

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Vanja Kelemen

**STABILNOST BIOAKTIVNIH DODATAKA HRANI NA BAZI
BILJNIH PROTEINA I POLIFENOLA SOKA VIŠNJE**

Doktorski rad

Osijek, 2025.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: kemija, prehrambena tehnologija

STABILNOST BIOAKTIVNIH DODATAKA HRANI NA BAZI BILJNIH PROTEINA I POLIFENOLA SOKA VIŠNJE

Vanja Kelemen

Doktorski rad je izrađen u: Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek

Mentor/i: Mentor: prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Kratki sažetak doktorskog rada:

Cilj ovog istraživanja bio je razviti stabilne bioaktivne dodatke hrani inkapsulacijom polifenola soka višnje na biljne proteine (graška, riže i badema) te ispitati njihovu stabilnost tijekom termičkog tretiranja i skladištenja. Na formuliranim kompleksima, određeni su ukupni polifenoli, proantocijanidini, antioksidacijska aktivnost, koncentracija pojedinačnih polifenola, parametri boje, te strukturne promjene na proteinima nakon adsorpcije polifenola višnje. Rezultati su pokazali da tip proteinskog matriksa značajno utječu na adsorpciju polifenola ali i na stabilnost polifenola tijekom termičkog tretiranja i skladištenja. Ujedno adsorpcija pojedinačnih polifenola na proteinske matrikse ovisi o kemijskoj strukturi polifenola. Rezultati istraživanja doprinose razumijevanju interakcija proteina i polifenola, te potvrđuju da ovakvi kompleksi mogu služiti kao stabilni dodatci za primjenu u razvoju funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

Broj stranica: 194

Broj slika: 35

Broj tablica: 29

Broj literaturnih navoda: 271

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biljni proteini, polifenoli soka višnje, liofilizacija, antioksidacijska aktivnost, termičko tretiranje, skladištenje

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science
Scientific Fields: chemistry, food technology

STABILITY OF BIOACTIVE FOOD ADDITIVES BASED ON PLANT PROTEINS AND POLYPHENOLS OF TART CHERRY JUICE

Vanja Kelemen

Thesis performed at: Faculty of Food Technology Osijek

Supervisor/s: Prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Short abstract:

The aim of this research was to develop stable bioactive food additives by encapsulating cherry juice polyphenols on plant proteins (pea, rice and almond) and to investigate their stability during thermal treatment and storage. On the formulated complexes, total polyphenols, proanthocyanidins, antioxidant activity, concentration of individual polyphenols, color parameters, and structural changes on proteins after adsorption of cherry polyphenols were determined. The results showed that the type of protein matrix significantly affects the adsorption of polyphenols but also the stability of polyphenols during thermal treatment and storage. At the same time, the adsorption of individual polyphenols on protein matrices depends on the chemical structure of the polyphenols. The research results contribute to the understanding of protein-polyphenol interactions, and confirm that such complexes can be used as stable additives for use in the development of functional food products

Number of pages: 194

Number of figures: 35

Number of tables: 29

Number of references: 271

Original in: Croatian

Key words: plant proteins, polyphenols sour cherry juice, freeze-drying, antioxidant activity, thermal treatment, storage

Date of the thesis defense:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Posebnu zahvalu upućujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Mireli Kopjar, na stručnom vodstvu, podršci te uloženom vremenu i trudu tijekom izrade ovoga doktorskog rada. Njezino znanje, poticaj i strpljenje bili su od neprocjenjive važnosti u svakome koraku ovoga istraživanja.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na ljubavi, razumijevanju i ohrabrenju. Njihova podrška dala mi je snagu da ustrajem i privedem ovaj put kraju.

Svima koji su na bilo koji način doprinijeli ostvarenju ovoga rada - hvala.

Doktorski rad posvećujem roditeljima.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Polifenoli.....	3
1.1.1. Definicija i karakteristike polifenola.....	3
1.1.2. Klasifikacija polifenola	3
1.1.2.1. Flavonoidi.....	4
1.1.2.2. Fenolne kiseline.....	8
1.1.2.3. Stilbeni.....	10
1.1.2.4. Lignani.....	10
1.1.3. Polifenoli višnje	11
1.2. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja polifenola.....	14
1.3. Stabilnost polifenola	16
1.3.1. Utjecaj pH vrijednosti	16
1.3.2. Utjecaj temperature	17
1.3.3. Utjecaj svjetlosti.....	17
1.3.4. Utjecaj prisutnosti kisika.....	17
1.3.5. Utjecaj iona metala.....	18
1.3.6. Interakcije s komponentama hrane.....	18
1.4. Inkapsulacija	19
1.4.1. Liofilizacija	21
1.4.2. Primjena biljnih proteina kao nosača u inkapsulaciji.....	23
1.4.3. Interakcije proteina i polifenola	24
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	31
3. MATERIJALI I METODE	32
3.1. Priprema kompleksa proteina i polifenola	33
3.2. Skladištenje kompleksa	34
3.3. Termičko tretiranje kompleksa	34
3.4. Ekstrakcija	36
3.5. Određivanje ukupnih polifenola	36
3.6. Određivanje proantocijanidina.....	36
3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	37
3.8. HPLC analiza pojedinačnih polifenola	37
3.9. FTIR-ATR spektroskopija	38

3.10. Analiza boje	39
3.11. Statistička analiza	39
4. REZULTATI	40
4.1. Stabilnost kompleksa tijekom skladištenja	43
4.1.1. Utjecaj skladištenja na polifenole i antioksidacijsku aktivnost	43
4.1.2. Parametri boje proteina i njihovih kompleksa tijekom skladištenja	60
4.2. Stabilnost kompleksa nakon termičkog tretiranja.....	62
4.2.1. Utjecaj temperature na polifenole i antioksidacijsku aktivnost	62
4.2.2. Parametri boje proteina i njihovih kompleksa nakon termičkog tretiranja	75
4.3. FTIR-ATR analiza	78
4.3.1. Promjene u strukturi biljnih proteina nakon kompleksiranja s polifenolima soka višnje.....	80
4.3.2. Promjene u strukturi kompleksa biljnih proteina s polifenolima soka višnje tijekom skladištenja.....	84
4.3.3. Promjene u strukturi biljnih proteina nakon termičkog tretiranja.....	88
4.3.4. Promjene u strukturi kompleksa biljnih proteina s polifenolima soka višnje nakon termičkog tretiranja	91
5. RASPRAVA.....	99
5.1. Ukupni polifenoli i proantocijanidini	100
5.2. Antioksidacijska aktivnost.....	109
5.3. Pojedinačni polifenoli tijekom skladištenja i termičkog tretiranja	120
5.4. Parametri boje kompleksa.....	135
5.5. FTIR-ATR analiza	142
6. ZAKLJUČCI.....	153
7. LITERATURA.....	157
8. SAŽETAK.....	183
9. SUMMARY	184
10. ŽIVOTOPIS	185

KRATICE

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), diammonijeva sol (eng. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)

ANOVA - analiza varijance (eng. analysis of variance)

CUPRAC - kapacitet redukcije bakrovih(II) iona (eng. cupric ion reducing antioxidant capacity)

DMAC - 4-(dimetilamino)cinamaldehyd (eng. 4-(dimethylamino)cinnamaldehyde)

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (eng. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

FRAP - antioksidacijska moć redukcije željeznih(III) iona (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay)

FTIR-ATR - infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom - prigušena totalna refleksija (eng. Fourier transform infrared spectroscopy - attenuated total reflectance)

HAT - prijenos atoma vodika (eng. hydrogen atom transfer)

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. high-performance liquid chromatography)

HPLC-DAD - HPLC s detekcijom diodnim nizom (eng. high-performance liquid chromatography with diode-array detection)

IR - infracrveno (eng. infrared)

RNS - reaktivne vrste dušika (eng. reactive nitrogen species)

ROS - reaktivne vrste kisika (eng. reactive oxygen species)

SET - prijenos jednog elektrona (eng. single electron transfer)

1. UVOD

Posljednjih godina, sve je izraženija potreba za razvojem inovativnih prehrambenih proizvoda s pozitivnim učinkom na zdravlje ljudi, poput antioksidacijskog, antidijabetičkog, antikancerogenog i protuupalnog djelovanja (Oancea i sur., 2017a). Potrošači pokazuju sve veći interes za funkcionalnu hranu, ali i funkcionalne dodatke. Preporuke nutricionista ističu važnost unosa dovoljne količine voća zbog sadržaja bioaktivnih komponenti, u koje se ubrajaju i polifenoli. Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti, prirodno prisutni u voću, povrću, žitaricama, začinskom bilju te sjemenkama (de Araújo i sur., 2021). Upravo iz njihove raznolike kemijske strukture proizlazi niz pozitivnih svojstava, poput antioksidacijskog, protuupalnog, antimikrobnog, antikancerogenog, kardioprotektivnog djelovanja (Velderrain-Rodriguez i sur., 2014; Dobson i sur., 2019). Kao bogat izvor polifenola, posebice antocijana (cijanidin-3-rutinozid, cijanidin-3-glukozil-rutinozid i cijanidin-3-glukozid), flavonola te fenolnih kiselina, ističe se višnja (*Prunus cerasus* L.) (Chaovanalikit i Wrolstad, 2004). Zbog polifenolnog sastava, višnja se sve više koristi za razvoj funkcionalnih dodataka hrani (Siddiq i sur., 2011), a radi visokog sadržaja antocijana, kao prirodno bojilo u prehrambenoj industriji (Tarone i sur., 2020). Unatoč mnogobrojnim pozitivnim svojstvima, polifenoli, pa tako i antocijani, osjetljivi su na vanjske čimbenike, poput temperature, svjetlosti, pH, prisutnost kisika te metalnih iona. Izlaganje polifenola spomenutim vanjskim čimbenicima rezultira njihovom degradacijom, gubitkom boje te redukcijom biološke aktivnosti tijekom obrade i skladištenja (Ballesteros i sur., 2017). Stoga se intenzivno razvijaju različite metode zaštite, s ciljem osiguravanja stabilnosti i učinkovitosti polifenola.

Jedna od vrlo važnih metoda je inkapsulacija - tehnika „zatvaranja“ jedne ili više aktivnih tvari (npr. bioaktivnih komponenti) unutar materijala ili smjese materijala (tzv. „nosača“) (Fang i Bhandari, 2010; Nedović i sur., 2011). Za inkapsulaciju polifenola, koriste se različiti nosači, poput polisaharida, lipida i proteina, ali i njihove kombinacije (Munin i Edwards-Levy, 2011). Posebno su zanimljivi proteini zbog njihove široke primjene u prehrambenoj industriji kao emulgatora te stabilizatora pjena i drugih koloidnih sustava, ali i sposobnosti stvaranja filmova (Liu i sur., 2019). Proteini iz biljnih izvora, odnosno njihova primjena u stvaranju različitih proteinskih matriksa za vezanje polifenola, predmet su sve većeg broja znanstvenih istraživanja (Roopchand i sur., 2012; Grace i sur., 2013; Kelemen i sur., 2022; Kopjar i sur., 2023). Struktura i svojstva proteinskog matriksa, ujedno i struktura te svojstva polifenola, imaju značajan utjecaj na vezanje polifenola na proteine tijekom formuliranja proteinskog kompleksa.

Cilj ovog istraživanja je istražiti mogućnost primjene proteinskih matrika graška, riže i badema, kao nosača polifenola soka višnje, u svrhu pripreme bioaktivnih dodataka hrani. Formuliranim bioaktivnim dodacima analizirat će se polifenoli, antioksidacijska aktivnost i parametri boje, te će se utvrditi njihova stabilnost tijekom skladištenja i termičkog tretiranja. Također će se odrediti strukturne promjene proteina nakon adsorpcije polifenola višnje, te promjene u strukturi tijekom skladištenja i termičkog tretiranja.

Ocjena rada u tijeku

1.1. POLIFENOLI

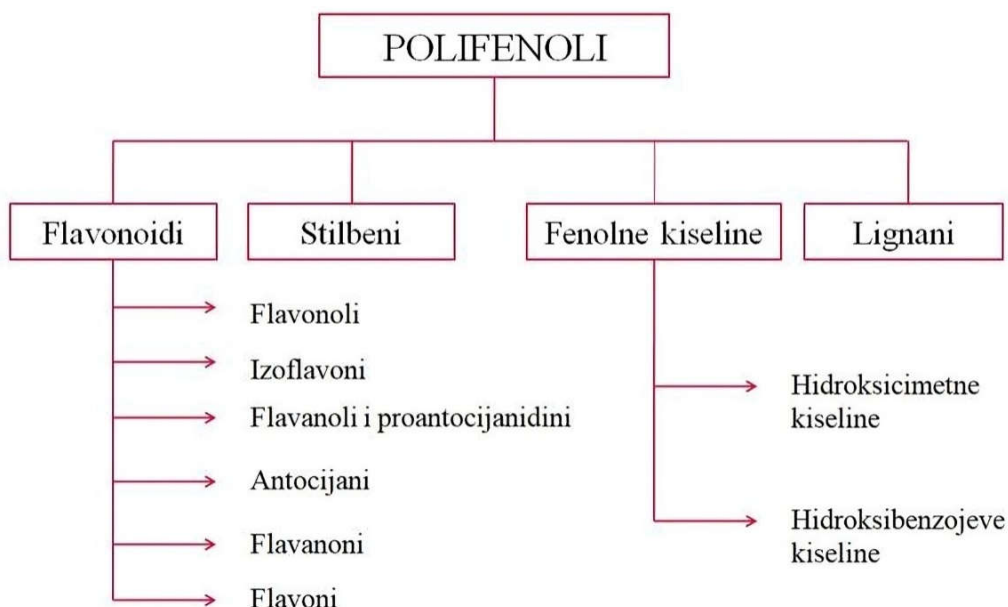
1.1.1. Definicija i karakteristike polifenola

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji se sintetiziraju kao odgovor na stresne uvjete, poput UV zračenja, napada patogena, oksidativnog stresa i mehaničkih oštećenja (Šamec i sur., 2021). Obzirom da sudjeluju u obrambenom mehanizmu biljaka, njihova sinteza je izraženija u nepovoljnim uvjetima, pružajući zaštitu od štetnih utjecaja uz istovremenu prilagodbu na različite okolišne uvjete (Tsao, 2010). Riječ je o velikoj te strukturno raznolikoj skupini prirodnih bioaktivnih spojeva prisutnih u voću, povrću, žitaricama, začinskom bilju te mahunarkama (Manach i sur., 2004). Njihova osnovna kemijska odlika je prisutnost jedne ili više fenolnih skupina, odnosno aromatskih prstena za koje je vezan određeni broj hidroksilnih skupina (Manach i sur., 2004). Nadalje, mogu biti u slobodnom obliku ili vezani za molekule, poput šećera, organskih kiselina, polisaharida ili proteina. Stoga ne čudi što polifenoli predstavljaju jednu od najvećih i najrasprostranjenijih skupina sekundarnih biljnih metabolita (Belščak-Cvitanović i sur., 2018).

Do sada je identificirano više od 8 000 različitih polifenolnih spojeva, a posljednjih nekoliko desetaka godina izazivaju sve veći interes znanstvene zajednice zbog svojih antioksidacijskih svojstava te uloge u prevenciji različitih bolesti (Tsao, 2010; Belščak-Cvitanović i sur., 2018; Rathod i sur., 2023). Intenzivno se istražuju njihova svojstva te mogućnosti primjene u prehrambenoj industriji. Primjerice, koriste se kao prirodni konzervansi za produljenje roka trajanja proizvoda i smanjenje upotrebe sintetskih aditiva (Oancea i sur., 2017a).

1.1.2. Klasifikacija polifenola

Polifenoli se najčešće klasificiraju prema kemijskoj strukturi, s posebnim naglaskom na broj fenolnih prstena te strukturne elemente koji ih međusobno povezuju. Prema navedenoj klasifikaciji, polifenoli se dijele u četiri temeljne skupine: flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni i lignani (Slika 1.) (Manach i sur., 2004; Tsao, 2010; Vermerris i Nicholson, 2006; Oliver i sur., 2016; Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Izuzev navedenih kategorija, kao peta podskupina polifenola, navode se tanini (Han i sur., 2007).



Slika 1. Podjela polifenola prema kemijskoj strukturi (Oliver i sur., 2016)

Nerijetko se u literaturi spominje klasifikacija polifenola prema porijeklu (lokaciji u biljci) te rasprostranjenosti (Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Obzirom na rasprostranjenost, polifenoli se dijele na: rijetko prisutne u prirodi (jednostavni fenoli - hidrokinon, vanilin), široko rasprostranjene polifenole (flavonoidi i njihovi derivati) te polimerne oblike (tanini i lignani) (Bravo, 1998). Prema porijeklu (lokaciju u biljci), polifenoli se mogu klasificirati na jednostavne - polifenoli koji nisu vezani za spojeve stanične membrane (npr. tanini i flavonoidi) te strukturno vezane polifenole - vezani za polisaharide ili proteine stanične stijenke, formirajući netopljive stabilne komplekse (kondenzirani tanini, fenolne kiseline). Navedena klasifikacija je važna, s nutritivnog stajališta, zbog fizioloških učinaka polifenola te njihove sudbine u gastrointestinalnom traktu, a posljedično i primjene u prehrambenoj industriji (Belščak-Cvitanović i sur., 2018).

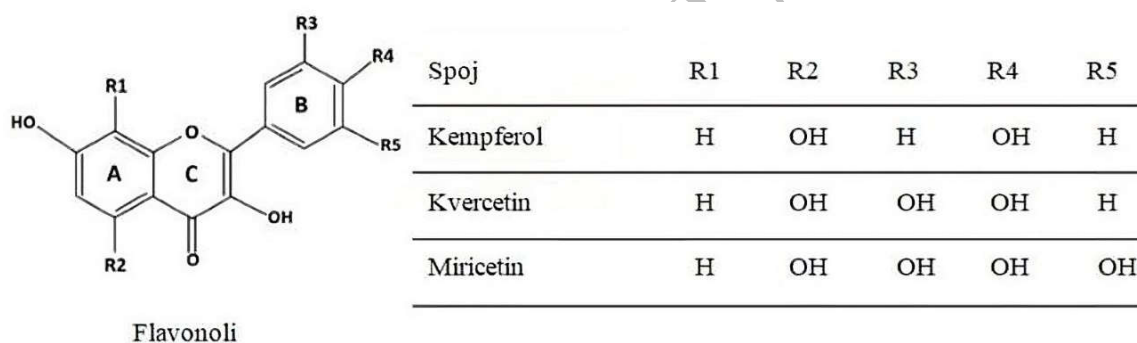
1.1.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najbrojnija te najistraživanija skupina polifenola, a ujedno čine i oko 60 % ukupnih polifenola prisutnih u ljudskoj prehrani (Manach i sur., 2004). Do sada je poznato čak više od 4 000 različitih flavonoida (Tsao, 2010; Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Njihova osnovna kemijska struktura sastoji se od C6-C3-C6 kostura koji uključuje dva aromatska prstena povezana tročlanim heterocikličkim prstenom. Na navedeni kostur, u većini slučajeva, vezano je tri ili više hidroksilnih skupina (Durazzo i sur., 2019). Kao posljedica hidroksilacije, glikozilacije i metoksilacije osnovne strukture, izdvaja se nekoliko podskupina flavonoida:

flavonoli, flavoni, flavanoni, izoflavoni, flavan-3-oli te antocijani (Crozier i sur., 2009; Tsao, 2010; Belščak-Cvitanović i sur., 2018; Durazzo i sur., 2019). Svaku od navedenih skupina karakterizira specifična kemijska struktura koja utječe na njihovu bioraspoloživost te biološku aktivnost.

Flavonoli

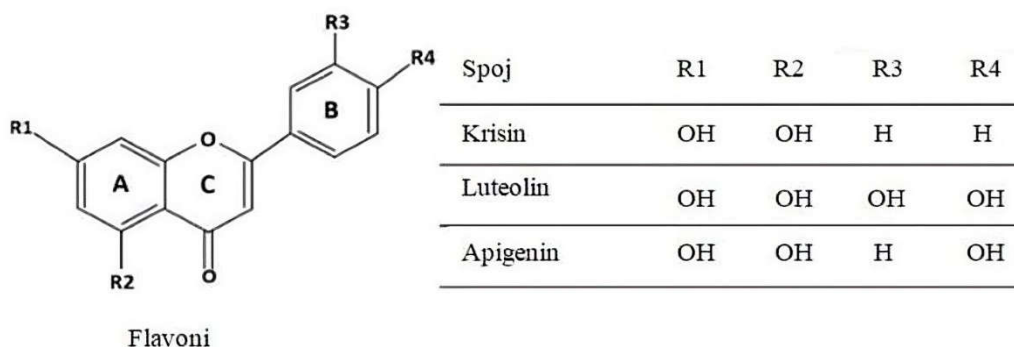
Flavonoli su najzastupljenija podskupina flavonoida, a najčešće se pojavljuju u formi glikozida, vezanih za šećere glukozu, ramnozu, arabinozu te galaktozu. Kod kemijske strukture (Slika 2.), karakterizira ih prisutnost hidroksilne skupine na prstenu C na poziciji 3, dvostruka veza između C2 i C3 te karbonilna skupina na C4 (Durazzo i sur., 2019). Navedene strukturne karakteristike pridonose njihovoj sposobnosti keliranja metalnih iona i neutralizacije slobodnih radikala, a samim time i bioloških svojstava (Tsao, 2010). Najvažniji predstavnici flavonola su kvercetin, kempferol i miricetin (Tsao, 2010; Shah, 2020).



Slika 2. Osnovna kemijska struktura flavonola i najpoznatiji primjeri s pripadajućim razmještajem supstituenata na osnovnom kosturu (Shah, 2020)

Flavoni

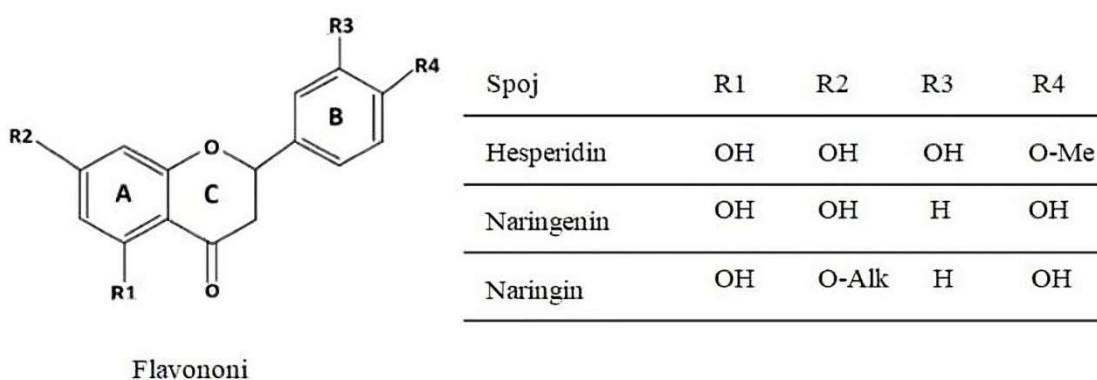
Flavoni su strukturno vrlo slični flavonolima, no odlikuje ih odsutnost hidroksilne skupine na položaju C3 (Vermerris i Nicholson, 2006). Zbog toga su i manje polarni u odnosu na flavonole. U biljkama se najčešće javljaju u obliku O- i C- glikozida (Yang i sur., 2018). Na Slici 3. prikazana je osnovna struktura te najznačajniji predstavnici: apigenin, luteolin te krisin (Zuiter, 2014).



Slika 3. Osnovna kemijska struktura flavona i najpoznatiji primjeri s pripadajućim razmještajem supstituenata na osnovnom kosturu (Shah, 2020)

Flavanoni

Flavanoni su zasićeni flavonoidi koji, za razliku od flavona i flavanola, nemaju dvostruku vezu između C2 i C3 (Slika 4.). Posljedično, strukturno su fleksibilniji i stabilniji. Podliježu reakcijama hidroksilacije, glikozilacije te *O*-metilacije. Prisutni su u visokim koncentracijama u agrumima, a najpoznatiji predstavnici su hesperidin, naringenin te naringin (Shah, 2020). Zanimljiv je podatak kako flavanonski rutinozidi nemaju okus, dok flavanonski neohesperidozidni spojevi (neohesperidin i naringenin) imaju izrazito gorak okus (B'chir i Arnaud, 2023).

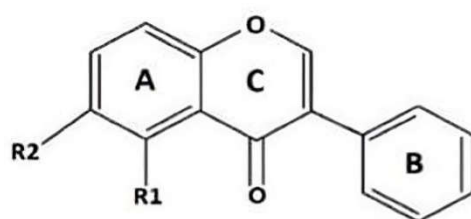


Slika 4. Osnovna kemijska struktura flavanona i najpoznatiji primjeri s pripadajućim razmještajem supstituenata na osnovnom kosturu (Shah, 2020)

Izoflavoni

Kod izoflavona, za razliku od ostalih podskupina flavonoida, prsten B je vezan na prsten C preko trećeg ugljikovog atoma (Slika 5.) (Tsao, 2010; Durazzo i sur., 2019; Rathod i sur., 2023). Izoflavoni posjeduju estrogenska svojstva te se nazivaju i fitoestrogenima, odnosno

imaju sposobnost vezanja na estrogenske receptore zbog položaja benzenskog prstena B (Rathod i sur., 2023). Glavni izvor izoflavona su leguminoze i mahunarke, posebice soja. Najznačajniji predstavnici su daidzein, genistein te glicitein (Shah, 2020).



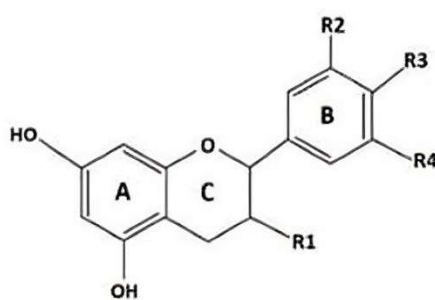
Izoflavoni

Spoj	R1	R2
Daidzein	H	H
Genistein	OH	H
Glicitein	H	OCH ₃

Slika 5. Osnovna kemijska struktura izoflavona i najpoznatiji primjeri s pripadajućim razmještajem supstituenata na osnovnom kosturu (Shah, 2020)

Flavan-3-oli

Jedina podskupina flavonoida koja se ne pojavljuje u glikozidnom obliku su flavan-3-oli. Osnovna kemijska struktura uključuje hidroksilnu skupinu na položaju C3 te odsutnost dvostruke veze između C2 i C3 (Slika 6.) (Vermerris i Nicholson, 2006). Često se flavan-3-oli nazivaju i katehinima. Treba naglasiti da se, zbog dva kiralna centra (C2 i C3), katehini javljaju kao četiri moguća diastereoizomera (Tsao, 2010). Najvažniji spojevi iz ove podskupine flavonoida su katehin, epikatehin te epigalokatehin (Vermerris i Nicholson, 2006; Shah, 2020).



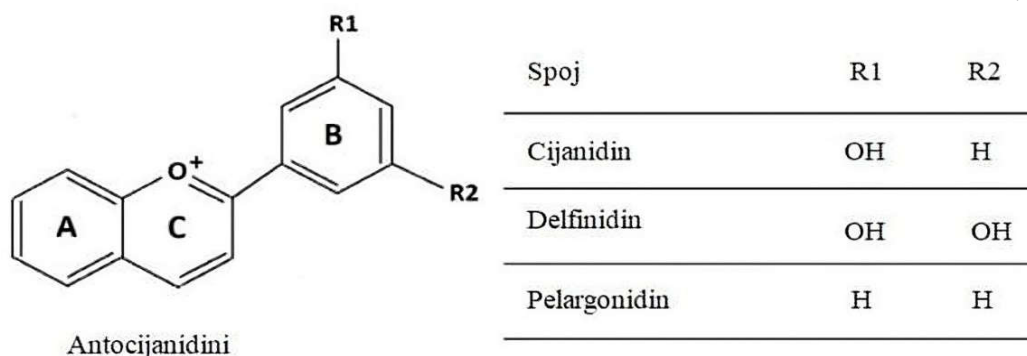
Flavanoli

Spoj	R1	R2	R3	R4
(+) Katehin	OH	OH	OH	H
(-) Epikatehin	OH	OH	OH	H
(-) Epigalokatehin	OH	OH	OH	OH

Slika 6. Osnovna kemijska struktura flavan-3-ola i najpoznatiji primjeri s pripadajućim razmještajem supstituenata na osnovnom kosturu (Shah, 2020)

Antocijani

Obzirom na kemijsku strukturu, antocijani su glikozilirani antocijanidini (aglikoni), čija osnova je flavilijev kation (Mattioli i sur., 2020). Većina se antocijana pojavljuje u esterificiranoj formi s organskim kiselinama, poput *p*-kumarinske kiseline i ferulične kiseline (Durazzo i sur., 2019). Bogat izvor antocijana su crni ribiz, malina, šljive, crveni luk (Durazzo i sur., 2019), a najzastupljeniji su cijanidin, delfinidin te pelargonidin (Slika 7.) (Shah, 2020).

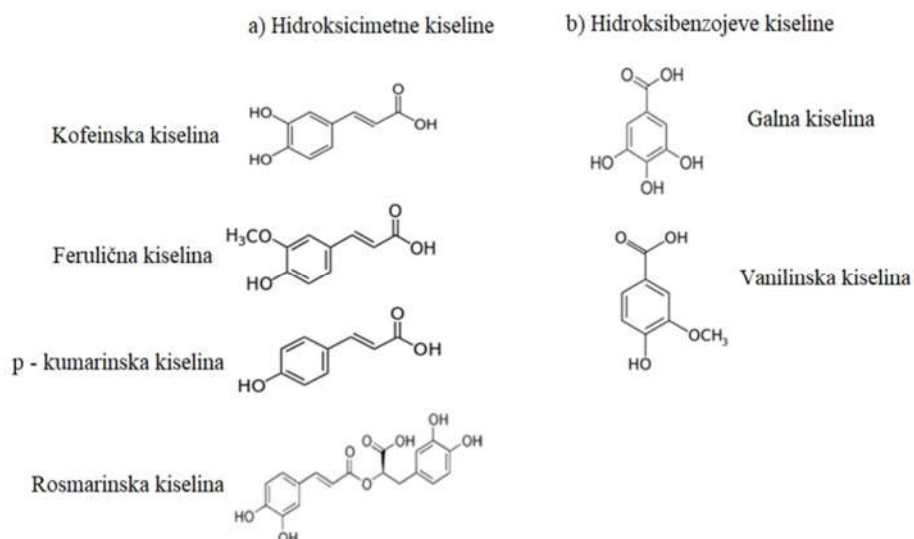


Slika 7. Osnovna kemijska struktura antocijana i najpoznatiji primjeri s pripadajućim razmještajem supstituenata na osnovnom kosturu (Shah, 2020)

1.1.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline predstavljaju važnu skupinu neflavonoidnih polifenola, čiju kemijsku strukturu odlikuje prisutnost benzenskog prstena, karboksilne skupine te jedne ili više hidroksilnih i/ili metoksilnih skupina (Yang i sur., 2001; Belščak-Cvitaović i sur., 2018). Fenolne kiseline se dodatno dijele na hidroksibenzojeve kiseline (C6 - C1), hidroksicimetne kiseline (C6 - C3) te njihove derivate. Rijetko se pojavljuju u slobodnoj formi, već najčešće u konjugiranom obliku s drugim polifenolima te esterificirane s vinskom ili kina kiselinom (Singla i sur., 2019). Na Slici 8. prikazana je podjela fenolnih kiselina na hidroksicimetne i hidroksibenzojeve te njihovi najzastupljeniji predstavnici.

Hidroksibenzojeve kiseline građene su od jednog aromatskog prstena (C6) povezanog s karboksilnom skupinom (C1). Osnovna struktura temeljena je benzojevoj kiselini, a predstavlja svojevrsni kostur na koji su vezane različite funkcionalne skupine (hidroksilne -OH i metoksi -OCH₃ skupine) (Belščak-Cvitanović i sur., 2018).



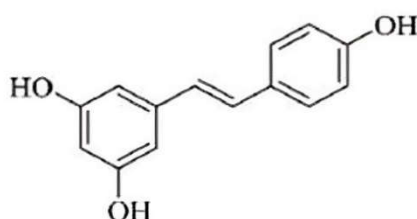
Slika 8. Podjela fenolnih kiselina na hidroksicimetne (a) i hidroksibenzojeve (b) kiseline te njihovi najznačajniji predstavnici (Kiokias i Oreopoulou, 2021)

Iako se u pojedinim vrstama voća hidroksibenzojeve kiseline mogu nalaziti u slobodnom obliku, uglavnom su konjugirane sa šećerima ili organskim kiselinama. Najvažniji spojevi iz ove skupine su galna i vanilinska kiselina (Kiokias i Oreopoulou, 2021), dok se među ostalima spominju još i siriginska te protokatehuinska kiselina (Tomás-Barberán i Clifford, 2000).

Hidroksicimetne kiseline složenije su strukture koja obuhvaća aromatski prsten (C6) povezan s tročlanim bočnim lancem (C3). Spomenuti tročlani bočni lanac uključuje dvostruku kovalentnu vezu te karboksilnu skupinu vezanu na aromatski prsten. Kao što i samo ime upućuje, osnovna struktura hidroksicimetnih kiselina temeljena je na cimetnoj kiselini, koja dalje podliježe modifikacijama, poput supstitucije hidroksilnim te metoksi skupinama (Vermerris i Nicholson, 2006). Hidroksicimetne kiseline su najčešće esterificirane (amidi i glikozidi), dok im je koncentracija u negativnoj korelaciji s dozrijevanjem plodova voća (Häkkinen i Törrönen, 2000). Najpoznatije hidroksicimetne kiseline su kofeinska, ferulična, *p*-kumarinska te rosmarinska kiselina (Kiokias i Oreopoulou, 2021). Fenolne kiseline čine čak jednu trećinu svih polifenola u ljudskoj prehrani, a odlikuje ih izuzetna antioksidacijska aktivnost (Yang i sur., 2001). Treba napomenuti kako je antioksidacijska aktivnost hidroksicimetnih kiselina veća od hidroksibenzojevih. Unatoč tome, hidroksibenzojeve kiseline pokazuju veću kemijsku stabilnost zbog jednostavnije strukture i odsutnosti bočnih lanaca (i dvostrukih kovalentnih veza), čineći ih manje reaktivnima te otpornijima na oksidativna oštećenja (Scalbert i Williamson, 2000; Balasundram i sur., 2006).

1.1.2.3. Stilbeni

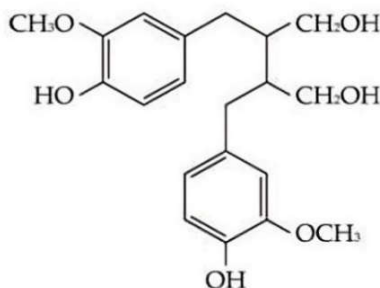
Osim fenolnih kiselina, druga i relativno mala skupa neflavonoida su stilbeni. Karakteriziraju ih dva aromatska prstena (C6) povezana etilenskim mostom (C2) (Singla i sur., 2019). Sintetiziraju ih biljke kao odgovor na infekciju ili ozljedu (Rudrapal i sur., 2022). Stilbeni se pojavljuju u oba izomerska oblika - cis i trans konfiguraciji, iako je trans konfiguracija češća zbog veće kemijske stabilnosti. Najznačajniji stilben je resveratrol (Slika 9.). Predmet je mnogobrojnih znanstvenih istraživanja zbog jakog antioksidacijskog učinka, a glavni izvori su grožđe, maline, borovnica, šljive i kikiriki (Weiskirchen i Weiskirchen, 2016).



Slika 9. Najznačajniji stilben - resveratrol (Azmi i sur., 2021)

1.1.2.4. Lignani

Lignani su skupina polifenola nastala dimerizacijom cimetnih alkohola, a čija osnovna struktura uključuje dva fenilpropanoidna lanca povezana različitim vezama (Slika 10.) (Adlercreutz, 2007). Vrijedan izvor ovih spojeva su žitarice, posebice lanene sjemenke. Zanimljivo je kako su lignani, uz ranije opisane izoflavone, fitoestrogeni. Odnosno, zbog svoje strukture su vrlo slični estrogenima. Metaboličkim procesima, u crijevima ih bakterije pretvaraju u metabolite s estrogenskim djelovanjem, poput ekvola, enterodiola te enterolaktona (Mrduljaš i sur., 2017).



Slika 10. Kemijska struktura lignana (Mrduljaš i sur., 2017)

1.1.3. Polifenoli višnje

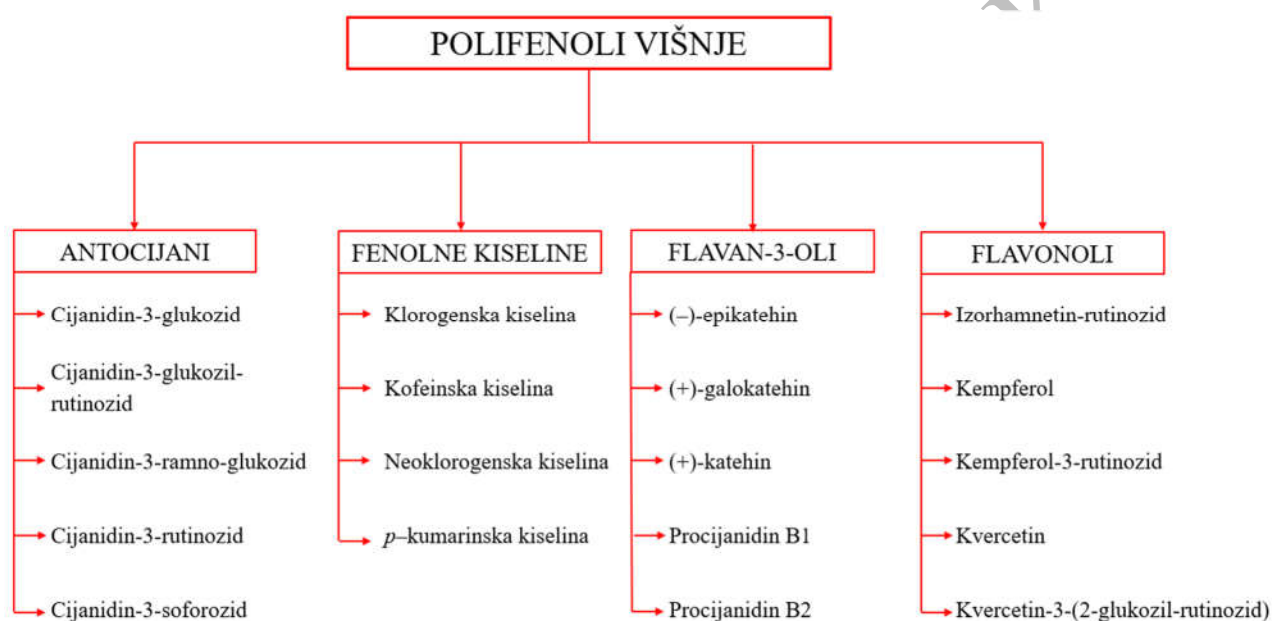
Višnja (lat. *Prunus cerasus* L.) drvenasta je i koštuničava vrsta iz porodice *Rosaceae*. Ujedno je nativna biljka Indije i Irana, a njezin uzgoj u Europi započinje prije 2 500 godina (Bačić i Sabo, 2007). U prilog njezine ekonomske važnosti govori podatak da je sedma kontinentalna voćna vrsta po uzgoju na globalnoj razini.

Višnja je nutritivno i fitoaktivno bogata biljka, a njezin kemijski sastav prikazan je u Tablici 1. Smatra se da je nutritivno uravnotežena zbog umjerenog sadržaja šećera, niskog udjela masti te prosječnog sadržaja vlakana. Vidljivo je da su najzastupljeniji voda te ugljikohidrati. Analizom mikronutrijenata, uočava se visok udio kalija te vitamina A (Sabou i sur., 2021). Ono što zaista karakterizira plod višnje jest visoka koncentracija polifenola, posebice antocijana (Ferretti i sur., 2010; Sabou i sur., 2021; Kopjar i sur., 2023). Polifenolni profil višnje prikazan je na Slici 11., a uključuje antocijane, fenolne kiseline, flavonole te flavan-3-ole (Mayta-Apaza i sur., 2018). Iako su antocijani kvantitativno dominantni, prisutnost ostalih polifenola značajno doprinosi ukupnom antioksidacijskom kapacitetu te biološkoj aktivnosti višnje (Chaovanalikit i Wrolstad, 2004; Siddiq i sur., 2011).

Tablica 1. Prosječan kemijski sastav ploda višnje na 100 g (ploda) (Sabou i sur., 2021)

Parametar	Vrijednost
Voda	86,00 g
Proteini	1,00 g
Lipidi	0,30 g
Ugljikohidrati	12,20 g
Vlakna	1,60 g
Šećeri	8,49 g
Natrij	3,0 mg
Kalij	173 mg
Fosfor	15,0 mg
Magnezij	9,0 mg
Vitamin C	10,0 mg
Vitamin A	1283 IU
Vitamin K	2,1 µg

Upravo su antocijani odgovorni za crvenu, ljubičastu te plavu boju plodova višnje dok sama boja i intenzitet ovisi ponajviše o zrelosti (ploda). Naime, tijekom sazrijevanja ploda, osim boje, mijenja se i polifenolni profil. U ranijim fazama sazrijevanja dominiraju fenolne kiseline, a sa sazrijevanjem se povećava udio antocijana (Karaaslan i Yaman, 2016). Najzastupljeniji antocijani, u plodovima višnje, su cijanidin-3-rutinozid, cijanidin-3-glukozid te cijanidin-3-glukozil-rutinozid (Chandra i sur., 1992; Wojdyło i sur., 2014). Nadalje, od fenolnih kiselina, u plodu višnje zastupljene su klorogenska, neoklorogenska i *p*-kumarinska kiselina (Mayta-Apaza i sur., 2018).



Slika 11. Polifenolni profil ploda višnje (*Prunus cerasus* L.) (Mayta-Apaza i sur., 2018; Jawad i sur., 2025)

Osim antocijana, antioksidacijskoj aktivnosti značajno pridonose i flavonoli, poput izorhamnetin-rutinozida, kempferola, kvercetina, kvercetin-3-(2-glukozil-rutinozida), kvercetin-3-rutinozida, kvercetin-3-glukozida te kempferol-3-rutinozida (Mayta-Apaza i sur., 2018). Naime, snažna antioksidacijska aktivnost kvercetina i sposobnost keliranja metalnih iona proizlaze iz prisutnosti 5 hidroksilnih skupina u strukturi (Serradilla i sur., 2016). Ujedno, derivati kvercetina dodatno povećavaju njegovu stabilnost i topljivost u vodi. Od flavanola, odnosno flavan-3-ola, u plodu višnje dominiraju katehini i epikatehini. Ovi spojevi su prisutni u višnji uglavnom u slobodnoj formi i poznati su po svojoj sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala i keliranja metalnih iona, što značajno doprinosi ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti višnje (Chaovanalikit i Wrolstad, 2004; Heim i sur., 2002). Flavonoli su u višnji prisutni

uglavnom u slobodnom obliku, što dodatno povećava njihovu biološku dostupnost i učinkovitost u prehrambenim proizvodima (Chaovanalikit i Wrolstad, 2004; Manach i sur., 2004). Proantocijanidini se uglavnom nalaze u sjemenkama ili kožici ploda, a struktura uključuje povezivanje flavanolnih monomera putem C4-C8 ili C4-C6 veza, što rezultira stvaranjem dimera, trimera ili viših polimernih oblika (Wojdyło i sur., 2014; Chandra i sur., 1993).

Ocjena rada u tijeku

1.2. MEHANIZAM ANTIOKSIDACIJSKOG DJELOVANJA POLIFENOLA

Polifenoli se smatraju jednim od najučinkovitijih prirodnih antioksidansa, odnosno komponenti koje neutraliziraju slobodne radikale, kao što su reaktivnih kisikovi (eng. *Reactive Oxygen Species* (ROS)) te reaktivni dušikovi spojevi (eng. *Reactive Nitrogen Species* (RNS)). Slobodni radikali, zbog neparnog broja elektrona u valentnoj ljusci, izrazito su reaktivni te nastaju tijekom staničnog disanja, upalnih procesa, izlaganjem UV zračenju, stresu, pesticidima i sl. (Tumilaar i sur., 2024). Riječ je o nizu različitih mehanizama koji uključuju donaciju vodikovih atoma ili elektrona, keliranje metalnih iona, inhibiciju lipidne peroksidacije te poticanje aktivnosti endogenih antioksidacijskih enzima (Heim i sur., 2002; Scalbert i sur., 2000; Kopjar i sur., 2023). Dva su glavna procesa mehanizama antioksidacijskog djelovanja polifenola: prijenos atoma vodika (eng. *Hydrogen Atom Transfer* (HAT)) te prijenos elektrona (eng. *Single Electron Transfer* (SET)) (Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Kod procesa prijenosa atoma vodika, dolazi do interakcije polifenola sa slobodnim radikalima putem prijenosa atoma vodika, što rezultira oksidacijom polifenola u stabilniji radikal. Navedeni je mehanizam osobito učinkovit u neutralizaciji hidroksilnih (-OH) te peroksi (-ROO) radikala (Belščak-Cvitanović i sur., 2018). S druge strane, proces prijenosa elektrona uključuje donaciju elektrona slobodnom radikal. Posljedično, stvara se stabilan radikalni kation. Ovakvim tipom reakcije uklanjanju se visoko reaktivni ROS, kao što su superoksidni anion (O_2^-) i peroksidni radikali (Olszowy, 2019).

Jedan od najvažnijih čimbenika koji utječe na antioksidacijsku učinkovitost polifenola je njihova kemijska struktura. Točnije, broj i položaj hidroksilnih skupina, stupanj polimerizacije, konjugacija prstena te prisutnost metoksi skupina (Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Broj hidroksilnih skupina je u pozitivnoj korelaciji sa sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, posebice kada su smještene u orto-položaju. Kofeinska kiselina koja u svojoj strukturi sadrži dvije hidroksilne skupine ima veću antioksidacijsku aktivnost, u odnosu na *p*-kumarinsku kiselinu čiju strukturu odlikuje samo jedna hidroksilna skupina. Kod metoksilacije, antioksidacijska učinkovitost ovisi o položaju metoksi skupine. Postoji razlika u rezultatima znanstvenih istraživanja o utjecaju metoksilacije na antioksidacijsku sposobnost (Olszowy, 2019). Konjugacijom aromatskih prstena, preko nezasićenog prstena C, dodatno se poboljšava antioksidacijska aktivnost polifenola. Posebno se navedeno odnosi na flavonoide zbog ranije opisane povezanosti prstenova A i B preko prstena C, čime je povećana njihova sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (Cutrim i sur., 2018; Olszowy, 2019). Sljedeći ključan

čimbenik je polimerizacija. Naime, polimerizacijom se također postiže veća antioksidacijska učinkovitost. Polimerizirani flavonoidi, proantocijanidini, imaju veću antioksidacijsku učinkovitost od monomernih oblika zbog većeg broja dostupnih hidroksilnih skupina i sposobnosti keliranja metalnih iona (Vennat i sur., 1994). Prijelazni metalni ioni, kao što su Fe^{2+} i Cu^{2+} , kataliziraju nastajanje ROS-a putem Fentonovih i Haber-Weissovih reakcija. Keliranjem navedenih metalnih iona sprječava se njihova katalitička aktivnost, a posljedično i nastajanje ROS-a. Sposobnost keliranja metalnih iona pokazuju flavonoidi, poput kvercetina, katehina i epikatehina (Heim i sur., 2002). Svakako treba spomenuti i sposobnost polifenola u inhibiciji lipidne peroksidacije, odnosno procesa oksidativnog oštećenja lipida u staničnim membranama. Time se narušava struktura i funkcija staničnih membrana (Rudrapal i sur., 2022).

Antioksidacijsko djelovanje polifenola je jedno od njihovih najznačajnijih svojstava, a značajno doprinosi u prevenciji oksidativnog stresa te njegovih štetnih posljedica. Oksidativni stres uzrokuje oštećenja proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Znanstvena istraživanja pokazuju da je povezan sa čak više od 50 različitih bolesti, uključujući dijabetes, karcinome, kardiovaskularne te neurodegenerativne bolesti (Tumilaar i sur., 2024).

1.3. STABILNOST POLIFENOLA

Iako su polifenoli poznati po snažnim antioksidacijskim svojstvima, izrazito su nestabilne molekule koje podliježu degradaciji tijekom tehnološke obrade hrane i skladištenja (Cao i sur., 2021). Čimbenici poput pH, temperature, izloženosti svjetlosti, oksidacije, prisutnosti iona metala te interakcije s ostalim komponentama hrane uzrokuju promjene u kemijskoj strukturi polifenola, a posljedično i njihovoj stabilnosti (Bakowska-Barczak, 2005; Cavalcanti i sur., 2011; Deng i sur., 2018; Enaru i sur., 2021; Kopjar i sur., 2022). Neke od najznačajnijih kemijskih reakcija koje uzrokuju spomenute promjene kemijske strukture su hidroksilacija, glikozilacija, acetilacija, epimerizacija, autooksidacija, esterifikacija, alkilacija te karboksimetilacija (Deng i sur., 2018; Cao i sur., 2021).

1.3.1. Utjecaj pH vrijednosti

Promjena pH vrijednosti značajno utječe na stabilnost polifenola, što je posebno izraženo kod antocijana. Naime, kemijski oblik u kojem se nalaze antocijani ovisi o pH vrijednosti otopine, a posljedično utječe i na boju (antocijana) (Deng i sur., 2018; Cao i sur., 2021). Flavilijev kation je dominantan kemijski oblik pri pH vrijednosti 1, a zaslužan je za ljubičastu i crvenu boju. Nadalje, pri pH vrijednostima između 3 i 4 prevladavaju kinoidni oblici, uzrokujući plavo obojenje. Bezbojni oblici (karbinol pseudobaza i halkon) prisutni su kod pH između 5 i 6, dok se pri pH 7 i iznad, antocijani degradiraju (Castañeda-Ovando i sur., 2009; Cao i sur., 2021). Istraživanja pokazuju da stabilnost antocijana ovisi o supstituentima na B prstenu te broju hidroksilnih (ili metoksilnih) skupina. Stoga su i aglikoni nestabilniji u neutralnim pH uvjetima, dok se pelargonidin pokazao najstabilnijim od antocijana (Castañeda-Ovando i sur., 2009).

Iako je utjecaj pH najvidljiviji kod antocijana zbog njihove osjetljive strukture, promjena pH vrijednosti utječe i na stabilnost drugih flavonoida. Flavonoidi koji sadrže ortodihidroksilne skupine na B-prstenu i hidroksilnu skupinu na C3 položaju (kao što je slučaj s kvercetinom) pokazali su znatnu nestabilnost u alkalnim uvjetima. Pri višim pH vrijednostima dolazi do autooksidacije, koja rezultira formiranjem kinona i gubitkom antioksidacijske aktivnosti (Jurasekova i sur., 2014). Fenolne kiseline, poput kofeniske i klorogenske pokazale su značajnu nestabilnost u alkalnim uvjetima, gdje dolazi do njihove oksidacije i stvaranja kinonskih struktura, što rezultira gubitkom funkcionalnih svojstava. Za razliku od njih katehin, epigalokatehin i ferulinska kiselina pokazali su veću stabilnost (Friedman i Jurgens, 2000).

Općenito, flavonoidi su najstabilniji u blago kiselom području pH 4-6, dok alkalni uvjeti pogoduju njihovoj razgradnji. U istraživanju Pasquet i suradnika (2024) analizirani su ekstrakti dobiveni iz agro-prehrambenih nusproizvoda, pri čemu je ispitivan utjecaj pH vrijednosti na stabilnost polifenola. Pri alkalnom pH ukupni sadržaj polifenola smanjio se na 38 % početne vrijednosti već unutar prvih 10 minuta, dok je nakon 24 sata iznosio svega 19 %, što upućuje na izrazitu nestabilnost polifenolnih spojeva u bazičnim uvjetima.

1.3.2. Utjecaj temperature

Obzirom da je termička obrada jedan od najčešće korištenih postupaka u prehrambenoj industriji, ne čudi što su provedena mnogobrojna istraživanja s ciljem utvrđivanja utjecaja temperature na stabilnost polifenola (Cavalcanti i sur., 2011; Deng i sur., 2018; Enaru i sur., 2021). Rezultati pokazuju da stabilnost polifenola, uključujući i antocijane, opada s povećanjem temperature. Naime, degradacija je uzrokovana glikozidnom hidrolizom, polimerizacijom, cijepanjem, hidrolizom te nizom drugih mehanizama kojima podliježu bioaktivni spojevi (Deng i sur., 2018; Enaru i sur., 2021). Izuzev navedenog smanjenja količine polifenola, s povećanjem temperature dolazi i do povećanja frakcije smeđih pigmenata (Enaru i sur., 2021). U istraživanju koje su proveli West i suradnici (2013) utvrđeno je da je toplinska obrada ekstrakta grožđa pri 35 °C dovela do smanjenja sadržaja antocijana za više od 50 % u odnosu na obradu pri 25 °C. Ujedno, uočena je i promjena boje antocijana - iz crvene u narančastu.

1.3.3. Utjecaj svjetlosti

Utjecaj svjetlosti na polifenole je dvojak; s jedne strane nužna je za njihovu biosintezu, a s druge strane uzrokuje degradaciju (Enaru i sur., 2021). Fotodegradacija se najčešće događa kod spojeva s dvostrukim konjugiranim vezama, što u konačnici rezultira smanjenjem antioksidacijskog djelovanja, ali i promjenom organoleptičkih svojstava (Rein, 2005). Amogne i suradnici (2020) istraživali su utjecaj svjetlosti na stabilnost antocijana iz soka grožđa te je opažen gubitak od 30 %, dok je gubitak ukupnih polifenola iznosio čak 50 %. Polifenole se može zaštititi od fotoinducirane degradacije korištenjem ambalaže od materijala koji sprječava prolazak svjetlosti ili dodatkom specifičnih kopigmenata (Rein, 2005).

1.3.4. Utjecaj prisutnosti kisika

Značajan faktor za stabilnost polifenola je prisutnost kisika (Deng i sur., 2018; Cao i sur., 2021). Dva su mehanizma kojima kisik degradira polifenole: izravni oksidacijski mehanizam

te djelovanje oksidacijskih enzima (Enaru, 2021). Točnije, katalitičko djelovanje enzima, kao što je polifenol oksidaza, rezultira stvaranjem reaktivnih kinona te radikala. Zatim, novonastali produkti reagiraju s proteinima i drugim komponentama hrane, čime se reducira koncentracija polifenola te njihova antioksidacijska učinkovitost (Cao i sur., 2021).

1.3.5. Utjecaj iona metala

Ioni metala mogu stabilizirati, ali i degradirati polifenole, ovisno o njihovoj vrsti i koncentraciji, samoj podskupini polifenola te uvjetima (npr. pH vrijednost) (Rein, 2005; Deng i sur., 2018; Cao i sur., 2021). Jedna od odlika polifenola je sposobnost vezanja (keliranja) iona metala pomoću svojih hidroksilnih skupina. Posebno se ističu ioni željeza (Fe^{2+} i Fe^{3+}), bakra (Cu^{2+}) te mangana (Mn^{2+}). Znanstvena istraživanja pokazuju da ioni željeza i bakra smanjuju antioksidacijska svojstva polifenola, čime se povećava njihova degradacija. S druge strane, kod katehina su se ioni mangana pokazali učinkovitima u povećanju antioksidacijske aktivnosti. Zanimljivo je da, u određenim uvjetima poput visoke temperature i neutralnog pH, isti kompleksi mogu stvarati reaktivne kisikove vrste, odnosno djelovati prooksidativno. Stoga se nerijetko u prehrambene proizvode dodaje EDTA, s ciljem vezanja metalnih iona i onemogućavanja njihove reakcije s polifenolima (Rein, 2005; Deng i sur., 2018; Cao i sur., 2021).

1.3.6. Interakcije s komponentama hrane

Polifenoli često stupaju u interakcije s ostalim komponentama matriksa hrane, poput proteina, polisaharida te lipida (Jakobek, 2015; Cao i sur., 2021). Iako navedene reakcije mogu biti pozitivne i negativne, većina znanstvenih istraživanja fokusirana je na iskorištavanje njihova potencijala u zaštiti polifenola. Primjerice, askorbinska kiselina poboljšava stabilnost katehina u zelenom čaju zbog redukcijskog djelovanja (Jakobek, 2015). S druge strane, askorbinska kiselina pospješuje degradaciju antocijana, dok ih flavonoli (kvercetin i kaempferol) štite od askorbinske kiseline. Poseban interes znanstvene zajednice izazivaju interakcije polifenola s proteinima, odnosno formiranje njihova kompleksa. Spomenute interakcije bazirane su na nekovalentnim interakcijama, poput vodikovih veza i hidrofobnih sila, koje učinkovito štite antocijane od oksidacije te negativnog učinka svjetlosti (Xue i sur., 2024; Ozdal i sur., 2013; Li i sur., 2021).

1.4. INKAPSULACIJA

Polifenoli se u prehrambenoj tehnologiji ističu kao spojevi s višestrukom primjenom zahvaljujući raznolikim funkcionalnim svojstvima, no njihova primjena može biti ograničena zbog osjetljivosti na vanjske čimbenike. Izloženost svjetlosti, povišenim temperaturama, prisutnosti kisika, metalnih iona i promjenama pH često dovodi do njihove kemijske degradacije i smanjenja bioaktivnosti. Kako bi se očuvala njihova stabilnost i funkcionalna svojstva tijekom tehnološke obrade i skladištenja, sve se češće primjenjuje tehnika inkapsulacije (Desai i Jin Park, 2005; Manjanna i sur., 2010). Inkapsulacija je tehnološki postupak u kojem se bioaktivni sastojak (ili smjesa bioaktivnih sastojaka) obavlja odgovarajućim nosačem ili se u njega inkorporira (Manjanna i sur., 2010; Choudhury i sur., 2021; Mehta i sur., 2022; Xu i sur., 2024). Treba naglasiti kako postoji razlika u definiciji inkapsulacije, ovisno o vrsti čestica koje nastaju navedenom tehnikom. Naime, mikro čestice/mikro kapsule karakterizira struktura jezgra - omotač, odnosno aktivna tvar je zatvorena/obavijena omotačem (ili kombinacijom omotača). S druge strane, mikro sfere ili matrične čestice nastaju ugradnjom, tj. disperzijom bioaktivnog sastojka unutar nosača (npr. biljnih proteina) (Manjanna i sur., 2010). Jedan od primjera takvih matričnih sustava je suhi prah koji nastaje liofilizacijom (Ratti, 2013).

Metode inkapsulacije (Tablica 2.) dijele se na kemijske, fizikalne te fizikalno - kemijske (Buljeta i sur., 2021; Weng i sur., 2024). Odabir metode inkapsulacije također ovisi o nizu čimbenika, poput svojstava aktivnog sastojka, konačnoj primjeni prehrambenog proizvoda, veličini čestica, vrsti nosača te ekonomičnosti (Nedović i sur., 2011; Choudhury i sur., 2021; Mehta i sur., 2022; Weng i sur., 2024). Neka od svojstava na koje je potrebno obratiti pozornost kod odabira metode inkapsulacije su topljivost u otapalima, osjetljivost na kisik i svjetlost, veličina, organoleptička svojstva te stabilnost (Choudhury i sur., 2021; Mehta i sur., 2022).

Najstarija i najčešće korištena metoda inkapsulacije je sušenje raspršivanjem (Desai i Jin Park, 2005; Nedović i sur., 2011). Naziv potječe od elementarnog principa - raspršivanja aktivnog sastojka i jezgre unutar komore kojom struji vrući zrak čime nastaje prah. Time je aktivni sastojak „zarobljen“ unutar osušenog, novonastalog praha (Mazár i sur., 2025). Prednosti ove metode su niži operativni troškovi, učinkovito prikrivanje neugodnih okusa i mirisa, brzina te stvaranje čestica širokog raspona veličina. Kao najznačajniji nedostatak, navodi se visoka temperatura sušenja čime ova tehnika nije podobna za termolabilne spojeve (poput polifenola). Stoga se, kod takvih spojeva, primjenjuje liofilizacija (Desai i Jin Park, 2005; Nedović i sur., 2011).

Tablica 2. Najčešće korištene metode inkapsulacije (Weng i sur. 2024; Munin i Edwards-Levy, 2011; Grgić i sur. 2020)

Metode inkapsulacije	
Fizikalne metode	Ekstruzija Koacervacija Liofilizacija Sušenje raspršivanjem
Kemijske metode	Interfazna polimerizacija Polimerizacija in situ
Fizikalno-kemijske metode	Emulzije Geliranje Ionsko očvršćivanje Spontana nanoenkapsulacija

Tablica 3. Najčešće korišteni materijali kao omotači za inkapsulaciju (Desai i Jin Park, 2005; Fahrurrozi i Wirawan, 2016; Ozturk i Temiz, 2018; Dhakal i He, 2020).

Vrsta	Materijal omotača
Ugljikohidrati	Agar, alginat, arabik guma, ciklodekstrin, dekstrin, guar guma, karagenan, kitozan, ksantan guma, maltodekstrin, pektin, škrob
Proteini	Kazein, kazeinat, laktoglobulin, proteini sirutke, zein, želatina
Lipidi	Fosfolipidi, gliceridi, masne kiseline, mikrokristalni vosak, parafinski vosak, pčelinji vosak

Odabir omotača ovisi o nekoliko faktora, kao što su svojstva bioaktivnog sastojka, primjena konačnog (prehrambenog) proizvoda te metoda inkapsulacije (Desai i Jin Park, 2005; Manjanna i sur., 2010; Buljeta i sur., 2021). Bobrysheva i suradnici (2024) navode da se učinkovitost inkapsulacije polifenola kreće se u rasponu od 50 do 90 % ili više, ovisno o primijenjenoj metodi, uvjetima inkapsulacije i vrsti nosača. U Tablici 3. prikazani su najčešće korišteni materijali, kao nosači, u metodi inkapsulacije. U prehrambenoj tehnologiji, koriste se materijali koji su biorazgradivi te jestivi.

Zanimljivo je kako inkapsulacija postaje predmet velikog interesa znanstvene zajednice posljednjih 20-tak godina, iako njezini začeci sežu u 1960-e godine. Prvotna namjena inkapsulacije bila je u farmaceutskoj industriji za ciljano i kontrolirano otpuštanje lijekova, dok je u prehrambenom sektoru njezina primjena znatno šira (Manjanna i sur., 2010; Shishir i sur.,

2018; Rezagholizade-Shirvan i sur., 2024). Najvažnija funkcija inkapsulacije u prehrambenom sektoru jest zaštita bioaktivnih sastojaka (polifenola, vitamina, minerala, fitosterola, eteričnih ulja, karotenoida itd.), kao sastavnih dijelova funkcionalne hrane. Ta zaštita je osobito važna tijekom tehnološke obrade, skladištenja te zbog interakcija s drugim komponentama hrane (Desai i Jin Park, 2005; Rezagholizade-Shirvan i sur., 2024).

Materijali koji se koriste za inkapsulaciju stvaraju fizičku barijeru koja učinkovito štiti polifenole od degradacije, čime se u obogaćenim prehrambenim proizvodima postižu izraženija antioksidacijska svojstva, produljen rok trajanja i veća funkcionalna stabilnost (Binkowska i sur., 2024). Brojna istraživanja potvrđuju da je inkapsulacija učinkovit tehnološki postupak za očuvanje bioaktivnosti i produljenje stabilnosti polifenola u različitim prehrambenim sustavima. Aizpurua-Olaizola i suradnici (2015) pokazali su da inkapsulirani polifenoli iz grožđa zadržavaju znatno veću stabilnost u usporedbi s ne inkapsuliranim uzorcima, bez obzira na korišteni nosač ili uvjete skladištenja. Slično tome, Ahmadi i suradnici (2025) utvrdili su da inkapsulacija ekstrakta klinčića korištenjem kombinacije maltodekstrina i gume arabike učinkovito smanjuje degradaciju ukupnih fenola i doprinosi očuvanju antioksidacijske aktivnosti tijekom skladištenja pri sobnoj i povišenoj temperaturi. U skladu s time, Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk (2011) dokazali su da inkapsulacija antocijana crnog ribiza značajno povećava njihovu stabilnost pri povišenim temperaturama i tijekom skladištenja. Ovi rezultati jasno potvrđuju da je inkapsulacija učinkovit pristup za produljenje roka trajanja i funkcionalnosti polifenolnih spojeva.

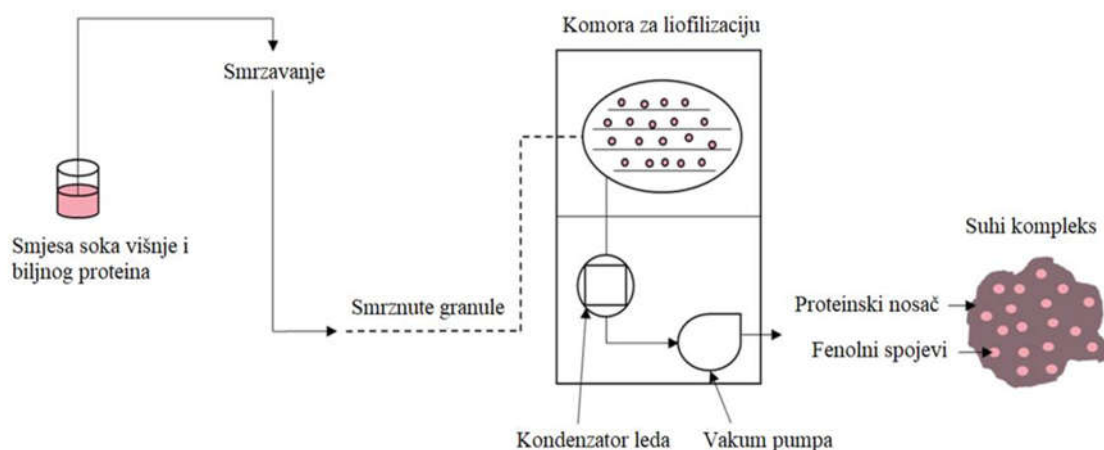
1.4.1. Liofilizacija

Liofilizacija ili sušenje zamrzavanjem je, uz sušenje raspršivanjem, najčešće korištena metoda inkapsulacije (De Castro, 2002; Rezvankhah i sur., 2019). Temeljna razlika između navedenih metoda je u principu sušenja. Naime, kod sušenja raspršivanjem, koristi se vrući zrak (temperature iznad 100 °C) u kratkom vremenu, s ciljem brzog isparavanja vode. Suprotno tome, liofilizacija se provodi pri niskim temperaturama (ispod 0 °C) tijekom dužeg vremenskog perioda (Rezvankhah i sur., 2019). Stoga je liofilizacija pogodna metoda inkapsulacije spojeva osjetljivih na visoke temperature i prisutnost kisika, poput polifenola (Papoutsis i sur., 2018; Nowak i Jakubczyk, 2020; Buljeta i sur., 2021b). Velika prednost ove metode jest produljenje roka trajanja te zadržavanje bioloških, organoleptičkih i nutritivnih svojstava konačnog proizvoda (Nowak i Jakubczyk, 2020). Najznačajniji nedostaci liofilizacije su dugotrajnost samog procesa, energetska zahtjevnost te visoka cijena (Mazar i sur., 2025).

Proces liofilizacije sastoji se od tri faze; zamrzavanje, primarno sušenje (sublimacija) te sekundarno sušenje (desorpcija) (Ratti, 2013; Nowak i Jakubczyk, 2020; Buljeta i sur., 2022). U prvoj fazi (zamrzavanju), uzorak koji sadrži vodu se zamrzava ispod točke leđišta (-40 °C do -80 °C). Navedeno zamrzavanje se provodi pod atmosferskim tlakom, s ciljem zamrzavanja slobodne vode i „zarobljavanja“ vezane vode u matrkusu uzorka. Nižom temperaturom i bržim zamrzavanjem se reducira vjerojatnost oštećenja strukture. U drugoj fazi, primarnom sušenju, vakuumom i postepenim dizanjem temperature se led izravno prevodi u vodenu paru (sublimacija), pri niskom tlaku i niskoj temperaturi. U navedenoj fazi se ukloni čak do 95 % cjelokupne vode. U trećoj fazi, sekundarnom sušenju, uklanja se sva preostala voda koja nije uklonjena sublimacijom. Cilj je postizanje krajnjeg sadržaja vlage od maksimalno 5 % zbog stabilnosti tijekom skladištenja (Ratti, 2013; Nowak i Jakubczyk, 2020). Na Slici 14. ilustrativno je prikazan proces liofilizacije.

Već je ranije opisano kako liofilizacijom nastaje prah, vrlo porozne strukture (Slika 12.) te nepravilnog oblika s mnoštvom pukotina (Palzer i sur., 2011; Rezvankhah i sur., 2019). Poroznost je posljedica uklanjanja vode sublimacijom, odnosno velike količine vode (80 - 85 %) koju sadrži svježi biljni (ili animalni) materijal (Nowak i Jakubczyk, 2020). Zbog navedene poroznosti vrlo lako i brzo upija vodu te je veće topljivosti, u odnosu na prahove dobivene nekim drugim procesom sušenja. Osim toga, prehrambeni dodatci dobiveni procesom liofilizacije privlačni su prehrambenim tvrtkama zbog manjih transportnih troškova (pakiranje i skladištenje) te ranije spomenutog produljenog roka trajanja (Rezvankhah i sur., 2019). Treba naglasiti kako morfološke odlike, prvenstveno poroznost praha, ne ovise samo o količini vode u uzorku, već i o vrsti nosača korištenom u procesu inkapsulacije (Papoutsis i sur., 2018; Rezvankhah i sur., 2019). Primjena materijala razgranate strukture u inkapsulaciji, poput maltodekstrina ili inulina, rezultira visokom poroznošću zbog odsutnosti gustog matriksa (Alibekov i sur., 2025). S druge strane, gelirajući nosači (npr. alginat) stvaraju kompaktniji matriks, a posljedično i manju poroznost suhog praha (Kondaveeti i sur., 2022). Svakako treba spomenuti i interakcije nosača s bioaktivnom tvari. Ako nosač ima visoki afinitet prema bioaktivnom sastojku (npr. protein - polifenoli), tada može doći do redukcije poroznosti praha (Papoutsis i sur., 2018).

LIOFILIZACIJA

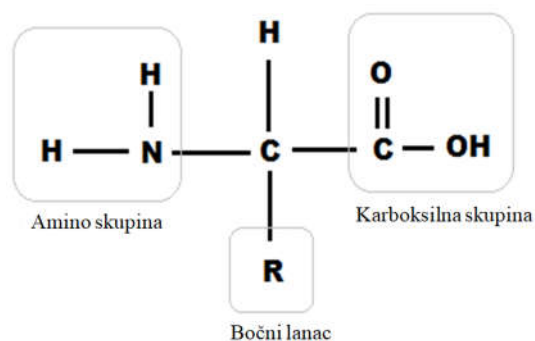


Slika 12. Ilustrativni prikaz procesa liofilizacije (Fang i Bhandari, 2010; Grgić i sur., 2020; adaptirano iz Buljeta i sur., 2021b)

U ovom istraživanju liofilizacija je odabrana kao metoda sušenja zbog svoje mogućnosti očuvanja toplinski osjetljivih polifenolnih spojeva iz soka višnje, osobito antocijana. Primjenom liofilizacije dobiveni su stabilni prahovi prikladni za daljnju analizu i moguću primjenu u formulaciji funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Osim toga, ovom metodom osigurana je veća stabilnost bioaktivnih tvari tijekom skladištenja i obrade, čime se potvrđuje njezina prikladnost za inkapsulaciju polifenolnih spojeva u biljne proteine korištene u ovom radu.

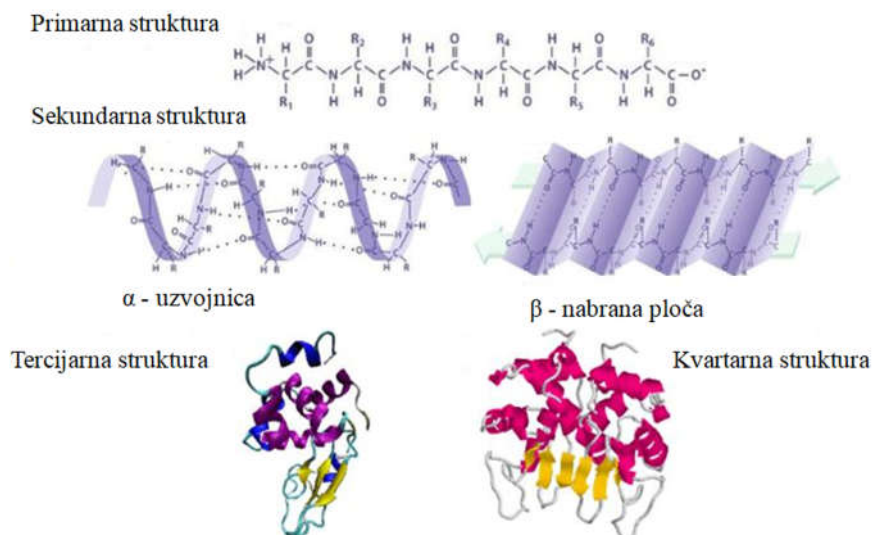
1.4.2. Primjena biljnih proteina kao nosača u inkapsulaciji

Osnove gradivne jedinice proteina su aminokiseline, građene od amino ($-\text{NH}_2$) i karboksilne ($-\text{COOH}$) skupine te bočnog lanca (R) vezanih za α ugljikov atom (Slika 13.) (Murray i sur., 2017; Lopez i Mohiuddin, 2024). Upravo R skupina određuje vrstu aminokiselina te njezina svojstva, poput polarnosti, kiselosti/bazičnosti, hidrofilnosti/hidrofobnosti, a posljedično utječe i na interakcije s drugim spojevima (Zhang i sur., 2024).



Slika 13. Osnovna struktura aminokiselina (Phillips, 2011)

Iako je do sada poznato oko 300 različitih aminokiselina, svega njih 20 gradi proteine. Međusobnim povezivanjem aminokiselina (peptidnim vezama) nastaju 4 različite strukturne organizacije proteina: primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna struktura (Slika 14.) (Widłak, 2013; Murray i sur., 2017; LaPelusa i Kaushik, 2022). Linearni redoslijed (sekvenca) aminokiselina povezanih peptidnim vezama predstavlja primarnu strukturu, a diktira sve ostale strukture. Međusobnim povezivanjem polipeptidnih lanaca vodikovim vezama mogu nastati α -uzvojnica (heliks) te β -nabrane ploče (paralelni ili antiparalelni ravni dijelovi polipeptida). Riječ je o prvoj razini prostorne organizacije značajne za stabilnost i funkcionalnost proteina. Ona olakšava daljnje savijanje u trodimenzionalnu (tercijarnu) strukturu. Ovdje dolazi do interakcija između R skupina različitih vrsta veza; vodikovim, ionskim, hidrofobnim te kovalentnim vezama. Tercijarna struktura određuje biološku funkciju proteina, kao posljedica interakcije s drugim spojevima. Posljednja, ujedno i najkompleksnija struktura, je kvartarna. Nastaje formiranjem proteinskog kompleksa od više polipeptidnih lanaca (podjedinica) (Widłak, 2013; Murray i sur., 2017; LaPelusa i Kaushik, 2022). Treba naglasiti kako tercijarna i kvartarna struktura imaju ključnu ulogu u interakcijama s polifenolima (Zhang i sur., 2024). Obzirom na strukturnu kompleksnost proteina, ne čudi njihov veliki broj bioloških funkcija; od enzima, imunoglobulina, hormona, promotora rasta, signalne transdukcije, kontrole permeabilnosti membrana, kontrakcije mišića (aktin i miozin) pa sve do strukture funkcije (keratin, elastin, kolagen) (Widłak, 2013).



Slika 14. Ilustrativni prikaz primarne, sekundarne, tercijarne i kvartarne strukture proteina
(Creative - Proteomics, 2024)

Primjena biljnih proteina u raznim aspektima prehrambene industrije predmet je mnogobrojnih istraživanja. Razlozi su višestruki; etička prihvatljivost, sve veća zabrinutost za dobrobit životinja, emisija stakleničkih plinova povezana s proizvodnjom proteina životinjskog porijekla i dr. (Shanthakumar i sur., 2022). Nerijetko se, kao najveći nedostatak biljnih proteina, navodi odsutnost esencijalnih aminokiselina - lizina, treonina, cistina te metionina. No, postoje iznimke, poput soje, graška i određenih žitarica (Kumar i sur., 2021; Langyan i sur., 2022).

Grašak (*Pisum sativum*) je druga najvažnija kultura iz porodice mahunarki (lat. *Fabaceae*), s prosječnim udjelom proteina od 20 - 25 % (Shanthakumar i sur., 2022). Prednosti proteina graška su višestruke: dostupnost, isplativost, antioksidacijska, antihipertenzivna i protuupalna svojstva, a svakako treba spomenuti i hipoalergenost (Liao i sur., 2019). Stoga se proteini graška koriste kao nosači u inkapsulaciji te proizvodnji fermentiranih proizvoda i sirnih masa zbog sposobnosti formiranja gelova, ali i jestivih filmova. Proteini graška se klasificiraju u 4 glavne kategorije: globulini (65 - 80 %), albumini (10 - 20 %), prolamin te glutelin (Lam i sur., 2018; Shanthakumar i sur., 2022). Globulini su temeljni skladišni proteini, a u tu kategoriju svrstavaju se legumin, vicilin te konvicilin. Legumin je heksamerni protein čiju kvartarnu strukturu stabiliziraju elektrostatske, disulfidne i hidrofobne interakcije. Sastoji se od 6 podjedinica povezanih nekovalentnim vezama. Povezanost između β- i α-lanaca osigurana je disulfidnim vezama. Nadalje, s vanjske strane molekule se nalaze hidrofilni β-lanci, a s unutrašnje strane hidrofobni dijelovi. Zanimljiva je varijabilnost između lanaca. Naime, β-lanac započinje leucinom i sadrži pretežno glutaminsku kiselinu, dok je α-lanac bogat alaninom,

valinom i leucinom te na N-terminalu sadrži glicin (Reinkensmeier i sur., 2015; Warnakulasuriya i Nickerson, 2018; Shanthakumar i sur., 2022). Vicilin je heterogena smjesa polipeptida, bez cisteinskih ostataka, čime je onemogućeno povezivanje disulfidnim vezama. Posljedično, koncentracija aminokiselina koje sadrže sumpor (metionin, cistein) je niska, dok je onih bazičnih (arginin, lizin) te kiselih (asparaginska i glutaminska kiselina) visoka. Upravo su legumin i vicilin važni u inkapsulaciji, odnosno formiranju protein/polifenol kompleksa (Islam i sur., 2023). Dodatno, eksperimentalna istraživanja pokazala su da proteini graška mogu formirati stabilne komplekse s polifenolima poput katehina, pri čemu prevladavaju hidrofobne interakcije i vodikove veze, što dovodi do poboljšane strukturne organizacije, jačanja antioksidacijske aktivnosti te unaprjeđenja tehnoloških svojstava poput emulgiranja i pjenjenja (Zhang i sur., 2022).

Karakteristike proteina riže (*Oryza sativa*) su odsutnost glutena, visoka biološka vrijednost, niska alergenost, antihipertenzivna, antioksidacijska, antikancerogena te antiadipozna svojstva (Yang i sur., 2023). Proteini riže dijele se u četiri osnovne frakcije na temelju njihove topljivosti: glutelini (topljivi u lužinama), albumini (topljivi u vodi), globulini (topljivi u otopinama soli) i prolamini (topljivi u alkoholu). Analize sastava pokazuju da se u glutelini najzastupljeniji (75 - 81 %), dok su albumini prisutni u 5 - 10 %, globulini u 7 - 17 %, a prolamini u 3 - 6 % (Jayaprakash i sur., 2022). Ukupna svojstva proteina riže uvelike su određena glutelinom. Naime, njihova slaba topljivost u vodi primarno se pripisuje prisutnosti brojnih vodikovih veza unutar i između molekula. Te veze nastaju uslijed interakcije amidnih skupina aminokiselina glutaminske i asparaginske kiseline s manjim aminokiselinama, poput glicina i alanina, pri čemu prostorne prepreke dodatno ograničavaju mogućnost vezanja vode (Yang i sur., 2023). Proteini riže pokazuju sposobnost formiranja stabilnih kompleksa s polifenolima, osobito s hidrofilnim spojevima poput fenolnih kiselina i flavonoida, pri čemu ključnu ulogu imaju hidrofobne interakcije i vodikove veze. Takva nekovalentna interakcija dovodi do promjena u konformaciji proteina, povećanja toplinske stabilnosti, poboljšanja antioksidacijskih svojstava te potencijalne primjene u sustavima isporuke bioaktivnih spojeva (Huang i sur., 2024).

Proteini badema (*Prunus dulcis*) dobivaju se kao nusproizvod prerade badema i sve se više koristi u prehrambenoj industriji zbog svoje dobre nutritivne vrijednosti, povoljne aminokiselinske ravnoteže te poželjnih funkcionalnih svojstava poput pjenjenja, emulgiranja i geliranja (Ahrens i sur., 2025). U sastavu proteina badema dominiraju albumini i globulini, pri čemu upravo globulinske frakcije pokazuju najveći tehnološki potencijal (Ahrens i sur., 2025). Analize strukture ukazuju na prisutnost velikog broja hidrofilnih i hidrofobnih aminokiselina

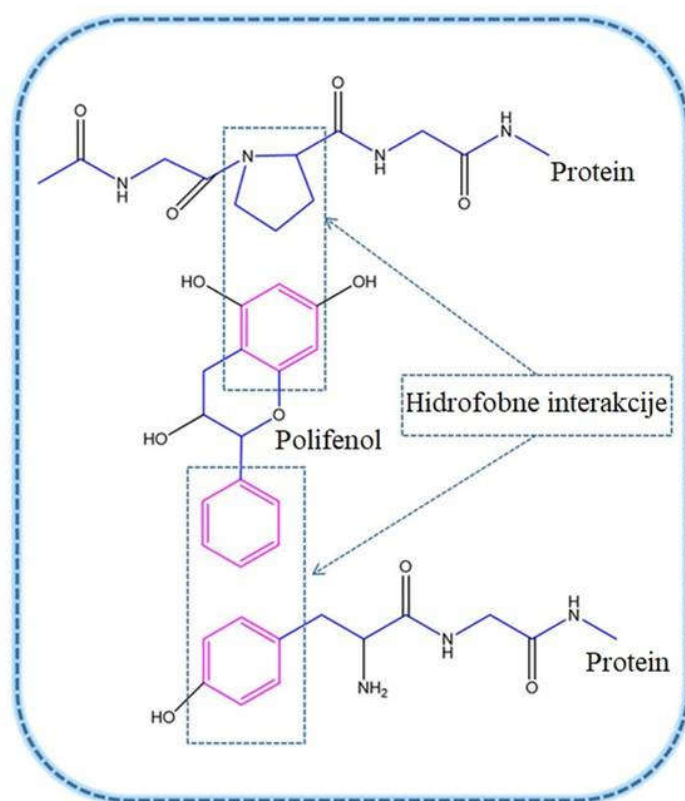
koje omogućuju interakcije s različitim bioaktivnim spojevima (Ahrens i sur., 2025). Posebno je značajna sposobnost proteina badema da veže polifenole, osobito fenolne kiseline, putem nekovalentnih interakcija. Jia i suradnici (2021) dokazali su da se fenolne kiseline vežu na proteine badema uz prevladavajuću ulogu hidrofobnih interakcija i vodikovih veza, što rezultira promjenama u sekundarnoj strukturi proteina i povećanjem antioksidacijskih svojstava kompleksa (Jia i sur., 2021). FTIR i CD spektroskopija potvrđuju da dolazi do smanjenja α -uzvojnica te povećanja β -struktura i nepravilnih struktura, što ukazuje na reorganizaciju proteinskog matriksa (Jia i sur., 2021). Osim toga, kompleksi proteina badema i fenolnih kiselina, poput cimetine kiseline, pokazali su povećanu toplinsku stabilnost u odnosu na čiste proteine, što ih čini pogodnim matriksom za isporuku bioaktivnih tvari u funkcionalnim prehrambenim formulacijama (Kopjar i sur., 2021). Ta svojstva potvrđuju potencijal proteina badema kao učinkovitog nosača za stabilizaciju i zaštitu bioaktivnih spojeva uključujući fenole i fenolne kiseline.

1.4.3. Interakcije proteina i polifenola

Do interakcije proteina i polifenola dolazi tijekom procesa skladištenja, transporta i prerade prehrambenih proizvoda (Zhang i sur., 2024), ali i ciljano tijekom procesa inkapsulacije. Navedene interakcije bazirane su na dvjema temeljnim vrstama veza: nekovalentnim i kovalentnim. Nekovalentne interakcije odvijaju se pomoću reverzibilnih sila. S druge strane, kovalentne interakcije uključuju stvaranje trajnih veza između proteina i fenola, što se odvija pod specifičnim uvjetima poput alkalne sredine ili prisutnosti enzima koji oksidiraju fenole (Yildirim-Elikoglu i Erdem, 2018; Zhang i sur., 2021; Zhang i sur., 2024).

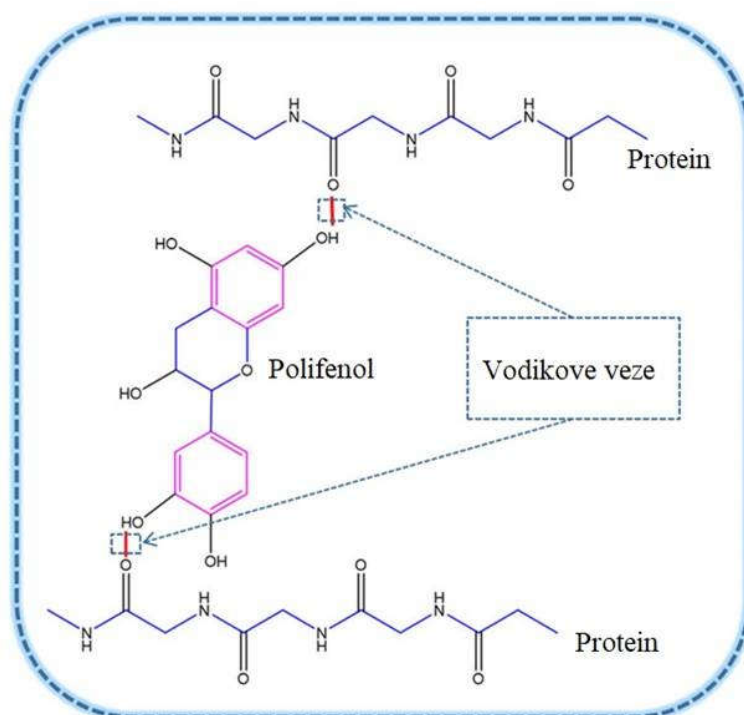
U određenim uvjetima osobito tijekom tehnološke obrade hrane poput zagrijavanja, alkalnih uvjeta, prisutnosti enzima ili slobodnih radikala može doći do stvaranja kovalentnih veza. Te interakcije uključuju formiranje reaktivnih međuprodukata, poput kinona i semikinona, koji se vežu za bočne lance aminokiselina (poput metionina, lizina, tirozina i cisteina), tvoreći čvrste, nepovratne kovalentne veze. Enzimski posredovane reakcije uključuju enzime poput lakaze i tirozinaze, koji kataliziraju oksidaciju fenola, omogućujući njihovo vezanje s proteinima. Kovalentne veze karakterizira veća čvrstoća i ireverzibilnost u usporedbi s nekovalentnima. Obje vrste veza značajno utječu na funkcionalna svojstva proteina i polifenola, no kovalentno vezani kompleksi pokazuju veću stabilnost (Ozdal i sur., 2013; Zhang i sur., 2024).

Nekovalentne interakcije predstavljaju dominantan mehanizam vezanja između proteina i polifenola u mnogim prehrambenim sustavima, osobito pri blagim tehnološkim uvjetima, poput sobne temperature i neutralnog pH. Te interakcije temelje se na reverzibilnim silama koje uključuju vodikove veze, hidrofobne interakcije, elektrostatske sile i Van der Waalsove sile, a njihov intenzitet i stabilnost ovise o kemijskim svojstvima uključenih molekula (npr. strukturi i polaritetu) te uvjetima okoliša poput pH, temperature i ionske jakosti (Ozđal i sur., 2013; Li i sur., 2021).



Slika 15. Hidrofobne interakcije između proteina i polifenola (Li i sur., 2021).

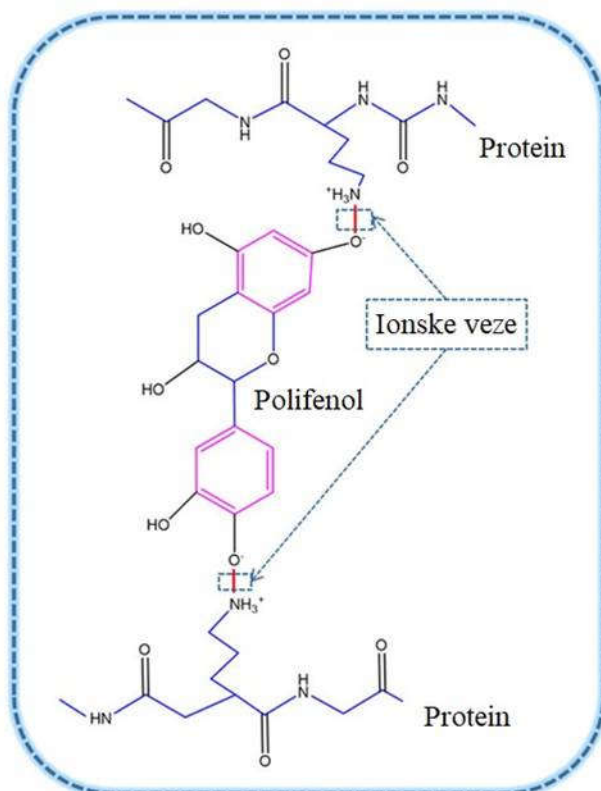
Hidrofobne interakcije (Slika 15.) nastaju kada nepolarne skupine aminokiselina (npr. valin, leucin, izoleucin) u proteinskoj strukturi stupaju u kontakt s aromatskim prstenovima polifenola. Ova vrsta vezanja osobito je izražena kod flavonoida poput kvercetina i katehina, koji imaju velike planarne molekule s izraženim hidrofobnim karakterom. Takve interakcije pridonose formiranju kompleksa koji su stabilni, ali istovremeno reverzibilni, što je povoljno za primjene u prehrambenim sustavima gdje je poželjna kontrolirana dostupnost polifenola (Ozđal i sur., 2013; Kieserling i sur., 2021).



Slika 16. Vodikove veze između proteina i polifenola (Li i sur., 2021).

Vodikove veze (Slika 16.) nastaju između hidroksilnih skupina polifenola i polarnih skupina na bočnim lancima aminokiselina (npr. serina, treonina, glutamina, asparagina), ali i peptidne okosnice proteina. Broj i raspored hidroksilnih skupina na polifenolu, kao i fleksibilnost proteinske konformacije, izravno utječu na broj i stabilnost formiranih vodikovih veza (Li i sur., 2021). Ove interakcije često se uočavaju u spektroskopskim analizama poput FTIR-a, gdje promjene u području od 3600 do 3200 cm^{-1} (O-H i N-H vibracije) ukazuju na prisutnost takvih veza u kompleksima (Li i sur., 2022).

Ionske veze su elektrostatske interakcije (Slika 17.) između nabijenih skupina proteina (npr. -NH_3^+ i -COO^-) i fenolnih aniona, osobito u uvjetima gdje su proteini djelomično ionizirani (ovisno o pH-u i točki izoelektričnosti). Na primjer, u blago alkalnim uvjetima, fenolne skupine mogu izgubiti proton, čime nastaju negativno nabijeni ioni koji se privlače pozitivno nabijenim dijelovima proteina, kao što su lizin ili arginin (Yilmaz i sur., 2022).



Slika 17. Ionske veze između proteina i polifenola (Li i sur., 2021).

Osim toga, Van der Waalsove sile, iako slabije u odnosu na ostale, pridonose ukupnoj stabilnosti kompleksa, osobito kad je riječ o velikim molekulama s bliskim prostornim kontaktom.

Nekovalentne interakcije ne narušavaju trajno strukturu proteina, ali mogu izazvati konformacijske promjene. Takve promjene mogu povećati dostupnost veznih mjesta i pojačati funkcionalna svojstva kompleksa, poput poboljšane toplinske stabilnosti i očuvanja antioksidacijske aktivnosti (Kieserling i sur., 2021; Yilmaz i sur., 2022). Upravo su takvi reverzibilni i prilagodljivi kompleksi ključni za inkapsulaciju i kontrolirano oslobađanje polifenola u funkcionalnim prehrambenim proizvodima.

Za razliku od kovalentnih veza, nekovalentne interakcije omogućuju dinamične, pH-osjetljive i toplinski ovisne komplekse, što ih čini iznimno pogodnima za primjenu u sustavima gdje se želi zadržati bioraspoloživost polifenola, ali istovremeno osigurati određena funkcionalna svojstva matriksa (Li i sur., 2021; Li i sur., 2023).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati stabilnost bioaktivnih dodataka hrani na bazi biljnih proteina (proteina riže, proteina graška i proteina badema) i polifenola soka višnje.

Postavljene hipoteze istraživanja bile su:

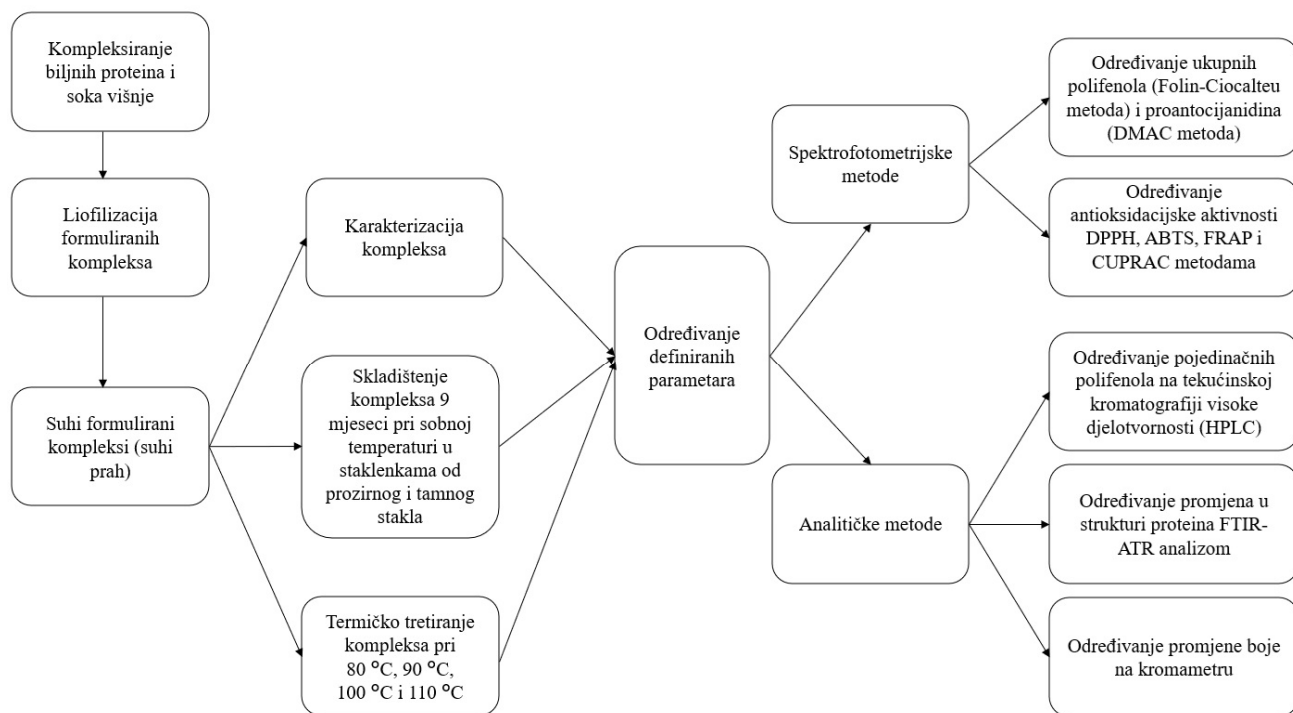
1. Odabrani proteini se mogu primijeniti kao nosači polifenola soka višnje za formuliranje bioaktivnih dodataka hrani odnosno kompleksa;
2. Vrsta proteinskog matriksa utječe na sposobnost vezanja polifenola soka višnje;
3. Formulirani kompleksi posjeduju antioksidacijsku aktivnost;
4. Vezanje polifenola soka višnje na proteine uzrokuje strukturne promjene proteina;
5. Vrsta proteinskog matriksa utječe na stabilnost polifenola, antioksidacijsku aktivnost i boju tijekom skladištenja kompleksa;
6. Vrsta proteinskog matriksa utječe na stabilnost polifenola, antioksidacijsku aktivnost i boju tijekom termičkog tretiranja kompleksa.

Kako bi testirali hipoteze postavljeni su određeni ciljevi istraživanja, a oni su bili:

1. Ispitati mogućnost primjene različitih biljnih proteina (proteina graška, proteina riže i proteina badema) kao nosača polifenola soka višnje u svrhu pripreme bioaktivnih dodataka hrani odnosno kompleksa;
2. Ispitati antioksidacijsku aktivnost formuliranih kompleksa;
3. Odrediti parametre boje formuliranih kompleksa;
4. Odrediti strukturne promjene na proteinima nakon vezivanja polifenola soka višnje;
5. Ispitati utjecaj uvjeta skladištenja kompleksa na udio polifenola, antioksidacijsku aktivnost i parametre boje te odrediti strukturne promjene;
6. Ispitati utjecaj termičkog tretiranja kompleksa na udio polifenola, antioksidacijsku aktivnost i parametre boje te odrediti strukturne promjene.

3. MATERIJALI I METODE

U istraživanju kao nosači polifenolnih spojeva korišteni su biljni proteini, a sok višnje kao izvor polifenola. Shematski prikaz rada prikazan je na Slici 18. U Tablicama 4. i 5. nalazi se popis korištenih materijala i kemikalija.



Slika 18. Shematski prikaz istraživanja

Tablica 4. Popis korištenog materijala za pripremu uzoraka

Materijal	Proizvođač
Proteini badema (udio proteina 50%, a vlakana 15%)	Biovega d.o.o., Zagreb, Hrvatska
Proteini riže (udio proteina 85%)	Biovega d.o.o., Zagreb, Hrvatska
Proteini graška (udio proteina 85%)	Biesterfeld, Lügde, Njemačka
Sok višnje	Lokalni proizvođač iz okolice Varaždina; Remetinec, 46°18'06.4"N 16°33'15.8"E

Tablica 5. Popis korištenih kemikalija za pripremu uzoraka

Materijal	Proizvođač
2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), SAD
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), SAD
2,4,6-tripiridil-s-tirazin (TPTZ)	Acros Organics (Geel), Belgija
4-(dimetilamino)-cinamaldehid (DMAC)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), SAD
Amonij acetat	Gram-mol (Zagreb), Hrvatska
Bakar(II) klorid	Acros Organics (Geel), Belgija
Cijanidin-3-rutinozid	Extrasynthese (Genay), Francuska
Etanol	Gram-mol (Zagreb), Hrvatska
Folin-Ciocalteu reagens	Carlo Erba Reagents (Sabadell), Španjolska
Galna kiselina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), SAD
Klorogenska kiselina	Acros Organics (Geel), Belgija
Klorovodična kiselina	Panreac (Barcelona), Španjolska
Kvercetin	Extrasynthese (Genay), Francuska
Kvercetin-3-rutinozid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), SAD
Metanol	J.T. Baker (Deventer), Nizozemska
Natrij karbonat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), SAD
Neoklorogenska kiselina	Extrasynthese (Genay), Francuska
Neokuproin	Acros Organics (Geel), Belgija
Orto-fosforna kiselina	Fisher Scientific (Loughborough), UK
<i>p</i> -kumarinska kiselina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), SAD
Procijanidin B2	Extrasynthese (Genay), Francuska
Trolox	Acros Organics (Geel), Belgija
Željezo(III) klorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), SAD

3.1. Priprema kompleksa proteina i polifenola

Kompleksi proteina i polifenola pripremljeni su miješanjem soka višnje s biljnim proteinima badema (BP), proteinima riže (RP) i proteinima graška (GP) pri čemu je udio proteina iznosio 10 % u odnosu na ukupnu masu smjese (m/m). Sok višnje bio je termički obrađen radi inaktivacije enzima 3 minute na 90 °C.

Proces kompleksiranja proveden je na sobnoj temperaturi na magnetskoj miješalici u vremenskom periodu od 15 minuta, uz konstantnu brzinu miješanja od 600 rpm. Nakon miješanja, dobivena smjesa je centrifugirana 15 minuta na 8000 rpm s ciljem odvajanja krute od tekuće faze. Kruta faza dobivena centrifugiranjem je zamrznuta na -18 °C tijekom 24 sata. Nakon zamrzavanja, uzorci su osušeni liofilizacijom u laboratorijskom liofilizatoru (Christ Freeze Dryer, Alpha 1-4, Njemačka), te je dobiven suhi kompleks. Uvjeti liofilizacije bili su sljedeći: temperatura zamrzavanja iznosila je -55 °C, a temperatura sublimacije se kretala u

rasponu od -35 °C do 0 °C pod vakuumom od 0,220 mbar. U završnoj fazi izotermne desorpcije temperatura je varirala od 0 °C do 22 °C pri vakuumu od 0,090 mbar. Cijeli proces sušenja trajao je 10 sati s ciljem potpunog uklanjanja vode, te dobivanja stabilnih suhih kompleksa, njihov popis je prikazan u Tablici 6.

Tablica 6. Popis kompleksa i njihova oznaka

Kompleks	Oznaka za kompleks
Proteini badema sa sokom višnje	BP/V
Proteini riže sa sokom višnje	RP/V
Proteini graška sa sokom višnje	GP/V

3.2. Skladištenje kompleksa

Dio dobivenih kompleksa BP/V, RP/V i GP/V (suhi prah) stavljen je na skladištenje pri sobnoj temperaturi u staklene bočice od prozirnog i tamnog stakla. Uzorci su uzorkovani periodično svaka 3 mjeseca (ukupno 9 mjeseci).

3.3. Termičko tretiranje kompleksa

Proteini (badema, riže i graška) i njihovi kompleksi (BP/V, RP/V i GP/V) termički su se tretirali u epruveti na određenoj temperaturi sat vremena. Analiza je provedena u termičkom bloku (Chombithrm-2, CH 3-150, Biosan). Blok je bio zagrijan na odgovarajuće temperature odnosno na 80 °C, 90 °C, 100 °C i 110 °C, a potom su dodani uzorci. Nakon inkubacije u termičkom bloku tijekom 60 minuta, uzorci su ohlađeni na ledu do sobne temperature.

Promjena koncentracije pojedinačnih polifenolnih spojeva uslijed termičkog tretiranja izračunata je kao pokazatelj njihove degradacije. Degradacija svakog spoja izražena je u postotku u odnosu na početnu koncentraciju, prema sljedećoj formuli:

$$\text{Degradacija (\%)} = [(C_0 - C_t) / C_0] * 100$$

Gdje je:

C_0 - početna koncentracija spoja (mg/kg)

C_t - koncentracija nakon termičkog tretiranja (mg/kg)

U slučajevima kada je izračunata vrijednost bila negativna ($C_t > C_0$), vrijednost je prikazana kao pozitivan postotak promjene.

Kako bi se odredila temperaturna ovisnost brzine degradacije polifenolnih spojeva, izračunata je energija aktivacije (E_a) za pojedine polifenolne spojeve na temelju Arrheniusove jednadžbe.

Izračun konstante brzine degradacije (k):

$$k = - (1/t) * \ln (C_t/C_0)$$

Gdje je:

k - konstanta brzine degradacije (min^{-1})

t - vrijeme termičkog tretiranja (izraženo u minutama, $t = 60$)

C_0 - početna koncentracija spoja (mg/kg)

C_t - koncentracija spoja nakon termičkog tretiranja (mg/kg)

Izračun vremena poluraspada ($t_{1/2}$):

$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

Gdje je:

$t_{1/2}$ - vrijeme poluraspada (min)

k - konstanta brzine degradacije (min^{-1})

Za određivanje nagiba pravca regresijske linije ($\ln(k)$ u odnosu na $1/T$), korištena je standardna formula linearne regresije:

$$\text{Nagib pravca} = [n * \sum(x_i * y_i) - \sum x_i * \sum y_i] / [n * \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2]$$

Gdje je:

n - broj podataka (u ovom slučaju 4)

x_i - vrijednosti $1/T$ (recipročne vrijednosti temperature u kelvinima)

y_i - vrijednosti $\ln k$

$\sum(x_i * y_i)$ - zbroj umnožaka x_i i y_i

$\sum x_i$ - zbroj svih vrijednosti x_i

$\sum y_i$ - zbroj svih vrijednosti y_i

$\sum x_i^2$ - zbroj kvadrata svih x_i vrijednosti

Dobivena vrijednost nagiba pravca koristi se za izračun energije aktivacije (E_a) prema izrazu:

$$E_a = (-\text{nagib pravca} * R)/1000$$

Gdje je:

E_a - energija aktivacije u kJ/mol

R - plinska konstanta = 8,314 J/molK

Podjela s 1000 služi za pretvorbu J/mol u kJ/mol

3.4. Ekstrakcija

Kao ekstrakcijsko otapalo, za ekstrakciju polifenola iz kompleksa, primijenjen je zakiseljeni metanol (omjer metanol:HCl 99:1 (v/v)). U plastičnu epruvetu je odvagano oko 200 mg suhog praha uzorka i otpipetirano 5 mL ekstrakcijskog otapala. Dobivena smjesa je ultrazvučno tretirana tijekom 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, smjesa je centrifugirana 15 minuta pri 8000 rpm. Supernatant je odvojen u zasebnu epruvetu, a zaostali talog je ponovno ekstrahiran pomoću 2 mL ekstrakcijskog otapala. Postupak ultrazvučne obrade i centrifugiranja ponovljen je kao u prethodnom koraku. Dobiveni supernatant spojen je s prvobitnim. Tako dobiveni ekstrakti upotrijebljeni su za daljnje analize, odnosno za provođenje spektrofotometrijskih analiza i određivanje pojedinačnih polifenola primjenom HPLC-a.

3.5. Određivanje ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijskom metodom prema Singletonu i Rossiju (1965), uz manje prilagodbe. U staklenu epruvetu otpipetirano je 0,1 mL ekstrakta, zatim dodano 0,9 mL destilirane vode, 5 mL razrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa (1:10) i 4 mL otopine natrijevog karbonata. Smjesa je homogenizirana i inkubirana 120 minuta na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Slijepa proba pripremljena je zamjenom uzorka s destiliranom vodom. Apsorbancija je izmjerena na 765 nm pomoću UV-Vis spektrofotometra (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Kalibracijska krivulja izrađena je pomoću standardnih otopina galne kiseline, a rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu uzorka (mg GAE/g). Za analizu su provedena tri mjerenja.

3.6. Određivanje proantocijanidina

Količina proantocijanidina u pripremljenim ekstraktima određena je primjenom DMAC metode, prema protokolu koji su opisali Prior i suradnici (2010). U staklenu epruvetu otpipetirano je 0,5 mL ekstrakta te 1 mL DMAC (4-dimetilamino-cinamaldehyd) reagensa, nakon čega je reakcijska smjesa inkubirana na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Apsorbancija je izmjerena na 640 nm pomoću UV-Vis spektrofotometra. Kvantifikacija je provedena prema kalibracijskoj krivulji pripremljenoj pomoću standardnih

otopina proantocijanidina B2. Za analizu su provedena tri mjerenja, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata proantocijanidina B2 po g uzorka (mg PB2E/g).

3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je primjenom četiri metode: DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC, a apsorbancija je izmjerena na UV-Vis spektrofotometru. Za analizu su provedena tri mjerenja. Kalibracijski pravci izrađeni su pomoću standardnih otopina Trolox-a unutar validiranih koncentracijskih raspona za svaku pojedinu metodu. Rezultati su izraženi kao μmol ekvivalenata Troloxa po 100 g uzorka ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$).

Sposobnost neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikala određena je metodom prema Brand-Williams i suradnika (1995). Za analizu je pomiješano 0,2 mL ekstrakta s 3,0 mL DPPH otopine. Smjesa je inkubirana tijekom 15 minuta na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi, nakon čega je izmjerena apsorbancija na 517 nm.

Sposobnost neutralizacije 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS^{•+}) radikala određena je primjenom metode s ABTS otopinom, prema protokolu Arnao i suradnici (2001). Za analizu je pomiješano 0,2 mL uzorka s 3,2 mL ABTS otopine. Smjesa je inkubirana tijekom 95 minuta na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi, nakon čega je izmjerena apsorbancija pri 734 nm.

Sposobnost redukcije trovalentnog željeza (Fe^{3+}) u dvovalentni oblik (Fe^{2+}) određena je prema FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) metodi opisanoj kod Benzie i Strain (1996). Za analizu u epruvetu je dodano 0,2 mL ekstrakta i 3,0 mL FRAP otopine. Smjesa je inkubirana tijekom 30 minuta na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi, nakon čega je izmjerena apsorbancija na 593 nm.

Sposobnost redukcije kompleksa bakar(II)-neokuproin u bakar(I)-neokuproin određena je primjenom CUPRAC metode (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) prema metodi Apak i suradnici (2004). Za analizu u epruvetu je dodano 1 mL otopine bakar (II) klorida, 1 mL otopine neokuproina i 1 mL otopine amonij acetata, potom je dodano 0,2 mL uzorka i 0,9 mL destilirane vode. Reakcijska smjesa je homogenizirana i inkubirana 30 minuta na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi, nakon čega je izmjerena apsorbancija na 450 nm.

3.8. HPLC analiza pojedinačnih polifenola

Za identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih polifenolnih spojeva prisutnih u ekstraktima pripremljenih kompleksa primijenjena je visoko djelotvorna tekućinska

kromatografija (HPLC) s detekcijom pomoću diodnog niza (DAD), prema metodi opisanoj kod Kopjar i suradnika (2021), uz određene prilagodbe specifične za primijenjene uzorke. Analize su provedene na sustavu 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), opremljenim kvaternom pumpom, kolonom za razdvajanje uzoraka i DAD detektorom. Odvajanje polifenolnih spojeva provedeno je na C18 koloni za razdvajanje (4,6 mm × 100 mm, 2,7 µm; Poroshell 120EC-C 18 kolona), koristeći gradijentni sustav eluenata. Za mobilnu fazu A korištena je 0,1 % ortofosforna kiselina, dok je mobilna faza B bio 100% metanol. Primijenjena gradijentna elucija je: 0 min 5 % B, 3 min 30 % B, 15 min 35 % B, 22 min 37 % B, 30 min 41 % B, 32 min 45 % B, 40 min 49 % B, 45 min 80 % B, 48 min 80 % B, 50 min 5 % B, 53 min 5 % B. Protok mobilne faze bio je 1 mL/min, a volumen injektiranja iznosio je 5 µL. Svi uzorci su prije analize filtrirani pomoću PTFE membranskog filtera (0,45 µm). UV-Vis spektri su snimljeni u području od 190 do 600 nm, a kvantitativna evaluacija provedena je na specifičnim valnim duljinama: 320 nm (fenolne kiseline), 360 nm (flavonoli) i 520 nm (antocijani). Identifikacija spojeva temeljila se na usporedbi vremena zadržavanja i UV-Vis spektra sa standardnim tvarima. Za potvrdu identiteta pojedinih spojeva korištena je metoda dodavanja standarda u uzorak. Kvantifikacija je izvršena primjenom metode vanjskog standarda. Standardne otopine pripremljene su u metanolu u različitim koncentracijama, a za izradu kalibracijskih pravaca korišteni su sljedeći spojevi: klorogenska kiselina, neoklorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kvercetin, kvercetin-3-rutinozid, cijanidin-3-rutinozid. Analize su provedene u dvostrukim ponavljanjima.

3.9. FTIR-ATR spektroskopija

Spektroskopijom u infracrvenom području s Fourierovom transformacijom uz tehniku prigušene totalne refleksije (FTIR-ATR) ispitane su strukturne promjene u uzorcima nakon kompleksiranja biljnih proteina s polifenolima soka višnje. Analiza je provedena korištenjem FTIR spektrometra Cary 630 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), opremljenog ATR dodatkom i pripadajućim softverom Micro Lab Expert.

Spektri su snimani u rasponu od 4000 cm⁻¹ do 600 cm⁻¹, a uzorci su aplicirani izravno na dijamantni kristal bez prethodne obrade. Usporedbom spektra čistih proteina i pripremljenih kompleksa omogućeno je praćenje potencijalnih pomaka valnih brojeva i promjena intenziteta koji ukazuju na promjene u strukturi proteina zbog adsorpcije polifenola višnje.

3.10. Analiza boje

Boja uzoraka određena je pomoću kromametra CR-400 (Konica Minolta, Inc., Osaka, Japan), koji mjeri reflektiranu svjetlost s površine uzorka pomoću osjetljivih silikonskih fotoćelija. Liofilizirani uzorci su ravnomjerno raspoređeni u posudici za mjerenje boje bez dodatne pripreme. U analizi je primijenjen CIELAB sustav boja, koji pruža rezultate slične percepciji ljudskog oka. Određene su vrijednosti L^* (svjetlina), a^* (crveno-zeleno) i b^* (žuto-plavo), kao i parametri zasićenje boje (C^*) i ton boje (h°). Ukupna promjena boje (ΔE) izračunata je na temelju izmjerenih vrijednosti L^* , a^* i b^* prema formuli:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Gdje su:

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

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

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

k - kontrolni uzorak

u - uspoređivani uzorak

Dobivene vrijednosti ΔE interpretirane su u skladu s percepcijom razlika u boji ljudskim okom, gdje vrijednosti $\Delta E < 1$ označavaju neprimjetne razlike, a $\Delta E > 3$ značajnije promjene. Ova metoda omogućuje praćenje promjena u boji uzoraka tijekom skladištenja te usporedbu utjecaja termičkog tretiranja na vizualna svojstva pripremljenih kompleksa. Svako mjerenje provedeno je u triplicatu.

3.11. Statistička analiza

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. Statistička obrada podataka provedena je pomoću softverskog paketa Statistica 13.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Analiza je provedena pomoću ANOVA testa uz razinu značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

Nakon kompleksiranja uzoraka biljnih proteina badema, riže i graška s polifenolima soka višnje, određene su početne vrijednosti ukupnih polifenola (UP), proantocijanidina (PANT) te antioksidacijska aktivnost. Ukupni polifenoli određeni su Folin-Ciocalteu metodom, dok su proantocijanidini analizirani korištenjem DMAC metode. Antioksidacijska aktivnost ispitana je pomoću četiri različite metode: DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC, kako bi se dobio što širi uvid u antioksidacijski potencijal ispitivanih kompleksa. U Tablici 7. prikazani su rezultati kompleksa nakon pripreme.

Tablica 7. Udio ukupnih polifenola (UP), proantocijanidina (PANT) i antioksidacijska aktivnost kompleksa nakon pripreme

komponente	kompleksi		
	BP/V	RP/V	GP/V
UP (mg/g)	16,15±0,40 ^a	14,79±0,37 ^b	14,95±0,33 ^b
PANT (mg/g)	3,38±0,31 ^a	1,09±0,03 ^b	1,17±0,04 ^b
DPPH (μmol/g)	30,39±0,75 ^a	30,52±0,04 ^a	31,24±0,99 ^a
ABTS (μmol/g)	72,37±0,36 ^a	65,64±0,59 ^b	66,65±0,75 ^b
FRAP (μmol/g)	97,33±0,23 ^a	93,92±0,93 ^c	96,14±0,14 ^b
CUPRAC (μmol/g)	168,89±3,04 ^a	147,98±3,96 ^b	160,74±1,46 ^b

BP/V: kompleks proteini badema/sok višnje; RP/V: kompleks proteini riže/sok višnje; GP/V: kompleks proteini graška/sok višnje; UP: ukupni polifenoli; PANT: proantocijanidin. Vrijednosti a-c u istom redu definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa nakon pripreme.

Kompleks BP/V imao je statistički najviši udio ukupnih polifenola (16,15 mg/g), dok su RP/V i GP/V imali statistički niže vrijednosti (14,79 mg/g i 14,95 mg/g). Kod kompleksa BP/V određena je statistički značajno viša početna vrijednost udjela proantocijanidina (3,38 mg/g) u odnosu na RP/V (1,09 mg/g) i GP/V (1,17 mg/g), koji nisu bili međusobno statistički različiti. Kod uzoraka nisu određene statistički značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti određenoj DPPH metodom, a početne vrijednosti iznosile su 30,39 μmol/g kod BP/V, 30,52 μmol/g kod RP/V i 31,24 μmol/g kod GP/V kompleksa. Antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom bila je statistički najviša kod BP/V (72,37 μmol/g), dok su RP/V i GP/V imali statistički iste vrijednosti te niže u odnosu na BP/V (65,64 i 66,65 μmol/g). FRAP metodom, kompleks BP/V imao je najveću početnu vrijednost antioksidacijske aktivnosti (97,33 μmol/g), slijedi GP/V s 96,14 μmol/g te RP/V s 93,92 μmol/g. Najviša vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom, bila je kod kompleksa BP/V (168,89 μmol/g), dok su kod RP/V i GP/V određene niže vrijednosti (147,98 i 160,74 μmol/g).

Za određivanje polifenolnog profila kompleksa nakon pripreme, primijenjena je visoko djelotvorna tekućinska kromatografija. U Tablici 8. prikazane su koncentracije (mg/kg) pojedinačnih polifenola: cijanidin-3-glukozil-rutinozid (C-3-G-R), cijanidin-3-rutinozid (C-3-R), kvercetin-3-rutinozid (K-3-R), kvercetin (K), klorogenska kiselina (KK), neoklorogenska kiselina (NKK), *p*-kumarinska kiselina (*p*-KK) i njezin derivat (d *p*-KK).

Tablica 8. Koncentracija (mg/kg) pojedinačnih polifenola na kompleksima nakon pripreme

komponente	kompleksi		
	BP/V	RP/V	GP/V
C-3-G-R	905,95±5,06 ^b	914,62±5,06 ^b	973,44±7,88 ^a
C-3-R	2184,90±8,35 ^c	2290,69±7,94 ^b	2378,73±5,43 ^a
K-3-R	231,51±2,03 ^a	200,34±0,18 ^b	200,82±2,53 ^b
K	125,89±1,46 ^b	175,12±1,74 ^a	173,83±0,78 ^a
KK	587,04±7,70 ^c	831,02±6,95 ^a	745,90±7,40 ^b
NKK	444,37±2,29 ^c	497,33±3,97 ^a	450,99±3,73 ^b
<i>p</i> -KK	204,38±3,68 ^c	447,66±3,54 ^a	390,76±0,72 ^b
d <i>p</i> -KK	623,12±2,16 ^c	769,61±4,39 ^a	683,81±0,53 ^b

BP/V: kompleks proteini badema/sok višnje; RP: kompleks proteini riže/sok višnje; GP: kompleks proteini graška/sok višnje; C-3-G-R: cijanidin-3-glukozil-rutinozid; C-3-R: cijanidin-3-rutinozid; K-3-R: kvercetin-3-rutinozid; K: kvercetin; KK: klorogenska kiselina; NKK: neoklorogenska kiselina; *p*-KK: *p*-kumarinska kiselina; d *p*-KK: derivat *p*-kumarinske kiseline. Vrijednosti a-c u istom redu definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa nakon pripreme.

Kompleks GP/V sadržavao je statistički najvišu koncentraciju C-3-G-R od 973,44 mg/kg, dok su kod BP/V i RP/V kompleksa određene niže i međusobno statistički jednake koncentracije (905,95 i 914,62 mg/kg). Koncentracija C-3-R također je bila statistički najviša kod GP/V kompleksa (2378,73 mg/kg), zatim kod RP/V (2290,69 mg/kg) te kod BP/V (2184,90 mg/kg), pri čemu su razlike između svih kompleksa bile statistički značajne. Najviša koncentracija K-3-R određena je kod BP/V kompleksa (231,51 mg/kg), dok su RP/V i GP/V imali statistički niže i međusobno jednake koncentracije (200,34 i 200,82 mg/kg). Suprotno tomu, najviše i statistički jednake koncentracije K su određene kod RP/V (175,12 mg/kg) i GP/V kompleksu (173,83 mg/kg), dok je kod BP/V određena statistički niža koncentracija (125,89 mg/kg). Od hidroksicimetnih kiselina, najviša koncentracija klorogenske kiseline određena je u RP/V kompleksu (831,02 mg/kg), zatim u GP/V (745,90 mg/kg) i BP/V (587,04 mg/kg), uz statistički značajne razlike među svim kompleksima. Isti trend statistički značajnih razlika među kompleksima određen je i kod neoklorogenske kiseline, s najvišom koncentracijom u RP/V (497,33 mg/kg), zatim u GP/V (450,99 mg/kg) te u BP/V (444,37 mg/kg). Kod *p*-kumarinske kiseline najviša koncentracija izmjerena je u RP/V kompleksu (447,66 mg/kg), zatim u GP/V (390,76 mg/kg) i BP/V (204,38 mg/kg), s jasno

izraženim statističkim razlikama između svih kompleksa. Derivat *p*-kumarinske kiseline također je bio najzastupljeniji u RP/V kompleksu (769,61 mg/kg), slijedi GP/V (683,81 mg/kg) te BP/V (623,12 mg/kg), pri čemu su razlike u koncentraciji među kompleksima bile statistički značajne.

Analiza boje provedena je u CIELAB sustavu. Promjene boje praćene su pomoću parametara: L* (svjetlina), a* (ton crveno - zelenog spektra), b* (ton žuto - plavog spektra), °h (ton boje u stupnjevima), C* (zasićenost boje) te ukupne promjene boje izražene kao ΔE. Nakon kompleksiranja određeni su početni parametri boje uzoraka kompleksa, a njihova boja uspoređena je s pripadajućim biljnim proteinom kako bi se procijenile promjene boje nakon kompleksiranja (ΔE*) (Tablica 9.).

Tablica 9. Parametri boje proteina i kompleksa nakon pripreme

Uzorci	Parametri					
	L*	a*	b*	ΔE*	°h	C*
BP	74,32±0,01	-1,19±0,02	19,93±0,01	-	93,42±0,03	19,97±0,01
RP	85,47±0,01	1,86±0,02	15,72±0,01	-	83,26±0,04	15,83±0,01
GP	79,78±0,01	2,85±0,01	19,91±0,02	-	81,84±0,04	20,11±0,01
BP/V	53,88±0,01	27,31±0,03	0,63±0,03	40,03	1,34±0,06	27,31±0,03
RP/V	57,56±0,02	25,99±0,03	0,07±0,02	40,08	0,16±0,04	25,99±0,03
GP/V	44,60±0,01	25,15±0,01	-0,04±0,02	46,19	359,90±0,04	25,15±0,01

BP: proteini badema; RP: proteini riže; GP: proteini graška; BP/V: kompleks proteini badema/sok višnje; RP/V: kompleks proteini riže/sok višnje; GP/V: kompleks proteini graška/sok višnje; ΔE*:promjena boje kompleksa u odnosu na proteine.

Nakon pripreme, kompleks BP/V imao je vrijednost L* od 53,88, što ukazuje na značajno tamniju boju u usporedbi s proteinom badema (74,32). Parametar a* povećao se s negativne vrijednosti (-1,19) na 27,31 što ukazuje na pomak prema crvenom spektru. Parametar b* se smanjio s 19,93 na 0,63, što ukazuje na gubitak žute komponente. Parametar zasićenosti (C*) povećao se s 19,97 na 27,31, a ton boje (°h) se značajno smanjio sa 93,42° na 1,34°. Ukupna promjena boje u odnosu na proteine badema (ΔE*) iznosila je 40,03. Kod kompleksa RP/V, vrijednost L* smanjila se s 85,47 na 57,56, što ukazuje na tamniju boju u odnosu na proteine riže. Vrijednost a* povećala se s 1,86 na 25,99, a vrijednost b* se smanjila s 15,72 na 0,07. Zasićenost boje C* povećala se s 15,83 na 25,99, dok se ton boje (°h) smanjio s 83,26° na 0,16°. Ukupna promjena boje (ΔE*) u odnosu na proteine riže bila je 40,08. U slučaju kompleksa GP/V, vrijednost L* smanjila se s 79,78 na 44,60, što ukazuje na najveće smanjenje svjetline među svim kompleksima. Vrijednost a* povećala se s 2,85 na 25,15, dok se b*

smanjila s 19,91 na -0,04. Parametar C* povećao se s 20,11 na 25,15, ton boje također se povećao s 81,84° na 359,90°. Ukupna promjena boje (ΔE^*) u odnosu na proteine graška iznosila je 46,19, što je ujedno bila i najveća ΔE^* među svim ispitivanim kompleksima.

4.1. STABILNOST KOMPLEKSA TIJEKOM SKLADIŠTENJA

4.1.1. Utjecaj skladištenja na polifenole i antioksidacijsku aktivnost

U ovom dijelu rezultata prikazani su podaci o promjenama udjela ukupnih polifenola, proantocijanidina, antioksidacijske aktivnosti i pojedinačnih polifenola u kompleksima proteina badema, riže i graška s polifenolima soka višnje tijekom skladištenja. Uzorci su bili skladišteni u bočicama od prozirnog stakla (S) i u bočicama od tamnog stakla (T) kroz razdoblje od 9 mjeseci, a analize su provedene nakon 3, 6 i 9 mjeseci skladištenja. Rezultati dobiveni tijekom skladištenja uspoređeni su s početnim vrijednostima (0) određenima neposredno nakon pripreme kompleksa.

Tablica 10. Udio ukupnih polifenola (UP) i proantocijanidina (PANT) u kompleksima tijekom skladištenja

Uzorci	Vrijeme skladištenja (mjeseci)				
		0	3	6	9
UP (mg/g)					
BP/V	S	16,15±0,40 ^a	16,05±0,21 ^a	15,08±0,29 ^b	14,96±0,04 ^b
	T		16,13±0,19 ^a	15,34±0,11 ^b	15,10±0,18 ^b
RP/V	S	14,79±0,37 ^a	13,90±0,31 ^b	12,31±0,25 ^c	11,46±0,10 ^c
	T		14,46±0,35 ^{ab}	13,04±0,21 ^c	12,37±0,17 ^c
GP/V	S	14,95±0,33 ^a	14,14±0,32 ^{ab}	14,11±0,25 ^{ab}	13,65±0,17 ^c
	T		14,13±0,18 ^{ab}	14,23±0,18 ^{ab}	13,83±0,25 ^{ab}
PANT (mg/g)					
BP/V	S	3,38±0,31 ^a	3,26±0,05 ^a	3,03±0,03 ^{bc}	2,29±0,01 ^d
	T		3,26±0,08 ^a	3,16±0,04 ^{ab}	2,97±0,10 ^c
RP/V	S	1,09±0,03 ^a	1,01±0,07 ^a	0,95±0,08 ^a	0,74±0,04 ^d
	T		1,09±0,09 ^a	0,98±0,09 ^a	0,82±0,01 ^c
GP/V	S	1,17±0,04 ^a	1,14±0,06 ^a	0,91±0,07 ^b	0,77±0,01 ^d
	T		1,19±0,05 ^a	0,92±0,06 ^b	0,86±0,04 ^c

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla; BP/V: kompleks proteini badema/sok višnje; RP/V: kompleks proteini riže/sok višnje; GP/V: kompleks proteini graška/sok višnje; UP: ukupni polifenoli; PANT: proantocijanidin. Vrijednosti a-c u istom redu definiraju statistički značajnu razliku tijekom skladištenja.

Tablica 10. prikazuje udio ukupnih polifenola i proantocijanidina u kompleksima tijekom skladištenja. U kompleksu BP/V, nakon 3 mjeseca skladištenja nije utvrđena statistički značajna promjena udjela ukupnih polifenola u odnosu na početnu vrijednost (16,15 mg/g), ni

u prozirnim (16,05 mg/g) ni u tamnim bočicama (16,13 mg/g). Nakon 6 mjeseci došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije UP u obje varijante skladištenja, 15,08 mg/g (S) i 15,34 mg/g (T). Do kraja skladištenja, nakon 9 mjeseci izmjerene koncentracije bile su 14,96 mg/g (S) i 15,10 mg/g (T), uz statistički značajnu razliku u odnosu na početnu vrijednost, no bez statistički značajne razlike u odnosu na 6 mjeseci skladištenja. Kod RP/V kompleksa, već nakon 3 mjeseca skladištenja u prozirnim bočicama utvrđeno je statistički značajno smanjenje udjela ukupnih polifenola s početnih 14,79 mg/g na 13,90 mg/g. U tamnim bočicama nije utvrđena statistički značajna razlika, a izmjerena vrijednost iznosila je 14,46 mg/g. Nakon 6 mjeseci došlo je do daljnjeg smanjenja koncentracije: 12,31 mg/g (S) i 13,04 mg/g (T), uz statistički značajne razlike u odnosu na početni uzorak. Najniže vrijednosti određene su nakon 9 mjeseci: 11,46 mg/g (S) i 12,37 mg/g (T). U GP/V kompleksu, nakon 3 mjeseca skladištenja izmjerene koncentracije ukupnih polifenola iznosile su 14,14 mg/g (S) i 14,13 mg/g (T), bez statistički značajne razlike u odnosu na početnu vrijednost (14,95 mg/g). Nakon 6 mjeseci vrijednosti su bile stabilne 14,11 mg/g (S) i 14,23 mg/g (T), međutim, nakon 9 mjeseci u prozirnim bočicama određeno je statistički značajno smanjenje na 13,65 mg/g, dok u tamnim bočicama izmjerena vrijednost (13,83 mg/g) nije bila statistički različita od početne.

Kod udjela proantocijanidina u BP/V kompleksu u prva 3 mjeseca skladištenja nije bilo značajne promjene. Izmjerene su jednake vrijednosti od 3,26 mg/g za prozirne i tamne bočice, koje su statistički jednake početnoj vrijednosti (3,38 mg/g). Nakon 6 mjeseci došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije u prozirnim bočicama 3,03 mg/g, dok kod bočica od tamnog stakla nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na početni uzorak 3,16 mg/g. Nakon 9 mjeseci skladištenja određeno je statistički značajno smanjenje udjela PANT na 2,29 mg/g (S) i 2,97 mg/g (T). U RP/V kompleksu početna koncentracija PANT bila je 1,09 mg/g, a nakon 3 mjeseca skladištenja vrijednosti su bile 1,01 mg/g (S) i 1,09 mg/g (T), bez statistički značajne razlike u odnosu na početnu koncentraciju. Nakon 6 mjeseci koncentracije su također bile statistički jednake početnoj s izmjerenim vrijednostima od 0,95 mg/g (S) i 0,98 mg/g (T), dok su nakon 9 mjeseci izmjerene vrijednosti od 0,74 mg/g (S) i 0,82 mg/g (T), uz statistički značajnu razliku u odnosu na početnu koncentraciju. Početna koncentracija proantocijanidina u GP/V kompleksu iznosila je 1,17 mg/g. Nakon 3 mjeseca skladištenja nije bilo statistički značajne promjene (1,14 mg/g (S) i 1,19 mg/g (T)). Nakon 6 mjeseci koncentracije su se smanjile na 0,91 mg/g (S) i 0,92 mg/g (T), dok su nakon 9 mjeseci iznosile 0,77 mg/g (S) i 0,86 mg/g (T), uz statistički značajno smanjenje u odnosu na početnu koncentraciju.

Tablica 11. Antioksidacijska aktivnost kompleksa tijekom skladištenja

Uzorci		Vrijeme skladištenja (mjeseci)			
		0	3	6	9
DPPH ($\mu\text{mol/g}$)					
BP/V	S	30,39 $\pm$ 0,75 ^a	30,25 $\pm$ 0,11 ^a	29,64 $\pm$ 0,24 ^a	27,77 $\pm$ 0,33 ^c
	T		30,31 $\pm$ 0,29 ^a	29,79 $\pm$ 0,15 ^a	28,30 $\pm$ 0,12 ^b
RP/V	S	30,52 $\pm$ 0,04 ^a	28,83 $\pm$ 0,12 ^c	26,12 $\pm$ 0,46 ^d	22,82 $\pm$ 0,36 ^e
	T		29,53 $\pm$ 0,36 ^b	27,39 $\pm$ 0,96 ^{cd}	23,23 $\pm$ 0,33 ^e
GP/V	S	31,24 $\pm$ 0,99 ^a	30,52 $\pm$ 0,76 ^a	27,64 $\pm$ 0,81 ^b	23,73 $\pm$ 0,57 ^d
	T		30,27 $\pm$ 0,19 ^a	28,82 $\pm$ 0,79 ^b	25,18 $\pm$ 0,18 ^b
ABTS ($\mu\text{mol/g}$)					
BP/V	S	72,37 $\pm$ 0,36 ^a	73,24 $\pm$ 0,87 ^a	71,63 $\pm$ 0,02 ^b	70,13 $\pm$ 0,12 ^c
	T		73,40 $\pm$ 0,02 ^a	72,81 $\pm$ 0,62 ^a	71,21 $\pm$ 0,41 ^b
RP/V	S	65,64 $\pm$ 0,59 ^a	63,32 $\pm$ 0,31 ^c	61,35 $\pm$ 0,79 ^d	54,35 $\pm$ 0,23 ^f
	T		64,34 $\pm$ 0,05 ^b	62,77 $\pm$ 0,50 ^{cd}	56,77 $\pm$ 0,48 ^e
GP/V	S	66,65 $\pm$ 0,75 ^a	64,22 $\pm$ 0,14 ^b	62,34 $\pm$ 0,44 ^d	58,34 $\pm$ 0,54 ^f
	T		65,49 $\pm$ 0,82 ^{ab}	63,22 $\pm$ 0,22 ^c	60,22 $\pm$ 0,31 ^e
FRAP ($\mu\text{mol/g}$)					
BP/V	S	97,33 $\pm$ 0,23 ^a	86,01 $\pm$ 0,63 ^b	77,73 $\pm$ 0,56 ^c	73,47 $\pm$ 0,66 ^d
	T		86,49 $\pm$ 0,95 ^b	78,53 $\pm$ 0,51 ^c	74,12 $\pm$ 0,70 ^d
RP/V	S	93,92 $\pm$ 0,93 ^a	75,78 $\pm$ 0,70 ^b	63,51 $\pm$ 0,13 ^d	54,52 $\pm$ 0,33 ^f
	T		76,07 $\pm$ 0,76 ^b	65,44 $\pm$ 0,53 ^c	56,28 $\pm$ 0,40 ^e
GP/V	S	96,14 $\pm$ 0,14 ^a	75,91 $\pm$ 0,86 ^b	64,26 $\pm$ 0,63 ^d	57,46 $\pm$ 0,28 ^f
	T		75,27 $\pm$ 0,75 ^b	67,73 $\pm$ 0,54 ^c	59,85 $\pm$ 0,84 ^e
CUPRAC ($\mu\text{mol/g}$)					
BP/V	S	168,89 $\pm$ 1,04 ^a	159,99 $\pm$ 0,85 ^c	142,91 $\pm$ 0,56 ^e	131,89 $\pm$ 1,03 ^g
	T		164,53 $\pm$ 0,57 ^b	146,29 $\pm$ 1,02 ^d	135,96 $\pm$ 0,28 ^f
RP/V	S	147,98 $\pm$ 1,96 ^a	129,39 $\pm$ 1,94 ^b	127,78 $\pm$ 0,39 ^c	115,39 $\pm$ 1,13 ^e
	T		131,91 $\pm$ 1,56 ^b	129,69 $\pm$ 0,37 ^b	121,46 $\pm$ 1,34 ^d
GP/V	S	160,74 $\pm$ 1,46 ^a	143,18 $\pm$ 0,91 ^b	130,44 $\pm$ 0,91 ^c	117,87 $\pm$ 0,30 ^e
	T		144,59 $\pm$ 0,92 ^b	133,92 $\pm$ 0,94 ^c	120,83 $\pm$ 0,94 ^d

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla; BP/V: kompleks proteini badema/sok višnje; RP/V: kompleks proteini riže/sok višnje; GP/V: kompleks proteini graška/sok višnje. Vrijednosti označene a-g u istom redu definiraju statistički značajnu razliku obzirom na antioksidacijsku aktivnost tijekom skladištenja.

Tablica 11. prikazuje antioksidacijsku aktivnost kompleksa tijekom skladištenja u bočicama od prozirnog i tamnog stakla. U kompleksu BP/V, početna vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom iznosila je 30,39 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca skladištenja izmjerene su vrijednosti 30,25 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 30,31 $\mu\text{mol/g}$ (T), bez statistički značajne razlike u odnosu na početni uzorak. Nakon 6 mjeseci antioksidacijska aktivnost i dalje se nije statistički značajno promijenila, a izmjerene vrijednosti bile su 29,64 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 29,79 $\mu\text{mol/g}$ (T). Na kraju skladištenja, nakon 9 mjeseci, došlo je do smanjenja antioksidacijske aktivnosti (27,77 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 28,30 $\mu\text{mol/g}$ (T)), uz statistički značajnu razliku u odnosu na početnu vrijednost, s izraženijim smanjenjem u prozirnim bočicama.

DPPH metodom u kompleksu RP/V određena početna vrijednost antioksidacijske aktivnosti iznosila je 30,52 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca uočeno je statistički značajno smanjenje antioksidacijske aktivnosti: 28,83 $\mu\text{mol/g}$ u prozirnim bočicama i 29,53 $\mu\text{mol/g}$ u tamnim. Nakon 6 mjeseci došlo je do daljnjeg smanjenja na 26,12 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 27,39 $\mu\text{mol/g}$ (T), uz statistički značajnu razliku u odnosu na početni uzorak. Najniže vrijednosti izmjerene su nakon 9 mjeseci skladištenja: 22,82 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 23,23 $\mu\text{mol/g}$ (T).

U kompleksu GP/V, početna vrijednost određena DPPH metodom iznosila je 31,24 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca skladištenja, izmjerene vrijednosti bile su 30,52 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 30,27 $\mu\text{mol/g}$ (T), bez statistički značajne razlike u odnosu na početni uzorak. Nakon 6 mjeseci došlo je do statistički značajnog smanjenja antioksidacijske aktivnosti: 27,64 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 28,82 $\mu\text{mol/g}$ (T). Nakon 9 mjeseci izmjerene su najniže vrijednosti: 23,73 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 25,18 $\mu\text{mol/g}$ (T).

U kompleksu BP/V, početna vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom iznosila je 72,37 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca skladištenja vrijednosti nisu imale statistički značajne razlike u odnosu na početnu: 73,24 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 73,40 $\mu\text{mol/g}$ (T). Nakon 6 mjeseci uočeno je smanjenje u prozirnim bočicama (71,63 $\mu\text{mol/g}$), koje je bilo statistički značajno, dok su vrijednosti u tamnim bočicama ostale statistički jednake početnima (72,81 $\mu\text{mol/g}$). Nakon 9 mjeseci određeno je smanjenje antioksidacijske aktivnosti na 70,13 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 71,21 $\mu\text{mol/g}$ (T), uz statistički značajnu razliku u odnosu na početnu vrijednost u oba uvjeta skladištenja.

U kompleksu RP/V, početna vrijednost izmjerena ABTS metodom iznosila je 65,64 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca skladištenja izmjerene su statistički niže vrijednosti: 63,32 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 64,34 $\mu\text{mol/g}$ (T). Nakon 6 mjeseci uočeno je daljnje smanjenje na 61,35 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 62,77 $\mu\text{mol/g}$ (T), a najniže vrijednosti određene su nakon 9 mjeseci: 54,35 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 56,77 $\mu\text{mol/g}$ (T). Sve vrijednosti bile su statistički značajno niže u odnosu na početni uzorak.

Početna vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom kod kompleksu GP/V iznosila je 66,65 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca skladištenja došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti kod uzoraka skladištenih u prozirnim bočicama 64,22 $\mu\text{mol/g}$, dok su uzorci skladišteni u bočicama od tamnog stakla imali statistički jednaku vrijednost kao nulti uzorak 65,49 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 6 mjeseci skladištenja dolazi do statistički značajnog smanjenja antioksidacijske aktivnosti kod oba skladištena uzorka: 62,34 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 63,22 $\mu\text{mol/g}$ (T). Na kraju skladištenja, nakon 9 mjeseci, izmjerene vrijednosti bile su

58,34 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 60,22 $\mu\text{mol/g}$ (T), te su i one bile statistički značajno niže u odnosu na početne vrijednosti.

U kompleksu BP/V, početna antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom iznosila je 97,33 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca skladištenja došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti na 86,01 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 86,49 $\mu\text{mol/g}$ (T). Nakon 6 mjeseci aktivnost je dodatno opala na 77,73 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 78,53 $\mu\text{mol/g}$ (T), a na kraju skladištenja, nakon 9 mjeseci, izmjerene su najniže vrijednosti: 73,47 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 74,12 $\mu\text{mol/g}$ (T), koje su bile statistički značajno niže u odnosu na početnu vrijednost.

U kompleksu RP/V, početna vrijednost antioksidacijske aktivnosti određena FRAP metodom iznosila je 93,92 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca određeno je smanjenje na 75,78 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 76,07 $\mu\text{mol/g}$ (T). Nakon 6 mjeseci došlo je do daljnjeg smanjenja na 63,51 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 65,44 $\mu\text{mol/g}$ (T), a nakon 9 mjeseci određene su najniže vrijednosti od 54,52 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 56,28 $\mu\text{mol/g}$ (T). Sve vrijednosti bile su statistički značajno niže u odnosu na početnu izmjerenu antioksidacijsku aktivnost.

