

# Biodostupnost i antioksidacijska aktivnost polifenolnih spojeva u 3D ispisanim funkcionalnim proizvodima na bazi jagode tijekom in vitro probave

---

Kralj-Vrsalović, Paula

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:786680>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported/Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023

Paula Kralj-Vrsalović

**BIODOSTUPNOST I  
ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST  
POLIFENOLNIH SPOJEVA U 3D  
ISPISANIM FUNKCIONALNIM  
PROIZVODIMA NA BAZI JAGODE  
TIJEKOM *in vitro* PROBAVE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo i u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević, te uz pomoć prof. dr. sc. Ksenije Durgo, dr. sc. Ane Huđek Turković i Anice Bebek Markovinović.



Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Tehnologija preprekama i 3D printanje za okolišno prihvatljivu proizvodnju funkcionalnih voćnih sokova (3D-SustJuice)“ (IP-2019-04-2105), voditeljice izv. prof. dr. sc. Danijele Bursac Kovačević.

## ZAHVALA

*Prije svega, želim se zahvaliti obitelji i prijateljima na podršci, razumijevanju i strpljenju tijekom mog akademskog obrazovanja. Hvala Frani što je bio uz mene tijekom pisanja rada.*

*Posebno se želim zahvaliti didi Toniju, koji je rekao da želi doživjeti dvije stvari, završetak gradnje Pelješkog mosta i da mojoj sestri Luciji i meni nosi cvijeće na promociju. Kako se Pelješki most već izgradio drugi par želja me motivirao da diplomski što brže privedem kraju.*

*Neizmjerno hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević na iskazanom povjerenju, vodstvu i savjetima tijekom izrade ovog rada. Veliko hvala dr. sc. Ani Huđek Turković, Anici Bebek Markovinović, mag. ing. i prof. dr. sc. Kseniji Durgo na iskazanoj pomoći, strpljenju i prenesenom znanju tijekom izrade ovog rada.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Nutricionizam

**Diplomski sveučilišni studij:** Nutricionizam

BIODOSTUPNOST I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA U 3D  
ISPISANIM FUNKCIONALNIM PROIZVODIMA NA BAZI JAGODE TIJEKOM *in vitro* PROBAVE

*Paula Kralj – Vrsalović, univ. bacc. nutr. 0058209629*

**Sažetak:** Povećanje svijesti potrošača o unaprjeđenju zdravlja rezultiralo je potrebom za razvojem inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Tehnologija 3D ispisa nudi mogućnost razvoja širokog spektra takvih proizvoda okrenutih ciljanim potrebama potrošača. U ovom istraživanju ispitana je biodostupnost i antioksidacijska aktivnost polifenolnih spojeva u 3D ispisanim proizvodima na bazi jagode tijekom *in vitro* probave koja se sastojala od oralne, želučane i intestinalne faze. Analizirani su uzorci kaše jagode i 3D ispisani uzorci s pšeničnim i s kukuruznim škrobom. Sadržaj polifenola je određen Folin-Ciocalteu metodom, dok je antioksidacijski kapacitet određen FRAP i DPPH metodama. Po provedenoj *in vitro* probavi, u uzorcima kaše jagode uočen je porast antioksidacijskog kapaciteta, dok isti učinak nije bio prisutan u 3D uzorcima. U svim uzorcima udio polifenola pozitivno utječe na antioksidacijski kapacitet. S obzirom na sadržaj polifenola i antioksidacijski kapacitet 3D ispisani proizvodi na bazi jagode ukazuju na širi potencijal 3D ispisa u razvoju inovativnih proizvoda u kategoriji funkcionalne hrane.

**Ključne riječi:** 3D ispis, *in vitro* probava, jagoda (*Fragaria ananassa* x Duch), bioaktivni spojevi, antioksidacijski kapacitet

**Rad sadrži:** 56 stranica, 12 slika, 5 tablica, 93 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

**Pomoć pri izradi:** prof. dr. sc. Ksenija Durgo, dr. sc. Ana Huđek Turković, Anica Bebek Markovinović mag.ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Maja Benković (član)
4. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (zamjenski član)

**Datum obrane:** 22. prosinac 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

**Graduate university study programme:** Nutrition

BIOAVAILABILITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYPHENOL COMPOUNDS IN 3D PRINTED FUNCTIONAL PRODUCTS BASED ON STRAWBERRY DURING *in vitro* DIGESTION

*Paula Kralj-Vrsalović*, univ. bacc. nutr. 0058209629

**Abstract:** Increasing consumer awareness of improving health has resulted in the need to develop innovative functional food products. 3D printing technology (3DP) offers the opportunity to develop a wide range of such products to meet the targeted needs of consumers. In this study, the bioavailability and antioxidant activity of polyphenolics in 3DP strawberry-based products were tested during *in vitro* digestion, which consisted of oral, a gastric and intestinal phase. Samples of strawberry pulp and 3DP samples with wheat and corn starch were analyzed. The polyphenol content was determined using Folin-Ciocalteu method and antioxidant capacity was determined by FRAP and DPPH assays. After *in vitro* digestion, an increase in antioxidant capacity was observed in pulp samples, while same effect was not present in 3DP samples. Polyphenolic content had positive effect on antioxidant capacity. Considering the polyphenolic content and antioxidant capacity, 3DP strawberry-based products show great potential for the development of innovative functional foods.

**Keywords:** 3D printing, *in vitro* digestion, strawberry (*Fragaria ananassa* x Duch), bioactive compounds, antioxidant capacity

**Thesis contains:** 56 pages, 12 figures, 5 tables, 93 references, 00 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Danijela Bursać Kovačević Associate professor

**Technical support and assistance:** Ksenija Durgo, PhD, Full professor; Ana Huđek Turković, PhD; Anica Bebek Markovinović, mag.ing.

### Reviewers:

1. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (president)
2. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Maja Benković, PhD, Associate professor (member)
4. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** Decmeber 22<sup>nd</sup>, 2023



## Sadržaj

1. UVOD.....	1
3. TEORIJSKI DIO .....	2
3.1 3D ispis u proizvodnji funkcionalne hrane na bazi voća .....	2
3.1.1 Potencijal 3D ispisane funkcionalne hrane na bazi voća .....	2
3.1.2 Utjecaj 3D ispisa na svojstva proizvoda na bazi voća .....	3
3.2 Jagoda ( <i>Fragaria ananassa</i> x Duch.) kao funkcionalna hrana .....	4
3.2.1 Fitokemikalije u plodovima jagode.....	5
3.2.2 Antioksidacijska aktivnost jagode.....	7
3.2.3 Učinak konzumacije jagoda na ljudsko zdravlje.....	7
3.3 <i>In vitro</i> modeli za ispitivanje probave polifenola.....	8
3.3.1 Mehanizam probavnog sustava .....	8
3.3.2 <i>In vitro</i> modeli za ispitivanje probave polifenola.....	9
3.3.3 Probava u ustima .....	10
3.3.4 Probava u želucu .....	11
3.3.5 Probava u tankom crijevu.....	12
3.3.6 Probava u debelom crijevu.....	12
3.3.7 Probava polifenola.....	13
3.3.8 Probava 3D ispisanih proizvoda.....	14
4. EKSPERIMENTALNI DIO .....	16
4.1 MATERIJAL .....	16
4.2 PRIPREMA KAŠE JAGODE ZA EKSTRAKCIJU I 3D ISPIS.....	16
4.2.1 Izvedba 3D ispisa .....	17
4.2.2 Postupak ekstrakcije.....	18
4.2.3 <i>In vitro</i> probava .....	18
4.2.4 Određivanje ukupnih fenola.....	22
4.2.5 Određivanje ukupnih flavonoida.....	24
4.2.6 Određivanje monomernih antocijana .....	27
4.2.7 Antioksidacijska aktivnost uzoraka <i>in vitro</i> probave .....	29
4.3 OBRADA PODATAKA .....	36
5. REZULTATI I RASPRAVA.....	37

5.1	KARAKTERIZACIJA KAŠE JAGODE .....	37
5.2	KARAKTERIZACIJA KAŠE JAGODE NAKON <i>IN VITRO</i> PROBAVE .....	40
5.3	KARAKTERIZACIJA 3D ISPISANOG PROIZVODA OD JAGODE S KUKURUZNIM ŠKROBOM NAKON <i>IN VITRO</i> PROBAVE .....	42
5.1	KARAKTERIZACIJA 3D ISPISANOG PROIZVODA OD JAGODE S PŠENIČNIM ŠKROBOM NAKON <i>IN VITRO</i> PROBAVE .....	44
6.	ZAKLJUČCI .....	48
7.	LITERATURA.....	49

# 1. UVOD

Zbog povećanja svijesti o pravilnoj prehrani dolazi do sve većeg komercijalnog interesa za funkcionalnom hranom. Prehrambena industrija nastoji odgovoriti na tu potrebu tržišta razvijanjem proizvoda pomoću inovativnih tehnologija. Jedna od njih je trodimenzionalni (3D) ispis hrane, a to je aditivna tehnologija kojoj je jedna od glavnih prednosti personalizacija proizvoda. Uz modifikaciju oblika i sastava, mogu se kreirati proizvodi namijenjeni za prehrambene potrebe određene populacije ili zdravstvenog stanja.

Plodovi jagode (*Fragaria ananassa* x Duch.) sadrže mnoge biološki aktivne spojeve koji doprinose očuvanju zdravlja, poput vitamina C, polifenola i prehrambenih vlakana. Zbog svog nutritivnog sastava jagoda ima veliki potencijal u primjeni tehnologije 3D ispisa. Izazov kod korištenja plodova jagode je visok udio vode, koji se mora ili ukloniti ili se voćnoj smjesi trebaju dodavati zgušnjivači kako bi se premostile teškoće u kreiranju 3D proizvoda odgovarajućih reoloških svojstava.

Cilj ovog rada bio je ispitati biodostupnost fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost u kaši jagode, kao i 3D ispisanim funkcionalnim proizvodima na bazi jagode uz dodatak škrobnih nosača. Kako bi se ispitala biodostupnost, simulirani su uvjeti probave pomoću *in vitro* sustava koji je sadržavao oralnu, želučanu i intestinalnu fazu. Probava bioaktivnih spojeva je složen proces te njihova biodostupnost ovisi o karakteristikama matriksa hrane te fiziološkim uvjetima koji su prisutni u različitim fazama probavnog trakta. Biodostupnost bioaktivnih spojeva 3D ispisanim proizvoda do danas je veoma malo istražena, stoga se ovim radom nastojalo doći do novih spoznaja o potencijalu primjene tehnologije 3D ispisa u proizvodnji funkcionalne hrane visoke biološke vrijednosti.

## 3. TEORIJSKI DIO

### 3.1 3D ispis u proizvodnji funkcionalne hrane na bazi voća

Trodimenzijski (3D) ispis hrane je automatizirani proizvodni proces putem kojeg se izrađuje trodimenzionalni oblik proizvoda slaganjem slojeva materijala. Najčešća metoda koja se koristi u 3D ispisu hrane je ispis ekstruzijom, koji se temelji na ekstruziji materijala pomoću mlaznice pod konstantnim tlakom (Pitayachaval i sur., 2018). Mlaznice prate zadani 3D model osmišljen primjenom odgovarajućeg računalnog programa. Dijelovi uređaja za 3D ispis su kućište, mehaničke brtve, motor i upravljački krug koji je povezan s računalom koje upravlja procesom 3D ispisa (Yang i sur., 2015). Faktori kao što su svojstva materijala za 3D ispis, procesni parametri ispisa i obrada proizvoda nakon 3D ispisa podjednako su važni za proizvodnju 3D ispisane hrane (Kewuyemi i sur., 2022). Prednosti 3D ispisane hrane u odnosu na konvencionalne metode proizvodnje hrane su personalizacija proizvoda, održivost, visoka reproducibilnost i energetska učinkovitost (Tomašević i sur., 2021). U Europskoj uniji, 3D ispisana hrana pripada kategoriji nove hrane i regulirana je uredbom Europske komisije 2283/2015 (Baiano i sur., 2018).

Voće u svom svježem obliku zbog visokog udjela vode nije odgovarajući materijal za 3D ispis, stoga se treba obraditi uz odgovarajuće dodatke kako bi se pripremila voćna pasta odgovarajuće konzistencije. Za formulaciju paste najčešće se kao dodatak koriste različiti hidrokoloidi, a ponajviše je u primjeni škrob (Bebek Markovinović i sur., 2023). Metil-celuloza i albumin se mogu koristiti zbog svojstva formiranja gela i dobre topljivosti, a hijaluronska kiselina zbog svojstva retencije vode i produljenja roka trajanja proizvoda (Zhou i sur., 2023). Materijal za 3D ispis može sadržavati dodatak bioaktivnih tvari koje stvaraju dodanu nutritivnu i biološku vrijednost proizvodu, poput probiotika ili proteina.

#### 3.1.1 Potencijal 3D ispisane funkcionalne hrane na bazi voća

Adekvatan dnevni unos voća i povrća povezuje se s prevencijom mnogih nezaraznih bolesti (Bursać Kovačević i sur., 2020) i sastavni je dio gotovo svih nacionalnih prehrambenih smjernica (FAO i WHO, 2014). Dizanjem svijesti potrošača o pravilnoj prehrani došlo je do potrebe za

razvojem proizvoda s povoljnim nutritivnim sastavom koji im mogu olakšati unos hranjivih tvari prema ciljanim prehrabnim potrebama (Kewuyemi i sur., 2022). Personaliziranjem 3D ispisanih proizvoda mogu se osmisliti proizvodi koji svojim poboljšanim nutritivnim sastavom i teksturom odgovaraju zahtjevima za određena stanja ili ciljanu populaciju (Tomašević i sur., 2021). Primjerice, mogu se dizajnirati 3D ispisani proizvodi za pacijente s disfagijom ili proizvodi obogaćeni s kritičnim nutrijentom u određenoj populacijskoj skupini, poput vitamin D u osoba starije životne dobi. Peng i suradnici osmislili su proizvod na bazi kivija s dodatkom pektina i tradicionalno sušene kore naranče (chenpi) koja ima učinak na poboljšanje lipidnog profila u krvi (Peng i sur., 2022).

Proizvodi na bazi voća lako se mogu obogatiti bioaktivnim spojevima koji mogu poboljšati njihov bioaktivni potencijal. Zbog niskog udjela proteina, voćne smjese za 3D ispis mogle bi se obogatiti proteinima što bi pozitivno utjecalo na nutritivnu i tehnološku vrijednost proizvoda. Dodatak proteina bi utjecao na povećanje osjećaja sitosti i na strukturalni integritet proizvoda.

### 3.1.2 Utjecaj 3D ispisa na svojstva proizvoda na bazi voća

Voće je izazovna sirovina sa izradu smjese za 3D ispis kojoj se moraju dodati zgušnjivači i dodaci koji će poboljšati reološka svojstva smjese. Veći udio škroba utječe na tvrdoću i koheziju smjese, dok agar guma ima suprotan učinak zbog svog svojstva da tvori gelove niže viskoznosti u 3D printanim proizvodima na bazi koncentrata naranče (Azam i sur., 2018).

Većina 3D uređaja za ispis ima mogućnost zagrijavanja mase za ispis koja se nakon postupka hladi, što predstavlja rizik za mikrobiološku kontaminaciju. Severini i suradnici (2018) su u 3D ispisanom *smoothie* proizvodu detektirali 4,28 log CFU/g u uzorku, sugerirajući potrebu za sanitizacijom. Za 3D ispis hrane trebaju se koristiti uređaji isključivo za ispis hrane, budući da uređaji koji imaju ispis hrane kao dodatnu opciju mogu sadržavati dijelove plastike čije mikročestice potencijalno mogu migrirati u hranu (Baiano, 2022). Budući da u dostupnoj literaturi ne postoji istraživanje koje se bavi procjenom sigurnosti 3D printanih prehrabnih proizvoda, svi mogući rizici se tek trebaju utvrditi (Baiano, 2022).

### 3.2 Jagoda (*Fragaria ananassa* x Duch.) kao funkcionalna hrana

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) definira funkcionalnu hranu kao hranu čija konzumacija pozitivno utječe na jednu ili više ciljanih funkcija u ljudskom organizmu i potencijalno smanjuje rizik od razvoja pojedinih bolesti (Stein i Rodriguez Cerezo, 2008). Jagoda (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) se nalazi među najpopularnijim jagodastim voćem koje se konzumira kako svježije, tako i prerađeno u proizvodima poput sokova, želiranih ili mliječnih proizvoda. Konzumacija plodova jagode ima višestruke pozitivne učinke na ljudsko zdravlje zbog visokog sadržaja mikronutrijenata poput minerala, vitamina C, folata i fitokemikalija (Tulipani i sur., 2009).

