

KOMPLEKS NA BAZI PROTEINA MLIJEKA I SOKA NARA: SASTAV POLIFENOLA I MOGUĆA PRIMJENA U INHIBICIJI RASTA STANICA KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA

Mirela KOPJAR

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek, Hrvatska

mirela.kopjar@ptfos.hr

Ina ĆORKOVIĆ

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek, Hrvatska

inacorkovic@gmail.com

Mary Ann LILA

North Carolina State University, Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Science, Plants for Human Health Institute, North Carolina Research Campus, 600 Laureate Way, Kannapolis, USA

mlila@ncsu.edu

Josip ŠIMUNOVIĆ

North Carolina State University, Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Science, 116C Schaub Hall, Raleigh, NC, USA

simun@ncsu.edu

Drazen RAUCHER

University of Mississippi Medical Center, Department of Cell and Molecular Biology, 2500 North State Street, Jackson, MS, USA

draucher@umc.edu

<https://dx.doi.org/10.21857/9e31lh21rm>

Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je formulirati komplekse na bazi proteina mlijeka i soka nara u svrhu pripreme funkcionalnog dodatka hrani. I proteini mlijeka i polifenoli nara poznati su po svojim brojnim pozitivnim učincima na zdravlje ljudi ali i na kvalitetu prehrambenih proizvoda. Kompleks je pripremljen u obliku liofiliziranog praha te su na pripremljenim kompleksima određeni ukupni polifenoli i proantocijanidini primjenom spektrofotometrijskih metoda, te pojedinačni polifenoli primjenom HPLC metode. Također je određena antioksidacijska aktivnost te su snimljeni IR spektri kako bi se utvrdile promjene na strukturi proteina mlijeka nakon adsorpcije polifenola soka nara. Ispitana je mogućnost primjene formuliranog kompleksa u inhibiciji stanica karcinoma debelog crijeva (SW1116 i Colo205). Od pojedinačnih polifenola na kompleksu su identificirani delfinidin-3-glukozid, cijanidin-3-glukozid, elaginska kiselina, galna

kiselina i punikalagin. Adsorpcijski kapacitet proteina mlijeka za identificirane polifenole padao je u smjeru: punikalagin (86,40%) > elaginska kiselina (67,78%) > galna kiselina (61,28%) > cijanidin-3-glukozid (52,07%) > delphinidin-3-glukozid (44,30%). Kompleksu je dokazan i antioksidacijski potencijal primjenom DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metoda. Inhibicijski učinak uzoraka uspoređen je s 5-fluorouracilom te je utvrđeno da je primjenom 5% ekstrakta postignuta gotovo jednaka inhibicija SW1116 i Colo205 stanica kao i s navedenim lijekom koji se standardno koristi u liječenju ovog tipa karcinoma. Snimanjem i usporedbom IR spektra proteina mlijeka i kompleksa utvrđene su strukturne promjene na proteinima mlijeka nakon adsorpcije polifenola nara posebice u regijama koje su karakteristične za proteine. Interakcije odgovorne za vezanje polifenola i proteina su bili ne-kovalentne prirode odnosno došlo je do stvaranja vodikovih veza i hidrofobnih interakcija. Formulirani kompleks može se koristiti kao funkcionalan dodatak hrani s ciljem obogaćivanja proizvoda polifenolima ali isto tako i poboljšanja antioksidacijske stabilnosti proizvoda te modificiranja boje. Ujedno navedeni kompleks može doprinijeti i pozitivnom učinku polifenola na zdravlje ljudi odnosno može poslužiti kao tzv. „delivery systems“ polifenola u organizmu.

Ključne riječi: proteini mlijeka, polifenoli nara, adsorpcijski kapacitet, antioksidacijska aktivnost, inhibicija stanica karcinoma debelog crijeva

Ključna poruka rada: Proteini mlijeka mogu se koristiti kao nosači polifenola soka nara s ciljem pripreme funkcionalnih dodataka hrani. Formulirani kompleksi mogu se koristiti kao dodatci u različite prehrambene proizvode s ciljem njihovog obogaćivanja polifenolima, povećanja antioksidacijskog potencijala, te modifikacije boje. Ujedno, je utvrđena i mogućnost primjene kompleksa u inhibiciji rasta stanica karcinoma debelog crijeva.

1. Uvod

U prehrambenoj industriji sve se više posvećuje pažnja razvoju inovativnih proizvoda s pozitivnim učinkom na zdravlje, poput antioksidacijskog, antidijabetskog, protuupalnog, antikancerogenog djelovanja (Oancea i sur., 2017; Rivero i sur., 2020). Moderan i užurban stil života uvelike utječe na prehrambene navike ljudi koje mogu imati negativan utjecaj na zdravlje. Nar (*Punica granatum* L.) je nativno voće na Mediteranu ali se uzgaja i konzumira širom svijeta (Gosset-Erard i sur., 2021). U narodnoj medicini je poznat od pamtiviljeka po pozitivnim učincima na zdravlje kao što su antioksidacijsko, protuupalno, antikancerogeno, antidijabetsko i antitumorsko djelovanje (Andrade i sur., 2019) koje je vezano uz visoki sadržaj bioaktivnih komponenata poput antocijana, fenolnih kiselina, proantocijanidina, flavonoida, lignina, fitosterola, masnih kiselina i organskih kiselina (Li i sur., 2006). Nar je bogat izvor punikalagina odnosno tanina koji se može

hidrolizirati a po kemijskoj strukturi predstavlja višestruke estere galne kiseline i glukoze, a poznat je po svom antioksidacijskom kapacitetu (Gosset-Erard i sur., 2021). Zbog sve veće popularnosti u cijelom svijetu i potencijalnih pozitivnih utjecaja na zdravlje, sve su veći zahtjevi za narom ali i proizvodima na bazi nara što je dovelo do ekspanzije prerade nara (Hasnaoui i sur., 2014). Osim polifenola, vrlo značajno mjesto u prehrambenoj industriji imaju i proteini. Ovisno o svojstvima proteina, oni se koriste kao emulgatori, stabilizatori disperznih sustava, kao polimeri sa sposobnošću formiranja filmova, ali i kao nosači različitih aktivnih komponenata (Nishinari i sur., 2014; Liu i sur., 2019; Kelemen i sur., 2022; Kopjar i sur., 2023). U posljednje vrijeme se sve više istraživanja provodi s ciljem spajanja ovih visokovrijednih komponenata u komplekse koji se mogu koristiti kao funkcionalni aditivi. Mikroinkapsulacija je jedna od tehnika koja se upotrebljava za postizanje stabilnosti polifenola te je odabir adekvatnog nosača od vrlo velike važnosti. Proteini se mogu koristiti kao nosači polifenola zbog njihove sposobnosti stvaranja interakcija odnosno kovalentnih i/ili nekovalentnih veza (Yildirim-Elikoglu i Erdem, 2018). Općenito je poznato da su polifenoli, a posebice antocijani vrlo nestabilni spojevi te se kompleksiranjem s proteinima pokušava postići njihova stabilnost pod različitim uvjetima procesiranja. Ujedno za postizanje pozitivnog učinka polifenola u našem organizmu neophodna je njihova stabilnost kroz gastrointestinalni trakt, te je općenito biodostupnost polifenola upitna. Kompleksiranje polifenola i proteina je jedno od mogućih rješenja kako bi se nadišli problemi njihove biodostupnosti te kako bi se povećao njihov potencijalno pozitivan učinak na naš organizam (Lila i sur., 2016; Lila i sur., 2022). U ovom istraživanju odabrani su proteini mlijeka. 80% proteina mlijeka čine kazeinatti koji su konjugirani proteini s fosfatnim skupinama esterificiranim na serin. Drugu proteinsku frakciju čine proteini sirutke (Yalcin, 2006).

Tijekom prošlih desetljeća, vrlo istraživano područje je uspostavljanje veze između unosa polifenola i prevencije različitih bolesti. Jedan od razloga je i protektivna uloga polifenola kod ljudi oboljelih od karcinoma debelog crijeva. Karcinom debelog crijeva je treći najčešće dijagnosticiran karcinom, a po smrtnosti je na drugom mjestu (Araújo i sur., 2011; Morgan i sur., 2023). Najčešći čimbenici koji uzrokuju ovaj karcinom su loša prehrana (visoki unos crvenog i procesiranog mesa, nizak unos voća i povrća te vlakana), pušenje, konzumacija alkohola, prekomjerna tjelesna masa i fizička neaktivnost (Morgan i sur., 2023). Prehrambene navike su odgovorne za 70% do 90% slučajeva karcinoma debelog crijeva te je uravnotežena prehrana vrlo bitna što uključuje i unos polifenola (Araújo i sur., 2011). Također se sve više provode istraživanja o mogućnosti primjene fitokemikalija s ciljem zamjene sintetskih komponenata koje imaju kemoteraputsku ili kemoprotektivnu ulogu (Hou i sur., 2004; Zafra-Stone i sur., 2007; Tang i sur., 2015). Kemoprevencija je vrlo istraživano područje a bazira se na primjeni sintetskih ili prirodnih komponenata (u farmakološkim dozama) s ciljem smanjenja rizika razvoja ili ponovnog pojavljivanja karcinoma. Polifenoli mogu utjecati na različite stanične procese u stanicama karcinoma te djelovati kao kemopreventivni blokatori (djeluju prije ili nakon inicijacijske faze karcinogeneze) ili kao kemopreventivni supresori (djeluju nakon inicijacijske faze karcinogeneze, tijekom faze rasta i progresije stanica karcinoma) ili oboje (Araújo i sur., 2011).

Cilj ovog rada bio je formulirati kompleks na bazi proteina mlijeka i polifenola soka nara. Na formuliranom kompleksu određeni su ukupni polifenoli, proantocijanidini i individualni polifenoli. Također je određen antioksidacijski potencijal i inhibicija rasta stanica karcinoma debelog crijeva (SW1116 – stanice rane faze i Colo205 – stanice kasne faze). Kompleksu je snimljen i IR spektar te je uspoređen s proteinom s ciljem utvrđivanja promjena u strukturi proteina mlijeka nakon adsorpcije polifenola nara.

2. Materijali i metode

Priprema kompleksa

Za pripremu kompleksa korišten je matriks proteina mlijeka (86% proteina na suhu tvar s 80% kazeinskih micela) i sok nara. 2 g proteinskog matriksa miješano je s 20 mL soka na magnetskoj miješalici 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon kompleksiranja, smjesa je centrifugirana 15 minuta (8000 o/min), te je tekući dio uklonjen a kruti dio je liofiliziran kako bi se dobio suhi prah. Liofilizacija je provedena u laboratorijskom liofilizatoru Alpha 1-4 (Martin Christ, Osterode am Harz, Njemačka). Za provođenje liofilizacije definirani su slijedeći parametri: temperatura zamrzavanja bila je -55 °C, temperatura sublimacije kretala se je u intervalu od -35 °C do 0 °C pod vakuumom od 0,220 mbar, temperatura izotermne desorpcije kretala se je u intervalu od 0 °C do 22 °C pod vakuumom od 0,080 mbar. Kompletan proces liofilizacije trajao je 5 sati.

Ekstrakcija kompleksa

200 mg uzorka je pomiješano s 1 mL zakiseljene destilirane vode (pH 3,5). Smjesa je inkubirana na 37 °C 3 sata uz konstantno miješanje. Nakon inkubacije smjesa je centrifugirana kako bi se dobio čisti ekstrakt koji se je koristio za sve daljnje analize.

Određivanje ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola određen je prema modificiranoj Folin-Ciocalteu metodi (Singleton i Rossi, 1965). U epruvetu je dodano 0,1 mL ekstrakta, 0,9 mL vode, 5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (3,3%) i 4 mL Na₂CO₃ (7,5%). Pripremljena smjesa je ostavljena u mraku pri sobnoj temperaturi te je nakon 120 minuta očitana apsorbancija na 765 nm. Mjerenja su provedena u tri paralele, a rezultati su prikazani u g ekvivalenata galne kiseline po kg uzorka (g/kg).

Određivanje sadržaja proantocijanidina

Za određivanje sadržaja proantocijanidina u uzorcima primijenjena je DMAC (4-(dimetilamino)-cinamaldehyd) metoda (Prior i sur., 2010). U epruvetu je otpipetirano 0,5 mL ekstrakta i 1 mL DMAC reagensa. Pripremljena smjesa ostavljena je u mraku pri sobnoj temperaturi te je nakon 30 minuta očitana apsorbancija na 640 nm. Rezultati su prikazani kao g ekvivalenata procijanidina B2 po kg uzorka (g/kg).

Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih polifenola

Pojedinačni polifenoli određeni su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) pomoću sustava 1260 Infinity II (Agilent Technology, Santa Clara, CA, SAD) koji je opremljen kvaternom pumpom, detektorom s nizom dioda (DAD) i kolonom za razdvajanje Poroshell 120 (EC C-18 column, 4.6×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$). Filtrirani uzorak (filtracija 1 mL uzorka kroz $0.45 \mu\text{m}$ PTFE filter) injektiran je u HPLC sustav. Volumen injektiranog ekstrakta bio je $5 \mu\text{L}$ pod protokom od 1 mL/min. Korištene su dvije mobilne faze: 0,1 % H_3PO_4 u vodi (faza A) i 100 %-tni metanol (faza B). Primijenjena je gradijentna elucija pod slijedećim uvjetima: 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. Snimanje UV-Vis spektra provedeno je u području od 190 nm do 600 nm. Punikalagin je identificiran na 260 nm, fenolne kiseline na 320 nm, a antocijanini na 520 nm. Za identifikaciju polifenola korišteni su standardi s kojima je provedena usporedba retencijskog vremena i UV-Vis spektra pikova u uzorku.

Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti primijenjene su četiri metode: DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC. Mjerenja za sve četiri metode su provedena u tri paralele, a rezultati su prikazani u μmol ekvivalenata Trolox-a po g uzorka ($\mu\text{mol/g}$). Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka primjenom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) reagensa korištena je metoda po Brand-Williams i sur. (1995) s malim modifikacijama. U staklenu epruvetu dodano je 0,2 mL uzorka i 3 mL DPPH otopine (0,5 mM otopina DPPH reagensa u 96 %-tnom etanolu). Pripremljena smjesa ostavljena je u mraku pri sobnoj temperaturi te je nakon 15 minuta očitana apsorbancija na 517 nm. Antioksidacijska aktivnost uzoraka, određena pomoću ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol) reagensa, provedena je prema metodi od Arnao i sur. (2001) s malim modifikacijama. $\text{ABTS}^{+\cdot}$ radikali dobiveni su miješanjem 10 mL otopine diamonijeve soli 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) i 10 mL otopine $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. U staklenoj epruveti pomiješano je 0,2 mL uzorka i 3,2 mL ABTS reagensa. Pripremljena smjesa ostavljena je u mraku pri sobnoj temperaturi te je nakon 95 minuta očitana apsorbancija na 734 nm. Sposobnost uzorka da reducira željezo, određena je prema metodi po Benzie i Strain (1996) s malim modifikacijama. FRAP reagens pripremljen je miješanjem 25 mL acetatnog pufera (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL TPTZ otopine (10 mM) i 2,5 mL FeCl_3 (20 mM). U staklenoj epruveti pomiješano je 0,2 mL uzorka i 3 mL FRAP reagensa (zagrijan na 37°C prije same analize). Pripremljena smjesa ostavljena je u mraku pri sobnoj temperaturi te je nakon 30 minuta očitana apsorbancija na 593 nm. CUPRAC metoda prethodno je opisana kod Apak i sur. (2004). U staklenu epruvetu dodan je 1 mL otopine CuCl_2 (10 mM), 1 mL otopine neokuproina (7,5 mM) i 1 mL amonijevog acetatnog pufera (1 M, pH 7,0). Nakon toga, dodani su uzorak i voda u ukupnom volumenu od 1,1 mL. Pripremljena smjesa ostavljena je u mraku pri sobnoj temperaturi te je nakon 30 minuta očitana apsorbancija na 450 nm.

Snimanje IR spektra

Za snimanje infracrvenog (IR) spektar proteina i formuliranog kompleksa korištena je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom u kombinaciji s prigušenom totalnom refleksijom (FTIR-ATR) na spektrometru Cary 600 (Agilent Technologies). Spektrometar je opremljenim sa MicroLab Expert softverom (Agilent Technologies). IR spektri uzoraka su snimljeni u rasponu od 4000 cm⁻¹ do 600 cm⁻¹.

Inhibicija stanica karcinoma debelog crijeva

Stanice karcinoma debelog crijeva, SW1116 i Colo205, su kultivirane u mikrotitarskim pločicama. Nakon 24 sata tretirane su pripremljenim otopinama ekstrakta u koncentraciji od 1%, 3% i 5%. Otopine ekstrakta pripremljene su u specifičnom mediju (RPMI1640 s 10% fetalnog goveđeg seruma i 1% penicilin/streptomcina). Stanice karcinoma netretirane sa ekstraktima korištene su kao negativna kontrola, a za pozitivnu kontrolu stanice karcinoma su tretirane s 5-fluorouracilom (lijekom koji se koristi za tretiranje stanica tumora debelog crijeva). Nakon 3 dana tretiranja stanica tumora, preživljavanje stanica određeno je CCK-8 metodom, a postotak preživjelih stanica tumora izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$\% \text{ preživjelih stanica tumora} = \left(\frac{A_{\text{tretiranih stanica}}}{A_{\text{netretiranih stanica}}} \right) \times 100$$

3. Rezultati i rasprava

Polifenoli i antioksidacijska aktivnost kompleksa

Cilj ovog istraživanja bio je formulirati kompleks na bazi proteina mlijeka i polifenola soka nara. Na formuliranom kompleksu određeni su ukupni polifenoli, proantocijanidini i individualni polifenoli te je izračunat adsorpcijski kapacitet proteina mlijeka za pojedinačne fenolne komponente. Također je određen antioksidacijski potencijal i inhibicija rasta stanica karcinoma debelog crijeva (SW1116 – stanice rane faze i Colo205 – stanice kasne faze). Kompleksu je snimljen i IR spektar te je uspoređen s proteinom kako bi se utvrdile promjene u strukturi proteina mlijeka nakon adsorpcije polifenola nara.

Tablica 1: Udio ukupnih polifenola, proantocijanidina i antioksidacijska aktivnost PM/N kompleksa

Ukupni polifenoli (g/kg)	4,39±0,10
Proantocijanidini (g/kg)	1,06±0,01
DPPH (μmol/g)	18,30±0,47
ABTS (μmol/g)	37,81±0,32
FRAP (μmol/g)	39,20±0,26
CUPRAC (μmol/g)	38,17±0,30

Rezultati određivanja ukupnih polifenola, proantocijanidina i određivanja antioksidacijske aktivnosti prikazani su u Tablici 1. Udio ukupnih polifenola u PM/N kompleksu iznosio je 4,39 g/kg a proantocijanidina 1,06 g/kg. Antioksidacijska aktivnost je određena upotrebom DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metoda. Razlika između primijenjenih metoda je u mehanizmu određivanja antioksidacijske aktivnosti. DPPH i ABTS metode se baziraju na inaktivaciji slobodnih radikala pomoću antioksidansa prisutnih u uzorku odnosno sposobnosti antioksidansa da donira vodikov atom sintetskim slobodnim radikalima (DPPH[•] i ABTS^{•+}). FRAP i CUPRAC metode se baziraju na redukciji metala. FRAP metoda bazirana je na redukciji Fe³⁺ u Fe²⁺ ione, a CUPRAC metoda je bazirana na redukciji Cu²⁺ u Cu⁺ ione djelovanjem antioksidansa. Primjenom DPPH metode antioksidacijski potencijal je iznosio 18,30 μmol/g, dok je primjenom ABTS metode utvrđen viši antioksidacijski potencijal, 37,81 μmol/g. Antioksidacijska aktivnost polifenola ovisi o njihovoj strukturi prvenstveno o broju i poziciji hidroksilnih skupina. Postojanje OH skupina na 3'-, 4'- i 5'- poziciji na B prstenu flavonoida povećava antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s polifenolima koji sadrže samo jednu hidroksilnu skupinu. ABTS^{•+} radikali reagiraju sa svim hidroksiliranim aromatskim komponentama bez obzira na njihov stvarni antioksidacijski potencijal za razliku od DPPH[•] radikala koji ne reagiraju s flavonoidima koji ne sadrže OH skupinu na B prstenu (Roginsky i Lissi, 2005). Primjenom FRAP i CUPRAC metoda određen je sličan antioksidacijski potencijal, 39,20 μmol/g i 38,17 μmol/g, te se može zaključiti da kompleks ima jednaki potencijal za redukciju iona željeza i bakra.