FRAP metodom, kod kompleksa GP/V, određena početna vrijednost antioksidacijske aktivnosti bila je 96,14 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca vrijednosti su se smanjile na 75,91 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 75,27 $\mu\text{mol/g}$ (T), uz statistički značajnu razliku. Nakon 6 mjeseci antioksidacijska aktivnost je dodatno smanjena na 64,26 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 67,73 $\mu\text{mol/g}$ (T), na kraju skladištenja izmjerene su vrijednosti 57,46 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 59,85 $\mu\text{mol/g}$ (T), a statistički značajne razlike u odnosu na početnu vrijednost određene su kod svih uzoraka.

Početna vrijednost antioksidacijske aktivnosti u kompleksu BP/V, određena CUPRAC metodom iznosila je 168,89 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca skladištenja izmjerene su statistički niže vrijednosti: 159,99 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 164,53 $\mu\text{mol/g}$ (T). Nakon 6 mjeseci došlo je do daljnjeg smanjenja antioksidacijske aktivnosti: 142,91 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 146,29 $\mu\text{mol/g}$ (T), a nakon 9 mjeseci određene su najniže vrijednosti: 131,89 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 135,96 $\mu\text{mol/g}$ (T). Sve vrijednosti bile su statistički značajno niže u odnosu na početnu izmjerenu antioksidacijsku aktivnost.

U kompleksu RP/V, početna vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom iznosila je 147,98 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca skladištenja vrijednosti su se statistički značajno smanjile na 129,39 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 131,91 $\mu\text{mol/g}$ (T). Nakon 6 mjeseci izmjerene su vrijednosti 127,78 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 129,69 $\mu\text{mol/g}$ (T) uz statistički značajnu razliku u odnosu na početni uzorak. Najniže vrijednosti izmjerene su nakon 9 mjesec skladištenja: 115,39 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 121,46 $\mu\text{mol/g}$ (T), te su i one bile statistički značajno niže u odnosu na početni uzorak.

Antioksidacijska aktivnost određena CUPRAC metodom u kompleksu GP/V kod početnog uzorka iznosila je 160,74 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 3 mjeseca skladištenja određeno je statistički

značajno smanjenje antioksidacijske aktivnosti na 143,18 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 144,59 $\mu\text{mol/g}$ (T). Daljnjim skladištenjem antioksidacijska aktivnost uzoraka se smanjuje, te su nakon 6 i 9 mjeseci skladištenja izmjerene statistički značajno niže vrijednosti u odnosu na početni uzorak. Nakon 6 mjeseci vrijednosti su iznosile 130,44 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 133,92 $\mu\text{mol/g}$ (T), a nakon 9 mjeseci 117,87 $\mu\text{mol/g}$ (S) i 120,83 $\mu\text{mol/g}$ (T).

U Tablicama 12. do 14. prikazane su koncentracije pojedinačnih polifenola u kompleksima proteina badema, riže i graška s polifenolima soka višnje tijekom skladištenja. Tablice 15. do 17. prikazuju postotak degradacije polifenola tijekom skladištenja.

Tablica 12. Koncentracija (mg/kg) pojedinačnih polifenola na kompleksima proteina badema tijekom skladištenja

Vrijeme skladištenja (mjeseci)				
	0	3	6	9
cijanidin-3-glukozil-rutinozid				
S	905,95 $\pm$ 5,06 ^a	904,20 $\pm$ 6,31 ^a	829,78 $\pm$ 5,11 ^c	649,57 $\pm$ 2,33 ^e
T		904,18 $\pm$ 4,33 ^a	857,57 $\pm$ 3,25 ^b	724,42 $\pm$ 4,81 ^d
cijanidin-3-rutinozid				
S	2184,90 $\pm$ 8,35 ^a	2180,77 $\pm$ 6,20 ^a	2020,48 $\pm$ 7,23 ^c	1554,03 $\pm$ 6,07 ^e
T		2181,76 $\pm$ 4,89 ^a	2077,06 $\pm$ 7,84 ^b	1757,17 $\pm$ 5,83 ^d
kvercetin-3-rutinozid				
S	231,51 $\pm$ 2,03 ^a	213,06 $\pm$ 2,81 ^b	201,48 $\pm$ 2,54 ^d	183,24 $\pm$ 1,89 ^e
T		228,69 $\pm$ 3,13 ^a	217,73 $\pm$ 3,03 ^c	205,31 $\pm$ 2,86 ^d
kvercetin				
S	125,89 $\pm$ 1,46 ^a	116,65 $\pm$ 2,74 ^b	107,14 $\pm$ 2,75 ^c	98,15 $\pm$ 2,62 ^d
T		126,33 $\pm$ 2,83 ^a	124,08 $\pm$ 1,89 ^a	102,61 $\pm$ 2,82 ^{cd}
klorogenska kiselina				
S	587,04 $\pm$ 7,70 ^a	585,76 $\pm$ 3,83 ^a	565,49 $\pm$ 2,89 ^b	561,86 $\pm$ 2,03 ^c
T		586,85 $\pm$ 5,32 ^a	572,44 $\pm$ 3,03 ^b	568,49 $\pm$ 3,44 ^b
neoklorogenska kiselina				
S	444,37 $\pm$ 2,29 ^a	444,36 $\pm$ 2,14 ^a	440,09 $\pm$ 2,45 ^a	436,39 $\pm$ 3,01 ^a
T		444,21 $\pm$ 2,31 ^a	442,74 $\pm$ 2,63 ^a	439,95 $\pm$ 2,75 ^a
<i>p</i> -kumarinska kiselina				
S	204,38 $\pm$ 3,68 ^a	204,52 $\pm$ 3,02 ^a	205,02 $\pm$ 2,18 ^a	141,19 $\pm$ 3,10 ^c
T		205,63 $\pm$ 3,22 ^a	204,31 $\pm$ 2,89 ^a	154,35 $\pm$ 3,09 ^b
derivat <i>p</i> -kumarinska kiselina				
S	623,12 $\pm$ 2,16 ^a	623,37 $\pm$ 2,88 ^a	603,84 $\pm$ 2,89 ^{bc}	584,42 $\pm$ 2,76 ^d
T		623,79 $\pm$ 3,03 ^a	608,86 $\pm$ 2,74 ^b	598,74 $\pm$ 2,33 ^c

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla. Vrijednosti označene od a-e, za pojedinu komponentu definiraju statistički značajnu razliku tijekom skladištenja.

Kod kompleksa proteina badema s polifenolima soka višnje početna koncentracija C-3-G-R iznosila je 905,95 mg/kg. Nakon 3 mjeseca skladištenja nije utvrđena statistički značajna

promjena koncentracije u usporedbi s početnom vrijednosti ni u prozirnim (904,20 mg/kg) ni u tamnim bočicama (904,18 mg/kg). Nakon 6 mjeseci skladištenja uočeno je statistički značajno smanjenje koncentracije od 829,78 mg/kg u prozirnim i 857,57 mg/kg u tamnim bočicama, što odgovara degradaciji od 8,41 % (S) i 5,34 % (T). Nakon 9 mjeseci skladištenja došlo je do daljnjeg smanjenja koncentracije C-3-G-R, pri čemu su izmjerene vrijednosti iznosile 649,57 mg/kg (S) i 724,42 mg/kg (T), uz degradaciju od 28,30 % (S) i 20,04 % (T).

Početna koncentracija C-3-R u kompleksu BP/V iznosila je 2184,90 mg/kg, a nakon 3 mjeseca skladištenja nije utvrđena statistički značajna promjena koncentracije u odnosu na početnu vrijednost, ni u prozirnim (2180,77 mg/kg) ni u tamnim bočicama (2181,76 mg/kg). Nakon 6 mjeseci došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije: 2020,48 mg/kg (S) i 2077,06 mg/kg (T), uz degradaciju od 7,53 % (S) i 4,94 % (T). Najniže koncentracije uočene su nakon 9 mjeseci skladištenja: 1554,03 mg/kg (S) i 1757,17 mg/kg (T), s degradacijom od 28,87 % (S) i 19,58 % (T).

Koncentracija K-3-R u kompleksu BP/V prije skladištenja iznosila je 231,51 mg/kg, a nakon 3 mjeseca se statistički značajno smanjila u prozirnim bočicama na 213,06 mg/kg (S), uz degradaciju od 7,97 %, dok kod tamnih bočica (228,69 mg/kg (T)) nije određena statistički značajna promjena. Nakon 6 mjeseci koncentracija se smanjila kod oba uzorka, na 201,48 mg/kg (S) i 217,73 mg/kg (T), s degradacijom od 12,97 % (S) i 5,95 % (T). Na kraju skladištenja, nakon 9 mjeseci, koncentracije su iznosile 183,24 mg/kg (S) i 205,31 mg/kg (T), uz degradaciju od 20,85 % (S) i 11,32 % (T).

Početna koncentracija kvercetina u kompleksu BP/V iznosila je 125,89 mg/kg. Nakon 3 mjeseca skladištenja u prozirnim bočicama koncentracija se statistički značajno smanjila na 116,65 mg/kg (S), što predstavlja degradaciju od 7,34 %, dok kod tamnih bočica (126,33 mg/kg (T)) nije određena promjena u odnosu na početnu koncentraciju. Nakon 6 mjeseci koncentracija se u prozirnim bočicama smanjila na 107,14 mg/kg uz degradaciju od 14,89 %, dok kod bočica od tamnog stakla i dalje ne dolazi do degradacije (124,08 mg/kg). Nakon 9 mjeseci, koncentracije su se statistički značajno smanjile kod oba uzorka u odnosu na početni i to na 98,15 mg/kg (S) i 102,61 mg/kg (T), uz degradaciju od 22,04 % (S) i 18,49 % (T).

Koncentracija klorogenske kiseline kod početnog uzorka iznosila je 587,04 mg/kg, a nakon 3 mjeseca skladištenja nije došlo do statistički značajnih promjena ni u prozirnim (585,76 mg/kg) ni u tamnim bočicama (586,85 mg/kg). Skladištenjem nakon 6 mjeseci određeno je statistički značajno smanjenje koncentracije, s izmjerenim vrijednostima od 565,49 mg/kg (S) i 572,44 mg/kg (T), što odgovara degradaciji od 3,67 % odnosno 2,49 %. Degradacija klorogenske kiseline nastavila se nakon 9 mjeseci skladištenja te je iznosila 4,29 %

u uzorcima skladištenim u prozirnim bočicama (561,86 mg/kg), te 3,16 % u tamnim bočicama (568,49 mg/kg), uz statistički značajne razlike u odnosu na početni uzorak.

Tijekom cijelog razdoblja skladištenja (3, 6 i 9 mjeseci), nije određena statistički značajna promjena koncentracije neoklorogenske kiseline ni u prozirnim ni u tamnim bočicama. Njena početna koncentracija iznosila je 444,37 mg/kg, dok je srednja vrijednost kroz mjesec za prozirne bočice bila 440,28 mg/kg, a za tamne 442,30 mg/kg. S obzirom na iste statističke oznake možemo zaključiti da nije došlo do njene degradacije tijekom skladištenja.

Početna koncentracija *p*-kumarinske kiseline iznosila je 204,38 mg/kg. Tijekom prvih 6 mjeseci skladištenja, nije bilo statistički značajnih razlika u promjeni koncentracije navedenog spoja kako u prozirnim, tako i u tamnim bočicama. Srednja vrijednost koncentracije u navedenom periodu skladištenja za prozirne bočice iznosila je 204,77 mg/kg, a za tamne 204,97 mg/kg. Međutim, nakon 9 mjeseci došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije na 141,19 mg/kg (S) i 154,35 mg/kg (T), a u skladu s tim, izračunata je degradacija od 30,92 % u prozirnim bočicama i 24,48 % u tamnim bočicama.

Zadnji određeni spoj, derivata *p*-kumarinske kiseline, u kompleksu BP/V imao je početnu koncentraciju od 623,12 mg/kg. Tijekom prva 3 mjeseca skladištenja koncentracija se nije statistički značajno promijenila, a bila je 623,37 mg/kg (S) i 623,79 mg/kg (T). Međutim, nakon 6 mjeseci došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije na 603,84 mg/kg (S) i 608,86 mg/kg (T), uz izračunatu degradaciju od 3,09 % u prozirnim i 2,29 % u tamnim bočicama. Nakon 9 mjeseci skladištenja, uočeno je smanjenje koncentracije na 584,42 mg/kg (S) i 598,74 mg/kg (T), s degradacijom od 6,21 % (S) i 3,91 % (T).

Početna koncentracija cijanidin-3-glukozil-rutinozida u kompleksu RP/V iznosila je 914,62 mg/kg. Nakon 3 mjeseca skladištenja određeno je statistički značajno smanjenje koncentracije u oba uvjeta na 878,18 mg/kg (S) i 900,87 mg/kg (T), uz degradaciju od 3,98 % (S) i 1,50 % (T). Nakon 6 mjeseci skladištenja koncentracija C-3-G-R nastavila se smanjivati, pri čemu su vrijednosti iznosile 820,18 mg/kg (S) uz degradaciju od 10,33 % i 848,88 mg/kg (T) uz degradaciju od 7,19 %. Najveće smanjenje koncentracije određeno je nakon 9 mjeseci skladištenja na 593,03 mg/kg (S) i 630,77 mg/kg (T), uz degradacije od 35,16 % (S) i 31,03 % (T).

Koncentracija C-3-R u početnom uzorku iznosila je 2290,69 mg/kg. Nakon 3 mjeseca skladištenja došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije na 2252,41 mg/kg (S) i 2258,55 mg/kg (T), uz degradacije od 1,67 % (S) i 1,40 % (T). Nakon 6 mjeseci koncentracije su se dodatno smanjile na 2053,11 mg/kg (S) i 2139,61 mg/kg (T), pri čemu su izračunate

degradacije iznosile 10,37 % (S) i 6,60 % (T). Najveće smanjenje koncentracije određeno je nakon 9 mjeseci skladištenja na 1464,02 mg/kg (S) i 1559,67 mg/kg (T), s degradacijama od 36,09 % (S) i 31,91 % (T).

Tablica 13. Koncentracija (mg/kg) pojedinačnih polifenola na kompleksima proteina riže tijekom skladištenja

Vrijeme skladištenja (mjeseci)				
	0	3	6	9
cijanidin-3-glukozil-rutinozid				
S	914,62±5,06 ^a	878,18±5,31 ^c	820,18±5,23 ^e	593,03±3,02 ^g
T		900,87±2,83 ^b	848,88±4,51 ^d	630,77±4,11 ^f
cijanidin-3-rutinozid				
S	2290,69±7,94 ^a	2252,41±5,20 ^b	2053,11±7,85 ^d	1464,02±5,14 ^f
T		2258,55±5,89 ^b	2139,61±7,01 ^c	1559,67±5,13 ^e
kvercetin-3-rutinozid				
S	200,34±0,18 ^a	193,26±2,75 ^b	181,28±2,87 ^c	163,21±2,41 ^d
T		198,64±3,43 ^{ab}	197,78±3,41 ^{ab}	185,45±2,75 ^c
kvercetin				
S	175,12±1,74 ^a	173,98±1,34 ^a	157,67±2,05 ^c	127,67±2,18 ^d
T		175,93±1,11 ^a	172,93±1,93 ^a	165,43±2,34 ^b
klorogenska kiselina				
S	831,02±6,95 ^a	831,22±4,23 ^a	818,03±2,75 ^b	804,58±2,03 ^d
T		831,23±4,48 ^a	829,56±2,11 ^{ac}	824,84±3,11 ^{cb}
neoklorogenska kiselina				
S	497,33±3,97 ^a	494,29±3,14 ^a	458,80±3,25 ^c	436,39±3,01 ^c
T		495,35±3,11 ^a	494,71±2,63 ^a	488,95±2,75 ^b
<i>p</i> -kumarinska kiselina				
S	447,66±3,54 ^a	443,31±2,89 ^a	442,83±3,18 ^a	295,83±2,73 ^c
T		445,95±2,98 ^a	444,04±3,25 ^a	335,08±2,99 ^b
derivat <i>p</i> -kumarinska kiselina				
S	769,61±4,39 ^a	764,59±3,78 ^a	761,91±4,29 ^a	684,42±2,91 ^c
T		765,31±3,93 ^a	764,10±4,23 ^a	698,74±2,78 ^b

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla. Vrijednosti označene od a-g, za pojedinu komponentu definiraju statistički značajnu razliku tijekom skladištenja.

Početna koncentracija K-3-R u kompleksu RP/V iznosila je 200,34 mg/kg. Nakon 3 mjeseca skladištenja uočeno je statistički značajno smanjenje koncentracije u prozirnim bočicama na 193,26 mg/kg (S), uz degradaciju od 3,53 %, dok kod tamnih bočica (198,64 mg/kg (T)) nije utvrđena statistički značajna promjena u odnosu na početnu vrijednost. Nakon 6 mjeseci skladištenja, koncentracija u prozirnim bočicama smanjila se na 181,28 mg/kg s degradacijom od 9,51 %, dok u tamnim bočicama nije određeno statistički značajno smanjenje koncentracije koja je iznosila 197,78 mg/kg (T). Nakon 9 mjeseci određeno je statistički značajno smanjenje koncentracije kod oba uzorka na 163,21 mg/kg (S) i 185,45 mg/kg (T), uz degradaciju od 18,53 % (S) i 7,43 % (T).

U početnom uzorku koncentracija kvercetina kod RP/V iznosila je 175,12 mg/kg. Tijekom prva 3 mjeseca skladištenja nije bilo statistički značajnih promjena koncentracije ni u prozirnim (173,98 mg/kg) ni u tamnim bočicama (175,93 mg/kg). Nakon 6 mjeseci došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije u prozirnim bočicama na 157,67 mg/kg, uz degradaciju od 9,96 %, dok kod tamnih bočica (172,93 mg/kg) nije određena značajna razlika u odnosu na početnu vrijednost. Nakon 9 mjeseci skladištenja koncentracija se smanjila na 127,67 mg/kg (S) i 165,43 mg/kg (T), uz degradaciju od 27,10 % (S) i 5,53 % (T).

Koncentracija klorogenske kiseline u početnom uzorku iznosila je 831,02 mg/kg. Statistički značajna promjena koncentracije nije određena nakon prva 3 mjeseca skladištenja, a iznosila je 831,22 mg/kg (S) i 831,23 mg/kg (T). Nakon 6 mjeseci uočeno je statistički značajno smanjenje koncentracije u prozirnim bočicama na 818,03 mg/kg, uz degradaciju od 1,56 %, dok u tamnim bočicama (829,56 mg/kg) nije došlo do značajne promjene u odnosu na početnu vrijednost. Nakon 9 mjeseci koncentracija KK se smanjila kod oba uzorka na 804,58 mg/kg (S) i 824,84 mg/kg (T), uz izračunatu degradaciju od 3,18 % (S) i 0,74 % (T).

Početna koncentracija neoklorogenske kiseline u kompleksu RP/V bila je 497,33 mg/kg. Tijekom prva 3 mjeseca skladištenja nije došlo do statistički značajnih promjena koncentracije ni u prozirnim (494,29 mg/kg) ni u tamnim bočicama (495,35 mg/kg). Nakon 6 mjeseci koncentracija se statistički značajno smanjila u prozirnim bočicama na 458,80 mg/kg, uz degradaciju od 7,75 %, dok u tamnim bočicama (494,71 mg/kg) nije došlo do statistički značajne promjene. Nakon 9 mjeseci, koncentracija se dodatno smanjila u prozirnim bočicama na 436,39 mg/kg, s degradacijom od 12,25 %, dok je u tamnim bočicama iznosila 488,95 mg/kg, uz degradaciju od 1,68 %.

Koncentracija *p*-kumarinske kiseline u početnom uzorku iznosila je 447,66 mg/kg. Tijekom prvih 6 mjeseci skladištenja nije bilo statistički značajnih promjena koncentracije, srednja vrijednost za prva dva mjerenja u prozirnim bočicama iznosila je 443,07 mg/kg, a u tamnim 444,99 mg/kg. Međutim, nakon 9 mjeseci došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije na 295,83 mg/kg u prozirnim i 335,08 mg/kg u tamnim bočicama. Sukladno tome, izračunata je degradacija od 33,92 % (S) i 25,15 % (T).

Početna koncentracija derivata *p*-kumarinske kiseline u kompleksu RP/V iznosila je 769,61 mg/kg. Tijekom prvih 6 mjeseci skladištenja nije došlo do statistički značajnih promjena koncentracije. U prozirnim bočicama srednja vrijednost mjerenja koncentracije za 3 i 6 mjeseci iznosila je 763,25 mg/kg, a u tamnim 764,70 mg/kg. Nakon 9 mjeseci skladištenja određeno je statistički značajano smanjenje koncentracije na 684,42 mg/kg u prozirnim i 698,74 mg/kg u tamnim bočicama, uz degradaciju od 11,07 % (S) i 9,21 % (T).

Tablica 14. Koncentracija (mg/kg) pojedinačnih polifenola na kompleksima proteina graška tijekom skladištenja

Vrijeme skladištenja (mjeseci)				
	0	3	6	9
cijanidin-3-glukozil-rutinozid				
S	973,44±7,88 ^a	942,27±3,93 ^b	932,01±5,01 ^c	630,29±5,02 ^e
T		947,27±3,12 ^b	939,93±3,58 ^{bc}	678,85±3,99 ^d
cijanidin-3-rutinozid				
S	2378,73±5,43 ^a	2307,64±4,25 ^c	2275,07±5,74 ^c	1440,92±3,11 ^g
T		2321,39±5,15 ^b	2318,96±5,35 ^d	1563,23±4,53 ^f
kvercetin-3-rutinozid				
S	200,82±2,53 ^a	191,21±3,45 ^b	179,22±2,59 ^c	153,28±2,41 ^d
T		197,58±3,49 ^{ab}	196,77±3,78 ^{ab}	195,31±2,98 ^{ab}
kvercetin				
S	173,83±0,78 ^a	154,84±2,3 ^c	144,69±2,85 ^d	136,61±2,41 ^e
T		173,86±1,98 ^a	162,38±2,52 ^b	145,72±2,35 ^d
klorogenska kiselina				
S	745,90±7,40 ^a	743,98±4,23 ^a	721,36±2,48 ^c	708,66±2,73 ^d
T		743,45±3,98 ^a	739,95±2,98 ^{ab}	733,71±3,19 ^b
neoklorogenska kiselina				
S	450,99±3,73 ^a	450,77±3,25 ^a	440,80±3,88 ^b	436,39±3,89 ^b
T		450,29±3,32 ^a	449,71±2,41 ^a	448,95±3,32 ^a
<i>p</i> -kumarinska kiselina				
S	390,76±0,72 ^a	389,67±2,79 ^a	325,41±3,68 ^c	273,64±3,73 ^c
T		390,25±3,08 ^a	360,34±3,45 ^b	306,56±3,59 ^d
derivat <i>p</i> -kumarinska kiselina				
S	683,81±0,53 ^a	674,59±3,78 ^b	661,91±4,19 ^c	654,42±2,48 ^d
T		680,31±3,93 ^{ab}	674,10±4,33 ^b	668,74±3,78 ^b

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla. Vrijednosti označene od a-g, za pojedinu komponentu definiraju statistički značajnu razliku tijekom skladištenja.

Početna koncentracija C-3-G-R u kompleksu proteina graška s polifenolima soka višnje (GP/V) iznosila je 973,44 mg/kg. Već nakon 3 mjeseca skladištenja uočeno je statistički značajno smanjenje koncentracije na 942,27 mg/kg (S) i 947,27 mg/kg (T), uz izračunatu degradaciju od 3,20 % (S) i 2,69 % (T). Nakon 6 mjeseci skladištenja koncentracija se nastavila smanjivati, s izmjerenim vrijednostima od 932,01 mg/kg (S) i 939,93 mg/kg (T), što odgovara degradaciji od 4,26 % (S) i 3,44 % (T). Najizraženiji gubitak uočen je nakon 9 mjeseci, kada se koncentracija smanjila na 630,29 mg/kg u prozirnim i 678,85 mg/kg u tamnim bočicama, s postotkom degradacije od 35,25 % (S) i 30,26 % (T).

Koncentracija cijanidin-3-rutinozida u početnom uzorku iznosila je 2378,73 mg/kg. Nakon 3 mjeseca skladištenja došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije u obje varijante skladištenja na 2307,64 mg/kg u prozirnim (S) i 2321,39 mg/kg u tamnim bočicama (T), uz degradaciju od 2,99 % (S) i 2,41 % (T). Skladištenjem tijekom 6 mjeseci koncentracija

se dodatno smanjila, na 2275,07 mg/kg (S) i 2318,96 mg/kg (T), što odgovara degradaciji od 4,36 % (S) i 2,51 % (T). Najveća degradacija spoja određena je nakon 9 mjeseci skladištenja, kada su koncentracije pale na 1440,92 mg/kg (S) uz degradaciju od 39,42 % i 1563,23 mg/kg (T) uz degradaciju od 34,28 %.

Početna koncentracija K-3-R u kompleksu iznosila je 200,82 mg/kg. Statistički značajno smanjenje koncentracije i degradacija ovoga spoja određeno je samo u bočicama od prozirnog stakla, nakon 3 mjeseca skladištenja koncentracija se smanjila na 191,21 mg/kg uz degradaciju od 4,79 %, nakon 6 mjeseci na 179,22 mg/kg uz degradaciju od 10,76 %, a nakon 9 na 153,28 mg/kg, uz degradaciju od 23,67 %. U bočicama od tamnog stakla tijekom skladištenja nije došlo do statistički značajne promjene koncentracije K-3-R te je srednja vrijednost za sva tri mjerenja iznosila 196,55 mg/kg.

U kompleksu GP/V početna koncentracija kvercetina iznosila je 173,83 mg/kg. Tijekom prva 3 mjeseca skladištenja došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije u prozirnima bočicama na 154,84 mg/kg, što odgovara degradaciji od 10,92 %, dok kod tamnih bočica (173,86 mg/kg) nije bilo značajne promjene. Nakon 6 mjeseci skladištenja koncentracija kvercetina u uzorcima iz prozirnih bočica dodatno se smanjila na 144,69 mg/kg, s degradacijom od 16,76 %, dok je kod tamnih bočica određena manja ali statistički značajna degradacija od 6,59 % a koncentracija je iznosila 162,38 mg/kg. Nakon 9 mjeseci skladištenja, koncentracija u prozirnima bočicama smanjila se na 136,61 mg/kg uz degradaciju od 21,41 %, dok je u tamnim bočicama određena koncentracija od 145,72 mg/kg uz degradaciju od 16,17 %.

Početna koncentracija klorogenske kiseline u kompleksu GP/V iznosila je 745,90 mg/kg. Tijekom 3 mjeseca skladištenja nije došlo do statistički značajnih promjena ni u prozirnima (743,98 mg/kg) ni u tamnim bočicama (743,45 mg/kg). Nakon 6 mjeseci skladištenja, koncentracija se statistički značajno smanjila u prozirnima bočicama na 721,36 mg/kg, što odgovara degradaciji od 3,29 %, dok kod tamnih bočica nije bilo statistički značajnih promjena (739,95 mg/kg). Nakon 9 mjeseci, koncentracija se dodatno smanjila na 708,66 mg/kg u prozirnima bočicama, uz degradaciju od 4,99 %, dok je u tamnim bočicama degradacija bila znatno manja i iznosila je 1,63 % (733,71 mg/kg), ali uz statistički značajnu razliku u odnosu na početnu vrijednost.

Tablica 15. Degradacija (%) pojedinačnih polifenola na kompleksima proteina badema tijekom skladištenja

Vrijeme skladištenja (mjeseci)			
	3	6	9
cijanidin-3-glukozil-rutinozid			
S	-	8,41	28,30
T	-	5,34	20,04
cijanidin-3-rutinozid			
S	-	7,53	28,87
T	-	4,94	19,58
kvercetin-3-rutinozid			
S	7,97	12,97	20,85
T	-	5,95	11,32
kvercetin			
S	7,34	14,89	22,04
T	-	-	18,49
klorogenska kiselina			
S	-	3,67	4,29
T	-	2,49	3,16
<i>p</i> -kumarinska kiselina			
S	-	-	30,92
T	-	-	24,48
derivat <i>p</i> -kumarinska kiselina			
S	-	3,09	6,21
T	-	2,29	3,91

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla.

Koncentracija neoklorogenske kiseline u početnom uzorku iznosila je 450,99 mg/kg. Tijekom prva 3 mjeseca skladištenja nije određena statistički značajna promjena koncentracije ni u prozirnim (450,77 mg/kg) ni u tamnim bočicama (450,29 mg/kg). Nakon 6 mjeseci, uočeno je statistički značajno smanjenje koncentracije u uzorcima skladištenim u prozirnim bočicama na 440,80 mg/kg, što odgovara degradaciji od 2,26 %, dok kod uzoraka u tamnim bočicama (449,71 mg/kg) nije došlo do statistički značajne promjene. Nakon 9 mjeseci skladištenja, koncentracija u prozirnim bočicama dodatno se smanjila na 436,39 mg/kg (degradacija od 3,24 %), dok tamnim bočicama i dalje nije došlo do statistički značajne razlike u odnosu na početni uzorak (448,95 mg/kg).

Početna koncentracija *p*-kumarinske kiseline iznosila je 390,76 mg/kg. Nakon prva 3 mjeseca skladištenja nije određena statistički značajna promjena koncentracije ni u prozirnim (389,67 mg/kg) ni u tamnim bočicama (390,25 mg/kg). Nakon 6 mjeseci skladištenja, koncentracija se značajno smanjila na 325,41 mg/kg u prozirnim bočicama, što odgovara degradaciji od 16,72 %, dok je u tamnim bočicama degradacija iznosila 7,78 % (360,34 mg/kg).

Nakon 9 mjeseci dolazi do daljnjeg smanjivanja koncentracije na 273,64 mg/kg u prozirnim i 306,56 mg/kg u tamnim bočicama, uz degradaciju od 29,97 % (S) i 21,55 % (T).

Koncentracija derivata *p*-kumarinske kiseline u početnom uzorku kompleksa GP/V iznosila je 683,81 mg/kg. Nakon 3 mjeseca skladištenja određeno je statistički značajno smanjenje koncentracije na 674,59 mg/kg u prozirnim bočicama (degradacija 1,35 %), dok u tamnim bočicama nije bilo statistički značajne promjene u odnosu na početni uzorak (680,31 mg/kg). Nakon 6 mjeseci skladištenja, koncentracije su se smanjile kod oba uzorka na 661,91 mg/kg (S) i 674,10 mg/kg (T), uz degradaciju od 3,20 % (S) i 1,42 % (T). Na kraju skladištenja, nakon 9 mjeseci, koncentracije su iznosile 654,42 mg/kg (S) i 668,74 mg/kg (T), s degradacijom od 4,30 % (S) i 2,20 % (T).

Tablica 16. Degradacija (%) pojedinačnih polifenola na kompleksima proteina riže tijekom skladištenja

Vrijeme skladištenja (mjeseci)			
	3	6	9
cijanidin-3-glukozil-rutinozid			
S	3,98	10,33	35,16
T	1,50	7,19	31,03
cijanidin-3-rutinozid			
S	1,67	10,37	36,09
T	1,40	6,60	31,91
kvercetin-3-rutinozid			
S	3,53	9,51	18,53
T	-	-	7,43
kvercetin			
S	-	9,96	27,10
T	-	-	5,53
klorogenska kiselina			
S	-	1,56	3,18
T	-	-	0,74
neoklorogenska kiselina			
S	-	7,75	12,25
T	-	-	1,68
<i>p</i> -kumarinska kiselina			
S	-	-	33,92
T	-	-	25,15
derivat <i>p</i> -kumarinska kiselina			
S	-	-	11,07
T	-	-	9,21

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla.

Tablica 17. Degradacija (%) pojedinačnih polifenola na kompleksima proteina graška tijekom skladištenja

Vrijeme skladištenja (mjeseci)			
	3	6	9
cijanidin-3-glukozil-rutinozid			
S	3,20	4,26	35,25
T	2,69	3,44	30,26
cijanidin-3-rutinozid			
S	2,99	4,36	39,42
T	2,41	2,51	34,28
kvercetin-3-rutinozid			
S	4,79	10,76	23,67
T	-	-	-
kvercetin			
S	10,92	16,76	21,41
T	-	6,59	16,17
klorogenska kiselina			
S	-	3,29	4,99
T	-	-	1,63
neoklorogenska kiselina			
S	-	2,26	3,24
T	-	-	-
<i>p</i> -kumarinska kiselina			
S	-	16,72	29,97
T	-	7,78	21,55
derivat <i>p</i> -kumarinska kiselina			
S	1,35	3,20	4,30
T	-	1,42	2,20

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla.

U tablicama 18. do 20. prikazani su kinetički parametri razgradnje pojedinačnih polifenola u kompleksima proteina badema, riže i graška s polifenolima soka višnje. Na temelju koncentracija određenih tijekom skladištenja, primjenom kinetičkog modela prvog reda izračunati su sljedeći parametri: k (brzina razgradnje), $t_{1/2}$ (vrijeme poluraspada) i R^2 (koeficijent determinacije). Koeficijent determinacije predstavlja statistički pokazatelj koji opisuje koliko dobro eksperimentalni podaci odgovaraju primijenjenom modelu što je u ovom slučaju kinetika razgradnje prvog reda. Kod spojeva kod kojih nakon 3 mjeseca skladištenja nije određena statistički značajna promjena koncentracije, nije bilo moguće primijeniti kinetički model zbog nedovoljnog broja relevantnih točaka potrebnih za pouzdanu linearnu regresiju.

Tablica 18. Kinetički parametri razgradnje pojedinačnih polifenola na kompleksima proteina badema tijekom skladištenja

Parametri			
	k (mjesec ⁻¹)	t _{1/2} (mjeseci)	R ²
kvercetin-3-rutinozid			
S	0,025	27,58	0,98
T	-	-	-
kvercetin			
S	0,029	24,08	1,00
T	-	-	-

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla; k: brzina degradacije; R²: koeficijent determinacije; t_{1/2}: vrijeme poluraspada

U kompleksu BP/V kinetički parametri razgradnje mogli su se izračunati za dva spoja skladištena u prozirnim bočicama. Za kvercetin-3-rutinozid konstanta brzine razgradnje iznosila je 0,025 mjesec⁻¹, a vrijeme poluraspada 27,58 mjeseci. Visoka vrijednost koeficijenta determinacije (0,980) ukazuje na vrlo dobru usklađenost eksperimentalnih podataka s kinetičkim modelom prvog reda. U slučaju kvercetina, brzina razgradnje iznosila je 0,029 mjesec⁻¹ dok je vrijeme poluraspada bilo 24,08 mjeseca, uz savršeno podudaranje s koeficijentom determinacije (1,000).

Tablica 19. Kinetički parametri razgradnje pojedinačnih polifenola na kompleksima proteina riže tijekom skladištenja

Parametri			
	k (mjesec ⁻¹)	t _{1/2} (mjeseci)	R ²
cijanidin-3-glukozil-rutinozid			
S	0,065	10,59	0,88
T	0,059	11,67	0,87
cijanidin-3-rutinozid			
S	0,072	9,65	0,90
T	0,062	11,23	0,86
kvercetin-3-rutinozid			
S	0,028	24,61	0,98
T	-	-	-

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla; k: brzina degradacije; R²: koeficijent determinacije; t_{1/2}: vrijeme poluraspada

U kompleksu RP/V kinetički parametri razgradnje pojedinačnih polifenola određeni su za tri spoja. Za C-3-G-R izračunata je konstanta brzine razgradnje od 0,065 mjesec⁻¹ (S) i 0,059 mjesec⁻¹ (T), što odgovara vremenu poluraspada od 10,59 mjeseci (S) i 11,67 mjeseci (T). Koeficijenti determinacije iznosili su 0,88 (S) i 0,87 (T). Kod C-3-R utvrđena je nešto viša brzina razgradnje, s vrijednostima k = 0,072 mjesec⁻¹ (S) i 0,062 mjesec⁻¹ (T), te odgovarajućim

vremenima poluraspada od 9,65 mjeseci (S) i 11,23 mjeseci (T). Koeficijenti determinacije iznosili su 0,90 (S) i 0,86 (T), potvrđujući dobru prilagodbu eksperimentalnih podataka modelu. Za K-3-R kinetički parametri mogli su se izračunati samo za uzorke skladištene u prozirnim bočicama, gdje je utvrđena konstanta brzine razgradnje od $0,028 \text{ mjesec}^{-1}$ i vrijeme poluraspada od 24,61 mjesec, uz vrlo visoku vrijednost koeficijenta determinacije (0,98). U tamnim bočicama nije bilo moguće primijeniti model zbog nedostatka statistički značajne promjene koncentracije.

Tablica 20. Kinetički parametri razgradnje pojedinačnih polifenola na kompleksima proteina graška tijekom skladištenja

Parametri			
	k (mjesec^{-1})	$t_{1/2}$ (mjeseci)	R^2
cijanidin-3-glukozil-rutinozid			
S	0,067	10,34	0,77
T	0,056	12,48	0,77
cijanidin-3-rutinozid			
S	0,078	8,83	0,77
T	0,066	10,52	0,75
kvercetin-3-rutinozid			
S	0,037	18,81	0,95
T	-	-	-
kvercetin			
S	0,021	33,20	1,00
T	-	-	-
derivat <i>p</i> -kumarinska kiselina			
S	0,005	137,00	0,98
T	-	-	-

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla; k: brzina degradacije; R^2 : koeficijent determinacije; $t_{1/2}$: vrijeme poluraspada

U kompleksu GP/V kinetički parametri razgradnje izračunati su za šest spojeva u uzorcima skladištenim u prozirnim bočicama, dok u tamnim bočicama model prvog reda nije bilo moguće primijeniti za kvercetin, kvercetin-3-rutinozid i derivat *p*-kumarinske kiseline zbog nedostatka statistički značajnih razlika. Za C-3-G-R konstanta brzine razgradnje bila je $0,067 \text{ mjesec}^{-1}$ u prozirnim i $0,056 \text{ mjesec}^{-1}$ u tamnim bočicama, što odgovara vremenima poluraspada od 10,34 (S) i 12,48 (T) mjeseci. Izračunati koeficijenti determinacije iznosili su 0,77 za oba uzorka, što ukazuje na zadovoljavajuću korelaciju modela s eksperimentalnim podacima. Kod C-3-R izračunata je vrijednost k od $0,078 \text{ mjesec}^{-1}$ (S) i $0,066 \text{ mjesec}^{-1}$ (T), uz vremena poluraspada od 8,83 (S) i 10,52 (T) mjeseca. Koeficijenti determinacije za ove modele su iznosili 0,77 (S) i 0,75 (T). Za kvercetin-3-rutinozid kinetički parametri mogli su se

izračunati samo za prozirne bočice (S), gdje je parametar brzine degradacije iznosilo $0,037 \text{ mjesec}^{-1}$, a vrijeme poluraspada 18,81 mjeseci, uz R^2 od 0,95. U slučaju kvercetina, u prozirnim bočicama određena je konstanta brzine razgradnje od $0,021 \text{ mjesec}^{-1}$ i odgovarajuće vrijeme poluraspada od 33,20 mjeseci. Prilagodba modela bila je $R^2 = 1,000$. Za derivat *p*-kumarinske kiseline model je također mogao biti primijenjen samo za prozirne bočice, gdje je izračunata vrlo niska vrijednost *k* od $0,005 \text{ mjesec}^{-1}$, što odgovara dugom vremenu poluraspada od 137,00 mjeseci. Koeficijent determinacije iznosio je 0,98, što potvrđuje visoku pouzdanost dobivenog modela.

4.1.2. Parametri boje proteina i njihovih kompleksa tijekom skladištenja

Radi procjene vizualnih promjena koje nastaju tijekom skladištenja, analizirani su parametri boje kompleksa biljnih proteina riže, badema i graška s polifenolima soka višnje. Uzorci su skladišteni u prozirnim (S) i tamnim (T) staklenim bočicama, a mjerenja boje provedena su nakon 3, 6 i 9 mjeseci skladištenja. Vrijednosti ukupne promjene boje (ΔE) za oba uvjeta (S i T) izračunate su u odnosu na početne vrijednosti svakog kompleksa (BP/V, RP/V i GP/V), što omogućuje procjenu vizualnih promjena boje tijekom skladištenja.

Tablica 21. Parametri boje na kompleksima proteina badema tijekom skladištenja

	L*	a*	b*	ΔE	$^{\circ}h$	C*
BP/V	53,88±0,01 ^e	27,31±0,03 ^d	0,63±0,03 ^d	-	1,34±0,06 ^e	27,31±0,03 ^e
3 mjeseca						
S	53,58±0,02 ^f	28,00±0,02 ^e	0,59±0,02 ^e	0,75	1,20±0,03 ^f	28,01±0,02 ^c
T	54,50±0,06 ^d	28,23±0,05 ^b	0,59±0,02 ^e	1,12	1,20±0,03 ^f	28,24±0,05 ^{bc}
6 mjeseci						
S	54,59±0,01 ^d	28,53±0,02 ^a	0,71±0,02 ^c	1,42	1,43±0,04 ^d	28,54±0,02 ^a
T	54,87±0,02 ^c	28,60±0,02 ^a	0,78±0,01 ^c	1,64	1,57±0,03 ^c	28,61±0,02 ^a
9 mjeseci						
S	56,61±0,04 ^a	28,28±0,01 ^b	1,58±0,01 ^b	3,05	3,21±0,01 ^b	28,33±0,01 ^b
T	55,50±0,01 ^b	27,44±0,03 ^d	1,94±0,01 ^a	2,09	4,04±0,02 ^a	27,51±0,03 ^d

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla; BP/V: kompleks proteini badema/sok višnje; ΔE : promjena boje uzoraka tijekom skladištenja u odnosu na kompleks BP/V. Vrijednosti a-f u istom stupcu definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa nakon pripreme.

Tijekom skladištenja kompleksa proteina badema s polifenolima višnje uočene su promjene u svim parametrima boje (Tablica 21.). Vrijednost L* (svjetlina) povećavala se s 53,88 u početnom uzorku na 56,61 nakon 9 mjeseci u prozirnim bočicama, odnosno na 55,50 u tamnim bočicama. Vrijednosti a* također su se povećale, od 27,31 (početni uzorak) na 28,28

(S) i 27,44 (T) nakon 9 mjeseci. Parametar b^* imao je izraženije povećanje vrijednosti tijekom skladištenja, s početnih 0,63 na 1,58 (S) i 1,94 (T). Ukupna promjena boje (ΔE), izračunata u odnosu na početni kompleks, povećavala se od 0,75 nakon 3 mjeseca do 3,05 nakon 9 mjeseci skladištenja u prozirnim bočicama, odnosno od 1,12 do 2,09 u tamnim bočicama. Ton boje ($^{\circ}h$) povećavao se s početne vrijednosti od $1,34^{\circ}$ na $3,21^{\circ}$ (S) i $4,04^{\circ}$ (T) nakon 9 mjeseci. Zasićenost boje (C^*) se također povećala, sa 27,31 u početnom uzorku na 28,33 (S) i 27,51 (T) nakon 9 mjeseci, što ukazuje na blago povećanje intenziteta boje tijekom skladištenja.

Tablica 21. Parametri boje na kompleksima proteina riže tijekom skladištenja

	L^*	a^*	b^*	ΔE	$^{\circ}h$	C^*
RP/V	$57,56 \pm 0,02^f$	$25,99 \pm 0,03^a$	$0,07 \pm 0,02^f$	-	$0,16 \pm 0,04^f$	$25,99 \pm 0,03^a$
3 mjeseca						
S	$58,40 \pm 0,01^c$	$25,71 \pm 0,02^b$	$0,47 \pm 0,01^e$	0,97	$1,06 \pm 0,03^e$	$25,72 \pm 0,03^b$
T	$58,14 \pm 0,14^e$	$25,95 \pm 0,04^a$	$0,42 \pm 0,03^e$	0,68	$0,93 \pm 0,07^e$	$25,95 \pm 0,04^a$
6 mjeseci						
S	$59,40 \pm 0,01^c$	$25,33 \pm 0,01^c$	$0,84 \pm 0,01^c$	2,10	$1,91 \pm 0,02^c$	$25,34 \pm 0,01^c$
T	$59,01 \pm 0,01^d$	$25,65 \pm 0,02^b$	$0,70 \pm 0,02^d$	1,61	$1,56 \pm 0,05^d$	$25,66 \pm 0,02^b$
9 mjeseci						
S	$62,22 \pm 0,04^a$	$22,40 \pm 0,02^e$	$3,33 \pm 0,07^a$	6,73	$8,45 \pm 0,18^a$	$22,64 \pm 0,02^e$
T	$61,21 \pm 0,04^b$	$23,38 \pm 0,02^d$	$2,53 \pm 0,02^b$	5,12	$6,19 \pm 0,04^b$	$23,51 \pm 0,03^d$

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla; RP/V: kompleks proteini riže/sok višnje; ΔE : promjena boje uzoraka tijekom skladištenja u odnosu na kompleks RP/V. Vrijednosti a-f u istom stupcu definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa nakon pripreme.

Tijekom skladištenja kompleksa rižinog proteina s polifenolima višnje uočene su progresivne promjene svih kolorimetrijskih parametara (Tablica 21.). Vrijednost L^* (svjetlina) postupno se povećavala s 57,56 (početni uzorak) do 62,22 nakon 9 mjeseci u prozirnim bočicama (S), odnosno do 61,21 u tamnim (T), što ukazuje na posvjetljivanje uzoraka tijekom skladištenja. Parametar a^* nije se mijenjao tijekom prvih 3 i 6 mjeseci (od oko 25,3 do 25,9), ali se nakon 9 mjeseci značajno smanjio na 22,40 (S) i 23,38 (T), što ukazuje na gubitak crvenila boje. Vrijednost b^* kontinuirano se povećavala s početnih 0,07 na 3,33 (S) i 2,53 (T) nakon 9 mjeseci, što upućuje na izraženiji žuti ton boje s vremenom. Ukupna promjena boje (ΔE) povećavala se tijekom skladištenja, s početnih 0,97 (S) i 0,68 (T) nakon 3 mjeseca do 6,73 (S) i 5,12 (T) nakon 9 mjeseci, pri čemu su promjene bile izraženije u prozirnim bočicama. Ton boje ($^{\circ}h$) značajno se povećao tijekom skladištenja, od 0,16 (početni uzorak) do 8,45 (S) i 6,19 (T) nakon 9 mjeseci. Zasićenost boje (C^*), koja u početku iznosila 25,99 smanjivala se s vremenom skladištenja, pri čemu su vrijednosti nakon 9 mjeseci iznosile 22,64 (S) i 23,51 (T).

Tablica 22. Parametri boje na kompleksima proteina graška tijekom skladištenja

	L*	a*	b*	ΔE	°h	C*
GP/V	44,60±0,01 ^d	25,15±0,01 ^a	-0,04±0,02 ^e	-	359,90±0,04 ^a	25,15±0,01 ^a
3 mjeseca						
S	44,82±0,01 ^c	25,09±0,02 ^a	0,24±0,01 ^d	0,36	0,54±0,02 ^g	25,09±0,02 ^a
T	44,52±0,05 ^d	25,07±0,02 ^a	0,31±0,01 ^d	0,37	0,70±0,02 ^f	25,08±0,01 ^a
6 mjeseci						
S	44,52±0,01 ^d	24,35±0,01 ^b	0,61±0,01 ^c	1,03	1,43±0,03 ^e	24,36±0,01 ^b
T	45,65±0,01 ^c	25,03±0,01 ^a	0,69±0,01 ^c	1,29	1,58±0,01 ^d	25,04±0,01 ^a
9 mjeseci						
S	49,53±0,04 ^a	22,22±0,01 ^d	3,67±0,02 ^a	6,84	9,39±0,04 ^b	22,52±0,01 ^d
T	48,89±0,01 ^b	22,64±0,01 ^c	3,02±0,01 ^b	5,84	7,60±0,03 ^c	22,84±0,01 ^c

S: skladištenje u bočicama od prozirnog stakla; T: skladištenje u bočicama od tamnog stakla; GP/V: kompleks proteini graška/sok višnje; ΔE: promjena boje uzoraka tijekom skladištenja u odnosu na kompleks GP/V. Vrijednosti a-g u istom stupcu definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa nakon pripreme.

Tijekom skladištenja kompleksa proteina graška s polifenolima soka višnje određene su promjene svih parametara boje (Tablica 22.). Vrijednost L* (svjetlina) tijekom prvih 6 mjeseci nije se mijenjala, no nakon 9 mjeseci došlo je do značajnijeg povećanja sa 44,60 (početni uzorak) na 49,53 (S) i 48,89 (T), što ukazuje na posvjetljivanje uzoraka tijekom skladištenja, osobito u prozirnim bočicama. Parametar a* se postupno smanjivao s početne vrijednosti 25,15 na 22,22 (S) i 22,64 (T) nakon 9 mjeseci, što upućuje na smanjenje crvenih nijansi. Vrijednost b* se s početnih -0,04 povećavala tijekom skladištenja i dosegla 3,67 (S) i 3,02 (T) nakon 9 mjeseci, što ukazuje na žuti ton boje kompleksa. Ukupna promjena boje (ΔE) povećavala se s 0,36 (S) i 0,37 (T) nakon 3 mjeseca na 6,84 (S) i 5,84 (T) nakon 9 mjeseci, pri čemu su promjene bile izraženije u prozirnim bočicama. Ton boje (°h), koji je na početku iznosio 359,90°, tijekom skladištenja se značajno smanjio (9,39° za S i 7,60° za T). Zasićenost boje (C*) smanjivala se sa 25,15 (početni uzorak) na 22,52 (S) i 22,84 (T) nakon 9 mjeseci, što potvrđuje promjene u intenzitetu i izraženosti boje.

4.2. STABILNOST KOMPLEKSA NAKON TERMIČKOG TRETIRANJA

4.2.1. Utjecaj temperature na polifenole i antioksidacijsku aktivnost

U Tablici 23. prikazani su rezultati analize kompleksa s ciljem utvrđivanja promjene nakon termičkog tretiranja kompleksa. Rezultati prikazuju udio ukupnih polifenola, proantocijanidina te antioksidacijsku aktivnost kompleksa. U termički netretiranim uzorcima, udio ukupnih polifenola (UP) iznosio je 16,15 mg/g u BP/V kompleksu, 14,79 mg/g u RP/V kompleksu i 14,95 mg/g u GP/V kompleksu. Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C, izmjerene vrijednosti ukupnih polifenola nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na netretirane

uzorke. Pri 90 °C, u BP/V kompleksu nije određena statistički značajna razlika u odnosu na netretirani uzorak, a izmjerena je vrijednost bila je 16,59 mg/g. U kompleksima RP/V i GP/V utvrđene su niže koncentracije u odnosu na termički netretiran uzorak od 13,87 mg/g, odnosno 11,57 mg/g. Povišenjem temperature na 100 °C i 110 °C, udio ukupnih polifenola se smanjio u svim kompleksima uz statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane uzorke. Pri 100 °C koncentracije su iznosile 13,58 mg/g (BP/V), 12,11 mg/g (RP/V) i 11,23 mg/g (GP/V), dok su pri 110 °C izmjerene najniže vrijednosti: 13,23 mg/g za BP/V, 10,17 mg/g za RP/V i 8,36 mg/g za GP/V. Pri svim temperaturama termičkog tretiranja, BP/V kompleks sadržavao je statistički značajno viši udio ukupnih polifenola u usporedbi s RP/V i GP/V.

U netretiranim uzorcima, sadržaj proantocijanidina (PANT) iznosio je 3,38 mg/g u BP/V kompleksu, dok su RP/V i GP/V sadržavali 1,09 mg/g, odnosno 1,17 mg/g. Termičkim tretiranjem kod svih uzoraka utvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na netretirane uzorke. Tretiranjem pri 80 °C, u BP/V kompleksu utvrđeno je smanjenje koncentracije na 1,52 mg/g, dok je u RP/V kompleksu izmjereno povećanje na 1,75 mg/g. U GP/V kompleksu izmjerena je vrijednost od 0,70 mg/g. Pri 90 °C sadržaj proantocijanidina smanjio se u svim kompleksima: na 0,41 mg/g (BP/V), 0,64 mg/g (RP/V) i 0,10 mg/g (GP/V). Nakon tretiranja pri 100 °C, proantocijanidini više nisu bili određeni u BP/V i GP/V kompleksima, dok je u RP/V kompleksu izmjerena vrijednost od 0,09 mg/g. Pri 110 °C, proantocijanidini nisu bili određeni ni u jednom kompleksu. Kod RP/V kompleksa određen je statistički značajno veći udio proantocijanidina u odnosu na ostale komplekse nakon termičkog tretiranja pri 80 °C i 90 °C.

Primjenom DPPH metode, u termički netretiranim uzorcima nisu utvrđene statistički značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti među kompleksima; izmjerene vrijednosti iznosile su 30,39 µmol/g (BP/V), 30,52 µmol/g (RP/V) i 31,24 µmol/g (GP/V). Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C, antioksidacijska aktivnost bila je viša u BP/V (32,85 µmol/g) i RP/V kompleksu (31,77 µmol/g), dok u GP/V kompleksu nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na netretirani uzorak (32,46 µmol/g). Pri temperaturi od 90 °C, u BP/V kompleksu određena je viša vrijednost (32,35 µmol/g) u odnosu na netretirani uzorak, kod RP/V kompleksa manja vrijednost 30,40 µmol/g (bez značajne razlike u odnosu na netretirani), dok je u GP/V kompleksu utvrđeno smanjenje na 28,51 µmol/g. Tretiranje pri 100 °C rezultiralo je nižim vrijednostima antioksidacijske aktivnosti u svim kompleksima: 29,48 µmol/g (BP/V), 27,90 µmol/g (RP/V) i 26,41 µmol/g (GP/V). Pri 110 °C izmjerene su najniže vrijednosti: 27,95 µmol/g (BP/V), 24,30 µmol/g (RP/V) i 24,13 µmol/g (GP/V). Pri svim temperaturama tijekom termičkog tretiranja, kompleks BP/V imao je statistički značajno višu antioksidacijsku

aktivnost izmjerenu DPPH metodom u odnosu na RP/V i GP/V, osim kod GP/V kompleksa tretiranog pri 80 °C, gdje razlika nije utvrđena.

Antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom u netretiranim uzorcima bila je statistički značajno viša u BP/V kompleksu (72,37 $\mu\text{mol/g}$) u odnosu na RP/V (65,64 $\mu\text{mol/g}$) i GP/V (66,65 $\mu\text{mol/g}$), između kojih nije utvrđena statistički značajna razlika. Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C, u svim kompleksima utvrđeno je statistički značajno smanjenje antioksidacijske aktivnosti: BP/V (60,13 $\mu\text{mol/g}$), RP/V (60,86 $\mu\text{mol/g}$) i GP/V (54,68 $\mu\text{mol/g}$). Pri 90 °C antioksidacijska aktivnost kompleksa se dodatno smanjuje, a izmjerene vrijednosti su: 54,19 $\mu\text{mol/g}$ (BP/V), 48,02 $\mu\text{mol/g}$ (RP/V) i 40,70 $\mu\text{mol/g}$ (GP/V). Daljnjim povećanjem temperature na 100 °C antioksidacijska aktivnost se nastavlja smanjivati: 45,26 $\mu\text{mol/g}$ (BP/V), 38,87 $\mu\text{mol/g}$ (RP/V) i 34,23 $\mu\text{mol/g}$ (GP/V). Najniže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti utvrđene su pri 110 °C: BP/V (40,10 $\mu\text{mol/g}$), RP/V (37,11 $\mu\text{mol/g}$) i GP/V (31,18 $\mu\text{mol/g}$). Pri svim temperaturama termičkog tretiranja, vrijednosti u BP/V kompleksu bile su statistički značajno više u odnosu na RP/V i GP/V, osim pri 80 °C, kada između BP/V i RP/V kompleksa nije utvrđena statistički značajna razlika. ABTS metodom u svim kompleksima utvrđeno je postupno, smanjenje antioksidacijske aktivnosti ovisno o temperaturi.

Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom u netretiranim uzorcima iznosila je 97,33 $\mu\text{mol/g}$ za BP/V, 93,92 $\mu\text{mol/g}$ za RP/V i 96,14 $\mu\text{mol/g}$ za GP/V. Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C, kod BP/V kompleksa određena je statistički jednaka vrijednost onoj izmjerenoj u netretiranom uzorku (97,53 $\mu\text{mol/g}$), dok su kod RP/V i GP/V kompleksa utvrđene niže vrijednosti: 90,64 $\mu\text{mol/g}$, odnosno 82,16 $\mu\text{mol/g}$. Pri temperaturi od 90 °C, u svim kompleksima izmjerena je niža antioksidacijska aktivnost uz statistički značajne razlike u odnosu na netretirane uzorke: BP/V (82,42 $\mu\text{mol/g}$), RP/V (73,57 $\mu\text{mol/g}$) i GP/V (62,99 $\mu\text{mol/g}$). Daljnjim povećanjem temperature na 100 °C, utvrđeno je dodatno smanjenje antioksidacijske aktivnosti; kod BP/V i RP/V kompleksa izmjerene su statistički jednake vrijednosti (64,48 $\mu\text{mol/g}$), dok je u GP/V kompleksu određena niža vrijednost (43,76 $\mu\text{mol/g}$). Nakon tretiranja pri 110 °C, izmjerene su najniže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti: 60,91 $\mu\text{mol/g}$ (BP/V), 53,96 $\mu\text{mol/g}$ (RP/V) i 41,09 $\mu\text{mol/g}$ (GP/V), sve tri vrijednosti bile su statistički značajno niže u odnosu na netretirane uzorke.

Tablica 23. Udio ukupnih polifenola (UP), proantocijanidina (PANT) i antioksidacijska aktivnost kompleksa nakon pripreme i nakon termičkog tretiranja

parametri	tretiranje	kompleksi		
		BP/V	RP/V	GP/V
UP (mg/g)	TN	16,15±0,40 ^{xa}	14,79±0,37 ^{ya}	14,95±0,33 ^{ya}
	80 °C	16,91±0,61 ^{xa}	15,38±0,21 ^{ya}	14,50±0,10 ^{za}
	90 °C	16,59±0,59 ^{xa}	13,87±0,38 ^{yb}	11,57±0,56 ^{zb}
	100 °C	13,58±0,19 ^{xb}	13,04±0,43 ^{xb}	11,23±0,04 ^{yb}
	110 °C	13,23±0,62 ^{xb}	10,17±0,04 ^{yc}	8,36±0,40 ^{zc}
PANT (mg/g)	TN	3,38±0,31 ^{xa}	1,09±0,03 ^{yb}	1,17±0,04 ^{ya}
	80 °C	1,52±0,10 ^{xb}	1,75±0,08 ^{xa}	0,70±0,06 ^{zb}
	90 °C	0,41±0,06 ^{yc}	0,64±0,03 ^{xc}	0,10±0,02 ^{zc}
	100 °C	0	0,09±0,03 ^{xd}	0
	110 °C	0	0	0
DPPH (μmol/g)	TN	30,39±0,75 ^{xb}	30,52±0,04 ^{xb}	31,24±0,99 ^{xa}
	80 °C	32,85±0,20 ^{xa}	31,77±0,25 ^{ya}	32,46±0,29 ^{xa}
	90 °C	32,35±0,23 ^{xa}	30,40±0,65 ^{yb}	28,51±0,53 ^{zb}
	100 °C	29,48±0,52 ^{xb}	27,90±0,96 ^{yc}	26,41±0,34 ^{zc}
	110 °C	27,95±0,27 ^{xc}	24,30±0,57 ^{yd}	24,13±0,12 ^{yd}
ABTS (μmol/g)	TN	72,37±0,36 ^{xa}	65,64±0,59 ^{ya}	66,65±0,75 ^{ya}
	80 °C	60,13±0,31 ^{xb}	60,86±1,10 ^{xb}	54,68±0,31 ^{yb}
	90 °C	54,19±0,82 ^{xc}	48,02±1,02 ^{yc}	40,70±0,95 ^{zc}
	100 °C	45,26±0,79 ^{xd}	38,87±1,13 ^{yd}	34,23±0,64 ^{zd}
	110 °C	40,10±0,22 ^{xe}	37,11±1,43 ^{yd}	31,18±0,01 ^{ze}
FRAP (μmol/g)	TN	97,33±0,23 ^{xa}	93,92±0,93 ^{za}	96,14±0,14 ^{ya}
	80 °C	97,53±0,21 ^{ya}	90,64±0,88 ^{zb}	82,16±1,45 ^{xb}
	90 °C	82,42±0,53 ^{xb}	73,57±1,13 ^{yc}	62,99±1,19 ^{zc}
	100 °C	64,18±0,70 ^{xc}	64,79±1,49 ^{xd}	43,76±0,58 ^{yd}
	110 °C	60,91±0,11 ^{xd}	53,96±0,16 ^{ye}	41,09±0,26 ^{ze}
CUPRAC (μmol/g)	TN	168,89±3,04 ^{xa}	147,98±3,96 ^{za}	160,74±1,46 ^{ya}
	80 °C	167,72±3,31 ^{xa}	150,16±3,03 ^{ya}	143,48±3,34 ^{yb}
	90 °C	142,31±1,49 ^{xb}	119,24±4,43 ^{yb}	108,89±2,32 ^{zc}
	100 °C	126,62±0,53 ^{xc}	103,47±2,65 ^{yc}	98,88±0,89 ^{zd}
	110 °C	109,82±0,28 ^{xd}	98,87±0,06 ^{yd}	80,88±3,46 ^{ze}

TN: termički netretiran uzorak - kontrolni uzorak, BP/V: kompleks proteini badema/sok višnje, RP/V: kompleks proteini riže/sok višnje, GP/V: kompleks proteini graška/sok višnje, UP: ukupni polifenoli, PANT: proantocijanidin. Vrijednosti označene s x, y ili z u istom redu definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa nakon pripreme odnosno termičkog tretiranja. Vrijednosti označene s a, b, c, d ili e u istom stupcu za pojedinu komponentu definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa obzirom na termičko tretiranje.

Najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene su CUPRAC metodom. Izmjerena vrijednost u BP/V kompleksu bila je 168,89 μmol/g, dok su statistički značajno niže vrijednosti utvrđene u RP/V (147,98 μmol/g) i GP/V kompleksima (160,74 μmol/g). Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C, BP/V kompleks zadržao je vrijednost statistički jednaku onoj u netretiranom uzorku (167,72 μmol/g), što je također utvrđeno i kod RP/V kompleksa

(150,16 $\mu\text{mol/g}$). U GP/V kompleksu određeno je smanjenje antioksidacijske aktivnosti (143,48 $\mu\text{mol/g}$). Tretiranjem pri 90 °C, u svim kompleksima izmjerene su niže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti: BP/V (142,31 $\mu\text{mol/g}$), RP/V (119,24 $\mu\text{mol/g}$) i GP/V (108,89 $\mu\text{mol/g}$). S povećanjem temperature, pri 100 °C, antioksidacijska aktivnost se dodatno smanjuje u svim kompleksima: BP/V (126,62 $\mu\text{mol/g}$), RP/V (103,47 $\mu\text{mol/g}$) i GP/V (98,88 $\mu\text{mol/g}$). Najniže vrijednosti izmjerene su nakon tretiranja pri 110 °C: 109,82 $\mu\text{mol/g}$ (BP/V), 98,87 $\mu\text{mol/g}$ (RP/V) i 80,88 $\mu\text{mol/g}$ (GP/V). Pri svim temperaturama termičkog tretiranja, u BP/V kompleksu određena je statistički značajno viša antioksidacijska aktivnost u usporedbi s kompleksima RP/V i GP/V.

U Tablici 24. prikazane su izmjerene koncentracije pojedinačnih polifenolnih spojeva u kompleksima prije i nakon termičkog tretiranja. Dobiveni rezultati omogućuju uvid u promjenu sadržaja tih spojeva ovisno o vrsti biljnog proteina korištenog u formulaciji svakog kompleksa. Analizirani spojevi obuhvaćaju predstavnike triju glavnih skupina: antocijanine, flavonole te hidroksicimetne kiseline i njihove derivate.

Koncentracije (Tablica 24.) cijanidin-3-glukozil-rutinozida (C-3-G-R) u termički netretiranim uzorcima iznosile su: 905,95 mg/kg u BP/V, 914,62 mg/kg u RP/V i 973,44 mg/kg u GP/V kompleksu. Postotak degradacije svakog spoja u odnosu na njegovu početnu koncentraciju prije termičkog tretiranja kompleksa prikazan je u Tablici 25. Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C, u svim kompleksima određeno je statistički značajno smanjenje koncentracije C-3-G-R u odnosu na termički netretirane uzorke. Najviša vrijednost izmjerena je u BP/V kompleksu (728,19 mg/kg), uz degradaciju od 19,62 %. Niže vrijednosti imali su kompleksi RP/V (664,57 mg/kg; degradacija 27,34 %) i GP/V (645,38 mg/kg; degradacija 33,70 %). Pri temperaturi od 90 °C došlo je do daljnjeg smanjenja koncentracija i povećanja postotka degradacije, BP/V i RP/V sadržavali su 451,57 mg/kg i 393,06 mg/kg, uz degradaciju od 50,16 % i 57,02 %. Najnižu izmjerenu vrijednost imao je GP/V kompleks (307,70 mg/kg; degradacija 68,39 %). Daljnjim povećanjem temperature na 100 °C, koncentracije C-3-G-R u svim kompleksima su se smanjile (BP/V 205,71 mg/kg, RP/V 210,55 mg/kg i GP/V 193,34 mg/kg), a degradacija je bila iznad 76 %. Pri 110 °C, koncentracije se nastavljaju smanjivati (BP/V 129,16 mg/kg, RP/V 137,06 mg/kg i GP/V 136,07 mg/kg), a degradacija je bila iznad 85 %.

Tablica 24. Koncentracija (mg/kg) pojedinačnih polifenola na kompleksima nakon pripreme i nakon termičkog tretiranja

komponente	tretiranje	kompleksi		
		BP/V	RP/V	GP/V
C-3-G-R	TN	905,95±5,06 ^{ya}	914,62±5,06 ^{ya}	973,44±7,88 ^{xa}
	80 °C	728,19±1,50 ^{xb}	664,57±0,97 ^{yb}	645,38±2,05 ^{zb}
	90 °C	451,57±3,88 ^{xc}	393,06±0,37 ^{yc}	307,70±0,45 ^{zc}
	100 °C	205,71±1,78 ^{yd}	210,55±0,10 ^{xd}	193,34±0,37 ^{zd}
	110 °C	129,16±0,43 ^{ye}	137,06±0,14 ^{xe}	136,07±0,25 ^{xe}
C-3-R	TN	2184,90±8,35 ^{za}	2290,69±7,94 ^{ya}	2378,73±5,43 ^{xa}
	80 °C	1594,43±4,85 ^{xb}	1592,23±7,29 ^{xb}	1468,69±7,22 ^{yb}
	90 °C	890,51±0,59 ^{xc}	854,24±3,79 ^{yc}	569,59±1,49 ^{zc}
	100 °C	308,48±3,79 ^{yd}	351,69±0,82 ^{xd}	286,42±1,64 ^{zd}
	110 °C	138,70±2,31 ^{ze}	162,71±3,80 ^{xe}	158,77±1,79 ^{ye}
K-3-R	TN	231,51±2,03 ^{xa}	200,34±0,18 ^{yd}	200,82±2,53 ^{yc}
	80 °C	219,41±7,03 ^{zb}	302,27±3,62 ^{xa}	238,65±7,75 ^{ya}
	90 °C	215,39±2,18 ^{yb}	260,06±5,42 ^{xb}	209,16±1,45 ^{zb}
	100 °C	198,74±7,69 ^{yc}	238,51±4,79 ^{xc}	199,38±3,98 ^{yc}
	110 °C	157,03±0,09 ^{zd}	197,91±1,54 ^{xd}	168,99±3,17 ^{yd}
K	TN	125,89±1,46 ^{yc}	175,12±1,74 ^{xa}	173,83±0,78 ^{xa}
	80 °C	123,15±3,42 ^{yc}	123,42±3,65 ^{yd}	158,48±5,24 ^{xc}
	90 °C	132,30±1,92 ^{yb}	131,34±2,72 ^{yc}	158,74±1,07 ^{xc}
	100 °C	144,70±1,46 ^{ya}	140,22±2,91 ^{yb}	165,66±1,74 ^{xb}
	110 °C	135,28±1,85 ^{zb}	144,22±2,59 ^{yb}	159,92±1,13 ^{xc}
KK	TN	587,04±7,70 ^{zd}	831,02±6,95 ^{xb}	745,90±7,40 ^{yb}
	80 °C	614,52±5,63 ^{zc}	890,90±0,60 ^{xa}	788,91±7,11 ^{ya}
	90 °C	629,15±2,29 ^{zb}	822,13±8,25 ^{xb}	725,11±1,82 ^{yc}
	100 °C	647,60±4,20 ^{za}	815,35±1,71 ^{xc}	755,49±3,98 ^{yb}
	110 °C	575,78±3,72 ^{ze}	754,46±4,75 ^{xd}	689,06±5,24 ^{yd}
NKK	TN	444,37±2,29 ^{za}	497,33±3,97 ^{xe}	450,99±3,73 ^{yb}
	80 °C	449,13±7,20 ^{za}	713,27±6,87 ^{xa}	508,49±9,88 ^{ya}
	90 °C	430,40±2,69 ^{zb}	589,43±2,96 ^{xb}	445,56±5,48 ^{yb}
	100 °C	420,60±5,44 ^{zc}	542,25±8,52 ^{xc}	447,23±5,42 ^{yb}
	110 °C	379,76±6,78 ^{zd}	458,74±1,13 ^{xe}	399,72±2,84 ^{yc}
<i>p</i> -KK	TN	204,38±3,68 ^{zd}	447,66±3,54 ^{xb}	390,76±0,72 ^{yc}
	80 °C	196,00±4,11 ^{zd}	264,63±11,78 ^{ye}	354,65±3,24 ^{xe}
	90 °C	249,19±4,57 ^{zc}	303,92±8,98 ^{yd}	377,62±5,00 ^{xd}
	100 °C	318,07±1,37 ^{zb}	393,34±10,90 ^{yc}	453,76±1,04 ^{xb}
	110 °C	372,66±5,11 ^{za}	500,48±7,83 ^{ya}	515,05±1,64 ^{xa}
<i>d p</i> -KK	TN	623,12±2,16 ^{zc}	769,61±4,39 ^{xd}	683,81±0,53 ^{yb}
	80 °C	655,50±10,01 ^{za}	1003,07±5,70 ^{xa}	767,82±3,99 ^{ya}
	90 °C	638,40±6,58 ^{zb}	883,32±5,90 ^{xb}	673,75±3,43 ^{yc}
	100 °C	615,77±8,57 ^{zc}	828,35±8,54 ^{xc}	665,83±4,26 ^{yd}
	110 °C	518,45±4,50 ^{zd}	707,90±1,19 ^{xe}	582,09±7,29 ^{ye}

TN: termički netretiran uzorak - kontrolni uzorak, BP/V: kompleks proteini badema/sok višnje, RP: kompleks proteini riže/sok višnje, GP: kompleks proteini graška/sok višnje, C-3-G-R: cijanidin-3-glukozil-rutinozid, C-3-R: cijanidin-3-rutinozid, K-3-R: kvercetin-3-rutinozid, K: kvercetin, KK: klorogenska kiselina, NKK: neoklorogenska kiselina, *p*-KK: *p*-kumarinska kiselina, *d p*-KK: derivat *p*-

kumarinske kiseline. Vrijednosti označene s x, y ili z u istom redu definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa nakon pripreme odnosno termičkog tretiranja. Vrijednosti označene s a, b, c, d ili e u istom stupcu za pojedinu komponentu definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa obzirom na termičko tretiranje.

U termički netretiranim kompleksima svi uzorci sadržavali su međusobno statistički značajno različite koncentracije cijanidin-3-rutinozida (C-3-R) (Tablica 24.). Najviša vrijednost izmjerena je u GP/V kompleksu (2378,73 mg/kg), zatim u RP/V (2290,69 mg/kg) i BP/V kompleksu (2184,90 mg/kg). Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C, u svim kompleksima određeno je statistički značajno smanjenje koncentracije C-3-R. Degradacija (Tablica 25.) je iznosila 27,03 % u BP/V kompleksu (1594,43 mg/kg), 30,49 % u RP/V (1592,23 mg/kg) te 38,26 % u GP/V kompleksu (1468,69 mg/kg). Termičkim tretiranjem pri 90 °C došlo je do daljnjeg smanjenja koncentracija i povećanja degradacije, uz statistički značajne razlike između svih kompleksa. Degradacija je iznosila 59,24 % za BP/V (890,51 mg/kg), 62,71 % za RP/V (854,24 mg/kg) i 76,05 % za GP/V (569,59 mg/kg). Pri temperaturi od 100 °C, koncentracije C-3-R u svim kompleksima smanjile su ispod 400 mg/kg, dok je stupanj degradacije bio iznad 84 %. Najniže izmjerene vrijednosti određene su pri 110 °C: 138,70 mg/kg u BP/V, 162,71 mg/kg u RP/V i 158,77 mg/kg u GP/V, uz stupanj degradacije veći od 92 % kod svih kompleksa.

U termički netretiranim kompleksima najviša koncentracija kvercetin-3-rutinozida (K-3-R) izmjerena je u BP/V kompleksu (231,51 mg/kg), dok su RP/V i GP/V sadržavali statistički jednake vrijednosti (200,50 mg/kg) (Tablica 24.). Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C, u RP/V i GP/V kompleksima određeno je povećanje koncentracije K-3-R na 302,27 mg/kg (+50,88 %) i 238,65 mg/kg (+18,84 %), dok je kod BP/V kompleksa došlo do smanjenja koncentracije na 219,41 mg/kg, uz degradaciju od 5,23 % (Tablica 25.). Pri temperaturi od 90 °C, kod BP/V kompleksa izmjerena je manja koncentracija u odnosu na netretirani uzorak (215,39 mg/kg; degradacija 6,96 %). Istovremeno, kod RP/V i GP/V kompleksa koncentracija spoja se povećala na 260,06 mg/kg (+29,81 %) i 209,16 mg/kg (+4,15 %) u odnosu na netretirane uzorke. Pri temperaturi od 100 °C, kod RP/V kompleksa određena je statistički značajna razlika u odnosu na druge komplekse, te je izmjereno daljnje povećanje koncentracije na 238,51 mg/kg, što predstavlja povećanje od +19,05 % u odnosu na netretirani uzorak. BP/V i GP/V nisu se međusobno statistički razlikovali; izmjerene koncentracije iznosile su 198,74 mg/kg (degradacija 14,45 %) i 199,38 mg/kg (degradacija 0,72 %). Pri 110 °C određena je degradacija K-3-R i statistički značajna razlika u odnosu na netretirani uzorak kod BP/V kompleksa koji je sadržavao 157,03 mg/kg (degradacija 32,17 %) i kod GP/V 168,99 mg/kg (degradacija

15,85 %). Kod kompleksa RP/V termičkim tretiranjem pri 110 °C određena vrijednost (197,91 mg/kg; degradaciju od 1,21 %) nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na netretirani uzorak. Tijekom termičkog tretiranja, kod kompleksa RP/V utvrđena je statistički značajno viša koncentracija K-3-R, u odnosu na ostale komplekse.

U termički netretiranim uzorcima koncentracije kvercetina (K) iznosile su 125,89 mg/kg u BP/V, 175,12 mg/kg u RP/V i 173,83 mg/kg u GP/V kompleksima (Tablica 24.), s tim da nije bilo statistički značajne razlike između RP/V i GP/V. Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C, u BP/V kompleksu izmjerena je koncentracija kvercetina od 123,15 mg/kg, uz degradaciju od 2,18 % (Tablica 25.), pri čemu ta promjena nije bila statistički značajna u odnosu na netretirani uzorak. U RP/V kompleksu, pri istoj temperaturi, određena je statistički značajna degradacija od 29,52 %, uz koncentraciju od 123,42 mg/kg. GP/V kompleks imao je višu koncentraciju kvercetina u usporedbi s ostalim kompleksima (158,48 mg/kg), uz degradaciju od 8,83 %. Pri temperaturi od 90 °C, kod BP/V kompleksa izmjereno je povećanje koncentracije na 132,30 mg/kg, što predstavlja povećanje od +5,09 % u odnosu na netretirani uzorak. Kompleks RP/V pri navedenoj temperaturi imao je manju koncentraciju spoja u odnosu na netretiran uzorak i ona je iznosila 131,34 mg/kg (degradacija 25,00 %), a kod GP/V također dolazi do smanjenja na 158,74 mg/kg (degradacija 8,68 %). Pri temperaturi od 100 °C, u BP/V kompleksu određeno je statistički značajno povećanje koncentracije kvercetina u odnosu na netretirani uzorak, koje je iznosilo +10,32 % (144,70 mg/kg). RP/V kompleks sadržavao je 140,22 mg/kg (degradacija 19,93 %), dok je u GP/V kompleksu izmjerena koncentracija iznosila 165,66 mg/kg (degradacija 4,70 %) te su obje koncentracije bile manje u odnosu na netretirane uzorke. Nakon tretiranja pri 110 °C, BP/V je imao statistički značajno višu vrijednost u odnosu na netretirani uzorak (135,28 mg/kg; +7,46 %). Koncentracije u RP/V i GP/V kompleksima bile su manje u odnosu na termički netretirane uzorke i iznosile su 144,22 mg/kg (degradacija 17,65 %) i 159,92 mg/kg (degradacija 8,00 %). Tijekom termičkog tretiranja, u kompleksu GP/V utvrđena je statistički značajno viša koncentracija kvercetina u usporedbi s ostalim kompleksima.

U termički netretiranim uzorcima, koncentracije klorogenske kiseline (KK) iznosile su: 587,04 mg/kg u BP/V kompleksu, 831,02 mg/kg u RP/V kompleksu i 745,90 mg/kg u GP/V kompleksu (Tablica 24.). Termičkim tretiranjem pri 80 °C, nije došlo do degradacije spoja ni u jednom kompleksu, već su koncentracije bile statistički više u odnosu na netretirane uzorke: BP/V 614,52 mg/kg (+4,68 %), RP/V 890,90 mg/kg (+7,21 %) i GP/V 788,91 mg/kg (+5,77 %) (Tablica 25.). Povećanjem temperature pri 90 °C u BP/V kompleksu koncentracija se povećala na 629,15 mg/kg (+7,17 %) u odnosu na netretirani uzorak, dok se kod RP/V i GP/V

koncentracija smanjila na 822,13 mg/kg (degradacija 1,07 %) i 725,11 mg/kg (degradacija 2,79 %). Pri 100 °C u BP/V kompleksu izmjerena je statistički najviša koncentracija klorogenske kiseline u odnosu na netretiran uzorak (647,60 mg/kg; +10,32 %). U RP/V kompleksu izmjerena je manja koncentracija, 815,35 mg/kg (degradacija 1,89 %), dok se kompleks GP/V pri temperaturi od 100 °C statistički nije razlikovao od netretiranog uzorak (755,49 mg/kg; +1,29 %). Daljnje tretiranje, pri 110 °C dovelo je do smanjenja koncentracije klorogenske kiseline u svim kompleksima u odnosu na netretirane uzorke: BP/V (575,78 mg/kg; degradacija 1,92 %), RP/V (754,46 mg/kg; degradacija 9,21 %) i GP/V (689,06 mg/kg; degradacija 7,62 %). Termičkim tretiranjem kompleksa, za koncentraciju klorogenske kiseline utvrđene su statistički značajne razlike među kompleksima uz dosljedan trend: $RP/V > GP/V > BP/V$.

U termički netretiranim uzorcima, koncentracija neoklorogenske kiseline (NKK) iznosila je 444,37 mg/kg u BP/V, 497,33 mg/kg u RP/V i 450,99 mg/kg u GP/V kompleksima (Tablica 24.). Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C kod BP/V kompleksa koncentracija je iznosila 449,13 mg/kg (+1,07 %) bez statistički značajne razlike u odnosu na netretirani uzorak, dok je povećanje koncentracije određeno kod RP/V kompleksa 713,27 mg/kg (+43,42 %) i GP/V kompleksa 508,49 mg/kg (+12,75 %). Pri temperaturi od 90 °C, kod BP/V kompleksa utvrđeno je smanjenje koncentracije na 430,40 mg/kg (degradacija 3,14 %), u RP/V kompleksu izmjereno je povećanje (589,43 mg/kg; +18,52 %), dok se GP/V s koncentracijom od 445,56 mg/kg (degradacija 1,20 %) nije statistički razlikovao od netretiranog uzorka. Koncentracija NKK se smanjila termičkim tretiranjem pri 100 °C kod BP/V (420,60 mg/kg; degradacija 5,35 %), povećala kod RP/V (542,25 mg/kg; +9,03 %). Kod GP/V s koncentracijom od 447,23 mg/kg (degradacija 0,83 %) nije određena statistički značajna razlika u odnosu na netretirani uzorak. Pri 110 °C, određeno je smanjenje koncentracije kod BP/V (379,76 mg/kg; degradacija 14,54 %) i GP/V (399,72 mg/kg; degradacija 11,37 %), dok se kompleks RP/V statistički nije razlikovao od netretiranog uzorka (458,74 mg/kg; degradacija 7,76 %). Pri svakoj temperaturi utvrđene su statistički značajne razlike u koncentraciji neoklorogenske kiseline među kompleksima, pri čemu su koncentracije slijedile dosljedan odnos: $RP/V > GP/V > BP/V$.

U termički netretiranim kompleksima, koncentracije *p*-kumarinske kiseline (*p*-KK) iznosile su: 204,38 mg/kg u BP/V, 447,66 mg/kg u RP/V i 390,76 mg/kg u GP/V kompleksima (Tablica 24.). Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C, kod BP/V kompleksa nije došlo do statistički značajne razlike u odnosu na netretirani uzorak (196,00 mg/kg; degradacija 4,10 %), dok je kod RP/V kompleksa određeno smanjenje koncentracije (264,63 mg/kg; degradacija od

40,89 %) kao i kod GP/V (354,65 mg/kg; degradacija 9,24 %). Pri temperaturi od 90 °C, u BP/V kompleksu izmjereno je povećanje koncentracije *p*-KK u odnosu na netretirani uzorak, s vrijednošću od 249,19 mg/kg (+21,92 %). Istovremeno, u RP/V i GP/V kompleksima određeno je smanjenje koncentracije 303,92 mg/kg (degradacija 32,11 %) i 377,62 mg/kg (degradacija 3,36 %). Trend povećanja koncentracije nastavio se pri 100 °C kod kompleksa BP/V (328,46 mg/kg; +55,63 %). Kod RP/V kompleksa nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na netretirani uzorak, a izmjerena koncentracija iznosila je 393,34 mg/kg, uz degradaciju od 12,13 %. Pri navedenoj temperaturi kod GP/V dolazi do povećanja koncentracije na 453,76 mg/kg (+16,12 %). Statistički značajne koncentracije *p*-KK u odnosu na netretirane uzorke određene su pri 110 °C, gdje kod svih kompleksa dolazi do povećanja koncentracije: BP/V 372,66 mg/kg (+82,34 %), RP/V 500,48 mg/kg (+11,80 %) i GP/V 515,05 mg/kg (+34,81 %). Pri svakoj temperaturi utvrđene su statistički značajne razlike u koncentraciji *p*-KK među kompleksima, pri čemu su koncentracije slijedile dosljedan odnos: GP/V > RP/V > BP/V.

U termički netretiranim kompleksima koncentracije derivata *p*-kumarinske kiseline (d *p*-KK) iznosile su: 623,12 mg/kg u BP/V, 769,61 mg/kg u RP/V i 683,81 mg/kg u GP/V kompleksima (Tablica 24.). Nakon termičkog tretiranja pri 80 °C, u svim kompleksima određeno je statistički značajno povećanje koncentracije d *p*-KK u odnosu na netretirane uzorke, pri čemu su postignute najviše koncentracije spoja: BP/V 655,50 mg/kg (+5,20 %), RP/V 1003,07 mg/kg (+30,33 %) i GP/V 767,82 mg/kg (+12,29 %). Pri temperaturi od 90 °C, kod BP/V (638,40 mg/kg; +2,45 %) i RP/V (883,32 mg/kg; +14,78 %) određeno je povećanje koncentracije u odnosu na termički netretirane komplekse. Smanjenje koncentracije određeno je kod GP/V kompleksa (673,75 mg/kg; degradacija 2,63 %). Termičkim tretiranjem pri 100 °C kod BP/V kompleksa nije određena statistički značajna razlika u odnosu na netretiran uzorak, te je koncentracija d *p*-KK iznosila 615,77 mg/kg uz degradaciju od 1,18 %. U RP/V kompleksu određeno je povećanje koncentracije (828,35 mg/kg; +7,63 %), dok je smanjenje koncentracije određeno kod GP/V (665,83 mg/kg; degradacija 2,63 %). Pri 110 °C, u svim kompleksima određeno je statistički značajno smanjenje koncentracije u odnosu na netretirane uzorke: BP/V 518,45 mg/kg (degradacija 16,80 %), RP/V 707,90 mg/kg (degradacija 8,02 %) i GP/V 582,09 mg/kg (degradacija 14,88 %). Statistički značajne razlike u koncentraciji d *p*-KK među kompleksima utvrđene su pri svakoj temperaturi, uz dosljedan odnos: RP/V > GP/V > BP/V.

Tablica 25. Degradacija (%) pojedinačnih polifenola tijekom termičkog tretiranja

Komponente	T (°C)	Kompleksi		
		BP/V	RP/V	GP/V
C-3-G-R	80	19,62	27,34	33,70
	90	50,16	57,02	68,39
	100	77,29	76,98	80,14
	110	85,74	85,01	86,02
C-3-R	80	27,03	30,49	38,26
	90	59,24	62,71	76,05
	100	85,88	84,65	87,96
	110	93,65	92,90	93,33
K-3-R	80	5,23	+50,88	+18,84
	90	6,96	+29,81	+4,15
	100	14,15	+19,05	0,72
	110	32,17	1,21	15,85
K	80	2,18	29,52	8,83
	90	+5,09	25,00	8,68
	100	+14,94	19,93	4,70
	110	+7,46	17,65	8,00
KK	80	+4,68	+7,21	+5,77
	90	+7,17	1,07	2,79
	100	+10,32	1,89	+1,29
	110	1,92	9,21	7,62
NKK	80	+1,07	+43,42	+12,75
	90	3,14	+18,52	1,20
	100	5,35	+9,03	0,83
	110	14,54	7,76	11,37
<i>p</i> -KK	80	4,10	40,89	9,24
	90	+21,92	32,11	3,36
	100	+55,63	12,13	+16,12
	110	+82,34	+11,80	+31,81
<i>d p</i> -KK	80	+5,20	+30,33	+12,29
	90	+2,45	+14,78	1,47
	100	1,18	+7,63	2,63
	110	16,80	8,02	14,88

BP/V: kompleks proteini badema/sok višnje; RP/V: kompleks proteini riže/sok višnje; GP/V: kompleks proteini graška/sok višnje; C-3-G-R: cijanidin-3-glukozil-rutinozid; C-3-R: cijanidin-3-rutinozid; K-3-R: kvercetin-3-rutinozid; K: kvercetin; KK: klorogenska kiselina; NKK: neoklorogenska kiselina; *p*-KK: *p*-kumarinska kiselina; *d p*-KK: derivat *p*-kumarinske kiseline; T: temperatura

U Tablici 26. prikazani su kinetički parametri degradacije cijanidin-3-glukozil-rutinozida (C-3-G-R) i cijanidin-3-rutinozida (C-3-R) u svim kompleksima, tijekom termičkog tretiranja pri 80, 90, 100 i 110 °C. Kinetički parametri za kvercetin-3-rutinozid (K-3-R) prikazani su isključivo za BP/V kompleks, jer je samo u tom slučaju određeno linearno smanjenje koncentracije spoja s povećanjem temperature.

Reakcije prvog reda karakterizira proporcionalnost između brzine degradacije i trenutne koncentracije spoja, pri čemu se koncentracija spoja smanjuje s vremenom. Reakcije drugog reda pretpostavljaju da je brzina degradacije proporcionalna kvadratu koncentracije reaktanta, što dovodi do bržeg smanjenja koncentracije pri višim početnim vrijednostima. U reakcijama nultog reda, brzina degradacije ostaje konstantna i ne ovisi o koncentraciji spoja. Na temelju najbolje prilagodbe eksperimentalnim podacima, kao najprikladniji model za opis degradacije ispitivanih spojeva odabrana je kinetika prvog reda. Parametri kinetike prvog reda uključuju konstantu brzine reakcije (k , min^{-1}), vrijeme poluraspada ($t_{1/2}$, h) i energiju aktivacije (E_a , kJ/mol).

U ispitivanim kompleksima vrijednosti konstante brzine reakcije (k) povećavale su se s povećanjem temperature. Vrijednosti vremena poluraspada ($t_{1/2}$) slijedile su obrnuti trend, smanjivale su se s povećanjem temperature. Dobivene vrijednosti energije aktivacije (E_a) omogućuju usporedbu termičke stabilnosti analiziranih spojeva unutar različitih proteinskih matriksa.

Za kinetičke parametre termičke degradacije cijanidin-3-glukozil-rutinozida (C-3-G-R) u BP/V kompleksu utvrđena je temperaturna ovisnost, što znači da su se s povećanjem temperature povećavale vrijednosti konstante brzine reakcije (k), dok su vremena poluraspada ($t_{1/2}$) bila sve kraća. Pri 80 °C, k i $t_{1/2}$ iznosili su 0,0036 min^{-1} i 3,17 h, dok je pri 90 °C došlo do povećanja degradacije ($k = 0,0116 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 1,00 \text{ h}$). Termičkim tretiranjem pri 100 °C i 110 °C konstanta k dodatno se povećala (0,0247 min^{-1} i 0,0324 min^{-1}), uz skraćenje vremena poluraspada na 0,47 h i 0,36 h. Energija aktivacije (E_a) iznosila je 82,85 kJ/mol. Sličan temperaturni trend određen je i kod degradacije cijanidin-3-rutinozida (C-3-R) u BP/V kompleksu. Pri 80 °C, k i $t_{1/2}$ iznosili su 0,0052 min^{-1} i 2,20 h, dok je pri 90 °C došlo do ubrzanja reakcije ($k = 0,0149 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 0,77 \text{ h}$). Pri višim temperaturama (100 °C i 110 °C) konstanta k povećala se na 0,0326 min^{-1} i 0,0459 min^{-1} , uz smanjenje $t_{1/2}$ na 0,35 h i 0,25 h. Dobivena energija aktivacije iznosila je 82,37 kJ/mol.

Za kvercetin-3-rutinozid (K-3-R) u BP/V kompleksu također je utvrđena temperaturna ovisnost kinetičkih parametara. Pri temperaturi od 80 °C, vrijednosti k i $t_{1/2}$ iznosile su 0,0008 min^{-1} i 12,91 h. Pri 90 °C određeno je povećanje vrijednosti k (0,0012 min^{-1}) i smanjenje $t_{1/2}$ (9,60 h). Povećanjem temperature došlo je do povećanja brzine reakcije tako da su pri 100 °C i 110 °C konstante k iznosile 0,0025 min^{-1} i 0,0064 min^{-1} , dok su vremena poluraspada bila 4,54 h i 1,79 h. Energija aktivacije iznosila je 74,77 kJ/mol.

Tablica 26. Kinetički parametri termičke degradacije

Komponente	T (°C)	k (min ⁻¹)	t _{1/2} (h)	E _a (kJ/mol)
BP/V				
C-3-G-R	80	0,0036	3,17	82,85
	90	0,0116	1,00	
	100	0,0247	0,47	
	110	0,0324	0,36	
C-3-R	80	0,0052	2,20	82,37
	90	0,0149	0,77	
	100	0,0326	0,35	
	110	0,0459	0,25	
K-3-R	80	0,0008	12,91	74,77
	90	0,0012	9,60	
	100	0,0025	4,54	
	110	0,0064	1,79	
RP/V				
C-3-G-R	80	0,0053	2,17	66,78
	90	0,0140	0,82	
	100	0,0244	0,47	
	110	0,0316	0,37	
C-3-R	80	0,0060	1,91	74,54
	90	0,0164	0,70	
	100	0,0312	0,37	
	110	0,0440	0,26	
GP/V				
C-3-G-R	80	0,0068	1,69	57,15
	90	0,0192	0,60	
	100	0,0269	0,43	
	110	0,0327	0,35	
C-3-R	80	0,0080	1,44	63,13
	90	0,0238	0,48	
	100	0,0352	0,33	
	110	0,0451	0,26	

BP/V: kompleks proteini badema/sok višnje; RP/V: kompleks proteini riže/sok višnje; GP/V: kompleks proteini graška/sok višnje; C-3-G-R: cijanidin-3-glukozil-rutinozid; C-3-R: cijanidin-3-rutinozid; K-3-R: kvercetin-3-rutinozid; k: konstanta brzine reakcije; t_{1/2}: vrijeme poluraspada; E_a: energija aktivacije; T: temperatura

Kinetika degradacije C-3-G-R u RP/V kompleksu imala je temperaturnu ovisnost. Pri 80 °C, vrijednosti k i t_{1/2} iznosile su 0,0053 min⁻¹ i 2,17 h, dok je pri 90 °C došlo do ubrzanja degradacije (k = 0,0140 min⁻¹; t_{1/2} = 0,82 h). Pri temperaturama 100 °C i 110 °C konstante k dodatno su se povećale (0,0244 min⁻¹ i 0,0316 min⁻¹), uz skraćenje t_{1/2} na 0,47 h i 0,37 h. Energija aktivacije iznosila je 66,78 kJ/mol. Za C-3-R u istom kompleksu, vrijednosti k i t_{1/2} pri 80 °C bile su 0,0060 min⁻¹ i 1,91 h, dok su pri 90 °C iznosile 0,0164 min⁻¹ i 0,70 h. Daljnjim

povećanjem temperature, pri 100 °C i 110 °C, k se povećao na 0,0312 min⁻¹ i 0,0440 min⁻¹, a vrijeme poluraspada smanjilo na 0,37 h i 0,26 h. Energija aktivacije za degradaciju C-3-R u RP/V kompleksu iznosila je 74,54 kJ/mol.

Kod GP/V kompleksa C-3-G-R kinetički parametri k i t_{1/2} pri temperaturi 80 °C iznosili su 0,0068 min⁻¹ i 1,69 h. Povećanjem temperature pri 90 °C došlo je do ubrzanja degradacije (k=0,0192 min⁻¹; t_{1/2}=0,60 h), dok su pri 100 °C i 110 °C određene vrijednosti k od 0,0269 min⁻¹ i 0,0327 min⁻¹, uz odgovarajuća vremena poluraspada 0,43 h i 0,35 h. Energija aktivacije iznosila je 57,15 kJ/mol. Kod C-3-R u istom kompleksu, vrijednost k pri 80 °C bila je 0,0080 min⁻¹ (t_{1/2}= 1,44 h), a pri 90 °C 0,0238 min⁻¹ (t_{1/2}=0,48 h). Pri 100 °C i 110 °C konstante k iznosile su 0,0352 min⁻¹ i 0,0451 min⁻¹, dok su vremena poluraspada bila 0,33 h i 0,26 h. Dobivena vrijednost E_a za degradaciju C-3-R u GP/V kompleksu iznosila je 63,13 kJ/mol.

4.2.2. Parametri boje proteina i njihovih kompleksa nakon termičkog tretiranja

Za procjenu vizualnih promjena nastalih nakon termičkog tretiranja uzoraka praćeni su parametri boje biljnih proteina badema, riže i graška te njihovih kompleksa s polifenolima soka višnje. Analiza boje provedena je u CIELAB sustavu. Parametar ΔE* definira ukupnu promjenu boje kompleksa u odnosu na pripadajući protein. Vrijednosti ΔE i ΔE* omogućuju procjenu vizualnog učinka kompleksiranja polifenola s proteinima te utjecaja termičkog tretiranja na promjenu boje.

Termičkim tretiranjem proteina badema vrijednost L* (svjetlina) kontinuirano se smanjivala povećanjem temperature s 83,53 u netretiranom uzorku na 74,69 pri 110 °C. Vrijednost a* se povećavala, od 0,96 u netretiranom uzorku do 6,18 pri 110 °C, a vrijednost b* pratila je isti trend povećanja od 15,83 kod netretiranog uzorka do 26,19 (110 °C). Ukupna promjena boje (ΔE) bila je u rasponu od 2,20 pri 80 °C do 14,59 pri 110 °C. Ton boje (°h) smanjivao se s 86,54 kod netretiranog uzorka do 76,73 pri 110 °C. Zasićenost boje (C*) povećavala se s 15,86 (netretirani uzorak) na 26,91 (110 °C).

Termičkim tretiranjem kompleksa BP/V za parametar L* određena je najviša vrijednost pri 100 °C (58,48), a najniža pri 110 °C (53,14) u odnosu na termički netretiran uzorak (54,14). Vrijednost a* se smanjivala s 29,84 (netretirani uzorak) do 12,61 pri 110 °C. Vrijednost b* se povećavala povećanjem temperature s 1,00 (termički netretiran uzorak) do 21,19 pri 110 °C. Vrijednosti ukupne promjene boje (ΔE) bile su u rasponu od 1,73 (80 °C) do 26,56 (110 °C).

Vrijednost ΔE^* određuje razliku u boji između kompleksa i odgovarajućeg proteina pri istoj temperaturi, te je bila u rasponu od 43,80 u netretiranom uzorku do 23,04 u kompleksu tretiranom pri 110 °C. Ton boje ($^{\circ}h$) povećavao se s 1,91° u netretiranom uzorku na 59,24° pri 110 °C. Zasićenost boje (C^*) smanjila se u odnosu na početni uzorak (29,86), pri čemu je najniža vrijednost određena pri 100 °C (21,51), a zatim se povećala na 24,66 pri 110 °C.

Tablica 27. Parametri boje proteina badema i kompleksa protein badema/sok višnje

T	L*	a*	b*	ΔE	ΔE^*	$^{\circ}h$	C^*
BP							
TN	83,53±0,01 ^a	0,96±0,01 ^e	15,83±0,01 ^e	-	-	86,54±0,03 ^a	15,86±0,01 ^e
80	81,89±0,01 ^b	1,32±0,03 ^d	17,26±0,02 ^d	2,20	-	85,62±0,11 ^b	17,31±0,03 ^d
90	80,84±0,04 ^c	1,69±0,02 ^c	18,72±0,07 ^c	4,02	-	84,84±0,04 ^c	18,79±0,07 ^c
100	78,32±0,03 ^d	4,11±0,03 ^b	23,22±0,08 ^b	9,57	-	79,95±0,05 ^d	23,58±0,08 ^b
110	74,69±0,02 ^e	6,18±0,02 ^a	26,19±0,04 ^a	14,59	-	76,73±0,03 ^e	26,91±0,04 ^a
BP/V							
TN	54,14±0,04 ^c	29,84±0,12 ^a	1,00±0,01 ^e	-	43,80	1,91±0,03 ^e	29,86±0,12 ^a
80	53,78±0,10 ^d	29,25±0,08 ^b	2,59±0,03 ^d	1,73	42,25	5,05±0,08 ^d	29,37±0,08 ^b
90	57,10±0,08 ^b	22,57±0,04 ^c	6,55±0,04 ^c	9,62	33,88	16,19±0,12 ^c	23,51±0,03 ^d
100	58,48±0,19 ^a	14,59±0,06 ^d	15,82±0,03 ^b	21,71	23,63	47,31±0,09 ^b	21,51±0,05 ^e
110	53,14±0,02 ^e	12,61±0,03 ^e	21,19±0,01 ^a	26,56	23,04	59,24±0,07 ^a	24,66±0,01 ^c

TN: termički netretiran uzorak - kontrolni uzorak; T: temperatura; BP: protein badema; BP/V: kompleks protein badema/sok višnje; ΔE : promjena boje termički tretiranog uzorka u odnosu na netretirani; ΔE^* : promjena boje kompleksa u odnosu na protein. Vrijednosti označene s a, b, c, d ili e u istom stupcu za pojedini parametar definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa obzirom na termičko tretiranje.

Termičkim tretiranjem proteina riže u temperaturnom rasponu od 80 °C do 110 °C, vrijednost L* (svjetlina) smanjila se s 85,05 u netretiranom uzorku na 83,29 pri 110 °C. Vrijednost a* povećala se s 1,67 na 2,11, dok se vrijednost b* linearno povećavala od 15,86 do 19,15. Ukupna promjena boje (ΔE) bila je u rasponu od 2,06 (80 °C) do 3,75 (110 °C). Ton boje ($^{\circ}h$) nije se značajno mijenjao, u netretiranom uzorku iznosio je 84,00°, a kod tretiranih uzoraka nisu utvrđene statistički značajne razlike, pri čemu je prosječna vrijednost iznosila 83,76°. Vrijednost zasićenosti boje (C^*) povećala se s 15,95 (netretirani uzorak) na 19,26 (pri 110 °C).

U kompleksu proteina riže s polifenolima soka višnje (RP/V), vrijednost L* u netretiranom uzorku iznosila je 57,41. Tijekom termičkog tretiranja povećavala se do najviše vrijednosti pri 100 °C (61,45), a zatim se smanjila na 57,20 pri 110 °C. Vrijednost a* se smanjivala s 27,52 (netretirani uzorak) na 12,37 (110 °C), dok se vrijednost b* povećavala s 0,65 na 23,11. Ukupna promjena boje (ΔE) povećavala se s 5,22 (80 °C) na 27,09 (110 °C). Vrijednost ΔE^* , koja određuje razliku u boji između kompleksa i čistog proteina, smanjivala se s 40,78 (netretirani kompleks) na 25,38 (100 °C), uz povećanje na 28,31 pri 110 °C. Ton boje

(°h) linearno se povećavao od 1,36° do 61,83°. Vrijednost C* iznosila je 27,52 u netretiranom uzorku, a tijekom termičkog tretiranja najniža vrijednost određena je pri 90 °C (20,76), Povećanjem temperature zasićenost boje se povećala na 22,52 pri 100 °C te na 26,21 pri 110 °C.

Tablica 28. Parametri boje proteina riže i kompleksa protein riže/sok višnje

T	L*	a*	b*	ΔE	ΔE*	°h	C*
RP							
TN	85,05±0,01 ^a	1,67±0,01 ^d	15,86±0,01 ^e	-	-	84,00±0,03 ^a	15,95±0,01 ^d
80	84,12±0,02 ^b	1,95±0,07 ^c	17,68±0,03 ^d	2,06	-	83,71±0,09 ^b	17,79±0,06 ^c
90	84,07±0,03 ^b	1,91±0,02 ^c	17,81±0,02 ^c	2,19	-	83,88±0,04 ^b	17,91±0,03 ^c
100	83,98±0,01 ^c	2,03±0,03 ^b	18,54±0,01 ^b	2,90	-	83,76±0,09 ^b	18,65±0,01 ^b
110	83,29±0,06 ^d	2,11±0,02 ^a	19,15±0,05 ^a	3,75	-	83,70±0,05 ^b	19,26±0,05 ^a
RP/V							
TN	57,41±0,05 ^c	27,52±0,02 ^a	0,65±0,03 ^e	-	40,78	1,36±0,06 ^e	27,52±0,03 ^a
80	58,99±0,01 ^b	23,71±0,01 ^b	3,86±0,02 ^d	5,22	36,00	9,25±0,04 ^d	24,02±0,01 ^c
90	61,06±0,26 ^a	18,29±0,04 ^c	9,83±0,03 ^c	13,51	29,35	28,25±0,09 ^c	20,76±0,03 ^e
100	61,45±0,01 ^a	13,70±0,01 ^d	17,88±0,01 ^b	22,45	25,38	52,54±0,03 ^b	22,52±0,00 ^d
110	57,20±0,04 ^d	12,37±0,06 ^e	23,11±0,10 ^a	27,09	28,31	61,83±0,16 ^a	26,21±0,09 ^b

TN: termički netretiran uzorak - kontrolni uzorak; T: temperatura; RP: protein riže; RP/V: kompleks protein riže/sok višnje; ΔE: promjena boje termički tretiranog uzorka u odnosu na netretirani; ΔE*: promjena boje kompleksa u odnosu na protein. Vrijednosti označene s a, b, c, d ili e u istom stupcu za pojedini parametar definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa obzirom na termičko tretiranje.

Tablica 29. Parametri boje proteina graška i kompleksa protein graška/sok višnje

T	L*	a*	b*	ΔE	ΔE*	°h	C*
GP							
TN	78,84±0,02 ^b	2,69±0,01 ^d	19,26±0,03 ^d	-	-	82,05±0,03 ^a	19,45±0,03 ^e
80	79,00±0,03 ^a	2,77±0,02 ^c	19,38±0,02 ^d	0,22	-	81,87±0,06 ^b	19,58±0,02 ^d
90	78,84±0,02 ^b	2,91±0,03 ^b	20,28±0,03 ^c	1,04	-	81,85±0,08 ^b	20,49±0,02 ^c
100	78,84±0,03 ^b	2,92±0,02 ^b	20,63±0,05 ^b	1,39	-	81,93±0,07 ^b	20,84±0,05 ^b
110	78,43±0,06 ^c	3,11±0,03 ^a	21,22±0,11 ^a	2,05	-	81,65±0,06 ^c	21,45±0,11 ^a
GP/V							
TN	42,67±0,05 ^d	25,39±0,10 ^a	0,78±0,01 ^d	-	46,53	1,76±0,03 ^d	25,41±0,10 ^a
80	48,16±0,03 ^c	22,36±0,03 ^b	13,89±0,04 ^c	7,44	39,35	39,54±0,03 ^c	21,82±0,05 ^c
90	50,82±0,08 ^a	16,82±0,03 ^c	13,89±0,04 ^c	17,66	31,39	39,54±0,03 ^c	21,82±0,05 ^c
100	48,89±0,02 ^b	14,56±0,01 ^d	18,57±0,02 ^a	21,74	32,20	51,86±0,05 ^a	23,59±0,02 ^b
110	42,33±0,07 ^e	12,92±0,04 ^e	15,98±0,08 ^b	19,66	37,78	51,02±0,07 ^b	20,55±0,08 ^d

TN: termički netretiran uzorak - kontrolni uzorak; T: temperatura; GP: proteini graška; GP/V: kompleks protein graška/sok višnje; ΔE: promjena boje termički tretiranog uzorka u odnosu na netretirani; ΔE*: promjena boje kompleksa u odnosu na protein. Vrijednosti označene s a, b, c, d ili e u istom stupcu za pojedini parametar definiraju statistički značajnu razliku između kompleksa obzirom na termičko tretiranje.

Termičkim tretiranjem proteina graška (GP), vrijednost L^* (svjetlina) ostala je gotovo nepromijenjena od netretiranog uzorka do tretiranog pri 100 °C (78,84), uz statistički značajno povećanje pri 80 °C (79,00). Značajnije smanjenje svjetline određeno je pri 110 °C, gdje je vrijednost L^* iznosila 78,43. Vrijednost a^* povećanjem temperature povećala se s 2,69 (netretirani uzorak) na 3,11 pri 110 °C, dok se vrijednost b^* također povećala s 19,26 na 21,22. Ukupna promjena boje (ΔE) bila je u rasponu od 0,22 pri 80 °C do 2,05 pri 110 °C. Ton boje ($^{\circ}h$) u netretiranom uzorku iznosio je 82,05°, a u termički tretiranim uzorcima zadržao se unutar raspona od 81,87° (80 °C) do 81,65° (110 °C). Vrijednost zasićenosti boje (C^*) linearno se povećavala od 19,45 (netretirani uzorak) do 21,45 pri 110 °C.

Vrijednost L^* u netretiranom kompleksu GP/V iznosila je 42,67, a tijekom termičkog tretiranja povećavala se do maksimalne vrijednosti od 50,82 pri 90 °C, nakon čega se smanjivala do 42,33 pri 110 °C. Vrijednost a^* se smanjivala od 25,39 (netretirani uzorak) do 12,92 pri 110 °C. Vrijednost b^* povećavala se s 0,78 (netretirani uzorak) do 18,57 pri 100 °C, a zatim se smanjila na 15,98 pri 110 °C. Ukupna promjena boje (ΔE) povećala se od 7,44 (80 °C) do 21,74 (100 °C), a zatim se smanjila na 19,66 pri 110 °C. Vrijednost ΔE^* , koja označava promjenu boje kompleksa u odnosu na odgovarajući protein, smanjivala se s 46,53 (netretirani kompleks) na 31,39 pri 90 °C, zatim se povećala na 32,20 pri 100 °C i dodatno na 37,78 pri 110 °C. Ton boje ($^{\circ}h$) povećavao se od 1,76° u netretiranom kompleksu do 51,86° pri 100 °C, a zatim se blago smanjio na 51,02° pri 110 °C. Vrijednost zasićenosti boje (C^*) smanjivala se s početnih 25,41 u netretiranom uzorku do minimalne vrijednosti od 20,55 pri 110 °C.

4.3 FTIR-ATR analiza

Kako bi se istražile strukturne promjene biljnih proteina te njihovih kompleksa s polifenolima soka višnje, provedena je FTIR-ATR spektroskopska analiza. Analizirani su uzorci biljnih proteina badema (BP), riže (RP) i graška (GP), kao i njihovi kompleksi s polifenolima soka višnje (BP/V, RP/V, GP/V). FTIR analiza korištena je za određivanje promjena karakterističnih vibracija koje odražavaju interakcije proteina s polifenolnim spojevima, kao i promjene tih interakcija tijekom skladištenja na svjetlu (S) i u tami (T) u trajanju od 3, 6 i 9 mjeseci i termičkog tretiranja pri 80 °C, 90 °C, 100 °C i 110 °C. Spektri su snimani u području od 4000 cm^{-1} do 600 cm^{-1} .

Analizirani su spektri koji su značajni za promjene u strukturi proteina, a kako navode mnogi autori (Li i sur., 2021; Shurvell, 2006; Sadat i Joye, 2020; Movasaghi i sur., 2008;

Larkin, 2017), određene regije IR spektra mogu se povezati s promjenama funkcionalnih skupina u proteinima:

- Regija $3600-3200\text{ cm}^{-1}$: Ova regija obuhvaća rastezanje O-H i N-H veza, često preklapljenih. Vibracije su povezane s prisutnošću vodikovih veza, a promjene u položaju i intenzitetu ove vrpce mogu ukazivati na reorganizaciju vodikovih mreža unutar proteina ili između proteina i polifenola.
- Amid I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$): Rastezanje karbonilne C=O veze peptidne skupine. Najosjetljivija regija za utvrđivanje sekundarne strukture proteina, gdje je moguće razlikovati α -uzvojnice ($\sim 1658-1650\text{ cm}^{-1}$) i β -nabrane ploče ($\sim 1640-1610\text{ cm}^{-1}$).
- Amid II ($1570-1480\text{ cm}^{-1}$): Uključuje kombinaciju savijanja N-H i rastezanja C-N veza. Ova regija reflektira promjene u vodikovim vezama te je korisna za praćenje promjena u konformaciji proteina.
- Amid III ($1300-1229\text{ cm}^{-1}$): Kombinacija C-N rastezanja i N-H savijanja; posebno osjetljiva na lokalne konformacijske promjene u proteinima, uključujući sekundarne strukture poput β -nabranih ploča.
- Regija $3000-2800\text{ cm}^{-1}$: Karakterizira alifatska C-H rastezanja, osobito CH_3 i CH_2 skupine bočnih lanaca aminokiselina. Promjene u ovoj regiji mogu ukazivati na denaturaciju proteina i reorganizaciju hidrofobnih interakcija.
- Regija $1400-1300\text{ cm}^{-1}$: Obuhvaća simetrična i asimetrična savijanja CH_3 i CH_2 skupina, uključujući CH_2 vibracijsko njihanje ($\sim 1370\text{ cm}^{-1}$), koje predstavljaju karakteristično „njihanje” CH_2 skupina u alifatskim lancima. Promjene intenziteta u ovoj regiji ukazuju na promjene u bočnim lancima proteina, osobito tijekom termičkog tretiranja ili interakcija s polifenolima.
- Regija $900-700\text{ cm}^{-1}$: vanplanarne deformacije aromatskih C-H veza, karakteristične za aromatske prstene prisutne u strukturi polifenolnih spojeva.

Budući da korišteni protein badema nije čisti protein već sadrži udio vlakana, određene vrpce u IR spektrima mogu se pripisati polisaharidnim skupina.

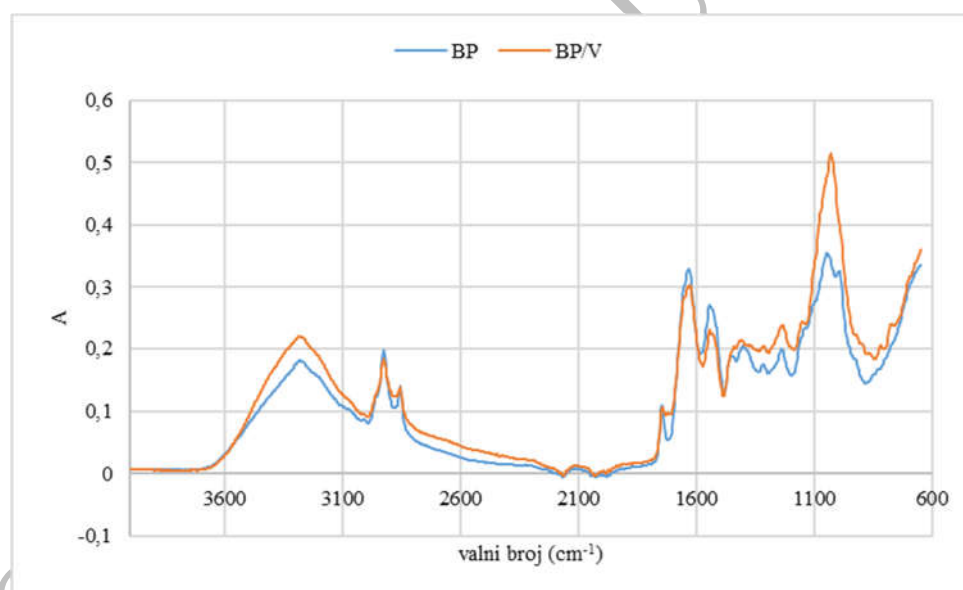
- Regija $1200-900\text{ cm}^{-1}$: “fingerprint” regija koja uključuje vibracije C-O, C-C i C-OH veza.
 - $\sim 1160-1150\text{ cm}^{-1}$: rastezanje C-OH i C-O-C skupina u pektinima i celulozi
 - $\sim 1028-1015\text{ cm}^{-1}$: povezano s C-C i C-O vibracijama u celulozi i škrobu
 - $\sim 980-970\text{ cm}^{-1}$: OCH_3 vibracije, deformacije C-O i C=O veza u metilnim skupinama polisaharida.

Analizom promjena u intenzitetu i položaju vrpce unutar navedenih regija moguće je detektirati: reorganizaciju sekundarne strukture proteina, pojavu ili gubitak vodikovih veza, potencijalne interakcije s polifenolima soka višnje, promjene interakcija tijekom izlaganja različitim uvjetima skladištenja i termičkog tretiranja, te stabilizacijski učinak polifenola na proteinsku strukturu.

4.3.1. Promjene u strukturi biljnih proteina nakon kompleksiranja sa polifenolima soka višnje

Na Slikama 19. do 21. prikazani su IR spektri promjena u strukturi biljnih proteina badema, riže i graška nakon kompleksiranja sa polifenolima soka višnje.

Promjene u strukturi proteina badema (BP) nakon kompleksiranja sa polifenolima soka višnje (BP/V)



Slika 19. IR spektri proteina badema (BP) i kompleksa proteini badema/polifenoli višnje (BP/V)

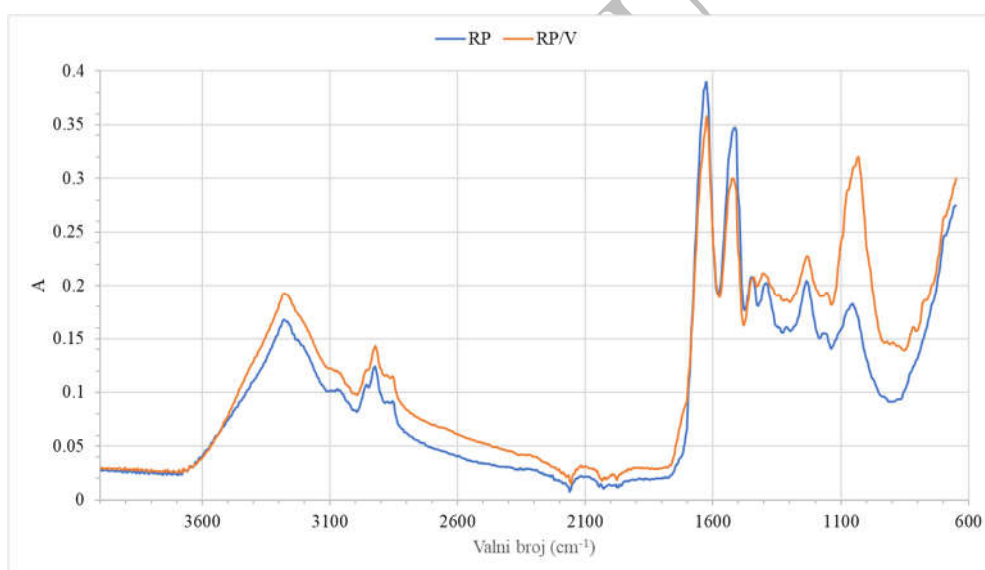
Slika 19. prikazuje IR spektr proteina badema i kompleksa proteini badema/polifenoli višnje, te njihovi spektri nakon derivacije. Nakon adsorpcije polifenola soka višnje na proteine badema utvrđene su određene promjene u strukturi proteina. U regiji od 3600 cm^{-1} do 3200 cm^{-1} intenzitet vrpce određene kod oba uzorka na 3280 cm^{-1} se povećao nakon adsorpcije polifenola, a navedena regija je povezana s istezanjem O-H skupina. Ove promjene upućuju na

formiranje dodatnih vodikovih veza između polifenola soka višnje i aminokiselinskih ostataka proteina. Ujedno je vrpca na 1744 cm^{-1} , koja je povezana s istezanje $\text{C}=\text{O}$, značajno promijenjena, odnosno vrlo slabo je izražena nakon vezanja polifenola soka višnje. Samo u regiji od 1700 cm^{-1} do 1570 cm^{-1} , odnosno regiji koja je karakteristična za Amid I i Amid II strukture, utvrđeno je smanjenje intenziteta vrpce nakon adsorpcije polifenola soka višnje na proteine badema. Vrpca karakteristična za Amid I regiju imala je pomak s 1628 cm^{-1} na 1625 cm^{-1} nakon vezanja polifenola soka višnje. Takva promjena upućuje na to da je došlo do interakcije polifenola soka višnje s aminokiselinama u proteinu, što može uzrokovati reorganizaciju sekundarne strukture proteina badema. Dodatno je došlo do stvaranje slabo izražene vrpce na 1543 cm^{-1} , što je indikator dodatnih promjena u Amid II strukturi. Adsorpcija polifenola uzrokovala je slabljenje vrpce na 1457 cm^{-1} (asimetrično istezanje CH_3 metilnih grupa proteina), te pomak vrpce s 1371 cm^{-1} (CH_2 njihanje) na 1382 cm^{-1} , što se može povezati s promjenama u bočnim lancima aminokiselina. U regiji Amid III vrpca proteina badema je na 1237 cm^{-1} , a vezanjem polifenola soka višnje dolazi do njenog pomaka na 1233 cm^{-1} uz povećanje intenziteta što ukazuje na konformacijske promjene u strukturi proteina izazvane interakcijama s polifenolima. Unutar tzv. „fingerprint“ regije ugljikohidrata koja se nalazi u području od 1200 cm^{-1} do 900 cm^{-1} također su utvrđene promjene. Vrpca na 1155 cm^{-1} , koja je povezana s vibrirajućim istezanjem vodikovih veza u $\text{C}-\text{OH}$ grupama, je izraženija kod kompleksa. Ujedno je utvrđeno pomicanje vrpce sa 1032 cm^{-1} na 1028 cm^{-1} odnosno došlo je do istezanje $\text{C}-\text{O}$ veza polisaharida, te nestajanje vrpce na 969 cm^{-1} što se može povezati s promjenama na $\text{C}=\text{O}$ vezama na polisaharidima. Nakon vezanja polifenola višnje na proteine badema došlo je do stvaranja dviju vrpce na 790 cm^{-1} i 749 cm^{-1} koje su povezane s vanplanarnim vibrirajućim izvijanjem, što upućuje na prisutnost $\pi-\pi$ interakcije između aromatskih prstena polifenola i aromatskih aminokiselina proteina.

Promjene u strukturi proteina riže (RP) nakon kompleksiranja sa polifenolima soka višnje (RP/V)

Slika 20. prikazuje IR spektre proteina riže i kompleksa proteina riže s polifenolima soka višnje. U regiji (3600 do 3200 cm^{-1}) rastezanja $\text{O}-\text{H}$ i $\text{N}-\text{H}$ veza u oba uzorka uočena je široka vrpca s maksimumom na 3291 cm^{-1} . Iako nije došlo do pomaka valnog broja, u kompleksu uočeno je povećanje intenziteta, što ukazuje na formiranje dodatnih vodikovih veza između $-\text{NH}$ i $-\text{OH}$ skupina proteina te hidroksilnih skupina polifenola. U regiji od 3000 do 2800 cm^{-1} karakterističnoj za alifatska $\text{C}-\text{H}$ rastezanja prisutna je vrpca na 2918 cm^{-1} u oba uzorka, ali je u kompleksu izraženija, što upućuje vezanje polifenola na hidrofobne bočne lance

alifatskih aminokiselina proteinskog matriksa. U Amid I i II regijama određeno je smanjenje intenziteta vrpce kod kompleksa. U Amid I regiji određena je vrpca na 1625 cm^{-1} u oba spektra, dok u Amid II regiji vrpca proteina riže je na 1528 cm^{-1} , a u kompleksu se pomiče na 1531 cm^{-1} . To može biti rezultat smanjenja broja slobodnih N-H veza zbog vodikovih interakcija s polifenolima iz soka višnje. U području savijanja CH_2 i CH_3 skupina kod proteina riže određene su vrpce na 1438 cm^{-1} i 1405 cm^{-1} , koje nestaju u kompleksu, što upućuje na interakcije bočnih lanaca proteina s polifenolima. U Amid III regiji protein riže ima vrpce na 1222 cm^{-1} , koja se u kompleksu pomiče na 1218 cm^{-1} uz povećanje intenziteta, što može biti indikator promjene u konformaciji proteina. U tzv. „fingerprint“ regiji vibracija C-O i C-C veza, kod proteina riže određena je vrpca na 1066 cm^{-1} , dok je kod kompleksu vrpca intenzivnija i na 1039 cm^{-1} . U regiji od 900 cm^{-1} do 700 cm^{-1} , koja se povezuje s vanplanarnim deformacijama C-H veza aromatskih prstenova, u spektru kompleksa pojavljuju se dvije nove vrpce na 793 cm^{-1} i 752 cm^{-1} , što potvrđuje prisutnost aromatskih polifenolnih spojeva iz soka višnje u kompleksu.

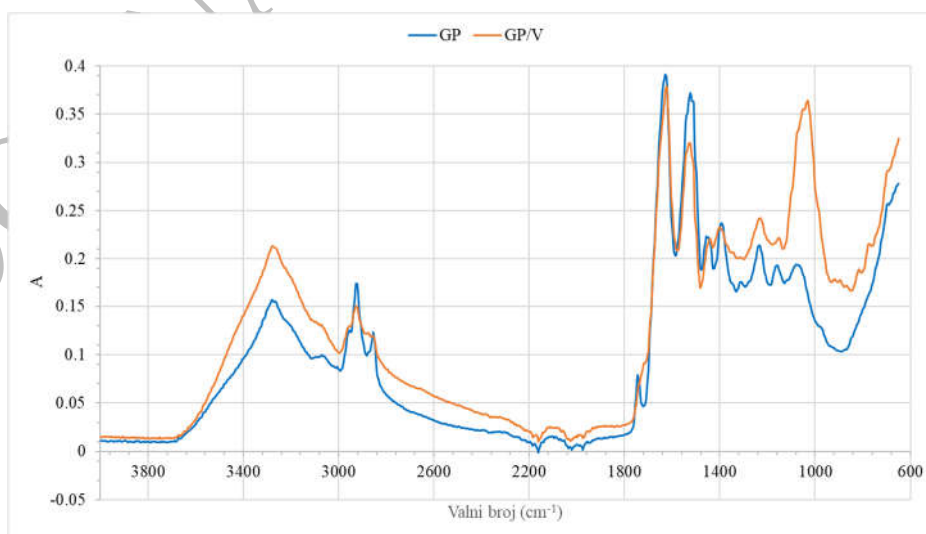


Slika 20. IR spektri proteina riže (RP) i kompleksa proteini riže/polifenoli višnje (RP/V)

Promjene u strukturi proteina graška (GP) nakon kompleksiranja sa polifenolima soka višnje (GP/V)

Slika 21. prikazuje usporedne IR spektre proteina graška i kompleksa proteina graška sa polifenolima soka višnje. U oba spektra određena je široka vrpca na 3280 cm^{-1} koja se pripisuje rastezanju O-H i N-H veza unutar regije od 3600 do 3200 cm^{-1} , pri čemu je nakon kompleksiranja uočeno pojačanje intenziteta vrpce, što upućuje na stvaranje dodatnih vodikovih veza između hidroksilnih skupina polifenola i funkcionalnih skupina proteina. U

regiji 3000-2800 cm^{-1} koja obuhvaća alifatska C-H rastezanja kod oba uzorka određena je vrpca na 2926 cm^{-1} , no u kompleksu dolazi do smanjenja intenziteta, što može upućivati na smanjenu pokretljivost bočnih lanaca uslijed interakcije s polifenolima. Vrpca na 2858 cm^{-1} prisutna kod proteina, nije jasno izražena u kompleksu. Vrpca određena u spektru proteina graška na 1744 cm^{-1} , pripisanoj istežanju karbonilnih C=O veza, u kompleksu nije izražena. U Amid I regiji koja je osjetljiva na promjene u sekundarnoj strukturi proteina, kod proteina je određena vrpca na 1628 cm^{-1} , dok se u kompleksu pomiče na 1625 cm^{-1} , uz blago smanjenje intenziteta, što upućuje na strukturnu reorganizaciju proteinskog matriksa. U Amid II regiji vrpca na 1524 cm^{-1} prisutna je u oba spektra, no intenzitet joj se nakon kompleksiranja smanjuje, što dodatno potvrđuje promjene u strukturi proteinskog lanca. U regiji savijanja CH_2 i CH_3 skupina izražene su vrpce na 1461 cm^{-1} i 1390 cm^{-1} u proteinu, dok u kompleksu vrpce nisu toliko izražene te dolazi do njihovog smanjenja intenziteta i pomaka na 1420 cm^{-1} i 1412 cm^{-1} , što se može pripisati interakciji s bočnim lancima aminokiselina u proteinskom matriksu. Kod proteina u Amid III regiji određena je vrpca na 1244 cm^{-1} , u kompleksu dolazi do pomaka vrpce na 1241 cm^{-1} i povećanja intenziteta, što je u skladu s promjenama u strukturi amidnih veza uslijed vezanja polifenola. U tzv. „fingerprint“ regiji (od 1200 cm^{-1} do 900 cm^{-1}) kod proteina graška određene su vrpce na 1148 cm^{-1} i 1084 cm^{-1} . Nakon vezanja s polifenolima iz soka višnje u navedenoj regiji dolazi do pomaka i povećanja intenziteta vrpce na 1162 cm^{-1} , a posebno se ističe široka vrpca na 1028 cm^{-1} . U regiji aromatskih deformacija (od 900 cm^{-1} do 700 cm^{-1}) u spektru kompleksa pojavljuju se dodatne vrpce na 793 cm^{-1} i 756 cm^{-1} , koje nisu određene u čistom proteinu, a koje su povezane s aromatskim prstenovima polifenola soka višnje.

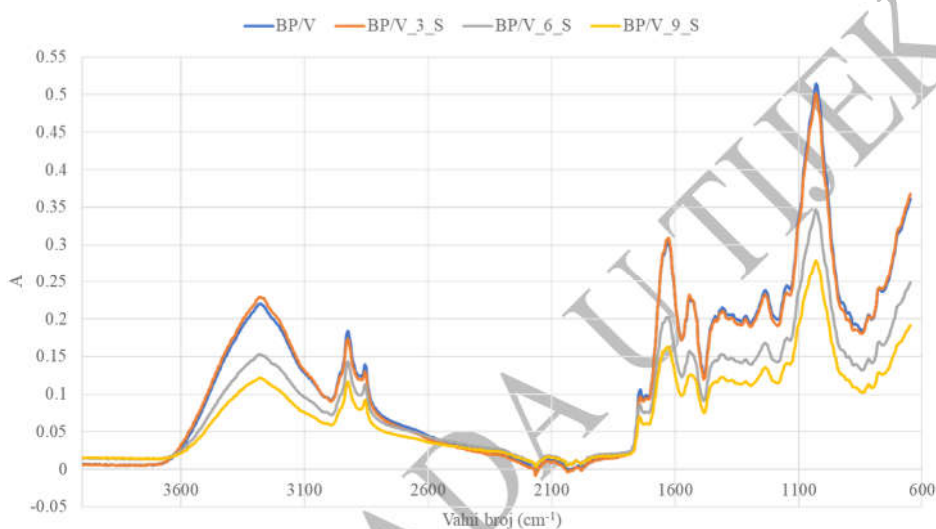


Slika 21. IR spektri proteina graška (GP) i kompleksa proteini graška/polifenoli višnje (GP/V)

4.3.2. Promjene u strukturi kompleksa biljnih proteina sa polifenolima soka višnje tijekom skladištenja

Na Slikama 22. do 27. prikazani su IR spektri kompleksa biljnih proteina badema, riže i graška sa polifenolima soka višnje tijekom skladištenja u trajanju od 3, 6 i 9 mjeseci, pri čemu su uzorci čuvani u bočicama od prozirnog i tamnog stakla.

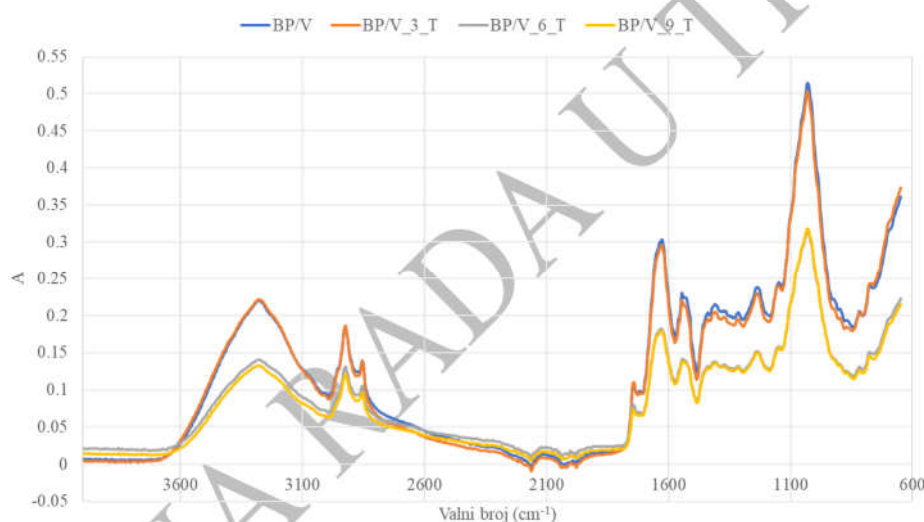
Promjene u strukturi kompleksa proteina badema sa polifenolima soka višnje (BP/V) tijekom skladištenja



Slika 22. IR spektri kompleksa proteini badema/polifenoli višnje (BP/V) tijekom skladištenja u bočicama od prozirnog stakla

Na Slikama 22. i 23. prikazani su IR spektri kompleksa proteina badema sa polifenolima soka višnje tijekom skladištenja. U regiji rastezanja O-H i N-H veza od 3600 cm⁻¹ do 3200 cm⁻¹, koja odražava prisutnost vodikovih veza, kod vrpce na 3280 cm⁻¹ tijekom skladištenja dolazi do postupnog smanjenja intenziteta, koje je izraženo kod uzoraka koji su bili skladišteni u prozirnim bočicama. Smanjenje intenziteta vrpce može se pripisati gubitku vodikovih. U Amid I regiji kod vrpce na 1744 cm⁻¹, koja je povezana s C=O rastezanjem i sekundarnom strukturom proteina, također je određeno smanjenje intenziteta vrpce tijekom skladištenja, što ukazuje na denaturaciju proteinskih lanaca i smanjenje stabilnosti sekundarne strukture. Sličan trend uočen je i u Amid II regiji kod vrpce na 1543 cm⁻¹, gdje se opaža smanjenje intenziteta vrpce povezanih s C-N rastezanjem i N-H savijanjem, što dodatno potvrđuje promjenu u strukturi proteinskog matriksa. U Amid III regiji koja osjetljiva na promjene u sekundarnoj strukturi proteina određena je vrpca na 1233 cm⁻¹, te je uočeno smanjenje intenziteta tijekom

skladištenja, posebno u uzorcima skladištenim na svjetlu. Slične promjene određene su i u regiji od 1400 cm^{-1} do 1300 cm^{-1} koje obuhvaćaju simetrična i asimetrična savijanja CH_3 i CH_2 skupina, uključujući CH_2 vibracijsko njihanje u koje spada određena vrpca na 1397 cm^{-1} te njeno smanjenje intenziteta odražava reorganizaciju bočnih lanaca aminokiselina. Regija od 3000 cm^{-1} do 2800 cm^{-1} koja karakterizira alifatska C-H rastezanja u bočnim lancima aminokiselina s određenom vrpcom na 2925 cm^{-1} , kao i tzv. “fingerprint” regija polisaharida s vrpcom određenom na 1028 cm^{-1} i pokazale su osjetljivost na skladištenje, te su intenziteti vrpce značajno opadali kroz mjesec. Kod vrpce određenih na 790 cm^{-1} i 749 cm^{-1} koje su povezane sa aromatskim C-H deformacijama u regiji od 900 cm^{-1} do 700 cm^{-1} uočeno je smanjenje intenziteta, što ukazuje na postupnu razgradnju aromatskih polifenolnih struktura, osobito pod utjecajem svjetlosti.

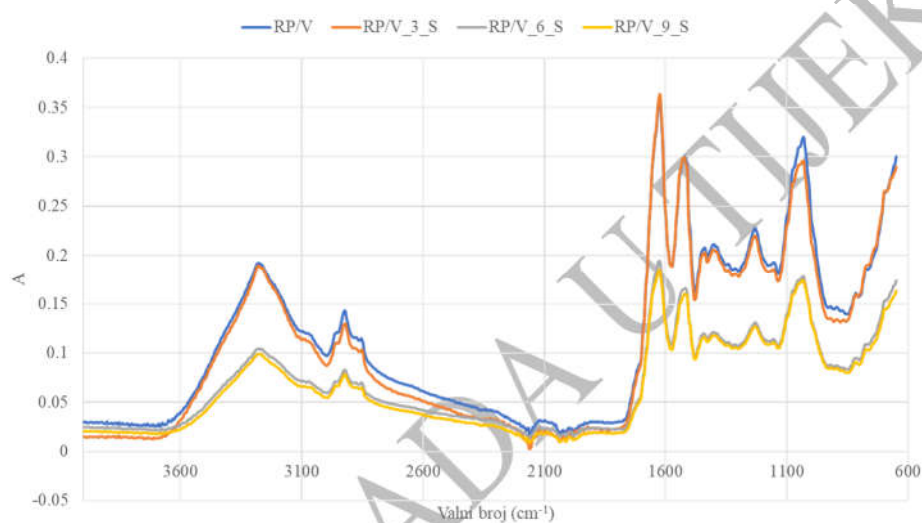


Slika 23. IR spektri kompleksa proteini badema/polifenoli višnje (BP/V) tijekom skladištenja u bočicama od tamnog stakla

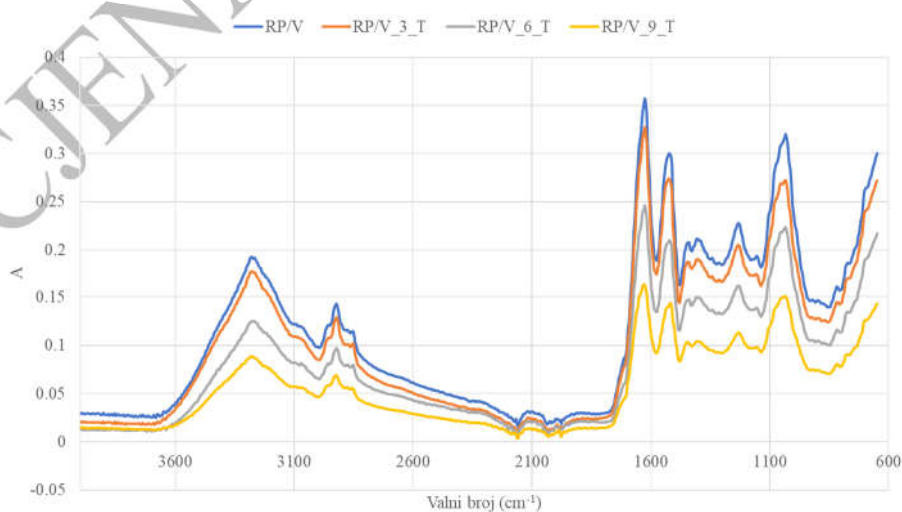
Promjene u strukturi kompleksa proteina riže sa polifenolima soka višnje (RP/V) tijekom skladištenja

Na Slikama 24 i 25. prikazani su IR spektri kompleksa proteina riže sa polifenolima soka višnje tijekom skladištenja. U regiji ($3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$) rastezanja O-H i N-H veza, intenzitet vrpce određene na 3291 cm^{-1} tijekom skladištenja postupno se smanjivao, osobito u uzorcima izloženima svjetlosti. U alifatskoj regiji od 3000 do 2800 cm^{-1} , karakterističnoj za simetrična i asimetrična rastezanja C-H veza u bočnim lancima alifatskih aminokiselina, određeno je smanjenje intenziteta vrpce na 2918 cm^{-1} tijekom skladištenja. U Amid I (vrpca na 1625 cm^{-1}), Amid II (vrpca na 1531 cm^{-1}) i Amid III regiji (vrpca na 1218 cm^{-1}) kod svih vrpce

određeno je smanjenje intenziteta tijekom skladištenja, osobito kod 6 i 9 mjeseci skladištenja na svjetlu. U regiji između 1400 i 1300 cm^{-1} , gdje su prisutna savijanja CH_2 i CH_3 skupina (1438 i 1405 cm^{-1}), uočen je kontinuirani pad intenziteta vrpce, što ukazuje na smanjenje fleksibilnosti bočnih lanaca i reorganizaciju strukture proteina tijekom duljeg skladištenja. U tzv. „fingerprint“ regiji, intenzitet vrpce na 1039 cm^{-1} postupno se smanjivao. Vrpce u regiji od 900 cm^{-1} do 700 cm^{-1} (vrpce na 793 i 752 cm^{-1}), karakteristične za deformacije C-H veza aromatskih prstenova, imale su smanjenje intenziteta tijekom skladištenja, osobito pod utjecajem svjetlosti

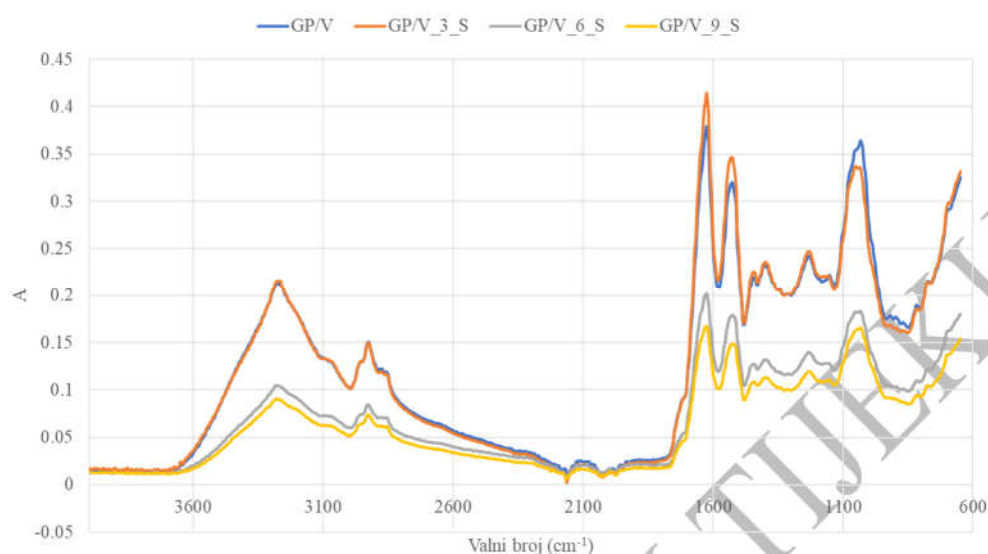


Slika 24. IR spektri kompleksa proteini riže/polifenoli višnje (RP/V) tijekom skladištenja u bočicama od prozirnog stakla

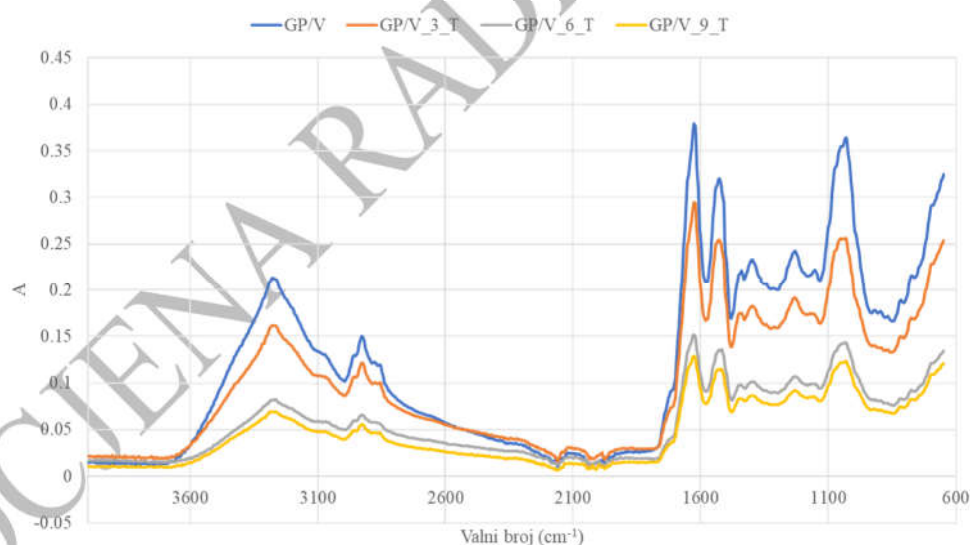


Slika 25. IR spektri kompleksa proteini riže/polifenoli višnje (RP/V) tijekom skladištenja u bočicama od tamnog stakla

Promjene u strukturi kompleksa proteina graška sa polifenolima soka višnje (GP/V) tijekom skladištenja



Slika 26. IR spektri kompleksa proteini graška/polifenoli višnje (GP/V) tijekom skladištenja u bočicama od prozirnog stakla



Slika 27. IR spektri kompleksa proteini graška/polifenoli višnje (GP/V) tijekom skladištenja u bočicama od tamnog stakla

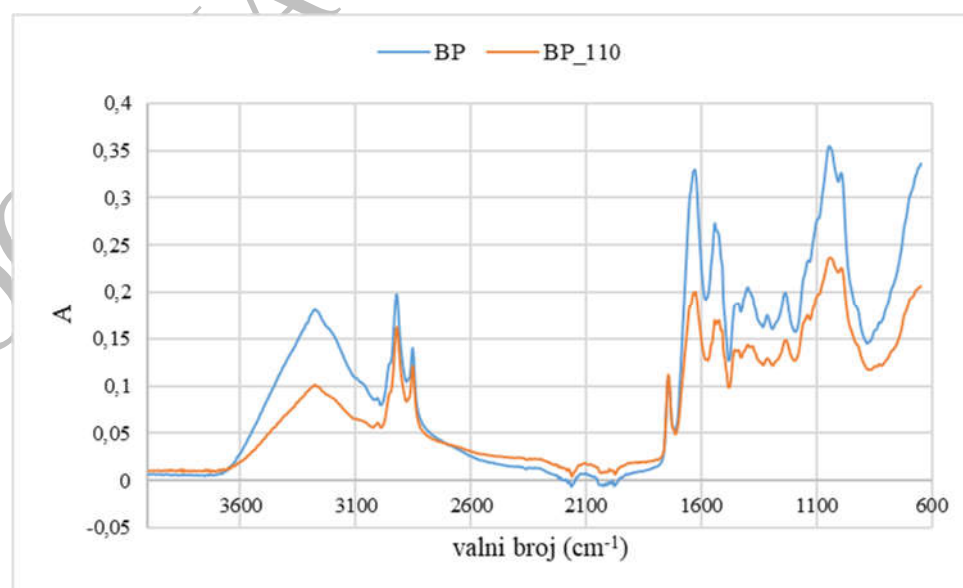
Na Slikama 26. i 27. prikazani su IR spektri kompleksa proteina graška sa polifenolima soka višnje tijekom skladištenja u trajanju od 3, 6 i 9 mjeseci, pri čemu su uzorci čuvani u prozirnim i tamnim bočicama. U regiji 3600 do 3200 cm⁻¹ koja obuhvaća rastezanja O-H i N-H

veza kod određene vrpce na 3280 cm^{-1} , uočeno je postupno smanjenje intenziteta vrpce tijekom skladištenja, što ukazuje na gubitak vodikovih veza, osobito kod uzoraka skladištenih na svjetlosti. U alifatskoj regiji od 3000 do 2800 cm^{-1} povezanoj s C-H rastezanjima bočnih lanaca aminokiselina, intenzitet vrpce na 2926 cm^{-1} se tijekom skladištenja smanjuje, što ukazuje na postupnu reorganizaciju strukture proteina. Sličan trend određen je i za vrpce u Amid I (vrpca na 1625 cm^{-1}), Amid II (vrpca na 1524 cm^{-1}) i Amid III regiji (vrpca na 1241 cm^{-1}) gdje također dolazi do smanjenja intenziteta vrpce tijekom skladištenja osobito kod 6 i 9 mjeseci. Ove promjene ukazuju na destabilizaciju sekundarne strukture proteina pod utjecajem svjetlosti. Regija savijanja CH_2 i CH_3 skupina (vrpce na 1420 cm^{-1} i 1412 cm^{-1}) također je pokazala postupno smanjenje intenziteta vrpce, a osobito je izraženo u uzorcima izloženima svjetlosti, što sugerira reorganizaciju bočnih lanaca aminokiselina. U ostalim regijama, uključujući tzv. „fingerprint“ regiju (1200 do 900 cm^{-1}) i aromatske deformacije (900 do 700 cm^{-1}) vrpce određene na 1162 , 1028 , 793 i 756 cm^{-1} , imaju smanjenje intenziteta tijekom skladištenja, što upućuje na postepenu razgradnju polifenolnih struktura u kompleksu.

4.3.3. Promjene u strukturi biljnih proteina nakon termičkog tretiranja

Na Slikama 27. do 29. prikazani su IR spektri biljnih proteina badema, riže i graška nakon termičkog tretiranja.

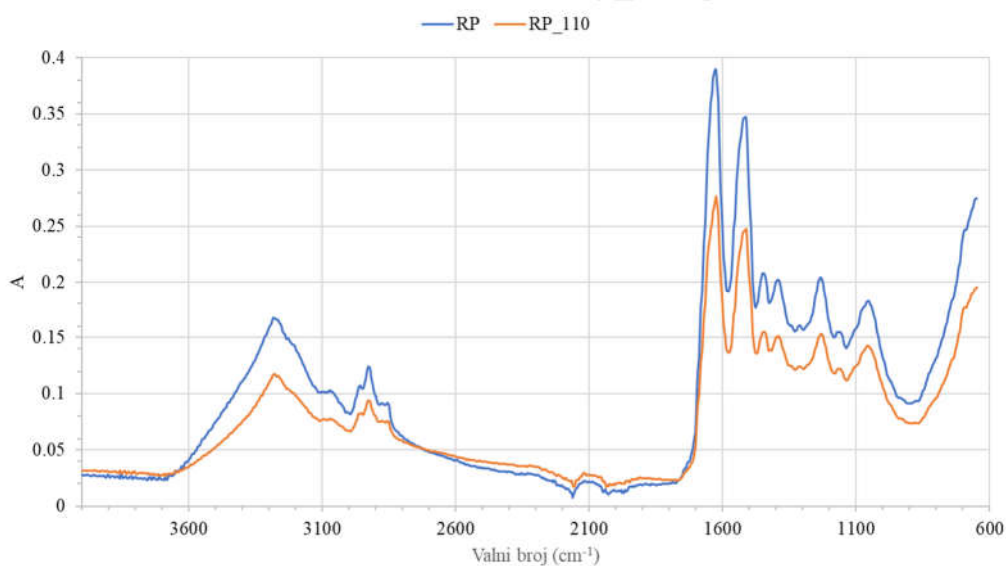
Promjene u strukturi proteina badema (BP) nakon termičkog tretiranja



Slika 27. IR spektri proteina badema (BP) i proteina badema termički tretiranog pri $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BP_110)

Kako bi se lakše uočile promjene nakon termičkog tretiranja proteina, na Slici 27. prikazani su IR spektri proteina badema i proteina badema termički tretiranog pri 110 °C. Vidljivo je da je nakon termičkog tretiranja došlo do značajnog smanjenja intenziteta vrpce. Uz vrpce na 1640 cm^{-1} nakon termičkog tretiranja stvara se popratna vrpca na 1643 cm^{-1} što je indikator promjena u nasumičnoj uzvojnici. Utvrđena je i značajna promjena u regiji od 1550 cm^{-1} do 1510 cm^{-1} pojavom novih vrpce na 1546 cm^{-1} , 1543 cm^{-1} i 1520 cm^{-1} , što je indikator promjena u Amid II strukturi koja je povezana sa savijanjem N-H veza i rastezanjem C-N veza. Na proteinu badema utvrđena je široka vrpca na 1431 cm^{-1} koja nakon termičkog tretiranja prelazi u dvije blago izražene vrpce što je indikator promjene u CH_2 skupini polisaharida. Ujedno i vrpca na 1401 cm^{-1} prelazi u dvije blago izražene vrpce na 1412 cm^{-1} i 1397 cm^{-1} što je indikator promjena u simetričnom rastezanju CH_3 metilnih skupina proteina.

Promjene u strukturi proteina riže (RP) nakon termičkog tretiranja

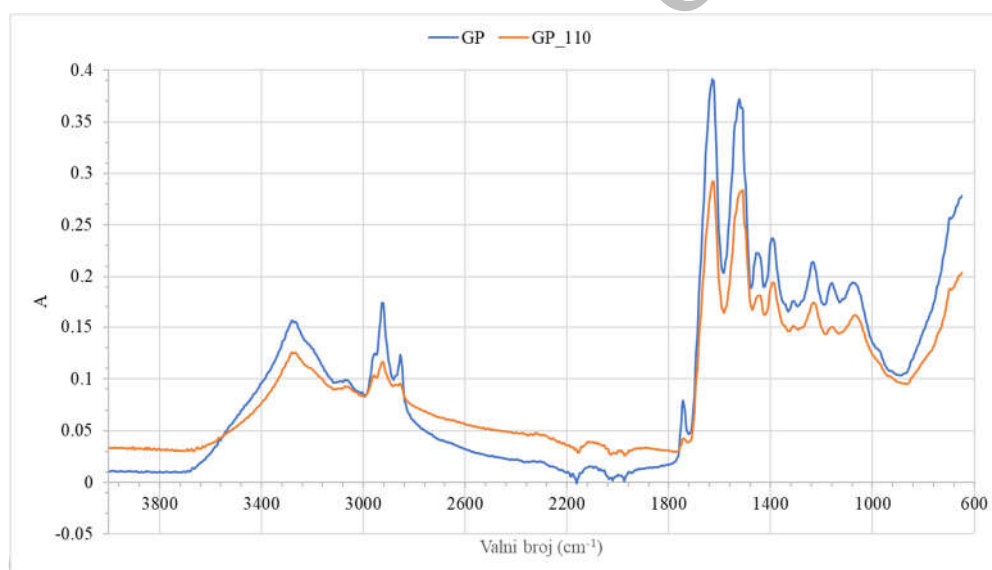


Slika 28. IR spektri proteina riže (RP) i proteina riže termički tretiranog pri 110 °C (RP_110)

Kako bi se uočile promjene nakon termičkog tretiranja proteina riže, na Slici 28. su prikazani IR spektri proteinskog matriksa i proteinskog matriksa tretiranog pri 110 °C. Uočeno je smanjenje intenziteta vrpce u svim analiziranim regijama, što ukazuje na strukturnu reorganizaciju proteina i djelomičnu denaturaciju uslijed termičkog tretiranja. U širokoj regiji (3600 do 3200 cm^{-1}) rastezanja O-H i N-H veza koja je povezana s vodikovim vezama unutar proteinske strukture, određena je vrpca na 3291 cm^{-1} u oba uzorka uz smanjenje intenziteta kod termički tretiranog, što može biti zbog gubitka vodikovih veza. U regiji od 3000 do 2800 cm^{-1}

alifatskih C-H rastezanja, vrpca na 2918 cm^{-1} također ima niži intenzitet kod termički tretiranog proteina. To ukazuje na promjene u hidrofobnim interakcijama bočnih lanaca alifatskih aminokiselina. Najizraženije promjene uočene su u Amid I (1625 cm^{-1}) i Amid II (1528 cm^{-1}) regijama, koje su ključne za određivanje sekundarne strukture proteina. Kod tretiranog proteina intenzitet tih vrpca je znatno smanjen, bez značajnog pomaka valnih brojeva, što ukazuje na gubitak α -uzvojnica i β -nabranih ploča. U regiji deformacija CH_2 i CH_3 skupina, vrpce na 1438 cm^{-1} i 1401 cm^{-1} uočeno je smanjenje intenziteta, što dodatno potvrđuje promjenu bočnih lanaca termički tretiranog proteina. U Amid III regiji vrpca koja je na 1222 cm^{-1} pomiče se na 1218 cm^{-1} kod termički tretiranog proteina, uz smanjenje intenziteta, što ukazuje na lokalne konformacijske promjene proteina. U tzv. „fingerprint“ regiji, vrpca na 1066 cm^{-1} dolazi do smanjenja intenziteta, što može biti posljedica destabilizacije funkcionalnih skupina (C-O, C-C).

Promjene u strukturi proteina graška (GP) nakon termičkog tretiranja



Slika 29. IR spektri proteina graška (GP) i proteina graška termički tretiranog pri $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ (GP_110)

U cilju analize termičkog tretiranja na strukturu proteina graška, FTIR spektroskopijom uspoređeni su spektri netretiranog proteina i uzorka nakon termičkog tretmana pri $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ vidljivi na Slici 29. U regiji od 3600 do 3200 cm^{-1} , koja je povezana s prisutnošću vodikovih veza vidljiva je široka vrpca na 3280 cm^{-1} u oba spektra. Međutim, kod termički tretiranog uzorka intenzitet ove vrpce bio je znatno manji, što ukazuje na smanjenje broja vodikovih veza

uslijed termičkog tretiranja. U regiji alifatskih C-H rastezanja (3000 do 2800 cm^{-1}) u oba spektra prisutna je vrpca na 2926 cm^{-1} , no nakon termičkog tretiranja također dolazi do smanjenja intenziteta što upućuje na promjene u bočnim lancima, dok vrpca na 2858 cm^{-1} nestaje kod tretiranog uzorka. Kod uzorka tretiranog pri $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ vrpca određena na 1744 cm^{-1} (GP) se pomaknula na 1740 cm^{-1} uz značajno smanjenje intenziteta, a pripisuje se istezanju karbonilnih C=O veza. Najizraženije promjene određene su u amidnim regijama odgovornima za sekundarnu strukturu proteina. Vrpca Amida I pomaknuta je s 1629 cm^{-1} na 1625 cm^{-1} , dok je Amida II s 1520 cm^{-1} pomaknuta na 1509 cm^{-1} . U oba slučaja uočeno je znatno smanjenje intenziteta vrpce. Takvi pomaci i slabljenje intenziteta ukazuju denaturaciju sekundarne strukture, osobito β -nabranih ploča i α -uzvojnica. U regiji koja obuhvaća simetrična i asimetrična savijanja CH_2 i CH_3 skupina, u spektru netretiranog proteina graška prisutne su izraženije vrpce na 1461 cm^{-1} i 1390 cm^{-1} . Nakon termičkog tretiranja pri $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, u uzorku dolazi do smanjenja intenziteta ovih vrpce te njihovih pomaka na 1457 cm^{-1} i 1382 cm^{-1} . U Amid III regiji, u spektru netretiranog proteina izražena je vrpca na 1244 cm^{-1} , dok se tretiranjem pomiče na 1237 cm^{-1} uz smanjenje intenziteta. U tzv. „fingerprint“ regiji kod proteina graška određene su vrpce na 1148 cm^{-1} i 1084 cm^{-1} , a kod termički tretiranog uzorka dolazi do smanjenja njenog intenziteta.

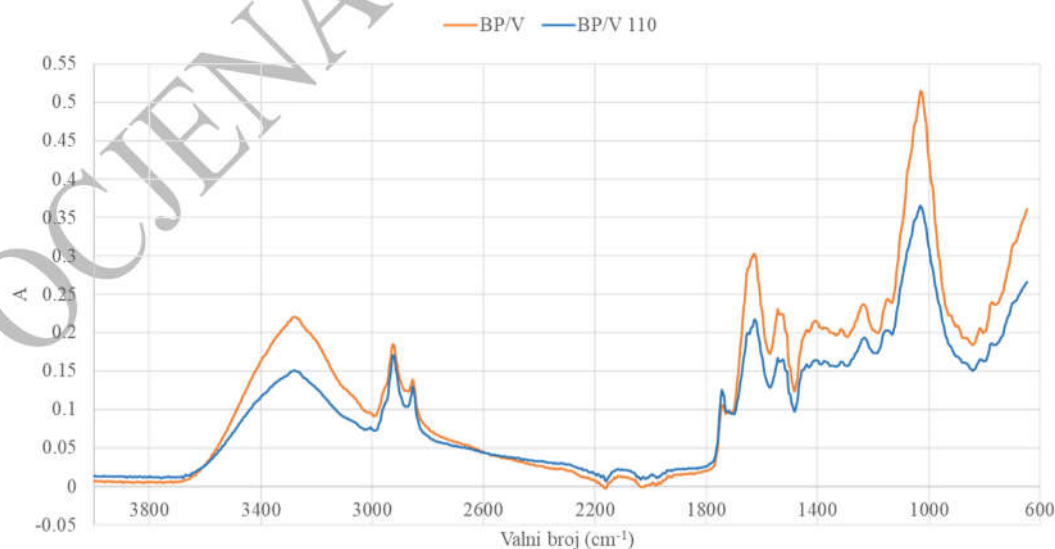
4.3.4. Promjene u strukturi kompleksa biljnih proteina sa polifenolima soka višnje nakon termičkog tretiranja

Na Slikama 30. do 35. prikazani su IR spektri kompleksa biljnih proteina badema, riže i graška sa polifenolima soka višnje nakon termičkog tretiranja.

Promjene u strukturi kompleksa proteina badema sa polifenolima soka višnje (BP/V) nakon termičkog tretiranja

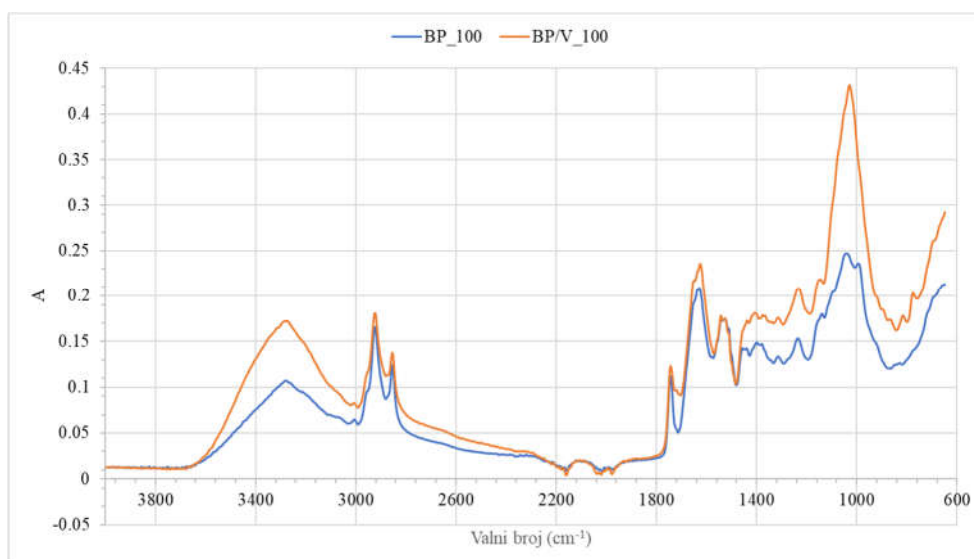
Kako bi se istražio utjecaj termičkog tretiranja na strukturne promjene i moguće promjene u interakcijama unutar kompleksa proteina badema s polifenolima soka višnje, uspoređeni su IR spektri (Slika 30.) netretiranog kompleksa s termički tretiranim kompleksima. U regiji od 3600 cm^{-1} do 3200 cm^{-1} netretirani kompleks BP/V imao je izraženu široku vrpcu na 3280 cm^{-1} karakterističnu za rastezanje O-H i N-H skupina, uz postupno smanjenje intenziteta s povećanjem temperature, a najniža vrijednost određena je kod proteina badema tretiranog pri $110\text{ }^{\circ}\text{C}$. U Amid I regiji karakterističnoj za C=O rastezanje peptidne veze (1700 cm^{-1} do 1600 cm^{-1}), slab intenzitet vrpce je određen u BP/V kompleksu na 1744 cm^{-1} , a

termičkim tretiranjem i povećanjem temperature intenzitet joj se povećava. U regiji Amid II od 1570 cm^{-1} do 1480 cm^{-1} koja je povezana s N-H savijanjem i C-N rastezanjem vrpca je određena na 1543 cm^{-1} kod svih uzoraka, ali se intenzitet postupno smanjuje s povećanjem temperaturom. Budući da je ova regija osjetljiva na vodikove veze i konformacijske promjene, navedeni rezultati ukazuju na promjene u strukturi proteina. U regiji Amid III (1300 cm^{-1} do 1229 cm^{-1}) uzorci tretirani pri višim temperaturama također su imali niže intenzitete vrpce, što je u skladu s promjenama konformacije proteina. Maksimum vrpce kod svih uzoraka u Amid III regiji je bio na 1233 cm^{-1} . U regiji od 3000 cm^{-1} do 2800 cm^{-1} koja je karakteristična za alifatska C-H rastezanja, osobito za CH_3 i CH_2 skupine bočnih lanaca aminokiselina, BP/V imao je vrpce na 2925 cm^{-1} . Termičkim tretiranjem dolazi do smanjenja intenziteta vrpce te se ona pomiče na 2922 cm^{-1} kod kompleksa tretiranih pri 100°C i 110°C . Vrpce povezanu sa njihanjem CH_2 na 1397 cm^{-1} imali su svi uzorci osim kompleksa tretiranom pri 110°C , kod kojeg je došlo do vidljivog smanjenja intenziteta i pomaka na 1375 cm^{-1} , što ukazuje na strukturnu reorganizaciju bočnih lanaca pri višim temperaturama. Vrpce povezane sa aromatskim C-H deformacijama u regiji od 900 cm^{-1} do 700 cm^{-1} bile su određene na 790 cm^{-1} i 749 cm^{-1} , a iako nije bilo pomaka, intenzitet se značajno smanjio pri višim temperaturama, što može ukazivati na gubitak π - π interakcija polifenola s proteinom. U tzv. „fingerprint“ regiji polisaharida (1200 cm^{-1} do 900 cm^{-1}) svi uzorci, osim kompleksa tretiranog pri 110°C , imali su maksimum na 1028 cm^{-1} , dok je kod njega određen pomak na 1032 cm^{-1} uz smanjen intenzitet. Ova regija uključuje vibracije C-C, C-O i C-OH veza, tipične za polisaharide.



Slika 30. IR spektri kompleksa (BP/V) i kompleksa termički tretiranog pri 110°C (BP/V 110)

Usporedba promjena u strukturi proteina badema (BP) i kompleksa proteina badema sa polifenolima soka višnje (BP/V) nakon termičkog tretiranja

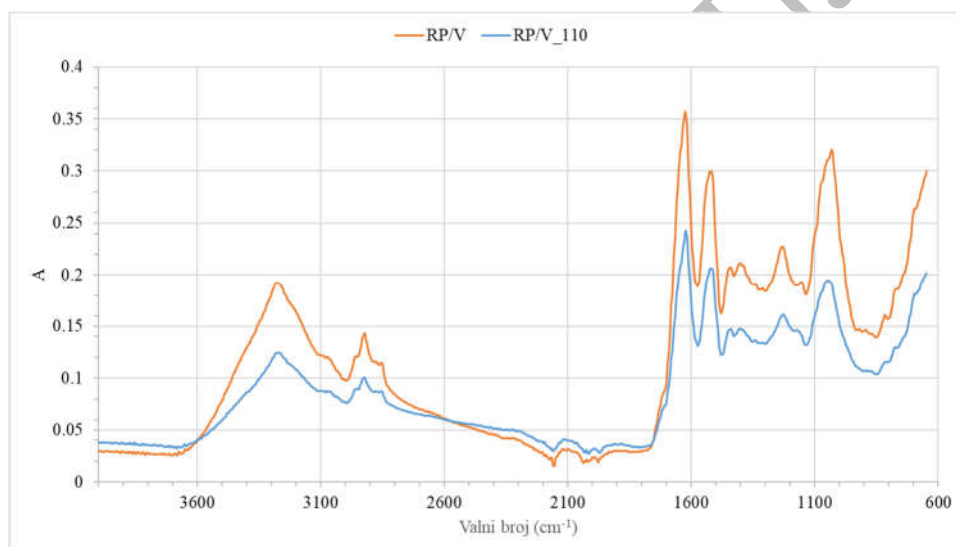


Slika 31. IR spektri termički tretiranog proteina badema i kompleksa pri 100 °C

Na Slici 31. prikazani su IR spektri termički tretiranog proteina badema i kompleksa pri 100 °C. U širokoj regiji od 3600 cm^{-1} do 3200 cm^{-1} koja obuhvaća O-H i N-H vibracije, kod svih kompleksa uočeno je povećanje intenziteta vrpce u odnosu na čisti protein, što upućuje na formiranje stabilnih vodikovih veza između polifenola i proteina, koje se održavaju čak i pri najvišoj temperaturi (110 °C). Vrpca Amid I (1700 do 1600 cm^{-1}) povezana s istezanjem karbonilnih C=O veza bila je izražena u proteinu badema, dok se kod kompleksa njen intenzitet smanjio. Termičkim tretiranjem dolazi do povećanja njenog intenziteta u odnosu na protein, a najveći intenzitet joj je u kompleksu tretiranom pri 110 °C. U Amid I regiji, koja je osjetljiva na promjene u sekundarnoj strukturi proteina, kod svih kompleksa uočeno je povećanje intenziteta u odnosu na protein. Vrpca koja se pripisuje asimetričnom istezanju CH_3 skupina u kompleksima je imala različit trend ovisno o temperaturi s povećanjem intenziteta pri 80, 90 i 100 °C, ali smanjenjem pri 110 °C, što može ukazivati na promjene u fleksibilnosti bočnih lanaca proteina tijekom zagrijavanja. Vrpca na 1371 cm^{-1} , povezana s njihanjem CH_2 , pomiče se na 1382 cm^{-1} u kompleksima, uz istovremeno povećanje intenziteta, što ukazuje na konformacijske promjene bočnih lanaca uzrokovane vezanjem polifenola. U tzv. „fingerprint“ regiji (1200 do 900 cm^{-1}), povezanoj s vibracijama polisaharida, vrpce na 1159 cm^{-1} kod svih kompleksa pokazale su veći intenzitet u odnosu na protein, iako se njihov intenzitet smanjuje s povećanjem temperature. Ove promjene upućuju na moguće interakcije između polifenola i

polisaharidnih komponenti prisutnih u proteinskom matriksu. Dodatno, pomaci s 1032 cm^{-1} na 1028 cm^{-1} , uz povećanje intenziteta, potvrđuju C-O vibracije i strukturne promjene kod polisaharidnih komponenti. Na nižim valnim brojevima, vrpca na 969 cm^{-1} , prisutna u proteinima badema, nestaje u kompleksima. Naposljetku, pojava novih vrpca na 790 cm^{-1} i 749 cm^{-1} , specifičnih za vanplanarne deformacije aromatskih C-H veza, isključivo u spektrima kompleksa, potvrđuje prisutnost π - π interakcija između aromatskih prstena polifenola i aromatskih aminokiselina proteina, koje se održavaju pri svim temperaturama termičkog tretiranja.

Promjene u strukturi kompleksa proteina riže sa polifenolima soka višnje (RP/V) nakon termičkog tretiranja

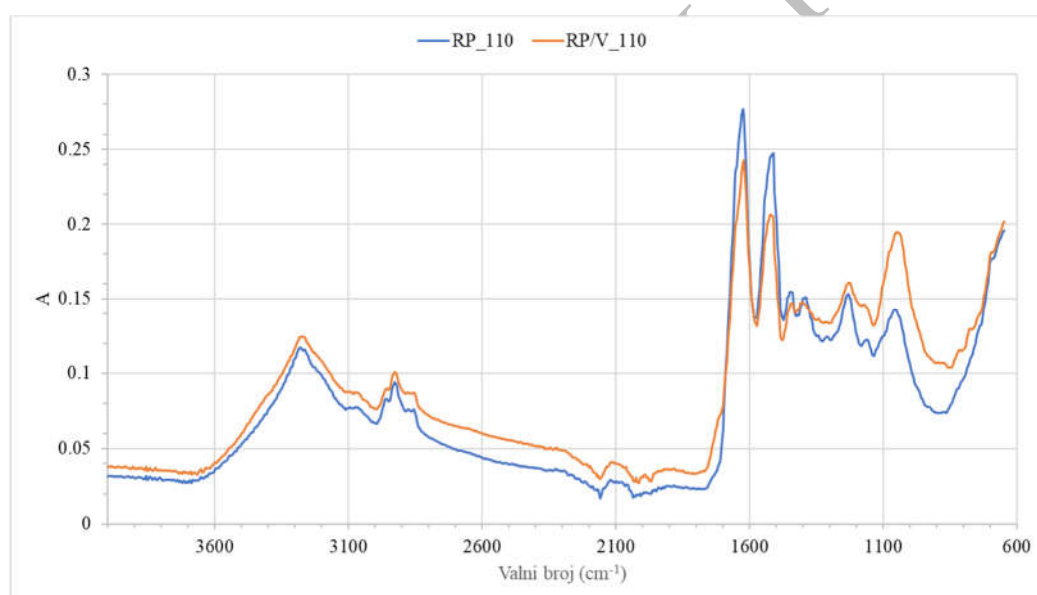


Slika 32. IR spektri kompleksa (RP/V) i kompleksa termički tretiranog pri 110 °C (RP/V 110)

Analizom IR spektra netretiranog kompleksa proteina riže i termički tretiranih kompleksa (Slika 32.) određene su promjene u analiziranim regijama, pri čemu se u gotovo svim uzorcima uočava smanjenje intenziteta vrpca. U širokoj regiji od 3600 do 3200 cm^{-1} koja obuhvaća rastezanja O-H i N-H veza kod svih termički tretiranih uzoraka uočeno je smanjenje intenziteta vrpce određene na 3291 cm^{-1} , što ukazuje na gubitak vodikovih veza. U regiji (od 3000 do 2800 cm^{-1}) alifatskih C-H rastezanja (na 2918 cm^{-1}) osobito $-\text{CH}_2$ i $-\text{CH}_3$ skupina u bočnim lancima hidrofobnih aminokiselina, nije određen pomak valnog broja, no intenzitet vrpce se smanjivao s povećanjem temperature. U Amid I regiji netretiran kompleks ima vrpcu na 1625 cm^{-1} koja se kod tretiranih uzoraka pomiče na 1621 cm^{-1} uz smanjenje intenziteta, što

upućuje na reorganizaciju sekundarne strukture. Kod Amid II regije također dolazi do smanjenja intenziteta vrpce (1531 cm^{-1}) povećanjem temperature, a time se potvrđuje smanjenje broja vodikovih veza. U području asimetričnih savijanja CH_2 i CH_3 skupina, vrpce na 1438 cm^{-1} i 1401 cm^{-1} postupno nestaju kod termički tretiranih uzoraka, što ukazuje na promjene u bočnim lancima proteina. Do smanjenja intenziteta vrpce kod termički tretiranih uzoraka dolazi i u Amid III regiji na 1218 cm^{-1} . Vrpca na 1039 cm^{-1} karakteristična za tzv. „fingerprint“ regiju ukazuje na osjetljivost na termičko tretiranje te dolazi do smanjenja intenziteta povećanjem temperature. U aromatskoj regiji od 900 cm^{-1} do 700 cm^{-1} , vrpcama na 793 cm^{-1} i 752 cm^{-1} određeno je smanjenje intenziteta povećanjem temperature.

Usporedba promjena u strukturi proteina riže (RP) i kompleksa proteina riže sa polifenolima soka višnje (RP/V) nakon termičkog tretiranja

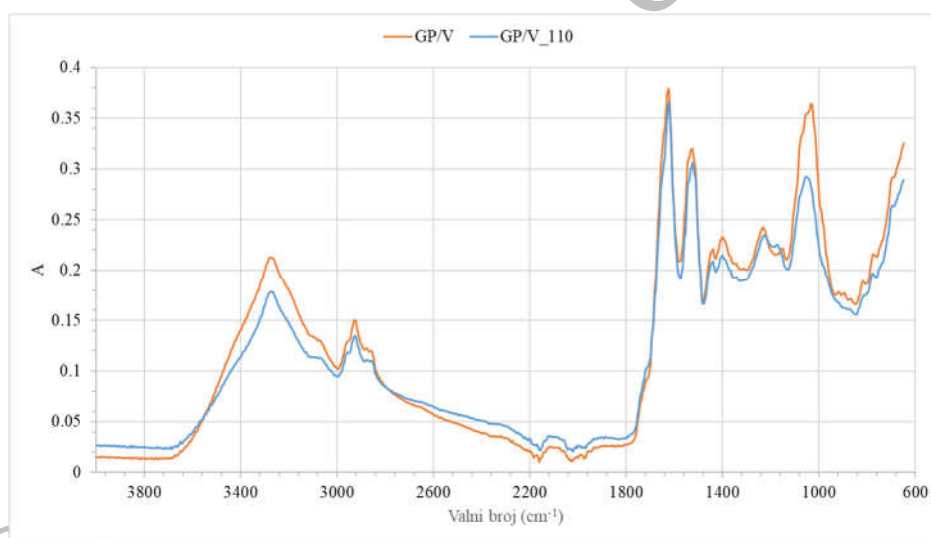


Slika 33. IR spektri termički tretiranog proteina riže i kompleksa pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$

Usporedbom IR spektra (Slika 33.) proteina riže u odnosu na njegov kompleks s polifenolima soka višnje nakon termičkog tretiranja određene su promjene u intenzitetu i pomaku valnih brojeva vrpce u analiziranim regijama. U regiji rastezanja O-H i N-H veza analiziranoj od 3600 do 3200 cm^{-1} vrpce su kod kompleksa imale viši intenzitet, osobito pri $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, što ukazuje na očuvanje vodikovih veza. Nasuprot tome, kod termički tretiranog proteina riže uočeno je slabljenje intenziteta vrpce u ovoj regiji. U regiji alifatskih C-H rastezanja (3000 do 2800 cm^{-1}), kod kompleksa je nakon termičkog tretiranja određen veći intenzitet vrpce u usporedbi s proteinom. Termičkim tretiranjem intenzitet vrpce Amid I i II

regija, povezanih sa promjenama u sekundarnoj strukturi proteina, intenzivniji je kod proteina riže u usporedbi s kompleksom, a povećanjem temperature kod svih uzoraka intenzitet se smanjuje. U području CH_2 i CH_3 deformacija, kod uzoraka proteina riže jasno su izražene vrpce na 1435 cm^{-1} do 1438 cm^{-1} i 1401 cm^{-1} do 1405 cm^{-1} , dok se u svim kompleksima te vrpce postupno gube. U Amid III regiji vrpca kod termički tretiranih uzoraka ima viši intenzitet u odnosu na proteine riže. U tzv. „fingerprint“ regiji povezanoj s polisaharidima (1200 do 900 cm^{-1}) kod proteina riže vrpca je na 1066 cm^{-1} , dok se u kompleksima vrpce pomiču ovisno o temperaturi prema 1054 cm^{-1} (pri $80\text{ }^\circ\text{C}$), 1051 cm^{-1} (pri $90\text{ }^\circ\text{C}$ i $100\text{ }^\circ\text{C}$) i 1028 cm^{-1} (pri $110\text{ }^\circ\text{C}$). Intenzitet vrpce u kompleksima pri svim temperaturama je veći u odnosu na protein. U regiji aromatskih deformacija vrpce na 793 cm^{-1} i 752 cm^{-1} nalaze se isključivo u kompleksima pri svim temperaturama, iako povećanjem temperature gube intenzitet.

Promjene u strukturi kompleksa proteina graška sa polifenolima soka višnje (GP/V) nakon termičkog tretiranja

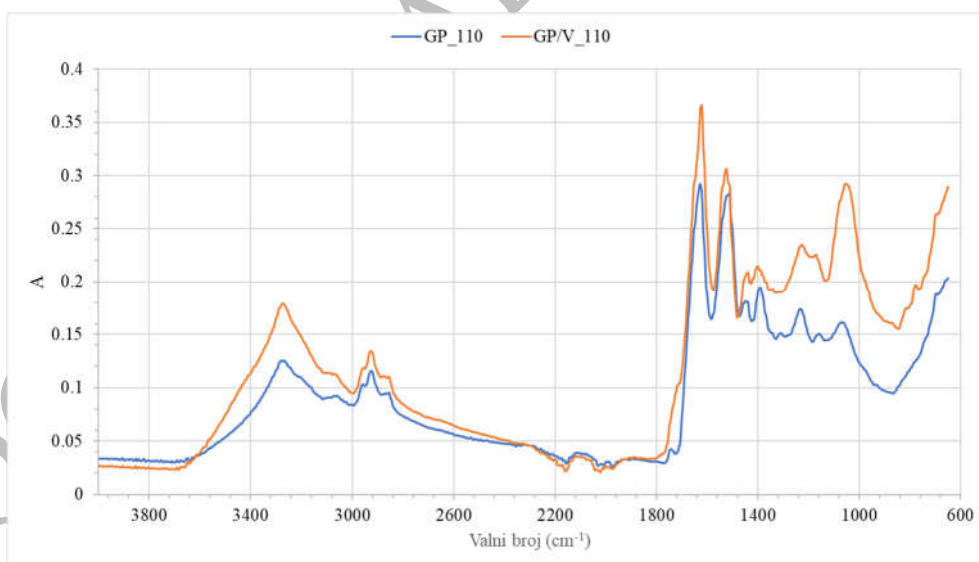


Slika 34. IR spektri kompleksa (GP/V) i kompleksa termički tretiranog pri $110\text{ }^\circ\text{C}$ (GP/V 110)

Analizom IR spektra (Slika 34.) netretiranog kompleksa proteina graška i termički tretiranih kompleksa određene su promjene u analiziranim regijama, pri čemu u termički tretiranim uzorcima dolazi do smanjenja intenziteta vrpce. Unutar regije od $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$ karakterističnoj za rastezanja O-H i N-H veza vrpce na 3280 cm^{-1} kod svih termički tretiranih uzoraka određeno je smanjenje intenziteta u odnosu na netretirani kompleks, što upućuje na smanjenje vodikovih veza. U regiji od 3000 do 2800 cm^{-1} alifatskih C-H vibracija (2925 cm^{-1}),

vidljivo je postepeno slabljenje intenziteta vrpce s povećanjem temperature, osobito kod uzoraka tretiranih pri 100 °C i 110 °C. Najizraženije promjene vidljive su u amidnim regijama, koje su ključne za interpretaciju sekundarne strukture proteina. U Amid I regiji vrpca kod netretiranog uzorka i uzorka tretiranog pri 80°C određena je na 1625 cm⁻¹, a termičkim tretiranjem određeni su pomaci prema nižem valnom broju na 1621 cm⁻¹ (uzorci tretirani pri 90, 100 i 110°C) uz smanjenje intenziteta povećanjem temperature. Ovakvi pomaci ukazuju na denaturaciju β-nabranih ploča i α-uzvojnica. Amid II regiji vrpce su na 1524 cm⁻¹, ali također je prisutno smanjenje intenziteta vrpce, osobito pri 100 °C i 110 °C. Termičkim tretiranjem u regiji CH₂ i CH₃ vrpce imaju smanjenje intenziteta povećanjem temperature, isti trend određen je i u Amid III regiji (na 1241 cm⁻¹). U tzv. „fingerprint“ regiji dominantna vrpca na 1028 cm⁻¹, koja je karakteristična za C-O i C-C vibracije, zadržava se u svim tretiranim uzorcima, ali pri višim temperaturama dolazi do smanjenja intenziteta. U regiji aromatskih deformacija specifične vrpce na 793 cm⁻¹ i 756 cm⁻¹, koje ukazuju na prisutnost aromatskih polifenolnih prstenova, također su oslabljene u tretiranim uzorcima.

Usporedba promjena u strukturi proteina graška (GP) i kompleksa proteina graška sa polifenolima soka višnje (GP/V) nakon termičkog tretiranja



Slika 35. IR spektri termički tretiranog proteina grššks i kompleksa pri 100 °C

Kako bi se usporedila struktura nakon termičkog tretiranja proteina graška i njegovog kompleksa s polifenolima soka višnje, analizirani su FTIR spektri uzoraka po regijama karakterističnim za proteine (Slika 35.). U regiji od 3600 do 3200 cm⁻¹ povezanoj s rastezanjem

O-H i N-H veza, uočeno je postupno smanjenje intenziteta s povećanjem temperature kod oba uzorka, ali su promjene bile izraženije kod čistog proteina, što ukazuje na stabilizacijski učinak polifenola kroz očuvanje vodikovih veza. U alifatskoj regiji od $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ kod proteina graška dolazi do smanjenja intenziteta i pomaka vrpce na niže valne brojeve, osobito pri višim temperaturama, dok je kod kompleksa manje smanjenje intenziteta u odnosu na protein, što može biti zbog smanjenja fleksibilnosti bočnih lanaca, ali i veće otpornosti kompleksa. Vrpca na 1744 cm^{-1} , povezana s C=O istezanjem, u proteinima graška se pri višim temperaturama pomiče na 1740 cm^{-1} uz smanjenje intenziteta, dok u kompleksu nije izražena. U Amid I regiji, karakterističnoj za sekundarnu strukturu proteina, vrpce se kod proteina graška pomiču na niži valni broj uz značajno smanjenje intenziteta, dok su pomaci kod kompleksa blaži uz veće očuvanje intenziteta, što može ukazivati na očuvanje strukturne organizacije kompleksa. U Amid II regiji, kod termički tretiranih proteina graška uočeno je smanjenje intenziteta i pomak vrpce, dok je kod kompleksa određen slabiji pomak i manji gubitak intenziteta, što potvrđuje da prisutnost polifenola usporava denaturaciju proteinske matrice. U regiji CH_2 i CH_3 savijanja, izražene vrpce kod proteina graška pomiču se uz smanjenje intenziteta, dok u kompleksu i u ovoj regiji vrpce ima manju promjenu intenziteta. U Amid III regiji uočeno je postupno smanjenje intenziteta u svim termički tretiranim uzorcima, bez značajnog pomaka valnih brojeva. U tzv. „fingerprint“ regiji, vrpca na 1148 cm^{-1} se kod proteina graška smanjuje povećanjem temperature, a izražena vrpca na 1028 cm^{-1} prisutna u kompleksu, ostaje prisutna pri najvišim temperaturama. U aromatskoj regiji ($900\text{ do }700\text{ cm}^{-1}$), specifične vrpce kompleksa na 793 cm^{-1} i 756 cm^{-1} imale su manji intenzitet ali su i dalje bile prisutne i pri 110°C .

5. RASPRAVA

Proteinski matriks predstavlja ključni čimbenik u stvaranju kompleksa s polifenolima. U ovom istraživanju korištena su tri biljna proteina, proteini badema (BP), proteini riže (RP) i proteini graška (GP), čiji se aminokiselinski sastav i strukturne karakteristike znatno razlikuju, što posljedično utječe na učinkovitost vezanja polifenola. U kompleksima polifenoli se vežu za proteine prvenstveno nekovalentnim interakcijama, uključujući vodikove veze, hidrofobne interakcije, elektrostatske interakcije i π - π interakcije, što je u skladu s literaturom (Zhang i sur., 2021; Yilmaz i sur., 2022). Adsorpcija polifenola na proteine i antioksidacijska aktivnost formuliranih kompleksa određeni su specifičnim strukturnim i kemijskim karakteristikama pojedinog proteina. Naime, aminokiselinski sastav, udio hidrofobnih i aromatskih ostataka, prisutnost funkcionalnih skupina poput -OH (hidroksilna skupina), -COOH (karboksilna skupina) i -NH₂ (amino skupina), kao i udio vlakana ili polisaharida, izravno utječu na način i učinkovitost nekovalentnih interakcija s polifenolima (Zhang i sur., 2021; Brudzynski i Maldonado-Alvarez, 2015; Feng i sur., 2023; Li i sur., 2021; Yilmaz i sur., 2022). Time proteinski matriks ne djeluje isključivo kao pasivni nosač, već aktivno sudjeluje u selektivnom vezanju i stabilizaciji polifenolnih spojeva.

Proteini badema sastoje se od albumina i globulina, a među dominantnim skladišnim proteinima je amandin (Li i sur., 2016). Aminokiselinski profil badema pokazuje visoke udjele arginina te značajne udjele glutaminske i asparaginske kiseline, uz hidrofobne aminokiseline poput leucina i izoleucina (Barreca i sur., 2020), što pogoduje hidrofobnim interakcijama s polifenolima (Zhang i sur., 2021; Yilmaz i sur., 2022). Aromatske aminokiseline (fenilalanin, tirozin, triptofan) omogućuju π - π interakcije s aromatskim prstenovima polifenola, dok polarne funkcionalne skupine -OH i -COOH sudjeluju u stvaranju vodikovih veza (Li i sur., 2021; Brudzynski i Maldonado-Alvarez, 2015). Zajednički učinak hidrofobnih, aromatskih i polarnih značajki objašnjava snažan afinitet proteina badema prema polifenolima (Feng i sur., 2023). Uz to, proteini badema sadrže i udio dijetalnih vlakana i polisaharida poput celuloze i pektina, koji mogu dodatno pridonijeti stabilizaciji polifenola te poslužiti kao fizička barijera za difuziju kisika i svjetlosti tijekom skladištenja (Zhang i sur., 2021; Cao i sur., 2021). Proteini riže sastoje se pretežno od glutelina, uz prolamine, albumine i globuline. Bitna značajka glutelina jest da tvore slabije topiv, rigidan matriks s disulfidnim vezama, koji nudi površinska mjesta za interakcije s polifenolima (Amaglieri i sur., 2017; Kawakatsu i Takaiwa, 2019). Prisutnost bočnih funkcionalnih skupina -NH₂ i -COOH omogućuje elektrostatske i vodikove interakcije s polifenolima (Yilmaz i sur., 2022), dok udio aromatskih aminokiselina omogućuje π - π

interakcije (Khalesi i FitzGerald, 2021). Proteini graška pretežno se sastoje od globulina, osobito legumina i vicilina, koji imaju izražene hidrofobne regije, dok bočni lanci s -COOH i -NH₂ skupinama omogućuju hidrofobne interakcije, π - π interakcije te vodikove veze s polifenolima (Lu i sur., 2020; Strauch i Lila, 2021). Aromatske aminokiseline poput fenilalanina i tirozina dodatno pogoduju stvaranju π - π interakcija (Zhang i sur., 2021).

Vrijednosti ukupnih polifenola (UP), proantocijanidina (PANT), pojedinačnih polifenolnih spojeva, antioksidacijske aktivnosti te parametara boje u kompleksima određene su kao polazna točka za razumijevanje kasnijih promjena tijekom skladištenja i termičkog tretiranja. Dobiivene vrijednosti odražavaju početni polifenolni profil nakon procesa kompleksiranja, što omogućuje procjenu učinkovitosti stabilizacije bioaktivnih spojeva unutar različitih proteinskih matriksa. Uočene razlike među kompleksima mogu se tumačiti kroz selektivne uloge pojedinih biljnih proteina u zaštiti, vezanju i dostupnosti polifenola.

5.1. Ukupni polifenoli i proantocijanidini

Folin-Ciocalteu metoda spektrofotometrijska je metoda koja se temelji na sposobnosti polifenolnih spojeva da reduciraju fosfomolibdenske i fosfotungstenske komplekse prisutne u reagensu, pri čemu otopina poprima karakterističnu plavu boju (Pérez i sur., 2023). Intenzitet razvijene boje proporcionalan je ukupnom redukcijskom kapacitetu uzorka (Platzer i sur., 2021). Reakcija se odvija prema mehanizmu prijenosa jednog elektrona (SET), pri čemu hidroksilne skupine polifenola doniraju elektron reagensu (Pérez i sur., 2023). Međutim, reagens nije selektivan isključivo za polifenole, već mogu reagirati i drugi spojevi s reducirajućim kapacitetom, poput askorbinske kiseline, određenih šećera i proteina, što može rezultirati precijenjenim vrijednostima ukupnih polifenola određenih ovom metodom (Pérez i sur., 2023). Reaktivnost pojedinih polifenola snažno ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi. Spojevi koji sadrže orto-difenolne (kateholne) skupine - dvije hidroksilne skupine (-OH) u orto položaju na B-prstenu ili trihidroksilne skupine (tri -OH skupine na aromatskom prstenu) pokazuju znatno izraženiju redukcijsku sposobnost, što se odražava u višim vrijednostima apsorbancije. Suprotno tome, glikozilacija, osobito na položaju C-3 kod flavonola, obično smanjuje vrijednosti određene Folin-Ciocalteu metodom jer umanjuje dostupnost, odnosno elektrondonorske mogućnosti fenolnih -OH skupina (npr. kvercetin > kvercetin-3-glukozid; taksoifolin > naringenin/hesperetin) (Rice-Evans i sur., 1996; Platzer i sur., 2021; Pérez i sur., 2023). Prema Singletonu i suradnicima (1999), Folin-Ciocalteu reagens ne mjeri isključivo polifenolne spojeve, već ukupni redoks kapacitet prisutnih polifenolnih i nefenolnih spojeva

sposobnih za donaciju elektrona. Stoga degradacija antocijana u fenolne kiseline ili transformacija proantocijanidina u kondenzirane pigmente ne mora rezultirati proporcionalnim smanjenjem UP vrijednosti, budući da novonastali produkti mogu zadržati ili čak privremeno povećati reducirajuću sposobnost. Različite polifenolne podskupine pokazuju različit odgovor u ovoj metodi (npr. kvercetin > klorogenska kiselina > *p*-kumarinska kiselina), što dodatno objašnjava zašto promjene u HPLC profilu ne moraju linearno odgovarati promjenama u Folin-Ciocalteu metodi (Singleton i sur., 1999).

U pripremljenim kompleksima određen je udio ukupnih polifenola (UP) prema sljedećem redoslijedu: BP/V > GP/V $\approx$ RP/V. Najviša koncentracija ukupnih polifenola u kompleksu BP/V može se objasniti većim udjelom proantocijanidina (flavan-3-oli), za koje je poznato da posjeduju više fenolnih -OH skupina i izraženiju reducirajuću sposobnost u odnosu na fenolne kiseline i antocijane. Zahvaljujući povoljnom redoks potencijalu i prisutnosti višestrukih kateholnih skupina, proantocijanidini pokazuju snažan spektrofotometrijski odaziv u Folin-Ciocalteu metodi (Liang i sur., 2024; Rice-Evans i sur., 1996; Foti, 2007). Osim pojedinačne snažne reaktivnosti, proantocijanidini mogu djelovati i sinergistički, povećavajući ukupni redukcijski kapacitet, što dodatno doprinosi najvišim vrijednostima UP u BP/V (Liang i sur., 2024). Važno je naglasiti da veći udio UP u BP/V ne znači nužno i najveće koncentracije svih pojedinačnih polifenola određenih HPLC metodom, već odražava jaču ukupnu reducirajuću moć prisutnih spojeva, osobito proantocijanidina. Nasuprot tome, kompleks GP/V sadrži veće koncentracije antocijana poput cijanidin-3-rutinozida (C-3-R) i cijanidin-3-glukozil-rutinozida (C-3-G-R), dok RP/V sadrži veće koncentracije hidroksicimetnih kiselina poput klorogenske i neoklorogenske kiseline, no oba kompleksa pokazuju niže udjele UP. To se može pripisati činjenici da ovi spojevi posjeduju manji broj fenolnih -OH skupina po molekuli, što rezultira smanjenom aktivnošću u Folin-Ciocalteu metodi (Seeram i sur., 2001; Wianowska i Gil, 2019; Platzer i sur., 2021; Foti, 2007). Glikozilacija antocijana, smanjuje njihovu elektrondonorsku sposobnost i redukcijski kapacitet, zbog čega GP/V, iako bogat antocijanima, pokazuje niže vrijednosti UP u odnosu na BP/V (Platzer i sur., 2021; Seeram i sur., 2001). RP/V sadrži značajne količine hidroksicimetnih kiselina, koje imaju slabiji redoks potencijal te to objašnjava zašto je u kompleksu određen manji udio UP u usporedbi s BP/V (Foti, 2007). Navedeno naglašava važnost uzimanja u obzir strukturnih svojstava polifenolnih spojeva pri interpretaciji vrijednosti UP, budući da spektrofotometrijski odaziv ne ovisi isključivo o koncentraciji, već i o broju reaktivnih hidroksilnih skupina te o vrsti prisutnih polifenola. Stoga vrijednosti UP dobivene Folin-Ciocalteu metodom ne predstavljaju izravnu sumu pojedinačnih polifenola izmjerenih HPLC-om, već su integrirani pokazatelj ukupne

redukcijske moći uzorka (Platzer i sur., 2021). Smanjenje određene koncentracije proizlazi iz promjene redoks stanja polifenola (pretvorba u kinone) i/ili njihovog kovalentnog vezanja na protein, a ne nužno iz potpunog gubitka molekula polifenola (Pérez i sur., 2023; Platzer i sur., 2021; Yilmaz i sur., 2022; Feng i sur., 2023; Ozdal i sur., 2013).

Tijekom skladištenja kompleksa BP/V, RP/V i GP/V na svjetlu (bočice od prozirnog stakla; S) i u tami (bočice od tamnog stakla; T), promjena udjela ukupnih polifenola ovisila je o proteinskom matriksu i trajanju skladištenja. Kod BP/V kompleksa vrijednosti su ostale stabilne do 3. mjeseca, dok je smanjenje postalo značajno nakon 6 mjeseci skladištenja. Kod RP/V kompleksa izraženije smanjenje udjela UP bilo je statistički značajno već od 3. mjeseca. U GP/V kompleksu promjene su bile blaže, pri čemu je značajno smanjenje određeno tek nakon 9 mjeseci na svjetlu, dok u tami nije bilo značajnih razlika tijekom skladištenja. Kompleks BP/V zadržao je najveći udio ukupnih polifenola tijekom 9 mjeseci skladištenja. Smanjenje ukupnih polifenola u uzorcima skladištenim pod svjetlom u odnosu na uzorke skladištene u tami, dosljedno je fotooksidacijskim mehanizmima. Svjetlost inicira fotooksidaciju pri kojoj polifenoli prelaze u semikinonske radikale, a zatim u kinonske oblike. Kinoni potom ulaze u oksidativnu polimerizaciju, pri čemu nastaju visokomolekularne tamnije pigmentne strukture smanjene redoks sposobnosti, što rezultira nižim vrijednostima određenim Folin-Ciocalteu metodom. (Lu i Zhao, 2017; Cozmuta i sur., 2024). Dokazano je da se u tami, zahvaljujući većoj svjetlosnoj barijeri, usporava gubitak polifenola u odnosu na uzorke na svjetlu (Zorić i sur., 2016; Ochoa i sur., 2001; Ali i sur., 2018; Bakowska i sur., 2003). Tijekom skladištenja smanjenje udjela UP očekivano je i u tami, uslijed spore autooksidacije zaostalim kisikom u prahu/ambalaži, a svjetlost dodatno ubrzava degradaciju kroz fotooksidacijske mehanizme (Zorić i sur., 2016; Ochoa i sur., 2001). Inkapsulacija polifenola može povećati njihovu stabilnost pri izlaganju svjetlu (Xue i sur., 2024; Xue i sur., 2024a; Cao i sur., 2021). Tako je u inkapsuliranim ekstraktima kore batata tijekom 60 dana gubitak ukupnih polifenola bio 5,2 % u tami naspram 18,6 % na svjetlu pri 25 ± 5 °C (Šergelj i sur., 2020), a slično tome, u nanoenkapsuliranom ekstraktu kore manga tijekom 60 dana u tami određeni su minimalni gubici ukupnih polifenola, dok je neenkapsulirani ekstrakt brže gubio polifenole, osobito u prvih 15 dana, što potvrđuje zaštitni učinak matriksa (Saborirad i sur., 2024). Nekovalentne interakcije stabiliziraju polifenole i smanjuju njihovu izloženost kisiku i svjetlu (Yilmaz i sur., 2022; Feng i sur., 2023; Ozdal i sur., 2013). Proteini badema formiraju stabilne π - π interakcije s aromatskim prstenovima polifenola, dok hidrofobne interakcije dodatno učvršćuju kompleks. Uz to, prisutnost polisaharida i vlakana stvara fizičku barijeru protiv difuzije kisika i svjetlosti, čime se smanjuju degradacijski procesi tijekom skladištenja. Prema literaturi, trostruke

interakcije proteina, polifenola i polisaharida mogu rezultirati stvaranjem kompaktnijih mreža koje poboljšavaju fotostabilnost vezanih spojeva (Barreeca i sur., 2020; Cao i sur., 2021; Xue i sur., 2024; Xue i sur., 2024a). Proteini riže imaju viši udio sumpornih aminokiselina (cisteina, metionina), koje su dobri nukleofili tako da oksidirani polifenoli (kinoni) tijekom skladištenja mogu reagirati s bočnim lancima proteina putem 1,4-konjugirane adicije (Michaelova adicija), čime se formiraju trajne C-S ili C-N kovalentne veze (Khalesi i FitzGerald, 2021; Yilmaz i sur., 2022; Feng i sur., 2023; Ozdal i sur., 2013; Bayati i Poojary, 2025). Sastav proteina graška pogoduje primarno vodikovim vezama i elektrostatskim interakcijama, dok su π - π interakcije slabije nego kod proteina badema (Khalesi i FitzGerald, 2021; Yilmaz i sur., 2022), te je time zaštita polifenola od oksidacije u GP/V kompleksu manje učinkovita nego u BP/V. S obzirom na to da je sok višnje bogat antocijanima, treba naglasiti da oni predstavljaju fotoosjetljivu komponentu ukupnih polifenola te djelovanjem svjetla degradiraju uz smanjenje antioksidacijske aktivnosti određene Folin-Ciocalteu metodom.

U provedenom istraživanju kompleksi su pokazali relativnu stabilnost ukupnih polifenola tijekom termičkog tretiranja. Udio UP se nije značajno mijenjao pri 80 °C i 90 °C, dok je smanjenje određeno pri 100 °C i 110 °C. Najveće smanjenje određeno je u GP/V kompleksu pri 110 °C.

Očuvanje vrijednosti ukupnih polifenola pri 80 °C i 90 °C ne znači potpunu stabilnost pojedinačnih polifenolnih spojeva, već odražava činjenicu da se gubitak osjetljivijih komponenti može nadoknaditi prisutnošću stabilnijih polifenola i njihovih degradacijskih produkata, koji i dalje doprinose ukupnom redoks odgovoru u Folin-Ciocalteu metodi. Iako HPLC analiza pokazuje da antocijani, osobito cijanidin-3-rutinozid (C-3-R) i cijanidin-3-glukozil-rutinozid (C-3-G-R), već pri 80 °C podliježu početnoj degradaciji i smanjenju koncentracije, ovaj gubitak se ne odražava na vrijednosti UP zbog relativne stabilnosti drugih polifenolnih spojeva (Pérez i sur., 2023; Platzer i sur. 2021; Seeram i sur., 2001). Fenolne kiseline u tom temperaturnom rasponu pokazuju znatno veću termičku otpornost. Njihove višestruke fenolne -OH skupine raspoređene u stabilnim aromatskim prstenovima omogućuju očuvanje redukcijskog kapaciteta u Folin-Ciocalteu metodi (Liang i sur., 2024; Alcázar Magaña i sur., 2021). Stoga, iako dolazi do degradacije osjetljivijih struktura kao što su one kod antocijana, ukupni redoks odgovor ostaje očuvan zahvaljujući doprinosu stabilnijih spojeva i novonastalih degradacijskih produkata. Smanjenje ukupnih polifenola pri 100 °C i 110 °C rezultat je termički induciranih promjena u strukturi polifenolnih spojeva, pri čemu dolazi do oksidacije, cijepanja i polimerizacije u spojeve koji više ne posjeduju jednak redoks kapacitet u Folin-Ciocalteu metodi. Antocijani prisutni u kompleksima, pri ovim temperaturama prelaze

u nestabilne međuprodukte i degradacijske produkte, što dovodi do gubitka funkcionalnih fenolnih -OH skupina odgovornih za redoks aktivnost (Seeram i sur., 2001). Paralelno s time, proantocijanidini višeg stupnja polimerizacije podliježu oksidacijskim reakcijama i kondenzaciji u veće, tamnije pigmente smanjenog redukcijskog kapaciteta, čime se smanjuje njihov doprinos u ovoj metodi (Liang i sur., 2024). Za razliku od antocijana, flavonoli pokazuju veću termičku stabilnost i degradiraju sporijim oksidativnim putem stvarajući kinonske derivate koji zadržavaju djelomičan redoks potencijal, čime doprinose očuvanju ukupnih polifenola pri povišenim temperaturama (Ravber i sur., 2016; Wang i Zhao, 2016; Schulze i sur., 2014; Rohn i sur., 2007). Promjene prilikom termičkog tretiranja nisu ograničene samo na antocijane, flavonole i proantocijanidine, klorogenske kiseline mogu izomerizirati ili prelaziti u kofeinsku i druge fenolne kiseline s nižom elektrondonorskom sposobnošću, što dodatno pridonosi smanjenju ukupnog redoks potencijala (Alcázar Magaña i sur., 2021). Pri povišenim temperaturama, degradacija polifenola postaje dominantna nad njihovom strukturnom stabilnošću, što rezultira smanjenjem vrijednosti UP. Udio ukupnih polifenola određen je polifenolnim profilom unutar kompleksa i zaštitnom ulogom proteinskog matriksa. Kompleks BP/V zadržava najviše vrijednosti UP zahvaljujući prisutnosti termički stabilnih polifenola i njihovih degradacijskih produkata, te strukturom proteina badema koja ograničava oksidaciju. RP/V kompleks pokazuje srednju stabilnost UP, što se može pripisati dominaciji hidroksicimetnih kiselina koje unatoč toplinskim promjenama poput izomerizacije i degradacije još uvijek mogu zadržati djelomičan redoks odgovor. Dodatno, rigidni glutelinski matriks riže, stabiliziran disulfidnim vezama, može djelomično ograničiti oksidativnu degradaciju. GP/V kompleks bilježi najveće smanjenje UP pri povišenim temperaturama, što proizlazi iz dominacije antocijana koji su izrazito termički nestabilni te iz ograničene zaštite proteinskog matriksa graška. Stoga se razlike među kompleksima se ne odražavaju u koncentraciji pojedinačnih polifenola, već u njihovoj kemijskoj sposobnosti prijenosa elektrona u Folin-Ciocalteu reakciji i zaštitnoj ulozi proteina.

Inkapsulacija polifenola u proteinske matrikse, dokazano štiti polifenole od vanjskih čimbenika (svjetlo, povišena temperatura) te smanjuje degradaciju, povećava stabilnost i održava antioksidacijsku aktivnost (Feng i sur., 2023; Cao i sur., 2021). Zanimljivo istraživanje provedeno je u kolačima pečenim pri 175 °C tijekom 22 minute, u kojima su polifenoli višnje inkapsulirani u maltodekstrin i gumu arabika. Dokazano je da je njihova inkapsulacija značajno povećala koncentraciju UP i očuvala antioksidacijsku aktivnost (određenu DPPH metodom) u odnosu na neinkapsulirane uzorke: UP $\approx$ 30,7 - 30,4 % vs. 22,2 % i 15,1 %, a DPPH $\approx$ 20,7 -

18,6 % vs. 8,9 % i 2,0 %. Time je potvrđeno da kompleksi povećavaju otpornost polifenola na termičko tretiranje (Luca i sur., 2014).

Promjene udjela ukupnih polifenola u kompleksima pokazale su jasnu ovisnost o skladištenju na svjetlu i u tami, te o temperaturama pri termičkom tretiranju. Tijekom skladištenja dominiraju fotooksidacijske reakcije, osobito pri izlaganju svjetlu, gdje polifenoli prelaze u semikinonske i kinonske oblike te naposljetku u polimerne pigmente smanjene reducirajuće sposobnosti. Za razliku od sporijih promjena tijekom skladištenja, termičko tretiranje dovodi do bržih kemijskih promjena polifenola, pri čemu se stabilnost očituje samo u ograničenom temperaturnom rasponu, nakon čega slijedi smanjenje redoks kapaciteta. Pri povišenim temperaturama dolazi do degradacije antocijana i flavonola, oksidacije proantocijanidina te kemijskih promjena fenolnih kiselina u spojeve s nižim redoks potencijalom, što se očituje u postupnom smanjenju vrijednosti ukupnih polifenola. Ovakve promjene potvrđuju da su razlike u udjelu ukupnih polifenola određene kemijskim svojstvima pojedinih polifenolnih skupina te ulogom proteinskih matriksa, čije strukture i interakcije s polifenolima utječu na njihovu otpornost prema degradacijskim procesima.

Za određivanje udjela proantocijanidina u kompleksima korištena je DMAC metoda. To je spektrofotometrijska metoda namijenjena selektivnoj kvantifikaciji proantocijanidina, odnosno kondenziranih flavan-3-ola, temeljem njihove reakcije s DMAC reagensom u kiseloj sredini. Metoda je osobito osjetljiva na „terminalne” flavan-3-ol jedinice, dok visoko-polimerni proantocijanidini daju slabiji odaziv zbog manjeg broja fenolnih -OH skupina dostupnih za reakciju s reagensom (Wang i sur., 2016). Antioksidacijska aktivnost proantocijanidina pripisuje se prisutnosti brojnih fenolnih -OH skupina, njihovoj specifičnoj stereokemijskoj strukturi i stupnju polimerizacije. Proantocijanidini s nižim stupnjem polimerizacije (monomeri i dimeri) pokazuju izraženiju antioksidacijsku aktivnost, što se objašnjava većim brojem slobodnih fenolnih -OH skupina dostupnih za neutralizaciju slobodnih radikala. S povećanjem stupnja polimerizacije dolazi do smanjenja međumolekulskog prostora i dostupnosti fenolnih -OH skupina (Liang i sur., 2024). U soku višnje proantocijanidini čine značajnu skupinu polifenola, pri čemu prevladavaju oligomeri nižeg stupnja polimerizacije, a proantocijanidin B2 kvantificiran je kao jedan od glavnih proantocijanidina u soku višnje (Capanoglu i sur., 2011; Losso i sur., 2018). On je B-tip dimer građen od dviju (epi)katehinskih jedinica povezanih C4-C8 vezom (De Taeye i sur., 2014; Xu i sur., 2015) i poznat je po snažnom odazivu u DMAC metodi zahvaljujući terminalnim flavan-3-ol jedinicama (Wang i sur., 2016). Degradacijom spoja dolazi do epimerizacije (epikatehin ↔ katehin), oksidacije i cijepanja C4-C8 interflavanidnih veza, što dovodi do stvaranja manjih oligomera i fragmenata - reakcije poznate

kao redistribucija stupnja polimerizacije odnosno depolimerizacije (De Taeye i sur., 2014; Xu i sur., 2015; Liang i sur., 2024). Oksidativna degradacija proantocijanidina dovodi do niza produkata (kinoni, manji oligomeri, fenolne kiseline, antocijani i drugi niskomolekularni derivati), a eksperimentalno je potvrđena i pojava A-tip produkata (De Taeye i sur., 2014; Xu i sur., 2015; Liang i sur., 2024). Tijekom skladištenja u prisutnosti svjetla i kisika fenolne -OH skupine proantocijanidina mogu se oksidirati do kinonskih derivata, što potiče polimerizaciju i nastanak smeđih produkata (Lu i Zhao, 2017; Cozmuta i sur., 2024; Liang i sur., 2024).

U pripremljenim kompleksima određene su početne koncentracije PANT prema redoslijedu $BP/V > GP/V \approx RP/V$. Visoki udjeli PANT u BP/V kompleksu mogu se dodatno objasniti afinitetom flavan-3-ola prema aromatskim i hidrofobnim domenama proteina badema. Vezanje se ostvaruje kombinacijom π - π interakcija, hidrofobnih interakcija i vodikovih veza, pri čemu aromatske bočne skupine i sekundarna struktura stvaraju povoljna mjesta za vezanje proantocijanidina (Yilmaz i sur., 2022; Barreca i sur., 2020). Budući da proantocijanidini nemaju izražene karboksilne ili druge snažno ionizirajuće skupine, mogućnost stabilnih elektrostatskih interakcija je ograničena. Njihovo vezanje stoga dominantno ovisi o bočnim skupina fenilalanina, tirozina i triptofana koji imaju ključnu ulogu u stabilizaciji kompleksa (Yilmaz i sur., 2022). Veće koncentracije proantocijanidina određenih u BP/V kompleksu također se odražavaju u višim početnim vrijednostima antioksidacijske aktivnosti određene ABTS, FRAP i CUPRAC metodama u odnosu na RP/V i GP/V, unatoč istim DPPH vrijednostima. Ovi rezultati u skladu su s literaturom u kojoj se navodi da oligo- i polimeri flavan-3-ola snažno doprinose SET i mješovitim antioksidacijskim metodama, dok se DPPH metodom može podcijeniti njihov doprinos (Rice-Evans i sur., 1996; Foti, 2007).

Slabije vezanje proantocijanidina u GP/V i RP/V kompleksima može se pripisati različitim strukturnim karakteristikama proteina. Proteini graška imaju manji udio aromatskih aminokiselina, uz izraženiju prisutnost hidrofilnih regija. Zbog toga prevladavaju vodikove veze i elektrostatske interakcije, dok je udio stabilnijih π - π i hidrofobnih interakcija ograničen, što rezultira slabijim vezanjem proantocijanidina (Lu i sur., 2020; Khalesi i FitzGerald, 2021). Proteini riže imaju rigidni matriks stabiliziran disulfidnim vezama, što ograničava dostupnost veznih mjesta proantocijanidinima. Dostupne bočne skupine (-NH₂, -COOH) ostvaruju prvenstveno elektrostatske i vodikove interakcije, dok manji udio aromatskih aminokiselina dodatno smanjuje mogućnost vezanja proantocijanidina (Amagliani i sur., 2017; Kawakatsu i Takaiwa, 2019). Stoga proteini badema, zahvaljujući bogatijem aromatskom profilu i povoljnijem rasporedu hidrofobnih regija, pokazuju veći afinitet prema proantocijanidinima,

dok proteini riže i graška ostvaruju slabije interakcije i niže početne vrijednosti PANT-a u pripremljenim kompleksima.