Prema podacima Američkog ministarstva poljoprivrede, sastav jagode većinski je voda (90,8 g na 100 g svježeg ploda). Od makronutrijenata u najvećem udjelu nalaze se ugljikohidrati, od kojih su najzastupljeniji monosaharidi fruktoza i glukoza (tablica 1). Jagoda u svom sastavu ima i organske kiseline, od kojih su najznačajnije limunska i jabučna kiselina. Iako u svom sastavu sadrži različite mineralne tvari, niti jedna se ne nalazi u količini dostatnoj da bi se plod jagode mogao karakterizirati kao dobar izvor te mineralne tvari (Direktiva 90/496/EEZ). Od vitamina se ističe askorbinska kiselina u sadržaju od 59,6 mg na 100 g svježih plodova jagode, što zadovoljava preko 50 % preporučenog populacijskog referentnog unosa (PRI) za vitamin C (90 mg/dan za zdrave žene odrasle dobi i 110 mg/dan za zdrave muškarce odrasle dobi). Jagode sadrže i ~ 2 g prehrambenih vlakana i 33 kcal na 100 g svježih plodova (tablica 1)

**Tablica 1.** Kemijski sastav plodova jagode

Sastojak	Prosječna količina	Mjerna jedinica
<b>Voda</b>	90,8	g/100g
<b>Dušik</b>	0,1	g/100g
<b>Proteini</b>	0,64	g/100g
<b>Masti</b>	0,22	g/100g
<b>Ugljikohidrati</b>	7,96	g/100g
<b>Od toga šećeri :</b>	4,86	g/100g
- <b>Saharoza</b>	<0,25	g/100g
- <b>Glukoza</b>	2,24	g/100g
- <b>Fruktoza</b>	2,62	g/100g
- <b>Laktoza</b>	<0,25	g/100g

**Tablica 1.** Kemijski sastav plodova jagode - *nastavak*

- <b>Galaktoza</b>	<0,25	g/100g
<b>Organske kiseline</b>		
- <b>Limunska kiselina</b>	700	mg/100g
- <b>Jabučna kiselina</b>	198	mg/100g
- <b>Oksalna kiselina</b>	<40	mg/100g
- <b>Pirogroždana kiselina</b>	<40	mg/100g
<b>Mineralne tvari</b>		
- <b>Kalcij, Ca</b>	17	mg/100g
- <b>Željezo, Fe</b>	0,26	mg/100g
- <b>Magnezij, Mg</b>	12,5	mg/100g
- <b>Fosfor, P</b>	23	mg/100g
- <b>Kalij, K</b>	161	mg/100g
- <b>Natrij, Na</b>	<2	mg/100g
- <b>Cink, Zn</b>	0,11	mg/100g
- <b>Bakar, Cu</b>	0,035	mg/100g
- <b>Mangan, Mn</b>	0,368	mg/100g
<b>Vitamini</b>		
- <b>Vitamin C, ukupna askorbinska kiselina</b>	59,6	mg/100g
- <b>Biotin</b>	<3,7	µg/100g
<b>Prehrambena vlakna</b>	2	g/100g

(Izvor: Američko ministarstvo poljoprivrede, služba za agrikulturna istraživanja)

### 3.2.1 Fitokemikalije u plodovima jagode

U plodovima jagode su najzastupljenije fitokemikalije koje prema kemijskoj klasifikaciji pripadaju u polifenolne spojeve. Najznačajniji polifenolni spojevi u plodovima jagode su antocijani i elagitanini. Kvantitativno najzastupljeniji spojevi su pigmenti antocijani, koji su zaslužni za jarko crvenu boju plodova jagode, i njihov sadržaj varira od 200 - 470 mg/kg svježih plodova jagode u ovisnosti o brojnim čimbenicima (Basu i sur., 2014). Antocijani se u plodovima jagode nalaze u formi glikozida, gdje je glukoza najčešći šećerni supstituent, iako su detektirani i konjugati s araginozom, ramnozom i rutinozom (Quideau, 2009). Pelargonidin-3-glukozid,

cijanidin-3-glukozid i malinil-3-glukozid su najčešće forme antocijana prisutne u plodovima jagode (Lopes de Silva, 2007).

Elagitanini su esteri monosaharida (najčešće glukoze) i fenolnih kiselina (najčešće galne ili heksahidroksidifenične kiseline). Zajedno sa galotaninima se nalaze u skupini hidroliziranih tanina, koji se nakon hidrolize razdvajaju na elaginsku kiselinu i druge metabolite. U ljudskoj prehrani, elagitanini se pretežito nalaze u porodici *Rosaceae*, u kojoj se nalaze nar, krkavina, malina i jagoda. U literaturi je zabilježen raspon sadržaja elagitanina u plodovima jagode od 25-59 mg/100 g svježih plodova (Giampieri i sur., 2012).

Jagode također sadrže male količine flavonola, od kojih su zabilježeni derivati kampferola i kvercetina. Flavonoli pokazuju visoku aktivnost hvatanja slobodnih radikala, protuupalnu aktivnost i vazodilatacijsku aktivnost (Basu i sur. 2014)

Flavanoli su klasa flavonoida koja se u hrani ne nalazi u obliku glikozida. U jagodama su detektirani monomeri (katehini) i polimeri (procijanidini). Iako nisu značajno zastupljeni, ispoljavaju visoku antioksidacijsku, antimikrobnu i antihipertenzivnu aktivnost (Santos Buelga i Scalbert, 2000).

Sadržaj fitokemikalija u plodovima jagode se mijenja kroz stupnjeve zrelosti ploda (Bebek Markovinović i sur., 2022), i dok pulpa nezrele voćke ima veći sadržaj polifenola nego pulpa zrele voćke, kod antocijana je prisutan suprotni trend (Giampieri i sur., 2012). Antioksidacijska aktivnost je u korelaciji s sadržajem polifenola, te je povećana u fazama rane zrelosti plodova. Okolišni faktori i uvjeti skladištenja utječu na sadržaj mikronutrijenata i fitokemikalija, primjerice uočen je uvećani sadržaj flavonoida nakon skladištenja svježih plodova, dok se ukupni antioksidacijski kapacitet povećava ili ostaje konstantan (Skrovankova i sur., 2015). Iako se jagode ponajviše konzumiraju kao svježe voće, komercijalno su važni i proizvodi od jagode, čiji proizvodni procesi uključuju metode koje negativno utječu na antioksidacijski kapacitet, od kojih je najznačajnija termička obrada plodova (Bursać Kovačević i sur., 2015).



### 3.2.2 Antioksidacijska aktivnost jagode

Antioksidacijska svojstva pojedine namirnice su karakterizirana sadržajem spojeva koji djeluju kao hvatači slobodnih radikala, primjerice polifenoli i askorbinska kiselina (Giampieri i sur., 2012). Istraživanja koja su mjerila ukupni antioksidacijski kapacitet pomoću metode mjerenja u ekvivalentima Trolox-a (engl. TEAC, *Trolox equivalent antioxidant capacity*) jagoda u odnosu na druge plodove jagodastog voća, pokazalo je da su jagoda voćna vrsta s visokim vrijednostima ukupnog antioksidacijskog kapaciteta i sadržaja ukupnih fenola. U usporedbi s drugim voćnim vrstama, plodovi jagode pokazuju veći ukupni antioksidacijski kapacitet od naranči, jabuka, rajčica, kivija, breskvi i banana (Proteggente i sur., 2002). Za visok antioksidacijski kapacitet plodova jagode većinski je zaslužno djelovanje vitamina C (30 % ukupne antioksidacijske aktivnosti) i antocijana (25-40 % ukupne antioksidacijske aktivnosti), dok se ostatak pripisuje derivatima elaginske kiseline (Giampieri i sur., 2012)

### 3.2.3 Učinak konzumacije jagoda na ljudsko zdravlje

Epidemiološka istraživanja pokazuju da redovita konzumacija jagodastog voća ima kardioprotektivni učinak. Analiza prehrambenog unosa flavonoida u NHS 1 (engl. *Nurses Health Study*) i NHS 2 koje je uključivalo preko 130 tisuća ispitanika ukazuje da povećani unos plodova jagode i borovnice (16-22 mg/dan) dovodi do redukcije hipertenzije za 8 % (Basu i sur., 2014). U Woman's health istraživanju (n = 38,176) konzumacija antocijana od 0,2 mg/dan povezana je sa smanjenjem razine c-reaktivnog proteina (upalnog markera) i smrtnošću od kardiovaskularnih bolesti (Sesso i sur., 2007) Tri su moguća načina djelovanja unosa jagode na prevenciju od kardiovaskularnih oboljenja, a to su smanjenje oksidativnog stresa i formiranja slobodnih radikala, antiaterosklerotični i antihipertenzivni učinak (Forbes-Hernandez i sur., 2016). Oksidativni stres, odnosno neravnoteža između antioksidacijske aktivnosti i proizvodnje slobodnih radikala povezana je s patogeneom kardiovaskularnih bolesti i raka. Intervencijska istraživanja koja su koristila svježe, konvencionalno sušene i jagode sušene liofilizacijom su pokazala smanjen antioksidativni stres uzrokovan hiperlipidemijom i metaboličkim sindromom (Basu i sur., 2014).

Konzumacija jagode utječe na smanjenje post-prandijalne hiperglikemije putem inhibicije GLUT 2 transportera, koji je najznačajniji transporter u tankom crijevu u uvjetima visoke koncentracije glukoze, što se objašnjava sposobnošću prolaska antocijana pelargonidin-3-

glikozida da iz lumena crijeva do bazolateralne strane gdje se nalaze transporteri za glukozu (Manzano i sur., 2010). Konzumacija jagode ili konzumacija miješanog jagodastog voća rezultirala je uvećanim post-prandijalnim antioksidacijskim kapacitetom seruma u odnosu na kontrolnu skupinu (Torronen i sur., 2010). U *in vitro* istraživanjima ekstrakata jagode različitih sorti pokazalo se da ekstrakti ujednačeno pokazuju inhibitorni potencijal prema enzimima  $\alpha$  - glukozidazi i  $\alpha$  - amilazi (Cheplick i sur., 2010).

Rezultati mnogih istraživanja ukazuju na kemoprotektivne učinke uslijed konzumacije jagoda, pogotovo utjecaj plodova jagoda i kupina na inhibiciju različitih tumorskih stanica *in vitro* (Giampieri i sur., 2012). Elaginska kiselina je polifenolni spoj koji je najviše povezivan s kemoprotektivnim učinkom na inicijalne stadije razvoja raka u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima (Mohammadinejad i sur. 2022). Antioksidacijska aktivnost je prvotno bila objašnjenje za inhibitorno djelovanje bioaktivnih spojeva u jagodastom voću na mutagenezu stanica, ali novija istraživanja pokazuju ulogu fitokemikalija iz jagodastog voća na modulaciju staničnih procesa povezanih s proliferacijom, apoptozom, upalom i angiogenezom. Unos liofilizirane jagode kod ispitanika s displazijom jednjaka doveo je do inhibicije razvoja lezija pomoću modulacije staničnih puteva povezanih s proliferacijom (Afrin i sur., 2016).

### **3.3 *In vitro* modeli za ispitivanje probave polifenola**

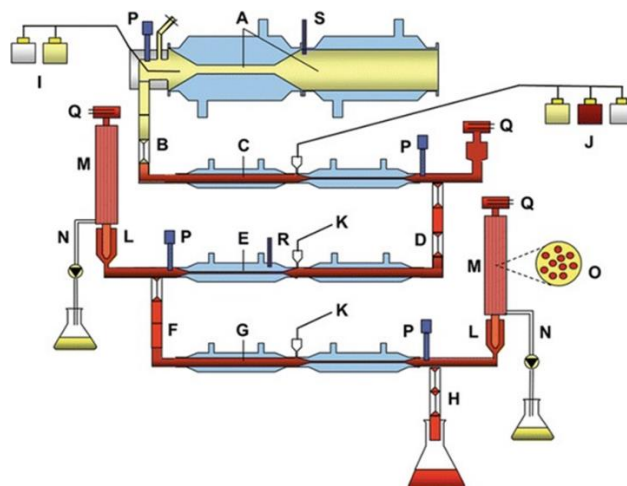
#### **3.3.1 Mehanizam probavnog sustava**

Probava hrane u ljudskom probavnom sustavu skup je raznovrsnih fizikalno-kemijskih procesa koji reguliraju unos hrane, razgradnju hrane, apsorpciju nutrijenata, transport do ciljnih stanica i tkiva te eliminaciju otpada. Ljudski probavni sustav sastoji se od probavne cijevi, žlijezda i pomoćnih probavnih organa (Saladin, 2017.) Probavna cijev proteže se od usta do anusa, a sastoji se od ždrijela, jednjaka, želuca, te tankog i debelog crijeva. Pomoćni organi uključuju zube, limfne i krvne žile i mnogobrojne mišićne grupe. Žlijezde uključene u proces probave su žlijezde slinovnice, jetra, gušterača i mnogobrojne male žlijezde koje se nalaze u stijenci probavnog trakta (Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021.) U svrhu poboljšanja probave hrane i apsorpcije nutrijenata sve je veći znanstveni interes za moguće modifikacije strukturalnih svojstava hrane, što rezultira mnogobrojnim znanstvenim istraživanjima ljudskog probavnog trakta.

### 3.3.2 *In vitro* modeli za ispitivanje probave polifenola

U porastu je zanimanje znanstvenika za istraživanje antioksidacijskog kapaciteta biološki aktivnih tvari nakon procesa probave. Međutim, određivanje istog u *in vivo* uvjetima je izrazito kompleksno. Istraživanja probave hrane u ljudskom probavnom sustavu su vrlo zahtjevna, skupa, varijabilnost između ispitanika je visoka i prisutna su etička ograničenja (Sensoy i sur., 2021). Uporaba životinjskih modela se nastoji izbjegavati, stoga se razvijaju *in vitro* modeli koji simuliraju fiziološke uvjete *in vivo*, uzimajući u obzir prisutnost i koncentraciju probavnih enzima, promjenu pH vrijednosti, vrijeme odvijanja probave i mnoge druge faktore koji utječu na probavne procese (Marcano i sur., 2015). *In vitro* modeli dijele se na statičke i dinamičke sustave. Statički su zbog svoje jednostavnosti češće u uporabi, ali protokoli za izvođenje sadrže različite uvjete (vremensko trajanje, pH, koncentracija žučnih soli i probavnih enzima) koji ne odražavaju stvarne uvjete i velika razlika između protokola otežava usporedbu istraživanja (Bohn i sur., 2017). Primjerice, u gastričnoj fazi probave pH je konstantan, dok je enzimska aktivnost u svim fazama konstantna neovisno o sastavu makronutrijenata u bolusu i intestinalna faza je svedena na jednu fazu dok je u ljudskom probavnom traktu sačinjena od tri (duodenalna, jejunalna i ileumna faza) (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020). Statički sustavi se najčešće koriste kod izoliranih ili pročišćenih komponenata hrane gdje probavni proces nije složen kao kod hrane kruće konzistencije (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

Dinamički *in vitro* sustavi su osmišljeni kako bi kontinuirano pratili promjenu fizikalno-kemijskih uvjeta u probavi, koji uključuju peristaltiku i miješanje bolusa, promjenu pH vrijednosti, promjenu koncentracije probavnih enzima i konzistencije bolusa (Dupont i sur., 2019). Sekrecija probavnih sokova je kontinuirana i sustav uključuje transport bolusa u komore koje simuliraju različite dijelove probavne cijevi (slika 1). U odnosu na statičke *in vitro* sustave, dinamički pružaju točniju procjenu biodostupnosti specifičnih bioaktivnih sastojaka i predviđanje mehanizma probave i promjene u matriksu namirnice (Tomšić A., 2022). Faktori koji uvelike utječu na oslobađanje polifenola iz matriksa namirnice i moraju biti simulirani u *in vitro* sustavu su mastikacija, peristaltika u želucu, kiseli pH u želucu koji potiče reakcije hidrolize i prisutnost probavnih enzima koji omogućuju oslobađanje polifenolnih spojeva iz matriksa namirnice (Bohn i sur., 2017).



**Slika 1.** Shematski prikaz dinamičkog *in vitro* modela TIM-1. A. želučani odjeljak; B. pilorički sfinkter; C. duodenalni odjeljak; D. peristaltički ventil; E. jejunski odjeljak; F. peristaltički ventil; G. ilealni odjeljak; H. ilealno-cekumski ventil; I. želučano izlučivanje; J. duodenalno izlučivanje; K. izlučivanje bikarbonata; L. prefilter; M. filtracijski sustav; N. filtrat s biopristupačnom frakcijom; O. sustav šupljih vlakana (presjek); P. pH elektrode; Q. senzori razine; R. senzori temperature; S. senzor tlaka. (Verhoeckx i sur., 2015)

### 3.3.3 Probava u ustima

Probava hrane je kontinuirani i dinamički proces koji započinje u oralnoj šupljini. Dva su ključna mehanizma zaslužna za oralnu probavu hrane, žvakanje (mastikacija) i lučenje sline (salivacija). Trajanje probave u ustima ovisi o konzistenciji unesene hrane, za tekuću hranu je proces znatno kraći jer su jedine promjene kojoj se tekuća hrana podvrgava u oralnoj šupljini izjednačavanje temperature s tjelesnom temperaturom i razrjeđivanje sa slinom. Kod krute hrane žvakanjem dolazi do smanjenja čestica hrane, a miješanjem sa slinom dolazi do omekšavanja konzistencije hrane i nastanka bolusa. U ovisnosti o mehaničkim svojstvima hrane, čestice se mastikacijom svedu na veličinu u rasponu od 0,8 mm do 3 mm prije formiranja bolusa. Žvakanje se nastavlja sve dok konzistencija bolusa nije optimalna za aktiviranje refleksa gutanja (engl. *swallowing treshold*, prag deglutacije).

Slina je bistra, vodena tekućina koju luče žlijezde slinovnice, sastoji se od ~ 99,5 % vode, dok ~ 0,3 % čine proteini i elektroliti kao što su natrijevi, kalijevi, magnezijevi, kalcijevi, fosfatni i bikarbonatni ioni (Sallas i sur., 2011). Proteini koji se nalaze u slini su pretežito enzimi, iako su detektirane i druge vrste kao što su imunoglobulin A (IgA) , lizozimi i mukozni glikoproteini (mucini) (Li i sur. 2020). U *in vitro* sustavima oralna faza probave uključuje dodatak  $\alpha$ -amilaze (izolirane iz ljudske sline) pri pH 7. Faza probave u ustima se uglavnom primjenjuje u slučajevima gdje uzorak sadržava ugljikohidrate, u reakciji razgradnje katalizirane enzimom  $\alpha$ -amilazom (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

#### 3.3.4 Probava u želucu

Bolus se iz oralne šupljine gutanjem i peristaltikom u jednjaku prenosi u želudac. Želučana faza ima četiri funkcije: skladištenje, usitnjavanje, miješanje i pražnjenje sadržaja u želucu. Ljudski želudac je anatomski podijeljen na četiri dijela; kardiju, fundus, antrum i pilorus. Proksimalni dio želuca (kardija i fundus) služi za skladištenje još neprobavljene hrane, dok se u distalnom dijelu odvijaju procesi usitnjavanja i miješanja. Antrum služi i kao pumpa koja izbacuje bolus iz piloričnog sfinktera u dvanaesnik (Sensoy i sur. 2021).

Želučana stijenka luči želučani sekret koji razgrađuje bolus, dok se želučanim kontrakcijama usmjerava prema piloričkom sfinkteru. Želučana sekret sadrži pepsinogen, klorovodičnu kiselinu, mukus, lipazu, elektrolite (natrijevi, kalijevi, kalcijevi, fosfatni, bikarbonatni i sulfatni ioni), hormone (serotonin i gastrin), vodu i intrinzični faktor (IF). Kao odgovor na unos hrane, G-stanice luče gastrin koji zatim aktivira parijetalne stanice koje izlučuju vodikove ione koji u reakciji s ionima klore tvore klorovodičnu kiselinu (Sensoy i sur., 2021). Kiseli pH uzrokovan sekrecijom klorovodične kiseline aktivira pepsin i dolazi do denaturacije proteina u bolusu. Vrijednost pH u praznom želucu iznosi 1-3, dolaskom hrane u želudac se podiže na 5,5 do 7, na polovini vremena pražnjenja opada na 4,5 i zatim se vraća na početnu vrijednost (Bender i sur., 2005) Probava hrane u želucu može trajati od 15 min do 3 h u ovisnosti o konzistenciji hrane (Li i sur., 2020). Nakon želučane probave bolus postaje kimus, kašasta mješavina želučanih sokova i hrane koja se pomoću želučane peristaltike prenosi u duodenum.

Pepsin se koristi u gastričnoj fazi u većini *in vitro* sustava, iako koncentracija varira, količina potrebnog pepsina se utvrđuje putem sadržaja proteina u uzorku. Lipaza je gotovo uvijek

izostavljena iz gastične faze u *in vitro* sustavima. Odsutnost želučane lipaze u *in vitro* sustavima može rezultirati manje preciznim rezultatima, budući da u ljudskom probavnom traktu, probava masti započinje u želucu, želučana lipoliza pridonosi emulgiranju lipida i poboljšava biodostupnost bioaktivnih lipofilnih spojeva, i služi kao okidač za nastavnu probavu lipida u intestinalnoj fazi probave (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

### 3.3.5 Probava u tankom crijevu

Tanko crijevo ima dvije važne uloge u ljudskom probavnom traktu, a to su razgradnja makromolekula i apsorpcija vode i nutrijenata. Anatomski se dijeli na duodenum, gdje se odvija razgradnja makromolekula, te na jejunum i ileum, koji su mjesta apsorpcije. Unutarnja stijenka tankog crijeva dovodi pankreasne sokove u lumen crijeva. Pankreasni sokovi su mješavina enzima lipaze, amilaze i proteaze. Osim sokova, pankreas izlučuje i bikarbonatne ione koji osiguravaju lužnati pH pri kojem probavni enzimi mogu katalizirati reakcije probave makronutrijenata. Pomoću pankreasnih sokova se složeni ugljikohidrati se razlažu na disaharide, proteini na tripeptide, dipeptide i aminokiseline dok se trigliceridi razlažu na monogliceride i slobodne masne kiseline. Žuč je vodena otopina koju stvara jetra i koja se skladišti u žučnoj vrećici. Putem žučovoda dolazi do dvanaesnika gdje emulgira lipide iz hrane i dispergira ih u kapljice. Žuč se sastoji od žučnih soli, kolesterola, bilirubina, fosfolipida, vode i elektrolita. Na površini epitela tankog crijeva nalaze se mikrovile putem kojih se izlučuju probavni enzimi koji razlažu disaharide na monosaharide koji se mogu apsorbirati (Sensoy i sur., 2021). Voda i nutrijenti se apsorbiraju u enterocitima putem tri mehanizama, aktivnog transporta, difuzije i olakšane difuzije. Djelovanje žučnih soli, elektrolita, pH, proteolitičkih, lipolitičkih i amilolitičkih enzima utječe na apsorpciju bioaktivnih spojeva. Neprobavljeni polisaharidi i proteini mogu vezati hidrofilne bioaktivne spojeve i tako smanjiti njihovu biodostupnost (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

### 3.3.6 Probava u debelom crijevu

Debelo crijevo ima funkciju reapsorpcije vode i izbacivanja otpada probave hrane iz organizma defekacijom. Debelo crijevo ima anaeroban okoliš koji je domaćin ~ 10<sup>11</sup>/g uvjetno anaerobnim mikroorganizmima. Crijevna mikrobiota sadrži enzime koji imaju sposobnost razgradnje prehrambenih vlakana, razgrađuje žučne soli i pankreasne enzime koji uz kimus dospiju u debelo crijevo.

Karakterizacija polifenolnih spojeva u *in vitro* fazi probave u kolonu ukazuje na biomodifikaciju uzrokovanu mikrobnom aktivnošću koja uključuje metilaciju, sulfataciju i glukuronidaciju (Scalbert i sur., 2002). Ograničenja *in vitro* faze probave debelog crijeva mogu biti reducirani broj i manja bioraznolikost mikrobnih vrsta prisutnih u sustavu u odnosu na ljudski kolon i mukoza, što bi značilo da se rezultati stope katabolizma i apsorpcije u *in vitro* sustavu značajno razlikuju od vrijednosti *in vivo* (Kong i Singh, 2010)

### 3.3.7 Probava polifenola

Glavni čimbenik koji utječe na biodostupnost polifenola je matriks hrane koji može odrediti interakcije polifenola s drugim prisutnim spojevima (Liović, 2019). Neki polifenolni spojevi tvore komplekse s enzimima i metalnim ionima zbog čega može doći do nastanka taloga (Bohn, 2014). Putem kovalentnih i vodikovih veza polifenoli stupaju u interakcije s polisaharidima što može smanjiti njihovu biodostupnost (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020). Izoflavoni iz soje pokazuju veću biodostupnost u *in vitro* uvjetima probave u uzorcima obogaćenih voćnih sokova u odnosu na uzorke pšeničnih keksa, što se može objasniti nižim stupnjem difuzije i slabijim otapanjem u uzorcima krute hrane (De Pascual i sur., 2006)

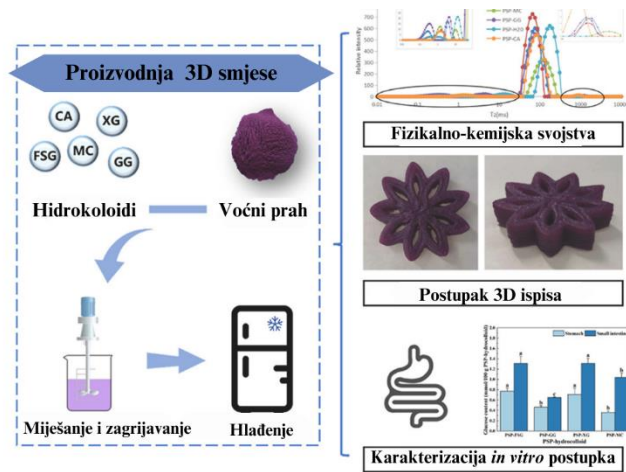
Iako faza probave u ustima traje relativno kratko u odnosu na druge faze, dva čimbenika su izuzetno bitna za biodostupnost polifenola. Žvakanjem dolazi do razlaganja matriksa hrane čime dolazi do oslobađanja polifenola, a salivacijom dolazi do njihovog otapanja u nastalom bolusu. Polifenolni spojevi imaju visoki afinitet prema salivarnim proteinima bogatim aminokiselinama histidinom i prolinom, s kojima stupaju u nekovalentne i kovalentne interakcije (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020). U uvjetima probave u želucu dolazi do najvećeg stupnja oslobađanja polifenola. Biodostupnost flavonoida, antocijana i ostalih polifenola u uzorcima jagode bila je četverostruka veća u gastričnoj fazi *in vitro* probave u odnosu na intestinalnu fazu (Ariza i sur., 2017). Količina biodostupnog pelargonidin-3-glikozida u gastričnoj fazi *in vitro* probave uzoraka jogurta od jagode i breskve povećala se za 55 % u odnosu na oralnu fazu (Oliviera i Pintado, 2015). U uvjetima višeg pH u intestinalnoj fazi dolazi do smanjenja biodostupnosti antocijana koji prelaze u bezbojni halkonski oblik (Oliviera i Pintado, 2015). Zbog lužnatog pH polifenolni spojevi u intestinalnoj fazi probave podliježu reakcijama oksidacije i polimerizacije, dolazi do formacije fenolnih derivata koji zbog visoke molekulske mase i slaboj topljivosti nisu dostupni za apsorpciju (Rodríguez-Roque i sur., 2015). Aglikonske forme koje nastaju cijepanjem fenolnih glikozida su

dostupne za apsorpciju u enterocitima putem mehanizama pasivne difuzije ili putem transportera (Bohn, 2014). U tankom i u debelom crijevu dolazi do metaboličkih transformacija polifenola koje uključuju metilaciju, glukuronidaciju i sulfataciju (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020). U debelom crijevu polifenolni spojevi stupaju u interakcije s mikroorganizmima i podliježu reakcijama deglukuronidacije, dimetilacije, hidrolize, deglikolizacije i cijepanja prstena, što rezultira produktima koji se mogu apsorbirati (Bohn, 2014). Kompleksni metaboliti, poput laktona formiranih od biljnih lignana ili elagitanina, reapsorbiraju se iz debelog crijeva i ponovno podliježu jetrenom metabolizmu, a konjugirani derivati se izlučuju putem urina, stoga uzorci plazme i urina odražavaju stopu metabolizma polifenola u jetri i debelom crijevu (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

### 3.3.8 Probava 3D ispisanih proizvoda

Trenutno je dostupan veoma mali broj literaturnih navoda koji se obrađuju problematiku *in vitro* probave 3D ispisanih proizvoda na bazi voća. Zhou i suradnici su u *in vitro* sustavu simulacije želučane i intestinalne faze ispitivali oslobađanje polifenolnih spojeva iz 3D ispisanog proizvoda na bazi aronije. Ispitivali su tri 3D ispisanu uzorka proizvedena iz uzoraka pripremljenih različitim postupcima: kuhanjem, obradom parom i pečenjem plodova aronije. Nakon 120 min želučane faze i 120 min intestinalne faze probave, kumulativna stopa oslobađanja polifenola postupno je rasla, iako je oslobađanje polifenolnih spojeva bilo značajno u intestinalnoj vezi u usporedbi sa želučanom fazom. To se može objasniti hidrolitičkim djelovanjem pankreasnih enzima na polifenolne spojeve i stabilnošću polifenola neutralnog naboja pri pH 7 (Zhao i sur., 2023). *In vitro* oslobađanje polifenolnih spojeva u skladu je s Ritger–Peppas jednadžbom koja opisuje kinetiku otpuštanja aktivne tvari iz hidrogela (Hu i sur. 2023) su u svom istraživanju ispitivali utjecaj različitih hidrokoloida poput hidroksipropil metilceluloze, ksantan gume, guar gume, lanene i x-karagenan gume na *in vitro* probavu 3D ispisanih proizvoda od slatkog ljubičastog krumpira (slika 2). Varijacije u interakcijama između hidrokoloida i polifenola utjecale su na otpuštanje pojedinačnih polifenola iz 3D ispisanog uzorka tijekom gastrointestinalne probave i fermentacije u debelom crijevu. 3D uzorak s guar gumom sadržavao je značajno veći sadržaj polifenola oslobođenih nakon fermentacije u debelom crijevu u usporedbi s ostalim uzorcima. U zaključku, ovo je istraživanje pružilo teoretske smjernice za dodavanje hidrokoloida u prehrambene materijale biljnog podrijetla kako bi se poboljšala njihova izvedba 3D ispisa i moduliralo njihovo otpuštanje uslijed povezivanja s polifenolnim spojevima.





**Slika 2.** Shematski prikaz postupka *in vitro* probave 3D proizvoda na bazi plavog krumpira s dodatkom hidrokoloida (prema Hu i sur., 2023)

## 4. EKSPERIMENTALNI DIO

Cilj eksperimentalnog rada je bio odrediti biodostupnost polifenolnih spojeva te promjenu antioksidacijskog kapaciteta kaše jagode te 3D ispisanih funkcionalnih proizvoda na bazi jagode tijekom simuliranih uvjeta probave.

### 4.1 MATERIJAL

Plodovi jagode (*Fragaria ananassa* × Duch., sorta 'Albion') korišteni za eksperimente nabavljeni su putem tvrtke Jagodar-HB d.o.o. (Donja Lomnica, Zagrebačka Županija), a ubrani su tijekom svibnja 2022. godine u konzumnoj fazi zrelosti. Po dospijeću u Laboratorij plodovi su oprani, osušeni i skladišteni u polipropilenske vrećice na -18 °C. Za simulaciju uvjeta probave pripremljeni su vodeni ekstrakti kaše jagode i 3D ispisanih proizvoda od jagode (3 uzorka). Kaša jagode je pripremljena iz prethodno odmrznutih plodova jagode sukladno protokolu opisanom u potpoglavlju 4.2.2. Smjese za 3D ispis su uz kašu jagode sadržavale i škrobne nosače, pšenični škrob (Denes Natura Kft., Pečuh, Mađarska) i kukuruzni škrob (Gustin, Dr. Oetker, Janossomorja, Mađarska) te su iz istih također na isti način pripremljeni vodeni ekstrakti.

### 4.2 PRIPREMA KAŠE JAGODE ZA EKSTRAKCIJU I 3D ISPIS

Prethodno odmrznuti plodovi jagode su usitnjeni i homogenizirani štapnim mikserom (Cordys SB-1, MS Industrial Ltd., Kina). Za pripremu vodenog ekstrakta, kaša je podvrgnuta liofilizaciji, dok su se za potrebe 3D ispisa, kaši dodavali pšenični ili kukuruzni škrob u udjelu od 15 % (w/w). Smjesa se potom zagrijavala na magnetskoj miješalici (LLG-uniStirrer 7, Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, Njemačka) uz kontinuirano miješanje do temperature želatinizacije škroba (približno 80 °C). Želatinizacija je neophodna obzirom je za postupak 3D ispisa potrebna homogena i viskozna konzistencija voćne mase. Po završetku želatinizacije, smjesa se hladila na sobnu temperaturu te je podvrgnuta postupku 3D ispisa. 3D ispisani proizvodi također su na isti način podvrgnuti liofilizaciji kako bi se proizveo prah 3D ispisanih proizvoda podesan za pripremu ekstrakata.

#### 4.2.1 Izvedba 3D ispisa

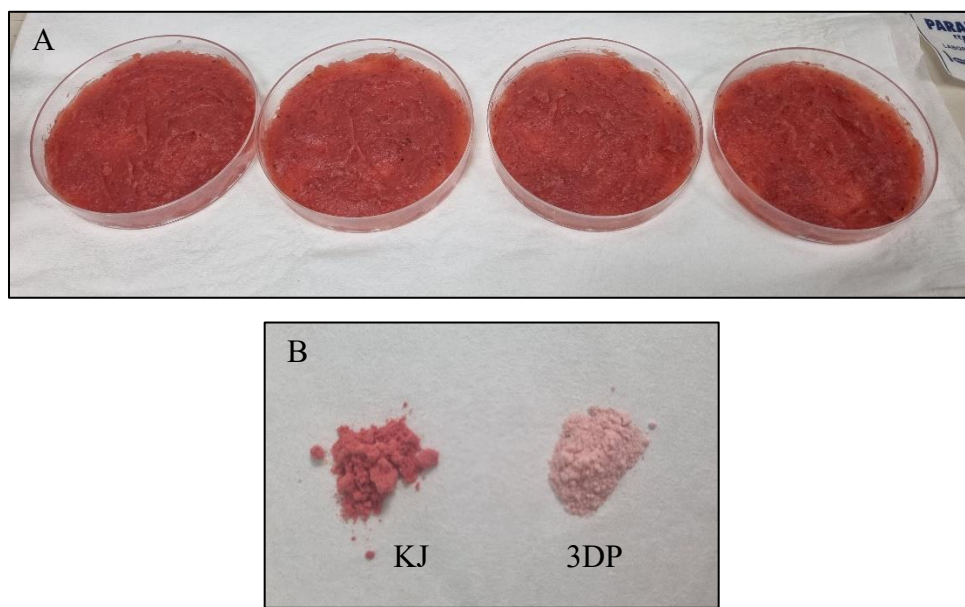
Za 3D ispis je korišten Foodini 3D pisač (Natural Machines, Barcelona, Španjolska) (slika 3) s pripadajućim kapsulama volumena 100 mL i promjera spanice 4 mm. Kapsule se napune smjesom za 3D ispis, postavu u nosače s unutarnje strane 3D pisača i računalno se pokreće postupak 3D ispisa. Željeni oblik i parametri ispisa konfigurirani su putem Foodini Creator Software na računalu. Za 3D ispis odabran je oblik srca s tri sloja, a dimenzije ispisanih 3D oblika iznosile su 53 mm (duljina), 51 mm (širina) i 12 mm (visina). Odabrani procesni parametri 3D ispisa su: brzina ispisa 14000 mm/min; debljina ispisne linije 3,4 mm; brzina protoka smjese 1,65 mm/s; te visina mlaznice prvog sloja 4,5 mm. Postupak 3D ispisa proveden je pri sobnoj temperaturi. Kontrolni uzorak je bila 3D ispisana kaša jagode bez dodataka škrobnih nosača, dok su uzorci 3D funkcionalnih ispisanih proizvoda bili ispisani uzorci jagode uz dodatak pšeničnog i kukuruznog škroba (15 %, w/w).



