



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD  
PREHRAMBENO INŽENJERSTVO

# **Funkcionalni proizvodi na bazi cerealijske i pseudocerealijske sa dodatkom inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle**

Doktorska disertacija

Mentor:

dr Vesna Tumbas Šaponjac, vanredni profesor

Kandidat:

Mirjana Jakišić, master inž.

Novi Sad, 2020

**Univerzitet u Novom Sadu**  
**Tehnološki fakultet**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Mirjana Jakišić, master inž. tehnologije
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Vesna Tumbas Šaponjac, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Funkcionalni proizvodi na bazi cerealija i pseudocerealija sa dodatkom inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija

Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2020.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	6 poglavlja, 145 stranica, 30 slika, 34 tabele, 230 literaturnih navoda
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo, Hemija hrane
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Funkcionalni krekeri, ekstrakt i inkapsulat tropa cvekle, inkapsulacija, funkcionalna svojstva, kvalitativne i kvantitativne karakteristike, polifenoli, betalaini, skladištenje
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta Novi Sad u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	U okviru disertacije kreirani su novi, nutritivno obogaćeni, fini pekarski proizvodi na bazi brašna od cerealija i pseudocerealija, kroz čiju se proizvodnju valorizuju sporedni proizvodi prehrambene industrije – trop cvekle. Rezultati istraživanja pružaju nova saznanja o stepenu

	<p>redukcije bioaktivnih jedinjenja (polifenola i betalaina) tokom postupka proizvodnje i skladištenja finih pekarskih proizvoda obogaćenih ekstraktom tropa cvekle, kao i njihov uticaj na reakcije neenzimskog tamnjenja.</p> <p>Uspešno realizovana istraživanja ukazala su na stepen stabilnosti bioaktivnih jedinjenja iz tropa cvekle inkapsulacijom na protein soje i na opravdanost primene ove metode (tehnike) u proizvodnji funkcionalne hrane. Na ovaj način se obezbeđuju funkcionalni proizvodi koji sadrže dovoljnu količinu visokovrednih jedinjenja koja imaju veću bioraspoloživost i finalan zdravstveni efekat. Zbog niza prednosti inkapsulirane forme ekstrakta imaju veliki potencijal primene u industriji u vidu boja i aditiva, tj. funkcionalnih dodataka u prehranbenim ali i kozmetičkim proizvodima. Istraživanja u okviru disertacije omogućavaju dobijanje inovativnih proizvoda koji proširuju asortiman nutritivno vrednih proizvoda i doprinose kvalitetnijoj ishrani potrošača.</p> <p>Upotrebom nusproizvoda prerade voća i povrća smanjuje se količina otpada i doprinosi zaštiti životne sredine, povećava dobit proizvođača kroz poboljšanje iskorišćenja sirovine i konkurentnosti na tržištu.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>13.04.2017.</p>

Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>dr Jelena Vulić, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, predsednik</p> <p>dr Vesna Tumbas Šaponjac, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, mentor</p> <p>dr Anamarija Mandić, naučni savetnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Univerzitet u Novom Sadu, član</p>

# University of Novi Sad

## Faculty of Technology

### KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Mirjana Jakišić, MSc
Mentor: MN	Vesna Tumbas Šaponjac, PhD, associate professor
Title: TI	Cereal- and pseudocereal-based functional products with encapsulated beetroot extract
Language of text: LT	Serbian, latin
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republuc of Serbia

Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2020
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	6 chapters, 145 pages, 30 figures, 34 tables, 230 references
Scientific field SF	Technology engineering
Scientific discipline SD	Food engineering, Food chemistry
Subject, Key words SKW	Functional biscuits, beetroot pomace extract, beetroot pomace, encapsulation, functional properties, qualitative and quantitative characteristics, polyphenols, betalains, storage
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Bulevar cara Lazara 1
Note: N	None
Abstract: AB	Within the thesis a new, nutrient-rich, fine bakery products based on flour of cereals and pseudocereals were created, through the production of which valorizing by-products of the food industry are produced- pomace beetroot. Results of the research provide new knowledge about degree of reduction bioactive

	<p>compounds (polyphenols and betalains) during process of production and storage of fine bakery products enriched with beetroot pomace extracts, as well as their influence on non-enzymatic tanning reactions.</p> <p>Successfully realized researches have indicated degree of stability bioactive compounds from beetroot pomace by encapsulation on soy protein and justification of application this method (technique) in the production of functional food. In this way, functional products witch contain a sufficient amount of high-value compounds which have higher bioavailability and final health effect are provided. Due to a number of advantages, encapsulated form of the extract have a great potential for application in industry like food color and additives, ie. functional supplements for food and cosmetic products. Research in the framework of the thesis allow obtaining innovative products which expand the range of nutritionally valuable products and contribute to the quality consumers diet.</p> <p>Using by-products of processing fruits and vegetables reduces the amount of waste and contributes to the protection of environment, increases the profit of producers by improving the efficiency of raw materials and market competitiveness.</p>
Accepted on Senate on: AS	13.04.2017.



Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>Jelena Vulić, PhD, assistant professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, chairman</p> <p>Vesna Tumbas Šaponjac, PhD, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, mentor</p> <p>Anamarija Mandić, PhD, senior research fellow, Institute of Food Technology, Novi Sad, University of Novi Sad, member.</p>

## **ZAHVALNOST**

*Prof. dr Vesni Tumbas Šaponjac, svom mentoru, zahvaljujem se na ukazanoj pomoći prilikom izrade doktorske disertacije. Hvala Vam na dragocenim savetima i pruženom znanju, bilo je zadovoljstvo učiti od Vas i sarađivati sa Vama.*

*Veliku zahvalnost dugujem docentu dr Jeleni Vulić na pomoći prilikom izrade doktorske disertacije, korisnim savetima i lepoj saradnji.*

*Prof. dr Jasni Čanadanović-Brunet i prof. dr Gordani Četković dugujem iskrenu zahvalnost na usmeravanju, znanju i nesebičnoj pomoći prilikom izrade doktorske disertacije.*

*Dr Slađani Stajčić hvala na lepoj saradnji i kolegijalnosti.*

*Zahvaljujem se Branislavu Bastaji na pomoći prilikom tehničke izrade rada.*

*Članu komisije, naučnom savetniku dr Anamariji Mandić, hvala na korektnoj i efikasnoj saradnji koja je doprinela zaokruživanju doktorske disertacije.*

*Veliko hvala kolegama sa Vojnotehničkog instituta Beograd, posebno kolegici prof. dr Maji Vitorović-Todorović na nesebičnoj i iskrenoj podršci, brojnim savetima i sugestijama tokom pisanja disertacije.*

*Mojim roditeljima, Vojinu i Silviji, i bratu Srđanu hvala od srca na bezuslovnoj ljubavi, poverenju, podršci i svemu što su mi omogućili da danas budem to što jesam.*

*Dragom Ivanu, hvala na strpljenju, razumevanju i velikoj ljubavi.*

**Mirjana**

## SKRAĆENICE

***a***\* – Udeo crvene/zelene boje

**AA** – Antioksidativna aktivnost

**AA<sub>ABTS+•</sub>** – Antioksidativna aktivnost na ABTS<sup>+</sup> radikale

**AA<sub>DPPH•</sub>** – Antioksidativna aktivnost na DPPH radikale

**ABTS** - 2,2'-azino-bis(-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

**AG** – Guma Arabika

**A<sub>R</sub>** – Apsorbanca radne probe

**A<sub>S</sub>** – Apsorbanca slepe probe

***b***\* – Udeo žute/plave boje

**BE** – Ekvivalent betanina

**BHA** – Butilovani hidroksianizol

**BHT** - *terc*-butil-4-hidroksitoluen

**CD** – Ciklodekstrin

**CE** – Katehin ekvivalent

**CIE** (*fr. Commission Internationale de l'Eclairage*) – Međunarodna komisija za osvetljenje

**CREA** (*ital. Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'analisi dell'Economia agraria*) - Institut za istraživanja u poljoprivredi i agroekonomiji

**DeFENS** (*engl. Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences*) – Departman za nauku o hrani, ishrani i zaštiti životne sredin

**DPPH•** - 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikal

**E-162** – Oznaka za betalain kao prehrambeni aditiv

**E** – 100% rafinirano brašno od einkorn pšenice

**E+A** – Krekeri sa 70% brašna od einkorn pšenice i 0% amaranta

**E+Ex** – 100% rafinirano brašno od einkorn pšenice sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle

**E+A+Ex** – Krekeri sa 70% brašna od einkorn pšenice i 0% amaranta sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle

**E+H** – Krekeri sa 70% brašna od einkorn pšenice i 30% heljdinog brašna

**E+H+Ex** – Krekeri sa 70% brašna od einkorn pšenice i 30% heljdinog brašna sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle

**E+H+I** – Krekeri sa 70% brašna od einkorn pšenice i 30% heljdnog brašna sa dodatkom inkapsulata tropa cvekle

**EI** – Efikasnost inkapsulacije

**E+I** – 100% rafinirano brašno od einkorn pšenice sa dodatkom inkapsulata tropa cvekle

**E+A+I** – Krekeri sa 70% brašna od einkorn pšenice i 0% amaranta sa dodatkom inkapsulata tropa cvekle

**E+K** – Krekeri sa 70% brašna od einkorn pšenice i 30% kinoe

**E+K+Ex** – Krekeri sa 70% brašna od einkorn pšenice i 30% kinoe sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle

**E+K+I** – Krekeri sa 70% brašna od einkorn pšenice i 30% kinoe sa dodatkom inkapsulata tropa cvekle

**FUFOSE** (*engl. Functional Food Science in Europe*) – Nauka o funkcionalnoj hrani u Evropi

**GAE** – Ekvivalent galne kiseline

**HMF** – Hidroksimetilfurfural

**HPLC** (*eng. High Pressure Liquid Chromatography*) – Visokopritisna tečna hromatografija

**ILSI** (*engl. International Life Science Institute*) – Međunarodni institute za prirodne nauke

**In** – Inulin

**L\*** – Svetloća

**MD** – Maltodekstrin

**NADPH** – Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

**NADH** – Nikotinamid adenin dinukleotid

**P** – Krekeri od rafiniranog brašna hlebne pšenice

**P+Ex** – Krekeri od rafiniranog brašna hlebne pšenice sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle

**PG** – Propil galat

**P+I** – Krekeri od rafiniranog brašna hlebne pšenice sa dodatkom inkapsulata tropa cvekle

**PP** – Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u celom inkapsulatu

**PU** – Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja na površini inkapsulata

**RCS** (*engl. Reactive Chlorine Species*) – Reaktivne vrste hlora

**RE** – Ekvivalent rutina

**RNS** (*engl. Reactive Nitrogen Species*) – Reaktivne vrste azota

**ROS** (*eng. Reactive Oxygen Species*) – Reaktivne vrste kiseonika

**RP** (*engl. Reducing Power*) – Redukciona sposobnost

**RSM** (*engl. Responce Surface Methodology*) – Metoda odzivnih površina

**SM** – Suva materija

**SP** – Sojin protein

**TBHQ** - 3,5-di-*terc*-butilhidrohinon

**TE** – Troloks ekvivalent

**TEAC** – Troloks ekvivalent antioksidativnog kapaciteta

**TFC** – Sadržaj ukupnih flavonoida

**TPC** – Ukupan sadržaj polifenola

**US FDA** (*engl. United States Food and Drug Administration*) – Američka uprava za hranu i lekove

**VE** – Ekvivalent vulgaksantina

**WP** (*engl. whey protein*) – Protein surutke

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPŠTI DEO.....	5
2.1. FUNKCIONALNA HRANA .....	5
2.2. NUSPROIZVODI PRERADE VOĆA I POVRĆA KAO IZVOR FUNKCIONALNIH KOMPONENTI.....	8
2.3. ANTIOKSIDANTI I SLOBODNI RADIKALI .....	9
2.3.1. Slobodni radikali i oksidativni stres.....	9
2.3.2. Antioksidanti u prehrambenoj industriji .....	13
2.4. BIOAKTIVNA JEDINJENJA.....	16
2.4.1. Polifenolna jedinjenja .....	17
2.4.2. Betalaini .....	23
2.5. CVEKLA .....	25
2.5.1. Opis biljke.....	25
2.6. INKAPSULACIJA BIOAKTIVNIH JEDINJENJA .....	27
2.6.1. Primena inkapsulacije .....	28
2.6.2. Metode inkapsulacije .....	30
2.7. KREKERI .....	38
2.8. PRIMENA NUS-PRODUKATA I INKAPSULATA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI.....	39
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	43
3.1. MATERIJAL .....	43
3.1.1. Sirovine .....	43
3.1.2. Hemikalije i reagensi .....	44
3.1.3. Instrumenti .....	44
3.2. ISPITIVANJE EKSTRAKTA, INKAPSULATA, TESTA I KREKERA ....	45

3.2.1. Ekstrakcija tropa cvekle i inkapsulacija ekstrakta .....	45
3.2.2. Priprema krekeri.....	46
3.2.3. Ekstrakcija inkapsulata/testa/krekeri.....	47
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja ...	48
3.2.5. Efikasnost inkapsulacije polifenolnih jedinjenja .....	49
3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih flavonoida .....	49
3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih betalaina.....	50
3.2.8. Određivanje antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale .....	52
3.2.9. Određivanje antioksidativne aktivnosti na ABTS <sup>+</sup> radikale .....	53
3.2.10. Određivanje redukcijske sposobnosti.....	54
3.2.11. Određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja polifenolnih jedinjenja i betalaina .....	56
3.2.11.1. <i>Određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja polifenolnih jedinjenja ....</i>	<i>56</i>
3.2.11.2. <i>Određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja betalaina.....</i>	<i>56</i>
3.2.12. Određivanje sadržaja furozina i hidroksimetilfurfurala (HMF) .....	57
3.2.13. Određivanje parametara boje CIELab metodom .....	58
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1. DOBIJANJE I FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE EKSTRAKTA     TROPA CVEKLE.....</b>	<b>59</b>
4.1.1. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida i betalaina u ekstraktu tropa cvekle .....	59
4.1.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih jedinjenja i betalaina u ekstraktu tropa cvekle .....	62
4.1.3. Antioksidativna aktivnost i redukcijska sposobnost ekstrakta tropa cvekle ..	64
<b>4.2. OPTIMIZACIJA PROCESA INKAPSULACIJE EKSTRAKTA     TROPA CVEKLE.....</b>	<b>67</b>
<b>4.3. FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE OPTIMALNOG     INKAPSULATA .....</b>	<b>70</b>

4.3.1.	Sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina u optimalnom inkapsulatu.....	70
4.3.2.	Kvalitativan i kvantitativan sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina u optimalnom inkapsulatu.....	72
4.3.3.	Antioksidativna aktivnost (AA) i redukciona sposobnost (RP) optimalnog inkapsulata .....	74
4.4.	FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE KREKERA .....	75
4.4.1.	Sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina.....	75
4.4.2.	Kvalitativan i kvantitativan sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina u krekerima .....	88
4.4.3.	Antioksidativna aktivnost (AA) i redukciona sposobnost (RP) krekeri .....	98
4.4.4.	Utvrđivanje sadržaja furozina i hidrosimetilfurfurala tokom termičkog tretmana.....	101
4.5.	ODREĐIVANJE PARAMETARA BOJE DOBIJENIH KREKERA .....	104
4.6.	ODRŽIVOST FUNKCIONALNIH KARAKTERISTIKA KREKERA TOKOM SKLADIŠTENJA.....	106
4.6.1.	Sadržaj bioaktivnih jedinjenja, antioksidativna aktivnost i redukciona sposobnost ekstrakta i inkapsulata tropa cvekle tokom skladištenja .....	107
4.6.2.	Sadržaj bioaktivnih jedinjenja, antioksidativna aktivnost i redukciona sposobnost krekeri.....	109
5.	ZAKLJUČAK .....	117
6.	LITERATURA.....	125





## 1. UVOD

U današnje vreme, potrošači traže hranu koja ne zadovoljava samo osnovne prehrambene potrebe, već traže hranu koja ima i pozitivno delovanje na zdravlje, kao što je anti-kancerogeno, anti-inflamatorno, anti-dijabetsko i druga dejstva. Sve je veća potreba za proizvodnjom nutritivno obogaćene i zdravstveno bezbedne hrane. Pod funkcionalnom hranom podrazumevamo hranu koja sadrži jednu ili više bioaktivnih komponenti i koja ima pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje. Iz tog razloga došlo je do velikog interesovanja za bioaktivna jedinjenja i proizvode obogaćenih ovim jedinjenjima.

Nedostatak bioaktivnih jedinjenja je njihova osetljivost, tj. podložnost degradaciji tokom prerade, pripreme i skladištenja pod dejstvom različitih faktora. Povećavanje stabilnosti bioaktivnih jedinjenja se može postići primenom postupka inkapsulacije pri čemu se mogu koristiti različiti nosači koji štite funkcionalnost bioaktivnih jedinjenja i kontrolišu njihovo otpuštanje tokom varenja hrane. Proteini su se pokazali kao pogodni nosači za vezivanje, koncentrovanje i stabilizaciju bioaktivnih jedinjenja, gde se sojin proteinski izolat najčešće koristi zbog niske cene i velikog sadržaja proteina koji se koriste u dijetetskim i prehrambenim proizvodima, i u dodacima ishrani zbog nutritivne i biološke vrednosti.

Cvekla (*Beta vulgaris L.*) spada u 10 najpotentnijih vrsta povrća zbog visokog sadržaja polifenolnih jedinjenja i betalaina (heterocikličnih vodorastvornih pigmenata). Cvekla je nutritivno veoma bogato, niskokalorično i lako probavljivo povrće. Prerodom voća i povrća nastaje otpadni materijal koji se koristi kao stočna hrana, izvor dijetetskih vlakana i za proizvodnju biogoriva. Otpadni materijal koji nastaje prerodom cvekle je pogodan izvor antioksidanata i boja. Crvena boja cvekle potiče od betalaina koji se koriste kao prirodne boje u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Pored betalaina, cvekla sadrži i polifenolna jedinjenja kao što su fenolne kiseline, flavan-3-oli, flavonoidi itd. Zbog osetljivosti na svetlost i toplotu njihova upotreba u hrani je ograničena. Polifenolna jedinjenja utiču na kvalitet, stabilnost i prihvatljivost hrane,

deluju kao boje, arome i antioksidanti i značajni su parametri za funkcionalne i organoleptičke karakteristike prehrambenih proizvoda.

Imajući u vidu navedene činjenice, u okviru ove disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Definisavanje uslova ekstrakcije biološki aktivnih jedinjenja iz sporednih proizvoda prerade cvekle (tropa) upotrebom rastvarača pogodnih za primenu u prehrambenoj industriji,
2. Optimizacija inkapsulacije ekstrakta tropa cvekle na odabranom nosaču (proteinski izolat soje) u cilju stabilizovanja i koncentrovanja bioaktivnih komponenata, kao i dobijanje ekstrakta u obliku pogodnom za aplikaciju, odnosno dobijanje funkcionalnih aditiva koji pokazuju visoku stabilnost i pogodni su za upotrebu u funkciji prirodnih antioksidanata ili boja u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji,
3. Karakterizacija dobijenog ekstrakta i inkapsulata u pogledu kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja polifenolnih jedinjenja, betalaina kao i antioksidativnog potencijala,
4. Optimizacija formulacije funkcionalnih krekeri na bazi cerealija (jednozrna (einkorn, *Triticum monococcum*) i obična (*Triticum aestivum*) pšenica) i pseudocerealija (heljda (*Fagopyrum esculentum*), amarant (*Amaranthus retroflexus*) i kinoa (*Chenopodium quinoa*)) bez dodatka, sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle i sa dodatkom inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle, i njihova priprema u pilot postrojenju,
5. Određivanje stepena neenzimskog tamnjenja (Maillard reakcije) u krekerima kao indikatora intenziteta termičke degradacije,
6. Određivanje boje i funkcionalnog kvaliteta testa i krekeri bez dodatka, sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle i sa dodatkom inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle, i njihove održivosti tokom 6 meseci.

Faze istraživanja i sadržaj doktorske disertacije obuhvata:

- I. Pregled dosadašnjih istraživanja iz oblasti bioaktivnih komponenata tropa cvekle i valorizacije sporednih proizvoda prerade voća i povrća, sa posebnim osvrtom na metode inkapsulacije i mogućnosti primene u prehrambenim proizvodima, u cilju povećanja i očuvanja funkcionalnih i nutritivnih svojstava.
- II. Dobijanje sporednog proizvoda prerade cvekle (tropa) ceđenjem povrća u laboratorijskim uslovima.
- III. Definisavanje uslova ekstrakcije tropa cvekle.

- 
- IV. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja u dobijenom ekstraktu (sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida) i betalaina (betacijana i betaksantina), kao i kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja bioaktivnih jedinjenja.
  - V. Priprema dobijenog ekstrakta za inkapsulaciju.
  - VI. Optimizacija parametara inkapsulacije u cilju dobijanja inkapsulata sa najvećim sadržajem polifenola i najvećom antioksidativnom aktivnošću.
  - VII. Optimizacija formulacije krejera na bazi cerealija i pseudocerealija, odnosno određivanje optimalne količine funkcionalnog dodatka.
  - VIII. Priprema krejera sa i bez funkcionalnog dodatka u pilot postrojenju.
  - IX. Određivanje parametara boje dobijenih krejera.
  - X. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja u testu i krekerima (sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida) i betalaina (betacijana i betaksantina), kao i kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja bioaktivnih jedinjenja.
  - XI. Utvrđivanje sadržaja furozina i hidrosimetilfurfurala u krekerima kao indikatora stepena neenzimskog tamnjenja (Maillard reakcije) tokom termičkog tretmana.
  - XII. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti testa i krejera na stabilne 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) i katjon 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS<sup>+</sup>) radikale i njihove ukupne redukcionne sposobnosti (Oyaizu test).
  - XIII. Praćenje sadržaja polifenolnih jedinjenja (sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida) i betalaina (betacijana i betaksantina) u ekstraktu i inkapsulatu tropa cvekle i krekerima, kao i antioksidativne aktivnosti na stabilne DPPH i ABTS<sup>+</sup> radikale i njihove ukupne redukcionne sposobnosti (Oyaizu test) tokom 6 meseci skladištenja na sobnoj temperaturi.



## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. FUNKCIONALNA HRANA

Danas potrošači preferiraju i biraju hranu koja pored osnovnih hranljivih materija sadrži i supstance koje mogu imati dugoročne pozitivne efekte na ljudsko zdravlje (Hernández-Carrión i sar., 2014). Koncept funkcionalne hrane nastao je u ranim osamdesetim godinama XX veka u Japanu i od tada je široko prihvaćen širom sveta (Ohama i sar., 2006).

U svetu postoji mnogo definicija za funkcionalnu hranu, ali zvanična definicija još uvek nije usvojena ([http://www.functional-food\\_en](http://www.functional-food_en)). Funkcionalna hrana se može definisati kao hrana koja, pored osnovne nutritivne vrednosti sadrži i bioaktivna jedinjenja, i ima blagotvorno dejstvo na ljudski organizam, kao što su poboljšanje zdravlja i smanjenje rizika od nekih bolesti (Bigliardi i Galati, 2013). Funkcionalnu hranu treba posmatrati kao marketinški termin za hranu koja ima optimalan uticaj na digestivni sistem, povoljan efekat na imunitet, krvne sudove, kao i veliki antioksidativni potencijal, jer je on značajan u borbi sa slobodnim radikalima koji se svakodnevno stvaraju u organizmu. Bioaktivna jedinjenja mogu biti makronutrijenti (omega-3 masne kiseline), mikronutrijenti (vitamin ili mineral), neesencijalni sastojci sa nekom funkcijom (likopen, biljni sterol) i fitohemikalije (sulforafan, izoflavoni, fitoestrogeni ili probiotici) (<http://www.studpol.rs/dokumenta/bilten/Funkcionalna%20hrana.pdf>).

Težnja Evropske komisije da definiše pojam funkcionalne hrane rezultirala je evropskim konsezusom o konceptu funkcionalne hrane koji je objavljen 1999. godine kao rezultat projekta "Nauka o funkcionalnoj hrani u Evropi" (*engl. Functional Food Science in Europe - FUFOSE*), koordinisane od strane Međunarodnog instituta za prirodne nauke (*engl. International Life Science Institute - ILSI*). Funkcionalna hrana je definisana kao hrana koja na zadovoljavajući način, pored osnovnih nutritivnih potreba, ispoljava povoljno dejstvo na jednu ili više funkcija ljudskog organizma, pri čemu dovodi do unapređenja zdravlja i opšteg stanja ljudskog organizma kao i do smanjenja rizika od oboljenja. Funkcionalna hrana su isključivo prirodne namirnice (Diplock i sar., 1999).

Da hrana može biti od terapijske koristi nije nov concept. Frazu “neka hrana bude tvoj lek, a lek tvoja hrana” izrekao je Hipokrat pre 2500 godina, međutim, ova fraza je napuštena u XIX veku sa pojavom savremene terapije lekovima. Značajna uloga ishrane u prevenciji bolesti kao i prikazivanje njenog značaja u zdravstvu, ponovo dolazi do izražaja početkom XX veka. Tokom prvih 50 godina XX veka, istraživanja su se fokusirala na indentifikaciju esencijalnih, ali i nutritivnih sastojaka hrane, kao što su vitamini, i otkrivanje njihove uloge u prevenciji raznih bolesti (Hasler, 2002).

Drugi termin koji se često koristi kao sinonim za funkcionalnu hranu je nutraceutik (*engl. nutraceuticals*) koji je priznat 1991. godine od strane Fondacije za inovacije u medicini i odnosi se na skoro svaku biološki aktivnu komponentu koja pruža zdravstvenu korist (Hasler, 2002). Nutraceutici su proizvodi koji se dobijaju izolovanjem ili prečišćavanjem iz hrane, koriste se u obliku lekova kao što su pilule i kapsule, pokazuju pozitivno delovanje na ljudsko zdravlje i pružaju zaštitu od hroničnih bolesti, ali nisu hrana. Sa naučnog gledišta nutraceutici su definisani kao dodaci ishrani koji sadrže veliku količinu bioaktivnih jedinjenja izolovanih iz prirodnih namirnica. Oni su u obliku lekova i doprinose poboljšanju zdravlja (Zeisel, 1999).

Međutim, veoma je bitno funkcionalnu hranu postaviti u posebnu kategoriju, tj. razdvojiti od nutraceutika, medicinske hrane (*engl. pharmafood*), dizajnirane hrane (*engl. designer food*) itd. Bez obzira na odabir definicije, funkcionalna hrana predstavlja jedinstveni concept, ona nije lek već isključivo hrana, bez obzira na to što ona sprečava nastajanje i razvoj mnogih bolesti (Roberfroid, 2002).

Kvalitet hrane se i dalje definiše prema zahtevima potrošača, a svodi se na senzorne karakteristike. Brz način života doveo je do povećane potražnje za gotovom hranom koja sadrži veliku količinu nezasićenih masnih kiselina (Hofstrand, 2008). Osnovni problem čoveka u pogledu nepravilne ishrane jeste prekomerno uzimanje šećera, masti i soli, zanemarivanje i nedostatak edukacije o vrednosti i neophodnosti unošenja sirove hrane, posebno voća i povrća, integralnog brašna, semenki, orašastih plodova, prirodnih zaslađivača, nedovoljno posvećivanje vremena i pažnje pripremanju hrane, kao i štetni sastojci u hrani (pesticidi, sintetički aditivi itd) (<http://www.zdravaishrana.net/dobrozdravlje.htm>).

Nova saznanja o funkcionalnoj hrani i njenom pozitivnom zdravstvenom dejstvu na ljudsko zdravlje, kao i povećanje zabrinutosti potrošača, dovela su do smanjenja primene sintetičkih aditiva u prehrambenoj industriji i do težnje za proizvodnjom zdravije hrane kako bi se

izbegli zdravstveni rizici koji su postali globalni problem (Caleja, i sar., 2015; Carochi i sar., 2014; Sarig i sar., 2003).

Funkcionalna hrana danas predstavlja jedan od najzapaženijih i najperspektivnijih pravaca u nutricionizmu i dijetetici (<http://nadijeti.com/2011/02/07/funkcionalna-hrana/>). Da bi organizam normalno i zdravo funkcionisao potrebno je uneti više od 60 hranljivih materija: ugljene hidrate, proteine, masti, vitamine, minerale i vodu.

Funkcionalna hrana može biti i sveža, ali i prerađena namirnica. Većina proizvoda od voća, povrća, riba, mesa i mleka sadrže prirodne komponente koje pokazuju blagotvorno dejstvo na funkcije u organizmu. To mogu biti omega-3 masne kiseline u ribi, likopen u paradajzu, saponini u soji, katehini u čaju i čokoladi itd. I prerađene namirnice mogu takođe da sadrže funkcionalnu, odnosno bioaktivnu komponentu, bez naknadnog obogaćivanja. Sa druge strane, neki literaturni podaci navode da kao funkcionalnu hranu treba smatrati samo hranu koja je obogaćena ili poboljšana komponentama koje imaju zdravstvenu korist, tj. bioaktivnim jedinjenjima. Tipovi prerađene funkcionalne hrane prikazani su u Tabeli 1 (Kotilainen i sar., 2006; Spence, 2006). Mnoga istraživanja ipak ukazuju na to da funkcionalna hrana treba da bude u formi klasičnih prehrambenih namirnica ([http://www.functional-food\\_en](http://www.functional-food_en)).

**Tabela 1.** Tipovi prerađene funkcionalne hrane

Vrsta funkcionalne hrane	Definicija	Primer
<b>Proizvod povećane hranljive vrednosti</b>	Hrana sa povećanim sadržajem hranljivih materija koje se prirodno nalaze u njoj	Voćni sokovi sa povećanim sadržajem vitamina C
<b>Obogaćeni proizvodi</b>	Hrana sa dodatkom novih hranljivih materija ili komponenata koje se prirodno ne nalaze u njoj	Margarin obogaćen sa estrima biljnih sterola, prebiotika, probiotika
<b>Izmenjeni proizvodi</b>	Hrana iz koje je štetna komponenta potpuno ili delimično uklonjena, ili zamenjena komponentom sa pozitivnim efektom	Prehrambena vlakna koja se dodaju u meso i sladoled da bi se zamenile masnoće
<b>Poboljšani proizvodi</b>	Hrana u kojoj je jedna komponenta prirodno poboljšana primenom posebnih uslova gajenja, izmenom sastava hrane i dr.	Jaja sa većim sadržajem omega-3-masnih kiselina koje potiču iz hrane za živinu



Funkcionalna hrana spada u treću generaciju hrane sa pozitivnim efektom na zdravlje i u tu kategoriju spadaju proizvodi koji objedinjuju prehrambene i zdravstvene aspekte ishrane. U prvu kategoriju hrane spadaju integralne žitarice, jogurt, hleb od celog zrna itd. Proizvodi druge generacije su proizvodi sa smanjenim sadržajem masti (zasićenih masnih kiselina) i šećera (složenih ugljenih hidrata) (<http://www.pharmamedica.rs/ishrana/funkcionalna-hrana-i-lekovito-bilje/>).

Funkcionalna hrana se može podeliti prema strukturi hrane i prema načinu njenog delovanja. Prema strukturi, funkcionalna hrana može biti čvrsta (npr. “energetske pločice”), praškasta i zrnasta, i tečna (npr. šejkovi, napici).

Prema načinu delovanja, funkcionalni proizvodi se mogu podeliti u tri grupe:

1. Proizvodi koji poboljšavaju život (*engl. “add good to your life”*) unapređujući npr. pravilan rad stomaka i creva (probiotici i prebiotici);
2. Proizvodi koji smanjuju postojeće zdravstvene rizike, npr. proizvodi koji smanjuju visoki krvni pritisak ili holesterol u krvi;
3. Proizvodi koji olakšavaju život (*engl. “makes your life easier”*), npr. bezglutenski proizvodi, proizvodi bez laktoze itd (Radojković, 2012).

## **2.2. NUSPROIZVODI PRERADE VOĆA I POVRĆA KAO IZVOR FUNKCIONALNIH KOMPONENTI**

Poznato je da voće i povrće sadrži komponente kao što su vitamini, minerali, antioksidanti i prebiotici, tj. vlakna, koji imaju sposobnost pozitivnog dejstva na zdravlje ljudi, sprečavanjem pojave mnogih bolesti. Brojne studije su pokazale negativnu korelaciju između konzumiranja voća i povrća i učestalosti pojave raznih bolesti, uključujući rak, aterosklerozu i kardiovaskularne bolesti.

Podizanje svesti potrošača o zdravoj ishrani dovodi do potrebe za istraživanjem novih bioaktivnih jedinjenja koja se mogu upotrebiti u funkcionalnim proizvodima (Tumbas Šaponjac i sar., 2016).

Tehnološkim postupkom prerade voća i povrća, veliki deo biljke, kao što su semenke, ljuska, spoljna tkiva i trop, ostaju neiskorišćeni. Na primer, tokom proizvodnje vina i soka od

jabuke, 25-30% sirovog materijala ostaje kao trop, dok kod prerade egzotičnog voća (npr. mango), kora i seme čine do 60% od ukupne mase ploda (Schieber, 2009).

Oni se smatraju tehnološkim (biljnim) otpadom i ekonomskim gubitkom, dok zakonske regulative iz oblasti zaštite životne sredine, dodatno otežavaju odlaganje ovog materijala. Zbog visokog sadržaja vode, ovi otpadni materijali su skloni mikrobiološkom kvarenju. Stoga se materijal nakon obrade obavezno mora sušiti, pri čemu troškovi sušenja, skladištenja i transporta predstavljaju ograničavajući ekonomski faktor za korišćenje ovog otpada (Schieber, 2009). Iz tog razloga se nusproizvodi najčešće koriste kao hrana za životinje, za pripremu dijetetskih vlakana i za proizvodnju biogoriva.

Novija istraživanja su pokazala da se nusproizvodi nastali preradom voća i povrća mogu koristiti kao izvori bioaktivnih jedinjenja, u proizvodnji funkcionalne hrane. Najveće interesovanje privukli su kora, seme i stabljika. Izolovana bioaktivna jedinjenja mogu biti bojene materije, antioksidanti, antimikrobna sredstva itd, te mogu naći primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Tumbas Šaponjac i sar., 2016).

Biološki aktivne komponente nalaze se u većim količinama u spoljašnjim delovima voća i povrća i u semenu. Ovi delovi biljaka se tokom proizvodnje odvajaju ili su pomešani (npr. semenke i pokožica grožđa koji se nalaze u tropu) (Schieber, 2009).

## 2.3. ANTIOKSIDANTI I SLOBODNI RADIKALI

### 2.3.1. Slobodni radikali i oksidativni stres

Slobodni radikali su atomi ili molekuli, koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona koji su sposobni za slobodno postojanje. Mogu nastati kao proizvodi homolitičke, heterolitičke ili redoks reakcije. Najčešće se nespareni elektroni nalaze na kiseoniku (reaktivne vrste kiseonika, *engl. reactive oxygen species* - ROS) ili azotu (reaktivne vrste azota, *engl. reactive nitrogen species* - RNS) i oni učestvuju u stvaranju oksidativnog stresa (Dasgupta i Klein, 2014). Najvažnije reaktivne vrste kiseonika i azota date su u Tabeli 2 (Halliwell i Whiteman, 2004).

**Tabela 2.** Najvažnije reaktivne slobodnoradikalske vrste

Slobodnoradikalske vrste
<i>Reaktivne vrste kiseonika</i>
Superoksid anjon radikal, O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
Hidroksil radikal, OH <sup>•</sup>
Hidroperoksil radikal, HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>
Peroksil radikal, RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>
Alkoksil radikal, RO <sup>•</sup>
Karbonatni radikal, CO <sub>3</sub> <sup>•-</sup>
Ugljendioksidni radikal, CO <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
<i>Reaktivne vrste azota</i>
Azotmonoksidni radikal, NO <sup>•</sup>
Azotdioksidni radikal, NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>

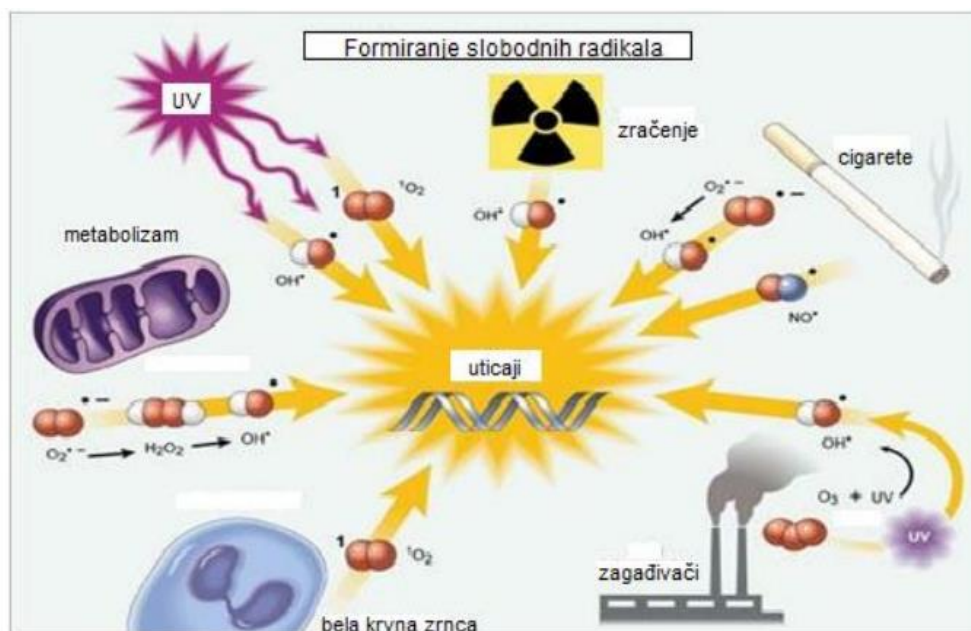
Postoje dva izvora koji dovode do slobodnoradikalskih reakcija: endogeni i egzogeni izvori (Dasgupta i Klein, 2014). Najznačajniji endogeni izvori slobodnih radikala su dati u Tabeli 3, dok su egzogeni izvori dati u Tabeli 4, a Slika 1 daje opšti prikaz formiranja slobodnih radikala pod uticajem endogenih i egzogenih faktora.

**Tabela 3.** Endogeni izvori slobodnih radikala

Fiziološki proces	Uticaj procesa
<i>Mitohondrijsko disanje</i>	Suštinski biološki proces u kojem se stvara superoksid anjon radikal.
<i>Autooksidacija</i>	Autooksidacija mnogih bioloških molekula (hemoglobina, mioglobina itd) može dovesti do nastanka slobodnih radikala u ljudskom telu. Superoksid anjon radikal je najvažniji proizvod autooksidacije.
<i>Enzimski reakcija</i>	Mnoge enzimske reakcije koje uključuju ksantin oksidazu, aldehid oksidazu itd. mogu stvarati slobodne radikale.
<i>Disanje</i>	To je proces u kojem fagociti dobijaju veliku količinu kiseonika tokom fagocitoze.
<i>Metalni joni</i>	Joni bakra i gvožđa mogu reagovati sa vodonik peroksidom stvarati slobodne radikale.
<i>Naporno vežbanje</i>	Može aktivirati ksantin oksidazu koja proizvodi slobodne radikale. Infekcija takođe može proizvesti slobodne radikale.
<i>Ishemija/ reperfuzija</i>	Može aktivirati ksantin oksidazu.

**Tabela 4.** Egzogeni izvori slobodnih radikala

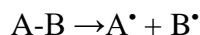
Egzogeni izvori	Uticaj izvora
Zagađenje vazduha	Izlaganje česticama u zagađenom vazduhu može proizvesti značajan oksidativni stres, povećanje rizika za pojavu astme, kardiovaskularnih bolesti, hronične plućne opstruktivne bolesti (KOPB) i raka pluća.
Neorganske čestice u vazduhu	Unos mineralnih čestica prašine kod pojedinaca koji rade u industriji može izazvati oksidativni stres, naročito kada vazduh sadrži finu mineralnu prašinu (kvarc, silicijum-dioksid i azbest).
Pušenje duvana	Oksidanti prisutni u duvanskom dimu mogu oštetiti pluća, uzrokovati KOPB i povećati rizik od raka pluća.
Neki lekovi	Lekovi kao što su bleomicin, adriamicin i sulfasalazin mogu izazvati oksidativni stres.
Industrijski rastvarači	Industrijski rastvarači kao što su hloroform i ugljen tetrahlorid mogu izazvati oksidativni stres ako se udišu.
Izlaganje zračenju	Prekomerno izlaganje ultraljubičastoj svetlosti, dugotrajno izlaganje suncu i tretman zračenjem kao terapija protiv raka, povećavaju oksidativni stres.

**Slika 1.** Formiranje slobodnih radikala pod uticajem endogenih i egzogenih faktora

Slobodni radikali učestvuju u lančanim reakcijama koje se dele u tri faze:

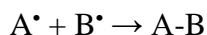
- Reakcija inicijacije
- Reakcija propagacije
- Reakcija terminacije

Inicijalni korak karakteriše nastajanje slobodnih radikala, najčešće homolitičkim cepanjem veze u kojem svaki fragment zadržava po jedan elektron. Inicijalni korak se može desiti spontano ili može biti izazvan grejanjem ili zračenjem, zavisno od tipa veze:



Nastavak reakcije se karakteriše stvaranjem novog radikala (propagacijom) tako da novonastali radikal može reagovati sa drugim molekulom i dati novi radikal, sve dok se dva radikala ne spoje u neutralni molekul. Ovaj proces se zove i lančana reakcija, jer se karakteriše nastankom stotina ili hiljada propagacijskih koraka („karika u lancu“) između inicijacijskog i terminacijskog koraka.

Terminacija se karakteriše destrukcijom slobodnih radikala. Suprotno od propagacije, kod terminacije kombinacijom dva slična ili različita radikala dolazi do nastajanja nove veze:



Oksidativni stres se definiše kao neravnoteža između prisustva relativno visokih nivoa slobodnih radikala i reaktivnih metabolita i njihova eliminacija zaštitnim mehanizmima (anti-oksidentima). Ova neravnoteža uzrokuje oštećenje značajnih biomolekula (protein, lipidi i DNK) u ćelijama sa potencijalnim uticajem na ceo organizam. Oksidativni stres može izazvati različite biološke reakcije, kao što su zaustavljanje rasta, adaptaciju i transkripciju gena i inicijaciju signala transdukcije (Cort i Ozben, 2014).

Poznato je da su visoki nivoi oksidativnog stresa toksični, dok niski nivoi mogu izazvati ćelijsku proliferaciju, što pokazuje da promene u ćeliji zavise od količine ROS (Cort i Ozben, 2014).

ROS se proizvode tokom normalne funkcije ćelija aerobnih organizama zbog njihovog oslanjanja na oksidativne procese neophodne za život. ROS su poznati kao toksini koji izazivaju razne štetne efekte (disfunkciju ćelija, smrt ili maligne transformacije). Nastaju tokom zračenja UV-zracima, X-zracima i gama zracima, proizvodi su metalo-katalizovanih reakcija, prisutni su kao zagađivači u atmosferi, nusproizvodi mitohondrijskih katalizujućih reakcija transporta elektrona i drugih mehanizama. Niže koncentracije ROS pokazuju mitogene efekte, dok visoke

koncentracije izazivaju oštećenje ćelijskih struktura (uključujući membrane lipida, proteina i nukleinskih kiselina) (Cort i Ozben, 2014).

ROS imaju važnu ulogu u patogenezi nekih neurodegenerativnih poremećaja kao što su Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest i amiotrofična lateralna bolest. Uzročnici su nastanka depresije, autizma i šizofrenije. Starosne bolesti oka, kao što su katarakta i retinalna degeneracija, se smatraju posledicom oksidativnog stresa. Takođe, dovode do nastanka mnogih oboljenja, kao što su ateroskleroza, kancer, kardiovaskularna oboljenja, astma, artritis, gastritis, dermatitis, dijabetes, bolesti jetre, bubrega, zapaljenski procesi itd. (Radojković, 2012).

Istraživanja su pokazala da pored štetnih efekata, ROS imaju i ulogu u regulisanju i održavanju normalnih procesa u živim organizmima (Assim i Reem, 2012). Značajna je njihova uloga u održavanju prečnika krvnih sudova i normalne funkcije vaskularnih ćelija, u neuronskoj apoptozi tokom razvoja mozga (Massaad i sar., 2011), kao i u regulaciji unosa glukoze gde deluju kao signalni molekuli (Sandström i sar., 2006). Takođe, neophodni su kofaktori tiroperoksidaze (enzim koji učestvuje u završnom koraku proizvodnje tiroidnih hormona) (Erdamar i sar., 2008), učestvuju u moduliranju procesa starenja (Salminen i Kaarniranta, 2012) i regulišu stabilnost gena (Rajendran i sar., 2011; Rodríguez-Fragoso i sar., 2014). Da bi do ovoga došlo, ROS i zaštitni antioksidativni sistemi moraju da rade u koordinaciji kako bi dostigli stanje redoks homeostaze, odnosno ravnoteže (Rodríguez-Fragoso i sar., 2014).

### **2.3.2. Antioksidanti u prehrambenoj industriji**

Oksidacija masti i ulja je odgovorna za nastajanje neprijatnog mirisa i ukusa proizvoda, što dovodi do smanjenja nutritivnog kvaliteta i ispravnosti hrane, uzrokovano formiranjem sekundarnih, potencijalno toksičnih jedinjenja. U cilju očuvanja senzorskih karakteristika hrane, i sprečavanja degradacije vitamina, u hranu se dodaju antioksidanti (Moure i sar., 2001).

Halliwell i Gutteridge (1990) su dali opšte prihvaćenu definiciju antioksidanata prema kojoj su antioksidanti supstance koje, prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat koji je podložan oksidaciji (lipidi, proteini, ugljeni hidrati, DNK), značajno usporavaju ili sprečavaju njegovu oksidaciju.

Važna uloga antioksidanata u prehrambenoj industriji ogleda se u produžavanju roka trajanja hrane i pića, sprečavanjem oksidacionih procesa koji narušavaju njen kvalitet i senzorske

karakteristike (Pokorny i sar., 2001). Američka uprava za hranu i lekove (*engl. United States Food and Drug Administration - US FDA*) definisala je antioksidante kao supstance koje se koriste za zaštitu hrane od kvarenja, užeglosti i promene boje usled oksidacije (Dziezak, 1986).

Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da (Aruoma, 1996):

- deluju kao "skevindžeri" slobodnih radikala, odnosno donori elektrona ili H atoma,
- kompleksiraju jone metala, čime se sprečava njihovo katalitičko dejstvo tokom oksidacije lipida ili reakcije razgradnje hidroperoksida lipida,
- razgrađuju hidroperokside lipida u neradikalske vrste (npr. alkohole),
- sprečavaju dejstvo singletnih oblika kiseonika,
- inhibiraju neke enzime,
- pokazuju sinergističke efekte i
- redukuju neka jedinjenja.

Antioksidanti su klasifikovani na više načina. Prema nivou i načinu delovanja u ljudskom organizmu antioksidanti su klasifikovani na:

- preventivne antioksidante,
- "skevindžer" antioksidante i
- "reparacione" antioksidante (Skinner i Hunter, 2013).

Preventivni antioksidanti sprečavaju stvaranje slobodnih radikala i iniciranje lančane reakcije peroksidacije dekompozicijom vodonik peroksida i lipidnih hidroperoksida (enzimski antioksidanti katalaza, glutation-peroksidaza, glutation-S-transferaza), kompleksiranjem jona metala (albumin, ceruloplazmin, mioglobin, transferin) i eliminacijom ROS (superoksid dismutaza).

"Skevindžer" antioksidanti imaju sposobnost da "hvataju" slobodne radikale i tako inhibiraju inicijaciju i prekidaju propagaciju reakcije lipidne oksidacije, pa se zato i zovu "prekidači" lančanih radikalskih reakcija (*eng. chain breaking antioxidants*). Dele se prema rastvorljivosti na:

- hidrosolubilne antioksidante (vitamin C, mokraćna kiselina, bilirubin, albumin, glutation, neki polifenoli) i
- liposolubilne antioksidante (vitamin E, vitamin A, karotenoidi, neki polifenoli) (Vaya i Aviram, 2001).

"Reparacioni" antioksidanti deluju posebnim mehanizmima, obnavljajući ili uklanjajući oštećene vitalne biomolekule koji nastaju u uslovima oksidativnog stresa i pored prisustva

preventivnih i "skevindžer" antioksidanata. U "reparacione" antioksidante spadaju: fosfolipaze, proteaze, lipaze, enzimi koji obnavljaju DNK, transferaze itd. (Vaya i Aviram, 2001).

Prema mestu nastajanja, antioksidanti značajni za ljudski organizam dele se na endogene i egzogene antioksidante. Endogeni antioksidanti su antioksidanti koji nastaju u ljudskom organizmu, a egzogeni se ne mogu sintetisati u organizmu, te se unose putem hrane ili lekova. Endogeni antioksidanti su: enzimski sistemi (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza), mokraćna kiselina, bilirubin, tioli (npr. glutation, lipoinska kiselina, N-acetilcistein), NADPH, NADH, koenzim Q10 (ubihinon), proteini koji kompleksiraju jone metala (albumin-bakar, ceruloplazmin-bakar, feritin-gvožđe, mioglobin-gvožđe, transferin-gvožđe). U egzogene antioksidante ubrajaju se: vitamin C, vitamin E, karotenoidi ( $\beta$ -karoten), oksikarotenoidi (likopen), polifenoli (flavonoidi, fenolne kiseline, proantocijanidini itd.) i drugi.

Prema poreklu antioksidanti mogu biti sintetički i prirodni. Sintetički antioksidanti se odlikuju velikom stabilnošću, efikasnošću i prihvatljivošću sa ekonomskog aspekta, što opravdava njihovu primenu. Široko primenjivani su: 2- i 3-*terc*-butil-4-hidroksianizol (BHA), *terc*-butil-4-hidroksitoluen (BHT), 3,5-di-*terc*-butil-hidrohinon (TBHQ), propil-galat (PG), dodecil-galat i oktil-galat. Klinička ispitivanja su pokazala da neki sintetički antioksidanti imaju toksično i kancerogeno delovanje, zbog čega je njihova primena ograničena, što je dovelo do povećanog interesovanja za ispitivanje antioksidativne aktivnosti prirodnih antioksidanata (Đilas i sar., 2008).

Prirodni antioksidanti mogu biti biljnog, životinjskog i mikrobiološkog porekla. Biljke predstavljaju najznačajniji izvor prirodnih antioksidanata: tokoferola, karotenoida, askorbinske kiseline, polifenola, terpena i mnogih drugih (Hagerman i sar., 1998). Međutim, i pored njihovog pozitivnog dejstva, primena prirodnih antioksidanata je ograničena. Faktori koji ograničavaju njihovu primenu su karakteristična aroma biljnih ekstrakta i nepotpuna toksikološka ispitivanja. Sa druge strane, polifenoli biljaka utiču na senzorska i organoleptička svojstva hrane, funkcionalnu i nutritivnu vrednost proteina prisutnih u hrani kao i na teksturu hrane (Moure i sar., 2001).

Objavljen je velik broj naučnih radova u kojima je utvrđena antioksidativna aktivnost ekstrakata različitih biljnih vrsta, njihovih etarskih ulja kao i nusproizvoda prerade biljaka kao što su: ljuske od kikirikija, seme rogača, kora i seme citrusa itd. (Vulić i sar., 2014; Stanković, 2011; Hussain i sar., 2011; Bocco i sar., 1998).



## 2.4. BIOAKTIVNA JEDINJENJA

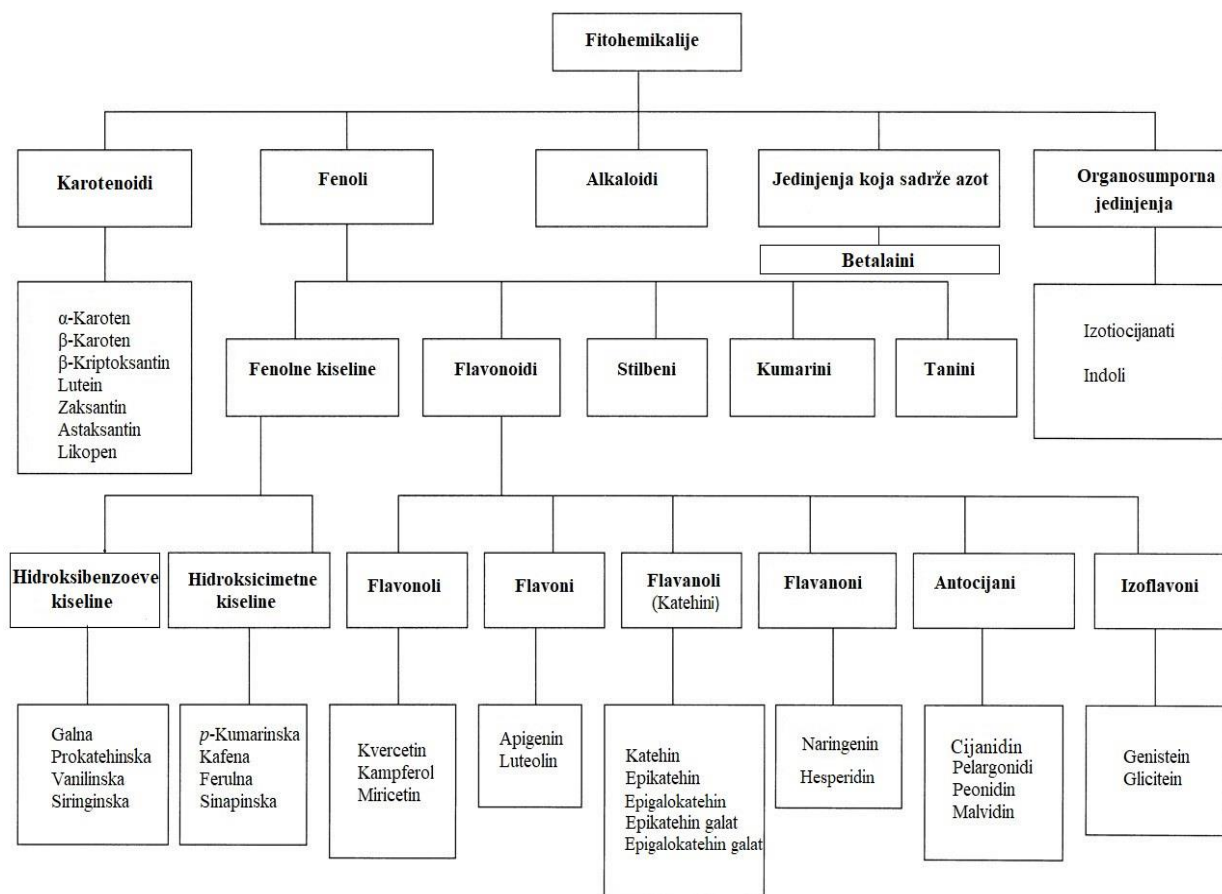
Biološki aktivna jedinjenja ili fitohemikalije su prirodna jedinjenja prisutna u biljnom svetu (grčki *phyton* - biljka) koje imaju potencijalno pozitivan uticaj na ljudski organizam. Pozitivni efekti hrane biljnog porekla se pripisuju prehranbenim vlakanima visoke molekulske mase i sekundarnim biljnim metabolitima niske molekulske mase. Najčešće korišćene biološki aktivne komponente su: vitamini, minerali, omega-3 masne kiseline, prebiotici, probiotici, prirodni pigmenti, i drugi biljni sastojci (Radojković, 2012).

Ova jedinjenja imaju značajnu ulogu u unapređenju zdravlja tako što deluju antioksidativno, antikancerogeno, antiinflamatorno, antidijabetski, antikoagulacijski, antihipertenzivno, antiaterotrombotički (Kosseva, 2013). Na taj način bioaktivne komponente prisutne kao prirodni sastojci hrane, pored obezbeđivanja osnovne hranljive vrednosti, imaju sposobnost sprečavanja nastanka bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, šizofrenija, rak i mnoge druge (Marsanasco i sar., 2015).

Fitohemikalije su sekundarni metaboliti biljaka koje pored primarnih metabolita (ugljeni hidrati, proteini i lipidi), koji obezbeđuju strukturne i funkcionalne komponente biljkama, utiču na međucelijsko funkcionisanje i reprodukciju unutar biljke (Wink, 2003).

Sekundarni biljni metaboliti igraju važnu ulogu u zaštiti biljke, štiteći je od biotičkog i abiotičkog stresa. Mogu se svrstati u četrnaest osnovnih klasa jedinjenja: alkaloidi, amini, cijanogeni glikozidi, diterpeni, flavonoidi, glukozinolati, monoterpeni, neproteinske aminokiseline, fenilpropani, poliacetileni, poliketoni, seskviterpeni, tetraterpeni, triterpeni, saponini i steroli (Wink, 2003).

Na slici 2 prikazana je klasifikacija fitohemikalija na osnovu njihove hemijske strukture.



**Slika 2.** Klasifikacija fitohemikalija na osnovu hemijske strukture

Fitohemikalije se u hrani obično javljaju u malim količinama i njihovo proučavanje je usmereno ka proceni njihovog efekta na zdravlje. One se ne akumuliraju u organizmu, te je neophodno redovno konzumiranje hrane koja ih sadrži. Na primer, veoma je važno unositi hranu bogatu esencijalnim masnim kiselinama jer ljudski organizam nema sposobnost stvaranja istih (Marsanasco i sar., 2015).