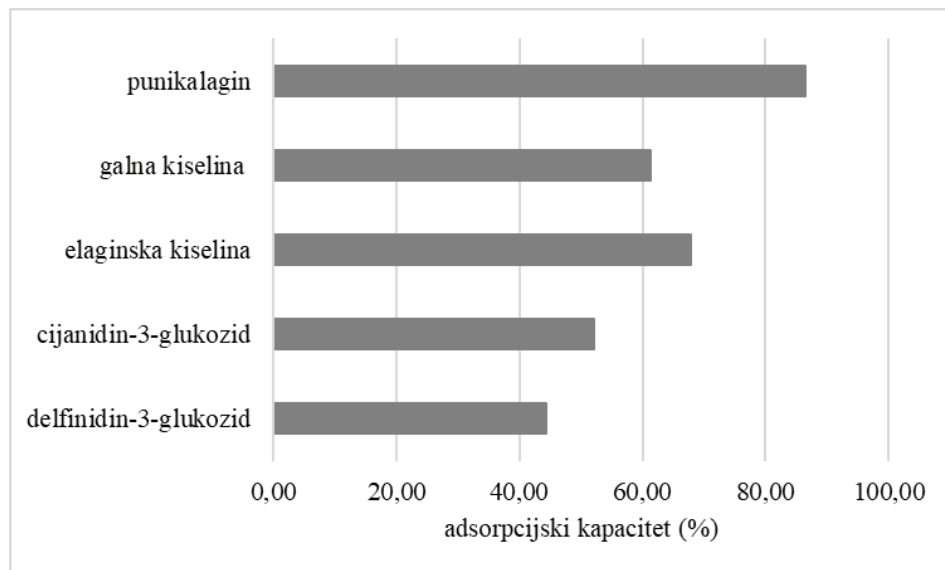
Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je potrebno primijeniti više različitih metoda kako bi se utvrdila antioksidacijska aktivnost nekog sustava.

U Tablici 2 prikazani su rezultati određivanja pojedinačnih polifenola. Identificirana su dva antocijana, dvije fenolne kiseline i punikalagin. Cijanidin-3-glukozid je određen u većoj koncentraciji od delfinidin-3-glukozida, 107,80 mg/kg i 71,59 mg/kg. U najvećoj koncentraciji određena je galna kiselina, 232,51 mg/kg. Uz galnu kiselinu, identificirana je elaginska kiselina u koncentraciji od 36,22 mg/kg. Punikalagin, polifenol karakterističan za nar, je određen u koncentraciji od 159,84 mg/kg.

Tablica 2: Udio pojedinačnih polifenola (mg/kg) u PM/N kompleksa

delfinidin-3-glukozid	71,59±0,44
cijanidin-3-glukozid	107,80±0,88
elaginska kiselina	36,22±0,51
galna kiselina	232,51±0,88
punikalagin	159,84±0,88

Slika 1: Adsorpcijski kapacitet matriksa proteina mlijeka za vezanje polifenola soka nara



Struktura i svojstva nosača i polifenola diktiraju vezanje polifenola na nosač. U tu svrhu izračunava se adsorpcijski kapacitet a rezultati su prikazani na Slici 1. Adsorpcijski kapacitet za ukupne polifenole iznosio je 61,42% a za proantocijanidine 58,60%. Od antocijana iz soka nara na proteinski matriks vezali su se delfinidin-3-glukozid i cijanidin-3-glukozid. Proteini mlijeka imali su veći afinitet za vezanje cijanidin-3-glukozida nego delfinidin-3-glukozid odnosno adsorpcijski kapacitet za navedene antocijane iznosio je 52,07% i 44,30%. Iz soka nara na proteinski matriks vezale su se i dvije fenolne kiseline, elaginska i galna kiselina koje se također razlikuju po adsorpcijskom kapacitetu. Adsorpcijski kapacitet za elaginsku kiselinu je iznosio 67,78% a za galnu kiselinu 61,28%. Proteinski matriks je imao najveći afinitet za vezanje punikalagina, 86,40%.

Kako je već spomenuto struktura i svojstva nosača, u ovom istraživanju proteinskog matriksa ali i struktura i svojstva polifenola značajno utječu na vezanje polifenola na proteinski matriks. Različiti proteinski matriksi korišteni su za vezanje polifenola iz različitih biljnih izvora (Roopchand i sur., 2012; Grace i sur., 2013; Kelemen i sur., 2022; Kopjar i sur., 2023). Istraživanjem o vezanju polifenola brusnice na nosače s različitim udjelom proteina (odmašćeno sojino brašno - 50% proteina, proteinski izolat soje - 70% proteina, proteinski izolat konoplje - 70% proteina, brašno srednje-prženog kikirikija - 50% proteina i proteinski izolat graška - 85% proteina) utvrđeno je da je najveći udio ukupnih polifenola adsorbiran na proteinski izolat konoplje a najmanji na proteinski izolat soje. Što se tiče antocijana brusnice, utvrđeno je da je najveći udio adsorbiran na odmašćeno sojino brašno a najmanji na proteinski izolat soje (Grace i sur., 2013). Istraživanjem o vezanju polifenola borovnice na odmašćeno sojino brašno u kombinaciji

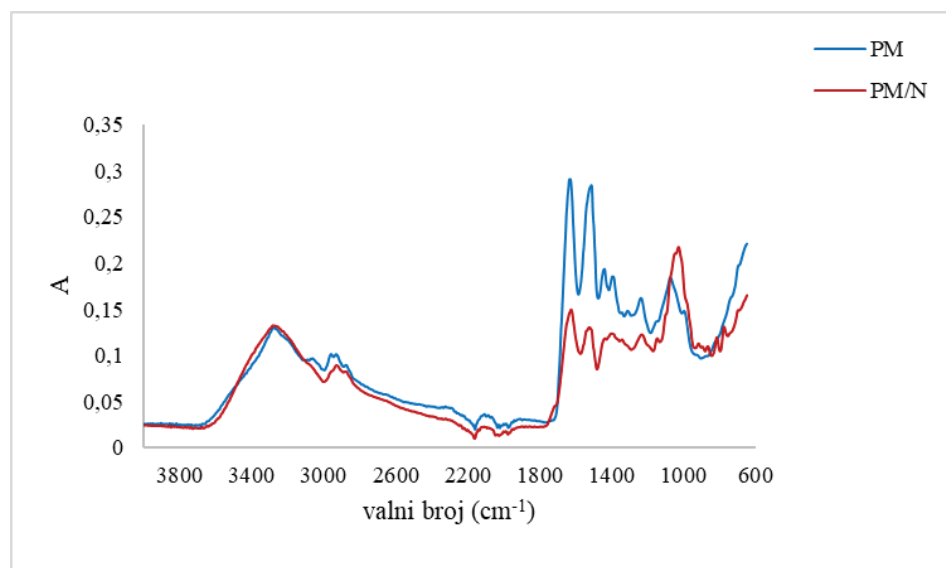
s cjelovitim brašnom pšenice, brašnom smeđe riže ili brašnom kukuruza (izvori bogati ugljikohidratima) utvrđeno je da su sve komponente a ne samo proteini bile uključene u adsorpciju polifenola. Usporedbom pojedinačnih nosača utvrđeno je da je najveći afinitet za vezanje antocijana borovnice imalo odmašćeno sojino brašno koje je ujedno imalo i najveći udio proteina, a zatim cjelovito brašno pšenice, brašno smeđe riže ili brašno kukuruza (Roopchand i sur., 2012). Usporedbom reaktivnosti i jačine vezanja polifenola na proteine soje, utvrđeno je da navedeni parametri slijede slijedeći redoslijed galna kiselina > klorogenska kiselina = kvercetin > miricetin > kafeinska kiselina > kempferol > apigenin > flavon. Posljednje dvije fenolne komponente imale su značajno nižu sposobnost vezanja na proteine soje u odnosu na ostale komponente (Sęczyk i sur., 2019). Provedeno je i istraživanje sposobnosti vezanja polifenola na albumin i globulin (Rawel i sur., 2002). Rezultati dobiveni za albumin su pokazali da klorogenska kiselina i galna kiselina imaju najveći kapacitet za vezanje na ovaj proteinski nosač, zatim slijede katehin i kvercetin, a najmanji kapacitet su imali apigenin i ferulična kiselina. Za globulin su utvrđeni nešto drugačiji rezultati. Klorogenska kiselina je imala najveći kapacitet vezivanja, zatim katehin i galna kiselina, te kvercetin, a najmanji kapacitet vezivanja imali su apigenin i ferulična kiselina (Rawel i sur., 2002). Isti autori su istraživali vezanje polifenola iz ekstrakta zelenog čaja i zelene kave na albumin i globulin te su utvrdili drugačiji trend. Utvrdili su veći kapacitet vezivanja klorogenske kiseline i katehina iz ekstrakta na navedene proteinske frakcije nego u slučaju čistih komponenata. Ekstrakti su kompleksan matriks koji je sadržavao i druge fenolne komponente koje su utjecale na vezanje klorogenske kiseline i katehina na proteine. Razlog navedenim rezultatima je kompeticija fenolnih komponenata za isto mjesto vezivanja na proteinima (Rawel i sur., 2002). Općenito, reaktivnost polifenola ovisi o broju hidroksilnih skupina ali i njihovoj poziciji, što vrijedi i za mogućnost interakcije polifenola s proteinima, a dodatno važna je i proteinska frakcija u smislu slobodnih mjesta na koje se mogu vezati polifenoli (Rawel i sur., 2002; Kanakis i sur., 2011; Sęczyk i sur., 2019). Za vezanje polifenola na proteine važne su interakcije i kovalentne i nekovalentne prirode (Ozdal i sur., 2013; Yildirim-Elikoglu i Erdem, 2018). Od nekovalentnih interakcija između polifenola i proteina mogu se odvijati hidrofobno povezivanje, stvaranje vodikovih veza, elektrostatska privlačnost i formiranje van der Waals-ovih veza. Ipak za formiranje protein/polifenol kompleksa najznačajnije su hidrofobno povezivanje i stvaranje vodikovih veza (Cao i Xiong, 2017).

IR spektri proteina mlijeka i kompleksa

Adsorpcija polifenola nara na proteine mlijeka dokazana je snimanjem i usporedbom IR spektra proteina mlijeka i PM/N kompleksa (Slika 3). Usporedbom navedena dva spektra, vidljivo je da adsorpcija polifenola soka nara na proteine mlijeka izazvala strukturne promjene na proteinima mlijeka. Regija od 3000 to 2800 cm^{-1} (vezana uz CH_2 asimetrično i simetrično vibracijsko istezanje) je indikator hidrofobnih interakcija između proteina i polifenola u kompleksu, a iz spektra je vidljivo da je došlo do promjena u navedenoj regiji. Dodatno je došlo do nestajanja vrpce na 3075 cm^{-1} koja je vezana za promjenu u Amid B strukturi zbog istezanja N-H veza. Adsorpcija polifenola nara na proteine mlijeka izazvala

je smanjenje intenziteta vrpce u regiji od 1740 cm^{-1} do 1150 cm^{-1} . U navedenoj regiji nalaze se amidne strukture koje su karakteristične za proteine odnosno Amid I (C-O istezanje) i Amid II (N-H preklapanje i C-H istezanje) strukture, a koje se pripisuju regijama od 1700 do 1600 cm^{-1} i od 1600 do 1500 cm^{-1} . Vrpca na 1435 cm^{-1} koja je vezana za asimetrično preklapanje metilnih skupina proteina je nestala nakon adsorpcije polifenola na proteinski nosač. Također su vidljive i promjene u regiji od 1380 do 1200 cm^{-1} koja je vezana za Amid III strukturu odnosno planarno preklapanje N-H praćeno s C-N preklapanjem. Adsorpcija polifenola je uzrokovala i stvaranje vrpce na 1145 cm^{-1} koja je vezana uz promjene u C-O vezi hidroksilnih skupina. Dodatno je došlo do pomicanja vrpce s 1077 cm^{-1} na 1032 cm^{-1} odnosno polifenoli nara uzrokovali su promjenu u simetriji fosfatnih skupina kazeina. Utvrđene su i promjene ispod 1000 cm^{-1} koje su vezane uz van-planarne vibracije.

Slika 3: IR spektri proteina mlijeka (PM) i kompleksa (PM/N)

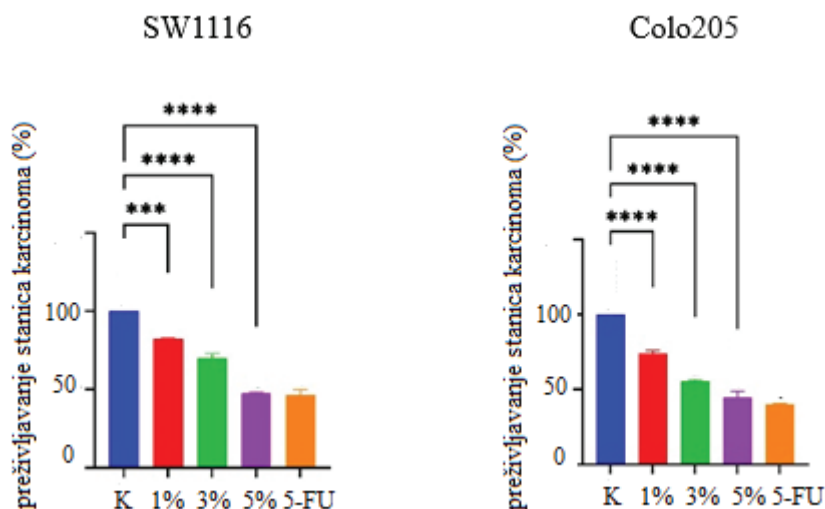


Inhibicija rasta stanica karcinoma debelog crijeva

Na Slici 2 prikazana je inhibicija stanica karcinoma debelog crijeva odnosno SW1116 stanica rane faze i Colo205 stanica kasne faze bolesti, pomoću ekstrakta kompleksa. Uzorci za inhibiciju stanica karcinoma su se dodavali u količini od 1%, 3% ili 5%, a rezultati su uspoređeni s 5-fluorouracilom koji je standardni lijek za testirane stanice karcinoma. Postotak preživljavanja SW1116 stanica karcinoma kada su tretirane sa standardnim lijekom iznosio je 46,29%. Ekstrakti kompleksa su također bili učinkoviti u inhibiciji rasta SW1116 stanica a učinkovitost je ovisila o količini dodanog ekstrakta. Postotak preživljavanja SW1116 stanica karcinoma bio je 82,32%, 70,02% i 47,86% kada su stanice tretirane s 1%, 3% i 5% ekstrakta kompleksa. Postotak preživljavanja Colo205 stanica karcinoma kada su tretirane sa standardnim lijekom iznosio je 40,23%. Ekstrakti

kompleksa su bili učinkoviti i u inhibiciji rasta ovih stanica karcinoma. Primjenom 1%, 3% i 5% ekstrakta kompleksa, postotak preživljavanja Colo205 stanica karcinoma bio je 74,18%, 55,30% i 44,94%. Primjenom 5% ekstrakta postignuta je gotovo jednaka inhibicija SW1116 i Colo 205 stanica kao i s 5-fluorouracilom. Utvrđena je ovisnost povećanja inhibicije stanica karcinoma s povećanjem dodatka ekstrakta za njihovu inhibiciju. Navedeni trend je utvrđen i za druge uzorke koji su sadržavali antocijane i/ili polifenole i druge tipove stanica karcinoma (npr. karcinom dojki, crijeva, želuca, pluća, centralnog nervnog sustava (Kamei i sur., 1995; Reddy i sur., 2005; Michaud-Levesque i sur., 2012; Tang i sur., 2015; Asl i sur., 2018; Jing i sur., 2020; Sánchez-Velázquez i sur., 2020; Kopjar i sur., 2024; Raucher i sur., 2024)

Slika 2: Inhibicija stanica tumora pomoću PM/N kompleksa (SW1116 - stanice karcinoma debelog crijeva u ranoj fazi; Colo205 - stanice karcinoma debelog crijeva u kasnoj fazi; K - kontrolni uzorak bez stanica karcinoma; 5-FU - 5-fluorouracil; 1%, 3% i 5% - količina ekstrakta kompleksa korištena za inhibiciju stanica karcinoma).



Iako nisu svi mehanizmi potvrđeni *in vivo*, izdvojeno je 6 glavnih kemopreventivnih efekata polifenola na stanice karcinoma: 1 – antioksidacijski utjecaj, 2 – antiproliferacijski utjecaj, 3 – indukcija zastoja staničnog ciklusa, 4 – indukcija apoptoze, 5 – antiinflamatorni utjecaj i 6 – inhibicija angiogeneze i metastaza (Ramos i sur., 2008). Kroz druga istraživanja također je utvrđena korelacija između sadržaja polifenola i inhibicije rasta stanica različitih vrsta karcinoma. U usporedbi s ostalim flavonoida, antocijani su učinkovitiji u inhibiciji direktnog rasta stanica (Kamei i sur., 1995). Utvrđeno je da delfinidin, petunidin i cijanidin mogu inhibirati rast stanica karcinoma, a to svojstvo je vezano za njihovu strukturu odnosno uz broj hidroksilnih skupina na B-prstenu. Delfinidin posjeduje tri hidroksilne skupine te je imao najveći inhibitorski učinak (83%) za razliku od druga dva

antocijana koja posjeduju dvije hidroksilne skupine i inhibitorni učinak od 48% (Lamy i sur., 2007). Utvrđeno je da punikalagin posjeduje citotoksični učinak na stanice karcinom crijeva (HCT 116, HT-29 i LoVo). Ima sposobnost induciranja apoptoze u navedenim stanicama te je otkriveno da povećava aktivnost kapaze-3. Također punikalagin je izazvao supresiju proteinske ekspresije MMP-2, MMP-9, Snail, i Slug (Sun i sur., 2023). Kao glavni mehanizam citotoksičnosti punikalagina spominje se i modulacija ekspresije Anx-A1 u HCT 116 stanicama kroz autofagiju (Ganesan i sur., 2020). Elaginska kiselina također posjeduje potencijalni kemopreventivni učinak tako što izaziva odgađanje progresije razvoja stanica karcinoma crijeva ali i inhibira proliferaciju stanica karcinoma crijeva i izaziva zastoj staničnog ciklusa i apoptozu (Zhao i sur., 2023). Drugi mehanizmi vezani uz anti-kancerogeni potencijal elaginske kiseline su aktivacija SIRT6 proteinske aktivnosti, inhibicija ekspresije HIF1 α (Lu i sur., 2023). Galna kiselina ima sposobnost inhibicije proliferacije HCT116 i HT29 stanica i izaziva apoptozu regulacijom omjera pocijepane kaspaze-3/pro-kaspaze-3 i pocijepane caspase-9/pro-caspase-9. Smatra se da inducira inhibiciju proliferacije stanica karcinoma kroz inhibiciju SRC i EGFR fosforilacije (Lin i sur., 2021).

Važno je uzeti u obzir da je u ovom radu korišten ekstrakt za tretiranje stanica tumora, koji sadrži različite fenolne komponente. Njihova koncentracija ali i njihov međusobni omjer mogu značajno utjecati na dostupnost slobodnih skupina koje mogu reagirati sa stanicama karcinoma. Dodatno, interakcije između komponenata mogu uzrokovati njihov sinergistički ili antagonistički efekt.

4. Zaključak

Cilj ovog istraživanja bio je formulirati kompleks na bazi proteina mlijeka i polifenola soka nara. Rezultati su potvrdili da se proteini mlijeka mogu koristiti kao nosači za polifenole nara a najviši afinitet su imali za vezanje punikalagina, a najmanji za vezanje antocijana. Osim što je formulirani kompleks imao antioksidacijski potencijal također je pokazao i inhibicijski učinak stanica karcinoma debelog crijeva. Inhibicijski učinak uzoraka uspoređen je s 5-fluorouracilom te je utvrđeno da je primjenom 5% ekstrakta postignuta gotovo jednaka inhibicija SW1116 i Colo205 stanica kao i s navedenim lijekom koji se standardno koristi u liječenju ovog tipa karcinoma. Formulirani kompleks se može koristiti kao funkcionalni dodatak hrani s ciljem povećanja udjela polifenola ali i antioksidacijske stabilnosti proizvod. Ujedno se kompleks može koristiti kao tzv. „delivery system“ za osiguravanje stabilnosti polifenola u našem organizmu te manifestacije pozitivnih učinaka polifenola na zdravlje.

Zahvala

Ovaj rad je financiran iz projekata IP-2019-04-5749 (financiran od HRZZ-a) i PZS-2019-02-1595 (financiran od ESF-a i HRZZ-a).

Literatura

- Andrade, M. A., Lima, V., Sanches Silva, A., Vilarinho, F., Castilho, M. C., Khwaldia, K. i Ramos, F. (2019). Pomegranate and grape by-products and their active compounds: Are they a valuable source for food applications? *Trends in Food Science & Technology*, 86, 68–84.
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M. i 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, 7970-7981.
- Araújo, J. R. Gonçalves, P. i Martel, F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 31, 77–87.
- Arnao, M.B., Cano, A. i Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73, 239-244.
- Asl, F.R., Barzegar, A. i Ebrahimzadeh, M.A. (2021). Evaluating Cytotoxic Potential of the Fruit and the Leaf Extracts of *Sambucus ebulus* (L.) on MCF7 and AGS Cell Lines. *Research in Molecular Medicine*, 9, 11-20.
- Benzie, I.F. i Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-79.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. i Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.
- Cao, Y. i Xiong, Y.L. (2017). Interaction of whey proteins with phenolic derivatives under neutral and acidic pH conditions. *Journal of Food Science*, 82, 409–419.
- Ganesan, T., Sinniah, A., Chik, Z. i Alshawsh M. A. (2020). Punicalagin Regulates Apoptosis-Autophagy Switch via Modulation of Annexin A1 in Colorectal Cancer. *Nutrients*, 12, 2430.
- Gosset-Erard, C., Zhao, M., Lordel-Madeleine, S. i Ennahar, S. (2021). Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. *Food Chemistry*, 352, 129396.

Grace, M.H., Guzman, I., Roopchand, D.E., Moskal, K., Cheng, D.M., Pogrebnyak, N., Raskin, I., Howell, A. i 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.

Hasnaoui, N., Wathélet, B. i Jiménez-Araujo, A. (2014). Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. *Food Chemistry*, 160, 196–203.

Hou, D.X., Kai, K., Li, J.J., Lin, S., Terahara, N., Wakamatsu, M., Fujii, M., Young, M.R. i Colburn, N. (2004). Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure–activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, 25, 29–36.

Jing, N., Song, J., Liu, Z., Wang, L. i Jiang G. (2020). Glycosylation of anthocyanins enhances the apoptosis of colon cancer cells by handicapping energy metabolism. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20, 312.

Kanakis, C.D., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. i Tajmir-Riahi, H.-A. (2011). Milk-lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 127, 1046–1055.

Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Koide, T., Umeda, T., Yukawa, T. i Terabe, K. (1995). Suppression of tumor cell growth by anthocyanins *in vitro*. *Cancer Investigation*, 13, 590–594.

Kelemen, V., Pichler, A., Ivic, I., Buljeta, I., Simunovic, J. i 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.

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

Kopjar, M., Raucher, F., Lila, M.A. i Šimunović, J. (2024). Anti-glioblastoma potential and phenolic profile of berry juices. *Processes*, 12, 242.

Lamy, S., Lafleur, S., Bedard, V., Moghrabi, A., Barrete, S., Gingras, D. i Béliveau, R. (2007). Anthocyanidins inhibit migration of glioblastoma cells: Structure-activity relationship and involvement of the plasmolytic system. *Journal of Cellular Biochemistry*, 100, 100–111.

Lila, M. A., Burton-Freeman, B., Grace, M. i Kalt W. (2016). Unraveling Anthocyanin Bioavailability for Human Health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 375–393.



- Lila, M. A., Targino Hoskin, R., Grace, M. H., Xiong, J., Strauch, R., Ferruzzi, M., Iorizzo, M. i Kay C. (2022). Boosting the Bioaccessibility of Dietary Bioactives by Delivery as Protein–Polyphenol Aggregate Particles. *Journal od Agriculture and Food Chemistry*, 19, 13017-13026.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. i Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254–260.
- Lin, X., Wang, G., Liu, P., Han, L., Wang, T., Chen K., i Gao, Y. (2021). Gallic acid suppresses colon cancer proliferation by inhibiting SRC and EGFR phosphorylation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21 (6), 638.
- Liu, J.; Yong, H., Yao, X., Hu, H., Yun, D. i Xiao, L. (2019). Recent advances in phenolic–protein conjugates: Synthesis, characterization, biological activities and potential applications. *RSC Advances*, 9, 35825.
- Lu, G., Wang, X., Cheng, M., Wang, S. i Ma, K. (2023). The multifaceted mechanisms of ellagic acid in the treatment of tumors: State-of-the-art. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, 115132.
- Michaud-Levesque, J., Bousquet-Gagnon, N. i Beliveau, R. (2012). Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. *Experimental Cell Research*, 318, 925–935.
- Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabasag, C. J., Laversanne, M., Vignat, J., Ferlay, J., Murphy, N. i Bray, F. (2023). Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*, 72, 338–344.
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S. i Phillips, G.O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39, 301–318.
- Oancea, A., Aprodu, I., Ghinea, I.O., Barbu, V., Ioniță, E., Bahrin, G., Răpeanu, G. i Stănciuc, N. (2017). A bottom-up approach for encapsulation of sour cherries anthocyanins by using β -lactoglobulin as matrices. *Journal of Food Engineering*, 210, 83–90.
- Ozdal, T., Capanoglu, E. i Altay, F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51, 954–970.
- Prior, R.L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M.J. i 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, 1473-1478.
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 507-26.

- Rawel, H.M., Czajka, D., Rohn, S. i Kroll, J. (2002). Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30, 137–150.
- Raucher, D., Rowsey, M., Hinson, J., Ćorković, I., Lila, M.A. i Šimunović, J. i Kopjar, M. (2024). Bioactive compounds, antioxidant activity, and antiproliferative potential on glioblastoma cells of selected stone fruit juices. *Processes*, 12, 1310.
- Reddy, M.K., Alexander-Lindo, R.L. i Nair, M.G. (2005). Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 9268–9273.
- Rivero, R., Archaina, D., Sosa, N., Leiva, G., Coronela, B.B. i Schebor, C. (2020). Development of healthy gummy jellies containing honey and propolis. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 100, 1030–1037.
- Roginsky, V. i Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92, 235–254.
- Roopchand, D., Grace, M.H., Kuhen, P., Cheng, D., Plundrich, N., Pouleva, A. i Lila, M.A. (2012). Efficient sorption of polyphenols to soybean flour enables natural fortification of foods. *Food Chemistry*, 131, 1193–1200.
- Sánchez-Velázquez, O.A., Cortés-Rodríguez, M., Milán-Carrillo, J., Montes-Ávila, J., Robles-Bañuelos, B., Santamaría del Ángel, A., Cuevas-Rodríguez, E.O. i Rangel-López, E. (2020). Anti-oxidant and anti-proliferative effect of anthocyanin enriched fractions from two Mexican wild blackberries (*Rubus* spp.) on HepG2 and glioma cell lines. *Journal of Berry Research*, 10, 513–529.
- Sęczyk, Ł., Świeca, M., Kapusta, I. i Gawlik-Dziki, U. (2019). Protein-phenolic interactions as a factor affecting the physicochemical properties of white bean proteins. *Molecules*, 24, 408.
- Singleton, V.L. i Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Sun, D.-P., Huang, H.-Y., Chou, C.-L., Cheng, L.-C., Wang, W.-C., Tian, Y.-F., Fang, C.-L. i Lin, K.-Y. (2023). Punicalagin is cytotoxic to human colon cancer cells by modulating cell proliferation, apoptosis, and invasion. *Human and Experimental Toxicology*, 42, 1–7.
- Tang, J., Oroudjev, E., Wilson, L. i Ayoub G. (2015). Delphinidin and cyanidin exhibit antiproliferative and apoptotic effects in MCF7 human breast cancer cells. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 2, 82–86.
- Yalcin, A. (2006). Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 1637–43.



Yildirim-Elikoglu, S. i 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.

Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A. i Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 675–683.

Zhao, J., Li, G., Ren, Y., Zhang, Z., Chen, H., Zhang, H., Zhao, X., Li, W., Jia, Y., Guan, X. i Liu, M. (2023). Ellagic acid inhibits human colon cancer HCT-116 cells by regulating long noncoding RNAs. *Anti-Cancer Drugs*, 34, 1112–1121.

COMPLEX BASED ON DAIRY PROTEINS AND POMEGRANATE JUICE: POLYPHENOL PROFILE AND POSSIBILITY OF UTILISATION IN GROWTH INHIBITION OF COLON CANCER CELLS

Mirela KOPJAR

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,
Franje Kuhača 18, Osijek, Croatia
mirela.kopjar@ptfos.hr

Ina ĆORKOVIĆ

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,
Franje. Kuhača 18, Osijek, Croatia
inacorkovic@gmail.com

Mary Ann LILA

North Carolina State University, Department of Food, Bioprocessing and Nutrition
Science, Plants for Human Health Institute, North Carolina Research Campus, 600
Laureate Way, Kannapolis, USA
mlila@ncsu.edu

Josip ŠIMUNOVIĆ

North Carolina State University, Department of Food, Bioprocessing and Nutrition
Science, 116C Schaub Hall, Raleigh, NC, USA
simun@ncsu.edu

Drazen RAUCHER

University of Mississippi Medical Center, Department of Cell and Molecular Biology,
2500 North State Street, Jackson, MS, USA
draucher@umc.edu

Abstract

The aim of this research was formulation of complex based on dairy proteins and pomegranate juice. Both, dairy proteins and pomegranate polyphenols are well known for their numerous health benefits but also for their impact on food quality. Complex was prepared in the form of freeze-dried powder and evaluated for total polyphenols and proanthocyanidins by spectrophotometric methods, and for individual polyphenols by HPLC method. In addition, they were evaluated for antioxidant activity and IR spectra were recorded in order to establish structural changes of dairy proteins upon adsorption of pomegranate polyphenols. Possibility of utilisation of formulated complex in inhibition of cancer cells of colon (SW1116 and Colo205) was also investigated. Individual polyphenols



identified on complex were delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, ellagic acid, gallic acid and punicalagin. Adsorption capacity of dairy proteins for identified polyphenols decreased in the following order: punicalagin (86.40%) > ellagic acid (67.78%) > gallic acid (61.28%) > cyanidin-3-glucoside (52.07%) > delphinidin-3-glucoside (44.30%). Complex also exhibited antioxidant potential by utilisation of DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC methods. Inhibition potential of samples was compared with 5-fluorouracil and it was determined that 5% of extract had almost the same inhibition potential of SW1116 and Colo205 cells as mentioned drug which is current drug of choice for treatment of this type of cancer. IR spectra of dairy proteins and complex were recorded and compared and it was established that adsorption of pomegranate polyphenols on dairy proteins caused changes in protein structure especially in the regions which are characteristic for proteins. Interaction responsible for adsorption of polyphenols on proteins were non-covalent ones i.e. hydrogen bonds were created and hydrophobic interactions occurred. Formulated complex can be utilised as functional food additive with the aim of fortification of foods with polyphenols as well as achieving antioxidant stability of foods and modification of their colour. In addition, mentioned complex can contribute to health benefits of polyphenols i.e. can be used as delivery systems of polyphenols in organism.

Key words: dairy proteins, pomegranate polyphenols, adsorption capacity, antioxidant activity, inhibition of cancer cells of colon

Key message of the paper: Dairy proteins can be utilised as carriers of pomegranate juice polyphenols with the aim of formulation of functional food additives. Formulated complexes can be used as additives in different food products in order to enrich them with polyphenols, increase antioxidant potential and modification of colour. Additionally, it was established that these complexes have potential in inhibition of colon cancer cells.