced antioxidant activity under adverse conditions. *Journal of Functional Foods* 26:632–644, 2016.

Liu D, Martinez- Sanz M., Lopez-Sanchez P, Gilbert EP, Gidley MJ: Adsorption behavior of polyphenols on cellulose is affected by processing history. *Food Hydrocolloids* 63:496-507, 2017.

Liu J, Li J, Ma Y, Chen F, Zhao G: Synthesis, characterization, and aqueous self- assembly of octenylsuccinate oat β-glucan. *Journal of Agrucultural and Food Chemistry* 61:12683-1269, 2013.

Liu Y, Ying Danyang, Sanguansri L, Cai Y, Le X: Adsorption of catechin onto cellulose and its mechanism study: kinetic models, characterization and molecular simulation. *Food Research International* 112:225-232, 2018.

Liu S, Jia M, Chen J, Wan H, Dong R, Nie S, Xie M, Yu Q: Removal of bound polyphenols and its effect on antioxidant and prebiotics of carrot dietary fiber. *Food Hydrocolloids* 93:284-292, 2019.

Liu X, Le Bourvellec C, Renard CMGC: Interactions between cell wall polysaccharides and polyphenols:Effect of molecular internal structure. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19:1-44, 2020.

Lončarić A, Pichler A, Trtinjak I, Piližota V, Kopjar M: Phenolics and antioxidant activity of freeze-dried sour cherry puree with addition of disaccharides. *Food Science and Technology* 73:391-396, 2016.

Lovergrove JA, Jackson KG: Functional foods and coronary heart disease (CHD). U *Functional foods - concept to product*, str. 153- 193. Woodhead Publishing, Cambridge, 2011.

Ludwig IA, Mena P, Calani L, Borges G, Pereira-Caro G, Bresciani L, Del Rio D, Lean MEJ, Crozier A: New insights into the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins. *Free Radical Biology and Medicine* 89:758- 769, 2015.

Magder S: Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life. *Critical Care*10:1-8, 2006.

Mamet T, Ge ZZ, Zhang Y, Li CM: Interactions between high galloilated persimmon tannins and pectins. *International Journal of Biological Macromolecules* 106:410-417, 2018.

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

Mandić M: *Dijetoterapija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

Mandić M: *Znanost o prehrani- hrana i prehrana u čuvanju zdravlja*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

Mandić M, Nosić M: *Funkcionalna svojstva prehrambenih vlakana.* Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2009.

Mathlouthi M: *Food packaging and preservation*. Springer Science and Business Media, Dordrecht, 1994.

McRae M: The benefits of dietary fiber intake on reducing the risk of cancer: an umbrella review of meta-analyses. *Jornal of Chiropractic Medicine* 17:90-96, 2018.

Melzoch K, Hanzlíková I, Filip V, Buckiová D, Šmidrkal J: Resveratrol in parts of vine and wine originating from Bohemian and Moravian vineyard regions. *Agruculturae Conspectus Scientificus*, 66:53-57, 2001.

Mirmiran P, Bahadoran Z, Moghadam SK, Vakili AZ, Azizi F: A prospective study of different types of dietary fiber and risk of cardiovascular disease:Teheran lipid and glucose study. *Nutrients* 8:1-15, 2016.

Mitic V, Jovanovic VS, Dimitrijevic M, Cvetkovic J, Simonovic S, Nikolic *Mandic* S: Chemometric analysis of antioxidant activity and anthocyanin content of selected wild and cultivated small fruit from Serbia. *Fruits* 69:413- 422, 2014.

Muller J, Wiemken A, Aeschbacher R: Trehaloze metabolism in sugar sensing and plant developement. *Plant Science* 147:37-47, 1999.

Myrie SB, Jones PJH: Functional foods and obesity. U: *Functional foods- concept to product*, str. 234-261. Woodhead Publishing, Cambridge, 2011.

Nanić L: Utjecaj antioksidansa resveratrola i melatonina te mladih transplantiranih fibroblasta na promjenu tkivne homeostaze i regeneraciju u starenju štakora. *Disertacija*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku, Institut Ruđer Bošković, 2018.

Neilson AP, Ferruzzi MG: Bioavailability and metabolism of bioactive compounds from food. U *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*, str. 407- 420. Academic Press, San Diego, 2013.

Neta T, Takada K, Hirasawa M: Low-cariogenicity of trehalose as a substrate. *Journal of Dentistry* 28:571-576, 2000.

Nicolaus B, Gambacorta A, Basso AL, Riccio R, DeRosa M, Grant WD: Trehalose in *Archaebacteria* bacteria systems. *Journal of Applied Microbiology* 10:215-217, 1988.

Nguela JM, Poncet-Legrand C, Sieczkowski N, Vernhet A: Interactions of grape tannins and wine polyphenols with a yeast protein extract, mannoproteins and β-glucan. *Food Chemistry* 210:671-682, 2016.

Ohtake S, Wang YJ: Trehalose: current use and future applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100:2020-2053, 2011.

Ozdal T, Capanoglu E, Altay F: A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International* 51:954–970, 2013.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR: Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* 5:1-15, 2016.

Pandey KB, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:270–278, 2009.

Patist A, Zoerb H: Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 40:107-113, 2005.

Peanparkdee M, Iwamoto S, Yamauchi R: Microencapsulation: a review of applications in the food and pharmaceutical industries. *Reviews in Agricultural Science* 4:56-65, 2016.

Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F: Total antioxidant capacity of plant foods beverages and oils consumed in Italy assesed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition* 133:2812-2819, 2003.

Phan ADT, Flanagan BM, D'Arcy BR, Gidley MJ: Binding selectivity of dietary polyphenols to different plant cell wall components: Quantification and mechanism. *Food Chemistry* 233:216–227, 2017.

Phan ADT, D'Arcy BR, Gidley MJ: Polyphenol–cellulose interactions: effects of pH, temperature and salt. *International Journal of Food Science and Technology* 51:203–211, 2016.

Quirós-Sauceda AE, Palafox-Carlos H, Ayerdi- Sáyago SG, Ayaga Zavala JF, Bello Perez LA, Álavrez-Parrilla E, De La Rosa LA, González-Córdova AF, González-Aguilar GA: Dietary fibres and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food and Function* 5:1063-1072, 2014a.

Quirós-Sauceda AE, Ayala-Zavala JF, Sáyago-Ayerdi SG, Vélez-de la Rocha, Sañudo-Barajas JA, González-Aguilar GA: Added dietary fiber affects antioxidant capacity and phenolic compounds content extracted from tropical fruit. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 87:227-233, 2014b.

Renard CMGC, Watrelot AA, Bourvellec CL: Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science & Technology* 9:43-51, 2017.

Roser B: Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends in Food Science and Technology* 10:166-169, 1991.

Sakakura K, Okabe A, Oku K, Sakurai M: Experimental and theoretiacal study on the intermolecular complex formation between trehalose and benzene compounds in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry* 115:9823-9830, 2011.

Sapers GM, Hicks KB, Burgher AM, Hargrave DL, Sondey SM, Bilyk A: Anthocyanin patterns in ripening thornless blackberries. *Journal of American Society for Horticultural Science* 111:945- 950, 1986.

Sariburun E, Sahin S, Demir C, Turkben C, Uylaser V: Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Food Chemistry* 75:328-335, 2010.

Saura-Calixto F: Dietary fiber as a career of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:43-49, 2011.

Saura-Calixto F, Diaz-Rubio ME: Polyphenols associated with dietary fiber in wine. A wine Poyphenols gap? *Food Research International* 40:613-619, 2007.

Shi M, Ying D-Y, Hlaing MM, Ye J-H, Sanguansri L, Augustin MA: Development of broccoli by-products as carrers for delivering EGCG. *Food Chemistry* 301:1-7, 2019.

Shivashankara KS, Acharya SN: Bioavailability of dietary polyphenols and the cardiovascular diseases. *The Open Nutraceuticals Journal* 3:227-241, 2010.

Shrikanta A, Kumar A, Govindaswamy V: Resveratrol content and antioxidant properties od underutilized fruits. *Journal of Food Science and Technology* 52:383-90, 2015.

Simonsen HT, Nielsen MS, Christensen NJ, Christensen U, La Cour TV, Motawia MS, Jespersen BPM, Engelsen SB, Møller BL: Molecular interactions between barely and oat β-glucans and phenolic derivatives. *Agricultural and Food Chemistry* 57:2056-2064, 2009.

Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Tunde, J, Sochor J: Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences* 16:24673-24706, 2015.

Slavin JL: Position of the american dietetic association: health implications of dietary fiber. *Journal of American Dietetic Association* 108:1716-1731, 2008.

Spormann TM, Albert FW, Rath T, Dietrich H, Will F, Stockis JP, Eisenbrand GJ, Anzowski C: Anthocanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidatice cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 17:3372-3380, 2008.

Staffolo MD, Bertola N, Martino M, Bevilacqua YA: Influence of dietary fibre addition on sensory and rheological propreties of yogurt. *International Dairy Journal* 14:263-268, 2004.

Stephen MA, Champ MMJ, Cloran SJ, Fleith M, Van Lieshout L, Mejborn H, Burley JV: Dietary Fiber in Europe: current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. *Nutrition Research Reviews* 30:149-190, 2017.

Sun-Waterhouse D, Smith BG, O'Connor CJ, Melton DL: Effect of raw and cooked onion dietary fiber on the antioxidant activity od ascorbic acid and quercetin. *Food Chemistry* 11:580-585, 2008a.

Sun-Waterhouse D, Melton LD, O'Connor CJ, Kilmartin PA, Smith BG: Effect of apple cell walls and their extracts on the activity of dietary antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:289-295, 2008b.

Tang HR, Covington AD, Hancock RA: Structure-activity relationships in the hydrophobic interactions of polyphenols with cellulose and collagen. *Biopolymers* 70:403-413, 2003.

Tate P, Kuzmar A, Smith SW, Wedge DE, Larcom LL: Comparative effects of eight varieties of balckberry on mutagenesis. *Nutrition Research* 23:971-979, 2003.

Titchenal A, Calabrese A, Gibby C, Revilla Fialkowski MK, Meinke W: *Human Nutrition*. University of Hawaii, Manoa, 2018.

USDA, U.S. Department of Agriculture, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2013. http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/ [11.02.2020.]

Van Can JGP, Van Loon LJC, Brouns F, Blaak EE: Reduced glycaemic and insulinaemic responses following trehalose and isomaltulose ingestion: implications for postprandial substrate use in impaired glucose- tolerant subjects. *British Journal of Nutrition* 108:1210-1217, 2012.

Verma AK, Sharma BD, Banerjee R: Quality characteristics and storage stability of low fat functional chicken nuggets with salt substitute blend and high fiber ingredients. *Fleischwirtschaft International* 24:54- 57, 2009.

VishWanath MS: *Intoduction to Clinical Nutrition*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, 2003.

Wadazumi T, Watanabe K, Watanabe H, Yokoyama H, Hongu N, Arai N: Effects of a single ingestion of trehalose during prolonged excercise. *Sports* 7:1-15, 2019.

Wang Y: Obesity and related disorders. U *Functional Food Product Development*, str. 388-425. Blackwell Publishing, Chichester, West Sussex, 2010.

Wang Y, Liu J, Chen F, Zhao G: Effects of molecular structure of polyphenols on their noncovalent interactions with oat β-glucan. *Agricultural and Food Chemistry* 61:4533-4538, 2013.

Webb GP: Free radicals and antioxidants. U *Dietary supplements and functional foods*, str. 107- 120. Blackwell Publishing, Chichester, West Sussex, 2006.

Wu Y, Chen ZX, Li X, Li M: Effect of tea polyphenols on the retrogradation of rice starch. *Food Research International* 42:221-225, 2009.

Wu Z, Li H, Ming J, Zhao G: Optimization of adsorption of tea polyphenols into oat β- glucan using rensponse surface metodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:378-385, 2011.

Xu Z, Xiong X, Zeng Q, He S, Yuan Y, Wang Y, Wang Y, Yang X, Su D: Alterations in structural and functional properties of insoluble dietary fibres-bound phenolic complexes derived from lychee pulp by alkaline hydrolisis treatement. *LWT-Foood Science and Technology* 127:1-8, 2020.

Yang H, Hewes D, Salaheen S, Federman C, Biswas D: Effects of blackberry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of *Lactobacillus*. *Food Control* 37:15-20, 2014.

Yoshizane C, Mizote A, Yamada M, Arai N, Arai S, Maruta K, Mitsuzumi H, Ariyasu T, Ushio S, Fukuda S: Glycemic, insulinemyc and incretin responses after oral trehalose ingestion in healthy subjects. *Nutrition Journal* 16:9, 2017.

Zhang L, Hu Z, Yan L, Li R, Cao C, Xiaoding H: Preparation and Characterization of Tea Polyphenols/Starch Inclusion Complex. *Applied Mechanics and Materials* 432:413-417, 2013.

Zhang H, Jung J, Zhao Y: Preparation, characterization and evaluation of antibacterial activity of catehins and catehins-Zn complex loaded β-chitozan nanoparticles od different particle sizes. *Carbohydrate Polymers* 137:82-91, 2016.

Zhang D, Zhu J, Ye F, Zhao G: Non-covalent interaction between ferulic acid and arabinan - rich pectic polysaccharide from rapeseed meal. *International Journal of Biological Macromolecules 103*:307- 315, 2017.

Zlatic E, Pichler A, Vidrih R, Hribar J, Pližota V, Kopjar M: Volatile profile of sour cherry puree as affected by sucrose and trehalose. *International Journal of Food Properties* 20:3237-3245, 2017.

Živković R: *Hranom do zdravlja: hrana nije lijek, ali liječi*. Medicinska naklada, Zagreb, 2000.

Životopis

Mario Nosić, rođen je 30. svibnja 1976. godine u Osijeku gdje je završio osnovnu i srednju školu (Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića). Na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku je stekao zvanje diplomirani inženjer prehrambene tehnologije. Diplomirao je na predmetu Osnove znanosti o prehrani obranivši diplomski rad pod nazivom „Dnevni unos prehrambenih vlakana studentske populacije“ pod vodstvom mentorica prof. dr. sc. Milene Mandić i prof. dr. sc. Antonije Perl. Nakon završetka fakulteta se zapošljava kao tehnolog kontrole kvalitete. Završio je pedagoško-psihološku naobrazbu. Kao nastavnik radi prvo u osnovnim školama na predmetu *Kemija*, a zatim u srednjim školama kao nastavnik na predmetima *Mikrobiologija hrane*, *Opća mikrobiologija*, *Fermentirani procesi u prehrani*, *Dijetetika*, *Poznavanje robe* i *Prehrana i biologija s higijenom i ekologijom*. Zbog doprinosa u unaprjeđenju nastavnog i izvannastavnog stručnog rada, od 2018. godine ima status profesora mentora.

Autor je dva pregledna znanstvena rada te koautor jedne sveučilišne monografije. Autor je nekoliko popularnih stručnih članka iz područja nutricionizma. U cilju promicanja, razvijanja i unaprjeđenja struke održava predavanja i radionice na županijskoj i međužupanijskoj razini. Kontinuirano se usavršava putem raznih edukacija i kongresa s međunarodnim sudjelovanjem, a u nekima i sam sudjeluje.

Od 2018. godine je predsjednik podružnice Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista (HDPBN) u Rijeci koja obuhvaća tri županije (Primorsko-goransku, Istarsku i Ličko-senjsku).

U veljači 2021. godine izabran je za vanjskog suradnika na Fakultetu zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci.