

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Ана М. Калушевић

**МИКРОИНКАПСУЛАЦИЈА БИОАКТИВНИХ
ЈЕДИЊЕЊА ИЗ СПОРЕДНИХ ПРОИЗВОДА
ПРЕХРАМБЕНЕ ИНДУСТРИЈЕ**

докторска дисертација

Београд, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Ana M. Kalušević

**MICROENCAPSULATION OF BIOACTIVE
COMPOUNDS FROM BYPRODUCTS
OF FOOD INDUSTRY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

Ментор:

Др Виктор Недовић, редовни професор
Универзитет у Београду
Пољопривредни факултет

Чланови комисије:

Др Ида Лескошек-Чукаловић, редовни професор
Универзитет у Београду
Пољопривредни факултет

Др Слађана Жилић, научни саветник
Институт за кукуруз, Земун Поље

Др Јела Милић, редовни професор
Универзитет у Београду
Фармацеутски факултет

Др Бранко Бугарски, редовни професор
Универзитет у Београду
Технолошко-металуршки факултет

Др Стева Левић, доцент
Универзитет у Београду
Пољопривредни факултет

Датум одбране:

Изјаве захвалности

Највећу захвалност на помоћи при изради докторске дисертације дугујем проф. др Виктору Недовићу, несвакидашњем ментору, несебичном и дивном човеку и педагогу, великом ослоњу за младе истраживаче, као и целе научне заједнице Србије. Хвала на бројним пруженим приликама, отвореним сарадњама и контактима, значајним искуствима, указаном поверењу и великој подрици током мог сазревања као истраживача. Била је велика одговорност и још већа част бити његов студент и близак сарадник.

Захваљујем се проф. др Иди Лескошек-Чукаловић на буђењу жеље за истраживачким радом и постдипломским студијама још током израде дипломског рада. Прави је пример како професор надахнут својом професијом може да вас инспирише на даље усавршавање.

Колеги др Стеви Левићу захваљујем на огромном стрпљењу у раду са мном, на пренетом знању и идејама током експерименталног дела, као и помоћи при писању научних радова и саме докторске дисертације.

Проф. др Бранку Бугарском захваљујем на прилици да будем део великог и најуспешнијег пројекта у оквиру ког је дисертација урађена. Хвала на лепој сарадњи не само на овом, већ и на свим осталим заједничким пројектима. Најискреније се захваљујем и његовим сарадницима на подрици и саветима при раду.

Проф. др Јели Милић и њеним сарадницима захваљујем на прилици да урадим део експеримента у њиховим лабораторијама и из других углова сагледам проблематику која је била предмет мог истраживања. Захваљујем јој се на разумевању и подрици, као и сугестијама током писања дисертације.

Захваљујем се научном саветнику др Слађани Жилић, вредној, посвећеној, темељној, неуморној особи и перфекционисти, како у експерименталном раду, тако и у писању радова. Хвала на свим саветима, помоћи, приликама и дивној сарадњи.

Уједно, захваљујем се њеној институцији Институту за кукуруз “Земун Поље” на могућности да део експеримента обавим у њиховим лабораторијама и обезбеђеној сировини за рад, где се посебно захваљујем др Весни Перић. Такође, захваљујем се огледном добру Пољопривредног факултета “Радмиловац” и винарији “Чокот” на сировини која ми је била на располагању за експериментални рад. Захваљујем се и Институту за хигијену и технологију меса на подрици, а колегама на помоћи и разумевању.

Огромну захвалност на помоћи при анализи узорака, тумачењу резултата и писању научних радова дугујем правом професионалцу и сараднику какав се може само пожелети, др Бојану Чалији са Фармацеутског факултета.

Желела бих да се захвалим и цењеном проф. др Владимиру Павловићу, као и тиму проф. Никишића, нарочито предивним колегиницама др Милени Пантић и Данки Матијашевић, на помоћи при анализи узорака.

Такође, дугујем захвалност колегама са Научног института за прехранбене технологије у Новом Саду, испред свих др Јованки Левић, др Небојши Илић и др Миони Беловић.

Захваљујем се и тиму проф. Сужњевић са Института за физичку хемију, а посебно колегама др Станислави Горјановић и др Ференцу Пастору.

Велико хвала Маји Вуковић на број(ча)ним подацима којима располаже Републички завод за статистику, који су нашли своје место у дисертацији, а дисертација у њима своју сврсисходност.

Захваљујем се Катедри са конзервасање и врење Пољопривредног факултета и свим цењеним професорима, колегама, стручним и техничким сарадницима који је чине. Нарочиту захвалност дугујем колегама из лабораторије 117 на помоћи и саветима при изради дела експеримената и анализа, али и дружењу – Саши Деспотовићу, др Радовану Ђорђевићу, др Гордани Узелац и Ани Салевић.

Посебну захвалност дугујем драгом колеги Милету Вељовићу, младом и великом господину и цењеном технологу од ког је задовољство учити, који је вратио смисао појмовима попут несебично преношење знања и искустава, колегијалност, пријатељство. Хвала на великој подршци, још већој помоћи и највећој мотивацији и инспирацији.

*Најискреније се захваљујем свим пријатељима и фамилијама Калушевић и Ристић, посебно **мајци Милени** и **оцу Милошу**. Хвала на стрпљењу и ненаметљивом приступу при мојим изборима кроз школовање, рад и живот. Захваљујем родитељима на свему што су несебично чинили за мене и на највећем дару, **сестри Биљани**. Њој и њеној породици хвала на огромној подршци, љубави и разумевању.*

*Ова дисертација је део истраживања у оквиру пројекта 46010 финансираног од **Министарства за просвету, науку и технолошки развој, Републике Србије**, чији сам стипендиста и истраживач-сарадник била током израде дисертације.*

Микроинкапсулација биоактивних једињења из споредних производа прехранбене индустрије

Резиме

Предмет истраживања ове докторске дисертације била је микроинкапсулација биоактивних једињења екстрахованих из споредних производа прехранбене индустрије у циљу њихове стабилизације и побољшања нутритивних својстава. Основне сировине за екстракцију биоактивних једињења, првенствено антоцијана, представљали су покожица црних сорти грожђа и семењача црне соје. Микроинкапсулати екстраката биоактивних једињења су добијени коришћењем три носача: малтодекстрина, арапске гуме и млека у праху, уз примену спреј сушења и лиофилизације као техника инкапсулације комерцијално примењивих у прехранбеној индустрији.

Процес екстракције биоактивних једињења, која су представљала активну компоненту микроинкапсулата, оптимизован је у погледу различитих третмана, времена екстракције, ефикасности растварача, односа чврсте и течне фазе и примене ултразвука различите фреквенције. Оптимизованим течним екстрактима је одређен садржај укупних фенолних једињења, укупних и индивидуалних антоцијана, макроелемената и елемената у траговима. Поред тога, дефинисана им је боја, као и њена стабилност. Такође, испитани су антиоксидативни капацитет, као и антимикробна активност екстраката биоактивних једињења на следеће патогене микроорганизме: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus spizizeni*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7 и *Candida albicans*.

Основни циљ истраживања је био добијање микроинкапсулата у форми која је најприхватљивија за употребу у прехранбеној индустрији. Испитиван је ефекат коришћених носача на ефикасност микроинкапсулације екстраката биоактивних једињења у зависности од примењене технике инкапсулације, као и на физичко-

хемијска својства микроинкапсулата. Испитивани су: морфологија микроинкапсулата, термичка својства, активност воде, насипна и тапкана густина, компресибилност, растворљивост, садржај укупних фенолних једињења, укупних и индивидуалних антоцијана, антиоксидативни капацитет, отпуштање/ослобађање активних једињења из микроинкапсулата у различитим медијумима, стабилност боје током складиштења, као и антимикробна активност на поменуте патогене бактерије и квасце. Прехрамбени производи којима су додати микроинкапсулати као природне боје су сензорно оцењени. Такође, испитана је могућност њиховог коришћења као додатка у производњи прехрамбених филмова.

Екстракти биоактивних једињења коришћени за микроинкапсулацију добијени су након оптимизације поступка екстракције. Садржај екстрахованих антоцијана из покожице грожђа био је 16,3 mg CGE/g_{см}, а из семењаче соје 10,6 mg CGE/g_{см}. Течно-хроматографска анализа потврдила је малвидин-3-глукозид као доминантано присутан антоцијан у екстракту из покожице грожђа (800-850 mg/L), док је код семењаче соје то био цијанидин-3-глукозид (300-320 mg/L). Као најефикаснији поступак екстракције биоактивних једињења из обе коришћене сировине показала се примена 70% V/V етанола као растварача и примена ултразвучних таласа фреквенције 40 kHz. У случају семењаче црне соје, ефикасност екстракције биоактивних једињења повећана је већим односом чврсте и течне фазе (1:40) и додатком лимунске киселине растварачу (1% m/V). Од макроелемената у екстрактима добијеним из обе сировине калијум је био присутан у највишој концентрацији.

Облик, порозност и димензије микроинкапсулата утврђене су скенирајућом електронском микроскопијом. Спреј сушењем су добијене сферне честице, (сем у случају млека у праху као носача код кога су честице неправилног облика), просечних пречника 3-5 μm без обзира на врсту носача. Лиофилизацијом су добијене честице неуниформног облика и структуре типичне за микроинкапсулате добијене овом техником. У односу на слободне форме, микроинкапсулисане активне компоненте показале су већу стабилност у процесима који подразумевају примену повишених температура (пекарски и кондиторски производи), што је анализом

узорака на диференцијално скенирајућем калориметру и потврђено. Добијени микроинкапсулати су показали добра физичка својства попут насипне и тапкане густине, проточности и компресибилности, што су врло значајне карактеристике прахова за потенцијалну примену у индустрији. Сви испитивани микроинкапсулати су показали изузетно ниске вредности активности воде (0,2-0,3), а они добијени спреј сушењем и веома високу растворљивост (око 90% *m/m*). Принос микроинкапсулата је варирао од 63,7 до 92,8%. Садржај укупних фенолних једињења у микроинкапсулатима се кретао од 5,81 до 11,57 mg GAE/g и био највиши код микроинкапсулата на бази арапске гуме добијених лиофилизацијом. У узорцима са овим носачем садржај укупних антоцијана је био најнижи, испод 2 mg CGE/g у случају семењаче соје као извора, док је највиши био код микроинкапсулата екстракта покожице грожђа на бази малтодекстрина добијених спреј сушењем (око 5 mg CGE/g). Течно-хроматографском анализом идентификовани су и квантификовани доминантни антоцијани (малвидин-3-глукозид у покожици грожђа и цијанидин-3-глукозид у семењачи соје). Одређивање антиоксидативног капацитета је показало предности млека у праху и арапске гуме као носача у микроинкапсулатима у зависности од примењене спектрофотометријске методе, а ти закључци су потврђени и електрохемијским мерењем поларографијом. Антоцијани су поред високог антиоксидативног потенцијала допринели атрактивној боји микроинкапсулата, што омогућава још разноврснију потенцијалну примену микроинкапсулата као природних боја (бојених материја) у прехранбеним производима. Боја као физичка и сензорна карактеристика екстракта и микроинкапсулата је окарактерисана употребом хромаметра, пре и после складиштења у трајању од шест месеци у адекватним условима, при чему је утврђена њихова изузетно висока стабилност у микроинкапсулисаног форми ($\Delta E=0,59-5,22$). Отпуштање/ослобађање активних компоненти из микроинкапсулата, са различитим носачима, временски је варирало у различитим медијумима, што се објашњава основним саставом микроинкапсулата, структуром и присутним хемијским везама потврђеним инфрацрвеном спектроскопијом. Добијени профили отпуштања/ослобађања антоцијана из микроинкапсулата у води и условима гастроинтестиналног тракта указали су да

микроинкапсулати са арапском гумом показују најспорије, а са малтодекстрином најбрже отпуштање активне компоненте. Ови резултати указују на могућност примене тих носача у зависности од планиране/жељене врсте финалних производа. Сензорна анализа производа са додатком микроинкапсулата указала је да највећи потенцијал за примену у прехранбеним производима имају микроинкапсулати добијени помоћу малтодекстрина као носача. Прехранбени филмови са микроинкапсулатима су показали визуелно уочљиве промене при променама рН вредности производа, што пружа могућност за њихово коришћење у паковању различитих прехранбених производа.

Резултати ове дисертације показују да је микроинкапсулација екстраката биоактивних једињења пореклом из обе коришћене сировине значајно допринела очувању садржаја фенолних једињења и антоцијана, антиоксидативног капацитета и антимикробне активности екстраката, побољшању термичких и сензорних својстава, нарочито боје, као и побољшању стабилности боје биоактивних једињења током складиштења. Техноекономском анализом закључено је да је производња микроинкапсулата као прехранбених боја предложеним техникама и носачима једноставна и финансијски одржива. Сем са економског аспекта, употреба предложених сировина је важна и са еколошког аспекта, јер су у питању споредни производи прехранбене индустрије. Микроинкапсулати описани у овој дисертацији могу бити унапређена замена вештачким бојама тренутно присутним у великом броју прехранбених производа, јер сем уноса бојених материја, њиховим додатком се прехранбеним производима побољшава укупна функционална вредност.

Кључне речи: микроинкапсулација, биоактивна једињења, носачи, антоцијани, спреј сушење, лиофилизација, прехранбени производи

Научна област: Биотехничке науке

Ужа научна област: Технологија конзервисања и врења

UDK: 579.222:631.57(043.3)

Microencapsulation of bioactive compounds from byproducts of food industry

Abstract

The subject of this doctoral thesis was the microencapsulation of bioactive compounds from byproducts of food industry. The raw materials for the extraction of bioactive compounds were the skins of red grape varieties and the coats of black soybean as byproducts of the grape and soybean processing. Microencapsulates were obtained using different carriers such as maltodextrin, gum Arabic and skimmed milk powder, and spray and freeze drying as encapsulation techniques widely used in the food sector.

The extraction process was optimized in terms of time of extraction, solvent efficiency, and addition of enzymes, acids, ethanol, solid/liquid ratio, as well as application of ultrasound with different frequencies. Optimized liquid extracts were analyzed by the content of total phenols, total and individual anthocyanins, macro- and rare elements. In addition, the extracts' colour and its stability were defined. Also, their antioxidant capacity and antimicrobial activities against growth of several pathogenic microorganisms (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus spizizeni*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7 и *Candida albicans*) were confirmed.

The aim of the research was to obtain a microencapsulation in the form that is the most accessible for the application in the food industry. The effects of applied carriers and techniques on the microencapsulation efficiency and physico-chemical properties of microencapsulates were examined. Morphology, thermal analysis, water activity, bulk and tapped density, compressibility, total phenol content, total and individual anthocyanin contents, release of active compounds from microencapsulates in different mediums, colour stability during storage, antioxidant capacity and antimicrobial activity against growth of above-mentioned pathogenic bacteria and yeast. Food products with addition of

microencapsulates as natural food colours were evaluated. Also, microencapsulates' ability to form food films was investigated.

Optimized extracts of bioactive compounds were used as active components of microencapsulates. The content of total anthocyanins extracted from the grape skin was 16.3 mg CGE/g_{CM}, while from the soybean coat it was 10.6 mg CGE/g_{CM}. HPLC analysis confirmed presence of malvidin-3-glucoside as dominant anthocyanin in the grape skin extract (800-850 mg/L), and cyanidin-3-glucoside in the soybean coat extract (300-320 mg/L). Ethanol (70% V/V) was the most efficient extraction solvent in case of both byproducts, using ultrasound with frequency 40 kHz. Addition of citric acid (1% m/V) contributed to the most efficient extraction of anthocyanins from the black soybean coat, as well as the solid/liquid ratio (1:40). Among all investigated elements, potassium was predominant in both types of the extracts.

In case of spray drying as an encapsulation technique spherical particles (except in the case of skimmed milk powder) were obtained, with an average diameter of about 3-5 microns, regardless of the type of carrier. Microencapsulates produced by freeze drying had non-uniform shape, with the structure typical for this technique. The morphology of microencapsulates was determined by scanning electron microscopy. In comparison with free form of active components, microencapsulated one showed better thermal stability. It was analyzed using a differential scanning calorimeter. It makes them suitable for the production of bakery, confectionary and similar products where high temperature is applied. The microencapsulates showed good physical properties such as bulk and tapped density, flowability and compressibility, which are very important characteristics of powders for potential applications in the industry. All tested microencapsulates showed extremely low water activity (0.2-0.3), and very high solubility (around 90% m/m). Microencapsulation yields varied from 63.7 to 92.8%. Total phenol contents ranged from 5.81 to 11.57 mg GAE/g and was the highest in microencapsulates produced by freeze drying with gum Arabic. The same samples had the lowest content of total anthocyanins below 2 mg CGE/g in case of the soybean coat, while the highest content was found in the microencapsulates of grape skin extract obtained by spray drying (app 5 mg CGE/g). The HPLC analysis confirmed the malvidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside as

dominantly presented anthocyanins in the microencapsulates from the grape skin and soybean coat extract, respectively. Determination of antioxidant capacity showed that gum Arabic and skimmed milk powder-based microencapsulates were preferable according to different methods. These conclusions were confirmed by the electrochemical method. The dominant anthocyanins which contributed to the attractive colours of microencapsulates enabling numerous applications. Colour, as an important physical and sensorial characteristic of extracts and microencapsulates, was characterized by the chromameter. The microencapsulates exhibited colour stability after six months of storage in adequate conditions ($\Delta E = 0.59\text{--}5.22$). The release of the active components from microencapsulates in different mediums was varied, due to their composition and chemical bonds confirmed by infrared spectroscopy. Obtained profiles of anthocyanins releases in water and pH and temperature conditions of gastrointestinal tract, gum Arabic showed the slowest, and maltodextrin, the fastest release profiles. These findings make them applicable according to final products and their characteristics. Sensorial analysis indicated that the highest potential for the application in food products have microencapsulates based on maltodextrin. Namely, except their bioactive potentials, these microencapsulates could be a substitute for artificial colourants present in the most food products nowadays. Films with added microencapsulates showed visible changes of colour with pH changes. Therefore, it could be used for “intelligent” food packaging of numerous products.

The results of the thesis showed that microencapsulates of bioactive compounds from both byproducts achieved satisfactory and constant total phenol and anthocyanin contents, antioxidant capacity, antimicrobial activity, enhanced thermal and colour stability. Technoeconomical analysis showed that the production of microencapsulates by proposed drying techniques is financially acceptable and sustainable. Beside an economical point of view, utilization of food processing byproducts as raw material is important from ecological aspect. Microencapsulates described in the thesis could be an improved replacement to artificial colourants widely used in the food sector. The ingredients such as proposed microencapsulates could improve not only colour of the product, but the functional properties as well.

Key words: microencapsulation, carrier, bioactive compounds, anthocyanins, spray drying, freeze drying, food products

Academic Expertise: Biotechnology

Field of Academic Expertise: Preservation and fermentation technology

UDK: 579.222:631.57(043.3)

САДРЖАЈ

	Стр.
1. УВОД	1
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО.....	4
2.1 Споредни производи прехрамбене индустрије.....	4
2.1.1 Грожђе и споредни производи прераде грожђа.....	9
2.1.1.1 Црне сорте грожђа.....	11
2.1.2 Соја и споредни производи прераде соје.....	14
2.1.2.1 Црна соја.....	18
2.2 Фенолна једињења споредних производа прехрамбене индустрије.....	20
2.2.1 Фенолна једињења, класификација и својства.....	20
2.2.2 Биоактивна својства фенолних једињења.....	33
2.3 Екстракција биоактивних једињења споредних производа.....	37
2.3.1 Екстракција биоактивних једињења из покожице грожђа.....	41
2.3.2 Екстракција биоактивних једињења из семењаче соје.....	44
2.4 Инкапсулација	46
2.4.1 Инкапсулација – појам и циљ.....	47
2.4.2 Технике и носачи за инкапсулацију биоактивних једињења.....	49
2.4.2.1 Технике инкапсулације.....	49
2.4.2.2 Носачи за инкапсулацију.....	56
2.4.3 Инкапсулација биоактивних једињења споредних производа прехрамбене индустрије.....	62
3. НАУЧНИ ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	65
4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ	67
4.1 Материјали.....	67
4.1.1 Хемикалије	67
4.1.2 Сировине.....	68
4.2 Методе	68
4.2.1 Екстракција биоактивних једињења из споредних производа	68
4.2.1.1 Екстракција биоактивних једињења из покожице грожђа	68
4.2.1.2 Екстракција биоактивних једињења из семењаче соје.....	69
4.2.2 Микроинкапсулација екстракта биоактивних једињења.....	69
4.2.2.1 Микроинкапсулација спреј сушењем.....	69
4.2.2.2 Микроинкапсулација лиофилизацијом.....	70
4.2.3. Примена микроинкапсулата.....	71
4.2.3.1 Примена микроинкапсулата у прехрамбеним производима.....	71
4.2.3.1.a Примена микроинкапсулата у овсеним кашама.....	71

4.2.3.1.б	Примена микроинкапсулата у јогуртима.....	71
4.2.3.2	Примена микроинкапсулата у производњи прехранбених филмова.....	71
4.2.4	Физичко-хемијска карактеризација екстраката и микроинкапсулата.....	72
4.2.4.1	Одређивање садржаја укупних фенолних једињења.....	72
4.2.4.2	Одређивање садржаја укупних мономерних антоцијана..	73
4.2.4.3	Одређивање антиоксидативног капацитета	74
4.2.4.3а	Одређивање укупне антиоксидативности <i>QUENCHER</i> _{ABTS} методом.....	75
4.2.4.3б	Одређивање антиоксидативности <i>ABTS</i> методом.....	77
4.2.4.3в	Одређивање антиоксидативности <i>DPPH</i> методом.....	78
4.2.4.3г	Одређивање антиоксидативности <i>FRAP</i> методом.....	79
4.2.4.3д	Електрохемијско одређивање антиоксидативности <i>HPMC</i> методом	80
4.2.4.4	Одређивање садржаја антоцијана <i>HPLC</i> методом	81
4.2.4.5	Одређивање макроелемената и елемената у траговима....	82
4.2.4.6	Одређивање боје узорака.....	83
4.2.4.7	Испитивање морфолошких карактеристика микроинкапсулата.....	85
4.2.4.8	Анализирање <i>FTIR</i> спектроскопијом.....	85
4.2.4.9	Испитивање термичких карактеристика.....	86
4.2.4.10	Одређивање насипне и тапкане густине и компресибилности.....	86
4.2.4.11	Одређивање растворљивости микроинкапсулата.....	87
4.2.4.12	Одређивање активности воде микроинкапсулата.....	87
4.2.5	Испитивање кинетике отпуштања биоактивних једињења из микроинкапсулата <i>in vitro</i>	88
4.2.6	Испитивање антимицробне активности.....	89
4.2.6.1	Сојеви микроорганизама и припрема култура.....	89
4.2.6.2	Микродилуциона метода са микротитарским плочицама.....	89
4.2.7	Сензорна анализа	90
4.2.7.1	Метода рангирања	90
4.2.7.2	Хедонска скала	91
4.2.8	Статистичка обрада података	92
5.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	93
5.1	Оптимизација екстракције и карактеризација екстраката.....	93
5.1.1.	Утицај различитих параметара на ефикасност екстракције	93

биоактивних једињења.....	
5.1.2 Садржај индивидуалних антоцијана екстраката.....	102
5.1.3 Антиоксидативна активност екстраката.....	103
5.1.4 Садржај макроелемената и елемената у траговима.....	105
5.1.5 Боја екстраката.....	109
5.1.6 Антимикробна активност екстраката.....	113
5.2 Оптимизација микроинкапсулације и карактеризација микроинкапсулата.....	113
5.2.1 Физичко-хемијске карактеристике микроинкапсулата.....	115
5.2.1.1 Морфолошке карактеристике микроинкапсулата.....	115
5.2.1.2 FTIR спектроскопска анализа	122
5.2.1.3 Термичке карактеристике микроинкапсулата.....	127
5.2.1.4 Остале физичке карактеристике микроинкапсулата.....	131
5.2.1.5. Садржај укупних фенолних једињења, укупних и индивидуалних антоцијана.....	137
5.2.1.6 Антиоксидативни капацитет микроинкапсулата.....	143
5.2.1.6а Антиоксидативни капацитет микроинкапсулата одређен директном методом.....	143
5.2.1.6б Антиоксидативни капацитет одређен спектрофотометријским методама.....	146
5.2.1.6в Антиоксидативни капацитет одређен електрохемијском методом.....	149
5.2.2 Кинетика отпуштања антоцијана из микроинкапсулата <i>in vitro</i> ...	151
5.2.3 Боја микроинкапсулата.....	157
5.2.4 Антимикробна активност микроинкапсулата.....	163
5.3 Примена микроинкапсулата.....	169
5.3.1 Сензорна анализа.....	169
5.3.1.1 Метода рангирања.....	170
5.3.1.2 Хедонска скала.....	173
5.3.2 Потенцијална примена микроинкапсулата у прехранбеним производима.....	175
5.3.3 Друге потенцијалне примене у прехранбеној индустрији.....	177
5.3.4 Трошкови производње микроинкапсулата.....	178
6. ЗАКЉУЧАК	182
ЛИТЕРАТУРА	187
БИОГРАФИЈА.....	222
ПРИЛОЗИ.....	223

1. УВОД

Један од тренутних фокуса многобројних научних истраживања су инкапсулисана биоактивна једињења која у таквој форми налазе примену у различитим областима. Међу таквим једињењима су пре свега фенолна једињења, која показују висок антиоксидативни потенцијал и стога се препоручују и као функционални додаци прехранбеним производима. Опште је познат широк спектар позитивних утицаја састојака екстракта различитог биљног материјала са високим садржајем на здравље људи (He и Giusti, 2010; Iriti и Faoro, 2011).

Упоредо са тим, искоришћење споредних производа прехранбене индустрије има све већи економски и еколошки значај. У свету је изражен тренд развоја таквих технологија у којима би споредни производи били максимално искоришћени чиме се остварује већа продуктивност уз минимално загађење животне средине (Schieber et al., 2001; Galanakis, 2012; Galanakis, 2015).

Предмет истраживања у овој дисертацији био је искоришћење споредних производа, односно биоактивних једињења која остају у њима током и након прераде црних сорти грожђа и црне соје, као и њихова микроинкапсулација ради даље примене у прехранбеним производима.

Резултати појединих аутора указују на изразиту антиоксидативну активност покожице црних сорти грожђа захваљујући присуству фенолних једињења (Iriti и Faoro, 2011). Екстракти из покожице црних сорти грожђа могу бити значајни извори антиоксиданата и природних пигмената, а тиме и потенцијални додаци храни. Фенолна једињења присутна у грожђу се око 90% налазе у слободној форми (Liu, 2007). У покожици грожђа је сконцентрисан највећи део присутних антоцијана грожђа, од којих је најдоминантнији малвидин-3-глукозид (Liang et al., 2008).

Када је соја у питању, истраживања су углавном фокусирана на нове сорте, посебно на оне које садрже висок садржај фенолних једињења у семењачи (Cho et al., 2013). У соји су фенолна једињења највећим делом везана, а доминирају фенолне киселине и изофлавоноиди. Поједине студије указују на то да екстракти из семењаче

црне соје делују као природни антиоксиданти и поседују имуномодулаторна својства (Kim et al., 2012). У поређењу са семењачом жуте соје, семењача црне соје има већи садржај фенолних једињења и то нарочито антоцијана и проантоцијанидина, међу којима је цијанидин-3-глукозид најприсутнији (Žilić et al., 2013).

Фенолна једињења екстрахована из описаних споредних производа су осетљива на различите факторе попут кисеоника, светлости, температуре, влаге, као и рН вредности средине те могу током процеса прераде, паковања или складиштења изгубити своја биолошка својства и боју. Антоцијани су посебно осетљива фенолна једињења која припадају групи флавоноида, налазе се у великом броју биљних врста као глукозиди антоцијанидина и одговорни су за њихову боју (различите нијансе плаве, црвене, љубичасте, наранцасте). Поред агроколошких услова као што су светлост, температура и рН земљишта, испољавању одређене боје антоцијана пре свега доприносе садржај и састав мешавине присутних антоцијана (Terić, 2012).

Један од начина да се очувају корисна својства поменутих екстраката биоактивних једињења је њихова инкапсулација. Инкапсулацијом се постижу три основна циља: (а) екстракти се преводe у форме погодније за складиштење, транспорт и употребу, (б) побољшава се стабилност екстраката (биоактивност, боја) и (в) постиже се жељено отпуштање активних компоненти. Осим тога, остали значајни ефекти који се постижу инкапсулацијом екстраката су: маскирање непријатних мириса или укуса (нпр. горак укус фенолних једињења) и побољшање квалитета финалног производа (Fang и Bhandari, 2010; Nedović et al., 2013). Инкапсулисани екстракти на тај начин могу да допринесу бољем квалитету многих прехранбених производа, јер би омогућили смањење употребе конзерванаса, вештачких боја или потпуно елиминисали захтеве за истим и дали овим производима додатну вредност у виду нпр. антиоксидативног дејства. Сем тога, инкапсулацијом таквих екстраката, инкапсулати могу да обезбеде прехранбеним производима атрактивнију боју, укус, мирис и текстуру, дужи рок трајања, контролу оксидативних процеса и сл.

Према доступним подацима микроинкапсулација екстракта из покожице грожђа и семњаче соје није довољно проучавана у литератури, нарочито када је у

питању семењача соје. Такође, до сада је објављено изузетно мали број истраживања о интеракцији између носача и инкапсулисаних компонената, а веома мало је података о примени истих у прехранбеним производима. Са друге стране, може се очекивати да ће специфична органолептичка својства добијеног производа са додатком микроинкапсулата бити интересантна за произвођаче који желе да вештачке боје замене природним бојама са биоактивним дејством. Коначно, гледано на полупроизоде (микроинкасалуте), као и крајње производе у које се микроинкапсулати додају, олакшано је чување, складиштење и дозирање истих. Са друге стране, прерађивачка индустрија може пронаћи свој интерес, јер би основне сировине за екстракцију биле споредни производи њихове прераде, најчешће третирани као отпад.

Конзумирање прехранбених производа са додацима који представљају доказан извор природних антиоксиданата, али и природних пигмената, може корисно утицати на здравље људи спречавањем или инхибицијом оксидативних оштећења као главним узрочником многих хроничних обољења. Уједно, због повећања конкуренције на тржишту пред произвођачима прехранбених производа се поставља обавеза да њихови готови производи у погледу нутритивне вредности, органолептичке примамљивости, здравствене безбедности и цене задовоље очекивања свих потенцијалних купца, а једна од могућности је примена микроинкапсулата биоактивних једињења.

2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1 Споредни производи прехранбене индустрије

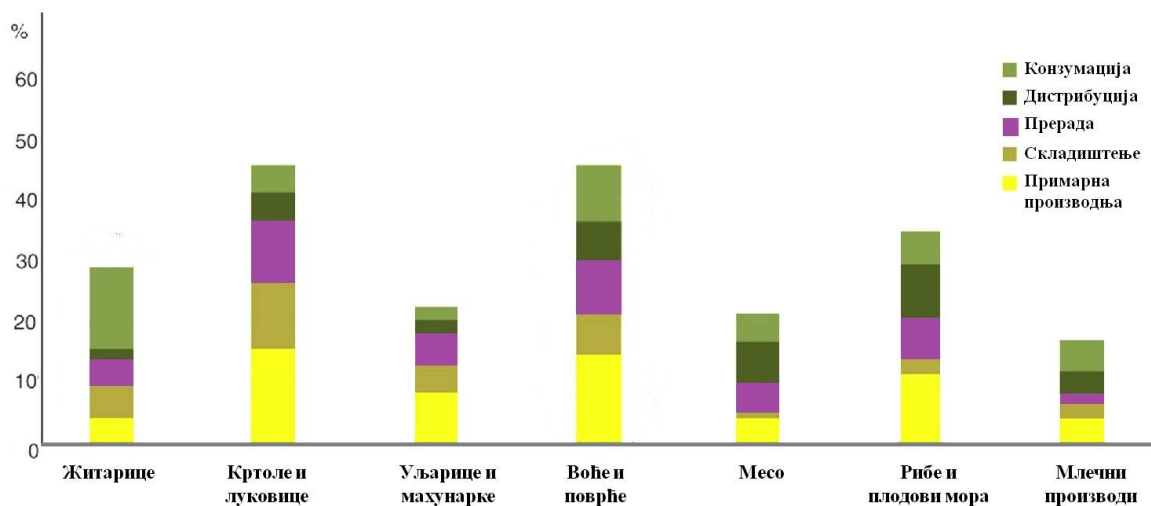
Од самог почетка развоја прехранбене индустрије постоје и настојања да се смањи или искористи отпад, споредни производи или неупотребљен део сировине за прераду. Са друге стране, изоловање једињења високе вредности из оваквих материјала је постало актуелно тек послењих пар деценија. Прва искуства на ову тему била су везана за изоловање уља из коштица, етарских уља, шећера и пектина из коре различитог воћа, као и протеинских концентрата и лактозе из сурутке. Комерцијализација наведених производа навела је истраживаче да интензивније размишљају и испитују могућности искоришћења различитих споредних продуката прехранбене индустрије. Уосталом, стално одлагање и неискоришћавање материјала богатих антиоксидантима, влакнима, протеинима, није пракса која би могла бити дуготрајна и прихваћена, ни са биоекономског аспекта, нити са аспекта одрживости савремене прехранбене индустрије. Стога су споредни производи прехранбене индустрије почели много учесталије да се разматрају као важан извор за добијање различитих функционалних једињења, а самим тим и потенцијал за развој производа са додатном вредношћу (Galanakis, 2012; Galanakis, 2015). Константно и исцрпно искоришћење свих извора хране, све бројнија људска популација, као и потреба за правилном исхраном не остаљају много простора нити алтернатива. Међутим, иако су данас у свету многи пројекти, патенти, конференције, радови, посвећени баш овом проблему, великих промена у прерађивачкој индустрији и на самом тржишту нема. Као што је познато, индустријски приступ се често не поклапа са научним, па се тако произвођачи хране не упуштају лако у проблематику коришћења и прераде споредних производа без добро развијених методологија, оптималних количина и уједначености квалитета сировина.

Тема ове дисертације и истраживања у оквиру ње, између осталог, усмерена су на превазилажење разлика и приближавање научног и индустријског приступа ка

заједничком циљу – максималне валоризације споредних производа прехранбене индустрије.

Споредни производи прераде воћарских и ратарских култура/усева о којима ће у овој дисертацији бити речи, од великог су интереса у погледу експлоатације за производњу прехранбених полупроизвода, производа или суплемената са високом нутритивном вредношћу.

Према Организацији за храну и пољопривреду (*Food and Agriculture Organization*, у даљем тексту *FAO*) готово једна трећина јестивих делова сировина заостаје (не буде искоришћена) током прераде истих у прехранбене производе, што износи око 1,3 милијарде тона годишње. Као што је већ наглашено ти споредни производи не представљају само отпад, већ и губитак потенцијалне хране за људску и/или животињску употребу (Gustavsson et al., 2011). Сем поменутог економског аспекта, настали споредни производи представљају посебан проблем са еколошког аспекта.



Слика 1. Губици појединих врста хране у укупном ланцу производње (*FAO, 2011*)

На слици 1 дата је процена губитака хране различитог порекла у различитим фазама њене производње и употребе.

И док развијене земље Европе, Северне Америке и Аустралије упорно осмишљавају начине да умање губитке при преради различитих сировина, неразвијене и мање развијене земље Африке, Средње и Јужне Америке стварају све

веће количине овог вида отпада. Неки од главних разлога за то су: климатски услови (реч је о земљама са топлим и влажним климом), неопремљеност њихових погона и продајних ланаца адекватном опремом и паковањем, као и незадовољавајући санитарни услови, лош транспорт и инфраструктура, као и непостојање свести о могућностима искоришћења. Све ово указује да иако постоје планови и јасне стратегије за искоришћење отпада, смањења губитака и рационализацију, реализација није на задовољавајућем нивоу (FAO, 2011, 2013).

Иако су укупни губици развијених земаља и земаља у развоју готово идентични, у развијеним земљама нешто преко 40% губитака настаје у продаји и код самих потрошача, док у земљама у развоју највећи део губитака настаје у тзв. *post-harvest* фази и при преради (Gustavsson et al., 2011).

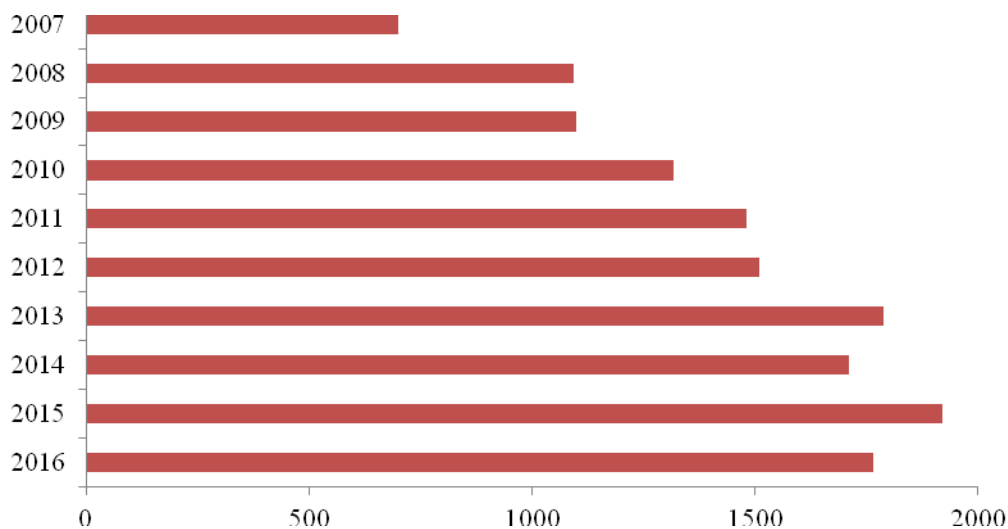
Са друге стране сами потрошачи неразвијених земаља су много одговорнији према храни, те су у Сахарској Африци, Јужној и Југоисточној Азији губици хране по становнику износе свега 6-11 kg годишње, док становници Европе и Северне Америке баце у просеку 95-115 kg хране годишње (Gustavsson et al., 2011). Поражавајуће делује податак да је на глобалном нивоу због овог вида отпада у 2007. години изгубљено 750 милијарди америчких долара (FAO, 2013).

Сем превенције, која се огледа у избегавању производње и куповине вишка прехранбених производа, искоришћење отпада из прехранбене индустрије представља једно од решења овог еколошко- и социо-економског проблема на нивоу читаве планете. На искоришћењу насталог отпада из прехранбене индустрије раде стручњаци различитих профила, јер се у многим споредним производима налазе компоненте значајне за различите индустрије попут производње сточне хране, алкохола, дијеталних влакана, компоста, различитих типова подлога, пигмената, киселина, уља, ароматичних једињења, пектина итд. Само неки од примера таквих извора су: коштице и семенке воћа и грожђа, кора поврћа и цитруса, троп, комина и покожица различитог воћа итд.

Последњих деценија прехранбена индустрија се сусреће са захтевима потрошача за развојем нових прехранбених производа који ће допринети здравијем стилу живота. У том смислу функционална храна има специфичну улогу која се не

односи само на задовољавање глади и унос неопходних нутријената, већ и на превенцију појединих болести, побољшање физичког и психичког стања корисника (Menrad, 2003).

Многобројна истраживања су указала да су тзв. фитохемикалије или микроконституенти воћа, поврћа, житарица (нпр. дијететска влакна, природни пигменти, фенолна једињења, провитами и витамини) вредне биоактивне компоненте са бројним повољним ефектима по здравље људи који их уносе у оптималним количинама (Ѓilas et al., 2009; Iriti и Faoro, 2011; Kim et al., 2012). Битно је истаћи и да је све већи број студија у којима су набројана једињења изолована баш из споредних производа прехранбене индустрије (слика 2) (Khanal et al., 2009; Strati и Oreopoulou, 2011; Machmudah et al., 2012; Cuccolini et al., 2013; Boukroufa et al., 2015; Goula et al., 2015; Aarabi et al., 2016)



Слика 2. Број публикација у последњих 10 година на тему искоришћења споредних производа и отпада прехранбене индустрије (*Web of Science*¹)

Коришћење споредних производа прехранбене индустрије за добијање једињења са функционалним својствима представља изузетно важан приступ. Наиме, многи производи настали тим путем су и даље веома богат извор вредних биоактивних компоненти, као што су нпр. антоцијани и друга фенолна једињења

¹ Подаци за 2016. годину нису потпуни и подложни су променама

(Galanakis, 2012; Galanakis, 2015). Та једињења се могу користити као замена вештачким прехранбеним бојама, уједно показујући и свој позитивни ефекат на здравље доприносећи развоју природних и квалитетнијих производа. Ово је нарочито значајно због ниске цене сировина, али и већ наведеног искоришћења отпада и замене вештачких додатака природним. Уз све то, у питању је и потенцијална производња нових функционалних прехранбених производа.

Производња функционалне хране је тренд којем у данашње време тежи већина произвођача, иноватора, али и самих потрошача. Како универзална дефиниција не постоји, функционалну храну можемо дефинисати као храну која има повољан утицај на људско здравље независно од нутритивних функција које она већ сама по себи поседује. Изјаве које представљају пратећу документацију за ту врсту хране се сврставају у две категорије: (1) изјаве о односу структуре и функције (*енгл. Structure and function claims*), које морају да буду истините и да не доводе у заблуду потрошача и не морају бити одобрене од стране Агенције за храну и лекове (*Food and drug administration* у даљем тексту *FDA*) (2) здравствене изјаве (*енгл. Health claims* или *disease-specific claims*) морају да буду ауторизоване од стране *FDA* и да поседују значајну научну потврду (тзв. Хилови критеријуми) (Miletić et al., 2008).

Истраживања и развој ове области иду у два правца – откривање функционалних својстава традиционалних производа и дизајнирање нових. Како су грожђе и соја, као и њихове прерађевине вековима присутни у људској исхрани, а инкапсулација модеран приступ у очувању компонената које могу бити функционалне, предмет истраживања ове дисертације представља, између осталог, место где се та два правца (традиционални и модерни) сусрећу.

2.1.1 Грожђе и споредни производи прераде грожђа

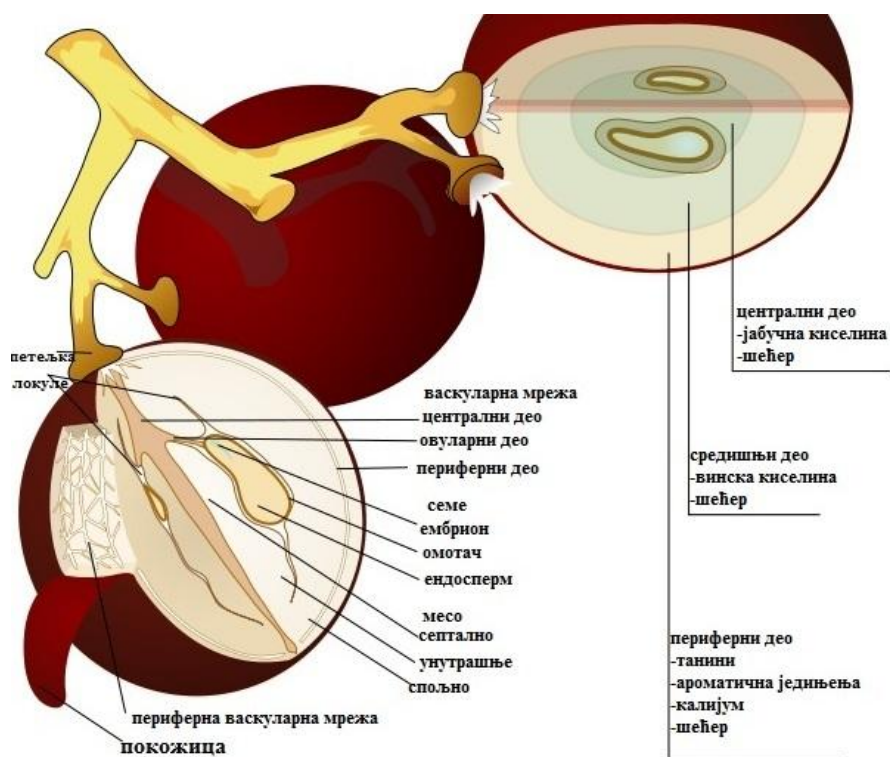
Осим што се конзумира као свеже, грожђе се најчешће прерађује у вино, сок, џем, слатко и суво грожђе. Добро је познато да су црне сорте грожђа и производи добијени њиховом прерадом значајан извор фенолних једињења. У последњих тридесетак година интензивно су проучавана биоактивна једињења вина и грожђа и њихов потенцијално позитиван утицај на здравље људи. Општи став да умерено конзумирање црвеног вина или унос хране богате фенолним једињењима има превентивно и/или терапеутско деловање против многих болести, поткрепљен је бројним студијама (Goldberg и Soales, 2011; Guilford и Pezzuto, 2011).

Током прераде чак до 40% укупне масе грожђа заостане у виду споредних производа (Moreno-Arribas и Polo, 2005). Када је реч о преради грожђа, око 80% светске производње грожђа се прерађује у вино. Преко 20% од масе полазне сировине тј. грожђа (слика 3) заостаје након прераде у виду покожице и семенки, што на глобалном нивоу износи и преко 10 милиона тона годишње. (Llobera и Cañellas, 2007; Maier et al., 2009). Упркос томе што се из комине грожђа могу добити вредни производи као што су етанол, тартарати, малати, лимунска киселина, уља семенки и дијететска влакна, комина се најчешће користи за добијање ђубрива и за исхрану животиња. Међутим, примена комине грожђа у исхрани животиња је ограничена, због њене лоше сварљивости (Famuyiwa и Ough, 1990; Kammerer et al., 2004).

Последњих деценија комина грожђа је препозната као вредан извор фенолних једињења која се слабо или непотпуно екстрахују из покожице и семенки током винификације. Kammerer и сарадници (2004) су утврдили да је у покожици и семенкама грожђа присутно 13 антоцијана (најдоминантнији је малвидин-3-О-глукозид, праћен пеонидин-3-О-глукозидом), 11 хидроксибензоєвих киселина (најдоминантнија је кафтарна киселина), 2 хидроксицинамичне киселине, 13 катехина и флавонола, као и 2 стилбена. У покожици су сконцентрисани антоцијани, хидроксицинамичне киселине, флавонол гликозиди, док су флаван-3-оли углавном смештени у семенкама. Бројне студије показују позитивне здравствене ефекте горе

набројаних једињења код различитих обољења (Iriti и Faoro, 2011). Антибактеријско, антивирусно, као и антифугално дејство споредних производа прераде грожђа је више пута потврђено (Friedman, 2014; de Souza et al., 2015).

Састав и садржај индивидуалних фенолних једињења веома варира нарочито у зависности од сорте и бербе, али и микроклиматских услова. Антоцијани су у великим количинама присутни у pokožици црних сорти грожђа, као што су, рецимо, аутохтона сорта прокупац и једна од најчешће прерађиваних *cabernet sauvignon* (Radovanović et al., 2009; Menković et al., 2014). Поменута једињења биће детаљно обрађена у делу 2.2.1.



Слика 3. Делови бобице грожђа

Поред pokožице, веома експлоатисан споредни производ прераде грожђа су семенке. Уље семенки грожђа је алтернатива традиционално коришћеним јестивим биљним уљима. Здравствене предности овог уља произилазе од присуства незасићених масних киселина (посебно линолеинске), ниског садржаја холестерола и присуства природних антиоксиданаса (полифенола и токоферола). Фенолна

једињења побољшавају оксидативну стабилност и антиоксидативни капацитет уља што доприноси очувању квалитета и нутритивне вредности, штитећи од непријатног укуса и деградације липида (Malićanin et al., 2014). Како је ова дисертација посвећена биоактивним једињењима из покожице црних сорти грожђа, једињења која се налазе у уљу семенки грожђа неће бити детаљно разматрана.

2.1.1.1 Црне сорте грожђа

У експерименталном раду, као извор биолошки активних једињења (првенствено антоцијана) за екстракцију и микроинкапсулацију коришћена је покожица грожђа сорте прокупац (слика 4). Прокупац је одабран јер представља најраспрострањенију аутохтону сорту Србије (Cvetković et al., 2013; Radojević et al., 2013). Ради потврде квалитета и потенцијала ове сорте као извора фенолних једињења, а пре свега антоцијана, резултати су у појединим експериментима (поглавље 5.1) упоређивани са резултатима добијеним коришћењем две веома распрострањене сорте *cabernet sauvignon* и *pinot noir* (бургундац црни) (слика 5).

Прокупац је домаћа аутохтона сорта која се највише гаји у ужем подручју Србије, на Косову и Метохији и местимично у Војводини. Такође, гаји се и у суседним земљама, нарочито у Бугарској и Македонији, док се спорадично јавља и у Руској федерацији. Важнији синоними за ову сорту су: зарчин (Бугарска), мајски чорнии (Русија, Молдавија), скопско црно (Македонија), каменичарка, рековачка црнка, никодимка, рскавац, прокупка и нишевка. Према еколошко-географској припадности спада у групу *Proles pontica* (*Convarietas pontica*).



Слика 4. Сорта грожђа прокупац (фото архива др Р. Борђевић)

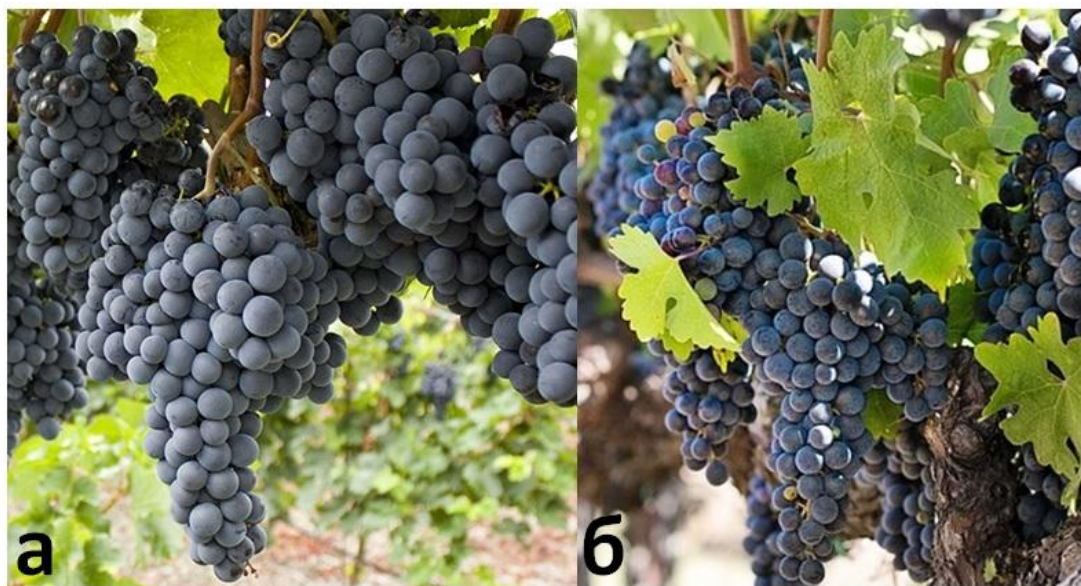
Прокупац има морфолошки и функционално хермафродитан цвет и веома се добро оплођава. Грозд је средње величине, ређе велики, цилиндрично конусан, средње збијен, ретко рехуљав, масе од 130 до 300 грама. Бобице су средње величине, округле, мало пљоснате или сфероидне. Покожица је дебела, плаво црне боје са многим тачкицама, посута обилним пепељком. Веома је позна сорта и сазрева између III и IV епохе. Успешно се гаји уз колац или на шпалиру, при чему резидба мора бити кратка, јер у супротном даје грожђе слабијег квалитета. Обично се гаји на јужним експозицијама и на сувим, растреситим, каменито-шљунковитим земљиштима. Припада веома приносним сортама и даје 15 до 20 тона грожђа по хектару. Прокупац је јако осетљив на пламењачу, средње осетљив према пепелници и релативно отпоран на сиву трулеж. Отпоран је на зимске мразеве, а у фази зимског мировања окца измрзавају на -14 до -18 °C.

Грожђани сок је безбојан и неутралног мириса, а при одговарајућим агроколошким условима садржи 18-22% шећера и 5-7 g/L укупних киселина. При јачем цеђењу грожђа шира је розе боје, а рандман сока се обично креће око 65-70%. Прокупац се користи за производњу стоних и квалитетних ружичастих и црвених вина, за купажирање са другим сортама и за производњу лозоваче и винског дестилата. Вина углавном садрже 11-13% V/V алкохола и 5-6 g/L укупних киселина, а

одликују се црвеном или рубин црвеном бојом (Милосављевић и Јовић, 1999; Аврамов и Žunić, 2001).

За разлику од прокупца, шира бургундца црног и *cabernet sauvignon*-а обично садржи 20-24% шећера и 5,5-9,0 g/L укупних киселина. Рандман при цеђењу им је нешто нижи, око 60 %. Грожђе обе сорте се користи за производњу врхунских и квалитетних црвених вина, нешто ређе и розе вина. У Француској се бургундац често користи и за производњу белих пенушавих вина – шампањца (Милосављевић и Јовић, 1999; Аврамов и Žunić, 2001).

Кратким увидом у карактеристике ове три сорте, закључује се да се употребљавају у исте или сличне сврхе и да су екстракти покожица поредиви. Оно што је очекивано је да и сама покожица прокупца, као и шира, има нешто мањи садржај шећера што олакшава даљу примену о којој је у овој дисертацији реч. Уз ту предност ове сорте, требало би имати у виду и виши садржај антоцијана, који заостаје након прераде у покожици, јер се ова сорта много чешће користи за производњу ружичастих вина у односу на друге две сорте.



Слика 5. Сорте грожђа *cabernet sauvignon* (а) и *pinot noir* (б)

2.1.2 Соја и споредни производи прераде соје

Соја (*Glycine max L. Merr*) припада породици *Fabaceae (Laguminosae)*, класи *Magnoliophyta*, роду *Glycine*. Поред пиринча, пшенице, јечма и проса, соја је један од главних усева који су значајно допринели опстанку цивилизације. Њена производња је у XX веку значајно порасла тако да се крајем века сврстала у ред водећих ратарских усева. Ова биљна врста је једна од главних пољопривредних сировина у свету, а највише је заступљена на америчком континенту, затим у Азији, знатно мање у Европи, Африци и Аустралији. Средином седамдесетих година XX века гајење соје као ратарске културе значајно се проширило и на подручјима наше земље, првенствено у Војводини. Трошкови узгајања соје нису високи, нарочито ако се у обзир узму приноси које соја даје.

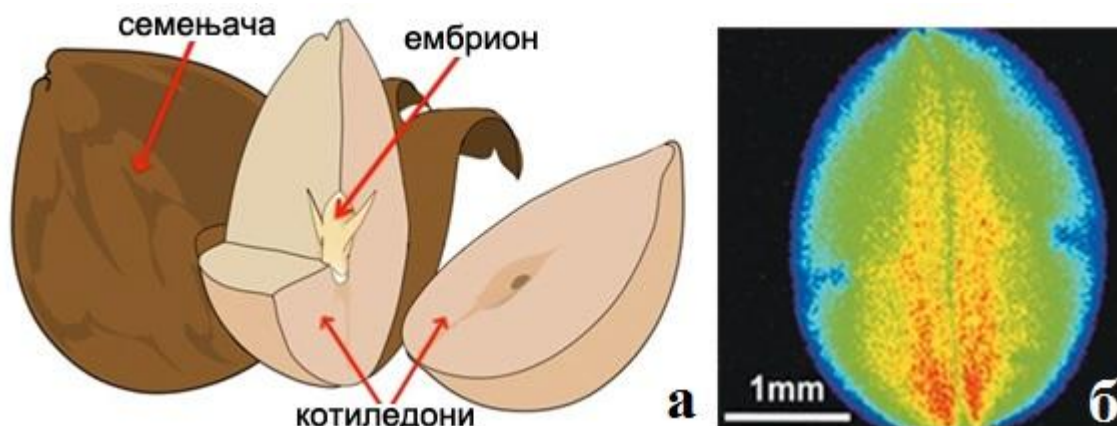
Соја је и са економског и са агротехничког аспекта врло важна сировина, а њена употреба веома разноврсна. Служи за исхрану како људи, тако и домаћих животиња, као и за индустријску прераду. Протеини соје чине око 2/3 светске производње биљних протеина, а 1/3 уља потиче од соје. Око 10% укупне количине соје користи се за производњу разних намирница. У исхрани људи се употребљава у облику сојиног зрна, различитих типова брашна, сојиног уља, сојиног млека, тофуа (сир од сојиног млека), темпеха итд (Stanojevic et al., 2011). Списак производа који се добијају од соје је дугачак и поред разних прехранбених производа и адитива, она је сировина у индустрији гуме, боја, лакова, лепкова, у фармацеутској индустрији итд. Последњих година све је популарнија и као сировина за производњу биодизела.

Због свега горе наведеног, производи од соје се препоручују због повољног дејства на правилан развој деце, у исхрани спортиста и рекреативаца, као и трудница, свима који су изложени појачаном физичком напору или се опорављају од различитих болести (Michaelsen et al., 2011). Такође, требало би да се нађу и у исхрани старијих особа, јер поред корисних састојака храну чине растреситијом и на тај начин погоднијом за жвакање и варење (Wu et al., 2005). Соја је корисна за дијабетичаре, јер садржи декстрин и обезбеђује довољно калорија и протеина, а приликом проласка кроз црева омогућава мању апсорпцију угљених хидрата.

При основној преради соје, једна од првих фаза је уклањање семењаче. Сепарација семењаче најчешће се врши након дробљења зрна и то помоћу система аспиратора (примарни, секундарни), циклона и различитих сита. Семењача се уклања, односно заостаје као споредни производ (нупроизвод) при следећим технолошким поступцима: производњи сојиног брашна, гриза, протеинског концентрата и изолата, као и ферментисаних производа од соје (Вараћ et al., 2014).

Заједничко за добијање свих протеинских производа од соје је одвајање семењаче од зрна када се уклони преко 90% исте. За разлику од свих поменутих процеса производње у којима се веома води рачуна о садржају и искоришћењу аминокиселина, уља, угљених хидрата зрна соје која ће се користити и прерадити, семењачи (која се углавном одбацује) се не придаје довољан значај без обзира на њен састав и квалитет. Она се у досадашњој пракси евентуално користила за исхрану домаћих животиња и као енергент.

Зрно соје се састоји од котиледона, семењаче (љуске) и клице (ембриона) (слика 6). Највећи масени удео има котиледон (често и преко 90%), док клица има најмањи удео са око 2%. Семењача соје у зависности од већег броја фактора најчешће заузима око 3-8% масе целог зрна (код комерцијалних сорти 8% и више). Фактори који највише могу утицати на горе наведене односе удела делова зрна су сорта, клима и услови гајења (Вараћ et al., 2014; Марић и Плазивић, 1995). Боја може бити жута, зелена, смеђа, црна и др.



Слика 6. Пресек (а) и *NMR* снимак (б) зрна соје (модификовано из *aglassroom.org* и *Borisjuk et al*, 2013)

Семе соје је важан извор нутритивних и биоактивних компонената важних за очување здравља људи. Од свих житарица и махунарки сојино семе има највећи проценат протеина чији садржај, у зависности од сорте и услова, варира између 30 и 50%. Комерцијалне сорте најчешће садрже 39-42% протеина (Žilić et al., 2011). Протеини соје садрже све есенцијалне аминокиселине и најсличнији су протеинима животињског порекла. У зависности од сорте и услова, садржај уља у семену соје варира између 12 и 14%, а у комерцијалним сортама је обично 19-22%. У сојиним уљима налазе палмитинска, стеаринска, олеинска, линолна и линолеинска киселина (Žilić et al., 2010). Семе соје је богато и витаминима Б комплекса, посебно ниацином, пиридоксином и фолном киселином, а у мањим количинама садржи и друге витамине. Садржи и минерале (гвожђе, магнезијум, калијум). Осим тога, соја садржи многе фитохемикалије, флавоноиде, фенолне киселине, сапонине и тритерпеноиде. Међу њима изофлавоноиди и антоцијани који припадају флавоноидима су категорисани као најважнија група фенолних једињења присутних у соји због функционалних и хранљивих својстава. Соја је познат извор фитоестрогена, пре свега даидзеина и генистеина којима се приписују повољни ефекти у превенцији губитка коштане масе у постменопаузи (Xiao et al., 2008).

Семењача соје се састоји из три слоја – епидермиса, хиподермиса и унутрашњег паренхимског слоја. Епидермис или епидермални слој је састављен из чврсто пакованих палисадних ћелија дугачких 35-70 μm . На спољашњем зиду ових ћелија налази се кутикула. Хиподермис је састављен из једног слоја склерифицираних ћелија дугачких 30-100 μm . Карактеристике ових ћелија су издуженост и међусобна раздвојеност, њихови зидови су неуједначене дебљине, истањени на крајевима ћелија, а ојачани у средишњем делу ћелије. Све ово чини један потпорни слој са знатним међућелијским простором. Ткиво унутрашњег паренхима је састављен из 6-8 слојева пљоснатих ћелија са танким зидовима. Ткиво је подједнако распоређено у целој семењачи, сем код хилума. Ту се образују три слоја – спољни, средњи и унутрашњи.

Семењача соје има улогу у пружању заштите од гљивичних патогена и инсеката, а такође одржава и интегритет семена. Истраживачи су фокусирани на нове

сорте које садрже разне боје семењаче за побољшање функционалне и хранљиве вредности соје. Фитохемијски састав и концентрација појединих једињења се значајно разликују у зависности од боје семењаче. Сојино семе најчешће има жуту боју семењаче, али као што је већ поменуто, она се може јавити и у зеленој, браон и црној боји, а може бити и шарена (слика 7).



Слика 7. Зрна соје различитих боја семењаче

Студије чији је фокус на соји, односно семењачама различитих боја истичу у први план њихов антиоксидативни потенцијал (Žilić et al., 2013) и њихов повољан ефекат на здравље (Kim et al., 2006; Kim et al., 2008; Cho et al., 2013). Главна разлика између стандардног (жутог) зрна соје и обојеног зрна соје је садржај антоцијана и проантоцијанидина у семењачи. Познавање хранљивих компоненти разнобојних семењача соје може помоћи у њиховом даљем коришћењу као функционалне хране. Дистрибуција и концентрација флавоноида зависи од услова животне средине (клима, година, влажност земљишта, географски регион, температура, светло) и генетских фактора (сорта, величина семена, тип ткива) (Cho et al., 2013.). Истраживања су показала да постоји повезаност између боје семењаче и концентрације флавоноида. У поређењу са семењачом жуте соје, семењача црне соје има већи садржај фенолних једињења и то нарочито антоцијана и проантоцијанидина, а као доминантан антоцијан јавља се цијанидин-3-глукозид (Ito et al., 2013. Žilić et al., 2013). Чак и односу на црвену и браон соју, црна соја има значајно виши садржај, али и комплекснији састав антоцијана (Kovinič et al., 2011). Детаљније о једињењима којима је богата семењача соје у поглављу о биоактивним једињењима 2.2. У овој дисертацији коришћена је семењача црне соје.

2.1.2.1 Црна соја

Црна соја има семењачу црне боје (слика 8). Њена постојбина је Индонезија (Astadi et al., 2009.). У биолошком смислу веома је квалитетна намирница. У широкој употреби је као “здрава храна“ и лековита биљка у оријенталној медицини. Последњих неколико година привлачи све већу пажњу као функционална храна, јер су у њеној семењачи сконцентрисане компоненте са значајним антиоксидативним потенцијалом, биљна влакна, фитинска киселина, фенолна и друга једињења (Ito et al., 2013; Žilić et al., 2013). Боја црне соје потиче од присуства антоцијана који се налазе у епидермису семењаче (Lee et al., 2009; Koh et al., 2014) и имају доказана позитивна дејства на здравље људи (He и Giusti, 2010).



Слика 8. Семењача црне соје

Биоактивне компоненте семењаче црне соје повољно делују на опште здравствено стање и редукују ризик од хроничних болести (Astadi et al., 2009). Црна соја је показала повољно дејство на циркулацију крви, дијабетес, проблеме са гојазношћу и успоравање процеса старења (Kim et al., 2008; Cho et al., 2013). Доприноси олакшању тегоба код оболелих од астме и кашља, а побољшава и рад бубрега, атеросклерозе, као и репродуктивног система мушкараца и жена (Kim et al., 2008; Kim et al., 2012). Генерално, богат је извор и цинка и подиже ниво имунитета.

Прехрамбена и фармацеутска индустрија су све више заинтересоване за употребу оваквих сировина богатих биоактивним једињењима која су посебно важна у превенцији и терапији обољења.

2.2 Фенолна једињења споредних производа прехранбене индустрије

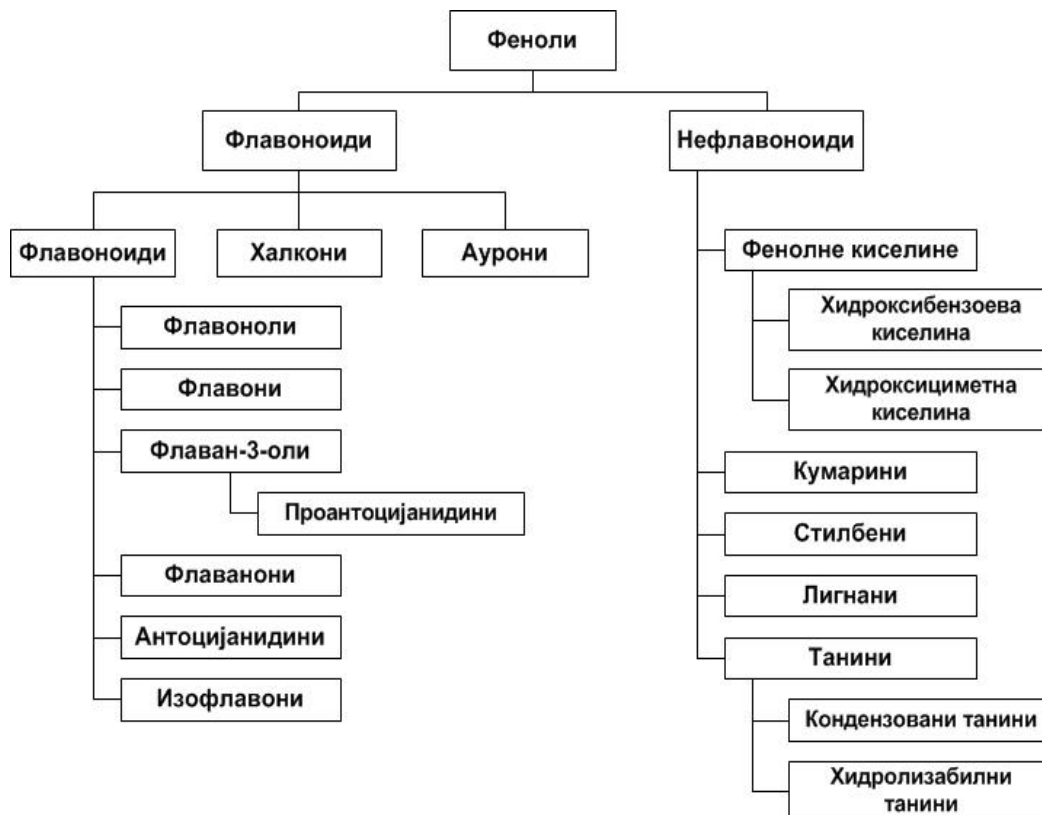
2.2.1 Фенолна једињења, класификација и својства

Фенолна једињења су производи секундарног метаболизма биљака, док је њихово присуство у животињским и људским ткивима последица конзумирања биљака (Shahidi и Naczk, 2003). Ова једињења утичу на раст и развој биљака, омогућавају адаптацију биљака на промене у окружењу, штите осетљиве састојке биљних ћелија од штетних зрачења и деструкције под утицајем светлости, а имају улогу и у привлачењу опрашивача и одбијању биљоједа. Такође, имају антиоксидативне карактеристике и ублажавају оксидативни стрес продужавајући рок употребе плодова.

Фенолна једињења су хемијска једињења која садрже минимум један ароматични прстен са једном или више директно везаних хидроксилних група. Стога се и деле на монофеноле (садрже само једну хидроксилну групу), бифеноле (имају две хидроксилне групе) и полифеноле (више од две хидроксилне групе). Захваљујући могућности да стварају различите комплексне гликозиде и способности да граде полимере постоји више хиљада различитих фенолних једињења (Lin и Harnly, 2007). Највећи део фенола је растворљив у води (смештени су у вакуолама), а мањи део је липофилан, односно нерастворљив у води (смештени су у епидермису) (Saltveit, 2010). Ово својство значајно зависи од извора фенолних једињења. Као што је већ напоменуто, код воћа је највећи део ових једињења у слободној форми, док је код житарица и легуминоза везан и нерастворљив (Liu, 2007).

Постоје два метаболичка пута биосинтезе фенолних једињења и то преко 1) метаболичког пута шикиминске киселине и 2) метаболичког пута малонске киселине. Први представља главни хемизам биосинтезе фенолних једињења у биљкама, а други је извор фенола код гљива и бактерија (Saltveit, 2010).

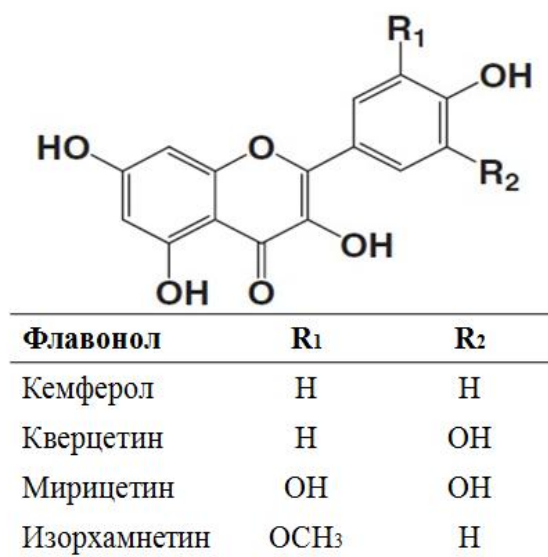
Фенолна једињења се деле на две главне групе: флавоноиде и нефлавоноиде. Подела унутар група варира у различитим литературним подацима. На слици 9 је дата једна од потпунијих класификација новијег датума (Вељовић, 2016).



Слика 9. Класификација фенолних једињења

Флавоноиди, класа органских једињења основног скелета $C_6-C_3-C_6$, веома присутна у биљним ткивима, нарочито у форми флавоноид-гликозида (само мали број се јавља као слободни флавоноид-агликони) (Milić et al., 2000). Називају се још и биофлавоноиди, јер утичу на еластичност, пропустљивост и резистентност капилара у организму човека. Поред тога делују и као антиоксиданти („хватачи“ слободних радикала) и имају антистресно дејство у организму човека, јер имају висок редокс потенцијал (Zhishen et al., 1999). У pokožици грожђа присутне су многе подгрупе флавоноида (Downey и Rochfort 2008), док је у семењачи црне соје углавном идентификовано значајно присуство изофлавона и антоцијана (Žilić et al., 2013).

Флавоноли су најраспрострањенији флавоноиди у биљној храни. Њихова синтеза стимулирана је сунчевом светлошћу, па се углавном акумулирају у спољашњим ткивима воћа и поврћа. Флавоноли се уобичајено налазе у форми гликозида (слика 10), а од присутне шећерне јединице зависи њихова биодоступност. Боја им је бела до жута, а најпознатији флавонол агликони су кверцетин, мирицетин, кемферол и метиловани дериват изорхамнетин. Од свих флавонола, најзаступљенији су гликозиди кверцетина и кемферола, којих има најмање око 280 и 350, респективно (Williams, 2006).



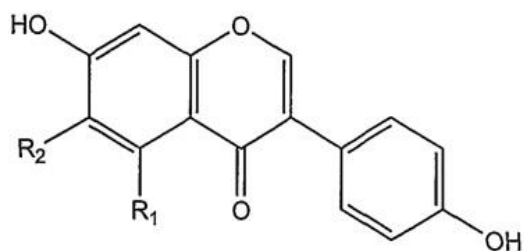
Слика 10. Најраспрострањенији флавоноли у pokožици грожђа и семењачи соје

Грожђе и сама pokožица грожђа садрже велики број различитих флавонола. Downey и Rochfort (2008) су идентификовали флавоноле pokožице црних сорти грожђа помоћу течне хроматографије са реверзном фазом. У највећем делу то су били следећи флавоноли: мирицетин-3-*O*-галактозид, кверцетин-3-*O*-глукуронид, кверцетин-3-*O*-глукозид, ларицитин-3-*O*-галактозид, кемферол-3-*O*-глукозид, изорхамнетин-3-*O*-глукозид итд. Флавоноли кемферол, кверцетин, мирицетин, изорхамнетин, су присутни и код семењаче црне соје, као и њихови 3-*O*-глукозиди (Kovinich et al., 2010).

Флавоноиди су структурно веома слични флавонолима, а разликују се једино по одсутности хидроксилне групе на C₃ атому C-прстена. За разлику од флавонола, нису тако широко распрострањени, а најважнији представници су апигенин и лутеолин са својим глукозидима. У највећим концентрацијама су присутни у першуну, целеру и артичокама, као и кукурузној свили (Žilić et al., 2016a). Полиметокси флавоноиди, као што су нобилетин, скутелареин, синенсетин и тангеретин налазе се искључиво у цитрусима (Jaganath и Crozier, 2010).

Флаванони представљају малу подгрупу флавоноида и имају јако сличну структуру као флавоноиди (једино немају двогубу везу између позиција 2 и 3). Називају се и дихидрофлавоноиди. Када је реч о присуству флаванона у воћу, они као и флавоноиди, углавном се налазе у цитрусима и то у облику гликозида, па се могу наћи у споредним производима прераде истих, а најчешће су то гликозиди нарингенина, хесперетина и ериодиктиола (Jaganath и Crozier, 2010).

Изофлавоноиди су веома ограничено распрострањени у природи. У значајним количинама се налазе једино у легуминозама (махунаркама) и то у соји и производима од соје и у мањим количинама у пасуљу и бобу (Graham, 1991). За разлику од других флавоноида, изофлавоноиди имају В прстен везан на позицији 3 за С прстен (слика 11).

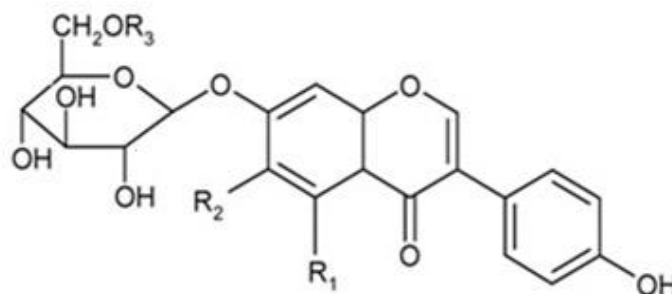


Изофлавоноид	R ₁	R ₂
Даидзеин	H	H
Генистеин	OH	H
Глицитеин	H	OCH ₃

Слика 11. Агликонске форме изофлавоноида

У соји доминирају гликозидне форме, док се агликони могу наћи само у изузетно малим количинама (слике 11 и 12). Међутим, изофлавоноиди у форми гликозида нису активни, јер су хидролиза и ослобађање агликонске компоненте неопходан услов за апсорпцију изофлавоноида у дигестивном тракту, што чини агликоне јединим биолошки активним формама изофлавоноида (Теравчевић, 2013.). Други аутори, пак, тврде да је биодоступност генистеина и даидзеина иста без обзира на форму у којој се налазе (Zubik и Mejdani, 2003). Структурно су слични естрогенима (тзв. фитоестрогени) и зато су значајни са становишта исхране човека. Поседују естрогенску активност, а веома велику пажњу су привукли након открића да имају превентивно дејство код канцера дојке, јајника у периоду менопаузе и остеопорозе (Barnes, 2003). Конкретно, генистеин инхибира ломљење костију и утиче на одржавање коштаног ткива. Такође, имају и друге потенцијалне корисне ефекте на метаболизам и биолошке функције, јер делују антиоксидативно и антибактеријско и помажу снижавању крвног притиска (Xiao, 2008; Liu et al., 2012).

Ху и Chang (2008) су у својој детаљној студији о фенолним једињењима у целом зрну соје и семењачи, како жуте, тако и црне соје, идентификовали тачне количине појединачних изофлавоноида. Када је у питању семењача црне соје присутни су следећи (по опадајућем редоследу): малонилгенистин, малонилдаидзин, малонилглицитин, генистин, даидзин, глицитин, генистеин, ацетилдаидзин, ацетилглицитин, даидзеин, ацетилгенистин, без идентификованог глицистеина (Žilić et al., 2013).



Изофлаво	R ₁	R ₂	R ₃
Даидзин	H	H	H
Генистин	OH	H	H
Глицитин	H	OCH ₃	H
Ацетилдаидзин	H	H	COCH ₃
Ацетилгенистин	OH	H	COCH ₃
Ацетилглицитин	H	OCH ₃	COCH ₃
Малонилдаидзин	H	H	COCH ₂ COOH
Малонилгенистин	OH	H	COCH ₂ COOH
Малонилглицитин	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH

Слика 12. Гликозидни облици изофлаво

Флаван-3-оли су по структури најсложенија подкласа флавоноида, а обухватају једињења од једноставних мономера, (+)-катехина и његовог еписмера (-)-епикатехина до олигомерних и полимерних проантоцијанидина, који су познати и као кондензовани танини. Називају се још и флаваноли или катехини, а зависно од стерео-конфигурација везе између В прстена и угљеника на позицији 2 и хидроксилне групе на позицији 3 могу имати два еписмерна облика: (+)-катехин и (-)-епикатехин са њиховим одговарајућим дериватима. Флаван-3-оли хидроксилацијом дају (+)-галокатехин и (-)-епигалокатехин, а естерификацијом са галном киселином катехин галате, од којих су најраспрострањенији (-)-епикатехин галат и (-)-епигалокатехин галат. Такође, флаван-3-оли граде полимере који се називају проантоцијанидини или кондензовани танини. Проантоцијанидини обично садрже од

2 до 60 мономерних јединица. Уколико се број мономерних јединица креће од 2-7, називају се олигопроантоцијанидини (Jaganath и Crozier, 2010; Tsao и McCallum, 2010). Степен полимеризације у семењачи црне соје се креће од 1–30 (Takahata et al., 2001).

Генерално, флаван-3-оли се највише акумулирају у покожицама воћа, поврћа и других биљака. Њихово присуство значајно утиче на квалитет хране у зависности од присутног садржаја, и то конкретно на трпкост, горчину, киселост, сласт, вискозитет, арома и боју (Agon и Kennedy, 2007).

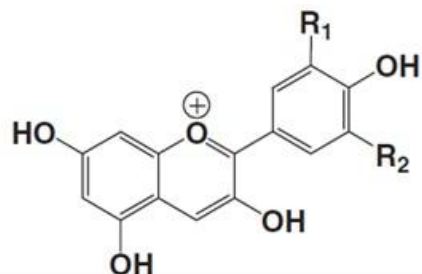
Грожђе је добар извор флаван-3-ола, који су сконцентрисани у покожици и семенкама, при чему је њихова концентрација у покожици значајно нижа. Покожица садржи катехине и галокатехине и њихове проантоцијанидине, конкретно процијанидине и проделфинидине, док се у семенкама налазе искључиво катехини и процијанидини (González-Manzano et al., 2004). Катехин је најзаступљенији флаван-3-ол и у покожици и у семенкама, мада је код неких сорти грожђа садржај катехина и епикатехина веома сличан. Од олигомера у покожици грожђа је најприсутнији процијанидин В1 (González-Manzano et al., 2004).

Флаван-3-оли црне соје су мање осетљиви на високе температуре у односу на антоцијане. То је потврдило и истраживање на сојином млеку и то под различитим температурним режимима (Xu и Chang, 2009). Висока антиоксидативна активност црне соје, између осталог је и последица присуства флаван-3-ола, а пре свега катехина (Žilić et al., 2013), који имају 20 пута јачи антиоксидативни капацитет од витамина Ц и 50 пута јачи од витамина Е (Shi et al., 2003)

Антоцијанидини су агликони у води растворљивих биљних пигмената антоцијана, који су главни носиоци црвене, плаве и љубичасте боје присутне у биљном свету. Хемијски, антоцијанидини су флавилијум катјони, а у природи се углавном јављају као глукозиди, и то моно- и диглукозиди. Антоцијанидини су са шећерном компонентом везани у положају 3 С-прстена или у положају 5 А-прстена. Од идентификованих више од 500 антоцијана, утврђено је да потичу од 31 антоцијанидина, међу којима су шест широко распрострањени: цијанидин, делфинидин, пеларгонидин, малвидин, пеонидин и петунидин (слика 13) (Andersen и

Jordheim, 2006). Они чине основу више од 90 % антоцијана. Листа нешто мање познатих антоцијанидина са њиховом доминантном бојом дата је на слици 14 (Hendry и Houghton, 1996; Delgado-Vargas и Paredes-López, 2013; Warner, 2015). Антоцијани (антоцијанидини + шећерна компонента) као шећерну компоненту најчешће имају глукозу, галактозу, затим арабинозу, ксилозу или рамнозу. За разлику од осталих флавоноида са C₆-C₃-C₆ структуром, антоцијани у киселој средини имају позитивно наелектрисање.

Упркос потенцијалној нестабилности о којој ће бити речи, не би требало занемарити чињеницу да ова група фенолних једињења има свој Е број (тачније поједини антоцијанидини) (слика 13) и да се не би смео потценити потенцијал истих, с обзиром на њихову биоактивност, за разлику од вештачких боја.



Антоцијанидин	R ₁	R ₂	Доминантна боја	Е број
Цијанидин	ОН	Н	пурпурна	E160a
Делфинидин	ОН	ОН	љубичасто плава	E163b
Малвидин	ОСН ₃	ОСН ₃	љубичаста	E163c
Пеларгонидин	Н	Н	наранџаста (лосос боја)	E163d
Пеонидин	ОСН ₃	Н	пурпурно црвена	E163e
Петунидин	ОН	ОСН ₃	љубичаста	E163f

Слика 13. Најчешће форме антоцијадина

Антоцијани, заједно са другим фенолним једињењима се налазе у вакуолама окружени тонопластом и цитоплазматичном мембраном, и сви скупа су

инкапсулисани унутар ћелијског зида (Castaneda-Ovando et al., 2009). Најприсутнији састојци ћелијског зида воћа и поврћа су целулоза која му даје чврстину и пектин који омогућава флексибилност (Castaneda-Ovando et al., 2009). При пуцању ћелије током прераде или током жвакања, мембране и зидови ћелије бивају уситњени омогућавајући на тај начин отпуштање садржаја унутар ћелија. Током тог отпуштања антоцијани по први пут долазе у контакт са ћелијским зидом, а самим тим долази до могућности интеракције међу њима. Међутим, како су биљне ћелије уобичајно реда величине 100 μm , значајно мање од величине сажваканог комада хране (обично око 2 mm), ћелијски зид не мора бити оштећен (Peuron et al., 2004). Ако се антоцијани нађу унутар неоштећене биљне ћелије, њихово отпуштање се дешава током дигестије. Насупрот том примеру, код процеса прераде мљењем или уситњавањем за производе као што су пиреи и сосови, интеракција између антоцијана и ћелијских зидова је остварива.

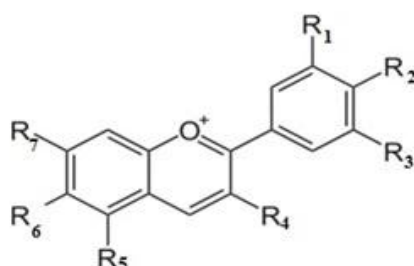
Ациловани антоцијани имају већу стабилност и отпорност на хидролизу у односу на неациловане. Међумолекулска копигментација такође стабилизује антоцијане преко хидрофобних интеракција са полифенолним једињењима у више слојева. Овакве везе стварају комплексну структуру која повећава стабилност антоцијана (Kammerer et al., 2004; Welch et al., 2008). Копигментација подразумева и самоагрегацију, али и интра- и интермолекуларне везе, односно стварање молекуларних комплекса, не само са фенолима, већ и металним јонима, аминокиселинама и органским киселинама (Malien-Aubert et al., 2001; Castaneda-Ovando et al., 2009). Пример за интрамолекуларну копигментацију би била ковалентна веза између ацилованог антоцијана и то најчешће на 6-ОН групи (ређе 4-ОН) и фенолне киселине односно њене ароматичне ацил групе (Malien-Aubert et al., 2001, Giusti и Wrolstad, 2003). Интермолекуларну копигментацију најбоље осликавају флавоноли из комине грожђа, који стабилизујући антоцијане, утичу на одсуство или бар смањење појава попут посветљивање, чак и губљење боје током излагања светлости или топлоти, једном речју имају превентивни ефекат на појаву фотодеградације (Malien-Aubert et al., 2001).

Структурна комплексност антоцијанина као значајан фактор њихове апсорпције и излучивања током метаболичких процеса је истраживана од стране више аутора (Charron et al., 2009; Crozier et al., 2009; Sui, 2017). Док ациловани антоцијани повећавају стабилност захваљујући копигментацији, исти ефекат доприноси смањењу апсорпције ових компонената током дигестије (Crozier et al., 2009). Тако је и са биоусвојивошћу, иако су неациловани антоцијани мање стабилни, студије на људима су показале да су овакви облици много лакше усвојиви *in vivo* (Charron et al., 2009; Kurilich et al., 2005). Једна студија показала је да се преко 75% антоцијана унетих кроз регуларну исхрану налази у неацилованој форми (Wu et al., 2006).

С обзиром на сировине коришћене у овој дисертацији као изворе антоцијана, може се рећи да се они налазе углавном су у форми моно- и дигликозида. Такве форме карактерише лимитирана стабилност, нарочито при хидратацији или промени рН. Малвидин је најзаступљенији антоцијанидин у највећем броју сорти грожђа врсте *V. vinifera* L., изузев неких мускатних култивара, где је доминантни агликон цијанидин. Поред глукозида малвидина и цијанидина у pokožици грожђа у нижој концентрацији присутни су глукозиди делфинидина и петунидина, док је глукозид пеларгонидина детектован само у траговима (He et al., 2010; Mazza и Miniati, 1993). Просечан садржај антоцијана у семењачи црне соје је 1 до 24 mg/g. Овај садржај варира током складиштења. Из семењаче црне соје изолована су три главна антоцијана: цијанидин-3-*O*-глукозид, делфинидин-3-*O*-глукозид и петунидин-3-*O*-глукозид. Њихови садржаји се крећу око 11,0-16,0, затим 2,0-3,0 и 0,5-0,9 mg/g, респективно (Choung et al, 2001; Cho et al., 2013). До 2009. године у објављеним истраживањима на ову тему углавном су детектована ова три антоцијана. Међутим, нешто касније у детаљнијим анализама, поред њих, у мањим количинама детектовани су и пеларгонидин-3-*O*-глукозид, катехин-цијанидин-3-*O*-глукозид, делфинидин-3-*O*-галактозид, цијанидин-3-*O*-галактозид и пеонидин-3-*O*-глукозид (Lee et al., 2009; Kovicich et al., 2011; Cho et al., 2013).

Боја прехранбених производа која потпуно или делимично потиче од антоцијана може бити непостојана, а разлози за промену су бројни: оксидација

антоцијана, хидролиза антоцијана, стварање соли са металима, присуство сумпор-диоксида или одређених ензима (Castaneda-Ovando et al., 2009; Терић, 2012). Оксидативне промене поспешене су већом концентрацијом кисеоника и вишом температуром, а интензитет ефекта и последица оксидације зависи и од врсте антоцијанидина. Примера ради пеларгонидин је најосетљивији, потом цијанидин и делфинидин, док су малвидин и петунидин стабилнији што је последица (не)блокираних хидроксилних група (Терић, 2012). У случају присуства органских киселина, антоцијани се ацилују и њихова боја је стабилнија (Žilić et al., 2016b).



Антоцијанидин	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Доминантна боја
Апигенидин	H	OH	H	H	OH	H	OH	наранџаста
Аурантинидин	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	наранџаста
Капенсиндин	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	OH	бордо
Еуропинидин	OCH ₃	OH	OH	OH	OCH ₃	H	OH	бордо
Хирсутидин	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	H	OCH ₃	бордо
Лутеолинидин	OH	OH	H	H	OH	H	OH	наранџаста
Пулхелидин	OH	OH	OH	OH	OCH ₃	H	OH	бордо
Росинидин	OCH ₃	OH	H	OH	OH	H	OCH ₃	црвена
Триацетидин	OH	OH	OH	H	OH	H	OH	црвена

Слика 14. Форме мање заступљених антоцијанидина
(модификовано из *Hendry u Houghton, 1996* и *Delgado-Vargas u Paredes-López, 2013*)

Антоцијани су од великог интереса, како за прехранбenu индустрију, тако и за фармацеутску индустрију и медицину, не само због својих атрактивних боја, већ и различитих биолошких особина. Снажни су антиоксиданти што значи да штите ћелије од патолошких промена. Као антиоксиданти спречавају оксидацију других

молекула и тиме онемогућавају реакцију оксидације у којој настају слободни радикали, који су веома реактивни и ступају у ланчане реакције са другим молекулима изазивајући оштећења ћелија (Smeriglio et al., 2016). Сем што делују антиканцерогено, препоручују се у превенцији и решавању проблема са простатом, леукемијом или карциномом дебелог црева (Hyun и Chung, 2004; Wang и Stoner, 2008). Спречавају таложење холестерола и липида на зидовима крвних судова и самим тим одржавају еластичност истих и смањују ризик од кардиоваскуларних обољења. Позитиван ефекат антоцијана вишеструко је потврђен када је у питању превентива од атеросклерозе, леукемије, канцера, дијабетеса, гојазности и неуродегенеративних болести (Hyun и Chung, 2004; Wrolstad, 2004; Kim et al., 2006; Kim et al., 2008; Kovicich et al., 2011, Kim et al., 2012).

Нефлавоноиди Најважнија фенолна једињења из групе нефлавоноида који се јављају у материјалу који је коришћен у дисертацији су фенолне киселине (деривати хидроксibenзоeве киселине (C₆-C₁) и деривати хидроксициметне киселине (C₆-C₃)) и стилбени (C₆-C₂-C₆).

Фенолне киселине, прецизније, хидроксibenзоeве киселине се одликују присуством карбоксилне групе супституисане на фенолни прстен. Главни представници хидроксibenзоата су гална, *p*-хидроксibenзоeва, гентизинска, протокатехинска, салицилна, ванилинска и сиригинска киселина. Обично се налазе у везаном облику и типичне су компоненте комплексних структура као што су лигнин и хидролизабилни танини. Гална киселина је основна јединица галотанина, и једна од субјединица елагитанина, који се заједно означавају као хидролизабилни танини (Jaganath и Crozier, 2010).

Деривати хидроксициметне киселине садрже C₆-C₃ скелет. Типични представници деривата хидроксициметне киселине су *p*-кумарна, кафе и ферулична киселина, а акумулирају се и у облику одговарајућих естара са винском киселином: *p*-кутарне, кафтарне и фертарне киселине.

Седам горе поменутих хидроксibenзоeвих киселина идентификовано је у грожђу, али су салицилна и гентизинска киселина детектоване само у траговима. У

грожђу, као и покожици грожђа оне се најчешће налазе, у везаном облику, у форми гликозида или естара (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

У семењачи црне соје идентификоване су прокатехинска и 2, 3, 4-трихидроксибензоева, и ванилинска из групе бензоевих киселина, док из групе цинимичних киселина присутне су кафе и хлорогенска, *trans* цинимична, *o*-кумарна и *m*-кумарна+ферулична киселина, респективно (Xu и Chang, 2008).

Стилбени имају $C_6-C_2-C_6$ структуру и представљају фитоалексине које биљке синтетишу (нпр. у бобицама и листовима грожђа) као одговор на UV зрачење, инфекције и болести, различите повреде и стрес (Jeandet et al., 1995). Најпознатији представник ове групе једињења је ресвератрол, као и његов глукозид пицеид. Поменута једињења могу се наћи и у *cis*- и *trans*- облику. Главни извор стилбена је грожђе и производи од грожђа. Могу се наћи и у другим биљкама, али у мањим концентрацијама (бобичасто воће, купус, спанаћ, кикирики и др.) (Jaganath и Crozier, 2010). Концентрација стилбена у грожђу зависи како од сорте и степена зрелости, тако и од спољних фактора, присуства фунгалне инфекције, зрачења, климе итд. Jeandet и сарадници (1995) потврдили су претпоставку других истраживача да је синтеза стилбена у грожђу у уској вези са синтезом антоцијана, јер користе исти биосинтетски пут, прекурсоре и ензим халкон цинтетазу. То као последицу има директан негативни однос између стварања стилбена и антоцијана у ћелијама покожице грожђа.

2.2.2 Биоактивна својства фенолних једињења

Фенолна једињења имају много значајних биолошких функција, као што су заштита од оксидативног стреса и превенција у развоју бројних обољења (канцер, дијабетес, остеопороза, кардиоваскуларна и неуродегенеративна обољења и др.). Резултати великог броја студија указују да је биолошка активност фенолних једињења директно повезана са њиховом израженом антиоксидативном активношћу. Друге студије утврдиле су директну везу исхране богате фенолним једињењима и смањења ризика од многих хроничних обољења (Scalbert et al., 2005; Arts и Hollman, 2005; Pereira et al., 2016).

У поређењу са испитивањима ефеката других антиоксиданата попут витамина Ц и Е, као и β -каротена, истраживање утицаја фенолних једињења на здравље је почело не тако давно, што се углавном објашњава комплексношћу њихових хемијских структура и механизма деловања (Scalbert et al., 2005). Фенолна једињења су веома ефикасни антиоксиданти *in vitro* и имају могућност неутрализације великог броја различитих реактивних врста, као што су хидроксил, пероксил, супероксид радикали итд. Своју антиоксидативну ефикасност већина фенола дугује два хемијским карактеристикама: 1) постојању фенолне -ОН групе која има способност редукције слободних радикала донирањем протона (атома водоника) или трансфером једног електрона и 2) ароматичној структури која омогућава резонантну стабилизацију насталог феноксил радикала (PO^{\bullet}) (Bors et al., 1990; Milić et al., 2000).

Поред директних реакција са слободним радикалима, фенолна једињења имају способност инхибиције прооксидативног деловања редокс активних метала (најчешће гвожђа и бакра), тако што их хелирањем везују у слабо реактивне комплексе (Mira et al., 2002). На тај начин феноли делују као секундарни или превентивни антиоксиданти: спречавају оксидацију без директне интеракције са оксидационим врстама.

Главни проблем са антиоксидативном активношћу фенолних једињења унутар анималних и људских ћелија је њихова релативно ниска биодоступност, чак и при конзумирању хране богате овим једињењима (Fraga, 2007; Fenandez et al., 2014).

Највеће концентрације фенолних једињења које могу бити постигнуте у крви након конзумирања хране богате истима су на нивоу наномолова (Rein et al., 2000; Holt et al., 2002; Schroeter et al., 2006). То је могући разлог што је потенцијално деловање фенолних једињења као антиоксиданата релевантно само у органима у којима се налазе у великој концентрацији, као што је у случају гастроинтестиналног тракта и крвних судова (Fraga, 2007; Galleano et al., 2010; Fernandez et al., 2014).

Велики број истраживања указује на чињеницу да уношење веће количине фенолних једињења путем исхране има превентивно дејство на развој коронарних болести срца (Dubick и Omaye, 2001; Nardini et al., 2007). Иако механизам којим антоцијанини спречавају адхезију појединих молекула није потпуно познат, поједини аутори антоцијане семењаче црне соје препоручују у превентиви и терапији кардиоваскуларних обољења, атеросклерозе и различитих оштећења ткива (Kim et al., 2006). Агрегација тромбоцита индукована колагеном *ex vivo* спречена је седмодневном употребом сока од грожђа, док исти резултат није постигнут са цитрусним соковима (Osman et al., 1998).

Иzolована фенолна једињења попут антоцијана и ресвератрола из грожђа, изофлавонона соје, као и кверцетина и проантоцијанидина из какаоа, показали су ендотел-зависну вазорелаксациону активност на аортама пацова, зечева и мајмуна (Chen и Pace-Asciak, 1996; Honoré et al., 1997; Andriambeloson et al., 1998; Karim et al., 2000).

Антиканцерогена активност фенолних једињења испитивана је у бројним студијама на животињама, у којима је показано њихово протективно дејство и последично смањење броја туморних ћелија и/или њиховог раста (Yang et al., 2001). Антитуморно дејство фенолних једињења је примећено код различитих органа од уста, стомака, дванаестопалачног црева, дебелог црева, преко јетре, до плућа, дојки и коже. У тим студијама тестирана су бројна фенолна једињења, међу којима су они којима су покожица грожђа и семењача соје богато кверцетин, катехини, изофлавонони, лигнани, флаванони, елагинска киселина, ресвератрол, и друга, где је свако од тих једињења или групе једињења показало антиканцерогено дејство у неком од анималних модела. Њихово антитуморно дејство је блокирајуће или супримирајуће

(Johnson et al., 1994; Yi et al., 2005; Wang и Stoner, 2008). Међутим, дозе фенолних једињења које су коришћене у експериментима на животињама или ћелијским линијама су често значајно веће у односу на дозе које се заиста могу унети уобичајеном исхраном. Као очигледан пример, стилбен ресвератрол има изражено антикарциногено дејство, али је његова концентрација у црвеном вину као најзначајнијем дијеталном извору веома мала (0,3-2,0 mg/L), што доводи у питање здравствене бенефите који се могу остварити уношењем овог једињења једино путем исхране (Scalbert et al., 2005).

Исхраном старих пацова са храном обогаћеном фенолним једињењима побољшане су њихове когнитивне функције и сигнална трансдукција (Joseph et al., 1999). Обогаћивање хране фенолним једињењима грозђа смањује неуродегенеративне промене индуковане хроничном конзумацијом алкохола и побољшава синаптичке функције мерене на изолованим синаптозомима (Sun et al., 1999).

Поједине биљке се традиционално користе у лечењу дијабетеса, а нека од њихових терапијских деловања се могу приписати високом садржају фенолних једињења (Bahadoran et al., 2013). Механизам се може појаснити на следећи начин - хипогликемијска активност фенолних једињења се заснива на смањењу интестиналне апсорпције угљених хидрата, модулацији ензима укључених у метаболизам глукозе, побољшању функције β -ћелија и активности инсулина, затим стимулисању секреције инсулина, као и на антиоксидативним и антиинфламаторним карактеристикама које поседују (Bahadoran et al., 2013). Један од најпознатијих утицаја фенолних једињења, а нарочито флавоноида, фенолних киселина и танина на метаболизам угљених хидрата јесте инхибиција главних ензима за разградњу полисахарида до глукозе (α -глукозидазе и α -амилазе) (Tadera et al., 2006). Резултати истраживања на 3T3-L1 ћелијама указују да антоцијанини црне соје инхибирају диференцијацију адипоцита и основну липолизу што доприноси борби против гојазности и дијабетеса (Kim et al., 2012).

Још један значајан фактор у вези присуства и активности фенолних једињења који је веома важно напоменути је форма у којој се налазе – као слободни и као

везани. Наиме, од тог фактора значајно зависе и бројни параметри везани за екстракцију (који ће се растварач користити, у ком односу, при којим условима и сл.), као и једноставност искоришћења основне сировине за екстракцију. Уједно, то важно нагласити јер су у овој дисертацији коришћене, са тог аспекта, различите сировине: грозђе, односно покожица грозђа где доминирају слободне форме фенолних једињења и соја, односно семењача соје где доминирају везане форме фенолних једињења.

Литературни подаци додатно прецизирају значајну разлику у уделу везаних фенолних једињења у појединим сировинама. Када је о житарицама реч тај удео је око 85% код кукуруза, око 75% код пшенице и ражи и око 62% код пиринча као извора фенолних једињења (Adom и Liu, 2002). Ради бољег увида колико је то драстична разлика као пример су дали феруличну киселину која се у житарицама налази у слободној, конјугованој и везаној форми у односу 0,1:1:100., респективно. Слично важи за антиоксидативну активност код оваквих сировина, где је учешће везаних једињења допринело 60-90% укупној активности (Adom и Liu, 2002). Везана фенолна једињења су значајна и због тога што нешто лакше остају очувана и условима гастроинтестиналног тракта, те не чуди што оболелима од различитих болести често саветују да у исхрани доминирају цела зрна житарица (Liu, 2007). Код воћа пак везане форме су занемарљиве у односу на укупан садржај фенолних једињења или њихов утицај на антиоксидативну активност. Рецимо, бруснице, јагоде, јабуке, па и грозђе имају по свега 5-10% везаних форми, а сличан проценат је и код различитог поврћа (Liu, 2007).

Поједини аутори сматрају да кључно у развоју адекватних система за стабилизацију фенолних једињења и њихову биодоступност је детаљније проучавање њихових форми у изворном систему. Као један од примера стабилизације ових једињења је формирање комплекса са протеинима (Stowe, 2013).

2.3 Екстракција биоактивних једињења споредних производа

У циљу искоришћења биоактивних једињења из различитих споредних производа као први корак се примењује екстракција. Превасходно, основни захтев који би екстракција требало да испуни је максимални принос конкретног једињења или групе једињења уз што мањи принос баластних/нежељених једињења. Принос, кинетика, састав и чистоћа, као и други параметри ефикасности екстракције у многоме зависе од основне сировине и њене структуре, састава биоактивних једињења у њима, примењене методе екстракције, растварача, температуре и многих других услова (Naczki и Shahidi, 2004).

Конвенционалне методе екстракције подразумевају екстракцију чврсто-течно, мацерацију, перколацију, дигестију, турбо-екстракцију и сл, и све оне су прилично дуге и подразумевају значајну потрошњу растварача.

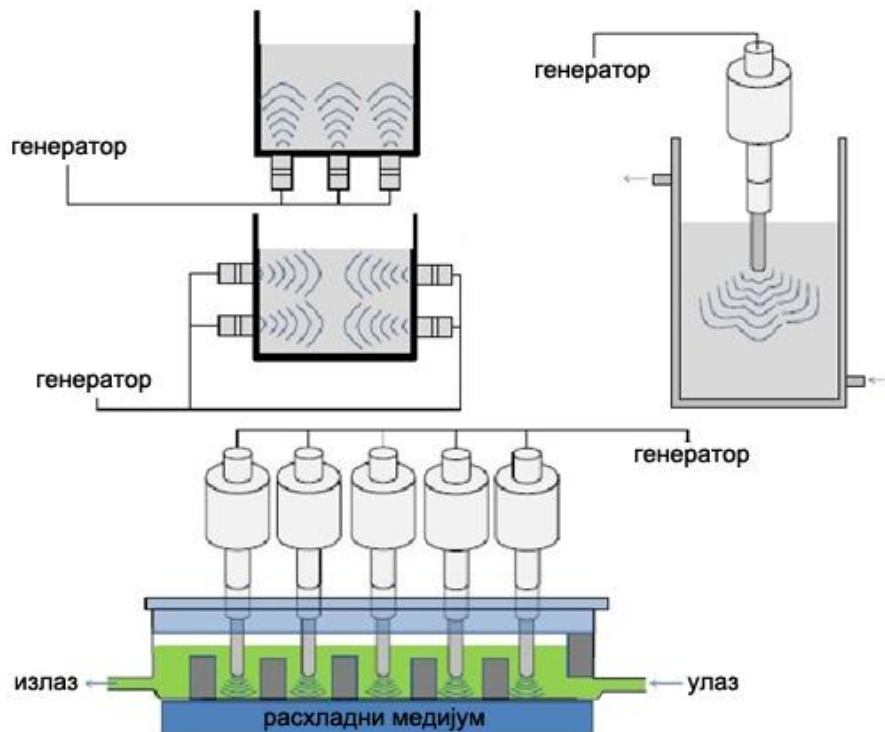
Када је о растварачима реч, опште је познато да се при екстракцијама упоредљавају велике количине истих, а многи од њих су веома опасни по здравље људи и околину. Још 1991. године хемичар Р.Т. Anastas нагласио је потребу за смањењем штетних растварача кроз специфичан програм назван зелена хемија (*green chemistry*), а неколико година касније утврдио принципе исте (Anastas и Warner, 1998). Данас, 25 година касније, тај концепт је увелико изашао из академских кругова, што може се закључити и по томе што је законодавство Европске Уније на пољу заштите околине за период 2010-2050. године ставку о смањењу коришћења опасних растварача ставило међу приоритете (ЕЕА, 8/2013).

Могло би се закључити да би идеално решење било коришћење неких процеса који не подразумевају раствараче. Међутим, због неопходности растварања чврстих материја као и преноса масе и топлоте, растварачи су незаобилазне компоненте. Сходно томе, предложене су две главне стратегије у циљу примене и развоја тзв. зелених растварача. Једна од њих се односи на замену растварача добијених из нафтних извора са растварачима добијеним из обновљивих извора, а друга се односи

на замену опасних растварача по здравље и безбедност људи и околине са онима који су погоднији за животну средину и нешкодљиви за људе (Свјетко Bubalo et al., 2015). Обновљиви извори попут дрвећа и различитих усева, али и споредни производи и отпад након њихове прераде, као и сама биомаса су извори растварача (метанол, етанол, глицерол, итд.) који су биоразградиви, еколошки прихватљивији и подеснији за различиту употребу у многим индустријским условима. Један од примера екстракције помоћу воде и глицерола је издвајање биофенола из лишћа маслине, где су циклодекстрини били употребљени у циљу повећања ефикасности екстракције (Mourtzinos et al., 2016). Лимуска киселина се, такође, често користи (у комерцијалној форми или као лимунов сок) да побољша екстракцију важних компонената различитих споредних производа, као што је пектин (Уаро, 2009; Minjares-Fuentes et al., 2014).

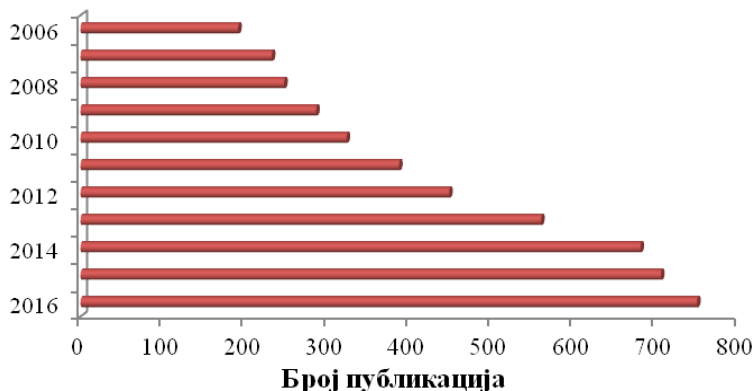
Већ је истакнуто да је циљ екстракције што већи принос конкретних једињења. Оно што најчешће стоји на путу високом приносу је матрикс у ком се та једињења налазе и начин тј. Хемијске везе којим су повезана за исти. С тим у вези, нешто иновативнији приступи и начини екстракције су примена ултразвучних и микроталаса, као и суперкритичних флуида. Такође, процеси који могу имати значајан ефекат на ефикасност екстракције су они који се изврше током предтретмана. Најчешћи процеси у оквиру предтретмана су примена високог притиска и пулсирајућег електричног поља на материјал за екстракцију. Набројане методе екстракције не само да повећавају ефикасност и смањују употребу нежељених растварача, већ спадају под тзв. *хладну* екстракцију. Самим тим што није неопходно подизање температуре, стабилност једињења која су биоактивна и по правилу врло осетљива, загарантована је. У последњих неколико деценија, колико се ове методе екстракције примењују у већој мери, најзаступљенија је примена ултразвучних таласа (слика 15). Разлози за примену ове технике су бројни: једноставност и лака примењивост, флексибилност, много мања инвестициона улагања итд. Ултразвучни таласи подразумевају фреквенцију од 20 kHz до 10 MHz. Таласи ове фреквенције изазивају вибрације, кавитацију, ударне таласе, силе смицања, компресију, и заслужни су за свеукупни ефекат ултразвучних таласа на ефикасност екстракције. На

нижим фреквенцијама које су коришћене и у експериментима у овој дисертацији (20-100 kHz) углавном су присутни физички ефекти ултразвучних таласа, док су на вишим фреквенцијама присутнији хемијски и аудио ефекти.



Слика 15. Различити типови ултразвучних уређаја (модификовано из *Tiwari, 2015*)

Ултразвук налази примену у све већем броју истраживања (слика 16), али и у комерцијалним производима (табела 1).



Слика 16. Број публикација о примени ултразвука од 2006. године (*Web of Science*)

Такође, не би требало занемарити и примену ултразвучних таласа у комбинацији са другим типовима екстракција. Тако рецимо имамо пример успешне екстракције антоцијана из коmine боровнице помоћу суперкритичне флуидне екстракције уз примену ултразвука снаге до 400 W (Reátegui et al., 2014). Поред тога, ултразвучни таласи фреквенције 40 kHz и снаге 50 W у комбинацији са микроталасима снаге 98 W могу обезбедити веома брзу екстракцију ликопена (за неколико минута) из пиреа парадајза (Lianfu и Zelong, 2008).

Табела 1. Индустијска примена ултразвучних таласа у екстракцији активних једињења

Активна компонента	Извор	Услови екстракције ултразвуком	Литература
Фенолна једињења	Комина грожђа	55 ± 5 kHz; 20–50 °C; вода 25 kHz; 20–50 °C; 50% V/V етанол	Bajerová et al., 2014. Tiwari, 2015.
Уље	Семе папаје	40 kHz; 50 °C	Samaram et al., 2014.
Антоцијани и проантоцијанидини	Комина ароније	30.8 kHz; 20–70 °C; 0–50% V/V етанол 72–216 W; 30–70 °C; 50% V/V етанол	Tiwari, 2015.
Пектин	Комина грожђа	37 kHz; 35–75 °C; лимунска киселина	Minjares-Fuentes et al., 2014
Фитостероли	Сојино млеко	35 и 130 kHz; 20 - 40°C; етанол	Fahmi et al., 2014.
Природни пигменти	Латице цвећа <i>B. glabra</i>	20 kHz; 40–60 °C; вода	Maran et al., 2015.
Шикиминска киселина	Звездасти анис	28 kHz; вода	Cai et al., 2014.
Полифеноли	Пустињско биље	40 kHz; 40–50 °C; 0 - 70% V/V етанол	Paz et al., 2015.
Олигосахариди	Воће и поврће	40 kHz; 25–50 °C; 35 - 85% V/V етанол	Jovanovic-Malinovska et al., 2015.

2.3.1 Екстракција биоактивних једињења из покожице грожђа

У табели 2 дат је преглед литературних података о оптимизацији и ефикасности екстракције фенолних једињења из покожице црних сорти грожђа, као једног од најчешћих споредних производа прераде грожђа. У оквиру услова екстракције наглашен је растварач, однос чврсте и течне фазе, број реекстракција, време екстракције, температура, као и да ли је примењено мешање, ултразвучни таласи или притисак. Неки од истраживача до података о екстрахованим једињењима су дошли помоћу спектрофотометријских, док су други користили хроматографске методе, што је такође наглашено у табели.

Многи аутори су у својим радовима нагласили тачан број идентификованих једињења, па су рецимо Sandhu и Gu (2010) објавили да су идентификовали чак 88 фенолних једињења, од којих 28 у покожици, док су преосталих 43 били пореклом из семенки, а 17 једињења је сконцентрисано у пулпи. Просечно, расподела садржаја фенолних једињења је у односу 87,1:11,3:1,6, за семенке, покожицу и пулпу, респективно. Док семенке углавном садрже танине, флаван-3-оле, деривате елагинске киселине и кверцетин рамнозид, у покожици највећи удео чине флавоноиди, укључујући антоцијане, кверцетин, мирицетин, кемферол глукозиде и др (Sandhu и Gu, 2010). У покожици грожђа, конкретно сорте *cabernet sauvignon*, аутори једне студије идентификовали су чак 24 антоцијана, од којих су 20 уобичајна за грожђе из рода *V. vinifera*. Под њима се подразумева 6 индивидуалних антоцијана, 5 ацилованих форми, 7 *p*-кумароилних форми, као и две кафе форме антоцијана (Xing et al., 2015).

Из табеле 2 се може видети да су махом коришћени растварачи који нису препоручљиви са еколошког аспекта, и да су однос чврсте и течне фазе, као и примењене температуре и времена знатно варирали.

Табела 2. Литературни подаци о екстракцији биоактивних једињења из покожице грожђа

Сировина	Услови екстракције	Резултат	Примењена техника анализе	Извор података
Лиофилизована и самлевена покожица: <i>V. cinerea</i> <i>V. champinii</i> <i>V. amurensis</i> <i>V. vinifera</i>	Метанол и 0,1% V/V хлороводонична киселина	TAC ¹ = 18,9 – 60,3 mg/g	Хроматографија (HPLC/MS)	De la Cruz et al., 2012.
Осушена и самлевена <i>Vitis vinifera</i> L. Muscat	Етанол Soxhlet 18-20 h; 40 °C	TPC ² = 150,0 mg GAE/g TFC ³ = 34,0 mg CE/g	Спектрофотометрија	Nirmala и Narendhirakannan, 2011.
Осушена комина црног грожђа <i>Vitis rotundifolia</i>	80% V/V ацетон; 1:7; 20 h; 37 °C; мешање	TAC = 41,4 µg/mL	Хроматографија (HPLC-PDA-MS)	Chedea et al., 2015.
Покожица 4 култивара	Ацетон/вода/сирћетнакиселина (70:29.7:0.3, V/V/V); 1:20; 20 min уз примену УЗ 2x5 min	TPC = 5,9 – 7,5 mg GAE/g	Спектрофотометрија	Sandhu и Gu, 2010.
Осушена и самлевена покожица <i>Vitis vinifera</i> L. <i>cabernet sauvignon</i>	Метанол и 2% мравља киселина; 1:20; уз примену УЗ 10 min и мешања у мраку; 25 °C; 30 min	TAC = 13,3-28,7 mg/g	Хроматографија (HPLC-ESI-MS/MS)	Xing et al., 2015.
<i>Vitis vinifera</i> Покожица 7 варијетета	Етанол/вода 80% V/V; 1:10; 60 °C; 60 min	TPC = 1,9 mg GAE/g TFC = 0,8 mg CE/g TAC = 0,8 mg MGE/g	Спектрофотометрија	Katalinić et al., 2010.

Покожица грожђа <i>Pinot noir</i> и <i>pinot meunier</i>	Ацетон/вода, етанол/вода, метанол/вода; 1:1, V/V; 25 °C; 40 min; 1:5, 2x; мешање у мраку	TAC = 3,4 - 17,3 mg MGE/g _{ек} TPC = 13,9-57,2 mg GAE/g _{ек}	Хроматографија (LC-MS) Спектрофотометрија	Cheng et al., 2012.
Комина грожђа сорте <i>pinot noir</i> након класичне и мацерације са CO ₂	Етанол/вода 70% V/V, метанол/вода 70% V/V, вода; 1:2; 25 °C; 1, 12, 24 h; мешање	TAC = 55,3 - 995,1 mg/L _{ек} TAC _{HPLC} = 59,4 - 1086,4 mg/L _{ек} TPC = 178,3-6782,8 mg GAE/L _{ек}	Спектрофотометрија Хроматографија (HPLC)	Lapornik et al., 2005.
Осушена и самлевена комина црног грожђа	Етанол/вода 90% V/V, Етилацетат вода 90% V/V; 5 и 24 h; 28 и 60 °C	nd ⁴	Спектрофотометрија	Spigno et al., 2007a
Покожица грожђа	Етанол (20-100% V/V); 1:20; високи хидростатички притисак(0,1-600 MPa); 20-90 °C; 30-90 min	TAC = 8,8 – 47,7 mg CGE/g	Хроматографија (HPLC)	Corrales et al., 2009.
Покожица грожђа сорте <i>pinot noir</i>	Надкритична вода уз притисак 10 MPa; 80-120 °C, 2 h	TPC = 44,3-77,0 mg GAE/g	Спектрофотометрија	Duba et al., 2015.

¹Садржај укупних антоцијана, ²Садржај укупних фенолних једињења, ³Садржај укупних флавоноида, ⁴није дефинисано

2.3.2 Екстракција биоактивних једињења из семењаче црне соје

У табели 3 дат је преглед литературних података о оптимизацији и ефикасности екстракције фенолних једињења из семењача црних сорти соје.

Табела 3. Литературни подаци о екстракцији биоактивних једињења из семењаче црне соје

Сировина	Услови екстракције	Резултат	Примењена техника	Извор података
Семењача црне соје Tawonkong и Geomjeongkong-2	Метанол/хлороводонична киселина (85:15, V/V); 1:10, (2x); 24 h; 4 °C; мешање	TAC ¹ = 13,1 - 19,7 mg/g	Хроматографија (LC/MS)	Koh et al., 2014
10 варијетета семењаче црне соје	Метанол 40% V/V и хлороводонична киселина 1%; 1:20 (3x); 24 h; 4 °C, мешање	TAC = 1,6 - 20,2 mg/g	Хроматографија (HPLC)	Choung et al., 2001.
Семењача црне соје	Ацетон/вода/сирћетна киселина (70:29.5:0.5, V/V/V); 1:10, 2x	TAC = 6,2 mgCGE/g TPC ² = 68,5 mgGAE/g TFC ³ = 47,0 mgCE/g	Спектрофотометрија	Xu и Chang, 2008.
Црна соја	Ацетон/вода(50:50, V/V и 80:20, V/V), ацетон/вода/сирћетна киселина (70:29.5:0.5, V/V/V), етанол/вода и метанол/вода (70:30, V/V), апсолутни алкохол. Мешање; 3 h, 12 h	TPC = 3,7 - 6,2 mg GAE/g TFC = 0,7 - 2,2 mg CE/g	Спектрофотометрија	Xu и Chang, 2007.

1:10, 2x				
Семењача црне соје	Метанол; 3x; 24 h; 4 °C	nd	nd	Kim et al., 2006
Семењача црне соје	Метанол и 1% мравља киселина; 1:5, 2x; 48 h; 4 °C	nd ⁴	Хроматографија (HPLC DAD-ESI/MS)	Lee et al., 2009.
Семењаче црне соје <i>black tokio</i> и <i>cornaja</i>	Натријум-хидроксид (1M), 4 h + Етил ацетат/диетилетар (1:1, V/V); 4x; 35°C.	TAC = 11,4 - 16,5 mg CGE/g TPC = 29,8 - 29,9 mg GAE/g TFC = 4,6 mg CE/g	Спектрофотометрија	Žilić et al., 2013
Семењача црне соје <i>geomjeongkong 2</i> , <i>seonheukkong</i> , <i>cheongja2</i> и <i>cheongja 3</i>	80% V/V метанол; 1:20; 12 h; 25°C; мешање	TAC = 8,9 – 23,0 mg/g	Хроматографија (HPLC)	Cho et al., 2013.

¹Садржај укупних антоцијана, ²Садржај укупних фенолних једињења, ³Садржај укупних флавоноида, ⁴није дефинисано

Кох и сарадници (2014) успели су да идентификују 7 антоцијана помоћу HPLC и LC/MS стандарда. То су били: делфинидин-3-*O*- β -*D*-глукозид, цијанидин-3-*O*-галактозид, цијанидин-3-*O*- β -*D*-глукозид, петунидин-3-*O*- β -*D*-глукозид, пеларгонидин-3-*O*-глукозид, пеларгонидин-3-*O*-(6"-малонилглукозид) и цијанидин. Пет од њих су претходно идентификовани и од стране Lee и сар. (2009), док многи истраживачи нису успели да идентификују све наведене антоцијане. Најчешће изоловани и уједно најдоминантнији у семењачи црне соје су: цијанидин-3-*O*-глукозид, делфинидин-3-*O*-глукозид и петунидин-3-*O*- β -*D*-глукозид. Kim и сарадници (2006) су дефинисали однос ова три антоцијана у испитиваним узорцима семењаче црне соје који је износио 72:20:6, респективно.

2.4. Инкапсулација

2.4.1 Инкапсулација – појам и циљ

Очување стабилности биоактивних једињења је једна од критичних тачака која се намеће у савременој производњи прехранбених производа. Биоактивне компоненте су осетљиве на различите факторе током процеса прераде и складиштења (кисеоник, светлост, температура) или пак подлежу променама у гастроинтестиналном тракту (рН, ензими). Стога је на произвођачима да обезбеде заштитни механизам који ће очувати активне компоненте до конзумирања и омогућити њихово дејство на циљаном месту у организму (Nedovic et al., 2011; Nedović et al., 2013). За прехранбене производе, нарочито оне функционалне, од пресудног значаја је очување стабилности присутних биоактивних једињења током процеса производње и складиштења. Технологије које ове захтеве испуњавају, а уз то омогућавају и веће искоришћење биоактивних једињења (антиоксиданти, минерали, витамини, фитостероли, екстракти, есенцијална уља) и ћелија попут пробиотика или квасца су инкапсулационе и имобилизационе технологије. Инкапсулација је ефикасан приступ очувања широког спектра компоненти њиховим смештањем у заштитни матрикс што доприноси побољшању стабилности и биодоступности компоненти *in vivo* и *in vitro* (Nedovic et al., 2011; Nedović et al., 2013).

Инкапсулација се може дефинисати као процес „хватања“ активне компоненте у носач или наношења физичке баријере - заштитног омотача око исте у циљу њене заштите од различитих непожељних утицаја из околне средине. Данас инкапсулисани системи играју важну улогу у различитим областима, као што су: биотехнологија, медицина, пољопривреда, хемијска индустрија, фармацеутска и прехранбена индустрија (Fang и Bhandari, 2010; Wandrey et al., 2010).

Сам концепт примене полупропустљивих капсула за заштиту и производњу различитих биолошких реагенаса започео је Chang пре око пола века, да би се током времена константно проширивао дијапазон таквих производа (Chang, 1964).

Компонента која се инкапсулише може бити диспергована-емулгована у заштитном материјалу или може стварати компактну целину око које је формиран заштитни слој. Данас многи иновативни процеси који укључују инкапсулацију потпомажу превазилажење проблема и омогућавају успешну производњу нових прехранбених производа.

Инкапсулација омогућује побољшану или потпуну стабилизацију прехранбених састојака и повећање њихове биоактивности обезбеђивањем адекватне заштите осетљивим биоактивним једињењима и другим активним компонентама од различитих неповољних спољашних утицаја. Између осталог, онемогућују се реакције са осталим компонентама у производу као што су кисеоник или вода (Zuidam и Shimoni, 2010; Nedovic et al., 2011). Укратко, инкапсулација омогућује да се врло реактивни, сензитивни и испарљиви састојци преведу у стабилне/стабилније форме (Nedovic et al., 2011; Nedović et al., 2013).

Још једна корисна страна инкапсулације је смањено испаравање и деградација испарљивих компоненти (Lesmes и McClements, 2010). Такође, лакше руковање са активном компонентом, превођењем из течног стања (нпр. екстракти биља, у овом случају покожице грожђа и семењаче соје) у чврсто стање-прах (Nedovic et al., 2011). Ту су и фенолна једињења, описана у поглављу 2.2, код којих се инкапсулација користи и због могућности маскирања непријатних утисака током конзумирања хране, као што је горак укус и астригенција коју нека од њих изазивају (Belščak-Cvitanović et al., 2015).

Инкапсулацијом биоактивних компоненти споредних производа прераде воћа и житарица могу се постићи неке од наведених предности инкапсулације и повећати ефикасност функционалне хране. Применом одговарајућих поступака екстракције биолошки вредних једињења, напредних технологија за њихову стабилизацију и развојем нових приступа омогућило би се побољшање нутритивних и здравствених својстава појединих компоненти хране.

Сматра се да је кључ функционалности, ефикасности и степена развијености савремене прехранбене индустрије обезбеђивање контролисаног ослобађања састојака хране на правом месту и у право време. Правовремено и циљано

отпуштање побољшава ефикасност додатака хране и осигурава њихово оптимално дозирање, што се на крају рефлектује на смањење цене уз истовремено повећање ефикасности производње.

Из свега наведеног проистиче да материјали који се користе за инкапсулацију морају бити биоразградиви и чинити заштитни слој између осетљивих и активних материја као унутрашње и окружења као спољашње фазе. Постоји велики број инкапсулационих техника, многе су нашле разноврсну примену, а оне најзаступљеније и оне коришћене у овој дисертацији биће детаљно описане.

2.4.2 Технике и носачи за инкапсулацију биоактивних једињења

2.4.2.1 Технике инкапсулације

Постоји велики број инкапсулационих техника које су нашле своју примену у прехранбеном сектору. Технике инкапсулације се могу поделити на оне код којих се капсула формира услед физичких ефеката (распршивањем, топљењем, замрзавањем) и на методе код којих се капсула формира под дејством хемијског третмана (јонотропско гелирање, полимеризација, коацервација и сл.). Имајући у виду да су једињења која се инкапсулишу најчешће у течном агрегатном стању, највећи број ових техника је заснован на сушењу. Генерално, спреј сушење је нашло највећу примену у прехранбеној индустрији јер је флексибилна, континуална, али пре свега економична техника. Уз помоћ спреј сушења добијају се честице задовољавајућег квалитета и веома малих димензија. То је нарочито пожељно са аспекта сензорних карактеристика финалних прехранбених производа, посебно текстуре (Manojlović et al., 2010; Nedovic et al., 2011). Данас се већина инкапсулата у прехранбеној индустрији добијају спреј сушењем, док се остатак добија спреј хлађењем, лиофилизацијом, емулзификацијом, екструзијом итд. Инкапсулација у микрочестице се може извести и применом савременије екструзионе методе – електростатичке екструзије. Уз наведене технике,

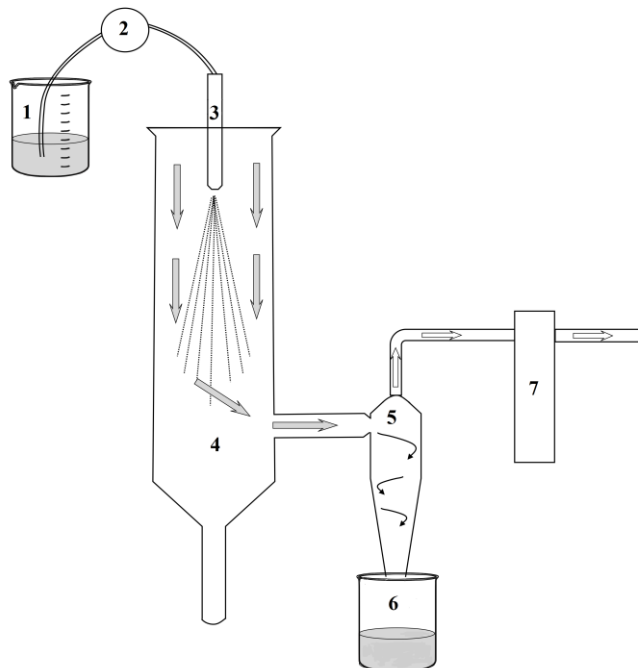
молекуларна инклузија у циклодекстрине и липозоме пружа бројне предности, али су ове технике са друге стране знатно скупље и самим тим, мање у примени. Процесом инкапсулације је могуће произвести честице различитих величина и облика. Величина честица варира у опсегу од неколико милиметара до нанометарских димензија. Сходно величини честица која се добија одређеном техником, сем основног појма инкапсулација, често се користе појмови микро- и наноинкапсулација.

У овом поглављу акценат ће бити на опису техника и носача који су употребљени у овој докторској дисертацији, али ће бити речи и о другим техникама и материјалима често коришћеним у различитим истраживањима и у прехранбеној индустрији, генерално.

Спреј сушење или сушење распршивањем је техника погодна за производњу различитих инкапсулисаних производа са широком применом у различитим областима индустрије. Посебно место место спреј сушење заузима у прехранбеној технологији, где се користи за инкапсулацију арома, витамина, уља, итд. Спреј сушење омогућава коришћење великог броја различитих материјала носача. Као носачи се најчешће користе малтодекстрин, арапска гума, модификовани скроб, млеко, као и сурутка у праху, желатин, шећери и многи други као и различите мешавине ових материјала. Поступак спреј сушења се састоји од емулговања или дисперговања материјала који се инкапсулише у раствору материјала омотача и распршивању тако добијене смеше у струји топлог ваздуха у комори за сушење (слика 17). У току овог процеса долази до формирања чврстих честица услед испаравања растварача, најчешће воде. У зависности од подешених параметара (пре свега температуре (*Inlet*) и протока) и карактеристика самог раствора (вискозитет и површински напон) могуће је добити честице чија величина може бити од око 1 μm до 100 μm (Nedović et al., 2013; Đorđević et al., 2015). Код ове технике сушења примењују се високе температуре током самог процеса формирања омотача. Контрола излазне температуре се врши преко контроле улазне температуре и протока улазног и излазног ваздуха. У процесима спреј сушења улазне температуре ваздуха

су углавном у опсегу од 130-220 °С, док се температура излазног ваздуха креће од 50 до 85 °С.

Када је реч о потенцијалној примени спреј сушења као технике инкапсулације, сматра се да је једна од најпримењенијих и најраспрострањенијих у различитим областима већ деценијама, због једноставности, поузданости, великог капацитета производње и великих приноса. У прехранбеној индустрији капацитети ових уређаја прелазе и више тона на сат, а у почетку су коришћени за производњу млека у праху, док је данас примена веома разноврсна. Карактеристике финалног производа након спреј сушења су јако пожељне са више аспекта, пре свега микробиолошког (активност воде је изузетно ниска), али и са оне практичне стране, где је производ у праху много лакше чувати, складиштити дистрибуирати, генерално, манипулисати са њим.



Слика 17. Шематски приказ процеса спреј сушења
(модификовано из *Čalija et al., 2016*)

(1. Материјал за распршивање (раствор) 2. Перисталтичка пумпа 3. Дизна 4. Комора за сушење, 5. Циклон сепаратор 6. Посуда за сакупљање производа, 7. Филтер)

Недостаци ове технике су релативно мали капацитет инкапсулације (углавном око 20 до 30%), ограничен избор материјала за носаче инкапсулата, као и активних компоненти које је могуће инкапсулисати. Та ограничења углавном се односе на

осетљивост активне компоненте на повишену температуру, њену растворљивост у води или другим за ову намену прихватљивим растварачима, као и на реолошке карактеристике раствора носача.

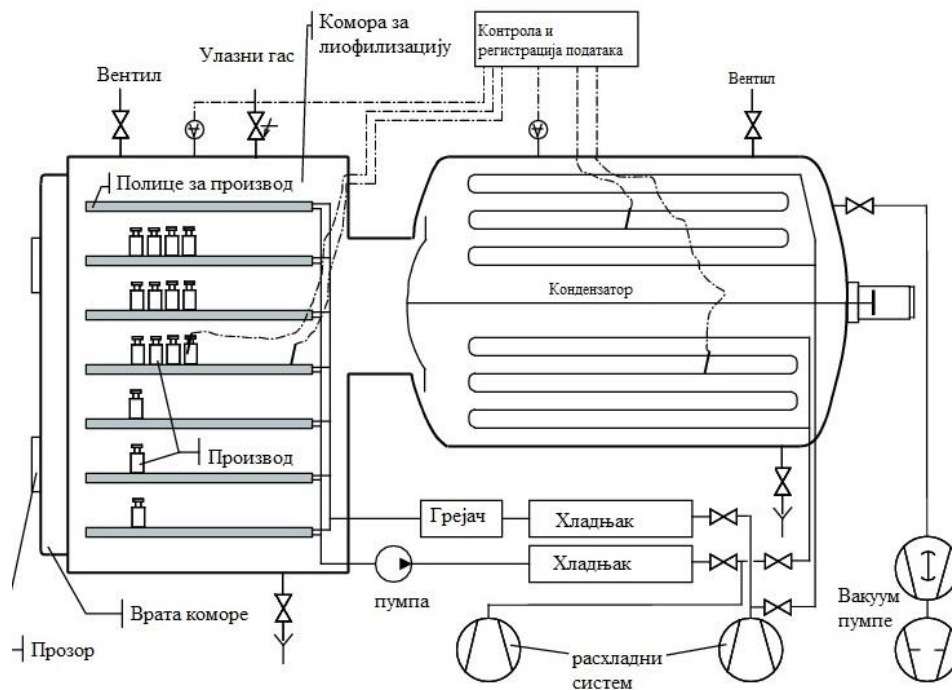
Лиофилизација се може дефинисати као процес уклањања воде, односно уклањање растварача (у случају процеса инкапсулације) на ниским температурама под вакуумом. Између осталих примена, ова техника се може користити за добијање инкапсулисане активне компоненте, која остаје заробљена унутар структуре носача. Генерално, лиофилизација се сматра алтернативом спреј сушењу када се инкапсулишу веома осетљиве компоненте, термолабилне, које не би очувале своја најважнија својства уколико би била изложена високој температури. Код ове технике инкапсулације, смеша носача и активне компоненте се у првој фази подвргне процесу замрзавања, а потом се под вакуумом и одговарајућом температуром врши директно испаравање растварача (најчешће вода) сублимацијом унутар лиофилизатора (слика 18).

Температуре током прве фазе и притисак током друге фазе који се примењују су обично -90 до -40 °C и неколико десетина паскала. Узорцима је на тај начин одузета вода, па их је лакше анализирати и окарактерисати на уређајима који захтевају одсуство воде. Наравно, гледано на полупроизвод и/или крајњи производ, олакшано је чување, складиштење, дозирање и сл. Међутим, ова техника је све распрострањенија у областима чији производи имају довољно високу цену коштања да могу покрити прилично велике трошкове производње.

Лиофилизација као техника инкапсулације је нашла примену како за живе ћелије (бактерије) које су јако осетљиве на различите спољне факторе, тако и за биоактивна једињења која су најчешће веома термолабилна. У последњих неколико година ова техника налази примену и у инкапсулацији природних пигмената попут антоцијана, беталаина, ликопена, изолованих из различитих сировина, нуспроизвода, и отпада прехранбене индустрија (Chiu et al., 2007; Cilek et al., 2012; Rodriguez et al., 2016; Tumbas Šaronjac et al., 2016).

Посебано поље примене лиофилизације је накнадно сушење инкапсулисаних активних компоненти добијених неком другом методом инкапсулације. Овде се

лиофилизација јавља након процеса инкапсулације, као финални процес дораде већ инкапсулисаног материјала (Balanč et al., 2016a).



Слика 18. Шематски приказ процеса лиофилизације
(преузето уз модификације са *gmpua.com*)

На овај начин се добијају осушени инкапсулати и са задовољавајућим карактеристикама посебно у поређењу са оним који су сушени класичним сушењем на повишеној температури (Stojanovic et al., 2012). Не би требало заборавити на чињеницу да ово додатно поскупљује потенцијални производ. Из тог разлога у овој дисертацији је лиофилизација коришћена као директна техника инкапсулације, растварањем различитих носача у екстрактима богатим антоцијанима (у претходно оптимизованим односима), замрзавањем мешавина и испаравањем растварача под вакуумом.

Леофилизација и **вакуум сушење** су врло сличне технике које дају добре резултате, али нису економичне, јер захтевају велики утрошак енергије и времена (Zuidam и Shimoni, 2010). Из ове групе техника истичу се још **спреј хлађење** и **облагање у флуидизованом слоју**, које су много ређе у употреби нарочито у

прехранбеном сектору. Овде их је од значаја поменути, јер могу представљати додатну заштиту инкапсулатима добијеним претходно поменути техникама сушења. Наиме, облагање у флуидизованом слоју је техника која се базира на третману чврстих честица, које се додатно заштићују омотачем и то најчешће липидним материјалима, али могу се користити и деривати целулозе, природне гуме и протеини. Основна предност ове технике инкапсулације се огледа у томе што се активна компонента може додатно заштити накнадним облагањем погодним омотачем, док су недостаци трајање процеса (у неким случајевима и до 20 сати) и релативно велика потрошња материјала за облагање (Zuidam и Heinrich, 2010). Спреј хлађење може бити употребљено у исте сврхе, с тим што су материјали који се могу користити и температуре њиховог топљења прилично значајан ограничавајући фактор.

Када је реч о техникама које се заснивају на хемијском третману најчешће се користе коацервација, јонотропно гелирање и полимеризације различитог типа.

Коацервација је први описан поступак микроинкапсулације и једна од првих метода која је примењена за индустријску производњу инкапсулата. Ова техника је заснована је на раздвајању раствора једног или више хидрофилних полимера на две фазе: вискозну фазу богату полимером и течну фазу која је окружује. У зависности од броја полимера који су укључени у овај процес, коацервација може бити проста и комплексна (Park и Yeo, 2007). У пракси се често користи систем арапска гума/желатин за добијање комплексних коацервата из емулзија (Zuidam и Shimoni, 2010), али и системи попут протеински изолат сурутке/карагенан (Ђорђевић et al., 2015). У прехранбеној индустрији нашла је примену за инкапсулацију етарских уља, арома, ликопена, пробиотика и др. Основни недостатак овог приступа је што је сложен и скуп, али и ограничен на једињења која нису хидрофилна (Ђорђевић et al., 2015).

Јонотропно гелирање је феномен заснован на особини појединих полимера да у контакту са неким јонима метала образују гелове. Циљ је да настали гелови буду уноформни, сферични и димензија сходних примени. Технике за инкапсулацију које су засноване на овом феномену разликују се по начину извођења, а најчешће су то укапавање раствора полимера у раствор гелирајућих јона екструзијом.

Екструзија у ширем смислу представља формирање одређеног профила, захваљујући проласку материјала кроз одговарајући облик. У пракси се на овај начин добијају тестенине и слични производи, као и храна за домаће животиње. За ово се користе екструдери који су посебно дизајнирани и опремљени за производњу различитих облика. Поред класичне екструзије, развијене су још и екструзије полимера у течном облику и формирање сферних честица применом различитих физичких сила. На овај начин се формирају честице обавијене заштитним материјалом. Поступак инкапсулације применом екструзионих техника се састоји од припреме смеше активне компоненте и омотача. Добијена смеша се даље преводи у облик капи неком од екструзионих техника (електростатичком екструзијом, вибрационом техником, техником пресецања млаза и коаксијалном техником). Једна од чешће коришћених екструзионих техника је електростатичка екструзија, једноставна, ефикасна и брза техника којом се добијају униформне честице Ова техника је нашла примену код инкапсулације микроорганизама (најчешће у калцијум-алгинатне честице) за потребе ферментације и производње пива, вина, воћних вина и етанола (Nedović et al., 2015), а такође и за инкапсулацију пробиотских култура (Manojlović et al., 2010).

Електростатичка екструзија се заснива на примени електричне силе, где је челична игла је повезана за позитивно наелектрисану электроду, док је раствор за гелирање (раствор CaCl_2) уземљен. Сферне честице са биоактивном компонентом се формирају екструзијом дисперзије кроз иглу при дејству електростатичког потенцијала од неколико киловолти. Детаљним истраживањима је утврђено да величина и униформност микрочестица зависе од више параметара, пре свега од разлике потенцијала, али и пречника игле/капиларе, растојања између електрода, протока и физичко-хемијских особина полимера (Nedović et al., 2001, 2002, 2006, 2013).

Електростатичка екструзија, као метода за инкапсулацију широко је примењивана у различитим областима биотехнологије. Генерално, примена електростатичке екструзије се може поделити на области биологије, инжењерства ткива, фармације, ферментација и инкапсулација активних хемијских супстанци (нпр. арома, екстраката биља, итд.) (Kostić et al., 2012). У комбинацији са одговарајућим

носачима, електростатичка екструзија представља јако погодну методу за инкапсулацију ћелија и ензима. Nedović и сарадници (2001) су показали да је применом електростатичке екструзије могуће добити честице калцијум алгината које пружају оптималне услове за раст ћелија квасца. Knezević и сарадници (2002) су користили електростатичку екструзију за имобилизацију липазе. Добијени имобилисани ензим је примењен за хидролизу палминог уља, са могућношћу поновне употребе ензима након реакције. У комбинацији са различитим носачима, електростатичка екструзија (и модификације ове методе) је коришћена за имобилизацију хепатоцита у комбинованом матриксу катјонских и ањонских полимера (Zhou et al., 2005), односно у калцијум алгинатни матрикс (Xie и Wang, 2007).

Електроспининг је још једна техника инкапсулације са применом електростатичког поља. Уколико се примењује високи напон долази до формирања полимерног млаза на врху игле који је привучен супротно наелектрисаним колектором. У току пута од врха игле до површине колектора долази до формирања полимерног влакна уз истовремено испаравање растварача. Овом техником се могу добити влакна нанометарских величина. Camerlo и сарадници (2013) успешно су инкапсулисали лимонен у нановлакна на бази поливинил алкохола. Исти материјал је примењен и као носач (у комбинацији са циклодекстринима) за инкапсулацију ванилина (Kaucić и Угар, 2012). Међутим, ова техника налази примену у инкапсулацији не само арома, већи и каротена, разних биоактивних једињења, чак и бифидобактерија (López-Rubio et al., 2012; Fernandez et al., 2009; Drosou et al., 2017).

2.4.2.2 Носачи за инкапсулацију

Материјали који се користе за инкапсулацију морају бити биоразградиви и да омогућавају формирање заштитног слоја између унутрашње фазе инкапсулата и окружења. Најчешће коришћени материјали за инкапсулацију у прехранбној индустрији су полисахариди као што су скроб, целулоза, њихови деривати, потом пектини, гуме, карагенан и алгинати. Уз њих, често се користе микробни и анимални

полисахариди попут декстрана, хитозана, ксантана и гелана (Nedović et al., 2013; Lević et al., 2014). Хитозан је веома примењиван материјал због могућности контролисаног отпуштања (Čaliја et al., 2011; Trifković et al., 2014). У литератури се све чешће срећу комбинације носача попут алгинат/хитозан (Trifković et al., 2012; Balanč et al., 2016b), као алгинат/поливинил-алкохол (Bezbradica et al., 2004; Lević et al., 2011). Сем природних и модификованих полисахарида, за инкапсулацију се користе и протеини и липиди. Неки од најчешће коришћених протеина су желатин, казеин и глутен. Најраспрострањенији липидни материјали су масне киселине и алкохоли, воскови, глицериди и фосфолипиди (Zuidam и Shimoni, 2010). Карнауба восак се својим карактеристикама посебно истиче као погодан носач. Досадашња испитивања су показала да је уз употребу одговарајућих техника могуће добити честице уједначених димензија и сферног облика (Milanović et al., 2011).

Како су у овој дисертацији коришћени само неки од поменутих носача они ће у даљем тексту бити детаљније описани.

Малтодекстрин је олигосахарид добијен делимичном хидролизом скроба. Поред бројних намена у прехранбеној индустрији, он је међу најчешће коришћеним носачима у процесима микроинкапсулације. Разлог томе је ниска цена, потом неутрална арома и укус (умерено слadak), али и висока растворљивост, низак вискозитет, донекле заштита од оксидације. Користе се малтодекстрин различитог декстрозног еквивалента, али и изолованог из различитих извора. С тим у вези, нарочита је предност што се на декларацијама производа са овим носачем могу истаћи тврдње попут *без глутена*, али и то што малтодекстрин нема свој Е број, који обичне потрошаче, лаике, често асоцира на нешто непожељно или нездраво. Уз све побројане предности за рад на овој дисертацији изабран је као типичан представник носача међу угљенохидратним материјалима доступан како у Србији и региону тако и широм света. У последњих неколико година објављена су истраживања на тему инкапсулације биоактивних једињења из различитих нуспроизвода где је овај материјал потврдио своје повољне карактеристике као носача (Cano-Chauca et al., 2005; Bakowska-Barczak и Kolodziejczyk, 2011; Cilek et al., 2012; Laokuldilok и Kanha, 2015, 2016).

Арапска гума (акација гума, гумиарабика, E414²) је гума која се добија из стабла акације и представља мешавину полисахарида и гликопротеина. То је често коришћен материјал у различитим областима с обзиром да се лако раствара у води и добар је стабилизатор и емулгатор. Уз то, неретко је коришћен носач, нарочито за микроинкапсулацију спреј сушењем. Иако поседује пожељне карактеристике попут високе растворљивости и ниског вискозитета, отежана набавка и цена овог материјала даје често предност другим носачима при избору оптималног носача. У многим истраживањима карактеристике арапске гуме и малтодекстрина као носача су поређени (de Souza et al., 2014, 2015). Разлике које се евентуално уочавају се најчешће објашњавају саставом односно унутрашњом структуром ових материјала, а надомешћују комбиновањем истог са другим материјалима, попут малтодекстрина или целулозе (Сапо-Чауса et al., 2005; Silva et al., 2013). За ову дисертацију с намером је изабрана и арапска гума, као представник међу биљним ексудатима употребљиваним као носачи за инкапсулацију попут гуар гуме, трагакант гуме.

Млеко у праху се добија извајањем/упаравањем воде из млека и представља мешавину протеина, лактозе, масти, и минерала. За разлику од арапске гуме, нашироко распрострањен и доступан материјал свуда у свету. У процесима инкапсулације углавном је коришћен као носач за ћелије пробиотика (Nedović et al., 2013). Овај материјал, генерално, није често коришћен носач, а нарочито за екстракте богате антоцијанима као што је случај у овој дисертацији. Оно што га издваја као потенцијалног, а ефикасног носача, пре свега код спреј сушења је висок принос активне компоненте, ефикасност, једноставност за употребу и ниска хигроскопност. Осим тога, извор је и протеина, лактозе, минерала, другим речима, доприноси нутритивном ефекту целог инкапсулата (Cervato et al., 1999; Baranauskienė et al., 2006; Hasni et al., 2011; Shamaei et al., 2017). То је био разлог више да се и овај материјал, с обзиром на другачији састав упореди са предходна два.

Наиме, сваки од горе описаних материјала би се могао дефинисати као представник одређене групе прехранбених материјала са веома разноликом

² Правилник о прехранбеним адитивима, Службени гласник РС, бр 63/2013.

функцијом и применама, па и применом у (микро)инкапсулацији биоактивних једињења. У даљем тексту биће описани носачи коришћени у предексперименталној фази дисертације.

Алгинати (Е 401) су природни линеарни полисахариди растворни у води, који се састоје од остатака β -D-мануронске (М) и α -L-гулуронске киселине (G), који су међусобно повезани 1,4-гликозидним везама. Представљају један од најшире испитиваних и коришћених биоматеријала у различитим областима. Једно од најпознатијих својстава алгината које је томе значајно допринело је формирање гелова у присуству одређених катјона. Наиме, алгинати испољавају специфичан афинитет према везивању одређених катјона и то: $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+}$. Дифузионе карактеристике алгинатних гелова тј. величина њихових пора су важан фактор када је у питању пренос материје кроз гел и стабилност инкапсулисане активне материје. Ове карактеристике гела су битне пре свега због транспорта материја код система са имобилисаним ћелијама (Nedović, 1999). У литератури постоје различити подаци за величину пора код алгинатних гелова. Генерално се може рећи да поре достижу величину до 200 nm. На величину пора утиче више фактора, а пре свега структура и концентрација алгината, као и кинетика формирања гела. У области биотехнологије, алгинатни гелови се најчешће користе у облику сферних честица различитих димензија (Nedović et al., 2001; Kalušević et al., 2012; Santos et al., 2013, Chatterjee и Bhattacharjee, 2015; Balanč et al., 2016a). У пракси се за добијање алгинатних честица користе технике које се базирају на примени спољашње силе за дисперговање алгината у облику капи које падају у раствор за гелирање где добијају коначни облик и димензије (Nedović et al., 2001). У прехранбеној технологији су присутни и као носачи активних компонената и то са многобројним применама. У истраживањима се већ деценијама користе за имобилизацију ћелија (најчешће квасаца), али и ензима (Nedović et al., 2015; Lević et al., 2016). У литератури скоријега датума су испитане потенцијалне примене алгината као носача у ферментисаним и функционалним производима (Kalušević et al., 2012; Nedović et al., 2013; Stajić et al., 2014; Kalušević et al., 2015a).

Пектини (E440) су састојци ћелијских зидова биљних ћелија са улогом везивног ткива. По хемијском саставу пектинске материје су слабокисели хетерополисахариди са основном градивном јединицом анхидроном галактуронском киселином. Оно што подразумевамо под пектином је пектининска киселина која има својство желирања и с тим разлогом је често коришћен носач, нарочито поређен са алгинатом. Ова два материјала (алгинат и пектин) су коришћена у предексперименталној фази докторске дисертације да би се испитале могућности не само њих као носача антоцијана, већ и техника попут интерне гелације, екструзије и електростатичке екструзије (Oidtmann et al., 2012; Kalušević et al., 2016a). Најчешћи извор пектина су цитруси, јабуке, дуње и сл.

Воскови су органска једињења која могу бити биљног, животињског и фосилног порекла. То су материјали који се ређе, али не без успеха користе као носачи у техникама инкапсулације базираним на очвршћавању. Наиме, нерастворљиви су у води, а тачка топљења им је најчешће од 50 до 80 °C. У предексперименталној фази ове докторске дисертације коришћени су конкретно пчелињи (E 901) и карнауба восак (E 903) (Salević et al., 2015). Пчелињи восак је нуспроизвод пчела радилица током прављења саћа. Једноставно се топи на око 62-64 °C. Карнауба восак се сматра једним од најтврђих воскова. Има изузетно високу тачку топљења, која је се обично креће око 78-86 °C (Zuidam и Shimoni, 2010.). Овај восак има веома различиту употребу у прехранбеним производима попут састојка гума за жвакање, за облагање сирева и кобасица или полирање кондиторских производа. У процесима инкапсулације, карнауба восак је коришћен као носач у комбинацији са аромама као активним компонентама. Методом дисперзије у води отопљеног воска и ароме добијене су сферне честице уз велику инкапсулациону ефикасност (Milanovic et al., 2010, 2011). Како је у овој дисертацији активна компонента за инкапсулацију термолабилна, примена овог воска није била адекватна с обзиром на време излагања температурама око 80 °C.

Сојин протеински изолат као биљни изолат спада у категорију носача биљног порекла, а настаје прерадом неоштећеног зрна соје коме се одстрањују семењача, уље, разне непротенске компоненте, те садржи и преко 90% протеина.

Сојин изолат је нашао примену у процесима инкапсулације етарских уља процесом коацервације (Jun-xia et al., 2011). Користи се не само као носач у разним емулгодисперзионим техникама, већ и за побољшање текстуре нарочито месних производа и кондиторских производа, задржавање влаге, а и као емулгатор (Hu et al., 2013, Tumbas Šaronjac et al., 2016).

Као што се може закључити првенствена замисао је била да сем активних компоненти и носачи буду споредни продукти или изолати из отпада током прераде воћа, соје или меда. Међутим, добијени резултати, иако интересантни са научног аспекта, нису имали економску оправданост, која је у прехранбеној индустрији често најбитнија. Наиме, сви добијени инкапсулати добијени помоћу ових носача или нису показали довољну ефикасност, односно имали су губитке активне компоненте при самом процесу производње, или је након инкапсулације био неопходан и процес сушења не би ли инкапсулате учинили стабилним на дужи период што би додатно подигло цену производње, а смањило шансе за ширу примену.

2.4.3 Инкапсулација биоактивних једињења споредних производа прехранбене индустрије

Многе од описаних техника и носача инкапсулације успешно су примењене у циљу заштите и дужег очувања биоактивних својстава појединих једињења изолованих из споредних производа прехранбене индустрије (Aizpurua-Olaizola et al., 2016). Преглед дат у табели 4 односи се на споредне производе, изворе искључиво природних пигмената, употребљене носаче као и технике за њихову инкапсулацију.

Према годинама из које датирају литературни подаци у табели 4 може се закључити да је у питању веома актуелна тема присутна углавном последњих неколико година. Иако се деценијама у назад истражују различите могућности за искоришћење отпада и споредних производа, за екстракцију, изолацију и карактеризацију појединих једињења, тек у последњој се улажу напори да се таква једињења инкапсулишу ради даље примене. Као примери и докази успешне примене таквих (микро)инкапсулата су додатак истих у чоколаде (Gültekin-Özgüven et al., 2016), безалкохолна пића (Burin et al., 2011), кексева (Tumbas Šaropjac et al., 2016), желе “кристале” (Chatterjee и Bhattacharjee, 2015), јогурте (Martins et al., 2014) итд. Међутим, овакви инкапсулати не налазе примену искључиво у прехранбеним производима, већ и у пољопривредним, козметичким и фармацеутским (нпр заштита коже, ...) (Kumar et al., 2014; Pal et al., 2016).

Табела 4. Преглед примера инкапсулације природних пигмената из споредних производа и отпада

Извор	Активна компонента	Носач	Техника инкапсулације	Литература
Комина боровнице	Антоцијани	Протеини сурутке Бели сирак Пектин Шелак	Спреј сушење Екструзија Емулзификација/ гелирање	Khanal et al., 2009. Oidtmann et al., 2012. Kropat et al., 2013. Flores et al., 2014a.
Комина вишње	Антоцијани	Протеини сурутке Протеини соје Малтодекстрин/арапска гума	Лиофилизација	Tumbas Šaponjac et al., 2016. Cilek et al., 2012.
Комина црне рибизле	Антоцијани	Малтодекстрин Инулин	Спреј сушење	Bakowska-Barczak и Kolodziejczyk, 2011.
<i>Pastazzo</i> (мешавина коре, пулпе, и семена слатке наранџе)	Антоцијани	Целулоза	Спреј сушење	Lauro et al., 2015.
Покожица бразилског “грожђа” (<i>M. cauliflora</i>)	Антоцијани	Алгинат Полиетилен гликол	Гелирање Брза експанзија	Santos et al., 2013.
Плави патлиџан	Антоцијани	Алгинат	Гелирање	Chatterjee и Bhattacharjee, 2015.
Комина грожђа/ Покожица грожђа	Антоцијани	Малтодекстрин Арапска гума Циклодекстрини Сунцокретово уље, Палмино уље	Спреј сушење Емулзификација	Burin et al., 2011. Sessa et al., 2012. Spigno et al., 2013. de Souza et al., 2014, 2015.
Комина дуда	Антоцијани	Малтодекстрин	Спреј сушење	Gültekin-Özgüven

		Хитозан		et al., 2016.
Семењача црне соје	Антоцијани	Карнауба восак	Очвршћавање	Salević et al., 2015.
Семењача црне соје	Антоцијани	Алгинат Пектин	Интерно гелирање	Kalušević et al., 2016a.
Мекиње црног пиринча	Антоцијани	Малтодекстрин	Спреј сушење Лиофилизација	Laokuldilok и Kanha, 2015, 2016.
Семењача црног пасуља	Антоцијани	β -циклодекстрин	Комплексна инклузија	Aguilera et al., 2016.
Споредни производи прераде шампа	Астаксантин	Желатин/гума индијског ораха	Коацервација	Gomez-Estaca et al., 2016.
Кора црвене питаје (змајево воће)	Беталаини	Малтодекстрин/пектин Малтодекстрин/арапска гума	Лиофилизација	Rodríguez et al., 2016.
Цвекла и цвет <i>Lampranthus productus</i>	Мираксантин (бетаксантин) и бетанидин (бетацијанин)	Малтодекстрин и хитозан	Спреј сушење	Gandía-Herrero et al., 2013.
Алга <i>H. pluvialis</i>	Олеорезин и астаксантин	Модификован скроб	Спреј сушење	Bustamante et al., 2016.
Кора и епидерм индијске смокве (“свекрвин језик”)	Индиксантин	Малтодекстрин	Спреј сушење	Gandía-Herero et al., 2010.
Комина парадајза	Ликопен	Желатин Сукроза	Спреј сушење Лиофилизација	Chiu et al., 2007. Ranveer et al., 2015.
Комина грожђа	Полифенолна једињења	Малтодекстрин/арапска гума	Спреј сушење	Tolun et al., 2016.
Цвет купине	Полифенолна једињења	Алгинат	Атомизација/ коагулација	Martins et al., 2014.

3. НАУЧНИ ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ истраживања ове дисертације била је оптимизација услова екстракције и микроинкапсулације биоактивних једињења из споредних производа прехранбене индустрије у сврху њиховог искоришћења и стабилизације. Као примери споредних производа у овом истраживању коришћени су покожице црних сорти грожђа и семењача црне соје који су извори биоактивних једињења, нарочито антоцијана. Наиме, највећи део садржаја антоцијана у црним сортама грожђа сконцентрисан је у покожици бобице, док је у црној соји то у семењачи. Ови делови плодова се најчешће одбацују приликом прераде ове воћарско-виноградарске, односно ратарске културе.

Стога је један од задатака био испитивање утицаја различитих параметара на ефикасност екстракције биоактивних једињења из поменутих споредних производа. Испитиван је утицај растварача, ултразвучних таласа, удела појединих фаза, додатка киселина и ензима, као и време трајања екстракције на њену ефикасност. Након процеса оптимизације, била је неопходна хемијска карактеризација екстраката, нарочито са аспекта одређених једињења који највише доприносе боји и антиоксидативним својствима екстраката.

Када је микроинкапсулација екстраката биоактивних једињења у питању, од кључног значаја било је упоредити карактеристике микроинкапсулата добијених од екстраката из поменутих сировина, а помоћу носача различитог састава, биљног и животињског порекла (малтодекстрина, арапске гуме, млека у праху) и техника (спреј сушење, лиофилизација). Између осталих карактеристика, пожељно је било постићи уједначену величину и облик микроинкапсулата, као и њихову стабилност. Стога су поједини задаци били дефинисање њихових физичких карактеристика као прахова, хемијских интеракција између носача и активне компоненте, утицаја носача на садржај појединих биоактивних једињења и антиоксидативни капацитет микроинкапсулата, стабилност боје, као и на брзину отпуштања антоцијана из микроинкапсулата у различитим медијумима и њихову антимикробну активност.

Још један од циљева овог рада био је да микроинкапсулисани екстракти биоактивних једињења који су изузетно богати антоцијанима буду примењени и као природна боја за одређене прехранбене производе и потом сензорно оцењени. Уносом микроинкапсулисаних екстраката биоактивних једињења одабраним производима сем промене боје остварује се и повећање биолошке вредности и функционалности у односу на стандардне комерцијалне производе.

Генерално, циљ овог рада је био да се испита могућност искоришћења екстракта биоактивних једињења из споредних производа на примерима црних сорти грожђа и црне соје, уграђених у различите врсте микроинкапсулата и на основу добијених резултата да предлог за њихову употребу као функционалних додатака у прехранбеним производима.

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

4.1 Материјали

4.1.1 Хемикалије

Хемикалије употребљене у експерименталном раду биле су аналитичке чистоће или *HPLC* чистоће у случају стандарда. Амонијум-хидроксид, сирћетна киселина, хлороводонична киселина концентрована, метанол су набављени од „Зорка“ (Шабац, Србија). Гвожђе-(III)-хлорид-6-хидрат, лимунска киселина натријум-ацетат, натријум-карбонат, натријум-дихидрогенфосфат, ди-натријум-хидрогенфосфат, алуминијум-хлорид, натријум-нитрит су набављени од Центрохем (Београд, Србија). Етанол је набављен од Врење-шпиритане д.о.о (Београд, Србија). *Müller Hinton* бујон/агар и агар-агар су набављени од Himedia (Мумбај, Индија), док је триптон соја бујон/агар набављен од фирме *Oxoid* (Хемпшир, Велика Британија). 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (*DPPH*), 1М раствор хлороводоничне киселине, (±)-6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина (*Trolox*), 2,4,6-три-2-пиридил-*s*-триазин (*TPTZ*), 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) ди-амонијумова со, калијум-персулфат, 1М натријум-хидроксид, цијанидин-3-*O*-глукозид, пеларгонидин-3-*O*-глукозид, петунидин-3-*O*-глукозид, малвидин-3-*O*-глукозид, делфинидин-3-*O*-глукозид и цијанидин-3,5-диглукозид *HPLC* степена чистоће су набављени од *Sigma-Aldrich* (Штајнхајм, Немачка). Ацетонитрил и метанол *HPLC* степена чистоће су набављени од *J.T. Baker* (Њу Џерзи, САД). *Folin-Ciocalteu* реагенс, гална киселина су набављени од *Merck* (Дармштат, Немачка). Пектолитички ензими (рапидаза) су набављени од произвођача ензима *Lallzyme HC Lallemand* (Монтреал, Канада), док је целулаза набављена од *Sigma-Aldrich* (Токио, Јапан).

4.1.2 Сировине

Као основне сировине за производњу екстракта и микроинкапсулата коришћене су покожица грожђа и семењача соје. Грожђе сорти прокупац, *cabernet sauvignon* и *pinot noir* добијено је од огледног добра Пољопривредног факултета „Радмиловац“ (Београд, Србија) и винарије „Чокот“ (Александровац, Србија) берба 2014. и 2015. године. Соја сорте *black tokio* добијена је од Института за кукуруз Земун Поље (Земун Поље, Србија). Малтодекстрин, декстрозног еквивалента 16 - 19,9 је произвођача Cargill дониран је од фирме Palco (Шабац, Србија). Арапска гума је набављена од *Himedia* (Мумбај, Индија), а млеко у праху је било уступљено од стране Суботичке млекаре (Суботица, Србија). Овсена каша је производ са тржишта произвођача Оргон (Београд, Србија), а јогурт производ млекаре Границе (Младеновац, Србија).

4.2 Методе

4.2.1 Екстракција фенолних једињења

4.2.1.1 Екстракција фенолних једињења из покожице грожђа

Уситњена покожица грожђа је екстрахована растварачима водом и етанолно-воденим растворима различите концентрације (0 до 70% V/V етанола) у различитим односима чврсте и течне фазе (1:1 до 1:40) ради испитивања оптималних услова екстракције. Из истих разлога испитиван је ефекат ултразвука различите јачине (40 и 59 kHz) за шта је коришћено ултразвучно купатило *FALC* и *Elma* (Зинген, Немачка). Мешање током екстракције је вршено на мешалици (шејкеру GFL 3005) 100 обр/минут (Штајнфурт, Немачка). При испитивању ефикасности екстракције, испитиван је додатак пектолитичких ензима (мешавина полигалактуроназе, пектин

естеразе и пектин лиазе), сирћетне и лимунске киселине, као и време неопходно за максималну екстракцију.

4.2.1.2 Екстракција фенолних једињења из семењаче соје

Самлевена сојина семењача екстрахована је различитим растварачима водом и етанолом различите концентрације (0 до 70% V/V) у различитим односима чврсте и течне фазе (1:1 до 1:40) ради испитивања оптималних услова екстракције. Мешање током екстракције је вршено на 100 обр/минут. Као и код покожице грожђа, испитиван је ефекат ултразвука различите јачине (40 и 59 kHz), додатак ензима целулазе, сирћетне и лимунске киселине.

4.2.2 Микроинкапсулација екстракта фенолних једињења

За микроинкапсулацију спреј сушењем и лиофилизацијом коришћени су екстракти фенолних једињења из покожице грожђа и семењаче црне соје, добијени екстракцијом са 70% V/V етанолом, као и екстракцијом са закишељеним 70% V/V етанолом (додатак 1% m/V лимунске киселине), уз примену ултразвучних таласа јачине 40 kHz. Екстракти су упаравани на вакуум упаривачу Електромедицина (Љубљана, Словенија) на 45 °C у циљу отклањања етанола. Запремина упареног етанола надокнађена је дестилованом водом. Процесу микроинкапсулације је предходило мешање воденог екстракта биоактивних једињења са носачем (у односу 5 mg CGE/g) у трајању од 10 минута у циљу постизања хомогенизације, односно потпуног растварања носача у екстракту.

4.2.2.1 Микроинкапсулација спреј сушењем

За спреј сушење свих наведених узорака коришћен је спреј сушач *Büchi mini B-290* (Флавил, Швајцарска) (слика 19). Овај уређај опремљен је нозлом за распршивање пречника 0,7 mm. Улазна температура била је 140 °C, а излазна 65 ± 2

°C. Остали параметри су били следећи - проток ваздуха 600 L/h, проток течности 8 mL/min и притисак атомизације 0,55 bar.



Слика 19. Спреј сушач *Büchi mini B-290*

4.2.2.2 Микроинкапсулација лиофилизацијом

За лиофилизацију свих узорака коришћен је лабораторијски *freeze dryer* или лиофилизатор *TelStar LyoAlfa 10* (Филаделфија, САД). Овај уређај опремљен је комором са загревним/расхладним плочама пречника 30 cm и површине 0,28 m² (слика 20). Полазна температура узорака је била -80 ± 2 °C, постигнута у уређају за дубоко замрзавање. Остали параметри лиофилизације су подешавани мануелно (притисак, температура (до 25°C) и време (до 24 h)).



Слика 20. Лиофилизатор *TelStar LyoAlfa*

При достизању програмиране температуре у кондензатору, узорци су постављени на полице. Моменат изједначавања температуре узорка и температуре грејања је био индикатор да нема преосталог леда за сублимацију, те је узорак сув, односно процес лиофилизације је завршен.

4.2.3. Примена микроинкапсулата

Како би се испитао потенцијал добијених микроинкапсулата као вишенаменски додаток у прехранбеној индустрији, али пре свега као извор природних боја, одабрано је неколико прехранбених производа којима су додати узорци микроинкапсулата (4.2.3.1а и б). Да би се испитао други вид примене (као део “паметне” амбалаже), формирану су прехранбени филмови (филмови за паковање и амбалажу прехранбених производа) са микроинкапсулатима (4.2.3.2).

4.2.3.1. Примена микроинкапсулата у прехранбеним производима

4.2.3.1.а Примена микроинкапсулата у овсеним кашама

Микроинкапсулати су додати овсеној каше са тржишта у концентрацији 25 mg/g. Након тога је додата вода температуре 60 °C, и узорак је промешан и непосредно након тога анализиран.

4.2.3.1.б Примена микроинкапсулата у јогуртима

Микроинкапсулати су додати јогурту са 1% *m/m* млечне масти узетог тржишта у концентрацији 10 mg/g. Температура јогурта је била око 5 °C, хомогенизован је са микроинкапсулатима, и непосредно након тога анализиран.

Наведени узорци (из дела 4.2.3.1а и б) са и без додатака микроинкапсулата су били подвргнути сензорној анализи.

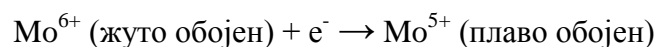
4.2.3.2 Примена микроинкапсулата у производњи прехранбених филмова

Припреме раствора агар-агара (2% *m/m*) је подразумевала загревање до кључања и хлађење до 60 °C. Микроинкапсулати су додати таквом раствору агар-агара у концентрацији 2,5 mg/g, након чега је топла смеша за филмове разливена у петри шоље и сушена на 35 °C током 12 часова. Формирани филмови су испитани у различитим медијумима (пуферима) на утицај различитих рН, чија промена је најчешће последица кварења прехранбеног производа (услед ферментације, протеолизе и сл).

4.2.4. Физичко-хемијска карактеризација екстраката и микроинкапсулата

4.2.4.1 Одређивање садржаја укупних фенолних једињења

Садржај укупних фенолних једињења одређен је методом по *Folin-Ciocalteu*. Тачна хемијска природа *Folin-Ciocalteu*-овог реагенса није потпуно позната, али је прихваћено да садржи комплекс фосфоволфрамове/фосфомолибденске киселине (Singleton et al., 1999). Метода се заснива на трансферу електрона у алкалној средини са фенолних и других редукујућих једињења на молибден, при чему се формира плави комплекс, чија се апсорбанца мери спектрофотометријски на 760 nm (Folin и Ciocalteu, 1927).



Реагенси:

1. Раствор Na_2CO_3 , 75 g/L
2. Раствор галне киселине, 0,1 g/L.
3. Реагенс по *Folin-Ciocalteu*: радни раствор је добијан тако што је *Folin-Ciocalteu* реагенс разблажен је десет пута дестилованом водом. Такав раствор је неопходно чувати на тамном месту или у тамном суду.

Поступак:

Узорак за анализу је представљао екстракт биоактивних једињења разблажен дестилованом водом или етанолом (у зависности од употребљеног растварача за екстракцију, као и садржаја фенолних једињења), као и микроинкапсулат растворен у дестилованој води. 0,25 mL узорка додато је 1,25 mL реагенса по *Folin-Ciocalteu*. Реакциона смеша је добро промешана и остављена на тамном месту 6 минута. Након тога, смеси је додат 1 mL раствора Na_2CO_3 , а после хомогенизације добијена реакциона смеша је остављена на инкубацију 2 часа на собној температури и на

тамном месту (Singleton и Rossi, 1965). Апсорбанца је мерена на 760 nm на спектрофотометру *HALO-DB/2S Dynamica* (Дитикон, Швајцарска). Упоредо је припремана и слепа проба, код које је узорак био замењен дестилованом водом. Концентрација фенолних једињења је очитавана са калибрационе криве стандардног раствора галне киселине (прилог I, слика 1), а резултати су изражени у еквивалентима галне киселине (mg GAE/L и mg GAE/g_{см} за екстракте и mg GAE/g за микроинкапсулате).

4.2.4.2 Одређивање садржаја укупних мономерних антоцијана

Садржај укупних мономерних антоцијана одређиван је рН диференцијалном методом која се заснива на структурној трансформацији антоцијана при промени рН вредности средине (Lee et al., 2005). Важно је нагласити да мономерни антоцијани подлежу реверзибилној структурној трансформацији у функцији рН, при чему се при рН = 1 налазе у облику интензивно обојеног флавилијум катјона, а при рН = 4,5 прелазе у безбојни хемикетални облик. Садржај антоцијана се одређује мерењем промене у апсорбанце при две различите рН вредности (рН = 1 и рН = 4,5), при чему је разлика апсорбанци пигмента на таласној дужини од 520 nm пропорционална концентрацији пигмента. Антоцијани у полимерном облику не подлежу промени боје при промени рН вредности, тако да се њихов садржај овом методом не може одредити.

Реагенси:

1. Пуфер рН = 1,0 (калијум-хлорид, 0,025M)
2. Пуфер рН = 4,5 (натријум-ацетат, 0,4M)

Поступак:

Узорци за анализу су припремани по процедури описаној у делу 4.2.4.1. Одговарајући фактор разблажења одређен је разблаживањем узорка са пуфером рН = 1 и мерењем његове апсорбанце на таласној дужини од 520 nm. Узорак је

разблаживан све док његова апсорбанца није била у линеарном опсегу спектрофотометра (0,1 - 1,0 AU). Користећи добијени фактор разблажења за сваки узорак су припремљена два раствора: један са пуфером рН = 1 и други са пуфером рН = 4,5. Запремина узорка не сме прећи 20% V/V у укупној запремини раствора како се не би превазишао капацитет пуфера. Апсорбанца добијених раствора са пуферима рН = 1 и рН = 4,5 мерена је на две таласне дужине: 520 и 700 nm. Апсорбанца на 700 nm је мерена ради корекције грешке која се јавља због евентуалног стварања пене у реакцији са узорком. Концентрација мономерних антоцијана је изражена у цијанидин-3-глукозид еквивалентима (CGE) (и то у mg CGE/L и mg CGE/g_{см} за екстракте и mg CGE/g за микроинкапсулате) према следећој формули:

$$\text{Антоцијани (цијанидин - 3 - глукозид еквиваленти)} = \frac{A \times M \times DF \times 10^3}{\varepsilon \times l}$$

$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}=1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}=4,5}$; M – моларна маса (за цијанидин-3-глукозид је 449,2 g/mol); DF – фактор разблажења; l – дужина кивете; ε – моларни екстинкциони коефицијент (за цијанидин-3-глукозид 26900 L \times mol⁻¹ \times cm⁻¹).

4.2.4.3 Одређивање антиоксидативног капацитета

Антиоксидативна активност узорака је одређивана помоћу пет метода, од којих се четири методе базирају на реакцијама где долази до трансфера електрона и спадају у спектрофотометријске, док је једна метода електрохемијска поларографска. Разлог за употребу више метода за одређивање антиоксидативног капацитета је селективност различитих реагенса, односно радикала према различитим антиоксидансима. Узорци за анализу су припремани по процедури описаној у делу 4.2.4.1.

1. *QUENCHER* (*QU*ick, *E*asy, *N*ew, *CHE*ap, *R*epr*o*ducible) метода
2. *ABTS* (2,2'-азинобис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) метода

3. *DPPH* (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) метода
4. *FRAP* (*Ferris reducing ability of plasma*) метода
5. *HPMC* (*HydroxoPerhydroxoMercury(II) Complex*) метода

4.2.4.3а Одређивање антиоксидативног капацитета *QUENCHER* методом

Мерење укупног антиоксидативног капацитета микроинкапсулата је извршено по директној или *QUENCHER* методи описаној од стране Serpen и сар. (2008) и Žilić и сар. (2013) коришћењем *ABTS*^{*+} (2,2'-азинобис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)) реагенса уз мање модификације. Због природе ове методе и превасходне намене, ова метода није примењивана на течне узорке.

Реагенси:

1. 7 mM раствор *ABTS*
2. 2,45 mM раствор $K_2S_2O_8$
3. Основни *ABTS*^{*+} раствор: помешане су једнаке запремине 7 mM *ABTS* и 2,45 mM $K_2S_2O_8$ да би се добио стабилни основни *ABTS*^{*+} раствор. Добијени плаво-зелени раствор остављен је на тамном месту на собној температури 12-16 часова пре употребе.
4. Радни *ABTS*^{*+} раствор: основни *ABTS*^{*+} раствор је разблажен (приближно 1/80) 50% V/V етанолом, док се на таласној дужини од 734 nm није добила апсорбанца од $0,70 \pm 0,02$ AU.
5. *Trolox*

У узорак у праху (10 mg) додато је 20 mL радног раствора *ABTS*^{*+}-а, након чега је смеша интезивно мешана током 25 минута. Након центрифугирања на 10.000 обр/мин у трајању од 5 минута, очитана је вредност апсорбанце супернатанта на 734 nm. Укупан антиоксидативни капацитет сваког узорка је одређен помоћу калибрационе криве конструисане за стандард *Trolox*-а (прилог I, слика 2). Антиоксидативни капацитет представљен је као еквивалент антиоксидативног

капацитета *Trolox*-а (ТЕ) и изражен у микромолима стандарда по граму микроинкапсулата ($\mu\text{mol TE/g}$). Ова метода није примењивана на течне узорке.

4.2.4.36 Одређивање антиоксидативног капацитета *ABTS* методом

ABTS метода је заснована на способности молекула антиоксиданаса да редукују стабилни $ABTS^{*+}$ (2,2'-азинобис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)) радикал. Плаво-зелени катјонски $ABTS^{*+}$ радикал се добија реакцијом између *ABTS* и калијум-персулфата ($K_2S_2O_8$) и показује апсорпционе максимуме на 645 nm, 734nm и 815 nm. Додатком антиоксиданаса, радикал се редукује, при чему долази до деколоризације, која је пропорционална концентрацији антиоксиданаса и трајању реакције (Re et al., 1999).

Реагенси:

1. 5 mM фосфатни пуфер (pH 7,4)
2. 14 mM раствор *ABTS* у 5 mM фосфатном пуферу.
3. 4,9 mM $K_2S_2O_8$ у 5 mM фосфатном пуферу.
4. Основни $ABTS^{*+}$ раствор: помешане су једнаке запремине 14 mM *ABTS* и 4,9 mM $K_2S_2O_8$ да би се добио стабилни основни $ABTS^{*+}$ раствор. Добијени плаво-зелени раствор остављен је на тамном месту на собној температури 12-16 часова пре употребе.
5. Радни $ABTS^{*+}$ раствор: основни $ABTS^{*+}$ раствор је разблажен (приближно 1/80) 5 mM фосфатним пуфером, док се на таласној дужини од 734 nm није добила апсорбанца од $0,70 \pm 0,02$ AU.
6. *Trolox*

Поступак:

У епрувету са 30 μL узорка адекватног разблажења додато је 3 mL радног $ABTS^{*+}$ раствора, а након мешања и инкубирања у трајању од 6 минута апсорбанца је

мерена на 734 nm. За слепу пробу је коришћен 5 mM фосфатни пуфер. Инхибиција $ABTS^{*+}$ радикала након 6 минута је израчуната употребом формуле:

$$I(\%) = \frac{A_c - A_{уз}}{A_c} \times 100$$

I – проценат инхибиције $ABTS^{*+}$ радикала; A_c – апсорбанца слепе пробе; $A_{уз}$ – апсорбанца анализе

Као стандард је коришћен раствор Trolox-a у 5 mM фосфатном пуферу (стандардна крива је дата у прилогу I, слика 3). Антиоксидативни капацитет представљен је као еквивалент антиоксидативног капацитета Trolox-a (TE) и изражен је у микромолима стандарда по граму узорка ($\mu\text{mol TE/g}$).

4.2.4.3в Одређивање антиоксидативног капацитета *DPPH* методом

Молекул 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (*DPPH*) је љубичасто обојени стабилни слободни радикал са делокализованим слободним електроном и са максимумом апсорпције на 515 nm. Реакцијом са антиоксидансима (редукујућим једињењима), тамно љубичасти слободни радикал прелази у бледо жути хидразин. Редукујућа способност антиоксиданаса према *DPPH* радикалу се мери електрон спин резонанцом или спектрофотометријски, праћењем смањења апсорбанце до постизања стабилне вредности на таласној дужини од 515-528 nm (Huang et al., 2005).

Реагенси:

1. 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил
2. Етанол (96% V/V)
3. 0,1 M ацетатни пуфер (pH 4,3)
4. Trolox

Поступак:

У раду је коришћена метода коју су описали Brand-Williams и сарадници (1995). Радни DPPH раствор направљен је мешањем раствора DPPH у етанолу концентрације $1,86 \times 10^{-4}$ mol/L са 0,1 М раствором ацетатног пуфера у односу 2:1 (V/V). У 0,2 mL узорка додато је 2,8 mL радног раствора DPPH, након чега је реакциона мешавина добро промешана и остављена у мраку 40 минута. Апсорбанца је мерена на таласној дужини од 525 nm на собној температури. За слепу пробу коришћен је етанол.

Као стандард за мерење антирадикалске активности коришћен је раствор Trolox-a, концентрације од 0,1 до 1 mM. Конструисан је дијаграм зависности процента инхибиције DPPH радикала у функцији концентрације раствора Trolox-a, чиме је добијена линеарна стандардна крива са које су читавани резултати (прилог I, слика 4).

$$I (\%) = \frac{A_c - A_{уз}}{A_c} \times 100$$

I – проценат инхибиције DPPH радикала; A_c – апсорбанца слепе пробе; $A_{уз}$ – апсорбанца анализе

Антиоксидативни капацитет представљен је као еквивалент антиоксидативног капацитета Trolox-a (TE) и изражен је у микромолима стандарда по граму узорка ($\mu\text{mol TE/g}$).

4.2.4.3г Одређивање антиоксидативног капацитета FRAP методом

FRAP метода се заснива на редукцији жутог фери-трипиридилтриазин комплекса ($Fe(III)$ -TPTZ) при ниској рН вредности (рН 3,6) и под утицајем електрон-донирајућих антиоксиданаса у интензивно плаво обојени феро комплекс ($Fe(II)$ -TPTZ), са апсорпционим максимумом на 593 nm. Вредност апсорбанце је линеарно пропорционална концентрацији антиоксиданаса у раствору, а за конструкцију стандардне криве најчешће се употребљавају раствори аскорбинске киселине, Trolox-a и $FeSO_4$. Реакција између фенолних једињења и $Fe(III)$ -TPTZ није специфична, и

свака полуреакција која при датим реакционим условима има мање позитиван редокс потенцијал од $Fe(III)/Fe(II)$ - $TPTZ$ полуреакције ($E_0 < 0,70$ V) може изазвати редукцију $Fe(III)$ - $TPTZ$ комплекса (Benzie и Strain, 1996).

Реагенси:

1. 40 mM раствор HCl
2. 10 mM раствор 2,4,6-трипиридил-s-триазина ($TPTZ$) у 40 mM HCl
3. 20 mM $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ у дестилованој води
4. 300 mM ацетатни пуфер, pH 3,60
5. $FRAP$ реагенс: помешан је ацетатни пуфер, $TPTZ$ и $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ раствор у запреминском односу 10:1:1, респективно.
6. *Trolox*

Поступак:

Пре анализе сви реагенси су инкубирани на 37 °C. У 0,4 mL узорка одговарајућег разблажења додато је 3 mL $FRAP$ реагенса, након чега су кивете инкубиране на 37 °C. Апсорбанца је читавана након 45 минута на 593 nm. За слепу пробу коришћена је вода или етанол. Као стандард коришћен је раствор *Trolox*-а концентрације од 0,2 до 0,8 mM. Антиоксидативна активност је читавана са калибрационе криве стандардног раствора *Trolox*-а (TE) (прилог I, слика 5), а резултати су изражавани у микромолима стандарда по граму испитиваног узорка ($\mu\text{mol TE/g}$).

4.2.4.3д Електрохемијско одређивање антиоксидативности $HPMC$ методом

За одређивање антиоксидативне активности примењена је и поларографска метода, заснована на класичној, DC поларографији једносмерне струје са капљућом живином електродом (КЖЕ) - $HPMC$ (*HydroxoPerhydroxoMercury(II) Complex*) метода (Gorjanović et al., 2013).

Ова мерења обављана су поларографским уређајем *PAR (Princeton Applied Research) 174A* са прикљученим *X-Y* писачем (*Houston Instruments, Omnigraphic 2000*) за аутоматско бележење поларографских *i-E* кривих. Засићена каломелова електрода је коришћена као референтна, а као помоћна служила је платинска електрода. Почетни потенцијал био је 0,10 V. Брзина промене напона поларизације износила је 10 mV/s.

Реагенси:

1. *ClarkLubs (CL)* пуфер: pH 9,8 (25 mL 0,4 M H_3BO_3 , 25 mL 0,4 M KCl и 40,8 mL 0,2 M NaOH)
2. Основни раствор за *HPMC*: 0,100 mL 1,00 M раствора H_2O_2 и 19,9 mL CL пуфера.

Поступак:

HPMC: Једнаке запремине од по 20 μ L разблаженог узорка (1:9) су постепено додаване, како би се добио линеаран пад анодне граничне струје.

Пре сваког снимања *i-E* кривих (како за основни раствор, тако и након сваког додатка испитиваног узорка), раствор је деаерисан и промешан азотом високе чиштоће, док је струја истог пропуштана изнад раствора за време снимања *i-E* кривих. Резултати поларографских метода су изражени као нагиб линеарног дела криве зависности процента смањења анодне струје комплекса, од запремине или масе додатог узорка, прецизније %/mL за екстракте биоактивних једињењ и %/mg за микроинкапсулате тих екстраката.

4.2.4.4 Одређивање садржаја антоцијана *HPLC* методом

Квантификација фенолних једињења је обављена течном хроматографијом високе резулације (*High Performance Liquid Chromatography – HPLC*) методом са применом стандарда. Као стандарди коришћена су следећа једињења: Цијанидин-3-*O*-глукозид (Cy-3-Glu), пеларгонидин-3-*O*-глукозид (Pg-3-Glu), петунидин-3-*O*-

глукозид (Pt-3-Glu), малвидин-3-*O*-глукозид (Mal-3-Glu), делфинидин-3-*O*-глукозид (De-3-Glu) и цијанидин-3,5-диглукозид (Cy-3,5-diGlu). Раствори стандарда припремани су са метанолом и хлороводоничном киселином (85:15) у следећим концентрацијама: 5, 10, 25, 50 и 100 mg/L. Сви раствори стандарда су филтрирани кроз филтер са величинама пора од 0,45 μm пре директног инјектовања на колону.

Припрема узорка: Водени раствор сваког микроинкапсулата (150 mg/mL) помешан је са закишељеним метанолом 1 М HCl (85:15, V/V) у запреминском односу 1:1. Након центрифугирања на 10000 обртаја током 3 минута, супернатант је одвојен и филтриран на најлонском филтеру са порама 0.45 μm . Након тога узорак је био спреман за инјектовање и хроматографску анализу.

Услови хроматографисања Садржаји појединих антоцијана су одређивани употребом течног хроматографа ThermoScientific UltiMate 3000 (Илиноис, САД) опремљеног са UV и DAD детектором, а раздвајање једињења је вршено са колоном Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ C18 (4,6 \times 150 mm, 3 μm). Систем растварача је имао константан проток од 0,7 mL/min. Мобилна фаза је била дестилована вода са 1 % мравље киселине (растварач А) и ацетонитрил са 1% мравље киселине (растварач Б). Коришћен је следећи градијент: 0 min, 10% Б; 30 min, 30% Б; 35 min, 100% Б; 38 min, 100% Б; 40 min, 10% Б; 45 min, 10% Б. Инјекциона запремина је била 10 μL , а температура је одржавана константном на 25 $^{\circ}\text{C}$. Таласна дужина детекције је бирања на основу апсорпционог максимума анализираних једињења: 520 nm.

Идентификовани пикови антоцијана су потврђени и квантификовани помоћу хроматографског софтвера *Thermo Scientific Dionex Chromeleon 7.2.*, а резултати су изражени у милиграмима по литру екстракта (mg/L) или микрограмима по граму микроинкапсулата ($\mu\text{g/g}$).

4.2.4.5 Одређивање макроелемената и елемената у траговима

Припрема узорка (екстракта) за анализу помоћу *ICP-MS*-а је подразумевала предигестију односно додатак H_2O_2 екстрактима биоактивних једињења и деловање током 1 часа. Потом је узорцима додата азотна киселина. Дигестија је вршена у

микроталасној пећи *MARS* (Даблин, Ирска) и то у два корака, од 20 и 15 минута, оба при снази од 1200 W. Након тога узорци су филтрирани. Припрема узорака за саму анализу подразумевала је разблажење и то 1:4 за ретке земљишне елементе и 1:10 за елементе у траговима.

Анализе су вршене на уређају *Perkin Elmer SCIEX* (Онтарио, Канада) модел серије 9000. Калибрациони стандарди су припремљени у 1% V/V азотној киселини. Германијум је коришћен као стандард за елементе у траговима и то у концентрацијама 50×10^{-9} g/L.

Оперативни услови су били следећи: проток гаса 0,75 L/min, снага *ICP RFa* 950 W, напон објектива 7 V, напон пулсне фазне 950 V. Слепе пробе су припремљене по истој процедури као и сами узорци (Drivelos et al., 2016).

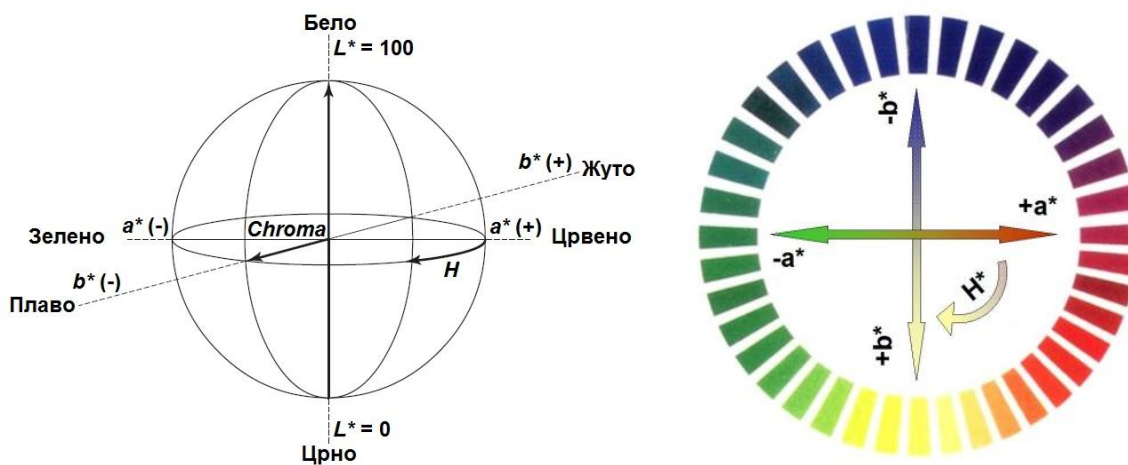
По описаној процедури екстракти биоактивних једињења покожице грожђа и семењаче соје су анализирани и на садржај макроелемената (Ca, K, P, Na, Mg).

4.2.4.6 Одређивање боје узорака

Боја узорака одређивана је мерењем помоћу ручног хромаметра тип CR-400 произвођача *Konica Minolta* (Токио, Јапан) (слика 21). Параметри боје очитавани су помоћу извора светлости D₆₅ (која се стандардно користи и представља дневну светлост са корекцијом UV зрака), и угла посматрања 2°. Боја екстраката измерена је у стакленој кивети са дужином пута светлости од 10 mm (CM-A98), монтираној на носач за мерење боје течних узорака (CR-A505). Боја микроинкапсулата као и основних сировина (носача, покожице и семењаче) мерена је коришћењем наставка за гранулиране материјале (CR-A50).

Слика 21. Хромаметар (модел *Konica Minolta CR-400*)

Резултати су изражени преко просторних координата које је дефинисала *Commission Internationale de l' Eclairage* (*CIE Lab* параметри) (слика 22).



Слика 22. *CIE Lab* просторне координате са одговарајућим бојама
(*Compendium of international analysis of methods*)

L^* - осветљеност (0 = црно, 100 = бело),

a^* - од црвене (+) до зелене (-),

b^* - од жуте (+) до плаве (-),

C^* - *chroma*, zasiћеност,

H или h° - *hue angle*, нијанса, мери угаону ротацију,

ΔE – укупна промена боје

Веза између изведених (C^* , h°) и основних (L^* , a^* и b^*) параметара боје може се приказати следећим формулама (1), (2). Промена боје се може израчунати на основу ових параметара помоћу једначине (3).

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (1)$$

$$h^\circ = \arctan\left(\frac{b}{a}\right) \quad (2)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (3)$$

Вредности $CIE L^*a^*b^*$ параметара калибрисане су на основу стандардне беле плочице. Боја свих узорака је мерена у три понављања.

4.2.4.7 Испитивање морфолошких карактеристика микроинкапсулата

Морфологија узорака микроинкапсулата испитивана је скенирајућим електронским микроскопом (SEM) уз претходно наношење злата. Испитивања су вршена на $JEOL JSM-6390LV$ уређају (Токио, Јапан), а наношење злата помоћу $BALTEC SCD 005$. За одређивање димензија, пречника, сферичности (у случају микроинкапсулата добијених спреј сушењем) коришћене су слике добијене SEM анализом. Само мерење на 100 појединачних микроинкапсулата вршено је у програму $ImageJ$. За потребе мерења и израчунавања средње вредности димензија узиман је узорак од 100 микроинкапсулата.

4.2.4.8 Анализа $FTIR$ спектроскопијом

Анализа спектра микроинкапсулата вршена је на инфрацрвеном спектрометру са Фуријеовом трансформацијом ($FTIR$) $Schimidzu$ (Кјото, Јапан) техником пригушене укупне рефлексије (ATR). Опсег анализе спектра био је $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$, док је резолуција била 4 cm^{-1} .

4.2.4.9 Испитивање термичких карактеристика

Термичка својства одабраних узорака (екстраката, носача, микроинкапсулата), али и потенцијалне интеракције у микроинкапсулатима, испитиване су методом диференцијалне скенирајуће калориметрије (DSC) на уређају *Mettler-Toledo* (Шверценбах, Швајцарска). Опсег загревања је био од 25 до 300 °C, а брзина загревања узорка била је 10 °C/min, а почетна маса узорка 5 mg. Анализе су вршене у атмосфери азота протока 50 mL/min. Празан алуминијумски суд је служио као референтни.

4.2.4.10 Одређивање насипне и тапкане густине и компресибилности

Одређивање насипне и тапкане густине узорака вршено је по процедури коју прописује Европска фармакопеја (*European Pharmacopeia* 8.0). Насипна густина је утврђена након што је узорак микроинкапсулата (30 g) подељена са очитаном запремином коју је узорак заузео у мензури од 100 mL. Тапкана густина је израчуната након механичког тапкања истих узорака и то 10, 500 и 1250 пута помоћу уређаја волуметра *STAV 2003* произвођача *Gemini B.V.*(Апелдорн, Холандија). приказаног на слици 23. Вредност тапкане густине је одређена из односа масе узорака и запремине након 1250 тапкања, уколико разлика између V_{500} и V_{1250} није била већа од 2 mL.



Слика 23. Уређај за одређивање тапкане густине и компресибилности прахова

Копресибилност прахова је изражена на два начина и то преко индекса компресибилности (CI) и Хауснеровог односа (HR). Једначине за израчунавање су дате под (4) и (5):

$$CI = \frac{V_0 - V_f}{V_0} \times 100 \quad (4)$$

$$HR = \frac{V_0}{V_f} \quad (5)$$

Где је V_0 – насипна запремина (очитана без тапкања узорака), а V_f – тапкана запремина (очитана након 1250 тапкања узорка)

4.2.4.11 Одређивање растворљивости микроинкапсулата

Растворљивост узорака је израчуната након што је маса узорка 0,5 грама растворена у 50 mL дестиловане воде уз константно мешање 30 минута од 150 обр/мин, након чега је сваки узорак центрифугиран брзином 3000 обр/мин током 5 минута у центрифуги *Boeco U-320* (Хамбург, Немачка). Супернатант је сушен у сушници *Memmert UF-55* (Швабах, Немачка) на 105 °C до константне масе.

Добијена и почетна маса узорка су послужиле за израчунавање растворљивости микроинкапсулата која је изражена процентуално.

4.2.4.12 Одређивање активности воде микроинкапсулата

Активност воде или a_w вредност је израчуната помоћу a_w –метра *Testo 650 Water Activity System* (Илиноис, САД).

4.2.5 Кинетика отпуштања биоактивних једињења из микроинкапсулата *in vitro*

Брзина отпуштања биоактивних једињења из микроинкапсулата је праћена на CE7 *Smart* уређају са проточним ћелијама произвођача *Sotax* (Масачусетс, САД) (слика 24). Испитан је утицај рН вредности медијума на брзину отпуштања биоактивних једињења из микроинкапсулата. Медијум за праћење профила отпуштања је константно пропуштан кроз ћелије протоком 1 mL/min и температуре $37 \pm 0,5$ °C. Употребљени су следећи медијуми за отпуштање: вештачки желудачни сок (0,1M HCl, рН 1,2), раствор који симулира рН услове у горњем и доњем делу интестиналног тракта (фосфатни пуфери рН 6,8 и 7,4), као и дестилована вода.



Слика 24. Уређај са проточним ћелијама за праћење брзине растварања/отпуштања

Медијум са отпуштеним биоактивним једињењима је прикупљан у колекторску чашу, а у ћелију са испитиваним узорком константно је допреман свеж медијум. У тачно одређеним временским интервалима (15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 минута), узорковано је по 4 mL медијума са раствореном активном супстанцом, а сваки узорак медијума замењен је истом запремином свежег медијума (Џалија et al., 2011, 2013). Пре одређивања садржаја активне компоненте сваки узорак је филтриран кроз мембрански филтер. Узорци су анализирани адекватним спектрофотометријским методама за одређивање фенолних једињења, односно

укупних мономерних антоцијана (део 4.2.4.2). Сви резултати су изражени као проценат отпуштених активних једињења из микроинкапсулата у односу на њихов почетни садржај у узорку микроинкапсулата, у зависности од времена.

4.2.6 Испитивање антимикробне активности екстраката и микроинкапсулата

4.2.6.1 Сојеви микроорганизама и припрема култура

За испитивање антимикробних својстава узорака екстраката и микроинкапсулата коришћено је три *Gram*-позитивне бактерије (*Bacillus spizizeni* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Listeria monocytogenes* ATCC 19111) и четири *Gram*-негативне бактерије (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 и *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729). Такође, испитана је и антимикробна активност на квасац *Candida albicans* ATCC 10259. Као медијум за раст *Candida albicans* коришћен је сладни бујон/агар, за *L. monocytogenes* и *E. coli* O157:H7 коришћен је триптон соја бујон/агар и за остале бактерије *Müller Hinton* бујон/агар. Култура је након аеробног раста током 20 часова на 37 °C (за бактерије) и 30 °C (за квасац) разблажена до густине 10^5 - 10^6 CFU/mL.

4.2.6.2 Микродилуциона метода са микротитарским плочицама

Минималне инхибиторне концентрације (МИК) биоактивних једињења из микроинкапсулата одређене су микродилуционом методом. За микродилуциони тест по 50 μ L сваке суспензије у погодном медијуму додато је у стерилне бунариће микротитарских плоча са 96 места у које је претходно додато по 50 μ L двоструко серијски разблаженог узорка у дестилованој води (Klančnik et al., 2010). Опсег тестираних концентрација једињења, добијен серијским разређењима кретао се од 4,7 до 300 mg/mL. Као негативна контрола коришћен је одговарајући медијум за раст

микроорганизма, док је позитивна контрола била микробна суспензија. Као индикатор хелијског обојења коришћен је ресазурин натријумове соли (6,75 mg/mL). Минимална инхибиторна концентрација (МИК) је дефинисана као најнижа концентрација узорка (mg/mL) за коју није детектована промена боје ресазурина из плаве у ружичасту (Sarker et al., 2007; Francisco et al., 2014). Пресејавањем садржаја бунарића који су садржали МИК на Петри плоче са одговарајућом хранљивом подлогом добијена је минимална микробицидна концентрација (ММК) (Nowacka et al., 2014; Duvnjak et al., 2016).

4.2.7 Сензорна анализа прехранбених производа са додатком микроинкапсулата

Сензорна анализа узорака обављена је коришћењем две методе и то рангирања и хедонска скала или скала преференције.

У оцењивању је учествовало 20 оцењивача лаика, који пре самог оцењивања нису имали ни обуку ни искуство са сензорним оцењивањивањем производа ове врсте. Узорци су припремани као и сам производ (слепа проба) према уобичајним препорукама произвођача на самој амбалажи. Температура узорака током сензорне евалуације је била око 35 °C, а сервирано је по 10 g узорка у провидним чашама запремине 100 mL. Провидне чаше су коришћене јер је оцењивана и боја узорака као једна од најважнијих параметара квалитета производа на који се утицало додавањем различитих микроинкапсулата. Сви узорци су шифрирани случајно изабраним троцифреним бројевима.

4.2.7.1 Метода рангирања

Метода рангирања се веома често користи у поступцима сензорне анализе прехранбених производа и то у ситуацијама када се захтева да се, у оквиру анализираних серије, узорци распореде према нивоу изражености једног или више својстава или према укупном квалитету (Radovanović и Попов-Raljić, 2001). Тест

рангирања омогућава мерење вероватноће да се узорак или више њих разликује од неког другог узорка, али не даје могућност квантитативног мерења степена различитости. Ова метода се често користи у процесу развоја и пројектовања новог производа, али и када је циљ испитивање утицаја измена у процесу производње на квалитет производа. На почетку оцењивања, сви узорци су достављени на потпуно идентичан начин. Предмет оцењивања биле су серије од по три узорка, које су се састојале од следеће пробе односно узорка без додатка микроинкапсулата и два узорка припремљена са додатком 25 mg микроинкапсулата по граму производа.

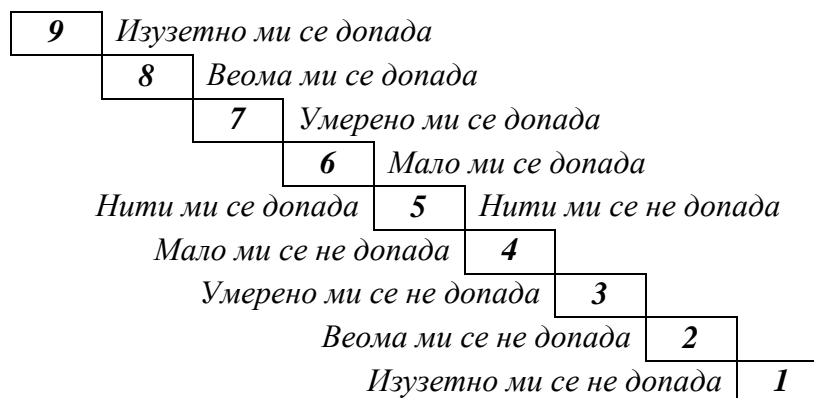
<i>МЕТОДА РАНГИРАЊА</i>			
<i>Достављено Вам је три узорка за пробу. Рангирајте их према утиску о општем квалитету од најбољег до најгорег (испод шифре најбољег узорка упишите број 1, а испод шифре најгорег број 3).</i>			
<i>Шифра узорка</i>			
<i>Ранг општег квалитета</i>			
<i>Коментар</i>			

Слика 25. Форма оцењивачког листића за методу рангирања

Задатак оцењивача је био да достављене узорке рангирају према упутству, тј да их распореде од узорка најбољег до узорка најгорег општег квалитета (слика 25). Основни циљ спровођења ове методе био је утврђивање на који начин се са додатком инкапсулата мењају својства и квалитет финалног производа.

4.2.7.2 Хедонска скала

Хедонска скала са девет нивоа је једна од најраспрострањенијих метода за утврђивање сензорне прихватљивости прехранбених производа од стране потрошача. Ову скалу су осмислили Peryam и Pilgrim (1957) у оквиру које почетна вредност (1) означава максимално непријатан, док крајња вредност (9) означава максимално пријатан утисак (слика 26).



Слика 26. Изглед хедонске скале на оцењивачком листићу

4.2.8 Статистичка обрада података

Статистичка обрада свих добијених резултата обављена је применом лиценцираног статистичког програма *STATISTICA 12 Data Analysis Software System, Stat-Soft, Inc* (Оклахома, САД). Резултати су приказани као аритметичка средина три понављања \pm стандардна девијација, уколико није назначено другачије. Статистичка значајност разлика између аритметичких средина утврђена је на нивоу статистичке значајности од $p \leq 0.05$ помоћу *One-way* анализе варијансе (*ANOVA*) и *Tuckey*-евог теста. Одступање од нормалне расподеле/дистрибуције вршено је преко дескриптивних тестова нормалности.

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

5.1 Оптимизација екстракције биоактивних једињења и карактеризација екстраката

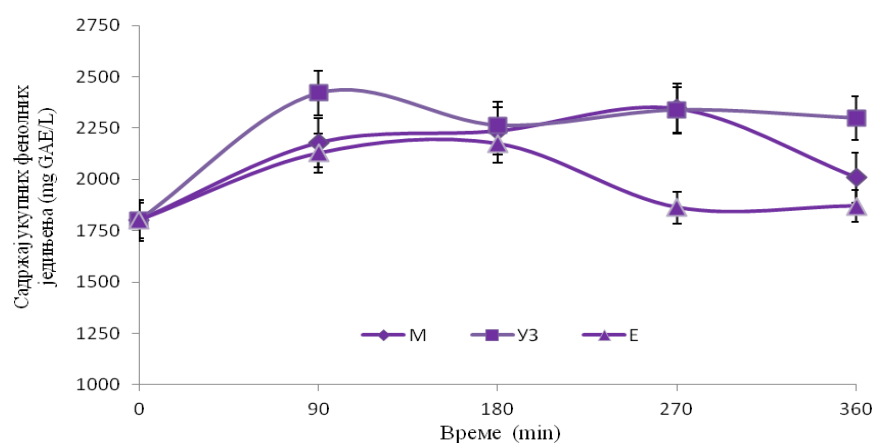
Производња микроинкапсулата и њихова карактеризација, као један од основних циљева ове дисертације, подразумевала је као прву фазу припрему тзв. активне компоненте, односно екстракта биоактивних једињења, првенствено антоцијана. Стога је екстракција споредних производа била прва фаза експерименталног дела, у ком је циљ био постићи високу концентрацију антоцијана испитујући утицај различитих параметара екстракције. Као што је у уводном делу наглашено, испитивани су само растварачи који су у складу са принципима тзв. зелених технологија. Такође, водило се рачуна да параметри чији се утицај на ефикасност екстракције испитивао буду једноставно усвојиви и примењиви и у индустријским условима, имајући у виду и економски аспект истих.

Антоцијани су екстраховани из покожице црних сорти грожђа и семењаче црне соје. Како је сортна структура Србије тренутно таква да је аутохтона сорта прокупац око 10 пута мање заступљена од *cabernet sauvignon*-а и око 3 пута мање од *pinot noir*-а, резултати екстракције су у појединим параметрима поређени са ове две доминантне и широм света познате сорте у циљу провере и потврде квалитета домаћих сорти. У овом поглављу биће изложени резултати добијени током оптимизације поступка екстракције на основу којих су одабрани екстракти биоактивних једињења за микроинкапсулацију.

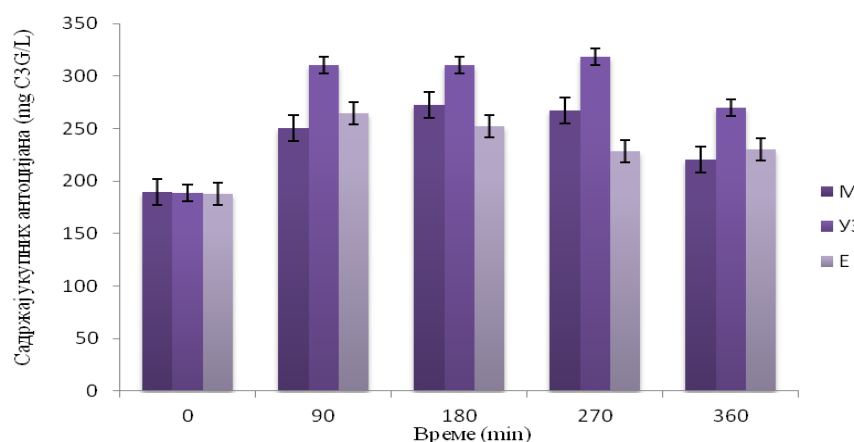
5.1.1 Утицај различитих параметара на ефикасност екстракције биоактивних једињења

Параметри чији су утицаји на ефикасност екстракције биоактивних једињења били испитивани су: време екстракције, примена мешања, примена ултразвучних таласа различитих фреквенција, додаток ензима, примењени растварачи, као и

додатак киселина растварачима. Први испитани третмани подразумевали су воду као растварач и третман константног мешања (М) током екстракције биоактивних једињења из обе сировине, затим примену ултразвучних таласа фреквенције 40 kHz (УЗ) и то 10 минута сваког сата трајања екстракције, као и третман који је подразумевао додатак ензима (Е), конкретно пектолитичких (у случају покожице грожђа) и целулитичких (у случају семењаче соје) чији су детаљи назначени у поглављу 4.2. Резултати анализе садржаја фенолних једињења и антоцијана у зависности од услова екстракције и времена приказани су на сликама 27 и 28.



Слика 27. Садржај укупних фенолних једињења екстрахованих из покожице грожђа у зависности од услова примењених поступака екстракције и времена (М-мешање, УЗ-ултразвук, Е-ензим)

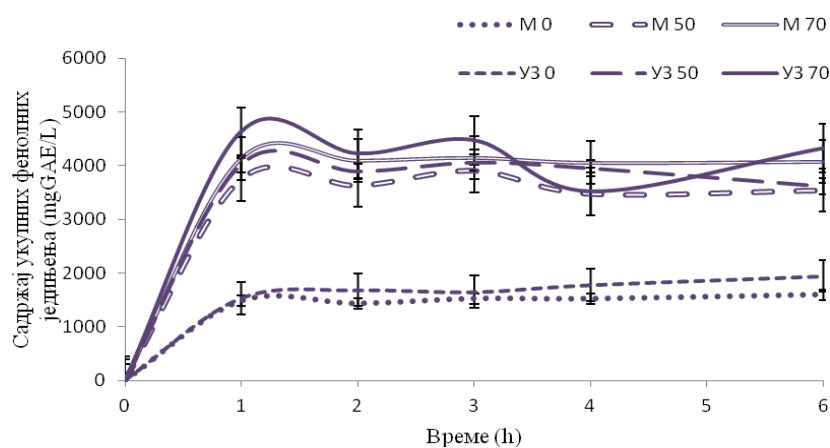


Слика 28. Садржај укупних антоцијана екстрахованих из покожице грожђа у зависности од услова примењених поступака екстракције и времена (М-мешање, УЗ-ултразвук, Е-ензим)

Са слике 27 се може закључити да за разлику од екстракције са применом ензима и мешања, где се максимални садржај укупних фенолних једињења постиже након 180 и 270 минута, респективно, коришћењем ултразвука значајно виши садржај, уједно и максималан, постиже се већ након 90 минута. На основу добијених резултата закључује се да примењен поступак екстракције има утицаја на принос укупних екстрахованих биоактивних једињења и кинетику екстракције. У поређењу са класичном мацерацијом, примена ултразвучних таласа значајно утиче на садржај фенолних једињења и време трајања процеса екстракције (90 минута за ултразвучну екстракцију у односу на 180 и 270 минута за екстракцију са применом ензима и мешања). Резултати испитивања екстракције мономерних антоцијана током 6 часова (слика 28) потврдили су у случају обе сировине на значајан ефекат ултразвучних таласа на повећање екстрахованих активних компоненти које се постиже већ у првих 90 минута. Примена ензима је за исти период (90 минута) такође показала утицај на повећање садржаја екстрахованих антоцијана током периода третмана, међутим садржај је значајно нижи од садржаја екстрахованог са употребом ултразвучних таласа. Резултати екстракције биоактивних једињења из семењаче соје нису приказани, јер су нису показали значајне разлике у односу на приказане профиле и кинетику екстракције истих из покожице грожђа. Екстракција без примене ултразвучних таласа и ензима (односно само константно мешање) показала је највећу ефикасност тек након три часа екстракције. Испитивањем утицаја ултразвука на садржај екстрахованих мономерних антоцијана из покожице грожђа, али и семењаче соје показан је статистички значајан ефекат његове примене у односу на само мешање као примењен третман током екстракције. Овај ефекат примене ултразвучних таласа се приписује кавитацији која утиче на разарање ћелијског зида и убрзан преноса масе екстрактивних антоцијана. Примена ултразвука доприноси уштеди времена и енергије у екстракцији антоцијана, али и укупних фенолних једињења из покожице грожђа и семењаче соје. У литератури постоје бројне студије које потврђују ефекте примене ултразвучних таласа на ефикасност екстракције (Sandhu и Gu, 2010; Xing et al., 2015). Резултати студије Corrales и сарадника (2008)

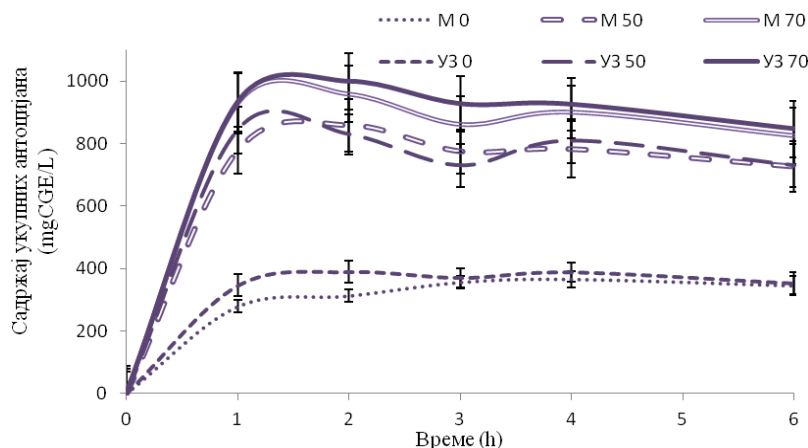
потврдили су, такође, значајан утицај примене ултразвука на екстракцију антоцијана и осталих фенолних једињења из покожице грожђа.

Такође, испитан је утицај растарача, прецизније воде и етанола различите концентрације као течне фазе уз мешање и примену ултразвука током екстракције (М-мешање, УЗ-ултразвук, 0, 50, 70 – проценат етанола у растварачу)(слике 29-32).



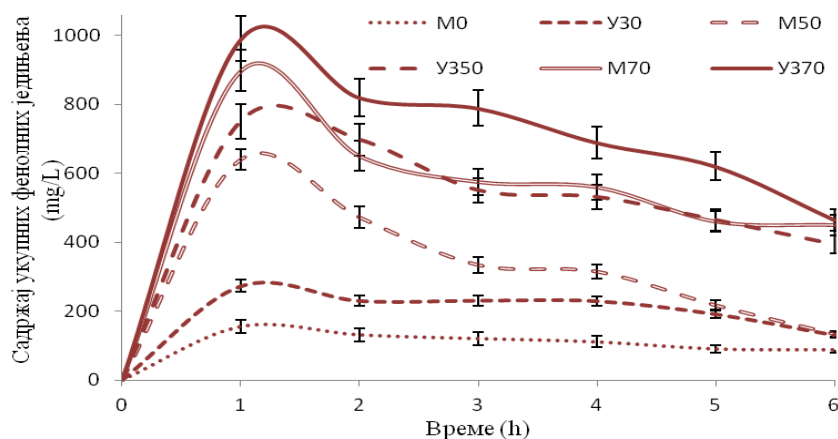
Слика 29. Садржај укупних фенолних једињења екстрахованих из покожице грожђа у зависности од услова екстракције и времена

У овом делу истраживања употребом поменутих растварача и третмана добијено је шест различитих екстраката биоактивних једињења покожице грожђа и семењаче соје.



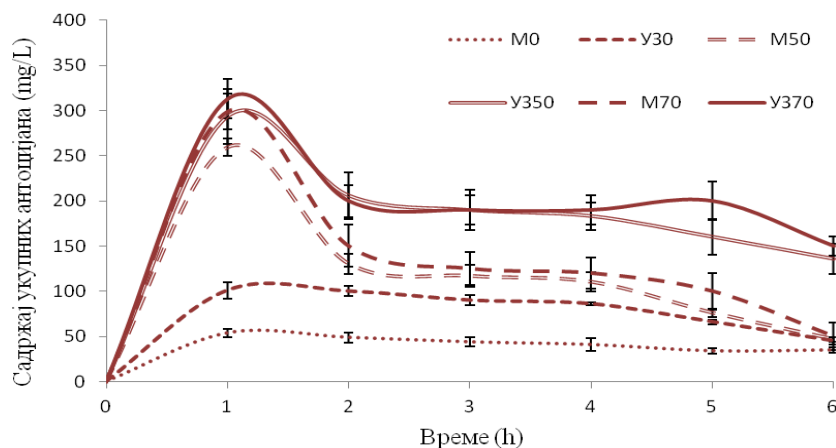
Слика 30. Садржај укупних антоцијана екстрахованих из покожице грожђа у зависности од услова примењених поступака екстракције и времена

Као што се може уочити са слика 29 и 31 најбоља екстракција укупних фенолних једињења је постигнута са 70% V/V етанолом као растварачем уз примену ултразвука (У370). Примена ултразвучних таласа је показала боље резултате у сваком испитиваном узорку (односно са све три врсте растварача).



Слика 31. Садржај укупних фенолних једињења екстрахованих из семењаче соје у зависности од услова примењених поступака екстракције и времена

Међутим, утицај етанола је показао велику статистичку значајност. Додатак етанола води значајно је побољшао екстракцију укупних мономерних антоцијана из обе сировине (слике 30 и 32). Антоцијани екстраховани етанолом различите концентрације показали су сличне резултате, но ипак најефикаснија екстракција постигнута је са 70% V/V раствором етанола.



Слика 32. Садржај укупних антоцијана екстрахованих из pokožице грождја у зависности од услова екстракције и времена

Као што се може закључити са слика 27-32, време које је потребно за оптималну екстракцију фенолних једињења и антоцијана је 90 минута екстракције. У предходном експерименту у случају екстракције водом као растварачем дошло је до врло сличног ефекта, односно скраћивања времена за максималну екстракцију фенолних једињења са 180 односно 270 минута на 90 захваљујући примени ултразвука.

Слични резултати су добијени и у случају екстракције антоцијана из семењаче црне соје која је, такође, испитана применом различитих растварача у период екстракције од 6 часова (слика 32). Етанол (обе примењене концентрације, 50 и 70% V/V) су у односу на воду (без етанола) показали значајан ефекат на екстракцију антоцијана, конкретно 55% m/V виши садржај антоцијана је постигнут коришћењем овог растварача.

У случају обе сировине за екстракцију антоцијана испитиван је ефекат фреквенције ултразвука од 40 и 59 kHz, међутим није постојала значајна разлика између ове две примењене вредности те је у наставку експеримената примењивана фреквенција од 40 kHz у свим узорцима.

Ефикаснија екстракција је омогућена додатком киселине (табеле 5 и 6), односно закишељавањем растварача лимунском или сирћетном киселином, а самим тим делимичном хидролизом везаних антоцијана што је у сагласности са литературом (Wang et al., 2016). Сем тог ефекта, додатком киселине се постигао и нижи рН што антоцијане одржава у стабилнијој форми, а последица тога је и атрактивнија боја екстракта биоактивних једињења, а касније и боја микроинкапсулата тих екстраката.

У случају покожице грожђа (табела 5) додаток киселине није имао тако значајан ефекат на ефикасност екстракције као у случају семењаче соје (табела 6). То се може објаснити саставом сировине и формама фенолних једињења у њима. Разлика у њиховим формама у ове две сировине је појашњена у уводном делу (део 2.2.2), где је наглашено да су у грожђу те форме слободне (преко 90%), а у соји везане (око 80%) (Liu, 2007). Закишељавање растварача потпомаже раскидању

појединих веза, а томе у прилог иду резултати студија изложених у уводном делу у табели 3.

Табела 5. Утицај додатка киселине растварачу на садржај укупних фенолних једињења (ТРС, mg GAE/g_{см}) и антоцијана (ТАС, mg CGE/g_{см}) покожице грожђа

	П		К		Б	
	ТРС	ТАС	ТРС	ТАС	ТРС	ТАС
ОК*	83,1 ± 1,6	16,3 ± 0,8	73,3 ± 2,4	15,2 ± 0,7	87,0 ± 1,4	19,3 ± 0,9
ЛК	71,7 ± 2,1	14,4 ± 0,7	66,8 ± 1,9	13,6 ± 0,7	83,4 ± 1,4	16,5 ± 0,8
СК	83,4 ± 1,4	16,8 ± 0,6	74,2 ± 2,7	16,0 ± 0,6	89,1 ± 1,6	21,5 ± 1,0

ОК – без додатка киселине, ЛК – додаток 1% лимунске киселине, СК – додаток 1% сирћетне киселине, П-прокупац, К- *cabernet sauvignon*, Б-бургундац црни, *екстракт коришћен за припрему микроинкапсулата

Додатком лимунске киселине екстрахован је око 17% *m/m* виши садржај укупних мономерних антоцијана у односу на садржај у екстракту без додате киселине растварачу. На крају, како је ефекат лимунске киселине био најзначајнији на екстракцију фенолних једињења, овај растварач (етанол 70% *V/V* уз додаток лимунске киселине) је коришћен у даљој производњи екстракта биоактивних једињења, односно антоцијана семењаче црне соје.

Табела 6. Утицај додатка киселине растварачу на садржај укупних фенолних једињења (ТРС, mg GAE/g_{см}) и антоцијана (ТАС, mg CGE/g_{см}) семењаче соје

	ТРС	ТАС
ОК	23,6 ± 0,6	9,0 ± 0,9
ЛК*	25,3 ± 0,8	10,6 ± 0,8
СК	23,1 ± 0,5	10,0 ± 0,8

ОК – без додатка киселине, ЛК – додаток 1% лимунске киселине, СК – додаток 1% сирћетне киселине, *екстракт коришћен за припрему микроинкапсулата

Такође, анализиран је и ефекат различитих концентрација киселине (0,1-1% m/V), где се њен додатак у концентрацији од 1% m/V био најзначајнији. Мора се споменути и да додатак ове киселине има утицај на сензорна својства екстракта и микроинкапсулата. То је уједно разлог зашто се није разматрао већи удео киселине (сензорна (не)прихватљивост).

Утицај односа чврсте и течне фазе на ефикасност екстракције приказан је у табелама 7 и 8. Циљ је био оптимизовати процес и пронаћи адекватну запремину растварача имајући у виду ефикасност истог, али и цену те запремине. Због садржаја воде у сировини у случају покожице грожђа био је могућ однос чврсте и течне фазе и 1:1 са задовољавајућим резултатима, док код семењаче соје, која има низак садржај влаге, није било могуће одвајање течне фазе све до односа 1:4, а прихватљиви резултати су се постизали тек при односу 1:10.

Као и из предходних резултата, и из ове табеле (табела 7) може се закључити да је прокупац као извор фенолних једињења поготово антоцијана, сорта са значајним потенцијалом. У случају све три сорте највиши садржај фенолних једињења је постигнут при односу чврсте и течне фазе 1:3 и/или 1:4 што је, генерално, у складу са литературом (Lapornik et al., 2005; Katalinić et al., 2010).

Табела 7. Садржај укупних фенолних једињења (TPC, mg CGE/g_{см}) и антоцијана (TAC, mg CGE/g_{см}) у екстракту у зависности од односа чврсте и течне фазе при екстракцији

Однос Ч-Т	П		К		Б	
	TPC	TAC	TPC	TAC	TPC	TAC
1:2	44,9 ± 1,5	9,3 ± 0,5	40,1 ± 3,1	8,1 ± 0,5	49,2 ± 4,5	10,4 ± 0,8
1:3*	83,1 ± 2,8	16,3 ± 0,9	76,4 ± 4,0	12,9 ± 0,7	84,8 ± 3,9	17,0 ± 0,9
1:4	87,5 ± 2,9	15,1 ± 1,6	80,4 ± 3,5	9,8 ± 0,9	85,2 ± 3,9	12,9 ± 0,5
1:10	74,7 ± 1,1	9,9 ± 0,8	70,8 ± 4,1	8,9 ± 0,6	78,0 ± 4,8	10,9 ± 0,7
1:20	68,1 ± 2,6	8,5 ± 0,9	61,9 ± 3,6	7,8 ± 0,5	65,5 ± 3,1	8,9 ± 0,5
1:40	53,3 ± 2,1	7,4 ± 0,8	49,8 ± 2,5	6,4 ± 0,4	58,1 ± 2,6	8,0 ± 0,4

П-прокупац, К- *cabernet sauvignon*, Б-бургундац црни, *екстракт коришћен за припрему микроинкапсулата

Код семењаче соје коришћен је много већи удео течне фазе (растварача), него што је случај код покожице, што се објашњава саставом материјала, присутним хемијским везама, као и садржајем воде у самом материјалу за екстракцију.

Табела 8. Садржај укупних фенолних једињења (TPC, mg CGE/g_{см}) и антоцијана (TAC, mg CGE/g_{см}) у екстрактима у зависности од односа чврсте и течне фазе при екстракцији

Однос Ч-Т	TPC	TAC
1:2	-	-
1:3	-	-
1:4	18,08 ± 0,24	6,68 ± 0,19
1:10	20,99 ± 1,02	7,37 ± 0,12
1:20	24,14 ± 1,16	9,06 ± 0,44
1:40*	29,09 ± 1,45	10,55 ± 0,51

*екстракт коришћен за припрему микроинкапсулата

Код покожице грождја преко 76% *m/m* је вода, док је код семењаче то свега око 9% *m/m*. Такође, разлику представља и сврсисходност, а можда чак и неопходност реекстракције код семењаче црне соје, у циљу смањења великих губитака. Уколико је однос чврсте и течне фазе 1:10, губици су износили чак од 26,3 до 43,6% *m/m*, у зависности од примењеног растварача.

У случају повећања тог односа на 1:40, ти губици су износили од 8,8 до 30,8% *m/m*, у зависности од примењеног растварача. Убедљиво најмањи губици (за случај изостанка реекстракције) забележени су у случају примене лимунске киселине у концентрацији од 1% *m/V* у етанолу концентрације 70% *V/V*. Ови резултати су у складу са доступном литературом о екстракцији антоцијана из семењача црне соје (Choung et al., 2001; Cho et al., 2013). Тај вежикулум је коришћен у даљем раду, а екстракти биоактивних једињења добијени помоћу наведеног растварача су микроинкапсулисани техникама већ описаним у делу 4.2.2.

5.1.2 Садржај индивидуалних антоцијана екстраката

Праћење кинетике и ефикасности екстракције посредством одређивања укупног садржаја фенолних једињења и антоцијана, било је релативно брзо и једноставно коришћењем спектрофотометријских метода. С обзиром да је најбоље резултате за екстракцију истих дао 70% V/V етанол уз примену ултразвучних таласа, као и додатак лимунске киселине у случају семењаче соје, за све даље анализе коришћени су екстракти биоактивних једињења добијени применом поменутих третмана. Екстракти су даље испитани хроматографски (HPLC методом) на садржај појединачних антоцијана (табела 9).

Као што се може уочити на хроматограму (прилог I, слика 6), малвидин-3-глукозид је био присутан у екстракту антоцијана изолованих из покожице грожђа у значајно вишој концентрацији у односу на све остале детектоване антоцијане. Још већи однос између доминантног антоцијана цијанидин-3-глукозида и свих осталих антоцијана уочен је у екстракту антоцијана семењаче црне соје (прилог I, слика 7).

Табела 9. Садржај индивидуалних антоцијана у екстрактима покожице грожђа (П) и семењаче соје (С) (mg/L)

Антоцијани	Покожица грожђа	Семењача соје
Цијанидин-3-глукозид	7,8 ± 1,0	309,6 ± 14,5
Делфинидин-3-глукозид	43,5 ± 5,3	1,6 ± 0,1
Малвидин-3-глукозид	824,0 ± 26,0	нд
Пеларгонидин-3-глукозид	нд	17,4 ± 4,4
Петунидин-3-глукозид	125,4 ± 10,1	нд
Цијанидин-3,5-диглукозид	нд	нд

нд-није детектован

На хроматограму антоцијана екстрахованих из покожице грожђа се на ретенционим временима 20,6, 23,1, 24,6, 26,6, могу уочити и ациловане форме антоцијана присутне у значајној концентрацији (прилог II, слика 6), док их у екстракту антоцијана семењаче соје није било (прилог II, слика 7). Антоцијани приказани у табели 9 и на хроматограмима у прилогу детектовани су у сличним концентрацијама и од стране бројних аутора који су испитивали ове две сировине (Corrales et al., 2008; Lee et al., 2009; Koh et al., 2014; Xing et al., 2015).

5.1.3 Антиоксидативна активност екстраката

Свим узорцима екстраката биоактивних једињења је антиоксидативна активност одређена спектрофотометријским методама, као и једном поларографском методом, а резултати ових анализа су приказани у табели 10. Прокупац, односно екстракт биоактивних једињења покожице ове сорте, изнова је показао значајне резултате и даљи експериментални рад, а превасходно микроинкапсуација, настављен је са екстрактом биоактивних једињења покожице ове сорте.

Табела 10. Антиоксидативна активност екстраката биоактивних једињења покожице грожђа и семењаче соје одређен различитим методама

Метода	П	К	Б	С
ТЕАС ($\mu\text{mol TE/g}_{\text{CM}}$)	757,5 \pm 34,9	699,0 \pm 24,9	801,4 \pm 39,9	510,9 \pm 41,0
DPPH ($\mu\text{mol TE/g}_{\text{CM}}$)	38,0 \pm 5,1	28,1 \pm 1,5	44 \pm 2,9	28,4 \pm 1,9
FRAP ($\mu\text{mol TE/g}_{\text{CM}}$)	170,1 \pm 15,1	155,2 \pm 14,9	187,8 \pm 19,1	69,4 \pm 3,3
НРМС (%/mL)	215,7 \pm 15,0	141,0 \pm 5,0	218,0 \pm 13,0	116,0 \pm 3,0

П-прокупац, К- *cabernet sauvignon*, Б-бургундац црни, С-семењача соје

Екстракти биоактивних једињења, независно од полазне сировине, показали су изузетно високе вредности антиоксидативности, по свим примењеним тестовима, а сличне оним из литературних података (Spigno et al, 2007b; Katalinić et al., 2010; Žilić et al., 2013). Добијени резултати су међусобно упоређени и утврђени су

коэффициенти корелације између свих употребљених спектрофотометријских метода (табеле 11 и 12).

Табела 11. Корелација између антиоксидативног капацитета одређеног различитим методама и укупног садржаја фенолних једињења и укупних антоцијана екстракта покожице грожђа сорте прокупац

Методe	r	r ²	t	p
<i>DPPH-ABTS</i>	0,949	0,901	9,964	0,00
<i>FRAP-ABTS</i>	0,853	0,728	6,009	0,01
<i>DPPH-FRAP</i>	0,951	0,904	10,084	0,00
<i>TPC- ABTS</i>	0,959	0,920	10,225	0,00
<i>TPC- DPPH</i>	0,968	0,937	10,831	0,00
<i>TPC- FRAP</i>	0,901	0,812	6,582	0,01
<i>TAC-ABTS</i>	0,911	0,830	6,911	0,00
<i>TAC-DPPH</i>	0,899	0,808	6,148	0,01
<i>TAC-FRAP</i>	0,854	0,729	6,012	0,01
<i>TPC-TAC</i>	0,902	0,814	7,520	0,00

Као што се из наведених табела може закључити, коэффициенти корелације (r) и детерминације (r^2) су високи и изузетно високи и теже вредности 1, а у табелама су приказане и вредности добијене t -тестом (t), као и ниво статистичке значајности (p , ако је $p < 0,05$ онда је разлика значајна). Међутим, ни корелација између спектрофотометријских метода и поларографске методе за одређивање антиоксидативне активности није била ниска и коэффициенти корелације (r) износили су 0,899, 0,924 и 0,858 са *ABTS*, *DPPH* и *FRAP* методом, респективно.

Табела 12. Корелација између антиоксидативног капацитета одређеног различитим методама и укупног садржаја фенолних једињења и укупних антоцијана екстракта семењаче соје сорте *black toki*

Метод	r	r ²	t	p
<i>DPPH-ABTS</i>	0,936	0,876	9,964	0,00
<i>FRAP-ABTS</i>	0,898	0,806	6,019	0,01
<i>DPPH-FRAP</i>	0,940	0,884	10,483	0,00
<i>TPC- ABTS</i>	0,960	0,922	11,215	0,00
<i>TPC- DPPH</i>	0,971	0,943	11,833	0,00
<i>TPC- FRAP</i>	0,919	0,845	9,582	0,00
<i>TAC-ABTS</i>	0,901	0,812	8,934	0,01
<i>TAC-DPPH</i>	0,900	0,810	8,911	0,01
<i>TAC-FRAP</i>	0,839	0,704	10,299	0,01
<i>TPC-TAC</i>	0,914	0,835	9,413	0,00

5.1.4 Садржај макроелемената и елемената у траговима

Екстрактима биоактивних једињења покожице црне сорте грожђа и семењаче црне соје одређени су садржаји 5 макроелемената (табела 13) и 26 елемената у траговима (табела 14).

Из табела 13 и 14 у којима је представљено поређење садржаја елемената покожица сорте прокупац са две најраспрострањеније сорте се може видети да садржај појединих елемената у узорцима веома варира у зависности од сорте грожђа. Разлике између различитих култура, али чак и сорти у литератури су објашњене појавом да биљне врсте испољавају селективан процес биоаккумуляције различитих елемената (Fabani et al., 2013). Ово је случај и код других биљних култура. На пример, анализа пиринча је такође показала да генетичко порекло представља један од најважнијих фактора који утичу на профил елемената (Danezis et al., 2007).

Такође, сем што доспевају из земљишта у ткиво биљака, присуство разних елемената је последица различитих заштитних третмана.

Калијум је најзаступљенији макронутријент у покожицама све три испитиване сорте грожђа, а прате га фосфор, калцијум, натријум и магнезијум што одговара литературни подацима (Stanković, 2008). Када је реч о семењачи соје такође је доминантан калијум, затим калцијум и магнезијум, а у вишеструко нижим концентрацијама присутни су натријум и фосфор. Највиши садржај одређен је семењачи соје, затим у покожици сорте *pinot noir* (бургундац црни), а значајно нижи у покожицама *cabernet sauvignon*-а и прокупаца. Иако међусобно различити садржаји добијени у испитиваним екстрактима биоактивних једињења значајно су виши у односу на концентрацију калијума коју су De Nisco и сарадници (2013) детектовали у покожици грожђа сорте *aglianico*. Поређењем са препорученом дневном дозом прописаном директивом Комисије Европске уније, унос око 100 грама оваквог материјала допринео би уносу од око 2-6% од максималне препоручене дозе за дневни унос калијума (Commission Directive, 2008/100/EC).

Табела 13. Садржај макроелемената у покожици грожђа и семењачи соје ($\mu\text{g}/\text{g}_{\text{cm}}$)

Сировина		Сорта грожђа		Сорта соје
Макроелемент	Прокупац	<i>Pinot noir</i>	<i>Cabernet sauvignon</i>	<i>Black tokio</i>
Ca	535,83	515,06	328,44	1113,89
K	1302,04	4142,23	1593,54	5404,54
Mg	222,70	493,27	278,85	945,72
Na	349,41	87,35	70,19	238,08
P	613,24	1073,99	29,95*	99,21

*вредност нижа од лимита детекције

Најзаступљенији минерални елементи у траговима приказани су по опадајућем редоследу: Fe > Zn > Мо и односе се на све узорке, али са много већим садржајем у семењачи соје. Минералне елементе биљка узима кореновим системом из земље и распоређује их у поједине органе ради различитих животних функција.

Сви поменути елементи важни су и за функционисање људског организма, као што је образовање хемоглобина, мождане функције, изградња костију, регулација температуре и крвног притиска и друге (Stanković, 2008).

Табела 14. Садржај елемената у траговима у екстрактима ($\mu\text{g/g}_{\text{cm}}$)

Елементи у траговима	Прокупац	<i>Pinot noir</i>	<i>Cabernet sauvignon</i>	<i>Black tokio</i>
Ag	0,02*	0,02*	0,05	0,16
Al	7,03	10,86	7,80	26,4
As	0,01*	0,01*	0,02*	0,06*
Ba	0,23	0,44	0,19	0,65
Be	12,50	31,95	7,23	24,50
Bi	0,02	0,01	0,03	0,10
Cd	0,04*	0,05*	0,06*	0,19*
Cr	2,86	1,93	1,78	6,03
Co	0,03	0,02	0,06	0,22
Cu	6,68*	15,06*	9,82*	33,3
Fe	18,86	17,01	86,82	294,45
Ga	0,02	0,03	0,02	0,08
Pb	0,56	0,25	0,21	0,71
Li	0,16	0,26	0,12	0,42
Mn	2,21	3,16	1,24	4,21
Mo	0,24*	0,28*	0,25*	0,84
Ni	0,43	0,49	8,48	28,75
Rb	3,84*	10,41*	0,89*	3,00*
Sb	0,07*	0,07*	0,08*	0,26
Se	0,30*	0,59*	0,59*	1,31
Sn	0,01*	0,03*	0,02*	0,08
Sr	0,32*	0,23*	0,05*	0,18*
Tl	0,16	0,03	0,03	0,09
U ¹	0,30	0,30	0,27	1,23
V	0,12*	0,11*	0,12*	0,40*
Zn	23,71*	41,64*	22,02*	74,67*

*вредност нижа од лимита детекције; ¹актиноиди

Током сазревања плодова, у овом случају бобица грожђа или зрна соје, а касније и током бербе и манипулације може доћи до разних видова контаминације, а један од њих је контаминација металима. То је један од главних разлога за анализу коришћених екстраката у којима је одређено и присуство токсичних и потенцијално токсичних метала, као што су Ag, Al, As, Bi, Cd, Co, Ga, Ni, Pb, Sb, Sn, Tl и V. Ови елементи имају потенцијал да се акумулирају у разним органима људског организма, испољавајући токсичне ефекте (Dhiman et al., 2011). У испитиваним узорцима присутни су елементи у веома малим концентрацијама, а опадајући редослед концентрација најзаступљенијих елемената је: Al > Ni > Pb > Cr у покожици грожђа односно: Ni > Al > Be > Cr > Pb у семењачи соје. Ови елементи воде порекло из земљишта или разних контаминената, као што су остаци фунгицида и других фитосанитарних средстава (De Nisco et al., 2013; Panceri et al., 2013).

Када је реч о покожици грожђа, истраживања су показала да она садржи мање тешких метала у односу на семенке, али више у односу на садржај у пулпи, као и да се након прања плода садржај тешких метала у покожици грожђа смањује за чак 50% у случају олова, односно 30% у случају бакра, цинка и кадмијума што указује да је присуство ових метала последица аеросол загађивача који су механички адсорбовани за покожицу (Angelova et al., 1999).

Резултати указују да је алуминијум најзаступљенији од потенцијално токсичних елемената анализираних екстраката. Алуминијум је распрострањен у природи и чини 8% Земљине површине, а биљке га лако могу апсорбовати из земљишта (Dhiman et al., 2011). У покожици сорте прокупац садржај алуминијума је био 7,03 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{sm}}$, што је слично садржају одређеном у покожици сорте *cabernet sauvignon*-а 7,80 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{sm}}$, а мањи у односу на садржај који су одредили De Nisco и сарадници (2013). Највећи садржај алуминијума одређен је у сорти бургундац црни (10,86 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{sm}}$). Семењача црне соје имала је значајно виши садржај алуминијума (26,4 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{sm}}$).

Веома је важно напоменути да су у покожицама све три испитиване сорте грожђа концентрације арсена, кадмијума, антимонона и калаја, као и арсена и кадмијума у семењачи соје испод лимита детекције одређених према Регулативи

Комисије Европске Уније (Commission Regulation, 2007/333/EC). Из наведеног се може закључити да се коришћење покожице грожђа и семењаче соје као дијететског суплемента може генерално сматрати безбедним у погледу садржаја токсичних и потенцијално токсичних елемената.

Присуство минералних елемената је веома важно, јер су то структурне компоненте органа и ткива човека, улазе у састав телесних течности као електролити и имају улогу катализатора у ензимским и хормонским системима (Dhiman et al., 2011). Ови елементи се не могу синтетисати у људском организму, већ се морају уносити храном. Имајући у виду њихов садржај у испитиваним узорцима (табела 13), може се закључити да покожица црног грожђа и семењача црне соје, односно њихови екстракти, а касније и микроинкапсулати могу бити коришћени као састојци функционалних производа.

5.1.5 Боја екстраката

Један од начина мерења боје је хромаметријско одређивање помоћу *CIE Lab* просторних координата. Боја узорака је мерена ручним хроматром са извором светлости D_{65} , при чему су резултати изражени преко просторних координата, односно *CIE Lab* параметара. Вредност угла боје (h°) представља положај одређене боје у точку боја, при чему је црвенољубичаста на углу од 0° односно 360° , жута на 90° , плавозелена на 180° и плава на 270° . Вредност хроне (C^*) представља засићеност боје узорка, при чему високе вредности представљају тзв. живе боје.

Сви параметри, почев од осветљености, преко боје, нијансе и таласне дужине дати су у табели 15 и односе се на оба екстракта биоактивних једињења пре и после периода складиштења. Осветљеност узорака екстраката је била значајно већа, односно L^* вредности су још ниже у односу на касније добијене микроинкапсулате.

Иако су екстракти складиштени на 4°C (услови у расхладним уређајима) како је уобичајено за течне узорке, промена боје је присутна у свим узорцима и свим одређиваним параметрима. Иницијални екстракт биоактивних једињења семењаче

црне соје имао је најнижу вредност L^* , али се осветљеност није значајно мењала ни код једног екстракта (табела 15).

Табела 15. *CIE Lab* хроматски параметри екстракта покожице грожђа (П) и екстракта семењаче соје (С)

Узорак	$L^*(D65)$	$a^*(D65)$	$b^*(D65)$	$C^*(D65)$	$h(D65)$	Доминантна таласна дужина (D65)
П ₀ [*]	17,86±0,00	7,62±0,08	0,66±0,04	7,65±0,09	4,99±0,29	495,59±0,11
П ₁₈₀	17,70±0,01	6,36±0,08	0,76±0,03	6,40±0,08	6,37±0,08	495,06±0,09
С ₀ [*]	21,70±0,01	25,63±0,01	7,19±0,01	26,62±0,05	15,67±0,16	665,83±6,74
С ₁₈₀	21,62±0,16	22,99±0,16	7,49±0,25	24,13±0,72	17,69±0,10	634,23±0,52

0 – пре складиштења

180 – после 180 дана (6 месеци) складиштења на 4 °C ван домаћаја светлости

*екстракти коришћени за припрему микроинкапсулата

Када је о осталим параметрима реч, промене су у истом смеру код сваке просторне координате, али израженије код екстракта биоактивних једињења семењаче соје у односу на екстракт биоактивних једињења покожице грожђа. Квантитативно промена боје израчуната је према једначини (3) из дела 4.2.4.7 и износила је у случају покожице грожђа 1,27, а у случају семењаче соје 2,66. Иако у прорачун за укупну промену боје не улазе ни C^* ни h° параметар, они се израчунавају преко параметара a^* и b^* , па су њихове промене последица промене пре свега параметара a^* . Требало би нагласити да је још једна потврда постојаније боје екстракта добијеног од покожице грожђа готово идентична доминантна таласна дужина у узорцима пре и након складиштења, за разлику од екстракта добијеног од семењаче соје где се она променила за 31,6 nm.

Како су ови екстракти биоактивних једињења само полазне сировине за микроинкапсулате, који би били додаци производима или суплементи, много је значајније испитивање промене боје микроинкапсулата, с обзиром да се услови складиштења таквих материјала најчешће другачији (нпр. собна температура) што је

и изложено у делу 5.2.3. Екстракти биоактивних једињења употребљени за микроинкапсулацију су обележени у табелама у оквиру поглавља 5.1.

5.1.6 Антимикробна активност екстраката

Екстракти биоактивних једињења показали су различито антимикробно деловање у зависности од извора и испитиваних организама. Екстракти су у најнижим испитиваним концентрацијама деловали антимикробно на *B. spizizeni*, затим на раст и развој *S. enteritidis* и *S. aureus*. Двоструко виша концентрација била је неопходна за антимикробни ефекат на *P. aeruginosa*. Једина бактерија на чији раст није утицала ни једна испитивана концентрација екстраката биоактивних једињења била је *E. coli* Н7:О157, а антимикробно дејство није уочено ни код патогеног квасца *C. albicans* што је у складу са резултатима других аутора (Cheng et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Friedman, 2014; El Ksibi et al., 2015).

На крају, јавља се питање даљег третмана и примене чврстог биљног остатка након екстракције биоактивних једињења из сировина. Наведени материјал који заостаје у највећем делу је обезбојен због екстрахованих антоцијана. У случају покожице грожђа, снижен је и садржај шећера и пектина, јер су и они делом екстраховани са биоактивним једињењима.

У случају обе сировине заостаје материјал богат целулозним влакнима и минералима који може бити искоришћен у различите сврхе. Једна од њих је компостирање где би овај материјал могао да се комбинује са различитим органским остацима из пољопривреде у циљу добијања компоста. Друго решење за искоришћење овог остатка након екстракције би могла да буде његова употреба као компоненте сточне хране. Поред тога, овај материјал би могао бити основна сировина за издвајање дијететских влакана која су пожељна у исхрани због здравственог ефекта посебно на перисталтику црева, али и као пребиотици. Још једно решење за искоришћење остатака након екстракције би могло бити њихово коришћење као енегента тј. као извора топлотне енергије³

Такође, требало би напоменути да као додатан бенефит искоришћења покожице грожђа као сировине, то што се током вакуум упаравања (након екстракције, а пре инкапсулације) издваја етанол са израженом и изузетно пријатном аромом који може бити искоришћен у различите сврхе попут производње ликера или мацерата, затим производње арома, а сам етанол може бити изнова искоришћен у исту сврху као растварач.

³ У Србији је од 2016. године на снази *Закон о управљању отпадом* који чланом 38 забрањује спаљивање отпада који испуњава услове за поновну употребу или поновно искоришћење. Изузетно, он се може спалити ако је то економски оправдано и не угрожава здравље људи и животну средину, уз претходно прибављену дозволу Министарства надлежног за послове заштите животне средине.

5.2 Оптимизација микроинкапсулације и карактеризација микроинкапсулата

Оптимизација процеса микроинкапсулације је подразумевала, пре свега, адекватан однос носача и екстракта (активне компоненте), који би био што економичнији, а давао као резултат стабилне прашове жељених карактеристика. У случају спреј сушења, оптимизација је подразумевала одабир адекватне улазне температуре, протока ваздуха и смеше носача и екстракта, као и притиска атомизације. Оптимизовани параметри који су дати у делу 4.2.11 су примењени за све узорке при микроинкапсулацији оба екстракта. Пример микроинкапсулата добијених под оптималним условима спреј сушења, дат је на слици 33 и 34.

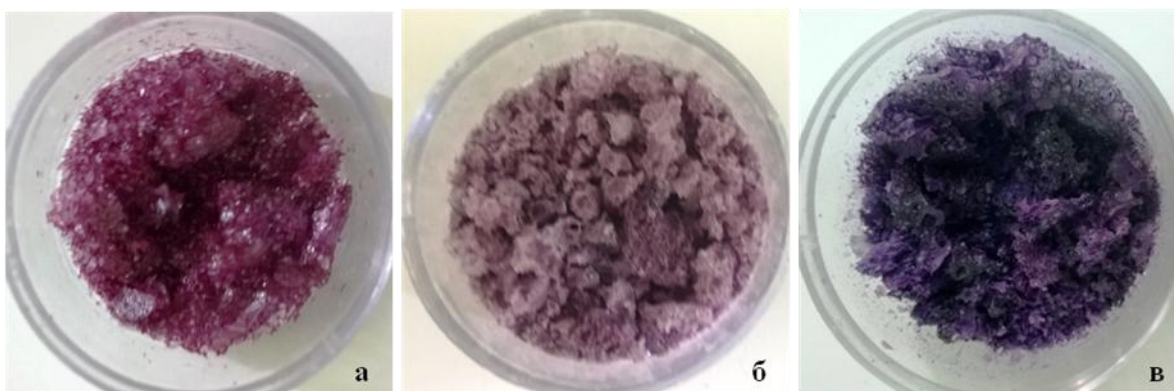


Слика 33. Микроинкапсулати екстракта покожице грожђа произведени техником спреј сушења са носачима МД (а), ГА (б) и МП (в)

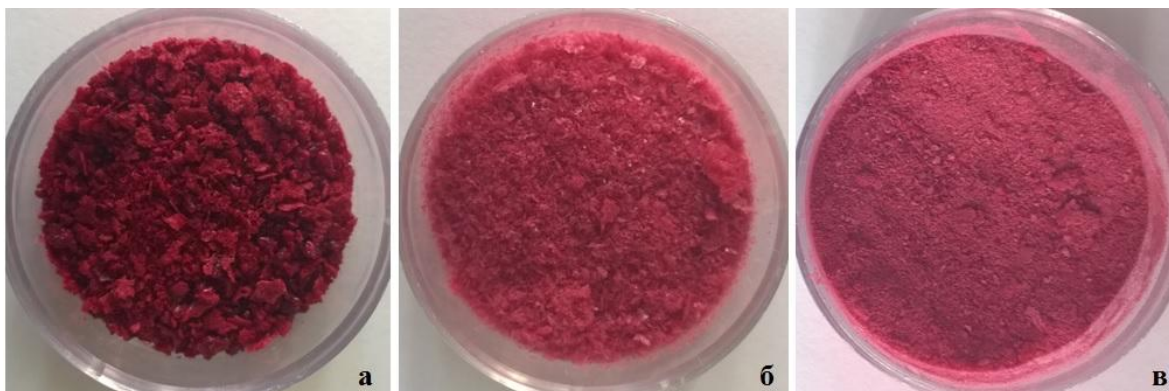


Слика 34. Микроинкапсулати екстракта семењаче соје произведени техником спреј сушења са носачима МД (а), ГА (б) и МП (в)

Када је у питању процес лиофилизације оптимизација је подразумевала одабир почетне температуре дубоко замрзнутог узорка, брзину промене температуре током процеса сушења, крајњу температуру, затим притисак (вакуум), као и време процеса лиофилизације. Оптимални услови лиофилизације су дати у оквиру дела 4.2.2.2, и сви узорци су инкапсулисани под датим условима. Пример узорака после процеса лиофилизације са различитим носачима приказан је на сликама 35 и 36.



Слика 35. Микроинкапсулати екстракта pokožице грождја произведени техником лиофилизације са носачима МД (а), ГА (б) и МП (в) (пре уситњавања)



Слика 36. Микроинкапсулати екстракта семењаче соје произведени техником лиофилизације са носачима МД (а), ГА (б) и МП (в) (пре уситњавања)

У случају обе технике микроинкапсулације као активне компоненте коришћени су екстракти биоактивних једињења pokožице грождја и семењаче соје који су одабрани након детаљне оптимизације описане у поглављу 5.1. У даљем делу ове дисертације изложени су резултати различитих анализа добијених микроинкапсулата

у погледу морфологије, физичких и хемијских карактеристика, термичких особина, садржаја укупних фенолних једињења и антоцијана, антиоксидативног и антимикробног потенцијала као и сензорних карактеристика. На самом крају дати су предлози примене микроинкапсулата у прехранбеној индустрији.

5.2.1 Физичко-хемијске карактеристике микроинкапсулата

5.2.1.1 Морфолошке карактеристике микроинкапсулата

Захваљујући снимцима микроинкапсулата начињеним помоћу скенирајућег електронског микроскопа под различитим увећањима, омогућен је детаљнији увид у карактеристике, пре свега оне морфолошке.

Микроинкапсулати добијени спреј сушењем (слика 37 и 38) били су полидисперзни по величини у зависности како од типа носача за микроинкапсулацију тако и од извора активне компоненте. Скенирајућа електронска микроскопија (*SEM*) спреј сушених узорака сем величине односно пречника показала је веома битне карактеристике попут сферичности микроинкапсулата, изгледа површине, постојања пора, пукотина, неравнина, и слично.

Пречник код микроинкапсулата (добијених спреј сушењем) је варирао од 1 до 20 μm са просечном вредношћу од око 4,5 μm за микроинкапсулате екстракта покожице грожђа, и 3 μm за микроинкапсулате екстракта семењаче црне соје.

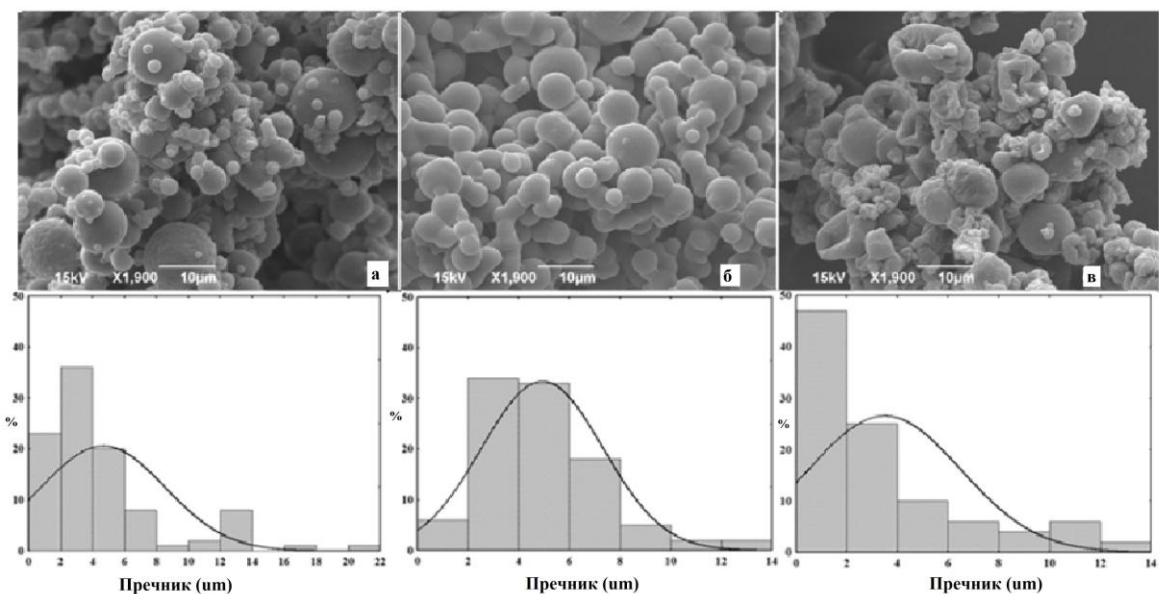
Када је реч о покожици грожђа и одговарајућим микроинкапсулатима добијених помоћу МД, уочена је висока дистрибуција пречника сферних честица, $4.7 \pm 3.9 \mu\text{m}$, глатке површине без видљивих пора односно шупљина.

Сферичност је уочена и код узорака микроинкапсулисних са ГА. Њихов просечан пречник је био $4,9 \pm 2,4 \mu\text{m}$, из чега се може закључити да су честице овог узорка биле занемарљиво веће од микроинкапсулата са малтодекстрином, али и нешто униформније.

Одсуство сферичности је примећено једино код узорака са МП, где је просечна величина честица микроинкапсулата износила $3,5 \pm 3,0 \mu\text{m}$. Такав облик

честица (слика 37в) је готово уобичајен за овај материјал и системе где се користи као носач при спреј сушењу. Требало би имати у виду и то да процес спреј сушења подразумева брзо издвајање воде, као и различиту вредност улазне температуре, што све скупа може утицати на морфологију честица инкапсулата. Не би требало занемарити и чињеницу да МП процес спреј сушења као термичког третмана пролази два пута, при производњи и добијању млека у праху од млека, и при инкапсулаци са одговарајућом активном компонентом. Међутим, основни разлог оваквог изгледа микроинкапсулата требало би тражити у структури носача, пре свега присуству казеина и лактозе. У литератури се могу наћи подаци који указују на чињеницу да су морфолошка својства честица у директној вези са карактеристикама овог носача. Као главни разлози за добијање честица неправилног облика на бази млека при спреј сушењу се наводе утицај атомизације улазног раствора пре сушења али и присуство казеина и његово понашање при сушењу (Bylaitė et al., 2001). Nijdam и Langrish (2006) су слична својства уочили и на млеку у праху спреј сушеном на нижим температурама.

Као што се може видети на слици 37, постоје одступања од нормалне расподеле. Изузетак је узорак приказан под б са ГА, који према Колмогоров-Смирнов тесту нормалности не одступа статистички значајно од нормалне расподеле, за разлику од свих осталих узорака. Ови резултати су у складу са недавно публикованом подацима у којима аутори потврђују најбољу расподелу пречника микроинкапсулата добијених спреј сушењем помоћу арапске гуме, у односу на оне добијене уз додатак полидекстрозе или помоћу гуар гуме (Kuck и Noreña, 2016).



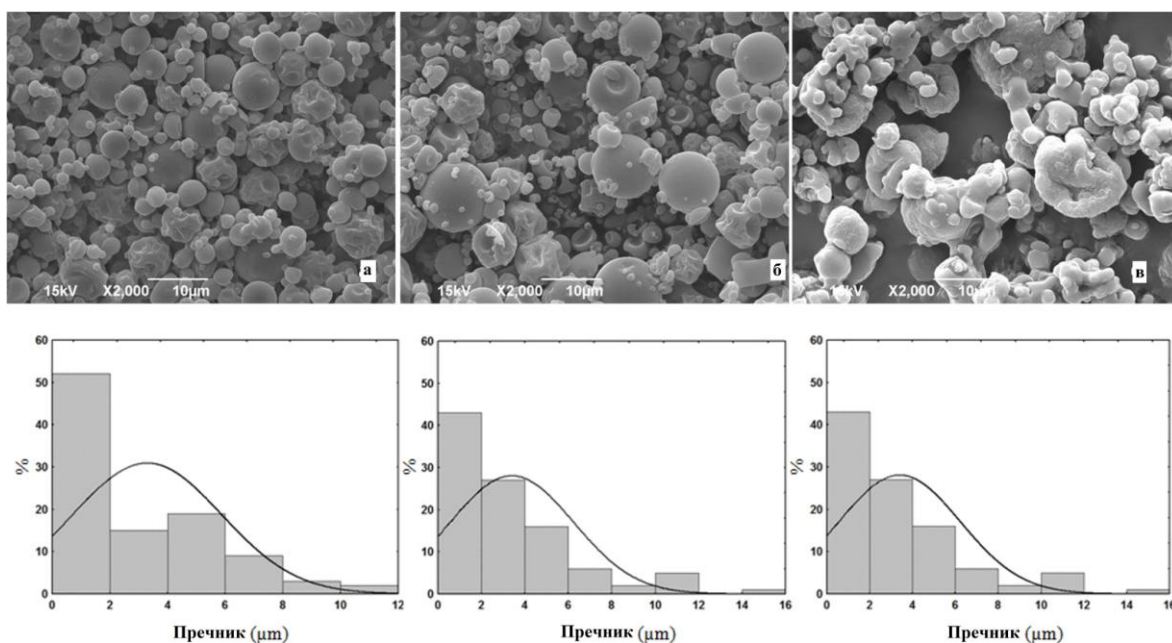
Слика 37. Микроинкапсулати pokožице грождја добијени спреј сушењем са МД (а), ГА (б), МП (в) и дистрибуција њихових пречника, респективно

У истом истраживању, просечан пречник микроинкапсулата на бази ГА је 4,5 μm , а интересантно је да је улазна температура била 140 $^{\circ}\text{C}$, (што је случај и у овој дисертацији), што није тако често примењивана температура код процеса спреј сушења (Kuck и Noreña, 2016).

Када је реч о микроинкапсулатима екстракта семењаче црне соје, није присутна нормална дистрибуција ни са једним типом носача. Микроинкапсулати највећег пречника добијени су са МД и то $3,6 \pm 2,6 \mu\text{m}$, мада су веома сличних димензија били и микроинкапсулати са ГА и то $3,4 \pm 2,8 \mu\text{m}$. Међутим, базирано на мерењима пречника 100 честица микроинкапсулата (слика 38а и 38б) може се запазити да су у случају ова два носача највећи удео чине честице пречника до 2 μm , док је код МП (слика 38в) највећи удео честица пречника од 2 до 4 μm . Такође, код микроинкапсулата на бази МП, просечан пречник микроинкапсулата је $2,8 \pm 1,6 \mu\text{m}$, са израженим одсуством сферичности, као што се показало и у другим узорцима са истим материјалом као носачем (ПМП, слика 37в). Генерално, одступање од нормалне дистрибуције пречника микроинкапсулата је јако слично у свим узорцима

добијеним спреј сушењем, с тим што у случају ГА као носача екстракта покожице грожђа дистрибуција се значајно приближава нормалној.

Када се, уопштено, дискутује о морфолошким карактеристима микроинкапсулата добијених лиофилизацијом димензије честица након лиофилизације нису од пресудног значаја, јер се оне често регулишу накнадно, различитим начином уситњавања/млевења и подешавањем гранулације.



Слика 38. Микроинкапсулати семењаче соје добијени спреј сушењем са МД (а), ГА (б), МП (в) и дистрибуција њихових пречника, респективно

Аутори који су испитивали морфолошке карактеристике инкапсулата добијених лиофилизацијом помоћу малтодекстрина из црног пиринча различитог декстрозног еквивалента (ДЕ), утврдили су да су добијени прахови различитих облика и величина појединачних честица/инкапсулата чак и при коришћењу малтодекстрина истог ДЕ (Laokuldilok и Kanha, 2015). У истој студији истакнуто је да пукотине на површини микроинкапсулата могу допринети (не)стабилности антоцијана током чувања односно складиштења и то конкретно због олакшаног приступа кисеоника. Микроинкапсулати добијени лиофилизацијом у овом раду приказани су на сликама 39 и 40 и немају уочљив велики број пукотина на површини,

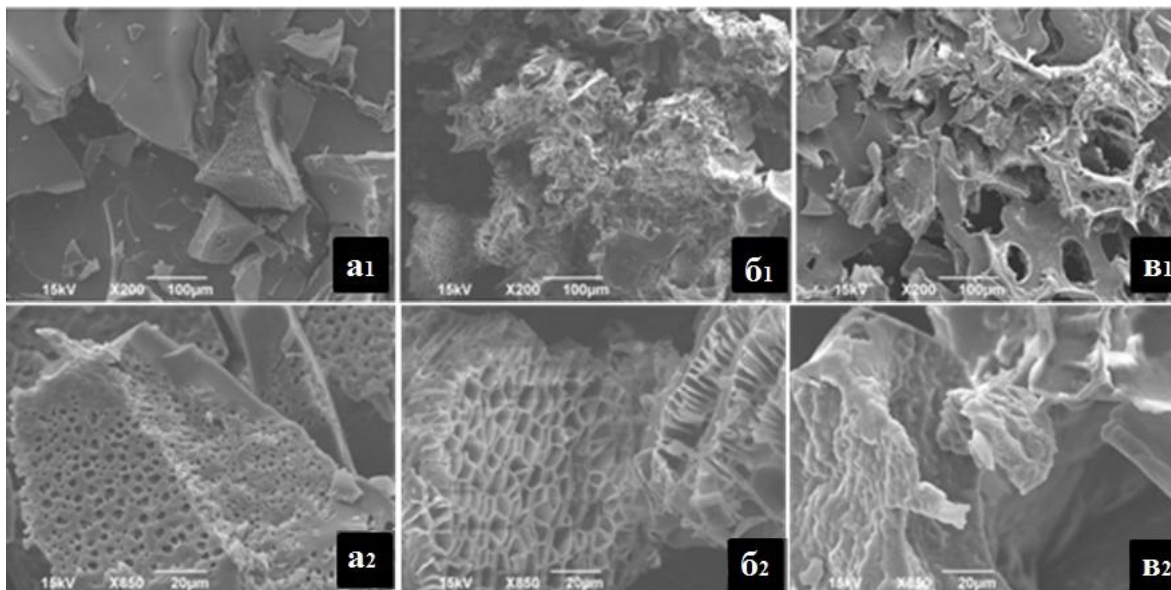
али је свакако њихов облик након уситњавања такав да омогућује контакт активне компоненте са кисеоником и влагом, што је неповољно узимајући у обзир потенцијално негативни утицај ових спољних фактора. Поменуте појаве су посебно уочљиве код микроинкапсулата екстракта покожице грожђа (слика 39).

Када је у питању МД као носач, значајан утицај има ДЕ, те тако у случају ниског ДЕ, односно малтодекстрина са дужим ланцима, он се понаша сличније скробу, односно доприноси вискозности недозвољавајући стварање великих кристала шећера. Са порастом ДЕ, односно веће концентрације ланаца мање молекулске масе, малтодекстрин почиње да се понаша као сируп, спешена је појава тамњења, као и повећање хигроскопности (Celli et al., 2016). Стога би требало фаворизовати малтодекстрине са дужим ланцима када се овај материјал користи као носач инкапсулата добијених лиофилизацијом.

Микроскопска анализа микроинкапсулата добијених лиофилизацијом у овој дисертацији је такође показала да се добијени прахови састоје од честица неправилне структуре, различите величине и порозитета (слика 39). Оно што се може уочити визуелно је да су поре у случају микроинкапсулата на бази МД и ГА прилично уједначених величина. Површина снимљена *SEM*-ом омогућава да се уоче облици и димензије пора унутар појединачног микроинкапсулата. Конкретно, код микроинкапсулата добијених помоћу МД (величине око 50 μm), уочава се сунђераста структура при чему су поре имале просечну дужину око 3 μm , док су код микроинкапсулата на бази ГА, чија структура подсећа на саће, поре биле око 6 μm . Овакви изгледи микроинкапсулата се подударају са доступним литературним подацима (Chranioti и Tzia, 2014; Laokuldilok и Kanha, 2015). Порозитет код микроинкапсулата на бази МП ће бити објашњен даље у тексту.

Harnkarnsujarit и сарадници (2012) су доказали да је димензија пора последица температуре смрзавања, као и величине молекула, односно дужине ланаца коришћених материјала. Како су узорци (смеше екстракта и носача) у овој тези лиофилизовани под истим условима, присуство различитих пора код различитих носача би се могло објаснити дужинама ланаца угљених хидрата. Другим речима, различит састав носача даје са екстрактом активне компоненте мешавине различитог

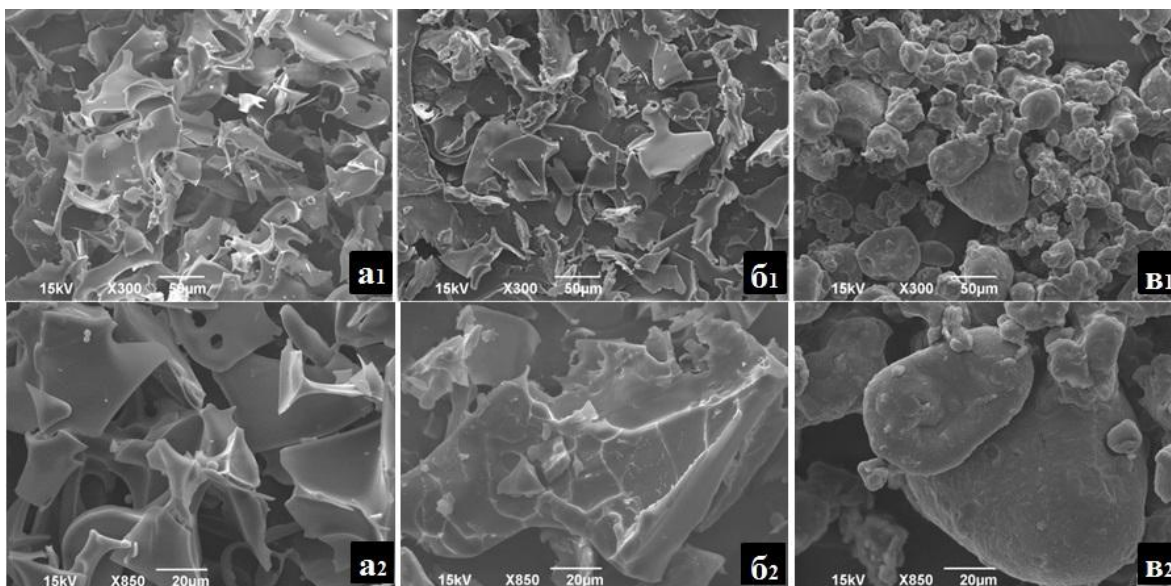
вискозитета, а то пак доприноси различитој количини незамрзнуте воде (Harnkarnsujarit et al., 2012).



Слика 39. Микроинкапсулати покожице грожђа добијени лиофилизацијом са МД (а), ГА (б), МП (в), увећање на *SEM* снимцима 200 (1) и 850 пута (2)

Одсуство уочљивих пора у преосталим узорцима може указивати на тзв. *колапс* структуре и слепљивање током процеса лиофилизације. Ово се највероватније дешава због топљења леда, које је праћено смањењем вискозитета, што коначно доводи до деформације матрикса праћеног губитком порозитета (Celli et al., 2016).

Последице присуства/одсуства пора на карактеристике прахова могу се уочити и у делу 5.2.4, где су презентовани резултати насипне и тапкане густине микроинкапсулата. Међутим, још израженији ефекат се увиђа у резултатима антиоксидативног капацитета (део 5.2.6), где су микроинкапсулати екстракта семењаче црне соје показали значајно виши антиоксидативни капацитет у односу на микроинкапсулате екстракта покожице грожђа, нарочито када су у питању ГА и МП као носачи, који су имали знатно више пора у структури микроинкапсулата.



Слика 40. Микроинкапсулати семењаче соје добијени лиофилизацијом са МД (а), ГА (б), МП (в), увећање на SEM снимцима 300 (1) и 850 пута (2)

Изглед микроинкапсулата на бази МП (слике 39в и 40в) се може приписати кристализацији аморфне лактозе. Узорак који се значајно разликује од свих до сада описаних је приказан на слици 40в. У питању је микроинкапсулат екстракта семењаче црне соје добијен лиофилизацијом помоћу МП као носача. Визуелно је уочљиво да су појединачне честице облих ивица, нема уобичајних кристалних структура типичних за лиофилизате, а може се приметити и тенденција ка агрегацији. Донекле, таква структура може се објаснити понашањем лактозе у различитим условима релативне влажности. Наиме, лактоза може кристалисати у више форми – као α -лактоза монохидрат, као анхидрована β -лактоза, стабилна и нестабилна анхидрована α -лактоза и као анхидрована мешавина α - и β -лактозе у моларном односу 4:1 или 5:3. Ова последња форма је најприсутнија када се употребљава третман лиофилизације млека (Jouppila et al., 1997).

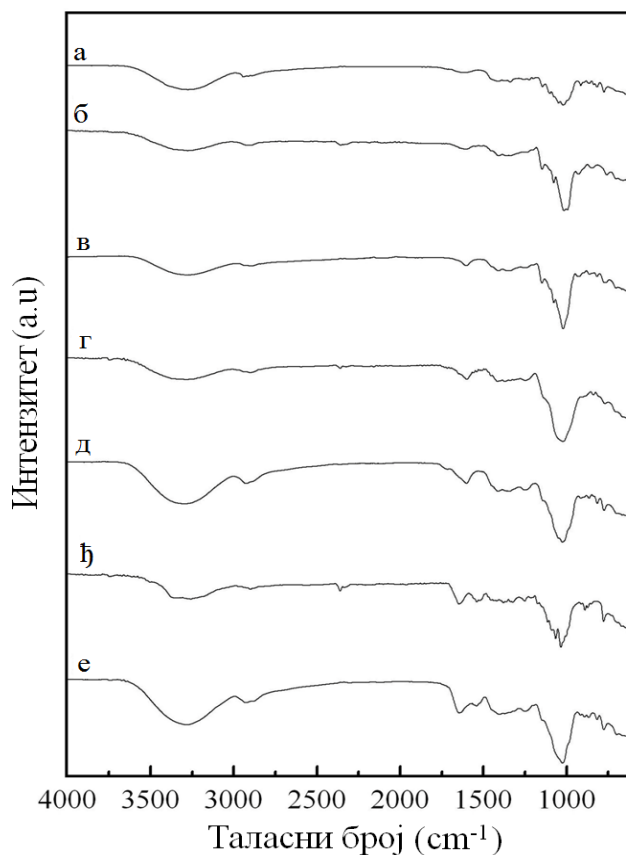
Генерални закључак о микроинкапсулатима добијених лиофилизацијом је да показују аморфну стакласту форму, која се, како наводе различити аутори (Kaushik и Roos, 2007; Laine et al., 2008, Chranioti et al., 2015), сматра адекватном заштитом за инкапсулисана једињења. Веома слични SEM снимци пигмената различитог порекла (цвекла, шафран, куркума, јагода, грожђе и др.) инкапсулисаних лиофилизацијом

помоћу малтодекстрина и арапске гуме су објављени од стране бројних аутора (Laine et al., 2008; Sousdaleff et al., 2013; Chranioti и Tzia, 2014; Khazaei et al., 2014; Chranioti et al., 2015; Kuck и Noreña, 2016).

5.2.1.2 FTIR спектроскопска анализа

Микроинкапсулати су анализирани FTIR спектроскопијом у циљу испитивања потенцијалних хемијских веза између носача и екстраката (активне компоненте). На сликама од 41-44 су дати резултати FTIR спектроскопске анализе, где су под *a* изложени резултати за екстракте који су представљали активне компоненте микроинкапсулата, под *b*, *c* и *d* спектри носача МД, ГА и МП респективно, док су под *e*, *f* и *g* спектри микроинкапсулата на бази поменутих носача.

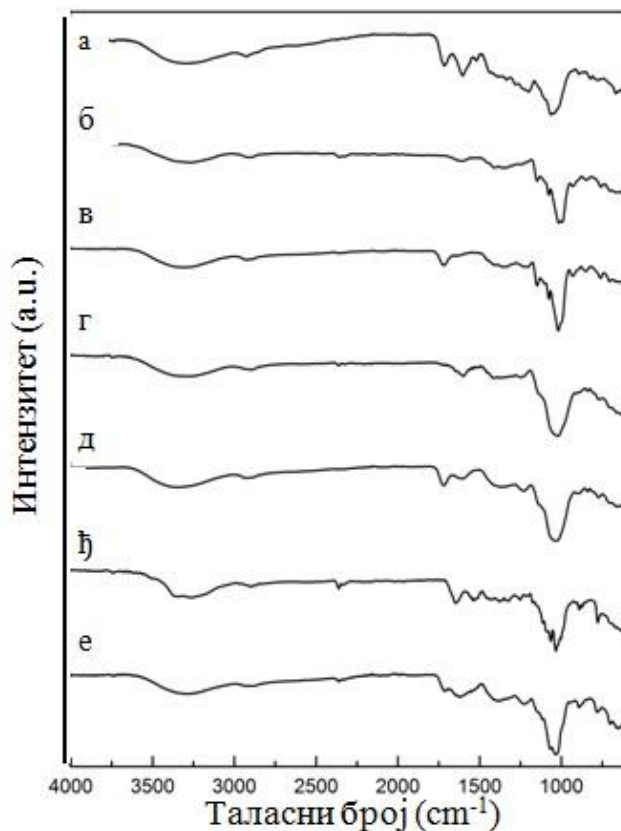
На спектрима се могу уочити широке траке између $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ који се могу приписати –ОН групама, док траке на $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ су последица вибрација С-Н веза (слика 41), што је потврђено од стране више аутора (Banerjee и Chen, 2007; Espinosa-Andrews et al., 2010; Krishnaiah et al., 2012, Wu et al., 2012; Santiago-Adame et al., 2015). Изражена трака на 1022 cm^{-1} која је уочена код свих спектара може бити приписана угљеним хидратима пореклом из покожице грожђа. Око овог пика јавља се више мањих трака које потврђују присуство органских киселина. Бројне траке у опсегу $1600-1200\text{ cm}^{-1}$ су последица присуства фенолних једињења грожђа (de Souza et al., 2015).



Слика 41. *FTIR* спектри екстракта покожице грожђа (а), носача (б, г, њ) и микроинкапсулата добијених спреј сушењем (в, д, е)

FTIR спектри узорака на бази МД (слика 41б, д) имају уочљиве траке у опсегу $1100-900\text{ cm}^{-1}$ који одговарају С-О-С везама. На 1411 cm^{-1} је трака која вероватно потиче од $-\text{CH}_2$ групе. На спектру ГА (слика 41в) идентификовано је неколико типичних пикова за овај носач на 1020 cm^{-1} , као и 1420 cm^{-1} и 1600 cm^{-1} . Први од њих је потврда С-О вибрација (Espinosa-Andrews et al, 2010). Када је реч о МП као носачу (слика 41г) пикови на 1650 cm^{-1} и 1540 cm^{-1} су тзв. амид I и амид II траке, док су они између 1150 cm^{-1} и 1000 cm^{-1} доказ присуства лактозе у носачу (Nicolaou et al., 2010). Спектри носача добијени *FTIR* спектрометријом поновно су приказани и на сликама 42-44 ради једноставнијег поређења са спектрима осталих узорака, односно активних компонената и микроинкапсулата.

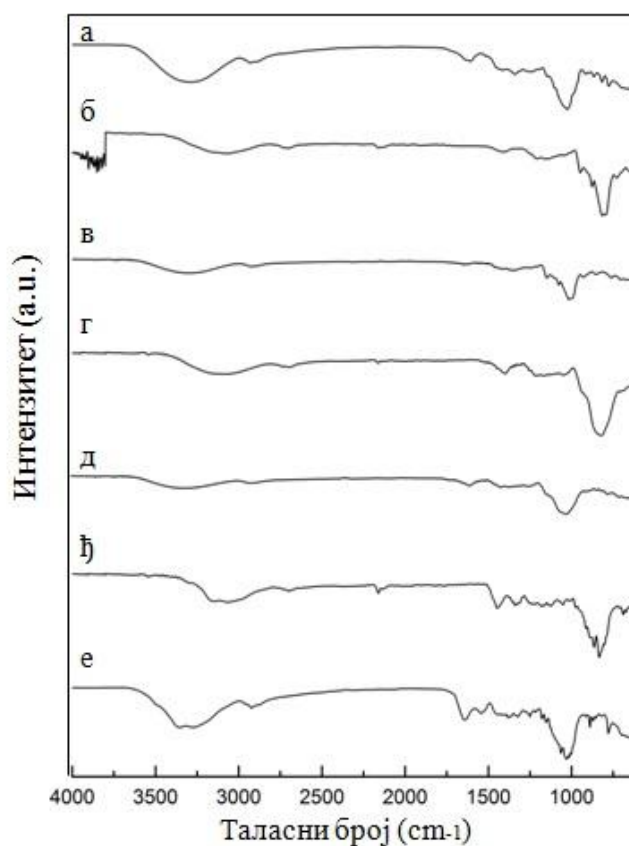
Ова анализа показала је да нема присуства изражених хемијских веза између активних компонената, односно екстракта и носача, што указује да су те мешавине и након спреј сушења задржале постојеће везе остајући физичка вишекомпонентна смеша.



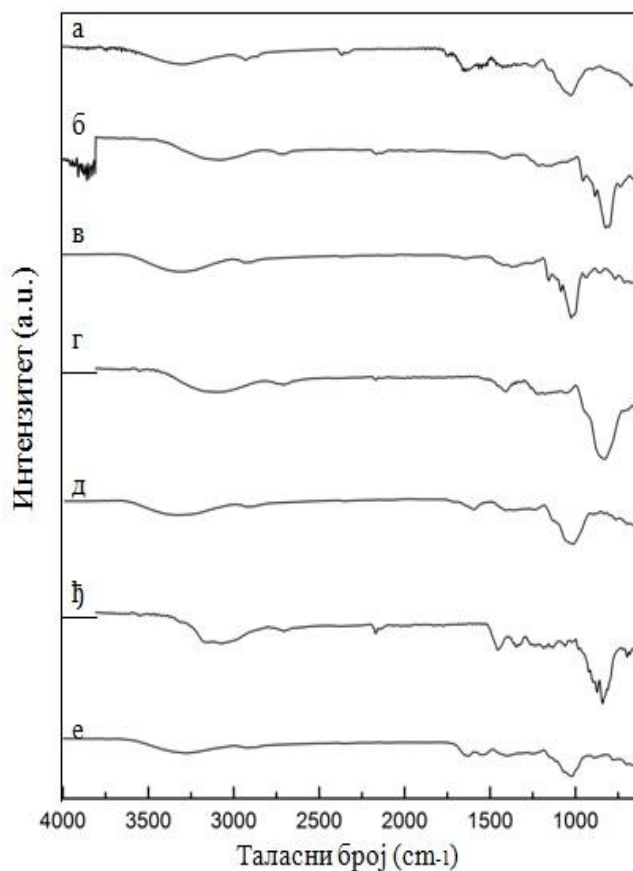
Слика 42. FTIR спектри екстракта семењаче црне соје (а), носача (б, г, ђ) и микроинкапсулата добијених спреј сушењем (в, д, е)

Сам екстракт семењаче црне соје (слика 42а) даје спектар са неколико карактеристичних трака на 1716 cm^{-1} , 1604 cm^{-1} и 1517 cm^{-1} , као и траке у опсегу $1400\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ и $700\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. За све њих се са разлогом претпоставља да су последица присутних фенолних једињења који су окарактерисани и у другим студијама од стране Arancibia-Avila и сарадника (2012) и Pereira и сарадника (2015). Остале везе чији су пикови уочљиви на спектрима су на $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ (ОН групе) и 2927 cm^{-1} (С-Н веза).

На *FTIR* спектрима микроинкапсулата СМД и СГА (слика 42в, д) јасно су уочљиве траке већ описане код носача и екстракта (активне компоненте). Једина разлика се уочава код спектра СМП узорка (слика 42е) где уместо пикова од амида I и II односно млечних протеина, уочавамо нови широк пик на 1620cm^{-1} . Интеракција између млечних протеина и фенолних једињења је комплексно поље истраживања на које су бројни истраживачи покушали да дају објашњења (Ryan and Petit, 2010; Yuksel et al., 2010; Hasni et al., 2011; Kanakis et al., 2011). Неке студије су рецимо, утврдиле да додаток млека може чак и повећати антиоксидативну активност чаја (Sharma et al., 2008). Међутим, у зависности од употребљених метода и техника, постоје различити закључци о томе да ли млеко повећава или смањује активност фенолних једињења. (Dubeau et al., 2010).



Слика 43. FTIR спектри екстракта покожице грожђа (а), носача (б, г, ђ) микроинкапсулата добијених лиофилизацијом (в, д, е)



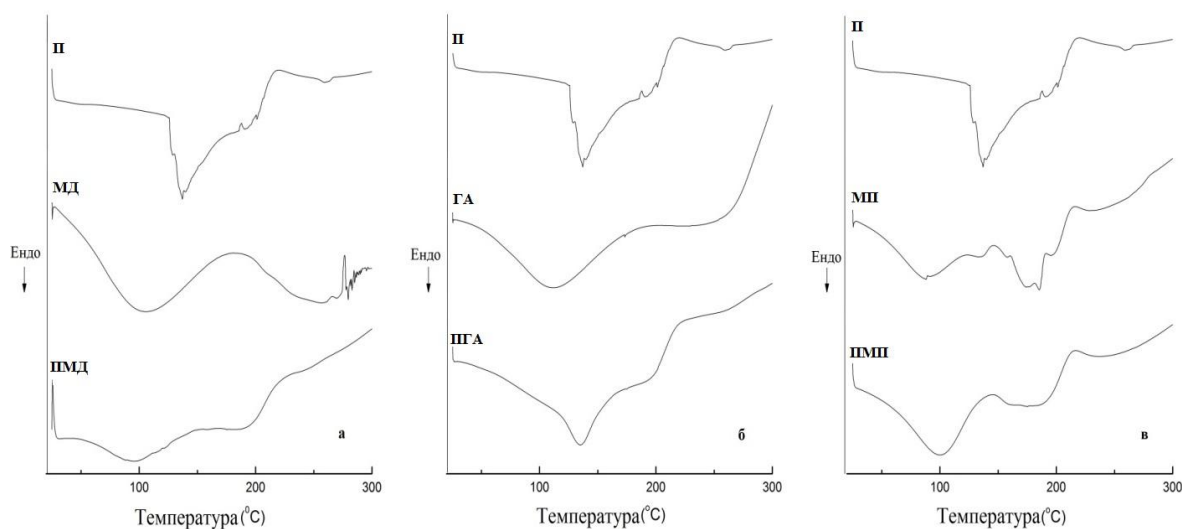
Слика 44. *FTIR* спектри екстракта семењаче црне соје (а), носача (б, г, њ) микроинкапсулата добијених лиофилизацијом (в, д, е)

FTIR спектри микроинкапсулата оба екстракта добијених лиофилизацијом приказани су на сликама 43 и 44. На њима су дати изнова спектри и самих екстраката (слике 43а и 44а) и носача (слике 43б, г, њ и 44б, г, њ), ради једноставнијег поређења, док се појашњења за њих већ предходно у тексту изнета. У даљем тексту биће дискутована само нова опажања на спектрима. Док су код микроинкапсулата СМД (слика 44в) јасно потврђене траке већ описане код носача и екстракта (активне компоненте), разлика се уочава код спектра СГА и СМП микроинкапсулата (слика 44д, е). Код њих уместо горе описаних и уобичајних карактеристичних трака ових носача, уочавамо нове широке траке у опсегу ($1500-1700\text{ cm}^{-1}$). Као што је већ наведено, интеракција између млечних протеина и фенолних једињења је већ потврђена бројним студијама (Ryan and Petit, 2010; Yuksel et al., 2010; Kanakis et al.,

2011; Hasni et al., 2011). Да би се сагледала потпуна слика и донели закључци о интеракцији протеина тј. носача са фенолиним једињењима, посебно оних из семењаче црне соје, потребно је урадити додатна испитивања, пре свега утицаја фенолних једињења на структурна својства протеина.

5.2.1.3 Термичке карактеристике микроинкапсулата

Диференцијална скенирајућа калориметрија (*DSC*) је у овој тези употребљена како би се утврдила термичка стабилност, како појединачних компонената, тако и микроинкапсулата, као и потенцијалне интеракције између компонената. На термограмима приказаним на сликама 45-47 уочава се низ ендотермних и егзотермних пикова, чији су опсези и максикуми анализирани у овом делу дискусије резултата. Ендотермни пикови говоре о појави да узорак користи енергију система то чега најчешће долази при губитку воде или топљењу узорка. Егзотермни пикови говоре о ослобађању енергије, када долази до експанзије и неретко термичке деградације узорака.



Слика 45. *DSC* термограми екстракта покожице грозђа, носача и микроинкапсулата добијених спреј сушењем са МД (а), ГА (б) и МП (в)

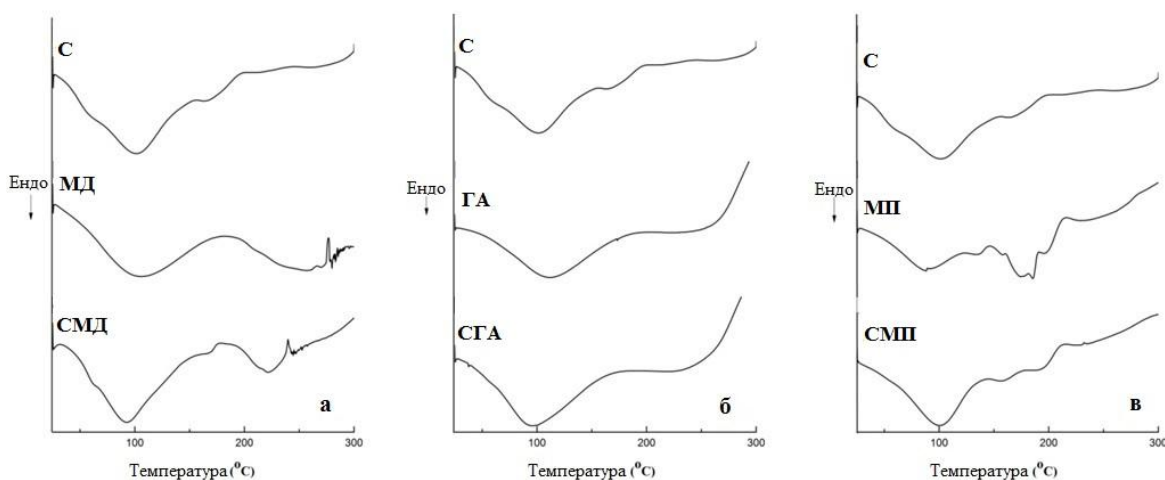
Генерално, на *DSC* термограмима индивидуалних носача се могу уочити широки ендотермни максимуми на око 100 °C, који вероватно потичу од губитка апсорбоване воде (слика 45). Разлике у позицији и интензитету ових максимума се вероватно јављају као последица разлика у садржају воде и хемијским везама и структури материјала у сваком појединачном узорку. Други ендотермни максимум на термограмима носача праћен егзотермним, доказ је процеса топљења и деградација полимера. Ове тврдње су у сагласности са резултатима термогравиметријске анализе малтодекстрина и арапске гуме (Klein et al., 2015), као и млека у праху (Choudhary et al., 2012).

Крива неинкапулисаног екстракта покожице грожђа (П) показује велики ендотермни пик између 125 и 200 °C због губитка кристалне структуре *d*-глукозе и *d*-фруктозе (Lee et al., 2010). Сличан термограм овом екстракту антоцијана су утврдили аутори испитујући екстракт антоцијана добијен од покожице тзв. бразилског грожђа (Santos et al., 2013) и *Bactris guineensis* корозо воћа (Osorio et al., 2010).

Поређењем *DSC* крива свих микроинкапулата, закључује се да је ендотермни пик екстракта покожице грожђа, као и његов максимум најоучљивији на термограму микроинкапулата припремљеног спреј сушењем са ГА као носачем (слика 45б). Мали померај овог максимума ка вишим температурама говори о нешто већој термичкој стабилности оваквих микроинкапулата. Супротно овом примеру, ендотермни максимум микроинкапулата припремљеног са МД (слика 45а) је незнатно померен ка нижим температурама са преклопљеним максимумима индивидуалних састојака слично узорку са МП (слика 45в).

Као што је већ напоменуто, сва три носача карактерише ендотермни максимум на око 100 °C (слика 46). И док је максимум истог код МД и ГА на 106 °C и 112 °C, респективно, последица губитка воде (Zohuriaan и Shokrolahi, 2004; Sousdaleff et al., 2013; Nosari et al., 2015), ендотермни пик код МП је на нижој температури (88 °C). Како је структура млека гледано са хемијског аспекта веома комплексна, није лако детектовати и идентифиовати све термичке процесе и промене. Ендотермни максимум екстракта семењаче црне соје (С) је на око 100 °C, због губитка воде, а егзотермне промене су практично неприметне до 300 °C (слика 46). То уједно говори

о доброј стабилности екстрахованих једињења. Са подизањем температуре, МД и ГА показују други ендотермни максимум који предходи егзотермном на око 250 °С. Та температура одговара температури топљења и деградације ових полимера. Термограми ових носача се слажу са закључцима Klein и сарадника на тему истих носача (Klein et al., 2015). Са друге стране, МП показује вишеструке ендотермне пикове све до 200 °С, док егзотермне промене започињу изнад 250°С. Главни разлог могу бити термичке трансформације протеина млека током спреј сушења, које могу довести до промена у структури протеина, као и генерално термичким својствима овог материјала (Choudhary et al., 2012; Pugliese et al., 2016).



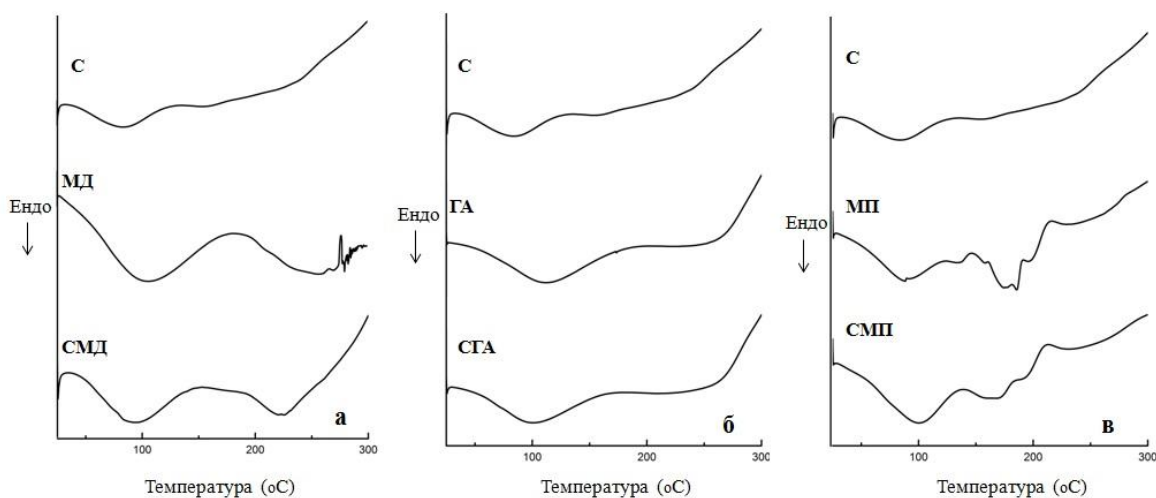
Слика 46. DSC термограми екстракта семрњаче црне соје, празних носача и микроинкапсулата добијених спреј сушењем са МД (а), ГА (б) и МП (в)

Микроинкапсулисани екстракт семењаче црне соје такође показује значајну термичку стабилност, чак и до 300 °С. Поређењем DSC термограма свих микроинкапсулата, може се закључити да је први ендотермни (на око 100 °С) максимум самог екстракта (С) најизраженији на термограму узорка СМП. Померај максимума ка вишим температурама указује на бољу термичку стабилност овог микроинкапсулата. Насупрот овом узорку, ендотермни максимум СМД узорка је незнатно померен ка нижим температурама са преклопљеним максимумима индивидуалних компоненти.

У истом температурном опсегу испитана је и термичка стабилност микроинкапсулата добијених поступком лиофилизације.

Појава више ендотермних максимума у температурном опсегу 130-160 °С код лиофилизованих узорака, него код истих узорака добијених спреј сушењем је веома изражена (слика 47), нарочито код оних на бази МД (слика 47а).

У литератури се за лиофилизате на бази малтодекстрина могу наћи слични подаци када су у питању термичка својства истих (Celli et al., 2016; Laine et al., 2008). Cheuyglintase (2009) је уочила сличне промене у *DSC* термограмима лиофилизоване смеше фруктозе са малтодекстрином. Друга истраживања, пак, указују, да са порастом ДЕ опада температура стакластог прелаза (T_g), што у многеме утиче на понашање лиофилизата МД или микроинкапсулата на бази МД (Celli et al., 2016). Исти аутори дошли су до закључка да снижавање T_g може бити условљено и самим саставом активне компоненте (феноли, органске киселине, моносахариди из екстракта).



Слика 47. *DSC* термограми екстракта семрњаче црне соје, празних носача и микроинкапсулата добијених лиофилизацијом са МД (а), ГА (б) и МП (в)

На слици 47б је приказан *DSC* термограм екстракта семењаче црне соје (С), носача ГА, и микроинкапсулата добијених помоћу ГА (СГА). У поређењу са микроинкапсулатима добијених методом спреј сушења, они добијени

лиофилизацијом, а на бази ГА не показују значајно одступање у термичким својствима. Код узорака на бази млека МП (слика 47в) се у температурном опсегу 120-160 °C уочава један широки ендотермни максимум, док сепојава наредних ендотермних процеса јавља на вишим температурама (~180 °C). Резултати за микроинкапсулате семењаче црне соје добијених лиофилизацијом су показали да је код узорка на бази МД дошло до више промена са повећањем температуре (изнад 200 °C), док код узорка на бази МП нису уочене драстичне промене на *DSC* термограму на вишим температурама.

Уочене промене у термичким својствима микроинкапсулата добијених лиофилизацијом могу бити последица начина припреме узорака и промена услед самог процеса лиофилизације. Такође, подједнако значајан узрок може бити неуједначени састав или структура узорака, а пре свега неуједначена величина/димензија појединачних честица након лиофилизације, односно уситањавања у прах (Celli et al., 2016).

Резултати ове анализе показују да испитани прахови (добијени помоћу обе технике микроинкапсулације) показују добру термичку стабилност када је у питању опсег битан за прехранбене процесе односно производњу хране.

5.2.1.4 Остале физичке карактеристике микроинкапсулата

У оквиру овог дела изложени су резултати анализа микроинкапсулата важни за њихову практичну примену као прахова, с обзиром на њихову форму након процеса микроинкапсулације. У питању су, пре свега, вредности активности воде, која нужно мора бити ниска како би производи били стабилни, слабо подложни кварењу и микробиолошкој активности. Поред тога, од велике важности су и вредности растворљивости микроинкапсулата, јер је у прехранбеној индустрији у већини случајева, пожељно брзо растварање под захтеваним условима. Такође, ради поређења економске оправданости коришћења спреј сушења или лиофилизације, као и ради поређења овде испитиваних сировина, урађена је и анализа приноса микроинкапсулата након процеса инкапсулације. Резултати тих анализа су приказани

у табелама 16 и 17. Добијеним микроинкапсулатима одређена је и насипна и тапкана густина и израчунат индекс компресибилности (CI) и Хауснеров однос (HR). Резултати тих анализа су дати у табелама 18 и 19. Ово су параметри који нам говоре о технолошким својствима прахова, у овом случају микроинкапсулата и важни су са аспекта будуће примене, али и за складиштење и транспорт микроинкапсулата. Наиме, из ових вредности се може закључити да ли прах заузима велику запремину, односно простор, да ли мења те вредности (да ли се компресује) при померању паковања унутар складишта/магацина, или при превозу, као и каква је проточност, што је посебно важно код дозирања.

Растворљивост је физичко-хемијско својство прахова, у овом истраживању микроинкапсулата, да са адекватном запремином воде формирају растворе. У овом раду, утврђена је веома висока вредност растворљивости за све узорке, нарочито оне добије техником спреј сушења (табела 16).

Када је реч о микроинкапсулатима добијеним спреј сушењем екстракта покожице грожђа, најнижа вредност растворљивости је била за узорак са МП 89,4% , затим 91,9% за узорак са ГА и највиша за прахове добијене са МД 94,8%. У случају екстракта семењаче црне соје, редослед је идентичан, растворљивост СМП микроинкапсулата је била 80,3%, СГА 89,3%, а СМД 94,3%. Веома слични резултати су добијени и од стране других аутора, рецимо у случају малтодекстрина и покожице грожђа (de Souza et al., 2015), као и истог носача и манга (Cano-Chauca et al., 2005). Şahin-Nadeem и сарадници (2013) су за малтодекстрин и арапску гуму као носаче спреј сушеног екстракта жалфије добили веома високу растворљивост, сличну вредностима добијеним за микроинкапсулате у овој тези. У истој студији утврдили су да је активност воде за поменуте узорке била око 0,25, што је у апсолутној сагласности са резултатима добијеним у овој дисертацији за микроинкапсулате екстракта покожице грожђа (0,24 - 0,28) и микроинкапсулата екстракта семењаче соје (0,31 - 0,33) (табела 16). Како су свеукупно микроинкапсулати имали веома ниску активност воде, са вредностима око 0,30, може се рећи да представљају микробиолошки стабилан састојак за различите намене.

Принос ових микроинкапсулата је варирао од 65,9% до 80,9% за микроинкапсулате екстракта покожице грожђа, и од 63,7% до 77,0%, код микроинкапсулата екстракта семењаче соје, тако да значајних разлика на основу извора активне компоненте није било. Принос остварен помоћу МД као носача (71,2%) екстракта семењаче је у високој корелацији са резултатима добијеним у студијама Laokuldilok и Kanha (2015) за екстракте богате антоцијанима инкапсулисане истим носачем ГА је дала резултат који представља добар принос (65,9%, односно 63,7%) и јако сличан оном добијеном од стране Fazaeli и сарадника (2012) који су се бавили спреј сушењем сока црног дуда, користећи исти носач. Највећи принос у случају екстракта семењаче соје остварен је са МП као носачем. Сличне закључке су објавили и други истраживачи коју су поредили носаче са богате млечним протеинима са другим материјалима (Belščak-Cvitanović et al., 2015).

Табела 16. Активност воде, растворљивост и принос микроинкапсулата произведених техником спреј сушења

Узорак	a_w	Растворљивост (%)	Принос (%)
ПМД	$0,257 \pm 0,05^a$	$94,81 \pm 0,18^a$	$80,9 \pm 1,2^a$
ПГА	$0,242 \pm 0,002^b$	$91,90 \pm 0,12^b$	$65,9 \pm 1,6^b$
ПМП	$0,282 \pm 0,003^c$	$89,40 \pm 0,19^c$	$75,3 \pm 2,5^c$
СМД	$0,328 \pm 0,001^a$	$94,29 \pm 0,14^a$	$71,2 \pm 3,4^a$
СГА	$0,309 \pm 0,001^b$	$89,31 \pm 0,20^b$	$63,7 \pm 9,5^a$
СМП	$0,326 \pm 0,001^{ab}$	$80,29 \pm 0,27^c$	$77,0 \pm 2,0^a$

П-екстракт покожице грожђа, С-екстракт семењаче соје, са малтодекстрином (МД), гумом арабиком (ГА) и млеком у праху (МП) a_w вредност је мерена на $\sim 25^\circ\text{C}$

За узорке добијене техником лиофилизације (табела 17) може се рећи да су се показали још стабилнијим, са вредностима активности воде од 0,19 до 0,26, што се сматра екстремно ниским вредностима које онемогућавају раст и развој микроорганизама. Према литературним изворима, ксерофилним плеснима и

осмофилним квасцима је неопходна вредност минимум 0,60 за раст и развој, док за већину бактерија она мора бити изнад 0,90 (Vereš, 2004).

Док резултати за микроинкапсулте добијене лиофилизацијом на бази МД и ГА, у значајној мери прате оне добијене спреј сушењем, узорци са МП у многоне одступају. Наиме, вредности растворљивости за све микроинкапсулате се углавном крећу око 90%, с тим да је лиофилизован узорак на бази МП имао растворљивост од око 65%. То донекле може бити објашњено и морфологијом микроинкапсулата. Наиме, на *SEM* фотографијама узорака (део 5.2.1), могу се запазити да узорци на бази МД и ГА показују изразите шупљине и поре, тј. растреситу структуру, док су они на бази МП компактнији и без пукотина, празнина и сличних формација које би помогле продирање воде и олакшале растварање. Наравно, требало би имати на уму да метода којом је одређивана растворљивост не подразумева коришћење загрејане воде, која би вероватно показала другачији ефекат и самим тим вероватно више вредности растворљивости чак и у случају узорака на бази МП.

Табела 17. Активност воде, растворљивост и принос микроинкапсулата произведених техником лиофилизације

Узорак	a_w	Растворљивост (%)	Принос (%)
ПМД	$0,203 \pm 0,002^a$	$92,23 \pm 0,27^a$	$91,0 \pm 2,1^a$
ПГА	$0,190 \pm 0,001^b$	$89,37 \pm 1,27^b$	$84,9 \pm 3,2^b$
ПМП	$0,224 \pm 0,001^c$	$65,26 \pm 0,95^c$	$92,8 \pm 3,1^a$
СМД	$0,261 \pm 0,001^d$	$91,70 \pm 1,14^a$	$90,1 \pm 1,4^a$
СГА	$0,236 \pm 0,001^{c,d}$	$87,73 \pm 0,97^b$	$88,9 \pm 2,1^c$
СМП	$0,245 \pm 0,004^{c,d}$	$65,30 \pm 1,24^c$	$91,0 \pm 3,0^a$

П-екстракт покожице грожђа, С-екстракт семењаче соје, са малтодекстрином (МД), гумом арабиком (ГА) и млеком у праху (МП) a_w вредност је мерена на $\sim 25^\circ\text{C}$

Поређењем добијених вредности за принос (табеле 16 и 17) уочава се да техника лиофилизације значајно већи принос (око 20% виши у односу на спреј

сушење). Међутим, основна мана лиофилизације је цена сушења, која доста лимитира ширу примену ове технике инкапсулацију.

У табелама 18 и 19 презентовани су резултати насипне и тапкане густине, као и индекса компресибилности и Хауснеровог односа за микроинкапсулате. У поређењу са насипном масом самих носача, насипна маса испитиваних микроинкапсулата је била нижа у просеку за око 57% у случају спреј сушења. Када је у путању лиофилизација добијени прахови су имали вишу насипну масу од носача и то 6,0% (ГА) и 40,5% (МП). Само је МД дао незнатно нижу вредност од 4,0%. Добијене вредности указују да су микроинкапсулати добијени спреј сушењем знатно погоднији са технолошког аспекта.

Такође, додаток екстракта покожице грожђа (П) је имао значајан утицај на вредности *HR* и *CI* параметара, односно проточност микроинкапсулата/прахова (табела 18). Прецизније говорећи, за спреј сушене прахове на бази ГА, *HR* и *CI* параметри су снижени за 9,6% и 41,3%, респективно. Добијене вредности указују на добру проточност прахова.

Табела 18. Насипна и тапкана густина, индекс компресибилности и Хауснеров однос микроинкапсулата добијених спреј сушењем

Узорак	Насипна густина (g/mL)	Тапкана густина (g/mL)	<i>CI</i> (%)	<i>HR</i>
ПМД	0,21 ± 0,02 ^a	0,31 ± 0,01 ^a	30,0±1,0 ^a	1,43±0,01 ^a
ПГА	0,30 ± 0,03 ^b	0,36 ± 0,03 ^a	12,0±1,7 ^b	1,14±0,01 ^b
ПМП	0,16 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,02 ^b	20,0±2,0 ^c	1,25±0,02 ^c
СМД	0,23 ± 0,04 ^a	0,26 ± 0,00 ^b	25,0±1,0 ^d	1,33±0,03 ^d
СГА	0,19 ± 0,02 ^a	0,25 ± 0,00 ^b	28,0±2,0 ^a	1,39±0,05 ^a
СМП	0,18 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,02 ^b	18,8±0,5 ^c	1,23±0,03 ^c

П-екстракт покожице грожђа, С-екстракт семењаче соје, са малтодекстрином (МД), гумом арабицом (ГА) и млеком у праху (МП)

Најмању разлику у овим вредностима између носача и одговарајућег микроинкапсулата је показао МП, при чему су микроинкапсулати на бази овог носача такође имали задовољавајуће карактеристике. Када је у питању узорак са МД, вредности су повишене за 6,0% и 16,3%, респективно, указујући на слабију проточност оваквих прахова. Код спреј сушених инкапсулата семењаче црне соје (С), најбоље карактеристике су постигнуте са МП, прихватљиве са МД, а слабије, и уједно најлошије са ГА.

Након микроинкапсулације лиофилизацијом *HR* и *CI* параметри микроинкапсулата су имали такве вредности да узорак на бази ГА сврставају у прахове са задовољавајућом проточношћу, док су узорци који спадају у категорију прахова са одличном проточношћу микроинкапсулати добијени лиофилизацијом помоћу МД и МП (табела 19).

Табела 19. Насипна и тапкана густина, индекс компресибилности и Хауснеров однос микроинкапсулата добијених лиофилизацијом

Узорак	Насипна густина (g/mL)	Тапкана густина (g/mL)	<i>CI</i> (%)	<i>HR</i>
ПМД	0,56 ± 0,04 ^a	0,59 ± 0,03 ^a	10,0±0,6 ^a	1,11±0,02 ^a
ПГА	0,71 ± 0,05 ^b	0,91 ± 0,05 ^b	21,43±2,1 ^b	1,27±0,03 ^b
ПМП	0,67 ± 0,04 ^b	0,71 ± 0,04 ^c	6,67±0,7 ^a	1,07±0,01 ^a
СМД	0,41 ± 0,04 ^a	0,47 ± 0,05 ^a	11,08±0,6 ^c	1,12±0,02 ^c
СГА	0,47 ± 0,05 ^a	0,57 ± 0,06 ^a	18,34±2,1 ^d	1,22±0,03 ^d
СМП	0,40 ± 0,06 ^a	0,49 ± 0,04 ^a	8,76±0,7 ^a	1,09±0,01 ^a

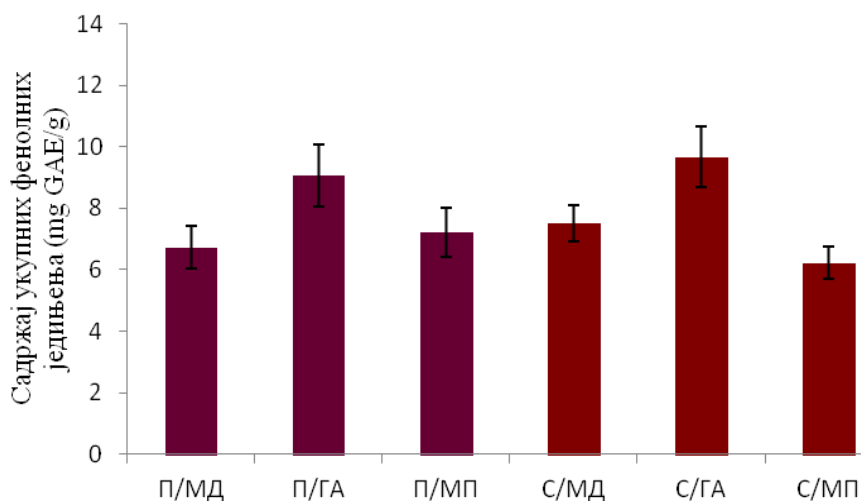
П-екстракт покожице грожђа, С-екстракт семењаче соје, са малтодекстрином (МД), гумом арабиком (ГА) и млеком у праху (МП)

5.2.1.5 Садржај укупних фенолних једињења, укупних и индивидуалних антоцијана

Као што је приказано на сликама 48 и 49, садржај укупних фенола је био у опсегу од 6,22 до 9,66 mg GAE/g за микроинкапсулате добијене спреј сушењем, и 5,81 до 11,57 mg GAE/g за оне добијене лиофилизацијом. Највећи садржај укупних фенола, када су у питању обе примењене технике микроинкапсулације је код узорака који су добијени са ГА као носачем, а најнижи код узорака који су као носач имали МП, са сататистички значајном разликом од микроинкапсулата са МД. Утицај примењене технике микроинкапсулације на садржај укупних фенола микроинкапсулата соје није био статистички значајан. Претпоставка је да је томе допринео и одабир температуре током спреј сушења, с обзиром да се ишло на минималну температуру која даје прахове задовољавајућих карактеристика. Наиме, са повећањем улазне температуре, расте и излазна температура која негативно утиче на састав и концентрацију биоактивних једињења (Kalušević et al, 2016b; Murali et al., 2015).

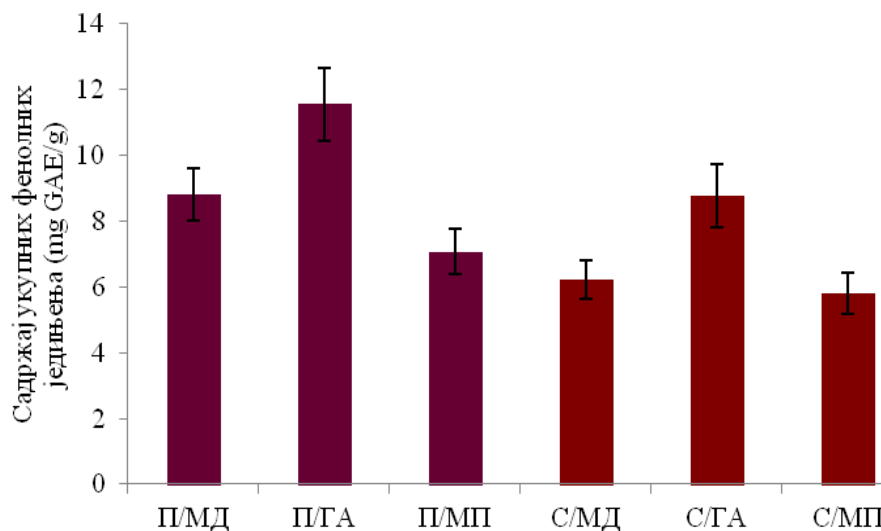
Утицај сировине као извора фенолних једињења је био статистички значајан ($p < 0,05$), као и међусобне интеракције извор-носач и извор техника. Истовремена међусобна интеракција сва три фактора на садржај фенолних једињења у микроинкапсулатима је, такође, био значајан.

Садржај укупних фенолних једињења одређиван *Folin-Ciocolteu* реагентом није апсолутно селективан. Другим речима, до реакције са њим (и промене боје из жуте у плаву) не долази само у контакту са фенолним једињењима, већ и шећерима, производима Мајардове реакције, протеинима и другим једињењима, које су дефинитивно присутне у анализираним узорцима (Wang et al., 2011; Žilić et al., 2016b).



Слика 48. Садржај укупних фенолних једињења у микроинкапсулатима добијених спреј сушењем

У прилог томе иде и резултат ове анализе на чистим носачима, тзв. празним микроинкапсулатима, где је у случају ГА и МП дошло до реакције са реагенсом (1,81 и 2,74 mg GAE/g, респективно), док је МД био потпуно неутралан (0,04 mg GAE/g).



Слика 49. Садржај укупних фенолних једињења у микроинкапсулатима добијених лиофилизацијом

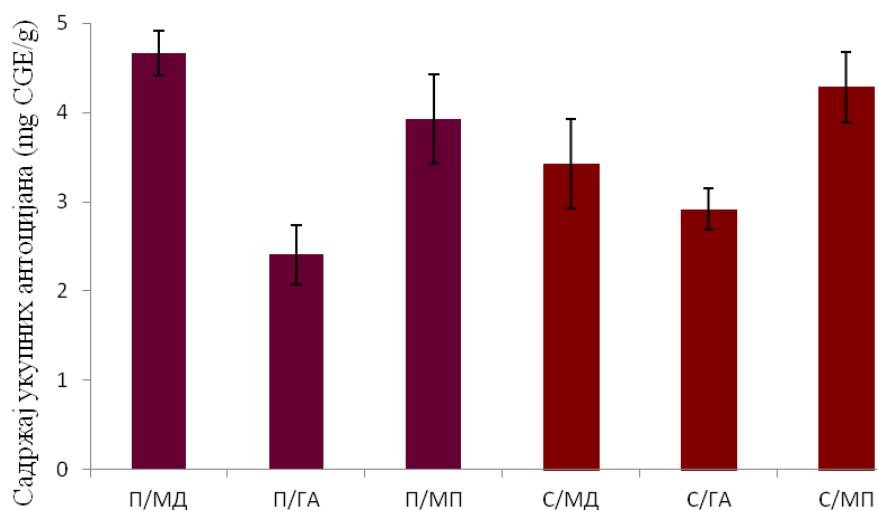
Садржај укупних антоцијана код празних микроинкапсулата није одређиван, јер се подразумевало да нема присуства истих у саставу ни једног коришћеног носача. Антоцијани у микроинкапсулатима су одређивани хроматографски (HPLC) и спектрофотометријски (TAC). Обе коришћене методе за одређивање садржаја антоцијана у микроинкапсулатима су показале да најнижу концентрацију антоцијана имају микроинкапсулати на бази ГА, а међу њима најмању вредност је показао узорак СГА добијен лиофилизацијом (1,72 mg CGE/g).

Ово се лако уочава и на сликама 50 и 51 које показују резултате спектрофотометријске анализе. Тај резултат иде у прилог резултатима испитивања отпуштања антоцијана из микроинкапсулата које је било најспорије са ГА као носачем у различитим медијумима о којима ће даље у тексту бити реч (део 5.2.7).

Резултат трофакторијалне статистичке анализе показала је да постоји значајан утицај сваког појединачног фактора (сировина, носач, техника) на садржај антоцијана, као и њихова истовремена међусобна интеракција (сировина*носач*техника) (Прилог III, табела1).

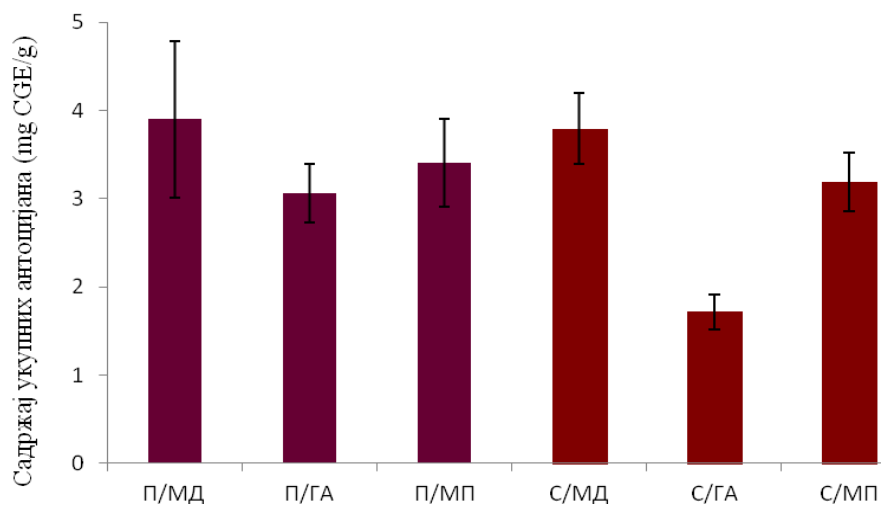
Требало би имати у виду и ефекат повишене температуре на антоцијане код примене спреј сушења у односу на лиофилизацију. Међутим, тест укупне антиоксидативности (*QUENCHER*) показао је највишу вредност баш у овом узорку (добијеном спреј сушењем). Стога би се овај резултат могао објаснити непотпуном екстракцијом антоцијана из микроинкапсулата на бази ГА у закишељеним растварачима коришћеним у хроматографској и спектрофотометријској анализи.

Без обзира на извор антоцијана (покожица грожђа и семењаче соје) и коришћене технике инкапсулације, микроинкапсулати добијени помоћу МД као носача су показали највећи садржај укупних мономерних антоцијана.



Слика 50. Садржај укупних антоцијана у микроинкапсулатима добијених спреј сушењем

Такође, ови резултати су у сагласности и са резултатима у табелама 3 и 4 из дела 5.1.4, у којима се може видети да микроинкапсулати на бази МД имају највећу растворљивост (већу од 90%), независно од примењене технике и извора активне компоненте.



Слика 51. Садржај укупних антоцијана у микроинкапсулатима добијених лиофилизацијом

Део резултата који се односе на садржај антоцијана код микроинкапсулата добијених лиофилизацијом може бити објашњен такође растворљивошћу, која је

непотпуна, нарочито у случају МП. Сви микроинкапсулати су имали нижу растворљивост у лиофилизованом облику, у односу на микроинкапсулате добијене спреј сушењем.

У микроинкапсулатима екстракта покожице грожђа преовладавао је садржај антоцијана малвидин-3-глукозида (табела 20), а детектовани су још цијанидин-3-глукозид, петунидин-3-глукозид и делфинидин-3-глукозид. У свим микроинкапсулатима екстракта семењаче црне соје доминантан антоцијан је био цијанидин-3-глукозид (табела 21), а детектовани су још пеларгонидин- и делфинидин-3-глукозид. Ово су уједно три доминантна антоцијана црне соје која су истом техником (*HPLC*) потврђена и у другим истраживањима (Koh et al., 2014).

Табела 20. Садржај индивидуалних антоцијана у микроинкапсулатима екстракта покожице грожђа ($\mu\text{g/g}$)

Техника	Спреј сушење			Лиофилизација		
	Антоцијани	ПМД	ПГА	ПМП	ПМД	ПГА
Цијанидин-3-глукозид	52,6 ± 2,9	21,9 ± 1,1	32,8 ± 3,1	28,4 ± 1,2	нд	87,9 ± 4,5
Делфинидин-3-глукозид	176,8 ± 10,0	64,0 ± 5,5	123,0 ± 10,1	16,8 ± 2,1	116,8 ± 2,1	78,4 ± 6,5
Малвидин-3-глукозид	4240,0 ± 25,5	2008,5 ± 20,6	3330,2 ± 20,5	3620,2 ± 21,5	2590,9 ± 22,1	2955,0 ± 18,8
Пеларгонидин-3-глукозид	нд ¹	нд	нд	нд	нд	нд
Петунидин-3-глукозид	595,2 ± 9,5	249,5	454,2 ± 13,0	237,6 ± 15,5	375,0 ± 14,0	343,8 ± 14,1
Цијанидин-3,5-диглукозид	нд	нд	нд	нд	нд	нд

¹нд-није детектованТабела 21. Садржај индивидуалних антоцијана у микроинкапсулатима екстракта семењаче соје ($\mu\text{g/g}$)

Техника	Спреј сушење			Лиофилизација		
	Антоцијани	СМД	СГА	СМП	СМД	СГА
Цијанидин-3-глукозид	3174,5 ± 19,5	2600,5 ± 25,6	3962,5 ± 32,8	2983,2 ± 30,5	1550,5 ± 20,1	3624,9 ± 28,8
Делфинидин-3-глукозид	19,8 ± 2,0	нд	18,0 ± 1,1	35,8 ± 3,1	нд	нд
Малвидин-3-глукозид	нд	нд	нд	нд	нд	нд
Пеларгонидин-3-глукозид	226,9 ± 8,5	320,9 ± 10,0	320,5 ± 9,3	170,8 ± 10,5	165,8 ± 5,5	225,1 ± 10,3
Петунидин-3-глукозид	нд	нд	нд	нд	нд	нд
Цијанидин-3,5-диглукозид	нд	нд	нд	нд	нд	нд

¹нд-није детектован

5.2.1.6 Антиоксидативни капацитет микроинкапсулата

5.2.1.6.a Антиоксидативни капацитет одређен директним методом

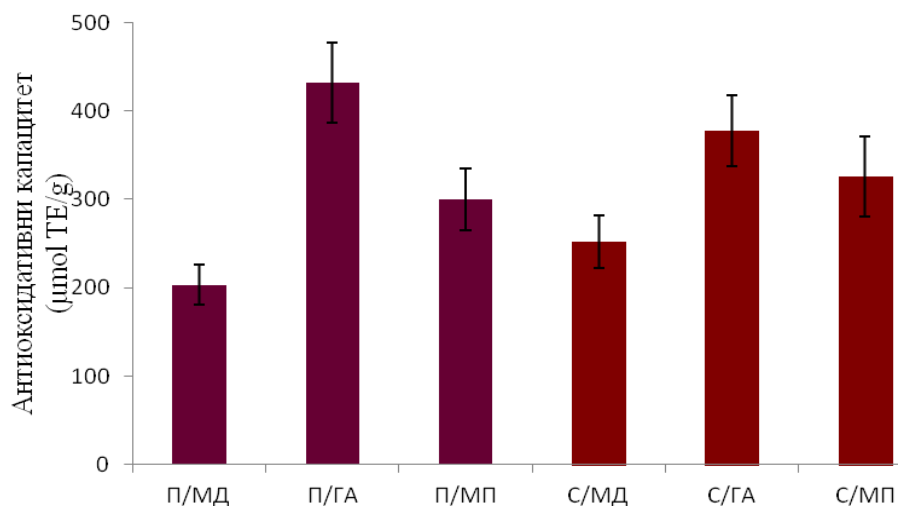
Укупна антиоксидативни капацитет је одређена спектрофотометријски директним *QUENCHER_{ABTS}* методом, како у микроинкапсулатима, тако и узорцима носача, а изражена је у *Trolox* еквивалентима по граму микроинкапсулата (ТЕ).

Носачи су били различитог антиоксидативног потенцијала (0,6-75,5 $\mu\text{mol TE/g}$). За МД (0,6 $\mu\text{mol TE/g}$) се може рећи да практично не показује антиоксидативни потенцијал, што одговара и резултатима других истраживача који су истраживали утицај различитих носача на антиоксидативност микроинкапсулата добијених спреј сушењем (Gandía-Herero et al., 2010, Gil et al., 2014). Одавде следи закључак да антиоксидативност свих микроинкапсулата на бази МД готово искључиво потиче од активне компоненте, односно екстракта.

Највиши антиоксидативни потенцијал међу носачима је показао МП. Антиоксидативност млека и казеина је потврђена у многим студијама (Cervato et al., 1999; Sharma et al., 2008; Žilić et al., 2012; Barać et al., 2015). Резултати добијени за носаче ГА (68,8 $\mu\text{mol TE/g}$) и МП (75,5 $\mu\text{mol TE/g}$) могли би бити приписани и антиоксидативној активности меланоидина, формираних Мајардовом реакцијом, захваљујући присуству шећера и протеина (као компонентата унутар самих носача) и повишеној температури током процеса спреј сушења (Wang et al., 2011).

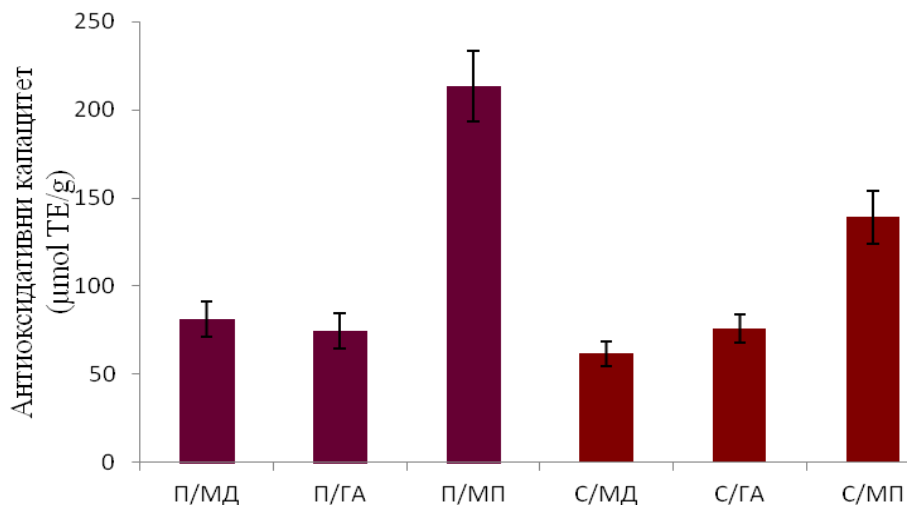
Када је реч о микроинкапсулатима покожице грожђа (П) и семењаче соје (С) добијених спреј сушењем, њихова укупна антиоксидативност се кретала у опсегу од 203,3 до 432,1 и од 252,9 до 378,3 $\mu\text{mol TE/g}$, респективно (слика 52). У ПМД и СМД узорку, односно микроинкапсулатима на бази МД, антиоксидативни потенцијал у потпуности зависи од садржаја антоцијана, али и других фенолних једињења присутних у екстракту.

У зависности од технике вредности су статистички значајно варирале у корист спреј сушења као технике која даје микроинкапсулате вишег антиоксидативног капацитета.



Слика 52. Укупни антиоксидативни капацитет микроинкапсулата добијених спреј сушењем одређен $QUENCHER_{ABTS}$ методом

Фенолна једињења су јако осетљива на повишене температуре, тако да би виша улазна температура током спреј сушења вероватно довела до деградације, па самим тим и ниже антиоксидативности у односу на оне произведене на нижој температури (Kalušević et al., 2016b). Ове претпоставке су потврђене и резултатима истраживања Laokudilok и Kanha (2016) који су произвели екстракт богат антоцијанима техникама спреј сушењем на различитим температурама.



Слика 53. Укупни антиоксидативни капацитет микроинкапсулата добијених лиофилизацијом одређен $QUENCHER_{ABTS}$ методом

Највиши потенцијал међу овим микроинкапсулатима показали су ПГА, па затим СГА, односно они на бази ГА као носача. Делимично, та вредност је висока због активности једињења којим је екстракт покожице, односно семењаче богат, а делимично захваљујући присуству меланоидина. Наиме, меланоидини су у различитим студијама показали значајну антиоксидативну активност (Žilić et al., 2016b), те ни у овде добијеним резултатима њихове ефекат на укупну антиоксидативност се не сме занемарити. Важно је поменути и чињеницу да антиоксидативни капацитет у неком систему (нпр. микроинкапсулат) није збир антиоксидативних капацитета свих једињења која улазе у састав тог система. Нека једињења појединачно могу испољавати нижи или виши антиоксидативни капацитет, али у систему укупни капацитет у многоме зависи од интеракција између појединих компоненти.

У случају микроинкапсулата добијених лиофилизацијом (слика 53), код узорка на бази МП, а нарочито код узорка СМП, значајан део укупне антиоксидативне активности се може приписати и самом носачу. Поједине студије су потврдиле да додатак млека, рецимо чају, повећава или стабилизује антиоксидативну активност самог чаја (Sharma et al., 2008).

Између вредности антиоксидативне активности микроинкапсулата добијених помоћу поменуте директне *QUENCHER_{ABTS}* методе и методе са *DPPH* реагенсом постоје веома високи коефицијенти корелације ($r = 0,91$ (П) и $r = 0,98$ (С)). Иако различита једињења могу имати другачије афинитете према различитим реагенсима, обе поменуте методе потврђују да су микроинкапсулати на бази ГА показали највиши антиоксидативни капацитет међу свим испитиваним спреј сушеним узорцима.

Горе поменути антиоксидативни потенцијал МП као носача је још више истакнут у резултатима за микроинкапсулате произведене лиофилизацијом. Наиме, микроинкапсулати на бази МП су показали значајно вишу укупну антиоксидативност у односу на друге носаче, без обзира на извор активне компоненте. Конкретно, ПМП и СМП са укупном антиоксидативношћу од 213,1 и 132,2 $\mu\text{mol TE/g}$, били су статистички значајно различити од оних на бази МД и ГА (од 61,6 до 81,4 μmol

TE/g). Ови резултати иду у прилог већ изложеним резултатима из дела 5.2.1, односно морфолошким карактеристикама микроинкапсулата. На *SEM* снимцима датим на сликама 39 и 40 јасно се уочавају, нарочито под већим увећањем (850 пута) да МД и ГА микроинкапсулати добијени лиофилизацијом показују другачије морфолошке карактеристике у односу на оне на бази МП. У случају лиофилизације екстракта покожице грожђа (слика 39) МД и ГА су дали микроинкапсулате које карактеришу поре, шупљине, које ометају потпуну инкапсулацију, а тиме и бољу заштиту. Када је реч о микроинкапсулатима екстракта семењаче соје нису у толико значајној мери присутне поре, али је најкомпактнији облик микроинкапсулата, без стакласте форме, добијен помоћу МП.

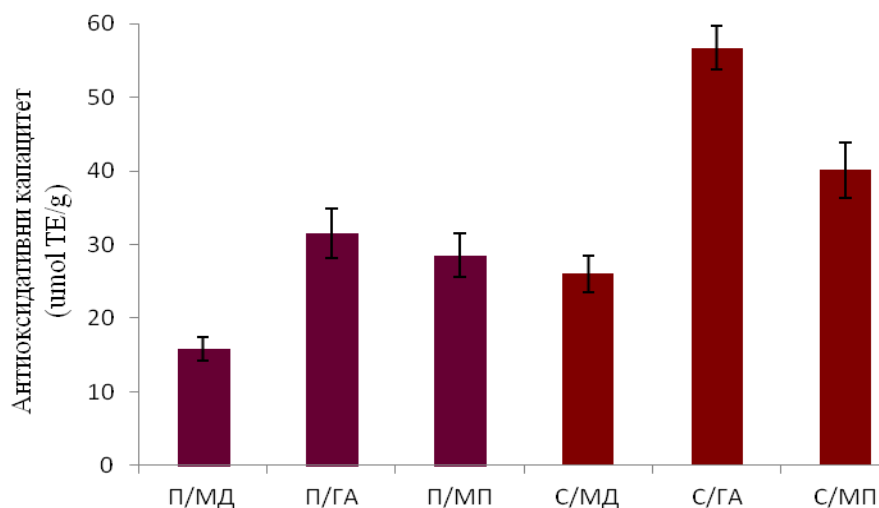
У случају микроинкапсулата добијених лиофилизацијом, резултати директне (*QUENCHER_{ABTS}*) и стандардне методе са *ABTS* и *FRAP* реагенсом су се значајно подударили. Наиме, високи коефицијенти корелације резултата антиоксидативне активности микроинкапсулата добијених помоћу ове две методе ($r = 0,90$ (II) и $r = 0,89$ (C)) потврђује микроинкапсулате на бази МП као узорке са највишом укупном антиоксидативношћу међу лиофилизованим узорцима. Значај употребе *QUENCHER* метода, као и висока корелација између ове две методе је потврђена и у другим студијама (Del Pino-García et al., 2015).

Трофакторијална анализа резултата показала је да је на укупну антиоксидативнос микроинкапсулата значајно утицао носач и техника, док сировина није утицала, као ни међусобна интеракција сировина*носач и сировина*техника. Интеракција сва три фактора је била статистички значајна (Прилог III, табела 1).

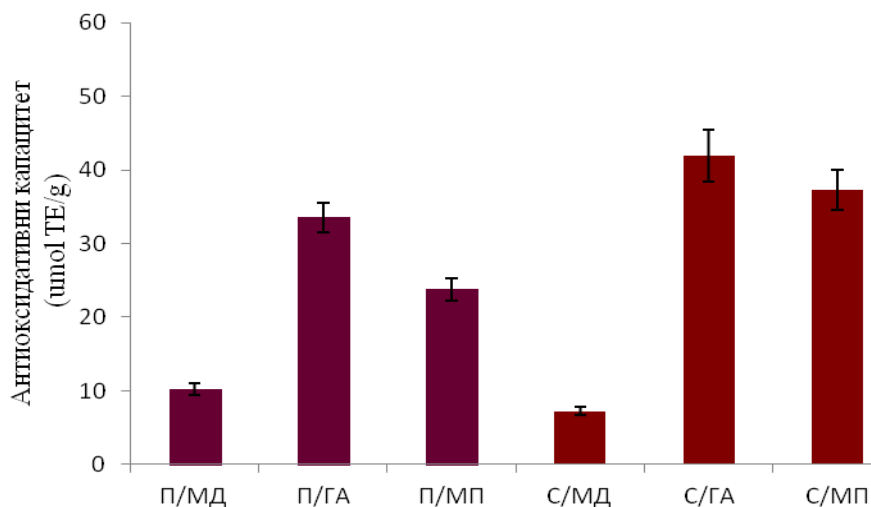
5.2.1.66 Антиоксидативни капацитет одређен спектрофотометријским методама

Резултати добијени помоћу истог реагенса (*ABTS*), али стандардном методом за одређивање антиоксидативног капацитета, која се најчешће примењује за течне узорке (или чврсте након екстракције), показала је значајно нижу вредност антиоксидативног капацитета: и то од 96,4 - 120,2 и 102,8 - 113,2 $\mu\text{mol TE/g}$,

микроинкапсулата покожице и семењаче, респективно. Тиме је и у овој тези потврђена неопходност примене *QUENCHER* метода, која подразумева директно деловање, у овом систраживању, *ABTS* реагенса на узорак/прах/брашно, у овом случају на микроинкапсулате. Како се ради о истом радикалу, претпоставка је да су ниже вредности последица непотпуне екстракције из микроинкапсулата.



Слика 54. Антиоксидативни капацитет микроинкапсулата добијених спреј сушењем одређен преко *DPPH* радикала



Слика 55. Антиоксидативни капацитет микроинкапсулата добијених лиофилизацијом одређен преко *DPPH* радикала

Као што је у предходном делу већ поменуто, вредности укупне антиоксидативне активности микроинкапсулата добијених помоћу *ABTS* и *DPPH* радикала су у веома високој корелацији (са коефицијентима $r = 0,91$ и $r = 0,98$).

Вредности антиоксидативног капацитета за микроинкапсулате добијене спреј сушењем су варирале од 15,9 до 56,7 $\mu\text{mol TE/g}$ (слика 54). У случају оба екстракта највиши резултат је постигнут са ГА као носачем. Ту вредност можемо приписати и активности једињења која су присутна у екстракту, али и горе поменутим продуктима Мајардове реакције. Вредности антиоксидативног капацитета за микроинкапсулате добијене лиофилизацијом су варирале од 10,2 до 42,0 $\mu\text{mol TE/g}$ (слика 55). Ови резултати се делимично могу објаснити резултатима изложеним у делу 5.2.1. Такође, вредности антиоксидативног капацитета нису само резултат присуства биоактивних једињења из екстраката, већ и антиоксидативног потенцијала самог млека. Наиме, микроинкапсулати су растварани у води за потребе ове анализе, а вода као растварач је сем фенолних једињења екстраховала и део шећера и протеина, што је код овог носача најочљивије.

Резултати спектрофотометријске методе са FRAP регенсом нису посебно приказиване, имајући у виду да је закључак резултата исти као код осталих спектрофотометријских метода да ГА пожељан носач у смислу антиоксидативног капацитета микроинкапсулата. Спреј сушење као техника је дало боље резултате у овом смислу.

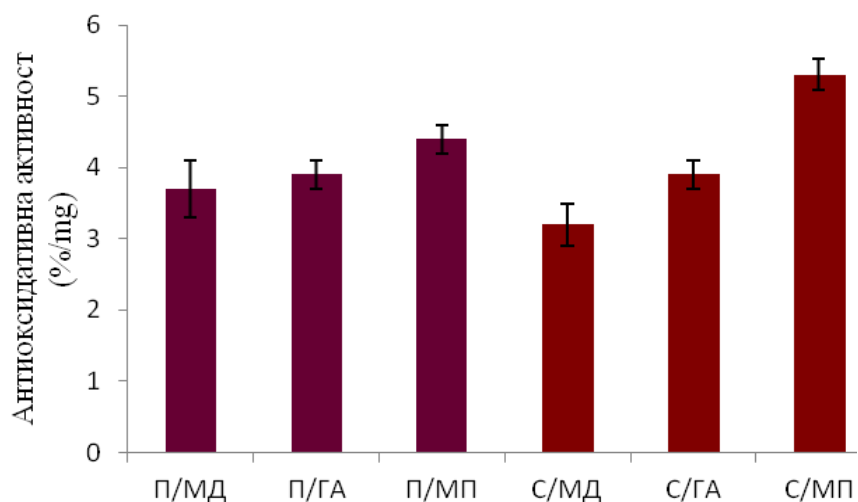
Генерално се може закључити да се резултати ове анализе у многоме подударају, не само са укупном антиоксидативношћу, већ и утврђеним садржајем укупних фенолних једињења у узорцима. Овако високе вредности антиоксидативног капацитета не изненађују с обзиром да су поједини аутори указали на то да антоцијани имају већу антиоксидативност од флаванола, флаван-3-ола и фенолних киселина (Jakobek et al., 2007). Међутим, као разлог за вредности антиоксидативног капацитета не би требало разматрати само појединачне компоненте микроинкапсулата. Постоји низ потенцијалних интеракција до којих може доћи у таквим системима, што су *DSC* и *FTIR* анализе и потврдиле. Стога су се

микроинкапсулати у зависности од носача, односно њиховог састава и реактивности са активном компонентом, разликовали и по антиоксидативном капацитету.

Статистичка анализа која је посматрала утицај три фактора на антиоксидативни капацитет микроинкапсулата показала је да је значајан утицај сваког појединачног параметра, као и њихове међусобне интеракције (Прилог III).

5.2.1.6в Антиоксидативни капацитет одређен електрохемијском методом

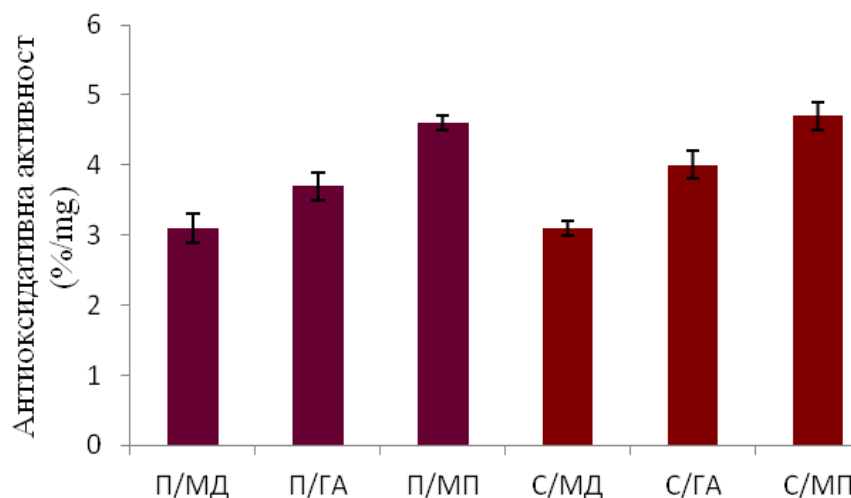
Међу микроинкапсулатима добијеним спреј сушењем и анализариним електрохемијском методом, највиши антиоксидативни капацитет показали су узорци на бази млека у праху (слика 56).



Слика 56. Антиоксидативна активност микроинкапсулата добијених спреј сушењем одређен преко НРМС

У случају обе сировине, распоред антиоксидативне активности микроинкапсулата је исти $МП > ГА > МД$, са напоменом да је разлика међу микроинкапсулатима екстракта покожице грожђа мања, него у случају семењаче соје, али сировина није представљала статистички значајан фактор. Од међусобних интеракција које су статистички значајно утицале на вредности микроинкапсулата су сировина*носач и сировина*носач*техника. Од свих анализираних узорака СМП је

показао најјачу антиоксидативну активност, што је у сагласности са резултатима за садржај укупних антоцијана, као и резултатима *FTIR* и *DSC* анализа из делова 5.2.2 и 5.2.3, где се увиђа хемијска интеракција између овог носача и антоцијана екстракта семењаче црне соје. Ни код микроинкапсулата добијених спреј сушењем ни код оних добијених лиофилизацијом се не може уочити значајна разлика у односу на извор екстракта, док сама примењена техника представља значајан фактор (слика 57).



Слика 57. Антиоксидативна активност микроинкапсулата добијених лиофилизацијом одређен преко *HPMCS*

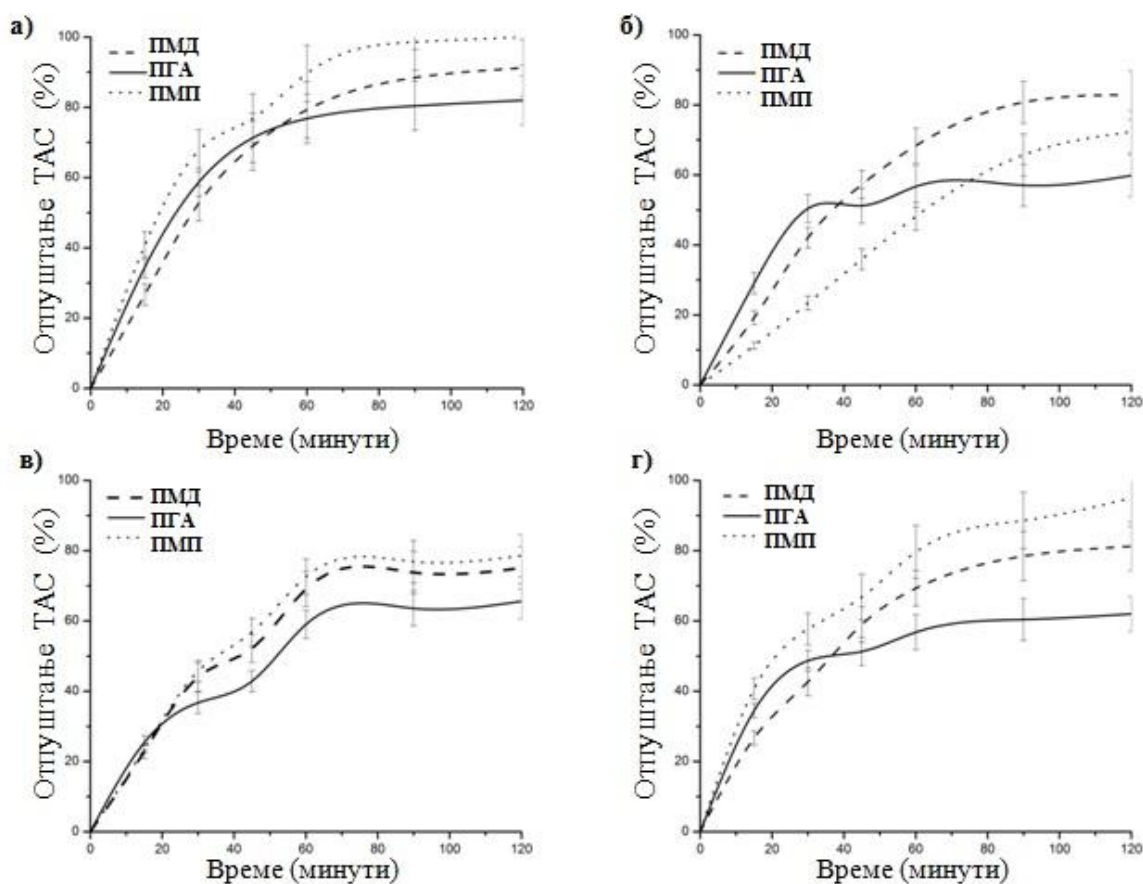
Другим речима, узорци добијени истом техником групишу се у зависности од носача. Распоред микроинкапулата према вредностима антиоксидативног капацитета је био идентичан као код оних добијених спреј сушењем тј. $МП > ГА > МД$. У овом случају, резултати су у високој корелацији ($r = 0,91$) са резултатима укупне антиоксидативне активности добијених *QUENCHER* методом (део 5.2.6.2).

Поређења ради, антиоксидативни капацитет који је показао један грам микроинкапсулата базираних на МД као носачу (узорци са најслабијим капацитетом) показују готово идентичну антиоксидативну активност као један грам црне чоколаде, познате као богат извор фенолних једињења са изузетно високом антиоксидативном активношћу (Laličić-Petronijević et al., 2016).

5.2.2 Кинетика отпуштања антоцијана из микроинкапсулата *in vitro*

На слици 58 приказане су кинетике, односно профили брзине отпуштања укупних антоцијана из микроинкапсулата у симулираним температурним и рН условима који одговарају гастричним (у даљем тексту СГФ), интестиналним условима (у даљем тексту СИФ за горњи део и СКФ за доњи део интестиналног тракта) у организму, као и у дестилованој води. Ови тестови су дизајнирани тако да рН вредности и температура ($37 \pm 0,5$ °C) одговарају засебним деловима гастроинтестиналног тракта. Узорак је изнова додаван сваком новом медијуму.

Према резултатима приказаним на слици 58а уочава се да у првих 60 минута микроинкапсулати отпуштају највећи део активне компоненте, при чему су микроинкапсулати на бази МП показали најбрже отпуштање антоцијана (преко 90%). Ови резултати су у складу са резултатима растворљивости микроинкапсулата добијених спреј сушењем (део 5.2.4). У условима СГФ-а микроинкапсулати екстракта покожице грожђа на бази МД и МП показали су веома сличан тренд и отпустили су око 70-80% садржаја антоцијана за 120 минута. Узорци на бази ГА показали су значајно спорије отпуштање антоцијана, и то у првих 30 минута око половине укупног садржаја, након чега није било значајних промена (слика 58б).

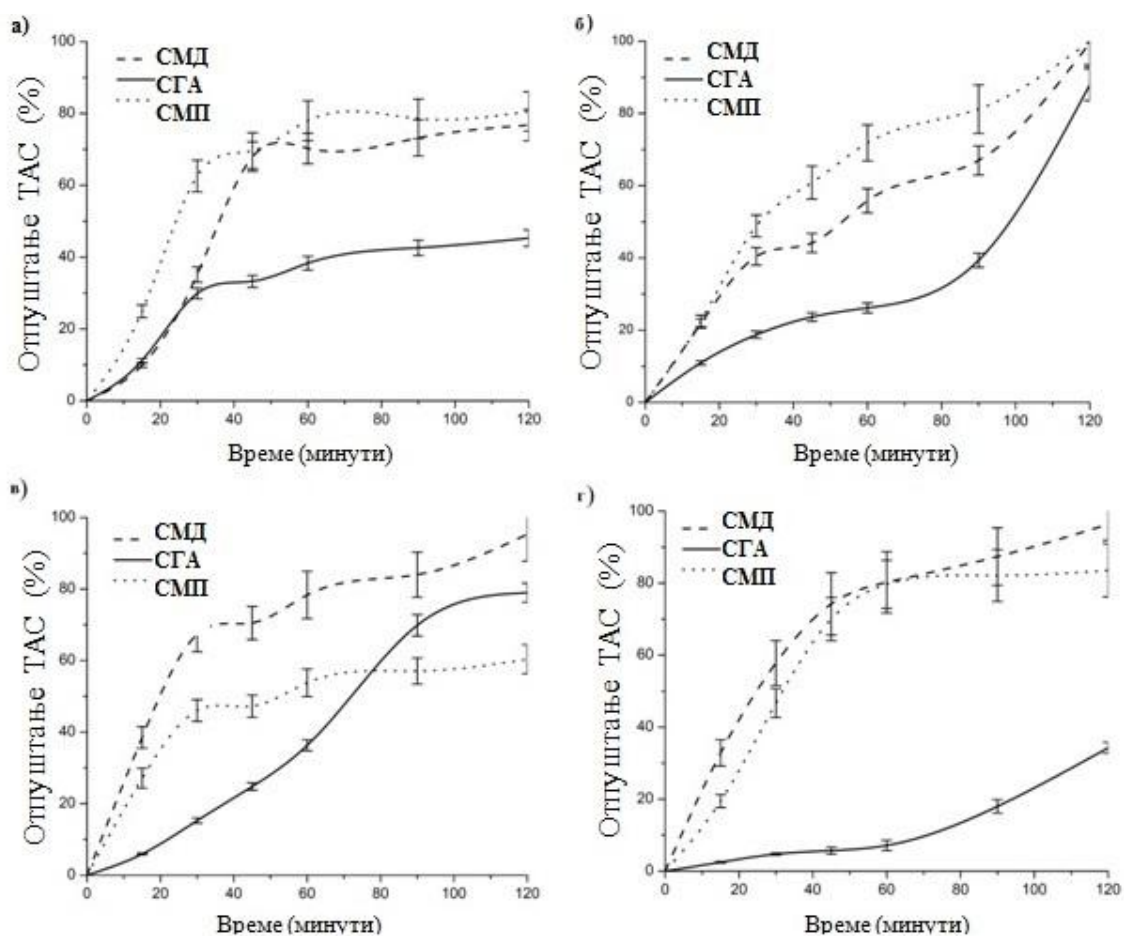


Слика 58. Кинетика отпуштања антоцијана из микроинкапсулата екстракта покожице грожђа добијених спреј сушењем у дестилованој води (а); СГФ (б); СИФ (в); СКФ (г)

Током првих 20 минута у СИФ-у профили отпуштања из свих узорака су били готово идентични, достижући око 30% од садржаја укупних антоцијана (слика 58в). И након тог периода сва три микроинкапсулата имали су веома сличан тренд отпуштања, док су микроинкапсулати на бази ГА и у овим рН условима показали нешто спорије отпуштање остатка садржаја антоцијана у односу на ПМА и ПМП. Профили отпуштања слични овим запажени су и код анализе отпуштања антоцијана у СКФ-у без значајних разлика (слика 58г). На основу изложених резултата може се закључити да ГА као носач показује боља својства (спорије отпуштање) при отпуштању активне супстанце у односу на друге испитиване носаче.

Иако у литератури нема сличних анализа са истим извором антоцијана или истим техникама инкапсулације, презентовани профили отпуштања се могу

упоредити са отпуштањем инкапсулисаних антоцијана, генерално. Једна од примењених техника је термално гелирање као техника инкапсулације антоцијана купине (Ferreira et al., 2009). Иако су у питању гелови као инкапсулациони системи, отпуштање антоцијана је било много брже (са отпуштених свих 100% антоцијана у првих 20 минута испитивања), него у случају микроинкапсулата у овом истраживању. Други пример је истраживање Oidtmann и сарадника (2012), у ком су аутори инкапсулисали антоцијане боровница у пектинске капсуле. У овом истраживању отпуштен је сав садржај антоцијана у року од 10 до 20 минута у СГФ условима, док је у интестиналним отпуштено 64% након 20 минута.



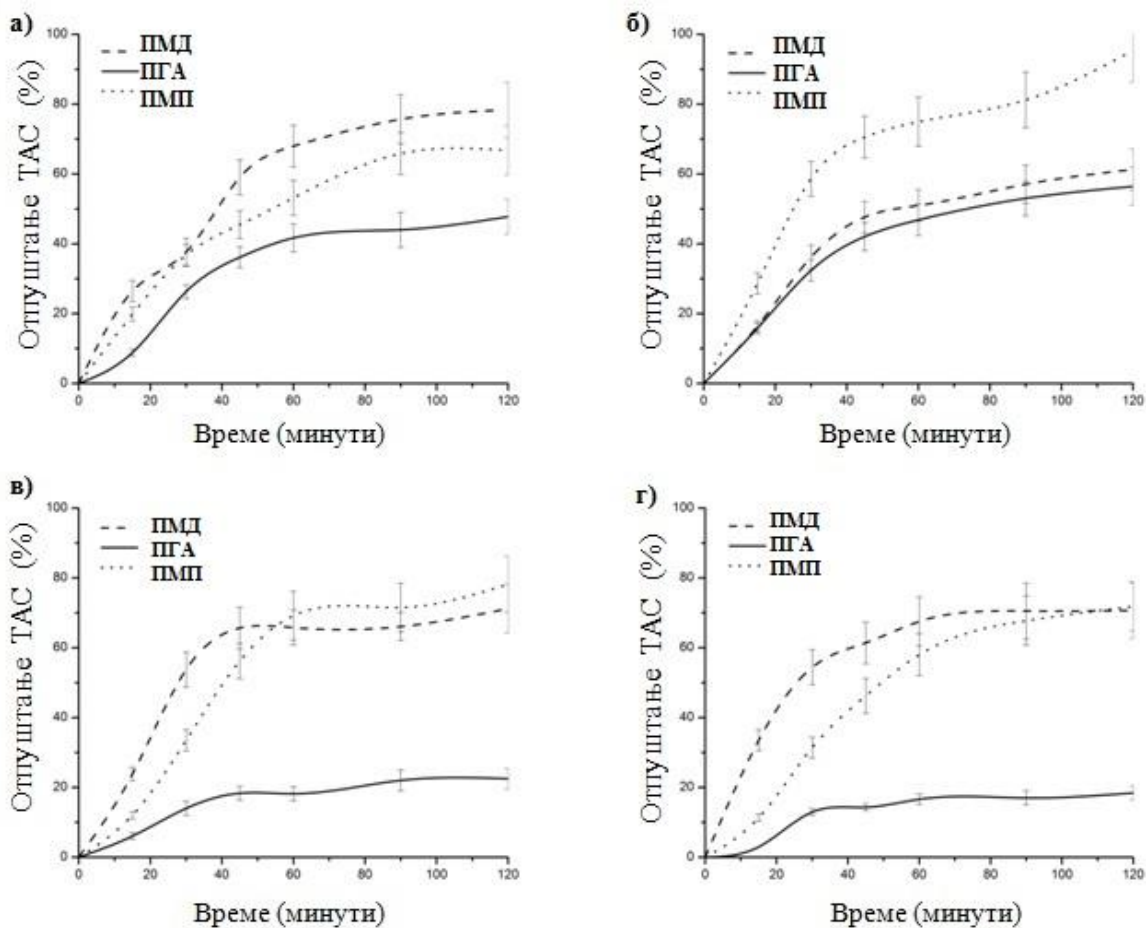
Слика 59. Кинетика отпуштања антоцијана из микроинкапсулата екстракта семењаче соје добијених спреј сушењем у дестилованој води (а); СГФ (б); СИФ (в); СКФ (г)

На слици 59 приказана је кинетика отпуштања укупних антоцијана из микроинкапсулата екстракта семењаче црне соје добијених спреј сушењем. На основу резултата који се могу запазити на слици 59а, СМД и СМП показују слично понашање, отпуштајући око 70% укупних антоцијана у првих сат времена испитивања у дестилованој води. То је двоструко виши садржај отпуштених једињења од садржаја отпуштеног из СГА микроинкапсулата (слика 59а). У СГФ условима (слика 59б) микроинкапсулати СМП су показали најбрже отпуштање укупних антоцијана и сличан тренд као СМД, док је узорак СГА отпустио највећи проценат након 90 минута. Веома велика растворљивост малтодекстрина у води и значајно нижа арапске гуме, па тиме и успорено отпуштање у условима СГФ-а је већ профил отпуштања активне компоненте описан у литератури (Chiou и Langrish, 2007).

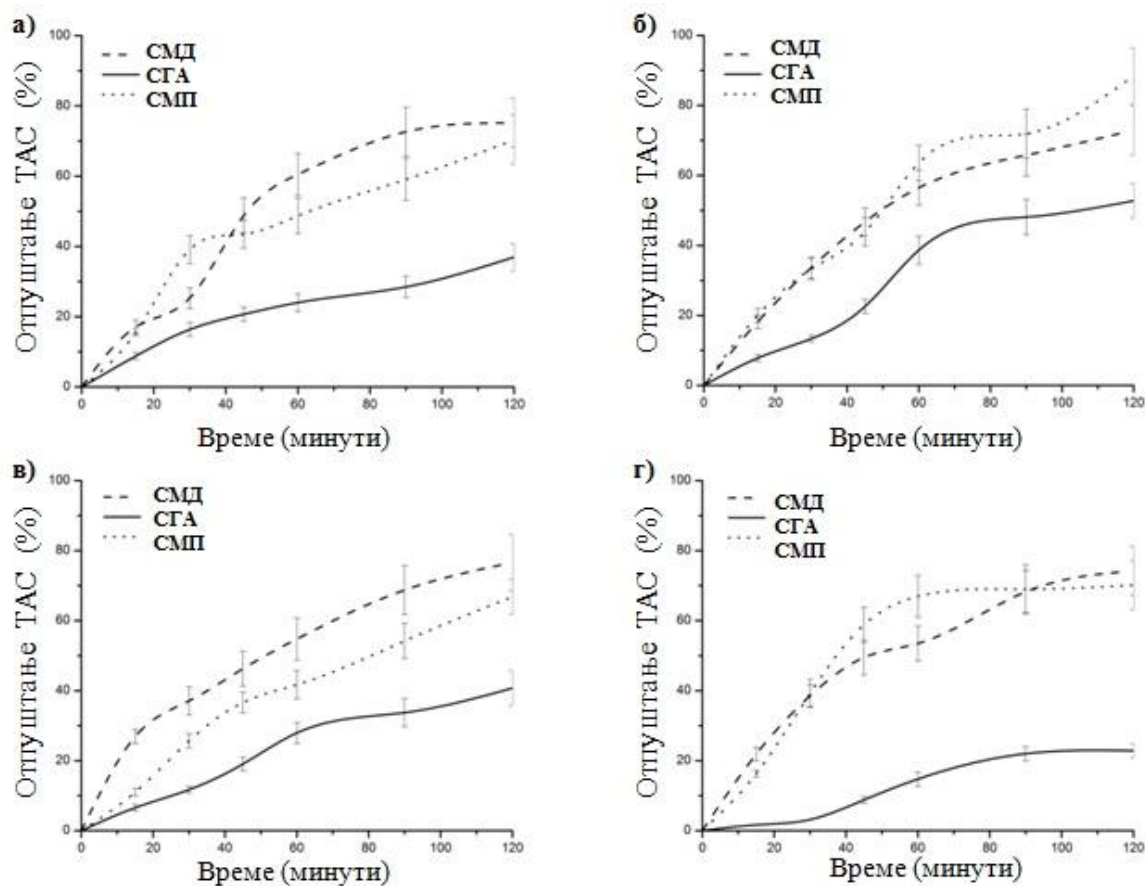
Отпуштање укупних антоцијана у СИФ-у (слика 59в) у првих 60 минута је веома различито, док у другом сату СМП показује најспорије отпуштање у поређењу са осталим микроинкапсулатима. У условима карактеристичним за дебело црево (СКФ), нешто вишем рН, односно више базној средини, понашање микроинкапсулата је драстично другачије. Наиме, отпуштање из СГА је значајно ниже у односу на све друге медијуме, нарочито у првих сат времена, али и током целокупног времена посматрања (слика 59г). Кинетика отпуштања у том медијуму је најсличнија оном описаном у дестилованој води.

Ако се упореде профили отпуштања антоцијана из микроинкапсулата добијених од различитих сировина (слике 58 и 59), запажа се значајно нижи проценат отпуштених антоцијана из микроинкапсулата семењаче соје, а нарочито је то изражено у првом сату. Овом закључку у прилог иду резултати из дела 5.2.1.4 и 5.2.1.6, али свакако и анализе *FTIR* спектроскопијом, где су новонастале хемијске везе најоучљивије баш код тих микроинкапсулата, нарочито на бази ГА. Нешто ”успешнијим” у контролисаном отпуштању биоактивних једињења из спреј сушених инкапсулата показали су се само протеини (Flores et al., 2014b; Belščak-Cvitanović et al, 2015). Flores и сарадници (2014b) су, конкретно, поредили су арапску гуму и

протеине сурутке као носаче спреј сушених антоцијана у *in vitro* условима. Први носач отпуштао је од око 60% до 90% антоцијана у прва два сата, односно у условима типичним за желудац, док је у анализама у овој дисертацији то било значајно спорије са око 40% отпуштених антоцијана за исти период.



Слика 60. Кинетика отпуштања антоцијана из микроинкапсулата екстракта покожице грожђа добијених лиофилизацијом у дестилованој води (а); СГФ (б); СИФ (в); СКФ (г)



Слика 61. Кинетика отпуштања укупних антоцијана из микроинкапсулата екстракта семењаче соје добијених лиофилизацијом у дестилованој води (а); СГФ (б); СИФ (в); СКФ (г)

Како се може уочити на свим графицима отпуштања активних компонената из лиофилизата (слике 60 и 61), ГА доприноси најспоријем отпуштању из микроинкапсулата у свим медијумима, захваљујући карактеристикама природних гума, које обично и дају пожељнији профил отпуштања од других полисахаридних носача. Као и код спреј сушених узорака, микроинкапсулати на бази МД и МП су се међусобно врло слично понашали. Ако се упореде профили отпуштања антоцијана истог порекла односно покожице грождја (слике 58 и 60) и семењаче соје (слике 59 и 61), утицај технике инкапсулације на брзину растварања микроинкапсулата постоји. Када је реч о покожици грождја, микроинкапсулати добијени спреј сушењем су

показала значајно брже отпуштање у свим медијумима. У просеку тај садржај је варирао од око 60% до 100% од укупног садржаја антоцијана, за разлику од лиофилизованих узорака код којих се тај проценат кретао од око 20% до 80%.

Уколико се не говори о аспекту отпуштања у гастроинтестиналном тракту (када се тежи што споријем, односно што каснијем и контролисанијем отпуштању биоактивних једињења), већ о примени микроинкапсулата у производњи прехранбених производа (када је пожељно брзо и потпуно отпуштање), микроинкапсулати на бази МД и МП дају одличне резултате за те сврхе.

5.2.3 Боја микроинкапсулата

Боја је физичка, али и сензорна карактеристика веома важна за општу прихватљивост производа од стране потрошача. Гледано са технолошког аспекта, њена постојаност, односно стабилност је је један од значајних параметара квалитета прехранбених производа.

Боја узорака микроинкапсулата (табеле 22 и 23) је значајно условљена бојама екстракта добијених од покожице грожђа и семењаче соје (табела 15, део 5.1.5), за које су одговорна углавном фенолна једињења, пре свега антоцијани (Kuck и Noreђа, 2016). Такође, утицај носача на боју микроинкапсулата није занемарљив. Стога су изложене вредности хроматских параметара самих носача у табели 24.

У обе табеле за сваки узорак микроинкапсулата дати су и *CIE Lab* параметари пре и након складиштења од 180 дана. Укупна промена боје израчуната је према једначини датој у делу 4.2.9.

Значајна промена осветљености узорака односно померање вредности L^* ка 100 се може запазати између микроинкапсулата произведених различитим техникама инкапсулације. Наиме, спреј сушеним узорцима је осветљеност значајно нижа у односу на лиофилизоване, како код микроинкапсулата од екстракта покожице грожђа, тако и од семењаче соје. Ово је, генерално, очекиван резултат, јер се и међу литературним подацима могу наћи такве разлике L^* вредности инкапсулата добијених спреј сушењем и лиофилизацијом. Када је у питању екстракт покожице

грожђа инкапсулисан спреј сушењем и лиофилизацијом помоћу арапске гуме као носача разлика у L^* вредностима између та два узорка је, као и у овој дисертацији, око 20, док је за a^* и C^* , око 18 у оба случаја (Кук и Норења, 2016).

Табела 22. *CIE Lab* хроматски параметри микроинкапсулата добијених спреј сушењем

Узорак	$L^*(D65)$	$a^*(D65)$	$b^*(D65)$	$C^*(D65)$	$h^{\circ}(D65)$	Доминантна таласна дужина (D65)
ПМД ₀	52,04±0,01	38,04±0,01	-2,51±0,01	38,12±0,01	356,22±0,02	499,12±0,01
ПМД ₁₈₀	52,98±0,00	37,53±0,00	-2,42±0,01	37,6±0,00	356,32±0,02	499,09±0,01
ПГА ₀	54,33±0,01	30,79±0,02	-2,33±0,00	30,88±0,01	355,67±0,01	499,40±0,01
ПГА ₁₈₀	54,51±0,24	30,93±0,10	-2,26±0,04	31,01±0,10	355,83±0,08	499,33±0,03
ПМП ₀	53,30±0,01	23,62±0,01	-8,55±0,01	25,12±0,02	340,09±0,02	516,02±0,06
ПМП ₁₈₀	52,82±0,01	24,19±0,01	-7,99±0,01	25,48±0,00	341,72±0,00	513,00±0,01
СМД ₀	64,42±1,08	37,87±0,18	5,53±0,21	38,27±0,21	8,30±0,27	494,70±0,06
СМД ₁₈₀	64,86±0,59	36,19±0,39	5,20±0,23	36,57±0,42	8,18±0,25	494,70±0,00
СГА ₀	68,83±0,01	28,82±0,03	6,93±0,02	29,64±0,03	13,53±0,05	611,53±58,80
СГА ₁₈₀	68,34±0,00	28,78±0,04	7,19±0,01	29,67±0,03	14,03±0,06	654,90±1,20
СМП ₀	64,71±0,02	34,15±0,03	2,30±0,02	34,23±0,03	3,80±0,03	496,13±0,01
СМП ₁₈₀	67,25±0,01	33,49±0,03	1,98±0,02	33,55±0,03	3,38±0,03	496,3±0,0

0 – пре складиштења

180 – после 180 дана (6 месеци) складиштења на 25 °C

ПМД и СМД су међу микроинкапсулатима имали најнижу L^* и највише a^* и C^* вредности, што показује да су ови узорци били најтамнији, са најинтензивнијом бојом, односно највећим уделом црвене боје. Сличне резултате (C^* и h° вредности) објавили су аутори који су истраживали микроинкапсулацију антоцијана црног пиринча. Ови аутори су као носач користили малтодекстрин и потврдили да виши ДЕ

малтодекстрина узрокује тамнију нијансу боје микроинкапсулата (Laokuldilok и Kanha, 2016).

Табела 23. *CIE Lab* хроматски параметри микроинкапсулата добијених лиофилизацијом

Узорак	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h°(D65)	Доминантна таласна дужина (D65)
ПМД ₀	32,25±0,46	19,21±0,05	-0,52±0,08	19,22±0,04	358,45±0,22	498,21±0,09
ПМД ₁₈₀	32,89±0,08	17,73±0,05	-0,14±0,03	17,73±0,05	359,54±0,07	497,76±0,03
ПГА ₀	34,21±0,03	13,14±0,02	-2,34±0,02	13,35±0,02	349,90±0,06	503,40±0,04
ПГА ₁₈₀	35,40±0,01	12,95±0,01	-2,24±0,01	13,14±0,01	350,20±0,02	503,18±0,02
ПМП ₀	41,34±0,02	12,10±0,01	-9,57±0,01	15,43±0,01	321,66±0,04	553,82±0,04
ПМП ₁₈₀	38,56±0,22	9,08±0,03	-6,35±0,02	11,08±0,03	325,04±0,11	549,32±0,16
СМД ₀	33,10±0,02	34,38±0,02	9,96±0,03	35,80±0,05	16,16±0,08	655,88±1,75
СМД ₁₈₀	31,39±0,59	31,24±0,68	9,81±0,15	32,74±0,70	17,44±0,12	638,29±1,15
СГА ₀	40,65±1,36	33,09±1,10	8,15±0,21	34,08±1,10	13,84±0,30	493,55±0,06
СГА ₁₈₀	40,06±1,33	32,69±0,63	8,44±0,02	33,76±0,61	14,49±0,30	493,45±0,01
СМП ₀	47,58±0,18	36,69±0,06	3,05±0,08	36,81±0,07	4,76±0,12	495,85±0,04
СМП ₁₈₀	48,81±0,11	36,70±0,04	2,64±0,02	36,79±0,04	4,11±0,03	496,06±0,01

0 – пре складиштења

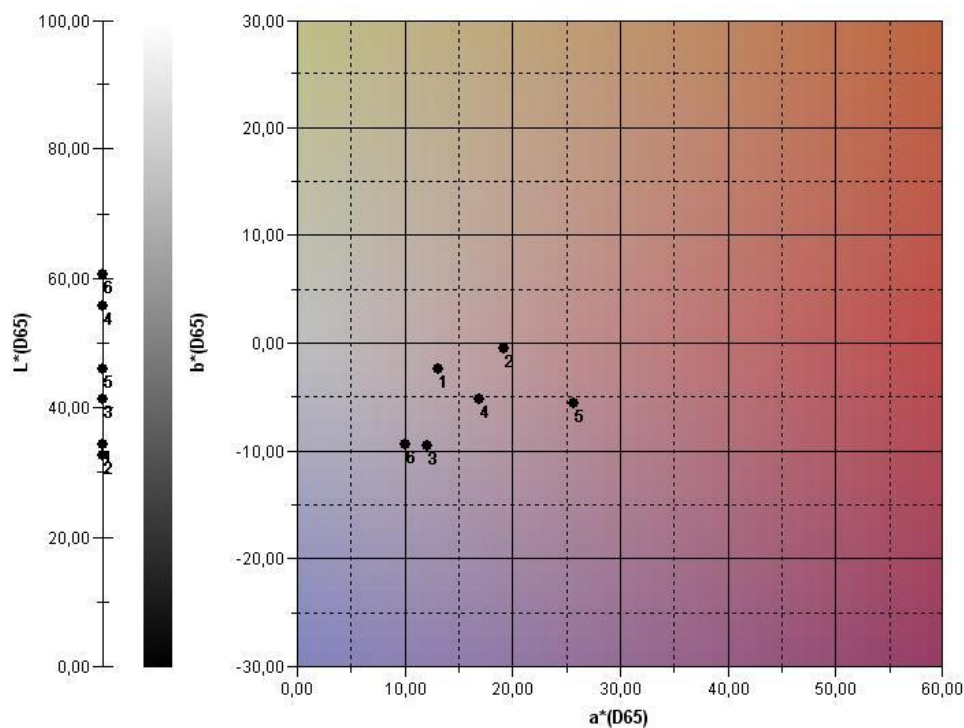
180 – после 180 дана (6 месеци) складиштења на 25 °C

Вредност h° угла свих микроинкапсулата (3,80–13,53) указује на црвену боју с вредностима нижим него у случају самог екстракта (део 5.1.5). Након микроинкапсулације L^* , a^* , и C^* вредности су биле ниже у односу на полазни екстракт (табела 15).

Табела 24. CIE Lab хроматски параметри носача

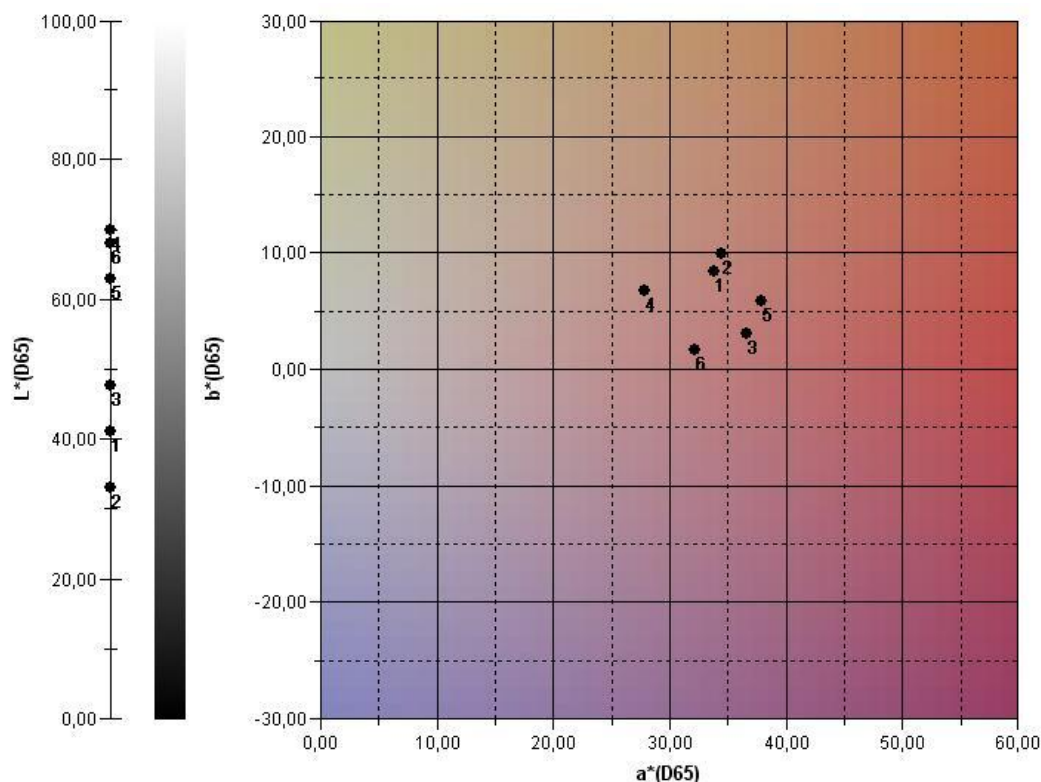
Узорак	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h°(D65)	Доминантна таласна дужина (D65)
ГА	85,38±0,10	1,19±0,01	9,88±0,04	9,95±0,04	83,16±0,02	578,04±0,01
МД	95,14±0,11	-1,19±0,01	1,33±0,01	1,78±0,01	131,91±0,13	560,53±0,07
МП	94,87±0,01	-3,09±0,01	10,78±0,01	11,22±0,01	106,02±0,02	571,51±0,01

Базирано на параметрима a^* , b^* као и h° угла, закључује се да је боја носача кретала у опсегу од беле до светло жуте, док су микроинкапсулати били светло црвени захваљујући активним компонентама екстракта. Боја микроинкапсулата је зависила и од носача (слике 62 и 63).



Слика 62. Боја микроинкапсулата екстракта покожице грозђа добијени са носачима ГА, МД и МП лиофилизацијом (1, 2, 3) и спреј сушењем (4, 5, 6)

Као што се може уочити на слици 62, узорци се међу собом генерално групишу према носачу, а не техници инкапсулације. Може се закључити да микроинкапсулати на бази МД имају највећи удео нијансе црвене међу узорцима, док они са МП имају највећи удео плаве нијансе. Микроинкапсулати добијени помоћу ГА су по нијанси боје нешто ближи МД, него МП. Интересантно је да се међу узорцима добијеним спреј сушењем и лиофилизацијом једино они базирани на МП статистички се не разликују. Слични резултати су добијени и код микроинкапсулата екстракта семењаче црне соје (слика 63), с тим што су сви узорци из категорије са доминантном црвеном бојом и благом нијансом плаве у случају МП као носача. Подаци који значајно појашњавају положај сваке групе узорка на овим шемама су њихове рН вредности чија важност за антоцијане је појашњена у делу 2.2.1. Наиме, рН вредности почетног екстракта покожице су се мењале мање или више додатком носача и то са $3,97 \pm 0,08$ на $4,00 \pm 0,10$ додатком МД, на $4,20 \pm 0,11$ додатком ГА и на $5,94 \pm 0,04$ додатком МП. Овим се може објаснити нијанса плаве у узорцима са МП као носачем, јер се присутни антоцијани налазе у нешто другачијем облику, и уједно мање стабилном облику, тзв. леуко база.



Слика 63. Боја микроинкапсулата екстракта семењаче соје добијени са носачима ГА, МД и МП лиофилизацијом (1, 2, 3) и спреј сушењем (4, 5, 6)

Слично се групишу и узорци микроинкапсулата екстракта семењаче црне соје према рН вредностима. Међутим, како са слике 63, тако и из изложених вредности у табели 8 се уочава да су те разлике значајно мање у односу на екстракте и микроинкапсулате екстракта покожице грожђа. Сам екстракт семењаче соје је имао вредност рН $2,74 \pm 0,04$, која је као и у случају претходне сировине додатком МД остала готово идентична $2,78 \pm 0,02$. Додатком ГА рН вредности се подиже на $3,25 \pm 0,05$, а са МП је опет највиша, међутим у овом случају у опсегу стабилне форме - $3,71 \pm 0,06$ (Giusti и Wrolstad, 2003).

Када је стабилност микроинкапсулата као носиоца боја реч (табела 25), може се закључити да сва три носача и обе технике дају веома добре и са аспекта примене прихватљиве резултате. Генерално, промене су мање код спреј сушених узорака, сем у случају МП и семењаче соје као извора бојених материја. Распон тих промена је

0,59 - 5,22, а ГА је носач који без обзира на извор бојених материја и примењене технике микроинкапсулације даје микроинкапсулате са најстабилнијом бојом. Поједине студије потврђују промене при складиштењу антоцијана, нарочито удела црвене боје у узорцима, приписујући их деградацији ових осетљивих једињења (Idham et al., 2012).

Табела 25. Укупна промена боје микроинкапсулата након складиштења

Техника	Узорак	ΔЕ
Спреј сушење	ПМД	1,07
	ПГА	0,59
	ПМП	0,93
	СМД	1,77
	СГА	0,56
	СМП	2,64
Лиофилизација	ПМД	1,66
	ПГА	1,21
	ПМП	5,22
	СМД	3,58
	СГА	0,77
	СМП	1,30

Захваљујући атрактивним бојама свих микроинкапсулата, они могу наћи примену у разним прехранбеним производима – пекарским, кондиторским, освежавајућим безалкохолним пићима, алкохолним пићима, млечним производима, кашама и инстант смешама. У оквиру поглавља 5.3 дато је неколико таквих примера примене микроинкапсулата добијених у овој дисертацији.

5.2.4 Антимикробна активност микроинкапсулата

За испитивање антимикробних својстава микроинкапсулата коришћено је три *Gram*-позитивне бактерије (*Bacillus spizizeni* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Listeria monocytogenes* ATCC 19111) и четири *Gram*-негативне бактерије

(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, и *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729), а испитана је и антимикуробна активност на патогени квасац *Candida albicans* ATCC 10259.

У табелама су приказане антимикуробне активности микроинкапсулата добијених спреј сушењем (табеле 26 и 27) и лиофилизацијом (табеле 28 и 29).

Сви узорци су показали инхибиторни ефекат и то у истој или сличној концентрацији (уједно и најнижој) на раст бактерије *B. spizizeni*.

У случају микроинкапсулата са носачима ГА и МП, исте или двоструко више концентрације углавном су биле довољне да инхибирају раст *L. monocytogenes* и *Y. enterocolitica*. Ове концентрације су биле чак 15, па и до 30 пута ниже од оних које су инхибирале раст *S. enteritidis* и *P. aeruginosa*. Ови резултати, као и често одсуство инхибиције у случају *E. coli* могу бити објашњени чињеницом да су *Gram*-негативне бактерије имају комплекснији састав ћелијских мембрана, које имају и други липидни слој, што отежава продирање антимикуробних компонената/агенаса. Ови резултати су у сагласности са резултатима објављеним од стране El Ksibi и сарадника (2015).

Међутим, у неким случајевима као што је *S. enteritidis*, била је неопходна висока концентрација 300 mg/mL, па чак и виша, да би се остварио микробистатички или микробицидан ефекат свих узорака микроинкапсулата.

Генерално, микроинкапсулати на бази МД показали су најслабији ефекат на микроорганизме, а они на бази ГА најјачи. Микроинкапсулати добијени техником лиофилизације су показали јачи антимикуробни ефекат и то важи за оба извора биоактивних једињења. У случају *C. albicans* микроинкапсулати нису показали жељени ефекат ни у највишим концентрацијама.

Резултати микроинкапсулата који су показали значајан ефекат на раст свих употребљених бактерија се подударају са резултатима укупне антиоксидативне активности и закључцима других аутора (Wang et al., 2011).

Табела 26. Минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минимална бактерицидна концентрација (МБК) микроинкапсулата покожице грожђа добијених спреј сушењем

Узорак Микроорганизам	ПМД		ПГА		ПМП	
	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК
<i>B. spizizeni</i> ATCC 6633	9,4 ± 0,0	18,8 ± 0,0	37,5 ± 0,0	75,0 ± 0,0	37,5 ± 0,0	75,0 ± 0,0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	18,8 ± 0,0	37,5 ± 0,0	150,0 ± 0,0	нд
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 27729	300,0 ± 0,0	нд ¹	18,8 ± 0,0	37,5 ± 0,0	18,8 ± 0,0	37,5 ± 0,0
<i>E. coli</i> 0157:H7 ATCC 35150	нд	нд	37,5 ± 0,0	75,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	нд
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	300,0 ± 0,0	нд	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	нд
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	150,0 ± 0,0	нд	75,0 ± 0,0	нд
<i>C. albicans</i> ATCC10259	нд	нд	нд	нд	нд	нд

МИК Минимална инхибиторна концентрација изражена је у mg микроинкапсулата по mL

МБК Минимална бактерицидна концентрација изражена је у mg микроинкапсулата по mL

¹нд – није детектован ефекат

Табела 27. Минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минимална бактерицидна концентрација (МБК) микроинкапсулата семењаче црне соје добијених спреј сушењем

Узорак	СМД		СГА		СМП	
	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК
<i>B. spizizeni</i> ATCC 6633	4,7 ± 0,0	9,4 ± 0,0	4,7 ± 0,0	9,4 ± 0,0	4,7 ± 0,0	9,4 ± 0,0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	нд ¹	нд	9,4 ± 0,0	18,8 ± 0,0	9,4 ± 0,0	18,8 ± 0,0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	нд	нд	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	нд
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 27729	нд	нд	9,4 ± 0,0	18,8 ± 0,0	9,4 ± 0,0	18,8 ± 0,0
<i>E. coli</i> 0157:H7 ATCC 35150	нд	нд	75,0 ± 0,0	150,0 ± 0,0	нд	нд
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	300,0 ± 0,0	нд	300,0 ± 0,0	нд	300,0 ± 0,0	нд
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	нд
<i>C. albicans</i> ATCC10259	нд	нд	нд	нд	нд	нд

МИК Минимална инхибиторна концентрација изражена је у mg микроинкапсулата по mL

МБК Минимална бактерицидна концентрација изражена је у mg микроинкапсулата по mL

¹нд – није детектован ефекат

Табела 28. Минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минимална бактерицидна концентрација (МБК) микроинкапсулата покожице грожђа добијених лиофилизацијом

Узорак Микроорганизам	ПМД		ПГА		ПМП	
	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК
<i>B. spizizeni</i> ATCC 6633	4,7 ± 0,0	4,7 ± 0,0	9,4 ± 0,0	18,8 ± 0,0	9,4 ± 0,0	9,4 ± 0,0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	75,0 ± 0,0	75,0 ± 0,0	9,4 ± 0,0	18,8 ± 0,0	18,8 ± 0,0	нд
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	9,4 ± 0,0	150,0 ± 0,0	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	нд
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 27729	300,0 ± 0,0	нд	18,8 ± 0,0	37,5 ± 0,0	18,8 ± 0,0	37,5 ± 0,0
<i>E. coli</i> 0157:H7 ATCC 35150	нд ¹	нд	37,5 ± 0,0	75,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	нд
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	150,0 ± 0,0	нд	300,0 ± 0,0	нд	75,0 ± 0,0	нд
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4,7 ± 0,0	18,8 ± 0,0	75,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	150,0 ± 0,0	нд
<i>C. albicans</i> ATCC10259	нд	нд	нд	нд	нд	нд

МИК Минимална инхибиторна концентрација изражена је у mg микроинкапсулата по mL

МБК Минимална бактерицидна концентрација изражена је у mg микроинкапсулата по mL

¹нд – није детектован ефекат

Табела 29. Минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минимална бактерицидна концентрација (МБК) микроинкапсулата семењаче црне соје добијених лиофилизацијом

Узорак	СМД		СГА		СМП	
	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК
<i>B. spizizeni</i> ATCC 6633	4,7 ± 0,0	9,4 ± 0,0	4,7 ± 0,0	9,4 ± 0,0	4,7 ± 0,0	9,4 ± 0,0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	нд ¹	нд	9,4 ± 0,0	18,8 ± 0,0	9,4 ± 0,0	18,8 ± 0,0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 27729	300,0 ± 0,0	нд	9,4 ± 0,0	18,8 ± 0,0	9,4 ± 0,0	18,8 ± 0,0
<i>E. coli</i> 0157:H7 ATCC 35150	нд	нд	37,5 ± 0,0	75,0 ± 0,0	75,0 ± 0,0	150,0 ± 0,0
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	нд
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	150,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	300,0 ± 0,0	нд
<i>C. albicans</i> ATCC10259	нд	нд	нд	нд	нд	нд

МИК Минимална инхибиторна концентрација изражена је у mg микроинкапсулата по mL

МБК Минимална бактерицидна концентрација изражена у mg микроинкапсулата по mL

¹нд – није детектован ефекат

5.3. Примена микроинкапсулата

Микроинкапсулати биоактивних једињења су припремани у циљу њихове примене у прехранбеним производима, те су у ту сврху и испитани са аспекта потенцијалне примене. Међу бројним својствима микроинкапсулата, испитана су она која су важна за њихову примену у прехранбеним производима попут активности воде, термичких особина, боје, антиоксидативног и антимикуробног потенцијала, проточности и растворљивости. Након добијених резултата за поменуте параметре, као пример потенцијалне примене микроинкапсулата узете су овсене каше (тзв. каше за доручак), као и јогурти. Каша за доручак је одабрана као тест производ из више разлога: додаток микроинкапсулата производу је једноставан (1), пре употребе и саме каше су у праху и зрну (2), пре конзумације овим кашама се додаје топла вода (или млеко), а микроинкапсулати су показали термичку стабилност на високим температурама (3); такође, каше, иако су често са додатком воћа, неатрактивних су боја или су са додатком вештачких боја (4), уношењем микроинкапсулата производу се повећава садржај фенолних једињења, антиоксидативна и антимикуробна својства (5). Стога је испитана сензорна прихватљивост додатака ових прахова тј. инкапсулата добијених у овој тези, као полупроизвода овсеним кашама. Јогурти су одабрани из сличних разлога, чест су додаток кашама и сличним производима, често постоји потреба да се обоје прехранбеним бојама у случају производње воћних јогурта или сродних производа.

5.3.1. Сензорна анализа

О било којој врсти или типу хране да је реч, сензорна својства представљају одлучујући фактор на основу кога потрошачи процењују квалитет производа. Код многих прехранбених производа доминантан параметар је укус, код неких пак мирис или арома, а у случају овде тестираних формулација важна је и боја производа, тј. визуелна атрактивност производа.

Веома је тешко параметре који се најчешће оцењују у сензорној анализи поредати према важности, јер сваки од њих у комбинацији са другим значајно доприноси формирању крајњег сензорног профила производа. Као што је у уводу овог поглавља напоменуто, бројне карактеристике неког производа или полупроизвода могу бити дефинисане физичким и хемијским параметрима, различитим аналитичким методама, чак и оним веома софистицираним. Међутим, колико год резултати таквих анализа били задовољавајући, крајњи квалитет и прихватљивост производа су показатељи који се не могу измерити аналитичким путем. За дефинисање оваквих показатеља, који највише занимају и произвођаче и потрошаче, производ се мора сензорно оценити конзумирањем истог. Сензорно оцењивање је неопходно ако је циљ квантификовати сензорне карактеристике производа. Како је у овом раду вршено испитивање како ће потрошачи прихватити нови производ са додатком микроинкапсулата, за сензорно оцењивање је одабран панел састављен од просечних потенцијалних потрошача. Како се ради о лаицима (особама које нису прошле кроз адекватну обуку), одабрано је методолошки једноставније сензорно оцењивање. У овој дисертацији за сензорно оцењивање производа са додатком микроинкапсулата коришћене су две методе: метода рангирања и хедонска скала.

5.3.1.1 Метода рангирања

У табелама 30 и 31. приказани су резултати сензорног оцењивања каша и табелама 32 и 33 резултати сензорног оцењивања јогурта добијених методом рангирања.

На основу просечних рангова утврђиван је утицај додатих микроинкапсулата на сензорну прихватљивост производа. Такође, утврђена је и прихватљивост производа са додатком у односу на контролни производ (К) без додатих микроинкапсулата. Појашњења ради, ако је вредност просечног ранга нижа, сензорна прихватљивост је виша. Из табела 30 - 33 се може видети да је у свакој оцењиваној серији од по четири узорка, контрола је имала највиши просечни ранг, што указује да

је производ са додатком микроинкапсулата прихваћен од стране потрошача. Према резултатима Фридмановог теста, статистички значајна разлика у односу на контролни производ постоји код свих узорака.

Табела 30. Резултати Фридмановог теста за каше са микроинкапсулатима добијеним спреј сушењем

Узорци	Просечан ранг	χ^2	р
К	$2,88 \pm 0,11^a$	5,889	0,054
К+ПМД	$1,22 \pm 0,44^b$		
К+ПГА	$2,00 \pm 0,71^{a,b}$		
К+ПМП	$1,89 \pm 0,61^b$		
К	$2,88 \pm 0,11^a$	4,556	0,066
К+СМД	$1,44 \pm 0,53^b$		
К+СГА	$2,10 \pm 0,87^{a,b}$		
К+СМП	$1,78 \pm 0,68^{a,b}$		

К- производ без додатих микроинкапсулата (контрола); χ^2 – вредност примењеног теста, р-ниво статистичке значајности ($p < 0,05$ разлика је значајна). Различита слова у колонома означавају статистички значајну разлику на нивоу статистичке значајности $p < 0,05$ према *Wilcoxon matched pair* тесту.

Табела 31. Резултати Фридмановог теста каше са микроинкапсулатима добијеним лиофилизацијом

Узорци	Просечан ранг	χ^2	р
К	$2,78 \pm 0,21^a$	3,828	0,073
К+ПМД	$1,12 \pm 0,54^b$		
К+ПГА	$1,80 \pm 0,41^b$		
К+ПМП	$1,22 \pm 0,60^b$		
К	$2,78 \pm 0,21^a$	3,222	0,082
К+СМД	$1,56 \pm 0,53^b$		
К+СГА	$1,67 \pm 0,87^b$		
К+СМП	$1,59 \pm 0,77^b$		

К- производ без додатих микроинкапсулата (контрола); СД – стандардна девијација; χ^2 – вредност примењеног теста, р-ниво статистичке значајности ($p < 0,05$ разлика је значајна). Различита слова у колонома означавају статистички значајну разлику на нивоу статистичке значајности $p < 0,05$ према *Wilcoxon matched pair* тесту.

Табела 32. Резултати Фридмановог теста за јогурте са микроинкапсулатима добијеним спреј сушењем

Узорци	Просечан ранг	χ^2	р
К	2,56 ± 0,34 ^а	2,811	0,114
К+ПМД	1,78 ± 0,19 ^б		
К+ПГА	2,22 ± 0,81 ^{а,б}		
К+ПМП	1,44 ± 0,71 ^б		
К	2,56 ± 0,34 ^а	3,403	0,086
К+СМД	1,47 ± 0,763 ^б		
К+СГА	2,00 ± 0,77 ^{а,б}		
К+СМП	1,68 ± 0,43 ^б		

К- производ без додатих микроинкапсулата (контрола); СД – стандардна девијација; χ^2 – вредност примењеног теста, р-ниво статистичке значајности (р < 0,05 разлика је значајна). Различита слова у колонома означавају статистички значајну разлику на нивоу статистичке значајности р < 0,05 према *Wilcoxon matched pair* тесту.

Табела 33. Резултати Фридмановог теста за јогурте са микроинкапсулатима добијеним лиофилизацијом

Узорци	Просечан ранг	χ^2	р
К	2,48 ± 0,43 ^а	3,519	0,083
К+ПМД	1,89 ± 1,05 ^б		
К+ПГА	2,33 ± 0,67 ^{а,б}		
К+ПМП	1,67 ± 0,71 ^б		
К	2,48 ± 0,43 ^а	6,006	0,052
К+СМД	1,78 ± 0,14 ^б		
К+СГА	2,36 ± 0,43 ^{а,б}		
К+СМП	2,17 ± 0,67 ^{а,б}		

К- производ без додатих микроинкапсулата (контрола); СД – стандардна девијација; χ^2 – вредност примењеног теста, р-ниво статистичке значајности (р < 0,05 разлика је значајна). Различита слова у колонома означавају статистички значајну разлику на нивоу статистичке значајности р < 0,05 према *Wilcoxon matched pair* тесту.

5.3.1.2 Хедонска скала

Како метода рангирања није погодна за поређење свих добијених узорака, сензорно оцењивање је обављено и употребом хедонске скале са 9 нивоа, чиме је на основу просечне оцене омогућено поређење свих узорака међусобно. У табелама 34 и 35 приказани су резултати сензорног оцењивања оба производа употребом хедонске скале.

Добијени резултати су углавном били у складу са резултатима добијеним методом рангирања, при чему је контролни производ поново добио најниже просечне оцене у поређењу са производима са додатком микроинкапсулата. Томе је нарочито допринела оцена који су ти узорци добили за параметар боја. Наиме, сензорне оцене у табелама 34 и 35 су просечне оцене за све оцењиване параметре, а сем боје, то су били укус, мирис и генерални утисак. Поред боје, која се значајно разликовала од контролног узорка, и укус и мирис су били на страни узорака са микроинкапсулатима, нарочито оних добијених од екстракта покожице грожђа. Поменути микроинкапсулати имају у свом саставу и фруктозу, пектин, арому грожђа (делимично екстраховани при екстракцији антоцијана), те је све то допринело да у случају оба типа микроинкапсулата они добију више оцене од микроинкапсулата добијених од екстракта семењаче соје (С). Такође, уколико се посматра утицај носача (МД, ГА, МП), запазиће се да је МД (односно микроинкапсулати на бази МД) у свим случајевима добио вишу оцену у односу на оне базиране на другим носачима. Према *ANOVA* тесту (табеле 34 и 35), није постојала статистички значајна разлика између узорака са додатком микроинкапсулата добијених спреј сушењем и лиофилизовањем, тако да се може закључити да су оба типа инкапсулата имала једнаку сензорну прихватљивост од стране потрошача, независно од носача. Резултати добијени овом методом су више него охрабрујући имајући у виду две ствари: да су просечне сензорне оцене преко 7 (чак у четири случаја преко 8, (највиша могућа оцена је 9)) добијене од стране потрошача веома високе и афирмативне, као и да би овакав производ представљао нови тип широко познатог и коришћеног производа од стране свих генерација, како на нашем тржишту, тако и на страном.

Табела 34. Резултати сензорног оцењивања каше са микроинкапсулатима хедонском скалом

Узорак (спреј сушење)	Сензорна оцена	Узорак (лиофилизација)	Сензорна оцена
К	5,99 ± 1,03	К	5,99 ± 1,03
К+ПМД	8,56 ± 0,34	К+ПМД	8,47 ± 0,31
К+ПГА	7,87 ± 1,03	К+ПГА	7,69 ± 1,07
К+ПМП	7,48 ± 1,09	К+ПМП	7,31 ± 1,05
К+СМД	8,12 ± 0,64	К+СМД	8,01±0,90
К+СГА	7,56 ± 1,00	К+СГА	7,44±0,94
К+СМП	7,11 ± 1,06	К+СМП	7,01±1,42

К- производ без додатих микроинкапсулата (контрола)

Иако су у случају испитивања сензорних карактеристика јогурта са додатком микроинкапсулата највише оцене у случају обе сировине (покожица и семењача) и обе технике микроинкапсулације добили узорци на бази МП, када су се посматрале оцене засебних ставки (боја, укус, мирис, генерални утисак) микроинкапсулати на бази МД су били најбоље оцењени за параметар боје.

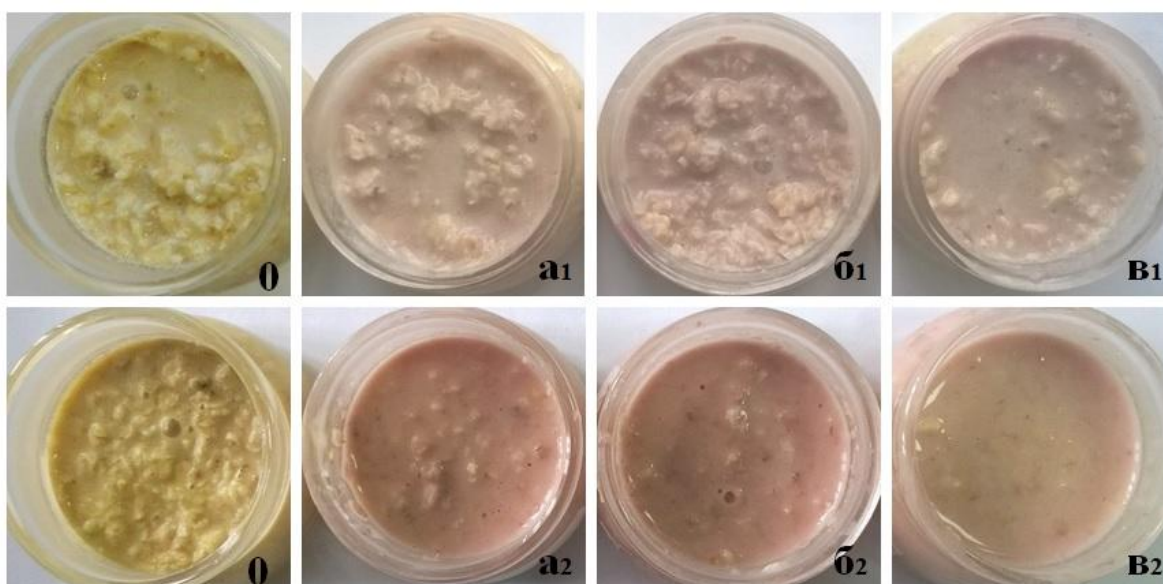
Табела 35. Резултати сензорног оцењивања јогурта са микроинкапсулатима хедонском скалом

Узорак (спреј сушење)	Сензорна оцена	Узорак (лиофилизација)	Сензорна оцена
К	6,50 ± 1,00	К	6,50 ± 1,00
К+ПМД	8,10 ± 0,39	К+ПМД	8,05 ± 0,31
К+ПГА	7,88 ± 1,05	К+ПГА	7,69 ± 1,07
К+ПМП	8,15 ± 0,41	К+ПМП	8,20 ± 0,55
К+СМД	7,88 ± 0,44	К+СМД	8,01 ± 0,80
К+СГА	7,55 ± 1,04	К+СГА	7,75 ± 0,95
К+СМП	7,89 ± 1,00	К+СМП	7,44 ± 0,42

К- производ без додатих микроинкапсулата (контрола)

5.3.2 Потенцијална примена микроинкапсулата у прехранбеним производима

Као што је описано у делу 5.3.1, сензорна анализа је била примењена на овсене каше и јогурте, како би се проценила прихватљивост додатка микроинкапсулата оваквим производима. Циљ је наине да се ови микроинкапсулати, с обзиром на форму у којој се налазе, примене у инстант производима, различитим смешама и кашама. Први пример је дат на слици 64.

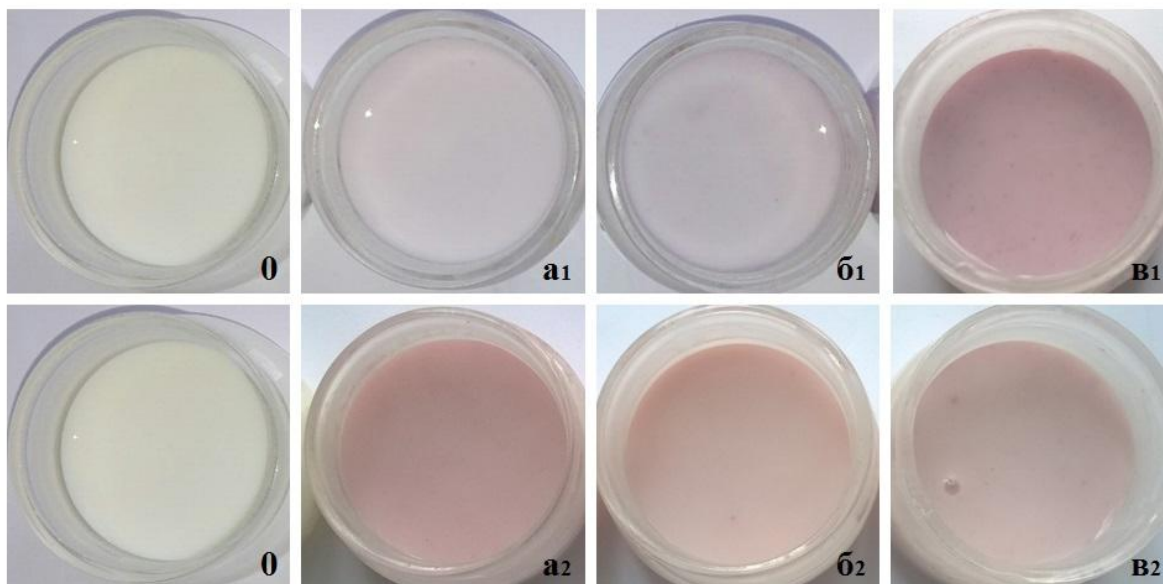


Слика 64. Примери каша без (0) и са микроинкапсулатима на бази МД (а), ГА (б) и МП (в) екстракта покожице грожђа (1) и екстракта семењаче соје (2)

Уочљива је промена боје, али су оцењивачи током сензорне анализе могли да потврде и промену укуса и мириса. Оно што је нарочито важно је да се оваквим адитивима не постиже само промена боје неког производа, већ и обогаћивање, а под тим се, пре свега, мисли на биоактивна својства ових микроинкапсулата.

Додатак ових микроинкапсулата је могућ у већини прехранбених производа, нарочито они на бази МД и ГА. С обзиром на њихову велику растворљивост, могуће их је користити чак и у бистрим пићима. Када је реч о микроинкапсулатима на бази МП, не само због мање растворљивости, већ и порекла и својстава носача (млеко),

примена је могућа у нешто ужем дијапазону производа. Примена је остварива у млечним, пекарским, и кондиторским производима, где се не захтева потпуна растворљивост или је хомогенизација са осталим састојцима могућа (нема издвајања на дну или површини производа). Пример јогурта са додатим микроинкапсулатима добијеним на бази сва три носача дат је на слици 65.

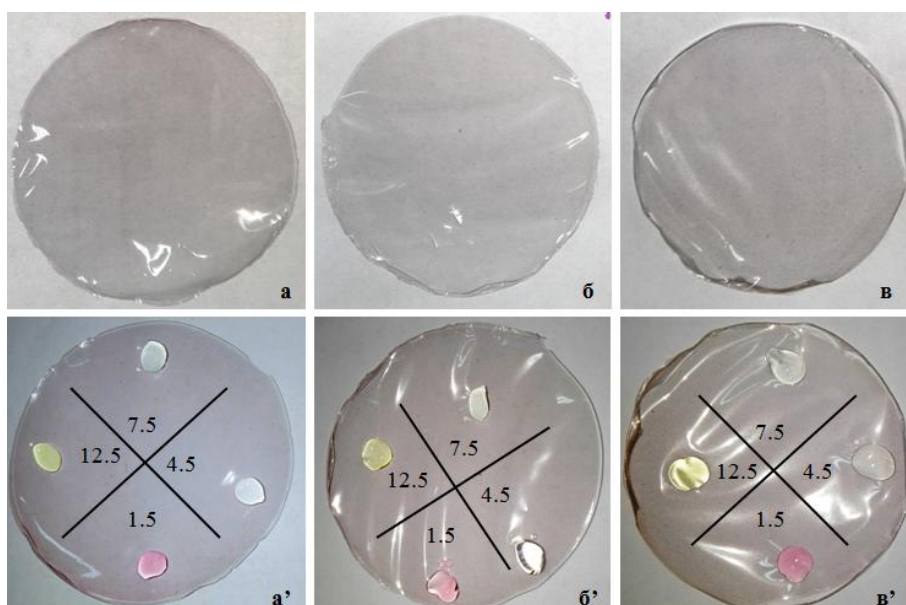


Слика 65. Примери јогурта без (0) и са микроинкапсулатима на бази МД (а), ГА (б) и МП (в) екстракта покожице грожђа (1) и екстракта семењаче соје (2)

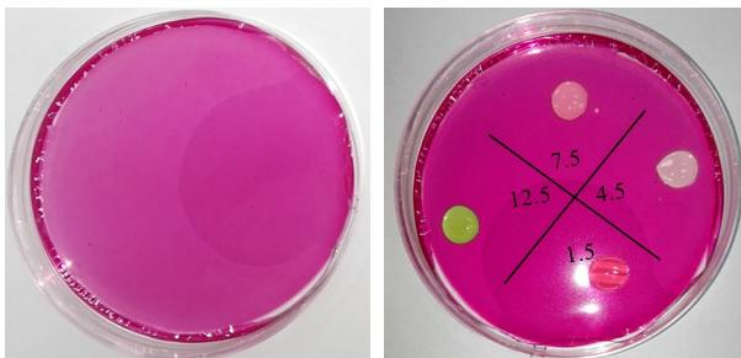
Као што је поменуто у претходном делу, коментар свих оцењивача је био да се микроинкапсулати на бази МП најбоље уклапају у укус и мирис почетног производа, што је очекивано, међутим када је реч о боји предност је дата микроинкапсулатима на бази МД.

5.3.3 Друге потенцијалне примене микроинкапсулата у прехранбеној индустрији

Примена која не подразумева додавање микроинкапсулата директно у производ је, такође могућа, захваљујући њиховим својствима. Пример који је овде изложен заснива се на карактеристикама антоцијана (активне компоненте микроинкапсулата). Наиме, формирањем филмова од микроинкапсулата, могуће је развијати и тзв. паметну амбалажу.



Слика 66. Пример изгледа филмова са микроинкапсулатима МД (а), ГА (б) и МП (в) и промена боје филмова деловањем раствора различитих рН вредности (а', б', в')⁴



Слика 67. Пример изгледа филмова са екстрактима и промена боје филмова деловањем раствора различитих рН вредности

⁴ Бројеви на сликама представљају рН вредности раствора за тестирање

Као што се може видети на слици 66 филмови са свим микроинкапсулатима су безбојни, што је пожељна карактеристика филмова. Међутим, када долази до промене рН вредности, као последица, на пример, кварења производа, моментално долази и до промене боје филма. Ово може наћи веома значајну примену, с обзиром да би таква промена (из безбојене у ружичасту или у жуту) могла потрошачу указати да је дошло до промене квалитета производа (која је праћена променом рН вредности) и да производ није за конзумацију. Те промене се често дешавају ако се производ укисели или дође до протеолизе, те је јако важно да се избегне конзумација из здравствених разлога.

Овај приступ је примењив и код самих екстраката (слика 67), али са појединим недостацима у односу на инкапсулисане форме. Прецизније говорећи, филмови израђени са екстрактима јесу много другачије, односно атрактивније боје од оних израђених помоћу микроинкапсулата, али не и пожељне да се нађу унутар амбалаже. Највећи недостаци оваквих филмова је што су промене рН вредности које нису веома велике и довољно базне (нпр. $\text{pH} < 12$) су у недовољном визуелном контрасту са основом (доминантном бојом филма), док је промена боје филма селовањем пуфера са најнижим рН вредностима практично неуочљива.

Не би требало занемарити што је предност инкапсулисаних форми њихово мање дозирање, а већа стабилност, како термичка, тако и хемијска.

5.3.4 Трошкови производње микроинкапсулата

Трошкови производње представљају један од најбитнијих параметара за успешно пословање, али и конкурентност на тржишту. Смањењем цене производње стварају се веће шансе за продају и примену (полу)производа, стварају се услови за већа улагања у различите активности, попут маркетинга, развоја, детаљнијих истраживања и адекватне процене потенцијала примене производа и његовог пласирања на тржишту. За различите финалне производе (микроинкапсулате) описане у поглављу 5.2, потребне су и различите сировине и различита опрема.

У табели 36 приказани су трошкови производње микроинкапсулата екстракта покожице грожђа (П) и семењаче соје (С), при чему су раздвојени трошкови производње рачунати према примењеној техници микроинкапсулације. Цена производње је израчуната на основу података добијених од више индустријских произвођача адитива, као и од компанија које се баве продајом и дистрибуцијом помоћних средстава у прехранбеној индустрији.

Табела 36. Трошкови производње микроинкапсулата

Основне компоненте	Спреј сушење		Лиофилизација	
	Цена, дин/kg		Цена, дин/kg	
	П	С	П	С
Вода	0,5	0,5	0,5	0,5
Грожђе - покожица	10,0	-	10,0	-
Соја - семењача	-	26,0	-	26,0
Етанол	500,0	1000,0	500,0	1000,0
Носач	200,0	200,0	200,0	200,0
Лимунска киселина	0,0	20,0	0,0	20,0
Амортизација	5,0	5,0	15,0	15,0
Енергенти	12,5	12,5	150,0	150,0
Складиштење сировина	1,2	0,2	1,2	0,2
Укупно	729,2	1264,2	876,7	1411,7

*просечан однос евра и динара по средњем курсу НБС (1€ ~ 123,5 РСД); П – покожица грожђа, С – семењача соје

У рачун су поред трошкова неопходних основних и помоћних сировина, узети у обзир и трошкови електричне енергије, као и амортизација опреме. У калкулацији не би требало заборавити ни на важне ставке попут транспорта сировина уколико тај трошак није укључен у цену сировине од самог произвођача. Када је реч о складиштењу сировина, тај трошак може значајно подићи цену производње финалног производа уколико се потребан складиштни простор изнајмљује и/или ако постоје посебни услови чувања, што би у случају покожице грожђа био случај. Наиме, због

високог садржаја влаге у pokožици грождја, та сировина би морала бити подвргнута или процесу сушења или процесу замрзавања, док је код семењаче соје једноставнији приступ с обзиром на стабилност самог материјала.

У прорачун нису узета инвестициона улагања, већ се подразумевало да су погони у којима се производе прехранбене боје опремљени оваквим уређајима. У случају инвестиционих улагања, трошкови би били знатно виши ако би се производња микроинкапсулата вршила лиофилизацијом. Када је наша земља у питању, спреј сушачи (различитих карактеристика и капацитета) далеко су присутнији и приступачнији од лиофилизатора.

Ако разматрамо основне сировине и њихову цену, мора се имати у виду да је узгајање винове лозе, као и производња вина део традиције и стратегије с обзиром на географски положај наше земље. Увоз грождја зато има негативан тренд, док извоз расте од један до три пута годишње са просечном ценом око 0,5 €/kg (Републички завод за статистику, 2016). Сортна структура је променљива, али су те промене последњих година позитивне захваљујући субвенцијама Министарства пољопривреде, као и све ширем знању произвођача грождја и вина. До 2015. године у Виноградарски регистар било је уписано преко 4000 ha. С обзиром да је испитивана сировина споредни производ који заостаје након производње розе и црвених вина, важно је истаћи да се у Србији годишње произведе око 20000000 литара таквих вина, па се лако закључује о доступности сировине за производњу екстраката и микроинкапсулата биоактивних једињења из pokožице грождја црних сорти (Вински атлас, 2015). Све ово указује да је омогућена значајно нижа цена и доступност pokožице грождја у односу на семењачу соје, која је (нарочито црна) типична за азијске земље. Међутим, посматрајући десетогодишњи период 2007-2016. године, извоз соје има растући тренд. Охрабрујућа је чињеница да још повољнији тренд са процентом промене извоза преко 40% за исти период имају чврсти остаци од соје (Републички завод за статистику, 2016). На жалост, не можемо рећи да се ради о црној соји, али и то се може подстаћи стратегијама, субвенцијама и ширењем знања из те области, као и адекватном селекцијом сорти соје.

Када је о предложеним носачима реч, требало би напоменути да се у приступу овом истраживању водило рачуна да материјали изабрани за рад буду доступни и приступачни. Према подацима Републичког завода за статистику раст производње малтодекстрина у нашој земљи је нагло порастао у последњих пет година, са тенденцијом даљег раста, што важи за декстрине и модификофано скрбове, генерално. Његова цена је најнижа од три материјала која су коришћена као носачи (испод 1€/kg). Иако се млеко у праху више увози него извози, тренд производње истог у земљи расте из године у годину. Како сировина (биљка) за производњу арапске гуме не успева на нашим подручјима не чуди што код овог материјала имамо негативни биланс. У 2016. години увезено је око 25 тона овог материјала што је значајно више у односу на претходне године. Ово је уједно и носач са највишом ценом од око 3,3 €/kg, али због своје широке употребе у прехранбеној индустрији све је доступнији и приступачнији (Републички завод за статистику, 2016). За прорачун у табели 36. узета је средња вредност цена коштања материјала коришћених као носача микроинкапсулата.

Као што се може закључити, без обзира на основну сировину која представља извор екстракта, односно природних пигмената, спреј сушење је економичнија техника. У поређењу са ценама природних прехранбених боја (нпр: рибофлавин, каротен, еноцијанин), али и неких вештачких ово су вишеструко ниже цене. Наравно, требало би имати у виду да се уносом микроинкапсулата богатих антоцијанима уноси и материјал који је послужио као носач, али то није редак случај ни са бојама на тржишту. У случају производа попут описаних микроинкапсулата све оно што они садрже сем антоцијана такође може бити потребно или пожељно у финалном производу (нпр: лактоза, фруктоза, пектин, фенолне киселине, воћне киселине и многе друге).

6. ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата и чињеница изложених у дисертацији могу се извести следећи закључци:

1. Резултати екстракције биоактивних једињења из полазних сировина, а пре свега фенолних једињења и антоцијана, показале су да је екстракција из обе врсте споредних производа најефикаснија када се користи 70% V/V етанол током 90 минута уз примену мешања и ултразвучних таласа фреквенције 40 kHz, уз додатак 1% *m/V* лимунске киселине растварачу у случају семењаче соје. Овакви екстракти су показали највиши садржај укупних фенолних једињења, укупних и индивидуалних антоцијана, као и антиоксидативну активност.

2. Садржај 30 елемената у екстракту покожица грожђа и семењачи црне соје одређен је применом технике индуктивне купловане плазме-масене спектрометрије након микроталасне дигестије. Добијени резултати указали су да покожице испитиваних сорти грожђа и семењача соје садрже значајан удео макроелемената, пре свега калијум, али и натријум, калцијум, магнезијум и фосфор што указује на потенцијал њихове примене као састојка функционалне хране. Анализа токсичних и потенцијално токсичних елемената показује да су они присутни у веома ниским концентрацијама, док су концентрације неких елемената (нпр. арсена, кадмијума и антимоана) испод лимита детекције што доводи до закључка да је примена екстраката и микроинкапсулата покожице грожђа и семењаче соје као дијететских суплемената безбедна.

3. Резултати испитивања морфолошких карактеристика показали су да међу спреј сушеним узорцима, малтодекстрин као носач даје микроинкапсулате сферних облика са равном и глатком површином без пора и пукотина. Микроинкапсулати на бази арапске гуме су показали већу униформност величине честица, док је млеко у праху као носач дао микроинкапсулате неправилних облика. Међутим, када су у питању микроинкапсулати добијени лиофилизацијом, млеко у

праху је дало најбоље карактеристике (најмање пора, шупљина, најкомпактније структуре). Разлика у односу на извор активне компоненте се одразила на просечан пречник микроинкапсулата и то са просечном вредношћу од око 4,5 μm за микроинкапсулате екстракта биоактивних једињења покожице грожђа, и око 3,0 μm за микроинкапсулате екстракта биоактивних једињења семењаче црне соје.

4. *FTIR* спектроскопска анализа показала је да нема присуства хемијских веза између активних компонената, односно екстракта и носача код спреј сушених узорака, што указује да су те мешавине и након тог процеса задржале постојеће везе и остале физичке мешавине. У случају лиофилизованих узорака уочљиве су потенцијалне интеракције носач-активна компонента, нарочито у случају микроинкапсулата на бази млека у праху што се објашњава интеракцијама протеин-полифеноли.

5. Захваљујући *DSC* анализи микроинкапсулатима су испитане и термичке особине и то у опсегу од 30 до 300 °C. Резултати ове анализе показали су да испитани прахови (добити помоћу обе технике микроинкапсулације) показују добру термичку стабилност када је у питању опсег температура битан за процесе у прехранбеној индустрији односно производњи хране (до 200 °C).

6. Остале физичке карактеристике испитиваних микроинкапсулата су прихватљиве са аспекта примене. Насипна и тапкана густина, као и компресибилност су параметри где су најбоље резултате показали узорци са млеком у праху као носачем. Међутим, ови узорци су показали најмању растворљивост. Као “компромисни” узорци, наметнули су се микроинкапсулати са малтодекстрином као носачем, са растворљивошћу изнад 90% у свим узорцима и прихватљивом компресибилношћу. Активност воде у свим узорцима је била изузетно ниска, око 0,30 за спреј сушене узорке и око 0,20 за лиофилизоване, те је један од закључака да су сви микроинкапсулати микробиолошки изузетно стабилни.

7. Садржај укупних фенолних једињења је био највиши у узорцима микроинкапсулата екстракта покожице грожђа лиофилизованих са арапском гумом

као носачем (11,57 mg GAE/g), док је садржај укупних мономерних антоцијана био највиши у микроинкапсулатима екстракта покожице грожђа добијених спреј сушењем са малтодекстрином (4,67 mg CGE/g). Поред тога што су микроинкапсулати на бази арапска гуме показали највиши садржај укупних фенолних једињења, исти узорци су показали најмањи садржај антоцијана. У микроинкапсулатима екстракта покожице грожђа доминантан антоцијан је био малвидин-3-глукозид, а у микроинкапсулатима екстракта семењаче соје цијанидин-3-глукозид, што је био случај и са самим екстрактима.

8. Када је реч о антиоксидативности, укупна антиоксидативност одређена директном методом код микроинкапсулата добијених спреј сушењем је била највиша код оних на бази арапске гуме, 432,1 $\mu\text{mol TE/g}$ у случају покожице грожђа и 378,3 $\mu\text{mol TE/g}$ у случају семењаче соје. Код микроинкапсулата добијених лиофилизацијом узорак на бази млека у праху је показао највиши антиоксидативни капацитет и то 213,1 $\mu\text{mol TE/g}$. Антиоксидативни капацитет одређен *DPPH*, *ABTS*, и *FRAP* методом је потврдио вишу антиоксидативност ових микроинкапсулата у односу на оне са малтодекстрином као носачем. Међутим, према поларографској методи микроинкапсулати на бази млека у праху показују највише вредности независно од примењене технике микроинкапсулације или употребљене сировине, а највећи антиоксидативни капацитет показали су микроинкапсулати екстракта семењаче соје са млеком у праху добијени спреј сушењем (изнад 5 %/mg).

9. Најспоријем отпуштању биоактивних једињења из микроинкапсулата допринела је арапска гума захваљујући карактеристикама природних гума да везују и спорије отпуштају фенолна једињења у различитим условима. Уколико се не разматра само аспект брзине отпуштања активних компоненти у гастроинтестиналном тракту (пожељно да буде што спорији), већ брзо и потпуно отпуштање (пожељно при производњи прехранбених производа, пре свега при хомогенизацији различитих компонената), малтодекстрин, а затим и млеко у праху као носачи бојених материја дају одличне резултате за те намене.

10. Боја узорока је значајно зависила од полазног екстракта, те је тако код микроинкапсулата покожице грожђа била израженија нијанса плаве боје, док је код микроинкапсулата семењаче соје доминирала црвена боја. Носачи су, такође, имали утицај на боју микроинкапсулата, те су они на бази малтодекстрина имали најтамнију нијансу (најизраженију боју). Након периода складиштења од 6 месеци микроинкапсулати су задржали своју боју са минималним променама појединих параметара у вредности од 0,59 - 5,22.

11. Резултати антимикуробне активности микроинкапсулата су показали значајан микробистатички и микробицидни ефекат истих на раст свих употребљених бактерија (*Bacillus spizizeni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* и *Yersinia enterocolitica*), али без антимикуробног ефекта раст и развој патогеног квасца *Candida albicans*. Најзначајнији ефекат су имали микроинкапсулати на бази арапске гуме, а најслабији на бази малтодекстрина.

12. Резултати процене сензорних карактеристика добијени на основу примењених сензорних метода (хедонска скала и метода рангирања) показали су веома високе просечне сензорне оцене, преко 7 и 8 (од 9). Производима додатком микроинкапсулата није промењена само боја, већ су и са аспекта других параметара добили више оцене у односу на полазни производ. Најбоље су оцењени производи са додатком микроинкапсулата на бази малтодекстрина у случају оба испитивана производа. Микроинкапсулати на бази млека у праху су показали боље ефекте на сензорну прихватљивост додавањем у јогурт у односу на овсену кашу.

13. Микроинкапсулати добијени током израде ове дисертације могу бити примењени као вишенаменски адитиви у млечним, кондиторским, пекарским производима и пићима различитих категорија, али и у производњи функционалних прехранбених филмова, који се даље могу користити у више намена. Испитани узорци таквих филмова потврдили су могућност потенцијалне примене као тзв. паметне амбалаже, јер су се активне компоненте микроинкапсулата показале као

јасни индикатори који указују на промену рН вредности и потенцијално кварење производа.

14. Укупно гледано, обе технике инкапсулата и сва три типа носача активних компоненти показала су одређене предности у различитим анализама, те би се најбоља и најефикаснија формулација микроинкапсулата могла дефинисати само у зависности од крајње примене.

15. Према финансијској процени, нешто нижа цена производње би се постизала применом технике спреј сушења у односу на лиофилизацију и малтодекстрина као носача. Утицај сировине је значајан, такође, а с обзиром на специфичности узгајања испитиваних сировина, њихова предност би била различита у различитим деловима света. Код нас, у Србији и региону, због традиционалног и успешног узгајања винове лозе и производње розе и црвених вина, предност као оптималнијој сировини за екстракцију биоактивних једињења би била на страни покожице грожђа.

ЛИТЕРАТУРА

Aarabi, A., Mizani, M., Honarvar, M., Faghihian H., Gerami A. (2016): Extraction of ferulic acid from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis and organic solvent methods. *Journal of Food Measurement and Characterization* 10: 42-47.

Adom, K.K., Liu, R.H. (2002): Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6182-6187.

Aguilera, Y., Mojica, L., Rebollo-Hernanz, M., Berhow, M., de Mejía E.G., Martín-Cabrejas, M.A. (2016): Black bean coats: new source of anthocyanins stabilized by β -cyclodextrin copigmentation in a sport beverage. *Food Chemistry* 212: 561-570.

Aizpurua-Olaizola, O., Navarro, P., Vallejo, A., Olivares, M., Etxebarria N., Usobiaga, A. (2016): Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Food Chemistry* 190: 614-621.

Anastas, P.T., Warner, J.C. (1998): Principles of green chemistry. In: P.T. Anastas (Eds.), *Green chemistry: Theory and practice*, pp. 29-56.

Andersen, Ø.M., Jordheim, M. (2006): The anthocyanins. In: Andersen, Ø.M., Markham, K.R. (Eds.), *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 472-551.

Angelova, V.R., Ivanov, A.S., Braikov, D.M. (1999): Heavy metals (Pb, Cu, Zn and Cd) in the system soil - grapevine - grape. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 713-721.

Andriambelason, E., Magnier, C., Haan-Archipoff, G., Lobstein, A., Anton, R., Beretz, A., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R. (1998): Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *The Journal of Nutrition* 128: 2324-2333.

Arancibia-Avila, P., Namiesnik, J., Toledo, F., Werner, E., Martinez-Ayala, A.L., Rocha-Guzmán, N.E., Alberto Gallegos-Infante, J.A., Gorinstein, S. (2012): The influence of different time durations of thermal processing on berries quality. *Food Control* 26: 587-593.

Aron, P.M., Kennedy, J.A. (2007): Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir during fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5670-5680.

Arts, I.C., Hollman, P.C. (2005): Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 317S-325S.

Astadi, I. R., Astuti, M., Santoso, U., Nugraheni, P.S. (2009): In vitro antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL). *Food Chemistry* 112: 659-663.

Avramov. L., Žunić, D. (2001): Posebno vinogradarstvo. Poljoprivredni fakultet, Beograd.

Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Azizi, F. (2013): Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 12: 43.

Bajerová, P., Adam, M., Bajer, T., Ventura, K. (2014): Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. *Journal of Separation Science* 37: 835-844.

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

Balanč, B., Kalušević, A., Drvenica, I., Coelho, M. T., Djordjević, V., Alves, V. D., Nedović, V., Bugarski, B. (2016a): Calcium–Alginate–Inulin Microbeads as Carriers for Aqueous Carqueja Extract. *Journal of Food Science* 81: E65-E75.

Balanč, B., Trifković, K., Đorđević, V., Marković, S., Pjanović, R., Nedović, V., Bugarski, B. (2016b): Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes. *Food Hydrocolloids* 61: 832-842.

Banerjee, S.S. Chen, D.H. (2007): Fast removal of copper ions by gum Arabic modified magnetic nano-adsorbent. *Journal of Hazardous Materials* 147: 792–799.

Barać M., Pešić M., Žilić S., Stanojević S. (2014): Proteinski proizvodi od soje. Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet, Beograd.

Barac, M.B., Pesic, M.B., Stanojevic, S.P., Kostic, A. Z., Bivolarevic, V. (2015): Comparative study of the functional properties of three legume seed isolates: adzuki, pea and soy bean. *Journal of Food Science and Technology* 52: 2779-2787.

Baranauskienė, R., Venskutonis, P.R., Dewettinck, K., Verhé, R. (2006): Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. *Food Research International* 39: 413–425.

Barnes, S. (2003): Phyto-oestrogens and osteoporosis: what is a safe dose? *British Journal of Nutrition* 89: 101-108.

Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Kalušević, A., Špoljarić, I., Đorđević, V., Komes, D., Mršić, G., Nedović, V. (2015): Efficiency Assessment of Natural Biopolymers as Encapsulants of Green Tea (*Camellia sinensis* L.) Bioactive Compounds by Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology* 8: 2444–2460.

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

Bezbradica, D., Matic, G., Obradovic, B., Nedovic, V., Leskosek-Cukalovic, I., Bugarski, B. (2004): Immobilization of brewing yeast in PVA/alginate micro beads using electrostatic droplet generation. *Hemijska Industrija* 58: 118–120.

Borisjuk, L., Rolletschek, H., Neuberger, T. (2013): Nuclear magnetic resonance imaging of lipid in living plants. *Progress in Lipid Research* 52: 465-487.

Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990): Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* 186: 343-355.

Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., Chemat F. (2015): Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry* 24: 72–79.

Burin, V.M., Rossa, P.N., Ferreira-Lima, N.E., Hillmann M.C., Boirdignon-Luiz, M.T. (2011): Anthocyanins: optimisation of extraction from *Cabernet Sauvignon* grapes, microcapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science and Technology* 46: 186-193.

Bustamante, A., Masson, L., Velasco, J., del Valle J.M., Robert, P. (2016): Microencapsulation of *H. pluvialis* oleoresins with different fatty acid composition: Kinetic stability of astaxanthin and alpha-tocopherol. *Food Chemistry* 190: 1013-1021.

Bylaitė, E., Venskutonis, P.R., Maždžierienė, R. (2001): Properties of caraway (*Carum carvi* L.) essential oil encapsulated into milk protein- based matrices. *European Food Research Technology* 212: 661–670.

Cai, M., Luo, Y., Chen, J., Liang, H., Sun, P. (2014): Optimization and comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction of shikimic acid from Chinese star anise. *Separation and Purification Technology* 133: 375-379.

Čalija, B., Cekić, N., Savić, S., Krajišnik, D., Daniels, R., Milić, J. (2011): An investigation of formulation factors affecting feasibility of alginate-chitosan microparticles for oral delivery of naproxen. *Archives of Pharmacal Research* 34: 919-929.

Čalija, B., Cekić, N., Savić, S., Daniels, R., Marković, B., Milić, J. (2013): PH-sensitive microparticles for oral drug delivery based on alginate/oligochitosan/Eudragit® L100-55 “sandwich” polyelectrolyte complex. *Colloids and Surfaces B*: 110: 395–402.

Čalija, B. (2016): *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs-Formulation Challenges and Potential Benefits*. Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-804017-1.

Calvo, P., Hernández, T., Lozano, M. González-Gómez, D. (2010): Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112: 852–858.

Camerlo, A., Vebert-Nardin, C., Rossi, R. M., Popa, A. M. (2013): Fragrance encapsulation in polymeric matrices by emulsion electrospinning. *European Polymer Journal* 49: 3806-3813.

Cano-Chauca, M., Stringheta, P.C., Ramos, A.M., Cal-Vidal, J. (2005): Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 6: 420–428.

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

Catelam, K. T., Sílvia, C., Trindade, F., Romero, J.T. (2011): Water adsorption isotherms sorption heat of spray-dried and freeze-dried dehydrated passion fruit pulp with additives and skimmed milk. *Ciência e Agrotecnologia* 35: 1196–1203.

Celli, G.B., Dibazar, R., Ghanem, A., Brooks, M.S.L. (2016): Degradation kinetics of anthocyanins in freeze-dried microencapsulates from lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium* Aiton) and prediction of shelf-life. *Drying Technology* 34: 1175-1184.

Cervato, G., Cazzola, R., Cestaro, B. (1999): Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal of Food Science and Nutrition* 50: 291-296.

Chang, T.M. (1964): Semipermeable microcapsules. *Science* 146: 524-525.

Charron, C.S., Kurilich, A.C., Clevidence, B.A., Simon, P.W., Harrison, D.J., Britz S.J., Novotny, J.A. (2009): Bioavailability of anthocyanins from purple carrot juice: effects of acylation and plant matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1226-1230.

Chatterjee, D., Bhattacharjee, P. (2015): Encapsulation of colour from peels of eggplant in calcium alginate matrix. *Nutrafoods* 14: 87-96.

Chedea, V.S., Palade, L.M., Rotar, M.C., Câlin, L.G., Dragomir, C. (2015): The anthocyanin composition of a red grape pomace in relation with the wine industry by-products valorization in animal feed. *Lucrări Științifice Seria Horticultură* 58: 29-34.

Chen, C.K., Pace-Asciak, C.R. (1996): Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *General Pharmacology: The Vascular System* 27: 363-366.

Cheng, V. J., Bekhit, A. E. D. A., McConnell, M., Mros, S., Zhao, J. (2012): Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry* 134: 474-482.

Cheuyglintase, K. (2009). Spray drying of fruit juice with vegetable fibre as a carrier. Doctoral thesis. University of Canterbury, Christchurch, New Zealand.

Chiu, Y.T., Chiu, C.P., Chien, J.T., Ho, G.H., Yang, J., Chen, B.H. (2007): Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly(γ -glutamic acid) as carrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5123-5130.

Chiou, D., Langrish, T.A.G. (2007): Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray drying technology. *Journal of Food Engineering* 82: 84-91.

Cho, K.M., Ha, T.J., Lee, Y.B., Seo, W.D., Kim, J.Y., Ryu, H.W., Lee, J.H. (2013): Soluble phenolics and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* L.) cultivars with varying seed coat colours. *Journal of Functional Foods* 5: 1065-1076.

Choudhary, A., Rana, A.C., Aggarwal, G., Kumar, V., Zakir, F. (2012): Development and characterization of an atorvastatin solid dispersion formulation using skimmed milk for improved oral bioavailability. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2: 421-428.

Choung, M. G., Baek, I. Y., Kang, S. T., Han, W. Y., Shin, D. C., Moon, H. P., Kang, K. H. (2001): Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5848-5851.

Chranioti, C., Tzia, C. (2014): Arabic gum mixtures as encapsulating agents of freeze-dried fennel oleoresin products. *Food and Bioprocess Technology* 7:1057- 1065.

Chranioti, C., Nikoloudaki, A., Tzia, C. (2015): Saffron and beetroot extracts encapsulated in maltodextrin, gum Arabic, modified starch and chitosan: Incorporation in a chewing gum system. *Carbohydrate Polymers* 127: 252-263.

Cilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin S., Sumnu G. (2012): Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology* 235: 587-596.