**Slika 3.** Ispis uzorka na Foodini 3D pisaču (*vlastita fotografija*)

#### 4.2.2 Postupak ekstrakcije

U 30 mL destilirane vode dodano je 3,85 g praha liofilizirane jagode (slika 4) ili praha liofiliziranog 3D ispisanog proizvoda, te je ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija provedena u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin DT 514 H Sonirex Digitec 13,5L, 860W, 40 kHz, Bandelin electronic, Njemačka) pri temperaturi 40 °C tijekom 30 min. Ekstrakt je potom centrifugiran na 6500 rpm tijekom 20 min. Dobiveni supernatant je prenesen u epruvetu kako bi se mogao koristiti u daljnjim eksperimentima *in vitro* probave.



**Slika 4.** Kaša jagode za pripremu vodenog ekstrakta pripremljena za zamrzavanje na – 80 °C  
(A) usitnjeni liofilizirani prah kaše jagode (KJ) i usitnjeni liofilizirani prah 3D ispisanog proizvoda (3DP) (*vlastita fotografija*)

#### 4.2.3 *In vitro* probava

Eksperiment *in vitro* probave je proveden u četiri faze od kojih svaka simulira jedan dio probave u ljudskom probavnom sustavu; inicijalna faza, faza probave u ustima, faza probave u želucu i faza probave u tankom crijevu. Metoda je provedena prema protokolu Shim i sur. (2010).

Za potrebe provedbe *in vitro* probave, originalni uzorci vodenog ekstrakta kaše jagode su razrijeđeni kalij-fosfatnim puferom kako bi simulirali realne uvjete probave te kako bi uzorci ekstrakta jagode bez nosača i s nosačima bili usporedivi. Koncentracija inicijalnog uzorka jagode bila je 128,33 mg/mL te je isti za potrebe *in vitro* probave bio razrijeđen 6,7 puta (20 mg/mL).

#### *Aparatura i pribor*

- Analitička vaga 1712 Mp8 SilverEdition (Sartorius, Velika Britanija)
- Centrifuga (Microspin 12, Biosan Ltd., Latvija)
- Laboratorijska tresilica model PR70-115V (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., SAD)
- Metalna špatula
- Mikrotitarske ploče s 96 jažica (Eppendorf, Njemačka)
- Mikropipete volumena 2 – 20  $\mu$ L, 20 – 200  $\mu$ L, i 200 – 1000  $\mu$ L (Gilson, SAD)
- Magnetna miješalica EV-100 (Tehtnica-Železniki, Slovenija)
- Papirnate lađice za vaganje
- Plastične epruvete od 2 mL (Eppendorf, Njemačka)
- Plastične epruvete od 15 mL (Eppendorf, Njemačka)
- Staklene laboratorijske čaše od 50, 100 i 1000 mL
- Stalak za epruvete
- Vodena kupelj (INKOLAB d.o.o., Hrvatska)

#### *Kemikalije*

- $\alpha$ -amilaza iz ljudske sline (Sigma-Aldrich, SAD)
- Otopina  $\alpha$ -amilaze

##### Priprema:

U originalnom pakiranju u kojem se nalazi 0,59 mg amilaze (100 IU) dodaje se 1,23 mL 20 mM kalij fosfatnog pufera. Pripremljena otopina čuva se na -20 °C.

- Pepsin iz svinjske sluznice (Sigma-Aldrich, SAD)
- Pepsin (3 mg/mL)

##### Priprema:

U laboratorijskoj čaši od 50 mL otopi se 60 mg pepsina u 20 mL 0,1 M otopine HCl-a te se sadržaj u čaši pomiješa na magnetnoj miješalici.

- Pankreatin iz svinjske gušterače (Sigma-Aldrich, SAD)
- HCl (klorovodična kiselina, 36,5 %, Kemika, Hrvatska)
- 0,1 M otopina HCl (klorovodična kiselina)

Priprema:

U laboratorijskoj čaši od 50 mL otpipetira se 0,42 mL otopine 36,5 % HCl i razrijedi destiliranom vodom do oznake na laboratorijskoj čaši.

- Žučne soli (Sigma-Aldrich, SAD)
- Lipaza iz svinjske gušterače (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , Kemika, Hrvatska)
- 1 M otopina  $\text{NaHCO}_3$

Priprema otopine: Prethodno izvaganih 1,26 g  $\text{NaHCO}_3$  prenese se u plastičnu epruvetu od 15 mL i otopi u nekoliko mililitara destilirane vode. Nakon što se suha tvar otopila čaša se nadopunjuje do oznake od 15 mL.

- Natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ , Kemika, Hrvatska)
- 1 M otopina  $\text{NaOH}$

Priprema otopine: Prethodno izvaganih 2 g  $\text{NaOH}$  prenese se u laboratorijsku čašu od 50 mL i otopi u nekoliko mililitara destilirane vode. Nakon što se suha tvar otopila čaša se nadopunjuje do oznake od 50 mL.

- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (dikalijev fosfat, Kemika, Hrvatska)
- 1 M otopina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

Priprema:

Prethodno izvaganih 17,42 g dikalijevog fosfata prenese se u laboratorijsku čašu od 100 mL i otopi u 100 mL destilirane vode.

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (monokalijev fosfat, Kemika, Hrvatska)
- 1 M otopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Priprema:

13,61 g monokalijevog fosfata prenese se u laboratorijsku čašu od 100 mL i otopi u 100 mL destilirane vode.

- Kalij-fosfatni pufer 20 mM, pH=7,0

Priprema:

Otpipetira se 61,5 mL 1 M  $K_2HPO_4$  i 38,5 mL 1 M  $KH_2PO_4$  u laboratorijsku čašu od 1000 mL te nadopuni do oznake destiliranom  $H_2O$ .

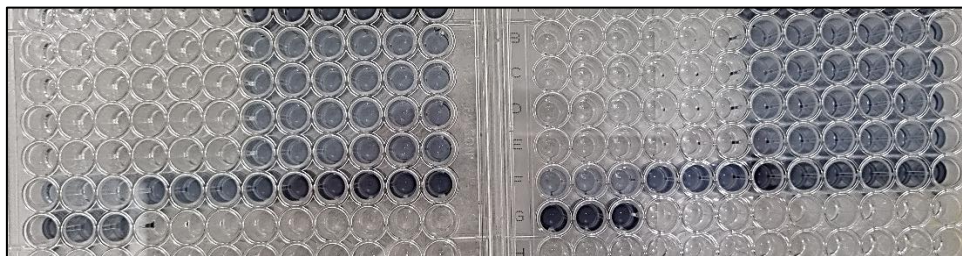
Postupak *in vitro* probave

Inicijalni uzorak se sastojao od ekstrakta kaše jagode otopljenog u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH = 7) do volumena od 2 mL. U fazi probave u ustima dodaje se 10  $\mu$ L  $\alpha$ -amilaze iz ljudske sline. Uzorci se 5 min inkubiraju pri 37 °C u vodenoj kupelji i na laboratorijskoj tresilici brzine 150 o/min. U želučanoj fazi dodaje se 0,4 mL pepsina koji je izoliran iz svinjske želučane sluznice (3 mg/mL). Uzorci se inkubiraju 60 min u vodenoj kupelji pri 37 °C i miješaju na tresilici brzine 150 o/min. Za fazu probave u tankom crijevu vrijednost pH uzoraka podešena je na 5,3 pomoću 1 M otopine  $NaHCO_3$ . Nakon toga se u uzorke dodaju pankreasni sokovi u volumenu od 0,9 mL (lipaza iz svinjske gušterače = 0,2 mg/mL, žučne soli = 2,4 mg/mL, pankreatin iz svinjske gušterače = 0,4 mg/mL, pripremljeni u 20 mM kalij-fosfatnom puferu). Vrijednost pH se povisuje na 7,0 dodavanjem otopine 1 M  $NaOH$ . Uzorci se zatim nadopunjavaju do volumena 2 mL uz dodatak kalij-fosfatnog pufera i inkubiraju u vodenoj kupelji 120 min pri 37 °C i na laboratorijskoj tresilici brzine 150 o/min. Nakon inkubacije, uzorci se centrifugiraju pri 12000 rpm, 10 min. Eksperiment *in vitro* probave je proveden na način da su za svaki od tri uzorka napravljena dva zasebna ekstrakta (dva neovisna eksperimenta), što je ukupno 6 ekstrakata od kojih je svaki ekstrakt proveden kroz faze *in vitro* probave.

Dobiveni uzorci iz različitih faza *in vitro* probave se nastavno koriste za ispitivanje antioksidacijskog potencijala i sadržaja polifenola. Provedeno je određivanje ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, monomernih antocijana, te antioksidacijske aktivnosti primjenom metoda DPPH• (2,2-difenil-pikrilhidrazil) i FRAP (engl. *Ferric reducing antioxidant power*, FRAP).

#### 4.2.4 Određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola provodi se primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem intenziteta obojenja pri 765 nm. U lužnatoj sredini (za snižavanje pH dodaje se  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) dolazi do prijenosa elektrona s polifenola na reagens, koji nakon redukcije tvori fosfomolibdatni kompleks plavog obojenja (slika 5). Protokol za određivanje ukupnih fenola prilagođen je za male volumene prema protokolu Lachman i sur. (1998). Izmjereni intenzitet obojenja se koristi za izračun ukupnih fenola pomoću baždarnog pravca galne kiseline. Rezultat se izražava kao mg ekvivalenta galne kiseline/100 g liofilizirane jagode.



**Slika 5.** Kompleks plavog obojenja u reakciji polifenola s Folin-Ciocalteu reagensom (*vlastita fotografija*)

#### *Aparatura i pribor:*

- Analitička vaga 1712 Mp8, SilverEdition (Sartorius, Velika Britanija)
- FLUOstar OPTIMA mikrotitarski čitač (BMG Labtech, SAD)
- Laboratorijska čaša od 50 mL
- Metalna špatula
- Mikrotitarske ploče s 96 jažica (Eppendorf, Njemačka)
- Mikropipete volumena 2 – 20  $\mu\text{L}$ , 20 – 200  $\mu\text{L}$ , i 200 – 1000  $\mu\text{L}$  (Gilson, SAD)
- Papirnate lađice za vaganje
- Plastične epruvete
- Stalak za epruvete



- Vibromikser EV-202 i EV-100 (Tehtnica-Železniki, Slovenija)

### *Kemikalije*

- Standard galne kiseline (Sigma-Aldrich, SAD)
- Otopina standarda galne kiseline 2 mg/mL

#### Priprema:

6 mg galne kiseline prenese se u plastičnu epruvetu od 3 mL i otopi u 3 mL destilirane vode. Iz pripremljene koncentrirane otopine pripreme se razrjeđenja u rasponu od 0,1 - 1,0 mg/mL .

- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Kemika, Hrvatska)
- 20 %-tna otopina natrijevog karbonata

#### Priprema:

Odvaže se 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i prenese se u staklenu čašu od 50 mL te se ulije ~15 mL destilirane vode. Tako pripremljena otopina lagano se zagrijava na miješalici uz dodatak magneta. Kada se sav sadržaj u čaši otopi, otopina se prebaci u menzuru i nadopuni do 50 mL.

Priprema uzorka: za pripremu ekstrakta vidjeti poglavlje 4.2.2.

### *Postupak određivanja ukupnih fenola*

Volumen od 50  $\mu\text{L}$  uzorka dobiven nakon provedenog eksperimenta *in vitro* probave pomiješan je sa 790  $\mu\text{L}$  destilirane  $\text{H}_2\text{O}$ , 20  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa i 150  $\mu\text{L}$  20 %-tnog  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , a potom je sadržaj reakcijske smjese homogeniziran pomoću vibromiksera. Uzorci su inkubirani na temperaturi od 37 °C tijekom 30 min, a zatim centrifugirani te je 50  $\mu\text{L}$  supernatanta preneseno u jačice mikrotitarske pločice. Napravljene su tri paralele za svaki istraživani uzorak (tri uzorka) u tri zasebna eksperimenta. Za izradu baždarnog dijagrama korištena su razrjeđenja standardne otopine galne kiseline u rasponu 0,1 – 1,0 mg/mL. Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 765 nm. Temeljem izmjerenih vrijednosti apsorbancije pripremi se baždarni dijagram s

vrijednostima apsorbancije na y osi i vrijednostima koncentracije galne kiseline na x osi. Rezultat sadržaja ukupnih fenola je izražen kao ekvivalent mase galne kiseline po masi liofilizirane jagode (mg galne kiseline na 100 g liofilizirane jagode). Izračun sadržaja ukupnih fenola dobiven je prema niže navedenoj jednadžbi pravca (1):

$$y = 0,895x + 0,0364 \quad R^2 = 0,9924 \quad [1]$$

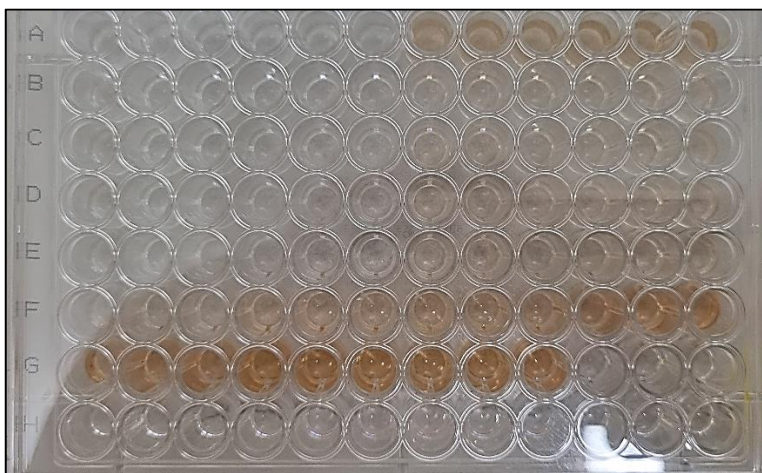
gdje je:

x – koncentracija galne kiseline (mg/mL)

y – apsorbancija pri 765nm

#### 4.2.5 Određivanje ukupnih flavonoida

Za određivanje ukupnih flavonoida korištena je kolorimetrijska metoda pomoću aluminij (III) klorida (Zhi-shen i sur., 1999). Aluminijev (III) klorid pri kiseljoj pH vrijednosti tvori stabilne komplekse s C-3 ili C-5 hidroksilnom skupinom flavona ili flavanola i s C-4 keto skupinom dajući žuto obojenje reakcijske smjese čija se apsorbancija mjeri pri 510 nm (slika 6).



**Slika 6.** Žuto obojenje reakcijske smjese prilikom provedbe metode određivanja ukupnih flavonoida pomoću aluminij (III) klorida (*vlastita fotografija*)

*Aparatura i pribor:*

- Analitička vaga 1712 Mp8, SilverEdition (Sartorius, Velika Britanija)
- FLUOstar OPTIMA mikrotitarski čitač (BMG Labtech, SAD)
- Laboratorijska čaša od 100 mL i 150 mL
- Metalna špatula
- Mikrotitarske ploče od 96 jažica (Eppendorf, Njemačka)
- Mikropipete volumena 2-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, i 200-1000  $\mu$ L (Gilson, SAD)
- Papirnate lađice za vaganje
- Plastične epruvete od 2 mL (Eppendorf, Njemačka)
- Plastične epruvete od 15 mL (Eppendorf, Njemačka)
- Stalak za epruvete
- Vibromikser EV-202 i EV-100 (Tehtnica-Železniki, Slovenija)
- Magnetna miješalica EV-100 (Tehtnica-Železniki, Slovenija)

*Kemikalije:*

- Standard kvercetina (Sigma-Aldrich, SAD)
- Otopina standarda kvercetina, 2 mg/mL

Priprema:

Izvaže se 8 mg kvercetina i prenese se u plastičnu epruvetu od 15 mL gdje se otopi u 4 mL 96 %-tnog etanola.

- Aluminijev klorid ( $\text{AlCl}_3$ , Sigma-Aldrich, SAD)
- 10 %-tna otopina aluminijevog klorida

Priprema:

Izvaže se 10 g aluminijevog klorida i prenese u staklenu čašu od 150 mL te se otopi u 100 mL destilirane vode uz miješanje na magnetnoj mješalici.

- Natrijev nitrit ( $\text{NaNO}_2$ , Sigma-Aldrich, SAD)
- 5 %-tna otopina natrijevog nitrita

Priprema:

Prethodno izvaganih 5 g natrijeva nitrita prenese se u laboratorijsku čašu od 100 mL te se otopi u 100 mL destilirane vode.