Tijekom skladištenja kompleksa BP/V, RP/V i GP/V određeno je postupno smanjenje udjela PANT, pri čemu je dinamika smanjenja ovisila o vrsti proteina i uvjetima skladištenja. U BP/V i GP/V kompleksima vrijednosti su ostale statistički nepromijenjene do 3. mjeseca, nakon čega je određeno smanjenje nakon 6. mjeseca, s većom stabilnošću u tami. Kod RP/V kompleksa vrijednosti su bile stabilne nakon 6. mjeseca, a nakon 9 mjeseci uslijedile su statistički značajne promjene. Smanjenje koncentracije je bilo izraženije u uzorcima skladištenim na svjetlu u odnosu na uzorke skladištene u tami, što je u skladu s fotooksidacijskim mehanizmima. Svjetlost, osobito UV i plava komponenta spektra, inducira oksidaciju fenolnih -OH skupina u semikinonske radikale, koji se daljnjom oksidacijom pretvaraju u kinonske oblike. Kinoni, kao kemijski reaktivni spojevi, mogu sudjelovati u polimerizaciji stvarajući tamnije pigmentne strukture smanjene redoks sposobnosti ili se kovalentno vezati na bočne lance aminokiselina poput lizina, histidina i cisteina. (Lu i Zhao, 2017; Cozmuta i sur., 2024; Yilmaz i sur., 2022; Feng i sur., 2023; Ozdal i sur., 2013; Bayati i Poojary, 2025). Takve reakcije objašnjavaju smanjenje koncentracije proantocijanidina u kompleksima skladištenim na svjetlu. Tijekom skladištenja proantocijanidini se u nekim voćnim matriksima pokazuju relativno stabilni kada je temperatura niska, a svjetlo i kisik ograničeni. Tako su u soku aronije skladištenom 6 mjeseci pri 25 °C ukupni proantocijanidini bili dobro očuvani (Wilkes i sur., 2014). Slično, u plodovima crnog ribiza zamrznutima pri -20 °C tijekom 9 mjeseci udio proantocijanidina se nije značajno smanjio (Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk, 2011).

Za razliku od sporijih oksidacijskih reakcija tijekom skladištenja, tijekom termičkog tretiranja dominiraju brze reakcije poput epimerizacije i oksidacije koje dovode do cijepanja strukture i polimerizacije, koje rezultiraju značajnim smanjenjem koncentracije proantocijanidina. Rezultati su potvrdili izrazitu termičku osjetljivost proantocijanidina u svim ispitivanim kompleksima. U BP/V kompleksu određeno je smanjenje proantocijanidina već pri 80 °C, dok pri 100 i 110 °C nisu bili određeni. U GP/V kompleksu uočeno je kontinuirano smanjenje, pri čemu PANT nisu određeni iznad 100 °C. Zanimljivo, u RP/V kompleksu uočeno je povećanje pri 80 °C, nakon kojeg pri 110 °C proantocijanidini nisu bili više određeni. Ovakav temperaturno ovisan obrazac odražava promjene unutar polimernih flavan-3-ola, pri čemu početne reakcije poput depolimerizacije i epimerizacije mogu privremeno povećati prisutnost DMAC reaktivnih oligomera, dok daljnja oksidacija i kondenzacija dovode do gubitka tih struktura. Termičko tretiranje inducira višestruke mehanizme degradacije proantocijanidina,

uključujući oksidaciju fenolnih -OH skupina u kinonske derivate, cijepanje interflavanidnih veza te kondenzaciju u visokomolekularne agregate smanjene reaktivnosti (Liang i sur., 2024; Xu i sur., 2015). Zbog smanjenja broja dostupnih flavan-3-olnih mjesta, udio PANT određen DMAC metodom opada i prije potpune degradacije molekula, što je u skladu s prethodno opisanim ponašanjem proantocijanidina pri termičkom tretiranju (Wang i sur., 2016). U RP/V kompleksu povećanje udjela proantocijanidina pri 80 °C može se povezati s redistribucijom stupnja polimerizacije viših polimera u manje oligomere, koji sadrže veći broj DMAC-reaktivnih terminalnih flavan-3-ol jedinica. Međutim, pri višim temperaturama oksidacija i kondenzacija proantocijanidina postaju dominantne, što rezultira time da oni više nisu određeni DMAC metodom (Liang i sur., 2024; Xu i sur., 2015). Najizraženije smanjenje proantocijanidina određeno je u BP/V kompleksu. Budući da DMAC reagens selektivno kvantificira terminalne flavan-3-ol jedinice, sve reakcije koje smanjuju njihov broj uključujući oksidaciju, cijepanje C4-C8 veza te kondenzaciju u visokomolekularne agregate rezultiraju padom odziva, iako fenolne strukture nisu nužno potpuno nestale (Liang i sur., 2024; Wang i sur., 2016). U BP/V kompleksu prevladavaju oligomeri višeg stupnja polimerizacije, s većim brojem slobodnih fenolnih -OH skupina i terminalnih mjesta, što ih čini osobito osjetljivima na toplinsku oksidaciju u kinonske oblike i naknadnu kondenzaciju u strukture smanjene reaktivnosti prema DMAC metodi (Xu i sur., 2015; Liang i sur., 2024).

Povećani broj fenolnih -OH skupina povećava antioksidacijsku aktivnost, ali istodobno i sklonost oksidaciji, što smanjuje otpornost na termičko tretiranje (Xu i sur., 2015; Foti, 2007). Rezultati potvrđuju da su proantocijanidini najosjetljivija skupina polifenola višnje na termičko tretiranje i da ono dovodi do njihove brze i gotovo potpune degradacije (Liang i sur., 2024; De Taeye i sur., 2014; De Paepe i sur. 2014). Tijekom skladištenja degradacija je sporija i postupna, međutim svjetlost potiče oksidaciju u kinone, te njihovu polimerizaciju ili kovalentno vezanje na proteinski matriks (Lu i Zhao, 2017; Wilkes i sur., 2014; Bayati i Poojary, 2025). Usporedba ovih reakcija jasno pokazuje da termičko tretiranje predstavlja dominantan i brži mehanizam degradacije proantocijanidina, dok skladištenje u tami omogućuje djelomičnu stabilizaciju njihove strukture i aktivnosti. Njihova stabilnost određena je i strukturom proteinskog matriksa: proteini badema, zahvaljujući aromatskim aminokiselinama, hidrofobnim domenama i prisutnosti polisaharida, pružaju najučinkovitiju zaštitu; proteini riže, zbog višeg udjela sumpornih aminokiselina, potiču trajno vezanje oksidiranih kinona; dok proteini graška, siromašniji aromatskim aminokiselinama, osiguravaju slabiju stabilnost.

5.2. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost polifenola proizlazi iz njihove sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta, a temelji se na nekoliko komplementarnih mehanizama. Najvažniji su mehanizam prijenosa elektrona (SET), u kojem polifenol reducira oksidacijski agens donacijom elektrona, te mehanizam prijenosa atoma vodika (HAT), u kojem polifenol donira atom vodika iz fenolne -OH skupine, pri čemu nastaje fenoksilni radikal stabiliziran rezonancijom (Lang i sur., 2024; Munteanu i Apetrei, 2021; Foti, 2007). Uz to, polifenoli mogu djelovati i kao kelatori prijelaznih metala (Fe^{2+} , Cu^{2+}), čime se sprječava stvaranje visoko reaktivnih hidroksilnih radikala putem Fentonove reakcije (Apak i sur., 2007). Strukturne značajke polifenola presudne su za njihovu antioksidacijsku aktivnost: orto-difenolna skupina u B-prstenu, prisutnost 2,3-dvostruke veze u konjugaciji s 4-keto skupinom, te hidroksilne skupine u položajima 3 i 5, koje stabiliziraju fenoksilne radikale intramolekularnim vodikovim vezama. Navedene strukture omogućuju učinkovitu delokalizaciju elektrona i stabilizaciju oksidiranih oblika polifenola (Kazazić, 2004; Rice-Evans i sur., 1996). U slučaju višnje, najveći doprinos ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti imaju proantocijanidini, antocijani, flavonoli i klorogenske kiseline. Antocijani i klorogenske kiseline posjeduju orto-difenolne i trihidroksilne strukture visokog redukcijskog kapaciteta (Platzer i sur., 2021; Seeram i sur., 2001), kvercetin-3-rutinozid dodatno pridonosi antioksidacijskoj aktivnosti zbog svoje strukture, dok proantocijanidini s više fenolnih -OH skupina i nižim redoks potencijalom posebno snažno doprinose ukupnom redukcijskom kapacitetu (Liang i sur., 2024; Foti, 2007). Kako bi se obuhvatila različita svojstva i mehanizmi djelovanja polifenola, u ovom istraživanju primijenjene su četiri metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti: DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC. One se međusobno nadopunjuju jer se razlikuju prema osnovnom mehanizmu reakcije, pH osjetljivosti, topivosti korištenih radikala i selektivnosti prema pojedinim polifenolnim strukturama (Apak i sur., 2007; Apak i sur., 2006).

Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom

DPPH metoda temelji se na sposobnosti spojeva da neutraliziraju slobodne radikale HAT i SET mehanizmima. DPPH[•] radikal je stabilni dušikov radikal tamnoljubičaste boje, koji se u organskom otapalu (najčešće metanol) pretvara u intenzivno ljubičastu otopinu. U prisutnosti antioksidansa reducira se u stabilni oblik (DPPH-H), pri čemu otopina poprima svijetloljubičastu nijansu, a apsorbancija se smanjuje proporcionalno antioksidacijskom

kapacitetu uzorka (Munteanu i Apetrei, 2021). Polifenoli, zbog prisutnosti jedne ili više fenolnih -OH skupina vezanih na aromatski prsten, lako doniraju vodikov atom ili elektron DPPH[•] radikalu. Međutim, metoda pokazuje selektivnost prema lipofilnim antioksidansima, dok hidrofilni spojevi poput jednostavnih fenolnih kiselina ili proantocijanidina često reagiraju sporije ili nepotpuno, što može rezultirati niže određenim vrijednostima antioksidacijske aktivnosti (Apak i sur., 2007; Liang i sur., 2024). Strukturne značajke određuju antioksidacijsku aktivnost u ovoj metodi, tako da spojevi s orto-difenolnim skupinama u B-prstenu pokazuju pojačanu sposobnost prijenosa elektrona zbog stabilizacije nastalog fenoksilnog radikala rezonancijom i intramolekularnim vodikovim vezama, što ih čini učinkovitijima u neutralizaciji slobodnih radikala (Rice-Evans i sur., 1996). Suprotno tome, jednostavne fenolne kiseline (poput *p*-kumarinske, kofeinske), koje imaju samo jednu -OH skupinu nemaju mogućnost rezonancijske stabilizacije, pa pokazuju niže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom (Munteanu i Apetrei, 2021). Ipak, njihova prisutnost u smjesama može pridonijeti ukupnom antioksidacijskom učinku kroz sinergističke interakcije s ostalim polifenolima (Apak i sur., 2007). Proantocijanidini, iako posjeduju više fenolnih -OH skupina, imaju sporiju i djelomičnu reaktivnost prema DPPH[•] radikalu, tako da njihova veća koncentracija u kompleksu ne mora rezultirati proporcionalnim povećanjem antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom (Liang i sur., 2024; Apak i sur., 2007; Rice-Evans i sur., 1996).

Početne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom u pripremljenim kompleksima nisu pokazale statistički značajne razlike ($BP/V \approx RP/V \approx GP/V$), što upućuje na to da različiti polifenolni profili mogu rezultirati usporedivim ukupnim radikalskim učinkom. U GP/V kompleksu antioksidacijska aktivnost može se pripisati prisutnosti antocijana, osobito cijanidin-3-rutinozida i cijanidin-3-glukozil-rutinozida, čije orto-difenolne skupine omogućuju brzu donaciju vodika i stabilizaciju fenoksilnih radikala rezonancijom (Seeram i sur., 2001; Rice-Evans i sur., 1996; Munteanu i Apetrei, 2021). U RP/V kompleksu antioksidacijski doprinos ostvaruju hidroksicimetne kiseline, koje unatoč slabijoj pojedinačnoj reaktivnosti mogu doprinijeti ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti (Wianowska i Gil, 2019; Platzer i sur., 2021). U BP/V kompleksu prisutnost kondenziranih proantocijanidina može rezultirati sporijom kinetikom reakcije s DPPH[•], budući da reaktivnost ovisi o dostupnosti terminalnih flavan-3-ol jedinica (Wang i sur., 2016; Liang i sur., 2024). Unatoč različitim mehanizmima neutralizacije radikala, svi kompleksi postižu usporedive vrijednosti DPPH aktivnosti, što potvrđuje da ukupna antioksidacijska učinkovitost nije određena isključivo vrstom polifenola, već i njihovom strukturom i kinetikom reakcije.

Tijekom skladištenja kompleksa određeno je postupno smanjenje antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom. Smanjenje antioksidacijske aktivnosti bilo je izraženije u uzorcima skladištenim na svjetlu u odnosu na one u tami, što je u skladu s fotooksidacijskim mehanizmima. Oksidacija fenolnih -OH skupina i nastanak kinonskih derivata smanjuju sposobnost donacije elektrona ili vodikovih atoma (Lu i Zhao, 2017; Yilmaz i sur., 2022; Feng i sur., 2023). Kod RP/V i GP/V došlo je do bržeg smanjenja antioksidacijske aktivnosti u odnosu na BP/V, što odražava razlike u svojstvima proteinskih matriksa. Rezultati su u skladu su s literaturom koja naglašava važnost ambalaže i temperature pri skladištenju uzoraka. U radu Saborirad i suradnika (2024) o nanoenkapsuliranom ekstraktu kore manga antioksidacijska aktivnost formulacija određena je DPPH metodom, dok je stabilnost (tijekom 60 dana na 5/25/45 °C) procijenjena prema UP. Dokazano je da inkapsulacija značajno smanjuje gubitke polifenola u odnosu na slobodni ekstrakt, pri čemu proteinsko-polisaharidni kompleks daje najvišu početnu antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom, a tijekom skladištenja najbolju stabilizaciju polifenola pri povišenoj temperaturi (45 °C). U radu Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk (2011) u mikroenkapsulatima crnog ribiza antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom praćena je od 0 do 12 mjeseci i pokazuje postupne promjene uz jasnu prednost inulina (antioksidacijska aktivnost je gotovo nepromijenjena nakon 12 mjeseci pri 8 °C, a blago niža pri 25 °C) nad maltodekstrinima. Kao dodatni primjer, u radu Ali i suradnika (2018) na suhim ekstraktima lista Piper betle antioksidacijska aktivnost najbolje se održala pri 5 °C u tami (gotovo potpuna stabilnost i nakon 180 dana), dok su 25 °C i/ili svjetlo ubrzavali njeno smanjenje. Autori ističu da je temperatura važniji čimbenik od svjetla, a optimalni uvjet za očuvanje antioksidacijske aktivnosti su 5 °C i tama. Sveukupno, smanjenje antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom tijekom skladištenja objašnjava se gubitkom reaktivnih fenolnih -OH skupina i njihovim kovalentnim vezanjem za proteinski matriks, pri čemu tamna ambalaža značajno usporava degradaciju, iako je ne može u potpunosti spriječiti.

Termičkim tretiranjem antioksidacijska aktivnost kompleksa određena DPPH metodom pokazala je dvofazni obrazac: pri 80 - 90 °C povećanje uslijed nastanka degradacijskih komponenata koje posjeduju antioksidacijsko djelovanje, a pri 100 - 110 °C smanjenje zbog prevladavajućih degradacijskih procesa. Pri umjerenim temperaturama kratkotrajno povećanje antioksidacijske aktivnosti, pripisuje se degradacijskim promjenama polifenola u manje, redoks aktivne spojeve (npr. fenolne kiseline), prije nego što pri višim temperaturama prevlada degradacija i polimerizacija te antioksidacijska aktivnost počinje opadati (Oancea i sur., 2017; Oancea i sur., 2018; Sadilova i sur., 2007; Ioannou i sur., 2020). Mehanizam početnog povećanja može se povezati i s denaturacijom proteina te destabilizacijom i reorganizacijom

vodikovih veza i hidrofobnih interakcija, što povećava dostupnost fenolnih -OH skupina dostupnih za reakciju s DPPH[•], a to je i u skladu s analiziranim FTIR spektrima (Zhang i sur., 2021; Yilmaz i sur., 2022). Iako su svi kompleksi imali jednaku početnu antioksidacijsku aktivnost, BP/V se tijekom termičkog tretiranja pokazao kao najstabilniji kompleks. U GP/V kompleksu dominiraju antocijani, čija je visoka početna aktivnost rezultat kateholnih skupina, ali oni su izrazito termički osjetljivi (otvaranje prstena, oksidacija), stoga termičkim tretiranjem dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti ovog kompleksa (Seeram i sur., 2001; Sadilova i sur., 2007; Cemeroglu i sur., 1994). U RP/V prevladavaju hidroksicimetne kiseline, koje u početku doprinose antioksidacijskoj aktivnosti zbog kateholne strukture, no pri povišenim temperaturama prolaze izomerizaciju te dolazi do smanjenja redukcijskog kapaciteta (Wianowska i Gil, 2019; Dawidowicz i Typek, 2017). Veća antioksidacijska aktivnost BP/V kompleksa pri 110 °C proizlazi iz termički otpornijih polifenolnih struktura i njihovih degradacijskih produkata koji i dalje sudjeluju u prijenosu elektrona u DPPH metodi. Pritom hidrofobne i π - π interakcije u proteinsko-polifenolnom matriksu mogu djelomično usporiti daljnju degradaciju tih spojeva, čime se produljuje dostupnost preostalih fenolnih -OH skupina za neutralizaciju radikala (Liang i sur., 2024; Wang i sur., 2016; Chaaban i sur., 2017; Sadowska-Bartosz i Bartosz, 2024; Yilmaz i sur., 2022). Literaturni primjeri podupiru ovakav obrazac opažen u kompleksima. U voćnim ekstraktima bogatim antocijanima antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom pokazuje jasno temperaturno i vremenski uvjetovano smanjenje: s povećanjem temperature i produženjem vremena zagrijavanja, antioksidacijska aktivnost se postupno smanjuje. Primjerice, u ekstraktu višnje termički tretiranog od 100 do 160 °C dolazi do progresivnog smanjenja antioksidacijske aktivnosti, s gotovo potpunim gubitkom pri najvišim temperaturama (Oancea i sur. 2017). Sličan obrazac prikazan je i za ekstrakt bazge, gdje se s povećanjem temperature smanjuje antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom tijekom vremena (Oancea i sur. 2018). Nasuprot tome, u ekstraktima kore citrusa (*Citrus unshiu*) termičko tretiranje (100 - 150 °C, 10 - 60 min) dovodi do povećanja antioksidacijske aktivnosti, što se tumači stvaranjem reaktivnijih niskomolekularnih spojeva (Jeong i sur., 2004).

Antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom

ABTS metoda, temelji se na neutralizaciji radikalskog kationa ABTS^{•+}, pri čemu dolazi do smanjenja apsorbancije proporcionalne antioksidacijskoj aktivnosti uzorka (Munteanu i Apetrei, 2021; Bibi Sadeer i sur., 2020). Reakcija se odvija prvenstveno SET mehanizmom, uz mogući doprinos HAT-a, a njezin intenzitet ovisi o strukturnim značajkama antioksidansa te

eksperimentalnim uvjetima poput pH-a, otapala, koncentracije i trajanja reakcije (Munteanu i Apetrei, 2021; Foti, 2007; Apak i sur., 2007). Za razliku od DPPH[•], ABTS^{•+}, je topiv u vodi i organskim otapalima te se može primjenjivati u širokom pH rasponu, što omogućuje određivanje antioksidacijske aktivnosti i hidrofilnih i lipofilnih spojeva (Bibi Sadeer i sur., 2020) poput fenolnih kiselina i antocijana (Apak i sur., 2007). Reakcija s ABTS^{•+}, snažno ovisi o broju i rasporedu fenolnih -OH skupina u spoju, tako da oni s kateholnim B-prstenom i niskim redoks potencijalom, poput flavan-3-ola, pokazuju najveću antioksidacijsku aktivnost (Rice-Evans i sur., 1996; Foti, 2007; Lang i sur., 2024). Suprotno tome, glikozilacija smanjuje dostupnost -OH skupina te time smanjuje i antioksidacijsku aktivnost, dok acilacija dodavanjem novih fenolnih funkcionalnih skupina može povećati antioksidacijsku aktivnost (Sadowska-Bartosz i Bartosz, 2024). Zbog toga ABTS metoda često pokazuje više vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u uzorcima bogatim hidrofilnim polifenolima u usporedbi s DPPH metodom, koja može podcijeniti njihov doprinos (Apak i sur., 2007; Apak i sur., 2008).

U pripremljenim kompleksima početne vrijednosti određene ABTS metodom slijedile su redoslijed BP/V > RP/V ≈ GP/V. Najviša antioksidacijska aktivnost u BP/V proizlazi iz visokog udjela flavan-3-ola, koji pokazuju snažan odaziv zahvaljujući niskom redoks potencijalu i višestrukim -OH skupinama pogodnim za reakcije prema SET i HAT mehanizmima, a njihova sposobnost stabilizacije fenoksilnih radikala dodatno pojačava učinak (Rice-Evans i sur., 1996; Liang i sur., 2024; Foti, 2007). U GP/V kompleksu antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom proizlazi iz udjela antocijana i flavonola, čije kateholne strukture omogućuju učinkovitu neutralizaciju ABTS^{•+}. Kompleks RP/V, iako bogat hidroksicimetnim kiselinama, pokazuje manju aktivnost od BP/V zbog manjeg broja -OH skupina i višeg redoks potencijala (Wianowska i Gil, 2019; Alcázar Magaña i sur., 2021; Platzer i sur., 2021). Ovakav redoslijed potvrđuje da antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom snažno odražava strukturalne karakteristike polifenola, osobito prisutnost višestrukih fenolnih -OH skupina i niži redoks potencijal te objašnjava višu aktivnost BP/V u usporedbi s RP/V i GP/V (Apak i sur., 2007; Bibi Sadeer i sur., 2020).

Tijekom skladištenja kompleksa određeno je postupno smanjenje antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom, pri čemu su statistički značajne promjene ovisile o vrsti proteinskog matriksa i uvjetima skladištenja. Kod BP/V kompleksa antioksidacijska aktivnost je ostala stabilna nakon prva 3 mjeseca skladištenja, dok je statistički značajno smanjenje određeno nakon 6 na svjetlu i nakon 9 mjeseci i na svjetlu i u tami, uz manje smanjenje u uzorcima u tami. Suprotno tome, kod RP/V i GP/V kompleksa smanjenje aktivnosti bilo je ranije i izraženije, sa statistički značajnim razlikama već nakon 3 mjeseca, što upućuje na manju

stabilnost polifenola u tim kompleksima. Ovakav obrazac u skladu je s fotooksidacijskim mehanizmima u kojima svjetlost inducira oksidaciju i polimerizaciju u pigmente smanjene antioksidacijske aktivnosti čime se smanjuje raspoloživi broj funkcionalnih skupina za reakciju s ABTS^{•+} (Lu i Zhao, 2017; Cozmata i sur., 2024; Yilmaz i sur., 2022). U BP/V kompleksu antioksidacijska aktivnost bila je najviša tijekom cijelog razdoblja skladištenja, što se može pripisati proantocijanidinima sa snažnim redoks potencijalom i većom otpornosti na oksidaciju u odnosu na antocijane ili hidroksicimetne kiseline (Liang i sur., 2024). Smanjenje antioksidacijske aktivnosti u RP/V kompleksu povezano je s oksidacijom i izomerizacijama hidroksicimetnih kiselina, kojima se smanjuje njihov redoks potencijal (Wianowska i Gil, 2019; Dawidowicz i Typek, 2017). U GP/V kompleksu smanjenje antioksidacijske aktivnosti proizlazi iz dominacije antocijana, koji su izrazito fotoosjetljivi, te pod utjecajem svjetla i kisika prolaze izomerizaciju, otvaranje prstena i oksidativna cijepanja, pri čemu nastaju produkti niske antioksidacijske aktivnosti (Xue i sur., 2024a; Seeram i sur., 2001). Iako se ne radi o inkapsuliranim polifenolima, rad autora (Coelho i sur., 2020) potvrđuje da skladištenje u tami održava antioksidacijsku aktivnost napitaka zelenog i crnog čaja, za razliku od onih skladištenih na svjetlu. U gotovim napitcima od zelenog i crnog čaja skladištenima 8 tjedana na sobnoj temperaturi, stabilnost je bila veća u mraku nego na svjetlu: u zelenom čaju približno 86 % u mraku naspram 78 % na svjetlu, dok je u crnom čaju smanjenje u mraku bilo minimalno (5 % nakon 8 tjedana), a na svjetlu izraženije (16 % nakon 4 tjedna; 22 % nakon 8 tjedana). Ovi rezultati potvrđuju da ambalaža i uvjeti skladištenja značajno utječu na očuvanje antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom.

Početne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom bile su najviše u BP/V kompleksu, zatim u RP/V i GP/V, što ukazuje na najizraženiji početni redoks kapacitet BP/V kompleksa. Razlike proizlaze iz dominantnih polifenolnih skupina: u BP/V to su proantocijanidini, u GP/V antocijani, a u RP/V hidroksicimetne kiseline. Tijekom termičkog tretiranja svi kompleksi pokazuju smanjenje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, ali s različitim intenzitetom. U BP/V kompleksu vrijednosti su se smanjivale postupno, pri čemu je zadržana najviša antioksidacijska aktivnost pri svim temperaturama termičkog tretiranja. To se može povezati s visokom početnom koncentracijom proantocijanidina, čije višestruke fenolne -OH skupine osiguravaju snažan SET odaziv, čak i nakon djelomične degradacije (Liang i sur., 2024). Kod RP/V i GP/V kompleksa smanjenje antioksidacijske aktivnosti je izraženije, pri čemu GP/V unatoč visokoj početnoj vrijednosti, pokazuje najnižu antioksidacijsku aktivnosti već pri 90 °C. Ovaj rezultat proizlazi zbog termičke osjetljivosti antocijana, koji u uvjetima povišene temperature prolaze izomerizaciju, otvaranje prstena i oksidaciju, što rezultira

gubitkom redukcijskog kapaciteta (Seeram i sur. 2001; Cemeroglu i sur. 1994). U RP/V kompleksu glavni nositelji aktivnosti su hidroksicimetne kiseline, koje pri termičkom tretiranju prolaze izomerizaciju i oksidativnu degradaciju, što smanjuje njihov doprinos antioksidacijskoj aktivnosti određenoj ABTS metodom (Wianowska i Gil, 2019; Dawidowicz i Typek, 2017). Proantocijanidini iz BP/V kompleksa pri 100 - 110 °C podliježu oksidaciji i kondenzaciji u visokopolimerne strukture smanjene reaktivnosti. Stoga antioksidacijska aktivnost BP/V kompleksa u ovom temperaturnom području proizlazi iz prisutnih flavonola, fenolnih kiselina i njihovih degradacijskih produkata, koji i dalje sudjeluju u SET reakcijama i doprinose ukupnom redoks odgovoru (Liang i sur., 2024; Inns i sur., 2007; Chaaban i sur., 2017; Dawidowicz i Typek, 2017). U literaturi su određeni slični trendovi smanjenja antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom tijekom termičkog tretiranja voćnih pigmenata. Sadilova i suradnici (2007) dokazali su da se u pročišćenim pigmentnim frakcijama crne mrkve, bazge i jagode pri 95 °C vrijednosti određene ABTS metodom smanjuju, ali sporije od koncentracije antocijana, jer dio aktivnosti preuzimaju novonastali polifenolni razgradni produkti. Ipak, ukupna antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom pokazuje sporiji pad u odnosu na koncentraciju antocijana. Autori naglašavaju da gubitak bioaktivnosti antocijana ne mogu nadoknaditi novonastali bezbojni polifenoli poput fenolnih kiselina. U radu Chaaban i suradnika (2017) ABTS metodom je praćena antiradikalska aktivnost šest flavonoida (kvercetin-3-rutinozid, naringin, eriodiktiol, luteolin, luteolin-7-O-glukozid, meskitol) pri 70 - 130 °C (do 2 h) te je dokazano da, unatoč djelomičnoj ili potpunoj degradaciji flavonoida, otopine mogu zadržati ili kratkotrajno povećati antioksidacijsku aktivnost; primjerice, kod kvercetin-3-rutinozida je uočeno povećanje tijekom prve faze zagrijavanja, nakon čega slijedi postupno smanjenje. Autori navode i primjer da je pri 100 °C/300 min otopina kvercetin-3-rutinozida i dalje posjedovala antioksidacijsku aktivnost zbog nastanka reaktivnih produkata.

Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom

FRAP metoda temelji se na sposobnosti spojeva da reduciraju trovalentno željezo (Fe^{3+}) u kompleksu s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom (TPTZ) u dvovalentno željezo (Fe^{2+} -TPTZ). Povećanje apsorbancije nastalog kompleksa intenzivne modro-plave boje proporcionalan je ukupnom reducirajućem kapacitetu uzorka (Munteanu i Apetrei, 2021; Apak i sur., 2007). Za razliku od metoda koje mjere hvatanje slobodnih radikala (DPPH, ABTS), FRAP metoda mjeri ukupni reducirajući potencijal u kiselom mediju ($\text{pH} \approx 3,6$). Ovaj uvjet omogućuje održavanje željeza u topljivom obliku, ali utječe i na reaktivnost pojedinih antioksidansa. Spojevi s nižim redoks potencijalom (npr. proantocijanidini) pokazuju veće vrijednosti antioksidacijske

aktivnosti određene FRAP metodom, dok spojevi višeg redoks potencijala (npr. neki antocijani) mogu pokazati manje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti unatoč radikalskoj aktivnosti u drugim metodama (Apak i sur., 2007; Rice-Evans i sur., 1995). Mehanizam FRAP metode pripada isključivo SET tipu, što ovu metodu čini selektivnom prema određenim strukturnim profilima polifenola. Najveću antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom imaju spojevi s orto-difenolnim i trihidroksilnim skupinama na aromatskom prstenu, jer omogućuju učinkovitu delokalizaciju elektrona i stabilizaciju fenoksilnog radikala nastalog nakon donacije elektrona (Rice-Evans i sur., 1996; Foti, 2007).

Poredak kompleksa po njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti određenoj FRAP metodom je: BP/V > GP/V > RP/V. BP/V kompleks je pokazao najviše vrijednosti zahvaljujući udjelu proantocijanidina čija struktura osigurava snažan redukcijski kapacitet (Liang i sur., 2024; Pulido i sur., 2000). Antocijani i falvonoli u FRAP metodi ostvaruju SET odaziv zahvaljujući kateholnom B-prstenu, no taj je učinak slabiji od proantocijanidina. Glikozilacija dodatno smanjuje redukcijski kapacitet u odnosu na aglikone zbog smanjene dostupnosti fenolnih -OH skupina za SET reakcije, što se jasno očituje u nižim vrijednostima određenim za GP/V kompleks (Seeram i sur., 2001; Sadowska-Bartosz i Bartosz, 2024; Rice-Evans i sur., 1996; Apak i sur., 2007). RP/V kompleks, u kojem dominiraju hidroksicimetne kiseline, s manjim brojem fenolnih -OH skupina i višim redoks potencijalom u usporedbi s proantocijanidinima i antocijanima, pokazuju slabiju antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom (Wianowska i Gil, 2019; Alcázar Magaña i sur., 2021; Dawidowicz i Typek, 2017). Važno je naglasiti da RP/V i GP/V, iako sadrže veće količine pojedinačnih polifenola nego BP/V, daju niže vrijednosti u FRAP metodi. To potvrđuje da ukupnom redukcijskom kapacitetu snažnije doprinosi oligomerna frakcija proantocijanidina nego pojedinačni polifenoli. Svaka strukturna promjena koja smanjuje dostupnost fenolnih -OH skupina ili konjugiranih elektronskih sustava izravno rezultira nižom antioksidacijskom aktivnošću određenom FRAP metodom (Benzie i Devaki, 2018; Pulido i sur., 2000; Foti, 2007).

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom značajno su se smanjivale tijekom skladištenja, pri čemu su promjene bile izraženije kod RP/V i GP/V. U BP/V kompleksu vrijednosti su se postupno smanjivale tijekom svih 9 mjeseci skladištenja, pri čemu nije bilo statistički značajnih razlika između uzoraka skladištenih na svjetlu i u tami. Najviša vrijednost antioksidacijske aktivnosti BP/V kompleksa proizlazi iz višeg udjela proantocijanidina kojima stabilnost dodatno osiguravaju π - π i hidrofobne interakcije te polisaharidi (Liang i sur., 2024; Barreca i sur., 2020; Cao i sur., 2021; Xue i sur., 2024a). Najveće smanjenje u RP/V kompleksu povezano je s osjetljivošću hidroksicimetnih kiselina i

trajnim kovalentnim vezanjem oksidiranih fenola na proteinski matriks (Khuwijitjaru i sur., 2014; Dawidowicz i Typek, 2017; Khalesi i FitzGerald, 2021; Bayati i Poojary, 2025). GP/V kompleks pokazao je smanjenje antioksidacijske aktivnosti, što je u skladu s fotoosjetljivošću antocijana (Sadilova i sur., 2007; Seeram i sur., 2001). Oksidacija te kovalentno vezanje na proteine smanjuju raspoložive donore elektrona, što smanjuje antioksidacijsku aktivnost uzorka (Yilmaz i sur., 2022; Feng i sur., 2023; Ozdal i sur., 2013; Lu i Zhao, 2017). Smanjenje antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom proizlazi iz reakcija oksidacije i polimerizacije, pri čemu je ova metoda osobito osjetljiva na gubitak slobodnih fenolnih -OH skupina u kiselom pH (Apak i sur., 2007; Foti, 2007).

Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom odražavala je sastav kompleksa: BP/V je bogat proantocijanidinima s višestrukim fenolnim -OH skupinama, GP/V sadrži antocijane s orto-difenolnim B-prstenom, dok RP/V ima veći udio klorogenskih kiselina s umjerenim reducirajućim učinkom (Liang i sur., 2024; Sadowska-Bartosz i Bartosz, 2024; Wianowska i Gil, 2019; Pulido i sur., 2000). Povišenje temperature dovelo je do smanjenja antioksidacijske aktivnosti u svim kompleksima, pri čemu se dinamika razlikovala ovisno o termičkoj stabilnosti polifenola i dostupnosti njihovih fenolnih -OH skupina (Manzocco i sur., 2000). U BP/V kompleksu smanjenje se povezuje s oksidacijom i kondenzacijom proantocijanidina, što je u skladu s opažanjima da povećanje stupnja polimerizacije smanjuje antioksidacijsku aktivnost u SET metodama (Manzocco i sur., 2000; Liang i sur., 2024). Kod GP/V kompleksa određeno je najveće smanjenje zbog termičke osjetljivosti antocijana, koji zagrijavanjem prelaze u fenolne kiseline slabijeg redukcijskog kapaciteta u FRAP metodi (Oancea i sur., 2021; Seeram i sur., 2001; Sadowska-Bartosz i Bartosz, 2024). U RP/V kompleksu toplina potiče izomerizaciju i oksidativnu degradaciju hidroksicimetnih kiselina, čime se smanjuje njihov redoks kapacitet i ukupna reducirajuća sposobnost, što rezultira smanjenjem antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom (Dawidowicz i Typek, 2017; Alcázar Magaña i sur., 2021; Wianowska i Gil, 2019).

Antioksidacijska aktivnost određena CUPRAC metodom

CUPRAC metoda temelji se na redukciji kompleksa Cu^{2+} -neokuproin u Cu^{+} -neokuproin, pri čemu nastaje stabilan kromofor. Reakcija se provodi u puferu pH ~7, što CUPRAC čini jednom od rijetkih antioksidacijskih metoda koja se provodi u bliskim fiziološkim uvjetima. Mehanizam reakcije dominantno uključuje SET, uz mogući manji doprinos HAT-a, ovisno o strukturi antioksidansa i kinetici reakcije (Apak i sur., 2008). CUPRAC metoda pogodna je za određivanje antioksidacijske aktivnosti i hidrofilnih i lipofilnih

antioksidansa, uključujući fenolne kiseline, flavonoide, antocijane, askorbinsku kiselinu i tiolne spojeve, što ju čini prikladnom za kompleksne biljne matrikse (Apak i sur., 2006). Strukturne značajke polifenola snažno određuju antioksidacijsku aktivnost određenu CUPRAC metodom. Spojevi s orto-dihidroksilnim skupinama u B-prstenu, višestrukim -OH skupinama i planarnim konjugiranim strukturama pokazuju povećanu reducirajuću sposobnost, dok ju glikozilacija smanjuje, a acilacija može povećati antioksidacijsku aktivnost dodavanjem dodatnih fenolnih funkcionalnih skupina (Foti, 2007; Rice-Evans i sur., 1996). Zbog toga ova metoda često daje više vrijednosti za flavan-3-ole i njihove oligo-/polimere, kao i za fenolne kiseline s orto-difenolnim strukturama, nego metode temeljene na radikalima poput DPPH metode (Apak i sur., 2008).

Kod pripremljenih uzoraka određene su razlike među kompleksima: BP/V > GP/V > RP/V. Najvišoj antioksidacijskoj aktivnosti BP/V kompleksa doprinose proantocijanidini, čija struktura osigurava snažan SET odaziv u CUPRAC metodi (Liang i sur., 2024; Rice-Evans i sur., 1996). U GP/V kompleksu glavni doprinos dolazi od antocijana, a unatoč tome što glikozilacija smanjuje njihov redoks potencijal u usporedbi s aglikonskim oblicima, planarna struktura i rezonancijska stabilizacija fenoksilnog radikala omogućuje im značajnu vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom (Sadowska-Bartosz i Bartosz, 2024; Seeram i sur., 2001). Najniže vrijednosti izmjerene su za RP/V kompleks, u kojem dominiraju hidroksicimene kiseline s manjim brojem fenolnih -OH skupina u odnosu na proantocijanidine i antocijane, što rezultira slabijim ukupnim redukcijskim kapacitetom (Wianowska i Gil, 2019; Alcázar Magaña i sur., 2021). Ovakav trend u skladu je s literaturom koja naglašava da CUPRAC metoda pokazuje izražen redoks odgovor za spojeve s kateholnim i trihidroksilnim strukturama (Apak i sur., 2006; Rice-Evans i sur., 1996).

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom u svim kompleksima pokazale su postupno smanjenje tijekom skladištenja (3, 6 i 9 mjeseci), pri čemu su smanjenja vrijednosti bila uočljivija u uzorcima skladištenim na svjetlu nego u tami. Budući da CUPRAC metoda mjeri ukupni redukcijski kapacitet, promjene ne ovise isključivo o koncentraciji pojedinačnih polifenolnih skupina, već o njihovom redoks potencijalu i nastanku sekundarnih spojeva s redukcijskim kapacitetom tijekom skladištenja (Apak i sur., 2006; Apak i sur., 2004). Tako da tijekom skladištenja degradacija antocijana u fenolne kiseline može privremeno održavati redukcijski kapacitet u SET uvjetima, nakon čega dugotrajnije oksidacijsko-polimerizacijske reakcije i fotooksidacija vode postupnom smanjenju antioksidacijske aktivnosti što objašnjava razlike između skladištenja na svjetlu i u tami (Manzocco i sur., 2000; Oancea i sur., 2021). Svjetlost potiče bržu oksidaciju i transformaciju

polifenola u pigmentne strukture smanjene redoks sposobnosti, čime se postepeno smanjuje ukupna antioksidacijska aktivnost, dok skladištenje u tami usporava degradacijske procese (Lu i Zhao, 2017). Stabilnost antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom tijekom skladištenja kompleksa određuju tri čimbenika: vrsta proteinskog matriksa, tip ambalaže (tamno > prozirno staklo) i duljina skladištenja (kumulativni oksidacijski učinci). Najbolju zaštitu pružaju proteini badema u kombinaciji s tamnim staklom, dok RP/V u prozirnoj ambalaži pokazuje najveće smanjenje antioksidacijske aktivnosti.

Rezultati CUPRAC metode pokazali su jasan temperaturno ovisan obrazac u svim kompleksima. Pri 80 °C vrijednosti su ostale relativno stabilne, što je u skladu s opažanjima da umjereno zagrijavanje može privremeno održati ili čak blago pojačati reduksijski kapacitet nastankom reducensa u ranoj fazi termičkog tretiranja (Xu i sur., 2007; Manzocco i sur., 2000). Međutim, već pri 90 °C uočava se značajno smanjenje antioksidacijske aktivnosti u svim kompleksima, što je dosljedno oksidaciji fenolnih -OH skupina u kinone i njihovoj naknadnoj polimerizaciji u visokomolekularne spojeve (Manzocco i sur., 2000; Liang i sur., 2024; Seeram i sur., 2001). Pri 100 i 110 °C antioksidacijska aktivnost se dodatno smanjuje, što upućuje na nepovratne reakcije degradacije u svim kompleksima (Oancea i sur., 2021). Razlike među kompleksima, kao i u drugim metodama, proizlaze iz vezanih polifenola. BP/V je u početku imao najvišu antioksidacijsku aktivnost određenu CUPRAC metodom zbog visokog udjela proantocijanidina (Liang i sur., 2024; Apak, 2018; Rice-Evans i sur., 1996). Ipak, upravo ta višestruka reaktivnost čini ih osjetljivima na termičku oksidaciju i polimerizaciju, pa BP/V, iako polazi s najvišim vrijednostima, pokazuje smanjenje tijekom termičkog tretiranja (Liang i sur., 2024; Manzocco i sur., 2000). GP/V, bogat antocijanima, pokazuje najizraženije smanjenje zbog termičke osjetljivosti antocijana jer njihovi produkti degradacije imaju slab SET odaziv (Oancea i sur., 2021; Seeram i sur., 2001; Sadowska-Bartosz i Bartosz, 2024). Kompleks RP/V, s dominacijom klorogenskih kiselina, pokazuje stabilnije, ali kontinuirano smanjenje antioksidacijske aktivnosti, jer prilikom zagrijavanja dolazi do izomerizacije i oksidativne degradacije, što mijenja polifenolni profil i smanjuje antioksidacijsku aktivnost mjerljivu u metodama poput FRAP i CUPRAC (Dawidowicz i Typek, 2017; Wianowska i Gil, 2019). CUPRAC metoda jasno razlikuje doprinos proantocijanidina, antocijana i hidroksicimetnih kiselina, što potvrđuje da na ovu metodu utječe gubitak funkcionalnih -OH skupina u SET mehanizmu pri povišenim temperaturama (Apak, 2018; Rice-Evans i sur., 1996; Oancea i sur., 2021).

Rezultati potvrđuju da stabilnost ukupnih polifenola (UP), proantocijanidina (PANT) i antioksidacijske aktivnosti u najvećoj mjeri ovisi o vrsti proteinskog matriksa i strukturi dominantnih polifenolnih skupina. U BP/V kompleksu proantocijanidini imaju važnu ulogu u početnom očuvanju antioksidacijske aktivnosti, budući da njihova struktura obiluje fenolnim -OH skupinama koje omogućuju višestruke reakcije u SET i HAT mehanizmima, što rezultira snažnim antioksidacijskim potencijalom na molarnoj osnovi. Literatura potvrđuje da oligomeri flavan-3-ola, poput dimera i trimera proantocijanidina, daju izražen odaziv u DPPH i CUPRAC metodama, koji se toplinskim tretiranjem smanjuje zbog redistribucije stupnja polimerizacije. U usporedbi s BP/V, RP/V i GP/V kompleksi pokazali su manju stabilnost UP, PANT i antioksidacijske aktivnosti zbog dominacije termički i fotoosjetljivijih skupina polifenola, poput antocijana i hidroksicimetnih kiselina, ali i slabije zaštite koju pružaju proteini riže i graška. Sveukupno, opaženi obrasci potvrđuju da ukupna stabilnost ne proizlazi iz jedne skupine polifenola, već iz sinergijskog djelovanja svih polifenolnih spojeva, njihovih degradacijskih produkata i interakcija s proteinskim matriksom, što zajedno određuje očuvanje funkcionalnih svojstava tijekom skladištenja i termičkog tretiranja.

5.3. Pojedinačni polifenoli tijekom skladištenja i termičkog tretiranja

Dok su rezultati ukupnih polifenola (UP) i proantocijanidina (PANT) dali opći uvid u smanjenje polifenolnih spojeva tijekom skladištenja i termičkog tretiranja, HPLC analiza omogućila je detaljno praćenje ponašanja pojedinih spojeva. Početni uzorci sadržavali su navedene skupine polifenola: antocijane (cijanidin-3-glukozil-rutinozid, C-3-G-R; cijanidin-3-rutinozid, C-3-R), flavonole (kvercetin-3-rutinozid, K-3-R; kvercetin, K) i fenolne kiseline (klorogenska kiselina, KK; neoklorogenska kiselina, NKK; *p*-kumarinska kiselina, *p*-KK; derivat *p*-kumarinske kiseline, d *p*-KK). Koncentracije pojedinačnih polifenola su se razlikovale među kompleksima, što upućuje na selektivnost proteinskih matriksa u vezanju različitih spojeva. Najviše početne koncentracije antocijana i kvercetina određene su u GP/V kompleksu, kvercetin-3-rutinozid u BP/V, dok su fenolne kiseline dominirale u RP/V kompleksu. Ovakav raspored ukazuje da matriks proteina riže pokazuje najveći afinitet prema fenolnim kiselinama, proteini graška prema antocijanima i flavonolima, dok proteini badema uravnoteženo vežu različite skupine polifenola, što se kasnije odrazilo i na njihovu stabilnost.

Razlike u početnim vrijednostima proizlaze iz strukturnih značajki proteina, odnosno funkcionalnih skupina uključenih u interakcije s polifenolima. Proteini badema sadrže aromatske aminokiseline (tirozin, fenilalanin, triptofan) koje omogućuju stabilne π - π i

hidrofobne interakcije s aromatskim prstenovima flavonola i antocijana, što objašnjava početnu zastupljenost ovih spojeva u BP/V kompleksu (Barreca i sur., 2020; Li i sur., 2016). U proteinima riže dominiraju glutelini i albumini bogati polarnim aminokiselinama i disulfidnim vezama, što pogoduje stvaranju vodikovih veza s hidroksilnim skupinama fenolnih kiselina, zbog čega RP/V ima najveće vrijednosti fenolnih kiselina (Amagliani i sur., 2017; Kawakatsu i Takaiwa, 2019). Proteini graška, u kojima prevladavaju globulini legumin i vicilin, sadrže prolinske i hidroksiprolinske ostatke čije hidrofobne površine pogoduju stabilnim interakcijama s antocijanima, što potvrđuje njihovu najveću početnu zastupljenost u GP/V (Lu i sur., 2020; Strauch i Lila, 2021). Može se zaključiti da selektivnost vezanja polifenola za proteinski matriks proizlazi iz komplementarnosti kemijske strukture polifenola i dostupnih funkcionalnih skupina proteinskog matriksa.

Degradacija polifenola tijekom skladištenja na svjetlu rezultat je složenih fotolitičkih i fotooksidacijskih reakcija, pri čemu fotoni svjetlosti iniciraju promjene u strukturi polifenolnih spojeva. Degradacija polifenola odvija se reakcijama fotooksidacije tipa I i fotooksidacije tipa II. U reakciji fotooksidacije tipa I dolazi do prijenosa elektrona ili vodika na kisik ili druge akceptore uz stvaranje slobodnih radikala ($O_2^{\cdot-}$); *o*-difenolne strukture oksidiraju u semikinone i *o*-kinone koji dalje polimeriziraju i formiraju tamne polimerne pigmente (Lu i Zhao, 2017; Ali i sur., 2018). Kod reakcije fotooksidacije tipa II energija se iz pobuđenog stanja prenosi na kisik uz stvaranje singletnog kisika (1O_2), izrazito reaktivnog oblika koji napada elektrondonorske segmente fenolne jezgre i potiče daljnje oksidacijske i degradacijske reakcije (Lu i Zhao, 2017). Navedene reakcije oksidacije, izomerizacije i polimerizacije dovode do formiranja sekundarnih produkata poput kinona, halkona i smeđih polimernih pigmenata. Fotodegradacija ovisi o valnoj duljini i o strukturi polifenola. Najosjetljivije su *o*-difenolne/trifenolne jezgre (npr. kvercetin, klorogenske kiseline), kod kojih broj i raspored -OH skupina povećava sklonost oksidaciji, dok metoksilacija supstitucijom -OH skupina metoksi (-OCH₃) grupama smanjuje reaktivnost i povećava fotooksidacijsku stabilnost. Kod antocijana, glikozidi su stabilniji od aglikona, a aciliranje (osobito aromatskim kiselinama) dodatno povećava stabilnost. Kod flavonola je potvrđeno da glikozidni oblici kvercetina, poput kvercetin-3-rutinozid, pokazuju veću fotostabilnost od slobodnog aglikona. Pri izlaganju svjetlu, flavonoli prolaze oksidaciju u kinonske derivate, no zbog stabilnije C6-C3-C6 strukture i odsutnosti reaktivnog flavilijevog kationa, njihova razgradnja odvija se sporije (Lu i Zhao, 2017). Klorogenske kiseline pod svjetlom i povišenom temperaturom prolaze izomerizaciju i degradaciju (Cozmuta i sur., 2024; Lu i Zhao, 2017; Enaru i sur., 2021; Xue i sur., 2024; Salazar-Orbea i sur., 2023; Xue i sur., 2016; Rice-Evans i sur., 1996; Bakowska i sur., 2003).

Zaključno, fotodegradacija ovisi o interakciji svjetlosne energije i molekularne strukture, najosjetljiviji su antocijani i *o*-difenolne kiseline, dok glikozilacija i acilacija povećavaju stabilnost.

U tami dominiraju sporije reakcije poput autooksidacije (Lu i Zhao, 2017; Ravber i sur., 2016) koja predstavlja važan mehanizam nestabilnosti polifenola. U prisutnosti kisika polifenoli spontano oksidiraju, pri čemu nastaju peroksidi, hidroperoksidi i slobodni radikali. Reakcija je potaknuta prisutnošću više fenolnih -OH skupina te konjugiranim dvostrukim vezama koje omogućuju elektronsku delokalizaciju. Veći broj -OH skupina povećava reaktivnost i smanjuje stabilnost polifenola. Posljedica autooksidacije je smanjenje koncentracije polifenola te njihova polimerizacija ili degradacija, uz gubitak bioaktivnosti (Rice-Evans i sur., 1996; Deng i sur., 2018).

U kompleksima biljnih proteina badema, riže i graška s polifenolima soka višnje (BP/V, RP/V, GP/V) termičko tretiranje tijekom 60 min pokreće niz kemijskih reakcija koje obuhvaćaju oksidaciju, degradaciju, izomerizaciju i polimerizaciju polifenola. Ove reakcije dovode do smanjenja koncentracije pojedinih polifenola, nastajanja smeđih polimernih pigmenata te promjenama u antioksidacijskoj aktivnosti (Ifie i Marshall, 2018; Yilmaz i sur., 2022; Oancea i sur., 2021; Zhang i Liu, 2022). Pri umjerenim temperaturama (80 - 90 °C) može doći do transformacija antocijana i drugih polifenola u manje, redoks-aktivne derivate, što se očituje kratkotrajnim povećanjem ukupne reducirajuće moći. Pri višim temperaturama (≥ 100 - 110 °C) dominiraju degradacijske reakcije koje dovode do postupnog smanjenja stabilnosti i koncentracije polifenola. (Chaaban, 2017; Oancea i sur., 2018; Oancea i sur., 2017; Sadilova i sur., 2007; Ioannou i sur., 2020; Wianowska i Gil, 2019; Nayak i sur., 2015; Xu i sur., 2007; Maghsoudlou i sur., 2019). Tijekom termičkog tretiranja antocijani (posebno cijanidinski glikozidi poput C-3-R i C-3-G-R) prolaze kroz niz reakcija koje u konačnici smanjuju njihovu koncentraciju i antioksidacijsku aktivnost. U istraživanju na soku višnje je dokazano da povećanje temperature značajno ubrzava degradaciju C-3-R i C-3-G-R, uz smanjenje intenziteta crvene boje i antioksidacijske aktivnosti (Szalóki-Dorkó i sur., 2015). Također u istraživanjima na voćnim matriksima potvrđeno je da degradacija antocijana tijekom zagrijavanja u pravilu slijedi kinetiku prvog reda, s bržim gubicima pri višim temperaturama (Loypimai i sur., 2016; Szalóki-Dorkó i sur., 2015; Kara i Erçelebi, 2013).

Stabilnost antocijana uvelike ovisi o uvjetima u kojima se nalaze, pri čemu prisutnost vode određuje dominantne mehanizme njihove degradacije. U vodenim sustavima flavilijev kation, kao osnovni oblik antocijana odgovoran za boju i antioksidacijsku aktivnost, podložan je nizu reakcija koje gotovo uvijek slijede kinetiku prvog reda (Seeram i sur., 2001; Ochoa i

sur., 2001; Stănciuc i Râpeanu, 2019; Bakowska i sur., 2003). Prvi korak u degradaciji često uključuje hidrolizu glikozidnih veza, čime se otpuštaju šećerni ostatci (npr. glukoza, ramnoza, galaktoza), a nastali aglikoni (antocijanidini) pokazuju znatno nižu stabilnost od svojih glikozidnih oblika. Ključna reakcija je hidratacija flavilijevog kationa, pri čemu nastaju bezbojne karbinol-pseudobaze, koje izomeriziraju u halkone, odnosno oblike otvorenog prstena flavonoidnog kostura (Loypimai i sur., 2016; Kopjar i sur., 2009; Bakowska i sur., 2003; Sadilova i sur., 2007). Halkoni su vrlo nestabilni i brzo ulaze u oksidativne reakcije, što rezultira daljnjim smanjenjem antioksidacijske aktivnosti. Osim toga, oksidacija orto-difenolnih struktura dovodi do stvaranja semikinona i *o*-kinona, koji se dalje kondenziraju u visokomolekularne pigmente smeđe boje (Lu i Zhao, 2017). Konačni produkti degradacije u vodenim sustavima uključuju fenolne kiseline (protokatehinska i vanilinska kiselina), koje doprinose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti, ali u znatno manjoj mjeri od izvornih antocijana (Seeram i sur., 2001; Ochoa i sur., 2001; Ifie i Marshall, 2018; Bakowska i sur., 2003; Sadilova i sur., 2007).

U suhim liofiliziranim prahovima kompleksa proteina i polifenola mehanizmi degradacije značajno se razlikuju jer je prisutnost slobodne vode minimalna, pa je reakcija hidratacije flavilijevog kationa izrazito ograničena. Umjesto toga, dominantne su reakcije oksidacije i polimerizacije. Polifenolne -OH skupine oksidiraju u kinonske oblike, koji se dalje polimeriziraju u visokomolekularne polimere smeđe boje s niskom antioksidacijskom aktivnošću (Zhang i sur., 2021; Xue i sur., 2024a). Pri povišenim temperaturama dolazi do deglikozilacije, pri čemu oslobođeni aglikoni vrlo brzo oksidiraju i ulaze u reakcije polimerizacije (Loypimai i sur., 2016; Bakowska i sur., 2003; Seeram i sur., 2001). Posebno je važan i mehanizam kovalentnog vezanja oksidiranih oblika antocijana na proteinski matriks, gdje kinoni tvore stabilne kovalentne veze s aminokiselinskim ostacima poput lizina, tirozina ili cisteina, čime se trajno smanjuje broj slobodnih fenolnih -OH skupina dostupnih za antioksidacijsko djelovanje (Zhang i sur., 2021; Ozdal i sur., 2013; Yilmaz i sur., 2022, Feng i sur., 2023, Xue i sur., 2024a; Bayati i Poojary, 2025).

Za razliku od antocijana, flavonoli pokazuju veću otpornost na degradaciju te prolaze prvenstveno deglikozilaciju i oksidativnu degradaciju, pri čemu nastaje aglikon s djelomično očuvanim redoks kapacitetom. Daljnjom oksidacijom aglikona formiraju se kinonski spojevi koji mogu polimerizirati ili se kovalentno vezati za aminokiselinske ostatke u proteinskom matriksu, čime nastaju stabilni protein-polifenolni adukti (Rohn i sur., 2007; Bayati i Poojary, 2025).

U fenolnim kiselinama dominiraju izomerizacijske i oksidacijske reakcije koje pri 80 - 100 °C mogu privremeno povećati koncentraciju zbog reorganizacije izomera i djelomične degradacije složenijih kofeoilkininskih kiselina, dok pri 110 °C prevladavaju oksidativna degradacija i kondenzacija. Privremeno povećanje koncentracije *p*-kumarinske kiseline objašnjava se cijepanjem klorogenske i neoklorogenske kiseline do kofeinske, koja se potom oksidacijom, dekarboksilacijom i dehidroksilacijom transformira u *p*-kumarinsku kiselinu (Dawidowicz i Typek, 2017; Alcázar Magaña i sur., 2021; Xue i sur., 2016; Ifie i Marshall, 2018; Manzocco i sur., 2000). Također oksidirani derivati hidroksicimetnih kiselina mogu reagirati s aminokiselinskim skupinama proteina, pridonoseći stvaranju tamnih pigmentiranih struktura (Rawel i Rohn, 2010)

Cijanidin-3-glukozil-rutinozid

Tijekom skladištenja kompleksa uočena je postupna degradacija cijanidin-3-glukozil-rutinozida u svim proteinskim matriksima, ali s različitim intenzitetom. Najveću stabilnost utvrđena je u BP/V kompleksu, u kojem su gubici bili umjereniji i sporiji, osobito u tami. Nasuprot tome, u RP/V i GP/V kompleksima degradacija je bila izraženija, pri čemu je izloženost svjetlu dodatno ubrzala smanjenje koncentracije ovog antocijana. Razlike između RP/V i GP/V kompleksa bile su male, ali su oba pokazala veće gubitke od BP/V, što potvrđuje selektivnu zaštitnu ulogu proteina badema u odnosu na proteine riže i graška te jasno potvrđuje negativan učinak svjetlosti tijekom skladištenja, što dodatno podupiru i kinetički parametri izračunati za RP/V i GP/V. Konstante brzine degradacije bile su veće na svjetlu nego u tami, što je u skladu s fotooksidacijskim mehanizmima degradacije antocijana. Vrijeme poluraspada kod RP/V kompleksa iznosilo je oko 10 mjeseci na svjetlu i 11 u tami, dok je za GP/V bilo također oko 10 mjeseci na svjetlu i 12 u tami. Izloženost svjetlu pokreće reakcije fotooksidacijske tipa I i tipa II. Kod reakcija tipa I dolazi do prijenosa elektrona ili protona s pobuđenog flavilijevog kationa ili drugih reaktivnih molekula na kisik ili druge akceptore, pri čemu nastaju slobodni radikali ($O_2^{\cdot -}$) koji iniciraju oksidaciju fenolnih -OH skupina i formiranje semikinona i potom kinona. U reakcijama tipa II energija se iz pobuđenog stanja prenosi na molekularni kisik, što rezultira stvaranjem singleton kisika ($^1O^2$), izrazito reaktivnog oblika kisika koji napada elektrondonorske segmente flavilijevog kostura. Oba mehanizma završavaju degradacijom antocijana i polimerizacijom u tamnije pigmente s nižim redoks potencijalom (Bakowska i sur., 2003; Xue i sur., 2024a; Lu i Zhao, 2017).

Povećanjem temperature degradacija cijanidin-3-glukozil-rutinozida u svim kompleksima slijedila je očekivani obrazac smanjenja koncentracije s povećanjem temperature.

Već pri 80 °C određeno je smanjenje koncentracije u svim kompleksima. Pri 90 °C degradacija se povećala te je u BP/V degradiralo više od polovice početne količine spoja, dok su gubici u RP/V i GP/V bili još veći. Pri 100 °C sadržaj se u sva tri kompleksa smanjio na približno četvrtinu početne vrijednosti, a pri 110 °C preostalo je tek oko 15 % ovog antocijana. Ovakav obrazac tipičan je za antocijane: veći gubici već pri 90 °C i gotovo potpuna degradacija pri 110 °C, što je u skladu s radovima o termičkoj degradaciji antocijana (Sadilova i sur., 2007; Sadilova i sur., 2006; West i Mauer, 2013; Enaru i sur., 2021). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju izrazitu termičku osjetljivost cijanidin-3-glukozil-rutinozida, ali i razlike među kompleksima, pri čemu proteini badema pokazuju učinkovitiju zaštitu na termičku degradaciju u usporedbi s proteinima riže i graška, što je potvrđeno i kinetičkim parametrima. Kinetički parametri su potvrdili da je degradacija slijedila kinetiku prvog reda, pri čemu su konstante brzine degradacije rasle s temperaturom, a vremena poluraspada se drastično skraćivala od nekoliko sati pri 80 °C do manje od pola sata pri 110 °C. Energija aktivacije (E_a) bila je najviša u BP/V kompleksu, nešto niža u RP/V, a najniža u GP/V. To pokazuje da je u kompleksu BP/V za pokretanje degradacije potrebna veća energija, što znači da protein ovdje pruža bolju zaštitu. Ovakva razlika povezuje se s većim udjelom aromatskih aminokiselina i mogućnošću π - π interakcija te hidrofobnih veza između polifenola i proteina, dok vlakna u proteinima badema mogu dodatno djelovati kao difuzijska barijera za kisik i svjetlost (Zhang i sur., 2021; Yilmaz i sur., 2022). Oancea i suradnici (2017) određivali su kinetiku degradacije polifenola u tekućem ekstraktu višnje pri 100 - 160 °C te izračunali energiju aktivacije za ukupne antocijane od $54,19 \pm 5,88$ kJ/mol. Nasuprot tome, Zorić i suradnici (2014) proveli su zagrijavanje liofilizirane paste višnje Marasca pri 80 - 120 °C i utvrdili da su vrijednosti energije aktivacije za pojedine antocijane iznosile 42 ± 2 kJ/mol za cijanidin-3-glukozil-rutinozid, 55 ± 2 kJ/mol za cijanidin-3-glukozid i 51 ± 2 kJ/mol za cijanidin-3-rutinozid. Iako su i termička degradacija i degradacija tijekom skladištenja slijedile kinetiku prvog reda, razlike su značajne: toplina uzrokuje gotovo potpunu degradaciju u svega nekoliko sati, dok se tijekom skladištenja gubici akumuliraju kroz mjesec, pri čemu svjetlo djeluje kao ubrzavajući čimbenik, a rezultat je kod oboje smanjenja koncentracije cijanidin-3-glukozil-rutinozida.

Put razgradnje cijanidin-3-glukozil-rutinozida uključuje deglikozilaciju kod koje dolazi do oslobađanja cijanidina (aglikona) i oksidaciju fenolnih -OH skupina u semikinone i kinone, te polimerizaciju u tamnije pigmente. Također može doći do kovalentnog vezanja kinona na proteinski matriks, što trajno smanjuje broj slobodnih fenolnih -OH skupina i ubrzava gubitak crvene boje (Ozidal i sur., 2019; Feng i sur., 2023; Zhang i sur., 2024; Xue i sur., 2024a). Degradacija antocijana do fenolnih kiselina vezana je više za sustave u kojima je prisutna voda,

poput soka višnje, u kojem su eksperimentalno potvrđene protokatehinska, 2,4-dihidroksibenzojeva i 2,4,6-trihidroksibenzojeva kiselina. Pri pH 3 i termičkom tretiranju uočen je i prelazak cijanidin-3-glukozil-rutinozida u cijanidin-3-glukozil te potom u cijanidin, što potvrđuje mehanizam deglikozilacije (Seeram i sur., 2001). Stabilnost različitih glikozida ovisi o vrsti i broju šećera te eventualnoj acilaciji, pri čemu složeniji šećerni ostaci poput glukozil-rutinozida mogu povećati termičku stabilnost spoja (Sadilova i sur., 2006; Mercali i sur., 2013; Oancea i sur., 2021). Cijanidin-3-glukozil-rutinozid može podlijegati cijepanju glukoznog ostatka, pri čemu nastaje cijanidin-3-rutinozid, što ga čini potencijalnim produktom djelomične deglikozilacije i međukorakom prije daljnje razgradnje u cijanidin (Adams, 1973; Seeram i sur., 2001). Ukupni rezultati su pokazali da je cijanidin-3-glukozil-rutinozid izrazito osjetljiv na termičko tretiranje i svjetlo, a reakcije degradacije prate kinetiku prvog reda.

Cijanidin-3-rutinozid

Tijekom skladištenja uočena je postupna degradacija cijanidin-3-rutinozida svim kompleksima, ali s različitim intenzitetom. Najveću stabilnost imao je u BP/V kompleks, dok je u RP/V i osobito GP/V došlo do izraženijeg smanjenja koncentracije. Degradacija se odvijala postupno, s manjim promjenama u početnom razdoblju i izraženijim gubicima u kasnijim fazama skladištenja, osobito nakon 9 mjeseci skladištenja. U svim kompleksima izloženost svjetlu dodatno je ubrzala degradaciju, dok su uzorci skladišteni u tami pokazali sporije promjene. Za cijanidin-3-rutinozid kinetički parametri su izračunati za komplekse RP/V i GP/V, te su oni potvrdili da je brzina degradacije veća na svjetlu nego u tami, što upućuje na fotooksidacijsku nestabilnost ovog antocijana. Rezultati potvrđuju selektivnu zaštitnu ulogu proteinskog matriksa, pri čemu su proteini badema pokazali najučinkovitiju zaštitu, dok su proteini riže i graška imali slabiju sposobnost očuvanja stabilnosti cijanidin-3-rutinozida.

Povećanjem temperature degradacija cijanidin-3-rutinozida u svim kompleksima imala je jasan temperaturno ovisan obrazac. Već na nižim temperaturama određeno je smanjenje koncentracije, a daljnjim povećanjem temperature gubici su postajali sve izraženiji. U svim kompleksima pri najvišim temperaturama preostale su samo male koncentracije spoja, što potvrđuje izrazitu termičku nestabilnost cijanidin-3-rutinozida. Unatoč tome, razlike među proteinskim matriksima bile su vidljive - BP/V je pokazao veću otpornost, dok su RP/V i osobito GP/V bili skloniji ubrzanoj degradaciji. Ovakvi rezultati potvrđuju da tip proteinskog nosača značajno utječe na termičku stabilnost antocijana, ali i da temperatura iznad 100 °C predstavljaju granicu nakon koje dolazi do ubrzane degradacije i gubitka stabilnosti antocijana. Ovakav profil, obilježen naglim smanjenjem pri povišenim temperaturama i gotovo potpunim

gubicima pri 110 °C, tipičan je za antocijane te je u skladu s podacima iz literature (Sadilova i sur., 2007; Sadilova i sur., 2006; West i Mauer, 2013; Enaru i sur., 2021) kao što je već i navedeno za cijanidin-3-glukozil-rutinozid. Svi kompleksi pratili su kinetiku prvog reda, pri čemu je povećanje temperature uzrokovalo porast konstante brzine reakcije i skraćenje poluvjeka s nekoliko sati pri 80 °C na svega pola sata pri 110 °C. Energija aktivacije bila je najviša u BP/V (82,37 kJ/mol), niža u RP/V (74,54 kJ/mol) i najniža u GP/V (63,13 kJ/mol). Kinetika potvrđuje da je za degradaciju spoja u matriksu proteina badema potrebna veća energija, što ukazuje na jači zaštitni učinak ovog proteina. Vrijednosti energije aktivacije bile su više nego u literaturi za antocijane, što jednako kao i kod C-3-G-R što potvrđuje ulogu proteina u usporavanju termičke degradacije.

Put razgradnje cijanidin-3-rutinozida uvelike je sličan cijanidin-3-glukozil-rutinozidu, pri čemu oksidacija fenolnih -OH skupina dovodi do stvaranja semikinona i kinona, koji se dalje polimeriziraju i kondenziraju u visokomolekularne pigmente smeđe boje. To je eksperimentalno potvrđeno upravo u višnji te objašnjava gubitak crvene boje i smanjenje antioksidacijske aktivnosti tijekom termičkog tretiranja (Seeram i sur., 2001; Mercali i sur., 2013). Iako prisutnost složenijeg šećernog ostatka poput rutinozida može donekle povećati stabilnost u odnosu na jednostavnije glikozide, presudni čimbenici ostaju svjetlost i temperatura (Mercali i sur., 2013; Sadilova i sur., 2006; Sadilova i sur., 2007; Oancea i sur., 2021). Tijekom skladištenja dominira fotooksidacija, koja u suhim kompleksima prvenstveno dovodi do oksidacije u semikinonske oblike i njihove polimerizacije i kondenzacije u tamne pigmente s reduciranim redoks potencijalom (Lu i Zhao, 2017; Xue i sur., 2024a). U prisutnosti kisika mogu se odvijati i autooksidacijske reakcije, pri čemu doniranje atoma vodika iz -OH skupina stvara perokside i slobodne radikale koji ubrzavaju oksidativnu polimerizaciju i degradaciju polifenola (Rice-Evans i sur., 1996; Wang i sur., 2008). Usporedbom s proteinima riže i graška, uočeno je da proteini badema pružaju bolju zaštitu od degradacije zbog π - π interakcija i hidrofobnih veza između aromatskih aminokiselina i polifenola, što potvrđuju viša energija aktivacije i sporiji gubici. Ipak, cijanidin-3-rutinozid pokazuje izrazitu osjetljivost na toplinu i svjetlo: pri 110 °C gotovo potpuno degradira, dok su tijekom 9 mjeseci skladištenja gubici veći na svjetlu nego u tami, potvrđujući da oksidacija i autooksidacija predstavljaju ključne mehanizme degradacije u suhim proteinsko-polifenolnim kompleksima.

Kvercetin-3-rutinozid

Tijekom skladištenja kvercetin-3-rutinozid pokazao je znatno veću stabilnost u odnosu na antocijane, iako su se razlike među proteinskim matriksima te utjecaj svjetla jasno očitovali.

U svim kompleksima skladištenim u tami očuvao se je ovaj fenolni spoj, dok je izloženost svjetlu ubrzala degradaciju. Najveću otpornost degradaciji u tami pokazao je GP/V kompleks, u kojem je kvercetin-3-rutinozid ostao gotovo potpuno očuvan, ali je upravo u ovom kompleksu svjetlo imalo najizraženiji negativan učinak. BP/V i RP/V kompleksi pokazali su umjerenije gubitke, pri čemu je degradacija bila izraženija na svjetlu nego u tami. U sva tri kompleksa degradacija na svjetlu slijedila je kinetiku prvog reda, što potvrđuje visoki R^2 ($>0,95$). Najveću stabilnost pokazao je BP/V s vremenom poluraspada od gotovo 28 mjeseci. U RP/V kompleksu degradacija je bila nešto brža (≈ 25 mjeseci), dok je u GP/V vrijeme poluraspada bilo najkraće, oko 19 mjeseci. Rezultati potvrđuju da je svjetlo glavni čimbenik degradacije kvercetin-3-rutinozid, dok različiti proteini moduliraju stupanj zaštite. U ovom istraživanju, na svjetlu, najveću stabilnost odnosno najmanju degradaciju spoja imali su kompleksi s proteinima riže, a najmanju s proteinima graška. Razlike proizlaze iz različitih udjela aromatskih aminokiselina i strukturnih karakteristika proteina, koje određuju jačinu i vrstu nekovalentnih interakcija s kvercetin-3-rutinozid (Zhang i sur., 2021; Yilmaz i sur., 2022).

Tijekom termičkog tretiranja kod kvercetin-3-rutinozid je uočeno drukčije ponašanje nego kod antocijana. U RP/V i GP/V kompleksu pri nižim temperaturama tretiranja (80 - 90 °C) određeno je povećanje koncentracije spoja. U BP/V kompleksu koncentracija se smanjivala već pri 80 °C, što upućuje na slabiji stabilizacijski učinak proteina badema u odnosu na proteine riže i graška. Daljnjim povećanjem temperature koncentracija kvercetin-3-rutinozida se smanjivala. Ovi rezultati ukazuju da je povećanje koncentracije pri nižim temperaturama posljedica temperaturno induciranih transformacija unutar kompleksa, dok pri višim temperaturama prevladava degradacija spoja zbog oksidacijskih i polimerizacijskih reakcija. Slični mehanizmi opisani su u literaturi, gdje je utvrđeno da toplina destabilizira vodikove i hidrofobne interakcije u protein-polifenolnim kompleksima, uzrokujući djelomične konformacijske promjene i smanjenu stabilnost kompleksa, dok istodobno potiče reakcije oksidacije i polimerizacije samih polifenola (Feng i sur., 2023; Zhang i sur., 2021; Ozdal i sur., 2013; Yilmaz i sur., 2022; Sun i sur., 2022; Zhang i sur., 2022a). U BP/V kompleksu degradacija je slijedila kinetiku prvog reda: vrijeme poluraspada postupno se smanjivalo od gotovo 13 h pri 80 °C do manje od 2 h pri 110 °C, a konstanta brzine degradacije se povećavala.

Termička razgradnja kvercetin-3-rutinozid uključuje cijepanje C-O glikozidne veze uz mogući nastanak kvercetina kao aglikona, nakon čega slijedi oksidacija u kinonske derivate i fragmentacije B-prstena uz formiranje smeđih polimera i kovalentnih adukata (Ravber i sur., 2016; Wang i Zhao, 2016; Bayati i Poojary, 2025). Tijekom skladištenja, na svjetlu dominira fotooksidacija, pri čemu se stvaraju singletni kisik i slobodni radikali koji oksidiraju kvercetin-

3-rutinozid ili njegov aglikon kvercetin, što dovodi do stvaranja kinonskih produkata i njihovog polimeriziranja u tamne pigmente. U tami su promjene sporije i vođene autooksidacijom, pri kojoj donacija vodika iz -OH skupina rezultira stvaranjem peroksida i lančanom oksidacijom (Lu i Zhao, 2017; Ravber i sur., 2016; Rice-Evans i sur., 1996). Zaključno, iako kvercetin-3-rutinozid pokazuje veću stabilnost od antocijana, i dalje je osjetljiv na produženo izlaganje toplini i svjetlu, a vrsta proteinskog matriksa utječe na stabilnost i degradaciju kvercetin-3-rutinozid u kompleksima.

Kvercetin

Tijekom devetomjesečnog skladištenja kvercetin je degradirao u svim kompleksima, pri čemu je svjetlost bila glavni čimbenik degradacije. U uzorcima skladištenim u tami očuvanje koncentracije je bilo znatno bolje, a promjene su bile sporije i manje izražene, dok je na svjetlu degradacija bila izraženija. Kvercetin je imao različit stupanj stabilnosti ovisno o proteinskom matriksu. Najmanje promjene određene su u RP/V kompleksu, osobito u tami. Na svjetlu degradacija je u kompleksima BP/V i GP/V pratila kinetiku prvog reda. U BP/V vrijeme poluraspada iznosilo je 24 mjeseca, dok je u GP/V degradacija bila sporija (≈ 33 mjeseci). U RP/V nije bilo moguće izračunati kinetiku jer promjene nisu bile kontinuirane. Sveukupno, rezultati jasno upućuju da proteini različito štite kvercetin, pri čemu su proteini riže omogućili nešto bolju zaštitu u odnosu na proteine badema i graška, dok je svjetlo bilo presudan čimbenik ubrzane degradacije. Na svjetlu kvercetin prolazi kroz fotooksidacijske reakcije, pri čemu reaktivni oblici kisika uzrokuju fragmentaciju B-prstena, što dovodi do stvaranja kinonskih derivata i tamnih polimernih pigmenata (ElGamal i sur., 2023; Wang i Zhao, 2016). U tami se odvijaju sporije reakcije autooksidacije, tijekom kojih nastali kinonski međuprodukti mogu reagirati s funkcionalnim skupinama aminokiselina unutar već formiranog kompleksa, tvoreći stabilne polifenolno-proteinske adukte. Takve reakcije ojačavaju postojeće veze i doprinose većoj stabilnosti kompleksa, čime se smanjuje daljnja oksidativna degradacija kvercetina (Schulze i sur., 2014; Enaru i sur., 2021; Buchner, 2006; Yilmaz i sur., 2022; Zhang i sur., 2021; Feng i sur., 2023; Bayati i Poojary, 2025).

Tijekom termičkog tretiranja, kvercetin je pokazao različit obrazac u odnosu na antocijane i kvercetin-3-rutinozid. U BP/V kompleksu termičko tretiranje nije dovelo do smanjenja, nego do povećanja njegove koncentracije. Termičkim tretiranjem dolazi i do degradacije kvercetin-3-rutinozid, cijepanja C-O glikozidne veze uz nastanak kvercetina kao njegova aglikona (Feng i sur., 2023; Zhang i sur., 2021; Ozdal i sur., 2013; Yilmaz i sur., 2022; Sun i sur., 2022; Zhang i sur., 2022a; Rohn i sur., 2007). U RP/V kompleksu uočeno je

smanjenje koncentracije kvercetina već pri nižim temperaturama, što ukazuje na slabiju stabilizacijsku ulogu proteina riže u odnosu na proteine badema i graška, te da pri nižim temperaturama tretiranja dolazi do reakcija oksidacije i degradacije. U GP/V kompleksu koncentracija kvercetina bila je niža u odnosu na početne vrijednosti pri svim temperaturama termičkog tretiranja, uz manje varijacije kroz cijeli temperaturni raspon.

Kvercetin se pokazao stabilnijim od antocijana, ali osjetljivijim od kvercetin-3-rutinozid, što potvrđuje veću stabilnost glikozidnih oblika spojeva. Razlike u stabilnosti među kompleksima upućuju na složenu ovisnost o vrsti proteina i uvjetima okoliša, pri čemu udio aromatskih aminokiselina i vrsta nekovalentnih interakcija u proteinskom matriksu određuju stupanj zaštite polifenola (Zhang i sur., 2021; Yilmaz i sur., 2022).

Klorogenska kiselina

Tijekom skladištenja klorogenska kiselina pokazala je iznimno visoku stabilnost u svim kompleksima, uz bolju stabilnost kod uzoraka skladištenih u tami. U svim proteinskim matriksima degradacija klorogenske kiseline bila je najveća nakon 9 mjeseci skladištenja na svjetlu. Takav obrazac potvrđuje da je ovaj spoj strukturno stabilniji od većine ostalih polifenolnih komponenti. U tami su svi kompleksi zadržali visoke koncentracije klorogenske kiseline, dok je svjetlo imalo minimalan učinak na njezinu degradaciju. Proteini riže pokazali su najjači zaštitni učinak, pri čemu je klorogenska kiselina bila gotovo potpuno očuvana. Tijekom skladištenja odsustvo izraženih promjena koncentracija pojedinih izomera pokazuje da izomerizacija nije bila dominantana, nego da se reakcije fotooksidacije odvijaju vrlo sporo zbog zaštitnog učinka proteinskog matriksa i stabilne kemijske strukture (Xue i sur., 2016; Lu i Zhao, 2017; Dawidowicz i Typek, 2017). Klorogenska kiselina ima stabilnu estersku strukturu s delokaliziranom konjugacijom i intramolekularnim vodikovim vezama, što značajno smanjuje oksidacijsku reaktivnost. Esterifikacijom kofeinske i kininske kiseline nastaju intramolekularne vodikove veze između karboksilnih i fenolnih skupina, koje dodatno stabiliziraju molekulu i ograničavaju dostupnost fenolnih -OH skupina za oksidaciju. Time se smanjuje vjerojatnost autooksidacije i formiranja reaktivnih kinonskih derivata (Dawidowicz i Typek, 2017; Xue i sur., 2016; Apak i sur., 2008). U kompleksima njihovu stabilnost dodatno povećava vezanje za proteinski matriks. Klorogenska i neoklorogenska kiselina mogu ostvariti vodikove i hidrofobne interakcije s aromatskim aminokiselinama poput tirozina i fenilalanina, čime se smanjuje dostupnost fenolnih skupina za oksidaciju i usporava nastanak reaktivnih radikala (Zhang i sur., 2021; Ozdal i sur., 2013; Yilmaz i sur., 2022).

Tijekom termičkog tretiranja klorogenska kiselina pokazala je visoku termičku stabilnost, znatno veću u usporedbi s antocijanima i flavonolima. U svim kompleksima određeno je povećanje koncentracije na nižim temperaturama tretiranja, a povećanjem temperature pri 110 °C dolazi do značajne degradacije, što ukazuje na oksidacijske reakcije. Toplina može potaknuti izomerizaciju između kafeoilkininskih kiselina, pri čemu se dio neoklorogenske i kriptoklorogenske kiseline preraspodjelom pretvara u klorogensku, što može privremeno povećati njezinu koncentraciju (Dawidowicz i Typek, 2017; Xue i sur., 2016). Ponašanje klorogenske kiseline tijekom zagrijavanja ovisi o ravnoteži između izomerizacije i degradacije. Kada prevlada degradacija, dolazi do cijepanja esterske veze i nastanka kofeinske i kininske kiseline, dok izomerizacija uključuje samo međusobnu pretvorbu klorogenske, neoklorogenske i kriptoklorogenske kiseline uz očuvanje osnovne strukture estera. Daljnjom oksidacijom kofeinske kiseline mogu nastati *p*-kumarinska i ferulinska kiselina, kao i reaktivni kinonski oblici koji sudjeluju u reakcijama posmeđivanja i polimerizacije (Alcázar Magaña i sur., 2021; Dawidowicz i Typek, 2017; Nguyen i sur., 2015; El Gamal i sur., 2023).

Rezultati pokazuju da su svi proteini pridonijeli stabilizaciji klorogenske kiseline, što je posebno izraženo tijekom skladištenja. Ova stabilizacija proizlazi iz hidrofobnih džepova i aromatskih aminokiselina u proteinskom matriksu, koji dodatno ograničavaju pristup kisiku i usporavaju reakcije oksidacije i polimerizacije (Zhang i sur., 2021; Yilmaz i sur., 2022).

Neoklorogenska kiselina

Tijekom skladištenja neoklorogenska kiselina pokazala je vrlo visoku stabilnost u svim kompleksima, pri čemu su razlike između uzoraka skladištenih na svjetlu i u tami bile minimalne. Najveću stabilnost imao je kompleks s proteinima badema, u kojem je koncentracija ostala gotovo nepromijenjena tijekom cijelog razdoblja skladištenja, što potvrđuje izražen zaštitni učinak ovog proteinskog matriksa. U kompleksima s proteinima riže i graška stabilnost je također bila visoka, uz značajne promjene pri kraju skladištenja na svjetlu, dok su uzorci skladišteni u tami zadržali gotovo cjelokupni sadržaj spoja. Ovakav obrazac pokazuje da neoklorogenska kiselina pripada među najstabilnije polifenolne komponente u kompleksima te da je utjecaj svjetla na njezinu degradaciju vrlo ograničen. Degradacija neoklorogenske kiseline bila je znatno manja od degradacije antocijana i flavonola, jer njezina struktura, raspored hidroksilnih skupina i intramolekularne vodikove veze ograničavaju reakcije oksidacije u odnosu na antocijane. Smanjenje koncentracije na svjetlu može se pripisati sporij fotooksidaciji u kasnijim fazama skladištenja, koje dovode do njene degradacije (Dawidowicz i Typek, 2017; Xue i sur., 2016; Lu i Zhao, 2017).

Tijekom termičkog tretiranja neoklorogenska kiselina pokazala je visoku otpornost na povišene temperature u svim kompleksima. Pri nižim temperaturama (80 °C) u kompleksima s proteinima riže i graška određeno je povećanje njezine koncentracije, dok je u kompleksu s proteinima badema koncentracija ostala statistički nepromijenjena u odnosu na netretirani uzorak. Ovakav obrazac može se povezati s izomerizacijskim reakcijama unutar skupine kafeoilkininskih kiselina, pri čemu dio klorogenske i kriptoklorogenske kiseline prelazi u neoklorogensku. Pri 110 °C prevladavaju reakcije oksidacije i degradacije, što se očituje smanjenjem koncentracije ovog spoja (Dawidowicz i Typek, 2017; Xue i sur., 2016; Alcázar i sur., 2021). Reakcije oksidacije dovode do nastanka kinonskih međuprodukata i daljnjih reakcija polimerizacije i posmeđivanja (Nguyen i sur., 2015; El Gamal i sur., 2023; Alcázar i sur., 2021). Rezultati potvrđuju da neoklorogenska kiselina pokazuje izrazitu stabilnost u proteinsko-polifenolnim kompleksima, pri čemu su dominantne reakcije izomerizacija pri nižim i oksidacija pri najvišim temperaturama tretiranja. Najizraženiji stabilizacijski učinak na neoklorogensku kiselinu pokazao je proteinski matriks riže, u kojem su koncentracije tijekom cijelog temperaturnog raspona ostale najviše, pri čemu glutelinska struktura proteina riže s izraženim hidrofobnim regijama i aromatskim aminokiselinama omogućuje najučinkovitiju zaštitu od oksidacijskih reakcija.

p-kumarinska kiselina

Tijekom skladištenja *p*-kumarinska kiselina pokazala je umjerenu stabilnost, uz izraženije gubitke u kasnijim fazama skladištenja. U BP/V i RP/V kompleksima koncentracije su tijekom prvih 6 mjeseci ostale relativno stabilne, dok je izraženije smanjenje određeno tek nakon 9 mjeseci skladištenja, osobito u uzorcima izloženima svjetlu. U GP/V kompleksu smanjenje koncentracije započelo je već nakon 6 mjeseci skladištenja, što ukazuje na osjetljivost *p*-kumarinske kiseline u ovom kompleksu i na ograničeniji zaštitni učinak proteina graška. Uzorci skladišteni u tami u svim kompleksima zadržali su više koncentracije *p*-kumarinske kiseline u odnosu na one izložene svjetlu. U usporedbi s klorogenskom i neoklorogenskom kiselinom, *p*-kumarinska kiselina pokazala je manju stabilnost tijekom skladištenja, što se može povezati s njezinom jednostavnijom kemijskom strukturom (jednom fenolnom -OH skupinom na aromatskom prstenu i nema dodatne esterske ili karboksilne skupine koje bi omogućile intramolekularno formiranje vodikovih veza). Takva struktura čini *p*-kumarinsku kiselinu reaktivnijom i podložnijom oksidaciji u prisutnosti kisika i svjetla. Tijekom skladištenja gubici *p*-kumarinske kiseline povezani su s oksidacijom fenolnih skupina i nastankom kinonskih međuprodukata, koji mogu dalje polimerizirati u tamne pigmente

(Manzocco i sur., 2000; Han i sur., 2024). Uz oksidacijske reakcije, svjetlost dodatno ubrzava degradaciju putem fotooksidacije, pri čemu dolazi do narušavanja konjugiranog aromatskog sustava i nastanka niskomolekularnih degradacijskih produkata (Lu i Zhao, 2017).

Tijekom termičkog tretiranja uočena je promjena koncentracije *p*-kumarinske kiseline koja je bila zajednička svim kompleksima. Pri nižim temperaturama (80 °C) određeno je početno smanjenje koncentracije, koje je bilo posebno izraženo u RP/V kompleksu. Daljnjim povećanjem temperature došlo je do povećanja koncentracije. Ovakav obrazac upućuje na to da se *p*-kumarinska kiselina pri višim temperaturama djelomično formira kao sekundarni produkt razgradnje kafeoilkininskih kiselina. Pri povišenim temperaturama dolazi do pucanja esterske veze u kafeoilkininskim kiselinama, uz nastanak kofeinske i kininske kiseline kao primarnih produkata razgradnje, nakon čega kofeinska kiselina može prolaziti oksidacijske i dekarboksilacijske reakcije koje vode do jednostavnijih hidroksicimetnih derivata, uključujući *p*-kumarinsku kiselinu (Dawidowicz i Typek, 2017; Alcázar i sur., 2021; Nguyen i sur., 2015; Stănciuc i Râpeanu, 2019).

Pri nižim temperaturama smanjenje koncentracije *p*-kumarinske kiseline može se povezati s oksidacijom fenolnih skupina i nastankom kinonskih međuprodukata, koji potom ulaze u reakcije polimerizacije, što dovodi do formiranja tamnih polimernih pigmenata. Time se potvrđuje da *p*-kumarinska kiselina, uz djelomičnu stabilnost, sudjeluje i kao međuprodukt u oksidativnoj degradaciji kafeoilkininskih kiselina, nastajući tijekom termičkih procesa iz kofeinske kiseline (Nguyen i sur., 2015; Stănciuc i Râpeanu, 2019; Zorić i sur., 2014).

Derivat p-kumarinske kiseline

Tijekom skladištenja derivat *p*-kumarinske kiseline pokazao je znatno veću stabilnost u odnosu na samu *p*-kumarinsku kiselinu. U svim kompleksima zadržane su visoke koncentracije spoja, uz tek manje gubitke nakon duljeg razdoblja skladištenja. Promjene su bile izraženije u uzorcima izloženima svjetlu nego u onima skladištenima u tami. Najveću stabilnost pokazao je kompleks s proteinima graška, u kojem je degradacija bila spora i postupna, što je potvrđeno i kinetičkom analizom koja je ukazala na visoku otpornost ovog spoja u navedenom kompleksu. Vrijeme poluraspada ukazuje da je derivat *p*-kumarinske kiseline izrazito stabilan tijekom skladištenja, čime se potvrđuje zaštitna uloga proteinskog matriksa u ograničavanju oksidacijskih reakcija.

Derivat *p*-kumarinske kiseline, vjerojatno prisutan u obliku konjugiranih (estriciranih ili glikoziliranih) spojeva, pokazao je visoku otpornost na termičko tretiranje te povećanje koncentracije pri umjerenim temperaturama. Prema literaturi, esterifikacija i glikozilacija mogu

povećati termičku i oksidacijsku stabilnost fenolnih kiselina, jer zaštitne skupine smanjuju reaktivnost fenolnih -OH skupina i time usporavaju oksidaciju (Dawidowicz i Typek, 2017; Alcázar Magaña i sur., 2021; Kieserling i sur., 2024; Tarahi i sur., 2024). Tijekom termičkog tretiranja pri 80 °C najviše vrijednosti određene su u kompleksu s proteinima riže (povećanje od oko 30 %), dok su kompleksi s proteinima badema i graška imali manja povećanja. Koncentracije derivata *p*-kumarinske kiseline u RP/V kompleksu ostale su više od početnih sve do temperature od 110 °C, što potvrđuje najizraženiji stabilizacijski učinak proteina riže. U BP/V kompleksu određeno je izraženije smanjenje pri 110 °C, dok je GP/V zadržao umjerenu stabilnost kroz cijeli temperaturni raspon. Takav obrazac upućuje na to da proteinski matriks riže, zbog svoje glutelinske strukture i hidrofobnih regija, učinkovitije stabilizira derivat *p*-kumarinske kiseline u odnosu na proteine badema i graška. Povećanje koncentracije na nižim temperaturama može se povezati s pretvorbom viših hidroksicimetnih kiselina u *p*-kumarinske derivate, dok smanjenje koncentracije proizlazi iz oksidativnih i dekarboksilacijskih reakcija koji dovode do nastanka jednostavnijih fenolnih kiselina i kinonskih međuprodukata (Dawidowicz i Typek, 2017; Alcázar Magaña i sur., 2021; El Gamal i sur., 2023; Zorić i sur., 2014). Proteini riže pokazali su najveći stabilizacijski učinak, dok su proteini badema i graška pokazali izraženije gubitke derivata pri višim temperaturama termičkog tretiranja.

Analizom stabilnosti pojedinačnih polifenola u kompleksima, uočena je osjetljivost spojeva tijekom skladištenja i termičkog tretiranja. Antocijani su bili najosjetljiviji, s početnim gubicima već pri 80 °C i značajnom degradacijom pri višim temperaturama termičkog tretiranja, gdje je određeno više od 80 % smanjenja koncentracije u svim kompleksima. Tijekom skladištenja njihove su se koncentracije kontinuirano smanjivale, pri čemu je smanjenje bilo izraženije u uzorcima skladištenim na svjetlu nego u onima skladištenim u tami, što potvrđuje fotooksidacijsku osjetljivost antocijana. Flavonoli su pokazali veću otpornost na termičke i skladišne uvjete. Klorogenska i neoklorogenska kiselina bile su među najstabilnijim spojevima, njihove su koncentracije tijekom skladištenja ostale gotovo nepromijenjene, dok su termičkim tretiranjem imale povećanje koncentracije. Kod *p*-kumarinske kiseline tijekom termičkog tretiranja pri višim temperaturama određeno je povećanje koncentracije, a kod derivata smanjenje. Tijekom skladištenja na svjetlu određeno je smanjenje koncentracije *p*-kumarinske kiseline i njezina derivata, osobito nakon duljih razdoblja. Proteinski matriksi imali su odlučujuću ulogu u stabilnosti polifenola. Kompleks s proteinima badema pokazao je najučinkovitiju zaštitu antocijana pri nižim temperaturama, gdje je određena najmanja degradacija u odnosu na komplekse s proteinima riže i graška. Istovremeno, kompleks s

proteinima riže pokazao je najveću sposobnost zadržavanja kvercetin-3-rutinozida i neoklorogenske kiseline pri umjerenom zagrijavanju, dok je kompleks s proteinima graška pokazao relativno dobru stabilnost flavonola tijekom skladištenja u tami. Ovi rezultati potvrđuju da zaštitni učinak matriksa proteina nije univerzalan, već specifičan za pojedinu skupinu polifenola i snažno ovisi o strukturnim značajkama proteina. Svjetlost se potvrdila kao dominantan čimbenik degradacije tijekom skladištenja. Termičko tretiranje je imalo različit učinak na polifenole, te je ono potaknulo kemijske reakcije unutar kompleksa, što se odražavalo kao privremeno povećanje koncentracije pojedinih polifenola, dok je pri višim temperaturama prevladavala degradacija. Ukupno gledano, stabilnost polifenola u proteinsko-polifenolnim kompleksima određena je međudjelovanjem kemijske strukture spojeva, svojstvima pojedinog proteinskog matriksa, te okolišnim uvjetima.

5.4. Parametri boje kompleksa

Promjene boje u liofiliziranim proteinsko-polifenolnim kompleksima rezultat su strukturnih i kemijskih transformacija polifenola, prvenstveno antocijana, flavonola i fenolnih kiselina, koje dovode do formiranja obojenih i smeđih polimernih struktura. U suhim kompleksima dominantni mehanizmi uključuju oksidaciju fenolnih -OH skupina, stvaranje kinonskih međuprodukata i njihovu kondenzaciju ili polimerizaciju u visokomolekularne pigmente. Te reakcije dovode do postupne transformacije izvornih, crvenih nijansi antocijana u tamnije tonove, što je jasno vidljivo u promjenama CIE $L^*a^*b^*$ parametara (Manzocco i sur., 2000; Bork i sur., 2022; Rawel i Rohn, 2010). Proteini dodatno moduliraju vizualne promjene jer interakcijama s polifenolima ograničavaju pristup kisika, svjetlosti i slobodnih radikala, čime usporavaju oksidaciju i polimerizaciju (Ozdal i sur., 2019; Feng i sur., 2023). Istodobno, oksidirani polifenoli mogu reagirati s bočnim skupinama aminokiselina, što rezultira stvaranjem stabilnih, tamnih pigmenata u obliku kovalentnih adukata (Zhang i sur., 2024; Bayati i Poojary, 2025).

Tijekom skladištenja i termičkog tretiranja dolazi do postupne oksidacije i polimerizacije antocijana, pri čemu nastaju tamni pigmenti (Sendri i sur., 2023; Dawidowicz i Typek, 2017). Oksidacijske reakcije uzrokuju smanjenja vrijednosti L^* (tamnjenje uzorka) i a^* (gubitak crvenog tona), te povećanja vrijednosti b^* (pomak prema žuto-smeđim tonovima) (Kara i Erçelebi, 2013; Wilkes i sur., 2014; Cemeroglu i sur., 1994). Povećanje ukupne razlike boje (ΔE) tijekom tretiranja odražava kumulativni učinak ovih reakcija, pri čemu se $\Delta E > 3,0$ objašnjava kao jasno vidljiva promjena boje (Pathare i sur., 2013). Flavonoli, poput kvercetina

i kvercetin-3-rutinozid, također sudjeluju u ukupnim promjenama boje proteinsko-polifenolnih kompleksa, iako ne doprinose intenzivnoj crvenoj nijansi poput antocijana. Tijekom skladištenja i termičkog tretiranja flavonoli pokazuju veću stabilnost od antocijana, no postupna oksidacija fenolnih skupina i formiranje kinonskih derivata dovodi do polimerizacije i stvaranja tamnijih pigmenata (Bakowska i sur., 2003; Bork i sur., 2022). Fenolne kiseline prolaze dekarboksilaciju i polimerizaciju u tamne pigmente, čime dodatno doprinose ukupnom tamnjenju uzorka (Bork i sur., 2022; Rawel i Rohn, 2010).

Čisti biljni proteini (BP, RP, GP) pokazali su svijetle i žućkaste tonove, s visokim parametrima L^* i b^* , te vrlo niskim ili negativnim parametrom a^* . To ukazuje da proteini sami po sebi nemaju izraženu crvenu komponentu, što je očekivano s obzirom na njihov kemijski sastav (aminokiseline, vlakna, ostaci polisaharida). Nakon kompleksiranja s polifenolima soka višnje, svi kompleksi poprimili su tamnocrvenu boju, uz naglo smanjenje L^* (tamnjenje), smanjenje b^* (nestanak žutih tonova) i značajno povećanje parametra a^* , što odražava prijenos crvene nijanse soka višnje na proteinski matriks. Dobivena niska vrijednost h° ($\sim 0^\circ$) i visoka C^* potvrđuju da je crvena boja dominantna i zasićena. Ukupna razlika boje ($\Delta E^* > 40$) jasno pokazuje da je promjena vizualno drastična i uočljiva (Sendri i sur., 2023; Pathare i sur., 2013). Ovakve transformacije u boji povezane su s prisutnošću antocijana soka višnje, prvenstveno cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-rutinozida, čiji flavilijev kation daje intenzivnu crvenu nijansu (Seeram i sur., 2001; Wojdyło i sur., 2019). Rezultati potvrđuju da su polifenoli soka višnje uspješno prenijeli svoju boju na proteinske matrikse, te da su kompleksi odmah nakon pripreme poprimili tamnocrvenu nijansu, što ne samo da ima estetsku i senzorsku važnost, već otvara i mogućnosti njihove primjene kao prirodnih bojila.

Promjene boje kompleksa tijekom skladištenja

Promjene boje u kompleksima proteina s polifenolima soka višnje tijekom skladištenja posljedica su kombiniranih oksidacijskih i fotooksidacijskih reakcija koje zahvaćaju antocijane, flavonole i fenolne kiseline. Pri izlaganju svjetlu dolazi do fotooksidacijskih reakcija, u kojima se fenolne -OH skupine oksidiraju u semikinone i kinone, koji se dalje kondenziraju ili polimeriziraju u tamne pigmente. Takvi pigmenti uzrokuju snižavanje L^* te pomak boje prema smeđim tonovima (Seeram i sur., 2001; Manzocco i sur., 2000; Bakowska i sur., 2003; Xue i sur., 2024a). U strukturama antocijana, oksidacijom cijanidinskih glikozida dolazi do otvaranja flavilijevog prstena, čime se gubi konjugirani π -elektronski sustav odgovoran za crvenu boju, što dovodi do smanjenja parametra a^* i pojave žutih tonova (West i Mauer, 2013; Enaru i sur., 2021; Seeram i sur., 2001). Istodobno, na svjetlu, fotooksidacija dodatno ubrzava degradaciju i

oksidaciju hidroksicimetnih kiselina, te nastali kinoni polimeriziraju u visokomolekularne pigmente tamnije boje koji dodatno doprinose tamnjenju boje kompleksa (Xue i sur., 2024a; Moser i sur., 2017; Manzocco i sur., 2000; Rawel i Rohn, 2010; Dawidowicz i Typek, 2017; Bork i sur., 2022; Alcázar Magaña i sur., 2021). Reakcije oksidacije i polimerizacije dovode do smanjenja L^* (tamnjenje) i povećanja b^* (pomak prema žutim i smeđim tonovima), uz postupno smanjenje crvene komponente (a^*). Uloga proteinskog matriksa ključna je u moduliranju navedenih reakcija jer hidrofobne i vodikove interakcije između proteina i polifenola ograničavaju pristup kisika i svjetlosti, čime usporavaju oksidaciju i produljuju stabilnost boje (Ozdal i sur., 2019; Feng i sur., 2023; Moser i sur., 2017). Razlike među kompleksima proizlaze iz strukturnih karakteristika proteina, koje određuju učinkovitost zaštite polifenola od oksidacijskih i fotooksidacijskih reakcija.

Rocha-Parra i suradnici (2016) su ispitivali stabilnost fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost i promjene boje u liofiliziranim praškovima crnog vina tijekom skladištenja. Autori su dokazali da tijekom skladištenja dolazi do postupne degradacije antocijana, praćene smanjenjem crvenog tona (a^*) i povećanjem žutog tona (b^*), što su pripisali oksidacijskim i polimerizacijskim reakcijama unutar suhog matriksa. Za razliku od antocijana, galna i kafeinska kiselina pokazale su visoku stabilnost, što je u skladu s opažanjima da su hidroksicimetne kiseline u suhim sustavima znatno otpornije na oksidaciju i fotodegradaciju. U istraživanju na proizvodima od višnje pokazano je da je prozirna ambalaža dovela do bržeg gubitka crvenih tonova (a^*) i većih vrijednosti ukupne razlike boje (ΔE), dok su tamne ili višeslojne barijerne ambalaže značajno usporile promjene. Utvrđeno je da uzorci skladišteni na svjetlu tijekom skladištenja brže prelaze prag vidljivih promjena, dok uzorci u tami zadržavaju stabilniju crvenu nijansu (Zorić i sur., 2016). Ovi rezultati potvrđuju da fotooksidacija ima presudnu ulogu u degradaciji antocijana i da zaštita od svjetlosti tijekom skladištenja predstavlja ključan čimbenik u očuvanju vizualne stabilnosti proteinsko-polifenolnog kompleksa. Tijekom devet mjeseci skladištenja svi kompleksi pokazali su dobru stabilnost boje, ali su brzina i intenzitet promjena ovisili o vrsti proteinskog matriksa i uvjetima skladištenja. Na svjetlu su promjene bile izraženije zbog ubrzanih oksidacijskih i fotooksidacijskih reakcija, dok su u tami te reakcije bile znatno usporene, što je rezultiralo manjim ukupnim razlikama boje (ΔE).

Kompleks BP/V pokazao je najbolju stabilnost boje tijekom cijelog razdoblja skladištenja. Nakon prva tri mjeseca skladištenja na svjetlu vrijednosti ΔE bile su niske (<1), a parametri a^* i C^* ostali su gotovo nepromijenjeni, što ukazuje na očuvanu crvenu nijansu. Nakon šest mjeseci određeno je povećanje parametara a^* i C^* uz stabilan b^* što upućuje na zadržavanje zasićene crvene nijanse, dok je nakon devet mjeseci određeno umjereno povećanje

L^* i b^* (uz $\Delta E = 3,05$), što označuje posvjetljivanje kompleksa i pojavu žutih tonova. U tami su promjene bile manje izražene, te je nakon devet mjeseci skladištenja ukupna razlika boje iznosila 2,09 što znači da je ostala ispod praga jasno vidljivih promjena ($\Delta E > 3,0$) (Pathare i sur., 2013). Dobiveni rezultati potvrđuju da je BP/V kompleks tijekom skladištenja očuvao vrlo stabilnu crvenu nijansu, što se pripisuje zaštitnom djelovanju matriksa proteina badema. Vezanjem polifenola i proteina stvaraju se hidrofbne i vodikove interakcije koje ograničavaju pristup kisiku i svjetlosti te time usporavaju oksidacijske reakcije (Ozdal i sur., 2019; Feng i sur., 2023).

Kompleks RP/V imao je nešto izraženije promjene, osobito u uzorcima izloženima svjetlu. Tijekom prva tri mjeseca ΔE je bio nizak, no već tada se uočavalo postupno smanjenje parametra a^* i povećanje b^* , što ukazuje na početak gubitka crvenih tonova. Nakon šest mjeseci nastavlja se smanjenje parametra a^* i povećanje b^* , a ΔE doseže 2,10. Nakon devet mjeseci skladištenja na svjetlu vrijednost ΔE povećala se na 6,73, uz jasno vidljiv pomak boje prema narančasto-žutoj nijansi (Sendri i sur., 2023; Pathare i sur., 2013). U tami su promjene bile manje ($\Delta E = 5,12$ nakon devet mjeseci), što potvrđuje da tama ublažava fotooksidacijske reakcije. Kompaktna struktura proteina riže, stabilizirana disulfidnim vezama, u početku ograničava difuziju kisika i svjetlosti, no tijekom duljeg skladištenja ta zaštita postaje nedovoljna. U usporedbi s BP/V kompleksom, RP/V pokazuje slabiji zaštitni učinak zbog manjeg udjela aromatskih aminokiselina i ograničenih hidrofbnih interakcija s polifenolima (Ozdal i sur., 2019; Feng i sur., 2023).

Najizraženije promjene boje tijekom skladištenja određene su u GP/V kompleksu. Tijekom prvih šest mjeseci vrijednosti ΔE bile su ispod praga jasno vidljivih promjena, uz stabilne parametre a^* i C^* , što upućuje na očuvanu crvenu nijansu. Međutim, nakon devet mjeseci, došlo je do značajnog povećanja L^* i b^* uz smanjenje a^* , što je rezultiralo posvjetljivanjem uzorka i pomakom boje prema narančasto-žutoj nijansi ($\Delta E = 6,84$ na svjetlu). U tami su promjene bile manje izražene ($\Delta E = 5,84$), ali su i dalje prelazile prag vidljive promjene (Sendri i sur., 2023; Pathare i sur., 2013). Promjene boje u GP/V kompleksu nastale su kao posljedica postupne oksidacije i degradacije antocijanskih pigmenata (Seeram i sur., 2000; West i Mauer, 2013; Enaru i sur., 2021; Bakowska i sur., 2003). Zbog hidrofilne prirode i labavije strukture proteina graška, difuzija kisika i svjetlosti kroz matriks je olakšana, što ubrzava degradaciju i smanjuje mogućnost formiranja stabilizirajućih hidrofbnih i π - π interakcija s polifenolima (Ozdal i sur., 2019; Feng i sur., 2023).

Tijekom skladištenja određene su razlike u stabilnosti boje među kompleksima: BP/V > RP/V > GP/V. Kompleks proteina badema zadržao je najstabilniju crvenu nijansu

zahvaljujući povoljnoj strukturi matriksa i prisutnosti aromatskih aminokiselina koje omogućuju učinkovite interakcije s antocijanima, dok su proteini riže i osobito graška pokazali manju sposobnost zaštite boje. Skladištenje u tami značajno je usporilo fotooksidacijske reakcije i smanjilo promjene boje u svim kompleksima. Dobiveni rezultati potvrđuju da je očuvanje boje povezano sa stabilnošću antocijana i strukturnim svojstvima proteinskog matriksa, pri čemu proteini s većim udjelom hidrofobnih i aromatskih skupina pružaju učinkovitiju zaštitu od oksidacijskih i fotooksidacijskih reakcija. Uvjeti skladištenja pritom su dodatno važan čimbenik u očuvanju boje kompleksa (Moser i sur., 2017; Rawel i Rohn, 2010; Bork i sur., 2022).

Promjene boje tijekom termičkog tretiranja

Promjene boje tijekom termičkog tretiranja voćnih proizvoda i kompleksa koji sadrže polifenole usko su povezane s degradacijom antocijana i nastankom njihovih degradacijskih produkata. Brojne studije potvrdile su da zagrijavanje sokova i ekstrakata dovodi do smanjenja crvenog tona (a^*), povećanja žutog tona (b^*) uz povećanje ukupne razlike boje (ΔE). Tijekom termičkog tretiranja antocijani prolaze kroz reakcije oksidacije koje uključuju oksidaciju fenolnih -OH skupina u semikinone i kinone, te njihovu naknadnu kondenzaciju i polimerizaciju u tamne, visokomolekularne pigmente smeđe nijanse. Ove kemijske promjene objašnjavaju smanjenje crvenog tona i pojavu žuto-narančastih tonova u kompleksima (Zorić i sur., 2014; Seeram i sur., 2001; Mercali i sur., 2013; Bakowska i sur., 2003; West i Mauer, 2013; Enaru i sur., 2021; Xue i sur., 2024a). Uz antocijane, u termičkim promjenama boje važnu ulogu imaju i ostali polifenoli. Primjerice, proantocijanidini poput proantocijanidina B2 koji je podložan epimerizaciji i cijepanju interflavanidnih veza pri 60 - 90 °C, što također doprinosi stvaranju žućkastih i smeđih tonova u kompleksima (De Taeye i sur., 2014). Flavonoli, iako termički stabilniji, pri duljem zagrijavanju prolaze oksidaciju fenolnih skupina i stvaranje kinonskih derivata, koji sudjeluju u polimerizaciji i dodatno pojačavaju tamnjenje uzorka (Enaru i sur., 2021; Bork i sur., 2022). Dodatno, hidroksicimetne kiseline, pri povišenim temperaturama prolaze izomerizaciju i oksidaciju uz stvaranje smeđe-žutih pigmenata, što dodatno doprinosi pomaku boje prema žutoj nijansi (Dawidowicz i Typek, 2017; Alcázar Magaña i sur., 2021; Bork i sur., 2022; Rawel i Rohn, 2010).

Kemijske reakcije tijekom termičkog tretiranja objašnjavaju karakteristične vizualne promjene: smanjenje parametra a^* , povećanje b^* i povećanje ΔE , koje se smatraju pouzdanim pokazateljima degradacije polifenola i formiranja tamnijih pigmenata (Xue i sur., 2024a; West i Mauer, 2013). U čistim biljnim proteinima povišene temperature uzrokuju denaturaciju,

otvaranje proteinskih lanaca i izlaganje reaktivnih aminokiselina poput tirozina, metionina i cisteina. Njihova oksidacija dovodi do formiranja kinonskih struktura i kovalentnog umrežavanja, što rezultira nastankom tamnijih, visokomolekularnih pigmenata i trajnim potamnjivanjem proteina. Daljna oksidacija dovodi do nastanka karbonilnih skupina, koje dodatno doprinose promjenama boje i smanjenju svjetline (Barreca i sur., 2020; Huelsebusch i sur., 2025). Tijekom termičkog tretiranja kod svih proteina i njihovih kompleksa određene su promjene boje, a intenzitet promjena je ovisio o temperaturi i strukturi proteinskog matriksa. Termičkim tretiranjem čistog proteina badema (BP) vrijednosti ΔE povećavale su se od 2,20 pri 80 °C do 14,59 pri 110 °C, što ukazuje na postupno i vidljivo posmeđivanje uzorka. Povećanje parametara a^* i b^* pokazuje da je boja proteina poprimila crvenkasto-žućkastu nijansu, što je posljedica oksidacije bočnih skupina aminokiselina. Kod kompleksa BP/V promjene su bile znatno veće, iako je pri 80 °C ΔE bio nizak (1,73), već pri 90 °C određeno je smanjenje parametra a^* i povećanje b^* ($\Delta E = 9,62$). Pri 100 °C vrijednosti a^* gotovo su se prepolovile, dok se b^* povećao, a ukupna promjena boje dosegla je 21,71, dok je pri 110 °C ΔE iznosio 26,56, uz potpuni gubitak crvene nijanse i pojavu narančasto-žutog tona. Usporedba BP i BP/V pokazuje da kod proteina prevladava oksidacija aminokiselinskih ostataka, dok kod kompleksa dodatnu ulogu ima degradacija antocijana, što uzrokuje smanjenje crvenih tonova i pomak prema žućkasto-smeđem spektru (West i Mauer, 2013; Enaru i sur., 2021; Bakowska i sur., 2003; Zorić i sur., 2014; Seeram i sur., 2001). Oksidacija proteina u kompleksu dodatno doprinosi ukupnom zatamnjivanju uzorka. Razlika u boji između kompleksa i proteina (ΔE^*) postupno se smanjivala od 43,80 u netretiranim uzorcima do 23,04 pri 110 °C, jer se crveni ton kompleksa gubio, dok je protein poprimio sve izraženije žute nijanse. Rezultati potvrđuju da termičko tretiranje dovodi do postupnog izjednačavanja boje proteina i kompleksa, uslijed degradacije antocijana i oksidacije proteina.

Kod proteina riže (RP) promjene boje izazvane termičkim tretiranjem bile su minimalne, što potvrđuje njegovu visoku termičku otpornost. Vrijednosti ΔE ostale su niske (3,75 pri 110 °C), uz povećanje parametara a^* i b^* , što ukazuje na pojavu žućkastih tonova. Takva stabilnost objašnjava se kompaktnom strukturom RP-a, bogatom sumpornim aminokiselinama koje formiraju disulfidne veze i ograničavaju denaturaciju, čime se usporava oksidacija bočnih skupina aminokiselina i smanjuje nastanak pigmentiranih oksidacijskih produkata (Huelsebusch i sur., 2025; Amagliani i sur., 2017; Kawakatsu i Takaiwa, 2019). Za razliku od čistog RP, kompleks RP/V pokazao je izraženije promjene boje već pri nižim temperaturama. Pri 80 °C određeno je smanjenje a^* i povećanje b^* ($\Delta E = 5,22$), što prelazi prag jasno vidljive promjene. Pri 90 °C crveni tonovi gotovo nestaju ($\Delta E = 13,51$), a pri 110 °C

ukupna promjena boje iznosi 27,09, uz narančasto-žuti ton karakterističan za oksidirane polifenole. Razlika u boji između RP i RP/V bila je najveća u netretiranom uzorku (40,78), a postupno se smanjivala s povećanjem temperature (28,31 pri 110 °C), jer se crveni ton kompleksa gubio, dok je protein postajao žući. Ovi rezultati potvrđuju da se kontrast između proteina i kompleksa smanjuje zbog degradacije antocijana, dok strukturna stabilnost RP-a ograničava oksidaciju i posmeđivanje čistog proteina.

Termičko tretiranje proteina graška (GP) uzrokovalo je vrlo male promjene boje. Vrijednosti ΔE ostale su niske (do 2,05 pri 110 °C), a parametri a^* i b^* imali su slabo povećanje, što ukazuje na relativnu stabilnost boje. Promjene su uglavnom bile povezane s povećanjem žutih tonova, što je posljedica ograničene oksidacije bočnih skupina aminokiselina (Hulsebusch i sur., 2025; Lu i sur., 2020). Suprotno tome, kompleks GP/V pokazao je izraženu osjetljivost na povišene temperature. Već pri 80 °C ukupna razlika boje iznosila je 7,44, što ukazuje na jasno vidljivu promjenu, uz smanjenje a^* i povećanje b^* . Pri 90 °C gubitak crvenih tonova bio je izraženiji ($\Delta E = 17,66$), a pri 100 °C kompleks je izgubio većinu crvene komponente i poprimio žuto-narančastu nijansu ($\Delta E = 21,74$). Pri 110 °C ΔE je ostao visok (19,66), što potvrđuje da je boja kompleksa vrlo osjetljiva na termičko tretiranje. Razlika između GP i GP/V bila je najveća u netretiranom uzorku (46,53), jer kompleks sadrži intenzivnu crvenu nijansu antocijana, ali se s povećanjem temperature ΔE postupno smanjuje (37,78 pri 110 °C) zbog gubitka crvenih tonova kompleksa i povećanja žutih tonova kod proteina. Vizualni kontrast između uzoraka ostaje izražen, što potvrđuje da kod GP dominiraju spore reakcije oksidacije aminokiselina, dok je kod GP/V presudna degradacija cijanidinskih glikozida, uz stvaranje smeđih polimernih produkata (Seeram i sur., 2001; De Taeye i sur., 2014; Rawel i Rohn, 2010; Bork i sur., 2022).

Promjena boje čistih proteina je posljedica oksidacije bočnih skupina aminokiselina i formiranja kinonskih struktura koje se kondenziraju u visokomolekularne pigmente tamne boje (Hulsebusch i sur., 2025; Barreca i sur., 2020), dok je glavni uzrok promjene boje u kompleksima oksidacija fenolnih skupina antocijana i njihove polimerizacije, pri čemu nastaju tamni polimerni pigmenti smeđe nijanse (West i Mauer, 2013; Enaru i sur., 2021; Bakowska i sur., 2003; Zorić i sur., 2014; Seeram i sur., 2001).

Biljni proteini i njihovi kompleksi s polifenolima soka višnje pokazali su različito ponašanje tijekom termičkog tretiranja i skladištenja, što je posljedica dominantnih mehanizama u svakom proteinskom matriksu. Promjena boje biljnih proteina tijekom termičkog tretiranja povezuje se s oksidacijom aminokiselina koje mogu potaknuti formiranje

smeđih oksidacijskih pigmenata (Hulsebusch i sur., 2025). Vrijednosti ΔE kod RP i GP uglavnom su ostale niske i blizu praga vidljivih promjena čak i pri 110 °C, što potvrđuje da proteini sami po sebi imaju visoku otpornost boje. Kod BP uočene su izraženije promjene u odnosu na RP i GP, što se može povezati s većim udjelom aromatskih aminokiselina. Iako ti aromatski ostaci u kompleksima s polifenolima pridonose stabilizaciji polifenola putem π - π interakcija, u čistim proteinima sudjeluju u oksidacijskim reakcijama, čime se objašnjava jače tamnjenje BP tijekom termičkog tretiranja. U stabilnosti se posebno istaknuo RP, čija je otpornost povezana s prisutnošću disulfidnih veza i većim udjelom termički stabilnih glutelinskih frakcija, što je potvrđeno i FTIR analizom gdje su RP uzorci pokazali najmanje promjena u amidnim regijama. Kompleksi proteina i polifenola soka višnje u početku su imali intenzivnu crvenu boju s visokim vrijednostima parametara a^* i C^* , što odražava prisutnost cijanidinskih glikozida. Međutim, tijekom termičkog tretiranja došlo je do značajnog smanjenja crvenih tonova i povećanja žutih tonova, što se očitovalo kroz povećanje ΔE vrijednosti. Tijekom termičkog tretiranja svi kompleksi pokazali su vrlo izražene promjene boje s povećanjem temperature. Najveće ukupne promjene boje pri 110 °C određene su kod RP/V i BP/V kompleksa, dok je kod GP/V kompleksa zabilježena umjerenija, ali i dalje značajna promjena boje. Skladištenje je dodatno potvrdilo razlike u stabilnosti. Kod kompleksa BP/V boja je ostala vrlo stabilna, a ΔE vrijednosti nakon devet mjeseci u tami bile su ispod praga vidljivih promjena, dok su na svjetlu promjene bile izraženije, ali i dalje umjerene. Kod RP/V i GP/V tijekom skladištenja su određene veće promjene, pri čemu su uzorci izgubili dio crvenih tonova i poprimili narančasto-žućkaste nijanse. Utjecaj uvjeta skladištenja bio je očit: tama je značajno usporila promjene boje u odnosu na svjetlost, što potvrđuje presudnu ulogu fotooksidacije u degradaciji antocijana (Zorić i sur., 2016; Wojdyło i sur., 2019). Može se zaključiti da su promjene boje pouzdan pokazatelj degradacije polifenola u proteinsko-polifenolnim kompleksima. Kod čistih proteina dominira povećanje žutih tonova kao posljedica oksidacije aminokiselina, dok kod kompleksa prevladava degradacija antocijana, što dovodi do gubitka crvene nijanse i povećanja ΔE vrijednosti.

5.5. FTIR-ATR

FTIR-ATR spektroskopija je često korištena metoda za proučavanje molekularne strukture i interakcija između bioaktivnih spojeva, poput polifenola i proteinskih matriksa. Metoda se temelji na apsorpciji infracrvenog zračenja od strane kemijskih veza unutar molekula, pri čemu svaka vrsta vibracije (npr. rastezanje, savijanje) ima karakterističnu

frekvenciju izraženu u valnim brojevima (cm^{-1}). U spektrima proteina i njihovih kompleksa moguće je identificirati promjene povezane s konformacijom, stabilnošću, denaturacijom i međumolekulskim interakcijama, osobito u prisutnosti polifenola, nakon termičkog tretiranja i tijekom skladištenja.

Regija između 3600 cm^{-1} i 3200 cm^{-1} obuhvaća rastezanja O-H i N-H veza koje su karakteristične za vodikove veze i hidrataciju proteina (Larkin, 2017; Movasaghi i sur., 2008; Shizawa i sur., 2017). Ove vibracije su karakteristične za biološke makromolekule i osjetljive su na prisutnost intermolekulskih interakcija (Movasaghi i sur., 2008). Intenzitet O-H vrpce ovisi o broju i jačini vodikovih veza, dok N-H vrpce mogu reflektirati promjene u sekundarnoj strukturi proteina (Larkin, 2017). Kopjar i suradnici (2022) dokazali su razlike u navedenoj regiji između biljnih proteina smeđe riže i badema te njihovih kompleksa s kvercetinom, što se interpretira kao dokaz nekovalentnih interakcija, prvenstveno vodikovih veza i hidrofobnih interakcija između proteina i polifenolnih skupina. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da kompleksi BP/V, RP/V i GP/V imaju povećan intenzitet vrpce u odnosu na odgovarajuće proteine, bez značajnijih pomaka valnog broja. To ukazuje na formiranje nekovalentnih interakcija, ponajprije vodikovih veza između hidroksilnih skupina polifenola i amino skupina proteina. Termičkim tretiranjem i povećanjem temperature, uočeno je postupno smanjenje intenziteta vrpce u ovoj regiji, osobito kod biljnih proteina, dok su kompleksi zadržali viši intenzitet, što ukazuje na stabilizacijsku ulogu polifenola. Smanjenje intenziteta vrpce ukazuje na gubitak vodikovih veza, dehidraciju i denaturaciju proteina (Shizawa i sur., 2017; Larkin, 2017; Bridelli, 2017) u našem slučaju kao posljedicu skladištenja i termičkog tretiranja. Dobiveni rezultati potvrđuju da prisutnost polifenola pridonosi očuvanju strukture proteinskog matriksa putem vodikovih veza, no takve interakcije imaju određenu nestabilnost pri višim temperaturama.

Amid I regija IR spektra, smještena između 1700 cm^{-1} i 1600 cm^{-1} , odražava rastezanje karbonilne ($\text{C}=\text{O}$) veze u peptidnoj skupini i smatra se osjetljivom regijom u kojoj dolazi do promjena u sekundarnoj strukturi proteina, osobito u razlikovanju α -uzvojnica (~ 1658 do 1650 cm^{-1}) i β -nabranih ploča (~ 1640 do 1610 cm^{-1}) (Li i sur., 2021; Shurvell, 2006; Sadat i Joye, 2020; Movasaghi i sur., 2008; Larkin, 2017). Promjene u ovoj regiji odražavaju poremećaje u mreži vodikovih veza koje stabiliziraju sekundarnu strukturu, pri čemu dolazi do reorganizacije interakcija između $\text{C}=\text{O}$ skupina, što uzrokuje pomake i promjene intenziteta vrpce (Seczyk i sur., 2019). Smanjenje intenziteta Amid I vrpce tipično upućuje na smanjenje udjela α -uzvojnica u korist β -strukture, zbog djelomičnog razmotavanja proteina, posebice u prisutnosti fenolnih spojeva (Jia i sur., 2019). Amid II regija, smještena između 1600 cm^{-1} i 1500 cm^{-1} ,

odnosi se na savijanje N-H veza i C-N rastezanje u peptidnoj skupini. Iako je manje osjetljiva od Amid I regije, promjene u položaju i intenzitetu Amid II vrpce također su povezane s konformacijskim promjenama, osobito gubitkom vodikovih veza i reorganizacijom strukture tijekom termičkog tretiranja, skladištenja ili interakcija s polifenolima (Movasaghi i sur., 2008; Li i sur., 2021; Seczyk i sur., 2019; Sadat i Joye, 2020; Kong i Yu, 2007; Larkin, 2017).

Na IR spektrima analiziranih uzoraka proteina određeni su karakteristični pomaci i smanjenje intenziteta Amid I i Amid II vrpce nakon termičkog tretiranja i tijekom skladištenja. Kod proteina, ti pomaci ukazuju na gubitak sekundarne strukture posebice α -uzvojnica, kao posljedicu denaturacije (Liu i sur., 2019; Seczyk i sur., 2019; Jia i sur., 2019). Nakon kompleksiranja s polifenolima soka višnje, kod svih kompleksa određeno je smanjenje intenziteta Amid I i Amid II vrpce. Ova pojava ukazuje na interakcije između polifenolnih skupina i peptidnih veza proteina koje mogu uzrokovati djelomično razmotavanje proteina i povećanje udjela β -strukture (Liu i sur., 2019; Seczyk i sur., 2019; Jia i sur., 2019). To je potvrđeno u radu Zhang i suradnika (2022), gdje je uočeno smanjenje α -uzvojnica i povećanje β -uzvojnica nakon vezanja katehina, što također upućuje na djelomičnu reorganizaciju sekundarne strukture. Analizom sekundarne strukture, Hasni i suradnici (2011) su dokazali da kompleksiranje s polifenolima dovodi do smanjenja udjela α -heliksa i β -ploča te povećanja udjela nasumičnih uzvojnica i β -uzvojnica. Ti rezultati sugeriraju djelomičnu denaturaciju i reorganizaciju proteinskog matriksa uslijed interakcije s polifenolima što se podudara s našim opažanjima. U radu Kopjar i suradnika (2022), određeni su pomaci i u Amid I i u Amid II regiji pri vezanju kvercetina na proteine badema. Slično tome, u radu Kopjar i suradnici (2021) također su dokazani pomaci u obje regije nakon vezanja cimetne kiseline na biljne proteine graška, badema i buče. Kod proteina sirutke su fenolne kiseline uzrokovale istu vrstu promjena (Jia i sur., 2019; Zhang i sur., 2014). Termički tretirani kompleksi BP/V i GP/V imali su veći intenzitet Amid I i II vrpce u usporedbi s odgovarajućim čistim proteinima na istim temperaturama. Takve promjene ukazuju na stabilizacijski učinak polifenola koji najvjerojatnije proizlazi iz formiranja vodikovih veza između polifenolnih i peptidnih skupina, čime se djelomično štiti sekundarna struktura od termičke denaturacije. Ovaj efekt potvrđen je i u radu Liu i suradnika (2019), gdje je za EGCG-laktoferin konjugat uočeno povećanje α -uzvojnica i β -strukture te smanjenje promjena u IR spektru nakon termičkog tretiranja. S druge strane, kompleksi proteina riže s polifenolima soka višnje imali su niže intenzitete Amid I i Amid II vrpce u usporedbi s čistim proteinima riže, čak i nakon termičkog tretiranja. Ovo se može pripisati visokoj termičkoj stabilnosti proteina riže, osobito zbog globulinskih frakcija

koje su poznate po svojim visokim temperaturama denaturacije i zadržavanju sekundarne strukture pri povišenim temperaturama (Liu i sur., 2021).

Amid III regija IR spektra, smještena između 1300 cm^{-1} i 1229 cm^{-1} , obuhvaća kombinaciju C-N rastezanja i N-H savijanja unutar peptidnih veza te se povezuje sa lokalnim konformacijskim promjenama u proteinima, osobito u udjelu β -strukture, uzvojica i nabranih ploča (Movasaghi i sur., 2008; Larkin, 2017; Singh i sur., 1993). Iako manje izražena od regija Amid I i Amid II, Amid III vrpca može pružiti vrijedne informacije o očuvanju sekundarne strukture te u našem istraživanju promjenama izazvanima interakcijama s polifenolima, termičkim tretiranjem i skladištenjem (Movasaghi i sur., 2008; Larkin, 2017). Za razliku od Amid I regije, koja se preklapa sa signalima deformacije vode, u području Amid III regije vibracije O-H veza iz vode ne interferiraju s FTIR signalima proteina, što omogućuje pouzdaniju interpretaciju sekundarne strukture čak i u hidratiziranim uzorcima (Anderle i Mendelsohn, 1987; Larkin, 2017; Singh i sur., 1993). Promjene intenziteta vrpce u Amid III regiji najčešće upućuju na smanjenje organiziranih struktura poput α -uzvojica i β -ploča te prijelaz u nasumične uzvojnice, što se interpretira kao djelomična denaturacija proteina (Singh, 2000; Stani i sur., 2020). Smanjenje intenziteta ove vrpce povezano je s poremećajem vodikovih veza i gubitkom sekundarne strukture, dok povećanje intenziteta može ukazivati na stabilizaciju ili reorganizaciju proteinske strukture (Anderle i Mendelsohn, 1987; Singh i sur., 1993).

Spektrima FTIR analize u ovom istraživanju, određeno je da kod kompleksiranja proteina s polifenolima soka višnje dolazi do pomaka vrpce na manji valni broj, ali i do povećanja intenziteta u odnosu na protein. To ukazuje na djelomično preoblikovanje proteinske strukture uslijed interakcija s polifenolima soka višnje. Interakcije koje utječu na amidne skupine kao što su vodikove veze, mogu uzrokovati pomake ili promjene u intenzitetu vrpce u Amid III regiji, što se direktno povezuje s konformacijskim promjenama u proteinima (Singh i sur., 1993). Termičkim tretiranjem, uočeno je smanjenje intenziteta Amid III vrpce kod svih uzoraka proteina i kompleksa, što potvrđuje učinak termičke denaturacije i destabilizaciju sekundarne strukture. Međutim, kod kompleksa je određen veći intenzitet vrpce u ovoj regiji u usporedbi s termički tretiranim proteinima, što upućuje na stabilizacijski učinak polifenola na amidne veze i očuvanje dijela konformacijske strukture (Larkin, 2017; Stani i sur., 2020). Manje razlike u odnosu intenziteta vrpce kompleksa i proteina u Amid III regiji uočene su kod kompleksa proteina riže, što je u skladu s prethodnim opažanjima da proteini riže imaju veću termičku otpornost te da možda slabije reagiraju na zaštitne učinke polifenola u ovoj regiji (Anderle i Mendelsohn, 1987; Liu i sur., 2021).

Vibracije u regiji između 3000 cm^{-1} i 2800 cm^{-1} pripisuju se simetričnim i antisimetričnim alifatskim rastezanjima C-H veza iz metilenskih $-\text{CH}_2$ i metilnih $-\text{CH}_3$ skupina bočnih lanaca aminokiselina (Larkin, 2017; Coates, 2000; Movasaghi i sur., 2008). Prema Shurvellu (2006), CH_3 skupine apsorbiraju u blizini 2960 i 2870 cm^{-1} , dok su karakteristične vrpce CH_2 skupina smještene oko 2930 i 2850 cm^{-1} . Međutim, u mnogim slučajevima se u regiji može uočiti samo jedna zajednička vrpca, jer se signali CH_3 i CH_2 skupina preklapaju, što može otežati njihovo individualno razlikovanje (Shurvell, 2006). Ova regija je osobito izražena u proteinima s većim udjelom hidrofobnih alifatskih ostataka poput alanina, valina, leucina, izoleucina i prolina (Zhu i sur., 2011; Howell i sur., 1999), budući da te aminokiseline sadrže više CH_2 i CH_3 skupina.

U prethodnim istraživanjima, promjene koje obuhvaćaju simetrična i antisimetrična rastezanja C-H veza metilenskih (CH_2) skupina, interpretirane su kao rezultat hidrofobnih interakcija u kompleksima proteina i polifenola. Hasni i suradnici (2011) analizirali su komplekse α - i β -kazeina s fenolnim spojevima iz čaja te su na temelju pomaka antisimetričnih i simetričnih CH_2 vibracija zaključili kako dolazi do hidrofobnih kontakata između fenolnih prstenova i hidrofobnih džepova proteina. Ovi rezultati sukladni su i s rezultatima rada Kopjar i suradnika (2022), gdje se navodi da su promjene u ovoj regiji potvrda postojanja hidrofobnih kontakata između kvercetina i proteinskih matriksa badema i smeđe riže. Promjene u intenzitetima i položajima CH_2 i CH_3 rastezanja mogu se koristiti za praćenje hidrofobnih interakcija, denaturacije i konformacijskih promjena u proteinima (Howell i sur., 1999). Prema radu Howell i suradnika (1999), kod termički obrađenog sojinog proteinskog koncentrata uočeno je smanjenje intenziteta vrpce u toj regiji, što autori povezuju s reorganizacijom hidrofobnih interakcija i denaturacijom proteina. Promjene u ovoj regiji, zajedno s promjenama u Amid regijama, mogu se koristiti kao indikator termičkih promjena i strukturnih oštećenja proteina.

U IR spektrima biljnih proteina badema (BP), riže (RP) i graška (GP), vrpce u alifatskoj regiji bile su izražene i u skladu s prisutnošću alifatskih lanaca. Termičkim tretiranjem određeno je postupno smanjenje intenziteta ovih vrpce s porastom temperature, što upućuje na narušavanje hidrofobnih interakcija i moguću reorganizaciju alifatskih dijelova proteinske strukture, sukladno ranijim rezultatima (Howell i sur., 1999). Kod kompleksa proteina s polifenolima soka višnje, primijećene su razlike među uzorcima. Kompleksi BP/V i GP/V imali su niži intenzitet vrpce u odnosu na njihove proteinske parove, što upućuje na učinak vezanja polifenola i smanjeno izlaganje hidrofobnih skupina. Nasuprot tome, kompleks RP/V imao je veći intenzitet vrpce u ovoj regiji u usporedbi s RP. Termičkim tretiranjem, kod svih kompleksa

određeno je smanjenje intenziteta vrpce u ovoj regiji, ali su zadržali veće vrijednosti od pripadajućih proteina. Takvi rezultati ukazuju na stabilizacijski učinak polifenola, koji mogu ograničiti denaturaciju i smanjiti reorganizaciju hidrofobnih dijelova proteinske strukture tijekom izlaganja povišenim temperaturama.

Regija između 1400 i 1300 cm^{-1} u IR spektrima proteina pripisuje se savijanjima i njihanjima metilnih (CH_3) i metilenskih (CH_2) skupina, koje čine alifatske bočne lance aminokiselina. Vrpce u ovoj regiji, osobito oko 1370 cm^{-1} (savijanje CH_3) i 1340 cm^{-1} (njihanje CH_2), predstavljaju karakteristične signale koji odražavaju lokalne strukturne promjene u bočnim lancima (Movasaghi i sur., 2008; Larkin, 2017). Vibracije CH_2 i CH_3 skupina u regiji od 1350 do 1380 cm^{-1} prisutne su u različitim biološkim makromolekulama, uključujući proteine i polisaharide (Movasaghi i sur., 2008), a promjene njihovih položaja i intenziteta mogu se koristiti za praćenje lokalnih molekularnih reorganizacija (Larkin, 2017). Eksperimentalna potvrda značaja ove regije dana je u radu Kopjar i suradnici (2021), gdje je vrpca proteina graška na 1395 cm^{-1} , koja odgovara simetričnom savijanju CH_3 skupina, pomaknuta na 1380 cm^{-1} nakon adsorpcije cimetine kiseline. Nadalje, u kompleksima s 1% proteina pojavila se dodatna vrpca na 1342 cm^{-1} , koja je pripisana njihanju CH_2 skupina. Autori su ovakve promjene interpretirali kao posljedicu interakcije između fenolnih skupina i bočnih lanaca aminokiselina, što je rezultat reorganizacije alifatskih bočnih lanaca proteina tijekom interakcije s polifenolnim spojevima.

U spektrima proteina badema, kompleksiranje s polifenolima soka višnje rezultiralo je pomakom vrpce prema nižim valnim brojevima i smanjenjem intenziteta, što ukazuje na konformacijsku reorganizaciju bočnih lanaca aminokiselina. Kod termički tretiranih BP uzoraka, određene su promjene u obliku cijepanja i pojave novih vrpce te smanjenja intenziteta, što potvrđuje destabilizaciju bočnih lanaca. U BP/V kompleksima, vrpce su imale viši intenzitet pri nižim temperaturama, no pri $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ dolazi do njihovog pomaka i slabljenja, što upućuje na termičku osjetljivost kompleksa. Kod proteina riže, izražene vrpce u ovoj regiji nestaju nakon vezanja polifenola iz soka višnje, što se može pripisati interakcijama s bočnim lancima. Termičkim tretiranjem dolazi do smanjenja intenziteta ovih vrpce, a kod RP/V kompleksa uočen je postupni nestanak vrpce s porastom temperature, što upućuje na ograničenu sposobnost polifenola da stabiliziraju ovu regiju. Usporedba RP i RP/V ukazuje na jasnije izražene vrpce kod čistih proteina, dok su one u kompleksima slabije, što potvrđuje reorganizaciju bočnih lanaca pod utjecajem polifenola i temperature. U spektrima proteina graška, izražene vrpce u ovoj regiji bile su smanjene i pomaknute u kompleksu s polifenolima, što potvrđuje interakcije polifenolnih spojeva s bočnim lancima proteinskog matriksa. Termičkim tretiranjem dolazi do

daljnjih pomaka i smanjenja intenziteta vrpce u proteinu, dok su u kompleksima promjene bile blaže, što ukazuje na djelomičnu stabilizaciju strukture u prisustvu polifenola. Ove promjene potvrđuju da je regija od 1400 do 1300 cm^{-1} osjetljiv IR marker za praćenje konformacijskih promjena alifatskih bočnih lanaca proteina, posebice u kontekstu interakcije s polifenolima i utjecaja termičkog tretiranja.

U regiji od 900 do 700 cm^{-1} uočene su vrpce kod kompleksa biljnih proteina s polifenolima soka višnje koje nisu bile prisutne u IR spektrima biljnih proteina, što upućuje na specifične interakcije aromatskih struktura prisutnih u polifenolnim spojevima s proteinima tijekom kompleksiranja. Ova regija pripada vanplanarnim deformacijama C-H veza karakterističnima za aromatske prstene. (Movasaghi i sur., 2008; Larkin, 2017; Coates, 2000; Silverstein i sur. 2005). Broj vodikovih atoma na benzenskom prstenu izravno utječe na poziciju i intenzitet vrpce u ovoj regiji. Tako se primjerice, mono- i orto-disupstituirani polifenoli javljaju na $\sim 770\text{--}750\text{ cm}^{-1}$, meta-supstituirani na $\sim 810\text{--}782\text{ cm}^{-1}$, a para-supstituirani na $\sim 880\text{--}860\text{ cm}^{-1}$ (Larkin, 2017). U navedenoj regiji, vrpce je moguće pripisati nekovalentnim interakcijama između aromatskih jezgri proteina i polifenola. Radi se prije svega o $\pi\text{--}\pi$ interakcijama, koje nastaju među konjugiranim elektronski bogatim aromatskim prstenovima, najčešće između polifenolnih skupina i bočnih lanaca aminokiselina poput fenilalanina, tirozina, triptofana i histidina (Lešnik i sur., 2025; Paik i sur., 2022). Takve interakcije igraju važnu ulogu u stabilizaciji sekundarne i tercijarne strukture proteina, kao i u formiranju kompleksa s polifenolima.

Uz $\pi\text{--}\pi$ interakcije, ova regija također odražava hidrofobne interakcije, koje predstavljaju jedan od glavnih mehanizama uključenih u formiranje kompleksa između proteina i polifenola. One se formiraju između benzenskih prstenova polifenola i hidrofobnih (alifatskih i aromatskih) aminokiselina u proteinima (Li i sur., 2021; Xue i sur., 2024). Aromatski prstenovi polifenolnih spojeva spontano se vežu u hidrofobne džepove proteinskog matriksa (Tazeddinova i sur., 2022; Shurvell, 2006). U radu Kopjar i suradnici (2021) u IR spektrima kompleksa biljnih proteina s cimetnom kiselinom određene su karakteristične nove vrpce na 770 cm^{-1} (kompleks s proteinom graška, badema, buče), 874 cm^{-1} (kompleks s proteinima graška i proteinima buče) i 980 cm^{-1} (kompleks s proteinima graška) koje nisu bile prisutne u čistim proteinima. Prisutnost navedenih vrpce može se pripisati adsorpciji cimetne kiseline na površinu proteinskog matriksa, pri čemu dolazi do specifičnih interakcija između aromatskih prstena cimetne kiseline i strukture proteina, osobito u području vanplanarnih C-H deformacija. U ovom istraživanju, kod kompleksa proteina badema, riže i graška s polifenolima soka višnje, uočene su dvije nove vrpce koje su bile prisutne pri svim temperaturama termičkog tretiranja,

pri čemu je određeno postupno smanjenje njihovog intenziteta s porastom temperature. Ova pojava potvrđuje vezanje aromatskih polifenolnih skupina na proteinski matriks te dodatno potkrepljuje zaključak o formiranju stabilnih kompleksa putem hidrofobnih i π - π interakcija, karakterističnih za ovu vibracijsku regiju.

Vlakna, uključujući celulozu, pektin i škrob, su kompleksni ugljikohidrati (polisaharidi) koji čine strukturne komponente biljnog tkiva, a mogu biti prisutni i u biljnim proteinima (Mudgil i Barak, 2013). Regija između 1200 cm^{-1} i 900 cm^{-1} poznata je kao „fingerprint“ regija jer sadrži jedinstvene vibracije C-O, C-C i C-OH koje omogućuju identifikaciju specifičnih funkcionalnih skupina polisaharida (Movasaghi i sur., 2008; Larkin, 2017; Hong i sur., 2021). Prema literaturi, ova regija je osjetljiva na strukturne promjene među polisaharidima te može reflektirati njihovu degradaciju, hidrataciju ili interakcije s drugim molekulama (Hong i sur., 2021; Xue i sur., 2024). Polifenoli i polisaharidi stvaraju nekovalentne komplekse prvenstveno putem vodikovih veza između polifenolnih OH skupina i hidroksilnih skupina u polisaharidima, te hidrofobnim interakcijama između aromatskih prstenova polifenola i nepolarnih dijelova polisaharida (Xue i sur., 2024).