Commision Regulaton (EC) No 333/2007 of 28 March 2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs.

Commission Directive (EC) No 2008/100/EC of 28 October 2008 amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for foodstuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions.

Compendium of international analysis of methods (2006): OIV-MA-AS2-11: R2006.

Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., Tauscher, B. (2008): Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9: 85-91.

Corrales, M., García, A. F., Butz, P., Tauscher, B. (2009): Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* 90: 415-421.

Crowe, K.M. (2013): Designing Functional Foods with Bioactive Polyphenols: Highlighting Lessons Learned from Original Plant Matrices. *Journal of Human Nutrition and Food Science* 1: 1018.

Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M.N. (2009): Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26: 1001-1043.

Cvetković, D., Hristov, P., Janković, B., Milosavljević, S., Trajković, J., Hristov, R. (2013): Effect of altitude on the quality and quantity of the indigenous variety of Prokupac grape. In: *Proceedings of 36th World Congress of vine and wine: "Vine and Wine between Tradition and Modernity"*, Bucharest – Romania. pp. 232-235.

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015): Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 90: 1631-1639.

Cuccolini, S., A. Aldini, L. Visai, M. Daglia, D. Ferrari. (2013): Environmentally friendly lycopene purification from tomato peel waste: Enzymatic assisted aqueous extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 1646–1651.

Ćujić, N., Trifković, K., Bugarski, B., Ibrić, S., Pljevljakušić, D., Šavikin, K. (2016): Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and alginate/inulin system. *Industrial Crops and Products* 86: 120-131.

Danezis, G.P., Tsagkaris, A.S., Brusic, V., Georgiou, C.A. (2016): Food authentication: state of the art and prospects. *Current Opinion in Food Science* 10: 22–31.

Daza, L.D., Fujita, A., Fávoro-Trindade, C.S., Rodrigues-Ract, J.N., Granato, D., Genovese, M.I. (2016): Effect of spray drying conditions on the physical properties of

Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts. Food and Bioproducts Processing 97: 20–29.

De Nisco, M., Manfra, M., Bolognese, A., Sofo, A., Scopa, A., Tenore G.C., Pagano, F., Milite C. Ruso, M.T. (2013): Nutraceutical properties and polyphenolic profile of berry skin and wine of *Vitis vinifera* L. (cv. Aglianico). Food Chemistry 140: 623–629.

De la Cruz, A.A., Hilbert, G., Rivière, C., Mengin, V., Ollat, N., Bordenave, L., Monti, J.P. (2012): Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by using LC–MS and LC–NMR. Analytica Chimica Acta 732: 145-152.

de Souza, V.B., Fujita, A., Thomazini, M., da Silva, E.R., Lucon, J.F., Genovese M.I., Favaro-Trindade C.S. (2014): Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. Food Chemistry 164: 380-386.

de Souza, V.B., Thomazini, M., de Carvalho Balieiro J.C., Fávoro-Trindade C.S. (2015): Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*) Food and Bioproducts Processing 93: 39-50.

Del Pino-García, R., García-Lomillo, J., Rivero-Pérez, M. D., González-SanJosé, M. L., Muñoz, P. (2015): Adaptation and validation of QUick, easy, new, CHEap, and reproducible (QUENCHER) antioxidant capacity assays in model products obtained from residual wine pomace. Journal of Agricultural and Food Chemistry 63: 6922-6931.

Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. (2003): Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC Press, Boca Raton.

Dhiman, A., Nanda, A., Ahmad, S. (2011): Metal analysis in Citrus sinensis fruit peel and *Psidium guajava* leaf. Toxicology International 18: 163-167.

Đilas, S., Čanadanović-Brunet, J., Ćetković, G. (2009): By products of fruits processing as a source of phytochemicals. The Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly 15: 191-202.

Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2015): Trends in

encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews* 7: 452-490.

Downey, M.O., Rochfort, S. (2008): Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal of Chromatography A*, 1201: 43-47.

Drivelos, S. A., Danezis, G. P., Haroutounian, S. A., Georgiou, C. A. (2016): Rare earth elements minimal harvest year variation facilitates robust geographical origin discrimination: The case of PDO “Fava Santorinis”. *Food Chemistry* 213: 238-245.

Drosou, C.G., Krokida, M.K., Biliaderis, C.G. (2017): Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying Technology* 35: 139-162.

Duba, K. S., Casazza, A. A., Mohamed, H. B., Perego, P., Fiori, L. (2015): Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: experiments and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 94: 29-38.

Dubeau, S., Samson, G., Tajmir-Riahi H.A. (2010): Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. *Food Chemistry* 122: 539-545.

Dubick, M.A., Omaye, S.T. (2001): Evidence for grape, wine and tea polyphenols as modulators of atherosclerosis and ischemic heart disease in humans. *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods* 3: 67-93.

Duvnjak, D., Pantić, M., Pavlović, V., Nedović, V., Lević, S., Matijašević, D., Sknepnek, A., Nikšić, M. (2016): Advances in batch culture fermented *Coriolus versicolor* medicinal mushroom for the production of antibacterial compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 34: 1-8.

EEA (2013): Towards a green economy in Europe. EU environmental policy targets and objectives 2010–2050. EEA Report No 8/2013, pp. 1-48.

El Ksibi, I., Slama, R.B., Faidi, K., Ticha, M.B., M’henni, M.F. (2015): Mixture approach for optimizing the recovery of colored phenolics from red pepper (*Capsicum annum* L.) by-products as potential source of natural dye and assessment of its antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products* 70: 34-40.

Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E.J., Lobato-Calleros, C. (2010): Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers* 79: 541–546.

European Pharmacopeia. 8th ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM); 2014.

Fabani, M.P., Luna, L., Baroni, M.V., Monferran, M.V., Ighani, M., Tapia, A., Wunderlin, D.A., Feresin, G.E. (2013): Pistachio (*Pistacia vera* var Kerman) from Argentinean cultivars. A natural product with potential to improve human health. *Journal of Functional Foods* 5: 1347–1356.

Fahmi, R., Khodaiyan, F., Pourahmad, R., Emam-Djomeh, Z. (2014): Effect of ultrasound assisted extraction upon the Genistin and Daidzin contents of resultant soymilk. *Journal of Food Science and Technology* 51: 2857-2861.

Famuyiwa, O.O., Ough, C.S. (1990): Effect of structural constituents of cell wall on the digestibility of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 966-968.

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

FAO (2011): Global food losses and food waste: extent, causes and prevention. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO (2013): Food Wastage Footprint. Impacts on Natural Resources. Rome.

Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Ashtari, A.K., Omid, M. (2012): Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food and Bioproducts Processing* 90: 667-675.

Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods* 7: 54-66.

Fernandez, A., Torres-Giner, S., Lagaron, J. M. (2009): Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine. *Food Hydrocolloids* 23: 1427-1432.

Ferreira, D.S., Faria, A.F., Grosso, C.R., Mercadante, A.Z. (2009): Encapsulation of blackberry anthocyanins by thermal gelation of curdlan. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20: 1908-1915.

Flores, F.P., Singh, R.K., Kong, F. (2014a): Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *Journal of Food Engineering* 137: 1–6.

Flores, F.P., Singh, R.K., Kerr, W.L., Pegg, R.B., Kong, F. (2014b): Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion. *Food Chemistry* 153: 272-278.

Folin, O., Ciocalteu, V. (1927): Tyrosine and tryptophan determinations proteins. *Journal of Biological Chemistry* 73: 627-650.

Fraga, C.G. (2007): Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life* 59: 308.

Francisco, L.F., Saviano, M.A., Pinto TdeJ., Felipe Rebelo Lourenço, F.R. (2014): Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products. *Journal of Microbiological Methods* 103: 104–111.

Friedman, M. (2014): Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 6025-6042.

Galanakis, C.M. (2012): Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology* 26: 68-87.

Galanakis, C.M. (2015): Food waste recovery processing technologies and industrial techniques. Academic Press, London.

Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I., Fraga, C.G. (2010): Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501: 23-30.

Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F., Escribano, J. (2010): Stabilization of the bioactive pigment of *Opuntia* fruits through maltodextrin encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 10646-10652.

Gandía-Herrero, F., Cabanes, J., Escribano, J., García-Carmona F., Jiménez-Atiénzar M. (2013): Encapsulation of the most potent antioxidant betalains in edible matrixes as powders of different colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 4294-4302.

Georgetti, S.R., Casagrande, R., Souza, C.R.F., Oliveira, W.P., Fonseca, M.J.V. (2008): Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 41: 1521-1527.

Gil, M., Restrepo, A., Millán, L., Alzate, L., Rojano, B. (2014): Microencapsulation of banana passion fruit (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*): a new alternative as a natural additive as antioxidant. *Food and Nutrition Science* 5: 671-682.

Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. (2003): Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* 14: 217-225.

Goldberg, D. M., Soleas, G. J. (2011): Wine and health: a paradigm for alcohol and antioxidants. *Journal of Medical Biochemistry* 30: 93–102.

Gomez-Estaca, J., Comunian, T. A., Montero, P., Ferro-Furtado, R., Favaro-Trindade, C. S. (2016): Encapsulation of an astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatin–cashew gum complex. *Food Hydrocolloids* 61: 155-162.

González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C. (2004): Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta* 513: 283-289.

Gorjanović, S., Pastor, F. T., Vasić, R., Novaković, M., Simonović, M., Milić, S., Sužnjević, D. (2013): Electrochemical versus spectrophotometric assessment of antioxidant activity of hop (*Humulus lupulus* L.) products and individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 9089-9096.

Goula, A.M. Lazarides, H.N. (2015): Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. *Journal of Food Engineering* 167: 45–50.

Graham, T.L. (1991): Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiology* 95: 594-603.

Guilford, J. M., Pezzuto, J. M. (2011): Wine and health: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 471–486.

Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Van Otterdijk, R., Meybeck, A. (2011): Global food losses and food waste. Extend, causes and prevention. Rome: Food and agriculture organization of the United Nations. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/ags/publications/GFL_web.pdf

Gültekin-Özğüven, M., Karadağ, A., Duman, Ş., Özkal B., Özçelik B. (2016): Fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessibility studies. *Food Chemistry* 201: 205-212.

Harnkarnsujarit, N., Charoenrein, S., Roos, Y.H. (2012): Microstructure formation of maltodextrin and sugar matrices in freeze-dried systems. *Carbohydrate Polymers* 88: 734-742.

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

He, J., Giusti, M.M. (2010): Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology* 1: 163-187.

He, F., Mu, L., Yan, G.L., Liang, N.N., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves. M.J., Duan, C.Q. (2010): Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* 15: 9057-9091.

Hendry, G. A. F., Houghton, J. D. (1996): Natural food colorants. Springer Science & Business Media, London.

Holt, R.R., Lazarus, S.A., Sullards, M.C., Zhu, Q.Y., Schramm, D.D., Hammerstone, J.F., Fraga, C.G., Schmitz, H.H., Keen, C.L. (2002): Procyanidin dimer B2

[epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76: 798-804.

Honoré, E.K., Williams, J.K., Anthony, M.S., Clarkson, T.B. (1997): Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertility and Sterility* 67: 148-154.

Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E. C., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., Pan, S. (2013): Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids* 30: 647-655.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. (2005): The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.

Hyun, J.W., Chung, H.S. (2004): Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G2/M phase and induction of apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry* 52: 2213-2217.

Idham, Z., Muhamad, I.I., Sarmidi, M.R. (2012): Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Food Process Engineering* 35: 522-542.

Iriti, M., Faoro, F. (2011): Health-promoting effects of grape bioactive phytochemicals. In: Watson R.R. (Ed.), *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population: An Evidence-Based Approach*. Elsevier, pp. 445-474.

Ito, C., Oki, T., Yoshida, T., Nanba, F., Yamada, K., Toda, T. (2013): Characterisation of proanthocyanidins from black soybeans: Isolation and characterisation of proanthocyanidin oligomers from black soybean seed coats. *Food Chemistry* 141: 2507-2512.

Jaganath, I.B., Crozier, A. (2010): Dietary flavonoids and phenolic compounds. In: Fraga, C.G. (Eds.), *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 1-49.

Jakobek, L., Šeruga, M., Medvidović-Kosanović, M., Novak, I. (2007): Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 103: 58-64.

Јакшић, Д., Иванишевић, Д., Ђокић, В., Брбаклић Тепавац, М. (2015): Вински атлас. Репулички завод за статистику, Београд, Србија.

Jeandet, P., Sbaghi, M., Bessis, R., Meunier, P. (1995): The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skins. *VITIS-Journal of Grapevine Research* 34: 91-94.

Jing, P., Giusti, M.M. (2005): Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corncoobs (*Zea mays* L.) and its application to color milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8775–8781.

Johnson, I.T., Williamson, G., Musk, S.R.R. (1994): Anticarcinogenic factors in plant foods: a new class of nutrients? *Nutrition Research Reviews* 7: 175-204.

Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N.A., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J. J., Bickford, P.C. (1999): Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *The Journal of Neuroscience* 19: 8114-8121.

Jovanovic-Malinovska, R., Kuzmanova, S., Winkelhausen, E. (2015): Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. *Ultrasonics Sonochemistry* 22: 446-453.

Jouppila, K., Kansikas, J., Roos, Y. H. (1997): Glass transition, water plasticization, and lactose crystallization in skim milk powder. *Journal of Dairy Science* 80: 3152-3160.

Jun-xia, X., Hai-yan, Y., Jian, Y. (2011): Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry* 125: 1267-1272.

Kalušević, A., Lević, S., Đorđević, V., Beatović, D., Jelačić, S., Bugarski, B., Nedović V. (2012): Encapsulation of basil (*Ocimum basilicum*) essential oil. In: Nedović V., Ilić N., Tumbas V., Kalušević A. (Eds.), *Proceedings of the 6th European Congress on Food*. Novi Sad, Serbia, pp. 1087-1092.

Kalušević, A., Đorđević, R., Petrović, A., Lević, S., Đorđević, V., Bugarski, B., Nedović, V. (2015a): Grapeskin of Prokupac as a source of bioactive compounds. In: Gligorić, M (Ed.), *Proceedings of IV International congress "Engineering, Environment*

and Materials in Processing Industry". Jahorina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, pp. 438-444.

Kalušević, A., Veljović, M., Salević, A., Lević, S., Djordjević, V., Bugarski, B., Nedović, V. (2015b): Soft drink based on the medicinal herbs enriched with polysaccharide particles. In: Gligorić, M (Ed.), Proceedings of IV International Congress: „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“. Jahorina, Bosnia and Herzegovina, pp. 375-381.

Kalušević, A., Veljović, M., Lević, S., Petrović, A., Đorđević, V., Nedović, V. (2015c): Extraction of natural colourants from the grapeskin of *Cabernet Sauvignon*. In: Kovačević, D. (Ed.), Proceedings of Sixth International Scientific Agricultural Symposium “Agrosym 2015”. Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, pp. 327-332.

Kalušević, A., Salević, A., Lević, S., Čalijski, B., Žilić, S., Milić J., Nedović, V. (2016a): Encapsulation of bioactive compounds from black soybean seed coats by internal gelation. Works of the Faculty of Agriculture and Food Sciences 66: 146-151.

Kalušević, A., Veljović, M., Salević, A., Lević, S., Stamenković-Đoković, M., Bugarski, B., Nedović, V. (2016b): Microencapsulation of herbs extract by spray drying, Works of the Faculty of Agriculture and Food Sciences 66: 151-155.

Kammerer, D., Claus, A., Carlem R., Schieber, A. (2004): Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:4360-7.

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

Karim, M., McCormick, K., Kappagoda, C.T. (2000): Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. The Journal of Nutrition 130: 2105S-2108S.

Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinč, P., Boban, M. (2010): Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). Food Chemistry 119: 715-723.

Kaushik, V., Roos, Y. H. (2007): Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic–sucrose–gelatin systems. *LWT-Food Science and Technology* 40: 1381-1391.

Kayaci, F., Uyar, T. (2012): Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chemistry* 133: 641-649.

Khanal, R.C., Howard, L.R., Brownmiller C.R., Prior, R.L. (2009): Influence of extrusion processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. *Journal of Food Science* 74: H52-H58.

Khazaei, K. M., Jafari, S. M., Ghorbani, M., Kakhki, A. H. (2014): Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers* 105: 57-62.

Kim, H.J., Tsoy, I., Park, J. M., Chung, J.I., Shin, S.C., Chang, K.C. (2006): Anthocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF- α -induced genes associated with ischemia/reperfusion in endothelial cell by NF- κ B-dependent pathway and reduce rat myocardial damages incurred by ischemia and reperfusion in vivo. *FEBS letters* 580: 1391-1397.

Kim, J.M., Kim, J.S., Yoo, H., Choung, M.G., Sung, M.K. (2008): Effects of black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seed coats and its anthocyanidins on colonic inflammation and cell proliferation in vitro and *in vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 8427–8433.

Kim H. K., J Kim J. N., Han S. N., Nam J. H., Na H. N., Ha T. J. (2012): Black soybean anthocyanins inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Nutrition Research* 32: 770-777.

Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina, S.S. (2010): Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 8: 121-126.

Klein, T.; Longhini, R.; Bruschi, M.L.; de Mello, J.C.P. (2015): Microparticles containing guaraná extract obtained by spray-drying technique: development and characterization. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25: 292–300.

Knezevic, Z., Bobic, S., Milutinovic, A., Obradovic, B., Mojovic, L., Bugarski, B. (2002): Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. *Process Biochemistry* 38: 313-318.

Koh, K., Youn, J.E., Kim, H.S. (2014): Identification of anthocyanins in black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties. *Journal of Food Science and Technology* 51: 377-381.

Kostić, I.T., Isailović, B.D., Đorđević, V.B., Lević, S.M., Nedović, V.A., Bugarski, B.M. (2012): Electrostatic extrusion as a dispersion technique for encapsulation of cells and bioactive compounds. *Hemijska Industrija* 66: 505-517.

Kovinich, N., Saleem, A., Arnason, J.T., Miki, B. (2010): Functional characterization of a UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase from the seed coat of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Phytochemistry* 71: 1253-1263.

Kovinich, N., Arnason, J. T., De Luca, V., Miki, B. (2011): Coloring soybeans with anthocyanins? In: Gang, D. (Ed.), *The Biological Activity of Phytochemicals*. Springer New York, pp. 47-57.

Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. (2012): Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chemical Engineering Research and Design* 90: 622–632.

Kropat, C., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Boettler, U., Teller N., Marko, D. (2013): Effect of microformulation on the bioactivity of an anthocyanin-rich bilberry pomace extract (*Vaccinium myrtillus* L.) in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 4873-4881.

Kuck, L.S., Noreña, C.P.Z. (2016): Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry* 194: 569-576.

Kumar, M., Velmurugan, P., Sreeram, K., Rao, J. R., Nair, B. U. (2014): Reuse of Solid Waste from Juice Industry (*Citrus sinensis* peel) in the Extraction of Antioxidants with Enhanced Activity through Polymer Encapsulates for the Preservation of Skin. *Journal of the American Leather Chemists' Association* 109: 231-238.

Kurilich, A.C., Clevidence, B.A., Britz, S.J., Simon, P.W., Novotny, J.A. (2005): Plasma and urine responses are lower for acylated vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6537-6542.

Laine, P., Kylli, P., Heinonen, M., Jouppila, K. (2008): Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11251-11261.

Laličić-Petronijević, J., Komes, D., Gorjanović, S., Belščak-Cvitanović, A., Pezo, L., Pastor, F., Ostojić, S., Popov-Raljić, J., Sužnjević, D. (2016): Content of Total Phenolics, Flavan-3-Ols and Proanthocyanidins, Oxidative Stability and Antioxidant Capacity of Chocolate During Storage. *Food Technology and Biotechnology* 54: 13-20.

Laokuldilok, T., Kanha, N. (2015): Effects of processing conditions on powder properties of black glutinous rice (*Oryza sativa* L.) bran anthocyanins produced by spray drying and freeze drying. *LWT-Food Science and Technology* 64: 405-411.

Laokuldilok, T., Kanha, N. (2016): Microencapsulation of Black Glutinous Rice Anthocyanins Using Maltodextrins Produced from Broken Rice Fraction as Wall Material by Spray Drying and Freeze Drying. *Journal of Food Processing and Preservation* <http://dx.doi.org/10.1111/jfpp.12877>

Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A.G. (2005): Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71: 214-222.

Lauro, M.R., Crasci, L., Carbone, C., Aquino, R.P., Panico A.M., Puglisi G. (2015): Encapsulation of a citrus by-product extract: Development, characterization and stability studies of a nutraceutical with antioxidant and metalloproteinases inhibitory activity. *LWT - Food Science and Technology* 62: 169-176.

Lee, J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E. (2005): Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International* 88: 1269-1278.

Lee, J.H., Kang, N.S., Shin, S.O., Shin, S.H., Lim, S.G., Suh, D.Y., Ha, T.J. (2009): Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *Food Chemistry* 112: 226-231.

Lee, J.W., Thomas, L.C., Schmidt, S.J. (2010): Investigation of the heating rate dependency associated with the loss of crystalline structure in sucrose, glucose, and fructose using a thermal analysis approach (part I). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 684–701.

Lesmes, U., McClements, D.J. (2009): Structure–function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends in Food Science & Technology* 20: 448-457.

Lević, S., Rac, V., Manojlović, V., Rakić, V., Bugarski, B., Flock, T., Nedović, V. (2011): Limonene encapsulation in alginate/poly (vinyl alcohol). *Procedia Food Science* 1: 1816-1820.

Lević, S., Kalušević, A., Đorđević, V., Bugarski, B., Nedović, V. (2014): Savremeni procesi inkapsulacije u tehnologiji hrane. *Hrana i ishrana* 55: 7-12.

Lević, S., Đorđević, V., Knežević-Jugović, Z., Kalušević, A., Milašinović, N., Bugarski B., Nedović, V. (2016): Encapsulation Technology of Enzymes and Applications in Food Processing. In: Ray, R.C., Rosell, C.M. (Eds.), *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*. CRC Press, Boca Raton, pp.469-502.

Liang, Z., Wu, B., Fan, P., Yang, C., Duan, W., Zheng, X., Li, S. (2008): Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chemistry* 111: 837-844.

Lianfu, Z., Zelong, L. (2008): Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrasonics Sonochemistry* 15: 731-737.

Lin, L.Z., Harnly, J.M. (2007): A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal of agricultural and food chemistry* 55: 1084-1096.

Liu, R.H. (2007): Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46: 207-219.

Liu, X.X., Li, S.H., Chen, J.Z., Sun, K., Wang, X.J., Wang, X.G., Hui, R.T. (2012): Effect of soy isoflavones on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22: 463-470.

Llobera, A., Cañellas, J. (2007): Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry* 101: 659-666.

López-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., Lagaron, J. M. (2012): Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids* 28: 159-167.

Machmudah, S., Zakaria, S., Winardi, S., Sasaki, M., Goto, M., Kusumoto N., Hayakawa, K. (2012): Lycopene extraction from tomato peel by-product containing tomato seed using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering* 108: 290-296.

Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D.R., Carle, R. (2009): Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry* 112: 551–559.

Malićanin, M., Rac, V., Antić, V., Antić, M., Palade, L.M., Kefalas, P. (2014): Content of antioxidants, antioxidant capacity and oxidative stability of grape seed oil obtained by ultra sound assisted extraction. *Journal of the American Oil Chemists* 91: 989-99.

Malien-Aubert, C., Dangles, O., Amiot, M.J. (2001): Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intramolecular and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 170–176.

Manojlović, V., Nedović, V.A., Kailasapathy, K., Zuidam, N.J. (2010): Encapsulation of probiotics for use in food products. In: Zuidam, N.J., Nedović, V.A (Eds.), *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Springer, New York, pp. 269-302.

Maran, J. P., Priya, B., Nivetha, C.V. (2015): Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from *Bougainvillea glabra* flowers. *Industrial Crops and Products*, 63: 182-189.

Marić, M., Plazinić, V. (1995): Genetika, selekcija i semenarstvo soje. U: Nenadić, N., Simić, D. (Eds.), *Soja, proizvodnja i prerada*. Poljoprivredni fakultet, INR Uljarice, Beograd, pp. 61-138.

Martins, A., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., Barreiro, F., Ferreira, I. C. (2014): Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food & Function* 5: 1091-1100.

Mazza, G., Miniati, E. (1993): Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. CRC press, Boca Raton.

Menković, N., Živković, J., Šavikin, K., Gođevac, D., Zdunić, G. (2014): Phenolic composition and free radical scavenging activity of wine produced from Serbian autochthonous grape variety Prokupac: A model approach. *Journal of the Serbian Chemical Society* 79: 11-24.

Menrad K. (2003): Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering* 56:181-88.

Michaelsen, K.F., Dewey, K.G., Perez-Exposito, A.B., Nurhasan, M., Lauritzen, L., Roos, N. (2011): Food sources and intake of n-6 and n-3 fatty acids in low-income countries with emphasis on infants, young children (6–24 months), and pregnant and lactating women. *Maternal & Child Nutrition* 7: 124-140.

Milanovic, J., Manojlovic, V., Levic, S., Rajic, N., Nedovic, V., Bugarski, B. (2010): Microencapsulation of flavors in carnauba wax. *Sensors* 10: 901-912.

Milanovic, J., Levic, S., Manojlovic, V., Nedovic, V., Bugarski, B. (2011): Carnauba wax microparticles produced by melt dispersion technique. *Chemical Papers* 65: 213-220.

Milić, B., Đilas, S., Čanadanović-Brunet, J., Sakač M. (2000): Biljni polifenoli. Tehnološki fakultet, Novi Sad.

Милосављевић, М., Јовић, С. (1999): Винова лоза, грожђе и вино. Агена, Београд.

Miletić, I., Šobajić, S., Đorđević, B. (2008): Functional foods and their role in the improvement of health status. *Journal of Medical Biochemistry* 27: 367-370.

Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M.C., Meza-Velázquez, J.A., Simal, S., Rosselló, C. (2014): Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using

citric acid: a response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers* 106: 179-189.

Mira, L., Tereza Fernandez, M., Santos, M., Rocha, R., Helena Florêncio, M., Jennings, K.R. (2002): Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research* 36: 1199-1208.

Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (2005): Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 265–286.

Mourtzinis, I., Anastasopoulou, E., Petrou, A., Grigorakis, S., Makris, D., Biliaderis, C.G. (2016): Optimization of a green extraction method for the recovery of polyphenols from olive leaf using cyclodextrins and glycerin as co-solvents. *Journal of Food Science and Technology* 53: 3939-3947.

Murali, S., Kar, A., Mohapatra, D., Kalia, P. (2015): Encapsulation of black carrot juice using spray and freeze drying. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 21: 604-612.

Naczek, M., Shahidi, F. (2004): Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054: 95-111.

Nardini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2007): Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. *Platelets* 18: 224-243.

Nedović, V.A. (1999): Imobilisani ćelijski sisitemi u fermentaciji piva. *Zadužbina Andrejević, Beograd*, pp. 1-99

Nedović, V.A., Obradović, B., Leskošek-Čukalović, I., Trifunović, O., Pešić, R., Bugarski, B. (2001): Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast. *Process Biochemistry* 37: 17-22.

Nedović, V.A., Obradović, B., Poncelet, D., Goosen, M.F., Leskošek-Čukalović, I., Bugarski, B. (2002): Cell immobilisation by electrostatic droplet generation. *Landbauforschung Volkenrode SH* 241: 11-17.

Nedović, V.A., Manojlović, V., Pruesse, U., Bugarski, B., Đonlagić, J., Vorlop, K.D. (2006): Optimization of the electrostatic droplet generation process for controlled

microbead production: Single nozzle system. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly/CICEQ* 12: 53-57.

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

Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Petrović, T., Bugarski, B. (2013): Encapsulation Systems in the Food Industry in Advances. In: Yanniotis, S.; Taoukis, P.; Stoforos, N.G.; Karathanos, V.T. (Eds.), *Food Process Engineering Research and Applications*. Food Engineering Series 2013, Springer, pp. 229-253.

Nedović, V., Gibson, B., Mantzouridou, T. F., Bugarski, B., Djordjević, V., Kalušević, A., Paraskevopoulou, A., Sandell, M., Šmogrovičová, D., Yilmaztekin, M. (2015): Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. *Yeast* 32: 173-216.

Nicolaou, N., Xu, Y., Goodacre, R. (2010): Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science* 93: 5651–5660.

Nijdam, J J., Langrish, T.A.G. (2006): The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. *Journal of Food Engineering* 77: 919-925.

Nirmala, J.G., Narendhirakannan, R.T. (2011): In vitro antioxidant and antimicrobial activities of grapes (*Vitis vinifera* L) seed and skin extracts–Muscat variety. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3: 242-249.

Nosari, A.B.F.L., Lima, J.F., Serra, O.A., Freitas, L.A.P. (2015): Improved green coffee oil antioxidant activity for cosmetical purpose by spray drying microencapsulation. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25: 307-311.

Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., Malm, A. (2014): Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. *LWT - Food Science and Technology* 59: 689-694.

Oidtman, J., Schantz, M., Mäder, K., Baum, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz K., Richling, E. (2012): Preparation and comparative

release characteristics of three anthocyanin encapsulation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 844-851.

Oliveira, D.A., Salvador, A.A., Smânia, A., Smânia, E.F., Maraschin, M., Ferreira, S. R. (2013): Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of Biotechnology* 164: 423-432.

Osman, H.E., Maalej, N., Shanmuganayagam, D., Folts, J.D. (1998): Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*). *The Journal of Nutrition* 128: 2307-2312.

Osorio, C., Acevedo, B., Hillebrand, S., Carriazo, J., Winterhalter, P., Morales, A. L. (2010): Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (*Bactris guineensis*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 6977-6985.

Oyekunle, M.A., Aiyelaagbe, O.O., Fafunso, M.A. (2006): Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L. Moench. *African Journal of Biotechnology* 5.

Pal, G.K., Suresh, P.V. (2016): Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 37: 201-215.

Panceri, C.P., Gomes, T.M., De Gois, J.S., Borges, D.L.G., Bordignon-Luiz, M.T. (2013): Effect of dehydration process on mineral content, phenolic compounds and antioxidant activity of *Cabernet Sauvignon* and *Merlot* grapes. *Food Research International* 54: 1343-1350.

Park, K., Yeo, Y. (2007): Microencapsulation Technology. In: Swarbrick, J., (Ed.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Informa Healthcare, New York, pp. 2315-2327.

Paz, J.E.W., Márquez, D.B.M., Ávila, G.C.M., Cerda, R.E.B., Aguilar, C.N. (2015): Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochemistry* 22: 474-481.

Pereira, Jr.V.A., de Arruda, I.N.Q., Ricardo Stefani, R. (2015): Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time-

Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloid*. 43: 180-188.

Pereira, C., Barros, L., Ferreira, I. C. (2016). Extraction, identification, fractionation and isolation of phenolic compounds in plants with hepatoprotective effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96: 1068-1084.

Peryam, D.R., Pilgrim, F.J. (1957): Hedonic scale method of measuring food preferences. *Food Technology* 11: 9-14.

Peyron, M.A., Mishellany, A., Woda, A. (2004): Particle size distribution of food boluses after mastication of six natural foods. *Journal of Dental Research* 83: 578-582.

Pinelo, M., Del Fabbro, P., Marzocco, L., Nunez, M. J., Vicoli, M. C. (2005a): Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry* 92: 109–117.

Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Nunez, M. J. (2005b): Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2111–2117.

Правилник о прехранбеним адитивима, Службени гласник РС, бр 63/2013.

Pugliese, A., Paciulli, M., Chiavaro, E., Mucchetti, G. (2016): Characterization of commercial dried milk and some of its derivatives by differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 123: 2583-2590.

Radojević, I., Mijatović, D., Jovanović-Cvetković, T. (2013): Rodni potencijal sorte prokupač u uslovima niškog vinogorja. *Agroznanje* 14: 441-448.

Radovanović, R., Popov-Raljić, J. (2001): Senzorna analiza prehrambenih proizvoda. Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun i Tehnološki fakultet, Novi Sad.

Radovanović, A., Radovanović, B., Jovančičević, B. (2009): Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chemistry* 117: 326–331.

Ranveer, R.C., Gatade, A.A., Kamble H.A., Sahoo, A.K. (2015): Microencapsulation and storage stability of lycopene extracted from tomato processing waste. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 58: 953-960.

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: 1231-1237.

Reátegui, J.L.P., da Fonseca Machado, A.P., Barbero, G.F., Rezende, C.A., Martínez, J. (2014): Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids* 94: 223-233.

Rein, D., Lotito, S., Holt, R.R., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G. (2000): Epicatechin in human plasma: *in vivo* determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *The Journal of Nutrition* 130: 2109S-2114S.

Републички завод за статистику (2016): HCCT, тарифни ставови: 0575100, 2222090, 0813100, 02221000, 2922200, 5922600.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006): *Handbook of Enology: The microbiology of wine and vinifications*. John Wiley & Sons, New Jersey.

Rodriguez, E.B., Vidallon, M.L.P., Mendoza, D.J.R., Reyes, C.T. (2016): Health-promoting bioactivities of betalains from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton and Rose) peels as affected by carbohydrate encapsulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96: 4679-4689.

Ryan, L., Petit, S. (2010): Addition of whole, semiskimmed, and skimmed bovine milk reduces the total antioxidant capacity of black tea. *Nutrition Research* 30: 14-20.

Şahin-Nadeem, H., Dinçer, C., Torun, M., Topuz, A., Özdemir, F. (2013): Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*Salvia fruticosa* Miller) by spray drying. *LWT - Food Science and Technology* 52: 31-38.

Salević, A., Kalušević, A., Lević, S., Čalija, B., Milić, J., Žilić, S., Nedović, V. (2015): Encapsulation of black soybean seed coats anthocyanins by melt solidification. In: Poncelet, D. (Ed.), *Proceedings of 23th International Conference on Bioencapsulation*. Delft, Netherlands, pp. 162-163.

Saltveit, M.E. (2010): Synthesis and metabolism of phenolic compounds. In: De la Rosa, L., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G.A. (Eds.), *Fruit and vegetable*

phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability. Wiley-Blackwell, Ames, pp. 89-100.

Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C.P., Ghazali, H.M. (2014): Ultrasound-assisted extraction and solvent extraction of papaya seed oil: Crystallization and thermal behavior, saturation degree, color and oxidative stability. *Industrial Crops and Products* 52: 702-708.

Sandhu, A. K., Gu, L. (2010): Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4681-4692.

Santos, D.T., Albarelli, J.Q., Beppu M.M., Meireles, M.A. (2013): Stabilization of anthocyanin extract from jabuticaba skins by encapsulation using supercritical CO₂ as solvent. *Food Research International* 50: 617–624.

Santiago-Adame, R., Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, J.A., Calderas, F., González-Laredo, R.F., Rocha-Guzmán, N.E., Ochoa-Martínez L.A., Bernad-Bernad, M.J. (2015): Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. *LWT-Food Science and Technology* 64: 571-577.

Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007): Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42: 321–324.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2005): Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 287-306.

Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R. (2001): By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends in Food Science & Technology* 12: 401-413.

Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C.L., Hollenberg, N.K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H.H., Kelm, M. (2006): (–)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 1024-1029.

Serpen, A., Gökmen, V., Pellegrini, N., Fogliano, V. (2008): Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. *The Journal of Cereal Science* 48: 816–820.

Sessa, M., Casazza, A.A., Perego, P., Tsao, R., Ferrari, G., Donsì, F. (2013): Exploitation of polyphenolic extracts from grape marc as natural antioxidants by encapsulation in lipid-based nanodelivery systems. *Food Bioprocessing and Technology* 6: 2609-2620.

Shahidi, F., Naczki, M. (2003): *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press, Boca Raton.

Shamaei, S., Seiedlou, S.S., Aghbashlo, M., Tsotsas, E., Kharaghani, A. (2017): Microencapsulation of walnut oil by spray drying: Effects of wall material and drying conditions on physicochemical properties of microcapsules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 39: 101-112.

Sharma, V., Kumar, H.V., Rao, L.J.M. (2008): Influence of milk and sugar on antioxidant potential of black tea. *Food Research International* 41: 124-129.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E., Kakuda, Y. (2003): Polyphenolics in grape seeds biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food* 6:291–299.

Silva, P.I., Stringheta, P.C., Teófilo, R.F., de Oliveira, I.R.N. (2013): Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering* 117: 538-544.

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

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

Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., Trombetta, D. (2016): Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy Research* 30: 1265-1286.

Sousdaleff, M., Baesso, M.L., Neto, A.M., Nogueira, A.C., Marcolino, V.A., Matioli, G. (2013): Microencapsulation by Freeze-Drying of Potassium Norbixinate and Curcumin with Maltodextrin: Stability, Solubility, and Food Application. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 61: 955-965.

Spigno, G., De Faveri, D.M. (2007a): Antioxidants from grape stalks and marc: influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering* 78: 793–801.

Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M. (2007b): Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81: 200-208.

Spigno, G., Donsì, F., Amendola, D., Sessa, M., Ferrari, G., De Faveri, D.M. (2013): Nanoencapsulation systems to improve solubility and antioxidant efficiency of a grape marc extract into hazelnut paste. *Journal of Food Engineering* 114: 207-214.

Stajić, S., Živković, D., Tomović, V., Nedović, V., Perunović, M., Kovjanić, N., Lević S., Stanišić, N. (2014): The utilisation of grapeseed oil in improving the quality of dry fermented sausages. *International Journal of Food Science and Technology* 49: 2356-2363.

Stanković, M.(2008): *Vino-hrana i lek*. Zadužbina Andrejević, Beograd, Srbija.

Stanojevic, S.P., Barac, M.B., Pesic, M.B., Vucelic-Radovic, B. V. (2011): Assessment of soy genotype and processing method on quality of soybean tofu. *Journal of agricultural and food chemistry* 59: 7368-7376.

STATISTICA (Data Analysis Software System) (2006). v.7.1., Stat-Soft, Inc., USA (www.statsoft.com).

Stojanovic, R., Belscak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2012): Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 685-696.

Strati, I.F., Oreopoulou, V. (2011): Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *International Journal of Food Science and Technology* 46: 23–29.

Sui, X. (2017): In Vitro and In Silico Studies of Anthocyanins Against Pancreatic α -Amylase. In: Sui, X. (Ed.), Impact of Food Processing on Anthocyanins. Springer, Singapore, pp. 115-125.

Sun, G.Y., Xia, J., Draczynska-Lusiak, B., Simonyi, A., Sun, A.Y. (1999): Grape polyphenols protect neurodegenerative changes induced by chronic ethanol administration. Neuroreport 10: 93-96.

Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T. (2006): Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. Journal of Nutritional Science and Vitaminology 52: 149-153.

Takahashi, R., Ohmori, R., Kiyose, C., Momiyama, Y., Ohsuzu, F., Kondo, K. (2005): Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprotein oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 4578–4582.

Takahata, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Furuta, S., Takahashi, M., Suda, I. (2001): Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 5843-5847.

Tepavčević, V. (2013): Analiza fitoestrogena sojinog semena. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

Tepić, A. (2012): Bojene materije voća i povrća. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija, pp 38-58.

Tiwari, B.K. (2015): Ultrasound: A clean, green extraction technology. TrAC Trends in Analytical Chemistry 71: 100-109.

Tolun, A., Altintas, Z., Artik, N. (2016): Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. Journal of Biotechnology 239: 23-33.

Trifković, K.T., Milašinović, N.Z., Isailović, B.D., Kalagasidis-Krušić, M.T., Đorđević, V.B., Knežević-Jugović, Z.D., Bugarski, B.M. (2012): Encapsulation of *Thymus serpyllum* L. aqueous extract in chitosan and alginate-chitosan microbeads. In: Nedović V., Ilić N., Tumbas V., Kalušević A. (Eds.), Proceedings of the 6th European Congress on Food. Novi Sad, Serbia, pp. 1052-1058.

Trifković, K.T., Milašinović, N.Z., Djordjević, V.B., Krušić, M.T.K., Knežević-Jugović, Z.D., Nedović, V.A., Bugarski, B.M. (2014): Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols. *Carbohydrate Polymers* 111: 901-907.

Tsao, R., McCallum, J. (2010): Chemistry of flavonoids. In: De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G.A. (Eds.), *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. Wiley-Blackwell, Ames, pp 131-153.

Tumbas Šaponjac, V., Ćetković, G., Čanadanović-Brunet, J., Pajin, B., Djilas, S. Petrović, J., Lončarević, I., Stajčić S., Vulić, J. (2016): Sour cherry pomace extract encapsulated in whey and soy proteins: Incorporation in cookies. *Food Chemistry* 207: 27–33.

Вељовић, М. (2016): Хемијска, функционална и сензорна својства пива обogaћеног биолошки активним састојцима грозђа. Докторска дисертација, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, Србија.

Vereš, M. (2004): *Osnovi konzervisanja namernica*, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.

Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, S.E. (2010): Materials for encapsulation. In: Zuidam, N.J., Nedovic V. (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer, New York, pp. 31–100.

Wang, L.S., Stoner, G.D. (2008): Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters* 269: 281-290.

Wang, H.Y., Qian, H., Yao, W.E., (2011): Melanoidins produced by the Maillard reaction: reaction: structure and biological activity. *Food Chemistry* 128: 573-584.

Wang, W., Jung, J., Tomasino, E., Zhao, Y. (2016): Optimization of solvent and ultrasound-assisted extraction for different anthocyanin rich fruit and their effects on anthocyanin compositions. *LWT-Food Science and Technology* 72: 229-238.

Warner L.M (Ed). (2015): *Handbook of Antocyanins: Food sources, chemical applications and health benefits*. Nova Science Publishers, Inc. New York.

Welch, C.R., Wu, Q., Simon, J.E. (2008): Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry* 4: 75-101.

Williams, C.A. (2006): Flavone and flavonol O-glycosides. In: Anderson, O.M., Markha, K.R. (Eds.), *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Taylor & Francis Group, New York, pp. 749-856.

Wrolstad, R.E. (2004): Anthocyanin pigments-bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science* 69: 419–425.

Wu, D.; Nie, P.; He, Y.; Bao, Y. (2012): Determination of Calcium Content in Powdered Milk Using Near and Mid-Infrared Spectroscopy with Variable Selection and Chemometrics. *Food Bioprocessing and Technology* 5: 1402–1410.

Wu, S.J., Ya-Hui, C., Wei, I.L., Kao, M.D., Yi-Chin, L., Pan, W.H. (2005): Intake levels and major food sources of energy and nutrients in the Taiwanese elderly. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 14: 211.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L. (2006): Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4069-4075.

Xiao, C.W. (2008): Health effects of soy protein and isoflavones in humans. *The Journal of Nutrition* 138: 1244S-1249S.

Xie, J., Wang, C.H. (2007): Electrospray in the dripping mode for cell microencapsulation. *Journal of Colloid and Interface Science* 312: 247-255.

Xing, R. R., Li, S. Y., He, F., Yang, Z., Duan, C. Q., Li, Z., Wang, J., Pan, Q. H. (2015): Mass spectrometric and enzymatic evidence confirm the existence of anthocyanidin 3, 5-O-diglucosides in Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 3251-3260.

Xu, B.J., Chang, S.K. (2007): A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72: S159-S166.

Xu, B., Chang, S.K. (2008): Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 8365-8373.

Xu, B., Chang, S.K. (2009): Isoflavones, flavan-3-ols, phenolic acids, total phenolic profiles, and antioxidant capacities of soy milk as affected by ultrahigh-temperature and traditional processing methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4706-4717.

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

Yapo, B. M. (2009): Lemon juice improves the extractability and quality characteristics of pectin from yellow passion fruit by-product as compared with commercial citric acid extractant. *Bioresource Technology* 100: 3147-3151.

Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., Akoh, C. C. (2005): Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry* 53: 7320-7329.

Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A.A. (2001): Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4083-4089.

Yuksel, Z., Avci, E., Erdem, Y.K. (2010): Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chemistry* 121: 450-456.

Закон о управљању отпадом, Службени гласник РС, бр. 36/09, 88/10 и 14/16.

Zhishen, J., Mengcheng, M., Jianming, W. (1999): The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.

Zhou, Y., Sun, T., Chan, M., Zhang, J., Han, Z., Wang, X., Yu, H. (2005): Scalable encapsulation of hepatocytes by electrostatic spraying. *Journal of Biotechnology* 117: 99-109.

Zohuriaan, M.J., Shokrolahi, F. (2004): Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing* 23: 575-579.

Zubik, L., Meydani, M. (2003): Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 77: 1459-1465.

Zuidam, N.J., Heinrich, E. (2010): Encapsulation of aroma. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A. (Eds.), Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing. Springer New York, pp. 127-160.

Zuidam, N.J., Shimoni, E. (2010): Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A. (Eds.), Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing. Springer, New York, pp 3-29

Žilić, S.M., Šobajić, S.S., Mladenović-Drinić, S.D., Kresović, B.J., Vasić, M.G. (2010): Effects of heat processing on soya bean fatty acids content and the lipoxygenase activity. Journal of Agricultural Sciences 55: 55-64.

Žilić, S.M., Barać, M.B., Pešić, M.B., Mladenović Drinić, S.D., Ignjatović-Micić, D.D., Srebrić, M.B. (2011): Characterization of proteins from kernel of different soybean varieties. Journal of the Science of Food and Agriculture 91: 60-67.

Žilić, S., Akilloğlu, G., Serpen, A., Barać, M., Gökmen, V. (2012): Effects of isolation, enzymatic hydrolysis, heating, hydration and Maillard reaction on the antioxidant capacity of cereal and legume proteins. Food Research International 49: 1-6.

Žilić, S., Akilloğlu, H. G., Serpen, A., Perić, V., Gökmen, V. (2013): Comparisons of phenolic compounds, isoflavones, antioxidant capacity and oxidative enzymes in yellow and black soybeans seed coat and dehulled bean. European Food Research and Technology 237: 409-418.

Žilić, S., Janković, M., Basić, Z., Vančetović, J., Maksimović, V. (2016a): Antioxidant activity, phenolic profile, chlorophyll and mineral matter content of corn silk (*Zea mays* L): Comparison with medicinal herbs. Journal of Cereal Science, 69: 363-370.

Žilić, S., Kocadağlı, T., Vančetović, J., Gökmen, V. (2016b): Effects of baking conditions and dough formulations on phenolic compound stability, antioxidant capacity and color of cookies made from anthocyanin-rich corn flour. LWT-Food Science Technology 65: 597-603.

www.agclassroom.org National Agriculture in the Classroom (18. 6. 2016.)

www.gmpua.com The website for the pharmaceutical industry (22. 12. 2016.)

<http://webofknowledge.com> Web of Science (10. 12. 2016.)

БИОГРАФИЈА

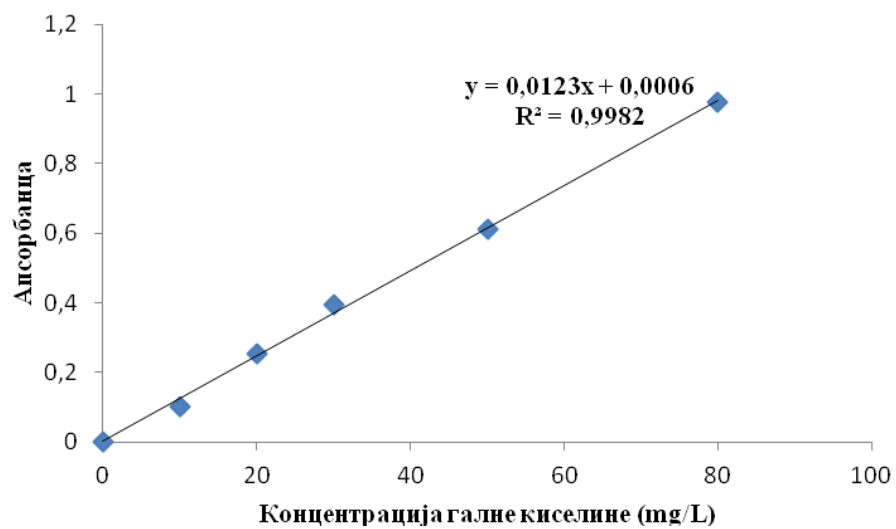
Ана Калушевић је рођена 18. 4. 1986. године у Београду, Република Србија. Средњу школу (Гимназија, природно-математички смер) завршила је у Младеновцу 2004. године и исте године уписала је Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, смер: Прехрамбена технологија биљних производа. Основне академске студије завршила је са просечном оценом 9,56 (девет педесет шест). Дипломирала је школске 2008/09. године са темом дипломског рада *Антимикробна и антиоксидативна својства пива са додатком екстракта тиммијана* и оценом 10 (десет).

Докторске академске студије на истом факултету уписала је школске 2009/10. године, смер Прехрамбена технологија. Током 2010. Године ангажована је као стипендиста Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије на пројекту *Развој нових прехрамбених и дијететских производа са медицинским гљивама и лековитим биљем*, бр. 20049. Од 2011. учесник је на пројекту *Развој и примена нових и традиционалних технологија у производњи конкурентних прехрамбених производа са додатом вредношћу за домаће и светско тржиште – створимо богатство из богатства Србије* бр. 46001. Од јула 2012. као истраживач сарадник ангажована је на пројекту *Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биолошки активних супстанци и других компоненти хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности*, бр. 46010 у оквиру Института за хигијену и технологију меса. Учесник је на билатералним пројектима у оквиру програма научне и технолошке сарадње између Републике Србије и Републике Италије, Словеније и Хрватске, као и завршеног пројекта са Републиком Португалијом, и пројекта акције COST-а (FA1001).

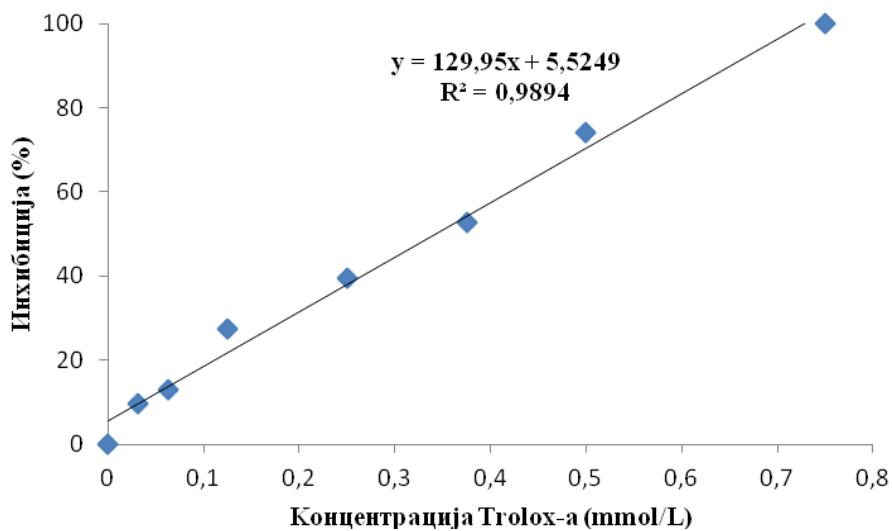
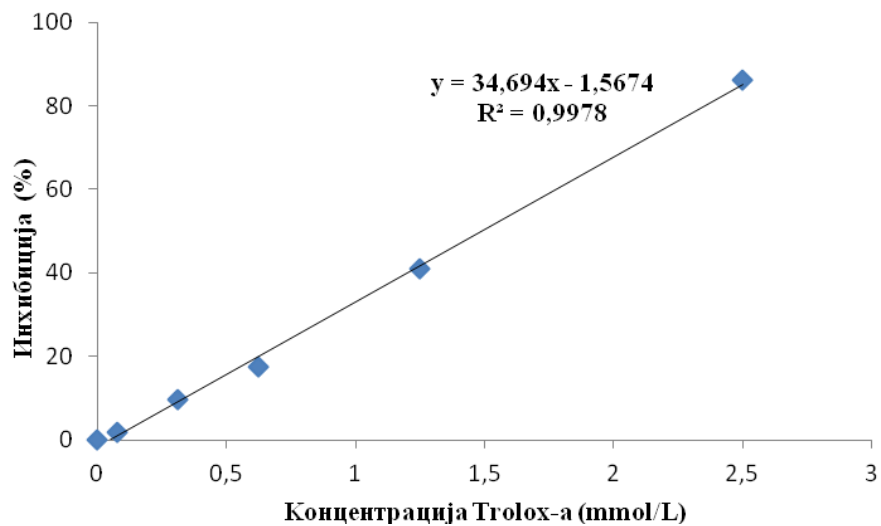
Била је члан Организационог одбора 6. Централноевропског конгреса о храни, *CEFood 2012*, у Новом Саду. Представљала је Србију на међународном такмичењу екоинновативних прехрамбених производа 2015. године. Члан је Удружења микробиолога Србије и Удружења прехрамбених технолога Србије. У току школске 2013/14. године ангажована је у настави у оквиру предмета *Топлотне и дифузионе операције*, а 2014/15. године у оквиру предмета *Биохемијско инжењерство*.

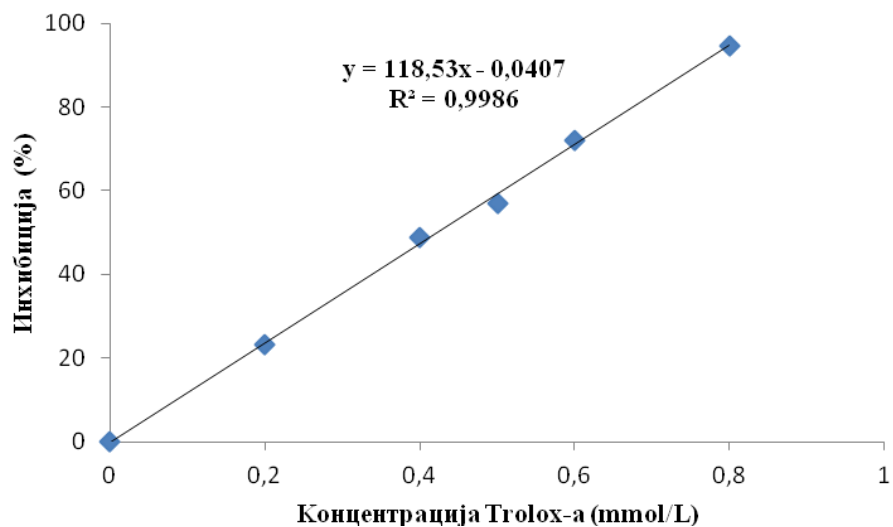
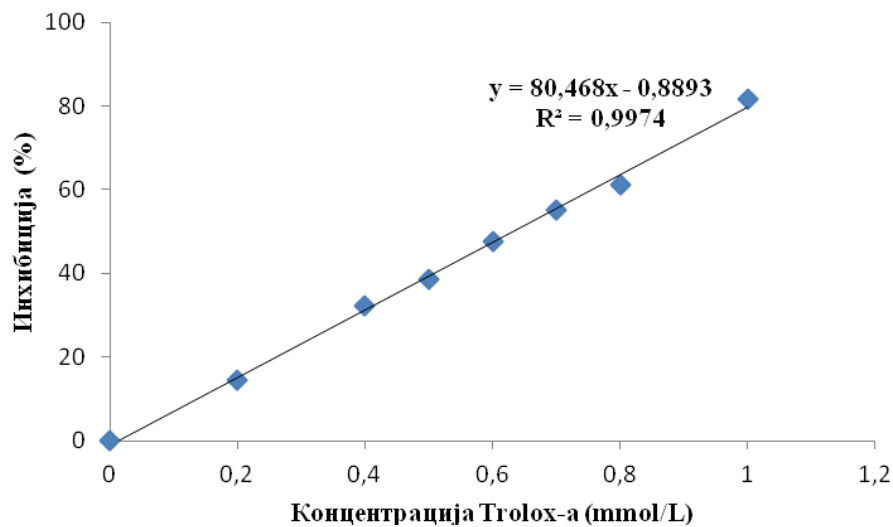
Прилози

Прилог I Стандардне криве коришћене у спектрофотометријским анализама

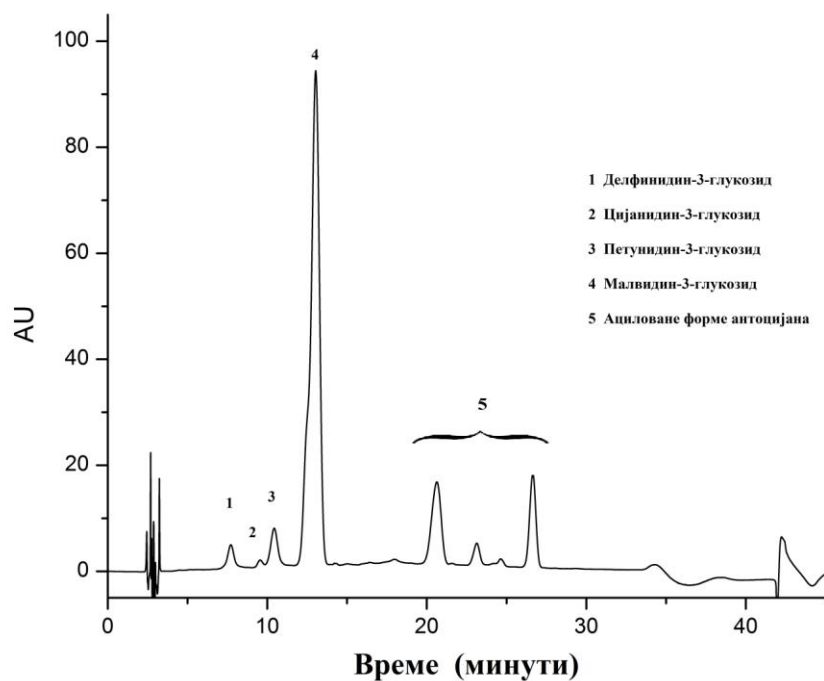


Слика 1. Калибрациона крива раствора галне киселине

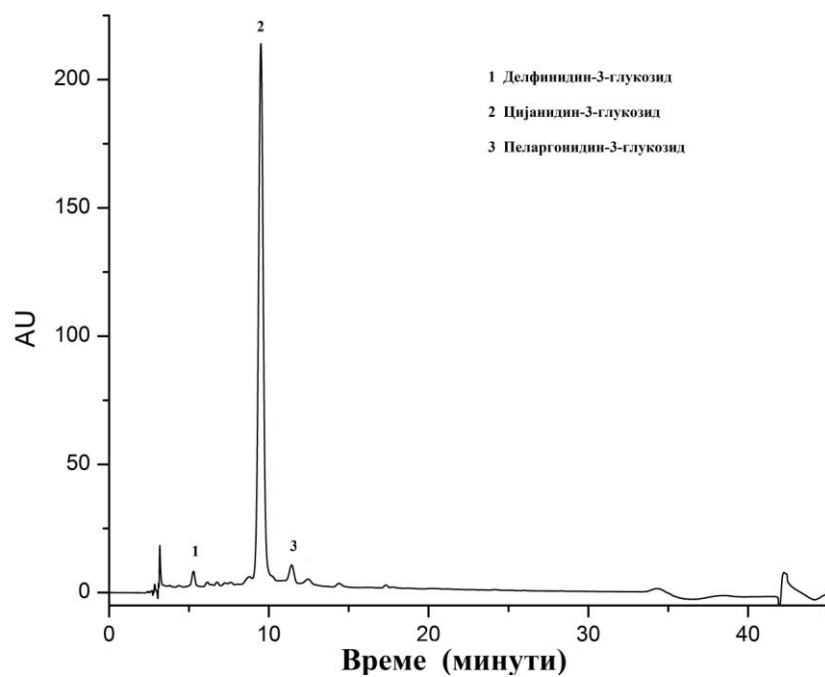
Слика 2. Калибрациона крива раствора *Trolox*-а: *QUENCHER* методаСлика 3. Калибрациона крива раствора *Trolox*-а: *ABTS* метода

Слика 4. Калибрациона крива раствора *Trolox*-а: *DPPH* методаСлика 5. Калибрациона крива раствора *Trolox*-а: *FRAP* метода

Прилог II Хроматограми екстракта антоцијана



Слика 6. Хроматограм екстракта антоцијана покожице грожђа



Слика 7. Хроматограм екстракта антоцијана семењаче соје

Прилог III Анализа варијансе за садржај укупних фенолних једињења и антоцијана и антиоксидативни капацитет микроинкапсулата

Табела 1. Резултати анализе варијансе

Фактори	TPC		TAC		QUENCHER _{ABTS}		DPPH		HPMC	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Техника инкапсулације	1,301	0,265204	8,417	0,007836	514,401	0,000000	78,150	0,000000	7,32	0,012338
Сировина за екстракцију	15,025	0,000720	5,321	0,030012	1,622	0,214997	169,621	0,000000	3,25	0,083806
Носач	52,064	0,000000	35,458	0,000000	45,143	0,000000	331,541	0,000000	134,29	0,000000
Техника*сировина	19,404	0,000189	2,232	0,148229	3,937	0,058793	30,667	0,000011	0,00	1,000000
Техника*носач	1,397	0,266765	1,694	0,204979	44,058	0,000000	8,720	0,001424	1,37	0,272568
Сировина*носач	0,074	0,929151	2,175	0,135434	2,019	0,154690	21,342	0,000005	8,59	0,001533
Сировина*техника*носач	3,692	0,039985	8,524	0,001596	6,506	0,005526	11,356	0,000338	7,47	0,002996

^aF – узорачка вредност за примењени тест; p - ниво статистичке значајности (ако је p<0,05 онда је разлика значајна).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Ана Калушевић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 09/1

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Микроинкапсулација биоактивних једињења из споредних производа
прехранбене индустрије

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду,

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Калушевић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 09/1

Студијски програм Прехрамбена технологија

Наслов докторске дисертације Микроинкапсулација биоактивних једињења из споредних производа прехрамбене индустрије

Ментор Проф. др Виктор Недовић

Потписана Ана Калушевић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду,

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Микроинкапсулација биоактивних једињења из споредних производа
прехранбене индустрије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду,