- Natrijev hidroksid (NaOH, Kemika, Hrvatska)
- 1 M otopina natrijevog hidroksida

Priprema:

Prethodno izvaganih 4 g natrijevog hidroksida se otopi u 100 mL destilirane vode.

- 96 % etanol (Kemika, Hrvatska)

Priprema uzorka: za pripremu ekstrakta vidjeti poglavlje 4.2.2

*Postupak određivanja ukupnih flavonoida*

Volumen od 100  $\mu$ L svakog uzorka dobivenog nakon provedene *in vitro* probave pomiješan je s 400  $\mu$ L destilirane vode. Uzorci su ostavljeni da se inkubiraju na sobnoj temperaturi 5 min. Nakon inkubacije u uzorke je dodano 30  $\mu$ L 10 %-tne otopine  $AlCl_3$ , nakon čega su uzorci vorteksirani i ostavljeni na inkubaciji 6 min pri sobnoj temperaturi. Zatim su uzorci nadopunjeni s 240  $\mu$ L destilirane vode i centrifugirani na 10000 rpm tijekom 5 min. Volumen od 100  $\mu$ L supernatanta svakog uzorka prenesen je u jažice mikrotitarske pločice te je izmjerena apsorbancija pri 510 nm. Rađene su tri paralele za svaki uzorak, uključujući slijepu probu i otopine standarda kvercetina za potrebe izrade baždarnog pravca.

Izrada baždarnog pravca: Za izradu baždarnog pravca korištena je koncentrirana otopina kvercetina pripremljena u 96 %-tnom etanolu u koncentraciji 2 mg/mL, od koje su pripremljena razrjeđenja u rasponu koncentracija 0,1 – 1,0 mg/mL. Temeljem izmjerenih apsorbancija pripremljen je baždarni pravac gdje os apcisa predstavlja koncentracije otopina standarda kvercetina, a os ordinata vrijednosti apsorbancija pri 510 nm. Rezultati mjerenja izraženi su kao mg ekvivalenta kvercetina po 100g liofilizirane jagode. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (2):

$$y = 0,074x + 0,0716 \quad R^2 = 0,9938 \quad [2]$$

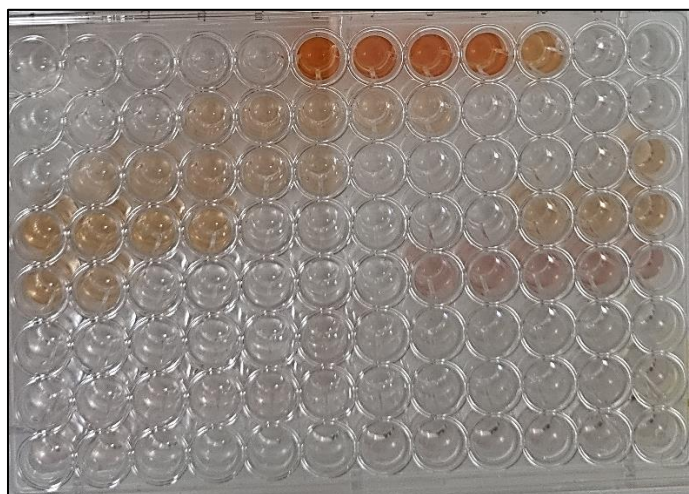
gdje je:

x – koncentracija kvercetina (mg/mL )

y – apsorbancija pri 510 nm

#### 4.2.6 Određivanje monomernih antocijana

Za određivanje monomernih antocijana korišten je protokol iz rada Giusti i Wrolstad (2001). S promjenom vrijednosti pH antocijani mijenjaju kemijsku strukturu, čime dolazi do promjene njihovog obojenja. Pri vrijednosti pH = 1 u formi kationa poprimaju crvenu boju, dok se pri vrijednosti pH = 4,5 nalaze u ravnoteži s leuko formom koja je bezbojna. Promjena u apsorbanciji pri različitim pH vrijednostima proporcionalna je koncentraciji antocijana u uzorku. Za vrijednosti pH 1,0 i 4,5 apsorbancija se mjeri na valnim duljinama od 520 nm i 740 nm (slika 7).



**Slika 7.** Prikaz promjene boje ekstrakata puferiranih puferima različitih pH vrijednosti (pH 1,0 – maksimum apsorpcije pri 520 nm) (*vlastita fotografija*)

*Aparatura i pribor:*

- Analitička vaga 1712 Mp8 SilverEdition (Sartorius, Velika Britanija)
- FLUOstar OPTIMA mikrotitarski čitač (BMG Labtech, SAD)
- Laboratorijska čaša od 50 mL
- Metalna špatula
- Mikrotitarske ploče od 96 jažica, (Eppendorf, Njemačka)
- Mikropipete volumena 2 – 20  $\mu\text{L}$ , 20 – 200  $\mu\text{L}$ , i 200 – 1000  $\mu\text{L}$ , (Gilson, SAD)
- Papirnate lađice za vaganje
- Plastične epruvete od 2 mL, (Eppendorf, Njemačka)
- Stalak za epruvete
- Vibromikser EV-202 i EV-100, (Tehtnica-Železniki, Slovenija)

*Kemikalije:*

- Kalijev klorid (KCl, Kemika, Hrvatska)
- 0,025 M otopina kalijevog klorida

Priprema:

Na analitičkoj vagi izvaže se 0,093 g kalijeva klorida i prenese u laboratorijsku čašu od 50 mL, zatim se otopi u 50 mL destilirane vode.

- Natrijev acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Hrvatska)
- 0,4 M otopina natrij acetat trihidrata

Priprema:

Izvaže se 2,7 g natrij acetata trihidrata i prenese u laboratorijsku čašu od 50 mL, te se sadržaj čaše otopi u 50 mL destilirane vode.

- Klorovodična kiselina (HCl, 36,5 %, Kemika, Hrvatska)

Priprema uzorka: za pripremu ekstrakta vidjeti poglavlje 4.2.2

### *Postupak određivanja monomernih antocijana*

Volumen od 200 µL uzorka pomiješan je s 800 µL 0,025 M otopine KCl (pH = 1,0) te je isti omjer miješanja ponovljen s 0,4 M otopinom natrijevog acetata (pH = 4,5). Za slijepu probu korištena je destilirana voda u kojoj je uzorak pripreman. Uzorci su inkubirani 60 min na sobnoj temperaturi, pa su zatim u volumenima od 100 µL preneseni u jažice mikrotitarskih pločica. Svakom uzorku, bilo da je puferiran s pH 1,0 ili pH 4,5 mjeri se apsorbancija pri 520 nm i 700 nm.

Izračunavanje monomernih antocijana: Koncentracija monomernih antocijana u uzorku izračunava se kao ekvivalent pelargonidin-3-glukozida (mg/L) prema jednadžbi pravca (3):

$$\text{Antocijani (mg /L)} = \frac{A \cdot M_w \cdot R \cdot 1000}{l \cdot \epsilon} \quad [3]$$

gdje je:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4,5}$$

$M_w$  = molekulska masa za pelargonidin-3-glukozid (468,8 g/mol)

$R$  = faktor razrjeđenja

1000 = faktor za preračunavanje g u mg

$\epsilon$  = molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (26 900 L/mol cm)

$l$  = debljina kivete / mikrotitarske pločice (1 cm)

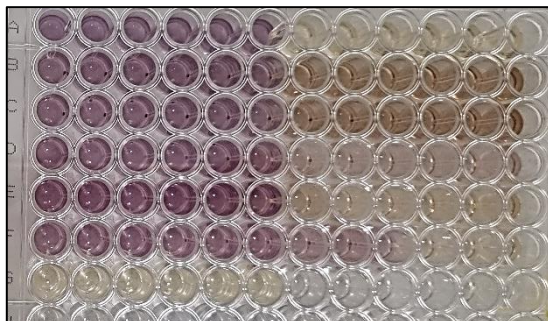
#### 4.2.7 Antioksidacijska aktivnost uzoraka *in vitro* probave

Za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka *in vitro* probave odabrane su metode DPPH• i FRAP, koje su provedene prema protokolu iz rada Šola i sur. (2020) i prilagođene za manje volumene uzoraka. Za obje metode kao referentni standard korišten je Trolox (6-hidroksi-

2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), sintetski analog vitamina E topljiv u vodi. Pripremljena je alikvot otopina standarda u koncentraciji 40 mg/mL, dok je raspon koncentracija otopine standarda Troloxa za izradu baždarnog dijagram bio 0,039 – 20 mg/mL .

#### metoda DPPH•

DPPH•, punog naziva 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil, slobodni je radikal ljubičaste boje. Metoda se temelji na redukciji otopine DPPH• radikala u prisutnosti antioksidansa gdje se kao produkt dobiva neradikalni oblik DPPH-H. Maksimalnu apsorpciju DPPH• ima pri 517 nm, no što je antioksidacijski potencijal tvari veći, DPPH• prelazi u neradikalni oblik što uzrokuje smanjenje apsorbanције pri toj valnoj duljini. Otopina poprima blijedo žuto obojenje ukoliko se radi o jakom antioksidansu ili narančasto obojenje uz prisutnost srednje jakog antioksidansa (slika 8). Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanције izračunavaju se rezultati koji se izražavaju kao % inhibicije DPPH•.



**Slika 8.** Prikaz promjene ljubičastog obojenja u žuto ili narančasto kod prisustva jakog odnosno srednje jakog oksidansa prilikom provedbe mjerenja antioksidacijske aktivnosti metodom DPPH• (*vlastita fotografija*)

#### *Postupak određivanja – metoda DPPH•*

Volumen od 50  $\mu$ L uzorka dobivenog nakon provedene *in vitro* probave pomiješan je s volumenom od 950  $\mu$ L DPPH• otopine (0,1 M). Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 10 min te su nakon inkubacije centrifugirani 5 min pri 10 000 rpm. Kao kontrola korištena je destilirana voda. Pripremljene su tri replike svakog uzorka na mikrotitarskoj pločici s 96 jažica, uključujući i uzorke standarda. Mjerenje apsorbancije provedeno je pri 517 nm, a rezultati su



izraženi kao % inhibicije DPPH• radikala. Postotak inhibicije računa se prema sljedećoj formuli (4):

$$\% \text{ inhibicije} = ((A_0 - A_t) / A_0) \cdot 100 \quad [4]$$

gdje je:

$A_0$  = apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

$A_t$  = apsorbancija uzorka (s ekstraktom)

Izrada baždarnog pravca: Iz otopine Trolox-a koncentracije 40 mg/mL pripremljena su razrjeđenja u rasponu 0,039 – 20 mg/mL. Mjerenje apsorbancije otopina standarda provedeno je na isti način kao i za uzorke ekstrakta samo što su umjesto uzoraka ekstrakta u jažice preneseni standardi i inkubirani na sobnoj temperaturi 30 min prije mjerenja. Baždarni dijagram na osi apscisa sadrži vrijednosti koncentracije Troloxa, a vrijednosti izmjerenih apsorbancija pri 517 nm na osi ordinata.

$$y = 0.8066x - 0.0157 \quad [5]$$
$$R^2 = 0.9983$$

gdje je:

x = koncentracija Troloxa (mg/mL)

y = apsorbancija uzorka (nm)

*Aparatura i pribor:*

- Analitička vaga 1712 Mp8 SilverEdition (Sartorius, Velika Britanija)
- FLUOstar OPTIMA mikrotitarski čitač (BMG Labtech, SAD)
- Laboratorijska čaša od 500 mL
- Metalna špatula
- Mikrotitarske ploče od 96 jažica (Eppendorf, Njemačka)
- Mikropipete volumena 2 – 20  $\mu$ L, 20 – 200  $\mu$ L, i 200 – 1000  $\mu$ L (Gilson, SAD)
- Papirnate lađice za vaganje
- Plastične epruvete od 2 mL (Eppendorf, Njemačka)

- Stalak za epruvete
- Vibromikser EV-202 i EV-100 (Tehtnica-Železniki, Slovenija)

*Kemikalije:*

- 96 % etanol (Kemika, Hrvatska)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox, Fluka, Švicarska)
- Koncentrirana otopina standarda Troloxa, 40 mg/mL

Priprema:

Izvaže se 40 mg Troloxa i prenese u plastičnu epruvetu od 2 mL te se sadržaj otopi u 1 mL 96 %-tnog etanola.

- DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) (Sigma-Aldrich, SAD)
- 0,1 mM otopina DPPH•

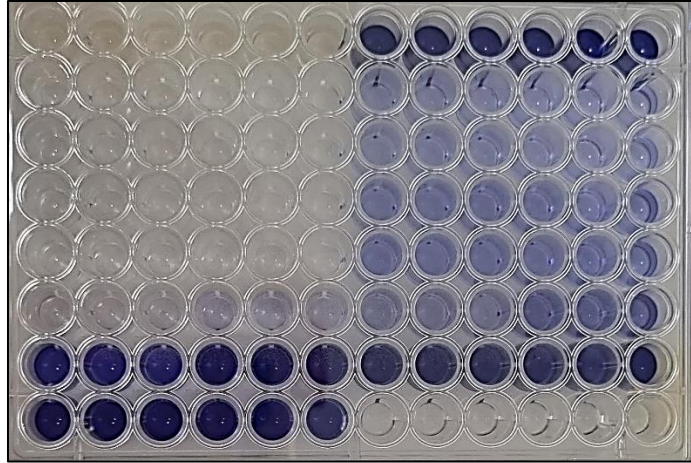
Priprema:

Na analitičkoj vagi izvaže se 0,0197 g DPPH•, prenese se u laboratorijsku čašu od 500 mL i sadržaj se otopi u 500 mL 96 % etanola.

Priprema uzorka: za pripremu ekstrakta vidjeti poglavlje 4.2.2

*Metoda FRAP*

Metoda FRAP bazira se na sposobnosti antioksidansa da reducira  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$  iona u TPTZ (željezo(III)-2,4,6- tri(2-piridil)-s-tirazin) reagensu. Reakcija se odvija pri niskoj pH vrijednosti.  $\text{Fe}^{2+}$  ioni pokazuju maksimalnu apsorbciju pri valnoj duljini od 593 nm (slika 9).



**Slika 9.** Prikaz promjene boje u plavo prilikom provedbe metode FRAP za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka (*vlastita fotografija*)

*Postupak određivanja – metoda FRAP*

U svaku jažicu mikrotitarske pločice otpipetirano je 5  $\mu\text{L}$  uzorka ekstrakta i zatim je uz pomoć multipipete dodano 95  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa. Prije korištenja FRAP reagens je zagrijan 10 min pri 37  $^{\circ}\text{C}$ . Sadržaj u jažicama inkubiran je 4 min i nakon toga je izmjerena apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba ima isti sadržaj svih reagensa osim uzorka, umjesto kojeg se koristi destilirana voda. Za mjerenje apsorbancije standarda korišten je isti postupak kao i kod uzorka ekstrakta. Za standard je korištena otopina Troloxa. Rezultati su izraženi kao postotak redukcije koji se dobiva iz razlike apsorbancije ekstrakta i slijepe probe. Rezultati su dobiveni primjenom sljedeće formule (5):

$$\% \text{ redukcije} = ((A_0 - A_t) / A_0) \cdot 100 \quad [6]$$

gdje je:

$A_0$  = apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

$A_t$  = apsorbancija uzorka (s ekstraktom)

*Izrada baždarnog dijagrama:*

Iz otopine standarda Trolox-a koncentracije 40 mg/mL pripravljena su razrjeđenja u rasponu 0,039 – 20 mg/mL. Po provedenim reakcijama, izmjerene su apsorbancije gdje je slijepa proba sadržavala sve osim uzorka. Temeljem izmjerenih apsorbancija pripremljen je baždarni dijagram na kojem se na apcisi nalaze vrijednosti koncentracija otopina standarda, a na ordinati vrijednosti apsorbancije na 593 nm.

$$y = 1.6875x - 0.0258 \quad [7]$$
$$R^2 = 0.999$$

gdje je:

x = koncentracija Troloxa (mg/mL)

y = vrijednosti apsorbancije uzoraka (nm)

*Aparatura i pribor:*

- Analitička vaga 1712 Mp8 SilverEdition (Sartorius, Velika Britanija)
- FLUOstar OPTIMA mikrotitarski čitač (BMG Labtech, SAD)
- Laboratorijska čaša od 50 mL, 100 mL i 1000 mL
- Metalna špatula
- Mikrotitarske pločice od 96 jažica (Eppendorf, Njemačka)
- Mikropipete volumena 20 µL, 200 µL, i 1000 µL (Eppendorf, Njemačka)
- Multipipeta (Eppendorf, Njemačka)
- Papirnate lađice za vaganje
- Plastične epruvete i stalak za epruvete
- Plastične epruvete od 2 mL (Eppendorf, Njemačka)
- Vibromikser EV-202 i EV-100, (Tehtnica-Železniki, Slovenija)

*Kemikalije:*

- natrijev acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Hrvatska)
- ledena octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Alkaloid AD, Makedonija)
- Acetatni pufer ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CH}_3\text{COOH}$ )

Priprema acetatnog pufera:

Izvaže se 3,1 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$  (natrijev acetat) i prenese u laboratorijsku čašu od 1 L te se nadoda 16 mL octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Laboratorijska čaša se nadopuni do 1 L destiliranom vodom.

- klorovodična kiselina (HCl, 36,5 %, Kemika, Hrvatska)
- 40 mM HCl

priprema otopine:

U laboratorijsku čašu volumena 1 L otpipetira se 3,4 mL HCl (36,5 %) i 996,6 mL destilirane vode.

- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ, Fluka, Švicarska)

Priprema otopine:

U menzuru od 50 mL ulije se 50 mL kloridne kiseline (40 mM), te se sadržaj menzure prelije u laboratorijsku čašu. Izvaže se 156,17 mg TPTZ-a i otopi u laboratorijskoj čaši s kloridnom kiselinom (40 mM).

- željezo (III) klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Hrvatska)
- 20 mM otopina željezovog (III) klorida heksahidrata

Priprema otopine:

Odvaže se 540,58 mg  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  i zatim se prenese u laboratorijsku čašu i otopi u 100 mL destilirane vode.

- Koncentrirana otopina standarda Troloxa, 40 mg/mL

Priprema:

Izvaže se 40 mg Troloxa i prenese u plastičnu epruvetu od 2 mL te se sadržaj otopi u 1 mL 96 %-tnog etanola.

- Radni FRAP reagens

#### Priprema reagensa:

U 50 mL acetatnog pufera (300 mM) otpipetira se 5 mL TPTZ otopine (10 mM) i 5 mL  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM). Prije upotrebe reagens je potrebno zagrijati 10 min pri 37 °C.

Priprema uzorka: za pripremu ekstrakta vidjeti poglavlje 4.2.2

### **4.3 OBRADA PODATAKA**

Podatci dobiveni iz rezultata eksperimenata obrađeni su u programu JASP (verzija 0.17.2.1). Provedena je jednosmjerna analiza varijance (engl. *one-way* ANOVA). Različite faze probave uspoređene su *post-hoc* Tukeyevim HSD testom. Shapiro-Wilk test korišten je za utvrđivanje normalne distribucije podataka. Za provjeru korelacije dobivenih rezultata korišten je Pearsonov koeficijent korelacije. Iz rada Evans (1996) definirani su stupnjevi korelacije u zavisnosti od vrijednosti koeficijenta. Kao granica statističke značajnosti korišten je uvjet  $p \leq 0,05$ .

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

Analizirana su 3 uzorka koji su uključivali vodeni ekstrakt kaše jagode te vodene ekstrakte 3D ispisanih proizvoda od jagode koji su se razlikovali prema vrsti dodanih hidrokoloida (kukuruzni i pšenični škrob, 15 %, w/w). Nakon provedenog postupka *in vitro* probave, zavisne varijable koje su eksperimentalno izmjerene i statistički analizirane su koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakata izmjeren metodama FRAP i DPPH•. Cilj rada bio je utvrditi biodostupnost fenolnih spojeva te antioksidacijsku aktivnost u kaši jagode, kao i 3D ispisanim funkcionalnim proizvodima na bazi jagode prilikom *in vitro* probave. U svim uzorcima nakon *in vitro* probave, provedene su i metode analize ukupnih flavonoida i monomernih antocijana, ali nisu detektirane značajne koncentracije istih te statistička analiza podataka nije provedena. Mogući razlog niske detekcije jest osjetljivost antocijana na povišenu temperaturu uslijed procesa želatinizacije škrobova u smjesama za 3D ispis jer su antocijani termolabilni. Posebice, pelargonidin-3-*O*-glikozid i cijanidin-3-*O*-glikozid, spojevi koji čine većinu sadržaja antocijana jagoda pokazuju vrlo visoku osjetljivost na termičku obradu (Oancea i sur. 2021), a smjese za 3D ispis se podvrgavaju temperaturi do 80 °C u svrhu želatinizacije škroba. Gubici antocijana u uzorcima mogući su i tijekom *in vitro* probave. U radu Wojtunik-Kulesza i sur. (2020) ukazuje se na gubitak antocijana uslijed *in vitro* probave u uzorcima ekstrakta maline i nara uslijed uvjeta intestinalne faze, a taj gubitak se objašnjava djelovanjem niskih vrijednosti pH i pankreasnih sokova na monomerne antocijane. Gubitak u ovom eksperimentu također je moguć zbog razrjeđenja uzoraka. Prema radu Taghawi i sur. (2022) kod mjerenja antocijana u uzorcima jagode može doći do zamućenja uzoraka s anorganskim otapalima, što ometa njihovu detekciju. Za potrebe simulacije realnih uvjeta u probavnom traktu, ovaj rad bio je ograničen na korištenje vode kao otapala. Niska detekcija flavonoida mogla bi biti posljedica slabog otapanja flavonoida u vodenom mediju (Gil- Izquierdo i sur., 2001).

### 5.1 KARAKTERIZACIJA KAŠE JAGODE

Prije provedbe *in vitro* probave, određen je bioaktivni sastav (ukupni fenoli, ukupni flavonoidi i monomerni antocijani) i antioksidacijska aktivnost (metode DPPH• i FRAP) uzoraka

vodenog ekstrakta kaše jagode, a rezultati su prikazani u tablici 1. Prema dobivenim rezultatima, vodeni ekstrakt kaše jagode korišten u ovom radu obiluje fenolnim spojevima ( $299.634 \pm 19.704$  mg GAE/100 g liofilizirane jagode). Flavonoidi su određeni u udjelu  $118.38 \pm 21.49$  mg QE/100 g liofilizirane jagode. Također, pokazan je izrazito visok antioksidacijski kapacitet mjeren metodama DPPH• ( $55.73 \pm 1.16$  % inhibicije) i FRAP ( $93.74 \pm 0.50$  % redukcije). Prema rezultatima rada Bebek Markovinović i sur. (2022) koncentracija ukupnih fenola u svježim plodovima jagode *Fragaria x ananassa Duch* sorte „Albion“ iznosila je  $49.67$  mg GAE/100 g, budući da udio vode u plodu jagode varira između 87 – 94 % (Raj i sur. 2022) rezultati u ovom istraživanju su u skladu sa podacima iz rada Bebek Markovinović i sur. (2022).

Jagodasto voće ima značajnu ulogu u ljudskoj prehrani i pruža brojne zdravstvene dobrobiti zbog visokog sadržaja hranjivih i bioaktivnih tvari, poput vitamina, minerala i polifenolnih spojeva (Cosme i sur., 2022). Brojne epidemiološke studije provedene u posljednjih nekoliko desetljeća pokazale su da konzumacija prehrane bogate voćem može smanjiti mogućnost razvoja brojnih ozbiljnih kroničnih bolesti (Nani i sur., 2021). Osim toga, potencijalne zdravstvene dobrobiti jagodastog voća, koje se prvenstveno mogu pripisati njihovom fitokemijskom sastavu i antioksidacijskom djelovanju, potaknule su interes za istraživanje voćnih vrsta s visokim udjelom polifenola (Rudrapal i sur., 2022). Jagode (*Fragaria x ananassa Duch.*) su jedno od najčešće konzumiranog jagodastog voća, uglavnom se konzumiraju u svježem obliku, ali se također naveliko i prerađuju u različite funkcionalne proizvode (Markovinović i sur., 2022).

Prema istraživanju Mahmood i sur. (2012) sadržaj ukupnih fenola u uzorcima svježih jagoda različitog sortimenta u fazi pune zrelosti varirao je u rasponu od  $1662 \pm 88$  do  $2067 \pm 67$  mg GAE/100 g DW. Levaj i sur. (2012) su određivali sadržaj ukupnih fenola na šest različitih sorti *Fragaria ananassa* × *Duch* gdje je raspon dobivenih vrijednosti bio od 251.97 do 713.06 mg GAE/100 g DW u uzorcima svježih plodova jagode. U istraživanju Dai i sur. (2020) kaša jagode uz dodatak ksilooligosaharida pasterizirana HTST metodom (engl. *High Temperature Short Time*) gdje se uzorci izlažu visokoj temperaturi u kratko vrijeme sadržavala je  $237 \pm 5$  mg GAE/100 g kaše jagoda. S obzirom na dostupnu literaturu, može se zaključiti da sadržaj ukupnih fenola u plodovima jagode značajno varira s obzirom na sortu, stupanj zrelosti i postupak korištene metode za izolaciju fenolnih spojeva, kao i metodologije njihovih određivanja.



U istraživanju Nour i sur. (2016), u uzorcima dviju sorti jagoda, detektirane su vrijednosti flavonoida  $79.56 \pm 3.25$  mg QE/100 g DW za sortu 'Magic' i  $38.88 \pm 1.89$  mg QE/100 g DW za sortu *Premial*. Nastavno na navedeno, može se zaključiti kako sadržaj ukupnih flavonoida značajno varira s obzirom na sortu jagode. Iako je kao ekstrakcijsko otapalo korišten metanol, vrijednosti ukupnih flavonoida su značajno manje, nego u ovom istraživanju, što se može objasniti primjenom ultrazvukom potpomognute ekstrakcije kao održive napredne ekstrakcijske tehnologije (tablica 2). Poznato je da su slobodne forme flavonoida netopljive ili slabo topljive u vodi, dok su visoko topljivi u organskim otapalima kao što su metanol, etanol i dimetil sulfoksid (Zhao i sur. 2019). S druge strane, flavonoidi supstituirani šećernim komponentama (flavonoidni glikozidi) su bolje topljivi u vodi u odnosu na aglikonske forme (Ferreira i Pinho, 2012). No, uz samo otapalo za ekstrakciju, vrijeme ekstrakcije, temperatura i koncentracija otapala, uvelike utječu na uspješnost ekstrakcije fenolnih spojeva iz biljnog materijala (Patra i sur., 2022). Kako bi se postigao najveći prinos fenolnih spojeva među kojima i flavonoida, važno je optimizirati procesne parametre ekstrakcije za svaki uzorak (Zhang i sur., 2018). Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, u usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom, ima brojne prednosti u skladu s održivom preradom, pri čemu valja istaknuti veće prinose izoliranih tvari, mogućnost izolacije termolabilnih spojeva, kao i smanjen utrošak energije i otapala (Carreira-Casais i sur., 2021, Milić i sur., 2021).

**Tablica 2.** Rezultati ispitivanja bioaktivnog sastava i antioksidacijskog potencijala vodenog ekstrakta kaše jagode

Parametar	VODENI EKSTRAKT JAGODE
Ukupni fenoli (mg GAE/100 g liofilizirane jagode)	$299.63 \pm 19.70$
Ukupni flavonoidi (mg QE/100 g liofilizirane jagode)	$118.38 \pm 21.49$
Monomerni antocijani (mg pelargonidin-3-glukozida/100 g liofilizirane jagode)	$5.90 \pm 0.59$
DPPH• (% inhibicije)	$55.73 \pm 1.16$
FRAP (% redukcije)	$93.74 \pm 0.50$

GAE – ekvivalenti galne kiseline, QE – ekvivalenti kvercetina

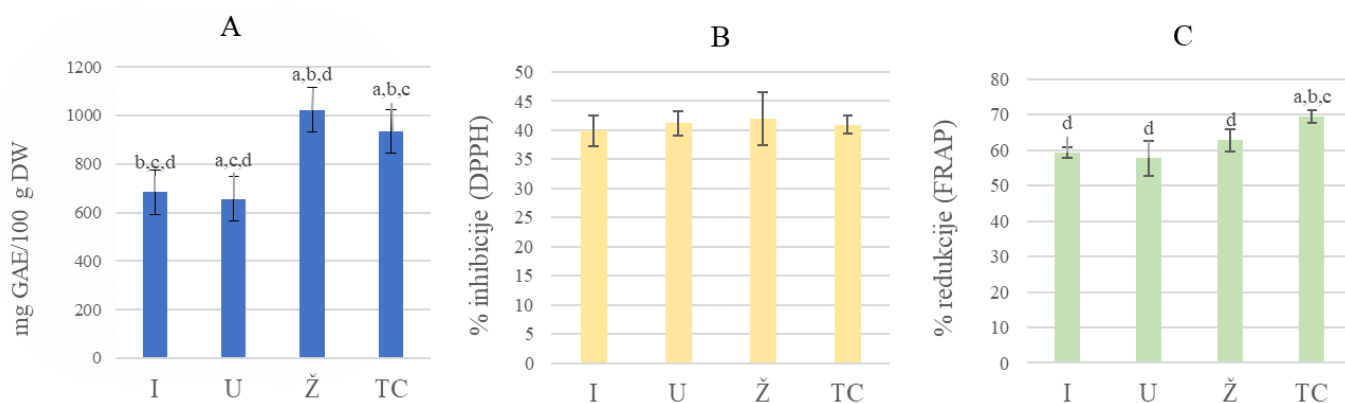
Dobiveni rezultati sadržaja monomernih antocijana su značajno niži, nego rezultati iz istraživanja Martinsen i sur. (2020), u kojem je određeno  $52.5 \pm 0.7$  mg monomernih antocijana/100 g jagoda u uzorku džema od jagoda.

Rezultati postotka inhibicije Rodrigues i sur. (2017) mjerene metodom DPPH• u vrijednosti od 56,7 % dobivene iz uzorka džema od jagode su u skladu s dobivenim rezultatima u ovom radu, iako su kod određivanja metode DPPH• koristili metanol kao otapalo. S obzirom na postotak redukcije dobivene korištenjem FRAP metode ( $93.747 \pm 0.50$  %), ekstrakt kaše jagode pokazuje visoki antioksidacijski kapacitet, i u skladu je s vrijednostima dobivenih u istraživanju Klopotek i sur. (2005), gdje je postotak redukcije izmjeren u uzorcima kaše jagode  $91.7 \pm 4.9$  %. Jagode karakterizira visok udio različitih bioaktivnih spojeva sa značajnim antioksidacijskim potencijalom koji je usko povezan s trenutno dostupnim učinkovitim hvatačima kisikovih radikala (Pukalskiene i sur., 2021).

## **5.2 KARAKTERIZACIJA KAŠE JAGODE NAKON *IN VITRO* PROBAVE**

Prema dobivenim rezultatima provedene *in vitro* probave vodenog ekstrakta kaše jagode, sadržaj ukupnih fenola se povećava u fazi želuca i tankog crijeva u odnosu na inicijalni uzorak i fazu usta za približno 30 %. Promjena ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta jagode tijekom različitih faza *in vitro* probave prikazana je na slici 10. (10A, 10B i 10C), gdje je vidljiv statistički značajan porast u koncentraciji ukupnih fenola u uzorku faze probave u želucu. Rezultati ovog istraživanja su u skladu s radom Ariza i sur. (2017) gdje je također najveća koncentracija ukupnih fenola zabilježena u želučanoj fazi *in vitro* probave, što je objašnjeno fiziološkim uvjetima u želucu koji pogoduju oslobađaju fenolnih spojeva iz matriksa namirnice. Ti uvjeti uključuju pH želuca (1-3), peristaltiku, temperaturu, prisutnost probavnih enzima, sadržaj, strukturu i viskozitet bolusa (Sensoy 2021). Svi procesi uključeni u probavu ovise o sastavu i strukturi hrane, karakteristikama osobe koja konzumira te vremenu konzumacije kao i vrsti hrane koja je konzumirana prethodno (McClements i Li, 2010). Antioksidacijska aktivnost prehrambenih polifenola *in vivo* je u zavisnosti o njihovoj dostupnosti i apsorpciji u probavnom traktu (Forbes-Hernandez, 2021). Biodostupnost se definira kao količina unesene hranjive tvari koja je dostupna za apsorpciju u crijevima nakon probave (Colle i sur., 2010).

Prema rezultatima mjerenja antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta kaše jagode metodom DPPH• nije vidljiva promjena postotka inhibicije kroz faze probave (slika 10B), dok se postotak redukcije izmjeren FRAP metodom statistički značajno povećao u fazi tankog crijeva (u odnosu na inicijalnu fazu, fazu usta i fazu želuca,  $p \leq 0.05$ , slika 10C). Promjena udjela ukupnih fenola i postotak redukcije (FRAP) kod ekstrakta kaše jagode pozitivno koreliraju (umjerenakorelacija,  $p \leq 0.001$ ; tablica 3). Prema tome, može se zaključiti da povećanje ukupnih fenola u tankom crijevu ima utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta jagode izmjeren FRAP metodom. Statistički značajno veći udio ukupnih fenolnih spojeva u fazi želuca i tankog crijeva predstavlja i potencijalno veću biodostupnost fenolnih spojeva iz inicijalnog uzorka jagode. Rezultati nisu u skladu s istraživanjem Forbes-Hernandez i sur. (2021) gdje je zabilježen suprotan učinak, u uzorcima svježe jagode nakon probave u želučanoj i intestinalnoj fazi došlo je do značajnog pada u antioksidacijskoj aktivnosti (55.3% smanjenja aktivnosti kod FRAP metode i 53.8% smanjenja aktivnosti kod DPPH metode).



**Slika 10.** Prikaz promjene masenih udjela koncentracije ukupnih fenola (A) i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta jagode (% inhibicije, metoda DPPH• (B) % redukcije, metoda FRAP (C) tijekom faza *in vitro* probave. I - inicijalna faza, U - usta, Ž - želudac, TC - tanko crijevo, GAE - ekvivalent galne kiseline. Statistički značajna razlika u odnosu na: I - a, U - b, Ž - c i TC - d (*one-way* ANOVA, *post-hoc* Tukeyev HSD;  $p \leq 0.05$ )

**Tablica 3.** Pearsonov koeficijent korelacije (r) izračunat temeljem rezultata promjene masenih udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti u uzorku kaše jagode

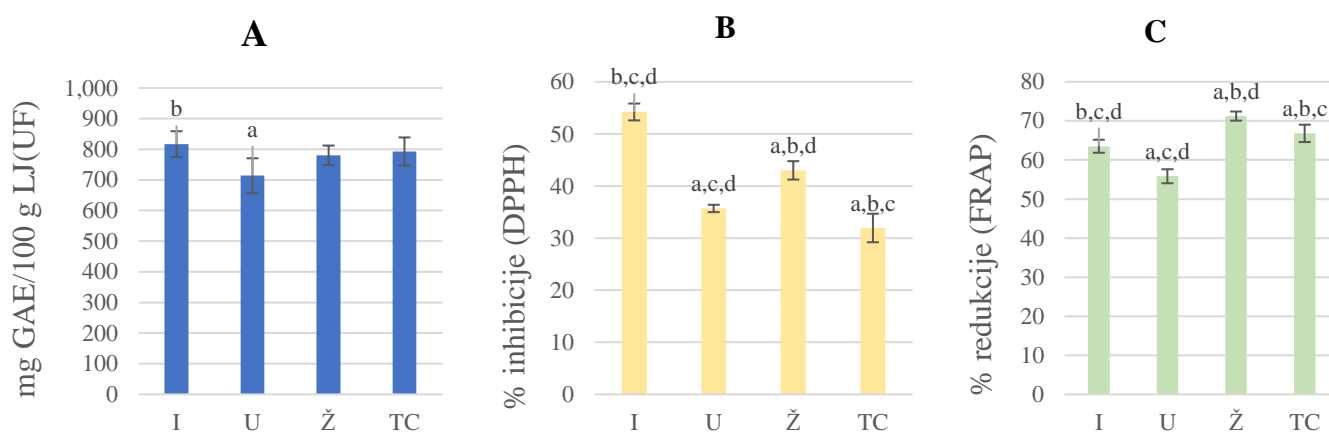
Pearsonov koeficijent korelacije (r)			
Varijabla	% inhibicije (DPPH•)	% redukcije (FRAP)	mg GAE/100g LJ (UF)
% inhibicije (DPPH•)	-		
% redukcije (FRAP)	0.218	-	
mg GAE/100g LJ (UF)	0.113	0.562***	-
*p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001			

DPPH• - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, FRAP (engl. *Ferric reducing antioxidant power*) GAE – ekvivalent galne kiseline, UF – ukupni fenoli, LJ – liofilizirana jagoda

### 5.3 KARAKTERIZACIJA 3D ISPISANOG PROIZVODA OD JAGODE S KUKURUZNIM ŠKROBOM NAKON *IN VITRO* PROBAVE

Sadržaj ukupnih fenola u 3D ispisanom proizvodu od jagode s kukuruznim nosačem nakon provedene *in vitro* probave je najveći u inicijalnoj fazi ( $816.70 \pm 42.20$  mg GAE/100 g liofilizirane jagode, slika 11A), iako se statistički značajno razlikuje samo od faze probave u ustima ( $714.14 \pm 56.35$  mg GAE/100 g liofilizirane jagode, slika 11A). Rezultati antioksidacijske aktivnosti mjereni DPPH• metodom pokazuju fluktuaciju u postotku inhibicije, gdje kod inicijalne faze i želučane faze dolazi do porasta ( $54.22 \pm 1.61$ ,  $43.01 \pm 1.76$ , % inhibicije, slika 11B), dok kod faze probave u ustima i tankom crijevu dolazi do pada aktivnosti ( $35.69 \pm 0.71$ ,  $31.95 \pm 2.73$  % inhibicije, slika 11B). Kod FRAP metode prisutan je sličan trend u oscilaciji postotka inhibicije antioksidacijske aktivnosti (slika 11C). U primjeni metoda DPPH• i FRAP, uočena je smanjena antioksidacijska aktivnost u fazama gdje su aktivni enzimi koji kataliziraju probavu škroba. Polifenolni spojevi sa slobodnim hidroksilnim grupama mogu stupati u interakcije s aktivnim mjestima na enzimima  $\alpha$ -amilazi, te također mogu stvarati komplekse putem hidrofobnih interakcija s amilazom (Ayua i sur., 2021), što potencijalno može utjecati na smanjenu dostupnost fenola za detekciju (Kan i sur., 2020). Inhibicijski učinci su u pozitivnoj su korelaciji sa sadržajem polifenola i uglavnom su

detektirani u tankom crijevu (Sun i Miao, 2019). Ove interakcije potencijalno mogu objasniti smanjenu antioksidacijsku aktivnost u uzorcima iz faza probave u ustima i tankom crijevu.



**Slika 11.** Prikaz promjene masenih udjela ukupnih fenola (A) i antioksidacijske aktivnosti 3D ispisanih proizvoda od jagode s kukuruznim škrobnim nosačem (% inhibicije, metoda DPPH• (B) % redukcije, metoda FRAP (C) ) tijekom faza *in vitro* probave. I - inicijalna faza, U - usta, Ž - želudac, TC - tanko crijevo, LJ – liofilizirana jagoda. Statistički značajna razlika u odnosu na: I - a, U - b, Ž - c i TC - d (*one-way* ANOVA, *post-hoc* Tukeyev HSD;  $p \leq 0.05$ ).

Prema rezultatima iz tablice 3, vidljiva je pozitivna umjerena korelacija između sadržaja ukupnih fenola i postotka redukcije izmjerena FRAP metodom ( $r = 0.449$ ,  $p \leq 0.001$ ). Sadržaj ukupnih fenola je u korelaciji i s rezultatima metode DPPH• (slaba korelacija,  $r = 0.351$ ,  $p \leq 0.014$ , tablica 4). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da sadržaj fenola u ekstraktu 3D ispisanih proizvoda od jagode s kukuruznim škrobnim nosačem ima utjecaja na antioksidacijski kapacitet.

**Tablica 4.** Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) izračunat temeljem rezultata promjene masenih udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti u uzorku 3D ispisanih proizvoda od jagode s kukuruznim škrobnim nosačem

Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ )			
Varijabla	% inhibicije (DPPH•)	% redukcije (FRAP)	mg GAE/100g LJ (UF)

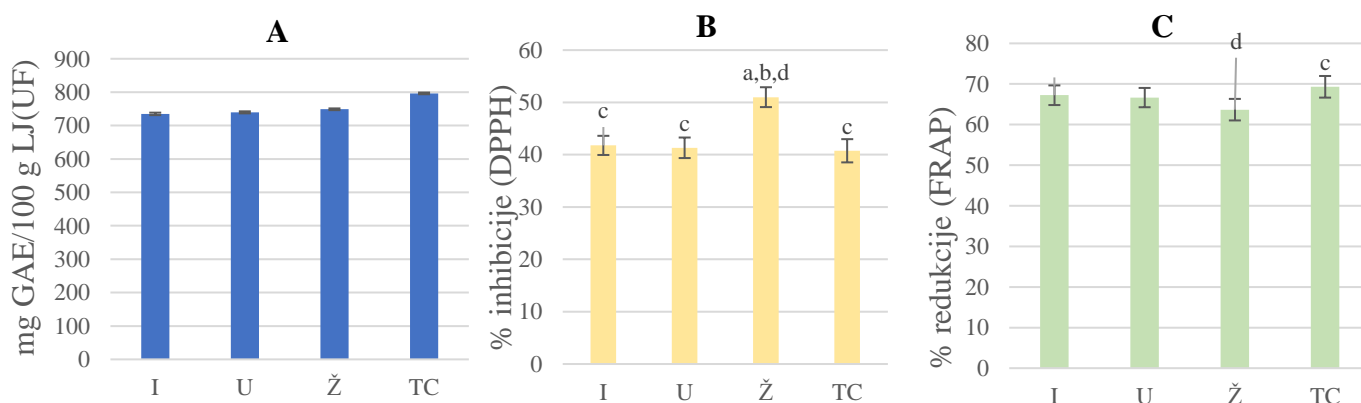
**Tablica 4.** Pearsonov koeficijent korelacije (r) izračunat temeljem rezultata promjene masenih udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti u uzorku 3D ispisanih proizvoda od jagode s kukuruznim škrobnim nosačem – *nastavak*

% inhibicije (DPPH•)	-		
% redukcije (FRAP)	0.024	-	
mg GAE/100g LJ (UF)	0.351	0.449***	-
*p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001			

DPPH• - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, FRAP (engl. Ferric reducing antioxidant power), UF – ukupni fenoli, GAE – ekvivalent galne kiseline, LJ – liofilizirana jagoda.

## 5.1 KARAKTERIZACIJA 3D ISPISANOG PROIZVODA OD JAGODE S PŠENIČNIM ŠKROBOM NAKON *IN VITRO* PROBAVE

Sadržaj ukupnih fenola u 3D ispisanom uzorku od jagode s pšeničnim nosačem se statistički značajno ne mijenja tijekom faza *in vitro* probave. Razlika između najvećeg masenog udjela (faza tankog crijeva) i najnižeg (inicijalna faza) je približno 61 mg GAE/100g liofilizirane jagode (slika 12A), što se nije pokazalo kao statistički značajna razlika. Kod DPPH• metode, izmjeren postotak inhibicije je najviši u fazi probave u želucu, te se statistički značajno razlikuje od tri preostale faze (razlika u odnosu na druge faze iznosi  $9.67 \pm 0.67$  % inhibicije, slika 12B).



**Slika 12.** Prikaz promjene masenih udjela ukupnih fenola (A) i antioksidacijske aktivnosti 3D ispisanog proizvoda od jagode s pšeničnim škrobnim nosačem (% inhibicije, metoda DPPH• (B),

**Slika 12.** *nastavak* - % redukcije, metoda FRAP (C)) tijekom faza *in vitro* probave. I-inicijalna faza, U - usta, Ž - želudac, TC - tanko crijevo, LJ – liofilizirana jagoda. Statistički značajna razlika u odnosu na: I - a, U - b, Ž - c i TC - d (*one-way* ANOVA, *post-hoc* Tukeyev HSD;  $p \leq 0.05$ )

Postotak redukcije 3D ispisanog uzorka od jagode s pšeničnim škrobnim nosačem mjerene metodom FRAP u inicijalnoj fazi i fazi probave u ustima ostaje nepromijenjen, dok u fazi probave želuca opada. Statistički je značajna razlika u uzorcima probave u želucu i tankom crijevu u odnosu na inicijalnu fazu, gdje je aktivnost u tankom crijevu veća za približno 10 % (slika 12C).

Rezultati DPPH• i FRAP metoda u uzorku 3D ispisanog proizvoda od jagode s pšeničnim škrobnim nosačem izraženi kao postotak inhibicije i postotak redukcije koreliraju negativno (jaka korelacija,  $r = -0.639$ ,  $p \leq 0.01$ , tablica 5). Dobivenoj negativnoj korelaciji potencijalno pridonosi sadržaj ukupnih fenola koji se nije značajno mijenjao kroz faze probave. Također, u tablici 4 prikazana je slaba pozitivna korelacija između postotka redukcije i sadržaj ukupnih fenola prethodno spomenutog uzorka ( $r = 0.352$ ,  $p = 0.014$ ). S obzirom na malu promjenu u sadržaju ukupnih fenola i samim time manju razliku u antioksidacijskoj aktivnosti u odnosu na uzorak 3D ispisanog proizvoda od jagode s kukuruznim škrobnim nosačem, spojevi potencijalno manje međudjeluju s pšeničnim škrobom i probavnim enzimima tijekom *in vitro* probave. Kompleksi koji nastaju interakcijom pšeničnog škroba i fenolnih spojeva su manje kompaktni, nego kompleksi između polifenola i kukuruznog škroba, pa dolazi do većeg oslobađanje polifenola iz matriksa namirnice u uzorcima s dodatkom pšeničnog škroba (Kan i sur., 2020).

**Tablica 5.** Pearsonov koeficijent korelacije (r) izračunat temeljem rezultata promjene masenih udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti u uzorku 3D ispisanih proizvoda od jagode s pšeničnim škrobnim nosačem

Pearsonov koeficijent korelacije (r)			
Varijabla	% inhibicije (DPPH•)	% redukcije (FRAP)	mg GAE/100g LJ (UF)
% inhibicije (DPPH•)	-		
% redukcije (FRAP)	-0.639***	-	
mg GAE/100g LJ (UF)	-0.197	0.352*	-
*p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001			

DPPH• - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, FRAP (engl. Ferric reducing antioxidant power), Uf – ukupni fenoli, GAE – ekvivalent galne kiseline, LJ – liofilizirana jagoda.

Zaključno, u ovom radu pokazano je da škrob kao nosač smanjuje biodostupnost fenolnih spojeva iz 3D ispisanih proizvoda. Pri tome, nije vidljiva razlika u vrsti primijenjenog škroba. Interakcije škroba s lipidima, proteinima i drugim glavnim komponentama hrane tijekom obrade hrane su neizbježne. Škrobno-lipidni kompleksi intenzivno se proučavaju više od pet desetljeća, međutim, kompleksi škroba i polifenola relativno su manje proučavani i predmet su novijeg interesa. Ljudski organizam ima specifične enzime amilaze i amiloglukozidaze, koji su odgovorni za razgradnju škroba u glukozu. Međutim, neke vrste škrobova, poznate kao rezistentni škrob, uspijevaju se oduprijeti probavi i proći kroz želudac i tanko crijevo, dospjevši u debelo crijevo, gdje podliježu fermentaciji pomoću specijaliziranih mikroorganizama (DeMartino i sur., 2020). U debelom crijevu rezistentni škrob prolazi kroz fermentaciju crijevnom mikrobiotom, što dovodi do proizvodnje kratkolančanih masnih kiselina (engl. *short-chain fatty acids*, SCFA), uključujući acetat, propionat i vrlo korisni butirrat. Butirrat ima ključnu ulogu u promicanju zdravlja crijeva smanjujući upalu, smanjujući rizik od raka debelog crijeva i poboljšavajući funkciju crijevne barijere (Leibovitzh i sur., 2022). No, ključno je razumjeti svojstva škroba, kako stupa u interakciju s drugim spojevima hrane i kako se ponaša tijekom obrade i skladištenja ako ga želimo koristiti u prehrambenim proizvodima i uvoditi inovativne nove proizvode. Uvođenjem škroba u prehrambene proizvode dolazi do samosklapanja škroba s kompaktnim i uređenim molekularnim strukturama koje rezultiraju ograničenjem enzimatske razgradnje i usporavaju probavu (Gutiérrez



i Tovar, 2021). U biljnoj hrani bogatoj fenolnim spojevima dodatak škroba dovodi do stvaranja njihovih interakcija što ne samo da povećava sadržaj rezistentnog škroba već i mijenja fizikalno kemijska svojstva i probavljivost hrane, a samim time i biodostupnost fenola (Raza i sur., 2023). Otkriveno je da fenolne hidroksilne skupine na fenolnim spojevima mogu tvoriti hidrofobne interakcije, vodikove veze, te elektrostatske interakcije s molekulama škroba. Također, pokazano je da interakcije između fenola i škroba ovise o strukturi fenola i vrsti škroba (Igoumenidis i sur., 2018). No, sveobuhvatne informacije o međudjelovanjima škroba i polifenola su još uvijek nedovoljno istražene.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U uzorku kaše jagode vidljivo je povećanje sadržaja ukupnih fenola tijekom *in vitro* probave, dok kod 3D ispisanih proizvoda od jagode uz dodatak škrobnih nosača isti efekt nije prisutan čime je pokazano da dodatak škroba smanjuje biodostupnost fenolnih spojeva u 3D ispisanim proizvodima od jagode.
2. Vrsta dodanog škrobnog nosača (kukuruzni vs. pšenični) u 3D ispisu funkcionalnih proizvoda na bazi jagode ne utječe značajno na biodostupnost polifenolnih spojeva, kao ni antioksidacijski kapacitet u 3D ispisanim proizvodima.
3. U sva tri ispitivana uzorka, kaši jagode kao i 3D ispisanim proizvodima na bazi jagode uz dodatak kukuruznog i pšeničnog škrobnog nosača, sadržaj ukupnih fenola pozitivno utječe na antioksidacijski kapacitet uzorka.
4. 3D ispisani proizvodi na bazi jagode pokazuju visok sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet i time ukazuju na širi potencijal primjene tehnologije 3D ispisa u razvoju inovativnih proizvoda u kategoriji funkcionalne hrane.

## 7. LITERATURA

Aaby K, Mazur S, Nes A, Skrede G (2012) Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* x Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chem* **132**, 86-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.037>

Afrin S, Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Reboredo-Rodriguez P, Mezzetti B, Varela-López A, Giampieri F (2016) Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *J Agric Food Chem* **64**, 4435-4449. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00857>

Ariza M, Forbes T, Giampieri F, Gasparrini M, Soria C, Martinez-Ferri E i sur. (2017) Effects of in vitro gastrointestinal digestion on strawberry polyphenols stability. *Acta Horti* **10**, 389-396. <https://doi.org/10.17660/ActaHort.2017.1156.126>

Ayua EO, Nkhata SG, Namaumbo SJ, Kamau EH, Ngoma TN, Aduol KO (2021) Polyphenolic inhibition of enterocytic starch digestion enzymes and glucose transporters for managing type 2 diabetes may be reduced in food systems. *Heliyon* **7**, e06245. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06245>

Azam, S M R, Zhang M, Mujumdar A S, Yang C (2018) Study on 3D printing of orange concentrate and material characteristics. *J Food Process Eng* **41**, e12689. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12689>

Basu A, Nguyen A, Betts NM, Lyons TJ (2014) Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **54**, 790-806. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.608174>

Baiano Antonietta (2022) 3D Printed Foods: A Comprehensive Review on Technologies, Nutritional Value, Safety, Consumer Attitude, Regulatory Framework, and Economic and Sustainability Issues. *Food Rev Int* **38**, 986-1016, <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1762091>

Bebek Markovinović A, Brdar, D, Putnik P, Bosiljkov T, Durgo K, Huđek Turković A i sur. (2024) Strawberry tree fruits (*Arbutus unedo* L.): Bioactive composition, cellular antioxidant activity, and 3D printing of functional foods. *Food Chem* **433**, 137287. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137287>

Bebek Markovinović A, Putnik P, Duralija B, Krivohlavek A, Ivešić M, Mandić Andačić (2022) Chemometric valorization of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. 'Albion' for the production of functional juice: the impact of physicochemical, toxicological, sensory, and bioactive value. *Foods* **11**, 640. <https://doi.org/10.3390/foods11050640>

Bohn T (2014) Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews* **72**, 429–452. <https://doi.org/10.1111/nure.12114>

Bohn T, Carriere F, Day L, Deglaire A, Egger L, Freitas D, i sur. (2018) Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Crit Rev Food Sci Nutr* **58**, 2239-2261. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1315362>

Bursać Kovačević D, Brdar D, Fabečić P, Barba FJ, Lorenzo JM, Putnik P. (2020) Strategies to achieve a healthy and balanced diet: fruits and vegetables as a natural source of bioactive compounds. U: *Agri-food industry strategies for healthy diets and sustainability*. Edition 1st, Izdavač: Academic Press, Urednici: Barba, F.J., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., str. 51-88. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817226-1.00002-3>

Bursać Kovačević D, Putnik P, Dragović-Uzelac V, Vahčić N, Skendrović Babojelić M, Levaj B (2015) Influences of organically and conventionally grown strawberry cultivars on anthocyanins content and color in purees and low-sugar jams. *Food Chem* **181**, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.063>

Carreira-Casais A, Otero P, Garcia-Perez P, Garcia-Oliveira P, Pereira AG, Carpena M i sur. (2021) Benefits and drawbacks of ultrasound-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from marine algae. *Int J Environ Res Public Health* **18**, 9153. <https://doi.org/10.3390/ijerph18179153>

Chaovanalikit A, Wrolstad RE (2008) Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *J Food Sci* **69**, 67–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17858.x>

Cheplick S, Kwon YI, Bhowmik P, Shetty K (2010) Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension. *Biores Technol* **101**, 404–13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.068>

Colle I, Lemmens L, Van Buggenhout S, Van Loey A, Hendrickx M (2010) Effect of thermal processing on the degradation, isomerization, and bioaccessibility of lycopene in tomato pulp. *J food Sci* **75**, 753-759. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01862.x>

Cosme F, Pinto T, Aires A, Morais MC, Bacelar E, Anjos R i sur. (2022) Red fruits composition and their health benefits a review. *Foods* **11**, 644. <https://doi.org/10.3390/foods11050644>

Dai H, Leung C, Corradini M, Xiao H, Kinchla A (2020) Increasing the nutritional value of strawberry puree by adding xylo-oligosaccharides, *Heliyon*, **6**, e03769. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e0376>

DeMartino P, Cockburn DW (2020) Resistant starch: impact on the gut microbiome and health. *Curr Opin Biotechnol* **61**, 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.10.008>

Dankar I, Haddarah A, E L F Omar, Sepulcre F, Pujolà F (2018) 3D printing technology: The new era for food customization and elaboration. *Trends Food Sci Technol* **75**, 231-242. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.018>

Dupont D, Alric M, Blanquet-Diot S, Bornhorst G, Cueva C, Deglaire A i sur. (2019) Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**, 1546-1562. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421900>

Direktiva vijeća Europske unije (1990) 90/496/EEZ, Službeni list Europske unije

De Pascual-Teresa, S Hallund, J Talbot, D Schroot, J Williams, CM Bugel, S Cassidy A (2006) Absorption of isoflavones in humans: Effects of food matrix and processing. *J Nutr Biochem* **17**, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.04.008>

Eswaran S, Chey WD, Jackson K, Pillai S, Chey SW, Han-Markey T (2017) A diet low in fermentable oligo-, di-, and monosaccharides and polyols improves quality of life and reduces activity impairment in patients with irritable bowel syndrome and diarrhea. *Clin Gastroenterol Hepatol* **15**, 1890-1899.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.044>

Evans JD (1996) Straightforward statistics for the behavioral sciences. Thomson Brooks/Cole Publishing Co.

FAO & WHO. 2014. Conference outcome document: Rome declaration on nutrition. Second International Conference on Nutrition. FAO and WHO, Rome.

Ferreira O, Pinho S (2012) Solubility of Flavonoids in Pure Solvents. *Ind Eng Chem Res* **51**, 6586–6590. <https://doi.org/10.1021/ie300211e>

Forbes-Hernandez T Y, Gasparrini M, Afrin S i sur. (2016) The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity? *Crit Rev Food Sci Nutr* **56** Suppl 1:S46-S59. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1051919>

Forbes T, Gasparrini M, Afrin S, Battino M, Giampieri F (2017). The effect of an enzymatic digestion process on strawberry antioxidant capacity. *Acta Horticult* **62**, 413-418. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1156.61>

Gayoso L, Claerbout AS, Calvo M I, Cavero R Y, Astiasarán I, Ansorena D (2016) Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the *in vitro* gastrointestinal digestion models. *J. Func. Foods* **6**, 428–438. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.003>

Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez MS, Quiles LJ, Mezzetti B, Battino M (2012) The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* **28**, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>

Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F, Tomás-Barberán FA (2001) *In vitro* availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J Agric Food Chem* **49**, 1035–1041. <https://doi.org/10.1021/jf0000528>

Giusti MM, Wrolstad RE (2001) Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy, Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, 1.2.1 – 1.2.13.

Gutiérrez TJ, Tovar J (2021) Update of the concept of type 5 resistant starch (RS5): Self-assembled starch V-type complexes. *Trends Food Sci Technol* **109**, 711–724. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.078>

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 17. 11. 2023. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=50504>>.

Hu H, Guo J, Huang Z, Huang Q, Lu X (2023) Effect of different hydrocolloids on the physicochemical, printing, and digestion properties of 3D printed purple sweet potato. *Food*

*Hydrocoll* **144**, 109058. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109058>

Igoumenidis PE, Zoumpoulakis P, Karathanos VT (2018) Physicochemical interactions between rice starch and caffeic acid during boiling. *Food Res Int* **109**, 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.062>

Kan L, Oliviero T, Verkerk R, Fogliano V, Capuano E (2020) Interaction of bread and berry polyphenols affects starch digestibility and polyphenols bio-accessibility. *J Funct Foods* **68**, 103924. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103924>

Kewuyemi OY, Kesa H, Adebo OA (2022) Trends in functional food development with three-dimensional (3D) food printing technology: prospects for value-added traditionally processed food products. *Crit Rev Food Sci Nutr* **62**, 7866-7904. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1920569>

Klopotek Y, Otto K, Böhm V (2005) Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* **53**, 5640–5646. <https://doi.org/10.1021/jf047947v>

Kong, F, Singh R P (2010) A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach. *J Food Sci* **75**, 627–635. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01856.x>

Lachman J, Hosnedl V, Pivec V, Orsák M (1998) Polyphenols in cereals and their positive and negative role in human and animal nutrition. Proceedings of Conference Cereals for Human Health and Preventive Nutrition. 118-125.

Leibovitz H, Lee SH, Xue M, Garay JAR, Hernandez-Rocha C, Madsen KL i sur. (2022) Altered gut microbiome composition and function are associated with gut barrier dysfunction in healthy relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **163**, 1364–1376. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.07.004>

Levaj B, Bursać Kovačević D, Bituh M, Dragović-Uzelac V (2012) Influence of jam processing upon the contents of phenolics and antioxidant capacity in strawberry fruit (*Fragaria ananassa* × Duch.). *Croat. J Food Sci Technol Biotechnol Nutr* **7**, 18-22.

Lijun S, Ming M (2019) Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **60**, 541-555. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1544883>

Liović N (2019) Utjecaj metoda obrade na biološku aktivnost i in vitro gastrointestinalnu stabilnost fenola iz kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.), Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet

Lopes da Silva F, Escribano-Bailon MT, Perez Alonso JJ, Rivas-Gonzalo J, Santos-Buelga C (2007) Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT Food Sci Technol* **40**, 374–82. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>

Mahmood T, Anwar F, Abbas M, Saari N (2012) Effect of maturity on phenolics (phenolic acids and flavonoids) profile of strawberry cultivars and mulberry species from Pakistan. *Int J Mol Sci* **13**, 4591–4607. <https://doi.org/10.3390/ijms13044591>

Marcano J, Hernando I, Fiszman, S (2015) *In vitro* measurements of intragastric

rheological properties and their relationships with the potential satiating capacity of cheese pies with konjac glucomannan. *Food Hydrocoll* **51**, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.028>

Manzano S, Williamson G (2010) Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 1773–1780. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000019>

Markovinović BA, Putnik P, Duralija B, Krivohlavek A, Ivešić M, Mandić Andačić I i sur. (2022) Chemometric valorization of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. 'Albion' for the production of functional juice: the impact of physicochemical, toxicological, sensory, and bioactive value. *Foods* **11**, 640. <https://doi.org/10.3390/foods11050640>

Martinsen BK, Aaby K, Skrede G (2020) Effect of temperature on stability of anthocyanins, ascorbic acid and color in strawberry and raspberry jams. *Food Chem* **316**, 126297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126297>

McClements DJ, Li Y (2010) Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food and funct* **1**, 32–59. <https://doi.org/10.1039/c0fo00111b>

Milić A, Daničić T, Tepić Horecki A, Šumić Z, Bursać Kovačević D, Putnik P i sur. (2021) Maximizing contents of phytochemicals obtained from dried sour cherries by ultrasound-assisted extraction. *Separations* **8**, 155. <https://doi.org/10.3390/separations8090155>

Mohammadinejad A, Mohajeri T, Aleyghoob G, Heidarian F, Kazemi Oskuee R (2022) Ellagic acid as a potent anticancer drug: A comprehensive review on *in vitro*, *in vivo*, in silico, and drug delivery studies. *Biotechnol Appl Biochem* **69**, 2323-2356. <https://doi.org/10.1002/bab.2288>

Nani A, Murtaza B, Sayed Khan A, Khan NA, Hichami A (2021) Antioxidant and anti-inflammatory potential of polyphenols contained in Mediterranean diet in obesity: molecular mechanisms. *Molecules* **26**, 985. <https://doi.org/10.3390/molecules26040985>

Nour V, Trandafir I, Cosmulescu S. (2017) Antioxidant compounds, nutritional quality and colour of two strawberry genotypes from *Fragaria × ananassa*. *Erwerbs-Obstbau* **59**. <https://doi.org/10.1007/s10341-016-0307-5>

Oancea S (2021) A review of the current knowledge of thermal stability of anthocyanins and approaches to their stabilization to heat. *Antioxidants* **10**, 1337. <https://doi.org/10.3390/antiox10091337>

Oliveira A, Pintado M (2015) Stability of polyphenols and carotenoids in strawberry and peach yoghurt throughout *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Funct* **6**, 1611-1619. <https://doi.org/10.1039/c5fo00198f>

Peng M, Gao Z, Liao Y, Guo J, Shan Y (2022) Development of functional kiwifruit jelly with chenpi (FKj) by 3D food printing technology and its anti-obesity and antioxidant potentials. *Foods* 2022 **11**, 1894. <https://doi.org/10.3390/foods11131894>

Pitayachaval P, Sanklong N, Thongrak A (2018) A Review of 3D Food Printing Technology, MATEC Web of Conferences. 213. 01012.

Pukalskiene M, Pukalskas A, Dienaite L, Revinyte S, Pereira CV, Matias AA, Venskutonis PR (2021) Recovery of bioactive compounds from strawberry (*Fragaria × ananassa*) pomace by conventional and pressurized liquid extraction and assessment their bioactivity in human cell cultures. *Foods* **10**, 1780. <https://doi.org/10.3390/foods10081780>

Proteggente, AR, Pannala, A S, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S (2002) The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin c composition. *Free Radic. Res.* **36**, 217–233. <https://doi.org/10.1080/10715760290006484>

Quideau S (2009) Chemistry and biology of ellagitannins: an underestimated class of bioactive plant polyphenols. World Scientific, Singapore

Raj R, Cosgun A, Kulić D (2022) Strawberry water content estimation and ripeness classification using hyperspectral sensing. *Agronomy* **12**, 425. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020425>

Raza H, Xu H, Zhou Q, He J, Zhu B, Li S i sur. (2023) A review of green methods used in starch-polyphenol interactions: physicochemical and digestion aspects. *Food and funct.* 8071–8100. <https://doi.org/10.1039/d3fo01729j>

Rodrigues LM, Silva ES, Oliveira TO, Lima JP (2017) Physical and chemical characterization and quantification of bioactive compounds in berries and berry jams. *Semina Cienc Agrar* **38**, 1853-1864. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4p1853>

Rodríguez-Roque MJ, de Ancos B, Sánchez-Moreno C, Cano MP, Elez-Martínez P, Martín-Belloso O (2015) Impact of food matrix and processing on the *in vitro* bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *J Funct Foods* **14**, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.020>

Rudrapal M, Khairnar SJ, Khan J, Dukhyil AB, Ansari MA, Alomary MN i sur. (2022) Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism(s) of action. *Front Pharmacol* **13**, 806470. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>

Saladin KS (2017) Human Anatomy. 5. Izdanje. McGraw-Hill Education; New York

Salles C, Chagnon MC, Feron G i sur. (2011) In-mouth mechanisms leading to flavor release and perception. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **51**, 67-90. <https://doi.org/10.1080/10408390903044693>

Santos-Buelga C, Scalbert (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric* **80**, 1094–117. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1)

Scalbert, A, Morand C, Manach C, Remesy C (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* **56**, 276–282. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00205-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00205-6)

Sensoy I (2021) A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Curr Res Food Sci* **4**, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>



- Sesso HD, Gaziano JM, Jenkins DJ, Buring JE (2007) Strawberry intake, lipids, C-reactive protein, and the risk of cardiovascular disease in women. *J Am Coll Nutr* **26**, 303–10. <https://doi.org/10.1080/07315724.2007.10719615>
- Severini C, Derossi A, Ricci I, Caporizzi R, Fiore A (2018) Printing a blend of fruit and vegetables. New advances on critical variables and shelf life of 3D edible objects. *J Food Eng* **220**, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.025>
- Shim SM, Choi MH, Park SH, Gu YU, Oh JM, Kim S, i sur. (2010) Assessing the digestibility of genetically modified soybean: Physiologically based in vitro digestion and fermentation model. *Food Res Int* **43**, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.08.011>
- Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J (2015) Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int J Mol Sci.* **16**, 24673-24706. <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- Šola I, Vujčić Bok V, Dujmović M, Rusak G (2020) Developmentally-related changes in phenolic and L-ascorbic acid content and antioxidant capacity of Chinese cabbage sprouts. *J Food Sci Technol* **57**, 702–712. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04103-y>
- Stein A, Rodriguez Cerezo E i urednici (2008) Functional food in the european union. EUR 23380 EN. Europska Komisija JRC43851
- U.S Department of Agriculture, Agricultural Research Service pristupljeno 25.11.2023 <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2263887/nutrients>
- Taghavi T, Patel H, Akande OE, Galam DCA (2022) Total anthocyanin content of strawberry and the profile changes by extraction methods and sample processing. *Foods* **11**, 1072. <https://doi.org/10.3390/foods11081072>
- Tarko T, Duda-Chodak A, Zajac N (2013) Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Rocz Panstw Zakl. Hig* **64**, 79–84.
- Tomšić A (2022) Bioraspoloživost inkapsuliranih ekstrakata koprive Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet.
- Torronen R, Sarkkinen E, Tapola N, Hautaniemi E, Kilpi K, Niskanen L (2010) Berries modify the postprandial plasma glucose response to sucrose in healthy subjects. *Br J Nutr* **103**, 1094–1097. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992868>
- Tulipani S, Mezzetti B, Battino M (2009) Impact of strawberries on human health: Insight into marginally discussed bioactive compounds for the Mediterranean diet. *Public Health Nutr* **12**, 1656-1662. <https://doi.org/10.1017/S1368980009990516>
- Verhoeckx K. Cotter P, López-Expósito I i sur. (2015) The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models (mrežna verzija). Poglavlje 5. Springer
- Wojtunik-Kulesza K, Oniszczyk A, Oniszczyk T, Combrzyński M, Nowakowska D, Matwijczuk A (2020) Influence of *in vitro* digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols-A non-systematic review. *Nutrients* **12**, 1401. <https://doi.org/10.3390/nu12051401>

Yang F, Zhang M, Bhandari B (2015) Recent development in 3D food printing. *Crit Rev Food Sci Nutr* **57**, 3145-3153. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1094732>

Zhao J, Yang J, Xie Y (2019) Improvement strategies for the oral bioavailability of poorly water-soluble flavonoids: An overview. *Int J Pharm* **570**, 118642. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118642>

Zhi-shen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* **64**, 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

Zhou Q, Nan X, Zhang S, Zhang L, Chen J, Li J, Wang H, Ruan Z (2023) Effect of 3d food printing processing on polyphenol system of loaded aronia melanocarpa and post-processing evaluation of 3D printing products. *Foods* **12**, 2068. <https://doi.org/10.3390/foods12102068>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Paula Kralj - Vrsalović izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis