

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Waława Dąbrowskiego
– Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

mgr inż. Urszula Trych

Wpływ wysokich ciśnień na biodostępność antyoksydantów owoców i warzyw

The influence of high pressures on the bioaccessibility of fruit and
vegetable antioxidants

Praca doktorska
Doctoral thesis

Promotor:

Dr hab. inż. Krystian Marszałek, prof. IBPRS-PIB
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Waława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Promotor pomocniczy:

Dr inż. Magdalena Buniowska-Olejek
Katedra Technologii Mleczarstwa
Instytut Technologii Żywności i Żywienia
Uniwersytet Rzeszowski

Recenzenci:

Prof. dr hab. inż. Aneta Wojdyło
Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Nutraceutyków Roślinnych
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Dr hab. Joanna Kobus-Cisowska, prof. UPP
Katedra Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Warszawa, 2023

Składam serdeczne podziękowania

*Panu Promotorowi dr hab. inż. Krystianowi Marszałkowi, prof. IBPRS-PIB
za nieocenione wsparcie merytoryczne i motywację do pracy.*

*Pani dr Sylwii Skąpskiej
za umożliwienie realizacji pracy oraz celne uwagi i wskazówki.*

*Współpracownikom IBPRS-PIB, w szczególności Koleżankom i Kolegom z Zakładu
Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych, za wspaniałą atmosferę oraz
wymianę doświadczenia naukowego.*

*Mojej rodzinie i przyjaciołom
za wsparcie, motywację i wyrozumiałość.*

*Niniejszą pracę dedykuję
moim rodzicom Bożenie i Włodzimierzowi*

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora.

Data.....

Podpis promotora pracy

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data.....

Podpis autora pracy

Streszczenie

Wpływ wysokich ciśnień na biodostępność antyoksydantów owoców i warzyw

Celem pracy była weryfikacja hipotezy badawczej: obróbka wysokociśnieniowa produktów owocowych i warzywnych może zwiększać biodostępność antyoksydantów w nich występujących. Soki i puree z czarnych porzeczek oraz soki z buraków ćwikłowych poddano obróbce wysokim ciśnieniem hydrostatycznym (HHP) w 200, 400 i 500 lub 600 MPa przez 5 minut w temperaturze 20°C oraz ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym (SCCD) w 10, 30 i 60 MPa przez 10 minut w 45°C. Ponadto wykonano próbę odniesienia polegającą na obróbce termicznej produktów w 45°C przez 10 min w celu oszacowania wpływu temperatury w technice SCCD oraz pasteryzacji w 85°C przez 10 minut dla porównania uzyskanych wyników z tradycyjną pasteryzacją termiczną. Wszystkie próbki poddawano symulacji trawienia w trzyetapowym modelu *in vitro* z dializą. W próbkach przed trawieniem oraz po każdym z etapów trawienia oznaczono pojemność przeciwutleniającą z rodnikami ABTS+• i DPPH• oraz zawartość antocyjanów i witaminy C (w czarnej porzeczce) i betalain (w buraku ćwikłowym). Podjęto również próbę analizy metabolitów po trawieniu delphinidyno-3-*O*-rutynozydu, głównego barwnika antocyjanowego obecnego w czarnej porzeczce, w celu wyjaśnienia niskiej biodostępności tych związków. Uzyskane wyniki potwierdziły postawioną hipotezę badawczą. Odnotowano zwiększoną stabilność podczas trawienia oraz biodostępność antyoksydantów w produktach poddanych obróbce wysokociśnieniowej przy wybranych parametrach, w porównaniu z próbkami pasteryzowanymi, a nawet próbkami soków surowych w niektórych przypadkach. Wzrost pojemności przeciwutleniającej, pomimo spadku zawartości oznaczanych antyoksydantów w próbkach poddanych działaniu HHP i SCCD potwierdził przypuszczenia, że powstające metabolity odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu właściwości prozdrowotnych produktów.

Słowa kluczowe

wysokie ciśnienia hydrostatyczne, ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym, biodostępność, antocyjany, witamina C, betalainy, pojemność przeciwutleniająca

Abstract

The influence of high pressures on the bioaccessibility of fruit and vegetable antioxidants

The aim of the study was to verify the hypothesis that high-pressure processing of fruit and vegetable products may increase the bioaccessibility of their antioxidants. Blackcurrant juices and puree and beetroot juices were treated with high hydrostatic pressure (HHP) at 200, 400 and 500 or 600 MPa for 5 min at 20°C and supercritical carbon dioxide (SCCD) at 10, 30 and 60 MPa for 10 min at 45°C. In addition, a reference samples were performed by heat treatment at 45°C for 10 min, to estimate the effect of temperature in the SCCD technique and pasteurization at 85°C for 10 min to compare the results with traditional thermal pasteurization. All the samples were digested in the three-stage *in vitro* model with dialysis. In the samples before and after each stage of digestion, the antioxidant capacity measured with ABTS+• and DPPH• radicals as well as anthocyanins and vitamin C content (in blackcurrant) and betalains content (in beetroot) were determined. There was also an attempt to determine the metabolites of delphinidin-3-*O*-rutinoside after digestion, which is the main anthocyanin pigment present in blackcurrant, in order to explain the low bioaccessibility of these compounds. The obtained results confirmed the research hypothesis. Increased stability during digestion and bioaccessibility of antioxidants was noted in products treated with high pressures at selected parameters, compared to pasteurized samples and raw samples, in some cases. The increase in antioxidant capacity, despite the decrease in antioxidants content during digestion in the HHP and SCCD samples, proves that the formed metabolites have a large impact on modeling the antioxidant properties of products.

Keywords

high hydrostatic pressure, supercritical carbon dioxide, bioaccessibility, anthocyanins, vitamin C, betalains, antioxidant capacity

Spis treści

1.	Wstęp	13
2.	Biodostępność.....	14
3.	Uzasadnienie wyboru materiału badawczego i ocena biodostępności wybranych składników bioaktywnych	15
4.	Niekonwencjonalne metody przetwarzania żywności.....	21
4.1.	Wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP).....	22
4.2.	Ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym (SCCD).....	23
5.	Hipoteza badawcza, cel i zakres pracy	24
6.	Materiały i metody badawcze	27
6.1.	Materiał badany	27
6.1.1.	Owoce, puree i sok z czarnych porzeczek.....	27
6.1.2.	Sok z buraków ćwikłowych	27
6.2.	Część technologiczna	27
6.2.1.	Obróbka termiczna	27
6.2.2.	Wysokie ciśnienie hydrostatyczne	28
6.2.3.	Ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym	28
6.3.	Część analityczna	28
6.3.1.	Model trawienia <i>in vitro</i>	28
6.3.2.	Oznaczanie zawartości witaminy C	29
6.3.3.	Ekstrakcja antocyjanów z puree z czarnej porzeczki.....	30
6.3.4.	Oznaczanie zawartości antocyjanów.....	30
6.3.5.	Oznaczanie zawartość betalain.....	30
6.3.6.	Oznaczanie pojemności przeciwutleniającej wobec rodnika ABTS+•	31
6.3.7.	Oznaczanie pojemności przeciwutleniającej wobec rodnika DPPH•	32
6.3.8.	Identyfikacja metabolitów delfinidyno-3-O-rutynozydu za pomocą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas – UPLC-MS/MS	33
6.4.	Analiza statystyczna	33
7.	Omówienie i dyskusja wyników.....	34
7.1.	Wpływ HHP na stabilność i biodostępność witaminy C	34
7.2.	Wpływ HHP na stabilność i biodostępność antocyjanów	36
7.3.	Wpływ HHP na stabilność i biodostępność betalain	37
7.4.	Wpływ HHP na pojemność przeciwutleniającą podczas trawienia.....	39
7.5.	Wpływ SCCD na stabilność i biodostępność witaminy C	42
7.6.	Wpływ SCCD na stabilność i biodostępność antocyjanów.....	44
7.7.	Wpływ SCCD na stabilność i biodostępność betalain.....	46
7.8.	Wpływ SCCD na pojemność przeciwutleniającą podczas trawienia	47
8.	Obserwacje i spostrzeżenia.....	50
9.	Wnioski.....	53
10.	Bibliografia:.....	55
11.	Cykl publikacji.....	65
12.	Oświadczenia współautorów publikacji	145
13.	Dorobek naukowy.....	189

**Wykaz publikacji stanowiących monotematyczny cykl publikacji będący
podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora:**

[P1] Trych, U., Buniowska, M., Skąpska, S., Zhu, Z., Bi, J., Liu, X., Barba, F. J. & Marszałek, K (2020). Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing. In Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

IF₂₀₂₀ = 0, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = 20

[P2] Trych, U., Buniowska, M., Skąpska, S., Starzonek, S., & Marszałek, K. (2020). The Bioaccessibility of Antioxidants in Black Currant Puree after High Hydrostatic Pressure Treatment. *Molecules*, 25(15), 3544.

IF₂₀₂₀ = 4.411, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = 140

[P3] Trych, U., Buniowska, M., Skąpska, S., Kapusta, I., & Marszałek, K. (2022). Bioaccessibility of Antioxidants in Blackcurrant Juice after Treatment Using Supercritical Carbon Dioxide. *Molecules*, 27(3), 1036.

IF₂₀₂₂ = 4.927, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = 140

[P4] Trych, U., Buniowska-Olejnik, M., & Marszałek, K. (2022). Bioaccessibility of Betalains in Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Juice under Different High-Pressure Techniques. *Molecules*, 27(20), 7093.

IF₂₀₂₂ = 4.927, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = 140

Sumaryczny Impact Factor publikacji wchodzących w monotematyczny cykl publikacji wynosi IF₂₀₂₂ = 14.265

Zgodnie z listą czasopism punktowanych opublikowaną przez MNiSW / MEiN₂₀₂₁ powyższe publikacje wyceniane są sumarycznie na 440 punktów, bez podziału na autorów.

IF oraz liczbę punktów MNiSW / MEiN₂₀₂₁ obliczono na podstawie danych z roku, w którym ukazała się publikacja lub ostatniego roku, dla którego dane te zostały opublikowane.

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie zrealizowano w ramach projektu pt. „Badanie wpływu wysokiego ciśnienia na bioprzyswajalność hydrofilowych antyoksydantów przetworów z owoców i warzyw” sfinansowanego z subwencji przyznanej przez MRiRW (projekt nr 134-01-ZO) w okresie od 10.2019 do 12.2022.

1. Wstęp

Owoce i warzywa to produkty bogate w związki o właściwościach antyoksydacyjnych, które mają potencjalne właściwości prozdrowotne i są składnikami niezbędnymi do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Związki te mogą hamować reakcje utleniania oraz neutralizować nadmiar wolnych rodników w organizmie, które przyspieszają procesy starzenia, a w skrajnych przypadkach mogą przyczyniać się do powstawania zmian nowotworowych. Dostarczanie składników o właściwościach przeciwutleniających z żywnością nie jest jednak jednoznaczne z tym, że zostaną one w pełni przyswojone i wykorzystane przez nasz organizm. Dlatego kluczowe jest zdobycie wiedzy na temat biodostępności tych składników dla ludzkiego organizmu. Wiedza na temat biodostępności jest istotna w projektowaniu żywności prozdrowotnej, w której kluczowy jest rzeczywisty wpływ na organizm człowieka, a nie tylko skład ilościowy substancji aktywnej w produkcie spożywczym. Ze względu na różnorodność czynników wpływających na proces trawienia i wchłaniania w przewodzie pokarmowym, najdokładniejszą metodą oceny biodostępności są badania *in vivo*. Odzworowanie warunków panujących w przewodzie pokarmowym w testach *in vitro* jest trudne do uzyskania, jednakże osiągnięto w tej sprawie międzynarodowy konsensus grupy INFOGEST, dzięki czemu wyniki badań *in vitro* są wystandaryzowane, a metodologia badawcza stosowana w różnych ośrodkach naukowych na świecie porównywalna. Organizacja INFOGEST powstała w ramach akcji COST (2011-2015), a od 2015 roku funkcjonuje jako międzynarodowa sieć badawcza, zrzeszająca ponad 440 naukowców ze 150 instytucji z całego świata. Jej głównym celem jest poprawa właściwości zdrowotnych żywności poprzez zgłębianie i dzielenie się wiedzą na temat procesu trawienia [Minekus i wsp. 2014; Brodkorb i wsp. 2019].

W ostatnich latach duże zainteresowanie w świecie nauki budzą możliwości poprawy biodostępności wybranych składników biologicznie aktywnych, dlatego poszukuje się metod pozwalających ograniczyć degradację tych składników w stosunku do tradycyjnej obróbki termicznej, a nawet poprawić ich biodostępność w odniesieniu do żywności nieprzetworzonej.

Techniki wysokociśnieniowej obróbki żywności, takie jak: wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP) oraz ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym (SCCD) cieszą się zainteresowaniem przemysłu ze względu na wysoką jakość produktów otrzymywanych z ich wykorzystaniem, przy jednoczesnym zachowaniu bezpieczeństwa i przedłużonej przydatności do spożycia. Ponadto najnowsze wyniki badań wskazują, że ich zastosowanie może istotnie wpływać na biodostępność niektórych składników żywności. Stanowią one

również obiecującą alternatywę dla tradycyjnej obróbki termicznej żywności, która przyczynia się do utraty dużej części termolabilnych składników bioaktywnych o właściwościach prozdrowotnych. Kluczowe znaczenie ma jednak dobór odpowiednich parametrów procesu do produktu i efektu jaki chcemy uzyskać. Istnieją doniesienia literaturowe wskazujące, że obróbka wysokociśnieniowa żywności może mieć pozytywny wpływ na biodostępność lipofilowych substancji bioaktywnych takich, jak np. karotenoidy. Istnieje jednak niewielka ilość doniesień literaturowych na temat biodostępności hydrofilowych substancji o właściwościach przeciwutleniających, takich jak antocyjany czy witamina C. Niewielka ilość dostępnych wyników badań na temat biodostępności hydrofilowych składników biologicznie aktywnych owoców i warzyw, szczególnie po obróbce innowacyjnymi technikami wysokociśnieniowymi było podstawą do podjęcia prac badawczych w tym kierunku.

2. Biodostępność

Biodostępność składników odżywczych i związków bioaktywnych jest definiowana jako część danej substancji, która została uwolniona z matrycy, a następnie może być wchłonięta do krwioobiegu, gdzie może podlegać procesom metabolicznym [Minekus i wsp. 2014]. W nomenklaturze anglojęzycznej spotykane jest często rozróżnienie pojęć biodostępności (ang. *bioaccessibility*) i bioprzyswajalności (ang. *bioavailability*), w odróżnieniu do publikacji polskich, gdzie podobny podział jest rzadko spotykany. Według zagranicznych źródeł pojęcie „bioprzyswajalność” obejmuje szerszy niż „biodostępność” zakres procesów mających miejsce w organizmie człowieka, ponieważ dotyczy frakcji związków, które po wchłonięciu są transportowane i wykorzystane podczas wypełniania funkcji fizjologicznych w organach docelowych oraz mogą być magazynowane w tkankach [Fernández-García i wsp. 2009, Rodríguez-Roque i wsp. 2013]. Istnieją doniesienia, że niektóre składniki bioaktywne mogą być wchłaniane nie tylko poprzez nabłonek jelita cienkiego, ale również na wcześniejszych odcinkach przewodu pokarmowego. Dlatego niekiedy badane są pod tym kontem płyny ustrojowe żołądka oraz potencjalny stopień wchłaniania po trawieniu na tym etapie poprzez odniesienie zawartości związków bioaktywnych po trawieniu na etapie żołądka do zawartości związków przed trawieniem [Carbonell-Capella i wsp. 2014; Milbury i wsp. 2002].

W badaniach biodostępności bardzo często wykorzystywane są modele trawienia *in vitro*, których zadaniem jest jak najdokładniejsze odwzorowanie warunków

fizjologicznych panujących w przewodzie pokarmowym. Powstają coraz bardziej zaawansowane modele, uwzględniające dynamiczny przepływ treści pokarmowej pomiędzy poszczególnymi odcinkami układu, ciągły pomiar i automatyczną kontrolę pH, a także umożliwiają wprowadzenie mikrobioty jelitowej. Aby przeprowadzić symulację wchłaniania substancji przez nabłonek jelit do krwioobiegu wykorzystywana jest najczęściej metoda dializy przez półprzepuszczalne membrany celulozowe, wirowanie lub hodowle linii komórkowych (np. Caco-2) [Carbonell-Capella i wsp. 2014, Minekus i wsp. 2014].

Badania *in vivo* z udziałem ludzi bez wątplenia umożliwiają najpełniejszą ocenę biodostępności, jednakże wiążą się z nimi pewne ograniczenia. Przeprowadzenie takich badań wymaga zapewnienia kontrolowanych warunków żywienia osób biorących w nich udział oraz wyselekcjonowania odpowiedniej grupy ochotników, co jest niezwykle trudne. Standaryzacja jest utrudniona a porównywalność i powtarzalność wyników niewielka. Dodatkowo wymagana jest zgoda komisji bioetycznej, a koszty takich prac są wysokie. Badania *in vitro* są cenne we wstępnej ocenie biodostępności, gdyż pozwalają zrozumieć pewne mechanizmy kierujące procesami trawienia i wchłaniania składników bioaktywnych oraz ich potencjalne działanie w organizmie [Hur i wsp. 2011; Egger i wsp. 2016]. Analiza biodostępności składników bioaktywnych jest niezbędna do oceny ich faktycznego wykorzystania przez organizm. Ponadto poprawa biodostępności poprzez zastosowanie innowacyjnych technik utrwalania żywności pozwala na zaprojektowanie żywności funkcjonalnej zapewniającej większe korzyści prozdrowotne.

3. Uzasadnienie wyboru materiału badawczego i ocena biodostępności wybranych składników bioaktywnych

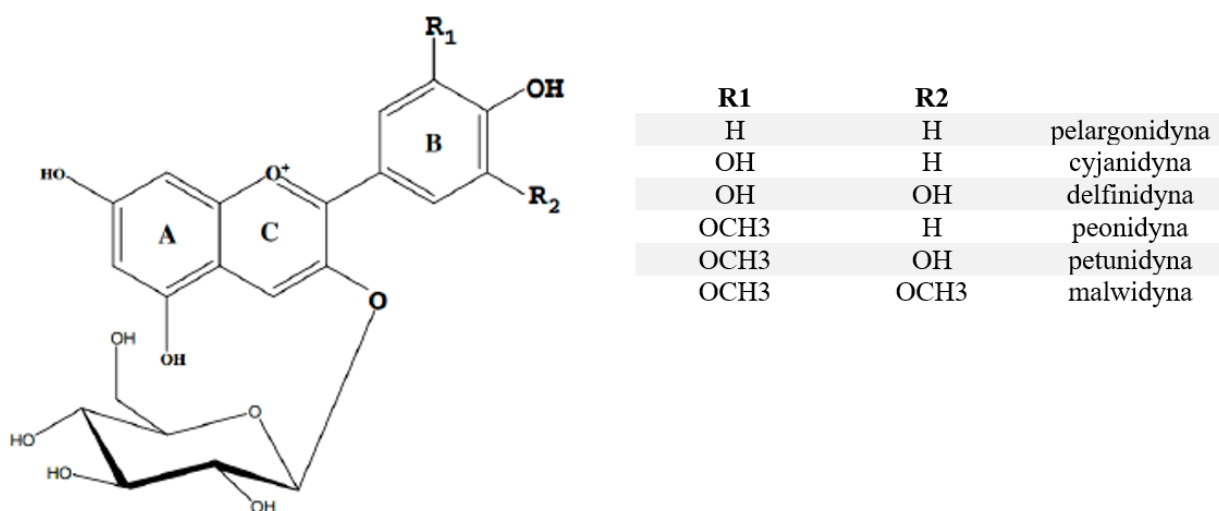
Polska jest największym w Europie oraz drugim na świecie producentem czarnych porzeczek (*Ribes nigrum* L.) [FAOSTAT 2021]. W 2021 r. zebrano 110 000 ton tych owoców, co stanowi ponad połowę ich światowej produkcji [GUS 2021]. Czarne porzeczki zaliczane mogą być z powodzeniem do tzw. „superowoców” ze względu na wysoki potencjał przeciwutleniający, wynikający głównie z bardzo wysokiej zawartości witaminy C i antocyjanów. Owoce te wyróżniają się również wysoką zawartością pektyn, kwasów organicznych oraz składników mineralnych. W mniejszej ilości można znaleźć w nich również witaminy z grupy B, K oraz prowitaminy A (β -karoten). Ze względu na wysoką zawartość przeciwutleniaczy są one cenione w profilaktyce chorób nowotworowych, układu krążenia i wad wzroku [Nowak i Żmudzinska-Żurek 2010;

Paredes-López i wsp. 2010]. Owoce te nadają się do bezpośredniej konsumpcji w formie surowej, a także są bardzo dobrym surowcem do produkcji soków, mrozonek, dżemów i nalewek. Liczne właściwości prozdrowotne czynią je również interesującym składnikiem do projektowania żywności funkcjonalnej [Nour i wsp. 2011].

Czarne porzeczki zawierają od 160 do 285 mg/100 g kwasu L-askorbinowego, dlatego już garść tych owoców wystarczy, aby pokryć jego zalecane dzienne spożycie (RDA) [Nour i wsp. 2011]. Kwas L-askorbinowy, w wyniku utleniania wiązania endiolowego (wiązanie podwójne pomiędzy dwoma grupami -OH w pierścieniu γ -laktonowym) może ulegać przekształceniu w kwas L-dehydroaskorbinowy (Rysunek 1). Reakcja ta jest odwracalna i obie formy kwasu wykazują aktywność witaminową. Witamina C to związek chemiczny stosunkowo stabilny w stanie stałym, lecz podatny na degradację w postaci roztworu. Związek ten jest szczególnie wrażliwy na zasadowe i obojętne pH, wysokie temperatury, obecność tlenu i niektóre jony metali [Janda i wsp. 2015]. Witamina C jest związkiem o wysokiej aktywności biologicznej i pełni wiele funkcji w organizmie. Między innymi wspomaga produkcję i zachowanie kolagenu niezbędnego do tworzenia tkanki łącznej oraz ułatwia gojenie się ran. Jest niezbędnym składnikiem w leczeniu anemii dzięki zwiększaniu wchłaniania żelaza i sprzyjaniu w produkcji czerwonych krwinek [Janda i wsp. 2015]. Witamina C wykazuje działanie antymutagenne dzięki zdolności do neutralizacji wolnych rodników oraz hamowania syntezy rakotwórczej nitrozoaminy w żołądku [Vallejo i wsp. 2004]. Badania epidemiologiczne na szczurach dowiodły również, że długotrwałe podawanie małych dawek witaminy C może mieć znaczący wpływ w zapobieganiu udarom mózgu [Li i wsp. 2019].

Witamina C wchłaniana jest w dwunastnicy i proksymalnym odcinku jelita cienkiego, zarówno w wyniku transportu biernego jak i aktywnego. W aktywnym transporcie kwasu L-askorbinowego szczególną rolę pełni aktywny transporter zależny od jonów sodu (SVCT1), natomiast w przypadku kwasu L-dehydroaskorbinowego funkcję tę posiadają również transportery glukozy (GLUT1). Biodostępność witaminy C jest zależna od podanej dawki i jest samoistnie regulowana w wyniku wysycania aktywnych transporterów błonowych oraz mechanizmów wydalania nerkowego. Doniesienia literaturowe wskazują, że syntetyczny kwas L-askorbinowy podany drogą doustną osiąga maksymalną biodostępność, bliską 100%, przy dawce do 200 mg, która spada przy stopniowym zwiększaniu dawki. Powyżej dawki 1250 mg biodostępność osiąga stałą wartość (33%). Proces wchłaniania zakłóca między innymi palenie tytoniu, przyjmowanie niektórych leków, zaburzenia trawienia oraz choroby nerek [Regulska i Litwiniuk 2020].

i proliferację komórek [Lyll i wsp. 2009]. Badania na modelach zwierzęcych wykazują możliwość przenikania pochodnych antocyjanów przez barierę krew-mózg. Ze względu na swoje właściwości neuroprotektoryjne są obiecującymi suplementami diety hamującymi stres oksydacyjny w mózgu i zapobiegającymi chorobom neurodegeneracyjnym, takim jak choroba Alzheimera, Parkinsona i stwardnienie rozsiane [Płatosz i wsp. 2021, Rashid i wsp. 2014].



Rysunek 2. Struktura antocyjanów: kation flawyliowy z przyłączoną resztą cukrową, oraz przykłady podstawników tworzących najpopularniejsze i najczęściej występujące antocyjany [Marszałek i wsp. 2017c].

Biodostępność antocyjanów dostarczanych drogą pokarmową jest niewielka i wynosi ok. 1%. Ich maksymalne stężenie w osoczu kształtuje się na poziomie kilkudziesięciu nM i występuje nieco ponad godzinę po spożyciu. Należy jednak zaznaczyć, że badania często nie uwzględniają wszystkich pochodnych antocyjanów, które mogły powstać w szlaku metabolicznym oraz możliwości ich powrotu z żółcią do przewodu pokarmowego [Fernandes i wsp. 2014, Grajek 2007]. Wchłanianie antocyjanów w przewodzie pokarmowym może spowalniać związanie ich z wielkocząsteczkowymi składnikami tkanki roślinnej, takimi jak celuloza, pektyna czy błonnik [Ribas-Agustí i wsp. 2018]. Według aktualnych doniesień antocyjany mogą być wchłaniane w różny sposób na różnych odcinkach przewodu pokarmowego, rozpoczynając od jamy ustnej aż po jelito grube.

Antocyjany mogą być obecne w osoczu krwi już po 5 minutach od kontaktu z tkanką nabłonkową jamy ustnej, ponadto w jamie ustnej występują podobne transportery, jak w jelicie, które mogą sprzyjać wchłanianiu antocyjanów również w ustach [Sigurdson i wsp. 2019]. Istnieją również przesłanki, że antocyjany mogą być wchłaniane w postaci

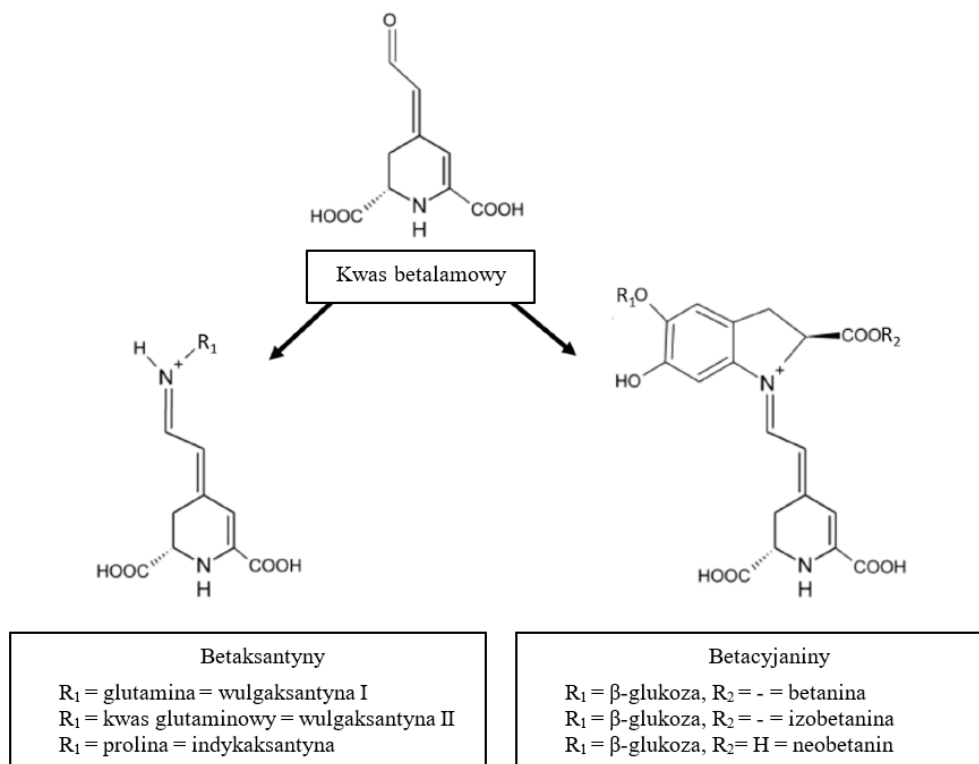
aglikonów i glikozydów przez błonę śluzową żołądka [Milbury i wsp. 2002, Cao i wsp. 2001]. W jelicie cienkim antocyjany są szybko metabolizowane i pojawiają się w krwioobiegu lub są wydalane z żółcią i moczem zarówno w postaci nienaruszonej, jak i metabolizowanej. Za transport na tym odcinku przewodu pokarmowego potencjalnie odpowiadają transportery glukozy (SGLT1, GLUT2), ale możliwy jest również bierny transport aglikonów [Fernandes i wsp. 2014]. Związki nie wchłonięte w jelicie cienkim są metabolizowane w dalszej kolejności przez mikroflorę jelita grubego [Mueller i wsp. 2017]. Metabolity antocyjanów identyfikowane w płynach ustrojowych zwierząt i ludzi są to najczęściej pochodne metylowane, glukuronidowane i siarczanowane [Fernandes i wsp. 2014, Płatosz i wsp. 2021]. Antocyjany są również metabolizowane do kwasów fenolowych, w szczególności kwasu protokatechowego, który jest wskazywany jako metabolit w dużej ilości obecny w płynach ustrojowych, moczu i kale ludzi na diecie bogatej w antocyjany [Vitaglione i wsp. 2007]. Pomimo ogólnie niskiej biodostępności antocyjanów, badania epidemiologiczne wskazują na ich pozytywny wpływ na organizm. Może to wynikać z biologicznej aktywności metabolitów antocyjanów wytwarzanych w organizmie, a także z ich potencjalnego synergistycznego oddziaływania z innymi związkami [Fernandes i wsp. 2014, Lila i wsp. 2016].

Buraki ćwikłowe (*Beta vulgaris* L.) to jedno z najbardziej popularnych warzyw okopowych uprawianych w Polsce. Ich produkcja w 2021 r. wyniosła 239 tys. ton, w wyniku czego Polska utrzymała pozycję największego producenta tych warzyw w Unii Europejskiej [GUS 2021]. Wykorzystywane są do produkcji soków, produktów fermentowanych, konserwowych, mrożonych czy suszonych, a także służą do pozyskiwania naturalnych czerwonych barwników spożywczych. Są one niezwykle cennym składnikiem diety ze względu na zawartość witamin (C, A, E, K, z grupy B), kwasu foliowego, przeciwutleniaczy, aminokwasów, garbników i soli mineralnych (mangan, magnez, potas, sód, fosfor, żelazo, cynk, miedź, bor, krzemiany i selen) [Ceclu i Nistor 2020, Chhikara 2020].

Wiodącą grupą związków fenolowych w burakach ćwikłowych są betalainy, których zawartość waha się, w zależności od odmiany i warunków uprawy, w granicach 800-1300 mg/L surowego soku [Wruss i wsp. 2015]. Są to rozpuszczalne w wodzie heterocykliczne pigmenty azotowe będące pochodnymi tyrozyny. Wśród nich wyróżniamy dwie podgrupy związków: betaksantyny, charakteryzujące się żółto-pomarańczową barwą i betacyjaniny, odpowiedzialne za czerwono-fioletową pigmentację. Podstawą budowy

tych związków jest kwas betalainowy, który w przypadku betacyjanin łączy się z glukozydem cyklo-DOPA-5-O-Glc (Rysunek 3). Betalainy są wrażliwe na zmiany pH, podwyższoną temperaturę, światło, działanie enzymów, obecność tlenu i jonów metali [Pandita i wsp. 2020, Nirmal i wsp. 2021].

Buraki ćwikłowe należą do pierwszej dziesiątki warzyw o największych właściwościach przeciwutleniających. Ich spożywanie jest zalecane w profilaktyce przeciwnowotworowej i chorób układu krążenia [Silva i wsp. 2021, Lechner i Stoner 2019]. Liczne badania wykazały szereg właściwości prozdrowotnych buraków, takich jak silne działanie przeciwzapalne i przeciwbakteryjne, obniżanie ciśnienia krwi oraz zmniejszanie poziomu lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) [Rahimi i wsp. 2019, Fu i wsp. 2020, Clifford i wsp. 2015, Pietrzakowski i wsp. 2010]. Są one również głównym źródłem azotanów w diecie, które są odpowiedzialne za prawidłowe napięcie i homeostazę naczyń krwionośnych oraz rozluźnianie, proliferację i wzrost mięśni gładkich [Pandita i wsp. 2020]. Badania donoszą, że spożycie buraków ćwikłowych zmniejszyło częstość występowania nowotworów skóry, płuc, wątroby, okrężnicy i przełyku. Betalainy były również w stanie hamować proliferację komórek nowotworowych: raka szyjki macicy i raka pęcherza moczowego *in vitro* [Ceclu i Nistor 2020].



Rysunek 3. Wzór chemiczny betalain: betacyjaniny/ betaksantyny lub budowa (cyklo-DOPA) [Nirmal i wsp. 2021].

Wchłanianie jelitowe betalain odbywa się głównie w wyniku bezpośredniej dyfuzji, w mniejszym stopniu również z udziałem transporterów białkowych. Przyjmuje się, że betacyjaniny mogą być wchłaniane do krwiobiegu w postaci niezmienionej i nie są sprzęgane z kwasem glukuronowym ani siarczanami. Na biodostępność betalain mają wpływ także ich interakcje z innymi składnikami diety [Klewicka 2012, Sawicki i wsp. 2020]. W badaniach *in vivo* na szczurach, którym podawano dożołądkowo sfermentowany sok z buraków, stwierdzono, że zarówno natywne, jak i metabolizowane betacyjaniny mogą być wchłaniane przez komórki błony śluzowej żołądka. W żołądku, krwi i moczu szczurów wykrywano głównie betaninę, izobetaninę, neobetaninę, betanidyny i dekarboksylowane formy betacyjanin [Sawicki i wsp. 2020]. W badaniach z udziałem 10 zdrowych mężczyzn, którzy spożywali sok z buraków lub całe buraki, nie wykryto betaniny w osoczu krwi, jednak poziomy tlenu azotu wzrosły po 8 godzinach od spożycia soku [Clifford i wsp. 2017].

4. Niekonwencjonalne metody przetwarzania żywności

Techniki wysokociśnieniowe zaliczane są do nietermicznych metod utrwalania żywności i stanowią obiecującą alternatywę dla tradycyjnej pasteryzacji i sterylizacji. Cieszą się one coraz większą popularnością, zarówno w badaniach naukowych jak i produkcji komercyjnej. Zastosowanie nowatorskich technik utrwalania jest uzasadnione w celu projektowania produktów o zwiększonych walorach prozdrowotnych, poprzez ograniczenie negatywnego wpływu wysokiej temperatury na produkt, dzięki czemu jego jakość jest nieporównywalnie wyższa niż w przypadku tradycyjnej termicznej pasteryzacji i sterylizacji. Wśród technik wysokociśnieniowych wyróżnia się między innymi wysokie ciśnienia hydrostatyczne – *High Hydrostatic Pressure* (HHP) i ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym/ pod wysokim ciśnieniem – *Supercritical Carbon Dioxide/ High Pressure Carbon Dioxide* (SCCD/ HPCD) [Marszałek i wsp. 2014].

Obróbka żywności jest również jednym z czynników wpływających na biodostępność składników aktywnych. Istnieją doniesienia naukowe, że zastosowanie technik wysokociśnieniowych, takich jak HHP i SCCD, może nie tylko wpływać na wyższą stabilność związków korzystnych dla zdrowia, ale i zwiększać ich biodostępność [Barba i wsp. 2015, Zhao i wsp. 2019], poza udowodnionym już w wielu pracach wpływem na wydłużenie terminu przydatności do spożycia [Marszałek i wsp. 2015, Marszałek i wsp. 2018, Marszałek i wsp. 2017d, Marszałek i wsp. 2019b].

4.1. Wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP)

HHP jest stosowane w przemyśle spożywczym w celu przedłużenia przydatności do spożycia produktów poprzez inaktywację natywnej mikroflory oraz zmniejszanie aktywności enzymów tkankowych. Brak wpływu wysokiej temperatury przyczynia się do zachowania cennych termolabilnych składników bioaktywnych, przy jednoczesnym zachowaniu właściwości sensorycznych (smak, zapach, barwa) na poziomie zbliżonym do produktu surowego. Technika ta stosowana jest na świecie na coraz większą skalę do utrwalania produktów owocowych i warzywnych, ale również dań gotowych do spożycia, mięsa i owoców morza [Barba i wsp. 2018, Sokołowska i Nasiłowska 2019].

Mechanizm działania HHP polega na transmisji ciśnienia w sposób natychmiastowy i równomierny na całą próbkę, niezależnie od jej kształtu, objętości i konsystencji. W przemyśle stosowane są obecnie ciśnienia do 600 MPa, natomiast w skali laboratoryjnej można osiągnąć nawet do 1400 MPa i więcej. Proces przebiega zwykle w czasie od kilku do kilkunastu minut i najczęściej prowadzony jest w temperaturze otoczenia. W wyniku sprężania medium przenoszącego ciśnienie, następuje adiabaticzny wzrost temperatury (w przypadku wody jest to 3-5°C na każde 100 MPa), a wytworzone ciepło jest przenoszone do komory wysokiego ciśnienia oraz utrwalanego produktu. Wysoka zawartość wody w produktach owocowo-warzywnych, a także duża pojemność cieplna komory HHP minimalizują efekt termiczny ogrzewania adiabaticznego [Barba i wsp. 2018]. Wysokie ciśnienie wpływa na redukcję aktywności enzymów roślinnych poprzez oddziaływanie na słabe wiązania chemiczne (wodorowe, jonowe, hydrofobowe) odpowiedzialne za tworzenie drugorzędowej i trzeciorzędowej struktury białek. Wpływ na hamowanie aktywności enzymatycznej jest zależny od zastosowanych parametrów procesu. Inaktywacja komórek drobnoustrojów zachodzi również w wyniku mechanicznego uszkodzenia komórek drobnoustrojów [Szczepańska i wsp. 2021]. Ciśnieniowanie przeprowadzane jest najczęściej w systemie periodycznym, na produktach zapakowanych w opakowania jednostkowe wykonane z tworzyw sztucznych. Najnowsze rozwiązania pozwalają również na półciągłą produkcję soków z rozlewem aseptycznym, co znacząco zwiększa wydajność procesu [Marszałek i wsp. 2021].

Wpływ wysokich ciśnień na biodostępność może być spowodowany zmianami, jakie wywołują one w strukturze tkanek roślinnych. Procesy te mogą ułatwić uwalnianie związków bioaktywnych z matrycy żywności i pośrednio wpłynąć na zmiany biodostępności. Oddziaływanie wysokich ciśnień na aktywność niektórych endogennych enzymów, np. pektynolitycznych, uwalnianych z uszkodzonych komórek, również może

sprzyjać ekstrakcji związków bioaktywnych ze struktur komórkowych, a w konsekwencji prowadzi do poprawy ich biodostępności [Barba i wsp. 2015]. Należy pamiętać, że wpływ wysokich ciśnień na biodostępność zależy od rodzaju badanych związków bioaktywnych oraz matrycy żywnościowej [Cilla i wsp. 2018].

4.2. Dیتlenek węgla w stanie nadkrytycznym (SCCD)

Wiele aktualnych badań wskazuje, że SCCD jest techniką, która może być stosowana w przemyśle spożywczym w celu utrwalania żywności. Podobnie jak HHP, przyczynia się do niszczenia natywnej mikroflory oraz znacznego obniżenia aktywności enzymów tkankowych, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej zawartości antyoksydantów oraz jakości sensorycznej produktów [Marszałek i wsp. 2015, 2018].

Mechanizm procesu polega na penetracji produktu dیتlenkiem węgla, który przy temperaturze powyżej 31,1°C i ciśnieniu 7,38 MPa osiąga stan nadkrytyczny. CO₂ w stanie nadkrytycznym ma niską lepkość ($3-7 \times 10^{-5}$ Pa·s) i niemal zerowe napięcie powierzchniowe, dzięki czemu z łatwością dyfunduje w matrycy żywności [Xue i wsp. 2016]. CO₂ w stanie nadkrytycznym obniża pH wewnątrz komórek mikroorganizmów, zaburzając ich procesy metaboliczne, powoduje modyfikację błon komórkowych oraz fizyczne rozerwanie tkanek roślinnych, przyczyniając się do ekstrakcji związków bioaktywnych. Jest on zatwierdzony jako substancja bezpieczna do stosowania w żywności (GRAS), jest nietoksyczny, niepalny, niedrogi, łatwo dostępny oraz dzięki wysokiej lotności, łatwy do usunięcia z próbki po procesie [Marszałek i wsp. 2019a, 2017a].

SCCD wykorzystywany jest w przemyśle oraz w licznych badaniach naukowych do ekstrakcji olejków zawierających kannabinoidy (CBD) z konopi, suplementów diety, chmielu, olejków eterycznych, wanilii, czosnku i innych przypraw [Marszałek i wsp. 2017c, Qamar i wsp. 2021]. Technika mikronizacji, czyli mikrokapsułkowania z wykorzystaniem płynów nadkrytycznych znalazła również szerokie zastosowanie w farmacji. Wykazano, że zastosowanie tej technologii zwiększało biodostępność substancji czynnej leku [Liu i wsp. 2020, Kankala i wsp. 2017]. Utrwalanie produktów owocowych i warzywnych techniką SCCD ma ogromny potencjał, ale nie jest jeszcze stosowane na skalę przemysłową. Przy ciśnieniach dziesięciokrotnie niższych niż w przypadku HHP, pozwala na otrzymanie produktów wysokiej jakości i bezpiecznych mikrobiologicznie. Jedną z barier stosowania tej techniki na szerszą skalę jest wciąż niepełna znajomość parametrów zapewniających pełną inaktywację enzymów endogennych o wysokiej odporności na wysokie ciśnienia. Drugim ograniczeniem jest

aplikacja głównie w płynnych produktach spożywczych, takich jak soki, gdyż przetwarzanie całych owoców, może powodować znaczną deformację tkanek [Damar i wsp. 2006, Marszałek i wsp. 2017c].

Obecnie brakuje badań na temat wpływu utrwalania żywności z wykorzystaniem SCCD na biodostępność antyoksydantów. Dostępne publikacje dotyczą jedynie produktów pomidorowych i biodostępności likopenu. Zastosowanie SCCD przy wybranych parametrach przyczyniało się do zwiększenia izomeryzacji *trans*-likopenu do *cis*-likopenu, który charakteryzuje się wyższą biodostępnością [Zhao i wsp. 2019].

Przeglądu literatury dokonano wykorzystując pierwszą z monotematycznego cyklu publikacji [P1].

5. Hipoteza badawcza, cel i zakres pracy

Hipoteza badawcza:

Zastosowanie HHP i SCCD do utrwalania soku/ puree z czarnych porzeczek oraz soku z buraków ćwikłowych zwiększa biodostępność hydrofilowych związków przeciwutleniających.

Hipoteza ta weryfikowana była przy pomocy hipotez szczegółowych formułowanych na poszczególnych etapach badań:

H1. Zastosowanie HHP wpływa na zwiększenie biodostępności witaminy C i antocyjanów w puree z czarnej porzeczki.

H2. Zastosowanie SCCD wpływa na zwiększenie biodostępności witaminy C i antocyjanów w soku z czarnej porzeczki.

H3. Zastosowanie HHP wpływa na zwiększenie biodostępności betalain w soku z buraka ćwikłowego.

H4. Zastosowanie SCCD wpływa na zwiększenie biodostępności betalain w soku z buraka ćwikłowego.

H5. Obróbka wysokociśnieniowa technikami HHP i SCCD wpływa na zwiększenie potencjału przeciwutleniającego produktów z czarnej porzeczki i buraka ćwikłowego po trawieniu.

Cel:

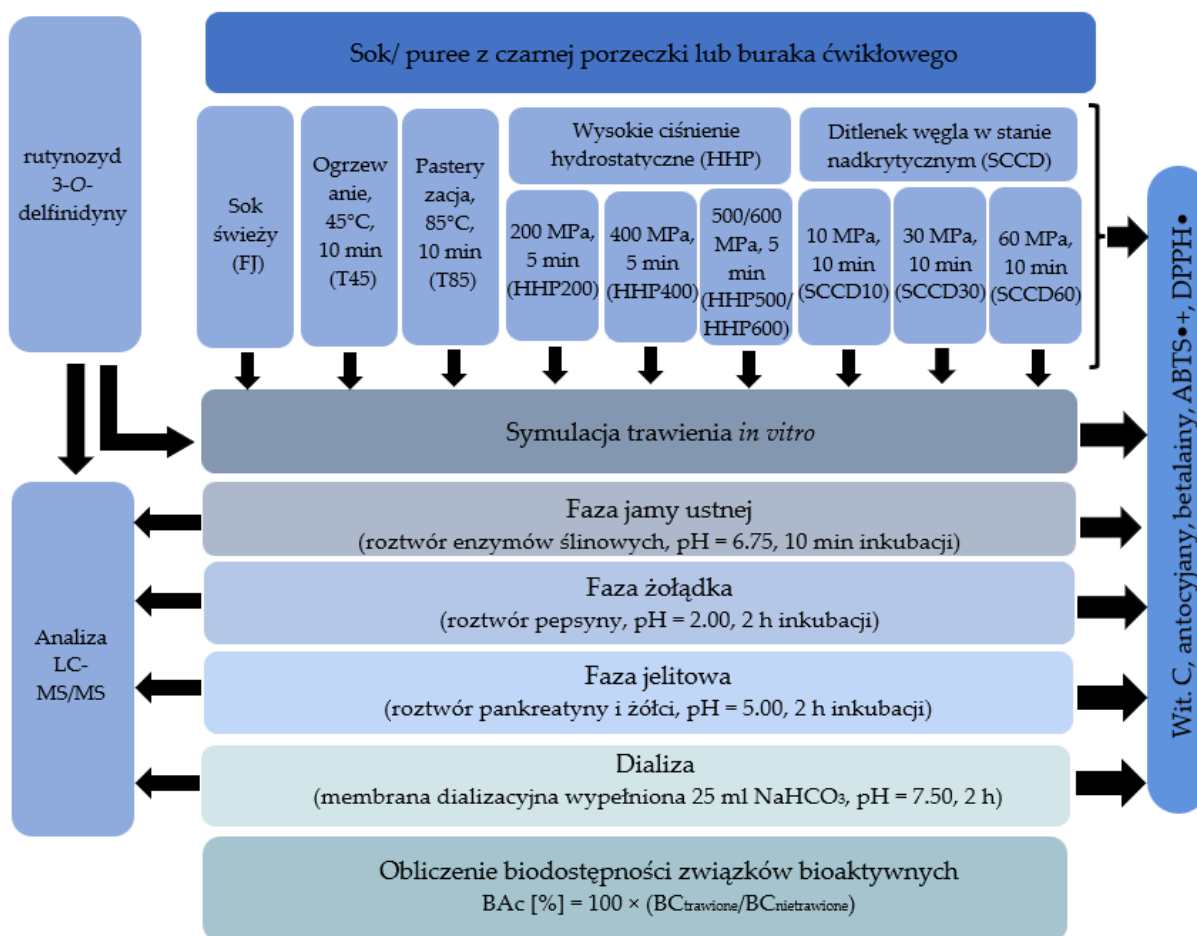
Celem pracy było zbadanie możliwości zastosowania wysokich ciśnień hydrostatycznych i ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym dla poprawy biodostępności wybranych antyoksydantów obecnych w owocach i warzywach, z wykorzystaniem modelowego przewodu pokarmowego *in vitro*.

Zakres pracy:

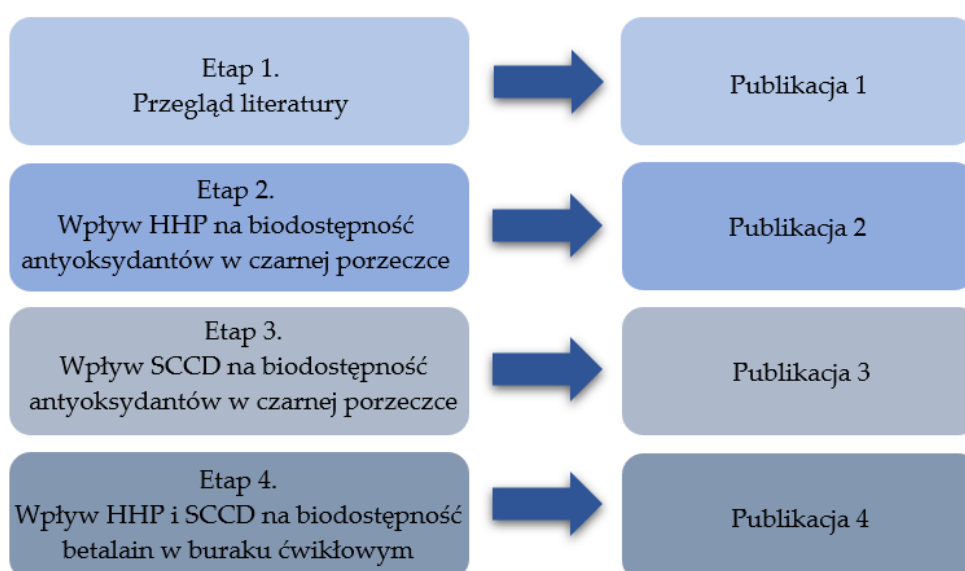
Graficzny opis zakresu pracy został przedstawiony na Rysunku 4.

Zakres pracy obejmował:

- Przygotowanie materiału do badań: produkcja puree i soku z czarnej porzeczki oraz soku z buraka ćwikłowego,
- Obróbka otrzymanych soków/puree: termiczna, wysokim ciśnieniem hydrostatycznym oraz ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym, przy wybranych parametrach ciśnienia,
- Przeprowadzenie symulacji trawienia w modelu przewodu pokarmowego *in vitro* uzupełnionego dializą,
- Przeprowadzenie oznaczeń zawartości wybranych antyoksydantów hydrofilowych oraz pojemności antyoksydacyjnej, przed trawieniem oraz po każdym etapie trawienia i dializie,
- Obliczenie biodostępności badanych antyoksydantów,
- Identyfikacja metabolitów antocyjanów w modelowym badaniu symulacji trawienia głównego antocyjanu czarnej porzeczki (rutynozydu 3-*O*-delfinidyny).



Rysunek 4. Schemat zakresu pracy obejmujący część technologiczną i część analityczną prowadzonych badań.



Rysunek 5. Schemat organizacji badań z podziałem na publikacje, w których opisano poszczególne etapy pracy.

6. Materiały i metody badawcze

6.1. Materiał badany

6.1.1. Owoce, puree i sok z czarnych porzeczek

Czarne porzeczki (*Ribes nigrum* L.) odmiany *Tisel* zostały zakupione w lokalnej hurtowni i zamrożone w temp -28°C do momentu rozpoczęcia eksperymentów. Część owoców rozgnieciono w mrożdzierzu (M) w celu zasymulowania przeżuwania w jamie ustnej. Kolejną część przetworzono na puree (P) poprzez rozdrobnienie w wielofunkcyjnym robocie kuchennym CL-30 (Robot Coupe, Francja) oraz zhomogenizowanie w młynku koloidalnym (Rietz, San Francisco, USA) w celu rozdrobnienia tkanki owoców do cząstek o wielkości poniżej 0,5 mm. Z tej samej partii owoców przygotowano również sok NFC (FJ) stosując obróbkę enzymatyczną miazgi enzymem pektynolitycznym w dawce 400 g/tonę (Klerzyme 150, DSM, Lille, France) w temp. 45°C przez 1,5 h, a następnie wytłoczenie na prasie hydraulicznej (Tako, Częstochowa, Polska). Otrzymane próbki zapakowano w butelki szklane (200 ml), zamrożono i przechowywano w temp. -20°C do czasu przeprowadzania analiz. Przygotowany w ten sposób materiał został wykorzystany do przeprowadzenia eksperymentów opisanych w publikacjach **P2** i **P3**.

6.1.2. Sok z buraków ćwikłowych

Buraki ćwikłowe (*Beta vulgaris* L.) zakupiono na lokalnym targu. Warzywa umyto, usunięto części niejadalne i przygotowano z nich sok NFC (FJ) z wykorzystaniem sokowirówki J80 Ultra (Robot Coupe, Francja). Sok zapakowano w butelki szklane (200 ml), zamrożono i przechowywano w temp. -20°C do czasu przeprowadzania analiz, które były przedmiotem pracy **P4**.

6.2. Część technologiczna

6.2.1. Obróbka termiczna

Puree (TT) oraz sok z czarnej porzeczki (T85) i sok z buraka ćwikłowego (T85) pasteryzowano w pasteryzatorze wannowym (Labo Play, Polska) w temperaturze 85°C przez 10 min. Pasteryzacja jest tradycyjną i najczęściej stosowaną techniką utrwalania produktów owocowych i warzywnych, dlatego zastosowano ją w celu porównania uzyskanych wyników z produktami przetwarzanymi innymi technikami. W celu wyeliminowania wpływu łagodnej obróbki termicznej w przypadku techniki SCCD, dla porównania przygotowano dodatkowe próbki, które poddano łagodnej obróbce termicznej w 45°C przez 10 min (T45) [**P2**, **P3**, **P4**].

6.2.2. Wysokie ciśnienie hydrostatyczne

Puree z czarnej porzeczki i sok z buraka ćwikłowego zapakowano w butelki PET lub HDPE i poddano obróbce HHP przy ciśnieniu 200, 400 i 500/600 MPa, w czasie 5 min i temperaturze 20°C (HHP200, HHP400, HHP500/HHP600). Próbkę produktów z czarnych porzeczek poddano działaniu wysokiego ciśnienia przy współpracy z Instytutem Wysokich Ciśnień – UNIPRESS w Warszawie z wykorzystaniem komory HHP, model U4000. Soki z buraka ćwikłowego poddano obróbce ciśnieniowej na urządzeniu CALIBER 70x1 (EXDIN Solutions Sp. z o.o., Kraków, Polska). Maksymalne stosowane ciśnienie było limitowane technicznymi możliwościami urządzenia [P3, P4].

6.2.3. Dytlenek węgla w stanie nadkrytycznym

Soki z czarnej porzeczki oraz buraka ćwikłowego poddano działaniu SCCD przy: 10, 30 i 60 MPa, przez 10 min, w temperaturze 45°C (SCCD10, SCCD30, SCCD60). Proces przebiegał w trybie periodycznym w aparacie Speed SFE 4 (Applied Separations, USA). Próbkę utrwalano w komorze, wyposażonej w termoparę kontrolującą temperaturę, przepłukanej wcześniej CO₂ w celu wyeliminowania obecności tlenu. Maksymalne stosowane ciśnienie było limitowane technicznymi możliwościami urządzenia [P2, P4].

6.3. Część analityczna

6.3.1. Model trawienia *in vitro*

Metodykę trawienia w przewodzie pokarmowym *in vitro* opracowano na podstawie badań przeprowadzonych przez Buniowską i wsp. (2017) oraz zgodnie z międzynarodowym konsensusem grupy INFOGEST [Minekus'a i wsp. 2014]. Do zakręcanych butelek na 100 ml z ciemnego szkła pobrano 50 ml soku/ puree lub wody destylowanej jako próby ślepej. Symulację trawienia w jamie ustnej rozpoczęto poprzez dodanie 5 ml roztworu enzymów ślinowych (alfa-amylazy i mucyny), doprowadzenie pH do $6,75 \pm 0,20$ za pomocą roztworów HCl (12 M lub 0,5 M) i NaOH (0,5 M lub 3 M) o stężeniach dobranych do badanej matrycy (HI 211 m, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) i termostatowanie roztworu w łaźni wodnej z wytrząsaniem (Labo Play, SWB 8N, Bytom, Polska) w 37°C przy 90 RPM, przez 10 minut. Próbkę o objętości 10 ml po trawieniu w jamie ustnej pobrano do analiz, a do pozostałej części dodano 20 ml roztworu pepsyny (3,2 g pepsyny, 2 g NaCl i 7 ml 38 % HCl w litrze wody destylowanej) i doprowadzono do pH 2,00. Uzyskane próbki ponownie inkubowano przez 2 h w 37°C wytrząsając przy 90 RPM. Ponownie 10 ml próbki z etapu symulacji trawienia w żołądku pobrano do analiz, a 20 ml z pozostałego roztworu przeniesiono do czystych butelek, gdzie

kontynuowano symulację trawienia jelitowego poprzez doprowadzenie pH roztworu do $5,00 \pm 0,20$ i dodanie 5 ml roztworu pankreatyny (1 g/L) i żółci (25 g/L). Odpowiednio wcześniej przygotowano 30 cm odcinki membrany celulozowej, wyjałowionej i wypełnionej 25 ml NaHCO_3 (0,5 M, pH 7,5). Tak przygotowane membrany dializacyjne zanurzano w roztworach próbek przygotowanych wcześniej do trawienia jelitowego i inkubowano przez 2 h, 37°C . Uzyskany roztwór wewnątrz membrany dializacyjnej stanowił frakcję związków potencjalnie wchłanianą do krwioobiegu na drodze transportu biernego. Roztwór z wnętrza membrany jak i spoza niej zabezpieczono do analiz. Po zakończeniu każdego z etapów symulacji trawienia próbki pobrane do analiz umieszczono w łaźni lodowej na 10 minut, w celu przerwania działania enzymów trawiennych. Symulacja trawienia każdego rodzaju próbek została wykonana w trzech powtórzeniach. Próbki pobrane do analiz przechowywano w zamrażarce w -20°C . Biodostępność (BAc) wybranych antyoksydantów obliczono na podstawie stosunku ich zawartości we frakcji potencjalnie wchłanianej do krwioobiegu (dializat) do wejściowej zawartości w produkcie przed rozpoczęciem symulacji trawienia (Równanie 1) i wyrażono w procentach [P2, P3, P4].

$$\text{BAc (\%)} = 100 \times (\text{BC}_{\text{dializat}} / \text{BC}_{\text{przed trawieniem}}) \quad (1)$$

Równanie 1. Obliczanie biodostępności (BAc – biodostępność antyoksydantu; $\text{BC}_{\text{dializat}}$ – zawartość antyoksydantu w dializacie; $\text{BC}_{\text{przed trawieniem}}$ – zawartość antyoksydantu przed trawieniem).

6.3.2. Oznaczanie zawartości witaminy C

Oznaczenie zawartości witaminy C jako kwasu L-askorbinowego i L-dehydroaskorbinowego w próbkach puree i soków z czarnej porzeczki przeprowadzono według metody przedstawionej przez Odriozola-Serrano i wsp. (2007). W celu oznaczenia kwasu L-askorbinowego próbki rozcieńczano 0,01% kwasem m-fosforowym, w zależności od rodzaju próbki i filtrowano przez jednorazowy filtr strzykawkowy ($0,45 \mu\text{m}$, Macherey-Nagel, Düren, Niemcy). W celu oznaczenia sumy kwasów L-askorbinowego i L-dehydroaskorbinowego 0,5 ml wcześniej przygotowanej próbki mieszano z 0,5 ml roztworu ditiotreitolu (DTT) (1 g/L w 0,01% kwasie *m*-fosforowym). Przed rozpoczęciem oznaczeń próbki z DTT pozostawiono na 1 h w ciemnym miejscu w temperaturze 4°C . Do analizy wykorzystano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykorzystując aparat HPLC firmy Waters (Milford, MA, USA) wyposażony w moduł separacyjny (2695 Separations Module) i detektor fotodiodowy (2995 Photodiode Array

Detector). Rozdział prowadzono na kolumnie Sunfire C 18, 5 μm , 4,6 mm \times 250 mm z odwróconą fazą, wyposażonej w prekolumnę Sunfire C18 Sentry, 5 μm , 4,6 mm \times 20 mm (Waters, Milford, MA, USA) w temperaturze 25°C i przepływie 1 m/min. Fazę ruchomą stanowił 0,01% kwas *m*-fosforowy. Czas analizy wynosił 10 min, a objętość nastrzyku 10 μl . Kwas L-askorbinowy identyfikowano przy długości fali 245 nm natomiast zawartość kwasu L-dehydroaskorbinowego obliczono z różnicy między sumą obu kwasów po reakcji z DTT a zawartością kwasu L-askorbinowego w próbce bez DTT [P2, P3].

6.3.3. Ekstrakcja antocyjanów z puree z czarnej porzeczki

Okolo 0,5 g próbki homogenizowanej (przed trawieniem oraz po etapie trawienia w jamie ustnej i żołądka) odważano na wadze technicznej (Medicat LTD 1600C, Zurich, Szwajcaria) a następnie ekstrahowano 80% roztworem metanolu zakwaszonym 0,1% HCl poprzez wytrząsanie przez 5 min przy 400 RPM (wytrząsarka, DLAB, Labindex, SK-0330-Pro, Warszawa, Polska) oraz działanie ultradźwiękami przez 5 min (łaźnia ultradźwiękowa, MKD-6, Warszawa, Polska). Następnie całość wirowano przez 5 min przy 9961 g (wirówka, Rotina 380R, Hettich, Tuttlingen, Niemcy). Supernatant zbierano do kolby miarowej o objętości 50 ml powtarzając ekstrakcję sześciokrotnie [P2].

6.3.4. Oznaczanie zawartości antocyjanów

Oznaczanie zawartości antocyjanów zostało przeprowadzone zgodnie z metodyką opisaną przez Oszmiańskiego (2002). Odpowiednie rozcieńczenia soków i ekstraktów z czarnej porzeczki (pkt. 6.3.3.) oraz próbki produktów po każdym etapie trawienia filtrowano (0,45 μm) przed analizą chromatograficzną. Zastosowano układ HPLC i kolumnę chromatograficzną analogicznie jak w punkcie 6.3.2. Analizę prowadzono w temperaturze 25°C, próbki termostatowano w 5°C w autosamplerze, objętość nastrzyku wynosiła 10 μl , a czas analizy 26 minut. Zastosowano gradientowy przepływ eluentów: A – 4,5% wodny roztwór kwasu mrówkowego i B – roztwór składający się w 80% z acetonitrylu i 20% eluentu A. Szybkość przepływu wynosiła 1,0 ml/min, a profil gradientu był następujący: 0 min – 0% A, 7 min – 17% A; 15 minut – 17% A; 21 minut – 100% A; 26 min – 0% A. Antocyjany oznaczono ilościowo przy długości fali 520 nm. Ilość antocyjanów podawano w przeliczeniu na cyjanidyno 3-glukozyd [P2, P3].

6.3.5. Oznaczanie zawartość betalain

Analiza zawartości betalain została przeprowadzona zgodnie z metodologią przedstawioną przez Ravichandran i wsp. (2013). Analizy wykonano wykorzystując

zestaw chromatograficzny opisany w pkt. 3.3.2. Rozdział prowadzono na kolumnie Sunfire C8, 5 µm 250 x 4,6 mm połączonej z prekolumną Sunfire C8, 5 µm, 20 x 4,6 mm (Waters, Milford, USA) w temperaturze 30°C. Odpowiednie rozcieńczenia soków filtrowano przez filtr strzykawkowy 0,45 µm (Waters, Milford, USA). Rozdział prowadzono przez 60 min, przy prędkości przepływu fazy ruchomej 1 ml/min i nastrzyku 10 µl. Fazę ruchomą stanowił 0,2% kwas mrówkowy (A) i acetonitryl (B) natomiast rozdział prowadzono w systemie gradientowym: 0 min – 100% A, 7 min – 100% A, 7-17 min – 97% A, 17-27 minut – 90% A, 27-35 minut – 90% A, 35-45 minut – 80% A, 45-50 minut – 0% A, 50-55 minut – 100% A, 55-60 minut – 100% A. Betacyjaniny identyfikowano przy długości fali 538 nm i wyrażano je jako równoważnik betaniny, podczas gdy betaksantyny wykrywano przy długości fali 480 nm i wyrażano jako równoważnik wulgaksantyny I [P4].

W celu identyfikacji betalain, świeży sok z buraków 5-krotnie rozcieńczono 0,2% kwasem mrówkowym (faza A), a następnie odwirowano. 2 ml supernatantu naniesiono na kolumnę Sep-Pak C18 (Waters, Milford, USA). Betaksantyny eluowano 6 ml fazy A, a betacyjaniny 6 ml fazy B (acetonitryl), zebrano w 10 ml kolbie i dopełniono do kreski. Całkowite stężenie obu barwników obecnych w zebranych frakcjach określono spektrofotometrycznie na podstawie molowych współczynników ekstynkcji i obliczono według równania 2.

$$\text{Zawartość betalain (mg/L)} = A \times DF \times MV \times 1000 / (e \times l) \quad (2)$$

Równanie 2. Zawartość betacyjanin i betaksantyn (A – absorpcja, DF – współczynnik rozcieńczenia, MW – masy cząsteczkowe, e – molowy współczynnik ekstynkcji, l – długość drogi optycznej. (Betacyjaniny – MW = 550 g/mol; e = 60 000 L/mol × cm; Betaksantyny – MW = 308 g/mol; e = 48 000 L/mol × cm).

Otrzymane frakcje o znanych stężeniach posłużyły do przygotowania serii rozcieńczeń do krzywych wzorcowych ($R^2 > 0,99$). Poszczególne betalainy zidentyfikowano analogicznie jak we wcześniejszych pracach [Sokołowska i wsp. 2017] oraz na podstawie czasów retencji porównywanych z danymi literaturowymi [Nemezer i wsp. 2011, Khan i Giridhar 2015, Miguel 2018].

6.3.6. Oznaczanie pojemności przeciwutleniającej wobec rodnika ABTS+•

Analizę przeprowadzono według metody opisanej przez Re i wsp. (1999). Roztwór rodników sporządzono poprzez połączenie 7 mM ABTS+• i 2,45 mM nadsiarczanu potasu, a następnie inkubację w ciemnym miejscu przez 18 h. Przed użyciem roztwór rodników rozcieńczono etanolem do absorbancji 0,740-0,750 mierzonej przy długości fali 734 nm.

Roztwór Troloxu w etanolu (1 mg/ml) stanowił materiał odniesienia, z którego przygotowano sześciopunktową krzywą wzorcową o stężeniach: 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/ml. Próbkę ekstraktów (pkt. 6.3.3.) lub soków z czarnej porzeczki i buraka ćwikłowego, przed i po trawieniu, były odpowiednio rozcieńczane, tak aby ich absorbancja mieściła się w zakresie pomiarowym po odbarwieniu roztworu. Do kuwety odmierzano 0,025 ml kolejnych wzorców Troloxu, badanej próbki lub wody jako próby ślepej, następnie dodawano 2,5 ml roztworu rodników ABTS+• i dokładnie mieszano. Próbkę inkubowano w 30°C przez 6 minut, a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 734 nm wobec etanolu. Wyniki wyliczono z uwzględnieniem krzywej wzorcowej oraz rozcieńczenia i wyrażono jako równoważnik pojemności przeciwutleniającej Trolox (TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Do pomiaru absorbancji zastosowano spektrofotometr UV/Visible Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Wielka Brytania) [P2, P3, P4].

6.3.7. Oznaczanie pojemności przeciwutleniającej wobec rodnika DPPH•

Analizę wykonano zgodnie z metodą przedstawioną przez Yen i Chen (1995). Rodniki DPPH• (1 mM) rozpuszczono w metanolu, inkubowano przez 3 h w ciemnym miejscu i rozcieńczono około 10-krotnie do uzyskania absorbancji 0,700-0,800 przy 517 nm. Do pomiarów absorbancji wykorzystano spektrofotometr opisany w punkcie 3.3.6. Wykonano również krzywą wzorcową z roztworu Troloxu w etanolu (1 mg/ml), uzyskując sześć punktów o stężeniach: 10, 20, 30, 40, 50 i 100 µg/ml. Próbkę ekstraktów (pkt. 3.3.3.) lub soków z czarnej porzeczki i buraka ćwikłowego, przed i po trawieniu były odpowiednio rozcieńczane, tak aby ich absorbancja mieściła się w zakresie pomiarowym po odbarwieniu rodnika. Analizę przeprowadzono poprzez odmierzanie do kuwety 0,1 ml kolejnych roztworów Troloxu, badanej próbki lub wody jako próby ślepej oraz 2 ml roztworu rodników DPPH•, a następnie pozostawienie kuwety w ciemności na 30 min w temperaturze pokojowej ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Absorbancję mierzono przy długości fali 517 nm wobec etanolu. Wyniki wyliczono z uwzględnieniem krzywej wzorcowej oraz rozcieńczenia i wyrażono jako równoważnik pojemności przeciwutleniającej Trolox (TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) [P2, P3, P4].

6.3.8. Identyfikacja metabolitów delfinidyno-3-*O*-rutynozydu za pomocą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas – UPLC-MS/MS

Analizy wykonano zgodnie z metodologią zaproponowaną przez Kapusta i wsp. (2018). Analizy prowadzono przy użyciu systemu UPLC-PDA-MS/MS ACQUITY (Waters, Milford, MA, USA) z detektorem PDA i tandemowym kwadrupolowym spektrometrem masowym (TQD). Rozdział prowadzono na kolumnie BEH C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm, Waters) w temperaturze 50°C. Fazę ruchomą stanowiły roztwory: 2% kwas mrówkowy (A) i 2% kwas mrówkowy w wodnym roztworze acetonitrylu (40% v/v) (B). Gradientowy przepływ eluentu, przy prędkości 0,35 ml/min, przebiegał następująco: 0 min 5% B, 0–8 min liniowo do 100% B, 8–9,5 min na przemywanie i powrót do warunków początkowych. Próbkę przesączono przez filtr membranowy (0,45 μm, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) i wstrzyknięto bezpośrednio do kolumny chromatograficznej, objętość nastrzyku wynosiła 5 μl. Parametrami zastosowanymi dla TQD były: napięcie kapilarne 3,5 kV; napięcie stożka 30 V w trybie dodatnim i ujemnym; źródło utrzymywano w temperaturze 250°C, a temperaturę desolwatacji 350°C; przepływ gazu w stożku 100 l/h; i przepływ gazu desolwatacyjnego 800 l/h. Jako gaz kolizyjny zastosowano argon przy natężeniu przepływu 0,3 ml/min. Detekcję i identyfikację związków chemicznych oparto na charakterystycznych widmach PDA, stosunku masy do ładunku oraz fragmentach jonów powstałych po dysocjacji wywołanej kolizją (CID). Analiza ilościowa była możliwa tylko dla jednego związku i opierała się na określonych przejściach MS w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM). Ocenę ilościową związku przeprowadzono na podstawie krzywej wzorcowej. Do zbierania i przetwarzania danych stosowano oprogramowanie Waters MassLynx v.4.1 [P3].

6.4. Analiza statystyczna

W celu statystycznej analizy wyników przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz analizę istotności różnic wartości średnich testem Tukeya na poziomie ufności $\alpha = 0,05$. Do analizy statystycznej wykorzystano oprogramowanie Statistica 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Wszystkie rodzaje produktów poddawano trzykrotnej symulacji trawienia, a analizy chemiczne wykonano w dwóch powtórzeniach [P2, P3, P4].

7. Omówienie i dyskusja wyników

7.1. Wpływ HHP na stabilność i biodostępność witaminy C

Wpływ HHP na stabilność i biodostępność witaminy C jako kwasu L-askorbinowego w puree z czarnej porzeczki został opisany w publikacji **P2**. Zastosowanie obróbki HHP przy ciśnieniu 200 i 400 MPa nie wpłynęło istotnie na zawartość witaminy C w produktach z czarnej porzeczki. Pomiedzy próbkami poddanymi różnym sposobom utrwalania zauważalne były statystycznie istotne różnice w zawartości witaminy C na poszczególnych etapach trawienia, co może świadczyć o zwiększonej wydajności ekstrakcji składników z matrycy połączonej z ich większą stabilnością w przewodzie pokarmowym. Znaczący wpływ na stabilność witaminy C w czasie trawienia miały najprawdopodobniej drastyczne zmiany pH na poszczególnych etapach symulacji. We wszystkich próbkach odnotowano około 50% spadek mierzonej zawartości kwasu L-askorbinowego po symulacji trawienia w jamie ustnej ($\text{pH}=6,75 \pm 0,20$), następnie jej wzrost na etapie symulacji trawienia w żołądku ($\text{pH}=2,00 \pm 0,20$). W próbkach po trawieniu w jelicie cienkim i dializie ($\text{pH}=7,50 \pm 0,20$) odnotowano około 98% degradację witaminy C. W dializacie witaminę C wykryto jedynie w próbkach poddanych wcześniej obróbce HPP przy ciśnieniu 400 i 600 MPa ale były to śladowe ilości tego związku. Inni autorzy również odnotowali znaczną degradację witaminy C po trawieniu w alkalicznych warunkach panujących w jelicie, np. o 91%, w przypadku surowych brokułów [Vallejo i wsp. 2004], czy też >95% w sokach z granatów [Pérez-Vicente i wsp. 2002]. Badania nad witaminą C w sokach wieloowocowych potwierdziły również jej stabilność w warunkach żołądkowych na poziomie ponad 75% oraz istotny spadek podczas trawienia jelitowego [Rodríguez-Roque i wsp. 2013]. Obserwowane przemiany kwasu L-askorbinowego można tłumaczyć utlenianiem go do kwasu L-dehydroaskorbinowego w obojętnym środowisku obecnym w jamie ustnej i redukcją powstałego kwasu ponownie do kwasu L-askorbinowego w kwaśnym środowisku żołądka. Reakcje te są odwracalne i mogły przyczynić się do zmian w mierzonej zawartości witaminy C w poszczególnych etapach trawienia. W literaturze światowej brak jest innych podobnych badań dotyczących przemian zawartości witaminy C podczas trawienia, obejmujących etap jamy ustnej, a także wpływu techniki HHP na jej stabilność i biodostępność.

Biodostępność witaminy C w puree z czarnej porzeczki, obliczona na podstawie jej zawartości w dializacie, była bardzo niska i sięgała ok. 1% w próbkach utrwalanych techniką HHP przy ciśnieniu 400 i 600 MPa. Jednocześnie była istotnie wyższa niż ta obliczona dla witaminy C obecnej w próbkach pasteryzowanych i nieprzetworzonych,

w których sięgała zaledwie 0,3%. Zwiększona biodostępność witaminy C w próbkach utrwalanych HHP była powiązana z jej wyższą stabilnością podczas trawienia, w szczególności na etapie prowadzenia dializy. Ciśnienie poniżej 400 MPa nie wpływało istotnie na biodostępność witaminy C. Zjawisko to można tłumaczyć niedostateczną degradacją enzymów tkankowych, takich jak oksydazy polifenolowe i peroksydazy, które mogły przyspieszać degradację witaminy C podczas etapu trawienia w jamie ustnej, przy pH ($6,7 \pm 0,2$) sprzyjającym aktywności tych enzymów [Marszałek i wsp. 2019a]. Ze względu na to, że witamina C może być również wchłaniana w żołądku lub proksymalnym odcinku jelita cienkiego [Rodríguez-Roque 2013], przeprowadzono analizę potencjalnego stopnia wchłaniania tego związku po symulacji trawienia pepsyną. Potencjalny stopień wchłaniania witaminy C po trawieniu w żołądku był zdecydowanie wyższy, co wynikało ze znacznie wyższej stabilności tego związku w niskim pH panującym na tym etapie trawienia. Zastosowanie HHP przy 400 i 600 MPa skutkowało wyższym o odpowiednio 5% i 10% potencjalnym stopniem wchłaniania witaminy C w porównaniu do próbek nieutrwalanego puree. W przypadku próbek utrwalanych HHP przy ciśnieniu 600 MPa potencjalny stopień wchłaniania witaminy C sięgał 90% i był na poziomie najmniej przetworzonych owoców czarnej porzeczki, zmiażdżonych jedynie w móżdżerku przed symulacją trawienia.

Badania dotyczące wpływu HPP na biodostępność witaminy C są nieliczne i nie wyjaśniają w pełni mechanizmu zachodzących zależności. Cilla i wsp. (2012) odnotowali, że pomimo zachowania wysokiej stabilności witaminy C w próbkach soków owocowo-mlecznych po zastosowaniu HPP (400 MPa, 40°C, 5 min), nie odnotowano wzrostu biodostępności tego składnika. Z kolei w badaniach Rodríguez-Roque i wsp. (2015) wykazano wzrost biodostępności witaminy C w napojach owocowych z wodą, mlekiem lub napojem sojowym poddanych obróbce HPP (400 MPa, 40°C, 5 min) w porównaniu z próbkami poddanymi obróbce termicznej (90°C, 60 s). Autorzy stwierdzili, że HPP może przyczyniać się do inaktywacji enzymów odpowiedzialnych za utlenianie witaminy C, takich jak oksydaza askorbinianowa i peroksydazy, podczas gdy krótkotrwałe ogrzewanie może nie wystarczyć do inaktywacji tych enzymów i mogą one powodować większą degradację witaminy C przed trawieniem.

Mechanizm odpowiedzialny za różnice w przebiegu trawienia próbek utrwalanych wysokim ciśnieniem w porównaniu do pasteryzowanych i nie poddawanych obróbce, jak również wpływu HHP na biodostępność nie jest do końca poznany. Wiadomo, że wysokie ciśnienia hydrostatyczne mogą wpływać na wiązanie składników bioaktywnych

z wielkocząsteczkowymi strukturami, takimi jak pektyny, co powodowało spowolnienie ich uwalniania w czasie symulacji trawienia, mniejszą degradację tych składników i mniejszą podatność na konwersję do niewykrywalnych form [Ribas-Agustí i wsp. 2018]. Wysokie ciśnienia mogą też wpływać na zwiększenie ekstrakcji związków bioaktywnych poprzez uszkodzenie struktur komórkowych matrycy roślinnej. Bardzo duży wpływ na biodostępność składników bioaktywnych ma również rodzaj matrycy pokarmowej [Lingua i wsp. 2018, Rodríguez-Roque, 2013].

7.2. Wpływ HHP na stabilność i biodostępność antocyjanów

Wpływ HHP na stabilność i biodostępność antocyjanów w puree z czarnej porzeczki został opisany w publikacji **P2**. Profil antocyjanów czarnej porzeczki jest bardzo charakterystyczny dla tych owoców i składa się z: delfinidyno-3-*O*-rutinozydu (df-3-*O*-rut), cyjanidyno-3-*O*-rutinozydu (cy-3-*O*-rut), delfinidyno-3-*O*-glukozydu (df-3-*O*-glu) i cyjanidyno-3-*O*-glukozydu (cy-3-*O*-glu). Zastosowanie HHP, czy pasteryzacji termicznej nie powodowało istotnego obniżenia zawartości antocyjanów w puree z czarnej porzeczki. Dynamika degradacji antocyjanów była podobna jak w przypadku witaminy C. Na etapie trawienia w jamie ustnej obserwowano znaczny spadek mierzonej zawartości antocyjanów, następnie wzrost ich zawartości na etapie żołądka oraz drastyczną degradację w warunkach panujących w jelicie. Podobne zjawisko odnotowywano w badaniach innych autorów [Carbonell-Capella i wsp. 2015, Lingua i wsp. 2018, Bouayed i wsp. 2011, Correa-Betanzo i wsp. 2014, Tagliazucchi i wsp. 2010, McDougall i wsp. 2005]. Wynikają one głównie z przemian chemicznych antocyjanów tj. przemian związanych z tworzeniem się chinonów i bezbarwnych hemiketali w wyniku zmiany pH środowiska [Torskangerpoll i Andersen 2005]. Reakcje te są odwracalne, co wpływa na mierzoną zawartość antocyjanów na różnych etapach trawienia. W próbkach pasteryzowanych odnotowano 70% spadek zawartości antocyjanów na etapie jamy ustnej, natomiast w próbkach utrwalanych HHP przy ciśnieniu 200 MPa, 400 MPa i 600 MPa odpowiednio 64, 55 i 56%, co świadczy o tym, że antocyjany w próbkach po HHP były stabilniejsze w obojętnym pH. Działanie ochronne mógł wywołać potencjalnie wyższy udział błonnika rozpuszczalnego w próbkach HHP [Yan i wsp. 2019]. Podobnego efektu nie zaobserwowano na etapie trawienia w jelicie cienkim, stopień degradacji antocyjanów był bardzo duży i nie różnił się znacząco w próbkach poddanych innym sposobom utrwalania (95-99%).

Biodostępność antocyjanów ogółem była bardzo niska. Nie wykazano wpływu HHP i pasteryzacji na poprawę biodostępności antocyjanów, która we wspomnianych próbkach

soku i puree wynosiła zaledwie 0,2–0,3%. W owocach rozgniecionych w moździerzu, które odwzorowuje spożycie świeżych owoców, odnotowano najwyższą biodostępność antocyjanów (1,62%) w stosunku do puree w stanie surowym oraz po każdym rodzaju obróbki, co potwierdza przypuszczenia, że stopień rozdrobnienia surowca ma istotny wpływ na biodostępność składników bioaktywnych. Tkanka owoców spożywanych na świeżo może działać ochronnie na antocyjany umożliwiając im dotarcie do końcowych odcinków przewodu pokarmowego w niezmienionej formie. Ze względu na doniesienia o możliwości wchłaniania antocyjanów również poprzez ściany żołądka [Milbury i wsp. 2002, Cao i wsp. 2001], wyliczono potencjalny stopień wchłaniania na podstawie zawartości antocyjanów na tym etapie trawienia. Wysoka stabilność antocyjanów w kwaśnym pH żołądka wpływa na wyższy potencjalny stopień wchłaniania antocyjanów, który sięgał 63-66% dla próbek utrwalanych HHP. Zastosowanie ciśnienia 600 MPa pozwoliło na uzyskanie na tym etapie trawienia istotnie wyższego potencjalnego stopnia wchłaniania antocyjanów niż w próbkach pasteryzowanych (o 13%) a także surowych (o 6%).

Niską biodostępność antocyjanów potwierdzają inne źródła [Grajek 2007, Ribas-Agustí i wsp. 2018]. Antocyjany to związki szczególnie wrażliwe na warunki otoczenia, takie jak: pH, temperatura, obecność tlenu, światła, jony metali, enzymy tkankowe, mikroorganizmy i inne [Sharma i wsp. 2016]. Ograniczona biodostępność antocyjanów w formach natywnych może być związana z połączeniami z innymi składnikami tkanki roślinnej, takimi jak pektyny, których bogatym źródłem są czarne porzeczki. Z drugiej strony związanie w wielkocząsteczkowych strukturach może przyczyniać się do zwiększenia stabilności tych związków w przewodzie pokarmowym i umożliwić transport tych związków do jelita w niezmienionej formie [Ribas-Agustí i wsp. 2018]. Biodostępność poszczególnych antocyjanów jest zależna od ich budowy chemicznej, np. większa liczba grup –OCH₃ sprzyja stabilności związków w przewodzie pokarmowym dzięki czemu biodostępność tych związków może być większa w porównaniu do antocyjanów o innej budowie cząsteczki [Peixoto i wsp. 2018].

7.3. Wpływ HHP na stabilność i biodostępność betalain

Wpływ HHP na stabilność betalain w próbkach soku z buraka ćwikłowego w czasie trawienia i ich biodostępność opisano w publikacji **P4**. Wśród związków należących do betalain oznaczono i analizowano zawartość betanin, izobetanin i neobetanin, należących do grupy betacyjanin, oraz wulgaksantyny I i wulgaksantyny II, należących do

betaksantyn. Sposób obróbki (termiczna, HHP i SCCD) oraz wysokość stosowanego ciśnienia nie miały istotnego wpływu na profil betalain w soku z buraków. Procesy obróbki termicznej w 45°C i 85°C oraz HHP przy ciśnieniu 200 MPa nie przyczyniły się do degradacji betacyjanin i betaksantyn w porównaniu do surowego soku przed trawieniem. Betacyjaniny i betaksantyny okazały się być jednak wrażliwe na działanie wyższych parametrów ciśnienia. Odnotowano istotny spadek zawartości obu tych grup związków po zastosowaniu HHP przy 400 i 500 MPa o odpowiednio 16% i 23%, aczkolwiek aktualne doniesienia literaturowe są niejednoznaczne. Istnieją prace wskazujące na to, że proces HHP przyczynił się do spadku [Sokołowska i wsp. 2017, Ubeira-Iglesias i wsp. 2019], jak i wzrostu [Paciulli i wsp. 2016, Jiménez-Aguilar i wsp. 2015] zawartości betalain. Różnice te mogą wynikać z różnorodności odmianowej buraków, jak również aktywności natywnych enzymów tkankowych przyspieszających degradację tych składników.

Dynamika trawienia betalain różniła się w zależności od rodzaju pigmentów (betacyjaniny, betaksantyny) oraz zastosowanej obróbki. Betacyjaniny ulegały większej w porównaniu do betaksantyn degradacji po symulacji trawienia w jamie ustnej oraz wykazywały wyższą stabilność w kwaśnym pH żołądka. Betaksantyny pozostały stabilne w pH jamy ustnej a ich zawartość drastycznie malała na etapie symulacji trawienia w żołądku i ulegała niewielkim zmianom po symulacji trawienia jelitowego. Betacyjaniny z kolei uległy znacznej degradacji po trawieniu w alkalicznym środowisku jelita. W badaniach innych autorów odnotowano istotny wpływ matrycy soku z opuncji figowej i buraka ćwikłowego na wyższą stabilność betacyjanin podczas symulacji trawienia w żołądku w porównaniu do trawienia ekstraktów z tych surowców. Podobna zależność nie wystąpiła w przypadku wulgaksantyny I, która ulegała stopniowej degradacji w czasie trawienia [Tesoriere i wsp. 2008].

Obróbka HHP przy ciśnieniu 200 MPa w najmniejszym stopniu wpływała na degradację betalain na każdym kolejnym etapie trawienia w porównaniu do pozostałych technik i parametrów utrwalania. Zastosowanie 400 i 500 MPa nie spowodowało pozytywnego wpływu na stabilność betacyjanin i betaksantyn. Całkowity spadek zawartości betalain w czasie trawienia w porównaniu z zawartością przed trawieniem wynosił około 72% ($\pm 5\%$) w próbkach HHP i około 79% ($\pm 1,5\%$) w próbkach soku surowego i soków po obróbce termicznej w 45°C i 85°C, co skutkowało poprawą biodostępności betalain ogółem w próbkach HHP. W innych badaniach *in vitro* odnotowywano utratę betalain w przewodzie pokarmowym do 96-99% [Desseva i wsp. 2020, Sawicki i wsp. 2019]. Betalainy są metabolizowane do kwasu betalainowego i cyklo-DOPA, a także form

dekarboksylowanych [Sawicki i wsp. 2019] oraz ulegają degradacji pod wpływem obecności tlenu i zmiennego pH. Ich stabilność i stopień ekstrakcji z tkanki roślinnej zależą również od rodzaju matrycy żywności [Nirmal i wsp. 2021].

Zastosowanie HHP poprawiło biodostępność betacyjanin w porównaniu z próbkami surowych soków oraz utrwalanych termicznie w 45°C i 85°C, ale nie wpłynęła na biodostępność betaksantyn. Początkowa wysoka zawartość betalain w sokach surowych i po obróbce termicznej nie wpłynęła na uzyskanie wyższej biodostępności pigmentów w testowanych próbkach. Spośród testowanych parametrów HHP najkorzystniejszy wpływ na biodostępność obu grup betalain miało ciśnienie 200 MPa. Biodostępność betacyjanin i betaksantyn i ich wrażliwość na działanie obróbki wysokociśnieniowej różni się ze względu na różnice w budowie chemicznej tych związków [Desseva i wsp. 2020, Gómez-Maqueo i wsp. 2021]. Gómez-Maqueo i wsp. (2021) odnotowali wzrost biodostępności betaniny o 20–27% w próbkach mięszu opuncji figowej poddanego obróbce HHP przy 350 MPa, w czasie 5 min, w porównaniu do próbek nieutrwalanych. Podobnych efektów nie przyniosło zastosowanie ciśnienia 100 i 600 MPa, co autorzy tłumaczyli możliwym wpływem zastosowanych parametrów ciśnienia na zmiany składników obecnych w matrycy pokarmowej, takich jak enzymy i polisacharydy. Nie odnotowano również zwiększonej biodostępności indykasantyny, a także betalain pochodzących ze skórki owoców. Wpływ parametrów ciśnienia na biodostępność był niezależny od początkowej zawartości tych związków przed trawieniem, co znajduje potwierdzenie również w niniejszej pracy. Zastosowanie HHP może przyczyniać się do poprawy ekstrakcji związków bioaktywnych z tkanki roślinnej oraz powodować zmiany w matrycy roślinnej, takie jak wzrost zawartości rozpuszczalnego błonnika pokarmowego, który mógł zwiększyć stabilność betalain w układzie pokarmowym [Gómez-Maqueo i wsp. 2021]. Obróbka HHP może zmniejszać ilość kompleksów polifenoli z białkami w porównaniu z próbkami poddanymi obróbce termicznej, co może pozytywnie wpływać na biodostępność związków wielkocząsteczkowych [Stübler i wsp. 2020].

7.4. Wpływ HHP na pojemność przeciwutleniającą podczas trawienia

Wpływ HHP na pojemność przeciwutleniającą próbek na różnych etapach trawienia opisano w publikacji **P2** oraz **P4**.

Pojemność przeciwutleniająca przed trawieniem mierzona wobec ABTS+• w próbkach czarnej porzeczki utrwalanych HHP przy ciśnieniu 400 i 600 MPa nie różniła się istotnie wobec próbek niepoddanych obróbce i była istotnie wyższa w porównaniu do próbek

pasteryzowanych i HHP przy 200 MPa. W metodzie z rodnikiem DPPH•, nie wykazano statystycznie istotnego wpływu sposobu utrwalania na właściwości przeciwutleniające czarnej porzeczki przed trawieniem, a także na etapie symulacji trawienia w jamie ustnej. W próbkach badanych metodą z rodnikiem ABTS+• trawienie enzymami ślinowymi i pepsyną zwiększało pojemność przeciwutleniającą owoców, co najprawdopodobniej wynikało z uwalniania z matrycy roślinnej związków o wysokim potencjalnie antyoksydacyjnym np. kwasów fenolowych. Zastosowanie ciśnienia 400 i 600 MPa spowodowało wzrost pojemności przeciwutleniającej w porównaniu do próbek pasteryzowanych, na etapie symulacji trawienia w jamie ustnej. Na etapie trawienia w żołądku wzrost ten był obserwowany jedynie w przypadku próbek HHP przy 400 MPa. Podobne obserwacje odnotowano w przypadku analiz z rodnikami DPPH•, gdzie zaobserwowano wzrost pojemności przeciwutleniającej w próbce po trawieniu pepsyną oraz pozytywny wpływ zastosowania ciśnienia 400 i 600 MPa w porównaniu do pasteryzacji. W wyniku symulacji trawienia w jelicie cienkim następował znaczny spadek pojemności przeciwutleniającej we wszystkich próbkach, skorelowany z degradacją związków bioaktywnych czarnej porzeczki. Należy jednak zwrócić uwagę, że spadek pojemności przeciwutleniającej był nieporównywalnie mniejszy niż spadek zawartości antocyjanów i witaminy C. Może to wskazywać na obecność metabolitów antocyjanów, o znacznie wyższym potencjalnie przeciwutleniającym w porównaniu do związków, z których powstały. Zarówno w metodzie z rodnikiem ABTS+• jak i DPPH• próbki utrwalane techniką HHP przy ciśnieniu 400 i 600 MPa wykazywały istotnie wyższą pojemność przeciwutleniającą we frakcji jelitowej i dializacie w porównaniu do próbek pasteryzowanych. Może to świadczyć o pozytywnym wpływie HHP na uwalnianie składników w trakcie trawienia i wchłanianie w przewodzie pokarmowym.

W innych badaniach wykazano pozytywny wpływ obróbki HHP w porównaniu do pasteryzacji na pojemność przeciwutleniającą (DPPH•) po trawieniu soków owocowych z dodatkiem mleka krowiego [Rodríguez-Roque i wsp. 2015]. Podobnie Briones-Labarca i wsp. (2011) odnotowali pozytywny wpływ warunków ciśnieniowania (500 MPa, 10 min) i trawienia na aktywność przeciwutleniającą jabłek, w porównaniu do próbek nieutrwalanych. Wyniki tych prac wskazują, że obróbka HHP może przyczyniać się do wzrostu stężenia przeciwutleniaczy w przewodzie pokarmowym poprzez ich uwalnianie ze struktur komórkowych lub poprzez inaktywację enzymów tkankowych, co powoduje wyższą podaż przeciwutleniaczy [Rodríguez-Roque i wsp. 2015, Briones-Labarca i wsp. 2011]. Różnice w pojemności przeciwutleniającej produktów podczas trawienia mogą

zależać również od rodzaju matrycy [Rodríguez-Roque i wsp. 2015]. W badaniach biodostępności antocyjanów w ekstraktach z wiśni z dodatkiem glinki mineralnej wykazano prawie dwukrotny wzrost pojemności przeciwutleniającej (ORAC) po trawieniu w warunkach jelita cienkiego, pomimo drastycznego spadku zawartości antocyjanów. Potwierdza to przypuszczenia, że metabolity powstałe po rozpadzie lub przekształceniu antocyjanów posiadają silniejsze właściwości przeciwutleniające niż substraty, z których powstały [Singh & Kitts 2019].

W próbkach soku z buraków ćwikłowych [P4] utrwalanych HHP przy ciśnieniu 200 MPa oznaczono najwyższą pojemność przeciwutleniającą z rodnikiem DPPH• oraz ABTS+•, na poziomie nieróżniącym się od surowego soku. Z kolei zastosowanie ciśnień 400 i 500 MPa skutkowało oznaczeniem najniższych wartości pojemności przeciwutleniającej, zbliżonych do wartości uzyskanych w soku pasteryzowanym. Proces trawienia wpływał na zmiany właściwości przeciwutleniających soków z buraka, podobnie jak w przypadku soków z czarnej porzeczki (DPPH•). Analiza pojemności przeciwutleniającej z rodnikami DPPH• wykazała wyraźny jej spadek na etapie trawienia w jamie ustnej, wzrost po trawieniu na etapie żołądkowym oraz ponowny spadek na etapie symulacji trawienia w jelicie, co było skorelowane z zawartością betalain ogółem w soku z buraków. Z kolei pojemność przeciwutleniająca oznaczona wobec ABTS+• wzrastała po trawieniu jelitowym we wszystkich próbkach z wyjątkiem pasteryzowanych. Uzyskane wyniki świadczą o różnym powinowactwie powstałych metabolitów wobec DPPH• i ABTS+•. Ponadto wysokie ciśnienia prawdopodobnie sprzyjają powstawaniu metabolitów o właściwościach przeciwutleniających znacznie wyższych niż substraty, z których one powstały.

W przypadku analizy z rodnikami DPPH• próbki utrwalane techniką HHP przy ciśnieniu 400 i 500 MPa odznaczały się niższą redukcją pojemności przeciwutleniającej po trawieniu enzymami ślinowymi niż próbki soku surowego i utrwalanego termicznie. Na etapie trawienia pepsyną soki utrwalane techniką HHP, niezależnie od parametrów ciśnienia, zachowały najwyższą pojemność przeciwutleniającą w porównaniu z pozostałymi próbkami. Próbki utrwalane ciśnieniem 200 MPa po trawieniu na etapie jelita charakteryzowały się nadal najwyższym potencjałem przeciwutleniającym, co nie potwierdziło się w analizie próbek po dializie. Silne właściwości przeciwutleniające soku z buraka po zastosowaniu HHP 200 MPa były skorelowane nie tylko z wysoką początkową zawartością betalain, ale i ich stabilnością w czasie trawienia. Test ABTS+• potwierdził

korzystny wpływ zastosowania ciśnienia 200 MPa na pojemność przeciwutleniającą soków z buraka po trawieniu na etapie żołądka, jelita oraz w dializacie. Wzrost pojemności przeciwutleniającej, pomimo ogólnego spadku zawartości betalain w czasie trawienia, świadczy o pojawieniu się metabolitów tych związków, mających znaczny wpływ na kształtowanie się właściwości przeciwutleniających badanych soków.

W innych badaniach odnotowano podobną dynamikę zmian pojemności przeciwutleniającej w czasie trawienia buraków ćwikłowych. Zauważono również utratę właściwości przeciwutleniających w próbkach po obróbce termicznej, jak w niniejszych badaniach w teście z rodnikiem DPPH• [Wang i wsp. 2020]. Gómez-Maqueo i wsp. (2019) odnotowali znaczną poprawę aktywności przeciwutleniającej mięszu opuncji figowej po zastosowaniu HHP przy 350 MPa w czasie 5 min, a uzyskane wyniki były skorelowane z zawartością związków fenolowych. Badania handlowych soków z buraków ćwikłowych również potwierdzały szczególny udział metabolitów powstających w czasie trawienia na działanie przeciwutleniające spożywanych soków. Podobnie jak w niniejszym badaniu, zmienność pojemności przeciwutleniającej była uzależniona od zastosowanych rodników, DPPH• lub ABTS+• [Wootton-Beard i wsp. 2011]. Metabolity powstające z rozpadu betalain i przyczyniające się do wzrostu pojemności antyoksydacyjnej trawionego soku to głównie produkty dekarboksylacji i deglikozylacji. Stężenie betacyjanin w surowicy krwi jest raczej niskie w stosunku do przyjętej dawki, jednak ich wysoki potencjał przeciwutleniający sprawia, że spożycie nawet niewielkiej ilości tych związków (w mikromolach) zmniejsza procesy utleniania warstwy lipidowej błon komórkowych oraz hamuje procesy rozkładu hemu w hemoglobinie, mioglobinie i cytochromach [Klewicka 2012, Sawicki i wsp. 2019]. Różnice w pojemności przeciwutleniającej oznaczonej z rodnikami DPPH• lub ABTS+• mogą wynikać między innymi z innego powinowactwa składników bioaktywnych ze wspomnianymi rodnikami, innego mechanizmu ich powstawania, reakcji ze składnikami kwasów żółciowych oraz odmiennej stabilności tych rodników [Desseva i wsp. 2020].

7.5. Wpływ SCCD na stabilność i biodostępność witaminy C

Wpływ SCCD na stabilność witaminy C (jako sumy kwasu L-askorbinowego i L-dehydroaskorbinowego) na kolejnych etapach trawienia i jej biodostępność w próbkach soku z czarnej porzeczki zostały opisane w artykule trzecim, należącym do cyklu publikacji [P3]. Zastosowanie SCCD w sokach z czarnej porzeczki, niezależnie od parametrów ciśnienia pozwoliło na zachowanie wysokiej zawartości witaminy C, która w kwaśnym

środowisku soku wysyconym CO₂ w stanie nadkrytycznym mogła pozostać bardziej stabilna [Oulé i wsp. 2013, Fabroni i wsp. 2010]. Niskie pH środowiska może również sprzyjać stabilności witaminy C w podwyższonej temperaturze [Rodríguez-Roque i wsp. 2013]. Kwas L-askorbinowy był główną formą witaminy C w próbkach soku przed trawieniem (98%), jednak na etapie trawienia w jelicie cienkim zdecydowanie dominował kwas L-dehydroaskorbinowy (76–93%). Zastosowanie SCCD przy 30 i 60 MPa indukowało przemianę kwasu L-askorbinowego do kwasu L-dehydroaskorbinowego bardziej niż pasteryzacja termiczna. Na etapie symulacji trawienia w jelicie, w próbkach po zastosowaniu SCCD odnotowano 2-4% wyższą zawartość tego kwasu niż w próbkach pasteryzowanych i 15-17% wyższą niż w próbkach surowego soku.

Wykazano wzrost zawartości witaminy C ogółem we wszystkich próbkach po symulacji trawienia w jamie ustnej oraz istotny spadek po trawieniu w żołądku. Zawartość witaminy C ogółem po trawieniu jelitowym zmniejszyła się o 45–66% w porównaniu z etapem symulacji trawienia w żołądku. Zastosowanie SCCD nie wpłynęło na zwiększenie stabilności tego związku w czasie trawienia. Większość witaminy C pozostałej po symulacji trawienia jelitowego została biernie przetransportowana przez błonę celulozową symulującą barierę nabłonkową jelita cienkiego.

Nie wykazano pozytywnego wpływu obróbki SCCD ani pasteryzacji na biodostępność witaminy C, która wynosiła w tych próbkach 25-28%. Najwyższą biodostępność witaminy C ogółem odnotowano w soku surowym (40%) i po łagodnej obróbce termicznej w 45°C (46%). Początkowa wyższa stabilność witaminy C w próbkach utrwalanych SCCD w porównaniu do próbek po obróbce termicznej i w sokach nieutrwalanych nie determinowała wyższej biodostępności witaminy C.

Jak już wspomniano w pkt. 4.1., w innych badaniach wskazywano na wysoką stabilność witaminy C w kwaśnym środowisku żołądka i znaczną degradację w warunkach jelitowych [Pérez-Vicente i wsp. 2002, Vallejo i wsp. 2004]. Z drugiej strony, badania *in vivo* wskazują na biodostępność witaminy C u zdrowych, niepalących osób na poziomie 70-80% (przy dawce 180 mg) [Janda i wsp. 2015]. Różnice w dynamice trawienia oraz biodostępności witaminy C pomiędzy badaniami opisanymi w artykule drugim i trzecim [P2, P3] mogły wynikać głównie z zastosowanie innej matrycy, jaką było puree. Znaczny wpływ rodzaju matrycy na trawienie, stabilność i biodostępność składników bioaktywnych wykazano również w innych badaniach [Lingua i wsp. 2018]. Dostępne nieliczne badania na temat wpływu SCCD na biodostępność substancji pochodzących z żywności dotyczyły tylko karotenoidów [Zhao i wsp. 2019]. Prezentowane badania są według wiedzy autorki

pierwszym doniesieniem na temat biodostępności witaminy C z produktów poddanych działaniu SCCD.

7.6. Wpływ SCCD na stabilność i biodostępność antocyjanów

Wpływ SCCD na stabilność i biodostępność antocyjanów w soku z czarnej porzeczki zostały opisane w publikacji **P3**. W niniejszym badaniu przedstawiono zawartość antocyjanów ogółem jak i poszczególnych monomerów, charakterystycznych dla czarnej porzeczki (df-3-*O*-rut, cy-3-*O*-rut, df-3-*O*-glu, cy-3-*O*-glu). Zastosowanie SCCD do utrwalania próbek soków z czarnej porzeczki istotnie wpłynęło na retencję antocyjanów, których zawartość niezależnie od zastosowanego ciśnienia była wyższa niż w soku surowym. Najlepszy efekt uzyskano stosując technikę SCCD przy ciśnieniu 30 i 60 MPa, w przeciwieństwie do pasteryzacji, która przyczyniła się do degradacji antocyjanów o 37%. Obróbka termiczna w 45°C nie miała istotnego wpływu na całkowitą zawartość antocyjanów. Inne badania potwierdzają, że technika SCCD pozwala na utrzymanie wysokiej stabilności antocyjanów pochodzących z owoców [Marszałek i wsp. 2017c], lub powoduje jedynie niewielką ich utratę [Marszałek i wsp. 2015, Fabroni i wsp. 2010]. Przyczyną tego zjawiska może być między innymi inaktywacja lub zmniejszenie aktywności enzymów tkankowych [Pozo-Insfran, i wsp. 2007], czy też zwiększona ekstrakcja związków z matrycy soku NFC [Briongos i wsp. 2016].

W wyniku symulacji trawienia w jamie ustnej nastąpił spadek całkowitej zawartości antocyjanów ogółem we wszystkich próbkach soku z czarnej porzeczki. W próbkach soku surowego i po łagodnej obróbce termicznej w temp 45°C degradacja ta wyniosła 20 %, w próbkach pasteryzowanych 36%, a w próbkach potraktowanych SCCD aż 61–72%. Po symulacji trawienia w żołądku odnotowano dalszy spadek zawartości antocyjanów ogółem w próbkach surowego soku i po obróbce termicznej w 45°C. W pozostałych próbkach zawartość antocyjanów wzrosła w przedziale od 6% w próbkach utrwalanych SCCD przy 60 MPa do 43% w próbkach pasteryzowanych. Utrwalanie soków techniką SCCD nie przyczyniało się do zwiększenia stabilności antocyjanów w podwyższonym pH jamy ustnej. Ostatecznie zawartość antocyjanów ogółem w tych próbkach nie była większa na etapie jamy ustnej i żołądka w porównaniu do próbek pasteryzowanych czy też soku surowego. Trawienie w jelicie cienkim wraz z dializą spowodowało utratę antocyjanów we wszystkich próbkach o 85–90%. Niemniej jednak najwyższą zawartość antocyjanów ogółem w dializacie charakteryzowały się próbki po obróbce SCCD przy 10 MPa oraz próbki przygotowane z surowego soku. Jak już wspomniano, wyższa stabilność

antocyjanów w żołądku i duża degradacja tych związków w jelicie cienkim jest związana z drastycznymi zmianami pH i została już opisana w innych badaniach [Lingua i wsp. 2018, Bouayed i wsp. 2011, Correa-Betanzo i wsp. 2014].

Najwyższą biodostępność antocyjanów ogółem stwierdzono w soku niepoddanym żadnej obróbce (4,4%), następnie w próbkach utrwalanych termicznie i SCCD przy 10 MPa (2,7–3,4%). Obróbka SCCD nie przyczyniła się do poprawy biodostępności antocyjanów ogółem, jednak przy zastosowaniu ciśnienia 10 MPa odnotowano poprawę biodostępności monomerów delfinidyny (df-3-*O*-glu i df-3-*O*-rut) w stosunku do próbek po obu wariantach obróbki termicznej. Cyjanidyny wykazywały jednak wyższą biodostępność niż delfinidyny, a najbardziej dostępnym z nich glikozydem był cy-3-*O*-rut, we wszystkich badanych próbkach. W badaniu antocyjanów pochodzących z jagód odnotowano, że delfinidyny były najmniej dostępnymi glikozydami [Peixoto i wsp. 2018], jednak ich metabolity mogą mieć duże znaczenie w kształtowaniu potencjału przeciwutleniającego w osoczu krwi [Correa-Betanzo i wsp. 2014].

W celu zweryfikowania hipotezy dotyczącej biodostępności metabolitów antocyjanów przeprowadzono dodatkowe doświadczenie polegające na trawieniu roztworu modelowego antocyjanu, występującego w soku z czarnej porzeczki w największej ilości (df-3-*O*-rut). Analizy monomeru oraz jego metabolitów wykonano metodą UPLC-MS/MS. Stwierdzono, że głównym metabolitem tego związku był kwas protokatechowy, który pojawił się po trawieniu na etapie jamy ustnej, a największe jego stężenie wykryto na etapie żołądka. Kwas protokatechowy należy do grupy kwasów fenolowych i charakteryzuje się silnymi właściwościami przeciwutleniającymi [Jeszka, Kobus-Cisowska & Dziedzic 2010]. Jego obecność wyjaśnia istotny wzrost mierzonych pojemności przeciwutleniającej badanych roztworów. W próbkach utrwalanych techniką SCCD przy ciśnieniu 30 i 60 MPa odnotowano wyższy współczynnik przyrostu pojemności przeciwutleniającej w stosunku do stężenia antocyjanów ogółem na etapie symulacji trawienia jelitowego oraz dializatu. Może świadczyć to o tym, że zastosowanie tej obróbki sprzyjało powstawaniu metabolitów takich jak kwas protokatechowy podczas trawienia. Powstawanie kwasu protokatechowego w wyniku trawienia antocyjanów potwierdzono w badaniach *in vivo* [Mallery i wsp. 2011, Vitaglione i wsp. 2007].

Istnieją tylko nieliczne badania na temat wpływu SCCD na biodostępność substancji pochodzących z żywności i dotyczyły one tylko karotenoidów [Zhao i wsp. 2019]. Zastosowanie SCCD powoduje uszkodzenie ścian komórkowych i wspomaga uwalnianie składników bioaktywnych z matrycy pokarmowej. W badaniach innych autorów

zauważono, że po obróbce SCCD zwiększył się udział małych cząstek i zmniejszył udział dużych cząstek w miąższu soku pomarańczowego, w porównaniu z sokiem bez obróbki. Podczas usuwania CO₂ z komory dochodzi do indukcji dużych naprężeń wewnętrznych, powodujących rozpad uszkodzonych na etapie tłoczenia cząstek tkanki [Briongos i wsp 2016, Niu i wsp. 2010].

7.7. Wpływ SCCD na stabilność i biodostępność betalain

Wpływ SCCD na stabilność betalain w próbkach soku z buraka ćwikłowego w czasie trawienia i ich biodostępność zostały opisane w publikacji **P4**. Profil betalain w soku z buraka ćwikłowego nie ulegał zmianie pod wpływem obróbki SCCD. Zastosowanie ciśnienia 60 MPa przyczyniło się do zachowania betacyjanin i betaksantyn na poziomie oznaczonym w surowych sokach. Z kolei zastosowanie ciśnienia 10 i 30 MPa powodowało istotny spadek zawartości barwników, odpowiednio o 21 i 34%. W badaniach innych autorów również zwrócono uwagę na niską stabilność betalain w sokach z buraka ćwikłowego poddanych utrwalaniu SCCD [Liu i wsp 2010, Marszałek i wsp. 2017b].

Stabilność pigmentów z grupy betacyjanin i betaksantyn różniła się na poszczególnych etapach symulacji trawienia oraz po zastosowaniu różnego rodzaju obróbki. Zastosowanie SCCD w soku z buraka ćwikłowego pozwoliło na zachowanie wyższej stabilności betacyjanin i betaksantyn w czasie symulacji trawienia, niż w przypadku próbek soku surowego i utrwalanego termicznie. Działanie na soki ciśnieniem 30 i 60 MPa okazało się korzystniejsze w porównaniu do próbek utrwalanych przy ciśnieniu 10 MPa. Po symulacji trawienia jelitowego w próbkach utrwalanych SCCD przy ciśnieniu 60 MPa odnotowano najmniejszy spadek zawartości betacyjanin (44%) w odniesieniu do etapu trawienia w żołądku, w przeciwieństwie do próbek pasteryzowanych, gdzie spadek był największy (74%). Wysoką stabilnością w czasie trawienia odznaczały się również betalainy w próbkach utrwalanych SCCD przy 30 MPa. Pomimo najniższej zawartości pigmentów przed trawieniem, pozostawały one trwalsze niż w innych próbkach, na każdym etapie trawienia, począwszy od jamy ustnej, aż do dializatu, gdzie stabilność betalain nie różniła się istotnie od próbek utrwalanych SCCD przy 60 MPa.

Zastosowanie SCCD przy wszystkich trzech parametrach ciśnienia przyczyniło się do poprawy biodostępności betacyjanin i betaksantyn w porównaniu do soków pasteryzowanych. W przypadku ciśnienia 30 i 60 MPa wyższą biodostępność obu grup pigmentów odnotowano także w stosunku do soków surowych i ogrzewanych w 45°C, a nawet próbek HHP [P4], pomimo dziesięciokrotnie niższych wartości ciśnienia

stosowanych w technice SCCD. Wskazuje to na większy wpływ ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym na biodostępność składników bioaktywnych niż samej wysokości ciśnienia. Łagodna obróbka termiczna nie miała istotnego wpływu na początkową zawartość betalain, ich stabilność podczas trawienia oraz na biodostępność. Oznacza to, że efekt wywołany zastosowaniem techniki SCCD był związany jedynie z wpływem CO₂ w stanie nadkrytycznym, a nie temperatury. Początkowa wysoka zawartość betalain nie determinuje ich biodostępności, ponieważ istotnym czynnikiem jest zachowanie stabilności związków podczas procesów trawiennych. Próbki utrwalane SCCD przy ciśnieniu 30 MPa wykazywały najwyższą biodostępność betacyjanin (23%) i betaksantyn (32%) pomimo początkowo najniższej stabilności tych związków w próbkach przed trawieniem. Mechanizm przyczyniający się do poprawy stabilności i biodostępności betalain w soku z buraka ćwikłowego nie został do końca poznany, jednak otrzymane wyniki badań świadczą o szczególnej roli CO₂ w tym mechanizmie. Dzięki jego właściwościom składniki bioaktywne mogą być uwalniane z tkanek obecnych w soku NFC, dzięki czemu oznaczona ich zawartość jest wyższa i przez to bardziej dostępna dla organizmu. Ponadto związki te mogą być również zamykane w wielkocząsteczkowych strukturach np. błonnika, co może wpływać na poprawę ich stabilności w przewodzie pokarmowym. Brak jest obecnie większej ilości prac dotyczących wpływu techniki SCCD na biodostępność związków bioaktywnych, szczególnie hydrofilowych.

7.8. Wpływ SCCD na pojemność przeciwutleniającą podczas trawienia

Wpływ SCCD na pojemność przeciwutleniającą próbek na różnych etapach trawienia opisano w publikacji **P3** oraz **P4**. Zastosowanie SCCD do obróbki soku z czarnej porzeczki przyczyniło się do zwiększenia początkowej pojemności przeciwutleniającej oznaczanej z rodnikiem ABTS⁺•, która niezależnie od zastosowanych parametrów, była istotnie wyższa niż w soku surowym i po obróbce termicznej. Pojemność przeciwutleniająca wobec rodników DPPH• przed trawieniem również była istotnie wyższa w próbkach po obróbce SCCD w porównaniu z próbkami pasteryzowanymi, jednak różnice te nie były aż tak znaczące.

Odnotowano znaczny wpływ procesów trawiennych na pojemność przeciwutleniającą soków z czarnej porzeczki. Przy czym zauważono wyższą jej wartość na poszczególnych etapach trawienia w sokach utrwalanych SCCD przy 30 i 60 MPa, w porównaniu do próbek utrwalanych termicznie (45°C i 85°C). Co ciekawe, na etapie jamy ustnej odnotowano wzrost pojemności przeciwutleniającej przy jednoczesnym spadku zawartości antocyjanów

ze względu na niekorzystne dla ich stabilności pH. Już na etapie jamy ustnej może dochodzić do transformacji antocyjanów do związków fenolowych i innych pochodnych, charakteryzujących się znacznymi właściwościami przeciwutleniającymi. Zarówno w metodzie z wykorzystaniem rodników DPPH•, jak i ABTS+• nastąpił spadek pojemności przeciwutleniającej po symulacji trawienia jelitowego z dializą (ABTS+•: spadek o 39–74%; DPPH•: spadek o 83–94%). Po trawieniu próbki poddane działaniu SCCD we wszystkich wariantach ciśnienia charakteryzowały się istotnie wyższą pojemnością przeciwutleniającą niż próbki pasteryzowane i nie różniły się istotnie od surowego soku. W przypadku testu z rodnikiem ABTS+• tendencja ta utrzymywała się w dializacie, z wyjątkiem próbki utrwalanej techniką SCCD przy ciśnieniu 10 MPa, gdzie obserwowano spadek pojemności przeciwutleniającej. W przypadku testu DPPH• nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pojemności przeciwutleniającej pomiędzy próbkami po dializie. Obróbka termiczna w temperaturze 45°C nie miała wpływu na zmianę potencjału antyoksydacyjnego soków, w związku z tym pozytywny wpływ obróbki SCCD można przypisać jedynie zastosowaniu ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym.

Spadek pojemności przeciwutleniającej na poszczególnych etapach symulacji trawienia był znaczący, ale nie proporcjonalny do degradacji antocyjanów, które są głównym składnikiem odpowiedzialnym za kształtowanie właściwości przeciwutleniających w czarnej porzeczce. Zjawisko to można tłumaczyć wysokim potencjałem antyoksydacyjnym metabolitów antocyjanów, które powstały po trawieniu. Obliczony współczynnik określający stosunek pojemności przeciwutleniającej do zawartości antocyjanów (1 μ M Trolox/ 1 mg/L antocyjanów) w soku z czarnej porzeczki charakteryzował się znacznym wzrostem na każdym etapie trawienia. We frakcji dializatu odnotowano trzykrotny wzrost tego współczynnika dla próbek utrwalanych SCCD przy 60 MPa oraz dwukrotny w próbkach utrwalanych SCCD przy 30 MPa w porównaniu do próbek kontrolnych. Zjawisko to może świadczyć o wpływie techniki SCCD na poprawę dostępności przeciwutleniaczy w przewodzie pokarmowym, dzięki czemu mogą one w łatwiejszy sposób ulegać metabolizmowi w organizmie i zwiększać potencjał antyoksydacyjny soku.

Metabolity powstające podczas trawienia antocyjanów w znaczący sposób przyczyniają się do kształtowania właściwości przeciwutleniających produktów spożywczych. Przykładem jest kwas protokatechowy wykryty w modelowym badaniu trawienia df-3-O-rut, charakteryzujący się wysoką aktywnością przeciwutleniającą. W badaniach *in vitro* wykazano, że po spożyciu soku z czerwonych pomarańczy (n=6), jako źródła

antocyjanów, odnotowano wysokie stężenia kwasu protokatechowego w osoczu, co przyczyniło się do wzrostu krótkotrwałej aktywności antyoksydacyjnej [Vitaglione i wsp. 2007]. Niska stabilność delfinidyny jest rekompensowana powstającymi w wyniku jej rozpadu metabolitami o wysokim potencjalnie przeciwutleniającym. Wyjaśnia to paradoks niskiej biodostępności polifenoli, w tym antocyjanów, przy jednoczesnym silnym działaniu antyoksydacyjnym i udowodnionym pozytywnym wpływie na organizm [Goszcz i wsp. 2017].

W sokach z buraków ćwikłowych poddanych działaniu SCCD odnotowano niższą pojemność przeciwutleniającą z rodnikiem DPPH• w porównaniu do próbek soku surowego i po obróbce termicznej. Natomiast test z rodnikiem ABTS+• wykazał brak statystycznie istotnych różnic pojemności przeciwutleniającej w próbkach utrwalanych SCCD przy 60 MPa i 10 MPa, w sokach surowych oraz po łagodnej obróbce termicznej. W teście z udziałem rodnika DPPH•, odnotowano wyższą wyjściową pojemność przeciwutleniającą w sokach utrwalanych SCCD w porównaniu do soków surowych i po obróbce termicznej. Symulacja trawienia w jamie ustnej nie powodowała istotnych zmian pojemności przeciwutleniającej wobec rodnika ABTS+• w sokach utrwalanych SCCD, surowych i po obróbce termicznej. Nie wykazano również pozytywnego wpływu SCCD na pojemność przeciwutleniającą w sokach z buraków ćwikłowych na etapie trawienia pepsyną, która była mniejsza bądź nie różniła się istotnie od próbek surowych i ogrzewanych soków. W sokach traktowanych ciśnieniem 60 MPa odnotowano istotnie wyższą pojemność przeciwutleniającą po trawieniu jelitowym, w porównaniu do pozostałych próbek. Po dializie najwyższą pojemność przeciwutleniającą wobec rodników DPPH• odnotowano w próbkach utrwalanych SCCD przy ciśnieniu 30 i 60 MPa, a w sokach po zastosowaniu SCCD przy 10 MPa również była ona istotnie wyższa w porównaniu do innych próbek. Analiza wobec rodnika ABTS+• potwierdziła pozytywny wpływ zastosowania SCCD przy 60 MPa na pojemność przeciwutleniającą soków z buraka ćwikłowego po dializie w porównaniu do obróbki termicznej w 85°C. Nie różniła się ona statystycznie istotnie od wartości oznaczonej w soku surowym i po łagodnej obróbce termicznej. Pomimo zmniejszającej się stabilności betalain na skutek niekorzystnych warunków panujących w przewodzie pokarmowym, ich właściwości antyoksydacyjne nie zostały utracone, gdyż najprawdopodobniej metabolity tych związków nadal odznaczały się wysoką aktywnością przeciwutleniającą.

W innych pracach obejmujących badania nad sokami z czerwonych grejpfrutów [Ferrentino i wsp. 2009], naparu z hibiskusa [Ramírez-Rodrigues i wsp. 2012], sokami

jabłkowymi [Porto i wsp. 2010], czy też z liczi [Liu i wsp. 2015] wykazano, że zastosowanie SCCD pozwoliło na zachowanie właściwości przeciwutleniających na tym samym lub wyższym poziomie co w produktach nieutrwalanych. Inne źródła donoszą, że sam proces trawienia przyczyniał się do spadku aktywności przeciwutleniającej w kolejnych etapach trawienia i był on skorelowany z zawartością antyoksydantów [Burgos-Edwards i wsp. 2017, Bouayed i wsp. 2011].

8. Obserwacje i spostrzeżenia

Wpływ procesów technologicznych na stabilność antyoksydantów:

- 1) Zastosowanie **HHP** do utrwalania soków z czarnej porzeczki pozwoliło na zachowanie najwyższej zawartości witaminy C (200 i 400 MPa/5 min) oraz antocyjanów (wszystkie parametry) w porównaniu do innych stosowanych technik. W przypadku soków z buraka ćwikłowego najkorzystniejsze okazało się ciśnienie 200 MPa w czasie 5 min. Parametry te pozwoliły na zachowanie antyoksydantów na niezmiennym poziomie w stosunku do surowca.
- 2) W sokach z czarnej porzeczki poddanych działaniu **SCCD** oznaczono wyższe zawartości witaminy C i antocyjanów niż w próbkach soków surowych. W sokach z buraków ćwikłowych zawartość betalain na poziomie surowego soku odnotowano jedynie w sokach utrwalanych przy ciśnieniu 60 MPa przez 10 min. Pozostałe parametry powodowały degradację tych związków.
- 3) **Pasteryzacja w 85°C/10 min**, przyczyniła się do istotnej utraty antocyjanów oraz nie miała wpływu na zawartość witaminy C i betalain w porównaniu do surowych soków z czarnej porzeczki oraz buraków ćwikłowych.
- 4) **Obróbka termiczna w 45°C/10 min** nie miała istotnego wpływu na zawartość badanych związków.

Stabilność antyoksydantów podczas trawienia:

- 5) Dynamika trawienia składników bioaktywnych zależy w dużej mierze od **rodzaju matrycy oraz badanego antyoksydantu** jak również warunków panujących na poszczególnych etapach modelu przewodu pokarmowego, w szczególności **zmiennego pH środowiska**:
 - Witamina C i antocyjany w puree oraz antocyjany w soku z czarnej porzeczki: odnotowano istotny spadek ich zawartości w jamie ustnej, następnie wzrost mierzonej zawartości na etapie symulacji trawienia w żołądku oraz drastyczną degradację po symulacji trawienia w jelicie cienkim z dializą.

- Witamina C w soku z czarnej porzeczki: obserwowano niewielki wzrost jej zawartości w jamie ustnej oraz spadek w żołądku i w jelicie cienkim.
 - Betacyjaniny w soku z buraka ćwikłowego: zaobserwowano spadek zawartości po symulacji trawienia w jamie ustnej, stabilizację w żołądku i znaczną degradację po trawieniu w jelicie cienkim.
 - Betaksantyny w soku z buraka ćwikłowego: wykazywały stabilność w warunkach trawienia w jamie ustnej i dużą wrażliwość na etapie żołądka oraz znacznie mniejszą na etapie jelita cienkiego.
- 6) Stabilność antyoksydantów w czasie trawienia różniła się w zależności od **zastosowanej obróbki**:
- Zastosowanie HHP zwiększyło stabilność witaminy C (przy 400 i 600 MPa) oraz antocyjanów (200, 400 i 600 MPa) w czasie trawienia puree z czarnej porzeczki. Zauważono, że w obojętnym pH jamy ustnej antocyjany były bardziej stabilne w próbkach utrwalanych techniką HHP. Obróbka HHP przy ciśnieniu 200 MPa korzystnie wpływała na stabilność betalain w soku z buraka ćwikłowego na każdym kolejnym etapie trawienia.
 - Zastosowanie SCCD nie wpłynęło na zwiększenie stabilności witaminy C oraz antocyjanów ogółem w czasie trawienia soków z czarnej porzeczki. Odnotowano jednak wyższą stabilność betacyjanin i betaksantyn w czasie symulacji trawienia soku z buraka ćwikłowego, w porównaniu do soku surowego i utrwalanego termicznie, a także HHP przy 400 i 500 MPa.
 - Zastosowanie SCCD przy 30 i 60 MPa indukowało przemiany witaminy C do formy kwasu L-dehydroaskorbinowego. W próbkach po zastosowaniu SCCD odnotowano 2-4% wyższą zawartość tego kwasu niż w próbkach pasteryzowanych i 15-17% niż w próbkach surowego soku na etapie trawienia jelitowego.

Wpływ procesów technologicznych na biodostępność wybranych składników:

- 7) Zauważono istotnie wyższą biodostępność **witaminy C** w próbkach utrwalanych **HHP przy 400 i 600 MPa** w porównaniu do próbek soku surowego (~1%) oraz wyższy potencjalny stopień wchłaniania z etapu żołądka o kolejno 5% i 10% w porównaniu do próbek surowych.
- 8) Nie wykazano wpływu **HHP** na poprawę biodostępności **antocyjanów**. Odnotowano jednak wyższy potencjalny stopień wchłaniania antocyjanów w próbkach utrwalanych przy ciśnieniu 600 MPa po symulacji trawienia w żołądku, o odpowiednio 13% i 6% w porównaniu do próbek pasteryzowanych i surowych owoców czarnej porzeczki.

- 9) Zastosowanie **HHP** poprawiło biodostępność **betacyjanin** w porównaniu z próbkami soków surowych oraz utrwalanych termicznie w 45°C i 85°C, ale nie wpłynęła na biodostępność **betaksantyn**. Spośród parametrów HHP najkorzystniejszy wpływ na biodostępność obu grup betalain miało ciśnienie 200 MPa.
- 10) Zastosowanie obróbki **SCCD** soków z czarnej porzeczki nie wpłynęło na poprawę biodostępności **witaminy C**, nie różniła się ona istotnie statystycznie od biodostępności oznaczonej w próbkach pasteryzowanych i wynosiła 25-28%.
- 11) Nie odnotowano istotnie wyższej biodostępności **antocyjanów** ogółem w sokach z czarnej porzeczki poddanych obróbce **SCCD**, jednak przy zastosowaniu 10 MPa nastąpiła poprawa biodostępności monomerów delfinidyny (df-3-O-glu i df-3-O-rut) w stosunku do próbek po obróbce termicznej w 45°C i 85°C.
- 12) Badania modelowe potwierdziły **obecność kwasu protokatechowego jako metabolitu df-3-O-rut**, związku o wysokim potencjale przeciwutleniającym.
- 13) Zastosowanie **SCCD** przy wszystkich badanych poziomach ciśnienia przyczyniło się do poprawy biodostępności **betacyjanin i betaksantyn** w porównaniu do soków pasteryzowanych. W przypadku ciśnienia 30 i 60 MPa wyższą biodostępność obu grup pigmentów odnotowano także w stosunku do soków surowych i ogrzewanych w 45°C.

Wpływ procesów technologicznych na pojemność przeciwutleniającą:

- 14) Po trawieniu jelitowym oraz dializie, próbki **czarnych porzeczek** utrwalane **HHP przy 400 i 600 MPa** wykazywały istotnie wyższą pojemność przeciwutleniającą (ABTS+•, DPPH•), w porównaniu do próbek pasteryzowanych. Może to świadczyć o wpływie HHP na zwiększone uwalnianie składników w trakcie trawienia, efektywniejsze ich metabolizowanie i wchłanianie w przewodzie pokarmowym.
- 15) Zastosowanie **HHP przy 200 MPa** przyczyniło się do zachowania silnych właściwości przeciwutleniających **soku z buraka**, które były skorelowane nie tylko z wysoką początkową zawartością betalain, ale również ich stabilnością w czasie trawienia.
- 16) **Soki z czarnej porzeczki** po obróbce **SCCD** we wszystkich wariantach ciśnienia charakteryzowały się istotnie wyższą pojemnością przeciwutleniającą niż próbki pasteryzowane i nie różniły się istotnie od surowego soku (ABTS+•) na etapie jelita cienkiego i dializatu (z wyjątkiem SCCD przy ciśnieniu 10 MPa).
- 17) We frakcji dializatu odnotowano trzykrotnie wyższy stosunek pojemności przeciwutleniającej do stężenia antocyjanów w próbkach po utrwalaniu SCCD przy 60 MPa oraz dwukrotnie wyższy w próbkach po utrwalaniu SCCD przy 30 MPa w porównaniu do próbek kontrolnych.

- 18) **Obróbka termiczna w temperaturze 45°C** nie miała wpływu na zmianę potencjału antyoksydacyjnego soków, w związku z tym pozytywny wpływ obróbki SCCD można przypisać jedynie zastosowaniu ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym.
- 19) Obróbka **SCCD soków z buraka ćwikłowego** korzystnie wpłynęła na pojemność przeciwutleniającą po trawieniu w jelicie cienkim i dializacie, w porównaniu do próbek pasteryzowanych (DPPH• i ABTS+•). Najkorzystniejsze okazało się zastosowanie ciśnienia 60 MPa. Pomimo zmniejszającej się stabilności betalain na skutek niekorzystnych warunków panujących w przewodzie pokarmowym, ich właściwości antyoksydacyjne nie zostały utracone, gdyż metabolity tych związków nadal odznaczają się wysoką aktywnością przeciwutleniającą.

9. Wnioski

Przeprowadzone badania na modelu *in vitro* przyczyniły się do częściowego potwierdzenia hipotezy głównej oraz hipotez szczegółowych postawionych w niniejszej pracy:

1. HHP przy wybranych parametrach ciśnienia wpływa na poprawę biodostępności witaminy C w puree z czarnej porzeczki, jednakże podobnego efektu nie wykazano wobec antocyjanów. Technika ta pozwala na większe zachowanie badanych związków w trakcie trawienia, umożliwiając jednocześnie uzyskanie wyższego potencjalnego stopnia wchłaniania witaminy C i antocyjanów na etapie żołądka.
2. SCCD nie wpłynęło na poprawę biodostępności witaminy C oraz sumy antocyjanów w sokach z czarnej porzeczki. Poprawę biodostępności odnotowano natomiast dla monomerów delfinidyny przy ciśnieniu 10 MPa. Różnice w biodostępności różnych monomerów mogą wynikać z różnej budowy chemicznej tych związków.
3. HHP przyczynia się do poprawy biodostępności betacyjanin w sokach z buraka ćwikłowego, jednak nie wpływa na biodostępność betaksantyn. Wyższa biodostępność betacyjanin wskazuje na znaczenie budowy chemicznej tych związków w ocenie biodostępności.
4. Zastosowanie obróbki SCCD może być skutecznym narzędziem do produkcji soków z buraka ćwikłowego o zwiększonych właściwościach prozdrowotnych poprzez poprawę biodostępności betacyjanin i betaksantyn oraz do projektowania żywności funkcjonalnej.
5. Wzrost pojemności przeciwutleniającej przy jednoczesnej degradacji składników bioaktywnych podczas trawienia wskazuje na powstawanie metabolitów o wysokiej aktywności np. kwasu protokatechowego z antocyjanów.
6. Uzyskane wyniki świadczą o możliwości poprawy biodostępności wybranych składników bioaktywnych poprzez zastosowanie innowacyjnych nietermicznych technik przetwórstwa żywności. Prace te wymagają jednak potwierdzenia w doświadczeniach z udziałem mikrobioty jelitowej w warunkach *in vivo*.

10. Bibliografía:

1. Bakowska-Barczak, A. M., & Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1301-1309.
2. Barba, F. J., Terefe, N. S., Buckow, R., Knorr, D., & Orlie, V. (2015). New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. *Food Research International*, 77, 725-742.
3. Barba, F. J., Ahméd, L., Xanthakis, E., Landerslev, M. G., & Orlie, V. (2018). Innovative technologies for food preservation. In *Innovative Technologies for Food Preservation* (pp. 25-51). Academic Press.
4. Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14-21.
5. Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M., & Maureira, H. (2011a). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*, 128(2), 520-529.
6. Briones-Labarca, V., Muñoz, C., & Maureira, H. (2011b). Effect of high hydrostatic pressure on antioxidant capacity, mineral and starch bioaccessibility of a non conventional food: *Prosopis chilensis* seed. *Food Research International*, 44(4), 875-883.
7. Briongos, H., Illera, A. E., Sanz, M. T., Melgosa, R., Beltrán, S., & Solaesa, A. G. (2016). Effect of high pressure carbon dioxide processing on pectin methylesterase activity and other orange juice properties. *LWT*, 74, 411-419.
8. Brodtkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A. R., Martins, C., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C. N., Souchon, I., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., & Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991-1014.
9. Buniowska, M., Carbonell-Capella, J. M., Frigola, A., & Esteve, M. J. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with *Stevia rebaudiana*. *Food Chemistry*, 221, 1834-1842.
10. Burgos-Edwards, A., Jiménez-Aspee, F., Thomas-Valdés, S., Schmeda-Hirschmann, G., & Theoduloz, C. (2017). Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 237, 1073-1082.
11. Cao, G., Muccitelli, H. U., Sánchez-Moreno, C., & Prior, R. L. (2001). Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(5), 920-926.
12. Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155-171.
13. Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2015). Effect of *Stevia rebaudiana* addition on bioaccessibility of bioactive compounds and

- antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. *Food Chemistry*, 184, 122-130.
14. Ceclu, L., & Nistor, O. V. (2020). Red beetroot: Composition and health effects—A review. *Journal of Nutritional Medicine and Diet Care*, 6(1), 1-9.
 15. Chhikara, N., Kushwaha, K., Sharma, P., Gat, Y., & Panghal, A. (2019). Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review. *Food Chemistry*, 272, 192-200.
 16. Cilla, A., Bosch, L., Barberá, R., & Alegría, A. (2018). Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds—A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 3-15.
 17. Cilla, A., Alegría, A., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Plaza, L., ... & Barberá, R. (2012). Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk-and soy-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7282-7290.
 18. Clifford, T., Constantinou, C. M., Keane, K. M., West, D. J., Howatson, G., & Stevenson, E. J. (2017). The plasma bioavailability of nitrate and betanin from *Beta vulgaris rubra* in humans. *European Journal of Nutrition*, 56, 1245-1254.
 19. Clifford, T., Howatson, G., West, D. J., & Stevenson, E. J. (2015). The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease. *Nutrients*, 7(4), 2801-2822.
 20. Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M., & Paliyath, G. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 165, 522-531.
 21. Damar, S., & Balaban, M. O. (2006). Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. *Journal of Food Science*, 71(1), R1-R11.
 22. Desseva, I., Stoyanova, M., Petkova, N., & Mihaylova, D. (2020). Red beetroot juice phytochemicals bioaccessibility: An in vitro approach. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 70(1), 45-53.
 23. Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Barberá, R., Brodkorb, A., Cattenoz, T., Clemente, T., Comi, I., Dupont, D., Garcia-Llatas, G., Lagarda, M. J., Le Feunteun, S., Duijghuijsen, L. J., Karakaya, S., Lesmes, U., Mackie, A. R., Martins, C., Meynier, A., Miralles, B., Murray, B. S., Pihlanto, A., Picariello, G., Santos, C. N., Simsek, S., Recio, I., Rigby, N., Rioux, L., Stoffers, H., Tavares, A., Tavares, L., Turgeon, S., Ulleberg, E. K., Vegarud, G. E., Vergères, G., & Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217-225.
 24. Fabroni, S., Amenta, M., Timpanaro, N., & Rapisarda, P. (2010). Supercritical carbon dioxide-treated blood orange juice as a new product in the fresh fruit juice market. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), 477-484.
 25. FAOSTAT 2021: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
 26. Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 7, 54-66.
 27. Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751-760.

28. Ferrentino, G., Plaza, M. L., Ramirez-Rodrigues, M., Ferrari, G., & Balaban, M. O. (2009). Effects of dense phase carbon dioxide pasteurization on the physical and quality attributes of a red grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 74(6), E333-E341.
29. Fu, Y., Shi, J., Xie, S. Y., Zhang, T. Y., Soladoye, O. P., & Aluko, R. E. (2020). Red beetroot betalains: Perspectives on extraction, processing, and potential health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(42), 11595-11611.
30. Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2010). Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta*, 232, 449-460.
31. Gómez-Maqueo, A., García-Cayuela, T., Welti-Chanes, J., & Cano, M. P. (2019). Enhancement of anti-inflammatory and antioxidant activities of prickly pear fruits by high hydrostatic pressure: A chemical and microstructural approach. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 54, 132-142.
32. Gómez-Maqueo, A., Steurer, D., Welti-Chanes, J., & Cano, M. P. (2021). Bioaccessibility of antioxidants in prickly pear fruits treated with high hydrostatic pressure: An application for healthier foods. *Molecules*, 26(17), 5252.
33. Goszcz, K., Deakin, S. J., Duthie, G. G., Stewart, D., & Megson, I. L. (2017). Bioavailable concentrations of delphinidin and its metabolite, gallic acid, induce antioxidant protection associated with increased intracellular glutathione in cultured endothelial cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-17.
34. Grajek W. (2007) Wchłanianie przeciwutleniaczy. In *Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty Zdrowotne, Technologiczne, Molekularne i Analityczne*; Grajek, W., Ed.; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warsaw, Poland, pp. 331–379. ISBN 978-83-204-3277-0.
35. GUS 2021: <https://stat.gov.pl>
36. Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12.
37. Janda, K.; Kasprzak, M.; & Wolska, J. (2015) Witamina C–budowa, właściwości, funkcje i występowanie. *Pomeranian Journal of Life Sciences*, 61(4), 419–425
38. Jeszka, M., Flaczyk, E., Kobus-Cisowska, J., & Dziedzic, K. (2010). Związki fenolowe–charakterystyka i znaczenie w technologii żywności. *Nauka Przyroda Technologia*, 4(2), 19.
39. Jiménez-Aguilar, D. M., Escobedo-Avellaneda, Z., Martín-Belloso, O., Gutiérrez-Urbe, J., Valdez-Fragoso, A., García-García, R., Torres, J.A. & Welti-Chanes, J. (2015). Effect of high hydrostatic pressure on the content of phytochemical compounds and antioxidant activity of prickly pears (*Opuntia ficus-indica*) beverages. *Food Engineering Reviews*, 7, 198-208.
40. Kankala, R. K., Zhang, Y. S., Wang, S. B., Lee, C. H., & Chen, A. Z. (2017). Supercritical fluid technology: an emphasis on drug delivery and related biomedical applications. *Advanced Healthcare Materials*, 6(16), 1700433.
41. Kapusta, I., Cebulak, T., & Oszmiański, J. (2018). Characterization of polish wines produced from the interspecific hybrid grapes grown in south-east Poland. *European Food Research and Technology*, 244, 441-455.
42. Khan, M. I., & Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*, 117, 267-295.
43. Klewicka, E. (2012). Betacyjaniny–biodostępność i biologiczna aktywność. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 19(2), 5-21.
44. Lechner, J. F., & Stoner, G. D. (2019). Red beetroot and betalains as cancer chemopreventative agents. *Molecules*, 24(8), 1602.

45. Li, L., Li, S., Hu, C., Zhou, L., Zhang, Y., Wang, M., & Qi, Z. (2019). BKCa channel is a molecular target of vitamin C to protect against ischemic brain stroke. *Molecular Membrane Biology*, 35(1), 9-20.
46. Lila, M. A., Burton-Freeman, B., Grace, M., & Kalt, W. (2016). Unraveling anthocyanin bioavailability for human health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 375-393.
47. Lingua, M. S., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2018). Effect of simulated digestion on the phenolic components of red grapes and their corresponding wines. *Journal of Functional Foods*, 44, 86-94.
48. Liu, L., Zeng, Q., Zhang, R., Wei, Z., Deng, Y., Zhang, Y., Tang, X. & Zhang, M. (2015). Comparative study on phenolic profiles and antioxidant activity of litchi juice treated by high pressure carbon dioxide and thermal processing. *Food Science and Technology Research*, 21(1), 41-49.
49. Liu, M., Liu, Y., Ge, Y., Zhong, Z., Wang, Z., Wu, T., Zhao, X., & Zu, Y. (2020). Solubility, antioxidation, and oral bioavailability improvement of mangiferin microparticles prepared using the supercritical antisolvent method. *Pharmaceutics*, 12(2), 90.
50. Liu, X., Gao, Y., Xu, H., Hao, Q., Liu, G., & Wang, Q. (2010). Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris* L.) extract with continuous high pressure carbon dioxide. *Food Chemistry*, 119(1), 108-113.
51. Lyall, K. A., Hurst, S. M., Cooney, J., Jensen, D., Lo, K., Hurst, R. D., & Stevenson, L. M. (2009). Short-term blackcurrant extract consumption modulates exercise-induced oxidative stress and lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(1), 70-81.
52. Mallery, S. R., Budendorf, D. E., Larsen, M. P., Pei, P., Tong, M., Holpuch, A. S., Larsen, P.E.; Stoner, G.D.; Fields, H.W.; Chan, K.K., Ling Y., & Liu, Z. (2011). Effects of Human Oral Mucosal Tissue, Saliva, and Oral Microflora on Intraoral Metabolism and Bioactivation of Black Raspberry AnthocyaninsCapacity for Enteric Recycling in Human Oral Mucosa. *Cancer Prevention Research*, 4(8), 1209-1221.
53. Marszałek, K., Doesburg, P., Starzonek, S., Szczepańska, J., Woźniak, Ł., Lorenzo, J. M., Skąpska, S.; Rzoska, S., & Barba, F. J. (2019a). Comparative effect of supercritical carbon dioxide and high pressure processing on structural changes and activity loss of oxidoreductive enzymes. *Journal of CO2 Utilization*, 29, 46-56.
54. Marszałek, K., Kruszewski, B., Woźniak, Ł., & Skąpska, S. (2017a). The application of supercritical carbon dioxide for the stabilization of native and commercial polyphenol oxidases and peroxidases in cloudy apple juice (cv. Golden Delicious). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 42-48.
55. Marszałek, K., Krzyżanowska, J., Woźniak, Ł., & Skąpska, S. (2017b). Kinetic modelling of polyphenol oxidase, peroxidase, pectin esterase, polygalacturonase, degradation of the main pigments and polyphenols in beetroot juice during high pressure carbon dioxide treatment. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 412-417.
56. Marszałek, K., Skąpska, S., Woźniak, Ł., & Sokołowska, B. (2015). Application of supercritical carbon dioxide for the preservation of strawberry juice: Microbial and physicochemical quality, enzymatic activity and the degradation kinetics of anthocyanins during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 101-109.
57. Marszałek, K., Szczepańska, J., Starzonek, S., Woźniak, Ł., Trych, U., Skąpska, S., Rzoska, S., Saraiva, J. A., Lorenzo, J. M. & Barba, F. J. (2019b). Enzyme inactivation and evaluation of physicochemical properties, sugar and phenolic profile changes in

- cloudy apple juices after high pressure processing, and subsequent refrigerated storage. *Journal of Food Process Engineering*, 42(4), e13034.
58. Marszałek, K., Woźniak, Ł., Barba, F. J., Skąpska, S., Lorenzo, J. M., Zambon, A., & Spilimbergo, S. (2018). Enzymatic, physicochemical, nutritional and phytochemical profile changes of apple (Golden Delicious L.) juice under supercritical carbon dioxide and long-term cold storage. *Food Chemistry*, 268, 279-286.
 59. Marszałek, K., Woźniak, Ł., Kruszewski, B., & Skąpska, S. (2017c). The effect of high pressure techniques on the stability of anthocyanins in fruit and vegetables. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 277.
 60. Marszałek, K., Woźniak, Ł., & Skąpska, S. (2014). Wysokie ciśnienia w przemyśle owocowo-warzywnym. *Przemysł Fermentacyjny i Ovocowo-Warzywny*, 11(12), 12.
 61. Marszałek, K., Woźniak, Ł., Skąpska, S., & Mitek, M. (2017d). High pressure processing and thermal pasteurization of strawberry purée: quality parameters and shelf life evaluation during cold storage. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 832-841.
 62. Marszałek, K., Woźniak, Ł., Wiktor, A., Szczepańska, J., Skąpska, S., Witrowa-Rajchert, D., Saraiva, J. A., Lorenzo J. M., & Barba, F. J. (2021). Emerging Technologies and Their Mechanism of Action on Fermentation. *Fermentation Processes: Emerging and Conventional Technologies*, 117-144.
 63. McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5896-5904.
 64. Michalska, A., Wojdyło, A., Lech, K., Łysiak, G. P., & Figiel, A. (2017). Effect of different drying techniques on physical properties, total polyphenols and antioxidant capacity of blackcurrant pomace powders. *LWT*, 78, 114-121.
 65. Miguel, M.G. (2018) Betalains in Some Species of the Amaranthaceae Family: A Review. *Antioxidants*, 7, 53.
 66. Milbury, P. E., Cao, G., Prior, R. L., & Blumberg, J. (2002). Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(8), 997-1006.
 67. Minekus, M.; Alving, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., & Brodkorb A. (2014). A Standardised Static in vitro Digestion Method Suitable for Food-an International Consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124
 68. Mueller, D., Jung, K., Winter, M., Rogoll, D., Melcher, R., & Richling, E. (2017). Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *Food Chemistry*, 231, 275-286.
 69. Narwojsz, A., & Borowska, E. J. (2011). Zmiany składników strukturotwórczych owoców porzeczki czarnej podczas maceracji miazgi a uwalnianie polifenoli do soku. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 18(1), 97-98.
 70. Nemzer, B., Pietrkowski, Z., Spórna, A., Stalica, P., Thresher, W., Michałowski, T., & Wybraniec, S. (2011). Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chemistry*, 127(1), 42-53.
 71. Nirmal, N. P., Mereddy, R., & Maqsood, S. (2021). Recent developments in emerging technologies for beetroot pigment extraction and its food applications. *Food Chemistry*, 356, 129611.

72. Niu, L., Hu, X., Wu, J., Liao, X., Chen, F., Zhao, G., & Wang, Z. (2010). Effect of dense phase carbon dioxide process on physicochemical properties and flavor compounds of orange juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 530-548.
73. Nour, V., Trandafir, I., & Ionica, M. E. (2011). Ascorbic acid, anthocyanins, organic acids and mineral content of some black and red currant cultivars. *Fruits*, 66(5), 353-362.
74. Nowak, K., & Żmudzinska-Żurek, B. (2010). Czarna porzeczka-źródło witaminy C. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 54(07-08).
75. Odriozola-Serrano, I., Hernández-Jover, T., & Martín-Belloso, O. (2007). Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry*, 105(3), 1151-1158.
76. Oszmiański, J. (2002). Stabilizacja i zastosowanie barwnika antocyjanowego aronii do barwienia napoi. *Technologia Alimentaria*, 1(1), 37-45.
77. Oulé, K. M., Dickman, M., & Arul, J. (2013). Properties of orange juice with supercritical carbon dioxide treatment. *International Journal of Food Properties*, 16(8), 1693-1710.
78. Paciulli, M., Medina-Meza, I. G., Chiavaro, E., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2016). Impact of thermal and high pressure processing on quality parameters of beetroot (*Beta vulgaris* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 68, 98-104.
79. Pandita, D., Pandita, A., Pamuru, R.R. & Nayik, G.A. (2020) Beetroot. In *Antioxidants in Vegetables and Nuts—Properties and Health Benefits*; Nayik, G.A., Gul, A., Eds.; Springer: Singapore, pp. 45–74, ISBN 978-981-15-7470-2.
80. Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Pérez, M., & Hernández-Pérez, T. (2010). Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life—a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 299-308.
81. Peixoto, F. M., Gouvêa, A. S., de Araújo Santiago, M. P., Martins, Z. D. S. V., Borguini, R. G., & de Oliveira Godoy, R. L. (2018). Characterization and bioaccessibility of anthocyanins from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) after simulated gastrointestinal digestion: A positive effect on malvidin derivatives. *Fruits*, 73(2), 101-109.
82. Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., & García-Viguera, C. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2308-2312.
83. Pietrzkowski, Z., Nemzer, B., Spórna, A., Stalica, P., Tresher, W., Keller, R., Jimenez, R., Michałowski, T., & Wybraniec, S. (2010). Influence of betalain-rich extract on reduction of discomfort associated with osteoarthritis. *New Medicine*, 1, 12-17.
84. Płatosz, N., Bączek, N., Topolska, J., Szawara-Nowak, D., Skipor, J., Milewski, S., & Wiczowski, W. (2021). Chokeberry anthocyanins and their metabolites ability to cross the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Food Chemistry*, 346, 128730.
85. Porto, C. D., Decorti, D., & Tubaro, F. (2010). Effects of continuous dense-phase CO₂ system on antioxidant capacity and volatile compounds of apple juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(9), 1821-1827.
86. del Pozo-Insfran, D., Balaban, M. O., & Talcott, S. T. (2007). Inactivation of polyphenol oxidase in muscadine grape juice by dense phase-CO₂ processing. *Food Research International*, 40(7), 894-899.
87. Prior, R. L. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 570S-578S.
88. Qamar, S., Torres, Y. J., Parekh, H. S., & Falconer, J. R. (2021). Extraction of medicinal cannabinoids through supercritical carbon dioxide technologies: A review. *Journal of Chromatography B*, 1167, 122581.

89. Rahimi, P., Mesbah-Namin, S. A., Ostadrahimi, A., Separham, A., & Jafarabadi, M. A. (2019). Betalain-and betacyanin-rich supplements' impacts on the PBMC SIRT1 and LOX1 genes expression and Sirtuin-1 protein levels in coronary artery disease patients: A pilot crossover clinical trial. *Journal of Functional Foods*, 60, 103401.
90. Ramírez-Rodrigues, M. M., Plaza, M. L., Azeredo, A., Balaban, M. O., & Marshall, M. R. (2012). Phytochemical, sensory attributes and aroma stability of dense phase carbon dioxide processed *Hibiscus sabdariffa* beverage during storage. *Food Chemistry*, 134(3), 1425-1431.
91. Rashid, K., Wachira, F. N., Nyabuga, J. N., Wanyonyi, B., Murilla, G., & Isaac, A. O. (2014). Kenyan purple tea anthocyanins ability to cross the blood brain barrier and reinforce brain antioxidant capacity in mice. *Nutritional Neuroscience*, 17(4), 178-185.
92. Ravichandran, K., Saw, N. M. M. T., Mohdaly, A. A., Gabr, A. M., Kastell, A., Riedel, H., Cai, Z., Knorr, D. & Smetanska, I. (2013). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Research International*, 50(2), 670-675.
93. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
94. Regulska, K. & Litwiniuk, M. M. (2020). Witamina C w terapii przeciwnowotworowej? – przegląd danych klinicznych i przedklinicznych. *Farmacja Polska*, 76(4), 222-236
95. Ribas-Agustí, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. & Elez-Martínez, P. (2018). Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2531-2548.
96. Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, 14, 33-43.
97. Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013). Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1859-1867.
98. Sawicki, T., Topolska, J., Bączek, N., Szawara-Nowak, D., Juśkiewicz, J. & Wiczkowski, W. (2020). Characterization of the profile and concentration of betacyanin in the gastric content, blood and urine of rats after an intragastric administration of fermented red beet juice. *Food Chemistry*, 313, 126169.
99. Sawicki, T., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Wiczkowski, W., Peñas, E., Bączek, N., & Zieliński, H. (2019). The effect of processing and in vitro digestion on the betalain profile and ACE inhibition activity of red beetroot products. *Journal of Functional Foods*, 55, 229-237.
100. Sigurdson, G.T. & Giusti, M.M. (2019) The Stability and Absorption of Anthocyanins in the Mouth. In *Anthocyanins from Natural Sources*; Brooks, M.S., Celli, G.B., Eds.; The Royal Society of Chemistry: London, UK, pp. 186–215.
101. Silva, D. V. T. D., Baiao, D. D. S., Ferreira, V. F., & Paschoalin, V. M. F. (2021). Betanin as a multipath oxidative stress and inflammation modulator: A beetroot pigment with protective effects on cardiovascular disease pathogenesis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(2), 539-554.

102. Singh, A., & Kitts, D. D. (2019). In vitro bioaccessibility of tart cherry anthocyanins in a health supplement mix containing mineral clay. *Journal of Food Science*, 84(3), 475-480.
103. Sokołowska, B., & Nasiłowska, J. (2019) *Controlling Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Beetroot (Beta vulgaris) Juice by High Hydrostatic Pressure*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, ISBN 9780128166796.
104. Sokołowska, B., Woźniak, Ł., Skąpska, S., Porębska, I., Nasiłowska, J., & Rzoska, S. J. (2017). Evaluation of quality changes of beetroot juice after high hydrostatic pressure processing. *High Pressure Research*, 37(2), 214-222.
105. Stübler, A. S., Lesmes, U., Juadjur, A., Heinz, V., Rauh, C., Shpigelman, A., & Aganovic, K. (2020). Impact of pilot-scale processing (thermal, PEF, HPP) on the stability and bioaccessibility of polyphenols and proteins in mixed protein-and polyphenol-rich juice systems. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64, 102426.
106. Szczepańska, J., Skąpska, S., Lorenzo, J. M., & Marszałek, K. (2021). The Influence of static and multi-pulsed pressure processing on the enzymatic and physico-chemical quality, and antioxidant potential of carrot juice during refrigerated storage. *Food and Bioprocess Technology*, 14(1), 52-64.
107. Sharma, R. J., Gupta, R. C., Singh, S., Bansal, A. K., & Singh, I. P. (2016). Stability of anthocyanins-and anthocyanidins-enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* ('jamun'). *Food Chemistry*, 190, 808-817.
108. Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.
109. Tesoriere, L., Fazzari, M., Angileri, F., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2008). In vitro digestion of betalainic foods. Stability and bioaccessibility of betaxanthins and betacyanins and antioxidative potential of food digesta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10487-10492.
110. Torskangerpoll, K., & Andersen, Ø. M. (2005). Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89(3), 427-440.
111. Ubeira-Iglesias, M., Wilches-Pérez, D., Cavia, M. M., Alonso-Torre, S., & Carrillo, C. (2019). High hydrostatic pressure processing of beetroot juice: Effects on nutritional, sensory and microbiological quality. *High Pressure Research*, 39(4), 691-706.
112. Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Pérez-Vicente, A., & García-Viguera, C. (2004). In vitro gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 135-138.
113. Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., & Fogliano, V. (2007). Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *The Journal of Nutrition*, 137(9), 2043-2048.
114. Wang, T., Liu, L., Rakhmanova, A., Wang, X., Shan, Y., Yi, Y., Liu, B., Zhou, Y., & Lü, X. (2020). Stability of bioactive compounds and in vitro gastrointestinal digestion of red beetroot jam: Effect of processing and storage. *Food Bioscience*, 38, 100788.
115. Wojdyło, A., Oszmiański, J., Milczarek, M., & Wietrzyk, J. (2013). Phenolic profile, antioxidant and antiproliferative activity of black and red currants (*Ribes* spp.) from organic and conventional cultivation. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(4), 715-726.
116. Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices

- before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217-224.
117. Wrolstad, R. E., Durst, R. W., & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 423-428.
 118. Wruss, J., Waldenberger, G., Huemer, S., Uygun, P., Lanzerstorfer, P., Müller, U., Höglinger, O., & Weghuber, J. (2015). Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42, 46-55.
 119. Xue, Z., Li, J., Yu, W., Lu, X., & Kou, X. (2016). Effects of nonthermal preservation technologies on antioxidant activity of fruits and vegetables: A review. *Food Science and Technology International*, 22(5), 440-458.
 120. Yan, L., Li, T., Liu, C., & Zheng, L. (2019). Effects of high hydrostatic pressure and superfine grinding treatment on physicochemical/functional properties of pear pomace and chemical composition of its soluble dietary fibre. *LWT*, 107, 171-177.
 121. Yen, G. C., & Chen, H. Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 27-32.
 122. Zhao, W., Sun, Y., Ma, Y., & Zhao, X. (2019). Dense phase carbon dioxide treatment of tomato juice: effect on physico-chemical properties, phenolic composition, lycopene isomerisation and in vitro bioaccessibility. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(5), 1658-1669.

11. Cykl publikacji

Impact of HPP on the bioaccessibility/ bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing

*Urszula Trych^a, Magdalena Buniowska^b, Sylwia Skąpska^a,
Zhenzhou Zhu^c, Jinfeng Bi^d, Xuan Liu^d, Francisco J. Barba^e,
and Krystian Marszałek^a*

^aProf. Waław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Department of Fruit and Vegetable Product Technology, Warsaw, Poland ^bUniversity of Rzeszów, Faculty of Biology and Agriculture, Department of Dairy Technology, Rzeszów, Poland ^cSchool of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, China ^dInstitute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing, China ^ePreventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department, Faculty of Pharmacy, Universitat de València, Valencia, Spain

1 Introduction

To function correctly, the human body needs to ingest food in proper proportions using a wide variety of ingredients. It is essential that nutrients, such as vitamins and minerals, are obtained via food. However, simply ingesting nutrients does not guarantee they will be completely utilized by the human body. Not only do nutrients need to be provided, they must also be absorbed. Therefore it is important that attention is paid to increasing the bioavailability of nutrients (Cilla, Bosch, Barberá, & Alegría, 2018). The term bioavailability is crucial when describing the process of effective nutrition, and in the development of new

food products. Proper nutrition and ensuring the better absorption of nutrients make it possible to prevent noncommunicable diseases such as obesity, cardiovascular diseases, cancer, etc. (Cilla, González-Sarrías, Tomás-Barberán, Espín, & Barberá, 2009; Fernández-García, Carvajal-Lérída, & Pérez-Gálvez, 2009).

The term bioavailability has many definitions, depending on the perspective, and may vary according to the field of science it concerns. From the physiological point of view, it is the fraction of a drug or other substance which enters the circulatory system after being introduced into the body and can, therefore, have an active effect (Srinivasan, 2001). The bioavailability of nutrient and bioactive compounds can, therefore, be defined as the fraction of an administered substance capable of being absorbed and available for use in physiological functions or storage (Barba, Koubaa, et al., 2017; Carbonell-Capella, Buniowska, Barba, Esteve, & Frígola, 2014). For clarification, it should be noted that the term bioavailability comprises two other concepts: bioaccessibility and bioactivity. It is important to differentiate between them because they refer to very similar functions and are often incorrectly used interchangeably (Fig. 1). The term bioavailability describes availability for absorption, metabolism, tissue distribution, and bioactivity. The idea of bioavailability draws upon the definition of bioactivity. Since biological activity is excluded from the definition of bioavailability, it is possible to find a term closer to the concept of bioaccessibility (Fernández-García et al., 2009; Galanakis, 2017).

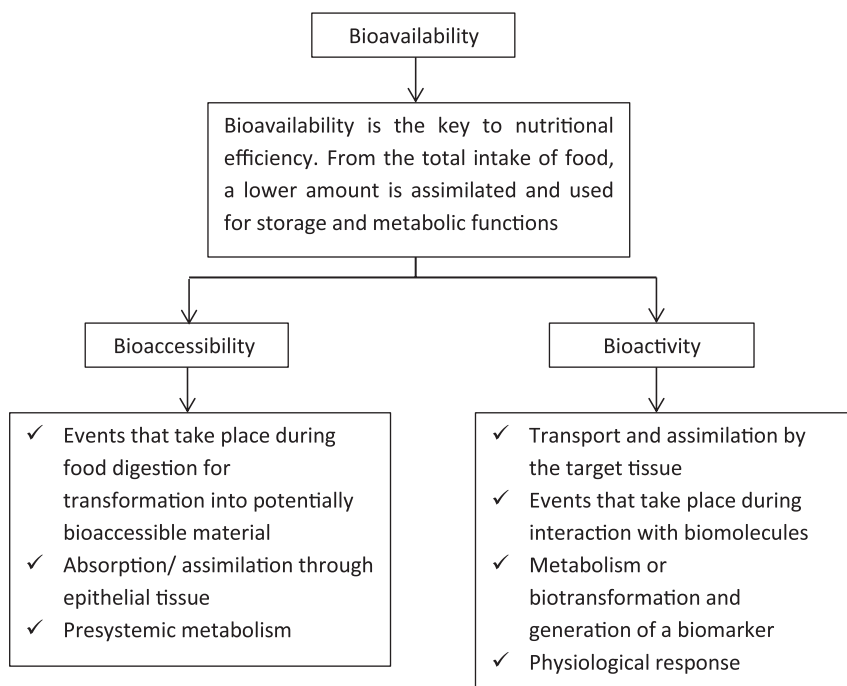


FIG. 1 Relations between concepts of bioavailability, bioaccessibility, and bioactivity. Physicochemical events involved at each stage (Fernández-García et al., 2009).

Prior to discussing the health benefits of nutrients on the human body, it is important to analyze whether and how the digestive process affects nutrients released from the matrix which is why the term bioaccessibility is important for many researchers undertaking various modifications to this concept. One definition states that bioaccessibility is the quantity of a compound that is released from its matrix in the gastrointestinal tract and therefore becomes available for absorption (Paustenbach, 2000). Unfortunately, the definitions based on absorption fail to present the beneficial effects of nutrients that cannot be absorbed (e.g., calcium binding of bile salts in the tract) (Carbonell-Capella et al., 2014). The other definition, which includes releasing and the possibility of absorption, also involves transportation through the intestinal epithelial cells reaching the circulatory system and hepatic metabolism (Cardoso, Afonso, Lourenço, Costa, & Nunes, 2015; Cilla et al., 2018; Fernández-García et al., 2009). It should be emphasized that the quantity of bioavailable substance may be less than the amount released from the food matrix due to the inability to convert into an available form, transformation of the substance into an unabsorbed form or interactions with nonabsorbed ingredients (Afonso et al., 2018; Stahl et al., 2002).

The concept of bioactivity relates to ideas representing: the transportation of nutrients to target tissues, biotransformation to active forms, generation of the biomarkers, substance interaction with biomolecules, the impact they exert on metabolism and the resulting physiological reactions (e.g., antioxidant, antiinflammatory properties) (Barba, Saraiva, Cravotto, & Lorenzo, 2019; Fernández-García et al., 2009). Bioactivity does not always relate to the possibility of the component's absorption. For instance, it also concerns the nondigestible polysaccharides, oligosaccharides, and dietary fiber which, despite being nonabsorbent, bring several health benefits. Data on bioactivity is necessary to confirm such health benefits (healthy properties or reduced risk of disease). A study of bioaccessibility, excluding bioactivity, is sufficient to support claims regarding the nutritional content of food and comparing it to other food products (Barba et al., 2019).

2 Methods for determining bioaccessibility

At this stage of development, there is no defined model for studying bioaccessibility and bioavailability. For instance, a number of methodologies are used to evaluate the bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and comparing the different techniques is complex as the conditions between them vary, therefore making it necessary to use *in vivo* studies to obtain appropriate results (Carbonell-Capella et al., 2014). Several methods are used for testing the bioavailability of nutrients, nevertheless *in vitro* and *in vivo* tests can be considered the two main methodological categories.

Recently, the standardized INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion protocol, based on an international consensus developed by the COST INFOGEST network, seems to be an interesting attempt to homogenize the different *in vitro* tests to determine the bioaccessibility of nutrients and bioactive compounds (for more information see Brodkorb et al., 2019).

The methods used for measuring bioactivity (regardless of the type) are based on events occurring at the point when the bioactive component interacts with biomolecules. This interaction creates a metabolite, signal, or response that will change and intensify until a systemic

physiological response is obtained, therefore providing a health benefit (Barba et al., 2019). Fundamental bioavailability research is based on in vivo studies conducted on humans or animals. Research on people is mainly based on analyses of blood and urine samples from healthy volunteers at a predetermined time after serving them a known amount of food or drink, rich in specific nutrients (Braga, Murador, de Souza Mesquita, & de Rosso, 2018; Moreda-Pineiro et al., 2011). For many of the factors affecting the digestive process and bioavailability of ingredients (especially hormonal and nervous control, feedback mechanisms, mucosal cell activity, the complexity of peristaltic movements, and influence of the immune system), in vivo experiments are the most reliable and correspond to the real conditions prevailing in the human organism. However, the in vivo technique is time-consuming. It requires meticulous planning and specific resources for adequate experimental control. This technique also has some analytical and ethical restrictions (Cardoso et al., 2015). In vivo methods represent a standard approach to determining the bioaccessibility of food nutrients or bioactive compounds, and are used for the validation of in vitro models. The multistage and complex digestive and absorption process mean that a detailed picture is not obtained through bioassay studies (Fernández-García et al., 2009).

Due to their considerable diversity, the in vitro methods provide a wider experimental field, which may be useful to obtain a broader understanding of bioaccessibility (Cardoso et al., 2015). Procedures based on in vitro gastrointestinal digestion imitate the physiological conditions in the digestive tract (Buniowska, Carbonell-Capella, Frigola, & Esteve, 2017; Cilla et al., 2011). This method comprises two or three sequential phases: oral (depending on the needs), gastric, and small intestinal, performed for a set period, pH, and temperature conditions. Briefly, the first step involves incubating the homogenized sample with the amylase solution at pH 6.5–6.9. Yet, it is often overlooked in the studies. The process is carried out in the gastric phase at about pH 2, with the addition of HCl and pepsin. Afterwards, there is intestinal digestion at about pH 7, involving pancreatic enzymes and bile salts. The soluble component in the digested samples is collected using methods such as centrifugation or dialysis across a semipermeable membrane to receive the bioaccessible fraction (Buniowska et al., 2017; Cilla et al., 2018; Carbonell-Capella et al., 2014; He et al., 2016; Rodríguez-Roque, Rojas-Graü, Elez-Martínez, & Martín-Belloso, 2013). Sometimes, digestion simulations involving colon microbiota are also conducted. It is known that active ingredients such as polyphenols can be digested with the participation of microorganisms and they also have a mutual influence on each other (Ozdal et al., 2016; Podsędek, Redzyna, Klewicka, & Koziołkiewicz, 2014). Bioaccessibility can be established using Eq. (1) and expressed as a percentage.

Equation 1 Calculation of bioaccessibility (Rodríguez-Roque et al., 2015).

$$\text{Bioaccessibility}(\%) = 100 \times \frac{BC_{\text{digested}}}{BC_{\text{nondigested}}}$$

In the equation, BC_{digested} expresses the concentration of the bioactive compound in the digested sample and $BC_{\text{nondigested}}$ means the concentration of the bioactive compound in the nondigested sample (Rodríguez-Roque et al., 2015).

The process of digestion in the gastrointestinal tract can be carried out in a special periodic system, comprising two successive compartments that adequately imitate the stomach and small intestine. It is formed of two glass units lined with a flexible silicone wall cover. The units are controlled via a computer connected to the operator panel and a programmable logic controller (Fernández-Jalao, Sánchez-Moreno, & De Ancos, 2017). Simulated gastrointestinal digestion can be performed with static or dynamic models. The static model, as opposed to dynamic, does not accurately simulate the parameters of physiological digestion because it runs under constant conditions. This excludes intestinal peristalsis and physical processes such as shearing, mixing, and hydration. The dynamic models allow more accurate simulation of the real state represented by the *in vivo* model through the use of gradual changes in the pH level and enzymes, and the removal of dialyzed components (Alegria, Garcia-Llatas, & Cilla, 2015).

Cell cultures are used to improve the method of determining the bioaccessibility of compounds released from the food matrix in the digestion process. The most popular and the most adequate to assess the bioavailability of ingredients administered by the oral route is the Caco-2 model. This is a monolayer of a human colon carcinoma cell line (Braga et al., 2018; Machhar et al., 2013). One of the most helpful features of these cells is their ability to spontaneously differentiate. They form a monolayer of well-polarized cells and exhibit many of the functional and morphological properties of mature human enterocytes. Their nucleus is located in the basal part; they have numerous mitochondria and a brush border in the top part. Caco-2 cells can produce enzymes, *inter alia* aminopeptidase, esterase and sulfatase. They also contain transport proteins responsible for the transportation of sugars, amino acids, peptides, vitamins, and they produce P-glycoproteins, which are known as drug resistance proteins (Machhar et al., 2013). The Caco-2 cell model allows the simulation of the intestinal epithelial barrier and is useful in measuring the interaction, uptake and cellular transportation of the food ingredients, drugs, and toxins (Alegria et al., 2015; Lee, Kim, Park, Holzapfel, & Lee, 2018).

3 Impact of high-pressure processing on bioaccessibility

There are many factors influencing the bioavailability of bioactive compounds derived from food products. Those resulting from individual variations of gastrointestinal physiology lack significance with *in vitro* methods (Maisanaba et al., 2018). Those, however, that are very important, include the physicochemical properties of food matrices, the structure of the bioactive compound, and the methods of technological treatment. Studies conducted so far have confirmed that the impact of processing on the bioaccessibility and bioavailability of nutrients correlates with the type of nutrient, structure, and composition of the food matrix, as well as the processing technique applied (Cilla et al., 2012).

Alternatives to the thermal treatment of food products are being sought more and more. Therefore, techniques based on the impact of high-pressure processing has triggered the interest of scientists and food technologists. High-pressure processing is considered to be an innovative food processing technology that is beneficial because of the low use of heat and preservatives. The process ensures the microbiological safety of food products and extends shelf life by inactivating many pathogenic and spoiling microorganisms

(Barba, Mariutti, et al., 2017; Andrés, Villanueva, & Tenorio, 2016; Varela-Santos et al., 2012). It maintains sensory properties and nutritional values (Barba, Esteve, & Frígola, 2012; Marszałek, Szczepańska, Woźniak, et al., 2019; Westphal, Schwarzenbolz, & Böhm, 2018).

High-pressure techniques include high-pressure processing (HPP) also known as high hydrostatic pressure (HHP), high-pressure homogenization (HPH), and supercritical carbon dioxide/high-pressure carbon dioxide (SCCD/HPCD) (Marszałek, Woźniak, Kruszewski, & Skąpska, 2017). Depending on the pressurization technique used, different types of mechanisms influence bioaccessibility. A pressure of 200 MPa, which affects the entire product in the HHP process, damages the walls of the plant cell thus causing an increase in the bioaccessibility of biologically active ingredients by releasing them from the plant matrix (Barba, Terefe, Buckow, Knorr, & Orlien, 2015). Under the high-pressure homogenization process, shear forces, cavitation, and turbulent movements also act on the product, as a result of forcing it through the homogenizer valve (Marszałek et al., 2017). The SCCD mechanism is based on inactivation of the microorganisms and enzymes by lowering the pH of the cytoplasm, disturbance of the electrolytic balance of cells, and the leaching of constituents through cell membranes. This process is combined with high-pressure action of up to 60 MPa (Marszałek et al., 2017). Unfortunately, there is a lack of research on the impact of SCCD on the bioaccessibility of nutrients. The only research available so far indicates that treatment under this method at 20 MPa for 20, 40, and 60 min has contributed to a significant increase in the bioaccessibility of lycopene compared to the control and heat treatment (Zhao, Sun, Ma, & Zhao, 2018).

The use of high-pressure technology can improve the bioaccessibility of nutrients. However, in view of the multiplicity of factors affecting that process and their mutual correlations, it is difficult to unambiguously state which processing conditions are the most ideal in terms of retention and stability of the nutrients (Fernández-García et al., 2009). High pressure may have an impact on the bioaccessibility of nutrients mainly through its effect on the food structure and through the activity of endogenous enzymes released from divided cells (Barba et al., 2015; Putnik et al., 2017; Wang, Riedl, Somerville, Balasubramaniam, & Schwartz, 2011). Cell breakdown using high-pressure treatment increases the extractability of compounds located inside the cell structures (Herranz et al., 2018). Changes in the structure of compounds may also occur during this process. Phenols may undergo, among other things, hydroxylation, methylation, glycosylation and also form phenolic derivatives because of partial degradation and loss of sugar moieties (Dugo et al., 2005).

3.1 Influence of the composition and structure of the food matrix

The structure of the food matrix has a significant impact on the bioavailability of nutrients. The size of particles, their distribution among the tissues, and content of fibers, fats or phytosterols with binding properties, all determine the bioaccessibility of bioactive components trapped in the structure of the food's matrix. Other important factors are interactions that occur between compounds in the food matrix (Carbonell-Capella et al., 2014; Cilla et al., 2012). The various studies provide conflicting results which show the difficulties in determining the effect of the matrix and type of compound on bioavailability. They reflect the complexity of the interaction between the compounds in the matrix and between the matrix and

the processes applied (Barba et al., 2015; Van Buggenhout et al., 2010). The viscosity of food matrices is also a factor that can be linked with changes in the bioaccessibility of bioactive compounds in the gastrointestinal tract (Herranz et al., 2018). The bioaccessibility is inversely correlated with the value of Bostwick's consistency index and viscosity, which increase as a result of high-pressure homogenization (Panozzo et al., 2013).

Bioactive components (e.g., phenolic compounds, carotenoids, glucosinolates, and vitamin C, among other things), are present in significant amounts in fruit and vegetable products. Consuming at least five portions of vegetable and fruit a day is recommended. Due to their high nutritional values, and delicate structure and sensitivity to temperature, fruit and vegetable products are often the basis for applying high-pressure techniques (Barba, Mariutti, et al., 2017). Plant products are also a rich source of fiber, which is an important pro-healthy compound but can, on the other hand, hinder the availability of some other nutritious ingredients (Colle, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx, 2010).

There are researches in which scientists have used the milk matrix to study the bioavailability and bioaccessibility of different compounds (Cilla et al., 2012, 2011; He et al., 2016; Rodríguez-Roque et al., 2015, 2016). Milk is a complex mixture and is susceptible to the influence of heat and pressure treatment. The micelles in milk are dynamic in nature and therefore subject to dissociation. Therefore, the level of the pressure applied, the temperature, and time of the process should be properly selected. Experimental data indicate that following pressure treatment at 350 MPa, the level of calcium-binding casein increased in the soluble milk phase while applying the pressure of 450 MPa reduced the levels of soluble calcium and phosphorus. Serum proteins have been notably denatured by pressures above 250 MPa (Cadesky, Walkling-Ribeiro, Kriner, Karwe, & Moraru, 2017; Orlien, Boserup, & Olsen, 2010). High pressure stimulates changes in the rennet coagulation process by inducing protein binding in micellar form. Pressure parameters not exceeding 250 MPa shortened the rennet coagulation time, the pressure of 400 MPa had little effect, and at 600 MPa the clotting time increased. Temperature also played an important role in this process (lower temperature increases the speed of rennet coagulation) in combination with high pressure. This phenomenon may also affect the bioaccessibility of nutrients derived from milk-based products (Zobrist, Huppertz, Uniacke, Fox, & Kelly, 2005).

The presence of fat in the food matrix also has a significant positive impact on the bioavailability and bioaccessibility of nutrients, and also facilitates the uptake of toxins and food contaminants. Research on pesticide residues in cherry tomatoes and their assimilation in the gastrointestinal tract in an *in vitro* model showed that the addition of oil notably influenced their bioaccessibility at the gastrointestinal stage (Liu et al., 2018). However, the digestive process itself plays a fundamental role in reducing the bioavailability of toxins through metabolic processes that cause the modification or degradation of food contaminants. Thermal processing of vegetables and fruits before consumption also reduces the content of harmful substances such as cylindrospermopsins (Maisanaba et al., 2018). The oil matrix may undergo crystallization because of high pressure, which limits nutritional availability (Gupta, Kopec, Schwartz, & Balasubramaniam, 2011; Knockaert, Lemmens, Van Buggenhout, Hendrickx, & Van Loey, 2012). On the other hand, high pressure promotes the formation of emulsions and the dissolution of carotenoids in the lipid fraction (Svelander, Lopez-Sanchez, Pudney, Schumm, & Alminger, 2011).

3.2 Influence on the nutrients and bioactive compounds

The bioavailability and bioaccessibility of nutrients and bioactive compounds are determined by the characteristics of a given constituent, such as the chemical structure and manner of metabolization. The diversity of test results reflects on the importance of the hydrophilic or lipophilic nature of the compound and correlations between the component and matrices in which it is located (Van Buggenhout et al., 2010).

3.2.1 Lipophilic compounds

In the context of the impact of high pressure on bioavailability, carotenoids are the most frequently studied lipophilic compounds (Table 1). Because of their hydrophobic structure, these compounds dissolve poorly in the aqueous conditions of the digestive tract. Additionally, carotenoids are located in the chromoplasts of cells. Their location within the chromoplast sub-structure and cell wall are the two principle natural structural barriers regulating the release of carotenoids in the digestive process. Therefore, it is important to work towards improving the bioavailability of lipophilic compounds beneficial to health through novel processing techniques (Palmero, Lemmens, Hendrickx, & Van Loey, 2014; Rodríguez-Roque et al., 2016).

A few studies show the results of the changes in the stability of tocopherols and bioaccessibility in the food product after processing. The availability of tocopherols depends strictly on the isomer that is being analyzed. The fruit juice-milk beverage study showed the content of α -, γ -, and δ -tocopherol at various levels depending on the type of milk used (full, skimmed, and soy). The dairy matrix in combination with high hydrostatic pressure (HHP) resulted in greater improvement in the bioaccessibility of tocopherols and carotenoids than thermal treatment (TT) (Cilla et al., 2012). The use of HHP to preserve spinach puree led to a significant increase in the bioaccessibility of carotenoids, chlorophylls, and vitamin E. However, it did not affect the total carotenoids content in the wild rose puree. HHP increased the extractivity of carotenoids, which probably contributed to improving their bioaccessibility (Westphal et al., 2018).

Pressure processing of carrots, broccoli, and green beans at 400 and 600 MPa did not affect the content of α - and β -carotene, therefore it did not change the bioaccessibility of these ingredients. However, a marked increase was noted in the *in vitro* availability of lutein in green beans after HHP preservation at 600 MPa. The disruption of cellular structures in seeds, under the influence of high pressures, could facilitate the release of lutein from plant tissues during the *in vitro* digestion process. However, from a nutritional point of view, the effect of HHP on the bioaccessibility of lutein would be considered minimal (McInerney et al., 2007). In studies of heat treatment, high pressure and techniques combining heat and pressure used on raw and preheated tomato juice, the bioaccessibility of β -carotene improved irrespective of the technique selected. Prewarmed juice showed more favorable results in terms of the bioaccessibility of β -carotene than raw juice. Lycopene bioaccessibility did not improve after any treatment, despite the 12% increase in extractability. In the pressure-treated samples, lycopene crystals were greater and more visible (Gupta et al., 2011). The effects of HHP, high-intensity pulsed electric fields (HIPEF) and heat treatment on the bioaccessibility of carotenoids in fruit juices with the addition of water, bovine milk, or soy milk were compared. The bioaccessibility decreased with each type of treatment, however, it was definitely lower in thermally stabilized beverages, where the loss of the bioaccessibility of compounds reached 63%. The exception

TABLE 1 High-pressure effect on bioaccessibility of lipophilic compounds.

Processing method	Parameters	Bioactive compound	Food matrix	Effect on bioaccessibility/bioavailability				References
				No effect	Higher than control	Higher than TT	Lower than control	
HHP	400 MPa, 40°C, 5 min	α-Tocopherol	Juice-milk beverages			x		Cilla et al., 2012
		γ-Tocopherol				x		
		δ-Tocopherol						
HHP	200, 400, 600 MPa; 5, 10 min; room temp.	carotenoids	Spinach puree			x		Westphal et al., 2018
		Carotenoids, chlorophylls and vitamin E			x			
HHP	400 MPa	Carotenoids	Wild rose puree	x				McInerney, Seccafien, Stewart, & Bird, 2007
		α- and β-Carotene	Carrots, broccoli and green beans	x				
HHP	600 MPa	Lutein	Green beans		x			Gupta et al., 2011
		β-Carotene	Broccoli				x	
		β-Carotene	Tomato juice		x			
HHP HHP+TT	700 MPa, 30°C, 5 min 700 MPa, 100°C, 5 min	Lycopene		x				
HHP	400 MPa at 40°C for 5 min	Carotenoids	Juice-milk beverages			x		Rodríguez-Roque et al., 2016
		cis-violaxanthin + neoxanthin			x			
HPH	10 MPa, 1 cycle	α- and β-carotene	Carrot emulsions		x			Svelander et al., 2011
	10 MPa, 10 cycles 100 MPa, 1 cycle	Lycopene	Tomato emulsions	x				
HPH + TT	8.4-132.7 MPa, 14-34°C (> 47.9 MPa)	Lycopene	Tomato pulp				x	Colle et al., 2010
HPH	10 MPa, 37°C	Lycopene	Tomato pulp	x				Colle et al., 2013
HPH+MV	10 MPa, 37°C + 20 min 90°C				x			

Continued

TABLE 1 High-pressure effect on bioaccessibility of lipophilic compounds—cont'd

Processing method	Parameters	Bioactive compound	Food matrix	Effect on bioaccessibility/bioavailability				References
				No effect	Higher than control	Higher than TT	Lower than control	
HPH	10 MPa, 4°C	Lycopene	Tomato pulp + oil		x			Knockaert, Lemmens, et al., 2012
HHP + TT mild	15 min, 450 MPa, 20°C			x				
HHP + TT strong	20 min, 600 MPa, 45°C			x				
HHP + TT sterilization	600 MPa, 117°C						x	
HPH	> 50 MPa	β -Carotene	Carrot puree +/- oil		x			Knockaert, Pulissery, et al., 2012
HPH + TT	+ 90°C, 10 min				x			
HPH + TT/HHP	+ 600 MPa, 45°C, 20 min			x				
HHP + TT mild	500 MPa, 25°C, 16 min	β -Carotene	Carrot slices		x			Knockaert et al., 2011
HHP + TT strong	600 MPa, 45°C, 20 min						x	
HHP + TT sterilization	600 MPa, 117°C, 9.6 min						x	
HPH	single pass 20, 50, 100 MPa	Lycopene, β -carotene, and lutein	Tomato pulp				x	Panozzo et al., 2013
HPH	100 MPa	Lycopene and β -carotene	Tomato chromoplasts- model		x			Palmero et al., 2016
		β -Carotene	Tomato cells- model		x			
		Lycopene and β -carotene	Tomato insoluble phases-model				x	
SCCD	10, 20 MPa, 10, 20, 40, 60 min, 55°C;	Lycopene	Tomato juice		x			Zhao et al., 2018
	30 MPa, 20 min							
	30 MPa, 10, 40, 60 min, 55°C						x	

HHP, high-pressure processing; HPH, high-pressure homogenization; MV, microwave heating; SCCD, supercritical carbon dioxide; TT, thermal treatment.

was *cis*-violaxanthin + neoxanthin, in which the bioaccessibility increased by 79% in samples treated with HIPEF and HPP (Rodríguez-Roque et al., 2016). Other studies confirmed the positive effects of HHP and HIPEF techniques on the stability of bioactive compounds such as vitamin C, carotenoids, and flavanones compared to pasteurization (Morales-de la Peña, Welti-Chanes, & Martín-Belloso, 2016; Sánchez-Moreno et al., 2005).

The impact of high-pressure homogenization (HPH) on the microstructure was studied together with changes in the bioaccessibility of carotenoids. Experiments were performed under various conditions in tomato and carrot emulsions (5% olive oil). Homogenized samples with further thermal pasteurization were compared to samples subjected only to thermal pasteurization in order to investigate the possibility of the additional tearing of the food matrix and increasing the bioaccessibility of carotenoids in the preprocessed material. HPH notably increased their discharge from the matrix and the incorporation of α - and β -carotene into the droplets of the carrot emulsion but did not affect the bioaccessibility of lycopene from tomato under the conditions investigated. Although HPH can damage cellular structures, active compounds (such as lycopene) may stay trapped in the cells, limiting their bioaccessibility. The absorption of carotenes by Caco-2 cells depended on *cis-trans* isomerization and the concentration of the compounds in the digestive solution (Svelander et al., 2011).

In other studies, the pressure values of HPH were increased for tomato pulp to investigate the effect of pressure on structural changes to the matrix and the bioaccessibility of lycopene. Heat treatment was applied after the use of HPH to check whether it would further increase bioaccessibility. HPH could breakdown cell clusters in tomato pulp. Pressure above 47.9 MPa enabled the total destruction of the cells and the systematic distribution of cell material inside the samples. The analysis of particle size distribution also confirmed this relationship. It showed a higher proportion of small particles thus improving the homogeneity of tomato pulp at a higher pressure. Although HPH supported by heat treatment did not cause loss of lycopene in tomatoes, it still decreased the bioaccessibility of this compound. According to this study, higher pressure in HPH may reinforce the fiber structure, presented by an analysis of the percentage of sludge. This led to an increase in product viscosity. So the lycopene remaining in the fiber structure of the tomato pulp became less susceptible to digestive enzymes and bile salts and was less bioaccessible. Nor did thermal treatment (30 min, 90°C), which causes greater disturbance of the cellular structure after HPH, improve the availability of lycopene in tomato pulp (Colle et al., 2010). In a later study conducted by this author, microwave heating at 90°C for 20 min, used after HPH, improved the bioaccessibility of lycopene. Predamaged cellular barriers could be broken by heat treatment, improving the release of lycopene during digestion. Microwave heating at a higher temperature (120°C) significantly increased the bioaccessibility of lycopene. HPH preceding this thermal treatment had no other effect on the biological availability of this compound (Colle et al., 2013).

Tomato puree, with and without 5% of added oil that was not homogenized under high pressure, showed the lowest bioaccessibility of lycopene compared to the treated samples. The pasteurization processes, both thermal and high pressure, mild and intense, did not have a negative effect on lycopene bioaccessibility. However, a decrease in bioaccessibility was observed in the samples which after HPH were further subjected to thermal sterilization and equivalent high-pressure processing. Subsequent high-temperatures, and equivalent high-pressure processes, induced lycopene degradation by oxidation the compound previously transferred via HPH to the oil phase (Knockaert, Lemmens, et al., 2012).

The same author observed the damaging effects of HPH on cells at pressure values above 50 MPa, which increased the bioaccessibility of β -carotene trapped in chromoplasts. Further use of thermal pasteurization increased the bioaccessibility of β -carotene in the carrot puree with 5% oil added. This was due to the softening of the cell walls and the increased solubility of β -carotene in the oil at an elevated temperature. In contrast, high-pressure pasteurization caused a reduction in bioaccessibility. According to the authors, high pressure could strengthen the cell walls and induce the oxidation of β -carotene. Furthermore, the factor that could have a negative impact on the bioaccessibility of carotenoids is the crystallization of the oil under some HPH conditions (Knockaert, Pulissery, et al., 2012). In other studies, conducted by this author, the use of HHP paired with the pasteurization of carrot slices enabled lowering the temperature in this process. Also, the aim was to achieve higher availability of β -carotene compared with raw and pasteurized samples without the use of pressure (Knockaert et al., 2011). In studies on tomato pulp, it was found that the higher the Bostwick consistency measurement and viscosity of the matrix, the lower the bioaccessibility of carotenoids (lycopene, β -carotene, and lutein) in vitro. The viscosity of the products increased under the influence of HPH because of matrix damage and the formation of fiber networks. The carotenoid type and its location within the matrix affected this relationship (Panozzo et al., 2013). Model systems were also used to investigate the effect of HPH on the bioaccessibility of carotenoids in tomato-based products. The systems varied in the occurrence of natural structural barriers (chromoplast substructure and cell walls or only chromoplast substructure) and in the presence of a soluble and insoluble phase isolated from tomatoes. The network of insoluble fibers built during the process could reduce the contact surface between the oil and digestive enzymes thus leading to a decrease in the in vitro availability of carotenoids. HPH caused the breakdown of the chromoplast structure and cell clusters, resulting in a slight increase in the bioaccessibility of lycopene and β -carotene in the system using only chromoplasts. HPH has a more significant impact on the bioaccessibility of β -carotene in model systems containing cell walls fraction (Palmero et al., 2016). Research on the influence of thermal treatment on model systems isolated from tomatoes, orange, red, and atomic red carrots showed no change, or a decrease in the bioavailability of carotenoids, depending on the compound (Palmero et al., 2014).

The only study found so far on SCCD's impact on bioaccessibility concerns lycopene in tomato juice. The processing parameters applied were 10, 20, and 30 MPa at 10, 20, 40, 60 min, and 55°C. The study showed that the technique implemented improved the bioavailability of lycopene at 10 and 20 MPa, and the most after 40 and 60 min. Compared to the control sample a decrease was recorded only at 30 MPa (10, 40, and 60 min). The positive effect of SCCD can be attributed to the isomerization of the lycopene to *cis*-form, which has higher bioaccessibility in the gastrointestinal tract. In turn, the negative effect of higher pressure and time elongation may result from the precipitation of proteins and the creation of barriers that reduce the availability of lycopene (Zhao et al., 2018).

3.2.2 Hydrophilic compounds

The studies available on the effect of high pressures on hydrophilic components bioaccessibility are presented in Table 2. Antioxidants with a hydrophilic structure are mainly compounds from polyphenols and vitamins (Santhakumar, Battino, & Alvarez-Suarez, 2018). The beneficial effects of antioxidants on health depends on their bioaccessibility. Ingredients that are easily soluble in water should be accessible in the gastrointestinal environment.

TABLE 2 High-pressure effect on bioaccessibility of hydrophilic compounds.

Processing method	Parameters	Bioactive compound	Food matrix	Effect on bioaccessibility/ bioavailability				References
				No effect	Higher than control	Higher than TT	Lower than control	
HHP	200 MPa, 5 min	Folate	Cauliflower, leek, string bean		x			Melse-Boonstra et al., 2002
HHP	300, 450, and 600 MPa, 30°C, 5 min	Folate	Cauliflower, baby carrots, carrot greens		x			Wang et al., 2011
HHP	400 MPa, 25°C, 5 min	Flavonols	Onion powder	x				Fernández-Jalao et al., 2017
		Specific flavonols ex. Quercetin diglucoside			x			
HHP	400 MPa, 25°C, 5 min	Flavonols	Onion powder, apple powder, quercetin supplement	x				Herranz et al., 2018
		Phenols			x			
HPH	250 MPa	Phenols	Juice-milk beverages				x	He et al., 2016
HHP	400 MPa, 40°C, 5 min	Vitamin C	Juice-milk beverages				x	Rodríguez-Roque et al., 2015
		Specific phenolic					x	
HHP	400 MPa, 40°C, 5 min	Vitamin C	Juice-milk beverages				x	Cilla et al., 2012
HHP	400 MPa, 40°C, 1 min	Vitamin C	Orange juice		x			Sánchez-Moreno et al., 2003
HHP	400 MPa, 40°C, 1 min	Vitamin C	Vegetable soup "gazpacho"		x			Sánchez-Moreno et al., 2004

HHP, high-pressure processing; HPH, high-pressure homogenization; TT, thermal treatment.

However, they are often characterized by a tendency to transform into other forms, and to degradation, such as anthocyanins. Nevertheless, their antioxidant properties are preserved and maximized, therefore they have a positive effect on the human body (Singh & Kitts, 2019). One of the main factors affecting the bioavailability of phytochemical components is their molecular weight and chemical structure. Hydrophilic phenolic aglycones can be transported through the intestinal epithelium by diffusion. Most of the polyphenols are present in glycosidic form, which affects their transportation from the intestine. In order to be absorbed, active transportation based on a hydrogen ions gradient or PepT1 transporter is needed (Karaś, Jakubczyk, Szymanowska, Ziotek, & Zielińska, 2017).

It is necessary to apply a moderately elevated temperature to efficiently inactivate enzymes during the high-pressure process. High hydrostatic pressure results in the greater stability of anthocyanin compared to traditional thermal treatment. The mechanisms of anthocyanin degradation are described by first-order reaction kinetics. The calculated activation energy has much lower values in HHP processes than in thermal pasteurization (Marszałek et al., 2017). The increase in temperature caused by mechanical stress in the high-pressure homogenization process can have a negative impact on the stability of anthocyanins. However, research has proven that it is an anthocyanin-safe technique if the cooling system is used to control the process temperature (Frank, Köhler, & Schuchmann, 2012; Karacam, Sahin, & Oztop, 2015). Studies on the impact of high hydrostatic pressure on the stability of antioxidants in cloudy apple juice showed no statistically significant effect on the changes to vitamin C, although, a decrease was observed in the content of gallic acid, flavonols, and dichydrochalkons (Marszałek, Szczepańska, Starzonek, et al., 2019).

The structure of bioactive compounds is very important in assessing bioavailability. Some studies on the transport of anthocyanins by the Caco-2 small intestine epithelial cell model have revealed a difference in the penetration of different types of anthocyanins. Glucose-based anthocyanins, such as cyanidin glucoside or peonidin glucoside, showed greater bioaccessibility than their galactose-based counterparts. Besides sugar residues, the nature of the aglycone part is also important for bioaccessibility (Faria et al., 2009). Anthocyanins are susceptible to gastrointestinal microbiota, which can hydrolyze anthocyanin glycosides into those accessible to specific enzymes (Braga et al., 2018).

In most cases, folic acid occurs in a form associated with the polyglutamate chain and with regard to absorption needs to undergo enzymatic digestion to monoglutamate. Melse-Boonstra et al. (2002) analyzed whether the processing of vegetables rich in folic acids, such as cauliflower, leek, string beans, supports the breakdown of polyglutamate into an easily digestible form of monoglutamate. After applying techniques such as freezing, thawing, and high hydrostatic pressure (200 MPa, 5 min), despite the loss of folic acid at a level of > 55%, the proportion of monoglutamate in the vegetables examined doubled or tripled which leads to the conclusion that processing treatments, such as HHP, may increase the bioaccessibility of folates. However, it is necessary to refine the technology to prevent the loss of these compounds in processed water (Melse-Boonstra et al., 2002). The increased bioaccessibility of folates may derive from the impact of high pressure on the structure of plant tissue as well as from the effect on the activity of endogenous enzymes. After cell deterioration, enzymes from the hydrolase group such as γ -glutamyl hydrolase are released and can hydrolyze complex folate molecules into short-chain or monoglutamyl folate. However, it should be emphasized that thermal treatment (e.g., blanching of vegetables) causes the inactivation of these

enzymes (Wang et al., 2011). Onion powder samples subjected to the pressure of 400 MPa at 25°C for 5 min were characterized by a higher overall content of flavonols after digestion than the control samples, however, unfortunately, this process did not translate into an improvement in bioaccessibility. The type of matrix certainly had a great effect, flavonols derived from onions were more accessible than those released during digestion from the dietary supplement quercetin. In addition, accessibility differed depending on the type of compound, and the highest values were determined for quercetin diglucoside (23%–96%) (Fernández-Jalao et al., 2017). Other studies conducted on the matrices showed similar results. HHP (400 MPa at 25°C for 5 min) increased the susceptibility of flavonols to extraction but had no effect on their bioaccessibility and only a slight effect on the availability of phenols. Processing significantly changed the microstructure of onion and apple powders and the supplement quercetin, with a decrease in viscosity over the next stages of digestion. Higher values of the consistency coefficient and viscosity in onion powders after HHP compared to nonprocessed ones were also observed in nondigested samples and in the oral and gastric phase. This can be explained by the deformation of the cell wall and a reduction in turgor caused by pressure. This phenomenon may explain the higher total phenol values observed in HHP onion gastric digestion phases compared to the control (Herranz et al., 2018).

Research on the use of high-pressure homogenization for improving the bioaccessibility of hydrophilic components is remarkably rare. Work so far presents the effects of HPH (250 MPa) and pasteurization (80°C/30 min and 90°C/3 s) on the bioaccessibility of phenols and the antioxidant capacity of apple, orange, and grape juices with the participation of a milk matrix. The use of homogenization regressed or had no effect on the bioaccessibility of phenols in juices to which milk was added. According to this research, thermal treatment is more effective in increasing the functional value of these products. The low HPH efficiency may result from the action of oxidoreductive enzymes released from the disrupted cells, causing the oxidation and degradation of polyphenols (He et al., 2016).

The effect of HHP methods, high-intensity pulsed electric field (HIPEF), and heat treatment on the bioaccessibility of vitamin C and phenolic compounds, as well as the hydrophilic antioxidant activity of drinks based on fruit juices with and without milk, were investigated. Both nonthermal techniques showed similar positive effects on the bioaccessibility of vitamin C, compared to the heating (90°C, 1 min) of the juice sample but each type of treatment resulted in a loss of the bioaccessibility of the vitamin. High pressure and HIPEF improved the bioaccessibility of some phenolic compounds, e.g., hesperidin and rutin, irrespective of the matrix type, but did not affect the total phenolic content determined by HPLC. Techniques such as HHP and HIPEF are able to inactivate the enzymes released from cells at the same time as these processes take place at relatively low temperatures. Therefore, thermolabile antioxidants can remain stable and bioactive in gastrointestinal digestion. Bioaccessibility also depended on the matrix type. Soy milk showed better bioaccessibility of the active ingredients than bovine milk (Rodríguez-Roque et al., 2015). This can be justified by the high content of phenolic compounds that naturally exist in soy milk as they could have an additional antioxidant function. On the other hand, bovine milk is rich in proteins and vitamins that can form complexes with active compounds from fruit juices and reduce their availability (Claeys et al., 2013).

Another team of researchers (Cilla et al., 2012) had differing results and concluded that fruit juice with the addition of soy milk was characterized by a lower bioaccessibility of

vitamin C than juices with bovine milk. In addition, it was demonstrated that the bioaccessibility of vitamin C is higher after short heat treatment (90°C for 30s) of the juices than after HHP at 400 MPa, 40°C, and 5 min. High-pressure treatment could promote the formation of complexes in combination with milk components more than pasteurization. This resulted in increased viscosity and reduced the availability of ascorbic acid molecules in the digestive model. A significantly lower loss of active ingredients in the process of simulated digestion was noticed than in earlier studies. The differences between the two studies could result from the varying methods used to obtain a bioavailable fraction (centrifugation in [Cilla et al., 2012](#) and dialysis in [Rodríguez-Roque et al., 2015](#)) and from applying various formulas and proportions of beverage preparation in the individual studies.

Sánchez-Moreno et al. conducted *in vivo* studies focusing on the bioavailability of vitamin C in orange juice ([Sánchez-Moreno et al., 2003](#)) and vegetable soup “gazpacho” ([Sánchez-Moreno et al., 2004](#)) processed using high hydrostatic pressure (400 MPa/40°C/1 min). Twelve healthy volunteers (6 women and 6 men) participated in the studies. The researchers collected fasting blood samples before analysis. They performed another test after 7 and 14 days of consuming the tested product. It was shown that drinking 500 mL of HHP treated orange juice daily increased the vitamin C content in the blood plasma. After 7 days of consuming 500 mL of “gazpacho” soup, there was a significant increase in the vitamin C content in the plasma. This proves that the HHP preservation allows maintaining the bioavailability of vitamin C and the resulting health-promoting values of the food products ([Sánchez-Moreno et al., 2003, 2004](#)).

3.2.3 Mineral compounds

Several researchers have investigated the impact of high hydrostatic pressure on the bioavailability of minerals in food products ([Table 3](#)). Briones-Labarca et al. reported the additional value of enzymatic digestion obtained from “Algarrobo” seed extracts. Analysis of the extracts received after the *in vitro* digestion of seeds treated with high hydrostatic pressure (500 MPa during 2, 4, 8, and 10 min) showed an increase in the total antioxidant capacity. Also, using the longest applied time, an increase in solubility and dialysability of Ca, Fe, and Zn was noted ([Briones-Labarca, Venegas-Cubillos, et al., 2011](#)). In other studies, carried out by the same team on apples treated with HHP using the same parameters as before, there was an increase in the bioaccessibility of Ca, Fe, and Zn and total antioxidant capacity. They claimed the pressure could disturb the continuity of the cell wall structure and lead to the release of mineral compounds into the extracellular phase. It also found that the bioaccessibility did not depend on the mineral concentration in the test solution ([Briones-Labarca, Muñoz, et al., 2011](#)).

In another study using milk-based fruit beverages, a higher bioavailability of calcium and phosphorus in products preserved with high pressure was observed compared to those subjected to thermal treatment. High hydrostatic pressure may also be useful in designing milk products with higher nutritional values ([Cilla et al., 2011](#)). The pressurization of milk induces destabilization and the dissociation of casein micelles, which is accompanied by the release of Ca, P, Mg, and casein into the supernatant. Furthermore, the types of casein: alpha(S1-) and alpha(S2-) located in the core of the micelles were released which indicates that high pressure disrupts micelles including their internal structure ([Regnault, Dumay, & Cheftel, 2006](#)). The process of converting calcium from a micellar (insoluble) to a soluble form is reversible and

TABLE 3 High-pressure effect on bioaccessibility of mineral compounds.

Processing method	Parameters	Bioactive compound	Food matrix	Effect on bioaccessibility/ bioavailability			References	
				No effect	Higher than control	Higher than TT		Lower than control
HHP	500MPa, 10min	Ca, Fe, Zn	"Algarrobo" seed		x			Briones-Labarca, Venegas-Cubillos, Ortiz-Portilla, Chacana-Ojeda, & Maureira, 2011
HHP	500MPa, 10min	Ca, Fe, Zn	Apples		x			Briones-Labarca, Muñoz, & Maureira, 2011
HHP	400MPa, 36°C, 5min	Ca, P	Juice-milk beverages			x		Cilla et al., 2011
HHP	300MPa	Ca, Cu	Germinated brown rice		x			Xia, Wang, Xu, Mei, & Li, 2017

HHP, high-pressure processing; TT, thermal treatment.

depends on the properties of the milk. Unfortunately, the released minerals may also bond to other proteins and inorganic compounds (Barba et al., 2015).

The effect of high pressure on the bioaccessibility of mineral compounds, amino acids, and starch was also studied in germinated brown rice. The use of this treatment increased the bioaccessibility of calcium, copper, and essential amino acids (AAs). It also enhanced the total antioxidant capacity and starch resistance to hydrolysis. This was beneficial for maintaining a low glycemic index. HHP significantly induced the accumulation of free AAs by accelerating mass transfer and enzymatic reactions in the pressurized samples. The highest values were determined at a pressure of 300 MPa, and with its increase structural changes in starch occurred, resulting in a decrease in bioaccessibility. At 300 MPa, the process of gelation of starch granules began which lowered their hardness and also the parameters of the texture profile such as cohesiveness, gumminess, and resilience. The study demonstrated a close correlation between texture parameters and the bioavailability of mineral compounds (Xia, Tao, et al., 2017; Xia, Wang, et al., 2017).

4 Conclusions

High-pressure affects the bioaccessibility of nutrients in various ways, depending on the structure of the compounds and the composition of the matrix. Many of the studies presented demonstrate the positive effect of high-pressure treatment on the bioaccessibility and bioavailability of bioactive components. A positive pressure effect was mainly the result of:

- maintaining the high stability of the compounds due to low process temperatures and the inactivation of enzymes from the oxidoreductase group
- increase in the extractivity
- damage to the cell structure (cell wall and chromoplasts) and release of bioactive compounds
- supporting the dissolution of carotenoids in oil
- influence on the activity of enzymes from the group of hydrolases supporting the breakdown of polyglutamates into monoglutamates

Some studies also showed no effect or a negative impact of pressure on bioaccessibility. According to the research analyzed, this may result from:

- the formation of large lycopene crystals after pressure
- entrapment of lycopene in the cell structure
- changes in the fiber structure
- increase in viscosity
- increased susceptibility to oxidation of the lipophilic compounds (e.g., lycopene) after transferring to the oil phase
- oil crystallization under pressure
- enzyme activity from the group of oxidoreductases on the components released from cells, using low-pressure parameters
- changes in the structure of proteins in dairy matrices.

The bioaccessibility of components under high pressure varied depending on the nature of the ingredient (e.g., isomerization of tocopherol or the type of phenyl compound). It also differed depending on the food matrix to which pressure was applied (e.g., the addition of a milk component or the absence or presence of oil). The effect of pressure on bioavailability has not been revealed. Depending on the matrix used, higher hydrostatic pressure caused an increase or decrease in bioaccessibility resulting from changes to the tissue structure. Higher pressure caused an increase in the viscosity of products which debilitates the availability of active ingredients. It also effectively inactivates enzymes reducing the content of nutritionally beneficial components. High-pressure homogenization is mainly used to improve the bioaccessibility of lipophilic components that are more connected in the tissue structures and harder to access in the aqueous stomach environment. In the context of the bioaccessibility of hydrophilic components and minerals, the majority of studies apply to the study of hydrostatic pressure.

The assessment of bioavailability is very important to learn about the real possibility of the body benefiting from active ingredients. The type of processing and parameters used, among many other factors, play an important role in modulating the bioavailability of nutrients. On the whole, they should be taken into consideration when developing new products with health-promoting properties. Beyond that, the research presented shows discrepancies, therefore, proving the need to conduct further studies in this area, in order to expand knowledge on the impact of high pressure on biological accessibility.

References

- Afonso, C., Costa, S., Cardoso, C., Coelho, I., Castanheira, I., Lourenço, H., & Bandarra, N. M. (2018). Bioaccessibility in risk-benefit analysis of raw and cooked seabream consumption. *Journal of Food Composition and Analysis*, *68*, 118–127.
- Alegría, A., García-Llatas, G., & Cilla, A. (2015). Static digestion models: General introduction. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, L. Lea, A. Mackie, ... H. Wichers (Eds.), *The impact of food bioactives on health in vitro and in vivo models* (pp. 3–13). New York: Springer Open.
- Andrés, V., Villanueva, M. J., & Tenorio, M. D. (2016). Influence of high pressure processing on microbial shelf life, sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content of milk-and soy-smoothies. *LWT- Food Science and Technology*, *65*, 98–105.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2012). High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *11*(3), 307–322.
- Barba, F. J., Koubaa, M., do Prado-Silva, L., Orlie, V., & de Souza Sant'Ana, A. (2017). Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *66*, 20–35.
- Barba, F. J., Mariutti, L. R., Bragagnolo, N., Mercadante, A. Z., Barbosa-Cánovas, G. V., & Orlie, V. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. *Trends in Food Science & Technology*, *67*, 195–206.
- Barba, F. J., Saraiva, J. M. A., Cravotto, G., & Lorenzo, J. M. (2019). *Innovative thermal and non-thermal processing, bioaccessibility and bioavailability of nutrients and bioactive compounds* (1st ed.). Elsevier: Woodhead Publishing, ISBN: 9780128141748.
- Barba, F. J., Terefe, N. S., Buckow, R., Knorr, D., & Orlie, V. (2015). New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. *Food Research International*, *77*, 725–742.
- Braga, A. R. C., Murador, D. C., de Souza Mesquita, L. M., & de Rosso, V. V. (2018). Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *Journal of Food Composition and Analysis*, *68*, 31–40.
- Briones-Labarca, V., Muñoz, C., & Maureira, H. (2011). Effect of high hydrostatic pressure on antioxidant capacity, mineral and starch bioaccessibility of a non conventional food: *Prosopis chilensis* seed. *Food Research International*, *44*(4), 875–883.

- Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M., & Maureira, H. (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*, 128(2), 520–529.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991.
- Buniowska, M., Carbonell-Capella, J. M., Frigola, A., & Esteve, M. J. (2017). Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with Stevia rebaudiana. *Food Chemistry*, 221, 1834–1842.
- Cadesky, L., Walking-Ribeiro, M., Kriner, K. T., Karwe, M. V., & Moraru, C. I. (2017). Structural changes induced by high-pressure processing in micellar casein and milk protein concentrates. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 7055–7070.
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171.
- Cardoso, C., Afonso, C., Lourenço, H., Costa, S., & Nunes, M. L. (2015). Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. *Trends in Food Science and Technology*, 41, 5–23.
- Cilla, A., Alegría, A., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Plaza, L., ... Barberá, R. (2012). Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk- and soy-based fruit beverages: influence of food matrix and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7282–7290.
- Cilla, A., Bosch, L., Barberá, R., & Alegría, A. (2018). Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds—A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 3–15.
- Cilla, A., González-Sarriás, A., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C., & Barberá, R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 114(3), 813–820.
- Cilla, A., Lagarda, M. J., Alegría, A., de Ancos, B., Cano, M. P., Sánchez-Moreno, C., ... Barberá, R. (2011). Effect of processing and food matrix on calcium and phosphorous bioavailability from milk-based fruit beverages in Caco-2 cells. *Food Research International*, 44(9), 3030–3038.
- Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., ... Herman, L. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 31(1), 251–262.
- Colle, I. J., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Met, K., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2013). Processing tomato pulp in the presence of lipids: The impact on lycopene bioaccessibility. *Food Research International*, 51(1), 32–38.
- Colle, I., Van Buggenhout, S., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2010). High pressure homogenization followed by thermal processing of tomato pulp: Influence on microstructure and lycopene *in vitro* bioaccessibility. *Food Research International*, 43(8), 2193–2200.
- Dugo, P., Lo Presti, M., Öhman, M., Fazio, A., Dugo, G., & Mondello, L. (2005). Determination of flavonoids in citrus juices by micro-HPLC-ESI/MS. *Journal of Separation Science*, 28(11), 1149–1156.
- Faria, A., Pestana, D., Azevedo, J., Martel, F., de Freitas, V., Azevedo, I., ... Calhau, C. (2009). Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells—Putative involvement of GLUT2. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 1430–1437.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751–760.
- Fernández-Jalao, I., Sánchez-Moreno, C., & De Ancos, B. (2017). Influence of food matrix and high-pressure processing on onion flavonols and antioxidant activity during gastrointestinal digestion. *Journal of Food Engineering*, 213, 60–68.
- Frank, K., Köhler, K., & Schuchmann, H. P. (2012). Stability of anthocyanins in high pressure homogenization. *Food Chemistry*, 130, 716–719.
- Galanakis, C. M. (2017). *Nutraceutical and functional food components. Effects of innovative processing techniques* (1st ed.). Elsevier: Academic Press [chapter 1].
- Gupta, R., Kopec, R. E., Schwartz, S. J., & Balasubramaniam, V. M. (2011). Combined pressure–temperature effects on carotenoid retention and bioaccessibility in tomato juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7808–7817.
- He, Z., Tao, Y., Zeng, M., Zhang, S., Tao, G., Qin, F., & Chen, J. (2016). High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect *in vitro* bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. *Food Chemistry*, 200, 107–116.





- Herranz, B., Fernández-Jalao, I., Álvarez, M. D., Quiles, A., Sánchez-Moreno, C., Hernando, I., & de Ancos, B. (2018). Phenolic compounds, microstructure and viscosity of onion and apple products subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 114–125.
- Karacam, C. H., Sahin, S., & Oztop, M. H. (2015). Effect of high pressure homogenization (microfluidization) on the quality of Ottoman strawberry (F. Ananassa) juice. *LWT-Food Science and Technology*, 64, 932–937.
- Karaś, M., Jakubczyk, A., Szymanowska, U., Złotek, U., & Zielińska, E. (2017). Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 291–305.
- Knockaert, G., De Roeck, A., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2011). Effect of thermal and high pressure processes on structural and health-related properties of carrots (*Daucus carota*). *Food Chemistry*, 125(3), 903–912.
- Knockaert, G., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2012). Changes in β -carotene bioaccessibility and concentration during processing of carrot puree. *Food Chemistry*, 133(1), 60–67.
- Knockaert, G., Pulissery, S. K., Colle, I., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2012). Lycopene degradation, isomerization and *in vitro* bioaccessibility in high pressure homogenized tomato puree containing oil: effect of additional thermal and high pressure processing. *Food Chemistry*, 135(3), 1290–1297.
- Lee, S. G., Kim, J., Park, H., Holzapfel, W., & Lee, K. W. (2018). Assessment of the effect of cooking on speciation and bioaccessibility/cellular uptake of arsenic in rice, using *in vitro* digestion and Caco-2 and PSI cells as model. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 597–604.
- Liu, Y. Y., Xiao, J. J., Fu, Y. Y., Liao, M., Cao, H. Q., & Shi, Y. H. (2018). Study of factors influencing the bioaccessibility of triazolone in cherry tomatoes using a static SHIME model. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), 993.
- Machhar, B. K., Shah, R., Bhimani, B., Patel, U., Daslaniya, D., & Patel, G. (2013). Biological, pharmaceutical and analytical considerations of Caco-2 Monolayer. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 6(4), III.
- Maisanaba, S., Guzmán-Guillén, R., Valderrama, R., Meca, G., Font, G., Jos, Á., & Cameán, A. M. (2018). Bioaccessibility and decomposition of cylindrospermopsin in vegetables matrices after the application of an *in vitro* digestion model. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 164–171.
- Marszałek, K., Szczepańska, J., Starzonek, S., Woźniak, Ł., Trych, U., Skapska, S., ... Barba, F. J. (2019). Enzyme inactivation and evaluation of physicochemical properties, sugar and phenolic profile changes in cloudy apple juices after high pressure processing, and subsequent refrigerated storage. *Journal of Food Process Engineering*, 42(4).
- Marszałek, K., Szczepańska, J., Woźniak, Ł., Skapska, S., Barba, F. J., Brnčić, M., & Brnčić, S. R. (2019). The preservation of fruit and vegetable products under high pressure processing. In P. Ferranti, E. Berry, & A. Jock (Eds.), *Encyclopedia of food security and sustainability* (pp. 481–492):Elsevier.
- Marszałek, K., Woźniak, Ł., Kruszewski, B., & Skapska, S. (2017). The effect of high pressure techniques on the stability of anthocyanins in fruit and vegetables. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 277.
- McInerney, J. K., Seccafien, C. A., Stewart, C. M., & Bird, A. R. (2007). Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability in vegetables. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(4), 543–548.
- Melse-Boonstra, A., Verhoef, P., Konings, E. J., Van Dusseldorp, M., Matser, A., Hollman, P. C., & West, C. E. (2002). Influence of processing on total, monoglutamate and polyglutamate folate contents of leeks, cauliflower, and green beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3473–3478.
- Morales-de la Peña, M., Welti-Chanes, J., & Martín-Belloso, O. (2016). Application of novel processing methods for greater retention of functional compounds in fruit-based beverages. *Beverages*, 2(2), 14.
- Moreda-Pineiro, J., Moreda-Pineiro, A., Romarís-Hortas, V., Moscoso-Pérez, C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., ... Prada-Rodríguez, D. (2011). In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(2), 324–345.
- Orlien, V., Boserup, L., & Olsen, K. (2010). Casein micelle dissociation in skim milk during high-pressure treatment: Effects of pressure, pH, and temperature. *Journal of Dairy Science*, 93(1), 12–18.
- Ozdal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., & Capanoglu, E. (2016). The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2), 78.
- Palmero, P., Lemmens, L., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2014). Role of carotenoid type on the effect of thermal processing on bioaccessibility. *Food Chemistry*, 157, 275–282.
- Palmero, P., Panozzo, A., Colle, I., Chigwedere, C., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2016). Role of structural barriers for carotenoid bioaccessibility upon high pressure homogenization. *Food Chemistry*, 199, 423–432.

- Panozzo, A., Lemmens, L., Van Loey, A., Manzocco, L., Nicoli, M. C., & Hendrickx, M. (2013). Microstructure and bioaccessibility of different carotenoid species as affected by high pressure homogenisation: a case study on differently coloured tomatoes. *Food Chemistry*, 141(4), 4094–4100.
- Paustenbach, D. J. (2000). The practice of exposure assessment: a state-of-the-art review. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 3(3), 179–291.
- Podśędek, A., Redzyna, M., Klewicka, E., & Koziolkiewicz, M. (2014). Matrix effects on the stability and antioxidant activity of red cabbage anthocyanins under simulated gastrointestinal digestion. *Biomed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/365738>.
- Putnik, P., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Gabrić, D., Shpigelman, A., Cravotto, G., & Bursać Kovačević, D. (2017). An integrated approach to mandarin processing: Food safety and nutritional quality, consumer preference, and nutrient bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1345–1358.
- Regnault, S., Dumay, E., & Cheftel, J. (2006). Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9°C or 20°C: Effects on the distribution of minerals and proteins between colloidal and soluble phases. *Journal of Dairy Research*, 73(1), 91–100.
- Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the *in vitro* bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, 14, 33–43.
- Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Vega, R., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2016). Food matrix and processing influence on carotenoid bioaccessibility and lipophilic antioxidant activity of fruit juice-based beverages. *Food & Function*, 7(1), 380–389.
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013). Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout *in vitro* gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1859–1867.
- Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., de Ancos, B., Plaza, L., Olmedilla, B., Granado, F., & Martín, A. (2003). High-pressurized orange juice consumption affects plasma vitamin C, antioxidative status and inflammatory markers in healthy humans. *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2204–2209.
- Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., de Ancos, B., Plaza, L., Olmedilla, B., Granado, F., & Martín, A. (2004). Consumption of high-pressurized vegetable soup increases plasma vitamin C and decreases oxidative stress and inflammatory biomarkers in healthy humans. *The Journal of Nutrition*, 134(11), 3021–3025.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., De Ancos, B., Martín-Belloso, O., & Cano, M. P. (2005). Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4403–4409.
- Santhakumar, A. B., Battino, M., & Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*, 113, 49–65.
- Singh, A., & Kitts, D. D. (2019). *In vitro* bioaccessibility of tart cherry anthocyanins in a health supplement mix containing mineral clay. *Journal of Food Science*, 84(3), 475–480.
- Srinivasan, V. S. (2001). Bioavailability of nutrients: a practical approach to *in vitro* demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. *The Journal of Nutrition*, 131(4), 1349S–1350S.
- Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R. M., ... Astley, S. B. (2002). Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 23, 39–100.
- Svelander, C. A., Lopez-Sanchez, P., Pudney, P. D., Schumm, S., & Alminger, M. A. (2011). High pressure homogenization increases the *in vitro* bioaccessibility of α - and β -carotene in carrot emulsions but not of lycopene in tomato emulsions. *Journal of Food Science*, 76(9), H215–H225.
- Van Buggenhout, S., Alminger, M., Lemmens, L., Colle, I., Knockaert, G., Moelants, K., ... Hendrickx, M. (2010). *In vitro* approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced microstructural changes. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 607–618.
- Varela-Santos, E., Ochoa-Martínez, A., Tabilo-Munizaga, G., Reyes, J. E., Pérez-Won, M., Briones-Labarca, V., & Morales-Castro, J. (2012). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 13–22.
- Wang, C., Riedl, K. M., Somerville, J., Balasubramaniam, V. M., & Schwartz, S. J. (2011). Influence of high-pressure processing on the profile of polyglutamyl 5-methyltetrahydrofolate in selected vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16), 8709–8717.
- Westphal, A., Schwarzenbolz, U., & Böhm, V. (2018). Effects of high pressure processing on bioactive compounds in spinach and rosehip puree. *European Food Research and Technology*, 244(3), 395–407.

- Xia, Q., Tao, H., Huang, P., Wang, L., Mei, J., & Li, Y. (2017). Minerals *in vitro* bioaccessibility and changes in textural and structural characteristics of uncooked pre-germinated brown rice influenced by ultra-high pressure. *Food Control*, *71*, 336–345.
- Xia, Q., Wang, L., Xu, C., Mei, J., & Li, Y. (2017). Effects of germination and high hydrostatic pressure processing on mineral elements, amino acids and antioxidants *in vitro* bioaccessibility, as well as starch digestibility in brown rice (*Oryza sativa* L.). *Food Chemistry*, *214*, 533–542.
- Zhao, W., Sun, Y., Ma, Y., & Zhao, X. (2018). Dense phase carbon dioxide treatment of tomato juice: effect on physico-chemical properties, phenolic composition, lycopene isomerisation and *in vitro* bioaccessibility. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(5), 1658–1669.
- Zobrist, M. R., Huppertz, T., Uniacke, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). High-pressure-induced changes in the rennet coagulation properties of bovine milk. *International Dairy Journal*, *15*(6-9), 655–662.

Article

The Bioaccessibility of Antioxidants in Black Currant Puree after High Hydrostatic Pressure Treatment

Urszula Trych ^{1,*}, Magdalena Buniowska ², Sylwia Skąpska ¹, Szymon Starzonek ³ and Krystian Marszałek ^{1,4,*}

¹ Department of Fruit and Vegetable Product Technology, Institute of Agricultural and Food Biotechnology, 02532 Warsaw, Poland; sylwia.skapska@ibprs.pl

² Department of Dairy Technology, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszow, Ćwiklinskiej 2D St., 35601 Rzeszów, Poland; mbuniowska@ur.edu.pl

³ Institute of High Pressure Physics, Polish Academy of Sciences, 29/37 Sokołowska St., 01142 Warsaw, Poland; starzoneks@unipress.waw.pl

⁴ Department of Food Technology and Human Nutrition, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszow, Poland, Zelwerowicza 2D, Rzeszow 35-601, Poland

* Correspondence: urszula.trych@ibprs.pl (U.T.); krystian.marszalek@ibprs.pl (K.M.)

Academic Editor: Antonio Zuorro

Received: 20 July 2020; Accepted: 30 July 2020; Published: 3 August 2020



Abstract: The aim of the study was to investigate the effect of high-pressure processing (HPP) and thermal processing (TP) on the bioaccessibility of vitamin C and anthocyanins as well as changes in the antioxidant capacity (AC) using ABTS+• and DPPH• tests on blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) puree during the steps in the digestive process. The puree was subjected to HPP at 200, 400, and 600 MPa for 5 min (room temperature) or TP at 85 °C for 10 min. The controls were untreated puree (P) and fruit crushed in a mortar (M). All the samples were digested in a static in vitro digestion model, including the mouth, stomach, and small intestine, and subjected to dialysis. The vitamin C, anthocyanin, and antioxidant capacity were monitored at each step of the digestion process. The potential bioaccessibility of the antioxidants studied was calculated in relation to the undigested sample. TP and HPP enabled a high content of vitamin C, anthocyanins, and AC to be maintained. After simulated digestion in the small intestine, a significant decrease was observed in the vitamin C and anthocyanins (approximately 98%) content. However, a high stability (approximately 70%) of both compounds was noted at the gastric stage. HPP and TP significantly affected the potential bioaccessibility of vitamin C and anthocyanins, although the bioaccessibility of both compounds in the samples treated using HPP was higher than when using TP. Moreover, the potential bioaccessibility of vitamin C after HPP treatment (400 and 600 MPa) was higher than the bioaccessibility calculated for the M and P control samples. TP and HPP treatment negatively affected anthocyanin bioaccessibility after dialysis. The most favorable pressure was 400 MPa, as it allowed maintaining the best antioxidant activity after digestion.

Keywords: bioaccessibility; high hydrostatic pressure; black currant; vitamin C; anthocyanins; antioxidant activity; in vitro digestion model

1. Introduction

Berries, including blackcurrants (*Ribes nigrum* L.), are distinguished by their excellent nutritional values. Due to their mineral, vitamin, and antioxidant content, they are recommended from a nutritional point of view. They are a rich source of vitamin C and anthocyanins responsible for their intensely dark red color [1]. Blackcurrants contain 160–285 mg/100 g of ascorbic acid; therefore, consuming approximately 20 g of this fruit provides the recommended daily allowance (RDA) for vitamin C [2].

Depending on the variety, region, ripeness, growing, and storage conditions, the concentration of polyphenols can be as much as from 500 to 1342 mg/100 g, and most of them are anthocyanins (160–411 mg/100 g) [3,4]. Blackcurrants are very good material for the production of juices, frozen foods, jams, and tinctures and can also be eaten as fresh fruit. Their many nutritional compounds also make them an interesting ingredient for the functional foods sector [2]. Their high content of antioxidants could help in the prevention of tumors and cardiovascular diseases. Anthocyanins are also responsible for anti-inflammatory, antimicrobial, and neuroprotective effects, the induction of cell apoptosis, and may help in maintaining eye health [5,6]. The free radical scavenging mechanisms, and inhibiting the formation of carcinogenic nitrosamine in the stomach, contribute to the antimutagenic and antioxidant effect of vitamin C [7]. Epidemiological studies in rats have proven that the long-term low-dosage administration of vitamin C prior to middle cerebral artery occlusion had a neuroprotective effect and may protect the brain against damage and strokes [8].

The bioavailability of nutrient and bioactive compounds is defined as the part of a substance administered for digestion and it is capable of being absorbed and available for use in physiological functions [9]. The concept of “bioavailability” includes availability for absorption, which is determined as “bioaccessibility”, absorption, tissue distribution, and bioactivity. It is not essential for all antioxidants to be fully absorbed from the digestive tract into the systemic circulation in order to fulfill their function and bring beneficial effects for the human body. By remaining in the intestines and colon, they can protect epithelial cells from oxidative DNA damage and cancerous changes associated with the release of free radicals [10].

Due to the difficulties associated with performing and comparing *in vivo* tests, static *in vitro* models are often used to assess bioaccessibility. *In vitro* tests map optimal conditions in the gastrointestinal tract, help to avoid ethical problems, and enable us to understand certain mechanisms that guide the digestive processes and the absorption of bioactive components and their potential bioaccessibility [11,12].

Numerous studies have shown the positive effects of high-pressure processing (HPP) on the stability of bioactive ingredients, compared to thermal processing, and the increase in the bioaccessibility of selected nutritional compounds was confirmed. HPP may affect plant tissue structures and increase the extractability of bioactive ingredients, simultaneously having a positive effect on their initial stability. Moreover, this treatment can disrupt the structure of the ingredients, both bioactive (polyphenols, folates) and those capable of binding them (such as pectin), thus making them more available. Therefore, high hydrostatic pressure may be a useful method of preservation in designing functional foods with high nutritional values [13,14]. According to our best knowledge, there are a limited number of studies on the influence of HPP on the bioaccessibility of anthocyanins and vitamin C, as well as changes to the antioxidant capacity (AC), during the digestive steps; therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of HPP conditions on the potential bioaccessibility of anthocyanins, vitamin C, as well as changes in the AC after simulated digestion in the mouth, stomach, and small intestine. Moreover, the passive transport of metabolites through the artificial membrane was investigated after dialysis. The differences between the HPP and thermal processing (TP) techniques, as well as between the various degrees of tissue disruption (puree and crushed fruits), were also highlighted.

2. Results and Discussion

2.1. Effect of Processing on the Bioaccessibility of Vitamin C

The vitamin C content in blackcurrants before digestion was the highest in fresh fruit crushed in a mortar (M), followed by untreated (P) and HPP treated puree at 200 MPa (HPP200) (Table 1). All the processes were insignificant regarding the degradation of vitamin C (except for the HPP600 sample) before digestion, which indicates that the vitamin C in blackcurrants is quite resistant to thermal treatment. This may be due to the fruit’s natural high acidity. In the control samples, vitamin C occurred only in the form of L-ascorbic acid, and only this bioactive form of the vitamin was analyzed.

Table 1. Results of physicochemical analyses of blackcurrants at various stages of digestion.

	Sample Code	Non-Digested Sample	SD	Salivary Digestive Fraction	SD	Stomach Digestive Fraction	SD	Non-Dialysed Intestinal Fraction	SD	Dialysate Fraction	SD
L-Ascorbic Acid (AA) [mg/100 g]	M	229.48 ^a	6.43	134.42 ^a	3.89	205.42 ^a	6.73	3.71 ^{ab}	0.36	<1.0 ^b	-
	P	227.24 ^a	4.45	112.02 ^b	5.08	177.62 ^c	7.03	3.48 ^{bc}	0.16	<1.0 ^b	-
	TP	221.56 ^{ab}	4.71	104.37 ^c	5.80	133.66 ^d	5.79	2.35 ^d	0.37	<1.0 ^b	-
	HPP200	229.20 ^a	2.41	97.70 ^c	4.26	140.95 ^d	4.69	2.90 ^{cd}	0.30	<1.0 ^b	-
	HPP400	225.23 ^{ab}	1.65	117.63 ^b	2.67	189.17 ^{bc}	5.36	4.08 ^{ab}	0.33	2.20 ^a	0.49
	HPP600	217.38 ^c	6.92	117.02 ^b	3.61	194.95 ^{ab}	9.37	4.18 ^a	0.50	2.09 ^a	0.35
Sum of Anthocyanins [mg/kg]	M	736.70 ^a	38.30	257.43 ^c	12.99	454.69 ^a	24.49	10.22 ^c	1.25	11.86 ^a	0.95
	P	638.04 ^b	43.52	251.94 ^{bc}	10.19	391.43 ^b	21.53	3.07 ^d	0.58	3.49 ^b	0.91
	TP	601.98 ^b	25.31	178.15 ^e	9.56	330.07 ^c	13.47	8.84 ^c	0.75	1.53 ^c	0.38
	HPP200	619.09 ^b	42.13	220.23 ^d	18.75	391.41 ^b	15.87	14.10 ^b	1.04	1.41 ^c	0.47
	HPP400	626.05 ^b	44.38	287.85 ^a	13.91	408.71 ^b	22.38	19.02 ^a	1.33	1.77 ^c	0.47
	HPP600	622.81 ^b	43.22	277.29 ^{ab}	16.04	419.47 ^{ab}	24.03	4.64 ^d	0.76	1.61 ^c	0.40
ABTS ⁺ • (µm/mL TEAC)	M	30.80 ^a	0.81	32.48 ^b	0.83	38.28 ^b	1.95	12.81 ^a	0.54	11.25 ^b	0.42
	P	30.11 ^{ab}	1.16	31.70 ^b	0.78	35.86 ^c	0.90	9.45 ^b	0.06	9.31 ^c	0.48
	TP	27.03 ^c	1.49	28.38 ^c	0.96	35.76 ^c	1.18	2.94 ^e	0.09	6.80 ^d	0.12
	HPP200	27.95 ^c	1.36	28.91 ^c	1.17	35.30 ^c	0.66	5.29 ^d	0.23	9.34 ^c	0.26
	HPP400	28.20 ^{bc}	0.73	37.29 ^a	1.03	42.02 ^a	0.66	9.59 ^b	0.39	13.44 ^a	0.47
	HPP600	31.82 ^a	1.59	34.91 ^a	0.78	35.49 ^c	0.66	6.25 ^c	0.22	9.39 ^c	0.37
DPPH• (µm/mL TEAC)	M	45.72 ^a	1.63	22.21 ^a	1.17	25.81 ^b	1.43	4.36 ^a	0.20	4.41 ^a	0.03
	P	47.24 ^a	1.57	23.75 ^a	0.96	26.08 ^{ab}	0.55	4.22 ^{ab}	0.14	3.33 ^{cd}	0.08
	TP	45.11 ^a	0.11	21.33 ^a	0.82	21.99 ^c	1.14	3.86 ^{bc}	0.20	3.18 ^d	0.05
	HPP200	47.35 ^a	0.34	22.05 ^a	0.54	22.67 ^c	1.15	3.63 ^c	0.15	3.45 ^c	0.03
	HPP400	45.61 ^a	0.28	22.63 ^a	1.33	28.94 ^a	0.94	4.63 ^a	0.20	3.83 ^b	0.01
	HPP600	45.89 ^a	0.45	21.99 ^a	1.00	27.15 ^{ab}	1.36	4.56 ^a	0.20	3.41 ^c	0.11

M—fruit manually crushed in a mortar; P—unprocessed puree; TP—thermally pasteurized puree; HPP200—puree after HPP at 200 MPa; HPP400—puree after HPP at 400 MPa; HPP600—puree after HPP at 600 MPa; $n = 3$, small letters a–c, indicate statically significant differences in the mean values within a column at a confidence level of $\alpha = 0.05$; SD—standard deviation. ABTS⁺•: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid diammonium salt, DPPH•: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.

The concentration of L-ascorbic acid decreased by approximately 50% in all the samples after salivary digestion. The significant degradation in vitamin C could be connected with the raising of the pH value to 6.75 ± 0.20 . Furthermore, it was evident that vitamin C was less stable in the samples treated with HPP at 200 MPa as well as TP. This phenomenon may be connected with the oxidation of L-dehydroascorbic acid to L-dehydroascorbic acid at a higher pH in the mouth. The most stable form of vitamin C was in the M samples, which was probably due to the larger fruit particles that can protect less available nutrients inside the tissue. During the digestive phase in stomach conditions, the vitamin C concentration increased significantly compared to the salivary phase. The highest concentration of vitamin C was observed in the M and HPP600 samples. Higher pressures promoted the reversibility of the degradation reactions, and lower concentrations of vitamin C were found when lower pressures were applied. In the unprocessed P samples, the vitamin C concentration was lower than in the samples treated using HPP at 400 and 600 MPa, and higher than in the same samples treated using 200 MPa and treated with TP. The acidic environment of the stomach is able to promote the stability of vitamin C, which is also confirmed by other studies—however, in the context of polyphenols [15].

Vitamin C was largely destroyed as a result of digestion in the small intestine (approximately 98–99%), irrespective of the type of processing and the conditions; whereas in dialysate, vitamin C was only detected in the samples treated using HPP at 400 and 600 MPa. The highest content of the vitamin was found in HPP600 samples (up to 4.18 mg/100 g), and the lowest content was found in the TP sample (2.35 mg/100 g). Such a large degradation of vitamin C may be caused by the high pH in the small intestine. Vitamin C is sensitive to environmental changes and is unstable in alkaline and neutral pH, at high temperatures, and in the presence of oxygen and some metal ions [16,17]. Other authors have also confirmed that vitamin C degraded under intestinal conditions, showing a decrease of 91% after the digestion of fresh broccoli [7]. Other studies reported a significant degradation in vitamin C (>95%) in pomegranate juice, after *in vitro* digestion at the small intestine stage [18]. Studies involving vitamin C and phenolic compounds have also confirmed their high stability in stomach conditions (a recovery of more than 75%) as well as a decline in their concentration during intestinal digestion [19]. According to our best knowledge, there is currently no research describing the changes in vitamin C at all the stages of digestion, including salivary digestion. The relative bioaccessibility (BAC) calculated for vitamin C after dialysis in relation to the non-digested sample is slight (Figure 1a). The highest BAC at this stage was calculated for vitamin C in samples treated using HPP at 400 and 600 MPa (about 1%). The BAC of vitamin C from the small intestine fraction was slightly higher, ranging from 1% in sample T to 2% in TP and HPP600-treated samples (Figure 1b). The BAC of vitamin C in samples treated under pressure at 400 and 600 MPa was higher than the BAC calculated for unprocessed M and P puree. This means that HPP may increase the BAC of vitamin C, which is probably due to the enhanced extraction of this compound from the tissue. HPP treatment may increase the extractivity of bioactive ingredients; however, the type of food matrix is of great importance to the further effect of increasing BAC [14,20]. It transpired that a pressure of 200 MP was insufficient to increase the BAC of vitamin C. This phenomenon may be justified by the low degradation of tissue enzymes such as polyphenol oxidases and peroxidases, which may accelerate the degradation of vitamin C. On the other hand, vitamin C is metabolized at a high pH and may also be absorbed by the epithelial lining of the small intestine as metabolites. Ascorbic acid can be absorbed via a sodium-dependent active transporter (SVCT1) mainly in the ileum and jejunum, while the absorption of dehydroascorbic acid is facilitated by diffusion in the duodenum and jejunum using glucose transporters. Generally, it is clear that compounds undergoing dialysis would be available for absorption in the human body, but in the case of vitamin C, it is highly probable that ascorbic acid is absorbed into the human cardiovascular system from the stomach or just at the beginning of the small intestine [21]. The BAC of vitamin C after digestion in the stomach phase was very good and was within the limits—from 60% for TP and HPP200-treated samples, and up to 90% for M and HPP600 samples (Figure 1c). It should be emphasized that vitamin C from HPP-treated samples at 600 MPa had a greater BAC than the P sample,

which indicated that the HPP technique may increase the BAC of vitamin C. However, TP significantly decreases the Bac to below the BAC recorded for the P and M samples.

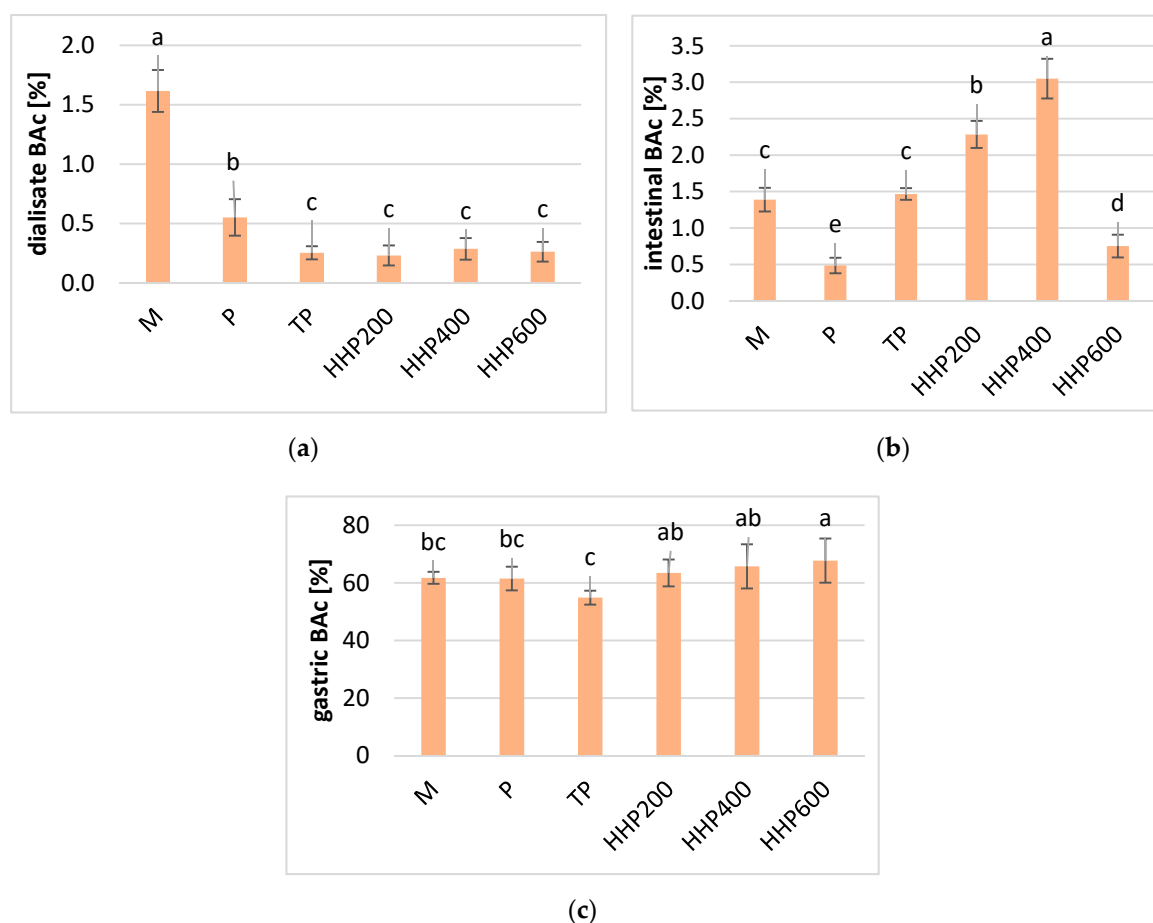


Figure 1. Relative bioaccessibility of total vitamin C in blackcurrants after different processing: M–crushed in a mortar; P–untreated puree; TP–thermal pasteurized puree; HHP200–high pressured puree at 200 MPa; HHP400–high pressured puree at 400 MPa; HHP600–high pressured puree at 600 MPa; (a) in the dialysate stage; (b) in the intestinal stage; (c) in the gastric stage; small letters a–e indicate statically significant differences in the mean values between samples at a confidence level of $\alpha = 0.05$.

There is limited research on the effect of HPP on the bioaccessibility of vitamin C. Aschoff et al. (2015) assessed the BAC of vitamin C in orange juices and observed that thermal pasteurization increased the BAC of vitamin C compared to fresh orange juice [22]. Cilla et al. (2012) verified the effect of short thermal treatment (90 °C, 30 s) on vitamin C BAC in fruit juices, with the addition of various types of milks compared to HPP treatment at 400 MPa and 40 °C for 5 min. They concluded that HPP, in contrast to thermal treatment, enabled the retention of vitamin C at a level similar to fresh juices. However, the retention of vitamin C did not contribute to an increase in the BAC of this component. The authors concluded that HPP can promote the formation of aggregates of whey protein in juices with the addition of milk and protect against the degradation of vitamin C by increasing viscosity, which may influence the reduction in the BAC of ascorbic acid molecules in the *in vitro* digestion model [23]. In another study, an increase in the BAC of vitamin C in fruit beverages with water, milk, or soymilk treated using HPP (400 MPa, 5 min, 40 °C) compared to thermally treated (90 °C, 60 s) samples was reported. The authors confirmed that HPP may contribute to the inactivation of enzymes responsible for vitamin C oxidation such as ascorbate oxidase and peroxidases, whereas short-term heating may not be sufficient to inactivate these enzymes [24].

2.2. Effect of Processing on the Bioaccessibility of Anthocyanins

According to the data presented in Table 1, the content of the sum of anthocyanins in blackcurrants before digestion was the highest in crushed fruits (sample M) and was 736.70 mg/kg of raw material. The sum of anthocyanins in the other samples was between 638.04 and 601.98 mg/kg in P and TP treated puree, respectively. The total anthocyanin content was higher in HPP-treated samples than in the TP, M, and P-treated ones, thus confirming that anthocyanins in blackcurrants are quite stable at high pressures [25]. Four main anthocyanin monomers were found: delphinidin-3-o-rutinoside (Df 3-o-rut), cyanidin-3-o-rutinoside (Cy 3-o-rut), delphinidin-3-o-glucoside (Df 3-o-glu), and cyanidin-3-o-glucoside (Cy 3-o-glu), and the same anthocyanin composition was found by other authors [26]. Cy 3-o-rut, which is the second most common anthocyanin in the cultivar of blackcurrant studied, is also known to be the most stable after thermal treatment [27].

The salivary digestion of all the samples caused a significant degradation in the anthocyanins (Table 1). Similarly, according to Carbonell-Capella et al., 2015. In beverages based on exotic fruits, the recovery of total anthocyanins detected after the salivary phase was significantly lower than those in the non-digested samples [28]. It is well known that anthocyanins are very sensitive to pH changes, and this reaction is reversible [25]. The largest decrease in these pigments was noted in the TP sample, reaching a value of 178.15 mg/kg, whereas the lowest was in the HPP200, M, and T samples: 220.23 mg/kg, 257.43 mg/kg, and 251.94 mg/kg, respectively. The most stable anthocyanins were in the HPP400 and HPP600 samples and amounted to 287.85 mg/kg and 277.29 mg/kg. As a result of digestion in an acidic stomach environment, the anthocyanin content increased significantly, but the concentration of this pigments reached 55–65% of the concentrations noted in the samples before the first step of digestion. A similar relationship was also found in another study. After the simulated digestion of grape samples in the mouth phase, the anthocyanin content was lower than in the control sample, before digestion, whereas it increased significantly in the gastric phase. Ultimately, 45% of the anthocyanins were available after the gastric stage. The authors concluded that this phenomenon is related to the type of food matrix, since there was no similar relationship in wine samples [15].

Simulated intestinal digestion resulted in a drastic decrease in anthocyanin concentration. The highest degradation was noted in the P, HPP600, and TP samples and reached from 0.5% to 1.5% compared to undigested samples. The best anthocyanin retention was noted in the M, HPP200, and HPP400 samples, where the concentration of these pigments was as high as 3% of the original value. A similar concentration of anthocyanins was detected in the dialysate obtained from untreated M and P samples. All the treatment processes resulted in a significantly lower absorption of anthocyanins after dialysis by artificial membranes. Similarly to vitamin C, the BAC of anthocyanins calculated according to the ratio of the substance in the dialysate and non-digested samples was very low (Figure 2a). For all the treated samples, the BAC was approximately 0.2–0.3%, and no statistically significant differences were observed. For samples M and P, the BAC of anthocyanins was higher and reached 1.62% and 0.55%, respectively. Taking into consideration the content of the substance digested at the gastric stage, the BAC of anthocyanins was statistically significantly lower in the TP samples (55%) compared to the HPP-treated samples (Figure 2c). The BAC of anthocyanins in the M and P samples was significantly lower compared to the HPP-treated samples, but it was still higher than the BAC calculated for the TP samples.

Previous studies confirm the high stability of anthocyanins in the gastric digestion phase and a large decrease in BAC after intestinal digestion [15,29–32]. The authors justified this phenomenon by the break in the anthocyanin ring when the pH of the environment changes from acidic (pH 2) to alkaline (pH 8). Only delphinidin- and malvidin-6-acetyl 3-glucosides were relatively stable to changes in the pH and showed far less degradation [30]. In the bioaccessibility studies of polyphenols (including anthocyanins) in apples, other authors observed a significant degradation in anthocyanins after digestion at the intestinal stage. This was explained by the pH changes from acidic in the stomach to alkaline in the small intestine, as well as by the action of pancreatin and bile. The release of anthocyanins from the fruit matrix is most effective during gastric digestion [15,29]. Bouayed et al.

(2011) noted that most polyphenols and flavonoids were already available in the gastric phase, but not all polyphenols detected in the intestinal stage were available for absorption under the conditions simulated by dialysis experiments. Studies of anthocyanin derived from blueberries proved that the delphinidine derivatives were unstable under gastrointestinal digestion. They were not detected after digestion and showed the lowest BAC. The differences in the availability of various anthocyanins may be related to the number of $-OCH_3$ groups present in the different molecules. It has been noted that a larger number of these groups promote bioavailability, since larger structures may contribute to less degradation and susceptibility to conversion to nondetectable (colorless) forms [33].

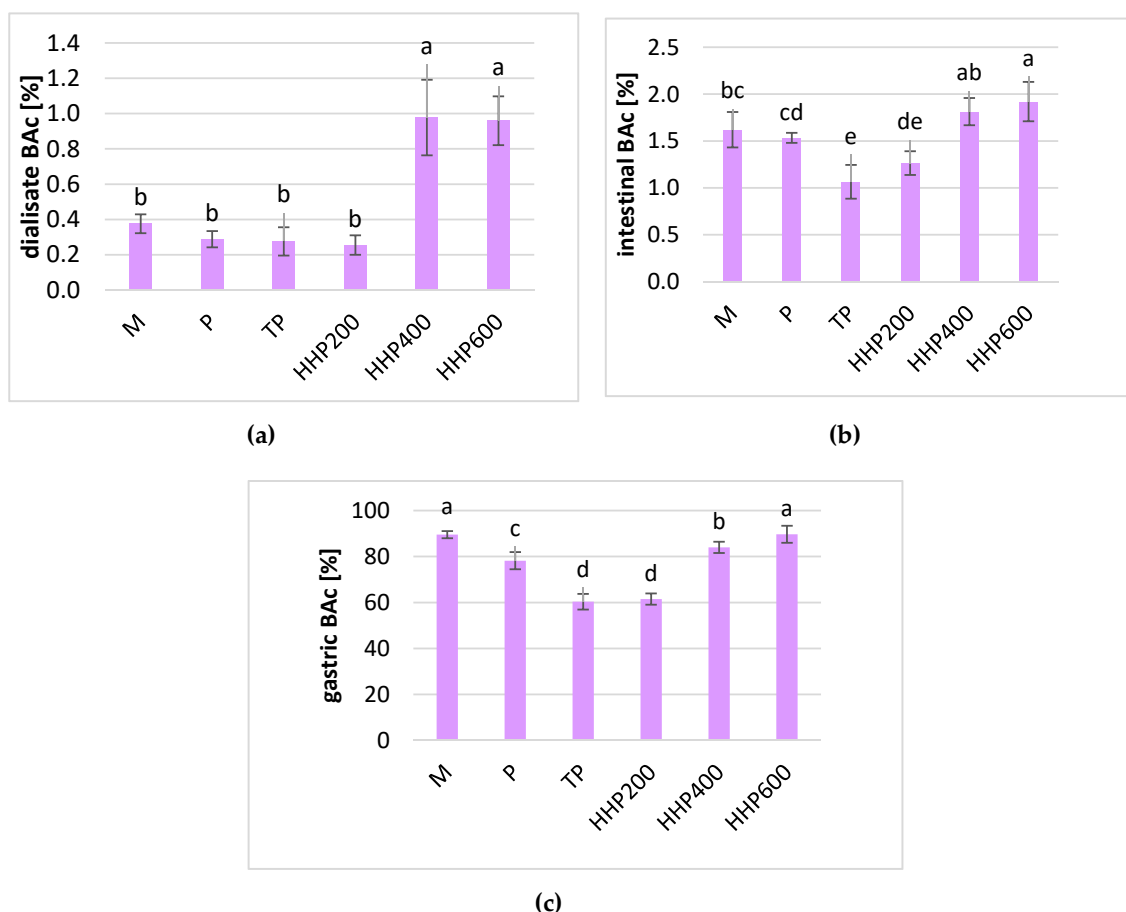


Figure 2. Relative bioaccessibility of total anthocyanins in blackcurrants after different processing: M—crushed in a mortar; P—untreated puree; TP—thermal-treated puree; HHP200—high-pressured puree at 200 MPa; HHP400—high-pressured puree at 400 MPa; HHP600—high-pressured puree at 600 MPa; (a) in the dialysate stage; (b) in the intestinal stage; (c) in the gastric stage; small letters a–d indicate statically significant differences in the mean values between samples at a confidence level of $\alpha = 0.05$.

Anthocyanins are very susceptible to degradation under the influence of temperature, light, pH changes, the presence of oxygen, sugars, sulfites, ascorbic acid, metal ions, and other pigments. They are also sensitive to the activity of tissue enzymes (β -glucosidase, polyphenoloxidase, and peroxidase), and microorganisms [25]. At a pH below 3, anthocyanins are found in the form of red flavylium cations. As the pH increases to 4, these cations are transformed into purple-violet quinoidal bases. At pH 4–6, colorless hemiketal forms may occur and also yellow retro-chalcones, resulting from ring opening. Furthermore, anthocyanins may undergo co-pigmentation reactions that occur in the presence of some compounds, such as other phenols and metal ions (including magnesium, copper, and aluminum), which increases their stability. Anthocyanins may also be easily transformed into insoluble polymeric brown pigments, which are liable to degradation at elevated temperatures, causing the polymerization of monomeric anthocyanins

to form brown compounds [25]. Anthocyanin bioaccessibility from foods is very limited. Even after consuming large amounts of these compounds, their maximum plasma concentration is at a level of several tens of nM and occurs just over an hour after ingestion. Moreover, the concentration of anthocyanins in the urine is less than 0.1% of the initial dose. However, it should be noted that studies often do not take into account all anthocyanin derivatives that may have arisen in the metabolic pathway, and moreover, they often forget about the possibility of biliary excretion back into the gastrointestinal tract [34,35]. The low bioaccessibility of anthocyanins may also be connected with their bonding with other plant tissue components, such as cellulose, pectin, and fiber [35]. As the blackcurrant is known to be a fruit containing a large amount of pectin (2.5 g/100 g), this hypothesis is highly probable [36].

However, anthocyanins can also be absorbed in a glycoside form through the gastric mucosa, as has been demonstrated in several studies [37,38]. Studies conducted on rats fed a diet enriched with blackberry anthocyanins have shown that anthocyanins and their metabolites can accumulate in the tissues of organs such as the bladder, prostate, testicles, heart, and adipose tissue. This demonstrates their bioavailability from the gastrointestinal tract and the circulatory system to targeted organs. Anthocyanins can be absorbed from the stomach and intestines, but they can also reach the colon, where they are metabolized by the microbiota, which confirmed the hypothesis that these compounds do not have to be stable in the small intestine [39].

The mechanisms describing the metabolism and absorption of anthocyanins are not yet fully understood. There are indications that they may even be absorbed in the mouth, as anthocyanins can be present in the blood plasma 5 min after their contact with the oral epithelial tissue. In addition, there are similar transporters in the mouth as in the intestine that can contribute to the absorption of anthocyanins from the oral cavity [40]. The gastrointestinal microflora plays also an important role in the digestion and absorption of anthocyanins [41]. Research results indicate that colon fermentation reduces the antioxidant activity of polyphenols and their potential to inhibit cancer cells [30]. In spite of the generally low bioavailability of anthocyanins, epidemiological studies indicate their positive effect on the body. This may be due to the biological activity of the metabolites and catabolites produced by microorganisms, as well as their potential synergistic interaction with other compounds [39].

It has been shown that food processing, including high-pressure techniques, can increase the bioaccessibility and bioavailability of antioxidants through the chemical or physical modification of food. The application of HPP helps in the retention of thermolabile antioxidants during processing and therefore favors more effective absorption in the gastrointestinal tract [35]. To the best of our knowledge, there is currently a lack of research on the effects of high pressure on the bioaccessibility of anthocyanins. Rodríguez-Roque et al. (2015) demonstrated that HPP treatment (400 MPa, 5 min, 40 °C) improved the bioaccessibility of total phenols compared to thermal treatment and control samples. The authors explained that HPP may affect the bioaccessibility of phenolic compounds by intervening with their structure (e.g., hydroxylation, methylation, isoprenylation, dimerization, and glycosylation). Phenolic derivatives may also be formed through the partial degradation of linked forms. HPP can also improve the bioaccessibility of active ingredients by affecting the structure of fiber, fats, and phytosterols, which are often associated with other food components, disturbing their absorption [24].

2.3. Effect of Processing on the Antioxidant Capacity of Blackcurrant Puree in a Simulated Digestive System

Measuring the antioxidant capacity (AC) of food products with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid diammonium salt (ABTS⁺•) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) radicals relies on a single electron transfer mechanism [42]. In the control samples, the AC measured with ABTS⁺• was between 27.03 and 31.82 µM/mL Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) in the TP and HPP600 samples, respectively. A similar trend was observed using DPPH• radicals, but the values were from 45.11 to 45.89 µM/mL TEAC, respectively (Table 1).

The highest AC in the salivary digestive fraction measured with ABTS⁺• was noted for HPP-treated samples at 400 and 600 MPa, whereas the type of processing and conditions were insignificant in tests

using DPPH•. The lowest AC was noted in samples treated using TP and HPP at 200 MPa. The AC measured with the ABTS⁺• test increased significantly in all the samples compared to the undigested samples, which indicates that digestion in the salivary step may increase the antioxidant potential of the nutritional compounds found in blackcurrants. By contrast, the method using the DPPH• radical noted a 50% decrease in AC in all the samples, and these values did not show statistically significant differences.

Digestion in the stomach caused a further increase in AC measured with ABTS⁺• in all the samples. The greatest changes were noted for the TP and HPP200 samples, where AC increased by almost 26% and 13%, respectively, compared to the salivary digestion stage. Despite the significant growth, their value was still lower than in the other samples. The highest value of AC was recorded in the HPP400 sample, reaching 42.02 µM/mL TEAC. Similarly, using the DPPH• method, an increase in AC was observed after gastric digestion. The highest increase occurred in the HPP400 and HPP600 samples, 28% and 23%, respectively.

During simulated digestion in the small intestine, there was a significant decrease in AC in all the samples. It was probably associated with a decrease in the vitamin C and anthocyanin content. Under the ABTS⁺• method, the decrease ranged from 66% in M to 92% in the TP samples. The M sample showed the highest AC, followed by HPP400 and P, whereas the pasteurized samples had the lowest AC. There were similar relationships in the dialysate fraction. In most of them, an increase in AA was observed, indicating that the bioaccessible fraction contains metabolites of the tested active ingredients, which was characterized by high AC. In addition, a pressure of 400 MPa also had the greatest beneficial effect on the AA of the fruit product.

Rodríguez-Roque et al. found that the use of HPP reduced hydrophilic antioxidant activity (measured by the DPPH• method) in fruit and soy-fruit beverages, but not below the AC noted for heat-treated samples. Depending on the matrix used, HPP caused an increase (in juices with milk), did not change (in juices with soymilk), or caused a decrease (in juices with water) in AC after digestion compared to the control samples, which indicates that the AC of food components is highly dependent on the food matrix. However, HPP always provided a higher AC than heat treatment in this experiment. The authors concluded that processing can cause changes in the structure of the analyzed substances, reducing or increasing their activity. The oxidation of certain bioactive compounds present in food may be the reason for the decrease in the AC of the food matrix after processing. However, processing can improve the concentration of antioxidants by their release from the food matrix or due to the inactivation of degradative enzymes [24]. In the research conducted on apples and algarrobo seeds, Briones-Labarca et al. also noticed an increase in the total antioxidant capacity (DPPH• method) after applying HPP treatment (500 MPa, 10 min). Processing contributed to the release of antioxidants and an increase in their solubility after breaking the cell wall structure [43,44]. Anthocyanin bioaccessibility and antioxidant activity (ORAC method) in tart cherry extracts with the addition of mineral clay were also studied. Despite a large decrease in the anthocyanin content after digestion under duodenal conditions, an almost twofold increase in antioxidant activity (ORAC) was noted. This may indicate that the metabolites formed after the breakdown or transformation of anthocyanins may still have antioxidant activity and that this activity is much stronger than before digestion [45].

3. Materials and Methods

3.1. Reagents and Solvents

The following reagents, enzymes, and laboratory equipment were purchased at Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): mucin from the porcine stomach—type II, α-amylase, heat-stable, (TDF-100A, 24975 U/mL), pepsin from porcine gastric mucosa (250 U/mg solid), pancreatin from the porcine pancreas (8 × USP specifications), bile extract from porcine, sodium dodecyl sulfate—ACS reagent, sodium bicarbonate ≥99.5% used to simulate digestion, dialysis tubing cellulose membrane (average flat width 25 mm), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid diammonium salt (ABTS⁺• radical),

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•] radical), (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid (Trolox), DL-dithiothreitol (HPLC) (DTT), phosphoric acid 85%, acetonitrile (HPLC), formic acid $\geq 95.0\%$ and sodium hydroxide pellets $\geq 98.0\%$, (NaOH).

Other reagents were obtained from Chempur (Piekary Śląskie, Poland), such as di-sodium hydrogen phosphate anhydrous pure p.a. $\geq 99.0\%$ (Na_2HPO_4), di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), sodium chloride pure p.a. $\geq 99.9\%$ (NaCl) and di-sodium edetate standard solution 0.01 mol/L (EDTA). Hydrochloric acid pure p.a. ACS reagent 37% (HCl) and potassium peroxodisulfate $\geq 99.0\%$ were purchased from Honeywell Fluka (Seelze, Germany). Ethanol (96% CZDA) and methanol (HPLC grade) came from Avantor (Gliwice, Poland).

3.2. Raw Materials

3.2.1. Blackcurrant Fruit Processing

The research material were frozen blackcurrants (*Ribes nigrum L.*) of the Tisel cultivar bought from a local market. Whole raw materials were divided into two parts. One part of the fruit was subjected to manual crushing ($\text{Ø} > 5.0$ mm) with a mortar (M). The other part was thawed and processed into puree (P) ($\text{Ø} < 0.2$ mm) with a colloid mill (Rietz, San Francisco, CA, USA). The puree obtained was divided into two subsequent parts and packed into 100 mL glass jars or 50 mL high-density polyethylene (HDPE) bottles. The glass jars were pasteurized in a laboratory bath pasteurizer (Labo Play, Bytom, Poland) at 85 °C for 10 min (TP). The puree packed in HDPE bottles was subjected to high-pressure processing (HPP) in a high-pressure U4000 chamber (UNIPRESS, Warsaw, Poland) at 200, 400, and 600 MPa (HPP200, HPP400, HPP600) and room temperature for 5 min. To limit adiabatic heating, all the bottles were cooled in an ice bath immediately after HPP. All the samples were frozen at -18 °C before analysis.

3.2.2. Extraction of Bioactive Compounds from Raw Materials

An extraction of bioactive compounds was prepared from all the samples before and after processing as well as after digestion in salivary and gastric steps. The intestinal fraction and samples after dialysis were analyzed directly without additional extraction. About 0.5 g of the sample was extracted by shaking for 5 min at 400 RMP (DLAB, Labindex, SK-0330-Pro, Warsaw, Poland) with 80% methanol solution acidified with 0.1% HCl and by ultrasonication for 5 min (ultrasonic bath, MKD-6, Warsaw, Poland). The supernatant was centrifuged for 5 min and $10,342\times g$ (centrifuge, Rotina 380R, Hettich, Tuttlingen, Germany) at 4 °C. Extraction was repeated six times to a final supernatant volume of 50 mL.

3.3. In Vitro Digestion, Dialysis, and Calculation of Bioaccessibility

In vitro gastrointestinal digestion was conducted according to method presented by Minekus et al., 2014 [46] and Buniowska et al. (2017) [47] with slight modifications. All samples were digested in triplicate, and distilled water was used instead of blackcurrants for the blank sample. Simulated digestion was started from the salivary step. Fifty grams of each sample was transferred to a dark glass bottle (100 mL) and mixed with 5 mL of a saliva enzyme solution (2.38 g Na_2HPO_4 , 0.19 g K_2HPO_4 , 8 g NaCl, 100 mg mucin, and α -amylase of 200 U/L enzyme activity, dissolved in 1 L of distilled water). The pH was adjusted (pH meter HI 211, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) to 6.75 ± 0.20 by the addition of HCl (12 mol/L) or NaOH (2 mol/L), and the solution was incubated in a shaking water bath (Labo Play, SWB 8N) at 37 °C and 90 RPM for 10 min. To start the simulation of the gastric phase, 13.08 mg pepsin was added, and the pH was adjusted to 2.0 by the addition of HCl (12 mol/L). The mixtures were incubated in a shaking water bath (37 °C/90 RPM) for 2 h in the dark. Twenty grams of the sample from the stomach stage was transferred to a fresh dark glass bottle and titrated with NaOH (2 mol/L) to pH 5.00 ± 0.20 to initialize the intestinal phase. Then, 5 mL of pancreatin (1 g/L) and bile (25 g/L) dissolved in distilled water were added. Finally, the dialysis membrane filled with 25 mL NaHCO_3 solution (0.5 M, pH 7.5) was immersed in the mixture for the dialysis step. Dialysis cellulose

membranes were prepared the day before by boiling in 0.01 mol/L EDTA (with 2% NaHCO₃ and 0.1% sodium dodecyl sulfate) for 10 min. The mixtures obtained were incubated again for 2 h in the shaking water bath under the previous conditions and cooled in the ice bath for 10 min. Samples were collected from each step of the simulated digestion for analysis. Bioaccessibility (BAc) was calculated according to Equation (1).

$$\text{BAc [\%]} = 100 \times (\text{BC}_{\text{digested}}/\text{BC}_{\text{non-digested}}) \quad (1)$$

where BAc—bioaccessibility of bioactive compound; BC_{digested}—the concentration of bioactive compound in the digested sample; BC_{non-digested}—the concentration of bioactive compound in the non-digested sample.

3.4. Chemical Analysis

3.4.1. Determination of L-Ascorbic Acid (AA)

Determination of the vitamin C content was performed according to the method presented by Odrizola-Serrano et al. (2007) [48]. The sample was transferred into a vial after appropriate dilution by 0.01% m-phosphoric acid and filtering on the disposable syringe filter (0.45 µm, Macherey-Nagel, Düren, Germany). A Waters chromatographic system (Milford, MA, USA) equipped with a 2695 Separations Module and 2995 Photodiode Array Detector was used. A column—Sunfire C 18, 5 µm, 4.6 mm × 250 mm with reversed phase and Sunfire C18 Sentry guard insert, 5 µm, 4.6 mm × 20 mm (both Waters)—was thermostated at 25 °C. Samples were eluted isocratically with 0.01% m-phosphoric acid as an eluent at a flow rate of 1 mL/min for 10 min. The AA was quantified using UV absorption at 245 nm.

3.4.2. Determination of Anthocyanins

For a quantitative determination of anthocyanins, the method described by Oszmiański (2002) [49] was used. The previously prepared extracts or intestinal fraction or dialysate were filtered through a disposable syringe filter (0.45 µm). The HPLC system and column were the same as described in Section 3.4.1. Ten µL of the samples was eluted for 26 min at 25 °C with the following eluents: a 4.5% aqueous solution of formic acid (A) and an 80% solution of acetonitrile in a previous solution of formic acid (B) at a flow rate of 1.0 mL/min as follows: 0 min–0% A; 7 min–17% A; 15 min–17% A; 21 min–100% A; 26 min–0% A. The anthocyanins were quantified at 520 nm. The amount of anthocyanins was calculated as cyanidin 3-glucoside.

3.4.3. Antioxidant Activity against ABTS⁺• Radical

Determining the antioxidant activity against the ABTS⁺• radicals was carried out according to the method described by Re et al. (1999) [50]. The solution of cationic radicals was prepared by combining 7 mM of ABTS⁺• and 2.45 mM of potassium persulfate. The solution was left in a dark place for 18 h to form colored radicals. The solution was diluted with ethanol to obtain an absorbance measured at 734 nm with a UV/Visible Spectrophotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Amersham, UK) between 0.740 and 0.750. One mg/mL solution of Trolox in ethanol was diluted into six 10-mL volumetric flasks, creating solutions in the following concentrations: 50, 100, 150, 200, 250, and 300 µg/mL to determine the calibration curves. Then, 0.025 mL of subsequent Trolox standards or samples were mixed with 2.5 mL of ABTS⁺• radical solution and incubated at 30 °C for 6 min. The blank sample contained water instead of a sample extract. The antioxidant capacity was expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) per 1 mL of the sample.

3.4.4. Antioxidative Activity against the DPPH• Radical

The determination of the antioxidant activity against the DPPH• radical was carried out according to the method presented by Yen and Chen (1995) [51]. A 1 mM stock solution of DPPH• in 80% methanol was prepared and incubated in a dark place for 3 h to obtain a concentration of 0.1 mM

and absorbance within 0.700–0.800 at 517 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). A standard curve was prepared from Trolox dissolved in methanol (1 mg/mL) in six 10 mL volumetric flasks, obtaining concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, and 100 µg/mL, respectively. Then, 2 mL of radical solution and 0.1 mL of the test sample were mixed, and the absorbance was measured after incubation for 30 min in darkness. The antioxidant activity was expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) per 1 mL of the sample.

3.5. Statistical Analysis

The results obtained were subjected to a one-way analysis of the variance and an analysis of the statistical significance of the differences in mean values using the Tukey test at a confidence level of $\alpha = 0.05$. Statistica 7.1 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA) was used for data analysis. All technological procedures as well as digestion were carried out triplicate, whereas all analytical analyses were carried out in duplicate.

4. Conclusions

HPP as well as TP enabled the retention of vitamin C, anthocyanins, and high antioxidant capacity in blackcurrant products in almost all the samples. Digestion under salivary conditions caused a decrease in the vitamin C and anthocyanin concentration as well as the antioxidant capacity measured with DPPH•, which was connected with the changes in the natural pH of fruits in salivary digestion. On the other hand, both the vitamin C and anthocyanin concentration increased after stomach digestion, which can be justified by the low pH in the stomach. The first step in the oxidation of vitamin C and the transformation of anthocyanins into quinoidal bases and colorless hemiketals are reversible reactions and may be the reason why an increase of these compounds in the stomach was observed. As a result of further digestion in the small intestine and dialysate digestion stages, a very high degradation of each compound was noted, thus confirming other authors' findings. The biological activity of vitamin C and anthocyanins may be related to the absorption of these compounds in the early stages of digestion or similar activity of their metabolites.

Despite the low stability of each compound during digestion, a higher bioaccessibility of vitamin C and anthocyanins after HPP treatment was observed. The higher the pressure used, the better bioaccessibility was observed, especially at the gastric stage. The lowest bioaccessibility of vitamin C and anthocyanins was observed in all the TP-treated samples at each of the digestion steps (except for the intestinal step for anthocyanins). The results of antioxidant capacity varied depending on the radical used in the assay (ABTS⁺• and DPPH•). Antioxidant capacity against the ABTS⁺• radical in the *in vitro* digestion model increased slightly after the simulation of salivary digestion; then, it reached the highest value at the stage of simulated gastric digestion, thereby indicating that the metabolites of the selected nutritional compounds from blackcurrants may indicate greater antioxidant potential.

A small number of papers on the impact of HPP on the bioaccessibility of hydrophilic antioxidants in food, as well as the promising results of this research, encourage their continuation. Further studies will be focused on determining selected metabolites in the nutritional compounds found in blackcurrants, as well as the use of more advanced methods to simulate the absorption of nutritional compounds and metabolites in more natural conditions, for example with Caco-2 cell lines.

Author Contributions: Conceptualization, U.T., K.M.; digestion methodology, U.T., M.B.; analysis, U.T.; data analysis, U.T.; writing, U.T.; editing and proof reading, K.M., M.B. and S.S. (Sylwia Skapska); HPP treatment, S.S. (Szymon Starzonek); funds for research, K.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Landbo, A.K.; Meyer, A.S. Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2004**, *5*, 503–513. [[CrossRef](#)]
2. Nour, V.; Trandafir, I.; Ionica, M.E. Ascorbic acid, anthocyanins, organic acids and mineral content of some black and red currant cultivars. *Fruits* **2011**, *66*, 353–362. [[CrossRef](#)]
3. Moyer, R.A.; Hummer, K.E.; Finn, C.E.; Frei, B.; Wrolstad, R.E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 519–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Paredes-López, O.; Cervantes-Ceja, M.L.; Vigna-Pérez, M.; Hernández-Pérez, T. Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life—A Review. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, *65*, 299–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bakowska-Barczak, A.M.; Kolodziejczyk, P.P. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Ind. Crops Prod.* **2011**, *34*, 1301–1309. [[CrossRef](#)]
6. Lyall, K.A.; Hurst, S.M.; Cooney, J.; Jensen, D.; Lo, K.; Hurst, R.D.; Stevenson, L.M. Short-term blackcurrant extract consumption modulates exercise-induced oxidative stress and lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses. *Am. J. Physiol.* **2009**, *297*, 70–81. [[CrossRef](#)]
7. Vallejo, F.; Gil-Izquierdo, A.; Pérez-Vicente, A.; García-Viguera, C. In vitro gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 135–138. [[CrossRef](#)]
8. Li, L.; Li, S.; Hu, C.; Zhou, L.; Zhang, Y.; Wang, M.; Qi, Z. BKca channel is a molecular target of vitamin C to protect against ischemic brain stroke. *Mol. Membr. Biol.* **2019**, *35*, 9–20. [[CrossRef](#)]
9. Fernández-García, E.; Carvajal-Lérida, I.; Pérez-Gálvez, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr. Res.* **2009**, *29*, 751–760. [[CrossRef](#)]
10. Stahl, W.; Van Den Berg, H.; Arthur, J.; Bast, A.; Dainty, J.; Faulks, R.M.; Gärtner, C.; Haenen, G.; Hollman, P.; Holst, B.; et al. Bioavailability and metabolism. In *Molecular Aspects of Medicine*; Azzi, A., Ed.; Pergamon: Oxford, UK, 2002; Volume 23, pp. 39–100.
11. Hur, S.J.; Lim, B.O.; Decker, E.A.; McClements, D.J. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chem.* **2011**, *125*, 1–12. [[CrossRef](#)]
12. Egger, L.; Ménard, O.; Delgado-Andrade, C.; Alvito, P.; Assunção, R.; Balance, S.; Barberá, R.; Brodkorb, A.; Cattenoz, T.; Clemente, A.; et al. The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Res. Int.* **2016**, *88*, 217–225. [[CrossRef](#)]
13. Barba, F.J.; Terefe, N.S.; Buckow, R.; Knorr, D.; Orlien, V. New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. *Food Res. Int.* **2015**, *77*, 725–742. [[CrossRef](#)]
14. Cilla, A.; Bosch, L.; Barberá, R.; Alegría, A. Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds—A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *68*, 3–15. [[CrossRef](#)]
15. Lingua, M.S.; Wunderlin, D.A.; Baroni, M.V. Effect of simulated digestion on the phenolic components of red grapes and their corresponding wines. *J. Funct. Foods* **2018**, *44*, 86–94. [[CrossRef](#)]
16. Janda, K.; Kasprzak, M.; Wolska, J. Witamina C—budowa, właściwości, funkcje i występowanie. *Pomeranian J. Life Sci.* **2015**, *61*, 419–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Torres, B.; Tiwari, B.K.; Patras, A.; Cullen, P.J.; Brunton, N.; O'Donnell, C.P. Stability of anthocyanins and ascorbic acid of high pressure processed blood orange juice during storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2011**, *12*, 93–97. [[CrossRef](#)]
18. Pérez-Vicente, A.; Gil-Izquierdo, A.; García-Viguera, C. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2308–2312. [[CrossRef](#)]
19. Rodríguez-Roque, M.J.; Rojas-Graü, M.A.; Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1859–1867. [[CrossRef](#)]
20. Herranz, B.; Fernández-Jalao, I.; Dolores Álvarez, M.; Quiles, A.; Sánchez-Moreno, C.; Hernando, I.; de Ancos, B. Phenolic compounds, microstructure and viscosity of onion and apple products subjected to in vitro gastrointestinal digestion. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2019**, *51*, 114–125. [[CrossRef](#)]

21. Rodríguez-Roque, M.J. In vitro Bioaccessibility of Health-Related Compounds from Beverages Based on Fruit Juice, Milk or Soymilk: Influence of Food Matrix and Processing. Ph.D. Thesis, Universitat de Lleida, Lleida, Spain, 2014.
22. Aschoff, J.K.; Kaufmann, S.; Kalkan, O.; Neidhart, S.; Carle, R.; Schweiggert, R.M. In vitro bioaccessibility of carotenoids, flavonoids, and vitamin C from differently processed oranges and orange juices [*Citrus sinensis* (L.) osbeck]. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 578–587. [[CrossRef](#)]
23. Cilla, A.; Alegría, A.; De Ancos, B.; Sánchez-Moreno, C.; Cano, M.P.; Plaza, L.; Clemente, G.; Lagarda, M.J.; Barberá, R. Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk- and soy-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7282–7290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rodríguez-Roque, M.J.; de Ancos, B.; Sánchez-Moreno, C.; Cano, M.P.; Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *J. Funct. Foods* **2015**, *14*, 33–43. [[CrossRef](#)]
25. Marszałek, K.; Woźniak, Ł.; Kruszewski, B.; Skapska, S. The effect of high pressure techniques on the stability of anthocyanins in fruit and vegetables. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Iversen, C.K. Black currant nectar: Effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. *J. Food Sci.* **1999**, *64*, 37–41. [[CrossRef](#)]
27. Rubinskiene, M.; Viskelis, P.; Jasutiene, I.; Viskeliene, R.; Bobinas, C. Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 867–871. [[CrossRef](#)]
28. Carbonell-Capella, J.M.; Buniowska, M.; Esteve, M.J.; Frígola, A. Effect of *Stevia rebaudiana* addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. *Food Chem.* **2015**, *184*, 122–130. [[CrossRef](#)]
29. Bouayed, J.; Hoffmann, L.; Bohn, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem.* **2011**, *128*, 14–21. [[CrossRef](#)]
30. Correa-Betanzo, J.; Allen-Vercoe, E.; McDonald, J.; Schroeter, K.; Corredig, M.; Paliyath, G. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem.* **2014**, *165*, 522–531. [[CrossRef](#)]
31. Tagliazucchi, D.; Verzelloni, E.; Bertolini, D.; Conte, A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem.* **2010**, *120*, 599–606. [[CrossRef](#)]
32. McDougall, G.J.; Dobson, P.; Smith, P.; Blake, A.; Stewart, D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5896–5904. [[CrossRef](#)]
33. Peixoto, F.M.; Senna Gouvêa, A.; de Araújo Santiago, M.C.; de Sá Velosos Martins, Z.E.; Galhardo Borguini, R.; de Oliveira Godoy, R.L. Characterization and bioaccessibility of anthocyanins from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) after simulated gastro-intestinal digestion: A positive effect on malvidin derivatives. *Fruits* **2018**, *73*, 101–109. [[CrossRef](#)]
34. Grajek, W. Wchłanianie przeciwutleniaczy. In *Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty Zdrowotne, Technologiczne, Molekularne i Analityczne*; Grajek, W., Ed.; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warsaw, Poland, 2007; pp. 331–379. ISBN 978-83-204-3277-0.
35. Ribas-Agustí, A.; Martín-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R.; Elez-Martínez, P. Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 2531–2548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Narwojsz, A.; Borowska, E.J. Zmiany składników strukturotwórczych owoców porzeczki czarnej podczas maceracji miazgi a uwalnianie polifenoli do soku. *Zywn. Nauk. Technol. Jakość/Food Sci. Technol. Qual.* **2011**, *18*, 87–98.
37. Milbury, P.E.; Cao, G.; Prior, R.L.; Blumberg, J. Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mech. Ageing Dev.* **2002**, *123*, 997–1006. [[CrossRef](#)]
38. Cao, G.; Muccitelli, H.U.; Sánchez-Moreno, C.; Prior, R.L. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: A pharmacokinetic study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 920–926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Fernandes, I.; Faria, A.; Calhau, C.; de Freitas, V.; Mateus, N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *J. Funct. Foods* **2014**, *7*, 54–66. [[CrossRef](#)]
40. Sigurdson, G.T.; Giusti, M.M. The Stability and Absorption of Anthocyanins in the Mouth. In *Anthocyanins from Natural Sources*; Brooks, M.S., Celli, G.B., Eds.; The Royal Society of Chemistry: London, UK, 2019; pp. 186–215.

41. Mueller, D.; Jung, K.; Winter, M.; Rogoll, D.; Melcher, R.; Richling, E. Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *Food Chem.* **2017**, *231*, 275–286. [[CrossRef](#)]
42. Koss-Mikołajczyk, I.; Baranowska, M.; Namieśnik, J.; Bartoszek, A. Metody oznaczania właściwości przeciwutleniających fitozwiązków w systemach komórkowych z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji/luminescencji* Determination of antioxidant activity of phytochemicals in cellular models by fluorescence/luminescence methods. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* **2017**, *71*, 602–617. [[CrossRef](#)]
43. Briones-Labarca, V.; Muñoz, C.; Maureira, H. Effect of high hydrostatic pressure on antioxidant capacity, mineral and starch bioaccessibility of a non conventional food: *Prosopis chilensis* seed. *Food Res. Int.* **2011**. [[CrossRef](#)]
44. Briones-Labarca, V.; Venegas-Cubillos, G.; Ortiz-Portilla, S.; Chacana-Ojeda, M.; Maureira, H. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chem.* **2011**, *128*, 520–529. [[CrossRef](#)]
45. Singh, A.; Kitts, D.D. In Vitro Bioaccessibility of Tart Cherry Anthocyanins in a Health Supplement Mix Containing Mineral Clay. *J. Food Sci.* **2019**, *84*, 475–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Minekus, M.; Alvinger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1113–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Buniowska, M.; Carbonell-Capella, J.M.; Frigola, A.; Esteve, M.J. Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with *Stevia rebaudiana*. *Food Chem.* **2017**, *221*, 1834–1842. [[CrossRef](#)]
48. Odriozola-Serrano, I.; Hernández-Jover, T.; Martín-Belloso, O. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem.* **2007**, *105*, 1151–1158. [[CrossRef](#)]
49. Oszmianski, J. Stabilizacja i zastosowanie barwnika antocyjanowego aronii do barwienia napoi. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2002**, *1*, 37–45.
50. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
51. Yen, G.C.; Chen, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 27–32. [[CrossRef](#)]





Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Bioaccessibility of Antioxidants in Blackcurrant Juice after Treatment Using Supercritical Carbon Dioxide

Urszula Trych ^{1,*}, Magdalena Buniowska ², Sylwia Skąpska ¹, Ireneusz Kapusta ³
and Krystian Marszałek ^{1,3}

¹ Department of Fruit and Vegetable Product Technology, Prof. Waclaw Dabrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, 36 Rakowiecka St., 02532 Warsaw, Poland; sylwia.skapska@ibprs.pl (S.S.); krystian.marszalek@ibprs.pl (K.M.)

² Department of Dairy Technology, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszow, Ćwiklinskiej 2D St., 35601 Rzeszow, Poland; mbuniowska@ur.edu.pl

³ Department of Food Technology and Human Nutrition, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszow, 2D Zelwerowicza St., 35601 Rzeszow, Poland; ikapusta@ur.edu.pl

* Correspondence: urszula.trych@ibprs.pl

Abstract: Blackcurrant juice (*Ribes nigrum* L.) was subjected to supercritical carbon dioxide (SCCD) at 10, 30, and 60 MPa for 10 min at 45 °C, as well as thermally treated at 45 and 85 °C for 10 min to determine the stability, antioxidant capacity (AC), and bioaccessibility (BAc) of vitamin C, total anthocyanins, and their individual monomers. An in vitro gastrointestinal digestion model completed with dialysis was used to assess BAc. The use of SCCD at each of the pressures applied improved the stability of vitamin C, total anthocyanins, and AC before in vitro digestion. As a result of digestion, the total content of vitamin C, anthocyanins, and AC decreased. The highest BAc of vitamin C was noted in fresh juice (FJ) (40%) and after mild heat treatment at 45 °C (T45) (46%). The highest BAc of total anthocyanins was also noted in the FJ (4.4%). The positive effect of the application of SCCD on the BAc of the delphinidin-3-O-glycosides was observed compared to T45 and thermal pasteurization at 85 °C (T85). Although SCCD did not significantly improve the BAc of vitamin C and total anthocyanins, the higher AC of SCCD samples after intestinal digestion (ABTS+• and DPPH•) and in dialysate (ABTS+•) compared to thermally treated was observed. The protocatechuic acid was detected by UPLC-PDA-MS/MS as the major metabolite formed during the digestion of delphinidin-3-O-rutinoside. This may indicate the influence of SCCD on improvement of the accessibility of antioxidants for digestion, thanks to which more metabolites with high antioxidant activity were released.

Keywords: bioaccessibility; supercritical carbon dioxide; blackcurrant; vitamin C; anthocyanins; antioxidant activity; in vitro digestion model



Citation: Trych, U.; Buniowska, M.; Skąpska, S.; Kapusta, I.; Marszałek, K. Bioaccessibility of Antioxidants in Blackcurrant Juice after Treatment Using Supercritical Carbon Dioxide. *Molecules* **2022**, *27*, 1036. <https://doi.org/10.3390/molecules27031036>

Academic Editor: Luisella Verotta

Received: 24 December 2021

Accepted: 29 January 2022

Published: 3 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Growing awareness of the impact of proper nutrition on the health and quality of human life is one of the most important topics for food technologists, especially with regard to the application of emerging techniques for food preservation. Modern food preservation techniques, such as treatment with supercritical carbon dioxide (SCCD) might be a good alternative to thermal heating since it allows maintaining a high antioxidant content while ensuring food safety and high sensorial properties [1–3]. Supercritical CO₂ is a non-toxic, inexpensive, readily available, non-flammable medium that is approved as safe. It is characterized by a low viscosity (3–7 × 10^{−5} Pa s) and zero surface tension, thanks to which it is able to quickly and effectively penetrate the sample [4]. SCCD carried out at a pressure ranging from 7.28 up to 60 MPa allowed for the effective reduction of microorganisms, even by more than three logarithmic cycles. The use of the parameters of 60 MPa, 30 min, and 45 °C made it possible to obtain strawberry juice while maintaining good microbiological

quality even for 12 weeks of storage at 6 °C [2]. SCCD also enables the inactivation of tissue enzymes such as polyphenol oxidase or peroxidase, thereby inhibiting the browning processes [2,3,5]. Penetration of a food sample with supercritical carbon dioxide causes a decrease in the pH inside the cell, physical disruption of the tissues, modification of cell membranes, and the extraction of intracellular compounds. In fruit and vegetable processing, SCCD is used primarily in liquid foods such as juices, where processing fruit caused significant tissue damage before preservation. Supercritical carbon dioxide is used in the food industry on a large scale for the extraction of caffeine from coffee beans, for the production of hop extracts, and for the de-alcoholization of wine. The use of SCCD has also been patented for, inter alia, the recovery of flavorings of seasonings and purification, fractionation and deodorization of oils. The fruit and vegetable preservation by SCCD technique has great potential, but is not yet used on an industrial scale [6].

The black currant contains 160–285 mg/100 g of ascorbic acid and 160–411 mg/100 g of anthocyanins, which are the most abundant representatives of polyphenols in that fruit [7]. Vitamin C and anthocyanins are well known for their anti-inflammatory, antibacterial, and neuroprotective properties. The high content of these antioxidants in blackcurrants makes this fruit a recommended dietary component in the prevention of cancer, cardiovascular diseases, and vision defects [8–10]. Vitamin C supports the production and preservation of collagen necessary for the formation of connective tissue. L-ascorbic acid facilitates the healing of wounds. It is an essential ingredient in the treatment of anemia thanks to increasing iron absorption and influencing the production of red blood cells. As a strong antioxidant, it participates in redox processes and is responsible for the destruction of free radicals [8,11]. The characteristic of blackcurrant anthocyanin profile consisting of the delphinidin and cyanidin rutosides and glucosides, has application in detection adulteration in juices and wines. The intense dark red color, stability in acidic food, and the strong antioxidant properties of black currant make this fruit a great raw material for the production of juices and wines, as well as an additive in the production of functional food [11]. Studies in mouse models confirmed the possibility of anthocyanin extracts, obtained from Kenyan purple tea, crossing the blood–brain barrier. Due to their neuroprotective properties, they are promising dietary supplements for inhibiting oxidative stress in the brain and preventing neurodegenerative diseases such as Alzheimer’s, Parkinson’s, and multiple sclerosis [12].

There are indications that anthocyanins may have a positive effect on the body even though their absorption by the intestinal epithelium is very limited. The metabolism and absorption of these substances are complicated and not fully understood. However, to take full advantage of the health benefits that can be associated with the consumption of antioxidant-rich fruits, it is important to ensure the highest possible bioavailability and bioaccessibility of these compounds so that they can reach the target tissues and organs in the human body [10,13]. Bioaccessibility is defined as the amount of an active compound that is released from the matrix and is available for absorption into the bloodstream [14]. The bioaccessibility study was performed using an *in vitro* model that simulated digestion in the mouth, stomach, and small intestine along with dialysis through a cellulose membrane simulating the passive transport of components through the intestinal epithelium into the bloodstream.

Technological processing of food is one of the factors influencing the bioaccessibility of nutrients and bioactive compounds. The aim of the present research was to investigate whether SCCD also affects the stability and bioaccessibility of bioactive ingredients such as vitamin C and anthocyanins in blackcurrant juice after digestion in an *in vitro* gastrointestinal model. Moreover, the metabolites of selected anthocyanins after *in vitro* digestion and dialysis were detected using UPLC-PDA-MS/MS. The diagram of the work carried out in these studies is presented in Figure 1.

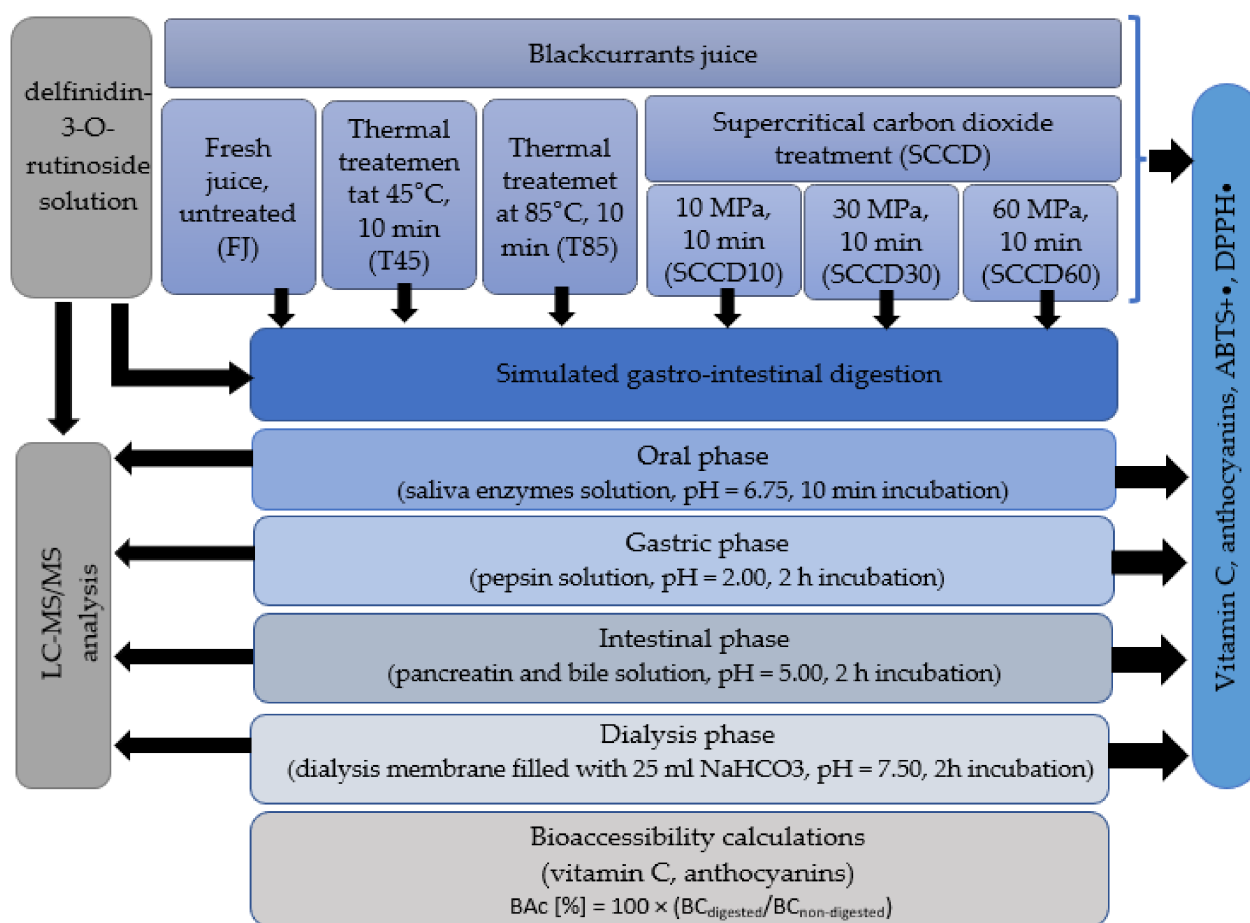


Figure 1. A schematic diagram showing the work flow described in this study.

2. Results and Discussion

2.1. Stability and Bioaccessibility of Vitamin C after SCCD Treatment

According to the data presented in Table 1, the vitamin C content in the control samples of blackcurrant juice before digestion ranged from 150 mg/L in untreated juice to 172.54 mg/L in juice treated using SCCD at 60 MPa. SCCD improved the stability and extractability of the vitamin C from the tissue to the juice. Thermal treatment did not significantly affect the vitamin C content. The vitamin C content in blackcurrant juice was similar to the values obtained in other studies, which ranged from 60 to 280 mg/L depending on the country of origin of the fruit [11]. Marszałek et al. (2018) reported no effect of SCCD treatment under pressure of 10–60 MPa on the vitamin C content in apple juice [3]. The higher sensitivity of vitamin C was observed in strawberry juice, where about 30% of the vitamin C was degraded after SCCD treatment under a pressure of 30 and 60 MPa [1]. In the studies conducted on orange juice, SCCD caused a 12% reduction in vitamin C compared to the control samples, but a 43% decrease in this vitamin after pasteurization was also noted. Vitamin C is susceptible to degradation in the presence of oxygen and active oxidative enzymes. In turn, supercritical CO₂ is a poor solvent for the extraction of this vitamin and does not contribute to its degradation. The replacement of the oxygen dissolved in the liquid juice matrix with supercritical CO₂ could be beneficial for the better stability of vitamin C in products [15,16]. It transpires that the vitamin C contained in blackcurrant juice is resistant to the application of temperature. A low pH of the environment could have a protective effect on the chemical structure of vitamin C [17].

Table 1. L-ascorbic acid (AA), L-dehydroascorbic acid (DHAA) and total vitamin C content at each stage of the digestion of blackcurrant juice.

	Sample	AA (mg/100 mL)	DHAA (mg/100 mL)	Total Vitamin C (AA+DHAA) (mg/100 mL)
control	FJ	147.71 ^c ± 11.04	2.29 ^c ± 0.71	150.00 ^c ± 11.08
	T45	155.09 ^{bc} ± 3.56	3.17 ^{ab} ± 0.91	158.25 ^{bc} ± 3.14
	T85	155.81 ^{bc} ± 2.82	1.95 ^c ± 0.65	157.76 ^{bc} ± 2.60
	SCCD10	162.68 ^{ab} ± 8.80	3.23 ^{ab} ± 1.21	165.91 ^{ab} ± 9.36
	SCCD30	156.93 ^{bc} ± 5.60	3.84 ^a ± 0.38	160.77 ^{bc} ± 5.82
	SCCD60	169.39 ^a ± 2.66	3.15 ^{ab} ± 0.92	172.54 ^a ± 2.25
oral	FJ	188.72 ^{bc} ± 15.05	9.10 ^a ± 1.64	197.82 ^{ab} ± 16.59
	T45	201.55 ^{ab} ± 11.03	1.83 ^c ± 0.49	203.38 ^{ab} ± 11.44
	T85	180.99 ^c ± 12.66	6.96 ^b ± 1.56	187.95 ^b ± 13.71
	SCCD10	210.91 ^a ± 4.06	2.35 ^c ± 0.83	213.26 ^a ± 3.66
	SCCD30	201.71 ^{ab} ± 4.87	8.69 ^{ab} ± 1.26	210.39 ^a ± 4.95
	SCCD60	196.97 ^{abc} ± 3.59	7.93 ^{ab} ± 0.48	204.90 ^{ab} ± 3.12
gastric	FJ	170.03 ^a ± 14.71	2.73 ^c ± 0.51	172.77 ^a ± 14.42
	T45	161.06 ^{ab} ± 3.57	2.40 ^c ± 0.77	163.46 ^{ab} ± 3.73
	T85	151.76 ^b ± 9.45	8.19 ^{ab} ± 5.27	159.96 ^{ab} ± 9.56
	SCCD10	151.88 ^b ± 11.08	11.65 ^a ± 2.31	163.53 ^{ab} ± 9.43
	SCCD30	131.45 ^c ± 12.82	4.08 ^{bc} ± 1.09	135.52 ^c ± 12.79
	SCCD60	152.94 ^{ab} ± 5.37	1.87 ^c ± 0.62	154.81 ^b ± 5.49
intestinal	FJ	4.25 ^a ± 0.93	13.83 ^{ab} ± 2.18	18.08 ^a ± 2.93
	T45	2.19 ^{bc} ± 0.70	14.81 ^a ± 3.15	16.99 ^{ab} ± 3.67
	T85	1.50 ^{cd} ± 0.17	12.20 ^{ab} ± 2.45	13.70 ^{bc} ± 2.61
	SCCD10	2.53 ^b ± 0.36	10.79 ^b ± 1.72	13.32 ^{bc} ± 1.36
	SCCD30	1.06 ^{de} ± 0.36	10.94 ^b ± 1.12	12.00 ^c ± 0.72
	SCCD60	0.46 ^e ± 0.06	6.28 ^c ± 0.67	6.74 ^d ± 0.67
dialysate	FJ	42.61 ^a ± 4.33	17.26 ^b ± 1.69	59.87 ^b ± 5.87
	T45	33.61 ^b ± 2.50	38.75 ^a ± 5.30	72.37 ^a ± 3.09
	T85	23.04 ^c ± 1.21	20.17 ^c ± 3.36	43.21 ^c ± 4.14
	SCCD10	30.22 ^b ± 2.89	16.04 ^c ± 1.21	46.26 ^c ± 3.79
	SCCD30	21.94 ^c ± 3.47	18.69 ^c ± 2.21	40.63 ^c ± 1.84
	SCCD60	21.43 ^c ± 1.79	23.86 ^c ± 3.59	45.28 ^c ± 2.52

FJ-fresh juice; T45-thermal treated juice at 45 °C; T85-thermal treated juice at 85 °C; SCCD10-juice after supercritical carbon dioxide treatment at 10 MPa; SCCD30-juice after supercritical carbon dioxide treatment at 30 MPa; SCCD60-juice after supercritical carbon dioxide treatment at 60 MPa. The same superscripts letter indicate no significant difference between mean ($p \leq 0.05$) in the columns within each digestion stage.

A total of 98% of vitamin C in the control samples was present in the L-ascorbic acid (AA) form. Due to digestion, it underwent reversible oxidation to L-dehydroascorbic acid (DHAA). During the simulated digestion in the small intestine, DHAA became the dominant form of vitamin C, reaching 76–93%. In the dialysate, the DHAA content again fell slightly, ranging from 29% in the FJ samples to 54% in the T45 samples. In the conditions prevailing in the digestive system, DHAA could also undergo further decomposition due to diketogulonic acid, 2-hydroxyfurfural, and other 5-carbon compounds [18].

The higher total vitamin C content in all treated and untreated samples were detected after first step of digestion in mouth in comparison to the same samples before digestion in mouth. Higher levels of vitamin C in samples after oral digestion compared to undigested samples may occur due to the activity of salivary enzymes. Enzymatic extraction of vitamin C from the juice tissue increased the content of this vitamin compared to non-digested samples. In contrast, the concentration of vitamin C significantly decreased after gastric digestion. Due to intestinal digestion and dialyse, the total vitamin C content decreased by 45–66% compared to the stomach stage. In our previous studies, we observed a decrease in the vitamin C content at the stage of oral digestion, and then, an increase in vitamin C

concentration in the acidic environment of the stomach, which could have been caused by using a different matrix (puree). After intestinal digestion and dialysis, the vitamin C was significantly degraded (~98%). Studies conducted on blended fruit juice made from orange, pineapple, and kiwi showed high vitamin C stability after gastric digestion (recovery > 75%) and a significant decrease in vitamin C stability in an alkaline pH, which occurred in the intestinal step of digestion [17]. During the study of the bioaccessibility (BAc) of bioactive ingredients, including vitamin C from broccoli inflorescences, only a 7% loss of vitamin C after digestion in gastric conditions was noted, but as much as a 91% degradation in intestinal conditions [19]. Similarly, in the studies of pomegranate juice, a 95% loss of vitamin C after intestinal digestion was reported [18]. Vitamin C is commonly known to be an unstable bioactive compound sensitive to changes in pH (pH > 4), high temperature, enzyme activity, oxygen, light, and some metal ions [7].

It can also be observed that most of the vitamin C remaining after the simulation of intestinal digestion was passively transported across a cellulose membrane simulating the epithelial barrier of the small intestine. The most effective diffusion took place in samples treated using SCCD60 (87%), followed by the T45 sample (81%). Other processing conditions resulted in an absorption level of vitamin C ranging from 76 to 78%. The absorption of vitamin C in the human organism differs depending on the type of metabolite. Riboflavin and ascorbic acid are absorbed via a sodium-dependent active transporter (SVCT1) in the upper part of the small intestine. Dehydroascorbic acid can be absorbed thanks to glucose transporters and facilitated diffusion in the duodenum and jejunum. It is also worth mentioning that age, habits, medications taken, and physiological characteristics affect the high variability of the actual BAc of vitamin C ingested by the human alimentary tract [18,20].

The highest BAc of total vitamin C was noted for FJ (40%) and T45 (46%) (Figure 2). BAc after T85 and SCCD treatment was about 25–28%. SCCD did not improve the BAc of vitamin C. The effect of a lower pressure level in the SCCD treatment was insignificant compared to other pressure parameters and pasteurization. The initial higher vitamin C stability in the samples treated by SCCD compared to the thermal and control samples does not make the BAc of vitamin C higher in these samples. The digestive processes that took place in the simulated *in vitro* digestion model had a great influence on the BAc of vitamin C. To the best of our knowledge, there are no studies on the BAc of vitamin C in samples treated using SCCD. In our previous research, the influence of High Hydrostatic Pressure (HHP) on the BAc of antioxidants in blackcurrant puree was indicated. We reported that the BAc of vitamin C in dialysate was unfortunately very low and reached only 1% in samples treated using HHP in 400 and 600 MPa. Due to the possibility of the absorption of vitamin C just after gastric digestion, BAc after that stage was considered and ranged between 60% in pasteurized samples and 90% in HHP 400 and 600 MPa [7]. The differences in the bioaccessibility obtained in our studies could largely be due to using a different food matrix, which was also noted by other researchers. For instance, polyphenols contained in wine were more readily bioaccessible than those derived from grapes. In the case of solid food matrices, digestion at the mouth and stomach stages plays a very important role. The process of mastication in an appropriate pH and the presence of digestive enzymes, provides additional extraction of bioactive compounds and is essential for their release and availability for absorption [21].

In other studies, the BAc of vitamin C varied depending on the type and composition of the food matrix and the method of assessing the absorption of substances into the bloodstream (centrifugation or dialysis). Rodríguez-Roque et al. [17] who used a dialysis membrane in their studies, reported a BAc level of vitamin C from blended fruit juice of 15%. In other studies, also using a cellulose membrane, the BAc of vitamin C was obtained at a lower level of approx. 2.5% (in pomegranate juice) and 3.2% (in broccoli inflorescences) [18,19]. Among the studies using the centrifugation technique to assess BAc, Cilla et al. (2012) noted large differences in the BAc of vitamin C depending on the addition of a protein component to the mixed fruit juice and the processing technique.

HHP treatment (400 MPa, 40 °C, 5 min) did not improve the BAc of vitamin C compared to short thermal treatment (90 °C, 30 s).

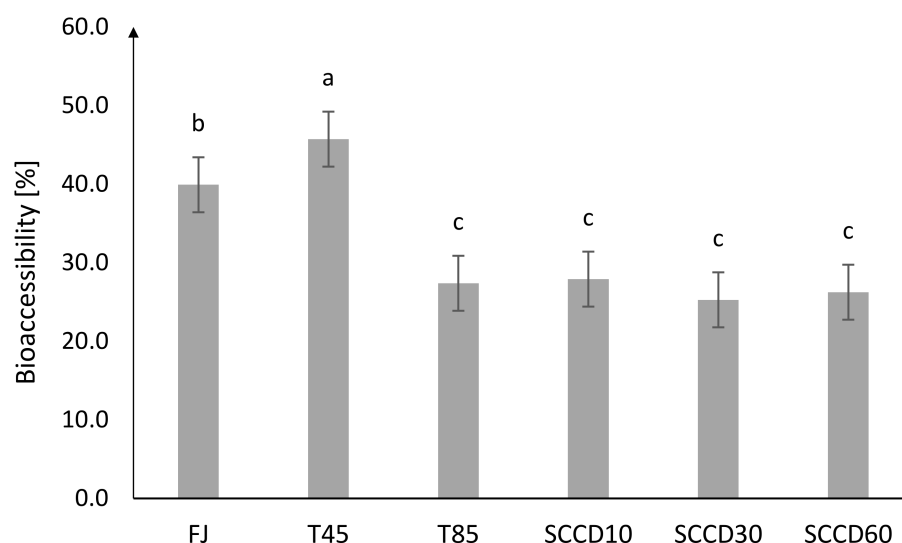


Figure 2. Bioaccessibility of total vitamin C in the dialysate after different processing: FJ-fresh juice; T45-thermal treated juice at 45 °C; T85-thermal treated juice at 85 °C; SCCD10-juice after supercritical carbon dioxide treatment at 10 MPa; SCCD30-juice after supercritical carbon dioxide treatment at 30 MPa; SCCD60-juice after supercritical carbon dioxide treatment at 60 MPa (The same letter above the bars indicates no significant difference between the mean ($p \leq 0.05$) bioaccessibility of the samples after the different type of treatment).

2.2. Stability and Bioaccessibility of Anthocyanins and Determination of Delphinidin Metabolites after In Vitro Gastro-Intestinal Digestion

The total anthocyanin content in blackcurrant juice in the control samples ranged from 1173 mg/L in the SCCD30 samples to 498 mg/L in the T85 samples (Table 2). The SCCD treatment of the juice positively influenced the retention and extractability of anthocyanins, which, regardless of the pressure applied, were higher than in the fresh juice. The best effect was obtained using SCCD treatment at 30 and 60 MPa. On the other hand, pasteurization at 85 °C definitely contributed to the degradation of anthocyanins. Thermal treatment at 45 °C did not have a significant effect on the total anthocyanin content. Four major anthocyanins were determined in the blackcurrant juice, in descending order of concentration: delphinidin-3-*O*-rutinoside (df-3-*O*-rut), cyanidin-3-*O*-rutinoside (cy-3-*O*-rut), delphinidin-3-*O*-glucoside (df-3-*O*-glu), and cyanidin-3-*O*-glucoside (cy-3-*O*-glu). Other studies confirmed that SCCD treatment allows maintaining the high stability of anthocyanins derived from plants [6], thanks to the inactivation of the polyphenol oxidases and reduction in the activity of peroxidases. Processing using the SCCD method may result in the occurrence of reversible changes in the structure of proteins, such as enzymes, and inactivate them [22]. As a result of the SCCD treatment (30 and 60 MPa, 45 °C, 30 min) on strawberry juice, anthocyanin degradation following first-order kinetics was observed. The processing temperature and time were the most important for preservation conditions followed by pressure [1]. In the other studies, SCCD treatment at 23 MPa decreased the anthocyanin content compared to the control samples of blood orange juice by about 8%, which did not differ significantly from the values obtained for the thermal treated samples (88–91 °C, 30 s). On the other hand, the application of 13 MPa showed a slight loss of anthocyanins compared to the control samples, and the stability of the anthocyanins was higher than in the pasteurized samples [16].

Table 2. Total anthocyanin content at each stage of digestion of blackcurrant juice.

	Sample	Df-3-O-glu (mg/L)	Df-3-O-rut (mg/L)	Cy-3-O-glu (mg/L)	Cy-3-O-rut (mg/L)	Total Anthocyanins (mg/L)
control	FJ	111.13 ^c ± 5.85	371.91 ^d ± 18.76	45.75 ^c ± 2.18	259.66 ^c ± 12.28	788.45 ^c ± 39.07
	T45	101.36 ^c ± 9.04	342.26 ^d ± 30.38	41.45 ^c ± 3.54	236.86 ^c ± 20.05	721.93 ^c ± 62.99
	T85	73.62 ^d ± 4.14	236.99 ^e ± 2.42	28.53 ^d ± 1.94	159.28 ^d ± 2.95	498.43 ^d ± 11.27
	SCCD10	138.80 ^b ± 19.38	460.60 ^c ± 31.44	56.08 ^b ± 7.35	306.72 ^b ± 27.17	962.20 ^b ± 25.31
	SCCD30	159.95 ^a ± 8.23	579.44 ^a ± 34.45	71.55 ^a ± 6.19	383.67 ^a ± 28.74	1173.02 ^a ± 64.69
	SCCD60	159.90 ^a ± 4.85	521.73 ^b ± 11.37	62.77 ^b ± 1.90	334.94 ^b ± 7.45	1079.34 ^a ± 25.30
oral	FJ	96.14 ^a ± 11.09	314.95 ^a ± 19.52	34.95 ^a ± 6.09	186.23 ^a ± 10.10	632.28 ^a ± 45.36
	T45	85.24 ^a ± 21.99	289.64 ^a ± 27.35	31.98 ^a ± 2.91	162.13 ^{ab} ± 18.40	568.99 ^a ± 59.44
	T85	44.97 ^b ± 13.15	153.49 ^b ± 16.45	17.25 ^b ± 5.37	105.52 ^c ± 22.08	321.23 ^b ± 27.05
	SCCD10	48.74 ^b ± 2.42	165.39 ^b ± 6.50	18.55 ^b ± 0.65	111.90 ^c ± 4.34	344.58 ^b ± 13.21
	SCCD30	49.97 ^b ± 8.19	150.17 ^b ± 2.04	19.05 ^b ± 3.26	108.77 ^c ± 10.14	327.95 ^b ± 20.68
	SCCD60	56.08 ^b ± 7.80	208.56 ^b ± 13.46	21.12 ^b ± 2.95	132.90 ^{bc} ± 9.04	418.66 ^b ± 21.29
gastric	FJ	66.37 ^a ± 6.28	237.17 ^a ± 15.89	27.14 ^a ± 2.56	165.86 ^a ± 6.94	496.55 ^a ± 26.55
	T45	54.24 ^c ± 6.95	238.86 ^a ± 13.54	22.11 ^b ± 2.31	126.41 ^c ± 16.47	441.62 ^b ± 26.36
	T85	60.33 ^{ab} ± 6.08	212.41 ^b ± 10.14	21.86 ^b ± 3.69	165.46 ^a ± 11.30	460.05 ^b ± 19.41
	SCCD10	66.57 ^a ± 1.54	228.10 ^{ab} ± 4.48	25.84 ^a ± 0.56	154.12 ^{ab} ± 3.29	474.62 ^{ab} ± 9.26
	SCCD30	62.22 ^{ab} ± 1.45	213.37 ^b ± 4.27	24.00 ^{ab} ± 0.38	143.22 ^b ± 2.57	442.82 ^b ± 8.53
	SCCD60	62.56 ^{ab} ± 2.98	212.83 ^b ± 7.91	23.97 ^{ab} ± 0.82	142.92 ^b ± 5.06	442.27 ^b ± 16.64
intestinal	FJ	1.88 ^d ± 0.73	11.11 ^c ± 1.88	1.03 ^b ± 0.31	11.53 ^b ± 1.62	25.55 ^c ± 2.30
	T45	4.13 ^a ± 0.49	18.59 ^a ± 1.83	2.27 ^a ± 0.69	17.40 ^a ± 2.55	42.39 ^a ± 5.28
	T85	3.17 ^{bc} ± 0.31	16.11 ^{ab} ± 2.67	1.91 ^a ± 0.29	15.86 ^a ± 2.33	37.04 ^{ab} ± 3.52
	SCCD10	3.40 ^{abc} ± 0.33	16.34 ^{ab} ± 1.16	2.05 ^a ± 0.10	16.91 ^a ± 0.62	38.69 ^{ab} ± 2.04
	SCCD30	3.77 ^{ab} ± 0.32	16.26 ^{ab} ± 3.04	2.03 ^a ± 0.26	16.78 ^a ± 1.80	38.83 ^{ab} ± 4.06
	SCCD60	2.80 ^c ± 0.64	12.88 ^{bc} ± 2.64	1.77 ^a ± 0.19	14.61 ^{ab} ± 1.27	32.05 ^{bc} ± 4.73
dialysate	FJ	3.63 ^a ± 0.79	15.72 ^a ± 0.95	1.93 ^a ± 0.29	13.29 ^a ± 2.11	34.56 ^a ± 3.94
	T45	1.67 ^b ± 0.14	6.53 ^c ± 0.91	1.28 ^b ± 0.14	9.98 ^b ± 0.90	19.46 ^b ± 1.63
	T85	0.96 ^b ± 0.16	4.03 ^d ± 0.93	1.08 ^b ± 0.08	8.21 ^{bc} ± 1.15	14.28 ^c ± 1.21
	SCCD10	3.96 ^a ± 0.83	12.51 ^b ± 2.27	1.76 ^a ± 0.22	13.96 ^a ± 2.59	32.19 ^a ± 5.41
	SCCD30	0.94 ^b ± 0.06	4.59 ^{cd} ± 0.25	1.04 ^b ± 0.08	8.17 ^{bc} ± 0.40	14.75 ^{bc} ± 0.73
	SCCD60	0.96 ^b ± 0.39	4.26 ^d ± 0.18	1.19 ^b ± 0.26	6.40 ^c ± 0.27	12.81 ^c ± 1.04

FJ-fresh juice; T45-thermal treated juice at 45 °C; T85-thermal treated juice at 85 °C; SCCD10-juice after supercritical carbon dioxide treatment at 10 MPa; SCCD30-juice after supercritical carbon dioxide treatment at 30 MPa; SCCD60-juice after supercritical carbon dioxide treatment at 60 MPa; df-3-O-glu-delphinidin-3-O-glucoside; df-3-O-rut-delphinidin-3-O-rutinoside; cy-3-O-glu-cyanidin-3-O-glucoside; cy-3-O-rut-cyanidin-3-O-rutinoside. The same superscripts letter indicates no significant difference between the mean ($p \leq 0.05$) in the columns within each digestion stage.

As a result of digestion at the oral stage, the total anthocyanin content decreased in all samples. In the FJ and T45 samples, there was a decrease of 20–21%, in the T85 of 36%, and in the samples treated with SCCD by as much as 61–72%. After digestion in gastric conditions, a further decrease in the total anthocyanins in the FJ and T45 samples of 22% was recorded. In the remaining samples, the anthocyanin content increased in the range of 6% in SCCD60 to 43% in T85. The total anthocyanin content after simulated gastric digestion was the highest in the FJ samples. Insignificant differences were observed in the remaining samples. The digestion at the small intestine and after dialysis stage decreased the amount of total anthocyanins in all samples by 85–90%. Less anthocyanins were absorbed by a membrane into the dialysate compared to vitamin C. The amount of anthocyanins in the dialysate was higher only in the FJ samples than detected on the other side of the membrane. Finally, insignificant differences were observed between SCCD10 and the FJ sample after dialysis.

Other studies have confirmed a decrease in anthocyanins as a result of simulated digestion. The conditions reflecting those in the stomach were the most favorable for anthocyanin stability. On the other hand, at the small intestine digestion stage, there was a significant decrease in the anthocyanin content [7,21,23]. This phenomenon was explained mainly by changes in pH, which are one of the factors that significantly influence the structural changes of anthocyanins. An alkaline pH contributes to the aglycone ring breakage and formation of insoluble polymeric brown pigments [24]. In the studies conducted on blackcurrant puree, a more pronounced increase in the anthocyanin content was noticed

during simulated gastric digestion. In a more complex matrix, containing more plant tissue and pectin than the juice, pepsin digestion and the effect of an acidic pH played a greater role in the extraction of bioactive compounds [7]. Anthocyanins are located in the vacuoles of cells, therefore, after consuming less processed fruit, the release of these compounds occurs during digestion [25].

The mechanisms of anthocyanin absorption in the gastrointestinal tract have not been thoroughly investigated. In vivo studies on humans and animals, based on the analysis of anthocyanins concentration in blood and tissues, provide evidence that, apart from the small intestine, they can be partially absorbed in the oral cavity [26], and also in a glycosidic form through the active transporters in the gastric mucosa [27]. The microbiota of the large intestine is also of great importance for the metabolism and absorption of anthocyanins [24,28].

The BAc of total anthocyanins was the highest in fresh juice (4.4%), then in the T45, T80 and SCCD10 samples (2.7–3.4%), the lowest in SCCD30 and 60 (1.3 and 1.2%) (Figure 3). SCCD did not improve the BAc of total anthocyanins compared to the thermally treated and untreated samples. The most accessible glycoside was cy-3-*O*-rut, in all types of samples. Cyanidins turned out to be more bioaccessible than delphinidins. Among the SCCD variants, the highest BAc of total anthocyanins was obtained after the application of 10 MPa. The SCCD treatment at 10 MPa improved the BAc of df-3-*O*-glu and df-3-*O*-rut compared to the samples subjected to thermal treatment at 45 and 85 °C. Peixoto et al. (2018) reported in a study of anthocyanins derived from blueberries that delphinidin derivatives were degraded by simulation of digestion and were the least bioaccessible glycoside. The greater the number of –OCH₃ groups in anthocyanin, the less susceptible the molecule was to convert or decay to undetectable forms. Consequently, these compounds were more available for absorption [29]. Delphinidin and malvidin derivatives in acetylated form maintained a high resistance to pH changes and lower degradation under digestive conditions. These can be one of the metabolites that are stable in the gastrointestinal tract and therefore enhance the antioxidant status of the blood plasma [24].

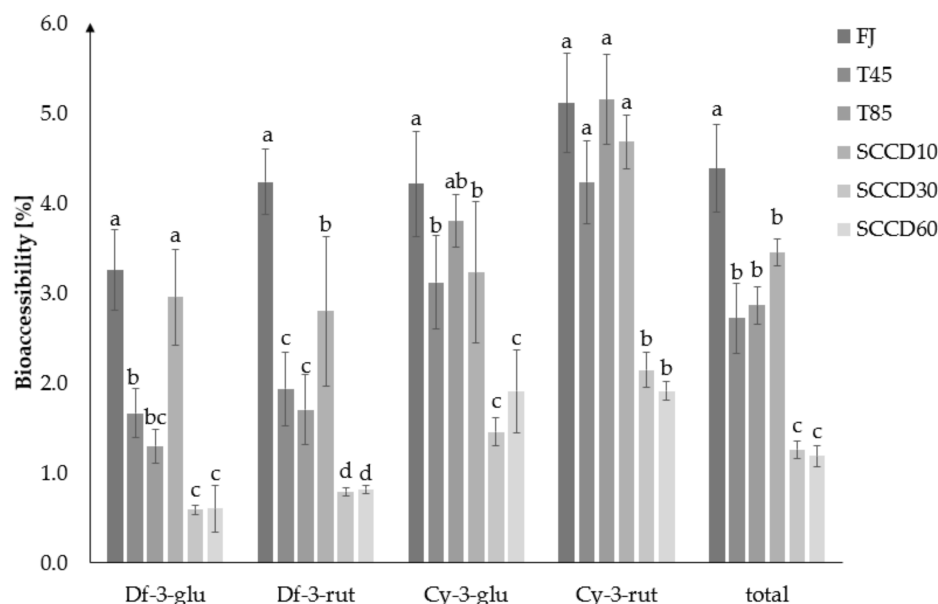


Figure 3. Bioaccessibility of blackcurrant juice anthocyanins in the dialysate after different processing: FJ-fresh juice; T45-thermal treated juice at 45 °C; T85-thermal treated juice at 85 °C; SCCD10-juice after super critical carbon dioxide at 10 MPa; SCCD30-juice after super critical carbon dioxide at 30 MPa; SCCD60-juice after super critical carbon dioxide at 60 MPa. (The same letter above the bars indicates no significant difference between the mean ($p \leq 0.05$) bioaccessibility of the samples after the different type of treatment).

Irrespective of the structure of different anthocyanins, the metabolites released after enzymatic and/or acidic hydrolysis may play an important role in human health.

To better understand this phenomenon, UPLC-PDA-MS/MS analysis were used to determine anthocyanin metabolites during digestion in model conditions (Table 3). The results obtained showed that the major metabolite of df-3-O-rut, the most abundant anthocyanin in blackcurrants, was protocatechuic acid. This compound was present in an amount possible to quantify after the first step of digestion with the use of salivary enzymes, and after simulation of gastric digestion. It was not detected in the intestinal and dialyse stage, possibly due to the low concentration caused by sequential dilutions (Table 4). Depending on the material tested, different anthocyanin metabolites have been found in the available publications. Our results have been confirmed in some in vivo studies on humans [30,31]. Mallery et al. (2011) conducted clinical studies on the effect of oral digestive conditions on metabolism and bioactivation of black raspberry anthocyanins using the LC/MS-MS technique. An analysis of the salivary samples after rinsing the mouth with preparations based on lyophilized black raspberry showed the presence of the parent anthocyanins as well as protocatechuic acid as a functional, stable metabolite, up to 4 h after administration [30]. Other studies dealt with the in vivo metabolism of cyanidin glycosides in blood orange juice (HPLC/MS/MS). A total of 44% of the metabolites detected in the blood plasma collected within 24 h after juice consumption were protocatechuic acid, a significant amount was also detected in the fecal samples, but not in the urine. It was shown that after digestion and absorption into the body, 73% of the ingested cyanidin glycosides turned into protocatechuic acid. This metabolite may have contributed to the short-term increased antioxidant capacity of blood plasma after the consumption of cyanidin-rich foods [31]. Goszcz et al. (2017) found that delphinidin was a very unstable anthocyanin ($t_{1/2} \sim 30$ min) and the main product of its degradation was gallic acid. The degradation of delphinidin was investigated by LC-MS/MS analysis of solutions incubated for 30 min in phenol red-free tissue culture medium (pH 7.4, temperature 37 °C). It was shown that at a concentration of 100 μ M of both delphinidins and gallic acid showed cytotoxicity to a cultured cell model of the human umbilical vein endothelium, and had a protective effect on the cells at lower concentrations (100 nM–1 μ M) [32]. In the in vivo studies of the metabolism of berry anthocyanins in humans, it was found that during 48 h of observation after consuming bilberry-lingonberry purée with and without oat cereals, the phenolic acid content in urine increased. Homovanillic and vanillic acids have been detected as the main metabolites of anthocyanins. As in this study, gallic acid was not found to be a breakdown product of delphinidin glycosides [33]. Other authors reported that hippuric acid was the main metabolite of anthocyanins detected in urine and the tissues of rats on a wild blueberry-enriched diet [34]. Phenolic acids are compounds that present very good antioxidant properties. The metabolites and degradation products catalyzed by the microbiota may be responsible for the health benefits attributed to anthocyanins [28].

Table 3. UPLC-PDA-MS/MS properties of delphinidin 3-O-rutinoside and protocatechuic acid as its major detectable metabolite (condition as in p. 3.4.5.2.).

No.	Compound	RT	[M – H]	Fragment Ions	Absorbance Maxima
		(Min.)	(m/z)	(m/z)	(nm)
1	Delphinidin 3-O-rutinoside	2.71	611 ⁺	303	277, 525
2	3,4-Dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid)	2.14	153 ⁻	109	260, 294

The bioavailability of anthocyanins in in vivo studies is reported to be very low, ranging from 1–2%, as they are often found only in slight amounts in urine, blood, and target organs. However, this value may be underestimated as the calculations do not consider all metabolites, activity of the microbiota in the anthocyanin's degradation, and conjugates that may have an additional effect on the bioavailability of anthocyanins. The

proven beneficial effects of consuming anthocyanin-rich foods on many health aspects further indicate the shortcomings of these data [10].

Table 4. The content of delphinidin-3-*O*-rutinoside (Df-3-*O*-rut) and protocatechuic acid at individual stages of the digestion simulation.

Stage of Digestion	Df-3- <i>O</i> -rut ($\mu\text{g/mL}$)	Protocatechuic Acid ($\mu\text{g/mL}$)
control	49.74 \pm 0.89	0.0
oral	16.25 \pm 1.34	0.63 \pm 0.02
gastric	52.66 \pm 3.25	0.44 \pm 0.02
intestinal	3.65 \pm 0.02	0.0
dialysate	0.0	0.0

In our previous studies, the BAC of anthocyanins calculated as the ratio of the substance in the dialysate to that in the control samples was very low (maximum 1.6% in fruit crushed in a mortar). No improvement in the BAC of anthocyanins was observed using HHP treatment, irrespective of pressure conditions. However, due to the possibility of absorption of the glycoside form of anthocyanins from the stomach, BAC after this digestive step was also considered. The BAC of total anthocyanins after simulation of gastric digestion was significantly higher in the samples treated with HHP than with thermal pasteurization, reaching the highest value after the application of 600 MPa (68%) [7].

There are studies showing the beneficial effect of the SCCD technique on bioaccessibility when used in the pharmaceutical industry to complex the active substance of a drug onto polymeric carriers such as silica or cyclodextrin. SCCD activation and SCCD-assisted impregnation methods have proved to be promising strategies to obtain better quality medical preparations [35]. However, with regard to food-derived substances, only sparse research was found and all of it concerned the effect of SCCD on the BAC of lipophilic compounds such as carotenoids. Zhao et al. [36] investigated the effect of SCCD at a pressure of 10, 20, and 30 MPa, at 55 °C for 10, 20, 40, and 60 min on the physicochemical properties, isomerization, and *in vitro* BAC of lycopene in tomato juice. The effect of the SCCD parameters on phenolics was different, depending on the type of compound detected. The application of 10 MPa did not show a positive effect on the total phenolic compound content compared to the control samples, but it positively influenced the caffeic and chlorogenic acid content compared to the heat-treated samples. Conditions of 20 and 30 MPa had a positive effect and in particular the use of 30 MPa for 40 and 60 min had a more positive effect on the phenolic compound content (myricinic acid, ferulic acid, naringin, and chlorogenic acid) compared to the control. The BAC of lycopene increased significantly after treatment at 20 MPa for 20, 40, 60 min compared to the control and heat-treated samples. The SCCD samples at 20 MPa for 10 min, and 10 MPa at all pressure-holding times also showed a higher BAC of lycopene than the control and thermally treated samples. Damage to the cell barriers and sample homogenization may be the reason for the improvement in BAC. SCCD supports the release of bioactive ingredients from the food matrix [36]. It was found that SCCD increased the content of *cis*-lycopene isomers, which are more accessible than the *trans* isomers. Other researchers noticed that SCCD caused an increase in the volume of the proportion of small particles, while there was a decrease in the volume of the proportion of large particles in the settling pulp of orange juice compared to untreated juice, thus having a homogenizing effect on the food matrix. The cause of this process was the induction of high internal stresses causing the breakdown of particles during CO₂ removal from the vessel [37,38]. In the research of Ubeyitogullari (2018), SCCD was used to produce low-crystallinity phytosterol nanoparticles by impregnating phytosterols into nonporous starch aerogels. The use of this technique allowed for a twenty-fold increase in the BAC of phytosterols [39]. In a study of the BAC of lycopene extracted using SCCD from tomato pomace, it was shown that it was about 2.4 times higher compared to hexane extraction. Extracts rich in *cis*-lycopene, obtained using SCCD treatment can be used to design novel functional foods while increasing the use of by-products of the tomato

processing industry [40]. SCCD processing may affect the BAC of polyphenols by increasing the extractability of these compounds under pressure. Moreover, penetration of the sample by CO₂ changes the pH of the environment to more acidic, which may contribute to the hydrolysis of polyphenols to simpler phenolic compounds [3].

2.3. Effect of Processing on the Antioxidant Capacity of Blackcurrant Juice in a Simulated Digestive System

The antioxidant capacity (AC) in control samples measured using the method with DPPH• radicals ranged from 13.90 to 15.35 μM/mL TEAC and was statistically significantly higher in FJ and SCCD treated samples compared to T85 (Figure 4). AC increased after digestion at the oral and stomach stage, and then significantly decreased after digestion in intestinal conditions and in dialysate. Following simulated oral digestion, the AC of FJ, SCCD at 10 and 60 MPa increased significantly, while SCCD at 30 MPa, T45, and T85 statistically had a significantly lower AC. After simulated gastric digestion, the AC of the FJ and T45 did not change significantly, but in the other samples the AC decreased in the range of from 11% in the SCCD-treated samples at 60 MPa to 27% in SCCD treated at 30 MPa. Due to simulated digestion in intestinal conditions and dialysate, a significant decrease in AC was noticed in all the samples. In the intestinal stage, samples treated using SCCD in all the pressure variants had similar level of AC as FJ and T45 samples and were significantly higher than T85 samples. However, no statistically significant differences were noted between the AC after dialysis.

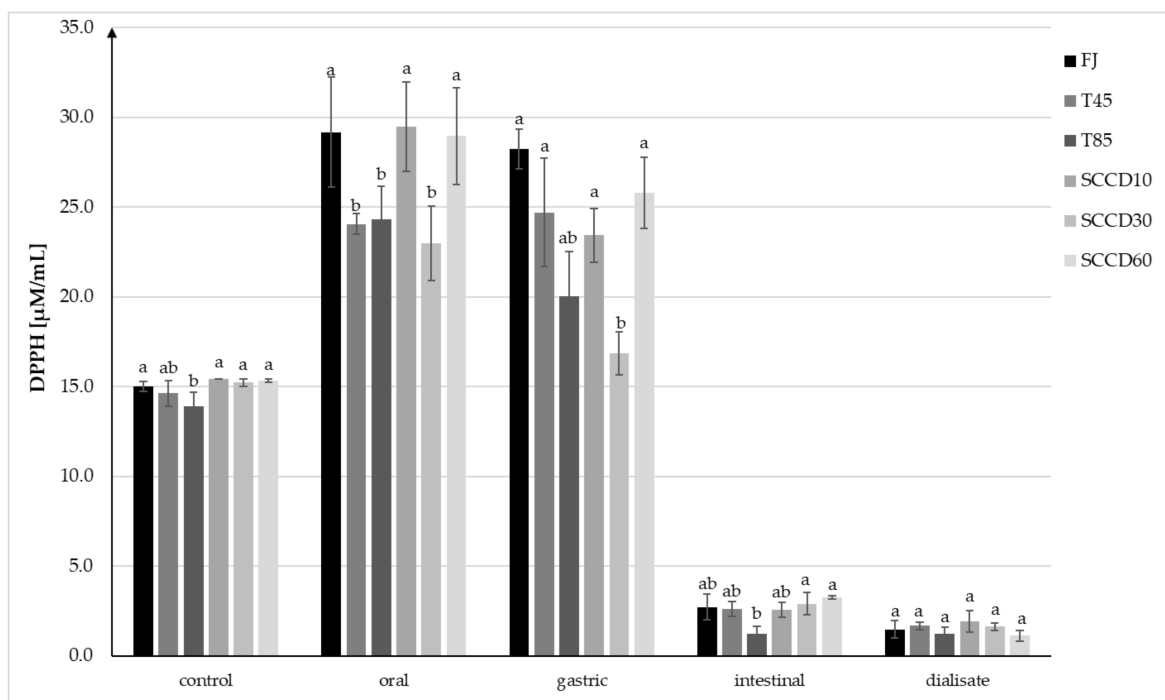


Figure 4. Antioxidant capacity (AC) of blackcurrant juice determined using the DPPH• assay at each step of digestion after different processing: FJ-fresh juice; T45-thermal treated juice at 45 °C; T85-thermal treated juice at 85 °C; SCCD10-juice after super critical carbon dioxide at 10 MPa; SCCD30-juice after super critical carbon dioxide at 30 MPa; SCCD60-juice after super critical carbon dioxide at 60 MPa. (The same letter above the bars indicates no significant difference between the mean ($p \leq 0.05$) within each digestion stage).

Similar trends in the AC changes were confirmed by the results obtained using the ABTS+• assay, but the AC was significantly higher in all the SCCD-treated samples than in those subjected to thermal treatment and FJ samples (Figure 5). After digestion at the oral stage, there was a noticeable increase of AC in FJ, T45, T85, and SCCD60. The AC changes in

SCCD10 and SCCD30 were insignificant. The highest AC after oral digestion was recorded in FJ samples, followed by SCCD, regardless of the type of pressure applied. T85 samples had the lowest AC. The increase in AC in FJ (70%) may have occurred due to the action of salivary enzymes, which contributed to the release of bioactive compounds from plant cells into the juice. Likewise, in other studies, at the earlier stages of digestion, a greater release of bioactive ingredients was noticeable in the non-processed samples. It was only at the intestinal stage that the advantage of the treated samples over the control ones in terms of antioxidant content could be observed [41]. Simulation of gastric digestion resulted in the unification of the AC to similar values in all the samples (25.4–30.3 $\mu\text{M}/\text{mL}$), with no statistically significant differences between them. Similarly to the DPPH• assay, there was a decrease in AC after the simulation of intestinal digestion; however, it was smaller than that observed using ABTS+• (ABTS+•: decrease of 39–74%; DPPH•: decrease of 83–94%). SCCD samples in all pressure variants were characterized by significantly higher AC than the samples subjected to thermal treatment and did not differ significantly from the FJ. This trend was maintained in the dialysate, with the exception of the SCCD10 sample, where the lowest AC was observed. The AC in the dialysate ranged from 8.8 to 15.3 $\mu\text{M}/\text{mL}$ TEAC, and these values were similar to those at the intestinal stage. In contrast, thermal treatment at 45 °C did not cause an increase in AC, therefore the positive effect of SCCD treatment can only be attributed only to the application of supercritical carbon dioxide.

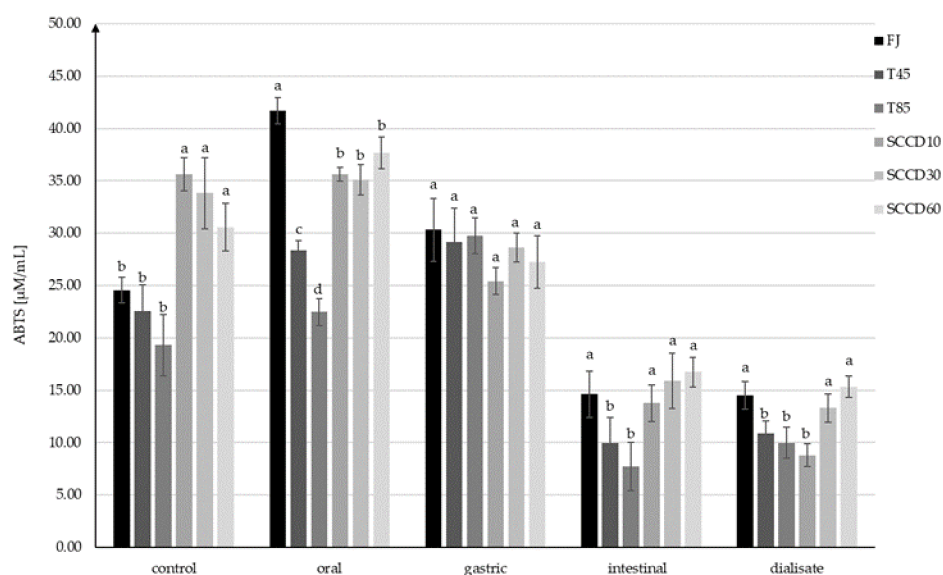


Figure 5. Antioxidant capacity (AC) using the ABTS+• assay at each step of digestion after different processing: FJ-fresh juice; T45-thermal treated juice at 45 °C; T85-thermal treated juice at 85 °C; SCCD10-juice after super critical carbon dioxide at 10 MPa; SCCD30-juice after super critical carbon dioxide at 30 MPa; SCCD60-juice after super critical carbon dioxide at 60 MPa. (The same letter above the bars indicates no significant difference between the mean ($p \leq 0.05$) within each digestion stage).

The decrease in AC at each step of the digestive tract was significant, but much lower in comparison to the anthocyanins degradation. This phenomenon can be justified by the high AC of anthocyanins metabolites, whose concentration increased after digestion. The calculated coefficient expressed as antioxidant capacity per 1 mg/L of anthocyanins in blackcurrant juice (Figure 6) indicates that the AC increased significantly in relation to 1 mg of anthocyanins per liter. Considering the calculated coefficient in the dialysate step of digestion, the AC of the SCCD60 sample was three-fold higher, and the SCCD30 sample was two-fold higher than the control's. This phenomenon may indicate the influence of SCCD on improvement the accessibility of antioxidants for digestion, thanks to which more metabolites were released and they could influence the AC of the fruit juice.

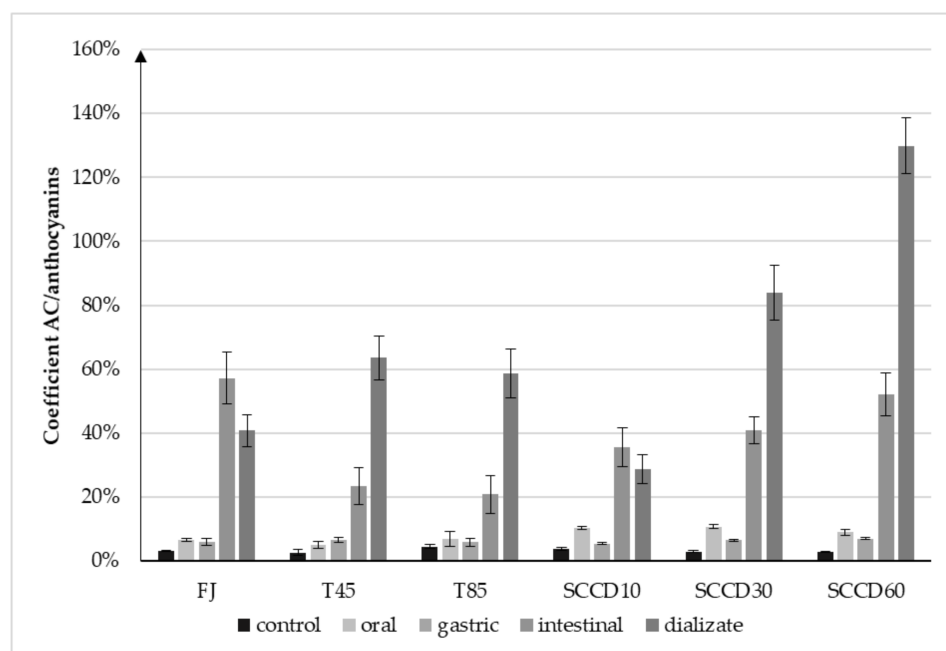


Figure 6. Coefficient of the ratio of increase the antioxidant capacity (AC) in relation to the total anthocyanins content in blackcurrant juice after different processing: FJ-fresh juice; T45-thermal treated juice at 45 °C; T85-thermal treated juice at 85 °C; SCCD10-juice after super critical carbon dioxide at 10 MPa; SCCD30-juice after super critical carbon dioxide at 30 MPa; SCCD60-juice after super critical carbon dioxide at 60 MPa.

Other authors' studies indicate the effectiveness of the SCCD method in maintaining the high antioxidant capacity of food products [42–45]. In the study of red grapefruit juice after SCCD treatment, at several pressure variants and times, no significant differences were detected in the total phenol content, ascorbic acid content, and AC compared to untreated juice [42]. Similarly, an examination of a hibiscus infusion treated using SCCD (34.5 MPa, 8% CO₂, 6.5 min and 40 °C) indicated a slight loss of anthocyanins (9%) and no significant changes in phenolic compounds or AC during 14 days of storage [43]. The AC of apple juices subjected to SCCD at 35 °C, 15 min and pressure of 15 or 25 MPa turned out to be significantly higher with the use of higher pressure. Moreover, both pressures applied improved the AC compared to the fresh samples. As mentioned before, SCCD can promote conformational changes in the secondary structure of proteins and the inactivation of tissue enzymes [44]. The lychee juice treated with SCCD (8 MPa, 36 °C, 120 s) also showed higher AC measured using FRAP and ABTS+• assays, as well as more total phenols and flavonoids compared to thermal treated juice (100 °C, 60 s), and UHT (134 °C, 4 s). Treatment with SCCD supported preservation of the bioactive compounds due to the exclusion of oxygen and a mild temperature [45].

In our previous studies, AC measured using ABTS+• radicals also increased after oral digestion and additionally the DPPH• and ABTS+• assays were in line with the improvement in AC after gastric digestion and the lowering of AC in intestinal conditions [7]. The effect of simulated gastrointestinal digestion on the content of phenolic compounds and their antioxidant capacity in wild Chilean currants was investigated. As a result of digestion, there was an approx. 50% decrease in the content of total phenols and flavonoids, and approx. 80% in anthocyanins and hydroxycinnamic acids, as well as a decrease in antioxidant activity at each stage of digestion, correlated with the loss of bioactive compounds [46]. In studies conducted on strawberry juices enriched with inulin and oligofructose, treated with ultrasound, simulated gastrointestinal digestion resulted in a decrease in the content of phenolic compounds, flavonoids, and AC at each subsequent stage of the process. However, at the stage of the small intestine, higher AC (TEAC) and

the content of the aforementioned bioactive compounds were noticed in the ultrasonically treated samples compared to the unprocessed ones [41].

The metabolites formed during the digestion of vitamin C and anthocyanins contribute remarkably to the antioxidant properties presented by the food products. For instance, protocatechuic acid detected in the samples in model conditions was the main metabolite of delphinidin-3-*O*-rutinoside. After the consumption of blood orange juice, as a source of anthocyanins, by six healthy subjects, high plasma concentrations of protocatechuic acid were noted, which contributed to an increase in short-term antioxidant activity [31]. Protocatechuic acid is one of the many metabolites that can be formed as a result of anthocyanin digestion in the gastrointestinal tract. The pathway of its formation from delphinidin-3-*O*-rutinoside is shown in Figure 7, according to available publications [6,47].

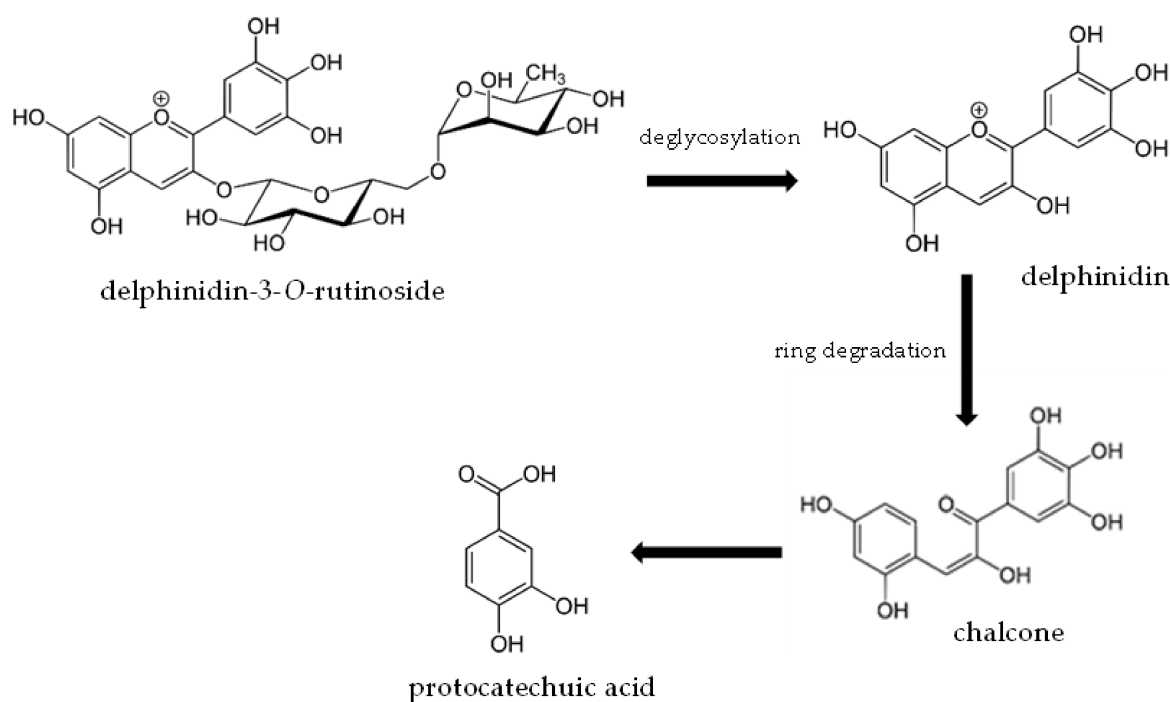


Figure 7. Proposed pathway for the formation of protocatechuic acid from delphinidin-3-*O*-rutinoside in the gastrointestinal tract.

Bouayed et al. (2011) [23] showed that the AC (FRAP and ABTS+•) of antioxidants in apples after digestion with dialysis was about 50% lower than the values originally contained in the pre-digested sample. According to available studies, AC is correlated with the antioxidant content at a given stage of digestion. In addition, AC is influenced by environmental conditions such as pH, the interactions of antioxidants with other matrix components (iron and other mineral ions, dietary fiber, proteins), and the chemical structure of the compounds. The free radical scavenging activity of polyphenols depends on the number and position of the hydrogen donating hydroxyl groups on the aromatic rings of the molecules. Therefore, aglycones indicate a higher AC than their glycosides [23].

It has also been found that due to its low stability, delphinidin does not have a significant influence on AC, but its metabolites may be responsible for strong antioxidant properties. The parent compound is not necessary to obtain high AC. This explains the paradox of the low bioavailability of polyphenols, including anthocyanins, while exerting strong antioxidant effects and health benefits [32].

3. Materials and Methods

3.1. Reagents and Solvents

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) was the supplier of the dialysis tubing cellulose membrane (avg. flat width 25 mm) and most of the enzymes and reagents, as follows: mucin from the porcine stomach—type II, α -amylase, heat-stable, (TDF-100A, 24,975 U/mL), pepsin from the porcine gastric mucosa (250 U/mg solid), pancreatin from the porcine pancreas (8 \times USP specifications), porcine bile extract, sodium dodecyl sulfate—ACS reagent, sodium bicarbonate $\geq 99.5\%$, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid, diammonium salt (ABTS+• radical), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH• radical), (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid (Trolox), DL-dithiothreitol (HPLC) (DTT), phosphoric acid 85%, acetonitrile (HPLC), formic acid $\geq 95.0\%$, and sodium hydroxide pellets $\geq 98.0\%$, (NaOH).

Other reagents were obtained from Chempur (Piekary Śląskie, Poland), such as: di-sodium hydrogen phosphate anhydrous pure p.a. $\geq 99.0\%$ (Na_2HPO_4), di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), sodium chloride pure p.a. $\geq 99.9\%$ (NaCl) and di-sodium edetate standard solution 0.01 mol/L (EDTA). Hydrochloric acid pure p.a. ACS reagent 37% (HCl) and potassium peroxodisulfate $\geq 99.0\%$ were purchased from Honeywell Fluka (Seelze, Germany). Ethanol—96% CZDA and methanol (HPLC grade) came from Avantor (Gliwice, Poland).

3.2. Testing Material

Preparation of Blackcurrant Juice

The research material was juice made from frozen blackcurrants (*Ribes nigrum* L.) of the *Tisel* cultivar, which is of Polish origin and bought from the local wholesaler. To produce blackcurrant juice, the fruit was enzymatically treated with a pectinolytic preparation (Klerzyme 150, DSM, Lille, France) for 1.5 h at 45 °C, and then squeezed in a hydraulic layer press (Tako, Czestochowa, Poland). The juice was transferred into 250 mL glass bottles and divided into six portions. The first was left without further processing (FJ). The second was heated to 45 °C for 10 min (T45), the third was pasteurized at 85 °C for 10 min (T85), both thermal processes were carried out in a laboratory pasteurizer (Labo Play, Bytom, Poland). The next portions were treated with supercritical carbon dioxide in the batch system using a Spe-ed SFE 4 (Applied Separations, Allentown, PA, USA). The method consists of placing the sample in a thermostatic pressure chamber, to pump CO_2 at the applicable pressure, and then leave it for a specified period of time to ensure penetration. Three pressure variants were applied: 10, 30, and 60 MPa for 10 min, at 45 °C (SCCD10, SCCD30, SCCD60). Selected pressure parameters cover the entire operating range of the device, from minimum to maximum, with the optimal duration time of the process. Pasteurization carried out at 85 °C for 10 min is a widely used method of preserving fruit products in bath pasteurization. Mild heat treatment at 45 °C was used to exclude the influence of temperature in the treatment using SCCD. The samples were frozen before carrying out further research. Samples not subjected to digestion were considered to be control samples.

3.3. In Vitro Digestion Model with Dialysis and Calculation of Bioaccessibility

In vitro gastrointestinal digestion was conducted according to a slightly modified method presented by Buniowska et al. (2017) [48] and international consensus on the in vitro digestion method suitable for food [14]. Three replications of the juice samples, and distilled water as a blank sample, were poured into dark glass bottles and mixed with 5 mL of salivary enzyme solution (2.38 g of Na_2HPO_4 , 0.19 g of K_2HPO_4 , 8 g of NaCl, 100 mg of mucin and α -amylase with enzymatic activity 200 U/L, solution per 1 L of distilled water). The pH of the solution was then adjusted (HI 211 m, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) to 6.75 ± 0.20 by adding HCl (12 mol/L) or NaOH (2 mol/L). The solution was incubated in a shaking water bath (Labo Play, SWB 8N, Bytom, Poland) at 37 °C and 90 rpm for 10 min. Gastric digestion was then performed by adding pepsin solution and adjusting

the pH to 2.0 with HCl (12 mol/L) and again incubating for 2 h. A total of 20 mL of each gastric digestion sample was placed in a clean bottle, titrated with NaOH (2 mol/L) to pH 5.00 ± 0.20 , and 5 mL of pancreatin (1 g/L) and bile solution (25 g/L) were added to carry out the intestinal phase. The previously prepared dialysis membranes (cellulose, width 25 mm, length 30 cm) filled with 25 mL of NaHCO₃ solution (0.5 M, pH 7.5) were immersed in the digested samples. The samples were incubated once more for 2 h under the same conditions. In order to finish the digestion simulation, the samples were cooled in an ice bath for 10 min. Samples were taken from each phase of the simulated digestion and frozen and stored until analysis. The dialysate solution inside the membrane is part of the sample potentially accessible to get into the bloodstream. Bioaccessibility (BAc) was determined using Equation (1) and is expressed as a percentage.

$$\text{BAc [\%]} = 100 \times (\text{BC}_{\text{digested}} / \text{BC}_{\text{non-digested}}) \quad (1)$$

Equation (1). Calculation of bioaccessibility (BAc—bioaccessibility of bioactive compound; BC_{digested}—the concentration of bioactive compound in the digested sample; BC_{non-digested}—the concentration of bioactive compound in the non-digested sample).

3.4. Chemical Analysis

3.4.1. Determination of Vitamin C

The vitamin C content was determined as a sum of L-ascorbic acid (AA) and L-dehydroascorbic acid (DHAA) according to the method introduced by Odriozola-Serrano et al. (2007) [49]. The sample was diluted using 0.01% phosphoric acid and filtered on a disposable syringe filter (0.45 µm, Macherey-Nagel, Düren, Germany). A solution of dithiothreitol (DTT) (1 g/L in 0.01% phosphoric acid) was used as the reducing agent to indicate the sum of AA and DHAA. Samples mixed with DTT in a 1:1 proportion were kept for 1 h in a dark place and at 4 °C before further analysis. The devices used for the analysis were: Waters chromatographic system (Milford, MA, USA), 2695 Separations Module, 2995 Photodiode Array Detector, Sunfire C 28 column, 5 µm, 4.6 mm × 250 mm with reversed phase and Sunfire C18 Sentry guard insert, 5 µm, 4.6 mm × 20 mm (both Waters, Milford, MA, USA). Samples were eluted isocratically using 0.01% phosphoric acid at a flow rate of 1 mL/min. Compounds were quantified using UV absorption at 245 nm. The amount of DHAA was calculated based on the difference between the sum of both acids and AA.

3.4.2. Determination of Anthocyanins

The total anthocyanin content and their individual monomers were determined according to the method presented by Oszmiański (2002) [50]. The equipment and column used for the analysis were the same as described before in Section 3.4.1. The sample injection was 10 µL, and the analysis time was 26 min, the column was heated to 25 °C as before. A 4.5% aqueous formic acid solution (A) and an 80% acetonitrile solution in the previous formic acid solution (B) at a flow rate of 1.0 mL/min were the eluent. Anthocyanins were quantified using vis absorption at 520 nm. The amount of anthocyanins was calculated as cyanidin-3-glucoside.

3.4.3. Antioxidant Capacity According to the ABTS+• Radical Assay

The method described by Re et al. (1999) [51] was the principle used to determine the antioxidant capacity with the ABTS+• radical. A total of 18 h before starting the analyses, a cationic radical solution was prepared by combining 7 mM ABTS+• and 2.45 mM potassium persulfate and was kept in a dark place. The radical solution was diluted with ethanol to an absorbance of 0.740–0.750 at a wavelength of 734 nm. The 1 mg/mL solution of Trolox in ethanol was the reference material, which was also used to prepare the standard curve. During the analysis, 0.025 mL of the sample, or distilled water as a blank, was dispensed into cuvettes, 2.5 mL of ABTS+• radical solution was added, mixed thoroughly,

and incubated at 30 °C for 6 min. Absorbance was measured at 734 nm in ethanol. The antioxidant capacity was determined using Equation (2) and expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC). The absorbance was measured with the use of a Pharmacia Biotech UV/Vis spectrophotometer, model Ultrospec 2000 (Amersham, UK).

$$AC [\mu\text{M}/\text{mL}] = ((A_0 - A_s) \times 100 \times a \times D)/1000 \quad (2)$$

Equation (2). Calculation of antioxidant capacity (AC) (A_0 —absorbance of the blank; A_s —absorbance of the sample; a —coefficient from the standard curve ($y = ax$); D —dilution carried out during sample preparation and in the cuvette).

3.4.4. Antioxidative Capacity According to DPPH• Radical Assay

The method presented by Yen and Chen (1995) [52] was the guideline used to determine the antioxidant capacity with the DPPH• radical. A solution of the DPPH• radical (1 mM) in methanol was prepared 3 h before starting the analyses and left to incubate in a dark place. After this time, it was diluted with 80% methanol to obtain a concentration of 0.1 mM and an absorbance in the range of 0.700–0.800. A standard curve was prepared using Trolox dissolved in methanol (1 mg/mL). A total of 2 mL of DPPH• solution and 0.1 mL of juice, or a blank sample, were mixed in a cuvette. After incubation at room temperature in the dark for 30 min, the absorbance of the samples was measured at 517 nm. A Pharmacia Biotech spectrophotometer (Ultrospec 2000; Amersham, UK) was also used this time. The antioxidant capacity was determined using Equation (2) and expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC).

3.4.5. Determination of Anthocyanin Metabolites in a Model System Preparation of the Delphinidin-3-*O*-Rutinoside Solution

In order to recognize the metabolites that are formed after anthocyanin digestion, an aqueous solution of 0.05 mg/mL of delphinidin-3-*O*-rutinoside (Df 3-*O*-rut) was prepared and subjected to simulated digestion in the same conditions as the blackcurrant juice. The solution was subjected to LC-MS/MS analysis before digestion and after each digestion step.

LC-MS/MS Analysis

The analysis was carried out according to the methodology developed by Kapusta et al. (2018) [53]. Anthocyanin metabolites were investigated using a UPLC-PDA-MS/MS Waters ACQUITY system (Waters, Milford, MA, USA), with binary pump manager, sample manager, column manager, PDA detector, and tandem quadrupole mass spectrometer (TQD) with electrospray ionization (ESI). The separation was performed using a BEH C18 column (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 μm, Waters) kept at 50 °C. The applied solvents were: 2% formic acid in water *v/v* (mobile phase A) and 2% formic acid in 40% acetonitrile in water *v/v* (mobile phase B). The gradient program was set as follows: 0 min 5% B, 0–8 min linear to 100% B, 8–9.5 min for washing and return to initial conditions. Before injection, samples were filtered through a membrane filter (0.45 μm, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) and injected directly into a chromatographic column. The injection volume was 5 μL (partial loop with needle overfill) and the flow rate was 0.35 mL/min. The parameters applied for TQD were: capillary voltage 3.5 kV; cone voltage 30 V in positive and negative mode; the source was maintained at 250 °C and the desolvation temperature was 350 °C; cone gas flow 100 L/h; and desolvation gas flow 800 L/h. Argon was used as the collision gas at a flow rate of 0.3 mL/min. The detection and identification of chemical compounds were based on characteristic PDA spectra, mass to charge ratio and ion fragments formed after collision-induced dissociation (CID). The quantitative analysis was possible only for one compound and was based on specific MS transitions in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. The most intense transitions 611 > 303 were used for the quantification. Quantification was performed by injecting a standard solution of certain concentration ranging from 0.05 to 5 mg/mL. External standard calibration lines

were generated by three repeated injections of standard solutions at seven concentration levels (0.05; 0.1; 0.25; 0.5; 1; 2.5; and 5 mg/L) at 1 day. A plot of peak area with respect to the corresponding concentration was used to demonstrate linearity. The linear regression equation and correlation coefficient were calculated by weighted ($1/x^2$) least-squares linear regression analysis. Linearity was considered to be acceptable when correlation coefficients were $R^2 \leq 0$. Waters MassLynx software v.4.1 was used for data acquisition and processing.

3.5. Statistical Analysis

A statistical analysis of the results obtained was carried out using the Statistica 7.1 program (StatSoft, Tulsa, OK, USA). A one-way analysis of variance with the ANOVA test and a significance analysis of the differences in mean values were performed using Tukey's test with a confidence level of $\alpha = 0.05$. Each sample was digested in three independent trials and analyzed in duplicate.

4. Conclusions

Supercritical carbon dioxide (SCCD) processing at 10, 30, and 60 MPa for 10 min and 45 °C contributed to an improvement in the stability of vitamin C, total anthocyanins, and antioxidant capacity (AC) measured using the ABTS+• assay in blackcurrant juices. Thermal treatment at 85 °C was insignificant for the stability of vitamin C, but caused a significant degradation of total anthocyanins and a decrease in AC. As a result of simulated gastrointestinal digestion in the *in vitro* model, ascorbic acid was gradually oxidized to dehydroascorbic acid, and the total vitamin C and anthocyanin content decreased. No improvement in the BAC of vitamin C and total anthocyanins was reported after SCCD treatment. The positive effect of SCCD at 10 MPa was noted for the BAC of glycosides: delphinidin-3-*O*-glucoside and delphinidin-3-*O*-rutinoside compared to thermal-treated samples. Overall, cyanidins were more bioaccessible than delphinidins, led by cyanidin-3-*O*-rutinoside in all sample types. An inverse correlation between AC and BAC of antioxidants was noted. This may indicate the formation of metabolites that were impossible to detect, but showed a high antioxidant value. The calculated BAC concerns dialysate compounds in the parent form, while they may have degraded to undetectable forms that are still of high antioxidant value. The UPLC-PDA-MS/MS analysis of the digested delphinidin-3-*O*-rutinoside extract showed that the main metabolite of this glycoside is protocatechuic acid, distinguished by its high antioxidant activity. SCCD is a non-thermal processing technique that increases the extractivity of bioactive compounds and reduces their degradation by penetrating the sample using CO₂ at supercritical state, while displacing oxygen, and inactivating tissue enzymes. The significantly higher antioxidant activity in the SCCD samples, especially at 30 and 60 MPa, than in the thermal samples, suggests that this technique may be an effective method of improving the health value of antioxidant-rich products.

Author Contributions: Conceptualization, U.T., K.M. and M.B.; methodology, K.M. and M.B.; formal analysis, U.T. and I.K.; investigation, U.T.; data curation, U.T. and I.K.; writing—original draft preparation, U.T.; writing—review and editing, K.M. and S.S.; supervision, K.M., M.B. and S.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original data presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Marszałek, K.; Skapska, S.; Woźniak, Ł.; Sokółowska, B. Application of Supercritical Carbon Dioxide for the Preservation of Strawberry Juice: Microbial and Physicochemical Quality, Enzymatic Activity and the Degradation Kinetics of Anthocyanins during Storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2015**, *32*, 101–109. [[CrossRef](#)]
2. Marszałek, K.; Woźniak, Ł.; Skapska, S. Effect of Supercritical Carbon Dioxide on Selected Quality Parameters of Preserved Strawberry Juice. *Zywnosc Nauka Technol. Jakosc* **2015**, *21*, 114–123. [[CrossRef](#)]
3. Marszałek, K.; Woźniak, Ł.; Barba, F.J.; Skapska, S.; Lorenzo, J.M.; Zambon, A.; Spilimbergo, S. Enzymatic, Physicochemical, Nutritional and Phytochemical Profile Changes of Apple (*Golden Delicious* L.) Juice under Supercritical Carbon Dioxide and Long-Term Cold Storage. *Food Chem.* **2018**, *268*, 279–286. [[CrossRef](#)]
4. Xue, Z.; Li, J.; Yu, W.; Lu, X.; Kou, X. Effects of Nonthermal Preservation Technologies on Antioxidant Activity of Fruits and Vegetables: A Review. *Food Sci. Technol. Int.* **2016**, *22*, 440–458. [[CrossRef](#)]
5. Marszałek, K.; Doesburg, P.; Starzonek, S.; Szczepańska, J.; Woźniak, Ł.; Lorenzo, J.M.; Skaopska, S.; Rzoska, S.; Barba, F.J. Comparative Effect of Supercritical Carbon Dioxide and High Pressure Processing on Structural Changes and Activity Loss of Oxidoreductive Enzymes. *J. CO₂ Util.* **2019**, *29*, 46–56. [[CrossRef](#)]
6. Marszałek, K.; Woźniak, Ł.; Kruszewski, B.; Skapska, S. The Effect of High Pressure Techniques on the Stability of Anthocyanins in Fruit and Vegetables. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 277. [[CrossRef](#)]
7. Trych, U.; Buniowska, M.; Skapska, S.; Starzonek, S.; Marszałek, K. The Bioaccessibility of Antioxidants in Black Currant Puree after High Hydrostatic Pressure Treatment. *Molecules* **2020**, *25*, 3544. [[CrossRef](#)]
8. Li, L.; Li, S.; Hu, C.; Zhou, L.; Zhang, Y.; Wang, M.; Qi, Z. BKCa Channel Is a Molecular Target of Vitamin C to Protect against Ischemic Brain Stroke. *Mol. Membr. Biol.* **2019**, *35*, 9–20. [[CrossRef](#)]
9. Diaconeasa, Z.; Leopold, L.; Rugină, D.; Ayvaz, H.; Socaciu, C. Antiproliferative and Antioxidant Properties of Anthocyanin Rich Extracts from Blueberry and Blackcurrant Juice. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 2352–2365. [[CrossRef](#)]
10. Lila, M.A.; Burton-Freeman, B.; Grace, M.; Kalt, W. Unraveling Anthocyanin Bioavailability for Human Health. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2016**, *7*, 375–393. [[CrossRef](#)]
11. Nour, V.; Trandafir, I.; Ionica, M.E. Ascorbic Acid, Anthocyanins, Organic Acids and Mineral Content of Some Black and Red Currant Cultivars. *Fruits* **2011**, *66*, 353–362. [[CrossRef](#)]
12. Rashid, K.; Wachira, F.N.; Nyabuga, J.N.; Wanyonyi, B.; Murilla, G.; Isaac, A.O. Kenyan Purple Tea Anthocyanins Ability to Cross the Blood Brain Barrier and Reinforce Brain Antioxidant Capacity in Mice. *Nutr. Neurosci.* **2014**, *17*, 178–185. [[CrossRef](#)]
13. Stahl, W.; Van Den Berg, H.; Arthur, J.; Bast, A.; Dainty, J.; Faulks, R.M.; Gärtner, C.; Haenen, G.; Hollman, P.; Holst, B.; et al. Bioavailability and Metabolism. In *Molecular Aspects of Medicine*; Azzì, A., Ed.; Pergamon Press: Oxford, UK, 2002; Volume 23, pp. 39–100.
14. Minekus, M.; Alvinger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; et al. A Standardised Static in vitro Digestion Method Suitable for Food—an International Consensus. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1113–1124. [[CrossRef](#)]
15. Oulé, K.M.; Dickman, M.; Arul, J. Properties of Orange Juice with Supercritical Carbon Dioxide Treatment. *Int. J. Food Prop.* **2013**, *16*, 1693–1710. [[CrossRef](#)]
16. Fabroni, S.; Amenta, M.; Timpanaro, N.; Rapisarda, P. Supercritical Carbon Dioxide-Treated Blood Orange Juice as a New Product in the Fresh Fruit Juice Market. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2010**, *11*, 477–484. [[CrossRef](#)]
17. Rodríguez-Roque, M.J.; Rojas-Graü, M.A.; Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. Changes in Vitamin C, Phenolic, and Carotenoid Profiles throughout in Vitro Gastrointestinal Digestion of a Blended Fruit Juice. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1859–1867. [[CrossRef](#)]
18. Pérez-Vicente, A.; Gil-Izquierdo, A.; García-Viguera, C. In Vitro Gastrointestinal Digestion Study of Pomegranate Juice Phenolic Compounds, Anthocyanins, and Vitamin C. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2308–2312. [[CrossRef](#)]
19. Vallejo, F.; Gil-Izquierdo, A.; Pérez-Vicente, A.; García-Viguera, C. In Vitro Gastrointestinal Digestion Study of Broccoli Inflorescence Phenolic Compounds, Glucosinolates, and Vitamin C. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 135–138. [[CrossRef](#)]
20. Rodríguez-Roque, M.J. *In Vitro Bioaccessibility of Health-Related Compounds from Beverages Based on Fruit Juice, Milk or Soymilk: Influence of Food Matrix and Processing*; Universitat de Lleida: Lleida, Spain, 2014.
21. Lingua, M.S.; Wunderlin, D.A.; Baroni, M.V. Effect of Simulated Digestion on the Phenolic Components of Red Grapes and Their Corresponding Wines. *J. Funct. Foods* **2018**, *44*, 86–94. [[CrossRef](#)]
22. Pozo-Insfran, D.d.; Balaban, M.O.; Talcott, S.T. Inactivation of Polyphenol Oxidase in Muscadine Grape Juice by Dense Phase-CO₂ Processing. *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 894–899. [[CrossRef](#)]
23. Bouayed, J.; Hoffmann, L.; Bohn, T. Total Phenolics, Flavonoids, Anthocyanins and Antioxidant Activity Following Simulated Gastro-Intestinal Digestion and Dialysis of Apple Varieties: Bioaccessibility and Potential Uptake. *Food Chem.* **2011**, *128*, 14–21. [[CrossRef](#)]
24. Correa-Betanzo, J.; Allen-Vercoe, E.; McDonald, J.; Schroeter, K.; Corredig, M.; Paliyath, G. Stability and Biological Activity of Wild Blueberry (*Vaccinium Angustifolium*) Polyphenols during Simulated in Vitro Gastrointestinal Digestion. *Food Chem.* **2014**, *165*, 522–531. [[CrossRef](#)]
25. Fernandes, I.; Faria, A.; de Freitas, V.; Calhau, C.; Mateus, N. Multiple-Approach Studies to Assess Anthocyanin Bioavailability. *Phytochem. Rev.* **2015**, *14*, 899–919. [[CrossRef](#)]

26. Sigurdson, G.T.; Giusti, M.M. The Stability and Absorption of Anthocyanins in the Mouth. In *Anthocyanins from Natural Sources*; Brooks, M.S., Celli, G.B., Eds.; The Royal Society of Chemistry: London, UK, 2019; pp. 186–215.
27. Fernandes, I.; Faria, A.; Calhau, C.; de Freitas, V.; Mateus, N. Bioavailability of Anthocyanins and Derivatives. *J. Funct. Foods* **2014**, *7*, 54–66. [[CrossRef](#)]
28. Fang, J. Bioavailability of Anthocyanins. *Drug Metab. Rev.* **2014**, *46*, 508–520. [[CrossRef](#)]
29. Peixoto, F.M.; Senna Gouvêa, A.; de Araújo Santiago, M.C.; de Sá Velosos Martins, Z.E.; Galhardo Borguini, R.; de Oliveira Godoy, R.L. Characterization and Bioaccessibility of Anthocyanins from Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) after Simulated Gastro-Intestinal Digestion: A Positive Effect on Malvidin Derivatives. *Fruits* **2018**, *73*, 101–109. [[CrossRef](#)]
30. Mallery, S.R.; Budendorf, D.E.; Larsen, M.P.; Pei, P.; Tong, M.; Holpuch, A.S.; Larsen, P.E.; Stoner, G.D.; Fields, H.W.; Chan, K.K.; et al. Effects of Human Oral Mucosal Tissue, Saliva, and Oral Microflora on Intraoral Metabolism and Bioactivation of Black Raspberry Anthocyanins. *Cancer Prev. Res.* **2011**, *4*, 1209–1221. [[CrossRef](#)]
31. Vitaglione, P.; Donnarumma, G.; Napolitano, A.; Galvano, F.; Gallo, A.; Scalfi, L.; Fogliano, V. Protocatechuic Acid Is the Major Human Metabolite of Cyanidin-Glucosides. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 2043–2048. [[CrossRef](#)]
32. Goszcz, K.; Deakin, S.J.; Duthie, G.G.; Stewart, D.; Megson, I.L. Bioavailable Concentrations of Delphinidin and Its Metabolite, Gallic Acid, Induce Antioxidant Protection Associated with Increased Intracellular Glutathione in Cultured Endothelial Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–17. [[CrossRef](#)]
33. Nurmi, T.; Mursu, J.; Heinonen, M.; Nurmi, A.; Hiltunen, R.; Voutilainen, S. Metabolism of Berry Anthocyanins to Phenolic Acids in Humans. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2274–2281. [[CrossRef](#)]
34. Del Bò, C.; Ciappellano, S.; Klimis-Zacas, D.; Daniela, M.; Claudio, G.; Riso, P.; Porrini, M. Anthocyanin Absorption, Metabolism, and Distribution from a Wild Blueberry-Enriched Diet (*Vaccinium Angustifolium*) Is Affected by Diet Duration in the Sprague-Dawley Rat. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 2491–2497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kankala, R.K.; Zhang, Y.S.; Wang, S.B.; Lee, C.H.; Chen, A.Z. Supercritical Fluid Technology: An Emphasis on Drug Delivery and Related Biomedical Applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1700433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Zhao, W.; Sun, Y.; Ma, Y.; Zhao, X. Dense Phase Carbon Dioxide Treatment of Tomato Juice: Effect on Physico-Chemical Properties, Phenolic Composition, Lycopene Isomerisation and in Vitro Bioaccessibility. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2019**, *54*, 1658–1669. [[CrossRef](#)]
37. Briongos, H.; Illera, A.E.; Sanz, M.T.; Melgosa, R.; Beltrán, S.; Solaesa, A.G. Effect of High Pressure Carbon Dioxide Processing on Pectin Methyl-esterase Activity and Other Orange Juice Properties. *LWT—Food Sci. Technol.* **2016**, *74*, 411–419. [[CrossRef](#)]
38. Niu, L.; Hu, X.; Wu, J.; Liao, X.; Chen, F.; Zhao, G.; Wang, Z. Effect of Dense Phase Carbon Dioxide Process on Physicochemical Properties and Flavor Compounds of Orange Juice. *J. Food Process. Preserv.* **2010**, *34*, 530–548. [[CrossRef](#)]
39. Ubeiyitogullari, A. *Enhancing Bioaccessibility of Phytosterols Using Nanoporous Starch Aerogels and Supercritical Carbon Dioxide*; The University of Nebraska: Lincoln, NE, USA, 2018.
40. Vallecilla Yopez, L.; Yopez, V. *Increasing Cis-Lycopene Content of the Oleoresin from Tomato Processing Byproducts Using Supercritical Carbon Dioxide and Assessment of Its Bioaccessibility*; University of Nebraska: Lincoln, NE, USA, 2017; Volume 89.
41. Cassani, L.; Gerbino, E.; Moreira, M.d.R.; Gómez-Zavaglia, A. Influence of Non-Thermal Processing and Storage Conditions on the Release of Health-Related Compounds after in Vitro Gastrointestinal Digestion of Fiber-Enriched Strawberry Juices. *J. Funct. Foods* **2018**, *40*, 128–136. [[CrossRef](#)]
42. Ferrentino, G.; Plaza, M.L.; Ramirez-Rodrigues, M.; Ferrari, G.; Balaban, M.O. Effects of Dense Phase Carbon Dioxide Pasteurization on the Physical and Quality Attributes of a Red Grapefruit Juice. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, E333–E341. [[CrossRef](#)]
43. Ramirez-Rodrigues, M.M.; Plaza, M.L.; Azeredo, A.; Balaban, M.O.; Marshall, M.R. Phytochemical, Sensory Attributes and Aroma Stability of Dense Phase Carbon Dioxide Processed Hibiscus Sabdariffa Beverage during Storage. *Food Chem.* **2012**, *134*, 1425–1431. [[CrossRef](#)]
44. Porto, C.D.; Decorti, D.; Tubaro, F. Effects of Continuous Dense-Phase CO₂ System on Antioxidant Capacity and Volatile Compounds of Apple Juice. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, *45*, 1821–1827. [[CrossRef](#)]
45. Liu, L.; Zeng, Q.; Zhang, R.; Wei, Z.; Deng, Y.; Zhang, Y.; Tang, X.; Zhang, M. Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Litchi Juice Treated by High Pressure Carbon Dioxide and Thermal Processing. *Food Sci. Technol. Res.* **2015**, *21*, 41–49. [[CrossRef](#)]
46. Burgos-Edwards, A.; Jiménez-Aspee, F.; Thomas-Valdés, S.; Schmeda-Hirschmann, G.; Theoduloz, C. Qualitative and Quantitative Changes in Polyphenol Composition and Bioactivity of *Ribes Magellanicum* and *R. Punctatum* after in Vitro Gastrointestinal Digestion. *Food Chem.* **2017**, *237*, 1073–1082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Prior, R.L. Fruits and Vegetables in the Prevention of Cellular Oxidative Damage 1-5. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 570S–578S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Buniowska, M.; Carbonell-Capella, J.M.; Frigola, A.; Esteve, M.J. Bioaccessibility of Bioactive Compounds after Non-Thermal Processing of an Exotic Fruit Juice Blend Sweetened with Stevia Rebaudiana. *Food Chem.* **2017**, *221*, 1834–1842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Odriozola-Serrano, I.; Hernández-Jover, T.; Martín-Belloso, O. Comparative Evaluation of UV-HPLC Methods and Reducing Agents to Determine Vitamin C in Fruits. *Food Chem.* **2007**, *105*, 1151–1158. [[CrossRef](#)]
50. Oszmianski, J. Stabilizacja i Zastosowanie Barwnika Antocyjanowego Aronii Do Barwienia Napoi. *Acta Sci. Polonorum. Technol. Aliment.* **2002**, *1*, 37–45.

51. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
52. Yen, G.C.; Chen, H.Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 27–32. [[CrossRef](#)]
53. Kapusta, I.; Cebulak, T.; Oszmiański, J. Characterization of Polish Wines Produced from the Interspecific Hybrid Grapes Grown in South-East Poland. *Eur. Food Res. Technol.* **2018**, *244*, 441–455. [[CrossRef](#)]

Article

Bioaccessibility of Betalains in Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Juice under Different High-Pressure Techniques

 Urszula Trych ^{1,*} , Magdalena Buniowska-Olejnik ²  and Krystian Marszałek ^{1,3,*} 

¹ Department of Fruit and Vegetable Product Technology, Prof. Waclaw Dabrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, 36 Rakowiecka St., 02-532 Warsaw, Poland

² Department of Dairy Technology, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszow, Ćwiklinskiej 2D St., 35-601 Rzeszow, Poland

³ Department of Food Technology and Human Nutrition, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszow, 2D Zelwerowicza St., 35-601 Rzeszow, Poland

* Correspondence: urszula.trych@ibprs.pl (U.T.); krystian.marszalek@ibprs.pl (K.M.)

Abstract: The influence of high hydrostatic pressure (HHP) and supercritical carbon dioxide (SCCD) on the bioaccessibility of betalains in beetroot (*Beta vulgaris* L.) juice was investigated. Freshly squeezed juice (FJ) was treated at a mild temperature of 45 °C for 10 min (T45), pasteurization at 85 °C for 10 min (T85), HHP at 200, 400, and 500 MPa at 20 °C for 5 min (HHP200, HHP400, HHP500) and SCCD at 10, 30 and 60 MPa at 45 °C for 10 min (SCCD10, SCCD30, SCCD60). The juice was subjected to an in vitro digestion system equipped with dialysis. The content of betalains was measured with the aid of a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), the antioxidant capacity (AC) (ABTS•+, DPPH•) was analyzed during each digestion step, and the bioaccessibility of betacyanins and betaxanthins was assessed. The SCCD at 30 and 60 MPa significantly increased pigments' bioaccessibility compared with other samples. The 30 MPa proved particularly advantageous, as it increased the bioaccessibility of the total betacyanins and the betaxanthins by 58% and 64%, respectively, compared to the T85 samples. Additionally, higher bioaccessibility of betacyanins was noted in HHP200 and HHP400, by 35% and 32%, respectively, compared to FJ, T45, and T85 samples. AC measured by ABTS•+ and DPPH• assays were not unequivocal. However, both assays showed significantly higher AC in SCCD60 compared to T85 (21% and 31%, respectively). This research contributed to the extended use of the HHP and/or SCCD to design food with higher health-promoting potentials.

Keywords: bioaccessibility; high hydrostatic pressure; supercritical carbon dioxide; beetroot; betalains; antioxidant capacity; in vitro digestion model



Citation: Trych, U.;

Buniowska-Olejnik, M.; Marszałek, K.

Bioaccessibility of Betalains in

Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Juice under

Different High-Pressure Techniques.

Molecules **2022**, *27*, 7093. [https://](https://doi.org/10.3390/molecules27207093)

doi.org/10.3390/molecules27207093

Academic Editor: Lesław Juszczyk

Received: 9 September 2022

Accepted: 14 October 2022

Published: 20 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Beetroots (*Beta vulgaris* L.) are vegetables extremely rich in bioactive compounds with numerous pro-health properties [1,2], used in producing juices, ready-to-eat, frozen, or dried products, and are also used to obtain natural red food pigments. The leading group of phenolic compounds in beetroots are betalains as heterocyclic and water-soluble nitrogen-containing tyrosine-derived pigments with two subgroups: betaxanthins, yellow-orange pigments, and betacyanins responsible for red-purple color. The basis of the structure of these compounds is betalamic acid [4-(2-oxoethylidene)-1,2,3,4-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylic acid], derived from the cleavage of the aromatic ring of dihydroxyphenylalanine (DOPA) [3,4]. Red beets are among the top ten vegetables with the greatest antioxidant properties. Their consumption is recommended in order to prevent cancer and cardiovascular diseases [5,6]. Numerous studies reported health benefits such as strong anti-inflammatory and antibacterial effects, lowering blood pressure, and reducing low-density lipoprotein (LDL) levels [7–10]. Betalains are sensitive to pH changes, heat, light, and oxygen. Therefore, the matter of interest is the investigation of emerging food

processing techniques to preserve betalains-rich products and improve the absorption of these pigments in the digestive system [8].

High Hydrostatic Pressure (HHP) is a food processing technique considered an alternative to thermal preservation, which is successfully used to damage pathogenic and spoilage microflora and reduce the activity of tissue enzymes responsible for browning reactions. In addition, it can assist the preservation of thermolabile bioactive ingredients, such as antioxidants, and retains sensory properties similar to the fresh product [11,12]. Supercritical Carbon Dioxide (SCCD) is a technique used in industry to extract selected compounds (caffeine, hops extracts, essential oils). However, this technique could be proposed as a good alternative for HHP and thermal pasteurization [13]. It can inactivate native microflora and significantly decrease tissue enzymes while the bioactive compounds are remained untouched. Due to the penetration of supercritical carbon dioxide into the sample, the tissues are physically disrupted, the cell membranes are modified, and the pH inside the cells is reduced. Therefore, the intracellular compounds could be extracted easily [14–16]. Depending on the process parameters, high pressure may increase, decrease or completely inhibit the activity of tissue enzymes. The decrease in enzyme activity is directly proportional to the pressure applied, and these reactions are most often described according to the first-order kinetic reactions [17]. The main limitation in using the HHP and SCCD techniques for preserving fruit and vegetable products is still incomplete knowledge of the parameters ensuring full inactivation of endogenous enzymes with high bar resistance. In addition, products are HHP treated in plastic packaging, and applying this technique in a continuous system is difficult. The SCCD treatment can only be used to preserve liquid foods, such as fruit and vegetable juices, beer, and milk, as processing the whole fruit causes significant tissue damage [12,13].

The concept of “bioaccessibility” is defined as the fraction of components released from the food matrix in the gastrointestinal tract and then possible to be absorbed by the intestinal epithelium cells and metabolized [18]. The calculation of bioaccessibility is essential to assess the intake of vitamins and other bioactive compounds into the body. Analyzing the bioaccessibility of antioxidants in high-pressure processed fruit and vegetable products may help design functional food with increased pro-health values. The most accurate model for bioaccessibility is in vivo studies with the human body simulation. However, it is associated with bioethical commissions and the complications with the standardization and comparability of research. Therefore, in vitro studies are valuable in the initial assessment of bioaccessibility, allowing an insight into the processes that may occur due to pH conditions and gastrointestinal enzymes. Cell cultures (e.g., Caco-2), centrifugation, or semi-permeable dialysis membranes are most often used to assess the absorption of substances into the bloodstream [18,19].

Increased awareness of the impact of diet on preventing civilization diseases like obesity, cardiovascular diseases, and cancer additionally emphasizes the importance of efforts to improve the bioaccessibility of bioactive compounds. In the current in vitro investigation, it is assumed that processing of beetroot juice under selected SCCD and HHP parameters may improve the bioaccessibility of betalains and antioxidant properties of juice after gastrointestinal digestion. In this context, this is the first study regarding the influence of SCCD and HHP on the bioaccessibility of betalains in the beetroot juice matrix.

2. Results and Discussion

2.1. Effect of HHP and SCCD on Betalains Content in Comparison to Thermal Treatment

Betanin, isobetanin, and neobetanin from the betacyanins, and vulgaxanthin I and vulgaxanthin II from betaxanthins were identified as the most abundant pigments in beetroot juice. Several compounds from the betaxanthin group, which were not identified qualitatively, were also detected (Supplementary Materials Figures S2 and S3). The betacyanins content in all betalains was as high as 88%; 86% ($\pm 1\%$) was represented by betanins. Betaxanthins constituted only 12% of total betalains, whereas vulgaxanthin I was the most common compound from this group of pigments (77% $\pm 1\%$). The juice treatment with

both non-thermal techniques had no significant effect on the betalains composition. On the other hand, the same techniques significantly influenced the concentration and stability of betalains during simulated digestion. The content of betacyanins (betanin, isobetanin, and neobetanin) in fresh beetroot juice was 893 mg/L (Figure 1), whereas the content of betaxanthins was only 128 mg/L (Figure 2). These data are supported by other studies where authors reported betalains concentration in the range 800–1300 mg/L of fresh beetroot juice, with the highest concentration of betaxanthins being 75–95% and the lowest betacyanins approximately 5–25%, depending on the beetroot variety [3,20].

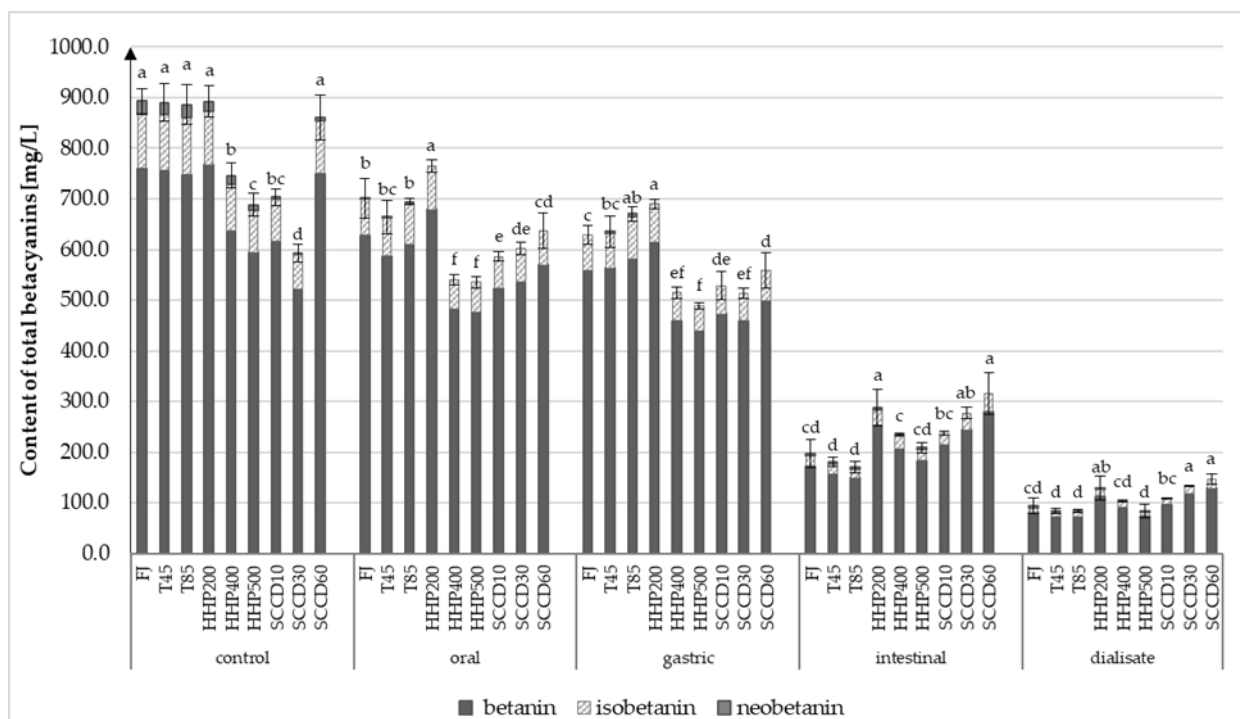


Figure 1. Content of total betacyanins (betanin, isobetanin, and neobetanin) in beetroot juice after different processing on every stage of simulated gastro-intestinal digestion. FJ—untreated juice; T45—thermal treatment of sample at 45 °C; T85—pasteurized sample at 85 °C; HHP200—sample subjected to HHP at 200 MPa; HHP400—sample subjected to HHP at 400 MPa; HHP500—sample subjected to HHP at 500 MPa; SCCD10—sample treated by SCCD at 10 MPa; SCCD30—sample treated by SCCD at 30 MPa; SCCD60—sample treated SCCD at 60 MPa. (Different letters over the bars indicate significant differences between total betacyanins content at each step of simulated digestion ($p \leq 0.05$)).

The content of both groups of these bioactive compounds in the fresh juice (FJ) did not differ significantly from the samples heated at 45 °C (T45) and 85 °C (T85). Other investigations proved that mild heating at temperatures below 50 °C should not affect the betacyanins. Moreover, betacyanins were not degraded by the short heat treatment (up to 3 min) even at 80 °C. However, the thermal treatment of beetroot at 90 °C for 3 min contributed to a decrease in the concentration of betacyanins by 25%. In contrast, the extension of the duration of the process to 10 min did not affect further betalains degradation [21]. High temperatures cause betanin degradation into betalamic acid and cyclo-DOPA. Isobetanin may also be found as a product of this degradation reaction. This hypothesis is very likely, as a slight increase in its content was noted in the T85 samples (5%). Most of the thermal reactions of degradation of betanin are reversible, depending on the initial betanin content, temperature, and acidity of the environment. The acidic environment favors the regeneration of betanin to its original form [21,22].

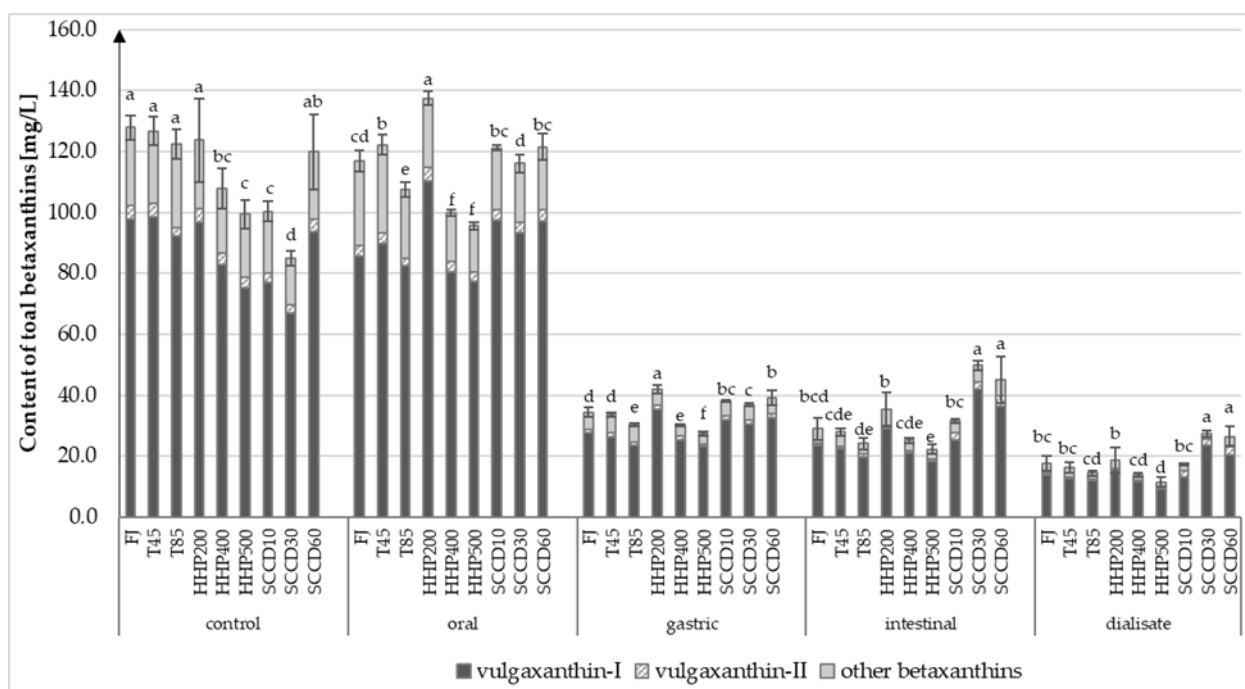


Figure 2. Content of total betaxanthins (vulgaxanthin-I, vulgaxanthin-II, and other betaxanthins) in beetroot juice after different processing on every stage of simulated gastro-intestinal digestion. T45—thermal treatment of sample at 45 °C; T85—pasteurized sample at 85 °C; HHP200—sample subjected to HHP at 200 MPa; HHP400—sample subjected to HHP at 400 MPa; HHP500—sample subjected to HHP at 500 MPa; SCCD10—sample treated by SCCD at 10 MPa; SCCD30—sample treated by SCCD at 30 MPa; SCCD60—sample treated by SCCD at 60 MPa. (Different letters over the bars indicate significant differences between total betaxanthins content at each step of simulated digestion ($p \leq 0.05$)).

Similarly, to thermal treatment, HHP at 200 MPa and SCCD at 60 MPa were able to maintain the content of betacyanins and betaxanthins at a not statistically different level from fresh juice samples. Employing HHP at 400 and 500 MPa and SCCD at 10 and 30 MPa significantly affected the betalain content in beetroot juice compared to the other treatment parameters in both techniques. Both betacyanins and betaxanthins were equally sensitive to the aforementioned high-pressure processing parameters. The content of these pigments decreased in samples HHP400, HHP500, SCCD10, and SCCD30 compared to the FJ samples by 16%, 23%, 21%, and 34%, respectively. The lowest content of these compounds was recorded in SCCD30 samples.

Depending on the applied parameters of HHP, other researchers noted both decreases [23,24] and increases [25,26] in betalain content. Sokołowska et al. (2017) [23] noted a decrease in betacyanins by 11.3–12.2% and betaxanthins by 7.7–8.9% in beetroot juice after application of high pressure at 300, 400, and 500 MPa for 10 min and the temperature up to 26 °C. It was found that betaxanthins were also more stable under HHP than betacyanins [23]. There is a hypothesis that higher degradation of these compounds may be caused by a baro-induced increase in oxygen in the sample, which may result in a decrease in the betalains content caused by faster oxidation processes. This hypothesis was confirmed by other authors who used HHP at 650 MPa, for at least 15 min. Moreover, they noted that prolonging the processing time from 15 to 30 min increased the betanins content compared to the control and blanched samples [25].

Considering HHP, the higher pressure resulted in the greater loss of betalain, unlike in SCCD, where the content of betalain in the SCCD60 samples was similar to the FJ samples. This phenomenon can be explained by the fact that the penetration of samples by supercritical CO₂ under 10 and 30 MPa contributed to the reduction in free forms of

betalains. At the same time, 60 MPa caused the release of betalains from the plant vacuoles and bounded in with proteins, fiber, or other carbohydrates. The obtained results indicate that the extraction of these compounds exceeded their degradation in the case of the highest-pressure parameters applied in the SCCD treatment of not from concentrate (NFC) beetroot juice. Higher pressures in the SCCD treatment contribute to a greater inactivation of tissue enzymes, which also prevents further degradation of bioactive compounds [3,4,14].

Liu et al. (2010) [27] analyzed the influence of SCCD in a continuous system in the pressure range of 4.5–30 MPa on, inter alia, the stability of betalains in red beet extracts. Continuous SCCD treatment at 30 MPa resulted in a significant decrease in betanin and isobetanin concentration by about 20%, similar to the present study [27]. In previous studies of the same research group, the content of betalains in the beetroot extract was examined after applying SCCD in a batch system at 37.5 MPa and 55 °C for 60 min or pasteurization at 95 °C and 5 min. The authors observed that SCCD treatment significantly decreased betanin, isobetanin, vulgaxanthin I, and II content by 7, 13, 17, and 19%, respectively. The thermal treatment not only resulted in a slight degradation of betacyanins but also increased the concentration of betaxanthins by about 14%. The spectrophotometric color measurement showed a greater proportion of yellow pigments in the blanched extracts, which was consistent with the increase in betaxanthins content and confirmed that these compounds might have been formed from other compounds under thermal treatment [28]. Studies on the effect of SCCD and thermal treatment on the degradation of betanin and isobetanin in aqueous solutions have shown that the degradation of these compounds follows first-order kinetic reactions. SCCD combined with a temperature of 45 °C (up to 66 °C) accelerated the degradation of betalains compared to thermal treatment alone [29]. Marszałek et al. (2017) [17] noticed a reduction in the betalains in beetroot juice after SCCD processing, along with increasing pressure, time, and temperature parameters. Under the most demanding conditions (60 MPa, 55 °C, 30 min), the degradation of betacyanins and betaxanthins reached 58% and 32%, respectively [17].

2.2. Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on Betalains Content in Beetroot Juice after Different Treatment

The decrease in betacyanins by 22% ($\pm 5\%$) during the simulated oral digestion was noted in all samples except the SCCD30. In the gastric digestion stage, the content of these compounds remained at a similar level, whereas a significant decrease was noted after the intestinal digestion step (the smallest decrease by 44% in the SCCD60 and 74% in the T85 samples, compared to the gastric digestion stage). Regarding betaxanthins, the conditions prevailing at the stage of simulated mouth digestion did not adversely influence the stability of these compounds. However, at the gastric digestion step, a significant decrease was observed (av. 70% $\pm 2\%$) compared to the oral digestion stage. As a result of simulated intestinal digestion, betaxanthins were further degraded by 17% ($\pm 2\%$), except for SCCD30 and SCCD60 samples (higher content of these compounds was noticed). Betaxanthins are more sensitive to an acidic environment than betacyanins, which have been mentioned in other studies [21,30]. Concerning betacyanin, an average of 46% ($\pm 3\%$) of the compounds passed the membranes during the dialysis step.

The highest concentration of betacyanins in the intestinal phase and dialysate was recorded in SCCD30, SCCD60, and HHP200 samples. It was reported that about 56% ($\pm 3\%$) of initial concentration betaxanthins were detected in dialysate, whereas the highest content was detected in SCCD30 and SCCD60 samples. It means that SCCD technology improves the bioaccessibility of betaxanthins significantly. At the same time, the lowest content of betacyanins was noticed in thermally treated samples T45, T85, and HHP500. Moreover, the lowest content of betaxanthins was noted in HHP500 samples. Da Silva et al. (2019) [31] noted a gradual decrease in the betanin content after digesting the purified beetroot juice extract by 7% in the simulated oral cavity, 35% in the stomach, and 46% in the intestines, compared to the initial sample [31]. A purified extract could have contributed to greater exposure of betanins to acidic pH and a greater decrease in betanins content in the gastric stage

compared to current findings with NFC (not from concentrate) juice. This phenomenon can be justified by a much higher concentration of other compounds like fiber in NFC juice compared to juice extracts. In the studies by Tesoriere et al. (2008) [30] on fresh and processed cactus pear fruit and beetroot and purified extracts, a protective impact of the matrix on the stability of betacyanins in simulated gastric digestion was demonstrated. In contrast, the matrix did not affect the stability of vulgaxanthin I, which was gradually degraded due to simulated digestion [30]. In the present study, the decrease in betacyanin and betaxanthin content after gastrointestinal digestion was similar among the samples treated in the same way. The loss of those pigments reached approximately 72% ($\pm 5\%$) in the HHP samples and approximately 79% ($\pm 1.5\%$) in the FJ, T45 and T85 samples compared to the initial content. In the SCCD samples, both pigments' content decreased due to digestion by approximately 65% (± 3), except in the SCCD30 sample, where betaxanthines decreased was only 41% and betacyanins by 53%. Other studies regarding *in vitro* gastrointestinal digestion of beetroot juice reported a 96% loss of betacyanin and 73% loss of betaxanthin [32] as well as a 98.6% decrease in the total betalain content [33]. In the gastrointestinal tract, betalains can undergo decarboxylation, isomerization, or cleavage [32]. As their major metabolites, the betalain precursors (betalamic acid and cyclo-DOPA), 17-decarboxy-neobetanin, and 6'-*O*-feruloyl betanin were identified in the *in vitro* study [33]. Betalains are sensitive to light, oxygen, the activity of tissue enzymes, and high temperatures. They are also the most stable at pH 3–7. Their stability and extraction also depend on the structure and matrix of the tissue as well as the concentration of pigments [4].

2.3. Bioaccessibility of Betalains after HHP and SCCD Treatment in Comparison to Thermal Treatment

The bioaccessibility (BAC) of the total betacyanins ranged from 9.5% in the T45 and T85 samples to 22.6% in the SCCD30 samples. The BAC of total betaxanthins ranged from 11.5% and 11.8% in HHP500 and T85, respectively, to 32.3% in SCCD30 (Figure 3). Despite the higher initial stability of betaxanthins in fresh juice and thermal treated samples, the highest losses due to digestion were noted. The SCCD30 samples showed the highest BAC of betacyanin and betaxanthins despite the initially lowest stability of these compounds in the samples before digestion. Higher BAC of betacyanin and betaxanthins also distinguished the samples subjected to SCCD at 10 and 60 MPa than the others. The use of HHP improved the BAC of betacyanin compared to FJ, T45, and T85 but did not improve the BAC of betaxanthins. Among the HHP samples, 200 MPa had the most beneficial effect on the BAC of both groups of betalains.

No similar studies were conducted about HHP and SCCD on the BAC of betalains pigments in red beetroot juices. There is only one study on the effects of HHP on BAC of betalains from prickly pear fruit [34], as well as scarce studies on the effects of other emerging techniques on betalains BAC [35]. Other reports consider the effect of high-pressure processing on the BAC of different hydrophilic bioactive ingredients, including previous research by our team [36–39]. The BAC of betacyanins and betaxanthins varies due to differences in their chemical structure. Desseva et al. (2020) [32] reported a significantly lower recovery of betacyanins (approx. 4%) compared to betaxanthins (approx. 27%) in *in vitro* gastrointestinal digestion. The BAC of betalains also depends on the glycosylation of these compounds and accompanying components in the diet. In this group of pigments, betanin and betanidin are compounds with the highest antioxidant properties. Consumption of even tiny amounts of these compounds (in micromoles) by humans and animals reduces the oxidation processes of the lipid layer of cell membranes and inhibits heme decomposition processes in hemoglobin, myoglobin, and cytochromes [21]. The intestinal absorption of betalains is primarily mediated by direct diffusion. The concentration of betacyanins in the blood serum is low concerning the consumed dose, suggesting impaired absorption of these compounds. Some betalain digestion products are transported by protein conveyors, with energy expenditure. It is assumed that betacyanins are absorbed into the bloodstream unchanged and are not conjugated with glucuronic acid or sulphates [21,40].

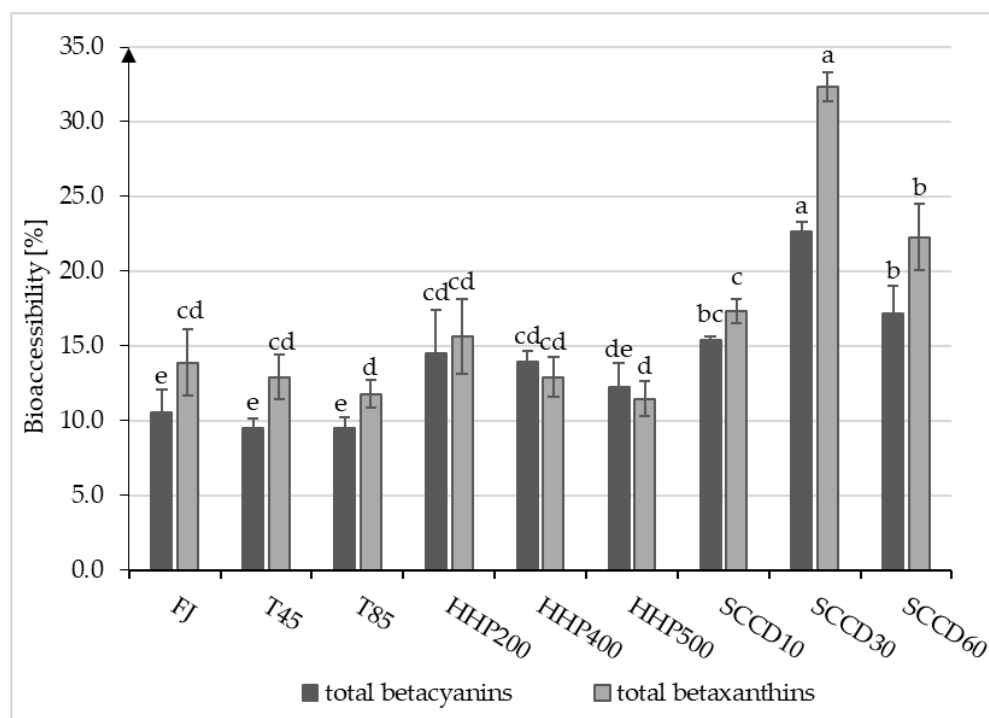


Figure 3. Bioaccessibility (Bac) of total betacyanins and total betaxanthins from beetroot juice after different processing: T45—thermal treatment of sample at 45 °C; T85—pasteurized sample at 85 °C; HHP200—sample subjected to HHP at 200 MPa; HHP400—sample subjected to HHP at 400 MPa; HHP500—sample subjected to HHP at 500 MPa; SCCD10—sample treated by SCCD at 10 MPa; SCCD30—sample treated by SCCD at 30 MPa; SCCD60—sample treated by SCCD at 60 MPa. (Different letters over the bars indicate significant differences between the mean bioaccessibility of betacyanins and betaxanthins ($p \leq 0.05$)).

In *in vivo* studies on rats administered intragastrically fermented beetroot juice found that both native and metabolized betacyanins can be absorbed through the gastric mucosa cells. Betanin, isobetanin, neobetainin, betanidines, and decarboxylated forms of betacyanins were largely detected in the gastric fluids and the blood and urine of rats [40]. In studies involving 10 healthy men who consumed beetroot juice or whole beets, no betanin was detected in the blood plasma. However, NO_x levels increased 8 h after juice consumption [41].

Gomez-Maqueo et al. (2021) [34] demonstrated a positive impact of HHP at 350 MPa and 5 min on the Bac of betanin from prickly pear fruit pulp. Depending on the fruit variety, an increase of 20–27% was noted compared to non-treated samples. On the other hand, there was no improvement in the Bac of indicaxanthin and peel-derived betalain. Using parameters 100 and 600 MPa simultaneously did not bring positive results. The Bac was calculated from the non-treated samples to the samples centrifuged after intestinal digestion. Similar to our research, the effect of pressure parameters on Bac was irrespective of the initial content of these compounds before digestion. These results were justified by an increase in the extractability of bioactive compounds from plant tissue and changes in the components of the fruit matrix, such as soluble dietary fiber, which could increase the stability of betalains in the digestive system [34]. The HHP treatment can reduce the amount of polyphenol complexes with proteins compared to thermally treated samples, which may increase the Bac of polyphenols [36]. Our previous research focused on the influence of HHP and SCCD treatment on the Bac of anthocyanins and vitamin C in blackcurrant juice/puree, indicating that both techniques can improve the Bac of bioactive compounds, depending on the parameters used. The improvement of bioaccessibility as a result of different high-pressure processing methods may occur due to increased extraction

of bioactive compounds from the tissue as well as binding them with macromolecular compounds such as fiber or pectin. The metabolites formed during digestion significantly impact the products' antioxidant properties [37,38].

2.4. The Influence of Treatment on the Antioxidant Properties of Beetroot Juice in an In Vitro Model of the Gastrointestinal Digestion

The antioxidant capacity (AC) in the non-digested beetroot juice, according to analysis using DPPH• radicals, was the highest in HHP200 and FJ samples (about 7.6 $\mu\text{M}/\text{mL}$) (Figure 4). The application of other techniques (thermal, HHP, or SCCD) contributed to the reduction in the AC of beetroot juice compared to FJ samples. The lowest AC measured by the DPPH• assay was noted in HHP400 samples (5.00 $\mu\text{M}/\text{mL}$). After in vitro oral digestion, a notable AC reduction in all samples ranging from 37% in HHP400 to 74% in T85 was noticed. On the other hand, under the conditions prevailing during simulated gastric digestion, an increase in AC was remarked in all samples by 56% ($\pm 10\%$) compared to the previous digestion step. In the samples treated by HHP, the AC reached a value greater than before digestion, which may indicate the release of metabolites of compounds with high AC. After digestion in the intestine conditions, the AC measured by the DPPH• assay decreased by 66% ($\pm 7\%$). The highest AC in the dialysate was achieved by SCCD30 and SCCD60 samples (2.74 and 2.78 $\mu\text{M}/\text{mL}$, respectively), and the lowest by FJ samples (1.65 $\mu\text{M}/\text{mL}$). The AC of the SCCD10 and HHP500 samples was statistically significantly higher than those treated at 400 and 200 MPa and heat treated at 45 °C and 85 °C. In the DPPH• assay, the correlation between the AC and the total betalains in the beetroot juice was noticeable.

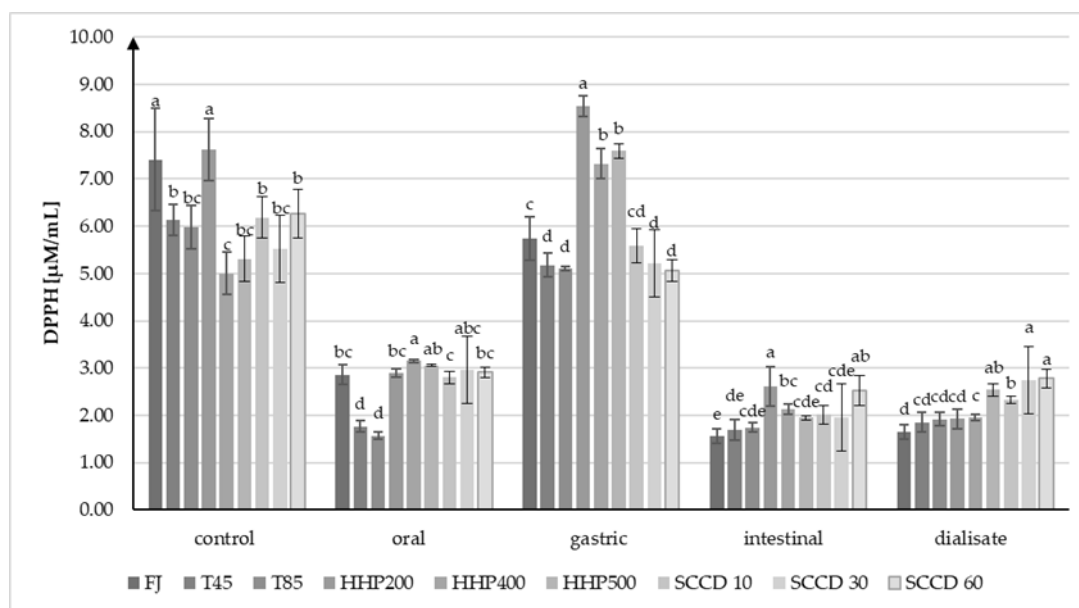


Figure 4. Results of DPPH• analysis of antioxidant properties (AC) of beetroot juice after different treatments on every stage of simulated digestion. FJ—untreated juice; T45—thermal treatment of sample at 45 °C; T85—pasteurized sample at 85 °C; HHP200—sample subjected to HHP at 200 MPa; HHP400—sample subjected to HHP at 400 MPa; HHP500—sample subjected to HHP at 500 MPa; SCCD10—sample treated by SCCD at 10 MPa; SCCD30—sample treated by SCCD at 30 MPa; SCCD60—sample treated by SCCD at 60 MPa. (Different letters over the bars indicate significant differences between the mean antioxidant capacity at each step of simulated digestion ($p \leq 0.05$)).

The AC in the control samples measured by the ABTS•+ assay was the highest in SCCD60 (9.81 $\mu\text{M}/\text{mL}$) and was not statistically significantly different from SCCD10 and HHP200 (Figure 5). The samples after thermal treatment at 85 °C, HHP400, HHP500, and

SCCD30 had lower AC than the FJ samples. The lowest AC was recorded in HHP500 samples (7.41 $\mu\text{M}/\text{mL}$). The ABTS $\bullet+$ assay did not indicate a decline in AC after digestion with the salivary enzymes and oral pH. Contrary to the DPPH \bullet method, there was a decline in AC caused by simulated gastric digestion compared to the previous digestion step, from 15% in T85 to 37% in SCCD60 samples. The exception is the AC of the HHP200 sample, which increased by 9% compared to the oral digestion stage while reaching the highest value. Simulated intestinal digestion increased the AC in all samples compared to gastric digestion. In addition, dialyzed samples reached higher AC than before dialyze, except for samples after SCCD treatment, where the AC remained at a similar level. This might be caused by the attendance of compounds characterized by high antioxidant activity in the dialysate. Despite the decreasing stability of betalains due to unfavorable conditions in the gastrointestinal tract, their antioxidant properties have not been lost, as the metabolites of these compounds are still distinguished by high antioxidant activity. Following the ABTS $\bullet+$ assay, the highest AC in the dialysate was found in the SCCD60 samples (10.87 $\mu\text{M}/\text{mL}$). They were not statistically significantly different from the AC of the FJ, T45, and HHP200 samples. The lowest AC was recorded in HHP500 samples (7.96 $\mu\text{M}/\text{mL}$). The results of the AC obtained with ABTS $\bullet+$ and DPPH \bullet methods are not unequivocal.

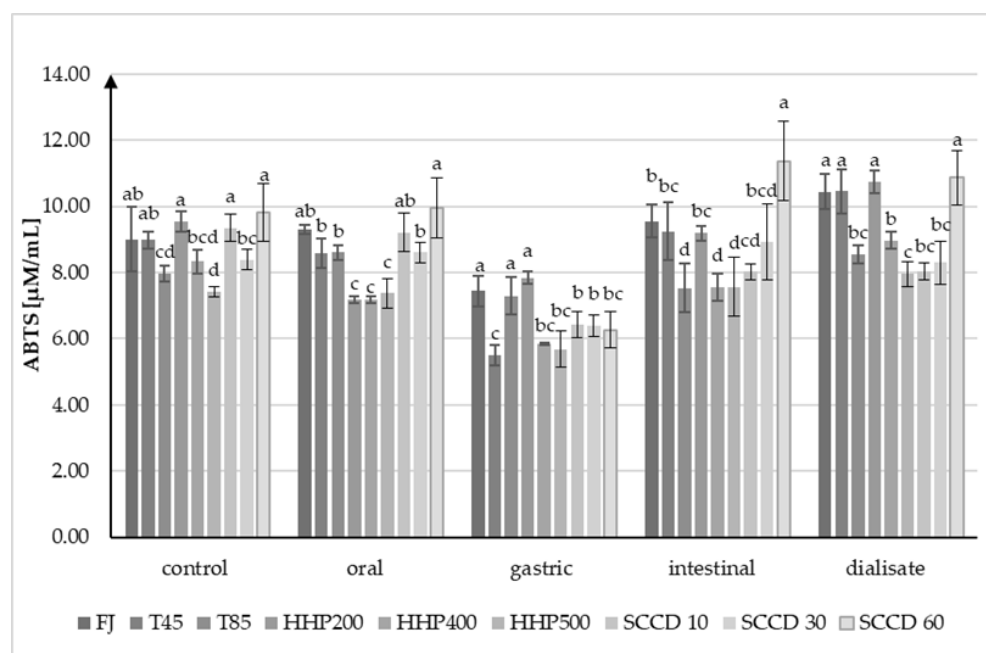


Figure 5. Results of ABTS $\bullet+$ analysis of antioxidant properties (AC) of beetroot juice after different treatments on every stage of simulated digestion. FJ—untreated juice; T45—thermal treatment of sample at 45 °C; T85—pasteurized sample at 85 °C; HHP200—sample subjected to HHP at 200 MPa; HHP400—sample subjected to HHP at 400 MPa; HHP500—sample subjected to HHP at 500 MPa; SCCD10—sample treated by SCCD at 10 MPa; SCCD30—sample treated by SCCD at 30 MPa; SCCD60—sample treated by SCCD at 60 MPa. (Different letters over the bars indicate significant differences between the mean ($p \leq 0.05$) antioxidant capacity at each step of simulated digestion).

The beneficial effect of HHP and SCCD treatment on the antioxidant properties of fruit and vegetable products was also noticed by previous investigations [42–44]. Gómez-Maqueo et al., 2019 [42] reported a significant improvement in the antioxidant activity of the pulp of the prickly pear after using the HHP at 350 MPa/5 min. It was correlated with the content of phenolic compounds. Rodríguez-Roque et al. (2015) [43] pointed to the possibility of improving the antioxidant capacity (DPPH \bullet) in fruit drinks with the addition of milk by treatment with HHP (400 MPa, 5 min). In addition, this treatment allowed the preservation of the higher AC of the fruit juices compared to the thermal

processing, regardless of the matrix. Briones-Labarca et al. (2011) [44] also reported stronger antioxidant properties of apples processed with HHP (500 MPa, 2–10 min) compared to untreated samples.

Our team's research has reported a positive effect of the SCCD at 30 and 60 MPa on the AC (ABTS•+ and DPPH•) of blackcurrant juice subjected to simulated gastro-intestinal digestion compared to thermally treated juices (45 and 85 °C, 10 min). SCCD improved the availability of antioxidants for digestion, thereby releasing more products of metabolism with potent antioxidant properties, such as protocatechuic acid [38]. Wang et al., 2020 [22] obtained similar AC results in the digestion stages as in DPPH• tests in this study. Under the oral digestion conditions, there was a decrease in AC. However, it was reversible at the gastric digestion step and rich the highest AC in those conditions. The decrease in AC after intestinal digestion occurred in the DPPH•, ABTS•+, and FRAP (ferric-reducing antioxidant power) assays. The loss of antioxidant activity in beetroot after heat treatment due to the loss of phenols, flavonoids, and betalains was also indicated [22]. Another study compared the AC of 23 fruits and vegetable juices bought in the local market before and after *in vitro* digestion. The beetroot juice is distinguished by the highest content of total polyphenols and AC, among other juices. According to the FRAP assay, beetroot juices from both producers showed a two-fold increase in AC at the stomach digestion stage. In the first juice, which also showed a slight decrease in total polyphenols (6%), this high level of AC was maintained even after intestinal digestion. In the second juice, the AC returned to a value close to that obtained in the fresh juice, although the polyphenol content was almost halved due to intestinal digestion. This supports the assumption that AC is shaped by metabolites formed upon digestion of the native antioxidants in beetroot. Less antioxidant losses than our study may be due to the omission of the digestive step in the mouth, the reduction in gastric digestion to 1 h, and the use of centrifugation after duodenum digestion, as opposed to dialysis, as in this study. As in the present study, the variation in AC was strongly related with the application of DPPH• or ABTS•+ radicals. This shows that the methods for determining activity do not always overlap, and the response to radicals may differ depending on the matrix [45].

Desseva et al. (2020) [32] also obtained varied results of AC analysis in beetroot juice after digestion by DPPH•, ABTS•+, FRAP, and CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assays. The authors report that the differences in results can be the presence of bile acids, the affinity of the radicals for the sample components, a different mechanism of radical formation and stability, and other reaction temperature conditions. Metabolites formed from the breakdown of betalains and contribute to the high antioxidant capacity of the digested juice are betalain deglycosylation products, as well as neobetanine or cyclo-DOPA. Betalamic acid and cyclo-DOPA glucoside formed in the alkaline environment do not exhibit antioxidant properties, but they can demonstrate them at acidic pH [21].

3. Materials and Methods

3.1. Reagents and Auxiliary Materials

Cellulose membrane for dialyzing (avg. flat width 25 mm, molecular weight cut-off = 14,000) and digestive enzymes such as α -amylase (TDF-100 A, 24,975 U/mL), mucin from the porcine stomach—type II, pepsin from the porcine gastric mucosa (250 U/mg solid), pancreatin from the porcine pancreas (8 × USP specifications), porcine bile extract, and reagents such as sodium dodecyl sulfate—ACS reagent, sodium bicarbonate $\geq 99.5\%$, (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH• radical), 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid, diammonium salt (ABTS+• radical), acetonitrile (HPLC) and sodium hydroxide pellets $\geq 98.0\%$ (NaOH) were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Reagents such as disodium hydrogen phosphate anhydrous pure p.a. $\geq 99.0\%$ (Na_2HPO_4), dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), sodium chloride pure p.a. $\geq 99.9\%$ (NaCl), and di-sodium wersenate standard solution 0.01 mol/L were supplied from Chempur (Piekary Śląskie, Poland). In addition, Honeywell Fluka (Seelze, Germany) provided pure hydrochloro-

ric acid p.a. ACS reagent 37% (HCl) and potassium peroxodisulfate $\geq 99.0\%$, and Avantor (Gliwice, Poland) provided formic acid 98–100% CZDA, ethanol 96% CZDA and methanol (HPLC grade).

3.2. Testing Material

Fresh beetroot (*Beta vulgaris* L.) juice was selected for the research, and vegetables of Polish origin were purchased at the local market. The vegetables were washed and squeezed in the Robot Coupe Juicer (model J80 Ultra, France) to produce beetroot juice. One batch of juices was left without any treatment (FJ). The next two batches of samples, in the same type of packaging, were subjected to thermal treatment at 45 °C for 10 min (T45) and pasteurization at 85 °C for 10 min (T85) in a pasteurization water bath (Labo Play, Bytom, Poland). Mild heat treatment was used to verify if the temperature was relevant in the SCCD, while pasteurization is a traditional method of juice preservation used as a comparative method for emerging techniques. SCCD juice treatment was carried out in 150 mL glass jars at three pressure parameters: 10, 30, and 60 MPa, for 10 min, at 45 °C (SCCD10, SCCD30, SCCD60) in the batch mode in a Speed SFE 4 (Applied Separations, Allentown, PA, USA). The HHP treatment was carried out in 250 mL PET bottles at 200, 400, and 500 MPa, 5 min, and 20 °C (HHP200, HHP400, HHP500) in the CALIBER 70 × 1 device (EXDIN Solutions Sp. z o.o., Kraków, Poland). In both methods of high-pressure treatment, the applied pressure conditions covered the whole scope of the parameters in the devices, with the optimal time length of the processes. Until the analyzes were performed, the samples were stored in a freezer at -20 °C. Controls are all sample types regardless of treatment but prior to simulated digestion. Figure S1 in the Supplementary Materials presents the research's scope and workflow.

3.3. Simulation of Gastrointestinal Digestion and Determination of Bioaccessibility

In vitro, gastrointestinal digestion simulation among dialysis was carried out under the model presented by Buniowska et al. (2017) [46] and Minekus et al. (2014) [19]. Oral digestion was simulated by mixing 50 mL of the juice or water as a blank sample and 5 mL of salivary enzyme solution. Using HCl or NaOH buffers, the pH was adjusted (HI 211 m, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) to 6.75 ± 0.20 , and then the solution was left for 10 min in a shaking water bath (Labo Play, SWB 8N, Bytom, Poland) at 37 °C, 90 rpm. After collecting part of the sample for analysis, 20 mL of pepsin solution (2 g of NaCl, 7 mL of HCl, 3.2 g of pepsin per 1 L of distilled water) was added, and the pH was adjusted to 2.00 as needed. Then, samples were incubated for 2 h again in the previously described parameters. To initiate simulated intestinal digestion, 20 mL of the solution from the gastric phase was moved to the clean bottle. Its pH was adjusted to 5.00 ± 0.20 and mixed with 5 mL of pancreatin (1 g/L) and bile solution (25 g/L). The cellulose membrane, cut into 30 cm sections, sterilized, washed, and filled with 25 mL of NaHCO_3 (0.5 M, pH 7.5), was dipped in the prepared sample and incubated for 2 h. The solution inside the dialysis membrane is considered potentially absorbed into the bloodstream. The samples were inserted into an ice bath for 10 min to complete the digestion process. All kinds of juice samples were subjected to simulated digestion in triplicate. Samples of each digestion and dialysis step were collected and stored in the -20 °C freezer until analysis. Equation (1) was employed to determine bioaccessibility (BAc).

$$\text{BAc (\%)} = 100 \times (\text{BC}_{\text{digested}} / \text{BC}_{\text{before digestion}}) \quad (1)$$

Equation (1). Calculating bioaccessibility (BAc—bioaccessibility of the analyzed compound; $\text{BC}_{\text{digested}}$ —the amount of analyzed compound in the juice after digestion; $\text{BC}_{\text{before digestion}}$ —the amount of analyzed compound in the juice before digestion).

3.4. Chemical Analysis

3.4.1. Identification of Betalains

Fresh beetroot juice was 5 times diluted with 0.2% formic acid (phase A) and then centrifuged. A total of 2 mL of the supernatant was applied to a Sep-Pak C18 column (Waters, Milford, CT, USA); The betaxanthins were eluted with 6 mL of phase A and the betacyanins with 6 mL of phase B (acetonitrile), both were collected in 10 mL flask and made up to the mark. The total concentration of both dyes present in the collected fractions was determined spectrophotometrically based on the molar extinction coefficients and calculated according to Equation (2).

$$\text{Betalain content (mg/L)} = A \times \text{DF} \times \text{MV} \times 1000 / (e \times l) \quad (2)$$

Equation (2). The concentration of betalain (A—absorption, DF—dilution factor, MW—molecular weights, e—molar extinction coefficient, l—pathlength. (Betacyanins—MW = 550 g/mol; e = 60,000 L/mol × cm; Betaxanthins—MW = 308 g/mol; e = 48,000 L/mol × cm) were applied.

The obtained fractions with known concentrations were used to prepare a series of dilutions for standard curves ($R^2 > 0.99$). LOD and LOQ for both groups of pigments were determined on the basis of the signal to noise ratio, which was $S/N = 10$ in the case of LOQ, and $S/N = 3$ in the case of LOD. Betaxanthins: $\text{LOQ} \geq 0.5 \text{ mg/L}$; $\text{LOD} \geq 0.2 \text{ mg/L}$. Betacyanins $\text{LOQ} \geq 2 \text{ mg/L}$ $\text{LOD} \geq 0.6 \text{ mg/L}$.

3.4.2. HPLC Analyses of Betalains

The analysis was carried out by the methodology presented by Ravichandran et al. (2013) [47]. For this purpose, a Waters 2695 HPLC system connected to a Photodiode Array Detector 2996 (Waters, Milford, CT, USA) was used. A Sunfire C8 column (250 × 4.6 mm, 5 μm, Waters, Milford, CT, USA) and a pre-column (Sun Fire C8, 20 × 4.6 mm, 5 mm, Waters, USA) were heated to 30 °C. Samples of the juices were diluted as needed and filtered through the 0.45 μm syringe filter (Waters, Milford, CT, USA). During 60 min and the flow of 1 mL/min, 10 μL of the juice was dispensed with 0.2% formic acid (A) and acetonitrile (B). The flow gradient of the eluates was as follows: A: B [%]; 100:0 (0 min); 100:0 (0–7 min); 97:3 (7–17 min); 90:10 (17–27 min); 90:10 (27–35 min); 80:20 (35–45 min); 0:100 (45–50 min); 100:0 (50–55 min); 100:0 (55–60 min). Betacyanins were detected at 538 nm and expressed as betanin equivalent, while betaxanthins were detected at 480 nm and expressed as vulgaxanthin I equivalent.

Individual betalains were identified based on an earlier experiment [23] and literature data on the typical retention order during the RP-HPLC separation [48–50], as well as their fluorescent properties at an excitation wavelength of 465 nm and an emission wavelength of 510 nm. Yellow pigments are highly fluorescent because of four conjugated double bonds, while betacyanins do not present fluorescence due to the conjugation of bonds with the cyclo-DOPA aromatic ring [51].

3.4.3. ABTS+• Radical Assay

To determine the antioxidant capacity with the ABTS+• radicals, the method presented by Re et al. (1999) [52] was applied. The cationic solution of radicals was prepared by mixing 7 mM ABTS+• and 2.45 mM potassium persulfate and leaving it in the darkness for 18 h before starting the analyses. The radical solution was diluted with ethanol to obtain an absorbance of 0.740–0.750 at a wavelength of 734 nm on a UV/Visible Spectrophotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Amersham, UK). Trolox (1 mg/mL) in ethanol was applied to prepare a six-point calibration curve with the following concentrations: 50, 100, 150, 200, 250, and 300 μg/mL. Then, 0.025 mL of the juice, Trolox standard in the case of a blank sample, and 2.5 mL of ABTS+• solution was dispensed into the cuvette and incubated at 30 °C for 6 min. The absorbance was determined at 734 nm, and the result was expressed in Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC).

3.4.4. DPPH• Radical Assay

To determine the antioxidant capacity with the DPPH• radicals, the method presented by Yen and Chen (1995) [53] was used. The DPPH• radicals (1 mM) were dissolved in methanol, incubated for 3 h in the darkness, and diluted approximately 10-fold to obtain the absorbance of 0.700–0.800 at 517 nm on a spectrophotometer described in the previous assay. A standard curve was also made of a solution of Trolox in methanol (1 mg/mL), obtaining the concentrations in the following points: 10, 20, 30, 40, 50, and 100 µg/mL. The analysis was performed by dispensing 0.1 mL of juice, standard or distilled water sample as a blank and 2 mL of DPPH• radical solution into the cuvette, then leaving it in the darkness for 30 min and room temperature (22 ± 1 °C) to incubate. The absorbance was measured at 517 nm. The result was expressed in Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC).

3.5. Statistical Analysis

The one-way analysis of variance was performed with the ANOVA test, and the significance analysis of differences in mean values with the Tukey's test on the confidence level of $\alpha = 0.05$. The Statistica 7.1 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA) was employed for statistical analysis. Each type of beetroot juice sample was conducted into simulated digestion in triplicate, and chemical analyses were performed in duplicate.

4. Conclusions

Thermal treatment (45 and 85 °C) did not reduce the stability of betacyanin and betaxanthins in the control samples (non-digested). Applying HHP200 and SCCD60 also allowed for maintaining the high stability of betacyanin and betaxanthins. The type of the beetroot juice treatment and process parameters did not affect the betalain composition but influenced their stability during simulated digestion. As a result of the unfavorable pH conditions and the presence of enzymes, the content of betalains decreased during digestion.

In the juices subjected to SCCD at 30 and 60 MPa, the bioaccessibility of betacyanins and betaxanthins was statistically significantly higher than in all other types of samples. The 30 MPa proved particularly advantageous, as it increased the bioaccessibility of the total betacyanins and the total betaxanthins by 58% and 64%, respectively, concerning the pasteurized samples. In the juices treated with HHP at 200 and 400 MPa, a significant improvement in the bioaccessibility of betacyanins by 35% and 32%, respectively, was also observed in fresh juices and thermally treated. The AC in the beetroot juices differed depending on the radical used in the analysis. The decreased stomach AC in the stomach in the ABTS•+ assay correlated with the betalain concentration decrease at this step of simulated digestion. In turn, in the method with DPPH• radicals, there was a significant increase in AC in the stomach. This may indicate greater sensitivity to compounds stable at acidic pH (such as polyphenols and betacyanins). The DPPH• assay showed a decrease in the AC after digestion, which was noticeably higher in the SCCD and HHP500 than in the other samples. According to the ABTS•+ assay, the antioxidant capacity increased by 7–14%, and in dialysate, it was significantly higher in SCCD60, HHP200, FJ, and T45 samples compared to others.

Applying high-pressure techniques such as HHP and SCCD to beetroot juices with selected pressure parameters may improve the bioaccessibility of betalains. Increasing the extraction and affecting the food matrix could improve the stability of betalains in the gastrointestinal tract, making them more accessible for metabolism and absorption. It would be necessary to confirm the beneficial influence of high-pressure techniques on the bioaccessibility of betalains and the related health benefits for the human body in *in vivo* studies.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27207093/s1>, Figure S1: The scope and the workflow of the research.; Figure S2: Chromatogram showing HPLC analysis of betaxanthins in fresh beetroot juice (FJ) at 480 nm.; Figure S3: Chromatogram showing HPLC analysis of betacyanins in fresh beetroot juice (FJ) at 538 nm.

Author Contributions: Conceptualization, U.T. and K.M.; Methodology, U.T., K.M. and M.B.-O.; Formal analysis, U.T.; Investigation, U.T.; Data curation, U.T.; Writing—original draft preparation, U.T.; Writing—review and editing, K.M. and M.B.-O.; Supervision, K.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original data presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Liliana, C.; Oana-Viorela, N. Red Beetroot: Composition and Health Effects—A Review. *J. Nutr. Med. Diet Care* **2020**, *5*. [[CrossRef](#)]
2. Chhikara, N.; Kushwaha, K.; Sharma, P.; Gat, Y.; Panghal, A. Bioactive Compounds of Beetroot and Utilization in Food Processing Industry: A Critical Review. *Food Chem.* **2019**, *272*, 192–200. [[CrossRef](#)]
3. Pandita, D.; Pandita, A.; Pamuru, R.R.; Nayik, G.A. Beetroot. In *Antioxidants in Vegetables and Nuts—Properties and Health Benefits*; Nayik, G.A., Gul, A., Eds.; Springer: Singapore, 2020; pp. 45–74, ISBN 978-981-15-7470-2.
4. Nirmal, N.P.; Mereddy, R.; Maqsood, S. Recent Developments in Emerging Technologies for Beetroot Pigment Extraction and Its Food Applications. *Food Chem.* **2021**, *356*, 129611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Silva, D.V.T.; Baião, D.D.S.; Ferreira, V.F.; Paschoalin, V.M.F. Betanin as a Multipath Oxidative Stress and Inflammation Modulator: A Beetroot Pigment with Protective Effects on Cardiovascular Disease Pathogenesis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *62*, 539–554. [[CrossRef](#)]
6. Lechner, J.F.; Stoner, G.D. Red Beetroot and Betalains as Cancer Chemopreventative Agents. *Molecules* **2019**, *24*, 1602. [[CrossRef](#)]
7. Rahimi, P.; Mesbah-Namin, S.A.; Ostadrahimi, A.; Separham, A.; Jafarabadi, M.A. Betalain- and Betacyanin-Rich Supplements' Impacts on the PBMC SIRT1 and LOX1 Genes Expression and Sirtuin-1 Protein Levels in Coronary Artery Disease Patients: A Pilot Crossover Clinical Trial. *J. Funct. Foods* **2019**, *60*, 103401. [[CrossRef](#)]
8. Fu, Y.; Shi, J.; Xie, S.Y.; Zhang, T.Y.; Soladoye, O.P.; Aluko, R.E. Red Beetroot Betalains: Perspectives on Extraction, Processing, and Potential Health Benefits. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 11595–11611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Clifford, T.; Howatson, G.; West, D.J.; Stevenson, E.J. The Potential Benefits of Red Beetroot Supplementation in Health and Disease. *Nutrients* **2015**, *7*, 2801–2822. [[CrossRef](#)]
10. Pietrzakowski, Z.; Nemzer, B.; Spórna, A.; Stalica, P.; Tresher, W.; Keller, R.; Jimenez, R.; Michałowski, T.; Wybraniec, S. Influence of Betalain-Rich Extract on Reduction of Discomfort associated with Osteoarthritis. *New Med.* **2010**, *1*, 12–17.
11. Sokołowska, B.; Nasiłowska, J. *Controlling Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Beetroot (Beta vulgaris) Juice by High Hydrostatic Pressure*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2019; ISBN 9780128166796.
12. Marszałek, K.; Szczepańska, J.; Woźniak, Ł.; Skapska, S.; Barba, F.J.; Brnčić, M.; Brnčić, S.R. The Preservation of Fruit and Vegetable Products under High Pressure Processing. In *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 2, pp. 481–492, ISBN 9780128126875.
13. Marszałek, K.; Woźniak, Ł.; Kruszewski, B.; Skapska, S. The Effect of High Pressure Techniques on the Stability of Anthocyanins in Fruit and Vegetables. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 277. [[CrossRef](#)]
14. Marszałek, K.; Doesburg, P.; Starzonek, S.; Szczepańska, J.; Woźniak, Ł.; Lorenzo, J.M.; Skapska, S.; Rzoska, S.; Barba, F.J. Comparative Effect of Supercritical Carbon Dioxide and High Pressure Processing on Structural Changes and Activity Loss of Oxidoreductive Enzymes. *J. CO2 Util.* **2019**, *29*, 46–56. [[CrossRef](#)]
15. Marszałek, K.; Kruszewski, B.; Woźniak, Ł.; Skapska, S. The Application of Supercritical Carbon Dioxide for the Stabilization of Native and Commercial Polyphenol Oxidases and Peroxidases in Cloudy Apple Juice (Cv. Golden Delicious). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2017**, *39*, 42–48. [[CrossRef](#)]
16. Marszałek, K.; Skapska, S.; Woźniak, Ł.; Sokołowska, B. Application of Supercritical Carbon Dioxide for the Preservation of Strawberry Juice: Microbial and Physicochemical Quality, Enzymatic Activity and the Degradation Kinetics of Anthocyanins during Storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2015**, *32*, 101–109. [[CrossRef](#)]

17. Marszałek, K.; Krzyżanowska, J.; Woźniak, Ł.; Skapska, S. Kinetic Modelling of Polyphenol Oxidase, Peroxidase, Pectin Esterase, Polygalacturonase, Degradation of the Main Pigments and Polyphenols in Beetroot Juice during High Pressure Carbon Dioxide Treatment. *LWT-Food Sci. Technol.* **2017**, *85*, 412–417. [[CrossRef](#)]
18. Carbonell-Capella, J.M.; Buniowska, M.; Barba, F.J.; Esteve, M.J.; Frígola, A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 155–171. [[CrossRef](#)]
19. Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; et al. A Standardised Static in Vitro Digestion Method Suitable for Food—An International Consensus. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1113–1124. [[CrossRef](#)]
20. Wruss, J.; Waldenberger, G.; Huemer, S.; Uygün, P.; Lanzerstorfer, P.; Müller, U.; Höglinger, O.; Weghuber, J. Compositional Characteristics of Commercial Beetroot Products and Beetroot Juice Prepared from Seven Beetroot Varieties Grown in Upper Austria. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *42*, 46–55. [[CrossRef](#)]
21. Klewicka, E. Betacyjaniny—Biodostępność i Biologiczna Aktywność. *Food Sci. Technol. Qual.* **2012**, *19*, 5–21.
22. Wang, T.; Liu, L.; Rakhmanova, A.; Wang, X.; Shan, Y.; Yi, Y.; Liu, B.; Zhou, Y.; Lü, X. Stability of Bioactive Compounds and in Vitro Gastrointestinal Digestion of Red Beetroot Jam: Effect of Processing and Storage. *Food Biosci.* **2020**, *38*, 100788. [[CrossRef](#)]
23. Sokołowska, B.; Woźniak, Ł.; Skapska, S.; Porebska, I.; Nasiłowska, J.; Rzoska, S.J. Evaluation of Quality Changes of Beetroot Juice after High Hydrostatic Pressure Processing. *High Press. Res.* **2017**, *37*, 214–222. [[CrossRef](#)]
24. Ubeira-Iglesias, M.; Wilches-Pérez, D.; Cavia, M.M.; Alonso-Torre, S.; Carrillo, C. High Hydrostatic Pressure Processing of Beetroot Juice: Effects on Nutritional, Sensory and Microbiological Quality. *High Press. Res.* **2019**, *39*, 691–706. [[CrossRef](#)]
25. Paciulli, M.; Medina-Meza, I.G.; Chiavaro, E.; Barbosa-Cánovas, G.V. Impact of Thermal and High Pressure Processing on Quality Parameters of Beetroot (*Beta vulgaris* L.). *LWT-Food Sci. Technol.* **2016**, *68*, 98–104. [[CrossRef](#)]
26. Jiménez-Aguilar, D.M.; Escobedo-Avellaneda, Z.; Martín-Belloso, O.; Gutiérrez-Urbe, J.; Valdez-Fragoso, A.; García-García, R.; Torres, J.A.; Welti-Chanes, J. Effect of High Hydrostatic Pressure on the Content of Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of Prickly Pears (*Opuntia Ficus-Indica*) Beverages. *Food Eng. Rev.* **2015**, *7*, 198–208. [[CrossRef](#)]
27. Liu, X.; Gao, Y.; Xu, H.; Hao, Q.; Liu, G.; Wang, Q. Inactivation of Peroxidase and Polyphenol Oxidase in Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Extract with Continuous High Pressure Carbon Dioxide. *Food Chem.* **2010**, *119*, 108–113. [[CrossRef](#)]
28. Liu, X.; Gao, Y.; Peng, X.; Yang, B.; Xu, H.; Zhao, J. Inactivation of Peroxidase and Polyphenol Oxidase in Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Extract with High Pressure Carbon Dioxide. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2008**, *9*, 24–31. [[CrossRef](#)]
29. Liu, X.; Gao, Y.; Xu, H.; Wang, Q.; Yang, B. Impact of High-Pressure Carbon Dioxide Combined with Thermal Treatment on Degradation of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Pigments. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6480–6487. [[CrossRef](#)]
30. Tesoriere, L.; Fazzari, M.; Angileri, F.; Gentile, C.; Livrea, M.A. In Vitro Digestion of Betalainic Foods. Stability and Bioaccessibility of Betaxanthins and Betacyanins and Antioxidative Potential of Food Digesta. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10487–10492. [[CrossRef](#)]
31. da Silva, D.V.T.; dos Santos Baião, D.; de Oliveira Silva, F.; Alves, G.; Perrone, D.; Del Aguila, E.M.; Paschoalin, V.M.F. Betanin, a Natural Food Additive: Stability, Bioavailability, Antioxidant and Preservative Ability Assessments. *Molecules* **2019**, *24*, 458. [[CrossRef](#)]
32. Desseva, I.; Stoyanova, M.; Petkova, N.; Mihaylova, D. Red Beetroot Juice Phytochemicals Bioaccessibility: An in Vitro Approach. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2020**, *70*, 45–53. [[CrossRef](#)]
33. Sawicki, T.; Martínez-Villaluenga, C.; Frias, J.; Wiczowski, W.; Peñas, E.; Bączek, N.; Zieliński, H. The Effect of Processing and in Vitro Digestion on the Betalain Profile and ACE Inhibition Activity of Red Beetroot Products. *J. Funct. Foods* **2019**, *55*, 229–237. [[CrossRef](#)]
34. Gómez-Maqueo, A.; Steurer, D.; Welti-Chanes, J.; Cano, M.P. Bioaccessibility of Antioxidants in Prickly Pear Fruits Treated with High Hydrostatic Pressure: An Application for Healthier Foods. *Molecules* **2021**, *26*, 5252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ramírez-Melo, L.M.; Cruz-Cansino, N.D.S.; Delgado-Olivares, L.; Ramírez-Moreno, E.; Zafra-Rojas, Q.Y.; Hernández-Traspeña, J.L.; Suárez-Jacobo, Á. Optimization of Antioxidant Activity Properties of a Thermosonicated Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Juice and Further in Vitro Bioaccessibility Comparison with Thermal Treatments. *LWT* **2022**, *154*, 112780. [[CrossRef](#)]
36. Stübler, A.S.; Lesmes, U.; Juadjur, A.; Heinz, V.; Rauh, C.; Shpigelman, A.; Aganovic, K. Impact of Pilot-Scale Processing (Thermal, PEF, HPP) on the Stability and Bioaccessibility of Polyphenols and Proteins in Mixed Protein- and Polyphenol-Rich Juice Systems. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2020**, *64*, 102426. [[CrossRef](#)]
37. Trych, U.; Buniowska, M.; Skapska, S.; Starzonek, S.; Marszałek, K. The Bioaccessibility of Antioxidants in Black Currant Puree after High Hydrostatic Pressure Treatment. *Molecules* **2020**, *25*, 3544. [[CrossRef](#)]
38. Trych, U.; Buniowska, M.; Skapska, S.; Kapusta, I.; Marszałek, K. Bioaccessibility of Antioxidants in Blackcurrant Juice after Treatment Using Supercritical Carbon Dioxide. *Molecules* **2022**, *27*, 1036. [[CrossRef](#)]
39. Zhao, W.; Sun, Y.; Ma, Y.; Zhao, X. Dense Phase Carbon Dioxide Treatment of Tomato Juice: Effect on Physico-Chemical Properties, Phenolic Composition, Lycopene Isomerisation and in Vitro Bioaccessibility. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2019**, *54*, 1658–1669. [[CrossRef](#)]
40. Sawicki, T.; Topolska, J.; Bączek, N.; Szawara-Nowak, D.; Juśkiewicz, J.; Wiczowski, W. Characterization of the Profile and Concentration of Betacyanin in the Gastric Content, Blood and Urine of Rats after an Intragastric Administration of Fermented Red Beet Juice. *Food Chem.* **2020**, *313*, 126169. [[CrossRef](#)]

41. Clifford, T.; Constantinou, C.M.; Keane, K.M.; West, D.J.; Howatson, G.; Stevenson, E.J. The Plasma Bioavailability of Nitrate and Betanin from *Beta vulgaris* Rubra in Humans. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 1245–1254. [[CrossRef](#)]
42. Gómez-Maqueo, A.; García-Cayuela, T.; Welte-Chanes, J.; Cano, M.P. Enhancement of Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Prickly Pear Fruits by High Hydrostatic Pressure: A Chemical and Microstructural Approach. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2019**, *54*, 132–142. [[CrossRef](#)]
43. Rodríguez-Roque, M.J.; de Ancos, B.; Sánchez-Moreno, C.; Cano, M.P.; Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. Impact of Food Matrix and Processing on the in Vitro Bioaccessibility of Vitamin C, Phenolic Compounds, and Hydrophilic Antioxidant Activity from Fruit Juice-Based Beverages. *J. Funct. Foods* **2015**, *14*, 33–43. [[CrossRef](#)]
44. Briones-Labarca, V.; Venegas-Cubillos, G.; Ortiz-Portilla, S.; Chacana-Ojeda, M.; Maureira, H. Effects of High Hydrostatic Pressure (HHP) on Bioaccessibility, as Well as Antioxidant Activity, Mineral and Starch Contents in Granny Smith Apple. *Food Chem.* **2011**, *128*, 520–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wootton-Beard, P.C.; Moran, A.; Ryan, L. Stability of the Total Antioxidant Capacity and Total Polyphenol Content of 23 Commercially Available Vegetable Juices before and after in Vitro Digestion Measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu Methods. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 217–224. [[CrossRef](#)]
46. Buniowska, M.; Carbonell-Capella, J.M.; Frigola, A.; Esteve, M.J. Bioaccessibility of Bioactive Compounds after Non-Thermal Processing of an Exotic Fruit Juice Blend Sweetened with Stevia Rebaudiana. *Food Chem.* **2017**, *221*, 1834–1842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ravichandran, K.; Saw, N.M.M.T.; Mohdaly, A.A.A.; Gabr, A.M.M.; Kastell, A.; Riedel, H.; Cai, Z.; Knorr, D.; Smetanska, I. Impact of Processing of Red Beet on Betalain Content and Antioxidant Activity. *Food Res. Int.* **2013**, *50*, 670–675. [[CrossRef](#)]
48. Nemzer, B.; Pietrzkowski, Z.; Spórna, A.; Stalica, P.; Thresher, W.; Michałowski, T.; Wybraniec, S. Betalainic and Nutritional Profiles of Pigment-Enriched Red Beet Root (*Beta vulgaris* L.) Dried Extracts. *Food Chem.* **2011**, *127*, 42–53. [[CrossRef](#)]
49. Khan, M.I.; Giridhar, P. Phytochemistry Plant Betalains: Chemistry and Biochemistry. *Phytochemistry* **2015**, *117*, 267–295. [[CrossRef](#)]
50. Miguel, M.G. Betalains in Some Species of the Amaranthaceae Family: A Review. *Antioxidants* **2018**, *7*, 53. [[CrossRef](#)]
51. Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. Structural Implications on Color, Fluorescence, and Antiradical Activity in Betalains. *Planta* **2010**, *232*, 449–460. [[CrossRef](#)]
52. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
53. Yen, G.C.; Chen, H.Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 27–32. [[CrossRef](#)]

12. Oświadczenia współautorów publikacji

Warszawa, 19.06.2023

mgr inż. Urszula Trych
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- współautorstwie w opracowaniu koncepcji publikacji,
- dokonaniu przeglądu i analizy literatury dotyczącej tematu pracy,
- opracowaniu tabel z przeglądem dostępnych wyników badań dotyczących tematu pracy,
- przygotowaniu manuskryptu w języku angielskim, włącznie z pracami redaktorskimi,
- byciu głównym wykonawcą projektu finansowanego z subwencji przyznanej przez MRiRW, (projekt nr 134-01-ZO), w ramach którego realizowana była praca doktorska.

...Urszula Trych...

Warszawa, 19.06.2023

Magdalena Buniowska-Olejniki
Zakład Technologii Mleczarstwa
Instytut Technologii Żywności i Żywienia
Uniwersytet Rzeszowski

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- korekcie językowej oraz merytorycznej gotowego manuskryptu, ze szczególnym uwzględnieniem rozdziału „Metody oceny biodostępności”.



Magdalena Buniowska-Olejniki

Warszawa, 19.06.2023

dr inż. Sylwia Skąpska
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Oświadczenie

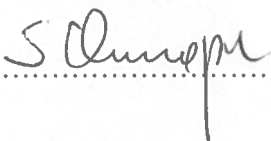
Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- korekcie językowej oraz merytorycznej gotowego manuskryptu, ze szczególnym uwzględnieniem rozdziału „Wpływ składu i struktury matrycy pokarmowej na biodostępność”.

.....


Wuhan, 19.06.2023

Zhenzhou Zhu
School of Food Science and Engineering,
Wuhan Polytechnic University,
Wuhan, China

Declaration

I hereby declare that I am the co-author of the publication:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

My contribution to this publication covered:

- substantive revision of the finished manuscript, in particular the chapter “Influence on the nutrients and bioactive compounds. Hydrophilic compounds.”

The declaration was drawn up in Polish and in English and is identical in content.



Wuhan, 19.06.2023

Zhenzhou Zhu
School of Food Science and Engineering,
Wuhan Polytechnic University,
Wuhan, China

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- korekcie merytorycznej gotowego manuskryptu, ze szczególnym uwzględnieniem rozdziału „Wpływ na składniki odżywcze i związki bioaktywne. Związki hydrofilowe.”

Oświadczenie sporządzono w języku polskim i w języku angielskim i jest tożsame co do treści.



Beijing, 19.06.2023

Jinfeng Bi
Institute of Food Science and Technology,
Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS),
Key Laboratory of Agro-Products Processing,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Beijing, China

Declaration

I hereby declare that I am the co-author of the publication:

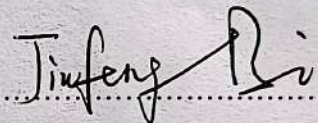
Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skapska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

My contribution to this publication covered:

- substantive revision of the finished manuscript, in particular the chapter “Influence on the nutrients and bioactive compounds. Lipophilic compounds”.

The declaration was drawn up in Polish and in English and is identical in content.

.....

.....

Beijing, 19.06.2023

Jinfeng Bi
Institute of Food Science and Technology,
Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS),
Key Laboratory of Agro-Products Processing,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Beijing, China

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

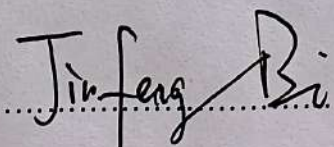
Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skapska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- korekcie merytorycznej gotowego manuskryptu, ze szczególnym uwzględnieniem rozdziału „Wpływ na składniki odżywcze i związki bioaktywne. Związki lipofilowe.”

Oświadczenie sporządzono w języku polskim i w języku angielskim i jest tożsame co do treści.

.....

.....

Beijing, 19.06.2023

Xuan Liu
Institute of Food Science and Technology,
Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS),
Key Laboratory of Agro-Products Processing,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Beijing, China

Declaration

I hereby declare that I am the co-author of the publication:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

My contribution to this publication covered:

- substantive revision of the finished manuscript, in particular the chapter “Influence on the nutrients and bioactive compounds. Mineral compounds”

The declaration was drawn up in Polish and in English and is identical in content.

Xuan Liu

Beijing, 19.06.2023

Xuan Liu
Institute of Food Science and Technology,
Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS),
Key Laboratory of Agro-Products Processing,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Beijing, China

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- korekcie merytorycznej gotowego manuskryptu, ze szczególnym uwzględnieniem rozdziału „Wpływ na składniki odżywcze i związki bioaktywne. Składniki mineralne.”

Oświadczenie sporządzono w języku polskim i w języku angielskim i jest tożsame co do treści.

Xuan Liu

Francisco J. Barba
Preventive Medicine and Public Health,
Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department,
Faculty of Pharmacy,
Universitat de València,
46100 Burjassot, València, Spain

Valencia, 19.06.2023

Declaration

I hereby declare that I am the co-author of the publication:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

My contribution to this publication covered:

- linguistic and substantive revision of the finished manuscript.

The declaration was drawn up in Polish and in English and is identical in content.

BARBA ORELLANA
FRANCISCO JOSE -
53202884C

Firmado digitalmente por
BARBA ORELLANA
FRANCISCO JOSE -
53202884C
Fecha: 2023.06.26 17:56:56
+02'00'

.....

Francisco J. Barba
Preventive Medicine and Public Health,
Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department,
Faculty of Pharmacy,
Universitat de València,
46100 Burjassot, València, Spain

Valencia, 19.06.2023

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- korekcie językowej i merytorycznej gotowego manuskryptu.

Oświadczenie sporządzono w języku polskim i w języku angielskim i jest tożsame co do treści.

BARBA ORELLANA
FRANCISCO JOSE -
53202884C

Firmado digitalmente por
BARBA ORELLANA
FRANCISCO JOSE -
53202884C
Fecha: 2023.06.26 17:56:56
+02'00'

.....

Warszawa, 19.06.2023

dr hab. inż. Krystian Marszałek, prof. IBPRS
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Waława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Zhenzhou Zhu, Jinfeng Bi, Xuan Liu, Francisco J. Barba, Krystian Marszałek (2020)

Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing; In: Present and Future of High Pressure Processing (pp. 87-109). Elsevier.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- pełnienie funkcji opiekuna naukowego,
- kierowanie projektem finansowanym z subwencji przyznanej przez MRiRW, (projekt nr 134-01-ZO), w ramach którego realizowana była praca doktorska,
- współautorstwo w opracowaniu koncepcji pracy,
- korekcie językowej oraz merytorycznej gotowego manuskryptu.

.....
Krystian Marszałek

Warszawa, 19.06.2023

mgr inż. Urszula Trych
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Szymon Starzonek, Krystian Marszałek
(2020) **The Bioaccessibility of Antioxidants in Black Currant Puree after High Hydrostatic Pressure Treatment**. *Molecules*, 25(15), 3544.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- współautorstwie w opracowaniu koncepcji badań i sformułowaniu hipotez badawczych,
- przeprowadzeniu prac technologicznych oraz przygotowaniu próbek do badań,
- wykonaniu badań laboratoryjnych,
- opracowaniu i analizie wyników,
- dokonaniu przeglądu literatury oraz dyskusji wyników,
- przygotowaniu manuskryptu w języku angielskim, włącznie z pracami redaktorskimi,
- byciu głównym wykonawcą projektu finansowanego z subwencji przyznanej przez MRiRW, (projekt nr 134-01-ZO), w ramach którego realizowana była praca doktorska.

Urszula Trych

Warszawa, 19.06.2023

Magdalena Buniowska-Olejek
Zakład Technologii Mleczarstwa
Instytut Technologii Żywności i Żywienia
Uniwersytet Rzeszowski

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Szymon Starzonek, Krystian Marszałek
(2020) **The Bioaccessibility of Antioxidants in Black Currant Puree after High Hydrostatic Pressure Treatment**. *Molecules*, 25(15), 3544.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- pełnienie funkcji promotora pomocniczego,
- współpracy w przeprowadzeniu symulacji trawienia w modelu *in vitro*,
- korekcie językowej oraz merytorycznej gotowego manuskryptu.


.....

Warszawa, 19.06.2023

dr inż. Sylwia Skąpska
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

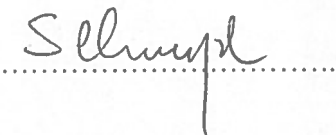
Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Szymon Starzonek, Krystian Marszałek
(2020) **The Bioaccessibility of Antioxidants in Black Currant Puree after High Hydrostatic Pressure Treatment**. *Molecules*, 25(15), 3544.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- korekcie językowej oraz merytorycznej gotowego manuskryptu.


.....

Warszawa, 19.06.2023

dr Szymon Starzonek
Wydział Elektrotechniki
Uniwersytet Lublański

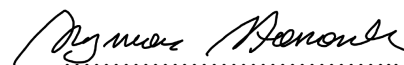
Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Szymon Starzonek, Krystian Marszałek
(2020) **The Bioaccessibility of Antioxidants in Black Currant Puree after High Hydrostatic Pressure Treatment**. *Molecules*, 25(15), 3544.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- współpracy w przeprowadzeniu utrwalania próbek wysokim ciśnieniem hydrostatycznym (HHP).



.....

Warszawa, 19.06.2023

dr hab. inż. Krystian Marszałek, prof. IBPRS
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Szymon Starzonek, Krystian Marszałek
(2020) **The Bioaccessibility of Antioxidants in Black Currant Puree after High Hydrostatic Pressure Treatment**. *Molecules*, 25(15), 3544.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- pełnieniu funkcji promotora pracy,
- kierowanie projektem finansowanym z subwencji przyznanej przez MRiRW, (projekt nr 134-01-ZO), w ramach którego realizowana była praca doktorska,
- współautorstwo w opracowaniu koncepcji badań i sformułowaniu hipotez badawczych,
- nadzorowaniu prac związanych z przygotowaniem artykułu,
- korekcie językowej oraz merytorycznej gotowego manuskryptu.

Krystian Marszałek

Warszawa, 19.06.2023

mgr inż. Urszula Trych
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Ireneusz Kapusta, Krystian Marszałek (2022)
Bioaccessibility of Antioxidants in Blackcurrant Juice after Treatment Using Supercritical Carbon Dioxide. *Molecules*, 27(3), 1036.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- współautorstwie w opracowaniu koncepcji badań i sformułowaniu problemu badawczego,
- przeprowadzeniu prac technologicznych oraz przygotowaniu próbek do badań,
- wykonaniu badań laboratoryjnych, (z wyjątkiem identyfikacji metabolitów delfinidyno-3-O-rutynozydu za pomocą analizy UPLC-MS/M)
- opracowaniu i analizie wyników,
- dokonaniu przeglądu literatury oraz dyskusji wyników,
- przygotowaniu manuskryptu w języku angielskim, włącznie z pracami redaktorskimi,
- byciu głównym wykonawcą projektu finansowanego z subwencji przyznanej przez MRiRW, (projekt nr 134-01-ZO), w ramach którego realizowana była praca doktorska.

.....Urszula Trych.....

Warszawa, 19.06.2023

Magdalena Buniowska-Olejniki
Zakład Technologii Mleczarstwa
Instytut Technologii Żywności i Żywienia
Uniwersytet Rzeszowski

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skapska, Ireneusz Kapusta, Krystian Marszałek (2022)
Bioaccessibility of Antioxidants in Blackcurrant Juice after Treatment Using Supercritical Carbon Dioxide. *Molecules*, 27(3), 1036.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- pełnieniu funkcji promotora pomocniczego pracy,
- wsparciu w opracowaniu metodyki trawienia w modelu *in vitro*
- korekcie językowej oraz merytorycznej gotowego manuskryptu.



.....

Warszawa, 19.06.2023

dr inż. Sylwia Skąpska
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

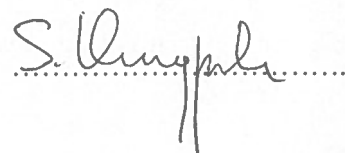
Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Ireneusz Kapusta, Krystian Marszałek (2022)
Bioaccessibility of Antioxidants in Blackcurrant Juice after Treatment Using Supercritical Carbon Dioxide. *Molecules*, 27(3), 1036.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- korekcie językowej oraz merytorycznej gotowego manuskryptu.



S. Skąpska.....

Warszawa, 19.06.2023

dr hab. inż. Ireneusz Kapusta, prof. UR

Zakład Ogólnej Technologii Żywności i Żywienia Człowieka

Instytut Technologii Żywności i Żywienia

Uniwersytet Rzeszowski

Oświadczenie

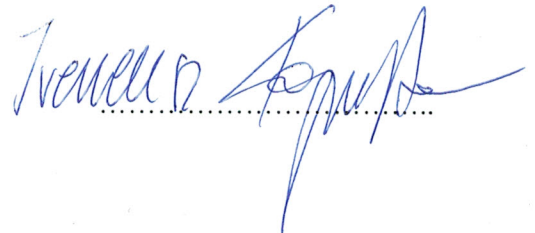
Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Ireneusz Kapusta, Krystian Marszałek (2022)

Bioaccessibility of Antioxidants in Blackcurrant Juice after Treatment Using Supercritical Carbon Dioxide. *Molecules*, 27(3), 1036.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- identyfikacji metabolitów delfinidyno-3-*O*-rutynozydu za pomocą analizy UPLC-MS/MS



Warszawa, 19.06.2023

dr hab. inż. Krystian Marszałek, prof. IBPRS
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Waława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska, Sylwia Skąpska, Ireneusz Kapusta, Krystian Marszałek (2022)
Bioaccessibility of Antioxidants in Blackcurrant Juice after Treatment Using Supercritical Carbon Dioxide. *Molecules*, 27(3), 1036.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- pełnieniu funkcji promotora pracy,
- kierowanie projektem finansowanym z subwencji przyznanej przez MRiRW, (projekt nr 134-01-ZO), w ramach którego realizowana była praca doktorska,
- współautorstwo w opracowaniu koncepcji badań i sformułowaniu hipotez badawczych,
- nadzorowaniu prac związanych z przygotowaniem artykułu,
- korekcie językowej oraz merytorycznej gotowego manuskryptu.

.....
Krystian Marszałek

Warszawa, 19.06.2023

mgr inż. Urszula Trych
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska-Olejek, Krystian Marszałek (2022)

Bioaccessibility of Betalains in Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Juice under Different High-Pressure Techniques. *Molecules*, 27(20), 7093.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- współautorstwie w opracowaniu koncepcji badań i sformułowaniu problemu badawczego,
- przeprowadzeniu prac technologicznych oraz przygotowaniu próbek do badań,
- wykonaniu badań laboratoryjnych,
- opracowaniu i analizie wyników,
- dokonaniu przeglądu literatury oraz dyskusji wyników,
- przygotowaniu manuskryptu w języku angielskim, włącznie z pracami redaktorskimi,
- byciu głównym wykonawcą projektu finansowanego z subwencji przyznanej przez MRiRW, (projekt nr 134-01-ZO), w ramach którego realizowana była praca doktorska.

.....Urszula Trych

Warszawa, 19.06.2023

Magdalena Buniowska-Olejnik
Zakład Technologii Mleczarstwa
Instytut Technologii Żywności i Żywnienia
Uniwersytet Rzeszowski

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorką publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska-Olejnik, Krystian Marszałek (2022)

Bioaccessibility of Betalains in Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Juice under Different High-Pressure Techniques. *Molecules*, 27(20), 7093.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- pełnieniu funkcji promotora pomocniczego pracy,
- wsparciu w opracowaniu metodyki trawienia w modelu *in vitro*,
- korekcie językowej oraz merytorycznej gotowego manuskryptu.


.....

Warszawa, 19.06.2023

dr hab. inż. Krystian Marszałek, prof. IBPRS
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Urszula Trych, Magdalena Buniowska-Olejek, Krystian Marszałek (2022)

Bioaccessibility of Betalains in Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Juice under Different High-Pressure Techniques. *Molecules*, 27(20), 7093.

Mój wkład w powstanie ww. publikacji polegał na:

- pełnieniu funkcji promotora pracy,
- kierowanie projektem finansowanym z subwencji przyznanej przez MRiRW, (projekt nr 134-01-ZO), w ramach którego realizowana była praca doktorska,
- współautorstwo w opracowaniu koncepcji badań i sformułowaniu hipotez badawczych,
- nadzorowaniu prac związanych z przygotowaniem artykułu,
- korekcie językowej oraz merytorycznej gotowego manuskryptu.

.....*Krystian Marszałek*.....

13. Wykaz dorobku naukowego

Lista publikacji naukowych:

1. Janiszewska-Turak, E., Pobiega, K., Rybak, K., Synowiec, A., Woźniak, Ł., **Trych, U.**, Gniewosz M., & Witrowa-Rajchert, D. (2023). Changes in Physical and Chemical Parameters of Beetroot and Carrot Juices Obtained by Lactic Fermentation. *Applied Sciences*, 13(10), 6113. (IF₂₀₂₃ = **2,7**, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = **70**)
2. Marszałek, K., **Trych, U.**, Bojarczuk, A., Szczepańska, J., Chen, Z., Liu, X., & Bi, J. (2023). Application of High-Pressure Homogenization for Apple Juice: An Assessment of Quality Attributes and Polyphenol Bioaccessibility. *Antioxidants*, 12(2), 451. (IF₂₀₂₃ = **7,0**, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = **100**)
3. **Trych, U.**, Buniowska-Olejniki, M., & Marszałek, K. (2022). Bioaccessibility of betalains in beetroot (*Beta vulgaris* L.) juice under different high-pressure techniques. *Molecules*, 27(20), 7093. (IF₂₀₂₂ = **4,927**, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = **140**)
4. **Trych, U.**, Buniowska, M., Skąpska, S., Kapusta, I., & Marszałek, K. (2022). Bioaccessibility of Antioxidants in Blackcurrant Juice after Treatment Using Supercritical Carbon Dioxide. *Molecules*, 27(3), 1036. (IF₂₀₂₂ = **4,927**, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = **140**)
5. **Trych, U.**, Buniowska, M., Skąpska, S., Starzonek, S., & Marszałek, K. (2020). The Bioaccessibility of Antioxidants in Black Currant Puree after High Hydrostatic Pressure Treatment. *Molecules*, 25(15), 3544. (IF₂₀₂₀ = **4,411**, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = **140**)
6. **Trych, U.**, Buniowska, M., Skąpska, S., Zhu, Z., Bi, J., Liu, X., Barba, F. J. & Marszałek, K. (2020). Impact of HPP on the bioaccessibility/bioavailability of nutrients and bioactive compounds as a key factor in the development of food processing. In *Present and Future of High Pressure Processing* (pp. 87-109). Elsevier. (IF₂₀₂₀ = **0**, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = **20**)
7. Kowalska, H., Marzec, A., Kowalska, J., **Trych, U.**, Masiarz, E., & Lenart, A. (2020). The Use of a Hybrid Drying Method with Pre-Osmotic Treatment in Strawberry Bio-Snack Technology. *International Journal of Food Engineering*, 16(1-2). (IF₂₀₂₀ = **1,713**, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = **40**)
8. Wellala, C. K. D., Bi, J., Liu, X., Liu, J., Lyu, J., Zhou, M., Marszałek, K., & **Trych, U.** (2020). Effect of high pressure homogenization combined with juice ratio on water-soluble pectin characteristics, functional properties and bioactive compounds in mixed juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 60, 102279. (IF₂₀₂₀ = **5,916**, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = **140**)
9. Ding, Y., Liu, X., Bi, J., Wu, X., Li, X., Liu, J., **Trych, U.** & Marszałek, K. (2020). Effects of pectin, sugar and pH on the β -Carotene bioaccessibility in simulated juice systems. *LWT*, 124, 109125. (IF₂₀₂₀ = **4,952**, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = **100**)
10. **Trych U.**, Skąpska S., Marszałek K. (2019). Wpływ wysokich ciśnień na bioprzyswajalność antyoksydantów owoców i warzyw – składniki hydrofilowe, *Przemysł Spożywczy*, lipiec l tom 73, 18-21. (IF₂₀₂₂ = **0**, MNiSW / MEiN₂₀₁₉ = **20**)

11. **Trych U.**, Skąpska S., Buniowska M., Kaczka P., Marszałek K. (2019). Wpływ wysokich ciśnień na bioprzyswajalność antyoksydantów owoców i warzyw – składniki lipofilowe, Przemysł Spożywczy, luty 1 tom 73, s.14-19. (IF₂₀₂₂ = 0, MNiSW / MEiN₂₀₁₉ = 20)
12. Marszałek K., Szczepanska J., Starzonek S., Woźniak Ł., **Trych U.**, Skąpska S., Rzoska S., Saraiva J. A., Lorenzo J. M., Barba F. J. (2019). Enzyme inactivation and evaluation of physicochemical properties, sugar and phenolic profile changes in cloudy apple juices after high pressure processing, and subsequent refrigerated storage, Journal of Food Process Engineering, e13034. (IF₂₀₁₉ = 1,703 MNiSW / MEiN₂₀₁₉ = 100)

Analiza biometryczna:

Sumaryczna liczba punktów MNiSW / MEiN₂₀₂₁: 1030

Sumaryczny Impact Factor: 38,249

Liczba cytowań*: 83

Liczba cytowań bez autocytowań*: 76

Indeks Hirscha*: 5

* wg bazy Scopus na dzień 29.06.2023 r.

Prezentacje ustne na konferencjach międzynarodowych i krajowych:

1. **Trych U.**, Skąpska S., Marszałek K. „Wpływ ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym na biodostępność betalain w soku z buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris* L.)” na Konferencji Naukowej WSiZ - "Bezpieczeństwo żywności i żywienia" w Warszawie; 20.09.2022
2. **Trych U.**, Skąpska S., Marszałek K. „Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na biodostępność betalain w soku z buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris* L.) w badaniach z wykorzystaniem modelu *in vitro*”. XIII Konferencja Technologów Przetwórstwa Owoców i Warzyw w Zegrzu k. Warszawy; 26-27.05.2022
3. **Trych U.**, Buniowska M., Skąpska S., Kapusta I., Marszałek K. „Biodostępność antocyjanów w soku z czarnej porzeczki po obróbce dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym”, XXVI Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej w Poznaniu; 19-20.05.2022
4. **Trych U.**, Buniowska M., Skąpska S., Marszałek K. „Wpływ procesów technologicznych na biodostępność antyoksydantów czarnej porzeczki”, XXIV Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej w Olsztynie; 23.05.2019
Wyróżnienie za prezentację wyników badań.

Postery prezentowane na konferencjach międzynarodowych i krajowych:

1. **Trych U.**, Woźniak Ł., Marszałek K. “Stability of beetroot dyes during digestion in the *in vitro* gastrointestinal model”, XXVII Sesja Naukowa Młodej Kadry Naukowej oraz Xth International Session of Young Scientific Staff, SGGW, Warszawa, 11-12.05.2023
2. **Trych U.**, Marszałek K., Starzonek S. “Application of HPP for modification of anthocyanins bioaccessibility from blackcurrant puree”, International Seminar on Soft Matter & Food – Physico-Chemical Models & Socio-Economic Parallels, 1st Polish-Slovenian Edition, IWC PAN Warszawa, 22-23.11.2021
3. **Trych U.**, Skąpska S., Rzoska S., Marszałek K. „Stabilność antyoksydantów czarnej porzeczki po obróbce technologicznej na poszczególnych etapach trawienia *in vitro*”, XII Konferencja Technologów Przetwórstwa Owoców i Warzyw, Łódź, 30-31.05.2019

Współautorstwo w prezentacjach na konferencjach międzynarodowych i krajowych:

1. Marszałek K., Liu X., Szczepańska J., **Trych U.**, Bi J., Skąpska S. „Influence of high pressure homogenization on the physicochemical quality and *in vitro* polyphenols bioaccessibility from apple juice”, 58th European High Pressure Research Group International Conference, 06-11.09.2020 Puerto de la Cruz (Hiszpania)
2. Marszałek K., **Trych U.**, Skąpska S. „Możliwości poprawy biodostępności i bioprzyswajalności składników bioaktywnych z soków” ; XXIII Międzynarodowe Sympozjum KUPS - Bieżące wyzwania branży sokowniczej, Gdańsk; 18-20.05.2022

Realizowane projekty badawcze i tematy realizowane z dotacji na działalność statutową IBPRS-PIB:

1. Temat statutowy: 102-ZO-01 „Określenie cytotoxycywności soku z buraków ćwikłowych wobec linii jelitowych komórek nowotworowych i jej ewentualnych zmian pod wpływem fermentacji z udziałem kultur LAB oraz obróbki HPP (high pressure processing).” Zad.2. Określenie cytotoxycywności wobec komórek nowotworowych oraz efektu ochronnego wobec czynników toksycznych (cytotoxycywność indukowana) soków z buraków ćwikłowych utrwalanych HHP. (2022-2024) - kierownik
2. Projekt: „Innowacyjny wysoko ciśnieniowy proces dla przedłużenia trwałości żywności ekologicznej „gotowej do spożycia” / ”ready to eat”” (akronim: HO-FOOD), finansowanie w ramach ERA-NET SUUSFOOD2 and CORE Organic Cofunds Joint Call 2019: Towards sustainable and organic systems” umowa nr SF-CO/HO-FOOD/4/2021.2 (2021-2024) - wykonawca
3. Temat statutowy: 167-ZO-01 „Badanie skrobi odpornej w produktach roślinnych oraz jej przemiany w procesach technologicznych” (2021-2022) - wykonawca
4. Temat statutowy: 134-ZO-01 „Badanie wpływu wysokiego ciśnienia na bioprzyswajalność hydrofilowych antyoksydantów przetworów z owoców i warzyw” (2019-2022) – główny wykonawca

5. Temat statutowy: 125-ZO-01 „Galaktolipidy w materiałach odpadowych przemysłu owocowo-warzywnego: analiza zawartości i izolacja przy użyciu ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla” (2019-2020) - wykonawca
6. Temat statutowy: 500-01-ZO-02 „Obecność maltozy w sokach jabłkowych jako indykator dojrzałości owoców i zafałszowań produktu” (2018-2019) - wykonawca
7. Projekt: „Opracowanie innowacyjnych produktów owocowych o wysokim potencjale prozdrowotnym, przeznaczonych szczególnie dla osób o specyficznych potrzebach żywieniowych” – finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju i realizowany w firmie Premium Rosa Sp. Z o.o.; w ramach Programu Badań Stosowanych nr PBS3/B8/24/2015, (2017-2018) - wykonawca

Działalność organizacyjna:

1. Członek komitetu organizacyjnego XIII Konferencji Technologów Przetwórstwa Owoców i Warzyw organizowanej przez ZO, 26-27.05.2022 r. Zegrze, k. Warszawy
2. Współprowadzenie warsztatów podczas Festiwalu Przemiany w Centrum Nauki Kopernik o tematyce: „Żywność pod wysokim ciśnieniem”. 3-6.10.2019 r. Warszawa

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelni biblioteki Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie.

.....