

Biotehnološki procesi kot sredstvo za povečanje dostopnosti in antioksidativne aktivnosti fenolnih spojin iz zrn krušne pšenice in pire

Marjeta MENCIN^{1, 2}

Received December 11, 2023; accepted May 01, 2024.
Delo je prispelo 11. decembra 2023, sprejeto 1. maja 2024.

Biotechnological processes as means to increase the accessibility and antioxidant activity of phenolic compounds from bread wheat and spelt grains

Abstract: Cereal grains, especially bran, are a rich source of phenolic compounds with antioxidant activity. The potential positive effects of phenolics from whole grains of spelt and bread wheat on human health are limited by the poor bioaccessibility and bioavailability of their bound phenolics. Studies have shown that biotechnological processes (germination/fermentation/enzymatic treatment) are an effective strategy for improving the release of bound phenolics from the cell wall matrix of cereal grains. In this review article, the effects of biotechnological processes on the composition, antioxidant activity and bioaccessibility of phenolics from spelt and bread wheat grains are discussed in detail. Existing research indicates the presence of a different phenolics in spelt and bread wheat grains, making whole grains excellent for improving nutritional value of products. It has been shown that biotechnological processes can effectively increase the content of bioaccessible and bioavailable phenolics in cereal grains, which enables improved *in vitro* antioxidant activity. Currently, there is a lack of *in vivo* studies to confirm the findings obtained *in vitro*, so *in vivo* studies to determine the biological activity of phenolic compounds from pre-treated grains will be crucial in the future.

Key words: phenolic compounds, antioxidant activity, accessibility, germination, fermentation, enzymatic treatment, LC-MS/MS

Biotehnološki procesi kot sredstvo za povečanje dostopnosti in antioksidativne aktivnosti fenolnih spojin iz zrn krušne pšenice in pire

Izvleček: Žitna zrna, zlasti otrobi, so bogat vir fenolnih spojin z antioksidativnim delovanjem. Potencialni pozitivni učinki fenolnih spojin iz polnozrnatih zrn krušne pšenice (*Triticum aestivum* L.) in pire (*Triticum spelta* L.) na človeško zdravje so zaradi slabe biološke dostopnosti in razpoložljivosti vezanih fenolnih spojin omejeni. Študije so pokazale, da so biotehnološki procesi (kaljenje/fermentacija/encimsko tretiranje) učinkovita strategija za izboljšanje sproščanja vezanih fenolnih spojin iz matriksa celičnih sten žitnih zrn. V preglednem članku temeljito obravnavamo vplive biotehnoloških procesov na sestavo, antioksidativno aktivnost in biološko dostopnost fenolnih spojin iz zrn krušne pšenice in pire. Obstoječe raziskave kažejo na prisotnost raznovrstnih fenolnih spojin v zrnih krušne pšenice in pire, zaradi česar so polnozrnatna žitna zrna odlična za uporabo v izdelkih, z namenom izboljšanja njihove hranilne vrednosti. Dokazano je, da biotehnološki procesi učinkovito povečajo vsebnost biološko dostopnih fenolnih spojin v žitnih zrnih, kar omogoča izboljšano *in vitro* antioksidativno delovanje. Trenutno primanjkuje *in vivo* študij za potrditev ugotovitev dobljenih *in vitro*, zato bodo v prihodnosti ključne *in vivo* študije določanja biološke aktivnosti fenolnih spojin iz predhodno obdelanih zrn.

Ključne besede: fenolne spojine, antioksidativna aktivnost, dostopnost, kaljenje, fermentacija, encimsko tretiranje, LC-MS/MS

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Slovenija

² Korespondenčni avtor, e-naslov: marjeta.mencin@ijs.si

1 UVOD

Krušno pšenico (*Triticum aestivum* L.) in piro (*Triticum spelta* L.) taksonomsko uvrščamo v družino trav (Poaceae), rod pšenice (*Triticum*). Pšenica predstavlja eno najpomembnejših rastlin namenjenih prehrani. Poznamo več vrst pšenice, vendar pa je v svetovnem merilu najbolj razširjena navadna ali krušna pšenica. To potrjujejo podatki FAOSTAT, ki navajajo, da so leta 2021 pridelali več kot 770 milijonov ton krušne pšenice na več kot 200 milijonih hektarjev (FAOSTAT, 2023). Krušna pšenica in izdelki iz nje predstavljajo dober vir energije, esencialnih aminokislin, mineralov, vitaminov in prehranskih vlaknin (Escarnot in sod., 2012). Pira predstavlja najstarejšo obliko heksaploidne pšenice. V začetku 20. stoletja se je pridelava pira močno zmanjšala, v zadnjih letih pa postaja pomembna alternativa navadni pšenici, zaradi večjega povpraševanja po ekološko pridelani hrani in pozitivnih učinkov na zdravje ljudi (Bojňanská in Frančáková, 2011). Pidelava pira ima številne prednosti, kot so majhni stroški pridelave, primerna je za gojenje brez pesticidov, saj ima dobro odpornost proti boleznim in škodljivcem, raste tudi v težkih pridelovalnih razmerah, vendar pa je hektarski pridelek manjši kot pri pšenici. Iz prehranskega stališča pa pira v primerjavi s krušno pšenico postaja bolj zaželena zaradi večje vsebnosti beljakovin (Pruska-Kedzior in sod., 2008), prostih sladkorjev (Zörb in sod., 2007), maščobnih kislin in lipidov (Ruibal-Mendieta in sod., 2005). Tako pri krušni pšenici kot piri predstavljajo ogljikovi hidrati glavne sestavine (59-71 %) zrna (Escarnot in sod., 2012), ki so bogata tudi s prehranskimi vlakninami (2 %). Poleg tega, da ima pira večjo vsebnost proteinov kot krušna pšenica, pa se razlikuje tudi razmerje med gliadinom in gluteninom, ki se pri piri giblje med 2,8 in 4,0, pri krušni pšenici pa med 1,5 in 3,1, kar nakazuje na večjo razteznost testa in manjši volumen pirinega kruha (Geisslitz in sod., 2019).

Pri vsebnosti bioaktivnih spojin nekateri avtorji navajajo, da večjih razlik med piro in krušno pšenico ni mogoče opaziti (Bonafaccia in sod., 2000), medtem ko drugi avtorji pripisujejo beli pirini moki večjo vsebnost antioksidantov kot moki iz krušne pšenice (Wang in sod., 2020). Bioaktivne spojine se v žitnih zrnih večinoma nahajajo v zunanjih plasteh zrna (perikarp, testa, alevronska plast), zato med bolj zdrave živilske izdelke sodijo polnozrnatni izdelki. V žitnih zrnih so najpogostejše bioaktivne spojine: prehranske vlaknine (β -glukani, arabinosilani, rezistentni škrob), fenolne spojine (fenolne kisline, flavonoidi), karotenoidi, steroli, fitati, itd. (Gani in sod., 2012).

Fenolne spojine se v rastlinski celici nahajajo v topni obliki, kamor spadajo proste in konjugirane fenolne spojine, ter v netopni vezani obliki. Proste fenolne spojine

so v nevezani obliki, konjugirane pa so vezane na topne molekule z majhno molekulsko maso (sladkorji, maščobne kisline), običajno pride med njimi do tvorbe kovalentnih vezi, lahko pa tudi do nekovalentnih vezi, vodikovih vezi ali hidrofobnih interakcij med različnimi molekulami. Večina topnih fenolnih spojin se nahaja v vakuolah rastlinskih celic (Shahidi in Yeo, 2016; Xu in sod., 2020). Proste in konjugirane fenolne spojine tako uvrščamo med ekstraktibilne fenolne spojine, netopne vezane fenolne spojine pa med neekstraktibilne (Xu in sod., 2020). Količinsko najbolj zastopana oblika so netopne vezane fenolne spojine, kar so potrdile tudi številne raziskave (Chen in sod., 2017; Pang in sod., 2018). Vezane fenolne spojine tvorijo različne vezi z molekulami v celičnih stenah zrna, tako lahko karboksilna skupina fenolnih kislin (benzojske in cimetne kisline) tvori estrske vezi s hidroksilno skupino komponent celične stene (strukturni ogljikovi hidrati, proteini). Med hidroksilnimi skupinami fenolnih spojin in komponentami celične stene (celuloza, lignin) se lahko tvorijo etrske vezi (Acosta-Estrada in sod., 2014). Nadalje se lahko med ogljikovim atomom fenolnih spojin in ogljikovim atomom komponent celičnih sten tvorijo tudi C-C vezi (C-glikozidi) ali pa fenolne spojine sodelujejo pri tvorbi vodikovih in elektrostatskih vezi (Shahidi in Yeo, 2016). Vezane fenolne spojine predstavljajo glede na skupno količino fenolnih spojin: 92 % v piri (Mencin in sod., 2022a), in 75 % v krušni pšenici (Adom in Liu, 2002). Nahajajo se v otrobih žitnih zrn, zato je pomembno poudariti, da uživanje žit pripomore k večjemu vnosu fenolnih spojin le pri uživanju polnozrnatih izdelkov.

Fenolne spojine zaradi svoje strukture izražajo antioksidativno aktivnost, tako da prostim radikalom oddajo elektron ali vodikov atom in jih na ta način stabilizirajo (Terpinc in Abramovič, 2010). V raziskavah kjer so *in vitro* testi določali antioksidativno aktivnost, so ugotovili, da vezane fenolne spojine izkazujejo znatno večjo antioksidativno aktivnost v primerjavi s prosto in konjugirano obliko (Acosta-Estrada in sod., 2014; Chen in sod., 2017; Pang in sod., 2018). V *in vivo* raziskavi, ki je bila narejena na 32 zdravih prostovoljcih, so Costabile in sod. (2008) ugotovili, da uživanje polnozrnatih krušne pšenice prispeva k povečani koncentraciji ferulne kisline v krvi, hkrati pa pozitivno vpliva na črevesno mikrobioto, saj se je povečala populacija koristnih bifidobakterij in mlečnokislinskih bakterij.

Struktura matriksa celičnih sten v otrobih in način, kako so fenolne spojine vključene v matriks, močno vplivata na njihovo biološko dostopnost. Zato so se razvile različne tehnologije, s katerimi olajšamo cepitev vezi, povečamo količino sproščenih vezanih fenolnih spojin in posledično izboljšamo njihovo biološko dostopnost (Wang in sod., 2014). Biotehnoški procesi, kamor spa-

dajo kaljenje, fermentacija in encimsko tretiranje, trenutno predstavljajo eno izmed najbolj aktualnih tem s področja izboljšanja biološke dostopnosti in razpoložljivosti fenolnih spojin.

Kaljenje predstavlja ekonomično in učinkovito naravno metodo, ki zmehča strukturo in izboljša hranilno vrednost zrna - poveča se vsebnost bioaktivnih spojin, hkrati pa se zmanjša vsebnost antinutritivnih komponent (Singh in Sharma, 2017). Kaljenje poveča aktivnost hidrolitičnih encimov, spodbudi nastanek novih in aktivacijo tistih, ki so v nekaljenem zrnu v neaktivnem stanju. Med procesom kaljenja pride do razgradnje makrohranil (ogljikovih hidratov, proteinov, lipidov), kar poveča količino njihovih presnovnih produktov (enostavnih sladkorjev, prostih aminokislin, organskih kislin), istočasno pa se sproži sinteza sekundarnih metabolitov. Z razgradnjo makrohranil se posledično sproščajo tudi vezane fenolne spojine, kar v začetni fazi kaljenja pomeni upad vezane frakcije in porast proste (Terpinc, 2019). Na omenjene spremembe lahko dodatno vpliva abiotični stres med kaljenjem. Rastline se na stresne razmere odzivajo tako, da inducirajo sintezo različnih zaščitnih spojin, tudi številnih fenolnih spojin, ki omogočajo preživetje in nadaljnjo rast v takšnih razmerah (Falcinelli in sod., 2017; Chen in sod., 2019; Ma in sod., 2019). Različne raziskave so pokazale, da je količina fenolnih spojin in razmerje med ekstraktibilnimi in vezanimi fenolnimi spojinami odvisno od obdelave zrn pred kaljenjem, razmer namakanja (Yang, 2001; Xu in sod., 2009) in od razmer, v katerih zrno kali: temperature (Pauca-Menacho in sod., 2017; Chavarín-Martínez in sod., 2019; Mencin in sod., 2021a), časa kaljenja (Terpinc in sod., 2016; Pauca-Menacho in sod., 2017; Kim in sod., 2018), načina osvetljevanja (Xiang in sod., 2017) in relativne vlage (Yang, 2001).

Druge postopke, s katerim lahko povečamo biološko dostopnost bioaktivnih spojin, predstavljajo različni tipi fermentacije (alkoholna, mlečnokislinska, spontana, itd.) (Angelino in sod., 2017). Prednost tega procesa je, da poleg encimov iz žitnih zrn sodelujejo tudi encimi eksternih mikroorganizmov, ki pripomorejo k razgradnji celične stene. Prav tako pa fermentacija spodbuja sintezo novih spojin kot tudi encimsko transformacijo že prisotnih bioaktivnih spojin. Dosedanje študije o vplivu fermentacije na vezane fenolne spojine v različnih žitnih zrnih so potrdile povečanje njihove biološke dostopnosti in razpoložljivosti (Wang in sod., 2014). Vpliv fermentacije na fenolne spojine je v glavnem odvisen od vrste zrn (Đorđević in sod., 2010), vrste mikroorganizmov (Katina in sod., 2007; Đorđević in sod., 2010; Mencin in sod., 2022a) in razmer fermentacije (temperatura, pH, čas) (Boskov Hansen in sod., 2002; Katina in sod., 2007).

Prav tako učinkovit postopek za sproščanje vezanih

fenolnih spojin iz komponent celične stene žitnih zrn je encimsko tretiranje, za katerega velja, da je okolju prijazno, energetsko učinkovito in sprošča le specifične spojine, ne da bi pri tem poškodoval ostale spojine (Ferri in sod., 2020). Pri encimskem tretiranju zrna neposredno obdelamo s hidrolitičnimi encimi, s čimer izboljšamo biološko dostopnost in razpoložljivost fenolnih spojin. Encimi, ki hidrolizirajo celične stene (celulaze, ksilanaze, esteraze itd.), so bili že večkrat uporabljeni za razgradnjo matriksa celičnih sten v žitnih zrnih (Moore in sod., 2006; Acosta-Estrada in sod., 2014; Bei in sod., 2018; Mencin in sod., 2022b). Feruloil esteraze spadajo v skupino esteraz, ki hidrolizirajo estrsko vez med hidroksicimetnimi kislinami in hemicelulozo, prisotno v celičnih stenah žitnih zrn. Prav tako je feruloil esteraza sposobna katalizirati cepitev kovalentne vezi med dvema ferulnima kislinama, ki sta pritrjeni na sosednja arabinoksilana. Feruloil esteraza postane aktivna tudi med kaljenjem, našli pa so jo tudi pri laktobacilih, prisotnih v črevesju človeka (Faulds in sod., 2004; Gänzle, 2014). Številni znanstveni članki (Sancho in sod., 2001; Mathew in Abraham, 2004; Moore in sod., 2006) opisujejo sinergistične interakcije med ksilanazami, ki naključno cepijo β -1,4 ksilansko strukturo, in med feruloil esterazami, ki olajšajo ksilanazam dostopnost do komponent celičnih sten. V povezavi z razgradnjo celičnih sten se omenjajo tudi α -amilaze in proteaze (Singh in sod., 2016).

Nekaj študij (Katina in sod., 2007; Anson in sod., 2009) je bilo narejenih tudi na področju uporabe različnih kombinacij biotehnoloških procesov (kaljenja/fermentacije/encimskega tretiranja) na različnih žitnih zrnih. Raziskave kažejo na sinergističen učinek pri sočasni uporabi različnih biotehnoloških procesov, saj pripomorejo k večji koncentraciji in aktivnosti hidrolitičnih encimov.

Uživanje bioaktivnih spojin je ključno predvsem zaradi njihovih ugodnih učinkov na naše zdravje. Preden lahko posamezni spojini pripišemo pozitivno delovanje, je potrebno poznati njeno biološko dostopnost in razpoložljivost v človeškem organizmu. Biološka dostopnost (ang. bioaccessibility) je definirana kot količina snovi, ki se lahko sprosti iz matriksa hrane v prebavni trakt in je na voljo za absorpcijo v tankem črevesu. Razgradnja hrane, ki je ključna za biološko dostopnost in razpoložljivost, se prične v ustih, nadaljuje se v želodcu in v črevesu. Vezane fenolne spojine niso dostopne encimom gastrointestinalnega (GI) trakta, tako ima več kot 90 % fenolnih spojin v žitnih zrnih majhno biološko dostopnost. Neabsorbirane fenolne spojine potujejo v debelo črevo, kjer njihovo razgradnjo deloma katalizirajo encimi črevesne mikrobiote (Vitaglione in sod., 2008).

Prispevek povzema rezultate raziskav, ki so bile opravljene na zrnih krušne pšenice in pire z namenom

izboljšanja dostopnosti in antioksidativne aktivnosti fenolnih spojin z različnimi biotehnološkimi procesi.

2 BIOTEHNOLOŠKI PROCESI IN NJIHOVA APLIKACIJA NA PODLAGI DOSEDANJIH RAZISKAV

V okviru svoje študije so Mencin in sod. (2021) raziskovali vpliv kaljenja pirinih zrn v različnih stresnih razmerah na antioksidativne lastnosti fenolnih spojin. Zanimala jih je vsebnost ekstraktibilnih in vezanih skupnih fenolnih spojin, določena s Folin-Ciocalteu metodo, hkrati pa tudi identifikacija in kvantifikacija posameznih fenolnih spojin, določena s HPLC-MS/MS metodo. Ekstraktibilne fenolne spojine so ekstrahirali z absolutnim metanolom, iz trdnega preostanka po metanolni ekstrakciji pa so netopne vezane fenolne spojine sprostili iz vezane oblike s pomočjo alkalne hidrolize. V raziskavi so zrna pire kalili 144 h v temi, stresne razmere so zagotovili z manj ugodno temperaturo kaljenja, manjšim dodatkom vode, povečano slanostjo in osmolarnostjo, z mehansko poškodbo kalčkov ter z različnimi kombinacijami naštetega. Prav kombiniranje različnih stresnih razmer je rezultiralo v večjih vsebnostih ekstraktibilnih in vezanih fenolnih spojin, hkrati pa se je povečala tudi sposobnost lovljenja DPPH[•] radikalov v primerjavi s kontrolo, tj. zrna kaljena 144 h pri 20 °C. Ne glede na vrsto abiotičnega stresa, so opazili znatne razlike v vsebnosti ekstraktibilnih in vezanih fenolnih spojin pri kaljenih zrnih, slednje so predstavljale kar dve tretjini vseh fenolnih spojin. Kaljenje pirinih zrn ob dodatku 25 mM NaCl in 50 mM sorbitola brez aplicirane mehanske poškodbe je med vsemi preizkušenimi kombinacijami najbolj prispevala k povečanju vsebnosti fenolnih spojin in njihove antioksidativne aktivnosti. Na podlagi preliminarne poskuse so avtorji ugotovili, da sta ustrezna temperatura kaljenja in dodatek vode predpogoj za povečano tvorbo fenolnih spojin med kaljenjem, saj so optimalno kombinacijo stresa aplicirali pri 25 °C in razmerju med maso zrn in dodatkom vode: 1:2 (15 g:30 ml). Prav tako so opazili, da so ekstraktibilne frakcije fenolnih spojin izkazovale relativno veliko antioksidativno aktivnost, glede na znatno večjo vsebnost fenolnih spojin v vezanih frakcijah. Avtorji so predvidevali, da večja heterogenost ekstraktibilne frakcije prispeva k antioksidativni aktivnosti.

Hübner in Arendt (2013) sta poročala, da je vsebnost fenolnih spojin, ki jih rastlina sintetizira in kopiči med kaljenjem, odvisna predvsem od odziva rastline na stresne dejavnike. Nadalje so različne raziskave pokazale, da kaljenje zrn poveča vsebnost topnih fenolnih spojin, kar pripisujejo sintezi *de novo* in različnim biološkim transformacijam (Gan in sod., 2017; Kim in sod., 2018).

Transformacije, ki se dogajajo med kaljenjem, so odvisne tudi od dolžine kaljenja, saj se v zgodnji fazi kaljenja zaradi razgradnje gradnikov celičnih sten poveča vsebnost enostavnih sladkorjev in aminokislin, hkrati pa se začne sproščati tudi fenolne spojine vezane na komponente celičnih sten. Z daljšim časom kaljenja se začnejo sintetizirati rastlinske celice z novimi celičnimi stenami in nekatere *de novo* sintetizirane topne fenolne spojine se vežejo z novo nastalimi komponentami celičnih sten. Tako se pri daljšem času kaljenja začne povečevati vsebnost vezanih fenolnih spojin (Wang in sod., 2014).

Večina raziskav poroča, da kaljenje znatno izboljša tudi antioksidativno aktivnost ekstraktibilnih fenolnih spojin v primerjavi z nekaljenimi žitnimi zrnji (krušna pšenica, riž, koruza, ječmen), kar pripisujejo povečani vsebnosti antioksidativnih spojin v kaljenih zrnih (Donkor in sod., 2012; Ti in sod., 2014; Žilić in sod., 2015).

Živković in sod. (2023) so poročali, da je kaljenje (96 h) pirinih zrn znatno povečalo vsebnost prostih in vezanih metabolitov. Večina fenolnih spojin pa je bila prisotna v vezani frakciji, kjer je prevladovala *trans*-ferulna kislina. V prosti frakciji so našli veliko vsebnost apigenin di-C-glikozidov, kaljenje pa je najbolj vplivalo na vsebnost šaftozida, saj se je vsebnost le-tega povečala za trikrat. Opazili so tudi povečanje antioksidativne aktivnosti kaljenih zrn pire, predvsem na račun kopičenja sekundarnih metabolitov.

Prav tako so Mencin in sod. (2021) poročali, da sta *trans*-ferulna in *p*-kumarna kislina glavni predstavnici identificiranih vezanih fenolnih spojin v 144 h kaljenih zrnih pire, njuna vezana oblika pa predstavlja kar 99 % od skupne vsebnosti (ekstraktibilne + vezane) posamezne kisline. Zanimivo je, da so stresne razmere vplivale na zmanjšanje vsebnosti posameznih ekstraktibilnih fenolnih spojin, po drugi strani pa se je vsebnost vezanih povečala v vzorcih, ki so bili izpostavljeni povečani slanosti in osmolarnosti.

Fermentacija je še ena koristna tehnika predhodne obdelave zrn, ki učinkovito sprošča fenolne spojine iz žitnih otrobov (Angelino in sod., 2017). Mencin in sod. (2022a) so pirina zrna izpostavili različnim tipom fermentacije (mlečnokislinska, alkoholna, kombinirana (mlečnokislinska + alkoholna), spontana), ki so jih kombinirali s kaljenjem in z encimskim tretiranjem. Ugotovili so, da se je ne glede na prisotno mikrofloro, po fermentaciji neobdelanih, kaljenih in encimsko tretiranih zrn povečala vsebnost ekstraktibilnih in vezanih fenolnih spojin. Hkrati se je znatno zmanjšalo razmerje med vezanimi in ekstraktibilnimi fenolnimi spojinami, kar je posledično pozitivno vplivalo na dostopnost pirinih antioksidantov. Rezultati so pokazali, da tako obdelava pirinih zrn s kaljenjem in encimskim tretiranjem

pred fermentacijo, kot tudi vrsta fermentacije vplivata na spremembe vsebnosti skupnih fenolnih spojin.

Wang in sod. (2014) so poročali, da kombinacija kaljenja in fermentacije vodi do sinergističnih učinkov, saj kaljena zrna predstavljajo bogat vir fermentabilnih virov (sladkor, dušikove spojine), hkrati pa tako kaljenje kot tudi fermentacija prispevata k večji koncentraciji in aktivnosti hidrolitičnih encimov, kar vodi k boljši biološki dostopnosti fenolnih spojin. Med fermentacijo zrn se vsebnost bioaktivnih komponent spreminja zaradi metabolne aktivnosti prisotnih mikroorganizmov, ki razgrajujejo estrske vezi in hidrolizirajo β -glukozidne vezi, pri čemer se sproščajo vezane fenolne spojine (Adebo in Medina-Meza, 2020). Po drugi strani pa na vsebnost fenolnih spojin med fermentacijo lahko vpliva tudi endogena sinteza fenolnih spojin v mikroorganizmih (Chrzanowski, 2020).

Mencin in sod. (2022a) so poročali, da so največjo vsebnost ekstraktibilnih in vezanih fenolnih spojin ter njihovo antioksidativno aktivnost določili pri kaljenih zrnih fermentiranih s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen. Zanimivo, pri encimsko tretiranih pirinih zrnih je najučinkoviteje povečala vsebnost ekstraktibilnih fenolnih spojin fermentacija z bakterijo *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1923 (Approved Lists 1980). medtem ko je imela ista fermentacija z *L. plantarum* negativen vpliv na vsebnost vezanih fenolnih spojin. O zmanjšanju vsebnosti fenolnih spojin so poročali tudi Spaggiari in sod. (2020), ki so predvidevali, da je razlog v metabolnih lastnostih mikroorganizmov, ki lahko transformirajo fenolne spojine v različne metabolite. Vsebnost ekstraktibilne *trans*-ferulne kisline se je najbolj povečala pri kaljeni piri fermentirani s kvasovko *S. cerevisiae* in to za kar 2922 %. Podobno so poročali tudi Anson in sod. (2009), fermentacija krušne pšenice s kvasovko *S. cerevisiae* je povečala biološko dostopnost ferulne kisline. Prav tako so Konopka in sod. (2014) poročali, da alkoholna fermentacija poveča vsebnost ekstraktibilne ferulne kisline v pšenici za kar 10-krat v primerjavi z neobdelanimi zrnji.

Mencin in sod. (2022a) so ugotovili tudi, da so fermentirana neobdelana, kaljena in encimsko tretirana pirina zrna, ki so imela večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin, izkazovala tudi boljšo antioksidativno aktivnost, določeno z DPPH in ABTS testom. Avtorji so poudarili, da je kombiniranje biotehnoških procesov najučinkovitejši način za znatno povečanje vsebnosti fenolnih spojin in njihove antioksidativne aktivnosti.

Moore in sod. (2006) so potrdili, da obdelava s kvasovkami (*S. cerevisiae*) znatno poveča skupno vsebnost prostih fenolnih spojin in antioksidativno aktivnost pšeničnih otrobov. Avtorji študije so izpostavili različno zmožnost kvasovk za presnavljanje posameznih fenolnih

spojin. Spaggiari in sod. (2020) so v fermentiranih pšeničnih otrobih ugotovili relativno veliko vsebnost kavne kisline, kar nakazuje na metabolno aktivnost mikroorganizmov. Tudi Žilić in sod. (2015) so v svoji raziskavi na krušni pšenici izpostavili, da lahko bakterije *Lactobacillus* spp. proizvajajo kavno kislino iz klorogenske kisline. Raziskava, ki so jo naredili Montemurro in sod. (2019), je pokazala, da fermentacija kaljenih zrn krušne pšenice s kislim testom ne vpliva zgolj na povečanje fenolnih spojin, ampak tudi na povečanje vsebnosti peptidov, prostih aminokislin, γ -aminomaslene kisline ter zmanjša koncentracijo fitinske kisline, kondenziranih taninov in inhibitorjev tripsina.

Tretji biotehnoški proces, s katerim lahko izboljšamo biološko dostopnost fenolnih spojin v zrnih, je encimsko tretiranje. Mencin in sod. (2022b) so pirina zrna tretirali s celulazami, ksilanazami, feruloil esterazami, α -amilazami in proteazami, posamezno in v različnih kombinacijah. Ugotovili so, da je encimsko tretiranje zrn, ne glede na vrsto uporabljenih encimov, izboljšalo vsebnost ekstraktibilnih skupnih fenolnih spojin do 5-krat v primerjavi z netretiranimi zrnji. Po drugi strani se je vsebnost vezanih fenolnih spojin zmanjšala po encimskem tretiranju. Tretiranje pirinih zrn z vsemi petimi encimi hkrati je vplivalo na največje povečanje vsebnosti ekstraktibilnih fenolnih spojin. Nadalje so avtorji poročali, da tretiranje zrn samo s feruloil esterazami ni bistveno povečalo vsebnost ekstraktibilnih skupnih fenolnih spojin. Kot razlog so navedli, da feruloil esteraze niso sposobne samostojno hidrolizirati estrskih vezi med hidroksicimetnimi kislinami in hemicelulozo v zrnih pšenice in pire zaradi morebitnih steričnih ovir, ki jih povzroča struktura polisaharidov, s čimer je okrnjena tudi migracija encimov. Po drugi strani pa so feruloil esteraze v kombinaciji s proteazami pokazale veliko sposobnost sproščanja vezanih fenolnih spojin, kar nakazuje na to, da lahko feruloil esteraze hidrolizirajo estrsko in etrsko vez med fenolnimi spojinami in komponentami celičnih sten zrn, po tem, ko proteaze hidrolizirajo strukturne proteine (Mencin in sod. 2022b). Čeprav so avtorji uporabili kar pet različnih hidrolitičnih encimov, pa encimsko tretiranje vseeno ni v celoti sprostilo vezanih fenolnih spojin. Slednje je v skladu z navedbo Moore in sod. (2006), da matriks celičnih sten zrn vsebuje tudi strukturne elemente, ki jih encimi ne morejo hidrolizirati.

Kombiniranje encimskega tretiranja z ostalima dvema biotehnoškima procesoma (kaljenjem in fermentacijo) je dodatno povečala vsebnost ekstraktibilnih skupnih fenolnih spojin v primerjavi s samo kaljenimi oz. fermentiranimi zrnji. Poleg tega je encimsko tretiranje kaljenih oz. fermentiranih zrn rezultiralo v povečanju deleža ekstraktibilnih fenolnih spojin glede na skupne (ekstraktibilne + vezane) in to za 10 % oz. 38 % (Mencin

in sod., 2022b). Bei in sod. (2018) so na podlagi zaporedne uporabe encimskega tretiranja in fermentacije na zrnih ovsa ugotovili, da poleg transformacije netopnih fenolnih spojin v topne, omogoča oslabitev kovalentnih vezi med netopnimi fenolnimi spojinami in komponentami celičnih sten, zato netopne fenolne spojine lažje ekstrahiramo in tako določimo njihovo večjo vsebnost.

Mencin in sod. (2022b) so poročali, da se je vsebnost prevladujočih fenolnih kislin (*p*-kumarne, *trans*-ferulne, kavne, *p*-hidroksibenzojske kisline) v ekstraktibilni frakciji pirinih zrn po encimskem tretiranju znatno povečala v primerjavi z netretiranimi zrnji. Največje povečanje ekstraktibilne *trans*-ferulne kisline so zasledili pri zrnih tretiranih hkrati s ksilanazami in feruloil esterazami. Svoje rezultate so potrdili s teorijo, da ksilanaze naključno cepijo β -1,4 ksilansko strukturo, medtem ko so feruloil esterase sposobne sproščati ferulno kislino (Sancho in sod., 2001). Podobne raziskave so delali tudi Rakariyatham in sod. (2020), ki so ugotovili, da tretiranje zrn s celulazami poveča sproščanje *o*-kumarne kisline, nadalje so Peixoto Araujo in sod. (2019) ugotovili, da tretiranje s proteazami in celulazami poveča vsebnost ekstraktibilne ferulne in *p*-hidroksibenzojske kisline. Mencin in sod. (2022b) so poročali tudi o znatnem povečanju vsebnosti ekstraktibilne *trans*-ferulne kisline za kar 5899 % oz. 8263 % pri kombiniranju encimskega tretiranja s kaljenjem in fermentacijo pirinih zrn. Rezultati nakazujejo na to, da kaljena in fermentirana zrna, v primerjavi z neobdelanimi zrnji, predstavljajo znatno boljši substrat za tretiranje z eksternimi encimi. Avtorji so zaključili, da predhodna obdelava zrn omogoča eksternim encimom lažji dostop do njihovih substratov, v primerjavi z neobdelanimi zrnji.

Prav tako so Mencin in sod. (2022b) potrdili, da je kombinacija kaljenja oz. fermentacije z encimskim tretiranjem dobra strategija za izboljšanje antioksidativne aktivnosti ekstraktibilnih fenolnih spojin. Tudi Azmir in sod. (2013) so v preglednem članku poročali, da encimsko tretiranje poveča antioksidativno aktivnost žitnih zrn, razlog pa vidijo v sproščanju polarnih antioksidantov, vezanih na komponente celičnih sten, in/ali s hidrolizo biopolimerov, kot so polipeptidi in polisaharidi. Wang in sod. (2018) pa navajajo še dve možni razlagi za povečanje antioksidativne aktivnosti encimsko tretiranih zrn: prva je, da z encimskim tretiranjem povečamo topnost fenolnih spojin iz zrn, druga pa je, da po encimskem tretiranju pridobimo fenolne spojine z večjo antioksidativno aktivnostjo.

Zanimive so tudi ugotovitve Mencin in sod. (2021, 2022a, 2022b), kjer so poleg *in vitro* antioksidativne aktivnosti pirinih zrn obdelanih z biotehnološkimi procesi, določali tudi antioksidativno aktivnost v živi celici – kvasovki *S. cerevisiae*, ki omogoča vpogled v živo okolje. Fenolne spojine kaljenih zrn niso pokazale antioksidativne

aktivnosti v celici, ker identificirane spojine niso uspele vstopiti v celico in jo zaščititi pred oksidacijo. Po drugi strani pa so ekstraktibilne frakcije fermentiranih in encimsko tretiranih pirinih zrn izkazale antioksidativno aktivnost v celici, medtem, ko vezane frakcije po večini niso izkazovale antioksidativne aktivnosti v celici. Avtorji so poudarili, da je za antioksidativno delovanje fenolnega ekstrakta v živi celici, ključno tudi razmerje med različnimi fenolnimi spojinami, ki vstopajo v celico. V njihovem primeru so določili manjšo znotrajcelično oksidacijo pri prehajanju večje količine flavonoidov in manjše količine hidroksicimetnih kislin v celico.

Biotehnološke procese raziskovalci pogosto uporabljajo z namenom izboljšanja biološke dostopnosti različnih bioaktivnih komponent v matriksu celičnih sten rastlin. Tako so Mencin in sod. (2022c) po obdelavi pirinih zrn z različnimi biotehnološkimi procesi določali tudi biološko dostopnost prisotnih fenolnih spojin. Uporabili so *in vitro* statični prebavni model INFOGEST (Brodkorb in sod., 2019), s katerim so posnemali prebavo v ustih, želodcu in tankem črevesu. Avtorji so poročali, da so biotehnološki procesi statistično značilno povečali vsebnost biološko dostopnih skupnih in posameznih fenolnih spojin iz pirinih zrn v primerjavi z neobdelanimi zrnji. Nadalje so poudarili, da kombiniranje biotehnoloških procesov, še posebej kaljenja in alkoholne fermentacije, najučinkoviteje izboljša biološko dostopnost fenolnih spojin. Biotehnološko obdelana zrna imajo znatno večjo začetno vsebnost fenolnih spojin kot neobdelana, posledično jih lahko več vstopa v debelo črevo. Po prebavi je bila vsebnost biološko dostopnih skupnih fenolnih spojin v kaljenih pirinih zrnih fermentiranih s kvasovko *S. cerevisiae* kar 7-krat večja kot pri neobdelanih zrnih. Podobno so opazili tudi Anson in sod. (2009), ki so poročali, da je kombinacija uporabe eksternih encimov in fermentacije pri otrobih krušne pšenice učinkovito povečala biološko dostopnost ferulne kisline za kar 5-krat v primerjavi z neobdelanimi otrobi. Večina raziskav omenja velike izgube fenolnih spojin med procesom prebave (Ortega in sod., 2011; Ydjedd in sod., 2017; Chait in sod., 2020). Drastične izgube fenolnih spojin po GI prebavi so lahko posledica spremembe v molekularni strukturi fenolnih spojin zaradi različnih kemijskih reakcij, predvsem oksidacije in polimerizacije, in zaradi encimskega delovanja, ki lahko povzroči spremembe v njihovi topnosti (Ortega in sod., 2011). Mencin in sod. (2022c) so poročali, da so se v primeru *trans*-ferulne kisline, ki prevladuje v pirinih zrnih, še posebej izkazale kombinacije dveh biotehnoloških procesov, ki so njeno biološko dostopnost povečale za od 24-krat (kaljena + encimsko tretirana zrna) do 63-krat (encimsko tretirana + fermentirana zrna) v primerjavi z neobdelanimi zrnji. Zanimive so tudi ugotovitve Zeng in sod. (2016), ki so poročali, da je bila

vsebnost biološko dostopnih fenolnih spojin v krušni pšenici manjša kot pri ovsu kljub večji vsebnosti skupnih fenolnih spojin in močnejše izraženi antioksidativni aktivnosti. To nakazuje, da žitna zrna z večjo vsebnostjo fenolnih spojin niso nujno tista z večjo biološko dostopnostjo. Očitno igra matriks celičnih sten žitnih zrn ključno vlogo pri prebavljivosti fenolnih spojin. Lima in sod. (2019) so izpostavili, da na stabilnost fenolnih spojin med postopkom GI prebave znatno vpliva njihova kemijska struktura, saj imajo fenolne spojine različno občutljivost na spremembo vrednosti pH in aktivnost prebavnih encimov. Mencin in sod. (2022c) so ugotovili, da je kljub uporabi različnih biotehnoloških postopkov, ki so znatno povečali biološko dostopnost fenolnih spojin, večji del fenolnih spojin ostal v biološko nedostopni obliki, ki nadalje vstopa v debelo črevo. V debelem črevesu pa poteka fermentacija, kjer bakterijski encimi olajšajo sproščanje fenolnih spojin, ki v tankem črevesu niso bile dostopne (Li in sod., 2022).

3 ZAKLJUČKI

Žitna zrna predstavljajo pomemben vir vlaknin in nanje vezanih bioaktivnih spojin, ki imajo majhno biološko dostopnost. Da bi izkazale svoje pozitivne učinke na zdravje, se morajo fenolne spojine sprostiti iz matriksa celičnih sten v hrani in biti dostopne v prebavnem traktu. Znatno večja izhodiščna vsebnost fenolnih spojin v biotehnološko obdelanih zrnih sovpada z večjo količino fenolnih spojin, ki bo uspešno prešla proces prebave. Dosedanji izsledki raziskav kažejo, da imajo biotehnološki procesi pozitiven učinek na povečanje vsebnosti biološko dostopnih fenolnih spojin in njihove antioksidativne aktivnosti v žitnih zrnih. Rezultati predstavljenih raziskav odpirajo možnosti za razvoj različnih funkcionalnih živil, saj prav s hranili osiromašena živila znatno pripomorejo k večji pojavnosti kroničnih bolezni. Zaradi številnih pozitivnih lastnosti biotehnoloških procesov, pa bi bili potencialni živilski izdelki z izboljšano hranilno vrednostjo dobro sprejeti med potrošniki. V prihodnje bi bilo potrebno dati poudarek na raziskavah, ki se bodo dotikale kombinacij biotehnoloških procesov, zlasti kaljenja in fermentacije, saj se je prav ta kombinacija izkazala za najučinkovitejšo metodo povečanja vsebnosti biološko dostopnih fenolnih spojin. Nadaljnje študije so potrebne tudi na področju biološke transformacije fenolnih spojin v njihove metabolite, saj lahko ti lažje vstopajo v živo celico, hkrati pa bi bilo potrebno prenesti *in vitro* študije določanja biološke dostopnosti in razpoložljivosti fenolnih spojin na *in vivo* nivo.

4 VIRI

- Acosta-Estrada B. A., Gutiérrez-Urbe J. A., Serna-Saldívar S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Adebo O. A., Gabriela Medina-Meza I. (2020). Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: a mini review. *Molecules*, 25(4), 927, 9 str. <https://doi.org/10.3390/molecules25040927>
- Adom K. K., Liu R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6182–6187. <https://doi.org/10.1021/jf0205099>
- Angelino D., Cossu M., Marti A., Zanoletti M., Chiavaroli L., Brighenti F., Rio D. D., Martini D. (2017). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: a review. *Food & Function*, 8(7), 2368–2393. <https://doi.org/10.1039/C7FO00574A>
- Anson N. M., Selinheimo E., Havenaar R., Aura A.-M., Mattila I., Lehtinen P., Bast A., Poutanen K., Haenen G. R. M. M. (2009). Bioprocessing of wheat bran improves *in vitro* bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6148–6155. <https://doi.org/10.1021/jf900492h>
- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bei Q., Chen G., Lu F., Wu S., Wu Z. (2018). Enzymatic action mechanism of phenolic mobilization in oats (*Avena sativa* L.) during solid-state fermentation with *Monascus anka*. *Food Chemistry*, 245, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.086>
- Bojňanská T., Frančáková H. (2011). The use of spelt wheat (*Triticum spelta* L.) for baking applications. *Plant, Soil and Environment*, 48(4), 141–147. <https://doi.org/10.17221/4212-PSE>
- Bonafaccia G., Galli V., Francisci R., Mair V., Skrabanja V., Kreft I. (2000). Characteristics of spelt wheat products and nutritional value of spelt wheat-based bread. *Food Chemistry*, 68(4), 437–441. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00215-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00215-0)
- Boskov Hansen H., Andreasen M., Nielsen M., Larsen L., Knudsen B. K., Meyer A., Christensen L., Hansen Å. (2002). Changes in dietary fibre, phenolic acids and activity of endogenous enzymes during rye bread-making. *European Food Research and Technology*, 214(1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0417-6>
- Brodkorb A., Egger L., Almingier 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 R. A., Martins C., Marze S., McClements J. D., 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). IN-FOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Chait Y. A., Gunenc A., Bendali F., Hosseini F. (2020). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of carob polyphenols: bioaccessibility and bioactivity. *LWT*, 117, 108623, 10 str. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108623>
- Chavarín-Martínez C. D., Gutiérrez-Dorado R., Perales-Sánchez J. X. K., Cuevas-Rodríguez E. O., Milán-Carrillo J., Reyes-Moreno C. (2019). Germination in optimal conditions as effective strategy to improve nutritional and nutraceutical value of underutilized Mexican blue maize seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(2), 192–199. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00717-x>
- Chen Z., Ma Y., Yang R., Gu Z., Wang P. (2019). Effects of exogenous Ca²⁺ on phenolic accumulation and physiological changes in germinated wheat (*Triticum aestivum* L.) under UV-B radiation. *Food Chemistry*, 288, 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.131>
- Chen Z., Wang P., Weng Y., Ma Y., Gu Z., Yang R. (2017). Comparison of phenolic profiles, antioxidant capacity and relevant enzyme activity of different Chinese wheat varieties during germination. *Food Bioscience*, 20, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodbio.2017.10.004>
- Chrzanowski G. (2020). *Saccharomyces cerevisiae*—an interesting producer of bioactive plant polyphenolic metabolites. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7343. <https://doi.org/10.3390/ijms21197343>
- Costabile A., Klinder A., Fava F., Napolitano A., Fogliano V., Leonard C., Gibson G. R., Tuohy K. M. (2008). Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *British Journal of Nutrition*, 99(1), 110–120. <https://doi.org/10.1017/S0007114507793923>
- Donkor O. N., Stojanovska L., Ginn P., Ashton J., Vasiljevic T. (2012). Germinated grains – Sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 135(3), 950–959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.058>
- Dorđević T. M., Šiler-Marinković S. S., Dimitrijević-Branković S. I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 119(3), 957–963. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.049>
- Escarnot E., Aguedo M., Paquot M. (2012). Enzymatic hydrolysis of arabinoxylans from spelt bran and hull. *Journal of Cereal Science*, 55(2), 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.12.009>
- Falcinelli B., Sileoni V., Marconi O., Perretti G., Quinet M., Lutts S., Benincasa P. (2017). Germination under moderate salinity increases phenolic content and antioxidant activity in rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera* Del.) sprouts. *Molecules*, 22(8), 1377, 13 str. <https://doi.org/10.3390/molecules22081377>
- FAOSTAT. (2023). *Crop statistics*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (accessible 8.12.2023)
- Faulds C. B., Mandalari G., LoCurto R., Bisignano G., Waldron K. W. (2004). Arabinoxylan and mono- and dimeric ferulic acid release from brewers grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5), 644–650. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1520-3>
- Ferri M., Happel A., Zamaroli G., Bertolini M., Chiesa S., Commisso M., Guzzo F., Tassoni A. (2020). Advances in combined enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran. *New Biotechnology*, 56, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.10.010>
- Gan R.-Y., Lui W.-Y., Wu K., Chan C.-L., Dai S.-H., Sui Z.-Q., Corke H. (2017). Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: an updated review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.010>
- Gani A., Sm W., Fa M. (2012). Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: a review. *Journal of Food Processing & Technology*, 3(3), 146, 10 str. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000146>
- Gänzle M. G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 37, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.007>
- Geisslitz S., Longin C. F. H., Scherf K. A., Koehler P. (2019). Comparative study on gluten protein composition of ancient (einkorn, emmer and spelt) and modern wheat species (durum and common wheat). *Foods*, 8(9), 409. <https://doi.org/10.3390/foods8090409>
- Hübner F., Arendt E. K. (2013). Germination of cereal grains as a way to improve the nutritional value: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(8), 853–861. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.562060>
- Katina K., Liukkonen K.-H., Kaukoviirta-Norja A., Adlercreutz H., Heinonen S.-M., Lampi A.-M., Pihlaja J.-M., Poutanen K. (2007). Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.07.006>
- Kim M. J., Kwak H. S., Kim S. S. (2018). Effects of germination on protein, γ -aminobutyric acid, phenolic acids, and antioxidant capacity in wheat. *Molecules*, 23(9), 2244, 13 str. <https://doi.org/10.3390/molecules23092244>
- Konopka I., Tańska M., Faron A., Czaplicki S. (2014). Release of free ferulic acid and changes in antioxidant properties during the wheat and rye bread making process. *Food Science and Biotechnology*, 23(3), 831–840. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0112-6>
- Li M., Bai Q., Zhou J., de Souza T. S. P., Suleria H. A. R. (2022). *In vitro* gastrointestinal bioaccessibility, bioactivities and colonic fermentation of phenolic compounds in different vigna beans. *Foods*, 11(23), 3884. <https://doi.org/10.3390/foods11233884>
- Lima K., Silva O., Figueira M. E., Pires C., Cruz D., Gomes S., Maurício E. M., Duarte M. P. (2019). Influence of the *in vitro* gastrointestinal digestion on the antioxidant activity of *Artemisia gorgonum* Webb and *Hyptis pectinata* (L.) Poit. infusions from Cape Verde. *Food Research International*, 115, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.029>
- Ma Y., Wang P., Wang M., Sun M., Gu Z., Yang R. (2019). GABA mediates phenolic compounds accumulation and the antioxidant system enhancement in germinated hullless barley

- under NaCl stress. *Food Chemistry*, 270, 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.092>
- Mathew S., Abraham T. E. (2004). Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(2–3), 59–83. <https://doi.org/10.1080/07388550490491467>
- Mencin M., Abramovič H., Jamnik P., Mikulič Petkovšek M., Veberič R., Terpin P. (2021). Abiotic stress combinations improve the phenolics profiles and activities of extractable and bound antioxidants from germinated spelt (*Triticum spelta* L.) seeds. *Food Chemistry*, 344, 128704, 12 str. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128704>
- Mencin M., Jamnik P., Mikulič Petkovšek M., Veberič R., Terpin P. (2022a). Improving accessibility and bioactivity of raw, germinated and enzymatic-treated spelt (*Triticum spelta* L.) seed antioxidants by fermentation. *Food Chemistry*, 394, 133483, 12 str. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133483>
- Mencin M., Jamnik P., Mikulič Petkovšek M., Veberič R., Terpin P. (2022b). Enzymatic treatments of raw, germinated and fermented spelt (*Triticum spelta* L.) seeds improve accessibility and antioxidant activity of their phenolics. *LWT*, 169, 114046, 13 str. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114046>
- Mencin M., Mikulič Petkovšek M., Veberič R., Terpin P. (2022c). Simulated gastrointestinal digestion of bio-processed spelt seeds: bioaccessibility and bioactivity of phenolics. *Antioxidants*, 11(9), 1703, 20 str. <https://doi.org/10.3390/antiox11091703>
- Montemurro M., Pontonio E., Gobetti M., Rizzello C. G. (2019). Investigation of the nutritional, functional and technological effects of the sourdough fermentation of sprouted flours. *International Journal of Food Microbiology*, 302, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.005>
- Moore J., Cheng Z., Su L., Yu L. (2006). Effects of solid-state enzymatic treatments on the antioxidant properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9032–9045. <https://doi.org/10.1021/jf0616715>
- Ortega N., Macià A., Romero M.-P., Reguant J., Motilva M.-J. (2011). Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in-vitro* digestion model. *Food Chemistry*, 124(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.105>
- Pang Y., Ahmed S., Xu Y., Beta T., Zhu Z., Shao Y., Bao J. (2018). Bound phenolic compounds and antioxidant properties of whole grain and bran of white, red and black rice. *Food Chemistry*, 240, 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.095>
- Paucar-Menacho L. M., Martínez-Villaluenga C., Dueñas M., Frias J., Peñas E. (2017). Optimization of germination time and temperature to maximize the content of bioactive compounds and the antioxidant activity of purple corn (*Zea mays* L.) by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.064>
- Peixoto Araujo N. M., Pereira G. A., Arruda H. S., Prado L. G., Ruiz A. L. T. G., Eberlin M. N., Castro R. J. S., Pastore G. M. (2019). Enzymatic treatment improves the antioxidant and antiproliferative activities of *Adenanthera pavonina* L. seeds. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101002, 7 str. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.040>
- Pruska-Kedzior A., Kedzior Z., Klockiewicz-Kaminska E. (2008). Comparison of viscoelastic properties of gluten from spelt and common wheat. *European Food Research and Technology*, 227(1), 199–207. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0710-0>
- Rakariyatham K., Liu X., Liu Z., Wu S., Shahidi F., Zhou D., Zhu B. (2020). Improvement of phenolic contents and antioxidant activities of longan (*Dimocarpus longan*) peel extracts by enzymatic treatment. *Waste and Biomass Valorization*, 11(8), 3987–4002. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00723-9>
- Ruibal-Mendieta N. L., Delacroix D. L., Mignolet E., Pycke J.-M., Marques C., Rozenberg R., Petitjean G., Habib-Jiwan J.-L., Meurens M., Quetin-Leclercq J., Delzenne N. M., Larondelle Y. (2005). Spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) as a source of breadmaking flours and bran naturally enriched in oleic acid and minerals but not phytic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2751–2759. <https://doi.org/10.1021/jf048506e>
- Sancho A. I., Bartolomé B., Gómez-Cordovés C., Williamson G., Faulds C. B. (2001). Release of ferulic acid from cereal residues by barley enzymatic extracts. *Journal of Cereal Science*, 34(2), 173–179. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0386>
- Shahidi F., Yeo J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21(9), 1216, 22 str. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>
- Singh A., Sharma S. (2017). Bioactive components and functional properties of biologically activated cereal grains: a bibliographic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 3051–3071. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1085828>
- Singh A., Sharma V., Banerjee R., Sharma S., Kuila A. (2016). Perspectives of cell-wall degrading enzymes in cereal polishing. *Food Bioscience*, 15, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.05.003>
- Spaggiari M., Ricci A., Calani L., Bresciani L., Neviani E., Dall'Asta C., Lazzi C., Galaverna G. (2020). Solid state lactic acid fermentation: a strategy to improve wheat bran functionality. *LWT*, 118, 108668, 9 str. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108668>
- Terpin P. (2019). Vezane fenolne spojine polnozrnatih žitnih pripravkov kot sestavina funkcionalnih živil: drugi del. *Acta agriculturae Slovenica*, 114(2), 279–291. <https://doi.org/10.14720/aas.2019.114.2.12>
- Terpin P., Abramovič H. (2010). A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids. *Food Chemistry*, 121(2), 366–371. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.037>
- Terpin P., Cigić B., Polak T., Hribar J., Požrl T. (2016). LC–MS analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of buckwheat at different stages of malting. *Food Chemistry*, 210, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.030>
- Ti H., Zhang R., Zhang M., Li Q., Wei Z., Zhang Y., Tang X., Deng Y., Liu L., Ma Y. (2014). Dynamic changes in the free and bound phenolic compounds and antioxidant ac-

- tivity of brown rice at different germination stages. *Food Chemistry*, 161, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.024>
- Vitaglione P., Napolitano A., Fogliano V. (2008). Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science & Technology*, 19(9), 451–463. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.02.005>
- Wang J., Chatzidimitriou E., Wood L., Hasanalieva G., Markelou E., Iversen P. O., Seal C., Baranski M., Vigar V., Ernst L., Willson A., Thapa M., Barkla B. J., Leifert C., Rempelos L. (2020). Effect of wheat species (*Triticum aestivum* vs *T. spelta*), farming system (organic vs conventional) and flour type (wholegrain vs white) on composition of wheat flour – Results of a retail survey in the UK and Germany – 2. Antioxidant activity, and phenolic and mineral content. *Food Chemistry: X*, 6, 100091, 10 str. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100091>
- Wang T., He F., Chen G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: a concise review. *Journal of Functional Foods*, 7, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.033>
- Xiang N., Guo X., Liu F., Li Q., Hu J., Brennan C. S. (2017). Effect of light- and dark-germination on the phenolic biosynthesis, phytochemical profiles, and antioxidant activities in sweet corn (*Zea mays* L.) sprouts. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1246, 13 str. <https://doi.org/10.3390/ijms18061246>
- Xu J. G., Tian C. R., Hu Q. P., Luo J. Y., Wang X. D., Tian X. D. (2009). Dynamic changes in phenolic compounds and antioxidant activity in oats (*Avena nuda* L.) during steeping and germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10392–10398. <https://doi.org/10.1021/jf902778j>
- Xu M., Rao J., Chen B. (2020). Phenolic compounds in germinated cereal and pulse seeds: classification, transformation, and metabolic process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(5), 740–759. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1550051>
- Yang T. K. B., Oraikul F. (2001). Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52(4), 319–330. <https://doi.org/10.1080/09637480120057567>
- Ydjedd S., Bouriche S., López-Nicolás R., Sánchez-Moya T., Frontela-Saseta C., Ros-Berruezo G., Rezgui F., Louaiche H., Kati, D.-E. (2017). Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on encapsulated and nonencapsulated phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp extracts and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 827–835. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05103>
- Zeng Z., Liu C., Luo S., Chen J., Gong E. (2016). The profile and bioaccessibility of phenolic compounds in cereals influenced by improved extrusion cooking treatment. *PLOS ONE*, 11(8), e0161086, 11 str. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161086>
- Zörb C., Betsche T., Langenkämper G., Zapp J., Seifert M. (2007). Free sugars in spelt wholemeal and flour. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 81(2), 172–174.
- Žilić S., Delić N., Basić Z., Ignjatović-Mićić D., Janković M., Vančetović J. (2015). Effects of alkaline cooking and sprouting on bioactive compounds, their bioavailability and relation to antioxidant capacity of maize flour. *Journal of Food & Nutrition Research*, 54(2), 155–164.
- Živković, A., Godevac, D., Cigić, B., Polak, T., & Požrl, T. (2023). Identification and quantification of selected benzoxazinoids and phenolics in germinated spelt (*Triticum spelta*). *Foods*, 12(9), 9. <https://doi.org/10.3390/foods12091769>