U podregiji 1160 do 1150 cm^{-1} pojavljuju se vibracije koje odgovaraju rastezanju C-O-C i C-OH veza, karakterističnih za polisaharide poput pektina i celuloze (Movasaghi i sur., 2008; Wonga i sur., 2022). U spektrima proteina badema određena je vrpca na 1155 cm^{-1} , što se može povezati s većim udjelom vlaknastih komponenti prisutnih u ovoj matrici. Nakon kompleksiranja s polifenolima soka višnje, intenzitet vrpce na 1155 cm^{-1} se povećava, što se pripisuje formiranju vodikovih veza između polifenolnih i polisaharidnih hidroksilnih skupina. Termičkim tretiranjem intenzitet vrpce se smanjuje, ali kod svih kompleksa BP/V zadržava višu vrijednost u odnosu na čiste proteine, što ukazuje na određeni stabilizacijski učinak polifenola. U spektru proteina graška (GP) određena je vrpca na 1148 cm^{-1} . Nakon kompleksiranja s polifenolima uočen je pomak vrpce i povećanje intenziteta, što potvrđuje formiranje vodikovih veza između polifenola i hidroksilnih skupina polisaharida u matriksu. Termičkim tretiranjem dolazi do smanjenja intenziteta ove vrpce u oba uzorka, no kompleks GP/V pri svim temperaturama zadržava viši intenzitet u odnosu na čiste proteine. Ovi rezultati sugeriraju da termičko tretiranje može uzrokovati denaturaciju i djelomičnu degradaciju polisaharida, ali i da kompleksiranje s polifenolima doprinosi očuvanju strukturnih interakcija s polisaharidnim komponentama (Hong i sur., 2021).

Kod proteina graška određena je vrpca na 1084 cm^{-1} , koja se pripisuje rastezanju C-OH veza u oligosaharidnim komponentama proteina (Movasaghi i sur., 2008). Nakon kompleksiranja s polifenolima soka višnje, uslijed formiranja vodikovih veza između

hidroksilnih skupina polifenola i oligosaharidnih lanaca, dolazi do pomaka i pojave izraženije vrpce na 1028 cm^{-1} , što ukazuje na strukturne reorganizacije (Xue i sur., 2024). Termičkim tretiranjem vrpce gube intenzitet, ali ostaju izraženije kod kompleksa.

U tzv. „fingerprint“ regiji kod proteina riže određena je vrpca na 1066 cm^{-1} koja se povezuje sa C-O vibracijama (Movasaghi i sur., 2008), kompleksiranjem s polifenolima vrpca se pomiče na 1039 cm^{-1} uz povećanje intenziteta. Termičkim tretiranjem vrpce se intenzitet smanjuje, s tim da zadržava veći intenzitet u kompleksima u odnosu na čiste proteine.

Kod proteina badema određena je vrpca koja pripada podregiji od 1028 cm^{-1} do 1015 cm^{-1} , a uključuje vibracije C-C i C-O veza karakterističnih u celulozi i škrobu, te predstavlja još jedno područje za identifikaciju polisaharida (Larkin, 2017; Wongsai i sur., 2022; Hong i sur., 2021; Movasaghi i sur., 2008). U ovoj regiji određena je vrpca kod proteina badema na 1032 cm^{-1} , kompleksiranjem s polifenolima vrpca se pomiče na 1028 cm^{-1} uz povećanje intenziteta. Termičkim tretiranjem vrpca gubi intenzitet, ali kod BP/V ta vrpca ima veći intenzitet u odnosu na čiste proteine. Također kod ovog proteina određena je i vrpca na 969 cm^{-1} koja pripada podregiji deformacija C-O i C=O veza u metilnim skupinama polisaharida (Movasaghi i sur., 2008). Termičkim tretiranjem kod vrpce je određeno smanjenje intenziteta, dok kompleksiranjem s polifenolima soka višnje vrpca nestaje.

Analizom IR spektra kompleksa tijekom skladištenja na svjetlu i u tami, u razdoblju od 3, 6 i 9 mjeseci, uočene su promjene isključivo u obliku postupnog smanjenja intenziteta vrpce u karakterističnim vibracijskim regijama, bez pomaka valnih brojeva. Rezultati su pokazali da skladištenje, osobito na svjetlu, dovodi do postupnog smanjenja intenziteta karakterističnih vrpce što ukazuje na degradaciju vodikovih veza, gubitak hidratacije i slabljenje strukturne stabilnosti kompleksa. Utvrđeno je da se smanjenje intenziteta vrpce progresivno povećava s duljinom skladištenja, što potvrđuje osjetljivost pojedinih funkcionalnih skupina na fotooksidacijske reakcije. Najmanje smanjenje intenziteta određeno je kod kompleksa RP/V, osobito u regijama Amid I i Amid II, gdje je zadržavanje intenziteta bilo izraženije u tami. Nasuprot tome, kompleks GP/V pokazao je izraženije smanjenje intenziteta već nakon 3 mjeseca, osobito u regijama Amid I, Amid II i Amid III dok je kompleks BP/V pokazivao kontinuirano smanjenje kroz sve mjesece, ali s blažim gubitkom intenziteta u aromatskim regijama (749 i 793 cm^{-1}), što može upućivati na veću stabilnost π - π interakcija aromatskih prstena. U gotovo svim analiziranim regijama i kod svih kompleksa, degradacija je bila izraženija na svjetlu, osobito u regiji rastezanja O-H i N-H veza, amidnim regijama, te u tzv. „fingerprint“ regiji, što potvrđuje fotoosjetljivost ključnih funkcionalnih skupina unutar kompleksa biljnih proteina s polifenolima soka višnje.

Na temelju provedene FTIR-ATR spektroskopske analize može se izvesti zaključak o termičkoj stabilnosti biljnih proteina badema (BP), riže (RP) i graška (GP), kao i njihovih kompleksa s polifenolima soka višnje (BP/V, RP/V, GP/V), tijekom termičkog tretiranja u rasponu od 80 do 110 °C. Analizom spektra po regijama određene su konformacijske promjene, pomaci vrpce i promjene u intenzitetima koji odražavaju strukturne reorganizacije i međumolekulske interakcije, osobito one potaknute prisutnošću polifenolnih spojeva.

Među biljnim proteinima, proteini riže imali su najveću otpornost na strukturne promjene izazvane termičkim tretiranjem. U ključnim regijama sekundarne strukture, posebice Amid I i Amid II regiji, RP je zadržao viši intenzitet i manji pomak valnih brojeva u usporedbi s BP i GP, što ukazuje na očuvanje α -uzvojnice i β -strukturne komponente proteina. Ova otpornost povezana je s visokim udjelom globulinskih frakcija u proteinu riže koje su poznate po svojoj prirodnoj termostabilnosti i višim denaturacijskim temperaturama. Također, u regiji deformacije bočnih lanaca (1400 do 1300 cm^{-1}) kod RP je imao manju reorganizaciju u odnosu na ostale proteine, što dodatno potvrđuje njegovu stabilnost. S obzirom na navedeno, proteini riže su u ovom istraživanju identificirani kao najstabilniji čisti proteinski matriks pod utjecajem povišenih temperatura.

S druge strane, kompleks BP/V, dobiven vezanjem polifenola soka višnje na proteine badema, imao je najizraženiji stabilizacijski učinak tijekom termičkog tretiranja. U gotovo svim analiziranim regijama FTIR spektra uočene su karakteristične promjene koje potvrđuju zaštitnu ulogu polifenola. U širokoj regiji rastezanja O-H i N-H veza, kod kompleksa BP/V određen je veći intenzitet vrpce u odnosu na čiste proteine pri svim temperaturama, što ukazuje na očuvanje vodikovih veza i hidratacije. U Amid I i Amid II regijama, kojima se određuje sekundarna struktura proteina, BP/V imao je izraženije intenzitete u odnosu na BP, što potvrđuje djelomično očuvanje α -uzvojnice i smanjenu denaturaciju. U Amid III regiji također je uočeno povećanje intenziteta, što upućuje na očuvanje amidnih veza u prisutnosti polifenolnih spojeva.

Dodatno, u alifatskoj regiji savijanja CH_3 i CH_2 skupina BP/V kompleks imao je blaže promjene u odnosu na čiste proteine, uz očuvanje strukture bočnih lanaca aminokiselina. Pojava novih vrpce u aromatskoj regiji koje su bile prisutne pri svim temperaturama termičkog tretiranja, potvrđuje se stabilno vezanje aromatskih prstena polifenola na proteinski matriks putem π - π i hidrofobnih interakcija. U tzv. „fingerprint“ regiji kod kompleksa BP/V uočeno je pojačanje intenziteta vrpce vezanih uz polisaharidne komponente, uz njihovu veću otpornost na termičko tretiranje, što dodatno potvrđuje da su polifenoli djelovali i na stabilizaciju polisaharidnih elemenata prisutnih u proteinima badema.

U konačnici, FTIR analiza potvrdila je da interakcije između biljnih proteina i polifenola mogu značajno doprinijeti strukturnoj stabilnosti proteinskih matriksa pod utjecajem okolišnih čimbenika. Među biljnim proteinima, proteini riže (RP) pokazali su najveću termičku otpornost, dok je među kompleksima, kompleks proteina badema i polifenola soka višnje pokazao najveću ukupnu stabilnost, kako tijekom skladištenja tako i pri termičkom tretiranju, što ga čini pogodnim nosačem za zaštitu osjetljivih bioaktivnih spojeva u prehrambenim sustavima.

Ocjena rada u tijeku

6. ZAKLJUČCI

Cilj ovoga rada bio je ispitati stabilnost bioaktivnih dodataka hrani temeljenih na biljnim proteinima i polifenolima soka višnje te procijeniti utjecaj vrste proteinskog matriksa na vezanje, stabilnost polifenola, antioksidacijsku aktivnost i boju tijekom skladištenja i termičkog tretiranja. Na temelju postavljenih hipoteza i dobivenih rezultata izneseni su sljedeći zaključci:

1. Odabrani proteini se mogu primijeniti kao nosači polifenola soka višnje za formuliranje bioaktivnih dodataka hrani odnosno kompleksa.

Rezultati su pokazali da su proteini badema, riže i graška uspješno vezali polifenole soka višnje te omogućili formuliranje liofiliziranih kompleksa. Određene vrijednosti ukupnih polifenola i proantocijanidina u formuliranim kompleksima potvrdile su prisutnost polifenolnih spojeva, čime je dokazano ostvareno vezanje. Analiza FTIR-ATR spektra upućuje na pojavu karakterističnih promjena u regijama Amid I i Amid II, što potvrđuje interakcije između proteina i polifenola. Vrsta proteina utjecala je na količinu vezanih polifenola. Time je potvrđena mogućnost primjene odabranih biljnih proteina kao nosača polifenola soka višnje u formuliranju dodataka hrani.

2. Vrsta proteinskog matriksa utječe na sposobnost vezanja polifenola soka višnje.

Rezultati su pokazali da vrsta proteinskog matriksa značajno utječe na količinu i selektivnost vezanja polifenola. Proteini badema pokazali su najveću sposobnost vezanja ukupnih polifenola i proantocijanidina, što se povezuje s većim udjelom aromatskih i hidrofobnih aminokiselina koje omogućuju formiranje više vodikovih i hidrofobnih interakcija s polifenolima. Kompleksi s proteinima riže imali su najviše koncentracije fenolnih kiselina (klorogenska, neoklorogenska, *p*-kumarinska i derivat *p*-kumarinske), što upućuje na selektivnost proteina riže prema spojevima s izraženijim polarnim karakterom. Kod proteina graška, koji sadrže veći udio globulina i manje aromatskih ostataka, najviše su koncentracije antocijana (cijanidin-3-glukozid-rutinozid, cijanidin-3-rutinozid), što ukazuje na sposobnost stvaranja elektrostatskih i vodikovih veza s antocijanima. Flavonoli (kvercetin i kvercetin-3-rutinozid) su se podjednako vezali za sve proteine. FTIR-ATR analiza je potvrdila različite interakcije među ispitivanim proteinima, čime je dokazano da struktura proteinskog matriksa određuje vrstu i količinu vezanih polifenola soka višnje.

3. Formulirani kompleksi posjeduju antioksidacijsku aktivnost.

Svi formulirani kompleksi pokazali su izraženu antioksidacijsku aktivnost određenu metodama DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC, čime je potvrđeno da vezani polifenoli zadržavaju sposobnost prijenosa elektrona i neutralizacije slobodnih radikala. Vrijednosti određene navedenim metodama razlikovale su se među kompleksima, što je u skladu s razlikama u količini i strukturi vezanih polifenola. Najviša antioksidacijska aktivnost određena većinom primijenjenih metoda (ABTS, FRAP, CUPRAC) utvrđena je u kompleksu s proteinima badema, dok su kompleksi s proteinima riže i graška imali manje vrijednosti. Takav redoslijed odgovara sadržaju ukupnih polifenola i proantocijanidina, što potvrđuje njihovu glavnu ulogu u antioksidacijskom odgovoru formuliranih kompleksa. Dobiveni rezultati dokazuju da formulirani kompleksi proteina i polifenola soka višnje posjeduju antioksidacijsku aktivnost te se mogu smatrati funkcionalnim dodacima hrani s antioksidacijskim svojstvima.

4. Vezanje polifenola soka višnje na proteine uzrokuje strukturne promjene proteina.

Rezultati FTIR-ATR analize pokazali su promjene u spektrima proteina nakon vezanja polifenola soka višnje, što ukazuje na nastanak interakcija i strukturnih promjena u proteinskom matriksu. U kompleksima su uočeni pomaci i promjene intenziteta vrpce u regijama Amid I i Amid II, što upućuje na promjene u udjelu α -heliksa i β -ploča te na reorganizaciju sekundarne strukture proteina. Osim toga, povećanje intenziteta u regiji rastezanja O-H i N-H veza povezana je s formiranjem vodikovih veza između hidroksilnih skupina polifenola i karboksilnih ili amino skupina proteina. U regiji od 900 do 700 cm^{-1} uočene su vrpce kod kompleksa koje nisu bile prisutne u IR spektrima biljnih proteina, što upućuje na specifične interakcije aromatskih struktura prisutnih u polifenolnim spojevima s proteinima tijekom kompleksiranja. Dobiveni rezultati potvrđuju da vezanje polifenola na proteine uzrokuje konformacijske promjene i stvaranje novih nekovalentnih interakcija, čime se mijenja sekundarna struktura proteinskog matriksa.

5. Vrsta proteinskog matriksa utječe na stabilnost polifenola, antioksidacijsku aktivnost i boju tijekom skladištenja kompleksa.

Rezultati su pokazali da vrsta proteinskog matriksa značajno utječe na stabilnost polifenola, antioksidacijsku aktivnost i boju tijekom skladištenja. Određeno je smanjenje sadržaja polifenola i antioksidacijske aktivnosti tijekom vremena, pri čemu su promjene izraženije u uzorcima skladištenim na svjetlu nego u onima u tami. Kompleksi s proteinima badema pokazali su najveću stabilnost ukupnih polifenola i proantocijanidina te najmanje smanjenje

antioksidacijske aktivnosti tijekom cijelog razdoblja skladištenja. Proteini riže pokazali su umjerenu stabilnost, osobito u očuvanju fenolnih kiselina i flavonola, dok su kompleksi s proteinima graška bili najosjetljiviji, što se očitovalo kroz veće gubitke antocijana i izraženije promjene boje. Promjene u parametrima boje bile su u skladu s degradacijom polifenola, pri čemu su kompleksi BP/V zadržali najstabilnije vrijednosti crvenog tona (a^*) i najmanje ukupne promjene boje (ΔE). Proteini badema imali su najveću sposobnost očuvanja polifenola, antioksidacijske aktivnosti i boje tijekom skladištenja, zatim proteini riže, dok su proteini graška pokazali najnižu stabilnost.

6. Vrsta proteinskog matriksa utječe na stabilnost polifenola, antioksidacijsku aktivnost i boju tijekom termičkog tretiranja kompleksa.

Rezultati su pokazali da vrsta proteinskog matriksa značajno utječe na stabilnost polifenola, antioksidacijsku aktivnost i boju tijekom termičkog tretiranja. U kompleksima vrijednosti ukupnih polifenola i proantocijanidina ostale su stabilne pri nižim temperaturama termičkog tretiranja, dok je pri višim temperaturama utvrđeno značajno smanjenje. Kompleksi s proteinima badema zadržali su najveće udjele ukupnih polifenola i proantocijanidina te najvišu antioksidacijsku aktivnost u većini primijenjenih metoda (ABTS, FRAP, CUPRAC). Proteini riže pokazali su umjerenu stabilnost, osobito u očuvanju fenolnih kiselina, dok su kompleksi s proteinima graška bili najosjetljiviji na povišene temperature, što se odrazilo na smanjenje sadržaja antocijana i izraženije promjene boje. Promjene u parametrima boje bile su u skladu s degradacijom polifenola, pri čemu su kompleksi BP/V zadržali najmanje promjene crvenog tona (a^*). Proteini badema pokazali su najveću sposobnost očuvanja polifenola, antioksidacijske aktivnosti i boje tijekom termičkog tretiranja, zatim proteini riže, dok su proteini graška pokazali najnižu stabilnost.

Dobiveni rezultati potvrdili su postavljene hipoteze i pokazali su da se biljni proteini badema, riže i graška mogu uspješno primijeniti kao nosači polifenola soka višnje u formuliranju stabilnih bioaktivnih dodataka hrani. Vrsta proteinskog matriksa određuje količinu i selektivnost vezanja polifenola te u velikoj mjeri utječe na njihovu stabilnost, antioksidacijsku aktivnost i boju tijekom skladištenja i termičkog tretiranja. Kompleksi s proteinima badema pokazali su najvišu sposobnost vezanja i očuvanja polifenola te najstabilniju boju i očuvanje antioksidacijske aktivnosti dok su proteini riže i graška ostvarili umjerenu odnosno nižu učinkovitost. Dobiveni rezultati potvrđuju potencijal primjene biljnih proteina kao učinkovitih

nosača polifenola u formuliranju funkcionalnih dodataka hrani s poboljšanim antioksidacijskim svojstvima i stabilnošću.

Ocjena rada u tijeku

7. LITERATURA

- Adams, J. B. (1973). Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100° C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(7), 747-762.
- Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Nutrition Reviews*, 65(9), 338-347.
- Agroklub (2023). Višnja. Dostupno na: <https://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/visnja-34/>
- Ahmadi, F., Suleria, H. A., Dunshea, F. R. (2025). Physicochemical Characterization, Storage Stability Behavior, and Intestinal Bioaccessibility of Clove Extract Encapsulated Using Varying Combinations of Gum Arabic and Maltodextrin. *Foods*, 14(2), 237.
- Ahrens, S., Venkatachalam, M., Mistry, A. M., Lapsley, K., Sathe, S. K. (2005). Almond (*Prunus dulcis* L.) protein quality. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60(3), 123-128.
- Aizpurua-Olaizola, O., Navarro, P., Vallejo, A., Olivares, M., Etxebarria, N., Usobiaga, A. (2016). Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Food Chemistry*, 190, 614-621.
- Alcázar Magaña, A., Kamimura, N., Soumyanath, A., Stevens, J. F., Maier, C. S. (2021). Caffeoylquinic acids: Chemistry, biosynthesis, occurrence, analytical challenges, and bioactivity. *The Plant Journal*, 107(5), 1299-1319.
- Ali, A., Chong, C. H., Mah, S. H., Abdullah, L. C., Choong, T. S. Y., Chua, B. L. (2018). Impact of storage conditions on the stability of predominant phenolic constituents and antioxidant activity of dried *Piper betle* extracts. *Molecules*, 23(2), 484.
- Alibekov, S. R., Aitbayeva, Z. A., Khamitova, M. B., Azimov, M. A., Sulaiman, A., Kamal, M. M. S., Taip, S. F. (2025). Effects of maltodextrin in freeze drying on the physical and functional properties of different type of milk powder. *Cogend Food and Agriculture*, 11(1), 2473540.
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., O'Mahony, J. A. (2017). Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 18-26.
- Amogne, N. Y., Ayele, D. W., Tsigie, Y. A. (2020). Recent advances in anthocyanin dyes extracted from plants for dye sensitized solar cell. *Materials for Renewable and Sustainable Energy*, 9(4), 23.

Anderle, G., Mendelsohn, R. (1987). Thermal denaturation of globular proteins. Fourier transform-infrared studies of the amide III spectral region. *Biophysical Journal*, 52(1), 69-74.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(5-6), 292-304.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4), 413-419.

Apak, R. (2018). Electron transfer-based antioxidant capacity assays and the cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay. *Measurement of antioxidant activity capacity: Recent Trends and Applications*, 57-75.

Arnao, M. B., Cano, A., Alcolea, J. F., Acosta, M. (2001). Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigment extracts. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 12(2), 138-143.

Azmi, N. M., Sian, A. T., Suhaimi, M., Alfarizal, K. (2021). Synthesis of indolostilbenes via FeCl₃ - promoted oxidative cyclisation and their biological effects on NG108-15 cell viability and H₂O₂-induced cytotoxicity. *Journal of Physical Science*, 32(1), 69-89.

B'chir, F., Arnaud, J. M. (2023). Chemical profile and extraction yield of essential oils from peel of Citrus limon, Citrus aurantium, and Citrus limetta: A review. *Studies in Natural Products Chemistry*, 79, 135-204.

Bačić, T., Sabo, M. (2007). Najvažnije medonosne biljke u Hrvatskoj. *Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek*. 140.

Bakowska-Barczak, A. M., Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1301-1309.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.

Barreca, D., Nabavi, S. M., Sureda, A., Rasekhian, M., Raciti, R., Silva, A. S., Mandalari, G. (2020). Almonds (*Prunus dulcis* Mill. D. A. Webb): A source of nutrients and health-promoting compounds. *Nutrients*, 12(3), 672.

Bayati, M., Poojary, M. M. (2025). Polyphenol autoxidation and prooxidative activity induce protein oxidation and protein-polyphenol adduct formation in model systems. *Food Chemistry*, 466, 142208.

Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. In *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (3-44). Woodhead Publishing.

Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

Benzie, I. F., Devaki, M. (2018). The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. *Measurement of antioxidant activity capacity: Recent Trends and Applications*, 77-106.

Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety - Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.

Bińkowska, W., Szpicer, A., Stelmasiak, A., Wojtasik-Kalinowska, I., Półtorak, A. (2024). Microencapsulation of Polyphenols and Their Application in Food Technology. *Applied Sciences*, (2076-3417), 14(24).

Bobrysheva, T. N., Anisimov, G. S., Zolotoreva, M. S., Evdokimov, I. A., Budkevich, R. O., Muravyev, A. K. (2025). Encapsulated polyphenols in functional food production. *Foods and Raw Materials*, 13(1), 18-34.

- Bork, L. V., Rohn, S., Kanzler, C. (2022). Characterization of colorants formed by non-enzymatic browning reactions of hydroxycinnamic acid derivatives. *Molecules*, 27(21), 7564.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Breternitz, N. R., Bolini, H. M. A., Hubinger, M. D. (2017). Sensory acceptance evaluation of a new food flavoring produced by microencapsulation of a mussel (*Perna perna*) protein hydrolysate. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 141-149.
- Bridelli, M. G. (2017). Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated biological macromolecules. *Fourier Transforms-High-Tech Application and Current Trends*, 191-213.
- Brudzynski, K., Maldonado-Alvarez, L. (2015). Polyphenol-protein complexes and their consequences for the redox activity, structure and function of honey. A current view and new hypothesis: A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 65(2).
- Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S., Kroh, L. W. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 20(21), 3229-3235.
- Buljeta, I., Pichler, A., Šimunović, J., Kopjar, M. (2022). Polysaccharides as carriers of polyphenols: Comparison of freeze-drying and spray-drying as encapsulation techniques. *Molecules*, 27(16), 5069.
- Buljeta, I., Pichler, A., Ivić, I., Šimunović, J., Kopjar, M. (2021a). Encapsulation of fruit flavor compounds through interaction with polysaccharides. *Molecules*, 26(14), 4207.
- Buljeta, I., Pichler, A., Šimunović, J., Kopjar, M. (2021b). Polyphenols and antioxidant activity of citrus fiber/blackberry juice complexes. *Molecules*, 26(15), 4400.
- Bąkowska, A., Kucharska, A. Z., Oszmiański, J. (2003). The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, 81(3), 349-355.

Bąkowska-Barczak, A. (2005). Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants: A review, 107-116.

Cao, H., Saroglu, O., Karadag, A., Diaconeasa, Z., Zoccatelli, G., Conte-Junior, C. A. Xiao, J. (2021). Available technologies on improving the stability of polyphenols in food processing. Food Frontiers, 2(2), 109-139.

Capanoglu, E., Boyacioglu, D., de Vos, R. C., Hall, R. D., Beekwilder, J. (2011). Procyanidins in fruit from Sour cherry (*Prunus cerasus*) differ strongly in chainlength from those in Laurel cherry (*Prunus lauracerasus*) and Cornelian cherry (*Cornus mas*). Journal of Berry Research, 1(3), 137-146.

Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry, 113(4), 859-871.

Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. Food Research International, 44(2), 499-509.

Cemeroglu, B., Velioglu, S., Isik, S. (1994). Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. Journal of Food Science, 59(6), 1216-1218.

Chaaban, H., Ioannou, I., Chebil, L., Slimane, M., Gérardin, C., Paris, C., Ghoul, M. (2017). Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. Journal of Food Processing and Preservation, 41(5), e13203.

Chandra, A., Nair, M. G. (1993). Quantification of benzaldehyde and its precursors in Montmorency cherry (*Prunus cerasus* L.) kernels. Phytochemical Analysis, 4(3), 120-123.

Chaovanalikit, A., Wrolstad, R. E. (2004). Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. Journal of Food Science, 69(1), 67-72.

Choudhury, N., Meghwal, M., Das, K. (2021). Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods. Food Frontiers, 2, 426-443.

Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 12, 10815-10837

Coelho, K. Y., de Oliveira, A. A., Brumano, M. H. N., Fidelis, P. C. (2020). Stability of total phenolic and antioxidant capacity in ready-to-drink black and green tea formulations. *Research, Society and Development*, 9(10), e219108160-e219108160.

Cozmuta, A. M., Peter, A., Nicula, C., Jastrzębska, A., Jakubczak, M., Purbayanto, M. A. K., Cozmuta, L. M. (2024). The impact of visible light component bands on polyphenols from red grape seed extract powder encapsulated in alginate-whey protein matrix. *Food Chemistry: X*, 23, 101758.

Creative - Proteomics (2024). What are Protein Structure.

Dostępno na: <https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/resource-what-are-protein-structure.html>

Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (2006). *Plant secondary metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell-Publishers.

Dawidowicz, A. L., Typek, R. (2017). Transformation of chlorogenic acids during the coffee beans roasting process. *European Food Research and Technology*, 243(3), 379-390.

de Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 127535.

De Castro, M. D. L., García, J. L. L. (2002). *Acceleration and automation of solid sample treatment* (Vol. 24). Elsevier.

De Matos, M.F., Rasea, B.G., Janser, R. (2023). Insects as a sustainable source of emerging proteins and their processing to obtain bioactive compounds: an updated review. *Sustainable Food Technology*, 2(1), 1-31.

De Paepe, D., Valkenburg, D., Coudijzer, K., Noten, B., Servaes, K., De Loose, M., Van Droogenbroeck, B. (2014). Thermal degradation of cloudy apple juice phenolic constituents. *Food Chemistry*, 162, 176-185.

De Taeye, C., Kankolongo Cibaka, M. L., Jerkovic, V., Collin, S. (2014). Degradation of (-)-epicatechin and procyanidin B2 in aqueous and lipidic model systems. First evidence of “chemical” flavan-3-ol oligomers in processed cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(36), 9002-9016.

Deng, J., Yang, H., Capanoglu, E., Cao, H., Xiao, J. (2018). Technological aspects and stability of polyphenols. In *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (295-323). Woodhead Publishing.

Desai, K. G. H., Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394.

Dhakal, S. P., He, J. (2020). Microencapsulation of vitamins in food applications to prevent losses in processing and storage: A review. *Food Research International*, 137, 109326.

Dobson, C. C., Mottawea, W., Rodrigue, A., Buzati Pereira, L. B., Hammami, R., Power, A. K., Bordenave, N. (2019). Impact of molecular interactions with phenolic compounds on food polysaccharides functionality. *Advances in Food and Nutrition Research*, 90, 135-181.

Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221-2243.

Eghbal, N., Liao, W., Dumas, E., Azabou, E., Dantigny, P., Gharsallaoui, A. (2022). Microencapsulation of Natural Food Antimicrobials: Methods and Applications. *Applied Sciences*. 12(8), 3837.

El Gamal, R., Song, C., Rayan, A. M., Liu, C., Al-Rejaie, S., El Masry, G. (2023). Thermal degradation of bioactive compounds during drying process of horticultural and agronomic products: A comprehensive overview. *Agronomy*, 13(6), 1580.

Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T. D., Stănilă, A., Diaconeasa, Z. (2021). Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. *Antioxidants*, 10(12), 1967.

Fahrurrozi, M., Wirawan, S. K. (2016). Microencapsulation technology of ginger oleoresin with chitosan as wall material: A review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(12), 209-223.

Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(10), 510-523.

Feng, Y., Jin, C., Lv, S., Zhang, H., Ren, F., Wang, J. (2023). Molecular mechanisms and applications of polyphenol-protein complexes with antioxidant properties: A review. *Antioxidants*, 12(8), 1577.

Ferretti, G., Bacchetti, T., Belleggia, A., Neri, D. (2010). Cherry antioxidants: From farm to table. *Molecules*, 15(10), 6993-7005.

Foti, M. C. (2007). Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12), 1673-1685.

Friedman, M., Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2101-2110.

Grace, M.H., Guzman, I., Roopchand, D.E., Moskal, K., Cheng, D.M., Pogrebnyak, N., Raskin, I., Howell, A., Lila, M.A. (2013). Stable binding of alternative protein-enriched food matrices with concentrated cranberry bioflavonoids for functional food applications. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61, 6856-6864.

Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Bucić-Kojić, A. (2020). Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants*, 9(10), 923.

Gullifa, G., Risoluti, R., Mazzoni, C., Barone, L., Papa, E., Battistini, A., Fragus, F.M., Materazzi, S. (2023). Microencapsulation by a Spray Drying Approach to Produce Innovative Probiotics-Based Products Extending the Shelf-Life in Non-Refrigerated Conditions. *Molecules*, 28(2), 860.

Häkkinen, S. H., Törrönen, A. R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33(6), 517-524.

Han, Z., Zhu, M., Wan, X., Zhai, X., Ho, C. T., Zhang, L. (2024). Food polyphenols and Maillard reaction: regulation effect and chemical mechanism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(15), 4904-4920.

Han, X., Shen, T., Lou, H., (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8, 950-988.

Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R., Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 126(2), 630-639.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.

- Hong, T., Yin, J. Y., Nie, S. P., Xie, M. Y. (2021). Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective. *Food Chemistry*: X, 12, 100168.
- Hosseini, H., Tajjani, Z., Jafari, S. M. (2019). Improving the shelf-life of food products by nano/micro-encapsulated ingredients. In *Food quality and shelf life* (159-200). Academic Press.
- Howell, N. K., Arteaga, G., Nakai, S., Li-Chan, E. C. (1999). Raman spectral analysis in the C-H stretching region of proteins and amino acids for investigation of hydrophobic interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 924-933.
- Huang, X., Xia, B., Liu, Y., Wang, C. (2024). Non-covalent interactions between rice protein and three polyphenols and potential application in emulsions. *Food Chemistry*: X, 22, 101459.
- Huelsebusch, L., Heyn, T. R., Amft, J., Schwarz, K. (2025). Extrusion of plant proteins: A review of lipid and protein oxidation and their impact on functional properties. *Food Chemistry*, 470, 142607.
- Ifie, I., Marshall, L. J. (2018). Food processing and its impact on phenolic constituents in food. *Cogent Food and Agriculture*, 4(1), 1507782.
- Inns, E. L., Bugey, L. A., Booer, C., Nursten, H. E., Ames, J. M. (2007). Effect of heat treatment on the antioxidant activity, color, and free phenolic acid profile of malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6539-6546.
- Ioannou, I., Chekir, L., Ghoul, M. (2020). Effect of heat treatment and light exposure on the antioxidant activity of flavonoids. *Processes*, 8(9), 1078.
- Islam, F., Amer Ali, Y., Imran, A., Afzaal, M., Zahra, S. M., Fatima, M., Shah, M. A. (2023). Vegetable proteins as encapsulating agents: Recent updates and future perspectives. *Food Science and Nutrition*, 11(4), 1705-1717.
- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 34-60.
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556-567.

- Jawad, M., Talcott, S. T., Hillman, A. R., Brannan, R. G. (2025). A Comprehensive Polyphenolic Characterization of Five Montmorency Tart Cherry (*Prunus cerasus* L.) Product-Formulations. *Foods*, 14(7), 1154.
- Jayaprakash, G., Bains, A., Chawla, P., Fogarasi, M., Fogarasi, S. (2022). A narrative review on rice proteins: Current scenario and food industrial application. *Polymers*, 14(15), 3003.
- Jeong, S. M., Kim, S. Y., Kim, D. R., Jo, S. C., Nam, K. C., Ahn, D. U., Lee, S. C. (2004). Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3389-3393.
- Jia, X., Ning, X., Li, W. L., Deng, Q. C., Yu, X., Cheng, C., Zhou, Q. (2019). Non-covalent interaction between almond protein and sinapic acid: impact on protein structure and antioxidant activity.
- Jia, L., Wang, J., Wang, Y., Wang, C. (2021). Interaction of almond protein with phenolic acids: Binding mechanism and improvement of antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 364, 130371.
- Jurasekova, Z., Domingo, C., García-Ramos, J. V., Sánchez-Cortés, S. (2014). Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(25), 12802-12811.
- Kadalkal, Ç., Duman, T. (2018). Thermal degradation kinetics of rutin and total phenolic compounds in rosehip (*Rosa canina* L.) nectar. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 24(7), 1370-1375.
- Kara, Ş., Erçelebi, E. A. (2013). Thermal degradation kinetics of anthocyanins and visual colour of Urmu mulberry (*Morus nigra* L.). *Journal of Food Engineering*, 116(2), 541-547.
- Karaaslan, N. M., Yaman, M. (2016). Determination of anthocyanins in cherry and cranberry by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 242(1), 127-135.
- Kawakatsu, T., Takaiwa, F. (2019). Rice proteins and essential amino acids. In *Rice* (109-130). AACC International Press.
- Kazazić, S. P. (2004). Antioksidacijska, antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 55(4), 279-290.

Kelemen, V., Pichler, A., Ivic, I., Buljeta, I., Simunovic, J. Kopjar, M. (2022). Brown rice proteins as delivery system of phenolic and volatile compounds of raspberry juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 57, 1866-1874.

Khalesi, M., FitzGerald, R. J. (2021). In vitro digestibility and antioxidant activity of plant protein isolate and milk protein concentrate blends. *Catalysts*, 11(7), 787.

Khuwijitjaru, P., Plernjit, J., Suaylam, B., Samuhaseneetoo, S., Pongsawatmanit, R., Adachi, S. (2014). Degradation kinetics of some phenolic compounds in subcritical water and radical scavenging activity of their degradation products. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 92(5), 810-815.

Kieserling, H., de Bruijn, W. J., Keppler, J., Yang, J., Sagu, S. T., Güterbock, D., Rohn, S. (2024). Protein-phenolic interactions and reactions: Discrepancies, challenges, and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(5), e70015.

Kiokias, S., Oreopoulou, V. (2021). A review of the Health Protective Effects of Phenolic Acids against a Range of Severe Pathologic Conditions (Including Coronavirus-Based Infections). *Molecules*, 26(17), 5405.

Kondaveeti, S., Petri, D. F., Jeong, H. E. (2022). Efficiency of air-dried and freeze-dried alginate/xanthan beads in batch, recirculating and column adsorption processes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 204, 345-355.

Kong, J., Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.

Kopjar, M., Piližota, V., Šubarić, D., Babić, J. (2009). Prevention of thermal degradation of red currant juice anthocyanins by phenolic compounds addition. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1(1), 24-30.

Kopjar, M., Buljeta, I., Ćorković, I., Kelemen, V., Šimunović, J., Pichler, A. (2021). Encapsulation of cinnamic acid on plant-based protein matrices: Evaluation by HPLC, DSC and FTIR-ATR. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(1), 728-737.

Kopjar, M., Buljeta, I., Ćorković, I., Kelemen, V., Šimunović, J., Pichler, A. (2022). Plant-based proteins as encapsulating materials for glucosyl-hesperidin. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(1), 728-737.

- Kopjar, M., Buljeta, I., Ćorković, I., Pichler, A., Šimunović, J. (2022). Adsorption of quercetin on brown rice and almond protein matrices: Effect of quercetin concentration. *Foods*, 11(6), 793.
- Kopjar, M., Buljeta, I., Ćorković, I., Kelemen, V., Pichler, A., Ivić, I., Šimunović, J. (2023). Dairy-protein-based aggregates as additives enriched with tart cherry polyphenols and flavor compounds. *Foods*, 12, 2104.
- Kumar, M. Tomar, M. Potkule, J. Verma, R. Punia, S. Mahapatra, A. Belwal, T., Dahuja, A. Joshi, S. Berwal, M. K. (2021). Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. *Food Hydrocolloids*, 115, 106595.
- Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T., Nickerson, M. T. (2018). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34(2), 126-147.
- Lang, Y., Gao, N., Zang, Z., Meng, X., Lin, Y., Yang, S., Li, B. (2024). Classification and antioxidant assays of polyphenols: A review. *Journal of Future Foods*, 4(3), 193-204.
- Langyan, S., Yadava, P., Khan, N. F., Dar, A. Z., Singh, R., Kumar, A. (2022). Sustaining Protein Nutrition Through Plant-Based Foods. *Frontiers in Nutrition*. 8, 772573.
- LaPelusa, A., Kaushik, R. (2022). Physiology, Proteins. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555990/>
- Larkin, P. (2017). *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier.
- Lešnik, S., Jukić, M., Bren, U. (2025). Unveiling polyphenol-protein interactions: a comprehensive computational analysis. *Journal of Cheminformatics*, 17(1), 50.
- Li, S., Geng, F., Wang, P., Lu, J., Ma, M. (2016). Proteome analysis of the almond kernel (*Prunus dulcis*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(10), 3351-3357.
- Li, J., Wang, B., He, Y., Wen, L., Nan, H., Zheng, F., Zhang, H. (2021). A review of the interaction between anthocyanins and proteins. *Food Science and Technology International*, 27(5), 470-482.

- Li, M., Ritzoulis, C., Du, Q., Liu, Y., Ding, Y., Liu, W., Liu, J. (2022). Recent progress on protein-polyphenol complexes: Effect on stability and nutrients delivery of oil-in-water emulsion system. *Frontiers in Nutrition*, 8, 765589.
- Li, J., Wang, B., He, Y., Wen, L., Nan, H., Zheng, F., Liu, H., Lu, S., Wu, M., Zhang, H. (2023). A review of the interaction between anthocyanins and proteins. *Food Chemistry*, 417, 135881.
- Liang, L., Liu, Y., Wu, L., Weng, L., Qiu, H., Zhong, W., Meng, F. (2024). Advances in extraction protocols, degradation methods, and bioactivities of proanthocyanidins. *Molecules*, 29(10), 2179.
- Liao, W., Fan, H., Liu, P., Wu, J. (2019). Identification of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) up-regulating peptides from pea protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 60, 103395.
- Lin, C., Zhang, M., Wang, Y., Li, S., Huang, X., Xu, J., Pan, S. (2021). Combustion of Laser-induced individual magnesium microparticles under natural convection. *Processes*, 9(8), 1276.
- Liu, J., Yong, H., Yao, X., Hu, H., Yun, D., Xiao, L. (2019). Recent advances in phenolic-protein conjugates: Synthesis, characterization, biological activities and potential applications. *RSC Advances*, 9(61), 35825-35840.
- Liu, K., Zheng, J., Chen, F. (2021). Heat-induced changes in the physicochemical properties and in vitro digestibility of rice protein fractions. *Journal of Food Science and Technology*, 58(4), 1368-1377.
- Lončarić, A., Pichler, A., Trtinjak, I., Piližota, V., Kopjar, M. (2016). Phenolics and antioxidant activity of freeze-dried sour cherry puree with addition of disaccharides. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 391-396.
- Lopez, J. M., Mohiuddin, S. S. (2024). *Biochemistry, Essential Amino Acids*. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK557845/>
- Losso, J. N., Finley, J. W., Karki, N., Liu, A. G., Prudente, A., Tipton, R., Greenway, F. L. (2018). Pilot study of the tart cherry juice for the treatment of insomnia and investigation of mechanisms. *American Journal of Therapeutics*, 25(2), e194-e201.

Loypimai, P., Moongngarm, A., Chottanom, P. (2016). Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 461-470.

Lu, B., Zhao, Y. (2017). Photooxidation of phytochemicals in food and control: A review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1398(1), 72-82.

Lu, Z. X., He, J. F., Zhang, Y. C., Bing, D. J. (2020). Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(15), 2593-2605.

Luca, A., Cilek, B., Hasirci, V., Sahin, S., Sumnu, G. (2014). Storage and baking stability of encapsulated sour cherry phenolic compounds prepared from micro-and nano-suspensions. *Food and Bioprocess Technology*, 7(1), 204-211.

Maghsoudlou, Y., Asghari Ghajari, M., Tavasoli, S. (2019). Effects of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of quince fruit and its tisane's sensory properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(5), 2365-2372.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

Manjanna, K. M., Shivakumar, B., Kumar Pramod, T. M. (2010). Microencapsulation: An Acclaimed Novel Drug-Delivery System for NSAIDs in Arthritis. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 27(6), 501-532.

Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M. C., Lerici, C. R. (2000). Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science and Technology*, 11(9-10), 340-346.

Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., Silva, P. (2020). Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules*, 25(17), 3809.

Mayta-Apaza, A. C. (2018). Evaluation of The Impact of Tart Cherries Polyphenols on The Human Gut Microbiota and Phenolic Metabolites In Vitro and In Vivo. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 59, 160-172.

- Mazár, J., Albert, K., Kovács, Z., Koris, A., Nath, A., Bánvölgyi, S. (2025). Advances in spray-drying and freeze-drying Technologies for the Microencapsulation of instant tea and herbal powders: The role of wall materials. *Foods*, 14(3), 486.
- Mehta, N., Kumar, P., Verma, A. K., Umaraw, P., Kumar, Y., Malav, O. P., Lorenzo, J. M. (2022). Microencapsulation as a noble technique for the application of bioactive compounds in the food industry: A comprehensive review. *Applied Sciences*, 12(3), 1424.
- Mercali, G. D., Jaeschke, D. P., Tessaro, I. C., Marczak, L. D. F. (2013). Degradation kinetics of anthocyanins in acerola pulp: Comparison between ohmic and conventional heat treatment. *Food Chemistry*, 136(2), 853-857.
- Moser, P., Telis, V. R. N., de Andrade Neves, N., García-Romero, E., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I. (2017). Storage stability of phenolic compounds in powdered BRS Violeta grape juice microencapsulated with protein and maltodextrin blends. *Food Chemistry*, 214, 308-318.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., ur Rehman, D. I. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134-179.
- Mrduljaš, N., Krešić, G., Bilušić, T. (2017). Polyphenols: Food sources and health benefits. *Functional food-improve health through adequate food*, 23-41.
- Mudgil, D., Barak, S. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 1-6.
- Munin, A. I Edwards-Levy, F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds: A review. *Pharmaceutics*, 2(4), 793-829.
- Munteanu, I. G., Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
- Murray, J.E., Laurieri, N., Delgoda, R. (2017). Proteins. *Pharmacognosy - Fundamentals, Applications and Strategies*. 477-494.
- Nagy, K., Courtet-Compondu, M. C., Williamson, G., Rezzi, S., Kussmann, M., Rytz, A. (2012). Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence. *Food Chemistry*, 132(3), 1333-1339.

Nayak, B., Liu, R. H., Tang, J. (2015). Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(7), 887-918.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.

Nguyen, D. M., Zhang, Z., Doherty, W. O. (2015). Degradation of hydroxycinnamic acid mixtures in aqueous sucrose solutions by the Fenton process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(5), 1582-1592.

Nowak, D., Jakubczyk, E. (2020). The freeze-drying of foods - The characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials. *Foods*, 9(10), 1488.

Oancea, A. M., Turturică, M., Bahrim, G., Râpeanu, G., Stănciuc, N. (2017). Phytochemicals and antioxidant activity degradation kinetics during thermal treatments of sour cherry extract. *LWT-Food Science and Technology*, 82, 139-146

Oancea, A. M., Onofrei, C., Turturică, M., Bahrim, G., Râpeanu, G., Stănciuc, N. (2018). The kinetics of thermal degradation of polyphenolic compounds from elderberry (*Sambucus nigra* L.) extract. *Food Science and Technology International*, 24(4), 361-369.

Oancea, S. (2021). A review of the current knowledge of thermal stability of anthocyanins and approaches to their stabilization to heat. *Antioxidants*, 10(9), 1337.

Oancea, A. M., Aprodu, I., Ghinea, I. O., Barbu, V., Ioniță, E., Bahrim, G., Stănciuc, N. (2017a). A bottom-up approach for encapsulation of sour cherries anthocyanins by using β -lactoglobulin as matrices. *Journal of Food Engineering*, 210, 83-90.

Ochoa, M. R., Kessler, A. G., De Michelis, A., Mugridge, A., Chaves, A. R. (2001). Kinetics of color change of raspberry, sweet (*Prunus avium*) and sour (*Prunus cerasus*) cherries preserves packed in glass containers: light and room temperature effects. *Journal of Food Engineering*, 49(1), 55-62.

Oliver, S., Vittorio, O., Cirillo, G., Boyer, C. (2016). Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules. *Polymer Chemistry*, 7, 1529-1544

Olszowy, M. (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 135-143.

Ozdal, T., Capanoglu, E., Altay, F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954-970.

Ozdal, T., Yalcinkaya, İ. E., Toydemir, G., Çapanoglu, E. (2019). Polyphenol-protein interactions and changes in functional properties and digestibility. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 566-577.

Ozturk, E., Temiz, U. (2018). Encapsulation Methods and Use in Animal Nutrition. *Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences*, 32(3), 624-631.

Paik, D., Lee, H., Kim, H., Choi, J. M. (2022). Thermodynamics of π - π Interactions of Benzene and Phenol in Water. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9811.

Palzer, S., Dubois, C., Gianfrancesco, A. (2011). Generation of Product Structures During Drying of Food Products. *Drying Technology*, 30(1), 97-105.

Pasquet, P. L., Julien-David, D., Zhao, M., Villain-Gambier, M., Trébouet, D. (2024). Stability and preservation of phenolic compounds and related antioxidant capacity from agro-food matrix: Effect of pH and atmosphere. *Food Bioscience*, 57, 103586.

Pathare, P. B., Opara, U. L., Al-Said, F. A. J. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36-60.

Phillips, G. O. W. P. A. (2011). *Handbook of food proteins*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, Philadelphia.

Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P. (2021). How does the phenol structure influence the results of the Folin-Ciocalteu assay? *Antioxidants*, 10(5), 811.

Prior, R. L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M. J., Reed, J. (2010). Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1473-1478.

Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.

Pérez, M., Dominguez-López, I., Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The chemistry behind the Folin-Ciocalteu method for the estimation of (poly) phenol content in food: Total phenolic intake in a mediterranean dietary pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543-17553.

Rathod, N. B., Elabed, N., Punia, S., Ozogul, F., Kim, S. K., Rocha, J. M. (2023). Recent developments in polyphenol applications on human health: A review with current knowledge. *Plants*, 12(6), 1217.

Ratti, C. (2013). Freeze drying for food powder production. *Food Science, Technology and Nutrition*, 57-84.

Ravber, M., Pečar, D., Goršek, A., Iskra, J., Knez, Z., Škerget, M. (2016). Hydrothermal degradation of rutin: Identification of degradation products and kinetics study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(48), 9196-9202.

Rawel, H. M., Rohn, S. (2010). Nature of hydroxycinnamate-protein interactions. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 93-109.

Rein, M. J. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. (Doctoral dissertation, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Food Chemistry, University of Helsinki).

Reinkensmeier, A., Bußler, S., Schlüter, O., Rohn, S., Rawel, H. M. (2015). Characterization of individual proteins in pea protein isolates and air classified samples. *Food Research International*, 76, 160-167.

Rezagholidade-Shirvan, A., Soltani, M., Shokri, S., Radfar, R., Arab, M., Shamloo, E. (2024). Bioactive compound encapsulation: Characteristics, applications in food systems, and implications for human health. *Food Chemistry: X*, 24, 101953.

Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., Askari, G. (2019). Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Drying Technology*, 38(1-2), 235-258.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.

Rocha-Parra, D. F., Lanari, M. C., Zamora, M. C., Chirife, J. (2016). Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and color of freeze-dried encapsulated red wine. *LWT-Food Science and Technology*, 70, 162-170.

Rohn, S., Buchner, N., Driemel, G., Rauser, M., Kroh, L. W. (2007). Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1568-1573.

Roopchand, D. E., Grace, M. H., Kuhn, P., Cheng, D. M., Plundrich, N., Poulev, A., Raskin, I. (2012). Efficient sorption of polyphenols to soybean flour enables natural fortification of foods. *Food Chemistry*, 131(4), 1193-1200.

Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., Devi, R. (2022). Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism (s) of action. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 806470.

Saborirad, S., Baghaei, H., Hashemi-Moghaddam, H. (2024). Optimizing the ultrasonic extraction of polyphenols from mango peel and investigating the characteristics, antioxidant activity and storage stability of extract nanocapsules in maltodextrin/whey protein isolate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 103, 106778.

Sabou, V. R., O'Leary, M. F., Liu, Y., Brown, P. N., Murch, S., Bowtell, J. L. (2021). Review of analytical methods and reporting of the polyphenol content of tart cherry supplements in human supplementation studies investigating health and exercise performance effects: recommendations for good practice. *Frontiers in Nutrition*, 8, 652094.

Sadat, A., Joye, I. J. (2020). Peak fitting applied to fourier transform infrared and raman spectroscopic analysis of proteins. *Applied Sciences*, 10(17), 5918.

Sadilova, E., Stintzing, F. C., Carle, R. (2006). Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *Journal of Food Science*, 71(8), C504-C512.

Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F. C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(12), 1461-1471

Sadowska-Bartos, I., Bartosz, G. (2024). Antioxidant activity of anthocyanins and anthocyanidins: a critical review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 12001.

Salazar-Orbea, G. L., Garcia-Villalba, R., Bernal, M. J., Hernandez-Jimenez, A., Egea, J. A., Tomas-Barberan, F. A., Sanchez-Siles, L. M. (2023). Effect of storage conditions on the stability of polyphenols of apple and strawberry purees produced at industrial scale by different processing techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(5), 2541-2553.

Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130, 2073S-2085S.

Schulze, B., Hubbermann, E. M., Schwarz, K. (2014). Stability of quercetin derivatives in vacuum impregnated apple slices after drying (microwave vacuum drying, air drying, freeze drying) and storage. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 426-433.

Seeram, N. P., Bourquin, L. D., Nair, M. G. (2001). Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4924-4929.

Sendri, N., Singh, S., Bhatt, S., Gupta, M., Bhandari, P. (2023). Insight into the influence of oxygen, sunlight and temperature on the stability and color attributes of red cabbage anthocyanins and in vitro gastrointestinal behaviour. *Food Chemistry Advances*, 3, 100359

Serradilla, M. J., Hernández, A., López-Corrales, M., Ruiz-Moyano, S., de Guía Córdoba, M., Martín, A. (2016). Composition of the cherry (*Prunus avium* L. and *Prunus cerasus* L.; *Rosaceae*). In *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (127-147). Elsevier.

Shah, A., Smith, D. L. (2020). Flavonoids in agriculture: chemistry and roles in, biotic and abiotic stress responses, and microbial associations. *Agronomy*, 10(8), 1209.

Shanthakumar, P., Klepacka, J., Bains, A., Chawla, P., Dhull, B.S., Najda, A. (2022). The Current Situation of Pea Protein and Its Application in the Food Industry. *Molecules*, 27, 5354.

Shinzawa, H., Turner, B., Mizukado, J., Kazarian, S. G. (2017). Protein hydration in living cells probed by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic imaging. *Analyst*, 142(13), 2475-2483.

Shurvell, H. F. (2006). Spectra-structure correlations in the mid-and far-infrared. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 3, 1783-1816.

Siddiq, M., Iezzoni, A., Khan, A., Breen, P., Sebolt, A. M., Dolan, K. D., Ravi, R. (2011). Characterization of new tart cherry (*Prunus cerasus* L.): selections based on fruit quality, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *International Journal of Food Properties*, 14(2), 471-480.

Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. (2005). *Silverstein-spectrometric identification of organic compounds* 7th ed. State University of New York, College of Environmental Science and Forestry.

Singh, B. R., DeOliveira, D. B., Fu, F. N., Fuller, M. P. (1993). Fourier transform infrared analysis of amide III bands of proteins for the secondary structure estimation. In *Biomolecular Spectroscopy III* (Vol. 1890, 47-55).

Singh, B. R. (2000). Basic aspects of the technique and applications of infrared spectroscopy of peptides and proteins.

Singla, K.R., Dubey, K.A., Garg, A., Sharma, K.R., Fiorino, M., Ameen, M.S., Haddad, A.M., Al-Hiary, M. (2019). Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC International*, 103(5), 1397-1400.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*, Vol. 299, 152-178. Academic Press.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Stani, C., Vaccari, L., Mitri, E., Birarda, G. (2020). FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: New insight into the amide III band. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 229, 118006.

Strauch, R. C., Lila, M. A. (2021). Pea protein isolate characteristics modulate functional properties of pea protein-cranberry polyphenol particles. *Food Science and Nutrition*, 9(7), 3740-3751.

Stănciuc, N., Râpeanu, G. (2019). Kinetics of phytochemicals degradation during thermal processing of fruits beverages. In *Non-alcoholic beverages* (407-440). Woodhead Publishing.

Sun, X., Sarteshnizi, R. A., Udenigwe, C. C. (2022). Recent advances in protein-polyphenol interactions focusing on structural properties related to antioxidant activities. *Current Opinion in Food Science*, 45, 100840.

Sęczyk, Ł., Świeca, M., Kapusta, I., Gawlik-Dziki, U. (2019). Protein-phenolic interactions as a factor affecting the physicochemical properties of white bean proteins. *Molecules*, 24(3), 408.

Szalóki-Dorkó, L., Végvári, G., Ladányi, M., Ficzek, G., Stéger-Máté, M. (2015). Degradation of anthocyanin content in sour cherry juice during heat treatment. *Food Technology and Biotechnology*, 53(3), 354.

Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*, 10(1), 118.

Šregelj, V., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Šaponjac, V. T., Vulić, J., Stajčić, S. (2020). Encapsulation and degradation kinetics of bioactive compounds from sweet potato peel during storage. *Food Technology and Biotechnology*, 58(3), 314.

Tarahi, M., Gharagozlou, M., Niakousari, M., Hedayati, S. (2024). Protein-chlorogenic acid interactions: mechanisms, characteristics, and potential food applications. *Antioxidants*, 13(7), 777.

Tarone, A. G., Cazarin, C. B. B., Junior, M. R. M. (2020). Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. *Food Research International*, 133, 109092.

Tazeddinova, D., Rahman, M. R., Hamdan, S. B., Matin, M. M., Bakri, M. B., Rahman, M. M. (2022). Plant based polyphenol associations with protein: A prospective review. *BioResources*, 17(4), 7110.

Tomás-Barberán, F. A., Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 80, 1024-1032.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.

Tumilaar, S. G., Hardianto, A., Dohi, H., Kurnia, D. (2024). A comprehensive review of free radicals, oxidative stress, and antioxidants: Overview, clinical applications, global perspectives, future directions, and mechanisms of antioxidant activity of flavonoid compounds. *Journal of Chemistry*, 2024(1), 5594386.

Velderrain-Rodríguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C. Y., Robles-Sánchez, M., Astiazaran-García, H., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G. A. (2014). Phenolic compounds: Their journey after intake. *Food and Function*, 5, 189-197.

Vennat, B., Bos, M. A., Pourrat, A., Bastide, P. (1994). Procyanidins from tormentil: Fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17, 1613-1615.

Vermerris, W., Nicholson, R. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer.

Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230-235.

Wang, J., Zhao, X. H. (2016). Degradation kinetics of fisetin and quercetin in solutions affected by medium pH, temperature and co-existed proteins. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 81(3), 243-253.

Wang, Y., Singh, A. P., Hurst, W. J., Glinski, J. A., Koo, H., Vorsa, N. (2016). Influence of degree-of-polymerization and linkage on the quantification of proanthocyanidins using 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(11), 2190-2199.

Warnakulasuriya, S. N., Nickerson, M. T. (2018). Review on plant protein-polysaccharide complex coacervation, and the functionality and applicability of formed complexes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(15), 5559-5571.

Weiskirchen, S., Weiskirchen, R. (2016). Resveratrol: how much wine do you have to drink to stay healthy? *Advances in Nutrition*, 7(4), 706-718.

West, M. E., Mauer, L. J. (2013). Color and chemical stability of a variety of anthocyanins and ascorbic acid in solution and powder forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4169-4179.

Wianowska, D., Gil, M. (2019). Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 273-302.

Widłak, W. (2013). Protein structure and function. In *Molecular biology: not only for bioinformaticians* (15-29). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Wilkes, K., Howard, L. R., Brownmiller, C., Prior, R. L. (2014). Changes in chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) polyphenols during juice processing and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 4018-4025.

Wojdyło, A., Nowicka, P., Laskowski, P., Oszmiański, J. (2014). Evaluation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) fruits for their polyphenol content, antioxidant properties, and nutritional components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(51), 12332-12345.

Wojdyło, A., Nowicka, P., Teleszko, M. (2019). Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry cloudy juices at different storage temperature. *Processes*, 7(6), 367.

Wongsa, P., Phatikulrungsun, P., Prathumthong, S. (2022). FT-IR characteristics, phenolic profiles and inhibitory potential against digestive enzymes of 25 herbal infusions. *Scientific Reports*, 12(1), 6631.

Wyspiańska, D., Kucharska, A. Z., Sokół-Łętowska, A., Kolniak-Ostek, J. (2019). Effect of microencapsulation on concentration of isoflavones during simulated in vitro digestion of isotonic drink. *Food Science and Nutrition*, 7(2), 805-816.

Xu, G., Ye, X., Chen, J., Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 330-335.

Xu, Z., Wei, L. H., Ge, Z. Z., Zhu, W., Li, C. M. (2015). Comparison of the degradation kinetics of A-type and B-type proanthocyanidins dimers as a function of pH and temperature. *European Food Research and Technology*, 240(4), 707-717.

Xu, Y., Yan, X., Zheng, H., Li, J., Wu, X., Xu, J., Zhen, Z., Du, C. (2024). The application of encapsulation technology in the food Industry: Classifications, recent Advances, and perspectives. *Food Chemistry*: X, 21, 101240.

Xue, M., Shi, H., Zhang, J., Liu, Q. Q., Guan, J., Zhang, J. Y., Ma, Q. (2016). Stability and degradation of caffeoylquinic acids under different storage conditions studied by high-performance liquid chromatography with photo diode array detection and high-performance liquid chromatography with electrospray ionization collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Molecules*, 21(7), 948.

Xue, H., Feng, J., Tang, Y., Wang, X., Tang, J., Cai, X., Zhong, H. (2024). Research progress on the interaction of the polyphenol-protein-polysaccharide ternary systems. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 11(1), 95.

Xue, H., Zhao, J., Wang, Y., Shi, Z., Xie, K., Liao, X., Tan, J. (2024a). Factors affecting the stability of anthocyanins and strategies for improving their stability: A review. *Food Chemistry*: X, 101883.

Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21(1), 381-406.

Yang, B., Liu, H., Yang, J., Gupta, K.V., Jiang, Y. (2018). New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends in Food Science and Technology*, 79, 116-124.

Yang, J., Meng, D., Wu, Z., Chen, J., Xue, L. (2023). Modification and solubility enhancement of rice protein and its application in food processing: A review. *Molecules*, 28(10), 4078.

Yildirim-Elikoglu, S., Erdem, K. E. (2018). Interactions between milk proteins and polyphenols: binding mechanisms, related changes and the future trends in dairy industry. *Food Reviews International*, 34, 665-697.

Yilmaz, H., Gultekin Subasi, B., Celebioglu, H. U., Ozdal, T., Capanoglu, E. (2022). Chemistry of protein-phenolic interactions toward the microbiota and microbial infections. *Frontiers in Nutrition*, 9, 914118.

Zhang, H., Yu, D., Sun, J., Guo, H., Ding, Q., Liu, R., Ren, F. (2014). Interaction of milk whey protein with common phenolic acids. *Journal of Molecular Structure*, 1058, 228-233.

- Zhang, Q., Cheng, Z., Wang, Y., Fu, L. (2021). Dietary protein-phenolic interactions: Characterization, biochemical-physiological consequences, and potential food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(21), 3589-3615.
- Zhang, N., Zhang, X., Zhang, Y., Li, Y., Gao, Y., Li, Q., Yu, X. (2022). Non-covalent interaction between pea protein isolate and catechin: effects on protein structure and functional properties. *Food and Function*, 13(23), 12208-12218.
- Zhang, Y., Liu, H. (2022). Chemical and biological changes of polyphenols caused by food thermal processing. *Frontiers in Nutrition*, 9, 948894.
- Zhang, S., Sheng, Y. N., Feng, Y. C., Diao, J. J., Wang, C. Y., Zhang, D. J. (2022a). Changes in structural and functional properties of globulin-polyphenol complexes in mung beans: Exploration under different interaction ratios and heat treatment conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(4), 1920-1935.
- Zhang, K., Huang, J., Wang, D., Wan, X., Wang, Y. (2024). Covalent polyphenols-proteins interactions in food processing: formation mechanisms, quantification methods, bioactive effects, and applications. *Frontiers in Nutrition*, 11(6), 1371401.
- Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., Wan, X. (2011). Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(3), 1187-1195.
- Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Kurtanjek, Ž., Elez Garofulić, I. (2014). Kinetics of the degradation of anthocyanins, phenolic acids and flavonols during heat treatments of freeze-dried sour cherry *Marasca* paste. *Food Technology and Biotechnology*, 52(1), 101-108.
- Zorić, Z., Pedisić, S., Kovačević, D. B., Ježek, D., Dragović-Uzelac, V. (2016). Impact of packaging material and storage conditions on polyphenol stability, colour and sensory characteristics of freeze-dried sour cherry (*Prunus Cerasus* var. *Marasca*). *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 1247-1258.
- Zuiter, A. S. (2014). Proanthocyanidin: Chemistry and Biology: From Phenolic Compounds to Proanthocyanidins. *Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 1-25.

8. SAŽETAK

U ovome je radu istražena mogućnost formuliranja bioaktivnih dodataka hrani temeljenih na biljnim proteinima i polifenolima soka višnje te je ispitan utjecaj tipa proteinskog matriksa na vezanje polifenola, antioksidacijsku aktivnost i boju dobivenih kompleksa te njihovu stabilnost. Kao nosači polifenola korišteni su proteini badema, riže i graška. Kompleksi su pripremljeni kompleksiranjem polifenola na proteinski matriks, nakon čega su liofilizirani i podvrgnuti ispitivanjima stabilnosti tijekom skladištenja i termičkog tretiranja. Spektrofotometrijske metode (Folin-Ciocalteu i DMAC) potvrdile su uspješno vezanje polifenola i proantocijanidina iz soka višnje na sve ispitivane proteine. HPLC analizom identificirane su glavne skupine spojeva - antocijani, flavonoli i fenolne kiseline koje su karakteristične za sok višnje. FTIR-ATR analizom uočene su promjene u regijama Amid I i Amid II te u regiji rastezanja O-H i N-H veza, što upućuje na formiranje vodikovih i hidrofobnih interakcija te na strukturne promjene sekundarne strukture proteinskog matriksa nakon vezanja polifenola. Tip proteinskog matriksa pokazao se ključnim čimbenikom koji određuje količinu i selektivnost vezanja polifenola. Proteini badema pokazali su najveću sposobnost vezanja ukupnih polifenola i proantocijanidina, proteini riže su pokazali izraženiju sposobnost vezanja fenolnih kiselina, dok su proteini graška pokazali veću sklonost prema vezanju antocijana. Takva selektivnost odrazila se i na antioksidacijsku aktivnost. Metodama DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC utvrđeno je da kompleksi s proteinima badema imaju najvišu antioksidacijsku aktivnost, zatim s proteinima riže, dok su kompleksi s proteinima graška imali niže vrijednosti, u skladu s količinom i strukturom vezanih polifenola. Tijekom skladištenja kompleksa određeno je postupno smanjenje sadržaja polifenola i antioksidacijske aktivnosti, izraženije u uzorcima skladištenim na svjetlu nego u tami. Kompleksi s proteinima badema zadržali su najvišu stabilnost ukupnih polifenola i proantocijanidina te najmanje promjene boje, dok su kompleksi s proteinima riže očuvali fenolne kiseline i umjereno zadržali boju. Kompleksi s proteinima graška pokazali su najveću osjetljivost, s izraženim gubicima antocijana i smanjenjem crvenog tona boje (a^*). Termičkim tretiranjem vrijednosti ukupnih polifenola i proantocijanidina ostale su stabilne do 90 °C, dok je pri višim temperaturama određeno smanjenje, u skladu s degradacijom antocijana i smanjenjem antioksidacijskog potencijala. Kompleksi s proteinima badema zadržali su najvišu stabilnost polifenola i boje, dok su kompleksi s proteinima graška pokazali najveću osjetljivost na povišene temperature. Utvrđeno je da se proteini badema, riže i graška mogu uspješno primijeniti kao nosači polifenola soka višnje te da vrsta proteinskog matriksa određuje količinu, selektivnost i stabilnost vezanih polifenola.

9. SUMMARY

This study investigated the possibility of formulating bioactive food additives based on plant proteins and sour cherry polyphenols and evaluated the influence of the protein matrix type on the binding of polyphenols, antioxidant activity, and color of the obtained complexes as well as their stability. Almond, rice, and pea proteins were used as polyphenol carriers. The complexes were prepared by complexation of polyphenols to the protein matrix, followed by freeze-drying and subsequent stability testing during storage and thermal treatment. Spectrophotometric methods (Folin-Ciocalteu and DMAC) confirmed the successful binding of polyphenols and proanthocyanidins from sour cherry juice to all investigated proteins. HPLC analysis identified the main groups of compounds - anthocyanins, flavonols, and phenolic acids, characteristic for sour cherry juice. FTIR-ATR analysis revealed changes in the Amide I and Amide II regions, as well as in the O-H and N-H stretching regions, indicating the formation of hydrogen and hydrophobic interactions and structural adjustments in the secondary structure of the protein matrix after polyphenol binding. The type of protein matrix proved to be a key factor determining the amount and selectivity of polyphenol binding. Almond proteins showed the highest binding capacity for total polyphenols and proanthocyanidins; rice proteins exhibited a greater affinity toward phenolic acids, while pea proteins demonstrated a higher tendency for binding anthocyanins. This selectivity was also reflected in the antioxidant activity. According to DPPH, ABTS, FRAP, and CUPRAC assays, complexes with almond proteins exhibited the highest antioxidant activity, followed by those with rice proteins, while complexes with pea proteins had lower values, consistent with the quantity and structure of bound polyphenols. During storage, a gradual decrease in polyphenol content and antioxidant activity was observed, more pronounced in samples stored under light compared to those kept in the dark. Complexes with almond proteins retained the highest stability of total polyphenols and proanthocyanidins and exhibited the smallest color changes, while complexes with rice proteins preserved phenolic acids and moderately retained color. Pea protein complexes showed the greatest sensitivity, with pronounced anthocyanin losses and a decrease in red color tone (a^*). Upon thermal treatment, total polyphenol and proanthocyanidin contents remained stable up to 90 °C, while higher temperatures led to a decrease, consistent with anthocyanin degradation and reduced antioxidant potential. Complexes with almond proteins retained the highest stability of polyphenols and color, whereas pea protein complexes were the most sensitive to elevated temperatures. It was established that almond, rice, and pea proteins can be successfully used as carriers for sour cherry polyphenols and that the type of protein matrix determines the amount, selectivity, and stability of bound polyphenols.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1988. godine u Osijeku, gdje sam završila III. gimnaziju. Preddiplomski studij biologije završila sam na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku na Odjelu za biologiju, dok sam diplomski studij završila na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularnih bioznanosti upisala sam na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Zaposlena sam u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, gdje radim u području molekularne dijagnostike i mikrobiologije. U okviru dokorskog istraživanja bavim se interakcijama polifenola i biljnih proteina te stabilnošću bioaktivnih spojeva u prehrambenim sustavima.

Popis publikacija

Popis radova:

Kelemen, V., Pichler, A., Ivić, I., Buljeta, I., Šimunović, J., Kopjar, M. (2021). Brown rice proteins as delivery system of phenolic and volatile compounds of raspberry juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 57, 1866-1874.

Kopjar, M., Buljeta, I., Jelić, I., Kelemen, V., Šimunović, J., Pichler, A. (2021). Encapsulation of cinnamic acid on plant-based proteins: Evaluation by HPLC, DSC and FTIR-ATR. *Plants*, 10, 2158.

Kopjar, M., Buljeta, I., Ćorković, I., Kelemen, V., Šimunović, J., Pichler, A. (2022). Plant-based proteins as encapsulating materials for glucosyl-hesperidin. *International Journal of Food Science and Technology*, 57, 728-737.

Kopjar, M., Buljeta, I., Ćorković, I., Kelemen, V., Pichler, A., Ivić, I., Šimunović, J. (2023). Dairy-protein-based aggregates as additives enriched with tart cherry polyphenols and flavor compounds. *Foods*, 12, 2104.

Sudjelovanja na kongresima:

Kelemen, V., Botak, I., Buljeta, I., Pichler, A., Šimunović, J., Kopjar, M. Enhancement of adsorption of phenolics on pea proteins through disaccharides addition. NIZO Plant Protein Functionality Conference; 2020 Oct 21-22; Netherlands. Elsevier, NIZO for better food & health. Poster prezentacija.

Kelemen, V., Buljeta, I., Lukić, J., Pichler, A., Šimunović, J., Kopjar, M. Proteins as delivery systems of phenolic and volatile compounds of tart cherry. IFT Annual Meeting and Food Expo; 2021 Jul 19-21; Chicago, USA. Institute of Food Technologist. Poster prezentacija.

Kelemen, V., Buljeta, I., Pichler, A., Ćorković, I., Šimunović, J., Kopjar, M. Milk protein isolates as encapsulating material of raspberry phenolics. 12th NIZO Dairy Conference "Innovations in Dairy Ingredients"; 2021 Oct 5-7; Online. Elsevier, NIZO. Poster prezentacija.

OCJENA RADA U TIJEKU