Utjecaj β-glukana na bioraspoloživost polifenola voća ispitivanjem kinetičkih modela simuliranih probavnih procesa

Ištuk, Jozo

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:109:198970

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 DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Jozo Ištuk, mag. preh. ing.

UTJECAJ β-GLUKANA NA BIORASPOLOŽIVOST POLIFENOLA VOĆA ISPITIVANJEM KINETIČKIH MODELA SIMULIRANIH PROBAVNIH PROCESA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, rujan, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam
Smjer: Prehrambena tehnologija
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za primijenjenu kemiju, biokemiju i instrumentalne metode
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

UDK broj: 547.56 : 544.4(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Znanstvena grana Inženjerstvo
Tema rada je prihvaćena na IX. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 20. srpnja 2020.
Voditelj: *prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron*

UTJECAJ β-GLUKANA NA BIORASPOLOŽIVOST POLIFENOLA VOĆA ISPITIVANJEM KINETIČKIH MODELA SIMULIRANIH PROBAVNIH PROCESA

Jozo Ištuk, 33/PTIN

Sažetak:

Cilj rada bio je istražiti bioraspoloživost polifenola voća i utjecaj β-glukana na bioraspoloživost. Provedena je *in vitro* simulacija probave kožice i mesa plodova tradicionalnih kultivara i komercijalnog kultivara jabuka (*Malus domestica* Borkh.) te plodova crne bazge (*Sambucus Nigra L.*), bez i uz dodatak β-glukana. Eksperimentalni podatci (količina polifenola otpuštenih tijekom probave (c_i) u ovisnosti o vremenu (t)) analizirani su kinetičkim jednadžbama. Istražen je i utjecaj polifenola na aktivnost α-amilaze i α-glukozidaze. Polifenolne skupine kožice i mesa plodova jabuka te plodova crne bazge pokazali su se kao potencijalni inhibitori α-amilaze i α-glukozidaze. Polifenoli postaju raspoloživi za apsorpciju u probavnom traktu u količinama koje su značajno manje od onih prisutnih u voću prije probave. Nakon probave u ustima, količina otpuštenih ukupnih polifenola u želudcu pokazuje značajan porast te se značajno smanjuje nakon probave u tankom crijevu. Polifenolne skupine su pokazale različita ponašanja tijekom simulirane probave. Nakon faze u ustima, količina svih polifenolnih skupina pokazala je značajan porast nakon probave u želudcu, dok su nakon probave u tankom crijevu antocijanini i flavan-3-oli potpuno nestali ili pokazali značajno smanjenje, fenolne kiseline i dihidrokalkoni pokazali značajno smanjenje, a količina flavonola bila je slična. β-glukan je smanjio količinu otpuštenih polifenola što je u nekim slučajevima bilo statistički značajno. Jednadžbe reakcija prvog i drugog reda su modificirane i prilagođene za karakteristično otpuštanje i razgradnju polifenola tijekom simulirane probave. Nelinearna regresija podataka c_i u ovisnosti o t modificiranom jednadžbom prvog reda pokazala je manju standardnu grešku u usporedbi s jednadžbama reakcija drugog ili nultog reda. Simulirana probava polifenolnih skupina u želudcu i tankom crijevu slijedi kinetiku prvog reda s vremenom polureakcije unutar 10 minuta odvijanja procesa. β-glukan ima potencijalno važnu ulogu u bioraspoloživosti polifenola i količini koja dospijeva do donjih dijelova probavnog sustava što je važno za različite pozitivne bioaktivnosti polifenola. Modificirane jednadžbe reda reakcije upotrijebljene prvi puta u ovom radu mogu se primjenjivati u daljnjim istraživanjima bioraspoloživosti polifenola.

Ključne riječi: polifenoli, bioraspoloživost, β-glukan, simulacije probave, kinetika

Rad sadrži: 123 stranice
40 slika
40 tablica
0 priloga
144 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	prof. dr. sc. Martina Skendrović Babojelić	predsjednik
2.	prof. dr. sc. Ivica Strelec	član
3.	izv. prof. dr. sc. Ivana Flanjak	član
4.	izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović	zamjena člana

Datum obrane: 8. rujna 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Postgraduate University Study-Food Technology and nutrition
Department of applied chemistry and ecology
Subdepartment of applied chemistry, biochemistry and instrumental methods
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia
UDC: 547.56 : 544.4(043.3)
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Scientific branch: Engineering
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. IX held on June 20, 2020..
Mentor: *Lidija Jakobek Barron*, PhD, Full Professor
Scientific field: Food technology

β-GLUCAN INFLUENCE ON THE FRUIT POLYPHENOL BIOACCESSIBILITY BY STUDYING KINETIC MODELS OF SIMULATED DIGESTIVE PROCESSES

Jozo Ištuk, 33/PTIN

Summary:

This study aimed to examine the bioaccessibility of fruit polyphenols and the effect of β-glucan on polyphenol bioaccessibility. An *in vitro* simulation of peel and flesh digestion of fruits of traditional and commercial apple cultivars (Malus domestica Borkh.) and black elderberry (Sambucus Nigra L.) was performed, without and with the addition of β-glucan. Experimental data (amount of polyphenols released during digestion (c_t) as a function of time (t)) were analyzed by kinetic equations. The effect of polyphenols on α-amylase and α-glucosidase activity was also investigated. Polyphenol classes of peel and flesh of apples and black elderberries were found as potential inhibitors of α-amylase and α-glucosidase. Polyphenols become available for absorption in the digestive system in amounts that are significantly lower than those present in fruit before digestion. After digestion in the mouth, the amount of total polyphenols released in the stomach showed a significant increase and decreased significantly after digestion in the small intestine. Polyphenolic classes showed different behaviours during simulated digestion. After the oral phase, the amount of all polyphenolic classes showed a significant increase after gastric digestion. After small intestine digestion anthocyanins and flavan-3-ols completely disappeared or showed a significant reduction, phenolic acids and dihydrocalcones showed a significant reduction, while the amount of flavonols was similar. β-glucan reduced the amount of polyphenols released, which was statistically significant in some cases. First and second order equations were modified and adjusted for the characteristic release and degradation of polyphenols during simulated digestion. Nonlinear regression of c_t data as a function of t modified by the first order equation showed a smaller standard error compared to the second or zero order reactions. Simulated digestion of polyphenolic classes in the stomach and small intestine follows first-order kinetics with a half-reaction time within 10 minutes of the process duration. β-glucan plays a potentially important role in the bioaccessibility of polyphenols and the amount that reaches the lower parts of the digestive system which is important for the various positive bioactivities of polyphenols. The modified kinetic equations used for the first time in this paper can be applied in further studies of polyphenol bioaccessibility.

Key words: polyphenols, bioaccessibility, β-glucan, digestion simulation, kinetics

Thesis contains:
123 pages
40 figures
40 tables
0 supplements
144 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Martina Skendrović Babojelić, PhD, Full Professor — chair person
2. Ivica Strelec, PhD, Full Professor. — supervisor
3. Ivana Flanjak, PhD, Associate Professor. — member
4. Martina Medvidović-Kosanović, PhD, Associate Professor — stand-in

Defense date: month, day, year (e.g. February 20, 2008.)

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek

Prvenstveno bih se želio zahvaliti mojoj mentorici, profesorici Lidiji Jakobek Barron, što mi je ukazala priliku. Hvala joj što je tijekom ovog čitavog putovanju bila ohrabrujuća riječ, topao osmijeh, glas razuma, oličenje integriteta i utjelovljenje izreke "Lead by an example.".

Hvala i mojoj dragoj obitelji što su uvijek bili tu. Hvala im za svako "Kako si?" i za svako "Volimo te." Hvala im što sam u svakom trenutku, svjesno ili nesvjesno, znao da se imam na koga osloniti i da nikad nisam sam.

Hvala i mojim kolegama Ivani, Petri i Andreju na stručnoj pomoći, prijateljskim razgovorima, podršci i razumijevanju. Hvala im i što su trpjeli moje fore i moje pjevanje. Jedno veliko hvala ide i čitavom kolektivu PTF-a, kao i mojim dragim kolegama i kolegicama koji su mi sasvim neprimjetno postali prijatelji i time uljepšali ovaj period života.

Zahvalio bih se i mojoj djevojci Martini što se uvijek smijala na moje fore. Hvala joj što sam rješavajući njezine probleme u potpunosti zaboravio na svoje (i ovo je fora). Hvala joj što je baš takva kakva jeste.

I na kraju, ali i najbitnije, Bogu hvala!

Sadržaj

1. UVOD 2
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Polifenolni spojevi 5
2.1.1. Fenolne kiseline 5
2.1.2. Flavonoidi 6
2.2. Voće kao izvor polifenola 9
2.2.1. Jabuke 9
2.2.2. Crna bazga 10
2.3. Prehrambena vlakna 10
2.3.1 β-glukan 10
2.4. Bioaktivnosti polifenolnih spojeva 11
2.5. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva 12
2.5.1. Interakcije polifenola s prehrambenim vlaknima 13
2.5.2. *In vitro* gastrointestinalna simulacija probave 14
2.6. Kemijska kinetika 15
2.6.1. Brzina reakcije, jednadžba za brzinu reakcije, konstanta brzine reakcije i red reakcije 15
2.6.2. Integrirane jednadžbe za brzine reakcije 17
2.6.3. Vrijeme polureakcije 18
2.6.4. Primjena kemijske kinetike za proces simulirane probave 19
3. EKSPERIMENTALNI DIO 20
3.1. Zadatak rada 21
3.2. Materijali i metode 22
3.2.1. Plan istraživanja 22
3.2.2. Kemikalije 24
3.2.3. Priprema otopina i reagensa 25
3.2.4. Priprema uzoraka jabuka i bobica crne bazge 26
3.2.5. Ekstrakcija polifenolnih spojeva 26
3.2.6. Razdvajanje polifenolnih skupina jabuka i bobica crne bazge primjenom kromatografije na stupcu 28
3.2.7. Folin-Ciocalteu metoda za ukupne polifenolne spojeve 29
3.2.8. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija obrnutih faza (RP-HPLC) 30
3.2.9. Inhibicija enzima polifenolima plodova jabuka i bobica crne bazge 32
3.2.10. Simulirani probavni proces 34
3.2.11. Kinetika procesa simulirane probave 35
3.2.12. Statistička analiza 37
4. REZULTATI 38
4.1. Ekstrakcija polifenola iz jabuka i bobica crne bazge 38

4.2. Vrednovanje metoda visokodjelotvorne tekućinske kromatografije obrnutih faza za određivanje polifenola 39
4.2.1. RP-HPLC metoda za polifenole jabuka 39
4.2.2. RP-HPLC metoda za polifenola iz bobica crne bazge 40
4.3. Identifikacija polifenola u jabukama i bobicama crne bazge 41
4.4. Inhibicija enzima polifenolima iz jabuke i bobica crne bazge 45
4.4.1. Inhibicija α-amilaze 50
4.4.2. Inhibicija α-glukozidaze 52
4.4.3. Kinetika inhibicije enzima 54
4.5. Simuliran probavni process 56
4.5.1. Simulirani probavni proces kožice plodova jabuke bez i s dodatkom β-glukana 56
4.5.3. Simuliran probavni proces bobica crne bazge bez i s dodatkom β-glukana 64
4.6. Usporedba simuliranog procesa probave sa i bez β-glukana 66
4.7. Kinetika simuliranog procesa probave 69
5. RASPRAVA 84
5.1. Ekstrakcija polifenola iz jabuke i bobica crne bazge 85
5.2. Vrednovanje metoda visokodjelotvorne tekućinske kromatografije obrnutih faza za određivanje polifenola 85
5.2.1. RP-HPLC metoda za polifenole plodova jabuka 86
5.2.2. RP-HPLC metoda za polifenole iz bobica crne bazge 86
5.3. Identifikacija polifenola u jabukama i bobicama crne bazge 86
5.4. Inhibicija enzima polifenolima iz jabuka i bobica crne bazge 87
5.4.1. Inhibicija α-amilaze 89
5.4.2. Inhibicija α-glukozidaze 90
5.4.3. Kinetika inhibicije enzima 91
5.5. Simulirani probavni proces 91
5.5.1. Simulirani probavni proces kožice i mesa plodova jabuke bez i s dodatkom β-glukana 92
5.5.3. Simulirani probavni proces bobica crne bazge bez i s dodatkom β-glukana 97
5.6. Usporedba simuliranog procesa probave sa i bez β-glukana 100
5.7. Kinetika simuliranog probavnog procesa 100
5.7.1.Oslobađanje polifenola voća prilikom simuliranog probavnog procesa 101
5.7.2. Kinetički modeli simuliranog probavnog procesa voća 101
6. ZAKLJUČAK 104
7. LITERATURA 107

Popis oznaka, kratica i simbola

A	Apsorbancija
B	Koeficijent u modificiranoj jednadžbi drugog reda
c_A	Koncentracija tvari A u vremenu t
c_{A0}	Koncentracija tvari A u vremenu $t = 0$
c_∞	Koncentracija tvari A kada reakcija teži u beskonačnost
DNS	3,5-dintriosalicilna kiselina
HPLC	Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija
I_∞	Postotak inhibicije kada reakcija teži u beskonačnost
IC_{50}	Koncentracija inhibitora koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju
k	Konstanta brzine reakcije
k_0	Konstanta brzine reakcije nultog reda
k_1	Konstanta brzine reakcije prvog reda
k_2	Konstanta brzine reakcije drugog reda
k_{1M}	Konstanta brzine reakcije prvog reda modificirane jednadžbe
k_{2M}	Konstanta brzine reakcije drugog reda modificirane jednadžbe
KNT	kalijev natrijev tartarat tetrahidrat
LOD	Granica detekcije
LOQ	Granica kvantifikacije
PCA	Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal component analysis)*
p-NPG	4-nitrofenil α-D-glukopiranozid
RP-HPLC	Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija obrnutih faza
S	Srednja vrijednost nagiba kalibracijske krivulje
SD	Standardna devijacija odsječka na y osi
SE	Standardna greška
STU	Simulirana tekućina usta
STŽ	Simulirana tekućina želudca
STT	Simulirana tekućina tankog crijeva
t	Vrijeme

$t_{1/2}$	Vrijeme polureakcije
UV/Vis	Spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom području
v	Brzina reakcije

1. UVOD

Polifenoli su prirodni bioaktivni spojevi prisutni u ljudskoj prehrani. Nastaju kao sekundarni metaboliti biljaka, u kojima je identificirano preko 8000 polifenolnih spojeva (Lewandowska i sur., 2013; Abbas i sur., 2017). Prema strukturnim razlikama se općenito mogu podijeliti na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Manach i sur., 2004). Postoji mogućnost povezanosti prehrane bogate polifenolima s potencijalnim smanjenjem rizika od bolesti krvožilnog sustava, karcinoma i dijabetesa (Hanhineva i sur., 2010; Link i sur., 2010; Stagos i sur., 2012; Mendonça i sur., 2018), zbog čega se polifenoli intenzivno istražuju. Međutim, kako bi pokazali potencijalno pozitivno djelovanje na ljudski organizam, polifenoli se moraju apsorbirati u određenoj količini.

Količina konzumiranog nutrijenta koja je dostupna za apsorpciju u tankom crijevu se definira kao bioraspoloživost. Nadalje, količina nutrijenta koja se probavi, apsorbira i iskoristi u normalnom metabolizmu se definira kao biodostupnost (Palafox-Carlos i sur., 2011), iz čega je vidljivo da biodostupnost ovisi o bioraspoloživosti. Stoga je problematika bioraspoloživosti polifenola iz raznih prehrambenih izvora ispitana u nizu istraživačkih radova (Kaulmann i sur., 2016; Bergantin i sur., 2017; Lingua i sur., 2019; Quatrin i sur., 2020). Zajednički zaključak je da su polifenoli dostupni za apsorpciju nakon probave, ali u znatno manjim količinama u odnosu na početne. Tijekom probave polifenoli mogu stupiti u interakcije s ostalim komponentama hrane poput ugljikohidrata i proteina (Jakobek, 2015). Posebice zanimljive su interakcije polifenola s prehrambenim vlaknima (Palafox-Carlos i sur., 2011;González-Aguilar i sur., 2017; Jakobek i Matić, 2019). Ove makromolekule su generalno otporne na razgradnju u gornjim dijelovima probavnog sustava, što upućuje na mogućnost „nošenja“ polifenola do donjih dijelova probavnog sustava. Ondje se polifenoli mogu osloboditi i potencijalno pozitivno djelovati, bilo u izvornom obliku ili kao kataboliti (Oomah, 2011; MacDonald i Wagner, 2012). Navedene interakcije mogu utjecati na bioraspoloživost polifenola, a posljedično i na biodostupnost. Jedno od prehambenih vlakana koje može stupiti u reakcije s polifenolima je β-glukan, topljivo prehrambeno vlakno prisutno u žitaricama, gljivama, kvascima, bakterijama, plijesnima i algama (Ahmad i Kaleem, 2018).

Interakcije između β-glukana i polifenola istražene su procesima adsorpcije (Jakobek i sur, 2017; Jakobek i sur. 2020b; Jakobek i sur, 2020c). Mogućnost vezanja polifenola na β-glukan ukazuje na mogućnost interakcija između ovih spojeva i u probavnom sustavu, te na utjecaj β-glukana na količinu oslobođenih polifenola dostupnih za apsorpciju. Utjecaj β-glukana na polifenole tijekom probave je moguće istražiti kroz statičku *in vitro* gastrointestinalnu simulaciju probavnog procesa. U osnovni, proces se sastoji od uzastopnih simulacija probave u ustima, želudcu i tankom crijevu, pri konstantnoj temperaturi te pH vrijednostima i koncentracijama enzima i elektrolita koje odgovaraju *in vivo* vrijednostima (Minekus i sur, 2014). Usporedbom

količine polifenola koja se oslobodi iz matrice hrane nakon simulacije probave s količinom polifenola prisutnoj u hrani prije probave je moguće doći do teorijskih informacija o bioraspoloživosti polifenola. Provođenjem jednakih eksperimenata uz dodatak β-glukana se može istražiti utjecaj β-glukana na bioraspoloživost polifenola. Utjecaj β-glukana na bioraspoloživost polifenola voća do sada nije detaljno istražen. Kao izvor polifenola osobito su zanimljivi plodovi tradicionalnih kultivara jabuke. Plodovi ovog voća postaju važni zbog veće količine polifenola u usporedbi s plodovima komercijalnih kultivara, a do sada nisu dovoljno istraženi.

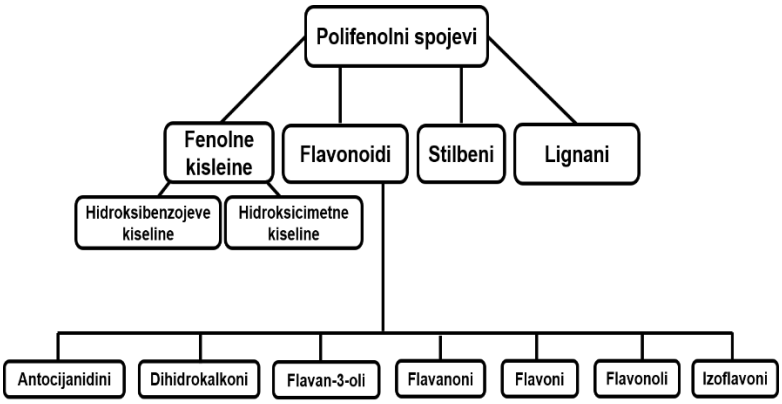
Oslobađanje polifenola iz matrice hrane, bez ili uz prisutnost β-glukana, ovisi i o vremenu. Određivanjem količina oslobođenih polifenola prilikom simulacije probave nakon različitih vremenskih intervala dobiju se eksperimentalni podatci koji se mogu opisati različitim kinetičkim modelima (nultog, prvog, drugog reda). Potencijalno slaganje eksperimentalnih podataka s modelima može ukazati na red reakcije, i time dati bolji uvid u sam mehanizam procesa, a do sada to nije istraženo.

U sklopu ovoga doktorata cilj je bio istražiti bioraspoloživost polifenola iz plodova tradicionalnih i komercijalnog kultivara jabuke i plodova crne bazge ispitivanjem *in vitro* simulacije probavnog procesa. Osim toga, cilj je bio istražiti utjecaj β-glukana na oslobođene i bioraspoložive polifenolne spojeve. Istražena je kinetika oslobađanja polifenola iz navedenog voća analiziranjem eksperimentalnih podataka nelinearnom regresijom jednadžbi reakcija nultog, prvog i drugog reda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Polifenolni spojevi

Polifenoli su skupina prirodnih spojeva koji sadrže fenolna strukturna obilježja, tj fenilnu skupinu (-C_6H_5) na koju je vezana hidroksilna skupina (-OH). Njihova uloga u biljkama nije u potpunosti razjašnjena, no smatra se da štite biljke od patogena i biljojeda te doprinose boji i okusu biljaka čime neposredno povećavaju izglede za rasprostranjivanjem sjemena. Identificiran je veliki broj polifenolnih spojeva koji se na osnovu razlika u strukturi mogu podijeliti na: fenolne kiseline, flavonoide, lignane i stilbene (Slika 1). Flavonoidi se nadalje mogu podijeliti na antocijanidine, dihidrokalkone, flavan-3-ole, flavanone, flavone, flavonole, izoflavone i proantocijanidine (Manach i sur., 2004.; Lattanzio i sur., 2008; Juadjur i Winterhalter, 2012; Belščak-Cvitanović i sur., 2018).



Slika 1 Podjela polifenolnih spojeva prema strukturalnim razlikama

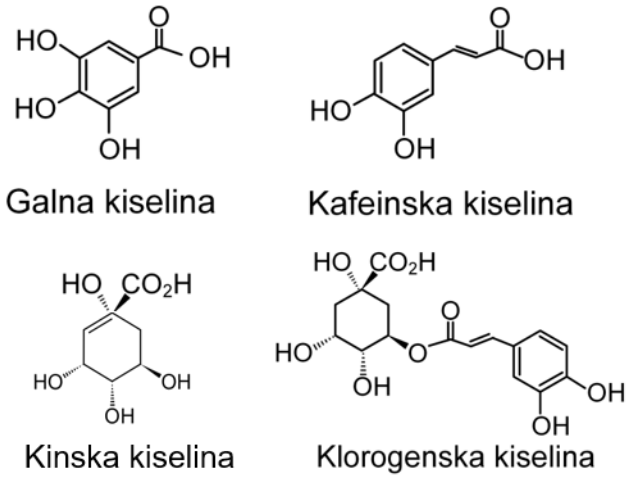
2.1.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline čine i do jedne trećine polifenolnih spojeva prisutnih u ljudskoj prehrani (Yang i sur., 2001). Na temelju razlika u kemijskoj strukturi se mogu podijeliti na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Općenitu strukturu hidroksibenzojevih kiselina čine sedam ugljikovih atoma (C_6-C_1), što ih čini najjednostavnijim fenolnim kiselinama nađenim u prirodi. Hidroksicimetne kiseline u svojoj strukturi posjeduju 9 ugljikovih atoma (C_6-C_3). U biljkama su uglavnom prisutne u esterificiranom ili glikoliziranom obliku, te se rijetko nalaze u svome slobodnom obliku (Slika 2) (Manach i sur., 2004).



Slika 2 Osnovne strukture hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina

Predstavnik hidroksibenzojevih kiselina je galna kiselina, dok je najbitnija hidroksicimetna kiselina klorogenska kiselina koja nastaje kao ester kafeinske i kinske kiseline (Slika 3). Osim klorogenske kiseline, u podgrupu hidroksicimetnih kiselina spadaju i ferulična, *p*-kumarinska, sinapična i kafeinska kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline su rijetko prisutne u jestivim biljkama. Nešto veće količine galne kiseline su prisutne u listovima čaja, luku i određenim crveno obojanim plodovima voća. Hidroksicimetne kiseline su prisutne u svim dijelovima voća, posebice u vanjskim dijelovima dozrelih plodova voća. Osim voća, velike količine klorogenske kiseline su prisutne i u kavi (Manach i sur., 2004; Belščak-Cvitanović, 2018).

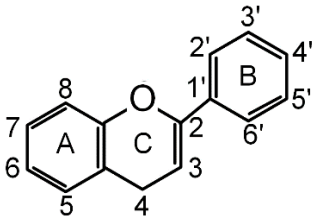


Slika 3 Kemijske strukture predstavnika hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina (Matić, 2021)

2.1.2. Flavonoidi

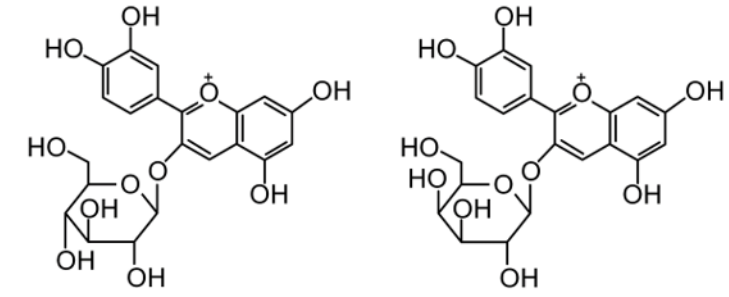
Flavonoidi predstavljaju najzastupljeniju skupinu polifenola identificiranih u biljnom svijetu. Struktura im se sastoji od dva aromatična prstena (A i B) međusobno povezana s tro-ugljičnim mostom (C_6-C_3-C_6) (Slika 4). Identificirano je preko 4000 različitih flavonoida koji se na osnovnu

zajedničkih karakteristika mogu dalje podijeliti u 13 podgrupa. Podgrupe flavonoida koje su zastupljene u ljudskoj prehrani su antocijanidini, dihidrokalkoni, flavan-3-oli, flavanoni, flavoni, flavonoli i izoflavoni. U prirodi se mogu pojaviti kao aglikoni, no većina flavonioda ima šećer vezan na svoju osnovnu strukturu, odnosno prisutni su u glikozidnom obliku (Crozier i sur., 2009; Belščak-Cvitanović, 2018).



Slika 4 Osnovna struktura flavonoida (Crozier i sur., 2009)

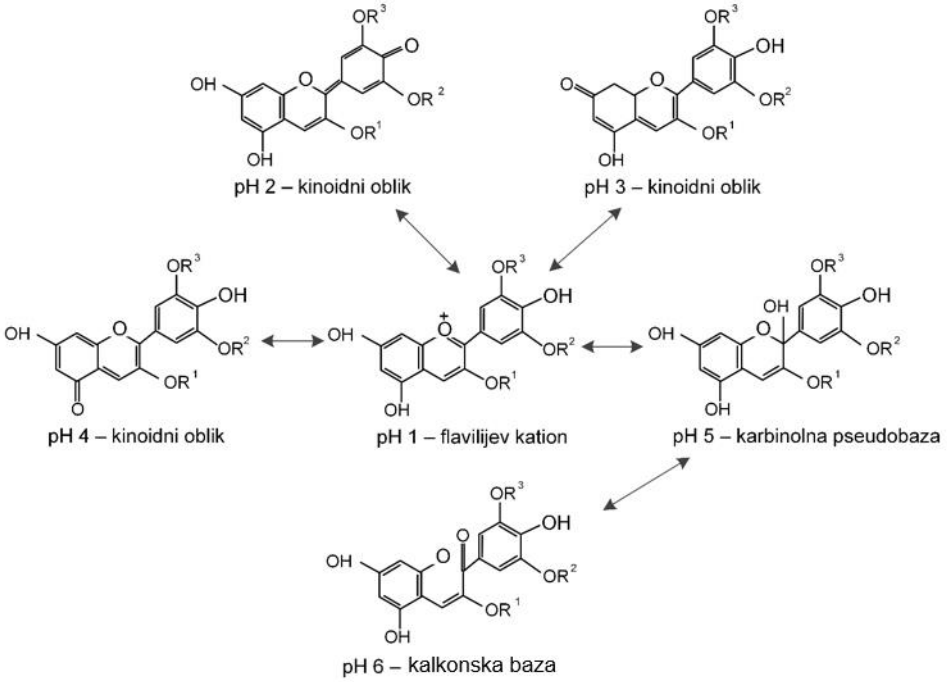
Antocijanidini su podgrupa flavonoida odgovorna za crvenu, ljubičastu i plavu boju plodova voća i cvjetova. Pronađeno je sedamnaest različitih antocijanidina, ali samo šest ih se uobičajeno pojavljuje u prirodi, a to su: cijanidin, delfinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin i malvidin. U biljkama se isključivo nalaze o obliku antocijanina, u kojima je molekula šećera vezana na antocijanidin (uglavnom na poziciji C-3) (Crozier i sur., 2009; Kamiloglu i sur., 2015). Preko 600 antocijanina je pronađeno u biljkama. Šećeri koji su vezani na antocijanidine su uglavnom glukoza, galaktoza, arabinoza, rutinoza, ramnoza i ksiloza. Najčešći antocijanin je cijanidin-3-glukozid (Slika 5). Na šećerni ostatak antocijanina često mogu biti acilirane fenolne kiseline poput *p*-kumarinske, kafeinske, ferulične i sinapične kiseline (Kamiloglu i sur., 2015)



Slika 5 Kemijske strukture glikozida cijanidina

Različiti čimbenici mogu utjecati na boju i stabilnost antocijanina, među kojima i pH vrijednost. Promjenom pH vrijednosti vodenih otopina koje sadrže antocijanine dolazi do

strukturnih promjena antocijanina, te oni mogu postojati u 4 oblika: kinoidni oblik, flavilijev kation, karbinolna pseudobaza i kalkonska pseudobaza (Kamiloglu i sur., 2015). Na slici 6 su prikazani različiti oblici antocijanina u ovisnosti o pH vrijednosti. Pri pH 1 prevladava falvilijv kation (crvena boja), pri pH 2-4 kinoidni oblik (plava boja), dok pri višim pH vrijednostima 5-6 prevladavaju bezbojni oblici karbinone pseudobaze i kalkonske baze (Da Costa i sur., 1998). Ovako ponašanje antocijanina je posebice bitno prilikom promjene pH vrijednosti u probavnom sustavu, budući da utječe na njihovu biodostupnost, a time i bioaktivnost (Kamiloglu i sur., 2015).



Slika 6 Oblici antocijanina prisutni na različitim pH vrijednostima (Da Costa i sur., 1998)

Flavan-3-oli su najkompleksnija podgrupa polifenola čija struktura varira od jednostavnih monomera (+)-katehina i (-)-epikatehina, do oligomera i polimera- proantocijandina (Crozier i sur., 2006). Od ostalih flavonoida ih razlikuje to što ne stvaraju glikozide, nemaju kisikovu skupinu na poziciji C-4 i ne posjeduju dvostruku vezu između pozicija C-2 i C-3. (Manch i sur., 2004). Prehrambeni izvori flavan-3-ola uključuju voće poput jabuke, breskve i jagodastog voća te pića poput vina i čajeva (Belščak-Cvitanović, 2018).

Flavonoli su najrasprostranjenija podgrupa flavonoida. U prirodi se uglavnom pojavljuju u obliku glikozida, gdje je šećer uobičajeno vezan na poziciju C-3, ali supstitucija je moguća i na drugim pozicijama (Crozier i sur., 2006). Neki od predstavnika flavonola su mircetin, kvercetin, izoramnetin i kemferol. Prisutni su u voću, povrću, žitaricama, začinima i raznim napitcima (Belščak-Cvitanović i sur., 2018).

Dihidrokalkoni su podgrupa flavonoida specifična za jabuke. Razlikuju se od ostalih flavonoida po otvorenoj kemijskoj strukturi i manjem broju ugljikovih atoma u osnovnoj strukturi. U jabukama su česti glikozidi floretina poput floretin-2'-glukozida i floretin-2'-ksiloglukozida (Jakobek i sur., 2017).

2.2. Voće kao izvor polifenola

Jedan od glavnih izvora polifenola u ljudskoj prehrani je voće koje doprinosi gotovo petini ukupnog unosa polifenola (Pérez-Jiménez i sur., 2011). Jabuka, uslijed dostupnosti kroz cijelu godinu i relativno velikog sadržaja polifenola, predstavlja dobar svakodnevni izvor polifenola (Fernández-Jalao i sur., 2020). Jagodasto voće poput crne bazge je također dobar izvor polifenola (Pérez-Jiménez i sur., 2010), iako nije zastupljeno u ljudskoj prehrani kao jabuka. Ovo voće je veoma bogato antocijaninima, koji su u jabuci prisutni u malim količinama (Mikulić-Petkovsek i sur., 2015). Konzumacija različitog voća doprinosi ukupnom unosu polifenola, kao i unosu različitih polifenolnih skupina.

2.2.1. Jabuka

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) je višegodišnja biljka koja pripada porodici *Rosaceae*. Razvijen je veliki broj različitih kultivara jabuke, no danas ih se samo nekolicina uzgaja komercijalno. Stari tradicionalni kultivari jabuke u posljednje vrijeme dobivaju sve veću pažnju (Preti i sur., 2020; Jakobek i sur., 2021). Plodovi ovih kultivara, osim boljih senzorskih i nutritivnih svojstava, su pokazali potencijal za bolji utjecaj na ljudsko zdravlje nego plodovi komercijalnih kultivara jabuka, što je povezano s većim sadržajem polifenola (Donno i sur., 2012; Vegro i sur., 2016; Kschoncek i sur., 2018). Neki od tradicionalnih starih kultivara jabuke s područja Republike Hrvatske se opisni u Banci biljnih genetskih resursa Hrvatske (https://cpgrd.hapih.hr/). Uobičajene polifenolne skupine u mesu plodova jabuke su flavan-3-oli, fenolne kiseline i dihidrokalkoni, dok je kožica plodova jabuke bogata flavonolima, posebice derivatima kvercetina. Plodovi jabuke s crvenom kožicom sadrže i antocijanine (Jakobek i sur., 2020a).

Polifenoli plodova jabuke su pokazali razne potencijalno pozitivne učinke na ljudsko zdravlje kao što su pozitivan utjecaj na specifične karcinome (Kao i sur., 2017; Wu i sur., 2018), anti-alergijske aktivnosti (Kojima i sur., 2000), antiviralna svojstva (Suarez i sur., 2010) i potencijalna terapeutska svojstva za pretilost (Tamura i sur., 2020). Predloženi pozitivni učinci polifenola plodova jabuke još nisu u potpunosti objašnjeni te je potrebno daljnje istraživanje.

2.2.2. Crna bazga

Crna bazga (*Sambucus nigra* L.) je listopadni grm ili u rijetkim slučajevima manje stablo (do 10 m visine) (Atkinson i Atkinson, 2002). Koristi se u medicinske svrhe, kao i zbog svojih nutritivnih svojstava. Cvjetovi i plodovi crne bazge se koriste za pripremu raznih napitaka, džemova, marmelada i likera (Kiprovski i sur., 2021). Posebna pažnja je usmjerena prema plodu crne bazge budući da su, zajedno s plodom aronije, voće s najvećim sadržajem polifenola (Pérez-Jiménez i sur., 2010). Većinu polifenola u plodovima crne bazge čine antocijanini, ali su prisutne i druge polifenole skupine poput flavan-3-ola, fenolnih kiselina i flavonola (Mikulic-Petkovski i sur., 2015).

Iako sve nije u potpunosti jasno, neka istraživanja su pokazala da polifenoli u plodovima crne bazge mogu imati potencijalno pozitivan utjecaj na neurodegenerativne bolesti (Mendes i sur., 2021) i kardiovaskularne bolesti (Ciocoiu i sur., 2009), kao i pokazati antiupalna (Ho i sur., 2017a) i antidijabetička svojstva (Ho i sur., 2017b).

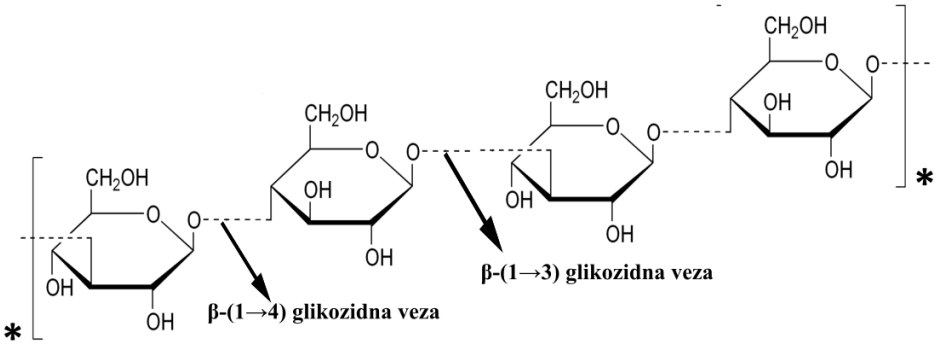
2.3. Prehrambena vlakna

Prehrambena vlakna su skupina ugljikohidratnih polimera otpornih na probavu i apsorpciju u tankom crijevu ljudi, dok se u debelom crijevu mogu djelomično ili potpuno fermentirati djelovanjem endogene mikroflore (Jakobek i Matić, 2019). Ovisno o topljivosti, prehrambena vlakna se mogu podijeliti na topljiva (pektini, β-glukan, oligosaharidi, inulini itd.) i netopljiva (celuloza, hemiceluloza, hitin, škrob) (Quirós-Sauceda i sur., 2014). Potencijalni pozitivan učinak prehrambenih vlakana na ljudsko zdravlje se sve više proučava, a prvenstveno se ogleda u njihovoj sposobnosti za modulacijom crijevne mikroflore i posljedičnog poboljšanja probave (Shen i sur., 2012; Cuervo i sur., 2014).

2.3.1 β-glukan

β-glukani su topljiva prehrambena vlakna čiju strukturu čine jedinice glukoze povezane glikozidnim vezama. Ako su molekule povezane β-(1,3) i β-(1,4) glikozidnim vezama molekula β-glukana će se nalaziti u nerazgranatom obliku, koji je zastupljen u žitaricama (Slika 7). Međutim, vezanje molekula glukoze β-(1,3) i β-(1,6) glikozidnim vezama rezultira razgranatim oblikom β-glukana, što je slučaj u gljivama (Ahmad i Kaleem, 2018). Najčešći izvori β-glukana su žitarice kao što su ječam, zob, riža i pšenica u kojima sadržaj β-glukana može biti i do 12 %. Pored

žitarica, u skorije vrijeme su otkriveni i novi izvori β-glukana poput gljiva, algi, kvasaca, plijesni i bakterija (Ahmad i Kaleem, 2018).



Slika 7 β-glukan izoliran iz žitarica sa karakterističnim β-(1,3) i β-(1,4) glikozidnim vezama

Neovisno o izvoru, β-glukani miješanih veza (tj. β-(1,3) i β(1,4) / β-(1,6)) su pokazali biološke aktivnosti zbog čega se intenzivno proučavaju i inkorporiraju u nutraceutike i dodatke prehrani. β-glukan porijeklom iz zobi se pokazao djelotvornim u snižavanju razine lipoproteina niske gustoće (LDL) (Ferguson i sur., 2020), kao i u poboljšavanju glikemičke kontrole pacijenata koji boluju od dijabetesa melitusa tipa 2 (Pino i sur., 2021). β-glukan izoliran iz ječma je pokazao imunomodulirajućne djelovanje na mikrofloru ljudskog probavnog sustava (Wang i sur., 2016). β-glukani iz drugih izvora poput kvasaca i gljiva su pokazali potencijalna antitumorska svojstva (Zou i sur, 2019; Bozbulut i sur., 2020). Uzimajući u obzir navedeno, Američka Uprava za hranu i lijekove (FDA) je preporučila konzumaciju β-glukana u količini od 3 g/danu, dok je Europska agencija za sigurnost hrane savjetovala nešto veću količinu od 4 g/danu (Ahmad i Kaleem, 2018)

2.4. Bioaktivnosti polifenolnih spojeva

Koncept bioaktivnosti predstavlja sve događaje u kojima bioaktivni spoj sudjeluje od trenutka ulaska u organizam pa sve do krajnjeg fiziološkog odgovora koji taj spoj uzrokuje (Fernández-García et al., 2009). U ljudskom tijelu polifenoli pokazuju niz bioaktivnosti koje su uglavnom posljedica redukcijskih aktivnosti polifenola, kao i njihove sposobnosti vezivanja. Upravo zbog toga, polifenoli su jedna od aktualnijih tema istraživanja u polju ljudske prehrane (Belščak-Cvitanović i sur., 2018.).

Jedna od mogućih bioaktivnosti zbog kojih se polifenoli istražuju je mogućnost inhibicije enzima odgovornih za razgradnju škroba: α-amilaze i α-glukozidaze. Hidroliza škroba je jedan od

glavnih razloga porasta razine glukoze u krvi nakon obroka. Učestale povišene razine glukoze u krvi mogu povećati rizik od pojave dijabetesa tipa 2. α-amilaza, koju luče žlijezde slinovnice i gušterača, hidrolizira škrob do maltoze i drugih oligosaharida. α-glukozidaza, locirana na površinskoj membrani tankog crijeva, razgrađuje oligosaharide nastale djelovanjem α-amilaze do glukoze (Nyambe-Silavwe I sur., 2015). Razvijeni su sintetski inhibitori poput akarboze ili miglitola koji smanjuju razinu glukoze u krvi nakon obroka putem kompetitivne inhibicije α-amilaze i α-glukozidaze (Krentz i sur., 2018). Međutim, preko 50 % ispitanika je prijavilo probavne smetnje nakon korištenja ovih lijekova (Shmeltz i Metzger, 2007) pa se razvila potreba za prirodnim inhibitorima ovih enzima. Polifenoli mogu inhibirati α-amilazu i α-glukozidazu, što je prijavljeno u mnogim istraživačkim i preglednim radovima (Zhang i sur., 2010; Ali Asgar, 2012; Martinez-Gonazalez i sur., 2017), iako sam mehanizam nije još u potpunosti razjašnjen.

2.5. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva

Oslobađanje polifenola iz matrice hrane prilikom probavnog procesa je preduvjet za njihovo potencijalno pozitivno djelovanje u ljudskom organizmu. Žvakanje i snižen pH želudca uzrokuju dezintegraciju i omekšavanje matrice hrane te posljedično oslobađanje polifenola. U želudcu dolazi i do depolimerizacije kompleksnijih polifenolnih spojeva u jednostavnije spojeve koji se lakše apsorbiraju. Apsorpcija jednostavnih polifenolnih spojeva se odvija u tankom crijevu pasivnom difuzijom ili aktivnim prijenosom (Lorenzo i sur., 2019). Na količinu polifenola dostupnih za apsorpciju u tankom crijevu (bioraspoloživost) mogu utjecati čimbenici poput svojstava matrice hrane, različiti načini procesiranja hrane, kao i fiziološki čimbenici (npr. pH vrijednost, koncentracija enzima, djelovanje mikroorganizama i sl.) (Lorenzo i sur., 2019; Jakobek i sur., 2021). Iako je količina bioraspoloživih polifenola znatno manja od količine polifenola prije probave, istraživanja su pokazala da probavni proces ne utječe na bioaktivnost polifenola (Lingua i sur.,2019). Osim količine polifenola koja se oslobodi u tankom crijevu, bitna je i količina polifenola koja dospije u debelo crijevo. Tu polifenoli mogu stupiti u interakcije s mikrobiotom debelog crijeva i pokazati prebiotički ili antimikrobni učinak. S druge strane, korisne bakterije u debelom crijevu mogu utjecati na bioraspoloživost polifenola transformacijom određenih polifenolnih spojeve u katabolite koji se lakše apsorbiraju (Rodríguez-Daza i sur., 2021). Na bioraspoloživost polifenola mogu utjecati i njihove interakcije s nutrijetnima koji ih okružuju u probavnom sustavu. Naime, kompleksne molekule mogu „zarobiti“ polifenole u svojoj strukturi te ih zaštiti od degradacije prilikom probavnog procesa. Na taj način veća količina polifenola može u nepromijenjenom obliku dospjeti do debelog crijeva i stupiti u prije spomenute pozitivne interakcije s crijevnom mikroflorom (Jakobek, 2015). Jedni od nutrijenata koji se intenzivno istražuju radi mogućnosti interakcija s

polifenolima su prehrambena vlakna (Saura-Calixto i sur., 2007; Velderrain-Rodríguez i sur., 2016; Zheng i sur., 2020).

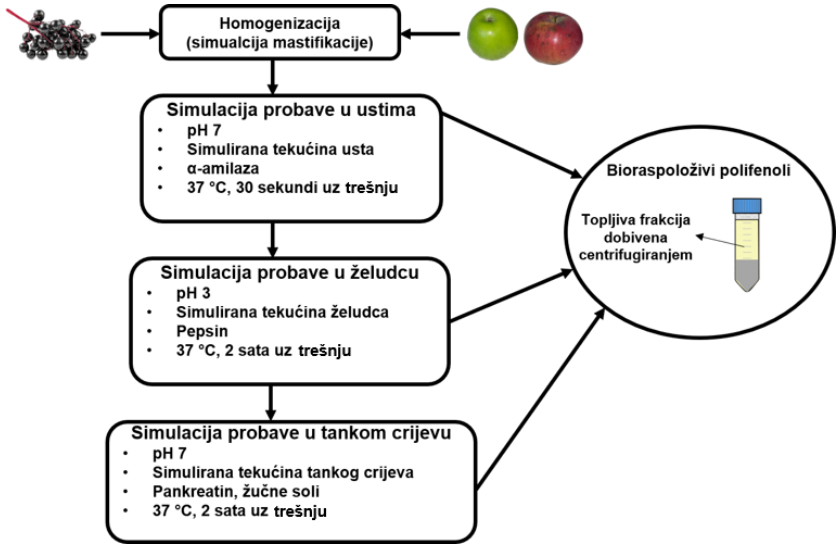
2.5.1. Interakcije polifenola s prehrambenim vlaknima

Mogućnost vezanja polifenola na prehrambena vlakna, kao i općenita otpornost prehrambenih vlakana na razgradnju u gornjem dijelu probavnog sustava, može utjecati na smanjenje bioraspoloživost polifenola u tankom crijevu, te posljedično dospijevanje veće količine polifenola u debelo crijevo (Quirós-Sauceda i sur., 2014; Jakobek i sur., 2015). Interakcije polifenola i prehambenih vlakana se uglavnom odvijaju putem nekovalentnih veza. Tri su glavna načina nekovalentnog vezanja polifenola i prehrambenih vlakana: vodikove veze, van der Waalsove sile i hidrofobne interakcije (Jakobek i Matić, 2018). Vodikove veze nastaju između parcijalno pozitivnog vodika jedne molekule i parcijalnog negativnog atoma druge molekule (uglavnom N, S ili O) (MacLeod i Rosei, 2011). Polifenoli i prehrambena vlakna posjeduju mnogo hidroksilnih skupina (-OH) što im omogućuje vezanje putem vodikovih veza (Quirós-Sauceda i sur., 2014). Nastajanjem vodikovih veza smanjuje se udaljenost između polifenola i prehrambenih vlakana, što stvara povoljne uvjete za interakciju molekula putem van der Waalsovih sila. van der Waalsove sile su slabe sile kratkog dometa koje nastaju uslijed dipol-dipol interakcija molekula i atoma (Kuech, 2011), a polifenoli i prehrambena vlakna posjeduju funkcionalne skupine koje mogu stvoriti polarizirane molekule (Wu i sur., 2011). Pojedini polifenoli i prehrambena vlakna su netopljivi u vodi. Kako bi smanjili dodirnu površinu s vodom ove molekule se mogu grupirati i tako smanjiti površinsku energiju. Navedene interakcije se nazivaju hidrofobne interakcije (Jakobek i Matić, 2018).

Polifenoli se mogu otpustiti iz raznih matriksa hrane, između ostalih i prehrambenih vlakana, te postati raspoloživi za apsorpciju. Vezanjem polifenola na prehrambena vlakna se potencijalno smanjuje njihova bioraspoloživost u tankom crijevu (Zheng i sur., 2011; Solari-Godiñ i sur., 2017), no to znači da se količina polifenola koja dospijeva u debelo crijevo potencijalno povećava (Jakobek i Matić 2018). Istraživanja su pokazala da polifenoli uistinu dospijevaju do debelog crijeva gdje ih endogena mikroflora oslobađa i biotransformira u razne katabolite (Parkar i sur., 2013; Alquarashi i sur., 2017). Nošenje polifenola u donje dijelove probavnog trakta bi mogla biti jedna od ključnih uloga prehrambenih vlakana (Saura-Calixto, 2011), no daljnja istraživanja su nužna.

2.5.2. *In vitro* gastrointestinalna simulacija probave

Bioraspoloživost polifenola se uglavnom određuje pomoću *in vitro* statičke metode koja simulira gastrointestinalnu probavu (Bouayed i sur., 2012; Sousa i sur., 2021; Jakobek i sur., 2021). Ova metoda je prvenstveno razvijena za bolji uvid u probavu i apsorpciju prehrambenog željeza (Miller i sur., 1981), no kasnije je prilagođena i za proučavanje bioraspoloživosti polifenola (Gil-Izquierdo i sur., 2001). Postignut je međunarodni konsenzus u kojem je provedena standardizacija ove metode za bilo koju namirnicu (Minekus i sur., 2014). Metoda se u osnovi sastoji od simualcija probave u ustima, želudcu i tankom crijevu. Neki modeli simuliraju i fermentaciju u deblom crijevu. *In vivo* uvjeti probave se simuliraju uzimajući u obzir omjer „obroka" i probavnih tekućina, prisutnost i koncentraciju enzima, pH vrijednost, vrijeme trajanja probave te koncentracije elektrolita i soli, za svaku fazu probave (Minekus i sur., 2014). Dva glavna svojstva polifenola za određivanje njihove bioraspoloživosti nakon simualcije probave su topljivost i mogućnost dijalize. Bioraspoloživost izražena preko topljivosti se temelji na određivanju količine otopljenih polifenola prisutnih u supernatantu nakon centrifugiranja ili filtracije. Pristup temeljen na mogućnosti dijalize podrazumijeva upotrebu vrećica za dijalizu nakon probave u želudcu, koje simuliraju barijeru tankog crijeva. Frakcija polifenola koja prođe kroz polupropusnu membranu vrećice predstavlja bioraspoložive polifenole (Alegria i sur., 2015). Grafički prikaz uvjeta simulacije probave voća je prikazan na slici 8.



Slika 8 Tijek i parametri procesa simulacije probave voća i određivanja bioraspoloživosti polifenola

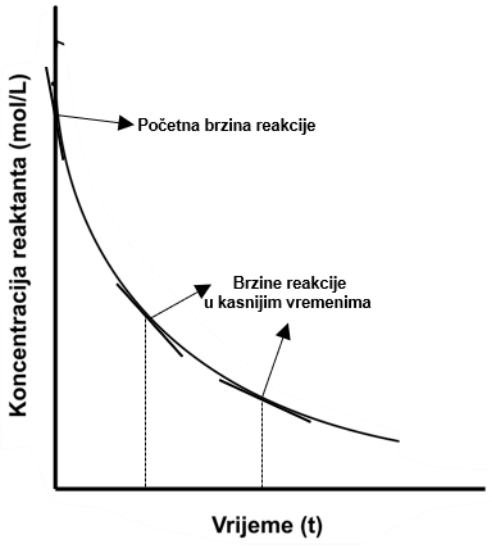
Bioraspoloživsot polifenola jabuke i crne bazge je ranije istraživana (Bouayed i sur., 2012; Tenore i sur., 2013; Pinto i sur., 2017; Fernández-Jalao i sur., 2020;), kao i bioraspoloživost polifenola vezanih za prehrambena vlakna manga (Blancas-Benitez i sur., 2015), *Hibiscus sabdariffa L*. (Mercado-Mercado i sur., 2015) i rižinih mekinja (Zhao i sur., 2015). Međutim, interakcije polifenola i β-glukan tijekom simuliranog probavnog procesa, koliko je poznato, još nisu istražene.

2.6. Kemijska kinetika

Grana fizikalne kemije koja se bavi brzinama kemijskih reakcija naziva se kemijska kinetika (Đorđević i Dražić, 1987). Njen zadatak je proučavanje brzine nestanka reaktanata i nastanka produkata određenih kemijskih reakcija, praćenje utjecaja raznih čimbenika na brzinu reakcije (temperatura, tlak, prisutnost katalizatora ili inhibitora), kao i identifikacija koraka kojima se reakcija odvija. Važnost kemijske kinetike se ogleda u mogućnosti određivanja brzine reakcije, predviđanju vremena potrebnog da reakcija dođe u stanje ravnoteže, kao i boljem razumijevanju samog mehanizma reakcije. Osim toga, praćenjem utjecaja raznih čimbenika na brzinu kemijske reakcije je moguće optimizirati reakciju mijenjanjem uvjeta reakcije. Parametri kemijske reakcije koje je važno odrediti su brzina reakcije, jednadžba za brzinu te reakcije, konstanta brzine reakcije, red reakcije i vrijeme polureakcije. U osnovi, ove parametre je moguće dobiti iz eksperimentalnih podataka, tj. koncentracije reaktanta i produkata u određenim vremenskim intervalima nakon početka reakcije (Atkins, 2001).

2.6.1. Brzina reakcije, jednadžba za brzinu reakcije, konstanta brzine reakcije i red reakcije

Brzina reakcije predstavlja brzinu promjene koncentracije reaktanta ili produkata u jedinici vremena (Henderson i Rettener, 2003). Računa se iz nagiba krivulje u jednadžbi ovisnosti koncentracije reaktanta ili produkta o vremenu, gdje strmija krivulja upućuje na veću brzinu reakcije. Budući da se brzina reakcije mijenja s vremenom, potrebno je uzeti u obzir i trenutnu brzinu reakcije koja predstavlja brzinu reakcije u određenom trenutku (Slika 9) (Atkins, 2001).



Slika 9 Dijagram ovisnosti koncentracije reaktanta i brzine reakcije o vremenu reakcije

Brzina reakcije je često proporcionalna molarnim koncentracijama reaktanta, kao što je prikazano u jednadžbi (1):

$$v = k * [A] * [B] \quad (1)$$

gdje je *v* brzina reakcije, *k* konstanta brzine reakcije, dok su *[A]* i *[B]* koncentracije reaktanata A i B. Jednadžba (1) naziva se jednadžba za brzinu reakcije. Određuje se eksperimentalno i izražava brzinu reakcije s obzirom na molarne koncentracije tvari u ukupnoj reakciji. Konstanta brzine reakcije *k* je karakteristična za reakciju koja se proučava, a ovisna je o temperaturi. Određivanjem ova dva parametra je moguće predvidjeti brzinu reakcije za bilo koji sastav reakcijske smjese i koncentraciju bilo kojeg sudionika u reakciji u određenom vremenu. Osim toga, stvara se jasniji uvid u mehanizam reakcije, budući da se mehanizam neke reakcije mora slagati s teorijom koja stoji iza objašnjena za brzinu reakcije (Brdička, 1969; Atkins, 2001).

Kemijske reakcije je moguće klasificirati prema njihovoj kinetici, gdje reakcije koje pripadaju jednakoj skupini pokazuju slično kinetičko ponašanje. Klasifikacija reakcija se temelji na redu reakcije, odnosno zbroju eksponenata na koje su podignute koncentracije u jednadžbi za brzinu reakcije (Atkins, 2001). Uobičajeno, reakcije su nultog, prvog ili drugog reda, iako red reakcije ne mora biti cijeli broj. Brzina reakcije u reakcijama nultog reda je neovisna o koncentraciji reaktanata. U reakcijama prvog reda brzina reakcije je ovisna o koncentraciji reaktanta, tj. brzina promjene koncentracije tvari je u svakom trenutku proporcionalna koncentraciji tvari. Brzina reakcija drugog reda je proporcionalna koncentraciji dva reaktanta, ili kvadratu koncentracije jednog reaktanta (tzv. bimolekularne reakcije) (Herak i sur., 1992; Atkins, 2001).

2.6.2. Integrirane jednadžbe za brzinu reakcije

Integrirane jednadžbe za brzinu reakcije su izrazi koji daju koncentraciju tvari kao funkciju vremena i uobičajeno se koriste. Preko ovih jednadžbi je moguće predvidjeti koncentraciju tvari u bilo kojem vremenu nakon početka reakcije, odrediti konstantu reakcije i red reakcije (Atkins, 2001).

Integrirana jednadžba za brzinu reakcije nultog reda dana je izrazom:

$$c_A = -k_0 * t + c_{A_O} \tag{2}$$

gdje c_A predstavlja koncentraciju reaktanta A u vremenu *t*, k_0 je konstanta brzine reakcije nultog reda, *t* je vrijeme, a c_{A_O} koncentracija reaktanta A u vremenu *t=0*. Jednadžba (2) je u linearnom obliku (y = ax +b) pa je dijagram odnosa koncentracije reaktanta A (c_A) i vremena ($_t$) pravac s nagibom *-k* (Slika 10).

Diferencijalni oblik jednadžbe za brzinu reakcije prvog reda glasi:

$$-\frac{dc_A}{c_A} = k_1 * dt \tag{3}$$

Integriranje jednadžbe (3) u granicama od *t = 0*, kada je koncentracija reaktanta A jednaka c_{A_O}, do željenog vremena t, kada je koncentracija reaktanta A jednaka c_A dobije se jednadžba:

$$\int_{c_{A_O}}^{c_A} \frac{dc_A}{c_A} = -k_1 * \int_0^t dt \tag{4}$$

Rješavanjem integrala se dobije integrirana jednadžba za brzinu reakcije prvog reda:

$$ln\frac{c_{A_O}}{c_A} = k_1 * t \tag{5}$$

Linearni i nelinearni oblici jednadžbe (5) su dani izrazima (6) i (7), navedenim redoslijedom:

$$\ln c_A = -k_1 * t + \ln c_{A_O} \tag{6}$$

$$c_A = c_{A_O} * e^{-k_1 t} \tag{7}$$

gdje c_A predstavlja koncentraciju reaktanta A u vremenu *t*, k_1 je konstanta brzine reakcije prvog reda, *t* je vrijeme, a c_{A_O} koncentracija reaktanta A u vremenu *t* = 0. Iz jednadžbe (6) je vidljivo da je dijagram ovisnosti lnc_A *vs t* pravac, gdje je $-k_1$ nagib pravca (Slika 10).

Diferencijalni oblik jednadžbe za brzinu reakcije drugog reda glasi:

$$\frac{dc_A}{{c_A}^2} = -k_2 * dt \tag{8}$$

Slično kao i kod reakcija prvog reda, integriranjem jednadžbe (8) i rješavanjem integrala se dobije integrirana jednadžba za brzinu reakcije drugog reda:

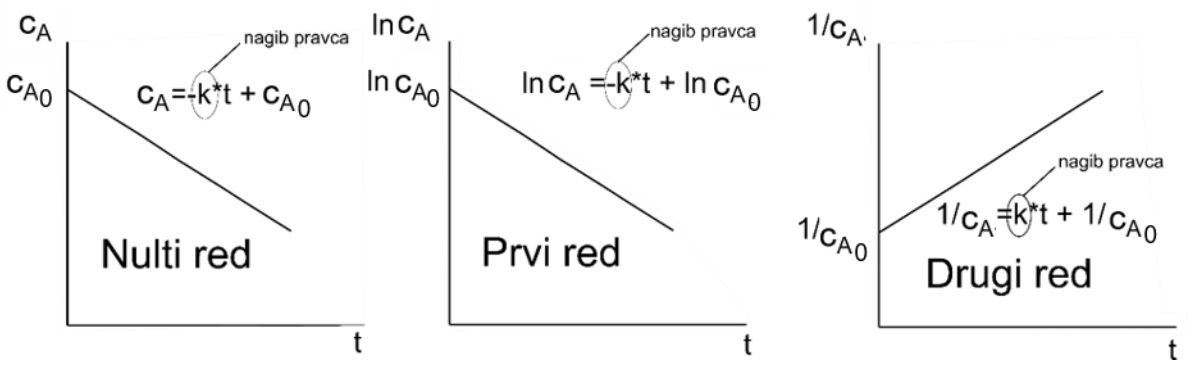
$$\frac{1}{c_A} - \frac{1}{c_{A_O}} = k_2 * t \tag{9}$$

čiji linearni (10) i nelinearni (11) oblik glasi:

$$\frac{1}{c_A} = k_2 * t + \frac{1}{c_{A_O}} \tag{10}$$

$$c_A = \frac{c_{A_O}}{1 + k_2 * t * c_{A_O}} \tag{11}$$

gdje je c_A koncentracija reaktanta A u vremenu t, k_2 je konstanta brzine reakcije drugog reda, t je vrijeme, a c_{A_O} koncentracija reaktanta A u vremenu $t = 0$. Odnos $1/c_A$ *vs* t je linearan (Jednadžba 10), s nagibom pravca jednakim k_2 (Slika 10).



Slika 10 Određivanje konstante brzine reakcija nultog, prvog i drugog reda pomoću dijagrama ovisnosti koncentracije reaktanta A i vremena (t)

2.6.3. Vrijeme polureakcije

Važan parametar koji se može odrediti kemijskom kinetikom je vrijeme polureakcije. Ono predstavlja vrijeme potrebno da koncentracija reaktanta ili produkta reakcije dosegne polovicu svoje početne vrijednosti. Vrijeme polureakcije jednadžbi za brzinu reakcije nultog, prvog i drugog reda je dano jednadžbama (12), (13) i (14), navedenim redoslijedom:

$$t_{1/2} = \frac{c_{A_O}}{2k_0} \tag{12}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1} \tag{13}$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_2 * c_{A_O}} \tag{14}$$

gdje je $t_{1/2}$ vrijeme polureakcije, dok su ostali parametri jednaki kao u prethodnim jednadžbama Vrijeme polureakcije reakcije prvog reda je neovisno o početnoj koncentraciji reaktanta, dok vrijeme polureakcije reakcije drugog reda ovisi o početnoj koncentraciji i produžava se kako koncentracija opada (Atkins, 2001).

2.6.4. Primjena kemijske kinetike za proces simulirane probave

Simulirani probavni proces, odnosno nastajanje produkata prilikom simulacije probave, može se proučavati primjenom kemijske kinetike. Jedna od metoda je određivanje krivulja probavljivosti (eng. digestibility curves) tijekom relativno dugih vremenskih perioda i opisivanje dobivenih krivulja kinetičkim jednadžbama (Butterwort i sur., 2012). No jednadžbe za kinetiku nultog, prvog i drugog reda opisane ranije (jednadžba 2, 7 ii 11) su jednadžbe koje opisuju nestajanje reaktanata tijekom reakcije. U probavnom procesu uobičajeno se prati nastajanje produkata, kao primjerice konverzija škroba u produkte tijekom probave (Butterwort i sur., 2012). Zbog toga je jednadžbe potrebno prilagoditi podatcima koji se dobiju u probavnom procesu. Zamjenom c_{A_O} i c_A u nelinearnom obliku jednadžbe za brzinu reakcije prvog reda (Jednadžba 7) s c_∞ i (c_∞-c_A) (navedenim redoslijedom) (Butterwort i sur., 2012), se dobiju izrazi:

$$c_A = c_\infty * \left(1 - e^{-k_{1'} * t}\right) \tag{16}$$

c_A predstavlja koncentraciju produkta u vremenu t, c_∞ je odgovarajuća koncentracija na kraju reakcije, dok je $k_{1'}$ konstanta brzine reakcije prvog reda.

Slično tome, uvrštavanjem c_∞ i (c_∞-c_A) umjesto c_{A0} i c_A u jednadžbe nultog reda (2) i drugog reda (10) se dobiju jednadžbe:

$$c_A = k_{0'} * t \tag{15}$$

$$c_A = c_\infty * \left(1 - \frac{1}{1 + c_\infty * k_{2'} * t}\right) \tag{17}$$

c_A predstavlja koncentraciju produkta u vremenu t, c_∞ je odgovarajuća koncentracija na kraju reakcije, dok su $k_{0'}$ i $k_{2'}$ konstante brzine reakcija nultog i drugog reda, navedenim redoslijedom. Konstanta brzine ovih reakcija je funkcija fiksne koncentracije enzima prilikom simulacije probave, pa se stoga nazivaju reakcije pseudo reda (Butterworth, 2012). Određivanjem kinetičkih parametara je moguće dobiti bolji uvid u sam mehanizam procesa, kao i u utjecaj β-glukana na bioraspoloživost polifenola.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

Zadatak ovog rada bio je:

-karakterizirati polifenolne spojeve u plodovima tradicionalnih i komercijalnog kultivara jabuke te u plodovima crne bazge,

-radi uvida u bioaktivnosti polifenola voća, provesti eksperimente inhibicije enzimske aktivnosti α-amilaze i α-glukozidaze polifenolima jabuke i bazge, u različitim vremenskim periodima te podatke analizirati nelinearnom regresijom jednadžbi kinetičkih modela,

-provesti *in vitro* simulirane probavne procese plodova tradicionalnih i komercijalnog kultivara jabuke i plodova crne bazge u ustima, želudcu i tankom crijevu, bez prisutnog β-glukana ili uz dodatak β-glukana,

-istražiti bioraspoloživost pojedinačnih polifenola te polifenolnih skupina,

-istražiti utjecaj β-glukana na bioraspoloživost,

-provesti simulirane probavne procese plodova jabuke i plodova crne bazge u ustima, želudcu i tankom crijevu bez prisutnog β-glukana ili uz dodatak β-glukana u različitim vremenskim periodima te analizirati bioraspoloživost nelinearnom regresijom jednadžbi kinetičkih modela.

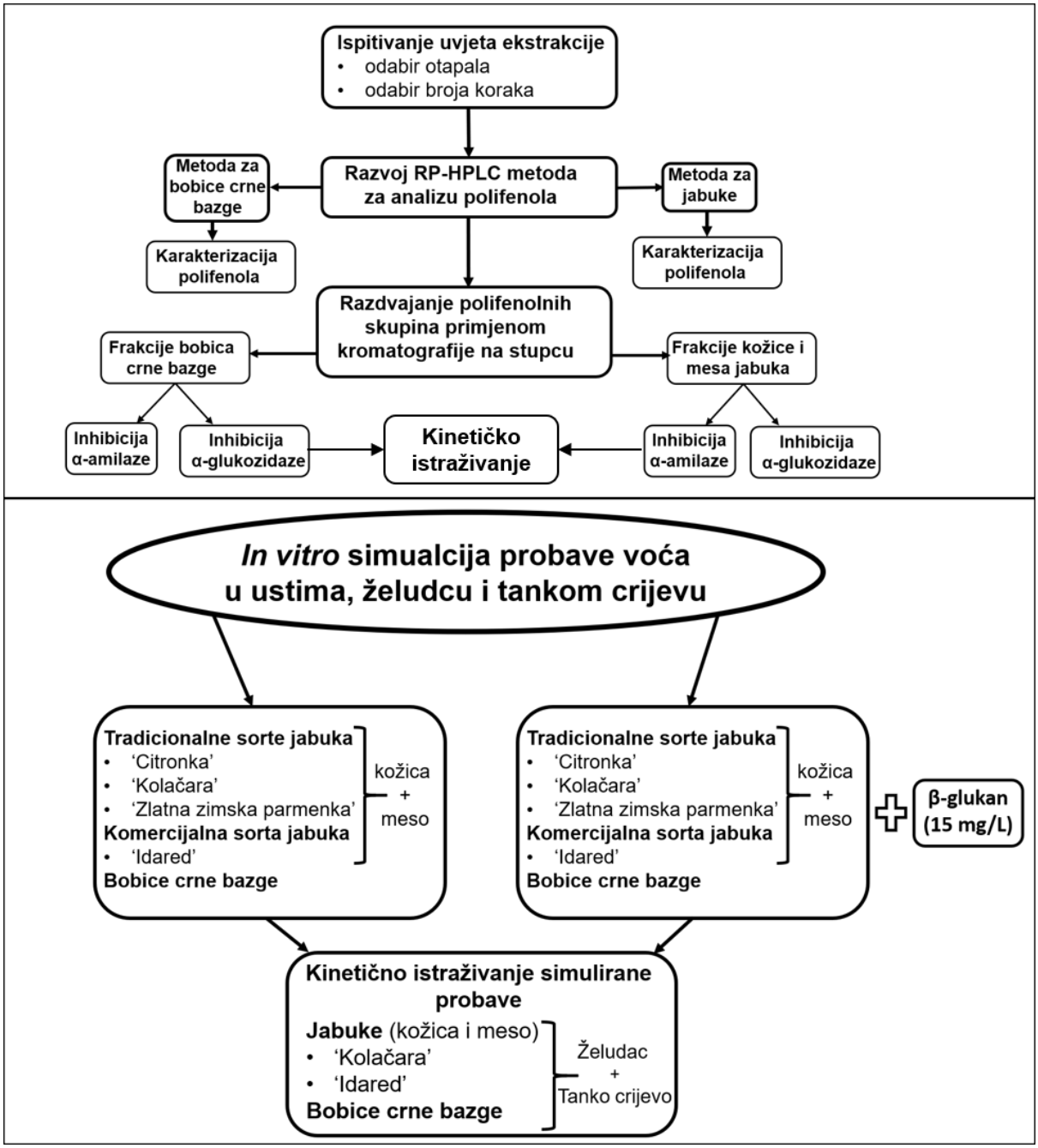
3.2. Materijali i metode

3.2.1. Plan istraživanja

Istražena su dva ekstrakcijska otapala za ekstrakciju polifenola (80 % metanol i 0,1 % HCl u metanolu). Vrednovane su dvije RP-HPLC metode, jedna za karakterizaciju polifenola iz jabuke, a druga za karakterizaciju polifenola iz crne bazge. Odabranim otapalom ekstrahirani su polifenoli mesa i kožice jabuke i boba crne bazge, te su karakterizirani polifenolni spojevi (Slika 11).

Radi istraživanja inhibicije enzimske aktivnosti, polifenoli kožice i mesa plodova jabuke te polifenoli plodova crne bazge su ekstrahirani odabranim otapalom, razdvojeni kromatografijom na stupcu te je istražena inhibicija enzima α-amilaze i α-glukozidaze polifenolnim frakcijama. Inhibicija enzimske aktivnosti praćena je u različitim vremenskim periodima, a podaci su analizirani nelinearnom regresijom jednadžbi nultog, prvog i drugog reda.

Konačno, *in vitro* simulirani probavni proces u ustima, želudcu i tankom crijevu proveden je sa ili bez prisutnog β-glukana, na kožici i mesu plodova tradicionalnih kultivara jabuke ('Citronka', 'Kolačara', 'Zlatna Zimska Parmenka'), na jednom komercijalnom kultivaru ('Idared') te na plodovima crne bazge. Simulirani probavni proces u želudcu i tankom crijevu praćen je u različitim vremenskim periodima u ukupnom trajanju od 4 h, a podatci su analizirani nelinearnom regresijom jednadžbi nultog, prvog i drugog reda. Radi prikladnosti jednadžbe za reakciju prvog reda eksperimentalnim podatcima, ova jednadžba je dodatno modificirana te na kraju primijenjena za konačnu analizu.



Slika 11. Grafički prikaz tijeka istraživanja

3.2.2. Kemikalije

Kemikalije upotrijebljene u ovom radu prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1 Popis korištenih kemikalija

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
Standardi polifenola		
cijanidin-3-*O*-galaktozid klorid	≥ 95 %	Extrasynthese, Genay, Francuska
cijanidin-3-*O*-glukozid klorid	≥ 96 %	Extrasynthese, Genay, Francuska
cijanidin-3-*O*-sambubiozid-5-*O*-glukozid klorid	≥ 90 %	Extrasynthese, Genay, Francuska
cijanidin-3-*O*-sambubiozid klorid	≥ 95 %	Extrasynthese, Genay, Francuska
(-)-epikatehin	≥ 90 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
(+)-katehin hidrat	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
procijanidin B1	≥ 90 %	Extrasynthese, Genay, Francuska
procijanidin B2	≥ 90 %	Extrasynthese, Genay, Francuska
Floretin	≥ 99 %	Extrasynthese, Genay, Francuska
floretin-2'-*O*-glukozid	≥ 99 %	Extrasynthese, Genay, Francuska
galna kiselina	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
klorogenska kiselina	≥ 95 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
p-kumarinska kiselina	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
kvercetin-3-*O*-galaktozid	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
kvercetin-3-*β*-D-glukozid	≥ 90 %	Extrasynthese, Genay, Francuska
kvercetin-3-*O*-ramnozid	98,5 %	Extrasynthese, Genay, Francuska
kvercetin-3-*O*-rutinozid-hidrat	95 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ostali reagensi i kemikalije		
metanol	HPLC	J.T. Baker, Nizozemska
klorovodična kiselina	37 %	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
acetonitril	HPLC	Fisher scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo
orto-fosforna kiselina	85 %	Fluka, Busch, Švicarska
folin-ciocalteuov reagens		Kemika, Zagreb, Hrvatska
natrijev karbonat, bezvodni		Gram-mol, Zagreb. Hrvatska
sephadex LH-20		Pharmacia A.B, Uppsala, Švedska
α-amilaza iz svinjske gušterače		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
α-glukozidaza iz *Saccharomyces cerevisiae*		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
akarboza	≥ 95 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4-nitrofenil α-D-glukopiranozid (*p*-NPG)	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
škrob		
kalijev natrijev tartarat tetrahidrat (KNT)	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
3-5-dintriosalicilna kiselina (DNS)	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat		Kemika, Zagreb, Hrvatska
natrijev dihidrogenfosfat dihidrat		Kemika, Zagreb, Hrvatska
natrijev hidrokisd		Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
kalijev klorid		Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
kalijev dihidrogen fosfat		Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
natrijev hidrogen fosfat		Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
kalcijev klorid		Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
magnezijev klorid		Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
amonijev karbonat		Kemika, Zagreb, Hrvatska
natrijev klorid		Carlo Erba Reagents, Francuska
pepsin (632 U/mg)		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
pankreatin (8 x USP)		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
žučne soli		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
B-D-glukan iz ječma	≥ 95 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

3.2.3. Priprema otopina i reagensa

3.2.3.1. Otopine i reagensi za inhibiciju enzimske aktivnosti

Da bi se pripremio reagens 3,5-dintrosalicilne kiseline (DNS reagens) pripremljene su otopine natrijevog hidroksida (c = 2 mol/L), 3,5-dinitrosalicilne kiseline (c = 96 mmol/L) u vodi Millipore čistoće te kalijevog natrijevog tartarata tetra-hidrata (c = 5,3 mol/L) (KNT) u otopini NaOH (c = 2 mol/L). Otopine KNT-a i DNS-a su grijane i miješane na magnetskoj miješalici (bez vrenja) kako bi se kruta tvar u potpunosti otopila. DNS reagens je dobiven miješanjem tople vode, toplih otopina KNT-a i DNS-a u omjeru 3:2:5, navedenim redoslijedom te čuvan na sobnoj temperaturi, zaštićen od svijetlosti.

Za inhibiciju enzimske aktivnosti α-amilaze pripremljen je fosfatni pufer (c = 0,02 mol/L, pH 6,9), otopina škroba (γ = 2,5 mg/mL) u fosfatnom puferu grijanjem na 90 °C 15 minuta i α-amilaza (3 U/mL) u fosfatnom puferu.

Za inhibiciju enzimske aktivnosti α-glukoidaze pripremljene su koncentrirane otopine α-glukozidaze (19,3 U/mL), pNPG-a (γ = 5 mg/mL) i akarboze (γ = 2 mg/mL) u fosfatnom puferu (c = 0,1 mol/L, pH 6,8). Radne otopine enzima (0,55 U/mL) i pNPG-a (γ = 0,40 mg/mL) su pravljene od koncentriranih otopina svježe svaki dan.

3.2.3.2. Otopine i reagensi za simulirani probavni proces

Pripremljene su stock otopine elektrolita: KCl (c = 0,5 mol/L), KH_2PO_4 (c = 0,5 mol/L), $NaHCO_3$ (c = 1 mol/L), $MgCl_2$ (c = 0,15 mol/L), $(NH_4)_2CO_3$ (c = 0,5 mol/L), NaCl (c = 2 mol/L) i $CaCl_2$ (c = 0,3 mol/L).

Prema preporuci Minekus i sur. (2014), napravljene su otopine simuliranih probavnih tekućina usta, želudca i tankog crijeva koncentriranije 1,25 puta nego što je predviđeno u radu (Minekus i sur., 2014). Razlog tome je što se tijekom simulirane probave u takve probavne tekućine dodaju ostali reagensi te su nakon dodatka reagensa koncentracije soli prilagođene koncentracijama u probavi *in vivo* (Minekus i sur., 2014). Ukratko, simulirana tekućina usta (STU), simulirana tekućina želudca (STŽ) i simulirana tekućina tankog crijeva (STT) su napravljene miješanjem otopina elektrolita u odmjernim tikvicama, dodatkom vode Millipore čistoće te prilagođavanjem pH vrijednosti. Simulirana tekućina usta pripremljena je u ukupnom volumenu 100 mL s konačnim koncentracijama elektrolita KCl (c = 18,875 mmol/L), KH_2PO_4 (c = 4,625 mmol/L), $NaHCO_3$ (c = 17 mmol/L), $MgCl_2$ (c = 0,05625 mmol/L), $(NH_4)_2CO_3$ (c = 0,06 mmol/L). Simulirana tekućina želudca pripremljena je u ukupnom volumenu 250 mL s konačnim koncentracijama elektrolita KCl (c = 8,625 mmol/L), KH_2PO_4 (c = 1,125 mmol/L), $NaHCO_3$ (c = 31,25 mmol/L), $MgCl_2$ (c = 0,15 mmol/L), $(NH_4)_2CO_3$ (c = 0,625 mmol/L), NaCl

(c = 59 mmol/L). pH je podešen na 3 s HCl (c = 1 mol/L). Simulirana tekućina tankog crijeva pripremljena je u ukupnom volumenu 500 mL, a konačne koncentracije elektrolita bile su KCl (c = 8,5 mmol/L), KH_2PO_4 (c = 1 mmol/L), $NaHCO_3$ (c = 106,25 mmol/L), $MgCl_2$ (c = 0,4125 mmol/L), NaCl (c = 48 mmol/L). pH je podešen na 7 s HCl (c = 1 mol/L).

Otopine enzima i žučnih soli su pravljene svježe svakodnevno i predinkubirane (inkubator Memmert IN 30, Schwabach, Njemačka) na 37 °C prije upotrebe. α-amilaza (γ = 1000 mg/L) je pripremljena u STU, pepsin (γ = 31 660,1 mg/L) u STŽ uz pomoć ultrazvučne kupelj (RK 100, Berlin, Njemačka), dok su pankreatin (γ = 8 000 mg/L) i žučne soli (γ = 25 000 mg/L) pripremljeni u STT. β-glukan *(γ* = 550 mg/L) je otopljen u vodi Millipore čistoće grijanjem i miješanjem na 80 °C.

3.2.4. Priprema uzoraka jabuke i plodova crne bazge

U eksperimentima simulirane probave korištene su tradicionalne sorte jabuke (*Malus domestica* Borkh.*)* 'Citronka', 'Kolačara' i 'Zlatna Zimska Parmenka', koje su opisane u bazi podataka Nacionalne banke biljnih genetskih izvora Hrvatske (https://cpgrd.hapih.hr/). Jabuke su ubrane na području Hrvatske (Perenci, 45.396075, 17.568265) u voćnjaku tradicionalnih sorata gospodina Mladena Katića. Komercijalna sorta jabuke 'Idared' je kupljena u lokalnoj trgovini. Svim sortama jabuke je kožica pažljivo odvojena od mesa pomoću gulilice te usitnjena u električnom mlincu za kavu. Mesu jabuke je uklonjena sredina sa sjemenkama te je ostatak izrezan na 4 dijela i homogeniziran pomoću štapnog miksera. Usitnjeni ili homogenizirani uzorci kožice i mesa jabuka su stavljeni u plastične vrećice i spremljeni u zamrzivač na -18 °C do daljnje uporabe. Plodovi crne bazge (*Sambucus nigra L.)* su ubrane u Hrvatskoj, regija Slavonija, homogenizirane pomoću štapnog miksera i spremljene u zamrzivač (-18 °C) do daljnje uporabe.

3.2.5. Ekstrakcija polifenolnih spojeva

3.2.5.1. Istraživanje ekstrakcije polifenolnih spojeva iz voća pomoću dva otapala

Oko 0,2 g homogeniziranog uzorka mesa i kožice jabuke te plodova crne bazge je odvagano u plastične kivete i dodan je 1 mL 80 %-tnog metanola ili 0,1 %-tne otopine HCl-a u metanolu. Uzorci su homogenizirani vortexom (Grant Bio, Cambridgeshire, Engleska), tretirani ultrazvukom 15 minuta u ultrazvučnoj kupelji (RK 100, Berlin, Njemačka) i potom centrifugirani 10 minuta na 10 000 rpm (Eppendorf MiniSpin, Hamburg, Njemačka). Ekstrakt je odvojen pipetiranjem od ostatka. Ostatak je ekstrahiran u nekoliko dodatnih koraka istim postupkom da bi se ekstrahirala većina polifenolnih spojeva (meso jabuke ukupno je

ekstrahirano dva puta, kožica jabuke tri puta, a plodovi crne bazge četiri puta). U svakom koraku ekstrakcije u ekstraktima su mjereni ukupni polifenolni spojevi Folin-Ciocalteu metodom (Singleton i sur., 1999).

3.2.5.2. Ekstrakcija polifenolnih spojeva za istraživanje inhibicije enzimske aktivnosti

Približno 0,5 g homogeniziranog uzorka jabuke (kožica ili meso) je odvagano deset puta u deset plastičnh kiveta i dodan je 1 mL 80 %-tnog metanola. Reakcijske smjese su homogenizirane i stavljene u ultrazvučnu kupelj 15 minuta. Nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10 000 rpm. Deset ekstrakata je odvojeno od ostatka pipetiranjem te spojeno u jedan ekstrakt čineći ukupni volumen ≈ 10 mL. Ovim postupkom ekstrahirani su polifenoli kožice i mesa dva tradicionalna kultivara jabuke (kultivar 'Kolačara' crvene boje kožice, kultivar 'Citronka' zeleno-žute boje kožice) te jednog komercijalnog kultivara (Idared).

Šest uzoraka plodova crne bazge (oko 0,2 g) je izvagano u plastične kivete. Svakom uzorku je dodan 1,5 mL 80 %-tnog metanola te je provedena ekstrakcija istim postupkom. Ekstrakti su odvojeni od ostataka i spojeni u jedan ekstrakt ukupnog volumen ≈ 9 mL.

Ekstrakti su podvrgnuti kromatografiji na stupcu radi razdvajanja frakcija s različitim polifenolnim skupinama. Na jednak način su pripremljeni ekstrakti za istraživanje kinetike inhibicije enzimske aktivnosti.

3.2.5.3. Kemijska i enzimska ekstrakcija polifenola prije simuliranog probavnog procesa

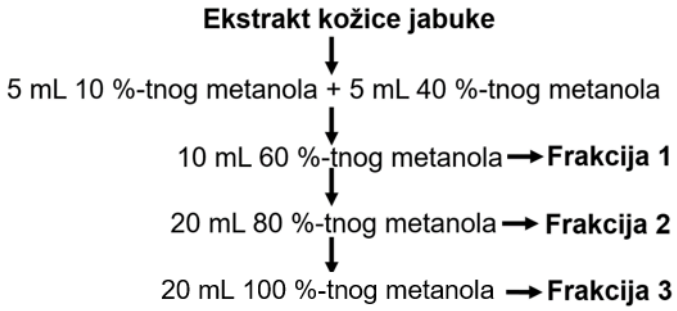
U svrhu određivanja količine ukupnih polifenola prije probavnog procesa, polifenoli su ekstrahirani iz voća kemijskom i enzimskom ekstrakcijom. Ukratko, usitnjena kožica jabuke (3 g) te homogenizirano meso jabuke (5 g) i homogenizirane plodovi crne bazge (3 g) su odvagani u plastične epruvete te im je dodano 22,5 mL 80 %-tnog metanola. Uzorci su homogenizirani i stavljeni u ultrazvučnu kupelj 15 minuta. Otopina je centrifugirana (SL 8R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) 10 minuta na 9 500 rpm te je ekstrakt odvojen od ostatka. Ostatak je ekstrahiran ponovo s 10 mL 80 % metanola. Ekstrakti su spojeni (ukupan volumen 32,5 mL), filtrirani kroz 0,45 µM PTFE filter i injektirani direktno u HPLC sustav.

Ostatak nakon kemijske ekstrakcije je podvrgnut postupku enzimske ekstrakcije (Bergantin i sur., 2017). Voda Millipore čistoće, pepsin, pankreatin i žučne soli su inkubirani na 37 °C te su dodani ostatcima nakon kemijske ekstrakcije u volumenima od 21, 0,3, 0,6 i 1,2 mL, navedenim redoslijedom. Reakcijske smjese su homogenizirane i inkubirane 2 sata

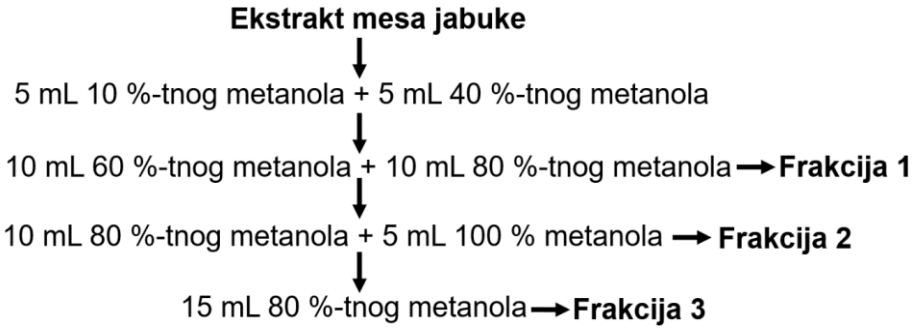
na 37 °C u vodenoj kupelji uz trešnju (SW 22, Julabo, Seelbach, Njemačka). Nakon toga, reakcijska smjesa je centrifugirana na 5 °C i 9 500 rpm 5 minuta. Ekstrakt je odvojen od ostatka, 1 mL je stavljen u led, filtriran kroz 0,45 μm filter i injektiran direktno u HPLC sustav. Provedena je još jedna enzimska ekstrakcija na istom ostatku s istom procedurom te je ekstrakt filtriran i analiziran odvojeno pomoću HPLC sustava.

3.2.6. Razdvajanje polifenolnih skupina jabuka i bobica crne bazge primjenom kromatografije na stupcu

Ekstrakti polifenola mesa i kožice jabuke te plodova crne bazge pripremljeni za inhibiciju enzimske aktivnosti, podvrgnuti su kromatografiji na stupcu s ciljem razdvajanja polifenolnih skupina u različite frakcije, prema prije ustanovljenoj metodi (Matić, 2021). Upotrijebljena je staklena kolona za kromatografiju (Lenz Laborglas GmbH & Co. KG, Wertheim, 200 mm promjer, 15 mL volumen). Kao stacionarna faza korišten je Sephadex LH-20 gel koji je pripremljen tako da je 5 g Sephadexa pomiješano s 30 mL 80 %-tnog metanola i ostavljeno preko noći kako bi gel nabubrio. Gel je oprezno uliven u kolonu i prilagođen na početni gradijent ispiranjem s 10 mL 60 %-tnog metanola i 20 mL 10 %-tnog metanola. Nakon toga je na površinu Sephadex LH-20 gela dodan ekstrakt kožice jabuke. Nakon što je gel upio sav ekstrakt, ekstrakt je eluiran s određenim volumenima i postotcima metanola (10, 40, 60, 80, 100 %) (Slika 12). Prikupljene su pojedine frakcije polifenola kožice jabuke. Kolona je nakon toga isprana s 30 mL 80 %-tnog metanola, 10 mL 60 %-tnog metanola i 20 mL 10 %-tnog metanola. U kolonu je dodan prethodno pripremljeni ekstrakt mesa jabuke. Nakon upijanja u kolonu, ekstrakt je eluiran s otopinama metanola određenih postotaka (10, 40, 60, 80, 100 %) i određenih volumena (Slika 13) te su hvatane frakcije. Metanol je uklonjen iz prikupljenih frakcija pomoću rotirajućeg isparivača pri temperaturi 40 °C (IKA RV 10 Digital D Distiling Rotary Evaporator, Njemačka).



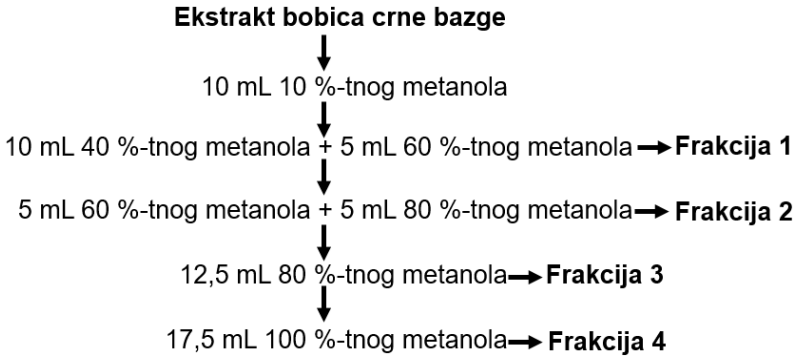
Slika 12. Uvjeti razdvajanja pojedinih polifenolnih skupina kožice jabuke primjenom kromatografije na stupcu



Slika 13 Uvjeti razdvajanja pojedinih polifenolnih skupina mesa jabuke primjenom kromatografije na stupcu

Ekstrakt plodova crne bazge je dodan na površinu Sephadex-LH 20 gela te je razdvajanje provedeno kako je prikazano na slici 14. Nakon razdvajanja, metanol je uklonjen iz prikupljenih frakcija pomoću rotirajućeg isparivača pri temperaturi 40 °C. Frakcije sa 100 %-tnim metalnolm su otopljene u vodi nakon uklanjanja metanola.

Dobivene frakcije kožice i mesa jabuke i plodova crne bazge su analizirane primjenom odgovarajuće RP-HPLC metode i korištene kao inhibitori enzima.



Slika 14 Uvjeti razdvajanja pojedinih polifenolnih skupina plodova crne bazge primjenom kromatografije na stupcu

3.2.7. Folin-Ciocalteu metoda za ukupne polifenolne spojeve

Ukupan sadržaj polifenola je određen pomoću Folin-Ciocalteau metode (Singleton i sur., 1999). Ukratko, 20 µL ekstrakta polifenola je pomiješano sa 1580 µL destilirane vode i 100 µL Folin-Ciocalteau reagensa. Smjesa je po dodatku 300 µL natrij karbonata (γ = 200 mg/L), homogenizirana te inkubirana 30 minuta na 40 °C. Apsorbancija (A) je očitana pri 765 nm na UV-Vis spektrofotometru (Shimadzu UV-1280, Kyoto, Japan) te je koncentracija izračunata pomoću prethodno konstruirane kalibracijske krivulje galne kiseline (γ = 0-500 mg/L).

3.2.8. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija obrnutih faza (RP-HPLC)

Polifenolni spojevi analizirani su kromatografijom obrnutih faza (RP-HPLC), na sustavu 1260 Infinity II opremljenog kvaternom pumpom i detektorom s nizom dioda (DAD). Razdvajanje polifenola je provedeno na koloni Poroshell 120 (EC-C18, 4,6×100 mm, 2,7 µm) s pretkolonom Poroshell 120 UHPLC Guard (EC-C 18, 4,6 mm) (Agilent, Santa Clara, SAD). Različite mobilne faze su upotrjebljene za analizu polifenola jabuke i plodova crne bazge (0,1 % H_3PO_4 i metanol; 0,5 % H_3PO_4 i acetonitril, navedenim redoslijedom). Analiza je provedena gradijentnom eluacijom, gdje se udio mobilne faze B (metanol ili acetonitril) povećavao tijekom trajanja analize, kako je prikazano u tablici 2. U obje metode protok je iznosio 0,8 mL/min, s volumenom injektiranja 10 µL te su kromatogrami snimani u području valnih duljina od 200 do 600 nm. Različite polifenole skupine su praćene na različitim valnim duljinama, sukladno valnoj duljini njihovog apsorpcijskog maksimuma. Flavan-3-oli i dihidrokalkoni su praćeni na 280 nm, fenolne kiseline na 320 nm, flavonoli na 360 nm i antocijanini na 510 nm.

Tablica 2 Gradijent RP-HPLC metoda za analizu polifenola jabuka i bobica crne bazge

Metoda za jabuke		**Metoda za bobice crne bazge**	
Vrijeme (min)	**Mobilna faza B (%)**	**Vrijeme (min)**	**Mobilna faza B (%)**
0	5	0	5
5	25	5	11
14	34	7,5	15
25	37	17,5	17,5
30	40	20	20
34	49	30	30
35	50	32	70
58	51	34	70
60	55	36	5
62	80	38	5
65	80		
67	5		
72	5		

3.2.8.1. Vrednovanje RP-HPLC metode

Vrednovanje metoda je provedeno određivanjem linearnosti, osjetljivosti, granice detekcije (eng. *Limit of detection*; LOD), granice kvantifikacije (eng. *Limit of quantification*, LOQ), preciznosti i istinitosti metode.

Linearnost, LOD i LOQ su određeni pomoću kalibracijskih krivulja polifenolnih standarda. Koncentrirane otopine standarda su pripremljene kako je prikazano u tablici 3, te

su napravljena razrjeđenja za sve standarde. Razrjeđenja su analizirana na HPLC uređaju te su napravljene kalibracijske krivulje stavljanjem u odnos površine pika (odziv uređaja) određenog polifenolnog spoja i njegove koncentracije. Linearnom regresijskom analizom je za svaku kalibracijsku krivulju određen koeficijent determinacije (r^2) i pripadajuća linearna jednadžba (Jednadžba 18):

$$y = ax + b \tag{18}$$

gdje je *y* odziv uređaja (površina pika), *x* ulazna varijabla (koncentracija u mg/L), *a* nagib kalibracijske krivulje (osjetljivost metode) i *b* odsječak na y osi.

Iz dobivenih kalibracijskih krivulja su izračunate LOD i LOQ. LOD predstavlja najnižu količinu analita u uzorku koja se može detektirati. Izmjerena je pomoću standardne devijacije odsječka na y osi (SD) i srednje vrijednosti nagiba kalibracijske krivulje (S), kao što je prikazano u jednadžbi 19 (Taverniers i sur., 2004.). LOD je izražena kao koncentracija analita u mg/L.

$$LOD = 3.3\frac{SD}{S} \tag{19}$$

LOQ predstavlja najnižu količinu analita koja se može kvantitativno odrediti s prihvatljivom razinom preciznosti, istinitosti i ponovljivosti. Izmjerena je pomoću standardne devijacije odsječka na y osi (SD) i srednje vrijednosti nagiba kalibracijske krivulje (S) kao što je prikazano u jednadžbi 20 (Taverniers i sur., 2004). LOQ je također izražen kao koncentracija analita u mg/L.

$$LOQ = 10\frac{SD}{S} \tag{20}$$

Tablica 3 Priprema koncentriranih otopina polifenolnih standarda

Polifenol	Otapalo	Koncentracija (mg/L)
cijanidin-3-*O*-galaktozid klorid	0,1 %-tna HCl u metanolu	485
cijanidin-3-*O*-glukozid klorid	0,1 %-tna HCl u metanolu	1320
cijanidin-3-*O*-sambubiozid-5-*O*-glukozid klorid	0,1 %-tna HCl u metanolu	909
cijanidin-3-*O*-sambubiozid klorid	0,1 %-tna HCl u metanolu	1000
(-)-epikatehin	Metanol	414
(+)-katehin	Metanol	421
procijanidin B1	Destilirana voda	160
procijanidin B2	Destilirana voda	450
floretin	Metanol	1000
floretin-2'-*O*-glukozid	Metanol	1000
galna kiselina	Metanol	1000
klorogenska kiselina	Metanol	1000
p-kumarinska kiselina	Metanol	1000
kvercetin-3-*O*-galaktozid	Metanol	893
kvercetin-3-*β*-D-glukozid	Metanol	1125
kvercetin-3-*O*-ramnozid	Metanol	276
kvercetin-3-*O*-rutinozid	Metanol	900

Preciznost metode procijenjena je analizom standardnog spoja i izražena kao koeficijent varijacije (%). Sve otopine standarda izmjerene su u istom laboratoriju od strane istog analitičara, koristeći istu opremu unutar jednog dana („intra-assay“ preciznost)

(Thompson i sur., 2002.). Istinitost metode je izražena preko iskorištenja, tj. na temelju određivanja postotka obnovljene količine standardnih spojeva nakon dodavanja standarda poznate koncentracije u ekstrakt.

3.2.8.2. Karakterizacija polifenola jabuke i crne bazge RP-HPLC metodama

Usporedbom spektra i vremena zadržavanja polifenola u ekstraktima voća sa spektrima i vremenima zadržavanja standarda polifenola, provedena je identifikacija polifenola. Ukoliko nije bio dostupan standard nekog polifenola, provedena je djelomična identifikacija na temelju UV/Vis spektra i podataka iz literature (izomer klorogenske kiseline, neoklorogenska kiselina, floretin-2'-ksiloglukozid, *p*-kumaroilkina kiselina, derivati kvercetina, kvercetin-3-ksilozid) (Wojdyło i sur., 2008; Giomaro i sur., 2014; Mikulic-Petkovsek i sur., 2014; Jakobek i sur., 2020a). Količina polifenola određena je upotrebom autentičnih kalibracijskih krivulja.

3.2.9. Inhibicija enzima polifenolima plodova jabuke i crne bazge

3.2.9.1. Inhibicija α-amilaze

Metoda za inhibiciju α-amilaze je preuzeta od Nyambe-Silavwe i sur. (2015), uz manje modifikacije. Kao inhibitori su korišteni akarboza različitih koncentracija (γ = 2-100 μg/mL) ili različite koncentracije polifenolnih frakcija kožice i mesa jabuke te plodova crne bazge. Inhibicija je provedena u četiri kivete prema postupku prikazanom u Tablici 4. Po dodatku reagensa kivete su predinkubirane 10 minuta na 37 °C. Reakcija je započela dodatkom 200 μL α-amilaze u glavne probe. Enzimska reakcije je provođena 15 minuta pri 37 °C, a zaustvaljena je dodatkom 1 mL DNS reagensa u sve četiri kivete i zagrijavanjem na 95 °C (15 minuta) u vodenoj kupelji (JB Academy, Grant instruments, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo). Apsorbancija je mjerena na 540 nm na UV-Vis spektrofotometru.

Tablica 4 Uvjeti inhibicijskog testa α-amilaze

	Neihibirana reakcija		**Inhibirana reakcija**	
Reagensi	**Slijepa proba (μL)**	**Glavna proba (0 % inhibicije) (μL)**	**Slijepa proba (μL)**	**Glavna proba (μL)**
Pufer	300	100	250	50
Inhibitor	0	0	50	50
Škrob	200	200	200	200
Predinkubacija 10 minuta na 37 °C				
α-amilaza	0	200	0	200
Inkubacija 15 minuta na 37 °C				
DNS reagens	1000	1000	1000	1000
Zagrijavanje 15 minuta na 95 °C				

3.2.9.2. Inhibicija α-glukozidaze

Metoda za inhibiciju α-glukozidaze je preuzeta od Granados-Guzmán i sur. (2018), uz manje modifikacije. Kao inhibitori su korišteni akarboza različitih koncentracija (γ = 303 – 1818,2 μg/mL) ili različite koncentracije polifenolnih frakcija kožice i mesa jabuke te bobica crne bazge. Inhibicija je provedena u četiri kivete prema postupku prikazanom u Tablici 5. Po dodatku reagensa kivete su predinkubirane inkubirane 5 minuta na 37 °C. Reakcija je započela dodatkom 85 μL α-glukozidaze u glavne probe. Enzimska reakcija je provođena 17,5 minuta pri 37 °C, a zaustavljena je dodatkom 665 μL natrijevog karbonata te je izmjerena apsorbancija na 405 nm na UV-VIS spektrofotometru.

Tablica 5 Uvjeti inhibicijskog testa α-glukozidaze

	Neihibirana reakcija		**Inhibirana reakcija**	
Reagensi	**Slijepa proba (μL)**	**Glavna proba (0 % inhibicije) (μL)**	**Slijepa proba (μL)**	**Glavna proba (μL)**
Pufer	250	165	85	0
Inhibitor	0	0	165	165
pNPG	85	85	85	85
Predinkubacija 10 minuta na 37 °C				
α-glukozidaza	0	85	0	85
Inkubacija 17,5 minuta na 37 °C				
Na_2CO_3	665	665	665	665

3.2.9.3. Određivanje postotka inhibicije i IC_{50} vrijednosti

Inhibicija enzima je izračunata prema jednadžbi 21:

$$\%\ inhibicije = \frac{\left(\Delta A_{neihibirana\ reakcija} - \Delta A_{inhibirana\ reakcija}\right)}{\Delta A_{neihibirana\ reakcija}} \times 100 \qquad (21)$$

gdje $\Delta A_{neihibirana\ reakcija}$ predstavlja razliku apsorbancije neihibirane reakcije i pripadajuće slijepe probe, a $\Delta A_{inhibirana\ reakcija}$ razliku apsorbancije inhibirane reakcije i pripadajuće slijepe probe.

Stavljanjem u odnos početne koncentracije polifenola i izračunatih postotaka inhibicije su dobiveni eksperimentalni podatci koji su opisani pomoću logaritamskih krivulja. Iz pripadajućih logaritamskih krivulja su grafički izračunate IC_{50} vrijednosti (koncentracija inhibitora koja daje 50 %-tnu inhibiciju).

3.2.9.4. Kinetika inhibicije enzimske aktivnosti

Provedena je inhibicija α-amilaze i α-glukozidaze ekstraktima kožice i mesa plodova tradicionalne jabuke i plodova crne bazge kako je prethodno opisano, uz zaustavljanje reakcije nakon prve minute te nakon svake 2,5 minute reakcije. Postotak inhibicije je izračunat prema formuli (21). Dobiveni eksperimentalni podatci su modelirani nelinearnom regresijom

jedandžbi nultog, prvog i drugog reda (Jednadžbe 15 do 17). Određeni su kinetički parametri: postotak inhibicije na kraju rekacije (I_∞), konstanta brzine reakcije k (1/min) te vrijeme polureakcije $t_{1/2}$ (min).

3.2.10. Simulirani probavni proces

Postupak simulacije probave proveden je prema prije utvrđenom postupku (Bergantin i sur., 2017. i Minekus i sur., 2014). Sve enzimske otopine i simulirane tekućine usta, želudca i tankog crijeva su prije analize inkubirane na 37 °C. Odvagano je 3 g (kožica jabuke i plodovi crne bazge) ili 5 g (meso jabuke) homogeniziranog voćnog materijala u plastične epruvete te je provedena simulacije probave kako slijedi.

Za simulaciju probave u ustima je u plastične epruvete s uzorkom voća dodano 0,975 mL vode miliporne čistoće, 3,5 mL simulirane tekućine usta, 0,025 mL $CaCl_2$ i 0,5 mL α-amilaze. Otopina je promiješana 30 sekundi na vortexu, odvojen je alikvot 0,5 mL, filtriran kroz 0,45 µm PTFE filter, stavljen u led i injektiran direktno u HPLC sustav.

Simulacija probave u želudcu je provedena dodatkom vode (0,295 mL), simulirane tekućine želudca (7,5 mL), pepsina (2 mL), kalcijevog klorida (0,005 mL) i HCl (c = 1 mol/L, 0,2 mL) u otopinu nakon simulacije probave u ustima. Otopina je promiješana na miješalici i inkubirana u vodenoj kupelji s tresilicom 2 sata na 37 °C (SW 22, Julabo, Seelbach, Njemačka). Nakon inkubacije, otopina je centrifugirana na 5 °C i 9,500 rpm 5 minuta. Alikvot od 500 µL je otpipetiran, filtriran kroz 0,45 µm PTFE filter, stavljen u led i injektiran direktno u HPLC sustav.

Naposlijetku, probava u tankom crijevu je simulirana dodatkom vode (3,61 mL), simulirane tekućine tankog crijeva (11 mL), pankreatina (5 mL), žučnih soli (0,2 mL), NaOH (c = 1 mol/L, 0,15 mL) i kalcijevog klorida (0,040 mL) u otopinu nakon simulacije probave u ustima i želudcu. Nakon inkubacije 2 h na 37 °C, otopina je centrifugirana na 5 °C i 9 500 rpm 5 minuta. Alikvot od 1 mL je otpipetiran, filtriran kroz 0,45 µm PTFE filter, stavljen u led i injektiran direktno u HPLC sustav.

Svaka faza probave s dodatkom β-glukana je provedena prema istom postupku uz zamjenu određenog volumena vode β-glukanom. β-glukan je dodan na početku svake faze kako bi se držala konstantna koncentracija (c = 15 mg/L. Volumeni reagensa su bili slijedeći: 3,5 mL simulirane tekućine usta, 0,839 mL H_20, 0,136 mL β-glukana, 0,025 mL $CaCl_2$ i 0,5 mL α-amilaze za probavu u ustima; 7,5 mL simulirane tekućine želudca, 0,023 mL H_20, 0,272 mL β-glukana, 0,005 mL $CaCl_2$, 0,2 mL HCl (c = 1 mol/L) i 2 mL pepsina za probavu u želudcu; 11 mL simulirane tekućine tankog crijeva, 3,065 mL H_20, 0,545 mL β-glukana 0,04 mL $CaCl_2$,

0,15 mL NaOH (*c* = 1 mol/L), 5 mL pankreatina i 0,2 µL žučnih soli za probavu u tankom crijevu.

Bioraspoloživost polifenola nakon određene probavne faze je izraženo kao postotak otpuštene količine polifenola u odnosu na početnu količinu polifenola prije probave prema jednadžbi 22:

$$Bioraspoloživost(\%) = \frac{\gamma_{\ probavne\ faze}\left({}^{mg}/_{kg}\right)}{\gamma_{\ prije\ probave}\left({}^{mg}/_{kg}\right)} \quad (22)$$

gdje $\gamma_{probavne\ faze}$ predstavlja koncentraciju polifenola nakon određene faze probave (mg/kg), $\gamma_{prije\ probave}$ predstavlja koncentraciju polifenola u voću prije probave određenu pomoću kemijske i enzimske ekstrakcije (mg/kg).

3.2.11. Kinetika procesa simulirane probave

Provedena je simulacije probave mesa i kore odabranih kultivara jabuke (jedan tradicionalni kultivar 'Kolačara', i jedan komercijalni kultivar 'Idared') i plodova bazge s ili bez β-glukana prema prije opisanom postupku. Alikvoti su uzimani iz reakcijske smjese u kojoj se odvijala simulirana probava želudca i tankog crijeva nakon 10, 20, 30, 60 i 120 minuta. Alikvoti su stavljeni u led, filtrirani kroz 0,45 µm PTFE filter i injektirani u HPLC sustav.

Dobiveni podatci za količinu otpuštenih polifenolnih skupina u vremenu (c_t, mg/kg) te vrijeme (t) su analizirani jednadžbama nultog, prvog i drugog reda (jednadžbe 15 do 17) koje su već ranije korištene za *in vitro* simulirane probavne procese u kojima je praćena amiloliza škroba te nastajanje produkta razgradnje (Butterworth i sur., 2012). No jednadžbe su se pokazale neprikladnima za analizu otpuštenih polifenolnih spojeva, a razlog tome može biti drugačije ponašanje polifenola tijekom probave.

Tijekom probave u želudcu, količina otpuštenih polifenola pokazuje porast u odnosu na početnu vrijednost koja predstavlja količinu nakon probave u ustima. Suprotno tome, tijekom probave u tankom crijevu količina otpuštenih polifenola pokazuje smanjenje u odnosu na početnu vrijednost koja predstavlja količinu nakon probave u želudcu. Razlog opisanih procesa su najvjerojatnije dva procesa koji se odvijaju istodobno, otpuštanje i degradacija polifenola. Da bi se kinetičke jednadžbe prilagodile ovim procesima, modificirane su bez utjecaja na određivanje konstanti brzina reakcije.

3.2.11.1. Modifikacija jednadžbe prvog reda

Provedena je modifikacija integrirane jednadžbe prvog reda (Jednadžba 7) dodavanjem faktora C_∞ , čime je dobiven modificirani oblik jednadžbe:

$$c_A = \left(c_{A_O} - c_\infty\right)e^{-k_{1M}t} + c_\infty \quad (23)$$

gdje c_A (mg/kg voća) predstavlja koncentraciju polifenola u vremenu *t*, c_{A_O} (mg/kg voća) predstavlja koncentraciju polifenola na početku reakcije (za simuliranu probavu želudca, početna koncentracija je koncentracija polifenola nakon probave u ustima; za simuliranu probavu tankog crijeva, početna koncentracija je koncentracija polifenola nakon probave u želudcu), c_∞ (mg/kg voća) je odgovarajuća koncentracija na kraju reakcije, dok je k_{1M} (1/min) konstanta brzine reakcije prvog reda. Ukoliko je:

$c_\infty > c_{A_O}$ krivulja jednadžbe pokazuje porast

$c_\infty < c_{A_O}$ krivulja jednadžbe pokazuje pad

Ova modifikacija omogućava korištenje iste jednadžbe za opis povećanja količine polifenola prilikom simulacije probave u želudcu i smanjenja količina polifenola prilikom simulacije probave u tankom crijevu. Prikazana je ovisnost c_A *vs t* te su nelinearnom regresijom određeni parametri c_∞ i *k*. Izračunato je i vrijeme polureakcije $t_{1/2}$ (min) (Jednadžba 13).

3.2.11.2. Modificirana jednadžba drugog reda

Modifikacijom integrirane jednadžbe drugog reda (Jednadžba 11) je dobivena jednadžba:

$$c_A = \frac{c_{A_O} - c_\infty}{1 + B * t} + c_\infty \quad (24)$$

c_A (mg/kg voća) predstavlja koncentraciju polifenola u vremenu *t*, c_{A_O} (mg/kg voća) predstavlja koncentraciju polifenola na početku reakcije (za simuliranu probavu želudca, početna koncentracija je koncentracija polifenola nakon probave u ustima; za simuliranu probavu tankog crijeva, početna koncentracija je koncentracija polifenola nakon probave u želudcu), c_∞ (mg/kg voća) je odgovarajuća koncentracija na kraju reakcije, dok je B koeficijent dan jednadžbom:

$$B = \left(c_{A_O} - c_\infty\right) * k_{2M} \quad (25)$$

Prikazana je ovisnost c_A *vs t*, vrijednost c_{A_O} je poznata eksperimentalna vrijednost, a nelinearnom regresijom određeni su parametri c_∞ i *B*. Iz parametra B (jednadžba 25) određena je konstanta brzine reakcije drugog reda k_{2M} (kg/min*mg). Kao i jednadžba za reakciju prvog reda, krivulja modificirane jednadžbe drugog reda pokazuje porast ili pad u ovisnosti o razlici između c_{A_O} i C_∞. Vrijeme polureakcije je izračunato prema jednadžbi 14.

Modificirane jednadžbe prvog i drugog reda isto su reakcije pseudo-reda zbog fiksne koncentracije enzima prilikom simulacije probave.

3.2.12. Statistička analiza

Za istraživanje dva različita ekstrakcijska otapala, ekstrakti kožice i mesa jabuke te plodova crne bazge pripremljeni su u dvije paralele te su svaka mjerenja provedena dva puta (n=4). Standardi polifenolnih spojeva za vrednovanje HPLC metode pripremljeni su u dvije paralele te mjereni jednom (n=2). Za inhibiciju enzimske aktivnosti pripremljen je jedan ekstrakt kožice i mesa jabuke te plodova crne bazge, a frakcije s različitim polifenolnim skupinama dobivene nakon kromatografije na stupcu mjerene su tri puta za inhibiciju enzima (n=3). Za kinetičko istraživanje inhibicije enzima svaki vremenski interval je mjeren 3 puta (n=3). Kemijska i enzimska ekstrakcija kožice i mesa jabuke te plodova crne bazge provedene su tri puta te su ekstrakti mjereni jednom da bi se dobila količina prije simulirane probave (n=3). Simulirana probava na voću provedena je u tri paralele, a mjerenja tijekom simulirane probave provedena su jednom (n=3). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardno odstupanje. Statistička obrada podataka provedena je upotrebom Tukey post-hoc testa pomoću programa Minitab (Minitab LLC., State College, PA, USA). Analiza glavnih komponenti (*engl. Principal component analysis*, PCA) je upotrijebljena za moguća grupiranja podataka pomoću programa Minitab. Razlike između IC_{50} vrijednosti akarboze i pojedinih polifenolnih frakcija voća su ispitane t-testom pomoću programa MS Excel 2016 (Microsoft Corporation, SAD). Nelinearna regresija jednadžbi u kinetici provedena je pomoću alata Solver u programu MS Excel (Redmond, USA), minimizirajući standardnu grešku (SE modela) danu jednadžbom:

$$SE = \sqrt{\frac{\sum(Ci - Cp)^2}{N - k}} \tag{26}$$

gdje c_i (mg/kg) predstavlja izmjerenu koncentraciju polifenola u određenom vremenskom intervalu, c_p (mg/kg) koncentraciju polifenola u određenom vremenskom intervalu procijenjenu kinetičkim modelom, N je ukupan broj mjerenja, a k je broj parametara u modelu.

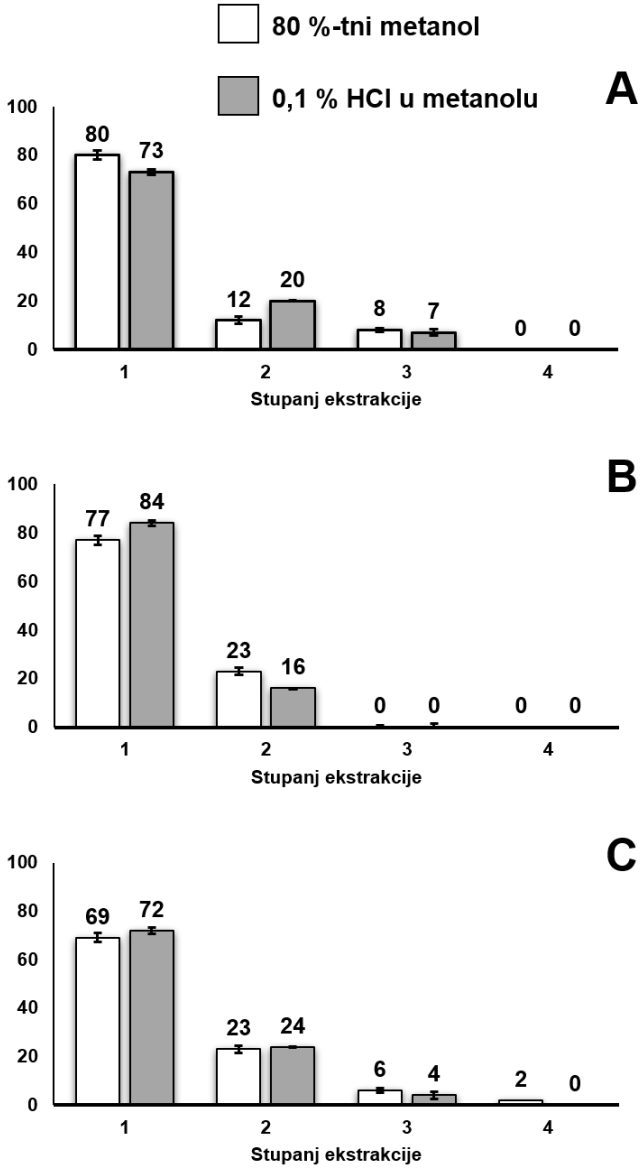
4. REZULTATI

4.1. Ekstrakcija polifenola iz plodova jabuke i crne bazge

Tablica 6 Količina ukupnih polifenola (mg/kg voća) u ekstraktima voća dobivena u više uzastopnih koraka ekstrakcije te uz pomoć dva otapala (80 % metanol i 0,1 % HCl u metanolu)

	80 % methanol				0,1 % HCl u metanolu			
Stupanj ekstrakcije	1	2	3	4	1	2	3	4
Voće								
Kožica jabuke	2054±280	297±12	220±18		2281±60	623±18	210±46	
Meso jabuke	613±9	187±29			702±46	135±5		
Bobice bazge	13292±893	4315±114	1171±57	428±60	13342±263	4260±4	687±35	0

*ukupni polifenoli mjereni su spektroskopskom Folin-Ciocalteu metodom. Ekstrakti su pripremljeni u dvije paralele i svaka paralela je mjerena 2 puta (n=4)



Slika 15 Postotak ekstrahiranih polifenola iz (A) kožice jabuke, (B) mesa jabuke i (C) plodova crne bazge u više uzastopnih ekstrakcija te uz pomoć dva otapala (80 % metanol i 0,1 % HCl u metanolu)

4.2. Vrednovanje metoda visokodjelotvorne tekućinske kromatografije obrnutih faza za određivanje polifenola

4.2.1. RP-HPLC metoda za polifenole jabuke

Tablica 7 Linearnost, granica detekcije (engl. Limit of Detection LOD), granica kvantifikacije (engl. Limit of Quantification LOQ) RP-HPLC metode za određivanje individualnih polifenola u jabukama[1]

Standard	Jednadžba kalibracijskog pravca	R^2	LOD mg/L	LOQ mg/L
Antocijanini				
cijanidin-3-galaktozid	y=97,76x-12,329	0,9988	0,24	0,71
cijanidin-3-glukozid	Y=38,723x+14,794	0,9933	0,56	1,71
Flavan-3-oli				
(+)-katehin	y=5,3923x+1,7429	0,9959	0,38	1,16
(-)-epikatehin	y=10,569x-4,7658	0,9984	1,35	4,10
procijanidin B1	y=4,7074x+19,278	0,9927	0,79	2,39
procijanidin B2	y=20,22x-5,9652	0,9985	0,59	1,81
Dihidrokalkoni				
floretin-2'-glukozid	y=60,157x-2,7218	0,9997	0,21	0,64
floretin	y=110,22x-8,0932	0,9998	0,34	1,04
Fenolne kiseline				
klorogenska kiselina	y=21,844x+27,441	0,9986	0,01	0,04
p-kumarinska kiselina	y=199,57x-416,38	0,9947	1,15	3,47
Flavonoli				
kvercetin-3-galaktozid	y=33,099x-0,1574	1	0,02	0,07
kvercetin-3-glukozid	y=38,233x-15,005	0,9993	0,72	2,17
kvercetin	y=116,66x-33,851	0,9989	0,57	1,73
kvercetin-3-ramnozid	y=64,537x-39,881	0,9976	0,87	2,64

[1] svaka koncentracija standarda pripremljena je u dvije paralele i svaka paralela mjerena je jednom (n=2)

Tablica 8 Preciznost[1] i istinitost[2] RP-HPLC metode za određivanje individualnih polifenola u jabukama

Standard	"Intra-assay" preciznost %	Analitički povrat %
Antocijanini		
cijanidin-3-galaktozid	3,4	99,3
cijanidin-3-glukozid	2,4	99,7
Flavan-3-oli		
(+)-katehin	2,6	113,7
(-)-epikatehin	1,7	98,0
procijanidin B1	2,1	90,3
procijanidin B2	1,4	101,5
Dihidrokalkoni		
floretin-2'-glukozid	1,7	102,4
floretin	1,3	102,2
Fenolne kiseline		
klorogenska kiselina	1,6	95,0
p-kumarinska kiselina	2,8	98,3
Flavonoli		
kvercetin-3-galaktozid	1,3	99,3
kvercetin-3-glukozid	0,9	107,2
kvercetin	0,8	98,5
kvercetin-3-ramnozid	0,8	90,2

[1] izražena preko "intra-assay" preciznosti (jedan analitičar, isti laboratorij, koncentracija napravljena u dvije paralele i mjerena jednom (n=2)

[2] izražena preko analitičkog povrata

4.2.2. RP-HPLC metoda za polifenole plodova crne bazge

Tablica 9 Linearnost, granica detekcije, granica kvantifikacije RP-HPLC metode za određivanje individualnih polifenola u plodovima crne bazge[1]

Standard	Jednadžba kalibracijskog pravca	R^2	LOD mg/L	LOQ mg/L
Antocijanini				
cijanidin-3-galaktozid	y = 97,996x - 354,1	0,9957	0,72	2,18
cijanidin-3-glukozid	y = 75,011x - 11,81	0,9971	1,25	3,79
cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid	y = 27,547x - 99,295	0,9991	0,67	2,02
cijanidin-3-sambubiozid	y = 41,498x + 7,1488	0,9947	0,27	0,80
Fenolne kiseline				
klorogenska kiselina	y = 97,431x - 719,9	0,9939	0,94	2,84
Flavonoli				
kvercetin-3-galaktozid	y = 223,12x - 749,8	0,9976	0,05	0,15
kvercetin-3-glukozid	y = 90,514x - 288,17	0,9995	0,87	2,65
kvercetin-3-rutinozid	y = 29,113x - 116,14	0,9962	0,32	0,97

[1] svaka koncentracija standarda pripremljena je u dvije paralele i svaka paralela mjerena je jednom (n=2)

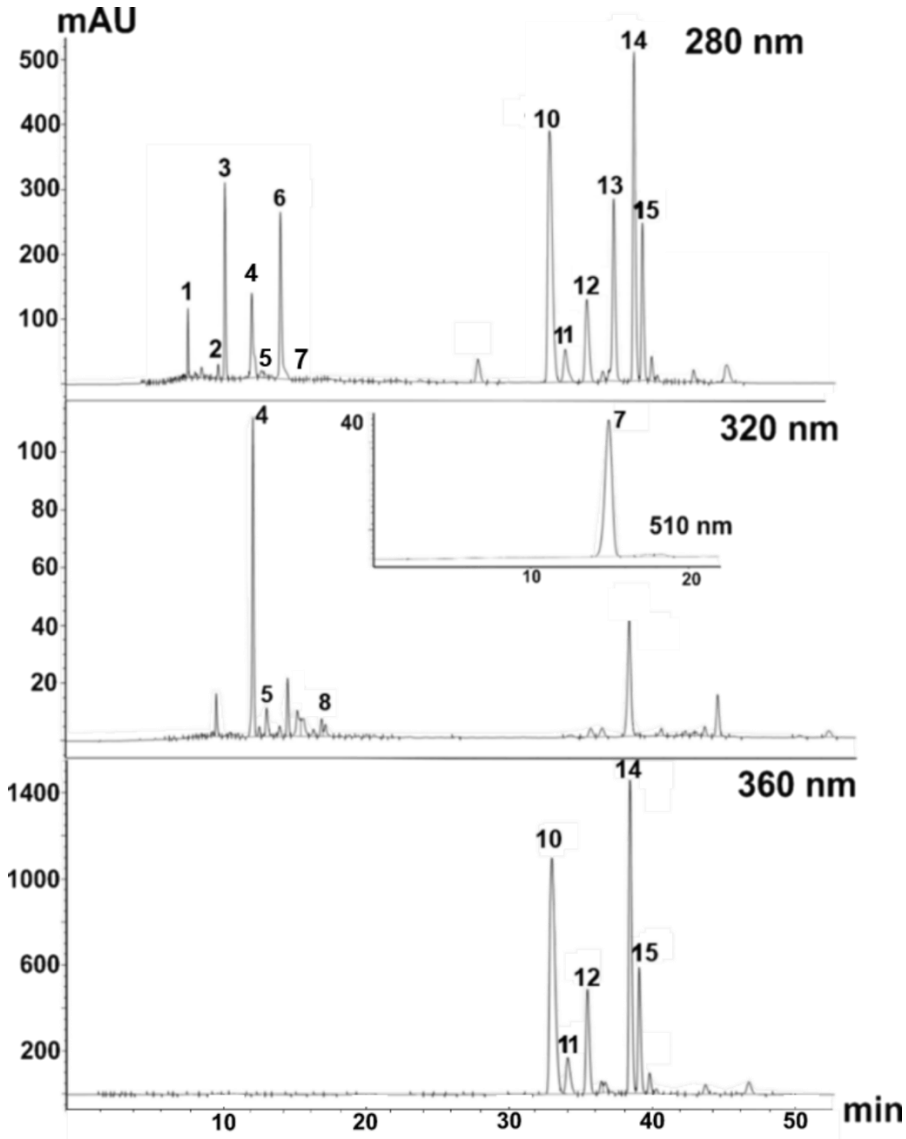
Tablica 10 Preciznost[1] i istinitost[2] RP-HPLC metode za određivanje individualnih polifenola u plodovima crne bazge

Standard	"Intra-assay" preciznost %	Analitički povrat %
Antocijanini		
cijanidin-3-galaktozid	2,0	115,7
cijanidin-3-glukozid	1,3	89,9
cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid	1,5	106,2
cijanidin-3-sambubiozid	2,9	95,2
Fenolne kiseline		
klorogenska kiselina	2,0	81,8
Flavonoli		
kvercetin-3-galaktozid	0,2	89,7
kvercetin-3-glukozid	3,0	109,2
kvercetin-3-rutinozid	1,3	104,2

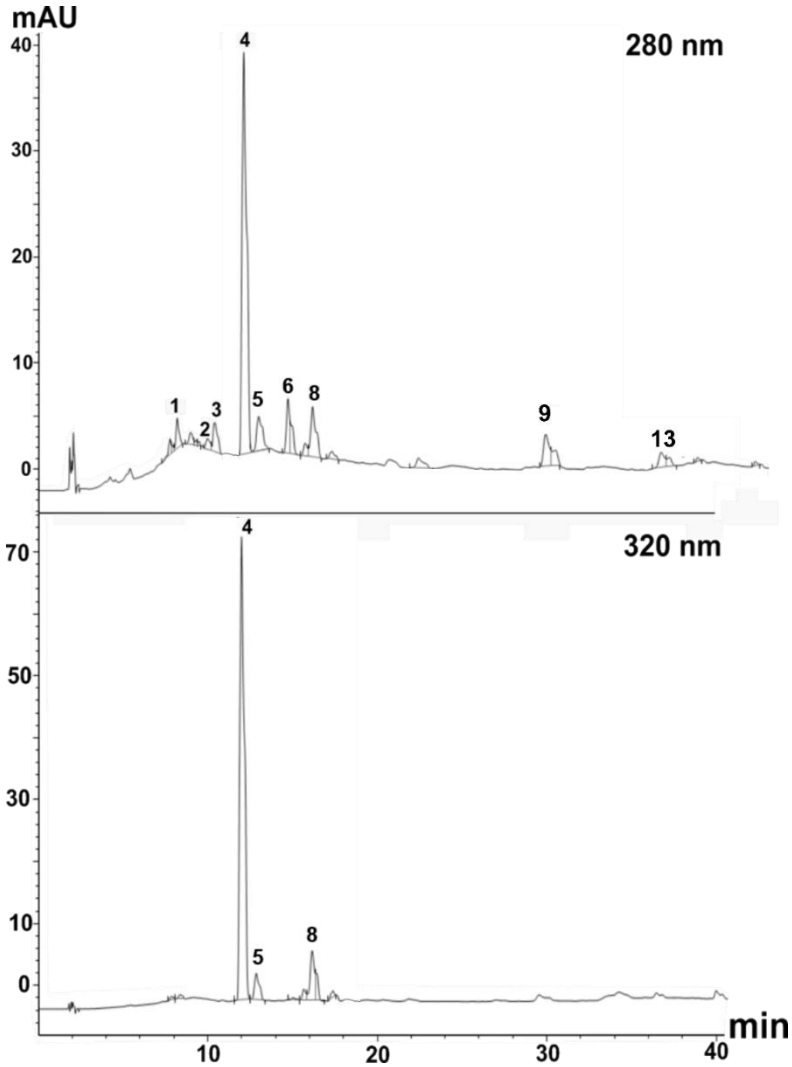
[1] izražena preko "intra-assay" preciznosti (jedan analitičar, isti laboratorij, koncentracija napravljena u dvije paralele i mjerena jednom (n=2))

[2] izražena preko analitičkog povrata

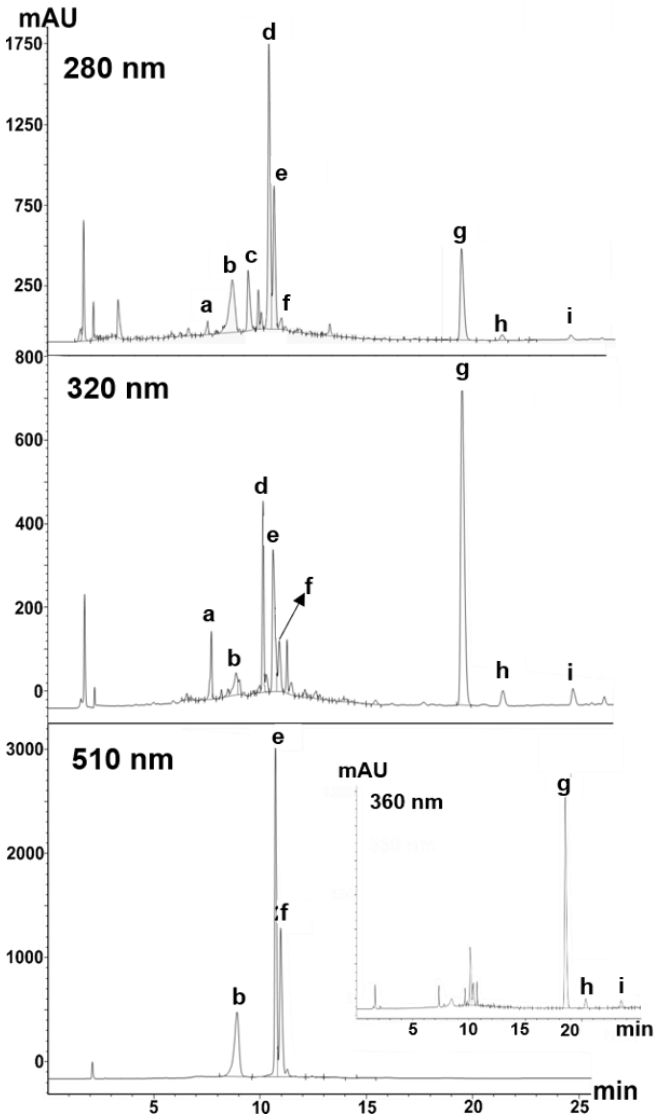
4.3. Identifikacija polifenola u plodovima jabuke I crne bazge



Slika 16 RP-HPLC kromatogrami kožice jabuke snimljeni na 280, 320, 360 i 510 nm. Identificirani polifenoli: 1- procijanidin B1; 2- (+)-katehin; 3- procijanidin B2; 4- klorogenska kiselina; 5- derivat klorogenske kiseline* 6- (-)-epikatehin; 7- cijanidin-3-galaktozid; 8- *p*-kumaroilkina kiselina* ; 10- kvercetin-3-galaktozid; 11- kvercetin-3-glukozid; 12- derivat kvercetina 1; 13- floretin-2'-glukozid; 14- kvercetin-3-ksilozid*; 15- kvercetin-3-ramnozid.
* - Djelomično identificirano



Slika 17 RP-HPLC kromatogrami mesa jabuke snimljeni na 280 i 320 nm. Identificirani polifenoli: 1- procijanidin B1; 2- (+)-katehin; 3- procijanidin B2; 4- klorogenska kiselina; 5- derivat klorogenske kiseline* 6- (-)-epikatehin; 8- *p*-kumaroilkina kiselina* 9- floretin-2'-ksiloglukozid*; 13- floretin-2'-glukozid. *-Djelomično identificirano



Slika 18 RP-HPLC kromatogrami plodova crne bazge snimljeni na 280, 320, 360 i 510 nm. Identificirani polifenoli: a-neoklorogenska kiselina*; b- cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid; c- (+)-katehin; d-klorogenska kiselina; e-cijanidin-3-sambubiozid; f- cijanidin-3-glukozid; g-kvercetin-3-rutinozid; h- kvercetin-3-glukozid; i-derivat kvercetina. *-Djelomično identificirano

Tablica 11 Identifikacija polifenola u mesu i kožici jabuke te plodovima crne bazge pomoću RP-HPLC metode koristeći njihovo vrijeme zadržavanja i UV/Vis maksimum (λ_{max})

Oznaka	Vrijeme zadržavanja (min)	λ_{max} (nm)	Identifikacija	Način identifikacije
		Plodovi jabuke		
1	7,9	280	procijandin B1	λ_{max} + standard
2	9,9	280	(+)-katehin	λ_{ma} + standard
3	10,1	280	procijandin B2	λ_{max} + standard
4	12,1	300, 326	klorogenska kiselina	λ_{max} + standard
5	13,0	300, 326	izomer klorogenske kiseline	λ_{max} + literatura
6	14,1	280	(-)-epikatehin	λ_{max} + standard
7	15,1	275, 520	cijanidin-3-galaktozid	λ_{max} + standard
8	16,2	312	*p*-kumaroilkina kisina	λ_{max} + literatura
9	29,9	285	floretin-2'-ksiloglukozid	λ_{max} + literatura
10	32,9	256, 356	kvercetin-3-galaktozid	λ_{max} + standard
11	33,9	256, 356	kvercetin-3-glukozid	λ_{max} + standard
12	35,2	256, 356	derivat kvercetin 1	λ_{max} + literatura
13	36,4	285	floretin-2'-glukozid	λ_{max} + standard
14	38,2	256, 354	kvercetin-3-ksilozid	λ_{max} + literatura
15	39,3	256, 352	kvercetin-3-ramnozid	λ_{max} + standard
		Plodovi crne bazge		
a	7,7	292, 330	neoklorogenska kiselina	λ_{max} + literatura
b	8,9	277, 514	cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid	λ_{max} +standard
c	9,4	280	(+)-katehin	λ_{ma} + standard
d	10,1	300, 326	klorogenska kiselina	λ_{max} + standard
e	10,8	280, 518	cijanidin-3-sambubiozid	λ_{max} + standard
f	11,0	280, 516	cijanidin-3-glukozid	λ_{max} +standard
g	19,7	254, 354	kvercetin-3-rutinozid	λ_{max} +standard
h	21,5	256, 356	kvercetin-3-glukozid	λ_{max} + standard
i	24,8	256, 354	derivat kvercetina 2	λ_{max} + literatura

4.4. Inhibicija enzima polifenolima iz kožice i mesa plodova jabuke i plodova crne bazge

Tablica 12 Količine polifenola u frakcijama kožice odabranih tradicionalnih kultivara, te komercijalnog kultivara jabuke dobivene primjenom kromatografije na stupcu (mg/kg svježeg voća)

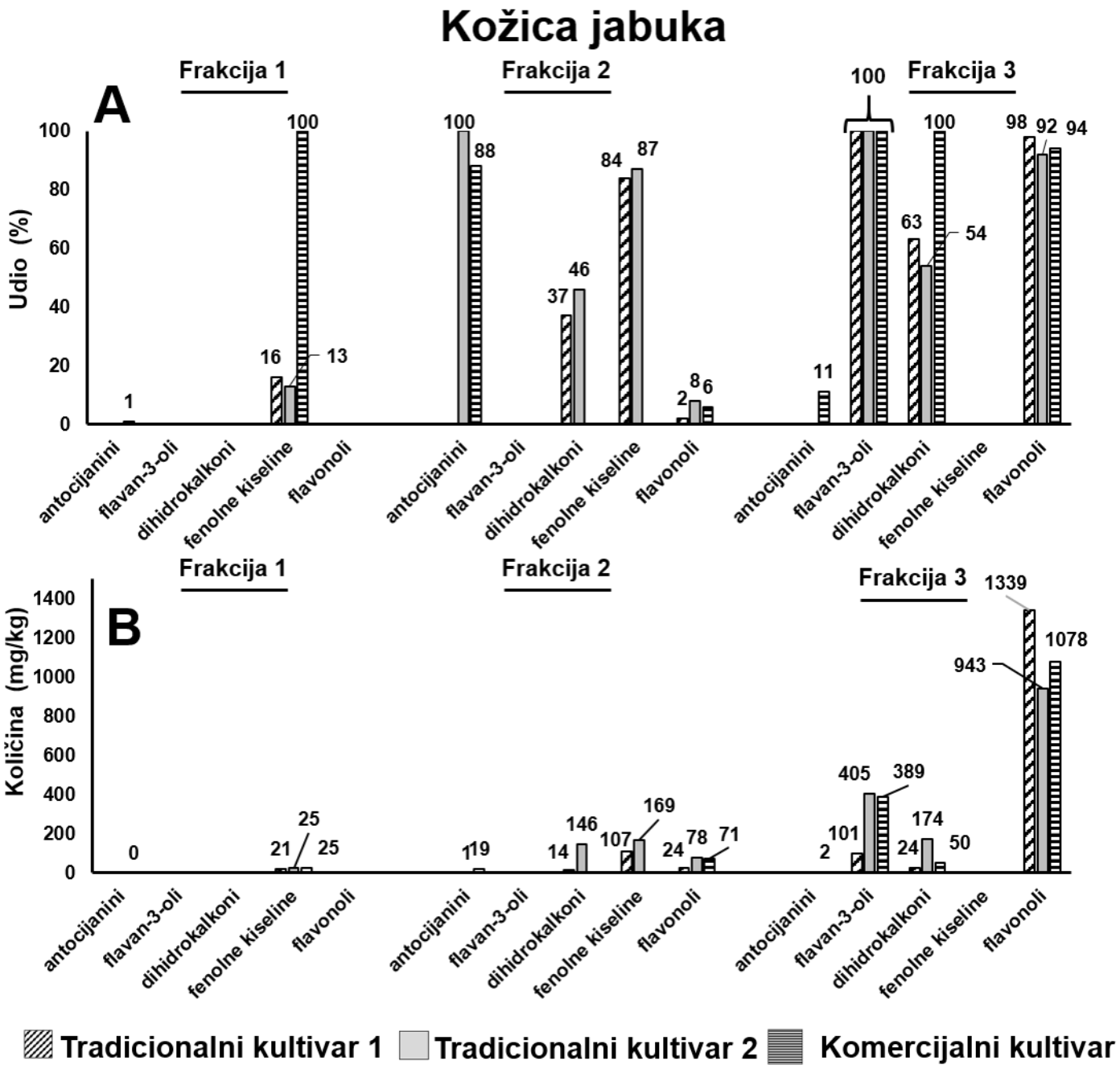
Polifenol	**tradicionalni kultivar 1**			**tradicionalni kultivar 2**			**komercijalni kultivar**		
	Frakcija 1	Frakcija 2	Frakcija 3	Frakcija 1	Frakcija 2	Frakcija 3	Frakcija 1	Frakcija 2	Frakcija 3
Antocijanini									
cijanidin-3-galaktozid					0,7 ± 0,0		0,2 ± 0,0	18,9 ± 0,5	2,3 ± 0,0
Ukupno							0,2 ± 0,0	18,9 ± 0,5	2,3 ± 0,0
Flavan-3-oli									
(+)-katehin						13,8 ± 0,1			10,8 ± 0,1
(-)-epikatehin			23,9 ± 0,0			77,5 ± 0,2			127,8 ± 0,4
procijanidin B1			21,2 ± 0,1			118,4 ± 3,9			42,3 ± 0,1
procijanidin B2			56,1 ± 0,1			194,9 ± 0,2			208,3 ± 0,4
Ukupno			101,3 ± 0,0			404,7 ± 3,1			389,2 ± 0,9
Dihidrokalkoni									
floretin-2'-ksiloglukozid		9,4 ± 0,2			111,1 ± 0,0				
floretin-2'-glukozid		4,6 ± 0,0	24,3 ± 0,0		34,6 ± 0,0	173,9 ± 0,1			49,1 ± 0,2
Ukupno		14,1 ± 0,2	24,3 ± 0,0		145,7 ± 0,0	173,9 ± 0,1			50,4 ± 0,7
Fenolne kiseline									
klorogenska kiselina	15,4 ± 0,1	85,6 ± 0,7		11,4 ± 0,1	138,3 ± 0,1		25,1 ± 0,4		
izomer klorogenske		10,6 ± 0,4		7,3 ± 0,0	15,8 ± 0,0				
p-kumaroilkina kiselina	5,7 ± 0,0	10,6 ± 0,0		5,9 ± 0,0	14,7 ± 0,0				
Ukupno	21,0 ± 0,1	106,8 ± 1,1		24,7 ± 0,2	168, ± 0,1		25,1 ± 0,4		
Flavonoli									
kvercetin-3-galaktozid		23,5 ± 0,1	543,7 ± 0,4		58,1 ± 0,0	354,4 ± 3,1			452,2 ± 5,1
kvercetin-3-glukozid			158,3 ± 0,1			151,3 ± 1,8			107,0 ± 7,0
derivat kvercetina 1			95,8 ± 0,0			112,4 ± 2,4			109,1 ± 5,7
kvercetin-3-ksilozid			23,6 ± 0,1		20,0 ± 0,1	226,3 ± 3,9		70,82 ± 0,20	257,9 ± 2,4
kvercetin-3-ramnozid			31,5 ± 0,0			98,8 ± 2,4			151,4 ± 3,9
Ukupno		23,5 ± 0,1	1339,2 ± 0,5		78,1 ± 0,1	943,4 ± 6,1		70,82 ± 0,20	1078,4 ± 20,6
Ukupni polifenoli	21,0 ± 0,0	144,4 ± 1,2	1464,8 ± 0,6	24,7 ± 0,2	407,9 ± 0,3	1539,7 ± 4,7	25,23 ± 0,4	89,6 ± 0,7	1517,6 ±

*Pojedinačni polifenoli su određeni pomoću RP-HPLC-a. Frakcije su pripremljene jednom i mjerene tri puta (n=3). Podatci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija
Tradicionalni kultivar 1 žuto-zelene boje kožice 'Citronka', tradicionalni kultivar 2 crvene boje kožice 'Kolačara'', komercijalni kultivar crvene boje kožice 'Idared'

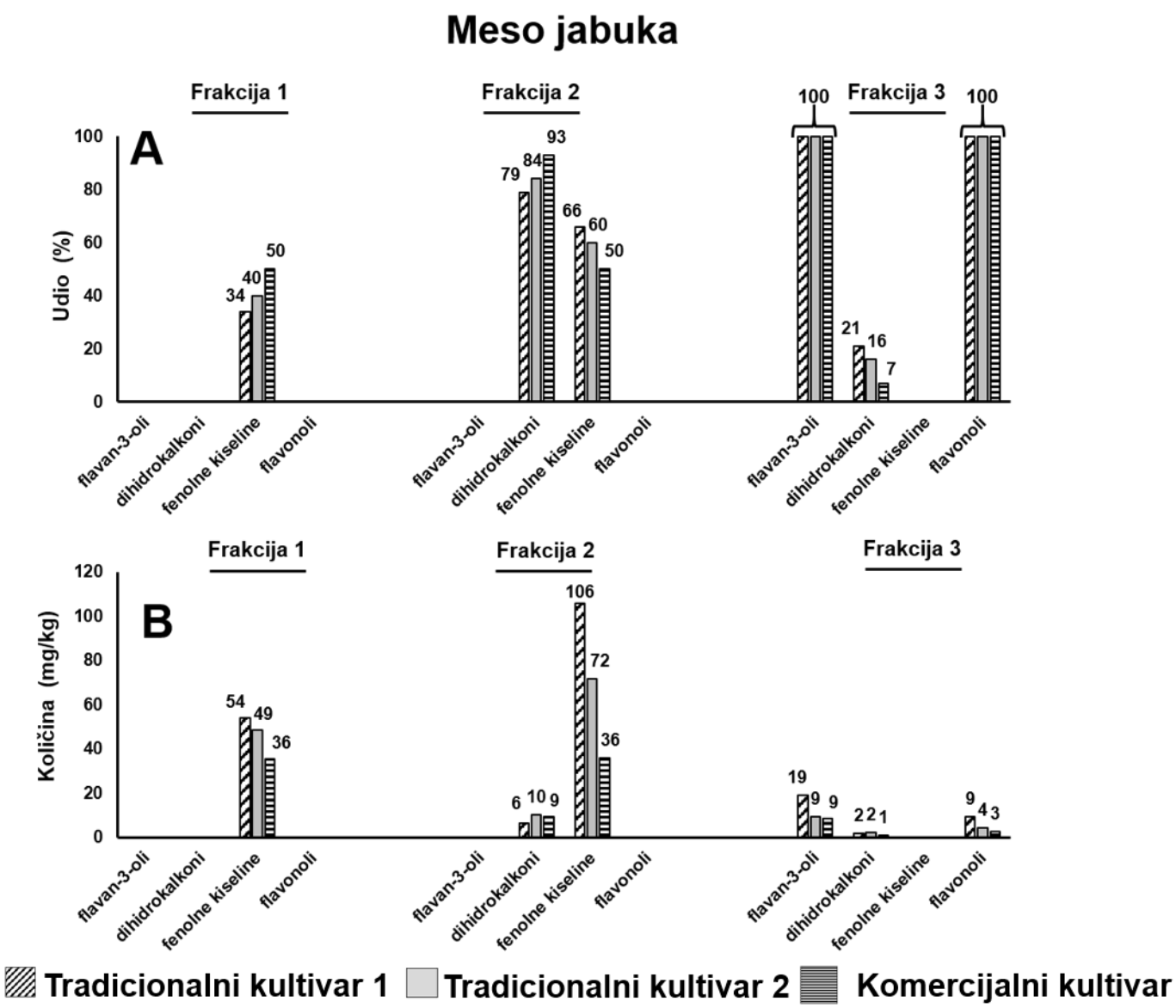
Tablica 13 Količine polifenola u frakcijama mesa odabranih tradicionalnih kultivara, te komercijalnog kultivara jabuke dobivene primjenom kromatografije na stupcu (mg/kg svježeg voća)

Polifenol	**tradicionalni kultivar 1**			**tradicionalni kultivar 2**			**komercijalni kultivar**		
	Frakcija 1	Frakcija 2	Frakcija 3	Frakcija 1	Frakcija 2	Frakcija 3	Frakcija 1	Frakcija 2	Frakcija 3
Flavan-3-oli									
(+)-katehin									
(-)-epikatehin			7,1 ± 0,1			5,9 ± 0,0			4,9 ± 0,0
procijanidin B1			10,1 ± 0,6			1,7 ± 0,0			1,0 ± 0,0
procijanidin B2			1,6 ± 0,0			1,3 ± 0,0			1,1 ± 0,4
Ukupno			18,9 ± 0,6			9,1 ± 0,0			8,5 ± 0,1
Dihidrokalkoni									
floretin-2'-ksiloglukozid		2,7 ± 0,0			5,4 ± 0,0			4,8 ± 0,0	
floretin-2'-glukozid		3,7 ± 0,0	1,7 ± 0,4		4,8 ± 0,0	1,9 ± 0,0		4,3 ± 0,0	0,7 ± 0,2
Ukupni		6,4 ± 0,0	1,7 ± 0,4		10,2 ± 0,0	1,9 ± 0,0		9,1 ± 0,0	0,7 ± 0,2
Fenolne kiseline									
klorogenska kiselina	27,8 ± 0,7	65,6 ± 0,0		17,7 ± 0,0	28,7 ± 0,4		7,6 ± 0,2	6,9 ± 0,2	
izomer klorogenske	9,0 ± 0,2			9,5 ± 0,0	5,2 ± 0,0		6,1 ± 0,0	9,3 ± 0,0	
izomer parakumarinske		20,0 ± 0,0			18,9 ± 0,0				
p-kumaroilkina kiselina	20,6 ± 0,0	19,9 ± 0,0		21,3 ± 0,0	18,8 ± 0,0		21,9 ± 0,0	19,2 ± 0,0	
Ukupno	54,0 ± 0,5	105,6 ± 0,1		48,5 ± 0,0	71,7 ± 0,4		35,6 ± 0,3	36,0 ± 0,2	
Flavonoli									
kvercetin-3-galaktozid			1,5 ± 0,0			0,5 ± 0,0			0,3 ± 0,0
kvercetin-3-glukozid			0,7 ± 0,0			0,4 ± 0,0			0,2 ± 0,0
derivat kvercetina			0,6 ± 0,0						0,3 ± 0,1
kvercetin-3-ksilozid			1,1 ± 0,0			0,4 ± 0,0			0,3 ± 0,1
kvercetin-3-ramnozid			5,1 ± 0,0			2,5 ± 0,0			1,5 ± 0,0
Ukupni			9,2 ± 0,0			4,0 ± 0,0			2,5 ± 0,0
Ukupni polifenoli	54,0 ± 0,5	112,1 ± 0,1	29,4 ± 0,7	48,5 ± 0,0	82,0 ± 0,4	16,58 ± 0,3	35,6 ± 0,3	45,2 ± 0,1	10,4 ± 0,7

*Pojedinačni polifenoli su određeni pomoću RP-HPLC-a. Frakcije su pripremljene jednom i mjerene tri puta (n=3). Podatci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija
Tradicionalni kultivar 1 žuto-zelene boje kožice 'Citronka', tradicionalni kultivar 2 crvene boje kožice 'Kolačara'', komercijalni kultivar crvene boje kožice 'Idared'



Slika 19 Frakcije kožice plodova jabuke dobivene primjenom kromatografije na stupcu: A – Udio pojedinih polifenolnih skupina; B – Količina pojedinih polifenolnih skupina

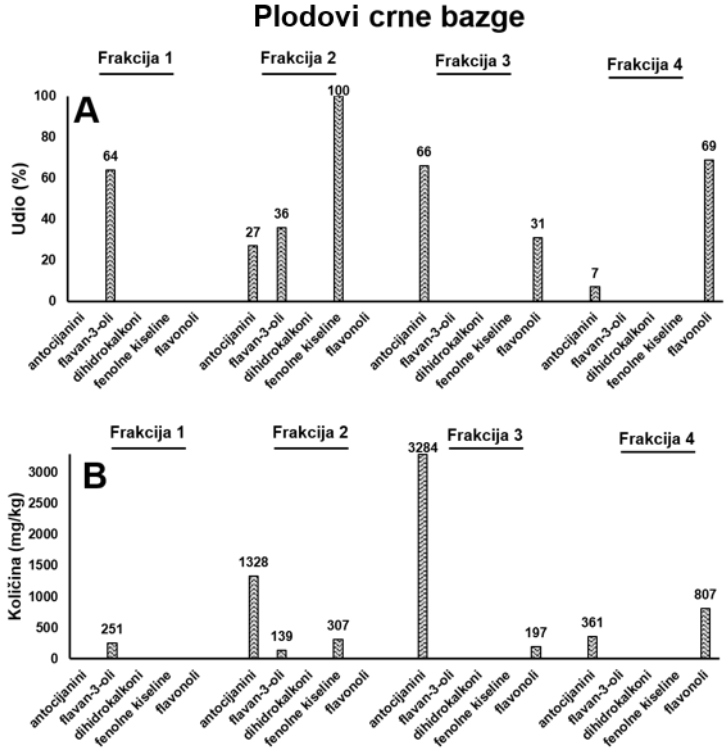


Slika 20 Frakcije mesa jabuke dobivene primjenom kromatografije na stupcu: A – Udio pojedinih polifenolnih skupina; B – Količina pojedinih polifenolnih skupina

Tablica 14 Količine polifenola plodova crne bazge u frakcijama dobivenim primjenom kromatografije na stupcu (mg/kg svježeg voća)

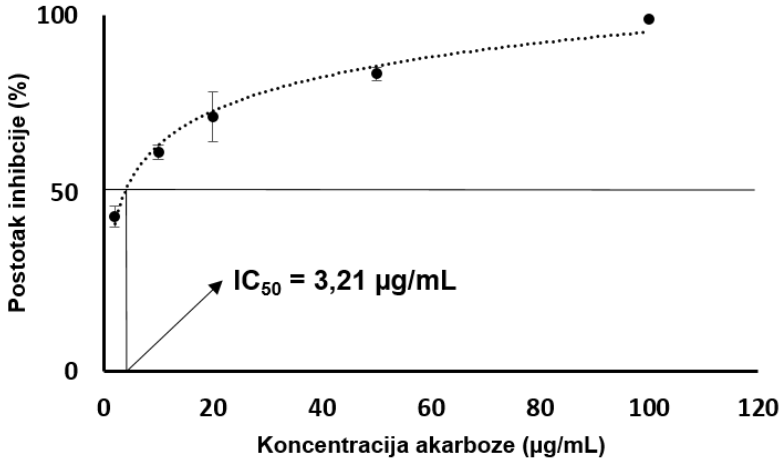
Polifenol	Frakcija 1	Frakcija 2	Frakcija 3	Frakcija 4
Antocijanini				
cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid		1327,9 ± 14,4	460,0 ± 19,9	
cijanidin-3-sambubiozid			2501,4 ± 147,2	41, 3 ± 1,6
cijanidin-3-glukozid			322,8 ± 32,0	319,3 ± 11,8
Ukupno		1327,9 ± 14,4	3284,3 ± 140,9	360,6 ± 13,5
Flavan-3-oli				
(+)-katehin	251,3 ± 1,5	138,8 ± 4,9		
Ukupno	251,3 ± 1,5	138,8 ± 4,9		
Fenolne kiseline				
neoklorogenska kiselina		127,0 ± 0,6		
klorogenska kiselina		180,4 ± 2,2		
Ukupno		307,4 ± 2,4		
Flavonoli				
kvercetin-3-rutinozid			141,1 ± 15,6	334,4 ± 10,6
Kvercetin-3-glukozid			56,2 ± 1,8	57,1 ± 0,8
derivat kvercetina 3				44,2 ± 0,3
Ukupno			197,3 ± 9,7	445,96± 11,7
Ukupni polifenoli	251,3 ± 1,5	1774,26 ± 18,41	3481,6 ± 131,1	806,6 ± 25,2

*Pojedinačni polifenoli su određeni pomoću HPLC-a. Frakcije su pripremljene jednom i mjerene tri puta (n=3). Podatci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

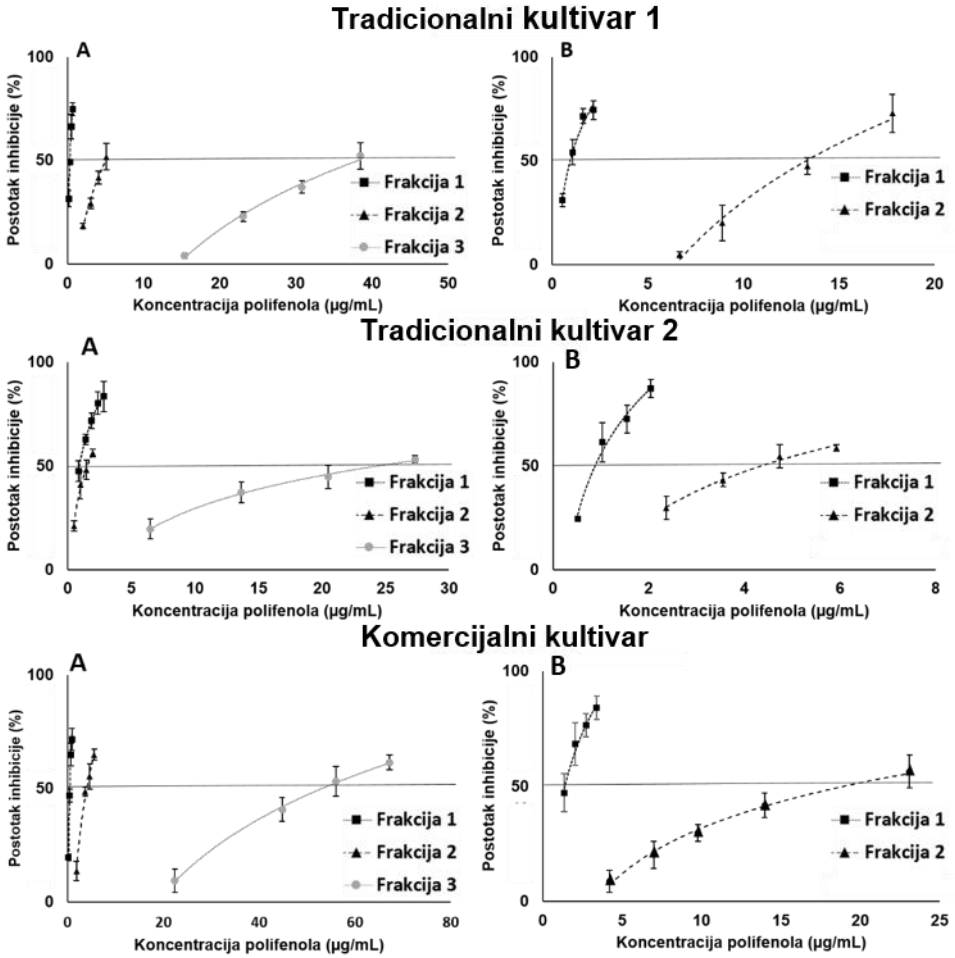


Slika 21 Frakcije plodova crne bazge dobivene primjenom kromatografije na stupcu: A – Udio pojedinih polifenolnih skupina; B – Količina pojedinih polifenolnih skupina

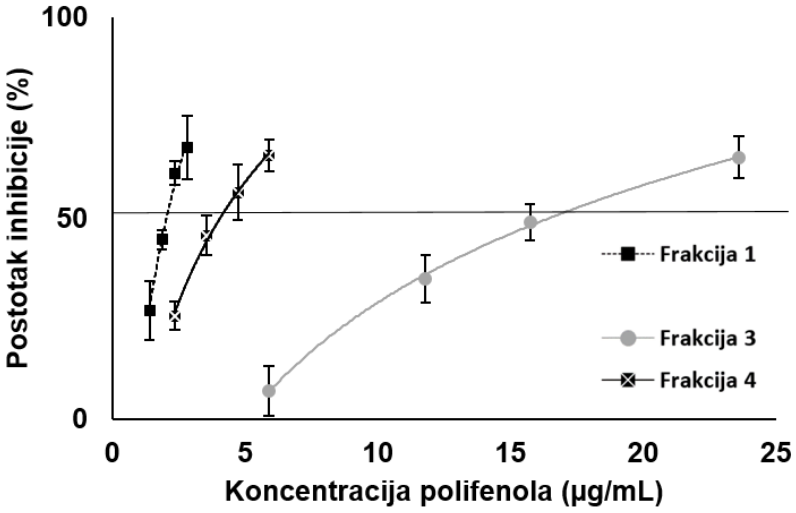
4.4.1. Inhibicija α-amilaze



Slika 22 Inhibicije α-amilaze pomoću akarboze koristeći škrob kao supstrat (vrijeme reakcije 15 minuta)



Slika 23 Inhibicija α-amilaze pomoću polifenola prisutnih u frakcijama tradicionalnih ('Citronka' i ' Kolačara) i komercijalnih ('Idared') jabuka. (A) kožica jabuke; (B) meso jabuke (vrijeme reakcije 15 minuta)



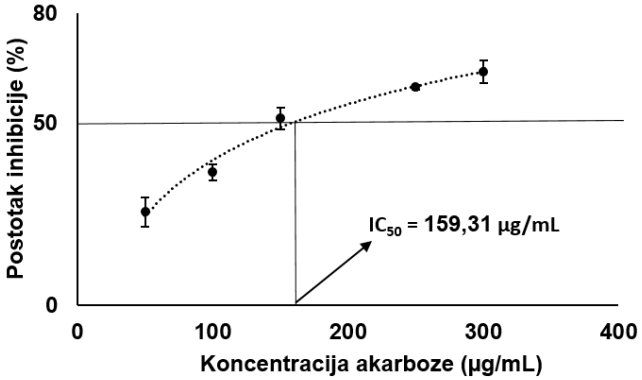
Slika 24 Inhibicija α-amilaze pomoću polifenola prisutnih u frakcijama plodova crne bazge (vrijeme reakcije 15 minuta)

Tablica 15 IC_{50} vrijednosti (µg/mL) dobivene za inhibiciju aktivnosti α-amilaze pomoću polifenolnih frakcija kožice i mesa tradicionalnih i komercijalnih plodova jabuke i crne bazge

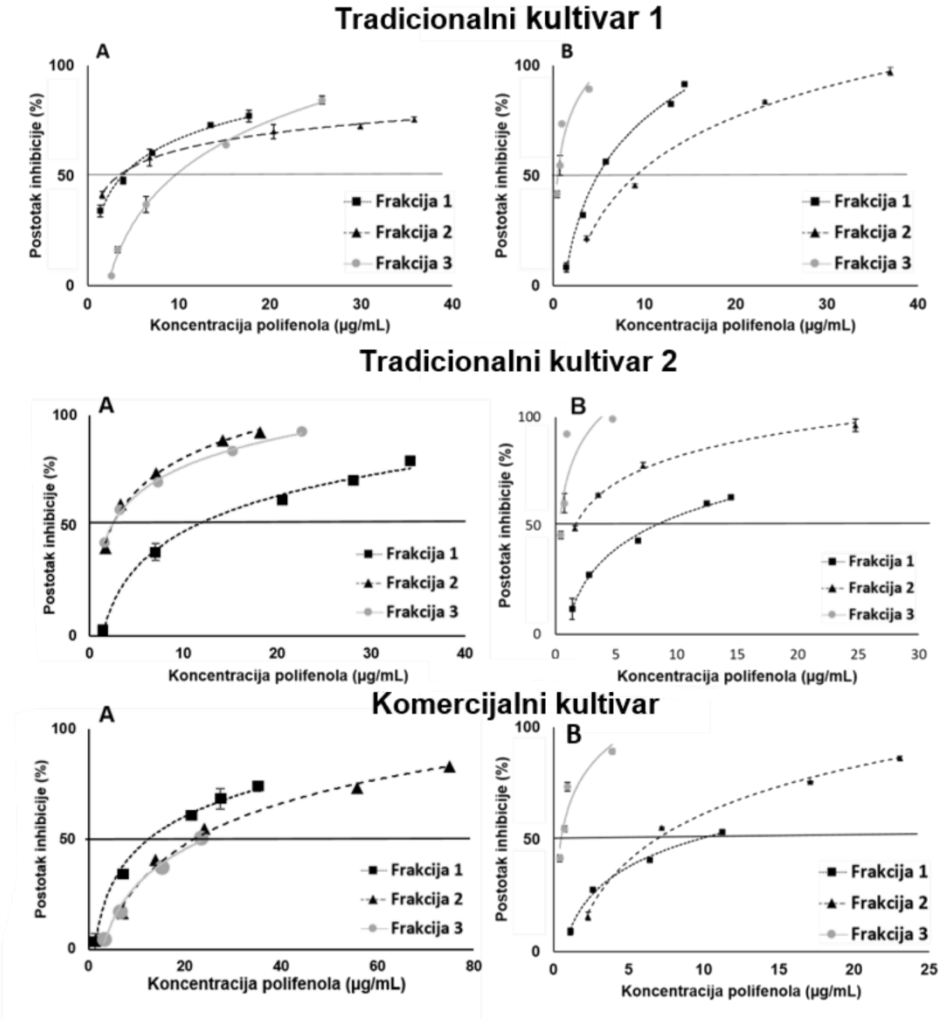
Inhibitor	**IC_{50} (µg/mL)**			
	Frakcija 1	Frakcija 2	Frakcija 3	Frakcija 4
Kožica jabuke				
Tradicionalni kultivar 1	**0,4 ± 0,2^{c}	3,8 ± 0,2^{b}	39,0 ± 9,2^{a}	
Tradicionalni kultivar 2	**0,9 ± 0,3^{b}	*1,7 ± 0,4^{b}	24,0 ± 1,9^{a}	
Komercijalni kultivar	**0,5 ± 0,0^{c}	4,0 ± 0,0^{b}	57,3 ± 6,1^{a}	
Meso jabuke				
Tradicionalni kultivar 1	**1,1 ± 0,3^{b}	12,4 ± 1,6^{a}	(IC_{27} = 5,8)	
Tradicionalni kultivar 2	**0,9 ± 0,3^{b}	4,2 ± 0,8^{a}	(IC_{19} = 2,9)	
Komercijalni kultivar	*1,7 ± 0,6^{b}	19,8 ± 1,1^{a}	(IC_{29} = 2,4)	
Bobice crne bazge	2,1 ± 0,6^{b}	(IC_{30} = 15,6)	18,0 ± 4,8^{a}	3,6 ± 0,6^{b}

Tradicionalni kultuvar 1- 'Citronka' žuto zelene boje kožice, tradicionalni kultivar 2 'Kolačara' crvene boje kožice, komercijalni kultivar 'Idared' crvene boje kožice
Vrijeme reakcije 15 min
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3).
Frakcije 3 mesa jabuke i frakcija 2 plodova crne bazge pri najvećim koncentracijama nisu uzrokovale inhibiciju α-amilaze veću od 50 %. Prikazane su kao IC vrijednost pri najvećoj koncentraciji frakcije.
Vrijednosti u redu s različitim slovima su statistički značajno različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.
Vrijednosti sa zvijezdicom su statistički značajno različite od IC_{50} vrijednosti akarboze prema t-testu (*$p \leq 0,05$; **$p \leq 0,01$)

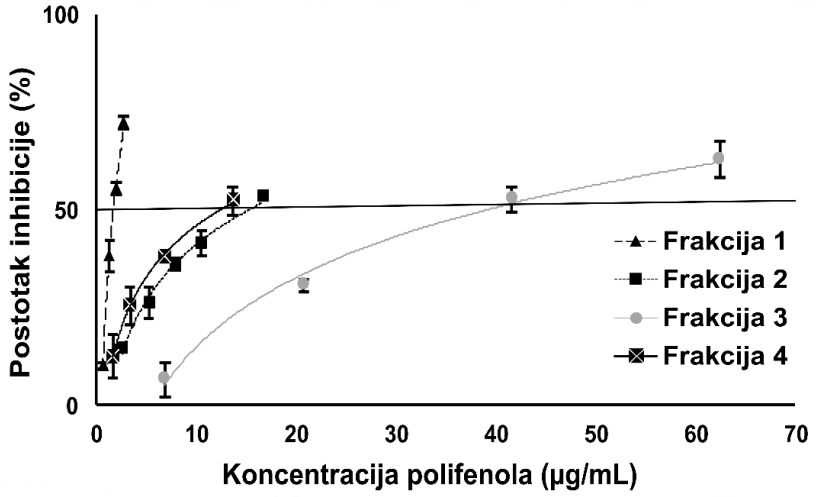
4.4.2. Inhibicija α-glukozidaze



Slika 25 Inhibicije α-glukozidaze pomoću akarboze koristeći škrob kao supstrat (vrijeme reakcije 17,5 min)



Slika 26 Inhibicija α-glukozidaze pomoću polifenola pristunih u frakcijama tradicionalnih ('Citronka' i 'Kolačara') i komercijalnih ('Idared') jabuka. (A) kožica jabuke; (B) meso jabuke (vrijeme reakcije 17,5 min)



Slika 27 Inhibicija α-glukozidaze pomoću polifenola pristunih u frakcijama plodova crne bazge (vrijeme reakcije 17,5 min)

Tablica 16 IC_{50} vrijednosti (µg/mL) dobivene za inhibiciju aktivnosti α-glukozidaze pomoću polifenolinh frakcija kožice i mesa tradicionalnih i komercijalnih plodova jabuke i crne bazge

Inhibitor	**IC_{50} (µg/mL)**			
	Frakcija 1	Frakcija 2	Frakcija 3	Frakcija 4
Kožica jabuke				
Tradicionalni kultivar 1	$^{***}3,44 \pm 0,26^{b}$	$^{***}3,84 \pm 0,14^{b}$	$^{***}9,56 \pm 0,15^{a}$	
Tradicionalni kultivar 2	$^{***}11,27 \pm 0,38^{a}$	$^{***}2,43 \pm 0,13^{b}$	$^{***}2,31 \pm 0,11^{b}$	
Komercijalni kultivar	$^{***}12,47 \pm 0,31^{b}$	$^{***}21,91 \pm 1,11^{a}$	$^{***}24,34 \pm 0,77^{a}$	
Meso jabuke				
Tradicionalni kultivar 1	$^{***}4,88 \pm 0,09^{b}$	$^{***}9,05 \pm 0,03^{a}$	$^{***}0,44 \pm 0,03^{c}$	
Tradicionalni kultivar 2	$^{***}8,02 \pm 0,17^{a}$	$^{***}1,59 \pm 0,11^{b}$	$^{***}0,34 \pm 0,03^{c}$	
Komercijalni kultivar	$^{***}9,64 \pm 0,34^{a}$	$^{***}6,85 \pm 0,18^{b}$	$^{***}0,50 \pm 0,02^{c}$	
Bobice crne bazge	$^{***}1,75 \pm 0,07^{c}$	$^{***}15,27 \pm 1,87^{b}$	$^{***}39,32 \pm 3,86^{a}$	$^{***}12,70 \pm 2,56^{b}$

Tradicionalni kultuvar 1- 'Citronka' žuto zelene boje kožice, tradicionalni kultivar 2 'Kolačara' crvene boje kožice, komercijalni kultivar 'Idared' crvene boje kožice

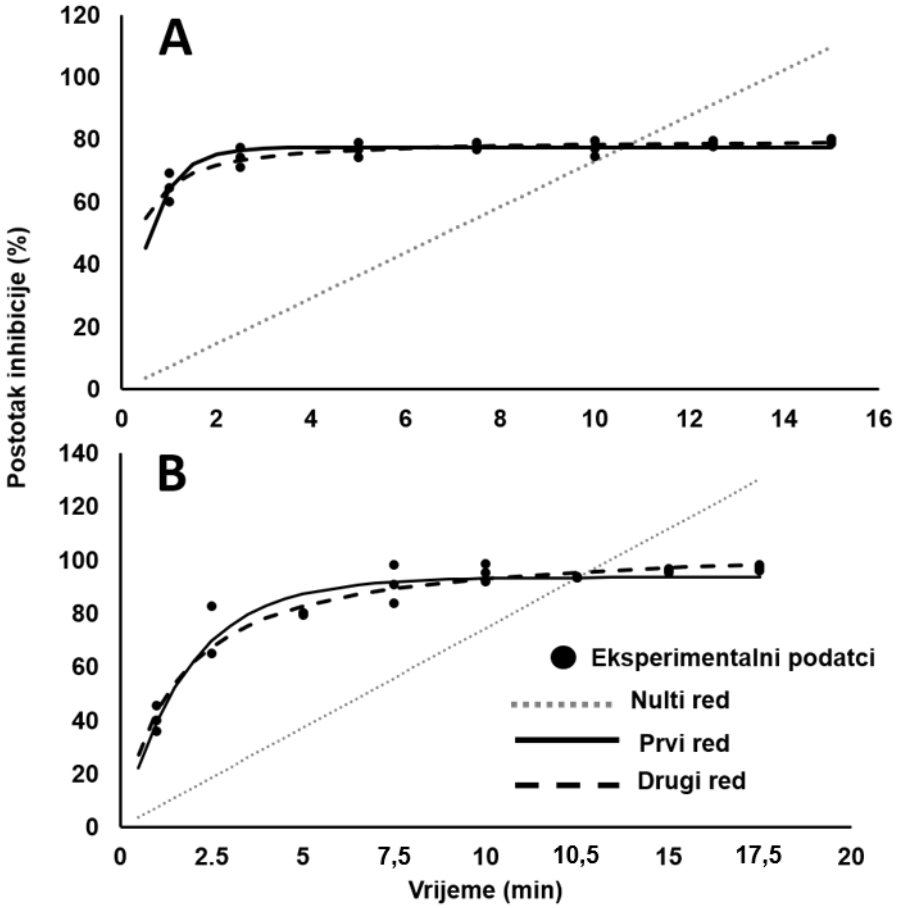
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3).

Vrijeme reakcije 17,5 min

Vrijednosti u redu s različitim slovima su statistički značajno različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.

Vrijednosti sa zvijezdicom su statistički značajno različite od vrijednosti akarboze prema t-testu (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; p ≤ 0,001)

4.4.3. Kinetika inhibicije enzima



Slika 28 Nelinearna regresija eksperimentalnih podataka (% inhibicije enzima ukupnim polifenolima kožice jabuke u ovisnosti o vremenu) jednadžbama nultog, prvog i drugog reda. A- α-amilaza; B- α- glukozidaza

Tablica 17 Standardne greške modela dobivene primjenom kinetičkih modela nultog, prvog i drugog reda na primjeru za inhibiciju enzima polifenolima kožice i mesa plodova jabuke i crne bazge

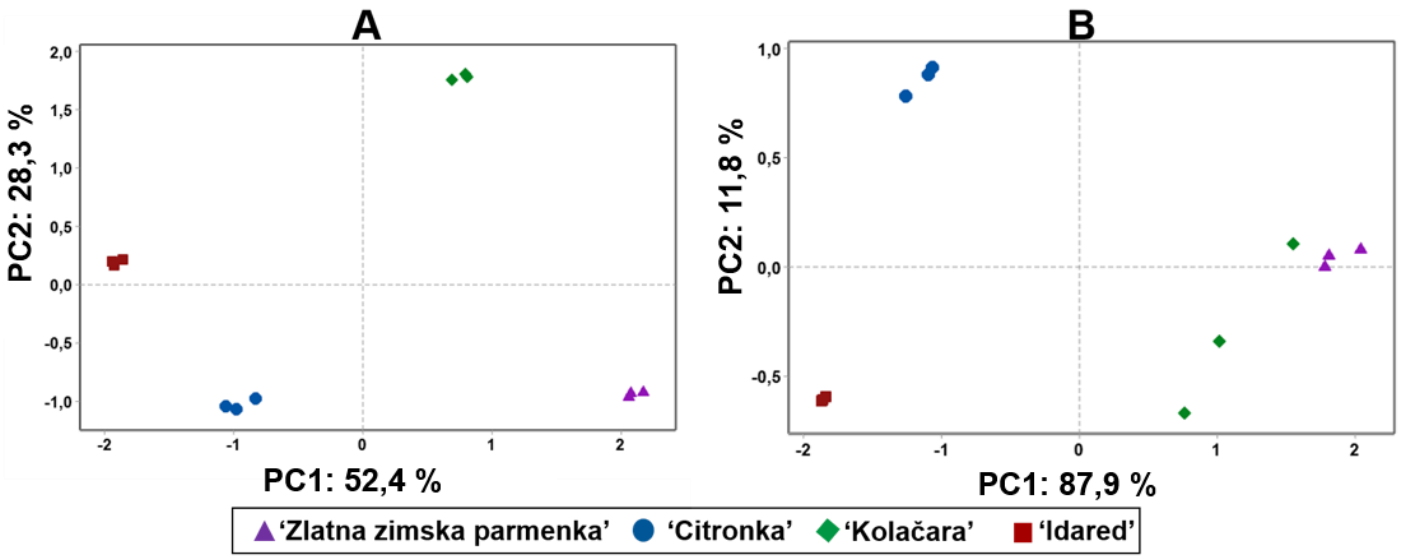
	Standardna greška modela (SE)		
	Nulti red	Prvi red	Drugi red
α-amilaza			
Kožica jabuke	39,1	2,6	2,9
Meso jabuke	43,5	19,4	19,7
Plodovi crne bazge	15,5	4,3	2,8
α-glukozidaza			
Kožica jabuke	33,2	5,3	6,7
Meso jabuke	40,2	9,7	10,5
Plodovi crne bazge	19,6	9,4	9,9

Tablica 18 Kinetički parametri modela prvog reda za inhibiciju probavnih enzima polifenolima plodova jabuke i crne bazge

	I_{eksp} (%)	I_{∞} (%)	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	SE
α-amilaza					
Kožica jabuke	79,6	77,6	1,760	0,4	2,6
Meso jabuke	87,0	82,2	2,543	0,3	19,4
Plodovi crne bazge	44,2	38,9	0,971	0,7	4,3
α-glukozidaza					
Kožica jabuke	97,2	93,6	0,546	1,3	5,3
Meso jabuke	96,1	90,9	0,317	2,2	9,7
Plodovi crne bazge	91,8	101,5	0,151	4,6	9,4

4.5. Simuliran probavni process

4.5.1. Simulirani probavni proces kožice plodova jabuke bez i s dodatkom β-glukana



Slika 29 Primjena analize glavnih komponenti na količinu polifenolnih skupina kožice (A) i mesa (B) plodova tradicionalnih i komercijalnih kultivara jabuke

Tablica 19 Količina polifenola (mg/kg svježe mase) u kožici plodova jabuke 'Zlatne Zimske Parmenke' nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simulirane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana

	Prije probave	Usta		Želudac		Tanko crijevo	
		Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Antocijanini							
cijanidin-3-galaktozid	65,2±6,1^{a}	12,1±0,4^{c}	10,7±1,2^{c}	27,0±2,3^{b}	27,1±2,2^{b}		
Ukupno	65,2±6,1^{a}	12,1±0,4^{c}	10,7±1,2^{c}	27,0±2,3^{b}	27,1±2,2^{b}		
Flavan-3-oli							
(+)-katehin	228,4±6,9^{a}	54,5±2,1^{c}	44,8±4,3^{c}	132,1±6,7^{b}	125,1±3,0^{b}		
procijanidin B1	158,7±10,1^{a}	34,3±0,1^{c}	31,8±2,2^{c}	73,8±3,8^{b}	69,5±0,5^{b}		
Ukupno	387,1±9,5^{a}	88,7±1,4^{c}	76,6±5,2^{c}	205,9±10,5^{b}	194,7±1,7^{b}		
Dihidrokalkoni							
floretin-2-glukozid	552,8±16,3^{a}	168,4±4,9^{f}	156,9±9,2^{f}	351,8±4,9^{b}	293,2±1,8^{c}	252,2±3,2^{d}	188,9±7,5^{e}
floretin-2-ksiloglukozid	164,9±3,3^{b}	52,6±0,7^{d}	57,4±5,9^{d}	181,9±11,4^{a}	108,8±6,1^{c}	57,7±0,8^{d}	113,8±7,4^{c}
Ukupno	717,7±18,6^{a}	221,0±4,0^{e}	215,5±1,6^{e}	533,8±16,3^{b}	408,5±12,6^{c}	309,9±2,4^{d}	297,5±14,9^{d}
Fenolne kiseline							
klorogenska kiselina	479,6±6,8^{a}	199,3±6,4^{d}	185,8±9,3^{d,e}	332,9±5,5^{b}	282,5±22,0^{c}	169,3±4,1^{e}	143,7±3,4^{f}
Ukupno	479,6±6,8^{a}	199,3±6,4^{d}	185,8±9,3^{d,e}	332,9±5,5^{b}	282,5±22,0^{c}	169,3±4,1^{e}	143,7±3,4^{f}
Flavonoli							
kvercetin-3-galaktozid	237,4±10,5^{a}	60,9±0,6^{d}	62,4±1,9^{d}	138,4±1,1^{b}	131,2±4,2^{b}	109,1±3,0^{c}	97,9±2,3^{c}
kvercetin-3-glukozid	262,8±9,0^{a}	62,1±1,2^{e}	58,8±1,5^{e}	155,2±1,9^{b}	123,5±3,8^{c}	114,9±4,0^{c}	77,3±2,9^{d}
derivat kvercetina	108,2±4,2^{a}	26,5±1,0^{d}	27,9±0,2^{d}	63,4±0,1^{b}	59,9±3,4^{b,c}	53,7±0,8^{c}	56,2±4,9^{b,c}
kvercetin-3-ksilozid	194,0±7,7^{a}	41,2±1,6^{e}	41,2±0,1^{e}	112±3,8^{b}	96,8±1,5^{c}	88,1±5,0^{c,d}	85,0±2,7^{d}
kvercetin-3-ramnozid	64,1±1,4^{a}	11,1±0,3^{d}	10,7±0,5^{d}	25,4±2,0^{b,c}	23,5±1,9^{c}	28,1±1,2^{b}	24,7±2,3^{b,c}
Ukupno	866,5±25,9^{a}	201,8±0,8^{f}	201,1±2,6^{f}	494,5±7,9^{b}	434,9±14,8^{c}	393,9±9,6^{d}	341,1±6,9^{e}
Ukupni polifenoli	2516,1±8,9^{a}	723,0±0,5^{f}	688,4±8,1^{f}	1603,4±38,6^{b}	1347,6±23,7^{c}	876,5±17,5^{d}	787,6±19,3^{e}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.
Ekstrakti su pripremljeni 3 puta, simulirana probava u ustima, želudcu i tankom crijevu je provedena 3 puta, a mjerenje jedan put (n=3).

Tablica 20 Količina polifenola (mg/kg svježe mase) u kožici plodova jabuke 'Citronke' nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana

	Prije probave	Usta		Želudac		Tanko crijevo	
		Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Flavan-3-oli							
(+)-katehin	70,8±2,1^{a}	12,4±0,8^{c}	11,9±0,3^{c}	27,8±0,1^{b}	27,9±0,2^{b}		
procijanidin B1	91,0±2,8^{a}	22,3±1,9^{c}	20,4±1,5^{c}	54,5±1,3^{b}	54,5±1,0^{b}		
Ukupno	161,8±4,8^{a}	34,7±1,9^{c}	32,4±1,7^{c}	82,3±0,7^{b}	82,0±1,3^{b}		
Dihidrokalkoni							
floretin-2-glukozid	52,8±0,2^{a}	10,9±1,9^{c}	10,7±3,1^{c}	23,9±1,2^{b}	24,1±0,5^{b}	8,4±1,0^{d}	5,8±1,9^{d}
Ukupno	52,8±0,2^{a}	12,4±1,6^{c}	12,3±3,9^{c}	23,9±1,2^{b}	24,1±0,5^{b}	8,4±1,0^{d}	5,8±1,9^{d}
Fenolne kiseline							
klorogenska kiselina	276,7±6,8^{a}	78,1±1,0^{c}	70,7±4,6^{c}	122,7±1,9^{b}	122,0±4,0^{b}	69,6±2,7^{c}	54,8±5,2^{c}
Ukupno	276,7±6,8^{a}	78,1±1,0^{c}	70,7±4,6^{c}	122,7±1,9^{b}	122,0±4,0^{b}	69,6±2,7^{c}	54,8±5,2^{c}
Flavonoli							
kvercetin-3-galaktozid	383,6±17,2^{a}	84,5±10,3^{c}	78,7±12,0^{c}	200,3±1,5^{b}	193,7±3,0^{b}	185,3±3,8^{b}	179,1±5,8^{b}
kvercetin-3-glukozid	185,7±9,6^{a}	41,9±2,6^{e}	38,5±4,9^{e}	98,2±4,8^{b}	92,6±0,1^{b,c}	85,5±1,9^{c}	78,9±1,9^{c}
derivat kvercetina	185,5±1,7^{a}	35,6±6,4^{c}	30,3±2,9^{c}	96,9±1,6^{b}	92,0±2,1^{b}	94,9±0,9^{b}	93,8±5,8^{b}
kvercetin-3-ksilozid	353,6±14,6^{a}	53,6±13,4^{c}	44,4±8,7^{c}	156,9±1,6^{b}	154,4±2,1^{b}	158,9±5,5^{b}	153,4±1,4^{b}
kvercetin-3-ramnozid	275,1±11,3^{a}	50,6±6,0^{c}	44,8±4,9^{c}	124,2±2,2^{b}	120,3±2,3^{b}	132,6±0,1^{b}	127,8±3,0^{b}
Ukupno	1383,5±45,4^{a}	266,3±27,4^{c}	236,7±23,7^{c}	679,5±11,5^{b}	657,9±11,0^{b}	653,6±5,1^{b}	632,9±10,4^{b}
Ukupni polifenoli	1875,0±46,0^{a}	391,5±30,1^{c}	352,1±28,9^{c}	910,3±11,1^{b}	883,2±11,3^{b}	732,8±16,7^{b}	693,6±26,0^{b}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.
Ekstrakti su pripremljeni 3 puta, simulirana probava u ustima, želudcu i tankom crijevu je provedena 3 puta, a mjerenje jedan put (n=3).

Tablica 21 Količina polifenola (mg/kg svježe mase) u kožici plodova jabuke 'Kolačare' nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana

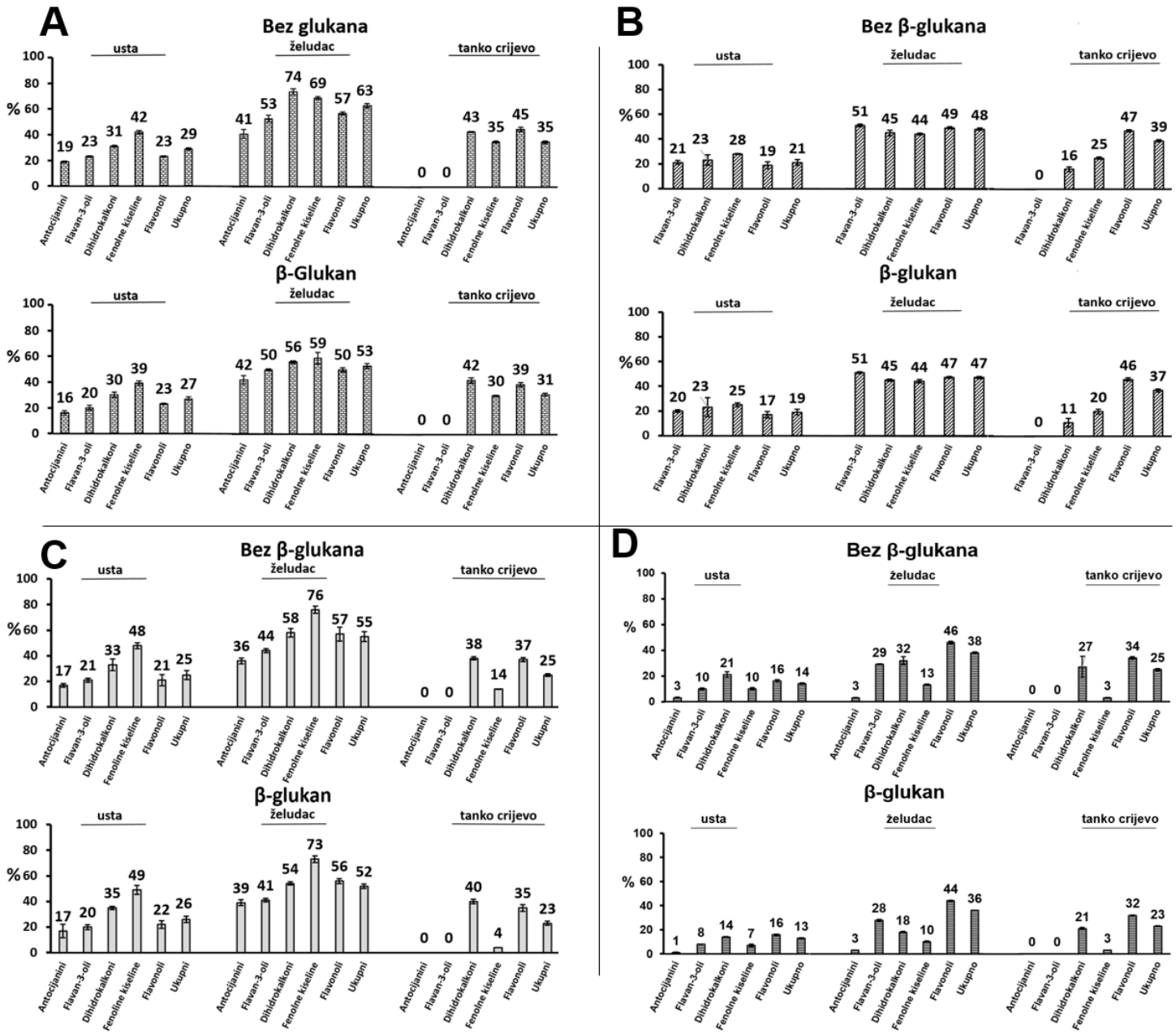
	Prije probave	Usta		Želudac		Tanko crijevo	
		Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Antocijanini							
cijanidin-3-galaktozid	13,2±3,6^{a}	2,2±0,2^{b}	2,3±0,7^{b}	4,7±0,3^{b}	5,1±0,3^{b}		
Ukupno	13,2±3,6^{a}	2,2±0,2^{b}	2,3±0,7^{b}	4,7±0,3^{b}	5,1±0,3^{b}		
Flavan-3-oli							
(+)-katehin	281,1±3,1^{a}	54,9±1,1^{d}	52,4±2,0^{d}	131,8±8,3^{b}	115,3±5,3^{c}		
(-)epikatehin	166,8±9,6^{a}	37,8±7,0^{c}	38,2±6,8^{c}	70,0±0,4^{b}	68,5±0,6^{b}		
procijanidin B1	123,6±5,1^{a}	26,0±1,4^{c}	22,7±2,7^{c}	52,0±1,0^{b}	48,2±1,6^{b}		
Ukupno	571,5±11,4^{a}	118,7±9,4^{d}	113,3±11,5^{d}	253,9±8,9^{b}	232,0±7,5^{c}		
Dihidrokalkoni							
floretin-2-glukozid	342,9±13,7^{a}	115,4±17,2^{d}	123,5±4,5^{d}	212,9±8,7^{b}	206,9±3,3^{b}	155,0±5,5^{c}	164,5±6,9^{c}
floretin-2-ksiloglukozid	63,7±10,2^{a}	17,1±1,8^{b}	16,9±1,0^{b}	22,8±4,8^{b}	12,5±1,7^{b}		
Ukupno	406,6±15,6^{a}	132,5±10,9^{d}	140,5±3,9^{d}	235,8±12,4^{b}	219,4±4,9^{b}	155,0±5,5^{c}	164,5±6,9^{c}
Fenolne kiseline							
klorogenska kiselina	174,1±14,9^{a}	84,0±4,1^{c}	84,9±6,2^{c}	133,0±4,8^{b}	127,7±4,3^{b}	24,0±0,1^{d}	12,2±0,1^{d}
Ukupno	174,1±14,9^{a}	84,0±4,1^{c}	84,9±6,2^{c}	133,0±4,8^{b}	127,7±4,3^{b}	24,0±0,1^{d}	12,2±0,1^{d}
Flavonoli							
kvercetin-3-galaktozid	169,6±10,6^{a}	49,0±9,6^{d}	58,5±5,5^{c,d}	131,8±15,8^{b}	128,7±3,9^{b}	78,6±2,8^{c}	66,9±9,2^{c,d}
kvercetin-3-glukotid	309,7±17,8^{a}	52,9±8,0^{c}	50,3±11,6^{c}	129,2±11,9^{b}	125,4±4,8^{b}	73,7±3,6^{c}	70,5±7,2^{c}
Derivat kvercetina	165,6±8,7^{a}	21,7±2,3^{d}	21,7±1,6^{d}	76,8±7,5^{b}	75,3±4,2^{b}	47,4±1,9^{c}	45,2±0,7^{c}
kvercetin-3-ksilozid	218,7±8,9^{a}	46,2±14,6^{d}	46,7± 5,4^{d}	135,5±10,7^{b}	131,6±3,4^{b}	98,0±3,8^{c}	93,1±6,7^{c}
Kvercetin-3-ramnozid	85,6±3,6^{a}	16,4±2,8^{c}	16,7±1,8^{c}	41,2±2,2^{b}	39,4±0,9^{b}	36,8±1,7^{b}	35,9±0,9^{b}
Ukupno	949,2±40,7^{a}	186,2±36,4^{d}	194,0±20,6^{d}	514,5±47^{b}	500,5±16,9^{b}	334,4±11,0^{c}	311,6±18,6^{c}
Ukupni polifenoli	2114,6±69,8^{a}	523,6±53,7^{c}	535,2±36,4^{c}	1142,1±65,8^{b}	1085,0±24,22^{b}	513,4±13,6^{c}	488,5±22,5^{c}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.
Ekstrakti su pripremljeni 3 puta, simulirana probava u ustima, želudcu i tankom crijevu je provedena 3 puta, a mjerenje jedan put (n=3).

Tablica 22 Količina polifenola (mg/kg svježe mase) u kožici plodova jabuke 'Idared' nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana

	Prije probave	Usta		Želudac		Tanko crijevo	
		Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Antocijanini							
cijanidin-3-galaktozid	145,8±0,6^{a}	4,0±1,0^{b}	2.2±0.6^{c}	4,8±0,4^{b}	3,8±0,3^{b}		
Ukupno	145,8±0,6^{a}	4,0±1,0^{b}	2.2±0.6^{c}	4,8±0,4^{b}	3,8±0,3^{b}		
Flavan-3-oli							
(+)-katehin	69,2±1,9^{a}	7,9±0,8^{c}	5,1±0,7^{c}	24,8±3,0^{b}	24,3±1,7^{b}		
procijanidin B1	87,1±3,3^{a}	9,3±0,8^{c}	8,8±0,2^{c}	24,4 0,4^{b}	24,6±0,1^{b}		
procijanidin B2	133,9±3,0^{a}	10,7±1,4^{c}	10,0±0,2^{c}	36,1±0,4^{b}	33,5±3,0^{b}		
Ukupno	290,2±6,2^{a}	27,9±1,6^{c}	23,8±1,2^{c}	85,3±2,5^{b}	82,2±3,5^{b}		
Dihidrokalkoni							
floretin-2-glukozid	60,2±1,2^{a}	12,3±1,7^{c,d}	8,6±0,2^{d}	19,2±2,0^{b}	10,7±0,4^{d}	16,4±4,7^{b,c}	12,6±0,3^{c,d}
Ukupno	60,2±1,2^{a}	12,3±1,7^{c,d}	8,6±0,2^{d}	19,2±2,0^{b}	10,7±0,4^{d}	16,4±4,7^{b,c}	12,6±0,3^{c,d}
Fenolne kiseline							
klorogenska kiselina	94,6±5,4^{a}	9,7±1,8^{b,c}	6,7±1,2^{c,d}	12,3±0,9^{b}	9,3±0,6^{b,c}	2,7±0,2^{d}	2,6±0,1^{d}
Ukupno	94,6±5,4^{a}	9,7±1,8^{b,c}	6,7±1,2^{c,d}	12,3±0,9^{b}	9,3±0,6^{b,c}	2,7±0,2^{d}	2,6±0,1^{d}
Flavonoli							
kvercetin-3-galaktozid	417,5±2,4^{a}	62,1±11,8^{d,e}	59,5±1,5^{e}	140,7±5,3^{b}	141,9±0,8^{b}	87,3±9,0^{c}	74,1±3,3^{c,d}
kvercetin-3-glukotid	162,0±6,9^{a}	26,8±0,7^{d}	33,8±2,6^{d}	141,4±8,6^{b}	142,9±3,9^{b}	114,6±0,7^{c}	113,9±9,1^{c}
derivat kvercetina 1	79,5±0,7^{a}	13,3±0,9^{d}	8,9±0,4^{e}	25,9±1,1^{b}	23,2±0,5^{c}	14,5±1.7^{d}	13,2±0.6^{d}
derivat kvercetina 2	63,5±2,2^{a}	15,1±1,3^{c}	8,8± 0,5^{d,e}	19,9±0,5^{b}	12,1±0,6^{c,d}	11,2±1,7^{d,e}	8,4±1,4^{e}
kvercetin-3-ksilozid	379,3±4,2^{a}	59,9±7,8^{e}	54,8± 2,8^{e}	146,2±0,2^{b}	135,8±2,1^{b}	103,4±4,5^{c}	89,9±7,7^{d}
kvercetin-3-ramnozid	255,7±8,6^{a}	42,9±3,0^{d}	53,8±3,5^{d}	144,2±3,7^{b}	135,6±2,8^{b,c}	137,4±4,2^{b,c}	129,5±4,1^{c}
Ukupno	1375,5±23,8^{a}	220,4±17,1^{e}	219,7±3,1^{e}	618,5±12,7^{b}	591,6±6,2^{b}	468,4±16,7^{c}	429,2±2,8^{d}
Ukupni polifenoli	1948,4±31,1^{a}	274,4±18,8^{d}	261,1±4,0^{d}	740,1±13,9^{b}	697,6±6,8^{b}	487,4±21,3^{c}	444,3±3,0^{c}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.
Ekstrakti su pripremljeni 3 puta, simulirana probava u ustima, želudcu i tankom crijevu je provedena 3 puta, a mjerenje jedan put (n=3)..



Slika 30 Postotak polifenola oslobođenih iz kožice plodova jabuke nakon simulirane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana. A- 'Zlatna Zimska Parmenka'; B- 'Citronka'; C- 'Kolačara'; D- ''Idared'

4.5.2. Simulirani probavni proces mesa plodova jabuka bez i s dodatkom β-glukana

Tablica 23 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u mesu plodova jabuke 'Zlatne Zimske Parmenke' nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana

	Prije probave	Usta		Želudac		Tanko crijevo	
		Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Flavan-3-oli							
(+)-katehin	54,3±5,2^{a}	12,6±0,0^{b}	12,2±1,4^{b}	55,3±7,0^{a}	49,3±2,6^{a}		
(-)-epikatehin	18,1±2,3^{b}	4,9±0,3^{d}	5,0±1,4^{d}	21,2±0,8^{a}	17,2±0,2^{b}	9,3±0,7^{c}	6,5±1,3^{c,d}
procijanidin B1	56,1±5,8^{a}	7,4±1,2^{c}	11,5±0,7^{c}	34,3±1,9^{b}	34,0±0,1^{b}	37,5±1,0^{b}	37,3±0,4^{b}
procijanidin B2	30,9±1,1^{a}	5,4±0,8^{d}	6,0±0,1^{d}	16,1±0,4^{c}	16,0±0,2^{c}	28,7±0,4^{b}	28,1±0,2^{b}
Ukupno	159,3±2,2^{a}	30,4±2,0^{d}	34,3±3,7^{d}	126,9±10,0^{b}	116,7±3,3^{b}	75,5±1,0^{c}	72,0±1,6^{c}
Dihidrokalkoni							
floretin-2-glukozid	9,9±1,0^{a}	4,3±0,0^{c}	4,1±0,5^{c}	8,7±1,2^{a,b}	7,7±0,8^{b}	3,4±0,7^{c}	2,5±0,2^{c}
floretin-2-ksiloglukozid	29,2±1,5^{a}	16,5±0,1^{c}	17,3±1,0^{c}	28,6±1,8^{a}	23,9±2,1^{b}	14,8±0,8^{c}	14,5±1,0^{c}
Ukupno	39,1±2,3^{a}	20,8±0,1^{c}	21,5±1,5^{c}	37,4±2,6^{a}	31,6±2,9^{b}	18,2±1,4^{c}	17,1±1,2^{c}
Fenolne kiseline							
klorogenska kiselina	298,6±5,1^{a}	79,8±0,0^{e}	83,8±3,4^{e}	201,2±9,7^{b}	171,1±1,0^{c}	142,3±3,1^{d}	135,8±0,9^{d}
izomer klorogenske kiseline	35,5±0,2^{a}	4,8±0,1^{d}	3,8±0,2^{d}	29,8±2,0^{b}	26,4±0,4^{c}	31,4±0,9^{b}	32,9±0,6^{b}
p-kumaroilkina kiselina	36,9±3,4^{a}	11,1±0,1^{c}	10,9±0,5^{c}	19,3±0,6^{b}	17,0±0,2^{b}	12,2±1,6^{c}	11,2±0,4^{c}
Ukupno	371,1±7,9^{a}	95,8±0,0^{e}	98,7±3,5^{e}	250,3±6,0^{b}	214,6±6,3^{c}	185,8±1,8^{d}	179,9±2,3^{d}
Ukupni polifenoli	569,6±12,0^{a}	147,0±0,3^{e}	154,5±8,0^{e}	414,6±17,4^{b}	362,9±11,5^{c}	279,7±0,9^{d}	269,1±4,3^{d}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.
Ekstrakti su pripremljeni 3 puta, simulirana probava u ustima, želudcu i tankom crijevu je provedena 3 puta, a mjerenje jedan put (n=3)

Tablica 24 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u mesu plodova jabuke 'Citronke' nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana

	Prije probave	Usta		Želudac		Tanko crijevo	
		Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Dihidrokalkoni							
floretin-2-glukozid	7,4±0,8^{a}	2,4±0,4^{b,c}	0,7±0,3^{c}	4,6±0,7^{a,b}	3,7±0,2^{b}	6,9±1,3^{a}	3,2±0,8^{b,c}
floretin-2-ksiloglukozid	4,8±0,8^{a}	1,4±0,4^{b}	1,6±0,2^{b}	2,5±0,1^{b}	2,4±0,3^{b}	2,5±0,1^{b}	1,9±0,6^{b}
Ukupno	12,2±1,3^{a}	3,8±0,3^{c,d}	2,3±0,5^{d}	7,1±0,6^{b,c}	6,1±0,4^{b,c,d}	9,4±1,4^{a,b}	5,1±1,3^{c,d}
Fenolne kiseline							
derivat klorogenske						4,6±0,7^{b}	5,9±0,5^{a}
klorogenska kiselina	180,6±7,5^{a}	57,6±1,9^{d,e}	40,4±5,3^{e}	93,2±3,5^{b}	85,6±4,3^{b,c}	70,4±6,9^{c,d}	67,7±9,5^{c,d}
izomer klorogenske kiseline	23,7±2,8^{a}	6,9±0,8^{c,d,e}	4,2±0,5^{e}	12,2±2,1^{b}	9,9±0,6^{b,c}	9,1±0,3^{b,c,d}	9,2±0,2^{b,c,d}
p-kumaroilkina kiselina	5,8±1,2^{a,b}	4,8±0,1^{a,b}	2,7±0,1^{b,c}	6,7±2,0^{a}	5,6±1,1^{a,b}	1,7±1,5^{c}	1,3±0,1^{c}
Ukupno	210,1±5,9^{a}	69,3±10,8^{d,e}	47,4±4,1^{e}	112,1±8,7^{b}	101,2±4,4^{b,c}	85,4±5,4^{b,c,d}	84,2±9,5^{b,c,d}
Ukupni polifenoli	222,4±5,8^{a}	73,1±10,8^{d,e}	49,7±4,5^{e}	119,2±9,3^{b}	107,3±6,4^{b,c}	94,8±2,2^{c,d}	89,3±9,3^{c,d}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.
Ekstrakti su pripremljeni 3 puta, simulirana probava u ustima, želudcu i tankom crijevu je provedena 3 puta, a mjerenje jedan put (n=3).

Tablica 25 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u mesu plodova jabuke 'Kolačare' nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana

	Prije probave	Usta		Želudac		Tanko crijevo	
		Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Flavan-3-oli							
(+)-katehin	50,9±6,7^{a}	4,7±0,6^{c}	3,1±0,4^{c}	11,5±4,1^{b}	10,5±3,8^{b}		
(-)-epikatehin	19,1±2,4^{a}	1,5±0,4^{b}	0,2±0,2^{b}	0,5±0,7^{b}	0,9±1,4^{b}		
procijanidin B1	52,7±1,8^{a}	4,3±0,1^{c}	4,1±0,1^{c}	12,4±0,8^{b}	11,9±0,2^{b}		
procijanidin B2	29,3±1,7^{a}	4,1±0,0^{c}	4,0±0,1^{c}	10,7±0,1^{b}	10,8±0,2^{b}		
Ukupno	152±8,2^{a}	14,6±1,1^{c}	11,4±0,6^{c}	35,3±3,7^{b}	34,1±5,4^{b}		
Dihidrokalkoni							
floretin-2-glukozid	11,6±2,2^{a}	2,3±0,4^{b,c}	1,2±0,1^{c}	2,9±0,7^{b,c}	4,3±0,7^{b}	9,1±1,3^{a}	11,5±1,2^{a}
floretin-2-ksiloglukozid	18,1±3,2^{a}	2,2±0,5^{c,d}	1,3±0,4^{d}	3,2±0,1^{c,d}	6,2±0,9^{c}	4,3±1,9^{c,d}	7,3±0,1^{b}
Ukupno	29,6±5,4^{a}	4,6±0,9^{d,e}	2,5±0,5^{e}	6,4±0,4^{d,e}	10,4±1,3^{b,c}	13,4±2,2^{b,c}	18,8±1,2^{b}
Fenolne kiseline							
derivat klorogenske						8,8±0,7^{b}	15,9±2,2^{a}
derivat klorogenske						4,0±1,4^{a}	5,5±1,6^{a}
klorogenska kiselina	236,2±45,7^{a}	37,0±7,8^{c,d}	24,6±1,7^{c,d}	70,9±3,3^{b,c}	87,7±12,3^{b}	20,8±0,0^{d}	36,2±2,8^{c,d}
izomer klorogenske kiseline	30,9±3,6^{a}	6,6±1,2^{d}	5,2±0,5^{d}	12,7±1,9^{b,c}	16,8±0,9^{b}	8,5±2,1^{c,d}	18,4±1,7^{b}
p-kumaroilkina kiselina	28,5±7,0^{a}	4,5±0,8^{c}	4,0±0,1^{c}	10,3±2,0^{b,c}	9,7±0,9^{c}	3,3±0,4^{c}	4,2±0,4^{c}
Ukupno	295,7,6±56,1^{a}	48,1±7,6^{c}	33,7±1,9^{c}	93,9±1,9^{b,c}	114,1±10,0^{b}	45,4±3,4^{c}	80,2±1,3^{b,c}
Ukupni polifenoli	477,3±53,7^{a}	67,2±9,5^{c}	47,8±2,4^{c}	135,4±3,1^{b}	158,7±12,8^{b}	58,9±5,3^{c}	99,1±1,4^{b,c}

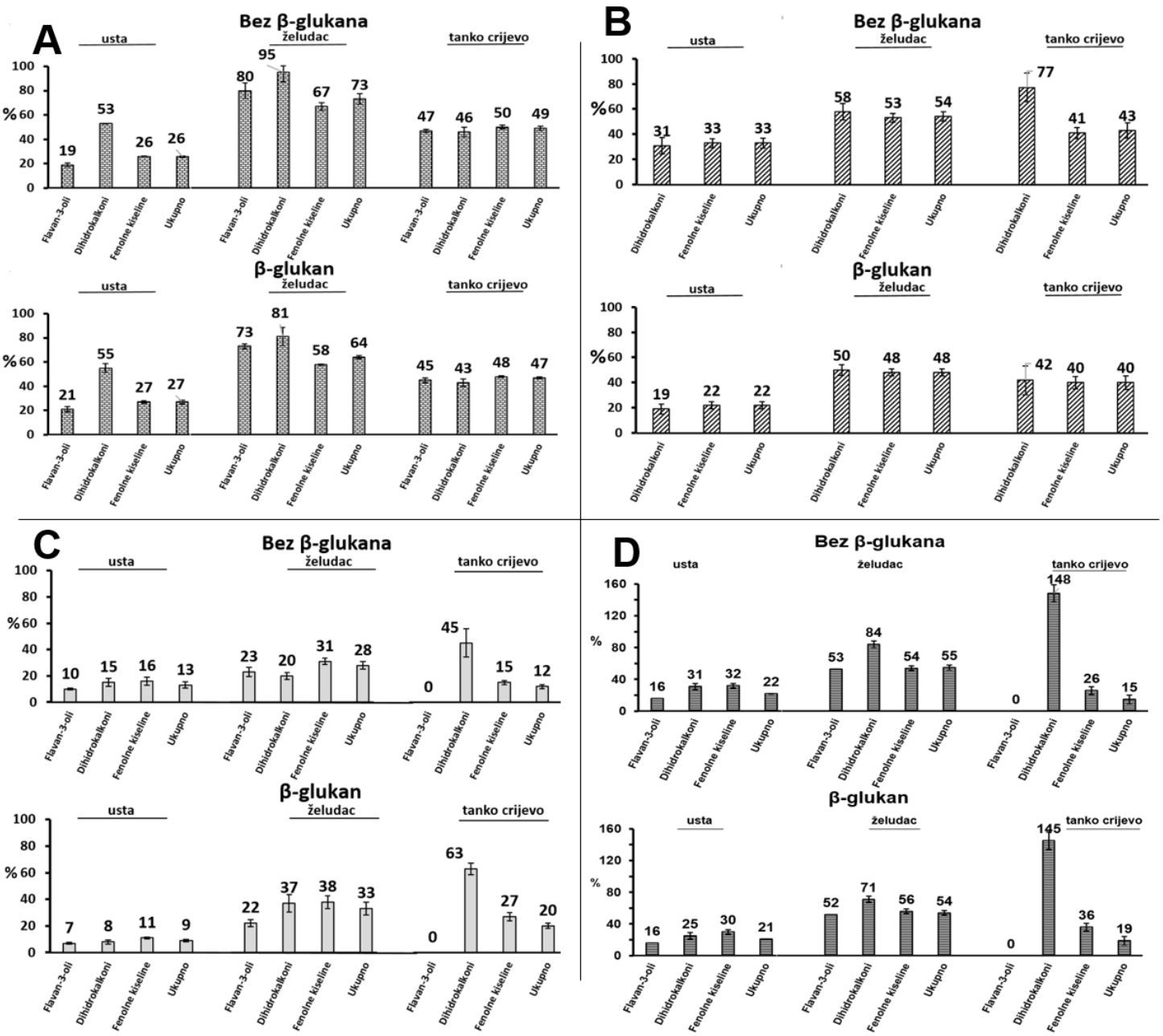
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.
Ekstrakti su pripremljeni 3 puta, simulirana probava u ustima, želudcu i tankom crijevu je provedena 3 puta, a mjerenje jedan put (n=3)

Tablica 26 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u mesu plodova jabuke 'Idared' nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana

	Prije probave	Usta		Želudac		Tanko crijevo	
		Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Flavan-3-oli							
(+)-katehin	1,5±0,1^{b}	0,3±0,1^{c}	0,4±0,1^{c}	2,6±0,2^{a}	2,5±0,2^{a}		
procijanidin B1	25,3±0,1^{a}	4,0±0,1^{c}	4,0±0,1^{c}	11,5±0,1^{b}	11,6±0,1^{b}		
procijanidin B2	25,8±0,1^{a}	4,0±0,0^{d}	4,0±0,0^{d}	13,9±0,4^{b}	13,0±0,4^{c}		
Ukupno	52,6±0,1^{a}	8,4±0,0^{d}	8,4±0,1^{d}	28,1±0,5^{b}	27,1±0,2^{c}		
Dihidrokalkoni							
floretin-2-glukozid	3,5±0,2^{b}	1,1±0,2^{d}	0,9±0,3^{d}	2,9±0,5^{b,c}	2,5±0,3^{c}	5,1±0,1^{a}	5,0±0,1^{a}
Ukupno	3,5±0,2^{b}	1,1±0,2^{d}	0,9±0,3^{d}	2,9±0,5^{b,c}	2,5±0,3^{c}	5,1±0,1^{a}	5,0±0,1^{a}
Fenolne kiseline							
derivat klorogenske kiseline						0,6±0,2^{a}	0,6±0,2^{a}
klorogenska kiselina	23,0±1,3^{a}	7,3±1,3^{c}	6,7±0,7^{c,d}	11,4±0,8^{b}	11,1±0,0^{b}	3,4±0,6^{e}	4,5±0,6^{d,e}
izomer klorogenske kiseline	5,7±0,1^{a}	1,5±0,1^{c}	1,5±0,^{1c}	3,5±0,4^{b}	3,7±0,7^{b}	2,1±0,93^{c}	3,0±0,6^{b}
p-kumaroilkina kiselina	3,5±0,6^{a}	1,4±0,2^{c,d}	1,3±0,5^{c,d}	2,3±0,4^{b,c}	2,9±0,6^{a,b}	2,0±0,5^{b,c}	3,3±0,1^{a}
Ukupno	32,3±2,0^{a}	10,3±2,1^{c,d}	9,8±0,6^{c,d}	17,2±0,3^{b}	17,8±0,8^{b}	8,2±1,1^{d}	11,5±0,5^{c}
Ukupni polifenoli	88,3±2,5^{a}	19,8±1,8^{c}	18,8±1,8^{c}	48,3±2,8^{b}	47,4±11,5^{b}	13,4±1,1^{d}	16,6±0,6c,^{d}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.

Ekstrakti su pripremljeni 3 puta, simulirana probava u ustima, želudcu i tankom crijevu je provedena 3 puta, a mjerenje jedan put (n=3)



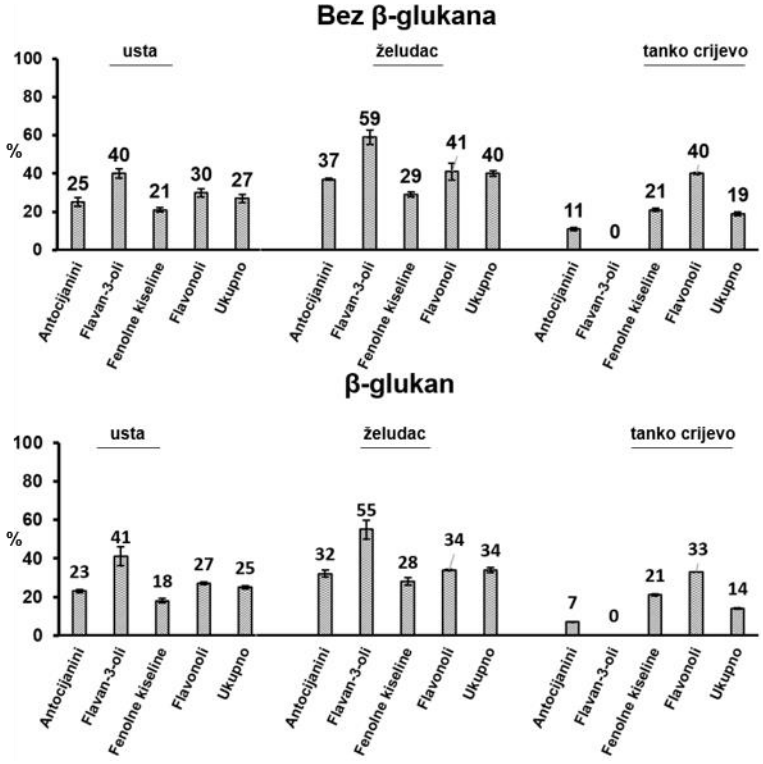
Slika 31 Postotak polifenola oslobođenih iz mesa plodova jabuke nakon simulirane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana. A- 'Zlatna Zimska Parmenka'; B- 'Citronka'; C- 'Kolačara'; D- ''Idared'

4.5.3. Simuliran probavni proces plodova crne bazge bez i s dodatkom β-glukana

Tablica 27 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u plodovima crne bazge nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana

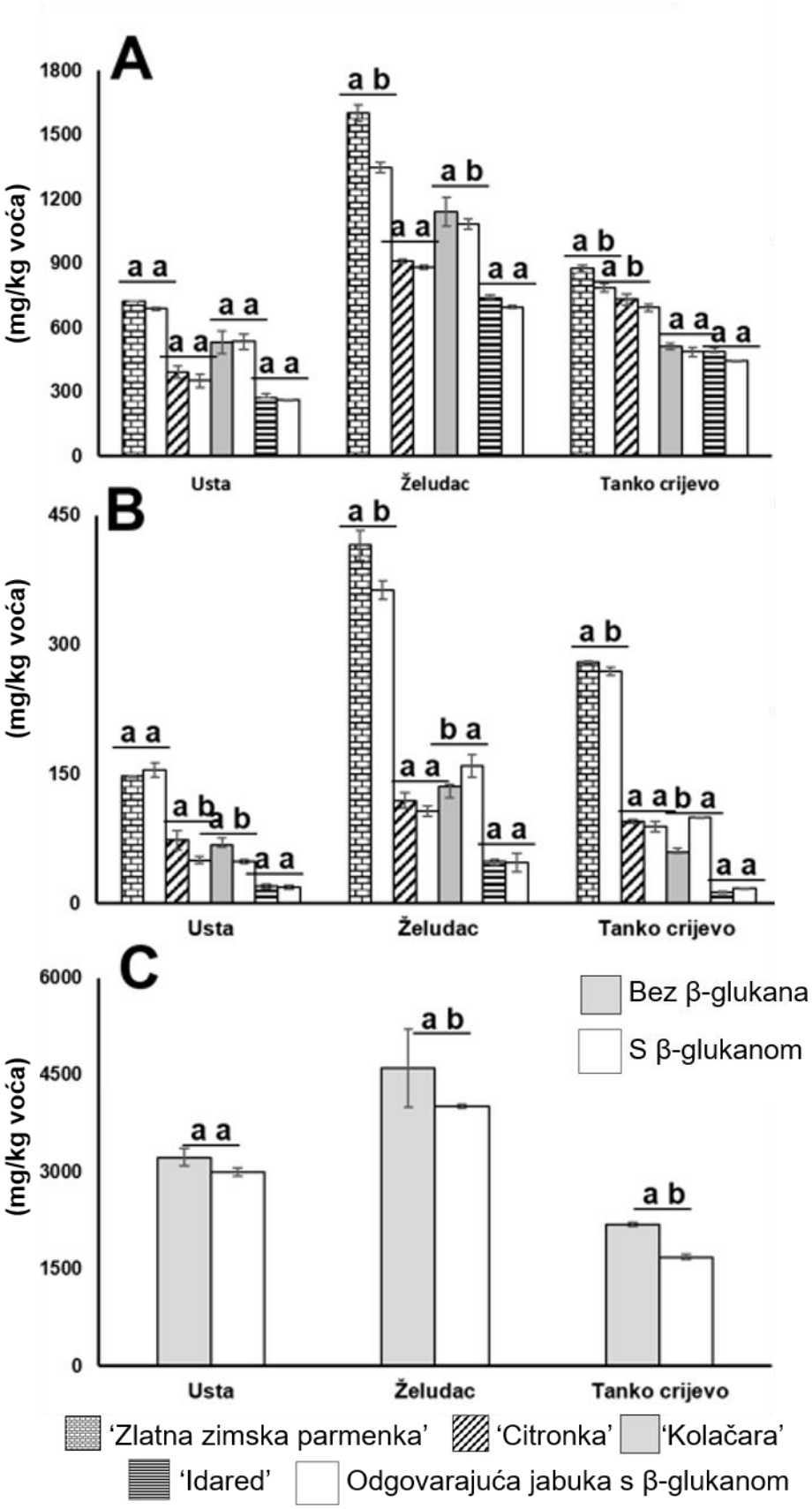
	Prije probave	**Usta**		**Želudac**		**Tanko crijevo**	
		Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Antocijanini							
cijanidin-3-glukozid	1280,7±85,9^{a}	254,4±10,4^{c}	236,9±12,0^{c}	407,1±40,1^{b}	364,3±3,7^{b}	8,7±1,9^{d}	2,1±2,0^{d}
cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid	3055,8±189,7^{a}	931,1±56,6^{c,d}	861,5±22,2^{d}	1273,4±74,8^{b}	1083,8±15,6^{b,c}	808,1±10,7^{d}	544,6±29,7^{d,e}
cijanidin-3-sambubiozd	3962,4±240,3^{a}	883,3±44,1^{c,d}	826,6±35,6^{d}	1416,7±115,7^{b}	1197,3±5,0^{b,c}	93,9±5,7^{d}	45,8±3,1^{e}
Ukupno	8299±515,9^{a}	2068,8±79,9^{c,d}	1925,0±66,0^{d}	3097,2±230,6^{b}	2645,5±16,9^{b,c}	910,7±16,9^{d}	591,8±24,7^{e}
Flavan-3-oli							
(+)-katehin	408,8±26,9^{a}	161,5±1,2^{c}	165,6±13,3^{c}	242,6±0,5^{b}	223,8±6,5^{b}		
Ukupno	408,8±26,9^{a}	161,5±1,2^{c}	165,6±13,3^{c}	242,6±0,5^{b}	223,8±6,5^{b}		
Fenolne kiseline							
klorogenska kiselina	419,1±0,3^{a}	78,4±4,6^{c,d}	66,2±5,4^{d}	74,5±6,6^{d}	88,5±5,5^{c}	110,7±4,4^{b}	110,2±3,5^{b}
neoklorogenska kiselina	107,5±2,1^{a}	30,3±2,3^{c}	29,7±1,3^{c}	59,7±1,6^{b}	61,2±5,1^{b}		
Ukupno	526,6±2,2^{a}	108,7±6,1^{c}	95,9±6,1^{c}	134,2±6,0^{b}	149,7±10,1^{b}	110,7±4,4^{c}	110,2±3,5^{c}
Flavonoli							
kverecetin-3-rutinozid	2860,9±26,3^{a}	864,3±57,3^{d,e}	793,0±15,3^{e}	1167,9±138,6^{b}	966,5±21,1^{c,d}	1119,1±5,4^{b,c}	928,2±18,9^{d,e}
kvercetin-3-glukozid	69,3±3,4^{a}	20,9±1,0^{d}	20,4±0,6^{d}	26,1±0,3^{c,d}	31,3±3,7^{c}	58,4±1,7^{b}	52,7±0,4^{b}
Ukupno	2930,2±28,2^{a}	885,2±58,3^{c,d}	818,5±7,4^{d}	1194,0±138,9^{b}	997,8±22,8^{c}	1177,5±5,4^{b}	980,5±13,2^{c}
Ukupni polifenoli	11755,8±543,8^{a}	3224,8±139,8^{c}	3000±63,3^{c}	4604,6±604,6^{b}	4016,9±26,4^{b}	2191,2±35,1^{d}	1682,9±36,1^{d}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.
Ekstrakti su pripremljeni 3 puta, simulirana probava u ustima, želudcu i tankom crijevu je provedena 3 puta, a mjerenje jedan put (n=3).

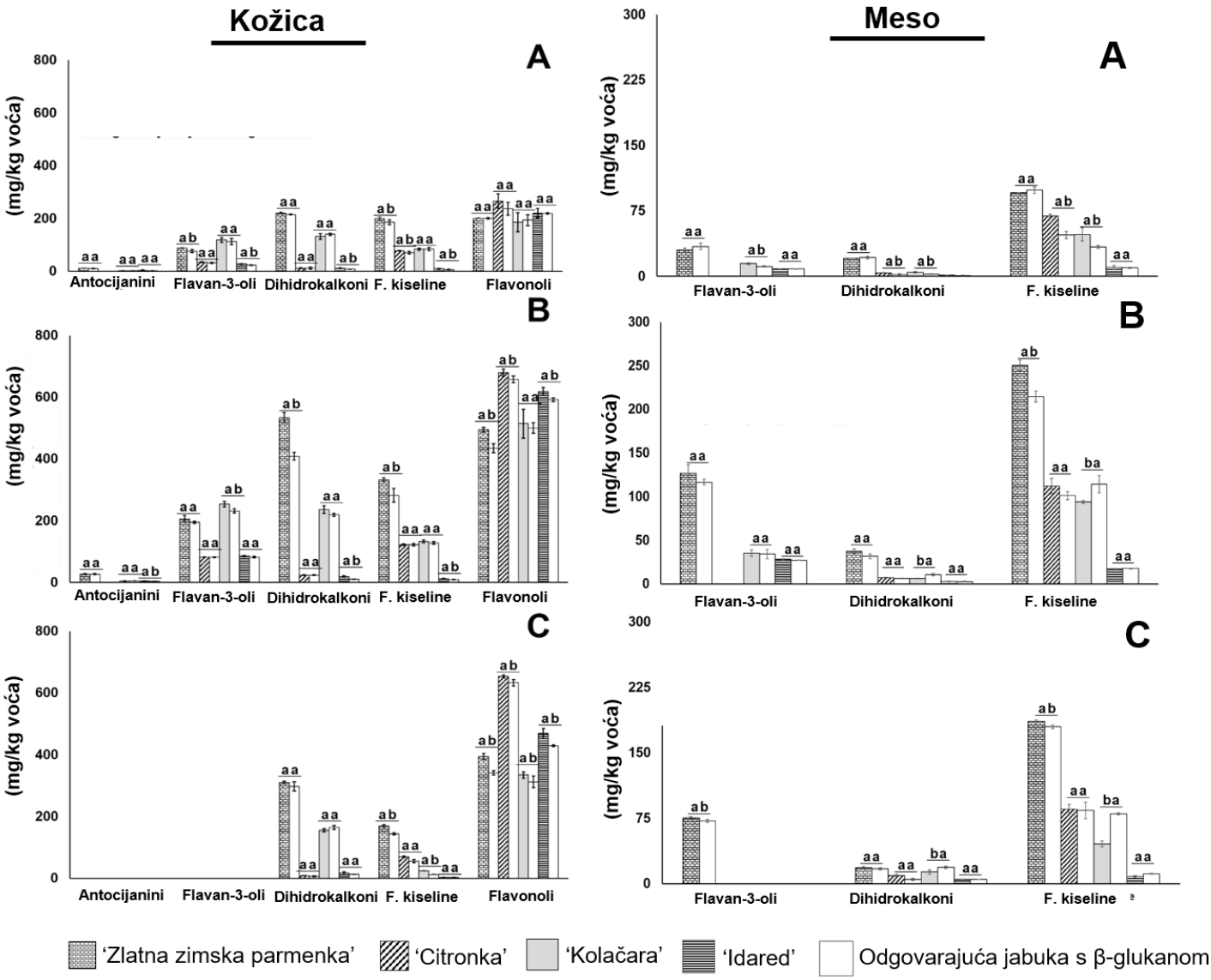


Slika 32 Postotak polifenola oslobođenih iz plodova crne bazge nakon simulirane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu bez ili uz dodatak β-glukana

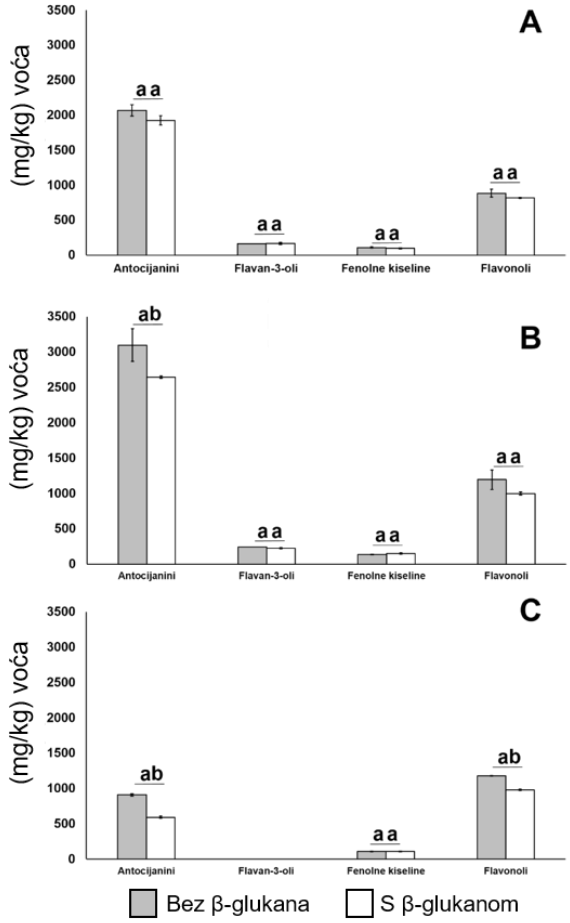
4.6. Usporedba simuliranog procesa probave sa i bez β-glukana



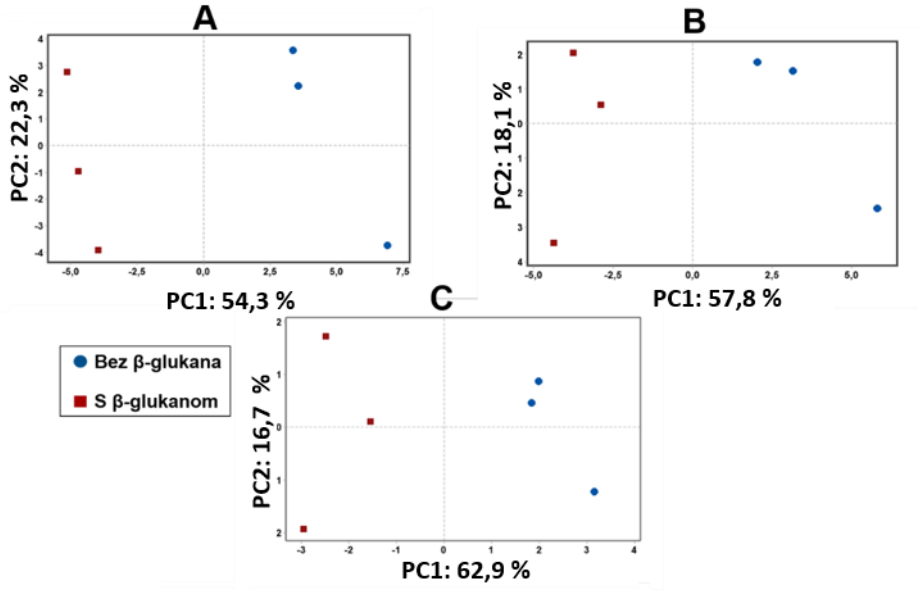
Slika 33 Količine ukupnih polifenola (mg/kg voća) oslobođenih iz kožice jabuke (A), mesa jabuke (B) i plodova crne bazge (C) nakon simulirane probave u ustima, želudcu i tankom crijevu



Slika 34 Količine polifenolih skupina (mg/kg voća) oslobođenih iz kožice i mesa plodova četiri kultivara jabuke nakon simulirane probave u ustima (A), želudcu (B) i tankom crijevu (C)



Slika 35 Količine polifenolnih skupina (mg/kg voća) oslobođenih iz plodova crne bazge nakon simulirane probave u ustima (A), želudcu (B) i tankom crijevu (C)



Slika 36 Primjena analize glavnih komponenata na količine svih polifenolnih skupina nakon simulirane probave u ustima, želudcu I tankom crijevu uz prisutan β-glukan ili bez β-glukana. (A) analiza polifenola kožice jabuke (B) analiza polifenola mesa jabuke te (C) plodova crne bazge

4.7. Kinetika simuliranog procesa probave

Tablica 28 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u kožici tradicionalnog kultivara jabuke nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simulirane probave u želudcu u različitim vremenskim periodima, bez ili uz dodatak β-glukana

		10 minuta		20 minuta		30 minuta		60 minuta		120 minuta	
	Prije probave	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Antocijanini											
cijanidin-3-galaktozid	13,2±3,6^{a}	4,6±1,2^{b}	5,1±1,3^{b}	4,2±0,8^{b}	7,3±1,4^{b}	5,3±0,4^{b}	5,8±0,1^{b}	4,0±0,8^{b}	4,9±0,4^{b}	4,8±0,3^{b}	5,1±0,3^{b}
Ukupno	13,2±3,6^{a}	4,6±1,2^{b}	5,1±1,3^{b}	4,2±0,8^{b}	7,3±1,4^{b}	5,3±0,4^{b}	5,8±0,1^{b}	4,0±0,8^{b}	4,9±0,4^{b}	4,8±0,3^{b}	5,1±0,3^{b}
Flavan-3-oli											
(+)-katehin	281,1±3,1^{a}	87,3±7,0^{g}	126,7±12,9^{d,e}	108, ±8,0^{f}	145,3±2,9^{b,c}	151,3±4,0^{b}	142,0±0,1^{b,c,d}	146,7±2,9^{b,c}	141,3±5,3^{b,c,d}	131,8±8,3^{c,d,e}	115,3±5,3^{e,f}
(-)epikatehin	166,8±9,6^{a}	67,0±1,9^{b}	72,3±4,1^{b}	80,0±6,0^{b}	78,1±3,2^{b}	76,2±2,2^{b}	74,0±1,2^{b}	70,7±4,1^{b}	72,9±3,2^{b}	70,0±0,4^{b}	68,5±0,6^{c}
procijanidin B1	123,6±5,1^{a}	44,3±2,5^{e}	54,3±2,9^{b}	46,1±0,3^{d,e}	54,1±0,2^{b,c}	56,0±1,3^{b}	53,3±0,4^{b,c}	54,6±0,8^{b}	51,9±0,9^{b,c,d}	52,0±1,0^{b,c}	48,2±1,6^{c,d,e}
Ukupno	571,5 11,4^{a}	200,6±11,4^{e}	253,3±19,9^{c,d}	234,6±9,7^{d}	277,5±4,4^{b,c}	283,5±7,0^{b}	269,3±1,1^{b,c}	271,9±4,7^{b,c}	261,1±2,8^{b,c}	253,9±8,9^{c,d}	232,0±7,5^{d}
Dihidrokalkoni											
floretin-2-glukozid	342,9±13,7^{a}	200,2±21,3^{c,d}	196,0±2,3^{d}	215,7±36,7^{b,c,d}	232,9±9,0^{b,c}	239,4±9,4^{b}	230,9±4,4^{b,c,d}	212,9±11,5^{b,c,d}	214,8±13,8^{b,c,d}	212,9±8,7^{b,c,d}	206,9±3,3^{b,c,d}
floretin-2-ksiloglukozid	63,7±10,2^{a}	41,7±6,1^{b,c}	30,7±0,8^{c,d,e}	42,7±1,0^{b}	34,8±1,6^{b,c}	33,0±1,7^{b,c}	26,9±0,3^{d,e}	32,5±0,2^{c,d}	22,0±0,1^{e,f}	22,8±4,8^{e,f}	12,5±1,7^{f}
Ukupno	406,6±23,9^{a}	241,9±10,7^{b,c,d,e}	226,7±1,0^{d,e}	285,4±26,7^{b,c}	267,7±7,5^{b,c,d}	272,4±11,1^{b,c,d}	258,7±1,7^{b,c,d}	245,4±7,9^{b,c,d,e}	236,8±13,8^{b,c,d,e}	235,8±12,4^{c,d,e}	219,4±5,0^{e}
Fenolne kiseline											
klorogenska kiselina	174,1±14,9^{a}	132,0±3,7^{b,c}	139,2±0,8^{b,c}	140,2±4,6^{b,c}	142,3±3,6^{b,c}	141,8±0,7^{b,c}	143,4±2,4^{b}	136,1±5,1^{b,c}	137,8±3,4^{b,c}	133,0±4,8^{b,c}	127,7±4,3^{c}
Ukupno	174,1±14,9^{a}	132,0±3,7^{b,c}	139,2±0,8^{b,c}	140,2 ±4,6^{b,c}	142,3±3,6^{b,c}	141,8±0,7^{b,c}	143,4± 2,4^{b}	136,1±5,1^{b,c}	137,8±3,4^{b,c}	133,0±4,8^{b,c}	127,7±4,3^{c}
Flavonoli											
kvercetin-3-galaktozid	169,6±10,6^{a}	117,4±34,8^{b}	131,5±7,2^{b}	115,8±27,3^{b}	140,7±9,4^{a,b}	135,4±2,5^{a,b}	140,8±1,0^{a,b}	120,6±13,4^{b}	135,0±3,8^{a,b}	131,8±15,8^{b}	128,7±3,9^{b}
kvercetin-3-glukotid	309,7±17,8^{a}	115,4±28,4^{b}	121,1±6,5^{b}	128,2±0,7^{b}	127,1±9,3^{a}	126,7±1,8^{a}	129,7±1,7^{a}	114,5±13,3^{b}	124,7±0,8^{a}	129,2±11,9^{b}	125,4±4,8^{b}
derivat kvercetina	165,6±8,7^{a}	64,6±1,4^{c}	82,3±6,1^{b}	72,5±18,0^{b,c}	85,2±7,0^{b}	79,9±4,8^{b,c}	86,7±2,3^{b}	79,1±3,5^{b,c}	86,9±0,8^{b}	76,8±7,5^{b,c}	75,3±4,2^{b,c}
kvercetin-3-ksilozid	218,7±8,9^{a}	112,9±44,9^{b}	134,1±12,1^{b}	111,5±51,4^{b}	150,1±9,8^{b}	150,3±1,7^{b}	147,2±0,2^{b}	133,3±9,4^{b}	138,5±2,9^{b}	135,5±10,7^{b}	131,6±3,4^{b}
kvercetin-3-ramnozid	85,6±3,6^{a}	38,2±7,3^{b}	39,1±4,1^{b}	41,8±11,4^{b}	46,7±0,1^{b}	46,8±1,1^{b}	45,7±0,3^{b}	41,2±3,1^{b}	41,8±0,3^{b}	41,2±2,2^{b}	39,4±0,9^{b}
Ukupno	949,2±40,7^{a}	448,6±82,6^{b}	508,1±34,1^{b}	469,9±76,1^{b}	549,8±25,2^{b}	539,1±2,4^{b}	550,1± 1,4^{b}	488,8±30,2^{b}	526,9±4,4^{b}	514,5±47,8^{b}	500,4±16,9^{b}
Ukupni polifenoli	2114,9±69,8^{a}	1027,7±88,8^{c}	1132,6±55,4^{b,c}	1107,4±109,2^{b,c}	1244,6 ±30,8^{b}	1242,1±16,9^{b}	1226,8±2,0^{b}	1146,3±44,9^{b,c}	1167,9±11,1^{b,c}	1142,1±65,8^{b,c}	1084,9±24,2^{b,c}

Kožica plodova jabuke 'Kolačare'

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3)

Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu sa razinom značajnosti 0,05..

Tablica 29 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u kožici tradicionalnog kultivara jabuke nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u tankom crijevu u različitim vremenskim periodima, bez ili uz dodatak β-glukana

	Prije probave	10 minuta		20 minuta		30 minuta		60 minuta		120 minuta	
		Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Dihidrokalkoni											
floretin-2-glukozid	342,9±13,7^{a}	193,7±16,1^{b,c}	197,9±0,8^{b}	192,2±5,4^{b,c}	190,5±4,9^{b,c,d}	168,5±5,1^{d,e,f}	174,2±10,2^{c,d,e,f}	182,2±2,0^{b,c,d,e}	173,5±7,7^{c,d,e,f}	155,0±5,5^{f}	164,5±6,9^{e,f}
floretin-2-ksiloglukozid	63,7±10,2^{a}	6,1±3,8^{c,d}	9,9±2,6^{b,c,d}	7,2±0,9^{c,d}	6,9±0,5^{c,d}	17,9±5,8^{b,c}	23,2±2,3^{b}				
Ukupno	406,6±23,9^{a}	199,8±17,9^{b}	207,9±1,2^{b}	199,4±6,1^{b,c}	195,6±3,5^{b,c}	186,4±6,7^{b,c,d}	197,4±8,8^{b,c}	182,2±1,4^{b,c,d,e}	173,5±5,5^{c,d,e,f}	155,0±5,5^{f}	164,5±4,9^{e,f}
Fenolne kiseline											
klorogenska kiselina	174,1±14,9^{a}	26,5±0,8^{b,c}	17,6±1,7^{c,d}	20,3±1,6^{c,d}	16,0±8,8^{c,d}	15,9±0,4^{c,d}	14,0±0,4^{c,d}	37,4±0,8^{b}	25,1±1,9^{b,c,d}	24,0±0,1^{b,c,d}	12,2±0,1^{d}
Ukupno	174,1±14,9^{a}	26,5±0,8^{b,c}	17,6±1,7^{c,d}	20,3±1,6^{c,d}	16,0±8,8^{c,d}	15,9±0,4^{c,d}	14,0±0,4^{c,d}	37,4±0,8^{b}	25,1±1,9^{b,c,d}	24,0±0,1^{b,c,d}	12,2±0,1^{d}
Flavonoli											
kvercetin-3-galaktozid	169,6±10,6^{a}	90,6±5,8^{c,d}	76,7±6,3^{d,e}	89,1±6,1^{c,d}	77,6±11,0^{d,e}	74,7±0,5^{d,e}	71,0±6,1^{e}	114,0±5,0^{b}	96,6±4,5^{b,c}	78,6±2,8^{d,e}	66,9±9,2^{e}
kvercetin-3-glukotid	309,7±17,8^{a}	82,4±1,0^{b,c}	72,3±6,0^{c}	85,8±5,2^{b,c}	74,5±12,2^{c}	76,8±8,8^{c}	64,1±8,0^{c}	102,4±5,2^{b}	84,9±5,0^{b,c}	73,7±3,6^{c}	70,5±7,2^{c}
derivat kvercetina	165,6±8,7^{a}	67,1±4,3^{b,c}	55,8±2,9^{d,e,f}	62,0±3,1^{c,d,e}	55,8±7,4^{d,e,f}	54,8±2,2^{d,e,f}	51,6±5,1^{e,f}	76,9±1,9^{b}	64,5±3,0^{c,d}	47,4±1,9^{f}	45,2±0,7^{f}
kvercetin-3-ksilozid	218,7±8,9^{a}	112,0±5,7^{b,c}	94,4±8,3^{d,e}	106,1±4,9^{b,c,d,e}	93,9±13,6^{c,d,e}	93,7±1,8^{d,e}	88,5±8,5^{e}	123,9±0,7^{b}	109,0±4,1^{b,c,d}	98,0±3,8^{c,d,e}	93,1±6,7^{d,e}
kvercetin-3-ramnozid	85,6±3,6^{a}	34,0±2,6^{b}	33,2±4,4^{b}	34,4±0,9^{b}	31,4±2,0^{b}	32,8±4,9^{b}	29,8±2,7^{b}	36,9±0,4^{b}	34,3±1,3^{b}	36,8±1,7^{b}	35,9±0,9^{b}
Ukupno	949,2±40,7^{a}	386,1±13,5^{c}	330,5±15,5^{c,d}	377,4±18,4^{c}	333,3±32,7^{c,d}	332,9±14,0^{c,d}	304,5±25,9^{d}	454,1±9,6^{b}	389,9±17,1^{c,d}	334,4±11,0^{c,d}	311,6±18,6^{d}
Ukupni polifenoli	2114,9±69,8^{a}	618,2±39,4^{b,c}	556,1±15,6^{c,d,e}	597,1±17,7^{b,c,d}	544,9±35,5^{c,d,e}	535,3±19,5^{c,d,e}	515,9±29,3^{d,e}	673,7±10,6^{b}	587,9±21,1^{zc,d}	513,4±13,6^{d,e}	488,3±22,5^{e}

Kožica plodova jabuke 'Kolačare'

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3)

Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu sa razinom značajnosti 0,05..

Tablica 30 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u mesu tradicionalnog kultivara jabuke nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u želudcu u različitim vremenskim periodima, bez ili uz dodatak β-glukana

		10 minuta		20 minuta		30 minuta		60 minuta		120 minuta	
	Prije probave	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Flavan-3-oli											
(+)-katehin	50,9±6,7^{a}	10,4±0,5^{b}	11,8±1,2^{b}	11,2±0,8^{b}	9,8±1,3^{b}	11,9±1,2^{b}	9,9±2,3^{b}	10,4±0,6^{b}	8,4±0,9^{b}	9,1±0,5^{b}	8,4±0,6^{b}
(-)-epikatehin	19,1±2,4^{a}			0,4±0,0^{b}	0,4±0,0^{b}		0,1±0,0^{b}	0,2±0,0^{b}	0,9±0,0^{b}	0,5±0,7^{b}	0,9±1,4^{b}
procijanidin B1	52,7±1,8^{a}	13,5±0,1^{b}	13,3±0,4^{b}	12,8±0,2^{b}	12,5±0,1^{b}	12,5±0,4^{b}	12,8±0,6^{b}	12,8±0,5^{b}	12,5±0,7^{b}	12,4±0,8^{b}	11,9±0,2^{b}
procijanidin B2	29,3±1,7^{a}	11,6±0,1^{b}	11,8±0,1^{b}	11,7±0,1^{b}	11,7±0,1^{b}	11,4±0,3^{b}	11,1±0,2^{b}	11,1±0,2^{b}	11,0±0,1^{b}	10,7±0,1^{b}	10,8±0,2^{b}
Ukupno	152,0±8,2^{a}	35,5±0,5^{b}	36,9 ±1,2^{b}	35,9 0,7^{b}	34,2±1,0^{b}	35,8±0,8^{b}	33,9 2,9^{b}	34,3±1,0^{b}	32,3±1,5^{b}	32,7±1,8^{b}	31,1±0,4^{b}
Dihidrokalkoni											
floretin-2-glukozid	11,6±2,2^{a}	2,1±0,7^{b,c,d}	2,3±0,3^{b,c,d}	3,4±0,7^{b,c,d}	4,2±0,3^{b,c}	1,4±0,3^{d}	1,5±1,3^{d}	1,6±1,5^{c,d}	1,4±0,9^{d}	2,9±0,7^{b,c,d}	4,3±0,7^{b}
floretin-2-ksiloglukozid	18,1±3,2^{a}	1,7 ±1,0^{c}	2,6±1,3^{c}	3,9±1,0^{b,c}	1,2±0,2^{c}	2,0±0,4^{c}	2,9±1,1^{b,c}	2,0±0,9^{c}	1,9±1,4^{c}	3,2±0,1^{b,c}	6,2±0,9^{b}
Ukupno	29,7±5,4^{a}	3,8 ±1,2^{c}	5,0±1,1^{b,c}	7,4±1,2^{b,c}	5,4±0,3^{b,c}	3,4±0,1^{c}	4,5 1,7^{c}	3,7±1,7^{c}	3,3±1,8^{c}	6,1±0,6^{b,c}	11±1,9^{b}
Fenolne kiseline											
klorogenska kiselina	238,2±38,4^{a}	73,9±3,9^{b}	70,6±8,6^{b}	84,6±5,5^{b}	75,5±4,9^{b}	76,1±7,1^{b}	53,7±12,8^{b}	67,8±8,2^{b}	48,7±12,6^{b}	70,9±2,3^{b}	87,7±12,3^{b}
izomer klorogenske kiseline	30,9±4,2^{a}	13,1±1,0^{b,c,d}	15,6±0,4^{b,c,d}	16,2±0,7^{b,c}	15,1±0,4^{b,c,d}	15,3±2,2^{b,c,d}	13,3±1,2^{b,c,d}	12,6±0,2^{c,d}	11,7±1,3^{d}	12,7±0,9^{c,d}	16,8±0,9^{b}
p-kumaroilkina kiselina	28,5±7,4^{a}	11,2±0,8^{b}	10,1±1,2^{b}	10,7±2,4^{b}	10,4±1,3^{b}	10,8±0,3^{b}	10,1±0,2^{b}	9,7±1,5^{b}	10,1±1,8^{b}	10,3±1,4^{b}	9,7±0,9^{b}
Ukupno	295,7±56,1^{a}	98,2±4,2^{b}	96,4±7,2^{b}	111,5±5,1^{b}	101,0±2,2^{b}	102,2±3,4^{b}	77,3±9,1^{b}	90,2±7,0^{b}	70,6±9,6^{c}	93,9±1,9^{b}	114,1±10,0^{b}
Ukupni polifenoli	477,3±53,7^{a}	137,6±7,2^{b}	138,6±9,4^{b}	154,8±7,0^{b}	140,6±2,8^{b}	141,5±3,9^{b}	115,6±12,5^{b}	128,2±9,7^{b}	106,2±12,6^{c}	132,8±1,1^{b}	155,6±11,6^{b}

Meso plodova jabuke 'Kolačare'

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3)

Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu sa razinom značajnosti 0,05.

Tablica 31 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u mesu tradicionalnog kultivara jabuke nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u tankom crijevu u različitim vremenskim periodima, bez ili uz dodatak β-glukana

		10 minuta		20 minuta		30 minuta		60 minuta		120 minuta	
	Prije probave	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Dihidrokalkoni											
floretin-2-glukozid	11,6±2,2^{a}	7,5±0,8^{b,c,d}	8,4±1,6^{b,c}	5,3±0,9^{d,e}	5,4±0,3^{d,e}	5,3±0,3^{d,e}	5,4±0,3^{d,e}	5,7±0,3^{c,d,e}	3,3±0,1^{e}	9,1±1,3^{a,b}	11,5±1,2^{a}
floretin-2-ksiloglukozid	18,1±3,2^{a}	4,7±0,2^{b,c,d}	6,2±0,6^{b,c}	1,9±0,1^{d}	2,2±0,6^{d}	2,5±0,2^{d}	2,4±0,3^{d}	2,3±0,1^{d}	3,9±0,8^{c,d}	4,3±1,9^{b,c,d}	7,3±0,1^{b}
Ukupno	29,7±5,4^{a}	12,2±1,0^{c,d}	14,7±1,7^{b,c}	7,2±0,6^{d}	7,7±0,7^{d}	7,8±0,3^{d}	7,8±0,4^{d}	8,1±0,3^{d}	7,2±0,7^{d}	13,4±2,2^{c}	18,8±1,2^{b}
Fenolne kiseline											
izomer klorogenske kiseline 1		5,7±1,0^{a,b}	8,4±0,4^{a,b}	6,2±0,8^{a,b}	6,4±0,1^{b}	7,0±0,2^{b}	9,2±1,1^{a,b}	17,0±0,9^{a}	13,5±0,3^{a}	8,8±0,7^{a,b}	15,9±2,2^{a}
izomer klorogenske kiseline 2		1,4±0,1^{c,d}	1,7±0,6^{c,d}	0,2±0,1^{d}	0,1±0,0^{d}	0,1±0,1^{d}	0,5±0,2^{d}	4,1±0,8^{a,b}	4,7±0,5^{a}	4,0±1,4^{b}	5,5±1,6^{a}
klorogenska kiselina	238,2±38,4^{a}	51,3±0,3^{b}	39,7±3,0^{b,c}	15,4±3,7^{b,c}	13,6±1,6^{b,c}	10,8±0,4^{b,c}	8,7±1,2^{c}	23,4±11,4^{b,c}	10,7±0,4^{b,c}	20,8±0,0^{b,c}	36,2±2,8^{b,c}
izomer klorogenske kiseline 3	30,9±4,2^{a}	13,8±0,4^{b}	13,3±0,9^{b}	7,7±0,9^{c}	7,2±0,9^{c}	6,7±0,7^{c}	7,0±1,1^{c}	16,3±0,6^{b}	10,6±0,7^{b}	8,5±2,1^{c}	18,4±1,7^{b}
p-kumaroilkina kiselina	28,5±7,4^{a}	4,8±0,7^{b}	3,8±0,7^{b}	2,0±0,1^{b}	1,8±0,3^{b}	2,7±1,0^{b}	2,7±0,1^{b}	1,9±0,1^{b}	3,4±0,1^{b}	3,3±0,4^{b}	4,2±0,4^{b}
Ukupno	295,7±56,1^{a}	77,0±0,1^{b,c}	66,9±3,1^{b,c}	31,5±1,5^{b,c}	29,1±0,1^{c}	27,3±1,0^{c}	28,2±0,1^{c}	62,7±13,5^{b,c}	42,9±1,5^{b,c}	45,5±3,4^{b,c}	80,2±1,3^{b}
Ukupni polifenoli	477,3±53,7^{a}	89,2±0,9^{b}	81,6±1,5^{b,c}	38,7±2,1^{c}	36,8±0,6^{c}	35,1±0,7^{c}	36±0,3^{c}	70,8±13,2^{b,c}	50,2±2,1^{b,c}	58,9±5,3^{b,c}	99,1±1,4^{b}

Meso plodova jabuke 'Kolačare'

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3)

Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu sa razinom značajnosti 0,05

Tablica 32 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u kožici komercijalnog kultivara jabuke nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođeni nakon simulirane probave u tankom crijevu u različitim vremenskim periodima, bez ili uz dodatak β-glukana

		10 minuta		20 minuta		30 minuta		60 minuta		120 minuta	
	Prije probave	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Antocijanini											
cijanidin-3-galaktozid	145,8±0,6^{a}	16,1±0,8^{b,c}	14,3±1,3^{c}	17,9±0,6^{b}	14,0±1,7^{c,d}	11,7±0,3^{d,e}	10,8±0,9^{e}	11,6±1,4^{e}	7,9±1,2^{f}	4,8±0,4^{g}	3,8±0,3^{g}
Ukupno	145,8±0,6^{a}	16,1±0,8^{b,c}	14,3±1,3^{c}	17,9±0,6^{b}	14,0±1,7^{c,d}	11,7±0,3^{d,e}	10,8±0,9^{e}	11,6±1,4^{e}	7,9±1,2^{f}	4,8±0,4^{g}	3,8±0,3^{g}
Flavan-3-oli											
(+)-katehin	69,2±2,7^{a}	26,0±1,7^{b,c,d,e}	31,2±0,0^{b,c}	27,0 2,9^{b,c,d}	21,7±1,1^{c,d,e}	19,1±1,2^{d,e}	16,4±0,7^{e}	35,7±4,3^{b}	22,7±0,5^{c,d,e}	24,7±3,0^{c,d,e}	24,3±1,7^{c,d,e}
procijanidin B1	87,3±5,6^{a}	27,0±2,2^{b,c}	26,8±0,2^{b,c}	27,3±0,4^{b,c}	27,2±0,2^{b,c}	25,7±0,4^{c}	25,1±0,1^{c}	29,6±0,6^{b}	26,0±0,3^{c}	24,4±0,4^{c}	24,6±0,1^{c}
procijanidin B2	133,9±4,0^{a}	36,6±4,0^{b}	31,0±0,2^{c,d}	33,9±1,7^{b,c}	33,2±0,5^{b,c,d}	29,0±0,4^{d}	30,6±0,9^{c,d}	37,6±1,9^{b}	35,2±0,3^{b,c}	36,1±0,4^{b}	33,5±3,0^{b,c,d}
Ukupno	290,2±6,2^{a}	89,6±3,2^{c}	89,1±0,0^{c}	88,2±2,5^{c}	81,9±1,7^{c,d,e}	73,7±2,0^{d,e}	72,2±0,5^{e}	103,0±6,7^{b}	83,9±0,1^{c}	85,3±2,5^{c}	82,5±3,5^{c,d}
Dihidrokalkoni											
floretin-2-glukozid	60,2±1,2^{a}	22,5±1,9^{c}	15,2±0,3^{e,f}	13,5±0,6^{f,g}	17,1±1,9^{d,e}	19,2±1,6^{d}	14,9±1,5^{e,f}	27,4±1,9^{b}	13,4±2,7^{f,g}	19,2±2,0^{d}	10,7±0,4^{g}
Ukupno	60,2±1,2^{a}	22,5±1,9^{c}	15,2±0,3^{e,f}	13,5±0,6^{f,g}	17,1±1,9^{d,e}	19,2±1,6^{d}	14,9±1,5^{e,f}	27,4±1,9^{b}	13,4±2,7^{f,g}	19,2±2,0^{d}	10,7±0,4^{g}
Fenolne kiseline											
klorogenska kiselina	94,6±5,4^{a}	14,4±1,7^{b,c}	11,0±0,6^{c,d}	15,3±0,1^{b}	14,2±0,8^{b,c}	10,9±0,7^{c,d}	9,5±0,8^{c}	15,6±0,5^{b}	13,3±0,5^{b,c,d}	12,3±0,9^{b,c,d}	9,3±0,6^{d}
Ukupno	94,6±5,4^{a}	14,4±1,7^{b,c}	11,0±0,6^{c,d}	15,3±0,1^{b}	14,2±0,8^{b,c}	10,9±0,7^{c,d}	9,5±0,8^{c}	15,6±0,5^{b}	13,3±0,5^{b,c,d}	12,3±0,9^{b,c,d}	9,3±0,6^{d}
Flavonoli											
kvercetin-3-galaktozid	417,3±6,2^{a}	141,0±22,7^{b}	157,3±14,7^{b}	145,9±2,5^{b}	151,9±8,3^{b}	136,6±6,0^{b}	147,8±0,5^{b}	149,3±6,9^{b}	143,2±4,6^{b}	140,7±5,3^{b}	141,9±0,9^{b}
kvercetin-3-glukotid	161,9±10,3^{a}	151,7±7,8^{a,b,c}	169,4±0,5^{a,b}	140,3±25,9^{c,d,e}	106,7±6,6^{e}	113,6±22,0^{d,e}	120,2±12,3^{d,e}	180,2±2,2^{a}	160,4±13,9^{a,b,c}	141,4±8,6^{b,c,d}	142,9±3,6^{b,c,d}
derivat kvercetina 1	79,5±2,1^{a}	18,6±3,3^{f,g}	17,2±0,3^{g}	16,9±0,6^{g}	29,6±2,6^{b}	30,7±1,2^{b}	29,5±1,6^{b,c}	19,0±0,2^{f,g}	20,8±1,7^{e,f}	25,9±1,1^{c,d}	23,2±0,5^{d,e}
derivat kvercetina 2	63,6±3,1^{a}	16,8±3,4^{b}	12,2±2,0^{c,d}	16,9±0,9^{b}	10,8±1,6^{d}	16,0±0,8^{b,c}	10,9±0,6^{d}	12,5±2,2^{c,d}	17,5±0,4^{b}	19,9±0,5^{b}	12,1±0,6^{c,d}
kvercetin-3-ksilozid	379,3±5,1^{a}	128,4±10,5^{c}	147,9±14,2^{b}	139,2±4,8^{b,c}	141,4±0,9^{b,c}	133,1±1,8^{b,c}	134,4±6,2^{b,c}	147,9±7,3^{b}	138,5±2,9^{b,c}	146,2±0,7^{b}	135,9±2,1^{b,c}
kvercetin-3-ramnozid	254,6±11,8^{a}	133,7±7,6^{a}	143,2±9,4^{c}	151,4±3,7^{b,c}	144,1±11,8^{b,c}	140,1±10,4^{b,c}	144,0±2,9^{b,c}	158,7±7,5^{b}	138,9±1,5^{b,c}	144,3±3,7^{b,c}	135,6±2,8^{c}
Ukupno	1357,5±23,8^{a}	589,9±17,4^{c,d}	647,3±40,1^{b,c}	601,1±26,3^{b,c,d}	584,5±23,1^{c,d}	569,8±29,1^{d}	586,9±14,6^{c,d}	667,8±25,2^{b}	625,8±24,8^{b,c,d}	618,5±12,7^{b,c,d}	591,5±6,2^{c,d}
Ukupni polifenoli	1948,4±31,1^{a}	732,6±20,0^{c,d}	776,9±42,7^{b,c}	736,2±27,6^{c,d}	711,8±22,8^{c,d}	685,5±29,5^{d}	694,3±14,5^{d}	825,4±29,8^{b}	743,4±24,9^{c,d}	740,1±13,9^{c,d}	697,9±6,8^{d}

Kožica plodova jabuke 'Idared'
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3)
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu sa razinom značajnosti 0,05.

Tablica 33 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u kožici komercijalnog kultivara jabuke nakon kebmijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u tankom crijevu u različitim vremenskim periodima, bez ili uz dodatak β-glukana

		10 minuta		20 minuta		30 minuta		60 minuta		120 minuta	
	Prije probave	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Dihidrokalkoni											
floretin-2-glukozid	60,2±1,2^{a}	30,2±3,1^{b}	19,5±0,5^{c,d}	20,2±3,5^{c}	15,9±0,8^{c,d}	14,9±0,0^{c,d}	12,9±6,3^{c,d}	11,1±1,9^{d}	11,1±3,5^{d}	16,3±4,8^{c,d}	12,6±0,3^{c,d}
Ukupno	60,2±1,2^{a}	30,2±3,1^{b}	19,5±0,5^{c,d}	20,2±3,5^{c}	15,9±0,8^{c,d}	14,9±0,0^{c,d}	12,9±6,3^{c,d}	11,1±1,9^{d}	11,1±3,5^{d}	16,3±4,8^{c,d}	12,6±0,3^{c,d}
Fenolne kiseline											
klorogenska kiselina	94,6±5,4^{a}	4,7±0,4^{b}	2,3±0,4^{b}	2,3±0,4^{b}	2,3±0,0^{b}	1,8±0,0^{b}	2,5±0,2^{b}	1,9±0,5^{b}	2,2±0,0^{b}	2,8±0,2^{b}	2,6±0,1^{b}
Ukupno	94,6±5,4^{a}	4,7±0,4^{b}	2,3±0,4^{b}	2,3±0,4^{b}	2,3±0,0^{b}	1,8±0,0^{b}	2,5±0,2^{b}	1,9±0,5^{b}	2,2±0,0^{b}	2,8±0,2^{b}	2,6±0,1^{b}
Flavonoli											
kvercetin-3-galaktozid	417,3±6,2^{a}	116,6±7,0^{b}	91,1±2,3^{c}	83,7±3,1^{c,d}	59,5±4,1^{f}	91,4±0,0^{c}	54,0±2,6^{f,g}	72,2±1,7^{e}	43,3±4,5^{g}	87,3±9,0^{c}	74,1±3,3^{d,e}
kvercetin-3-glukotid	161,9±10,3^{a}	68,2±0,9^{d}	58,4±12,3^{d}	111,1±8,9^{b,c}	110,7±14,2^{b,c}	72,6±0,0^{d}	97,8±6,6^{c}	70,6±3,2^{d}	66,9±0,7^{d}	114,6±0,7^{b}	113,9±9,1^{b}
derivat kvercetina 1	79,5±2,1^{a}	30,4±2,0^{b}	24,5±0,2^{c}	24,4±1,3^{c}	20,8±0,8^{d}	13,2±0,0^{e,f}	20,6±0,4^{d}	10,4±0,7^{f,g}	8,6±2,6^{g}	14,5±1,7^{e}	13,2±0,6^{e,f}
derivat kvercetina 2	63,6±3,1^{a}	19,0±3,2^{b,c}	17,9±1,2^{b,c}	19,9±0,9^{b}	17,9±0,0^{b,c}	17,7±0,0^{b,c}	13,3±3,4^{c,d,e}	15,4±2,3^{b,c,d}	10,4±0,5^{d,e}	11,2±1,7^{d,e}	8,4±1,4^{e}
kvercetin-3-ksilozid	379,3±5,1^{a}	130,5±5,5^{b}	121,5±8,5^{b,c}	93,9±10,9^{e,f}	85,2±3,8^{f}	112,8±0,0^{c,d}	103,3±1,6^{d,e}	56,4±13,6^{g}	59,2±0,4^{g}	103,4±4,5^{d,e}	89,8±7,7^{e,f}
kvercetin-3-ramnozid	254,6±11,8^{a}	107,4±3,2^{c}	87,7±0,1^{d}	98,1±6,8^{c,d}	107,1±8,2^{c}	109,0±0,0^{c}	60,0±0,2^{e}	48,9±8,5^{e}	54,1±8,8^{e}	137,4±4,2^{b}	129,5±4,1^{b}
Ukupno	1357,5±23,8^{a}	471,1±9,4^{b}	401,3±17,5^{c}	427,1±6,6^{c}	406,0±5,2^{c}	416,7±0,0^{c}	349,1±5,4^{d}	276,9±21,4^{e}	242,6±2,1^{e}	468,4±16,8^{b}	429,1±2,8^{c}
Ukupni polifenoli	1948,4±31,1^{a}	505,7±6,0^{b}	423,2±17,4^{d}	449,6±3,9^{c,d}	418,8±4,8^{d}	433,4±0,0^{d}	364,5±9,7^{e}	290,1±19,4^{f}	256,2±3,2^{g}	487,5±21,3^{b,c}	444,4±3,0^{d}

Kožica plodova jabuke 'Idared'

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3)

Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu sa razinom značajnosti 0,05.

Tablica 34 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u mesu komercijalnog kultivara jabuke nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u želudcu u različitim vremenskim periodima, bez ili uz dodatak β-glukana

		10 minuta		20 minuta		30 minuta		60 minuta		120 minuta	
	Prije probave	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Flavan-3-oli											
(+)-katehin	1,5±0,1^{d}	0,8±0,0^{e}	1,5±0,1^{d}	2,8±0,1^{b}	2,1±0,1^{c}	2,5±0,4^{b,c}	2,0±0,1^{c,d}	2,9±0,6^{b}	6,3±0,5^{a}	2,6±0,2^{b,c}	2,5±0,2^{b,c}
procijanidin B1	25,3±0,1^{a}	12,4±0,2^{c}	12,7±0,0^{b,c}	12,9±0,1^{b,c}	13,2±0,1^{b}	12,3±0,2^{c}	12,4±0,1^{c}	13,0±0,8^{b}	12,2±0,1^{c}	11,5±0,1^{d}	11,6±0,1^{d}
procijanidin B2	25,8±0,1^{a}	13,3±0,2^{d,e}	13,2±0,2^{e}	14,6±0,5^{c,d}	15,1±0,8^{c}	15,0±0,2^{c}	14,8±0,1^{c}	14,8±0,3^{c}	19,4±1,4^{b}	13,9±0,4^{c,d,e}	13,0±0,4^{e}
Ukupno	52,6±0,1^{a}	26,6±0,4^{e}	27,4±0,2^{e}	30,2±0,4^{c}	30,4±0,7^{c}	29,9±0,7^{c}	29,3±0,3^{c,d}	30,8±0,6^{c}	38,0±1,2^{b}	28,1±0,5^{d,e}	27,1±0,2^{e}
Dihidrokalkoni											
floretin-2-glukozid	3,5±0,2^{b,c,d}	3,2±0,9^{b,c,d}	3,9±1,2^{b,c,d}	4,2±0,9^{b,c,d}	6,3±0,1^{a}	3,5±0,6^{b,c,d}	4,4±1,2^{b,c}	4,9±1,1^{a,b}	6,4±0,0^{a}	2,9±0,5^{c,d}	2,5±0,3^{d}
Ukupno	3,5±0,2^{b,c,d}	3,2±0,9^{b,c,d}	3,9±1,2^{b,c,d}	4,2±0,9^{b,c,d}	6,3±0,1^{a}	3,5±0,6^{b,c,d}	4,4±1,2^{b,c}	4,9±1,1^{a,b}	6,4±0,0^{a}	2,9±0,5c,^{d}	2,5±0,3^{d}
Fenolne kiseline											
klorogenska kiselina	23,0±1,3^{a}	14,7±0,0^{b,c}	12,2±0,0^{c}	18,7±5,7^{a,b}	20,4±0,2^{a}	15,2±1,8^{b,c}	13,4±0,0^{c}	21,4±4,2^{a}	19,5±0,1^{a,b}	11,4±0,8^{c}	11,1±0,0^{c}
izomer klorogenske kiseline 1	5,7±0,1^{a}	3,1±0,2^{b}	4,1±0,7^{b}	4,0±1,0^{b}	3,9±0,1^{b}	3,7±0,4^{b}	3,5±0,1^{b}	4,0±0,4^{b}	3,5±0,0^{b}	3,5±0,4^{b}	3,7±0,4^{b}
p-kumaroilkina kiselina	3,5±0,6^{a}	2,2±0,3^{a}	2,9±1,1^{a}	2,9±0,8^{a}	3,1±0,1^{a}	2,8±0,8^{a}	3,4±1,2^{a}	3,7±1,2^{a}	3,6±0,4^{a}	2,3±0,4^{a}	2,9±0,6^{a}
Ukupno	31,9±1,5^{a}	20,0±0,3^{d,e}	19,2±1,3^{e}	25,7±5,4^{b,c,d}	27,4±2,6^{a,b,c}	21,8±1,5^{c,d,e}	20,3±1,0^{d,e}	28,6±1,9^{a,b}	26,7±0,3^{a,b,c}	17,2±0,3^{f}	17,8±0,2^{e}
Ukupni polifenoli	88,0±1,8^{a}	49,8±1,3^{d,e}	50,6±2,0^{e}	59,8±5,8^{b,c,d}	64,1±3,4^{a,b,c}	55,2±2,5^{c,d,e}	54,0±1,5^{d,e}	64,3±1,0^{a,b,c}	71,1±1,5^{a,b}	48,3±1,4^{d,e}	47,4±0,5^{d,e}

Meso plodova jabuke *'Idared'*

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3)

Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu sa razinom značajnosti 0,05.

Tablica 35 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u mesu komercijalnog kultivara jabuke nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u tankom crijevu u različitim vremenskim periodima, bez ili uz dodatak β-glukana

		10 minuta		20 minuta		30 minuta		60 minuta		120 minuta	
	Prije probave	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Dihidrokalkoni											
floretin-2-glukozid	3,5±0,2^{d}	6,7±0,0^{a}	5,4±1,4^{b,c}	6,5±0,0^{a}	2,3±0,3^{e}	2,6±0,2^{d,e}	2,5±0,0^{d,e}	6,2±0,0^{a}	6,6±0,2^{a,b}	5,1±0,1^{c}	5,0±0,1^{c}
Ukupno	3,5±0,2^{d}	6,7±0,0^{a}	5,4±1,4^{b,c}	6,5±0,0^{a}	2,3±0,3^{e}	2,6±0,2^{d,e}	2,5±0,0^{d,e}	6,2±0,0^{a}	6,6±0,2^{a,b}	5,1±0,1^{c}	5,0±0,1^{c}
Fenolne kiseline											
klorogenska kiselina	23,0±1,3^{a}	2,2±0,4^{d}	3,2±0,9^{d}	2,3±0,3^{d}	3,1±0,7^{d}	0,8±0,1^{e}	0,4±0,1^{e}	5,4±0,1^{b}	5,1±0,3^{b}	3,4±0,6^{c,d}	4,5±0,6^{b,c}
izomer klorogenske kiseline 1	5,7±0,1^{a}	1,6±0,3^{e}	1,9±0,6^{d,e}	1,5±0,3^{e,f}	2,2±0,7^{c,d,e}	0,6±0,1^{f,g}	0,3±0,2^{g}	2,5±0,1^{b,c,d}	3,2±0,3^{b}	2,1±0,3^{d,e}	3,0±0,6^{b,c}
izomer klorogenske kiseline 2		1,2±0,3^{f}	1,9±1,0^{d,e,f}	1,5±0,3^{e,f}	2,3±0,5^{c,d}	0,4±0,1^{g}	0,2±0,2^{g}	2,6±0,2^{a,b}	3,0±0,1^{a}	0,6±0,2^{c,d,e}	0,6±0,2^{c,d,e}
p-kumaroilkina kiselina	3,5±0,6^{a}	0,6±0,1^{d}	1,0±0,1^{b,c,d}	0,9±0,1^{b,c,d}	1,1±0,1^{b,c}	0,8±0,1^{b,c,d}	1,1±0,2^{b,c}	1,3±0,3^{b}	0,8±0,1^{b,c,d}	2,0±0,5^{c,d}	3,3±0,1^{c,d}
Ukupno	31,9±1,5^{a}	5,6±0,6^{d}	8,0±1,4^{c,d}	6,4±0,8^{c,d}	8,8±1,2^{c}	2,7±0,2^{e}	2,1±0,2^{e}	11,8±0,1^{b}	12,2±0,2^{b}	8,2±1,1^{c}	11,5±0,5^{b}
Ukupni polifenoli	88,0±1,8^{a}	12,4±0,6^{c}	13,4±4,0^{c}	12,9±0,7^{c}	11,1±1,5^{c}	5,3±0,1^{d}	4,6±0,2^{d}	18,0±0,1^{b}	18,8±0,1^{b}	13,4±1,1^{c}	16,6±0,6^{b}

Meso plodova jabuke 'Idared'

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3)

Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu sa razinom značajnosti 0,05.

Tablica 36 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u plodovima crne bazge nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u želudcu u razlčitim vremenskim periodima, bez ili uz dodatak β-glukana

		10 minuta		20 minuta		30 minuta		60 minuta		120 minuta	
	Prije probave	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Antocijanini											
cijanidin-3-glukozid	3055.8±189.7^{a}	1680.5±34.0^{b}	1634.7±91.0^{b}	1542.1±26.3^{b,c}	1389.5±11.5^{c,d}	1316.8±53.9^{c,d,e}	1309.7±120.8^{c,d,e}	1528.9±669.3^{b,c}	1260.4±53.9^{d,e}	1273.4±74.8^{d,e}	1083.8±15.6^{e}
c-3-s-5-glukozid*	3962.4±240.3^{a}	1857.0±9.8^{b}	1817.9±136.8^{b,c}	1682.3±91.9^{b,c,d,e}	1481.4±72.5^{c,d,e,f}	1354.0±93.0^{e,f}	1439.0±178.8^{d,e,f}	1761.9±68.4^{b,c,d}	1328.0±111.5^{f}	1416.7±115.7^{d,e,f}	1197.3±5.0^{f}
cijanidin-3-sambubiozd	1280.7±85.9^{a}	517.6±23.0^{b}	496.4±56.1^{b,c}	460.6±50.4^{b,c}	395.8±45.2^{b,c,d}	357.6±46.9^{c,d}	396.3±73.8^{b,c,d}	504.0±10.3^{b,c}	344.8±55.9^{d}	407.1±40.1^{b,c,d}	364.3±3.7^{c,d}
Ukupno	8299.0±515.9^{a}	4055.1±26.9^{b}	3949.0±283.1^{c}	3685.0 155.8^{c,d,e}	3266.6±128.1^{d,e}	3028.4±176.5^{e,f}	3145.0±370.4^{d,e,f}	3794.8±148.0^{b,c,d}	2933.2±213.6^{f}	3097.2±230.6^{d,e,f}	2645.5±16.9^{f}
Flavan-3-oli											
(+)-katehin	408.8±26.9^{a}	327.5±12.7^{b}	304.0±11.5^{b,c}	298.4±17.3^{b,c}	262.7±16.9^{c,d,e,f}	271.5±17.0^{c,d,e}	248.2±24.8^{d,e,f}	292.8±8.0^{b,c,d}	237.9±3.2^{e,f}	242.6±0.5^{e,f}	223.8±6.5^{f}
Ukupno	408.8±26.9^{a}	327.5±12.7^{b}	304.0±11.5^{b,c}	298.4±17.3^{b,c}	262.7±16.9^{c,d,e,f}	271.5±17.0^{c,d,e}	248.2±24.8^{d,e,f}	292.8±8.0^{b,c,d}	237.9±3.2^{e,f}	242.6±0.5^{e,f}	223.8±6.5^{f}
Fenolne kiseline											
klorogenska kiselina	419.1±0.3a	162.9±4.2^{b,c}	167.4±8.5^{b,c}	170.7±11.4^{b,c}	168.7±9.5^{b,c}	159.0±13.6^{b,c}	159.0±11.0^{b,c}	184.3±4.4^{b}	143.3±20.2^{c}	74.5±6.6^{d}	88.5±5.5^{d}
neoklorogenska kiselina	107.5±2.1^{a}	64.6±0.5^{b}	62.8±1.6^{b}	63.9±2.0^{b}	60.4±1.4^{b}	58.1±1.4^{b}	59.2±2.7^{b}	60.0±3.9^{b}	58.5±1.5^{b}	59.7±1.6^{b}	61.2±5.1^{b}
Ukupno	526.6±2.2^{a}	227.5±4.2^{b,c}	227.5 10.1^{b,c}	234.6±12.3^{b,c}	229.1 9.3^{b,c}	217.1±14.8^{b,c}	218.2±13.7^{b,c}	244.3±1.8^{b}	201.8±21.7^{c}	134.2±6.0^{d}	149.7±10.1^{d}
Flavonoli											
kverecetin-3-rutinozid	2860.9±26.3^{a}	1448.3±32.4^{b}	1263.7±58.5^{b,c}	1311.6±70.0^{b,c}	981.1±30.7^{e,f}	1006.3±162.7^{d,e,f}	1184.9±39.6^{c,d}	1412.4±2.7^{b}	1001.0±68.2^{d,e,f}	1167.9±138.6^{c,d,e}	966.5±21.1^{f}
kverecetin-3-glukozid	69.3±3.8^{a}	35.2±2.1^{b}	31.2±2.7^{b,c}	33.2±4.0^{b}	27.3±2.2^{b,c}	27.3±5.0^{b,c}	29.2±6.6^{b,c}	36.2±1.8^{b}	21.8±3.1^{c}	26.1±0.3^{b,c}	31.3±3.7^{b,c}
Ukupno	2930.2±28.2^{a}	1483.5±33.9^{b}	1294.9±61.0^{b,c}	1344.8±73.4^{b,c}	1008.1±28.5^{e}	1088.5±127.7^{d,e}	1214.1±23.0^{c,d}	1448.7±0.6^{b}	1022.8±49.5^{d}	1194.0±138.9^{d}	997.8±22.8^{e}
Ukupni polifenoli	11755.8 543.8^{a}	6093.7±12.9^{b}	5778.1±350.0^{b}	5562.8±249.3^{b,c}	4766.8±111.2^{c,d}	4605.9±156.8^{d}	4825.5±381.5^{c,d}	5780.7±157.5^{b}	4395.7±249.2^{d}	4604.6±604.6^{d}	4016.9±26.4^{d}

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3)

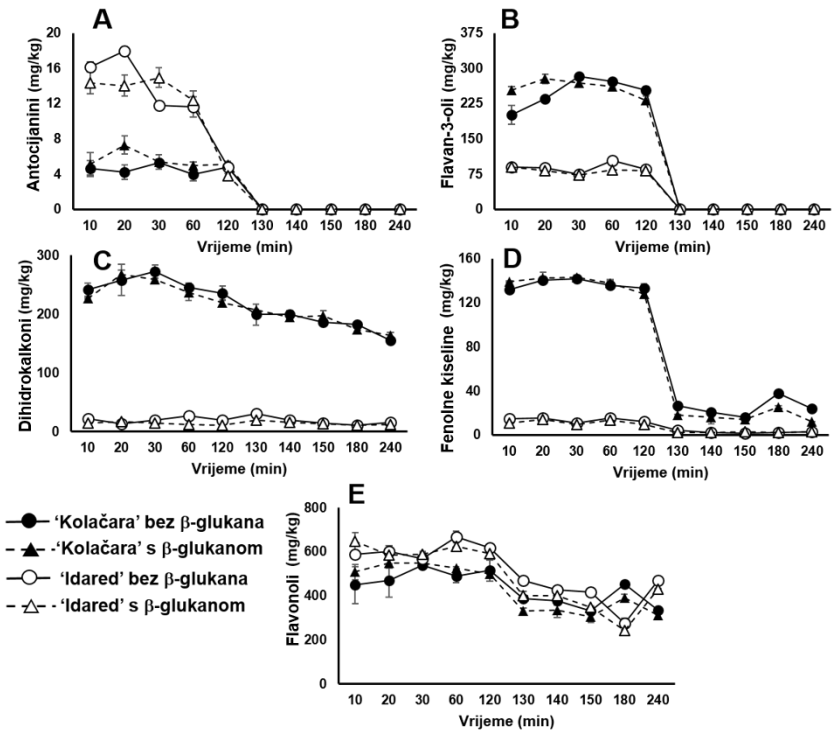
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.

*cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid

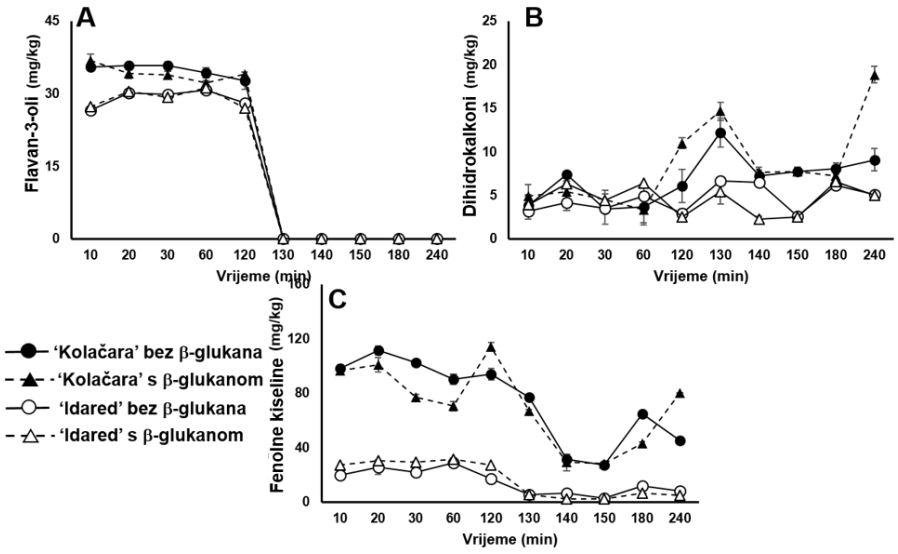
Tablica 37 Količine polifenola (mg/kg svježe mase) u plodovima crne bazge nakon kemijske i enzimske ekstrakcije (prije probave) te oslobođena nakon simularane probave u tankom crijevu u različitim vremenskim periodima, bez ili uz dodatak β-glukana

		10 minuta		20 minuta		30 minuta		60 minuta		120 minuta	
	Prije probave	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan	Bez β-glukana	β-glukan
Antocijanini											
c-3-s-5-glukozid*	3055.8±189.7^{a}	481.2±45.5^{c}	411.0±19.8^{c}	284,7±0,0$_{d}$	231,1±0,0$_{d}$	172,7±0,0$_{e,d}$	146,9±0,0$_{e}$	201,8±0,0$_{e,d}$	612,3±23,7^{c}	808.1±10.7^{b}	544.6±29.7^{c}
cijanidni-3-sambubiozid	3962.4±240.3^{a}	52.2±1.5^{b}	57.8±1.0^{b}	30,6±0,0^{c}	13,1±0,0^{d}	13,2±0,0^{d}	4,0±0,0^{e}	13,2±0,0^{d}	85,4±16,2^{b}	93.9±5.7^{b}	45.8±3.1^{b}
cijanidin-3-glukozid	1280.7±85.9^{a}									8.7±1.9^{b}	2.1±2.0^{b}
Ukupno	8299.0±515.9^{a}	533.8±44.7^{b}	468.8±18.7^{b}	315,4±0,0^{c}	244,2±0,0^{d}	185,9±0,0^{d}	150,9±0,0^{d,e}	215,0±0,0^{d,e}	707,4±21,1^{b}	910.7±16.9^{b}	591.8±24.7^{b}
Fenolne kiseline											
klorogenska kiselina	419.1±0.3^{a}	108.6±2.8^{b}	103.7±1.7^{b}	98,7±0,0^{b}	95,4±0,0^{b}	101,4±0,0^{b}	98,2±0,0^{b}	108,9±0,0^{b}	112,3±14,5^{b}	110.7±4.4^{b}	110.2±3.5^{b}
Ukupno	419.1±0.3^{a}	108.6±2.8^{b}	103.7±1.7^{b}	98,7±0,0^{b}	95,4±0,0^{b}	101,4±0,0^{b}	98,0±0,0^{b}	108,0±0,0^{b}	112,3±14,5^{b}	110.7±4.4^{b}	110.2±3.5^{b}
Flavonoli											
kverecetin-3-rutinozid	2860.9±26.3^{a}	650.3±43.3^{d}	601.8±38.8^{d}	390,7±31,3^{e}	512,5±19,9^{d}	409,5±47,7^{d,e}	516,6±31,7^{d}	520,9±37,9^{d}	866,7±60,0^{c}	1119.1±5.4^{b}	928.2±18.9^{c}
kverecetin-3-glukozid	69.3±3.8^{a}	41.8±2.9^{c}	44.2±4.6^{c}	48,6±2,2^{b}	48,0±9,4^{b}	53,4±17,0^{b}	46,6±2,8^{b,c}	46,5±7,2^{b,c}	52,1±7,3^{b}	58.4±1.7^{b}	52.7±0.4^{b}
Ukupno	2930.2±28.2^{a}	677.7±22.9^{d}	646.0±41.2^{d}	439,2±16,4^{e}	560,5±4,8^{e,d}	470,5±32,5^{e}	563,2±51,2^{e,d}	558,2±19,5^{e,d}	918,8±67,3^{c}	1177.5±5.4^{b}	980.5±13.2^{c}
Ukupni polifenoli	11755.8±543.8^{a}	1334.5±23.2^{c}	1218.6±61.5^{c}	957,7±15,9^{c}	900,1±4,8^{c,d}	716,5±75,2^{d}	812,3±75,4^{d}	878,1±19,5^{c,d}	1703,3±23,3^{c}	2191.2±35.1^{b}	1682.9±36.1^{c}

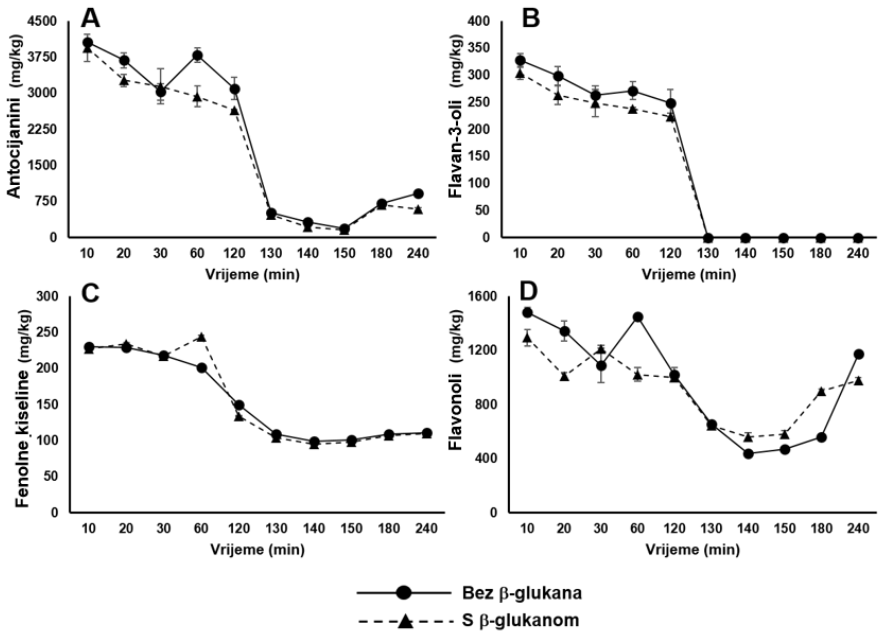
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (n=3)
Srednje vrijednosti u jednom redu s različitim slovima su statističke različite prema post-hoc Tukey testu s razinom značajnosti 0,05.
*cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid



Slika 37 Polifenolne skupine oslobođene iz kožice tradicionalne i komercijalne sorte jabuke tijekom simulirane probave u želudcu i tankom crijevu. A – Antocijanini; B – Flavan-3-oli; C - Dihidrokalkoni; D – Fenolne kiseline; E – Flavonoli



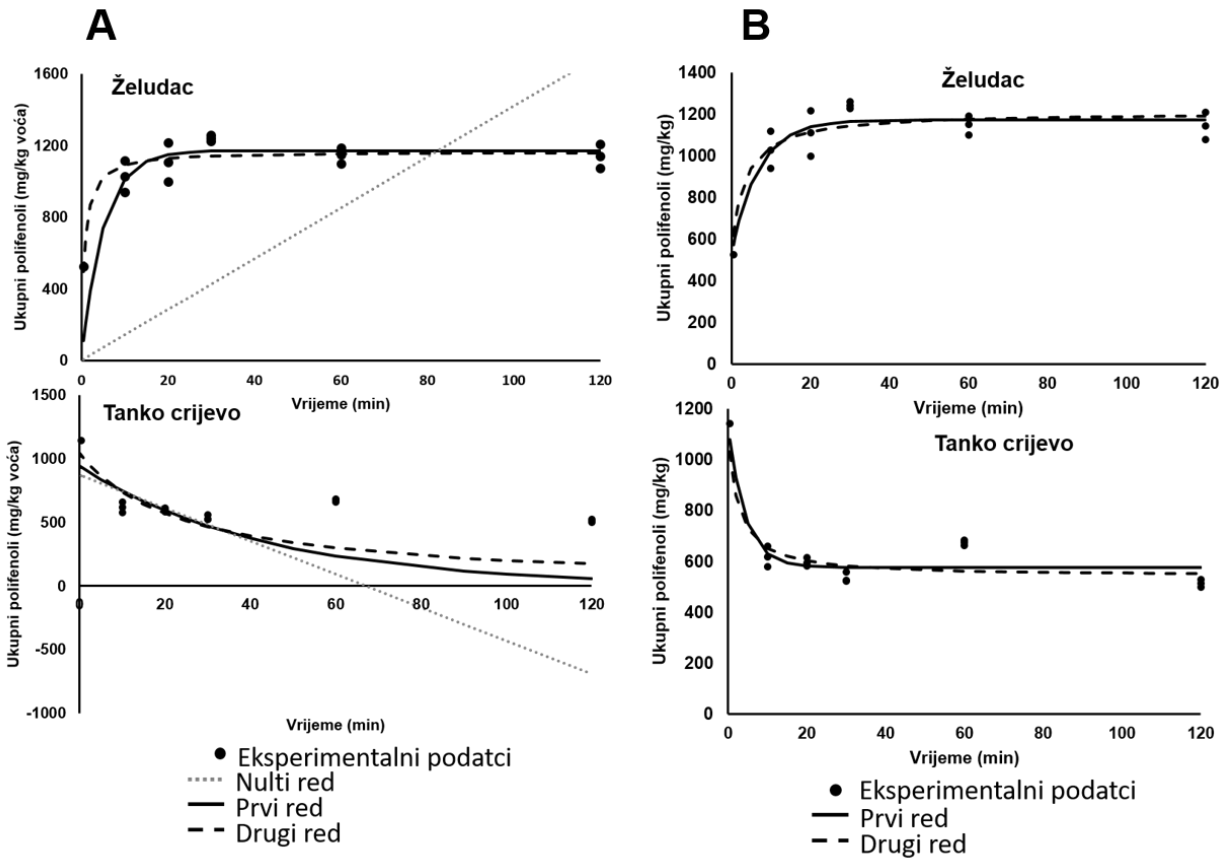
Slika 38 Polifenolne skupine oslobođeni iz mesa tradicionalne i komercijalne sorte jabuke tijekom simulirane probave u želudcu i tankom crijevu. A – Flavan-3-oli; B – Dihidrokalkoni; C - Fenolne kiseline



Slika **39** Polifenolne skupine oslobođene iz plodova crne bazge tijekom simulirane probave u želudcu i tankom crijevu. A – Antocijanini;
B – Flav-3-oli; C - Fenolne kiseline; D – Flavonli

Tablica 38 Standardne greške modela dobivene primjenom osnovnih i modificiranih kinetičkih modela nultog, prvog i drugog reda

	Standardna greška modela (SE)		
	Nulti red	Prvi red	Drugi red
Početne jednadžbe			
Želudac	751,8	133,6	84,3
Tanko crijevo	626,6	305,5	245,8
Modificirane jednadžbe			
Želudac	-	75,9	85,1
Tanko crijevo	-	63,0	70,0



Slika **40** Modeliranje eksperimentalnih podataka (količina ukupnih oslobođenih polifenola kožice jabuke u želudcu i tankom crijevu u ovisnosti o vremenu) (A) jednadžbama nultog, prvog i drugog reda za simulirani probavni proces (B) i modificiranim jednadžbama prvog i drugog reda

Tablica 39 Parametri reakcije prvog reda za simulaciju probave polifenola plodova jabuke i crne bazge u želudcu

	β-glukan	C_{eksp} (mg/kg)	C_{∞} (mg/kg)	k (1/min)	$t_{1/2}$ (min)	SE*
Ukupni polifenoli						
Kožica tradicionalne jabuke	-	1142,1	1170,5	0,148	4,7	75,9
	+	1084,9	1181,9	0,252	2,7	67,5
Kožica komercijalne jabuke	-	740,1	750,4	0,267	2,6	53,9
	+	697,6	725,3	0,390	1,7	47,1
Meso tradicionalne jabuke	-	132,8	139,6	0,302	2,3	11,1
	+	155,6	131,4	0,381	1,8	21,0
Meso komercijalne jabuke	-	48,3	57,0	0,178	3,9	6,2
	+	47,1	59,07	0,174	4,0	8,9
Plodovi crne bazge	-	4688,1	5337,3	0,487	1,4	665,3
	+	4016,9	4751,1	0,529	1,3	659,2
Antocijanini						
Kožica tradicionalne jabuke	-	4,8	4,6	0,305	2,3	0,7
	+	5,1	5,6	0,249	2,8	1,1
Kožica komercijalne jabuke	-	4,8	12,4	0,489	1,4	4,8
	+	3,8	11,9	0,461	1,5	4,4
Plodovi crne bazge	-	3097,2	3529,0	0,487	1,4	449,1
	+	2645,5	3183,7	0,532	1,3	500,9
Flavan-3-oli						
Kožica tradicionalne jabuke	-	253,9	269,6	0,087	7,9	16,1
	+	232,0	260,5	0,120	5,7	27,9
Kožica komercijalne jabuke	-	85,3	88,3	0,174	4,0	10,6
	+	82,2	81,9	0,208	3,3	8,3
Meso ' tradicionalne jabuke	-	32,7	34,9	0,155	4,5	2,9
	+	34,1	34,3	0,199	3,5	3,5
Meso komercijalne jabuke	-	28,1	29,9	0,190	3,6	1,2
	+	27,1	29,6	0,223	3,1	1,7
Plodovi crne bazge	-	248,7	281,4	0,493	1,4	33,9
	+	223,8	255,0	0,523	1,3	31,2
Dihidrokalkoni						
Kožica tradicionalne jabuke	-	235,8	253,3	0,234	2,9	18,6
	+	219,4	244,7	0,210	3,3	19,4
Kožica komercijalne jabuke	-	19,2	20,4	0,457	1,5	4,9
	+	10,7	14,0	0,446	1,5	2,5
Meso tradicionalne jabuke	-	6,1	4,9	0,129	5,4	1,9
	+	11,0	10,0	0,150	4,6	4,9
Meso komercijalne jabuke	-	2,9	3,9	0,159	4,3	1,0
	+	2,5	0,9	0,195	3,5	1,6
Fenolne kiseline						
Kožica tradicionalne jabuke	-	132,9	137,9	0,222	3,1	4,6
	+	127,7	138,3	0,330	2,1	6,7
Kožica komercijalne jabuke	-	12,2	13,7	0,434	1,6	2,0
	+	9,3	11,5	0,271	2,5	2,1
Meso tradicionalne jabuke	-	93,9	99,6	0,305	2,3	8,8
	+	114,1	92,0	0,378	1,8	18,1
Meso komercijalne jabuke	-	17,2	23,2	0,168	4,1	4,6
	+	17,8	22,8	0,176	3,9	4,1
Plodovi crne bazge	-	134,2	211,5	0,423	1,6	42,2
	+	149,7	205,7	0,449	1,5	33,7
Flavonoli						
Kožica tradicionalne jabuke	-	514,5	509,0	0,155	4,5	52,6
	+	500,4	532,8	0,248	2,8	28,2
Kožica komercijalne jabuke	-	618,5	617,3	0,175	3,9	42,6

	+	591,6	607,8	0,287	2,4	41,9
Plodovi crne bazge	-	1022,9	1276,5	0,520	1,3	205,9
	+	997,8	1106,7	0,537	1,3	133,3

Tradicionalni kultivar jabuke 'Kolačara', komercijalni kultivar jabuke 'Idared''
*SE- standardna greška modela

Tablica 40 Parametri reakcije prvog reda za simulaciju probave polifenola plodova jabuke i crne bazge u tankom crijevu

	β-glukan	C_{eksp} (mg/kg)	C_{∞} (mg/kg)	k (1/min)	$t_{1/2}$ (min)	SE
Ukupni polifenoli						
Kožica tradicionalne jabuke	-	513,4	576,8	0,228	3,0	62,3
	+	488,3	530,7	0,262	2,6	44,9
Kožica komercijalne jabuke	-	487,4	398,6	0,105	6,5	67,5
	+	444,3	360,7	0,141	4,9	65,9
Meso tradicionalne jabuke	-	58,9	50,2	0,123	5,6	16,6
	+	99,1	56,7	0,179	3,8	24,9
Meso komercijalne jabuke	-	13,4	12,1	0,300	2,3	4,5
	+	16,4	12,5	0,291	2,3	5,5
Plodovi crne bazge	-	2198,9	1168,6	0,276	2,5	565,1
	+	1682,9	1463,3	0,401	1,7	456,1
Antocijanini						
Bobice crne bazge	-	910,7	391,3	0,263	2,6	291,9
	+	591,8	410,9	0,293	2,4	233,4
Dihidrokalkoni						
Kožica tradicionalne jabuke	-	155,0	154,4	0,022	31,1	10,4
	+	1645	158,3	0,023	30,1	5,7
Kožica komercijalne jabuke	-	16,3	13,0	0,025	27,7	6,6
	+	12,6	13,1	0,035	19,8	4,2
Meso tradicionalne jabuke	-	9,1	8,9	0,594	1,2	1,9
	+	18,9	11,2	0,826	0,8	4,9
Meso komercijalne jabuke	-	5,1	6,1	0,431	1,6	0,7
	+	5,0	6,1	0,431	1,6	1,2
Fenolne kiseline						
Kožica tradicionalne jabuke	-	24,0	23,7	0,288	2,4	8,6
	+	12,2	15,9	0,281	2,5	7,0
Kožica komercijalne jabuke	-	2,7	2,1	0,152	4,5	0,5
	+	2,6	2,4	0,327	2,1	0,4
Meso tradicionalne jabuke	-	45,4	43,4	0,110	6,3	17,4
	+	80,2	46,4	0,171	4,0	20,5
Meso komercijalne jabuke	-	8,2	8,0	0,461	1,5	2,7
	+	11,5	10,1	0,467	1,4	2,1
Plodovi crne bazge	-	110,7	105,1	0,237	2,9	5,2
	+	110,2	103,7	0,323	2,1	9,1
Flavonoli						
Kožica tradicionalne jabuke	-	334,4	374,1	0,105	6,6	51,5
	+	311,6	332,7	0,176	3,9	40,1
Kožica komercijalne jabuke	-	468,4	381,2	0,088	7,8	65,3
	+	429,1	343,5	0,117	5,9	64,4
Plodovi crne bazge	-	1177,5	653,8	0,306	2,3	287,6
	+	980,9	738,6	0,489	1,4	178,1

Tradicionalni kultivar jabuke 'Kolačara', komercijalni kultivar jabuke 'Idared'
*SE- standardna greška modela

5. RASPRAVA

5.1. Ekstrakcija polifenola iz plodova jabuke i crne bazge

Upotrebljena su dva otapala za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz mesa i kožice plodova jabuke te iz plodova crne bazge - 80 % metanol i metanol zakiseljen s HCl (0,1 %). Polifenoli su ekstrahirani primjenom ultrazvuka u nekoliko uzastopnih ekstrakcija, a ukupni polifenoli su određeni Folin-Ciocalteau metodom (Tablica 6 , Slika 15).

U prve dvije ekstrakcije, pomoću 80 % metanola ekstrahirano je 92 % i 100 % polifenola kožice i mesa jabuke, a pomoću 0,1 % metanola 93 % i 100 % polifenola kožice i mesa plodova jabuke (Slika 15 A i B). Dva koraka ekstrakcije dovoljna su za ekstrakciju polifenola iz kožice i mesa jabuke. S obzirom na dva upotrijebljena otapala, vidljivo je da su ukupne količine ekstrahiranih polifenola nešto veće ukoliko se upotrebljava zakiseljeni metanol, u usporedbi s 80 % metanolom (Tablica 6). No, zakiseljeni metanol može uzrokovati hidrolizu ponekih polifenola iz jabuke što je u skladu većom količinom ekstrahiranih ukupnih polifenola, ali i s ranijim istraživanjima (Jakobek i sur., 2015; Medvidović-Kosanović i sur, 2017). Da bi se izbjegla hidroliza, preporučljivo je koristiti 80 % metanol. U ovom istraživanju za ekstrakcije je korišten 80 % metanol.

Iz plodova crne bazge pomoću 80 % metanola ekstrahirano je 92 % polifenola u prve dvije ekstrakcije, dok su treća i četvrta ekstrahirale dodatnih 8 % polifenola (Slika 15 C). Zakiseljeni metanol rezultirao je sa 96 % ekstrahiranih polifenola u prva dva koraka ekstrakcije, dok su naredna dva dodatno dala još oko 4 % polifenola. I kod plodova bazge najveća količina polifenola ekstrahirana je u prva dva koraka ekstrakcije, ali je preporučljivo koristiti više koraka ekstrakcije, barem tri uzastopne ekstrakcije, zbog velike količine polifenola u plodovima crne bazge. Dobivene vrijednosti ukupnih polifenola (Tablica 6) su u skladu s literaturom (Wu i sur., 2004; Ferreira i sur., 2020). Izbor otapala može biti 0,1 % HCl u metanolu jer bazga sadrži velike količine antocijanina kojima zakiseljena sredina odgovara za ekstrakciju. Naime, pri tim uvjetima antocijanini se nalaze u stabilnijoj formi flavilijevog kationa. Ali i 80 % metanol može poslužiti kao dobro ekstrakcijsko otapalo jer umanjuje mogućnost hidrolize ostalih polifenola prisutnih u bazgi. U ovom radu u daljnjim eksperimentima korišten je 80 % metanol.

5.2. Vrednovanje metoda visokodjelotvorne tekućinske kromatografije obrnutih faza za određivanje polifenola

5.2.1. RP-HPLC metoda za polifenole plodova jabuke

Svi analizirani standardi su pokazali dobru linearnost u ispitanom rasponu s koeficijentima korelacije u rasponu od 0,9927 do 1 (Tablica 7). Nagib kalibracijskog pravca, koji je u proporcionalnom odnosu s osjetljivosti metode, ukazuje da je metoda najosjetljivija za *p*-kumarinsku kiselinu, dok je najmanje osjetljiva za procijanidin B1 (Tablica 7). Iz dobivenih kalibracijskih krivulja su procijenjene vrijednosti LOD i LOQ, odnosno minimalne koncentracije analita koje se mogu detektirati i kvantificirati, navedenim redoslijedom. Vrijednosti LOD i LOQ su bile u rasponu od 0,01-1,35 i 0,04-4,10 mg/L, navedenim redoslijedom, što su prihvatljive vrijednosti (Tablica 7).

Preciznost metode je izražena preko „intra-assay" preciznosti (Tablica 8). Vrijednosti koeficijenta varijacije u rasponu od 0,8 do 3,4 % sugeriraju prihvatljivu preciznost (Taverniers i sur, 2004). Istinitost metode izražena preko analtičkog povrata je dobivena usporedbom koncentracija određenog polifenolnog spoja u uzorku prije i nakon dodavanja poznate količine standarda, te izražena kao postotak. U svim slučajevima je analtički povrat bio veći ili jednak 90,2 %. Vrednovana metoda upotrijebljena je za određivanje polifenola plodova jabuke.

5.2.2. RP-HPLC metoda za polifenole plodova crne bazge

Svi analizirani standardi su pokazali dobru linearnost u ispitanom rasponu (R^2 0,9939 do 0,9995), uz prihvatljivo niske vrijednosti LOD (0,05 do 1,25 mg/L) i LOQ (0,15 do 3,79 mg/L) (Tablica 9). Metoda se pokazala najosjetljivijom za kvercetin-3-galaktozid, a najmanje osjetljivom za cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid. Vrijednosti koeficijenta varijacije (0,15 do 3,0 %) (Tablica 10) ukazuju na zadovoljavajuću preciznost metode. Analitički povrat je bio u prihvatljivom rasponu za sve spojeve (Tablica 10) (Taverniers et al., 2004). Vrednovana metoda upotrijebljena je za analizu polifenola plodova crne bazge.

5.3. Identifikacija polifenola u plodovima jabuke i crne bazge

U svrhu identifikacije polifenola prisutnih u kožici i mesu plodova jabuke i plodovima crne bazge, polifenoli su ekstrahirani 80 % metanolom i analizirani odgovarajućom RP-HPLC metodom. Ukupno petnaest polifenola je identificirano u kožici i mesu jabuke (Slika 16 i 17, Tablica 11). U mesu plodova jabuke su identificirani flavan-3-oli ((+)-katehin i (-)-epikatehin, te njihovi dimeri – procijanidin B1 i procijanidin B2), fenolne kiseline (klorogenska kiselina, izomer

klorogenske kiseline i *p*-kumaroilkina kiselina) i dihidrokalkoni (floretin-2'-glukozid i floretin-2'-ksiloglukozid). U kožici jabuke su, osim navedenih skupina, identificirani i antocijanini (cijanidin-3-galakatozid) te flavonoli (kverecetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid, derivat kvercetina, kvercetin-3-ksilozid i kvercetin-3-ramnozid). Polifenoli identificirani u ovome radu su u skladu s literaturom (Wojdyło i sur., 2008; Giomaro i sur., 2014; Kschonsek i sur., 2018). Prisutnost nekih dodatnih polifenola poput cijanidin-3-glukozida, procijanidina C1 i procijanidina A2 je pronađena u ranijim istraživanjima (Wojdyło i sur., 2008; Kschonsek i sur., 2018).

RP-HPLC analizom plodova crne bazge identificirano je devet polifenola (Slika 18, Tablica 11) koji pripadaju skupinama antocijanina (cijandin-3-sambubiozid-5-glukozid, cijanidin-3-sambubiozid i cijanidin-3-glukozid), flavan-3-ola ((+)-katehin), fenolnih kiselina (neoklorogenska i klorogenska kiselina) i flavonola (kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-glukozid i derivat kvercetina). Veberić i sur. (2009) su pronašli navedene antocijanine kao glavne spojeve u plodovima različitih kultivara crne bazge, uz manje količine cijanidin-3,5-diglukozida i cijanidin-3-rutinozida (Veberic i sur., 2009). (+)-katehin je identificiran kao glavni flavan-3-ol (Oancea i sur., 2018), neoklorogenska i klorogenska kiselina kao glavne fenolne kiseline (Mikulić-Petkovsek i sur., 2015), kvercetin-3-rutinozid kao glavni flavonol uz manje količine kvercetin-3-glukozida (Mikulić-Petkovsek i sur., 2015) što je u skladu s istraživanjem u ovome radu.

5.4. Inhibicija enzima polifenolima iz plodova jabuke I crne bazge

Da bi se ispitala interakcija polifenolnih spojeva s enzimima, provedeno je istraživanje inhibicije enzimske aktivnosti. Odabrani enzimi su α-amilaza i α-glukozidaza. To su enzimi koji se nalaze u probavnom sustavu, ali su isto tako važni enzimi u metabolizmu ugljikohidrata. To ih čini važnima u metabolizmu glukoze. Metode za analizu inhibicije aktivnosti α-amilaze i α-glukozidaze su spektrofotometrijske metode te se pomoću ovih metoda dobiju rezultati inhibicije enzimske aktivnosti ukupnih polifenola prisutnih u uzorku. Da bi se ipak dobilo više podataka o inhibiciji enzima, u ovom radu polifenolni spojevi su ekstrahirani pomoću 80 % metanola iz mesa i kožice plodova jabuke te iz plodova crne bazge, ali su ujedno ekstrahirani polifenoli razdvojeni u pojedine frakcije koje sadržavaju različite polifenolne skupine. Za razdvajanje polifenola u pojedine frakcije upotrijebljena je kromatografija na stupcu. Frakcije su analizirane pomoću odgovarajućih RP-HPLC metoda te su upotrijebljene kao inhibitori enzimske aktivnosti.

Polifenoli ekstrahirani iz kožice plodova tradicionalnih i komercijalnog kultivara jabuke razdvojeni su u tri frakcije (Tablica 12). Prva frakcija sadržavala je najmanje količine polifenola

(21 do 25 mg/kg). Slijedi ju druga frakcija s većim količinama polifenola (90 do 408 mg/kg) te treća frakcija s najvećim količinama polifenola (1465 do 1540 mg/kg). Izračunat je postotak polifenolnih skupina u frakcijama s obzirom na njihovu ukupnu količinu u plodovima jabuke, a prikazane su i količine polifenolnih skupina u pojedinim frakcijama (Slika 19). S obzirom na postotke i količine u frakcijama, vidljivo je da polifenolne skupine nisu potpuno razdvojene. No ipak se može uočiti da su frakcije obogaćene pojedinim skupinama polifenola. Može se istaknuti da je prva frakcija sadržavala malu količinu fenolnih kiselina (21 do 25 mg/kg, 13 do 16 % od ukupnih fenolnih kiselina), druga je bila obogaćena fenolnim kiselinama (107 do 169 mg/kg, 84 do 87 % od ukupnih fenolnih kiselina) i dihidrokalkonima (14 do 146 mg/kg, 37 do 46 % od ukupnih dihidrokalkona), a treća flavonolima (943 do 1339 mg/kg, 92 do 98 % od ukupnih flavonola) i flavan-3-olima (101 do 389 mg/kg, 100%). Ostali polifenoli su pronađeni u manjim količinama.

Polifenoli ekstrahirani iz mesa plodova jabuke razdvojeni su u 3 frakcije, a količine su prikazane u Tablici 13. Prva frakcija sadržavala 36 do 54 mg/kg polifenola. Slijedi ju druga frakcija s većom količinom polifenola (45 do 112 mg/kg polifenola) dok je u trećoj frakciji izdvojeno manje polifenola (10 do 29 mg/kg). S obzirom na postotak polifenolnih skupina te količinu, može se vidjeti da su frakcije obogaćene pojedinim skupinama polifenola. U prvoj frakciji izdvojene su fenolne kiseline (34 do 50% od ukupnih fenolnih kiselina), u drugoj fenolne kiseline (50 do 66 % od ukupnih fenolnih kiselina) i dihidrokalkoni (79 do 93% od ukupnih dihidrokalkona) iako su dihidrokalkoni bili prisutni u maloj količini, a u trećoj flavonoli (100 %) i flavan-3-oli (100%), ali opet treba napomenuti malu količinu obje skupine (Slika 20).

Polifenoli ekstrahirani iz plodova crne bazge razdvojeni su u četiri frakcije (Tablica 14). Količina izdvojenih polifenola rasla je od prve do treće frakcije (252, 1774, 3482 mg/kg, redoslijedom), te je u četvrtoj frakciji izdvojeno manje polifenola (807 mg/kg). S obzirom na postotak polifenolnih skupina u frakcijama te njihovu količinu, može se vidjeti koje skupine dominiraju frakcijama. Prva frakcija obogaćena je flavan-3-olima (64 % od njihove ukupne količine). U drugoj frakciji dominirali su antocijanini (27 % od njihove ukupne količine) te fenolne kiseline (100%). Treća frakcija sadržavala je veći dio antocijanina (66 % od njihove ukupne količine). U četvrtoj frakciji dominirali su flavonoli (69 % od njihove ukupne količine) (Slika 21). U istraživanju koje su proveli Tian i sur. (2018), polifenoli bobičastog voća (aronije i crne mahunice (*Empetrum Nigrum L.)*) su također razdvojeni primjenom kromatografije na stupcu i Sephadex LH-20 gela. Slično kao i u našem istraživanju, fenolne kiseline su bile zastupljene u drugoj frakciji, antocijanini u drugoj, trećoj i četvrtoj (s najvećim količinama u trećoj), dok su flavonoli bili zastupljeni u četvrtoj frakciji (Tian i sur., 2018).

5.4.1. Inhibicija α-amilaze

Za ispitivanje inhibicijskog kapaciteta uzoraka prema α-amilazi nužno je imati referentni spoj, tj. pozitivnu kontrolu. Akarboza se u većini studija koristi kao referentni spoj. Međutim, blage modifikacije uvjeta eksperimenata određivanja inhibicijskog učinka (prvenstveno koncentracije enzima i supstrata) dovode do velikih razlika u IC_{50} vrijednostima akarboze (Koh i sur., 2010; Ali i sur., 2013), što uvelike otežava usporedbu rezultata između različitih istraživanja (Granados-Guzmán i sur, 2018). Nyambe-Silavwe i sur. (2015) su prepoznali ovaj problem te optimizirali metodu za ispitivanje inhibicijskog učinka određenih spojeva prema α-amilazi. IC_{50} vrijednosti akarboze dobivene u navedenom istraživanju su iznosile 2,3 μg/ml i 6,45 μg/ml, kada su kao supstrat korišteni amiloza i amilopektin, navedenim redoslijedom (Nyambe-Silavwe i sur., 2015). IC_{50} vrijednost akarboze dobivena primjenom optimizirane metode u našem istraživanju je iznosila 3,21 μg/ml (Slika 22), što je usporedivo s prije spomenutim vrijednostima.

Polifenolne frakcije su korištene kao inhibitori α-amilaze. Inhibicija enzima povećavala se s povećanjem početne koncentracije polifenola u reakcijskoj smjesi za sve frakcije iz kožice i mesa plodova jabuke (Slika 23) te iz plodova crne bazge (Slika 24). Iz krivulja ovisnosti početne koncentracije polifenola o postotku inhibicije očitana je IC_{50} vrijednost koja predstavlja koncentraciju polifenola potrebnu za 50 % inhibiciju enzimske aktivnosti. Veća IC_{50} vrijednost predstavlja manju inhibicijsku aktivnost. Vrijednosti su prikazane u Tablici 15. Za frakcije dobivene iz kožice plodova jabuke, inhibicija enzima se većinom značajno smanjivala redoslijedom frakcija 1 > frakcija 2 > frakcija 3, a za frakcije iz mesa jabuke značajno redosljedom frakcija 1 > frakcija 2. Frakcija 3 polifenola mesa jabuke slabije je inhibirala enzimsku aktivnost, nije niti dosegla 50 %-tnu inhibiciju te se može predložiti da je najslabiji inhibitor. Frakcije polifenola su se razlikovale po polifenolnim skupinama te je moguće da su pojedine polifenolne skupine utjecale na inhibicijsku aktivnost. Prva frakcija kožice i mesa jabuke sadržavala je samo fenolne kiseline, dok su frakciju 2 činile većinom fenolne kiseline i dihidrokalkoni, a treću flavonoli i flavan-3-oli. Može se zaključiti da su fenolne kiseline bolji inhibitori α-amilaze (frakcija 1 i 2), dok su dihidrokalkoni oslabili inhibiciju (frakcija 2). Flavonoli i flavan-3-oli su se pokazali kao slabiji inhibitori (frakcija 3). Ovo se slaže s literaturnim podatcima. Naime, fenolne kiseline su pokazale mogućnost inhibicije α-amilaze (Sun i sur., 2016; Zhao i sur., 2019 Li i sur., 2019) dok je floretin-2'-glukozid okarakteriziran kao lošiji inhibitor (Zhao i sur., 2019; Li i sur., 2019). Monomeri flavan-3-ola su pokazali slabiji inhibicijski učinak naspram α-amilaze, dok su procijanidini okarakterizirani kao dobri inhibitor α-amilaze (Grussu i sur., 2011; Yilmazer-Musa i sur., 2012; Zhao i sur., 2019).

Inhibicijski učinak frakcija plodova crne bazge značajno se smanjivao redoslijedom Frakcija 1 i 4 > Frakcija 3. Frakcija 2 slabije je inhibirala enzimsku aktivnost, nije niti dosegla 50 %-tnu inhibiciju te se može predložiti da je najslabiji inhibitor. Razlike u polifenolnim skupina između frakcija su mogle utjecati na inhibicijski učinak. Flavan-3-oli (frakcije 1) i flavonoli (frakcije 4) pokazali su se kao bolji inhibitori od antocijanina prisutnim u velikim količinama u frakciji 3 te frakciji 2. Ranija istraživanja pokazala su da antocijanini i flavonoli (Akkarachiyasit i sur., 2010; Homoki i sur., 2016; Ho i sur., 2017b; Swilam i sur., 2022) te (+)-katehin (Yilmarez-Musa i sur., 2012; Zhao i sur., 2019) mogu inhibirati α-amilazu što se slaže s rezultatima u ovom radu.

5.4.2. Inhibicija α-glukozidaze

Akarboza je uspješno inhibirala α-glukozidazu s IC_{50} vrijednošću 159,31 μg/mL (Slika 25). Granados-Guzmán i sur. (2018) su optimizirali metodu za procjenu inhibicije α-glukozidaze, i u njihovom istraživanju IC_{50} vrijednost akarboze iznosila je 164,31 μg/mL, što je vrlo slično rezultatima u ovome radu.

Polifenolne frakcije su korištene kao inhibitori α-glukozidaze. Rezultati su pokazali da se s porastom koncentracije polifenola u frakcijama, povećavala inhibicija α-glukozidaze (Slike 26 i 27). Iz krivulja ovisnosti početne koncentracije polifenola o postotku inhibicije (Slika 26 i 27) dobivene su IC_{50} vrijednosti i prikazane u tablici 16. Polifenoli svih frakcija kožice i mesa plodova jabuke i crne bazge bili su bolji inhibitori α-glukozidaze u usporedbi s akarbozom ($p < 0,001$) što se podudara s ranijim istraživanjima (de Oliveira Raphaelli i sur., 2019; Les i sur., 2018; Yilmazer-Musa i sur., 2012). U većini istraženih frakcija dobivenih iz kožice i mesa jabuke, snažniju inhibicijsku aktivnost pokazali su polifenoli frakcije 3, a nešto slabiju polifenoli frakcije 2 i 1 (kožica tradicionalnog kultivara 2, meso tradicionalnih i komercijalnog kultivara). Može se predložiti da su dobri inhibitori α-glukozidaze bili flavan-3-oli frakcije 3 (u mesu jabuke) koji su i u ranijim istraživanjima pokazali dobru inhibicijsku aktivnost (Yilmazer-Musa i sur., 2012; Gong i sur., 2020), a moguće je da su flavonoli frakcije 3 (kožica jabuke) usporavali inhibiciju što je pokazano ranijim istraživanjima (Gong i sur., 2020). Dihidrokalkoni te fenolne kiseline frakcija 2 i 1 slabije su inhibirali α-glukozidazu.

U plodovima bazge značajno snažniju inhibiciju pokazali su polifenoli frakcije 1 > 4 i 2 >3. U frakciji 1 nalaze se male količine flavan-3-ola za koje je već spomenuto da su dobri inhibitori α-glukozidaze te je moguće da su i ovdje pridonijeli značajno boljoj inhibiciji. U frakciji 2 su sve fenolne kiseline te nešto antocijanina, a u frakciji 4 flavonoli. Ovi polifenoli slabije su inhibirali enzimsku aktivnost. Antocijanini su pridonijeli slabijoj inhibicijskoj aktivnosti frakcije 3. Ranija

istraživanja pokazala su da polifenoli mogu inhibirati aktivnost α-glukozidaze (Akkarachiyasit i sur., 2010; Gong i sur., 2020; Ho i sur., 2017b; Li i sur., 2019).

5.4.3. Kinetika inhibicije enzima

U svrhu istraživanja kinetike procesa inhibicije α-amilaze i α-glukozidaze, inhibicija je praćena u različitim vremenskim periodima. Eksperimentalni podatci inhibicije enzima ukupnim polifenolima kožice i mesa jabuke te plodova crne bazge u ovisnosti o vremenu, modelirani su jednadžbama nultog, prvog i drugog reda (jednadžbe 15 do 17), a primjer se može vidjeti na Slici 28. Eksperimentalnim podatcima najbolje odgovara jednadžba prvog reda, što je vidljivo prema najmanjim standardnim greškama modela (2,9 do 19,4) (Tablica 17). Zbog najboljeg slaganja eksperimentalnih podataka s jednadžbom prvog reda, u Tablici 18 prikazani su samo parametri reakcije prvog reda. To su postotak inhibicije na kraju reakcije (I_∞), konstanta brzine reakcije (k) te vrijeme polureakcije ($t_{1/2}$).

Vidljiva je dobra usklađenost eksperimentalnih postotaka inhibicije α-amilaze i α-glukozidaze (I_{eksp}) i postotaka inhibicije dobivenih modelom (I_∞). Prema vremenu polureakcije može se reći da se polovica inhibicije enzima -amilaze događa između 0,3 i 0,7 minuta, a polovica inhibicije α–glukozidaze između 1,3 i 4,6 minuta. Prema tome, reakcija inhibicije α-glukozidaze je nešto sporija. Moguće je da interakcije polifenola sa škrobom koji se upotrebljava kao supstrat u reakciji inhibicije α-amilaze sprječavaju vezanje enzima na škrob, a posljedica toga je brža i bolja inhibicija enzima α-amilaze. Aleixandre i sur. (2022.) su također zaključili da inkubacija polifenola sa škrobom prije dodatka enzima dovodi do njihove interakcije, što može utjecati na inhibiciju enzima. Nadalje, prema navedenim rezultatima može se pretpostaviti da inhibicija ispitivanih enzima prati zakone prvog reda što je sukladno ranijim istraživanjima (Li i sur., 2020).

5.5. Simulirani probavni proces

Polifenoli kožice i mesa plodova jabuka te crne bazge su ekstrahirani kemijskom ekstrakcijom te enzimski pomognutom ekstrakcijom da bi se odredila količina polifenola prije probave. Nakon toga kožica i meso plodova jabuke i bazge podvrgnuti su simulaciji probave u ustima, želudcu i tankom crijevu te je praćeno otpuštanje polifenola nakon svake faze.

5.5.1. Simulirani probavni proces kožice i mesa plodova jabuke bez i s dodatkom β-glukana

Količine ukupnih polifenola, polifenolnih skupina i pojedinačnih polifenola kožice i mesa plodova jabuke prije probave su prikazane u tablicama 19-26. S ciljem utvrđivanja potencijalnih razlika između kultivara jabuka na temelju sadržaja polifenolnih skupina kožice i mesa prije probave provedena je analiza glavnih komponenata (engl. Principal component analysis, PCA). Došlo je do grupiranja kultivara u četiri različite grupe (Slika 29), što sugerira da se kultivari jabuke razlikuju s obzirom na sadržaj polifenolnih skupina.

U kožici plodova jabuke su prije probave identificirani flavan-3-oli (162 do 572 mg/kg), dihidrokalkoni (53 do 718 mg/kg), fenolne kiseline (95 do 480 mg/kg) i flavonoli (867 do 1384 mg/kg) dok su plodovi jabuke s nijansama crvene boje kožice ('Zlatna Zimska Parmenka', 'Kolačara' i 'Idared') sadržavali i antocijanine (13 do 146 mg/kg) (Tablice 19 do 22). Količine su u skladu s literaturom (Jakobek i sur., 2015; Kschonsek i sur., 2018). U mesu plodova jabuke prije probave su identificirane i kvantificirane tri skupine polifenola: flavan-3-oli (0 do 159 mg/kg), dihidrokalkoni (4 do 39 mg/kg) i fenolne kiseline (32 do 371 mg/kg) (Tablice 23 do 26). Polifenolne skupine i njihove količine su slične onima iz prijašnjih istraživanja (Giomaro i sur., 2014; Jakobek i sur., 2015; Kschonsek i sur., 2018).

Količina pojedinačnih polifenola, polifenolnih skupina te ukupnih polifenola nakon svake faze probave sa ili bez β-glukana je bila statistički značajno manja u usporedbi s količinama prije probave (Tablice 18 do 25) što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Lingua i sur., 2019; Dong i sur., 2021; Jakobek i sur., 2021). Tijekom simulirane probave kožice plodova jabuke u ustima, otpušteno je od 14 % do 29 % ukupnih polifenola ukoliko je simulirana probava provedena bez β-glukana, te od 13 % do 27 % ukoliko je probava provedena s dodatkom β-glukana (Slika 30). Ovi postotci ovise o kultivaru jabuke. U želudcu se količina otpuštenih ukupnih polifenola povećala te je otpušteno od 38 % do 63 % ili od 36 % do 53 % ukupnih polifenola, bez ili s β-glukanom dodanim probavi. Postotak ukupnih polifenola smanjio se tijekom simulirane probave u tankom crijevu te je pronađeno od 25 % do 39 % ili od 23 % do 37 % polifenola bez ili s β-glukanom dodanim probavi. Na slici 31 su prikazani postotci oslobođenih ukupnih polifenola iz mesa jabuka. Nakon probave u ustima oslobođeno je od 13 % do 33 % i od 9 % do 27 % ukupnih polifenola, bez i s dodatkom β-glukana, navedenim redoslijedom. U želudcu je postotak oslobođenih ukupnih polifenola porastao (od 28 % do 73 % i od 33 % do 64 %, bez i s dodatkom β-glukana), a u tankom crijevu se smanjio (od 12 % do 49 % i od 19 % do 47 %, bez ili uz prisustvo β-glukana).

Slični postotci oslobođenih polifenola su pronađeni i u ranijim istraživanjima. Sousa i sur. (2021) su istraživali bioraspoloživost polifenola crne šljive (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) te

ustanovili bioraspoloživost od 27, 58 i 29 % (probava u ustima, želudcu i tankom crijevu, navedenim redoslijedom). Slično, simulacijom probave mrkve u ustima, želudcu i tankom crijevu je oslobođeno 48, 62 i 64 % ukupnih polifenola, navedenim redoslijedom (Dong i sur., 2021). Također, bioraspoloživost polifenola cijelih plodova jabuke (Bouayed i sur., 2012; Fernández-Jalao i sur., 2020), kao i kožice i mesa plodova jabuke (Tenore i sur., 2013; Jakobek i sur., 2021) je bila slična kao ona dobivena u ovome istraživanju.

5.5.1.1. Antocijanini

Antocijanin cijanidin-3-galaktozid je pronađeni u kožici plodova jabuke u malim količinama (Tablice 19 do 22, Slika 30). Male količine su se oslobodile tijekom simulirane probave u ustima (od 3 % do 19 %, od 1 % do 17 % bez ili sa prisutnosti β-glukana), te nešto veće količine tijekom probave u želudcu (od 3 % do 41 %, od 3 % do 42 % bez ili sa prisutnosti β-glukana). U tankom crijevu antocijanini nisu pronađeni (Slika 30). Povećanje količine olsobođenih polifenola nakon probave u želudcu bilo je statistički značajno samo za 'Zlatnu Zimsku Parmenku'. Sniženje pH vrijednosti i dulje vrijeme simulacije probave u želudcu je rezultiralo porastom količine antocijanina. Nestanak antocijanina nakon probave u tankom crijevu može biti posljedica povećanja pH vrijednosti u tankom crijevu. Naime, antocijanini u vodenim otopinama mogu postojati u različitim oblicima, u ovisnosti o pH vrijednosti (Slika 6). Pri niskim pH vrijednostima (1-3) na kojima se odvija probava u želudcu, antocijanini su uglavnom prisutni u obliku flavilijevog kationa crvene boje. Daljnji porast pH dovodi do prelaska antocijanina u bezbojnu karbinol pseudo-bazu (pH 4-5), plavo-ljubičasto kvinodalnu bazu (pH 7-8) ili bezbojne kalkone (pH 12). Pri pH probave u tankom crijevu, antocijanini su uglavnom prisutni kao kvinoidalna baza, što može otežati njihovo određivanje (Lapidot i sur., 1999; Pérez-Vicente i sur., 2002). Nestanak antocijanina u tankom crijevu je primijećen i u drugim istraživanjima (Bouayed i sur., 2011). Pored pH vrijednosti, niska početna količina antocijanina može utjecati na njihov nestanak u tankom crijevu. Simulacija probave voća bogatog antocijaninima, poput borovnice (Jiao i sur., 2017), endemske sorte bazge (Pinto i sur., 2017), crne šljive (Sousa i sur., 2021) i aronije (Bermudez-Soto i sur., 2007) nije uzrokovala nestanak antocijanina, ali je došlo do značajnog smanjenja količine nakon probave u tankom crijevu.

5.5.1.2. Flavan-3-oli

Flavan-3-oli kožice plodova jabuke su oslobođeni tijekom kratke probave u ustima (od 10 % do 23 % te od 8 % do 20 % bez ili sa prisutnim β-glukanom), postotak oslobođenih se povećao

u želudcu (od 29 % do 53 % te od 28 % do 51 % bez ili sa prisutnim β-glukanom), a nakon probave u tankom crijevu nisu pronađeni (Slika 30). Povećanje količine oslobođenih pojedinačnih i ukupnih flavan-3-ola kožice plodova jabuke od probave u ustima do probave u želudcu je statistički značajno (Tablice 19 do 22). Slični rezultati su ostvareni i za meso plodova jabuke, gdje su flavan-3-oli oslobođeni prilikom kratke simulacije probave u ustima (od 10 % do 19 % i od 7 % do 21 %, bez ili sa prisutnim β-glukanom), postotak oslobođenih flavan-3-ola je porastao nakon probave u želudcu (od 23 % do 80 %, i od 22 % do 73 %, bez ili uz prisutnost β-glukana), te se smanjio ili su flavan-3-oli potpuno nestali nakon probave u tankom crijevu (od 0 % do 47 % i od 0 % do 45 %, bez ili uz prisutnost β-glukana) (Slika 31). Ovaj trend je vidljiv i u količini oslobođenih pojedinačnih i ukupnih flavan-3-ola mesa plodova jabuke i statistički je značajan u većini slučajeva (Tablice 23 do 26).

Flavan-3-oli su pronađeni u sličnim postotcima nakon simulacije probave komercijalne jabuke 'Golden Delicious' (u ustima 32 %, želudcu 17 %, tankom crijevu 2 %) (Fernández-Jalao i sur., 2020). Također, usporedivi postotci flavan-3-ola su oslobođeni iz mesa jabuka i u prijašnjim istraživanjima (35, 40 i 56 % nakon simulacije probave u ustima, želudcu i tankom crijevu, navedenim redoslijedom) (Tenore i sur., 2013). Prijašnja istraživanja su potvrdila različita ponašanja flavan-3-ola u tankom crijevu. Tarko i sur. (2020) su utvrdili porast koncentracije (+)-katehina nakon simulirane probave mošta i vina od jabuke od 151 % i 213 % u odnosu na početnu koncentraciju, navedenim redoslijedom. Autori su kao moguće objašnjenje za navedeni porast naveli razgradnju flavan-3-ol oligomera u jednostavne monomere flavan-3-ola, poput (+)-katehina (Tarko i sur., 2020). Međutim, niz autora je primijetio smanjenje ili potpuni nestanak flava-3-ola nakon simulacije probave u tankom crijevu (Bouayed i sur., 2012; Annunziata i sur., 2018; Fernández-Jalao i sur., 2020; Suosa i sur., 2021). Primjerice, u istraživanju koje su proveli Bouayed i sur (2012) (-)-epikatehin i procijanidin B2 su bili prisutni u jabuci prije probave i nakon simulacije probave u želudcu, no nestali su nakon simulacije probave u tankom crijevu. Slično, prilikom inkubacije polifenola prisutnih u jabuci sa simuliranom tekućinom tankog crijeva, primijećena je potpuna degradacija procijanidina B2, bez porasta (-)-epikatehina (Kahle i sur., 2010). Potpuni nestanak flavan-3-ola (bez porasta količine monomera) upućuje na degradaciju ovih polifenola u nepoznate produkte. Bouayed i sur. (2012) su kao vrlo vjerojatno objašnjenje nestanka flavan-3-ola u tankom crijevu naveli degradaciju u nepoznate produkte uzrokovan prelaskom iz kisele sredine želudca u blago alkalnu sredinu tankog crijeva, kao i mogućeg djelovanja pankreatina i žučnih soli. Međutim, Kahle i sur. (2010) su dobili vrlo slične rezultate prilikom inkubacije polifenola jabuka u simuliranoj tekućini tankog crijeva i puferu jednake pH

vrijednosti koji nije sadržavao žučne soli ili pankreatin, te su autori predložili da su upravo kemijski uvjeti eksperimenta (pH vrijednost i temperatura) odgovorni za modifikacije polifenola. Drugi autori su također nisku bioraspoloživost flavan-3-ola pripisali neutralnim uvjetima prilikom simulacije probave u tankom crijevu koji pogoduju epimerizaciji i autooksidaciji flavan-3-ola (Annunziata i sur., 2018).

5.5.1.3. Dihidrokalkoni

Dihidrokalkoni kožice plodova jabuke su oslobođeni nakon probave u ustima (od 21 % do 33 % te od 14 % do 35 %, bez ili sa prisutnim β-glukanom), postotak oslobođenih dihidrokalkona povećao se u želudcu (od 32 % do 74 % te od 18 % do 56 %, bez ili sa prisutnim β-glukanom), te smanjio u tankom crijevu (od 16 % do 43 % te od 11 % do 42 %, bez ili sa prisutnim β-glukanom) (Slika 30). Povećanje količine tijekom simulirane probave želudca, te smanjenje tijekom probave u tankom crijevu je u većini slučajeva statistički značajno (Tablice 19 do 22). Dihidrokalkoni mesa plodova jabuke su pokazali slično ponašanje. Oslobođeni su nakon probave u ustima (od 15 % do 53 % i od 8 % do 55 %, bez i uz prisustvo β-glukana), postotak je porastao nakon simulacije probave u želudcu (od 20 % do 95 % i od 37 % do 81 %, bez ili uz prisustvo β-glukan), te u većini slučajeva porastao nakon probave u tankom crijevu (od 45 % do 148 % i od 43 % do 145 %, bez ili uz prisustvo β-glukana) (Slika 31). Prema količinama oslobođenih dihidrokalkona može se vidjeti da je porast oslobođenih polifenola nakon probave u želudcu i tankom crijevu statistički značajan samo u nekim slučajevima (Tablica 23 do 26).

Povećanje količine dihidrokalkona u želudcu je primijećeno i prilikom simulacije probave tradicionalne talijanske sorte jabuke 'Annurca' i četiri komercijalne sorte jabuka (Tenore i sur., 2013). Dihidrokalkoni su pokazali dobru stabilnost u kiselim uvjetima (Bouayed i sur., 2012; Tarko i sur., 2020; Tenore i sur., 2013), što bi značilo da dospijevaju u tanko crijevo bez formiranja odgovarajućeg aglikona (floretina). Manje količine dihidrokalkona nakon simulacije probave u tankom crijevu u odnosu na želudac su primijećene i u drugim istraživanjima (Quan i sur., 2017; Tarko i sur., 2020). Upravo je hidroliza glikozida floretina u floretin u blago alkalnim uvjetima predložena kao glavni razlog smanjenja količine dihidrokalkona u tankom crijevu (Tarko i sur., 2020). Međutim, neka istraživanja simulacije probave jabuke u tankom crijevu pokazala su da dolazi do porasta količine dihidrokalkona (Bouayed i sur., 2012; Tenore i sur., 2013; Fernández-Jalao i sur., 2020). Takav trend je primijećen i u ovome istraživanju prilikom simulacije probave mesa plodova jabuke.

5.5.1.4. Fenolne kiseline

Klorogenska kiselina je bila jedina fenolna kiselina pronađena u kožici plodova jabuke. Kratkotrajna faza probave u ustima je uzrokovala oslobođenje klorogenske kiseline (10 do 48 % te 7 do 49 % bez ili sa prisutnim β-glukanom). Veće količine su oslobođene nakon simulacije probave u želudcu (13 do 76 % te 10 do 73 % bez ili sa prisutnim β-glukanom), što je praćeno smanjenjem količine nakon simulacije probave u tankom crijevu (3 do 35 % te 3 do 30 % bez ili sa prisutnim β-glukanom) (Slika 30). Porast količine nakon probave u želudcu i pad nakon probave u tankom crijevu je uglavnom bio statistički značajan (Tablice 19 do 22). Fenolne kiseline mesa plodova jabuke su otpuštene nakon probave u ustima (16 do 33 % i 11 do 30 %, bez i uz prisustvo β-glukana), primijećen je porast nakon probave u želudcu (31 do 67 i 38 do 58 %, bez i uz prisustvo β-glukana) te smanjenje nakon probave u tankom crijevu (15 do 50 i 27 do 48 %, bez i uz prisustvo β-glukana) (Slika 31). Ovaj trend je vidljiv i u količini oslobođenih pojedinačnih i ukupnih fenolnih kiselina i statistički je značajan u većini slučajeva (Tablice 23 do 26).

Postotci pronađenih fenolnih kiselina jabuke nakon simulirane probave u našem ranijem istraživanju su slične (do 40, 67 i 10 %, za simulacije probave u ustima, želudcu i tankom crijevu) (Jakobek i sur., 2021). Istraživanja drugih autora (Bouayed i sur., 2012; Fernández-Jalao i sur., 2020) bila su također slična istraživanjima u ovom radu. Bouayed i sur. (2012) su simulirali probavu četiri komercijalne sorte jabuke i primijetili dobru stabilnost klorogenske kiseline u želudcu i njenu degradaciju u tankom crijevu uz porast neoklorogenske i kriptoklorogenske kiseline, sugerirajući izomerizaciju klorogenske kiseline. Gubitak klorogenske kiseline uz rast njenog izomera je vidljiv i u našem istraživanju za meso 'Zlatne Zimske Parmenke', ali ne i za ostale sorte. Nadalje, u tankom crijevu je primijećen nastanak fenolnih kiseline koje nisu bile prisutne u ekstraktu mesa (Tablica 24 i 25). Hidroliza klorogenske kiseline, estera kafeinske i kina kiseline, u slobodne kiseline je predložena kao glavni metabolički put klorogenske kiseline (Farah i sur., 2008). Moguće je da su upravo ove slobodne kiseline detektirane nakon simulacije probave u tankom crijevu. Nadalje, Farah i sur. (2006) su ispitali probavljivost klorogenske kiseline u ljudskim probavnim tekućinama te primijetili njenu stabilnost u simuliranoj ili prirodnoj tekućini želudca. Međutim, inkubacijom klorogenske kiseline sa simuliranom ili prirodnom tekućinom tankog crijeva (pH > 6) je došlo do hidrolize klorogenske kiseline, što upućuje na to da bi povišena pH vrijednost prilikom simulacije probave u tankom crijevu mogla uzrokovati gubitak klorogenske kiseline.

5.5.1.5. Flavonoli

Flavonoli su bili najzastupljenija polifenolna skupina u kožici svih istraživanih sorti jabuke. Oslobođeni su nakon probave u ustima (od 16 % do 23 %, bez ili sa prisutnim β-glukanom) te u većoj količini nakon probave u želudcu (od 46 % do 57 % te od 44 % do 56 %, bez ili sa prisutnim β-glukanom). Postotci otpuštenih flavonola u tankom crijevu su bili od 34 % do 47 % te od 32 % do 46 %, bez ili sa prisutnim β-glukanom (Slika 30). Nakon probave u tankom crijevu količina pojedinih flavonola se statistički značajno smanjila, ili je ostala slična količini u želudcu što može značiti bolju stabilnost flavonola tijekom probave (Tablica 19 do 22). Nakon simulacije probave 5 različitih sorti jabuka u ustima, želudcu i tankom crijevu, postotak oslobođenog kvercetin-3-rutinozida iznosio 35, 65 i 47 % navedenim redoslijedom (Tenore i sur., 2013) što je slično istraživanju u ovom radu.

Dobra stabilnost glikozida kvercetina, posebice prilikom probave u želudcu, je utvrđena u drugim istraživanjima (Bouayed i sur., 2012; Tenore i sur., 2013; Fernández-Jalao i sur., 2020). Tenore i sur. (2013) su pratili količine kvercetin-3-rutinozida u pet različitih sorti jabuka nakon probave u ustima, želudcu i tankom crijevu. Utvrđena je otpornost glikozida kvercetina na hidrolizu u želudcu i dospijevanje u tanko crijevo u početnom obliku (Tenore i sur., 2013). Bouayed i sur. (2012), kao i Jakobek i sur. (2021), nisu pronašli aglikon kvercetina nakon simulacije probave u tankom crijevu, što upućuje da su glikozidi kvercetina otporni na hidrolizu i pri blago alkalnim uvjetima tankog crijeva. Rezultati ovog istraživanja, zajedno s navedenim literaturnim podatcima, upućuju na to da su flavonoli dostupni za apsorpciju u tankom crijevu u relativno velikim količinama.

5.5.3. Simulirani probavni proces plodova crne bazge bez i s dodatkom β-glukana

U plodovima bazge antocijanini su bili zastupljeni u najvećoj količini (8299 mg/kg), a pratili su ih flavonoli (2930 mg/kg), fenolne kiseline (527 mg/kg) i flavan-3-oli (409 mg/kg) (Tablica 27). Ukupna količina polifenola utvrđena u plodovima bazge (11756 mg/kg) je usporediva s onom iz prijašnjih istraživanja (Lee i Finn, 2007).

Prilikom simulirane probave plodova crne bazge oslobođene su značajno manje količine ukupnih polifenola u odnosu na one prisutne prije probave (Tablica 26). Količina oslobođenih ukupnih polifenola je kao i kod jabuke pratila trend usta < želudac > tanko crijevo, bez obzira da li je u probavi bio prisutan β-glukan ili nije (Tablica 27). Ovaj trend vidljiv je i u postotku oslobođenih polifenola (Slika 32). Nakon probave u ustima oslobođeno je 27 % i 25 % ukupnih

polifenola s prisutnim ili bez β-glukana, u želudcu je postotak porastao (40 % ili 34 % sa ili bez prisutnog β-glukana), a u tankom crijevu se smanjio (19 % ili 14 % sa ili bez prisutnog b-glukana). Ovi postotci su slični onim ostvarenim prilikom simulacije probave crne šljive, voća bogatog antocijaninima (27, 58 i 29 % za simulaciju probave u ustima, želudcu i tankom crijevu) (Suosa i sur., 2021).

5.5.3.1. Antocijanini

Antocijanini u plodovima crne bazge su pripadali glikozidima cijanidina, točnije cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid, cijandin-3-sambubiozid i cijanidin-3-glukozid. Ukupni antocijanini oslobođeni su nakon probave u ustima (25 % ili 23 % sa ili bez prisutnog β-glukana), njihov postotak se povećao nakon probave u želudcu (37 % ili 32 % sa ili bez prisutnog β-glukana) te smanjio nakon probave u tankom crijevu (11 % ili 7 % sa ili bez prisutnog β-glukana) (Slika 32). Ovaj trend je vidljiv i u količini oslobođenih pojedinačnih i ukupnih antocijanina i statistički je značajan (Tablica 27). Kao i u kožici jabuke, smanjenje količine antocijanina u tankom crijevu je vrlo vjerojatno posljedica povišenog pH, pri kojem su antocijanini u obliku kvinoidalne baze, što otežava njihovu detekciju. Jiao i sur. (2017) su proveli simulaciju probave borovnica i ustanovili slično ponašanje glikozida cijanidina. Cijanidin-3-glukozid je pokazao dobru stabilnost prilikom simulacije probave u želudcu (gubitak od 46 %), i gotovo potpun nestanak nakon simulacije probave u tankom crijevu (gubitak 97 %), što je objašnjeno povišenjem pH vrijednosti. Nadalje, iz tablice 26 je vidljivo da različita glikolizacija cijanidina utječe na stabilnost antocijanina u tankom crijevu. Svi antocijanini su bili oslobođeni u ustima u sličnom postotku (20, 30 i 22 % za cijandini-3-glukozid, cijandin-3-sambubiozid-5-glukozid i cijandin-3-sambubiozid, navedenim redoslijedom) i želudcu (32, 42 i 36 % za cijandini-3-glukozid, cijandin-3-sambubiozid-5-gluikozid i cijandin-3-sambubiozid, navedenim redoslijedom), ali je u tankom crijevu došlo do velikih razlika. Dok su cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-sambubiozid gotovo u potpunosti nestali (gubitak od 99 i 98 %, navedenim redoslijedom), cijandini-3-sambubiozid-5-glukozid je pokazao dobru stabilnost tankom crijevu sa oporavkom od 26 %. Navedene razlike u stabilnosti antocijanina su vrlo vjerojatno posljedica drugačijih struktura. Općenito, čimbenici koji poboljšavaju stabilnost antocijanina su prisutnost metoksi (OCH_3) skupine na aglikonu antocijanina, ali i prisutnost dodatnog šećera vezanog na poziciju 5 prstena A osnovne strukture flavonoida (Slika 4) (Liu i sur., 2014). Budući da su svi antocijanini prisutni u plodovima crne bazge imali jednak aglikon (cijanidin), bolja stabilnost cijandin-3-sambubiozid-5-glukozida je vrlo vjerojatno posljedica dodatne molekule šećera na poziciji C5 prstena A. Olejnik i sur. (2016) su dobili slične rezultate prilikom simulacije probave plodova crne bazge, gdje su 3,5-diglukozidi cijanidina pokazali znatno

bolju stabilnost nakon potpune probave (oslobođeno 56 %) nego 3-monoglukozidi (oslobođeno 12 %).

5.5.3.2. Flavan-3-oli

Flavan-3-oli su u plodovima crne bazge bili prisutni u obliku (+)-katehina (Tablica 27). Oslobođeni su u ustima (40 % ili 41 % sa ili bez prisutnog β-glukana), nakon čega je došlo do porasta u želudcu (59 % ili 55 % sa ili bez prisutnog β-glukana) (Slika 32) te potpunog gubitka u tankom crijevu (Slika 31). Slični postotci oslobođenih flavan-3-ola su prikazani i u našem ranijem istraživanju (do 41, 76 i 0 % za simulaciju probave u ustima, želudcu i tankom crijevu, navedenim redoslijedom) (Jakobek i sur., 2021). Porast količine u želudcu je statistički značajan (Tablica 26). Gubitak flavan-3-ola u tankom crijevu vjerojatno je posljedica povišene pH vrijednosti i degradacije flavan-3-ola. Potpuni gubitak (+)-katehina je primijećen i prilikom simulacije probave divljih kupina (Sánchez-Velázquez i sur., 2021).

5.5.3.3. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline pronađene u plodovima crne bazge su klorogenska i neoklorogenska kiselina (Tablica 27). Oslobođene su u ustima (21 % i 18 %, bez ili uz prisutnost β-glukana), postotak je porastao u želudcu (29 % i 28 %, bez ili uz prisutnost β-glukana) te se smanjio u tankom crijevu (21 %, bez ili uz β-glukan) (Slika 32). Postotci oslobođenih kiselina podudaraju se s literaturom (Fernández-Jalao i sur., 2020). Prema oslobođenim ukupnim fenolnim kiselinama, vidljiv je isti statistički značajan trend (Tablica 26). No ponašanje pojedinačnih kiselina nešto je drugačije. Količina oslobođene neoklorogenske kiseline povećala se u probavi želudca, a nakon toga ona je potpuno nestala. S druge strane, količina klorogenske kiseline značajno se povećala tijekom sve tri faze probave (Tablica 26).

5.5.3.4. Flavonoli

Dva flavonola pronađena su u plodovima crne bazge: kvercetin-3-rutinozid i kvercetin-3-glukozid. Flavonoli su pokazali dobro stabilnost u svim fazama probave. U ustima je oslobođeno najmanje flavonola (30 % i 27 %, bez ili uz prisustvo β-glukana), što je praćeno porastom u želudcu (41 % i 34 %, bez ili uz β-glukan). Nakon simulacije probave u tankom crijevu postotak oslobođenih flavonola ostao je sličan (40 % i 33 %, bez ili uz β-glukan). Količina oslobođenih

ukupnih flavonola te količina kvercetin-3-rutinozida pokazuje isti statistički značajan trend, povećanje količine u želudcu te zatim stalnu količinu u tankom crijevu (Tablica 27). To sve upućuje na dobru otpornost glikozida kvercetina na hidrolizu u želudcu i tankom crijevu (Slika 32). Drugi autori su dobili slične rezultate (Pinto i sur., 2017; Fernández-Jalao i sur., 2020; Jakobek i sur., 2021).

5.6. Usporedba simuliranog procesa probave sa i bez β-glukana

Količine ukupnih polifenola i pojedinih polifenolnih skupina oslobođenih iz voća nakon simulacije probave, bez ili uz prisustvo β-glukana su uspoređene statističkim testom da bi se vidjele razlike između polifenola otpuštenih iz voća tijekom probave sa ili bez prisutnosti β-glukana (slike 33 do 35). Općenito, prisutnost β-glukana je smanjila količinu oslobođenih ukupnih polifenola iz kožice i mesa jabuke te iz plodova bazge tijekom probave u ustima, želudcu i tankom crijevu (Slika 32) kao i polifenolnih skupina (Slika 34 i 35). Ovo smanjenje je u nekim slučajevima bilo statistički značajno. Razlike između količina polifenolnih skupina nakon pojedinih faza probave s obzirom na prisutnost β-glukana su dalje analizirane analizom glavnih komponenti (PCA). Došlo je grupiranja podataka (Slika 36), što sugerira da β-glukan uistinu utječe na bioraspoloživost polifenola. Može se predložiti da je β-glukan adsorbirao na svoju površinu dio oslobođenih polifenola tijekom probave što je utjecalo na njihovu manju količinu u probavi. β-glukan može vezati polifenole na svoju površinu procesom adsorpcije, što je već istraženo na polifenolima čaja (Wu i sur., 2011), jabuke (Jakobek i sur., 2020b) i vina (Mekoue Nguela i sur., 2016). Također, Ahmad i sur. (2018) su pokazali da β-glukan može enkapsulirati polifenole i na taj način poboljšati njihovu stabilnost tijekom simulirane probave. Međutim, razni čimbenici mogu utjecati na vezanje polifenola na β-glukan, poput pH vrijednosti i temperature (Gao i sur., 2012) te koncentracije polifenola (Jakobek i sur., 2020c). Također, različite polifenolne skupine mogu pokazati drugačije adsorpcijske kapacitete prilikom vezanja na β-glukan (Krivak i sur., 2016).

5.7. Kinetika simuliranog probavnog procesa

U svrhu boljeg razumijevanja ponašanja polifenola prilikom simuliranog probavnog procesa, praćene su količine oslobođenih polifenola iz kožice i mesa tradicionalnih i komercijalnih sorata jabuke te plodova crne bazge nakon različitih vremenskih perioda (10, 20, 30, 60 i 120 minuta probave u želudcu; 10, 20, 30, 60 i 120 minuta probave u tankom crijevu). Utjecaj β-

glukana na kinetiku oslobađanja polifenola je istražen u usporednom eksperimentu u kojem je simulirana probava voća uz dodatak β-glukana (Tablice 28 do 37).

5.7.1.Oslobađanje polifenola voća prilikom simuliranog probavnog procesa

Na slikama 37 do 39 je prikazano oslobađanje pojedinih polifenolnih skupina iz kožice i mesa plodova jabuke te plodova crne bazge u ovisnosti o vremenu. Može se vidjeti da je količina oslobođenih polifenolnih skupina prilikom probave u želudcu rasla u prvih 10 do 30 minuta, ovisno o skupini spojeva i voću. Nakon tog perioda količina varira te je u nekim slučajevima stalna ili pokazuje pad. Smanjenje količine oslobođenih polifenolnih skupina vidljivo je u periodu probave u tankom crijevu. Veliki gubitak ili potpuni nestanak polifenola u prvih 10 minuta simulacije probave u tankom crijevu je vidljiv za antocijanine i flavan-3-ole. S druge strane, smanjenje količina dihidrokalkona, fenolnih kiselina i flavonola je bilo znatno blaže, što upućuje na bolju stabilnost ovih skupina prilikom prelaska između različitih faza probave. Sánchez-Velázquez i sur. (2021) su utvrdili blago smanjenje količine ukupnih polifenola oslobođenih iz divljih i komercijalnih kupina od 30-te do 120-te minute probave u želudcu, praćeno značajnim smanjenjem prilikom probave u tankom crijevu. Navedeni rezultati su usporedivi s rezultatima dobivenim u ovome istraživanju.

5.7.2. Kinetički modeli simuliranog probavnog procesa voća

Istraživanje količine oslobođenih polifenola u ovisnosti o vremenu omogućuje procjenu kinetičkih parametara probave polifenola voća. Dobivene količine oslobođenih ukupnih polifenola nakon simulirane probave želudca i tankog crijeva (c_A) u ovisnosti o vremenu t, analizirane su nelinearnom regresijom jednadžbi nultog, prvog i drugog reda koje su upotrijebljene u ranijim istraživanjima za otpuštene nutrijente tijekom probavnog procesa (Slika 40). Krivulje ovih jednadžbi nisu pokazale dobru podudarnost s eksperimentalnim vrijednostima nakon probave u želudcu i tankom crijevu, a posebno veliko neslaganje pokazalo se za modeliranje podataka tankog crijeva (slika 40 A). Razlog tome je vjerojatno što se tijekom simulirane probave polifenolnih spojeva oni otpuštaju iz voća što je vidljivo za probavu u želudcu gdje količina otpuštenih polifenola raste, ali se polifenoli isto tako i razgrađuju. Razgradnja je osobito vidljiva tijekom probave u tankom crijevu gdje se tijekom vremena količina polifenola smanjuje. Jednadžbe za nulti, prvi i drugi red koje su se već koristile za modeliranje podataka dobivenih simuliranom probavom su jednadžbe koje opisuju otpuštanje produkata i ne odgovaraju ovakvim

eksperimentalnim podatcima. Usporedbom jednadžbi nultog, prvog i drugog reda posebno je vidljivo da jednadžba nultog reda ne odgovara podatcima te pokazuje veliku standardnu grešku (Slika 40 A, tablica 38).

Zbog toga su jednadžbe prvog i drugog reda modificirane te primijenjene za analizu eksperimentalnih podataka (jednadžbe 25 i 26) dok jednadžba nultog reda nije primjenjena za analizu eksperimentalnih podataka zbog velikog neslaganja s eksperimentalnim podatcima. Nakon nelinearne regresije modificiranih jednadžbi prvog i drugog reda vidljivo je da krivulje odgovaraju eksperimentalnim podatcima (Slika 40 B), a standardne greške modela su manje. Usporedbom standardne greške modela prvog i drugog reda vidljivo je da su greške manje za prvi red te su daljnje analize napravljene samo s jednadžbom za prvi red. Kinetički modeli prvog reda su i u ranijim istraživanjima korišteni za opisivanje oslobađanja polifenola (Villanueva-Carvajal i sur., 2013) ili škroba (Butterworth i sur., 2012; Zhang i sur., 2021;) prilikom *in vitro* simulacije probave.

Procijenjeni su parametri - koncentracija oslobođenih polifenola kada reakcija teži u beskonačnost (c_∞), konstanta brzine reakcije (k) te vrijeme polureakcije ($t_{1/2}$) (Tablica 39 i 40). Vrijednosti c_∞ pojedinih polifenolnih skupina i ukupnih polifenola kožice i mesa plodova jabuke i plodova crne bazge dobivene za simulaciju probave u želudcu i tankom crijevu odgovaraju eksperimentalnim vrijednostima, uz relativno niske standardne greške modela (Tablica 39 i 40). Vrijednosti vremena polureakcije oslobađanja polifenola u želudcu (od 1,3 do 7,9 minuta) sugeriraju da se većina polifenola oslobodi u prvih 5 do 10 minuta probave, nakon čega dolazi do znatnog usporavanja reakcije. Niža vremena polureakcije polifenolnih skupina plodova crne bazge (od 1,3 do 1,6 minuta) upućuju na brže oslobađanje polifenola iz ovoga voća. Moguće je da su prehrambena vlakna prirodno prisutna u jabukama usporila oslobađanje polifenola. Utjecaj različitih matrica hrane na oslobađanje polifenola je spomenut i u ranijim istraživanjima (Mandalari i sur., 2016). Vremena polureakcije u tankom crijevu (od 0,8 do 31,1 min za dihidrokalkone te od 1,4 do 7,8 min za sve ostale polifenolne skupine i ukupne polifenole) su uglavnom bila slična onima dobivenim za simulaciju probave u želudcu. Iznimka su dihidrokalkoni kožice jabuke koji su pokazali znatno veća vremena polureakcije (od 0,8 do 31,1 minuta) što može ukazivati na njihovu bolju stabilnost prilikom probave u tankom crijevu. Također, vidljiv je trend smanjenja vremena polureakcije u prisutnosti β-glukana, iako razlike nisu velike.

Navedeni rezultati sugeriraju da se oslobađanje polifenola prilikom simulacije probave odvija prema reakciji prvog reda, što odgovora ranijim istraživanjima (Villanueva-Carvajal i sur., 2013). U reakcijama prvog reda brzina reakcije je ovisna o koncentraciji reaktanta, tj. brzina

promjene koncentracije tvari je u svakom trenutku proporcionalna koncentraciji tvari (Atkins, 2001).To nam ukazuje kako je brzina reakcije oslobađanja polifenola iz voća prilikom simulacije probave ovisna o samoj količini polifenola u voću. Reakcija je na početku brza, a smanjenjem količine bioraspoloživih polifenola u voću dovodi do usporavanja reakcije.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu je istražen utjecaj β-glukana na bioraspoloživost polifenola plodova jabuke i crne bazge istraživanjem kinetičkih modela simuliranih probavnih procesa. Na osnovi rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Karakterizacija polifenola u tradicionalnim i komercijalnom kultivaru jabuke i u plodovima crne bazge

- dvije vrednovane RP-HPLC metode su prema istraživanim parametrima (linearnost, osjetljivost, granica detekcije, granica kvantifikacije, preciznost i točnost) prihvatljive za analizu polifenolnih spojeva iz plodova jabuke i crne bazge
- upotrebom vrednovanih RP-HPLC metoda u kožici i mesu plodova jabuke identificirano je petnaest polifenolnih spojeva koji pripadaju skupinama flavan-3-ola, fenolnih kiselina, dihidrokalkona, antocijanina te flavonola. U plodovima crne bazge identificirano je devet spojeva iz skupina antocijanina, flavonola, fenolnih kiselina i flavan-3-ola.

2. Potencijal polifenolnih spojeva plodova jabuke i crne bazge kao inhibitora enzimske aktivnosti

- polifenolni spojevi su pokazali dobar potencijal za inhibiciju enzimske aktivnosti α-amilaze i α-glukozidaze.
- fenolne kiseline su se pokazale kao bolji inhibitori α-amilaze od sintetskog inhibitora akarboze, dok su se sve polifenolne skupine pokazale kao bolji inhibitori α-glukozidaze nego akarboza.
- eksperimentalni podaci inhibicije oba enzima su pokazali bolje slaganje s modelom prvog reda. Vrijeme polureakcije inhibicije α-amilaze i α-glukozidaze polifenolima voća je iznosilo od 0,3 do 0,7 i od 1,3 do 4,6 minuta, navedenim redoslijedom. Može se predložiti da je inhibicija α-amilaze nešto brža reakcija u usporedbi s inhibicijom α-glukozidaze. Moguće je da interakcije polifenola sa škrobom koji se upotrebljava kao supstrat u reakciji inhibicije α-amilaze sprječavaju vezanje enzima na škrob, a posljedica toga je brža i bolja inhibicija enzima α-amilaze.

3. Bioraspoloživost polifenolnih spojeva plodova jabuke i crne bazge

- Prema rezultatima *in vitro* simulacije probave u ustima, želudcu i tankom crijevu moguće je zaključiti da polifenoli postaju raspoloživi za apsorpciju u probavnom sustavu, iako u značajno manjim količinama u odnosu na početnu količinu prije probave. Generalno, manje količine polifenola su oslobođene u ustima, njihova količina je značajno porasla nakon probave u želudcu te se značajno smanjila nakon probave u tankom crijevu.

- Pojedine polifenolne skupine su pokazale različita ponašanja prilikom simulacije probave.
- Antocijanini su oslobođeni tijekom probave u ustima iz kožice jabuke i plodova crne bazge, njihova količina je značajno porasla tijekom probave u želudcu te se značajno smanjila tijekom probave u tankom crijevu (plodovi bazge) ili su antocijanini potpuno nestali (kožica jabuke). Različita pH vrijednost probavnog procesa utječe na molekularnu formu antocijanina. Povišeni pH u tankom crijevu utjecao na njihovu degradaciju i otežao određivanje. Cijanidni-3-sambubiozid-5-glukozid, prisutan u plodovima crne bazge je pokazao bolju stabilnost u tankom crijevu. Moguće je da molekula glukoze na poziciji C5 prstena A poboljšala stabilnost ovog antocijanina u tankom crijevu.
- Flavan-3-oli su pokazali slično ponašanje kao i antocijanini, oslobođeni su tijekom simulacije probave u ustima (kožica i meso jabuke, plodovi crne bazge), njihova količina je značajno porasla tijekom probave u želudcu te se značajno smanjila tijekom probave u tankom crijevu ili su potpuno nestali. Degradacija ovih spojeva u nepoznate produkte pri pH vrijednosti probave u tankom crijevu je vjerojatno objašnjenje.
- Fenolne kiseline su pokazale nešto bolju stabilnost tijekom probave. U tankom crijevu je došlo do moguće izomerizacije klorogenske kiseline, kao i njene hidrolize.
- Dihidrokalkoni su oslobođeni tijekom probave u ustima iz kožice i mesa jabuke, njihova količina je značajno porasla tijekom probave u želudcu te se značajno smanjila tijekom probave u tankom crijevu.
- Flavonoli su pokazali najbolju stabilnost tijekom probavnog procesa, budući da tijekom probave u tankom crijevu nije došlo do značajnog smanjenja količine oslobođenih flavonola.

4. Utjecaj β-glukana na bioraspoloživost polifenolnih spojeva

- Jednak trend oslobađanja polifenola kroz simulaciju probave je primijećen i u eksperimentu s dodanim β-glukanom.
- Prisutnost β-glukana je smanjila količine oslobođenih ukupnih polifenola, polifenolnih skupina i pojedinačnih polifenola, u odnosu na simuliranu probavu bez dodanog β-glukana. Može se pretpostaviti da je β-glukan adsorbirao polifenole na svoju površinu i na taj način smanjio njihovu bioraspoloživost u gornjim dijelovima probavnog sustava, ali za posljedicu ima mogućnost povećati količine polifenola koje dospijevaju do debelog crijeva.

5. Kinetičko istraživanje bioraspoloživosti polifenolnih spojeva plodova jabuke i crne bazge

- Provedeno kinetičko istraživanje oslobađanja polifenola iz plodova jabuke i crne bazge tijekom simulirane probave, bez i uz prisutnost β-glukana pokazalo je da se većina polifenola voća oslobodi u prvih 10 do 30 minuta simulirane probave želudca, a razgradnja polifenola dogodi se u prvih 10 minuta simulirane probave u tankom crijevu.
- Dihidrokalkoni, fenolne kiseline i flavonoli su pokazali bolju stabilnost tijekom probave u tankom crijevu, dok se antocijanini i flavan-3-oli potpuno degradiraju ili dolazi do znatnog smanjenja količine.
- Oslobađanje polifenola tijekom probave u želudcu i smanjenje njihove količine tijekom probave u tankom crijevu najbolje slažu s modificiranom jednadžbom prvog reda. Prema tome, moguće je zaključiti da je brzina reakcije oslobađanja polifenola iz istraživanih plodova prilikom probavnog procesa ovisna o samoj količini polifenola prisutnoj u voću. Vrijeme polureakcije oslobađanja polifenola u želudcu iznosi od 1,3 do 7,9 min za polifenole kožice i mesa jabuke te 1,3 do 1,6 min za polifenole plodova crne bazge. Moguće je da se polifenoli nešto sporije oslobađaju iz plodova jabuke nego iz plodova crne bazge. Vrijeme polureakcije oslobađanja polifenola u tankom crijevu iznosi od 1,4 do 7,8 min za sve polifenole kožice i mesa jabuke te plodova crne bazge, osim za dihidrokalkone (od 0,8 do 31,1 min) što ukazuje na sporije otpuštanje dihidrokalkona tijekom probave u tankom crijevu.
- U ovom radu prvi puta je istraživan utjecaj β-glukana na bioraspoloživost polifenolnih spojeva iz plodova tradicionalnih kultivara jabuke te plodova crne bazge. Kinetičko istraživanje simuliranog procesa probave također do sada nije napravljeno, prema dosadašnjim saznanjima. Doprinos cijelom istraživanju dalo je i modificiranje jednadžbi prvog i drugog reda koje se sada mogu primijeniti u daljnjim istraživanjima. Rezultati dobiveni u ovom radu su omogućili bolje razumijevanje bioraspoloživosti polifenola plodova jabuke i crne bazge, kao i utjecaju β-glukana na bioraspoloživost.

7. LITERATURA

Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F.M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M.S., Ishtiaq, A., Hussain, S., Suleria, H.A.R. (2017): Natural polyphenols: An overview. International Journal of Food Properties 20, 1689–1699.

Ahmad, A., Kaleem, M. (2018): β-Glucan as a food ingredient, U: Biopolymers for Food Design. Elsevier, pp. 351–381.

Ahmad, M., Ashraf, B., Gani, A., Gani, A. (2018): Microencapsulation of saffron anthocyanins using β-glucan and β-cyclodextrin: Microcapsule characterization, release behaviour & antioxidant potential during *in-vitro* digestion. International Journal of Biological Macromolecules 109, 435–442.

Akkarachiyasit, S., Charoenlertkul, P., Yibchok-anun, S., Adisakwattana, S. (2010): Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α-glucosidase and pancreatic α-amylase. International Journal of Molecular Sciences 11, 3387–3396.

Alegría, A., Garcia-Llatas, G., Cilla, A., 2015. Static digestion models: General introduction, U: The impact of food bioactives on health. Springer International Publishing, 3–12.

Aleixandre, A., Vicente Gil, J., Sineiro, J., Rosell, C.M. (2022): Understanding phenolic acids inhibition of α-amylase and α-glucosidase and influence of reaction conditions. Food Chemistry 372, 131231.

Ali, A. (2013): Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. International Journal of Food Properties 16, 91–103.

Ali, R.B., Atangwho, I.J., Kuar, N., Ahmad, M., Mahmud, R., Asmawi, M.Z. (2013): *In vitro* and *in vivo* effects of standardized extract and fractions of *Phaleria macrocarpa* fruits pericarp on lead carbohydrate digesting enzymes. BMC Complementary and Alternative Medicie 13, 39-50.

Alqurashi, R.M., Alarifi, S.N., Walton, G.E., Costabile, A.F., Rowland, I.R., Commane, D.M. (2017*): In vitro* approaches to assess the effects of açai (*Euterpe oleracea*) digestion on polyphenol availability and the subsequent impact on the faecal microbiota. Food Chemistry 234, 190–198.

Annunziata, G., Maisto, M., Schisano, C., Ciampaglia, R., Daliu, P., Narciso, V., Tenore, G., Novellino, E. (2018): Colon bioaccessibility and antioxidant activity of white, green and black tea polyphenols extract after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. Nutrients 10, 1711-1728.

Aryaeian, N., Khorshidi Sedehi, S., Arablou, T. (2017): Polyphenols and their effects on diabetes management: A review. Medical Journal of The Islamic Republic of Iran 31, 886–892.

Atkins, P. (2001): The elements of Physical Chemistry. Oxford University Press, Oxford.

Atkinson, M.D., Atkinson, E. (2002): *Sambucus nigra* L.: *Sambucus nigra*. Journal of Ecology 90, 895-923

Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018): Overview of polyphenols and their properties, U: Polyphenols: Properties, recovery, and applications. Elsevier, 3–44.

Bergantin, C., Maietti, A., Cavazzini, A., Pasti, L., Tedeschi, P., Brandolini, V., Marchetti, N. (2017): Bioaccessibility and HPLC-MS/MS chemical characterization of phenolic antioxidants in Red Chicory (*Cichorium intybus*). Journal of Functional Foods 33, 94–102.

Bermudez-Soto, M., Tomasbarberan, F., Garciaconesa, M. (2007): Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. Food Chemistry 102, 865–874.

Blancas-Benitez, F.J., Mercado-Mercado, G., Quirós-Sauceda, A.E., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G.A., Sáyago-Ayerdi, S.G. (2015): Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and *in vitro* kinetics release of polyphenols in Mexican 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica L.*) by-products. Food & Function 6, 859–868.

Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L., Bohn, T. (2012): Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. Food Chemistry 131, 1466–1472.

Bouayed, J., Hoffmann, L., Bohn, T. (2011): Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. Food Chemistry 128, 14–21.

Bozbulut, R., Şanlıer, N., Döğer, E., Bideci, A., Çamurdan, O., Cinaz, P. (2020): The effect of β-glucan supplementation on glycemic control and variability in adolescents with type 1 diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice 169, 108464.

Brdička R. (1969): Osnove fizikalne kemije. Školska knjiga, Zagreb.

Butterworth, P.J., Warren, F.J., Grassby, T., Patel, H., Ellis, P.R. (2012): Analysis of starch amylolysis using plots for first-order kinetics. Carbohydrate Polymers 87, 2189–2197.

Ciocoiu, M., Mirón, A., Mares, L., Tutunaru, D., Pohaci, C., Groza, M., Badescu, M. (2009): The effects of *Sambucus nigra* polyphenols on oxidative stress and metabolic disorders in experimental diabetes mellitus. Journal of Physiology and Biochemistry 65, 297–304.

Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2006): Phenols, polyphenols and tannins: An overview, U: Plant Secondary Metabolites. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 1–24.

Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2009): Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. Natural Products Report 26, 1001-1045.

Cuervo, A., Valdés, L., Salazar, N., de los Reyes-Gavilán, C.G., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., González, S. (2014): Pilot study of diet and microbiota: Interactive associations of fibers and polyphenols with human intestinal bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62, 5330–5336.

da Costa, C.T., Nelson, B.C., Margolis, S.A., Derek Horton (1998): Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography A 799, 321–327.

de Oliveira Raphaelli, C., dos Santos Pereira, E., Camargo, T.M., Vinholes, J., Rombaldi, C.V., Vizzotto, M., Nora, L. (2019): Apple phenolic extracts strongly inhibit α-glucosidase activity. Plant Foods for Human Nutrition 74, 430–435.

Dong, R., Liu, S., Xie, J., Chen, Y., Zheng, Y., Zhang, X., Zhao, E., Wang, Z., Xu, H., Yu, Q. (2021): The recovery, catabolism and potential bioactivity of polyphenols from carrot subjected to *in vitro* simulated digestion and colonic fermentation. Food Research International 143, 110263.

Donno, D., Beccaro, G.L., Mellano, M.G., Torello Marinoni, D., Cerutti, A.K., Canterino, S., Bounous, G. (2012): Application of sensory, nutraceutical and genetic techniques to create a quality profile of ancient apple cultivars: Quality profile of ancient apple cultivars. Journal of Food Quality 35, 169–181.

Đorđević, S.Đ., Dražić, V.J. (1987): Fizička hemija, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.

Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C.M., Lafay, S. (2008): Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. The Journal of Nutrition 138, 2309–2315.

Ferguson, J.JA., Stojanovski, E., MacDonald-Wicks, L., Garg, M.L. (2020): High molecular weight oat β-glucan enhances lipid-lowering effects of phytosterols. A randomised controlled trial. Clinical Nutrition 39, 80–89.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., Hornero-Méndez, D. (2012): Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. Food Research International 46, 438–450.

Fernández-Jalao, I., Balderas, C., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B. (2020): Impact of an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant capacity of apple treated by high-pressure processing. Innovative Food Science & Emerging Technologies 66, 102486-102498.

Ferreira, S.S., Silva, P., Silva, A.M., Nunes, F.M. (2020): Effect of harvesting year and elderberry cultivar on the chemical composition and potential bioactivity: A three-year study. Food Chemistry 302, 125366.

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

Gil-Izquierdo, A., Gil, M.I., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A. (2001): *In vitro* availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 1035–1041.

Giomaro, G., Karioti, A., Bilia, A.R., Bucchini, A., Giamperi, L., Ricci, D., Fraternale, D. (2014): Polyphenols profile and antioxidant activity of skin and pulp of a rare apple from Marche region (Italy). Chemistry Central Journal 8, 45-55.

Gong, T., Yang, X., Bai, F., Li, D., Zhao, T., Zhang, J., Sun, L., Guo, Y. (2020): Young apple polyphenols as natural α-glucosidase inhibitors: *In vitro* and *in silico* studies. Bioorganic Chemistry 96, 103625-103635.

González-Aguilar, G.A., Blancas-Benítez, F.J., Sáyago-Ayerdi, S.G. (2017): Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: molecular interactions and bioaccessibility. Current Opinion in Food Science 13, 84–88.

Granados-Guzmán, G., Castro-Rios, R., de Torres, N.W., Salazar-Aranda, R. (2018): Optimization and validation of a microscale *in vitro* method to assess α-glucosidase inhibition activity. Current Analytical Chemistry 14, 458–464.

Grussu, D., Stewart, D., McDougall, G.J. (2011): Berry polyphenols inhibit α-amylase *in vitro*: identifying active components in rowanberry and raspberry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59, 2324–2331.

Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K. (2010): Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. International Journal of Molecular Sciences 11, 1365–1402.

Henderson, D.J., Rettner, C.T. (2003): Physical chemistry, U: Encyclopedia of Physical Science and Technology. Elsevier, 159–176.

Herak M., Kušec LJ., Marković M., Petreski A., Škorić K.,Galas D. (1992): Osnove fizikalne kemije. Školska knjiga, Zagreb.

Ho, G., Wangensteen, H., Barsett, H. (2017a): Elderberry and elderflower extracts, phenolic compounds, and metabolites and their effect on complement, RAW 264.7 macrophages and dendritic cells. International Journal of Molecular Sciences 18, 584-601.

Ho, G.T.T., Kase, E.T., Wangensteen, H., Barsett, H. (2017b): Phenolic elderberry extracts, anthocyanins, procyanidins, and metabolites influence glucose and fatty acid uptake in human skeletal muscle cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 65, 2677–2685.

Homoki, J.R., Nemes, A., Fazekas, E., Gyémánt, G., Balogh, P., Gál, F., Al-Asri, J., Mortier, J., Wolber, G., Babinszky, L., Remenyik, J. (2016): Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and α-amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus L.*). Food Chemistry 194, 222–229.

Jakobek, L. (2015): Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. Food Chemistry 175, 556–567.

Jakobek, L., Boc, M., Barron, A.R. (2015): Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from apples. Food Analytical Methods 8, 2612–2625.

Jakobek, L., Matić, Petra., Krešić, V., Barron, A.R. (2017): Adsorption of apple polyphenols onto β-glucan. Czech Journal of Food Science 35, 476–482.

Jakobek, L., Matić, P. (2019): Non-covalent dietary fiber - polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. Trends in Food Science & Technology 83, 235–247.

Jakobek., L., Ištuk, J., Buljeta, I., Voća S., Šic Žalbur, J., Lesičar, J., Skendrović Babojelić, M. (2020a): Polyphenol content, profile, and distribution in old, traditional apple varieties. Croatian Journal of Food Science and Technology 12, 110-117.

Jakobek, L., Buljeta, I., Ištuk, J., Barron, A.R. (2020b): Polyphenols of traditional apple varieties in interaction with barley β-glucan: a study of the adsorption process. Foods 9, 1278-1292.

Jakobek, L., Matić, P., Kraljević, Š., Ukić, Š., Benšić, M., Barron, A.R. (2020c): Adsorption between quercetin derivatives and β-glucan studied with a novel approach to modeling adsorption isotherms. Applied Sciences 10, 1637-1653.

Jakobek, L., Ištuk, J., Matić, P., Skendrović Babojelić, M. (2021): Interactions of polyphenols from traditional apple varieties 'Bobovac', 'Ljepocvjetka' and 'Crvenka' with β-Glucan during *in vitro* simulated digestion. Food Chemistry 363, 130283-130295.

Jiao, X., Li, B., Zhang, Q., Gao, N., Zhang, X., Meng, X. (2018): Effect of *in vitro* -simulated gastrointestinal digestion on the stability and antioxidant activity of blueberry polyphenols and their cellular antioxidant activity towards HepG2 cells. International Journal of Food Science & Technology 53, 61–71.

Juadjur, A., Winterhalter, P. (2012): Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60, 2427–2433.

Kahle, K., Kempf, M., Schreier, P., Scheppach, W., Schrenk, D., Kautenburger, T., Hecker, D., Huemmer, W., Ackermann, M., Richling, E. (2011): Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. European Journal of Nutrition 50, 507–522.

Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Grootaert, C., Van Camp, J. (2015): Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal caco-2 cells—A review. International Journal of Molecular Sciences 16, 21555–21574.

Kao, Y.-L., Kuo, Y.-M., Lee, Y.-R., Chen, W.-J., Lee, Y.-S., Lee, H.-J. (2017): Apple polyphenol decelerates bladder cancer growth involving apoptosis and cell cycle arrest in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced experimental animal model. Journal of Functional Foods 36, 1–8.

Kaulmann, A., André, C.M., Schneider, Y.-J., Hoffmann, L., Bohn, T. (2016): Carotenoid and polyphenol bioaccessibility and cellular uptake from plum and cabbage varieties. Food Chemistry 197, 325–332.

Kiprovski, B., Malenčić, Đ., Ljubojević, M., Ognjanov, V., Veberic, R., Hudina, M., Mikulic-Petkovsek, M. (2021): Quality parameters change during ripening in leaves and fruits of wild growing and cultivated elderberry (*Sambucus nigra*) genotypes. Scientia Horticulturae 277, 109792.

Koh, L.W., Wong, L.L., Loo, Y.Y., Kasapis, S., Huang, D. (2010): Evaluation of different teas against starch digestibility by mammalian glycosidases. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 148–154.

Kojima, T., Akiyama, H., Sasai, M., Taniuchi, S., Goda, Y., Toyoda, M., Kobayashi, Y. (2000): Anti-allergic effect of apple polyphenol on patients with atopic dermatitis: A pilot study. Allergology International 49, 69–73.

Krentz, A.J. (2018): Evolution of glucose-lowering drugs for type 2 diabetes, u: Nutritional and therapeutic interventions for diabetes and metabolic syndrome. Elsevier, 431–454.

Krivak, P., Ukić, Š., Jakobek, L. (2016): Polyphenols and β-glucan interactions through linear adsorption models. Croatian Journal of Food Science and Technology 8, 66-73.

Kschonsek, J., Wiegand, C., Hipler, U.-C., Böhm, V. (2019): Influence of polyphenolic content on the *in vitro* allergenicity of old and new apple cultivars: A pilot study. Nutrition 58, 30–35.

Kuech, T.F. (2011): Integration of dissimilar materials, u: Comprehensive semiconductor science and technology. Elsevier, 1–24.

Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R., Kanner, J. (1999): pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47, 67–70.

Lattanzio, V., Kroon, P.A., Quideau, S., Treutter, D. (2008): Plant phenolics– secondary metabolites with diverse functions, u: Recent advances in polyphenol research. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 1–35.

Les, F., Arbonés-Mainar, J.M., Valero, M.S., López, V. (2018): Pomegranate polyphenols and urolithin A inhibit α-glucosidase, dipeptidyl peptidase-4, lipase, triglyceride accumulation and adipogenesis related genes in 3T3-L1 adipocyte-like cells. Journal of Ethnopharmacology 220, 67–74.

Lewandowska, U., Szewczyk, K., Hrabec, E., Janecka, A., Gorlach, S. (2013): Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61, 12183–12199.

Li, D., Sun, L., Yang, Y., Wang, Z., Yang, X., Zhao, T., Gong, T., Zou, L., Guo, Y. (2019): Young apple polyphenols postpone starch digestion *in vitro* and *in vivo*. Journal of Functional Foods 56, 127–135.

Li, Y., Zhang, X., Wang, R., Han, L., Huang, W., Shi, H., Wang, B., Li, Z., Zou, S. (2020): Altering the inhibitory kinetics and molecular conformation of maltase by Tangzhiqing (TZQ), a natural α-glucosidase inhibitor. BMC Complementary Medicine and Therapies 20, 350-358.

Lingua, M.S., Theumer, M.G., Kruzynski, P., Wunderlin, D.A., Baroni, M.V. (2019): Bioaccessibility of polyphenols and antioxidant properties of the white grape by simulated digestion and Caco-2 cell assays: Comparative study with its winemaking product. Food Research International 122, 496–505.

Link, A., Balaguer, F., Goel, A. (2010): Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. Biochemical Pharmacology 80, 1771–1792.

Liu, Y., Zhang, D., Wu, Y., Wang, D., Wei, Y., Wu, J., Ji, B. (2014): Stability and absorption of anthocyanins from blueberries subjected to a simulated digestion process. International Journal of Food Sciences and Nutrition 65, 440–448.

Lo Piparo, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M., Chou, C.J. (2008): Flavonoids for controlling starch digestion: Structural requirements for inhibiting human α-amylase. Journal of Medicinal Chemistry 51, 3555–3561.

Lorenzo, J.M., Estévez, M., Barba, F.J., Thirumdas, R., Franco, D., Munekata, P.E.S. (2019): Polyphenols: Bioaccessibility and bioavailability of bioactive components, u: Innovative thermal and non-thermal processing, bioaccessibility and bioavailability of nutrients and bioactive compounds. Elsevier, 309–332.

MacDonald, R.S., Wagner, K. (2012): Influence of dietary phytochemicals and microbiota on colon cancer risk. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, 6728–6735.

MacLeod, J.M., Rosei, F. (2011): Directed assembly of nanostructures, u: Comprehensive nanoscience and technology. Elsevier, 13–68.

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

Mandalari, G., Vardakou, M., Faulks, R., Bisignano, C., Martorana, M., Smeriglio, A., Trombetta, D. (2016): Food matrix effects of polyphenol bioaccessibility from almond skin during simulated human digestion. Nutrients 8, 568-585.

Martinez-Gonzalez, A.I., Díaz-Sánchez, Á.G., Rosa, L.A. de la, Vargas-Requena, C.L., Bustos-Jaimes, I., Alvarez-Parrilla, and E. (2017): Polyphenolic compounds and digestive enzymes*: In vitro* non-covalent interactions. Molecules 22, 669-693.

Matić, P. (2021): Ravnotežna i kinetička istraživanja adsorpcije polifenolnih spojeva na β-glukanu. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; Sveučilište u Zagrebu. Doktorski rad.

Medvidović-Kosanović, M., Šter, A., Jakobek, L., Krivak, P. i Mađarić, R. (2017): Electrochemical and spectrophotometric determination of total polyphenol content in Croatian apple varieties. Croatica Chemica Acta, 90, 129-134.

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

Mendes, D., Valentão, P., Oliveira, M.M., Andrade, P., Videira, R.A. (2021): A nanophytosomes formulation based on elderberry anthocyanins and Codium lipids to mitigate mitochondrial dysfunctions. Biomedicine & Pharmacotherapy 143, 112157-112169.

Mendonça, R.D., Carvalho, N.C., Martin-Moreno, J.M., Pimenta, A.M., Lopes, A.C.S., Gea, A., Martinez-Gonzalez, M.A., Bes-Rastrollo, M. (2019) Total polyphenol intake, polyphenol subtypes and incidence of cardiovascular disease: The SUN cohort study. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 29, 69–78.

Mercado-Mercado, G., Blancas-Benitez, F.J., Velderrain-Rodríguez, G.R., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G.A., Alvarez-Parrilla, E., Sáyago-Ayerdi, S.G. (2015): Bioaccessibility of polyphenols released and associated to dietary fibre in calyces and decoction residues of Roselle (*Hibiscus sabdariffa L.*). Journal of Functional Foods 18, 171–181.

Mikulic-Petkovsek, M., Ivancic, A., Todorovic, B., Veberic, R., Stampar, F. (2015): Fruit Phenolic Composition of Different Elderberry Species and Hybrids. Journal of Food Science 80, C2180–C2190.

Miller, D.D., Schricker, B.R., Rasmussen, R.R., Van Campen, D. (1981): An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. The American Journal of Clinical Nutrition 34, 2248–2256.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014): A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. Food Function. 5, 1113–1124.

Nyambe-Silavwe, H., Villa-Rodriguez, J.A., Ifie, I., Holmes, M., Aydin, E., Jensen, J.M., Williamson, G. (2015): Inhibition of human α-amylase by dietary polyphenols. Journal of Functional Foods 19, 723–732.

Olejnik, A., Olkowicz, M., Kowalska, K., Rychlik, J., Dembczyński, R., Myszka, K., Juzwa, W., Białas, W., Moyer, M.P. (2016): Gastrointestinal digested *Sambucus nigra L.* fruit extract protects *in vitro* cultured human colon cells against oxidative stress. Food Chemistry 197, 648–657.

Oomah, B.D., Patras, A., Rawson, A., Singh, N., Compos-Vega, R. (2011): Chemistry of pulses, u: Pulse Foods. Elsevier, 9–55.

Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G.A. (2011): The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. Journal of Food Science 76, R6–R15.

Parkar, S.G., Trower, T.M., Stevenson, D.E. (2013): Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. Anaerobe 23, 12–19.

Pérez-Jiménez, J., Fezeu, L., Touvier, M., Arnault, N., Manach, C., Hercberg, S., Galan, P., Scalbert, A. (2011): Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. The American Journal of Clinical Nutrition 93, 1220–1228.

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

Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., García-Viguera, C. (2002): *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 2308–2312.

Pino, J.L., Mujica, V., Arredondo, M. (2021): Effect of dietary supplementation with oat β-glucan for 3 months in subjects with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, controlled clinical trial. Journal of Functional Foods 77, 104311-104324.

Pinto, J., Spínola, V., Llorent-Martínez, E.J., Fernández-de Córdova, M.L., Molina-García, L., Castilho, P.C. (2017): Polyphenolic profile and antioxidant activities of Madeiran elderberry (*Sambucus lanceolata*) as affected by simulated *in vitro* digestion. Food Research International 100, 404–410.

Preti, R., Tarola, A.M. (2021): Study of polyphenols, antioxidant capacity and minerals for the valorisation of ancient apple cultivars from Northeast Italy. European Food Research and Technology 247, 273–283.

Quan, W., Tao, Y., Lu, M., Yuan, B., Chen, J., Zeng, M., Qin, F., Guo, F., He, Z. (2018): Stability of the phenolic compounds and antioxidant capacity of five fruit (apple, orange, grape, pomelo and kiwi) juices during *in vitro* -simulated gastrointestinal digestion. International Journal of Food Science & Technology 53, 1131–1139.

Quatrin, A., Rampelotto, C., Pauletto, R., Maurer, L.H., Nichelle, S.M., Klein, B., Rodrigues, R.F., Maróstica Junior, M.R., Fonseca, B. de S., de Menezes, C.R., Mello, R. de O., Rodrigues, E., Bochi, V.C., Emanuelli, T. (2020): Bioaccessibility and catabolism of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria trunciflora*) fruit peel during *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation. Journal of Functional Foods 65, 103714-103728.

Quirós-Sauceda, A.E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S.G., Ayala-Zavala, J.F., Bello-Perez, L.A., Álvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L.A., González-Córdova, A.F., González-Aguilar, G.A. (2014): Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. Food & Function 5, 1063–1072.

Rodríguez-Daza, M. C., Pulido-Mateos, E. C., Lupien-Meilleur, J., Guyonnet, D., Desjardins, Y., Roy, D. (2021): Polyphenol-mediated gut microbiota modulation: toward prebiotics and further. frontiers in nutrition. 8, 689456

Saura-Calixto, F., Díaz-Rubio, M.E. (2007): Polyphenols associated with dietary fibre in wine. Food Research International 40, 613–619.

Shen, Q., Zhao, L., Tuohy, K.M. (2012): High-level dietary fibre up-regulates colonic fermentation and relative abundance of saccharolytic bacteria within the human faecal microbiota *in vitro*. European Journal of Nutrition 51, 693–705.

Shmeltz, L., Metzger. B. (2007): Diabetes/Syndrom X, u: Comprehensive Medicinal Chemistry II. Elsevier, 417-458.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent, u: Methods in Enzymology. Elsevier, 152–178.

Solari-Godiño, A., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Borderías, A.J., Moreno, H.M. (2017): Anchovy mince (*Engraulis ringens*) enriched with polyphenol-rich grape pomace dietary fibre: I*n vitro* polyphenols bioaccessibility, antioxidant and physico-chemical properties. Food Research International 102, 639–646.

Sousa, M. de M., Lima, R.M.T. de, Lima, A. de, Reis, A.C., Cavalcante, A.A. de C.M., Sattler, J.A.G., Almeida-Muradian, L.B. de, Lima Neto, J. de S., Moreira-Araujo, R.S. dos R., Nogueira, N. do N.

(2021): Antioxidant action and enzyme activity modulation by bioaccessible polyphenols from jambolan (*Syzygium cumini (L.) Skeels*). Food Chemistry 363, 130353-130367.

Stagos, D., Amoutzias, G.D., Matakos, A., Spyrou, A., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D. (2012): Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. Food and Chemical Toxicology 50, 2155–2170.

Suárez, B., Álvarez, Á.L., García, Y.D., Barrio, G. del, Lobo, A.P., Parra, F. (2010): Phenolic profiles, antioxidant activity and *in vitro* antiviral properties of apple pomace. Food Chemistry 120, 339–342.

Sun, L., Chen, W., Meng, Y., Yang, X., Yuan, L., Guo, Y. (2016): Interactions between polyphenols in thinned young apples and porcine pancreatic α-amylase: Inhibition, detailed kinetics and fluorescence quenching. Food Chemistry 208, 51–60.

Swilam, N.; Nawwar, M.A.M.; Radwan, R.A.; Mostafa, E.S. (2022): Antidiabetic activity and in silico molecular docking of polyphenols from *Ammannia baccifera L.* subsp. Aegyptiaca (Willd.) koehne waste: Structure elucidation of undescribed acylated flavonol diglucoside. Plants 11, 452.

Tamura, Y., Tomiya, S., Takegaki, J., Kouzaki, K., Tsutaki, A., Nakazato, K. (2020): Apple polyphenols induce browning of white adipose tissue. The Journal of Nutritional Biochemistry 77, 108299-108317.

Tarko, T., Duda-Chodak, A., Soszka, A. (2020): Changes in phenolic compounds and antioxidant activity of fruit musts and fruit wines during simulated digestion. Molecules 25, 5574-5587.

Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E. (2004): Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. Trends in Analytical Chemistry 23, 535–552.

Tenore, G.C., Campiglia, P., Ritieni, A., Novellino, E. (2013): *In vitro* bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila Miller cv Annurca*). Food Chemistry 141, 3519–3524.

Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. (2002): Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry 74, 835–855.

Tian, Y., Liimatainen, J., Puganen, A., Alakomi, H.-L., Sinkkonen, J., Yang, B. (2018): Sephadex LH-20 fractionation and bioactivities of phenolic compounds from extracts of Finnish berry plants. Food Research International 113, 115–130.

Veberic, R., Jakopic, J., Stampar, F., Schmitzer, V. (2009): European elderberry (*Sambucus nigra L.*) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. Food Chemistry 114, 511–515.

Vegro, M., Eccher, G., Populin, F., Sorgato, C., Savazzini, F., Pagliarani, G., Tartarini, S., Pasini, G., Curioni, A., Antico, A., Botton, A. (2016): Old apple (*Malus domestica* L. Borkh) varieties with hypoallergenic properties: An integrated approach for studying apple allergenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 64, 9224–9236.

Velderrain-Rodríguez, G., Quirós-Sauceda, A., Mercado-Mercado, G., Ayala-Zavala, J.F., Astiazarán-García, H., Robles-Sánchez, R.M., Wall-Medrano, A., Sayago-Ayerdi, S., González-Aguilar, G.A. (2016): Effect of dietary fiber on the bioaccessibility of phenolic compounds of mango, papaya and pineapple fruits by an *in vitro* digestion model. Food Science & Technology 36, 188–194.

Villanueva-Carvajal, A., Bernal-Martínez, L.R., García-Gasca, M.T., Dominguez-Lopez, A. (2013): *In vitro* gastrointestinal digestion of *Hibiscus sabdariffa L.*: The use of its natural matrix to improve the concentration of phenolic compounds in gut. LWT - Food Science and Technology 51, 260–265.

Wang, Y., Ames, N.P., Tun, H.M., Tosh, S.M., Jones, P.J., Khafipour, E. (2016): High molecular weight barley β-glucan alters gut microbiota toward reduced cardiovascular disease risk. Frontiers in Microbiology. 7, 157-172.

Wojdyło, A., Oszmiański, J., Laskowski, P. (2008): Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 6520–6530.

Wu, K.-H., Ho, C.-T., Chen, Z.-F., Chen, L.-C., Whang-Peng, J., Lin, T.-N., Ho, Y.-S. (2018): The apple polyphenol phloretin inhibits breast cancer cell migration and proliferation via inhibition of signals by type 2 glucose transporter. Journal of Food and Drug Analysis 26, 221–231.

Wu, X., Gu, L., Prior, R.L., McKay, S. (2004): Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of ribes, aronia, and sambucus and their antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 7846–7856.

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

Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.-T., Newmark, H.L. (2001): Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annual Review of Nutrition 21, 381–406.

Yilmazer-Musa, M., Griffith, A.M., Michels, A.J., Schneider, E., Frei, B. (2012): Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α-amylase and α-glucosidase activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, 8924–8929.

Zhang, H., Li, Z., Zhang, L., Lai, P.F.H., Tian, Y., Cui, S.W., Ai, L. (2021): Effects of soluble dietary fibers on the viscosity property and digestion kinetics of corn starch digesta. Food Chemistry 338, 127825.

Zhang, L., Li, J., Hogan, S., Chung, H., Welbaum, G.E., Zhou, K. (2010): Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. Food Chemistry 119, 592–599.

Zhao, G., Zhang, R., Dong, L., Huang, F., Tang, X., Wei, Z., Zhang, M. (2018): Particle size of insoluble dietary fiber from rice bran affects its phenolic profile, bioaccessibility and functional properties. LWT 87, 450–456.

Zhao, T., Sun, L., Wang, Z., Nisar, T., Gong, T., Li, D., Niu, P., Guo, Y. (2019): The antioxidant property and α-amylase inhibition activity of young apple polyphenols are related with apple varieties. LWT 111, 252–259.

Zheng, L., Ding, Z., Zhang, M., Sun, J. (2011): Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. Journal of Food Engineering 104, 89–95.

Zheng, Y., Liu, Shuai, Xie, Jianhua, Chen, Y., Dong, R., Zhang, X., Liu, Shiqi, Xie, Jiayan, Hu, X., Yu, Q. (2020): Antioxidant, α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities of bound polyphenols extracted from mung bean skin dietary fiber. LWT 132, 109943-109957.

Zou, S., Duan, B., Xu, X. (2019): Inhibition of tumor growth by β-glucans through promoting CD4+ T cell immunomodulation and neutrophil-killing in mice. Carbohydrate Polymers 213, 370–381.