### 2.4.1. Polifenolna jedinjenja

Polifenolna jedinjenja se klasifikuju kao primarni antioksidanti koji su uglavnom skevin-džeri slobodnih radikala. Oni odlažu ili inhibiraju inicijaciju ili prekidaju reakciju lipidne oksidacije, čime se, između ostalog, smanjuje formiranje proizvoda razlaganja karakterističnih za užegle proizvode (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Polifenolna jedinjenja predstavljaju rasprostranjenu heterogenu grupu sekundarnih biljnih metabolita, koja su veoma važna kod senzorskih i nutritivnih osobina voća i povrća i drugih biljaka (Liu i sar., 2004). Polifenolna jedinjenja u strukturi sadrže aromatičan prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Njihova struktura se kreće od jednostavnih fenola male molekulske mase do kompleksnih polimera velike molekulske mase (Ignat i sar., 2011).

Imajući u vidu veliku raznovrsnost i važnu ulogu biljnih polifenola, njihova klasifikacija je komplikovana. Postoje različite klasifikacije gde je najčešća ona koja je zasnovana na broju ugljenikovih atoma u osnovnom skeletu (Tabela 5) (Balasundram i sar., 2006).

**Tabela 5.** Osnovna podela polifenolnih jedinjenja

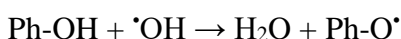
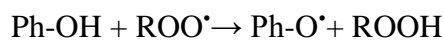
Osnovni skelet	Klasa	Primer
<b>C6</b>	Jednostavni fenoli	Katehol, hidrohinol, rezorcinol
	Benzohinoni	
<b>C6-C1</b>	Fenolne kiseline	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina, salicilna kiselina
<b>C6-C2</b>	Fenilsirćetne kiseline	<i>p</i> -hidroksifenilsirćetna kiselina
<b>C6-C3</b>	Fenilpropeni	Eugenol, miristicin
	Kumarini	Umbeliferon, eskuletin, skopolin
	Hromoni	Eugenin
<b>C6-C4</b>	Naftohinoni	Juglon
<b>C6-C1-C6</b>	Ksantoni	Mangostin, mangiferin
<b>C6-C2-C6</b>	Stilbeni	Rezveratrol
	Antrahinoni	Emodin, hrizofanol
<b>C6-C3-C6</b>	Flavonoidi	
	Flavoni	Sinenstein, nobiletin, izosinensitin, tangeretin, diosmin
	Flavonoli	Kvercetin, kempferol
	Flavonol glikozidi	Rutin
	Flavanoli	Dihidroksikvercetin, dihidroksikempferol glikozidi
	Flavanoni	Hesperidin, naringenin
	Flavanon glikozidi	Neohesperidin, narirutin, naringin, eriocitrin
	Antocijani	Glikozidi peralgonidina, peonidina, delfinidina, petunidina, cijanidina
	Flavanoli (katehini)	(+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin
<b>(C6-C3)<sub>2</sub></b>	Halkoni	Floridžin, arbutin, halkonaringenin
<b>(C6-C3-C6)<sub>2</sub></b>	Lignini	Pinorezinol
	Biflavonoidi	Agatisflavon

Pored ove podele, polifenolna jedinjenja se klasifikuju i na osnovu elemenata koji su vezani za fenolni prsten. Po ovoj klasifikaciji glavne grupe polifenola su: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, kumarini i tanini (Liu i sar., 2004).

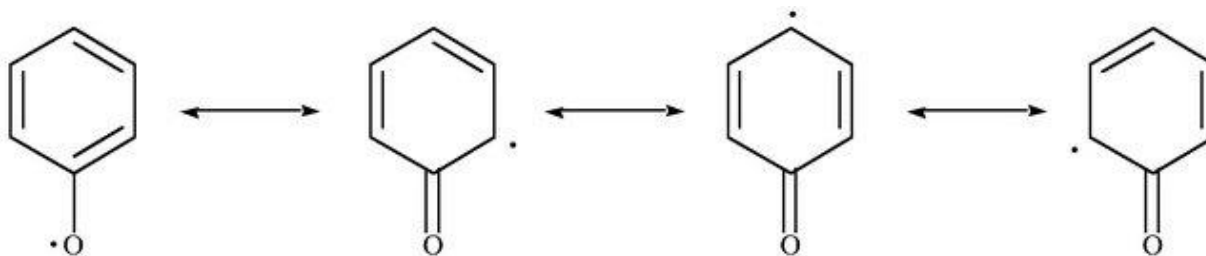
U prirodi se polifenolna jedinjenja mogu nalaziti u slobodnom obliku, ili češće u obliku glikozida. Glikozidi sadrže aglikonski deo fenolne strukture i različit broj monosaharidnih jedinica, pri čemu je za biološku aktivnost polifenolnih jedinjenja zaslužan isključivo aglikonski deo molekula. Monosaharidi koji ulaze u sastav glikozida su: glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, manoz, glukuronska i galakturonska kiselina. Pored toga, šećeri mogu biti prisutni u obliku mono-, di-, tri-, ili tetrasaharida (Sakakibara i sar., 2003). Ova jedinjenja se mogu naći i u obliku kompleksa sa organskim kiselinama, lipidima, ugljenim hidratima, aminima i drugim polifenolnim jedinjenjima.

Polifenolna jedinjenja u biljkama obavljaju niz funkcija delujući kao antioksidanti, anti-mikrobni i antiinflamatorni agensi, fotoreceptori, privlače insekte oprašivače, deluju u zaštiti biljnih tkiva od prekomernog UV zračenja, doprinose boji i senzorskim karakteristikama voća i povrća (Liu i sar., 2004). Dokazano je da prirodni polifenoli imaju veoma važnu ulogu u ljudskom organizmu u zaštiti od patoloških bolesti kao što su ateroskleroza, neurodegenerativna i kancerogena oboljenja. U industriji se polifenoli koriste kao prirodne boje i konzervansi za hranu, u proizvodnji boja, papira i u kozmetici (Ignat i sar., 2011).

Smatra se da je antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja pre svega rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i kao takvi uklanjaju slobodne radikale uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala (Ph-O<sup>•</sup>):



Povećana stabilnost fenoksil radikala pripisuje se prvenstveno delokalizaciji elektrona i postojanju više rezonantnih formi (Slika 3). Stabilizacija fenoksil radikala je takođe moguća i njegovim kuplovanjem sa slobodnoradikaliskim vrstama karakterističnim za reakcije oksidacije lipida, pri čemu nastaju relativno stabilne neradikalne vrste (Duh i sar., 1999).



**Slika 3.** Rezonantne strukture fenoksil radikala

Polifenolna jedinjenja su od velikog značaja u fiziologiji biljaka zbog važne uloge u rastu, razmnožavanju, pigmentaciji i formiranju ukusa, kao i otpornosti na patogene organizme i predatore. Međutim, polifenolna jedinjenja u biljkama nisu ravnomerno raspoređena na nivou tkiva, ćelijskom i subćelijskom nivou. Nerastvorni polifenoli su sastavni deo ćelijskog zida, dok se rastvorni polifenoli nalaze unutar ćelijskih vakuola (Naczki i Shahidi, 2004).

Dijetetski unos polifenola u velikoj meri zavisi od navika u ishrani i volji pojedinaca (Shahidi i Naczki, 2004). Prosečan dnevni unos dijetetskih polifenola je približno 1 g po osobi (Scalbert i Williamson, 2000). Najznačajniji izvori polifenolnih jedinjenja, i izvori antioksidanata, su začinsko i lekovito bilje, voće, jezgrasto voće, povrće, seme uljarica, integralne žitarice, masline, razni napici, kakao, crna čokolada, brojni životinjski i mikrobiološki proizvodi (Naczki i Shahidi, 2006; Mitić, 2011).

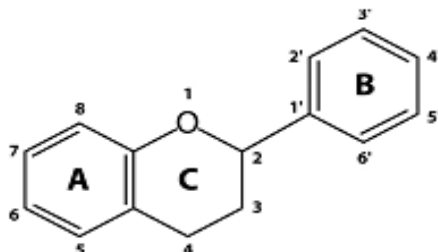
Neki antioksidanti pokazuju prooksidativno dejstvo pod određenim uslovima, dok pod drugim uslovima mogu pokazivati kancerogene osobine, što znači da prevelike količine antioksidanata mogu biti i štetne po zdravlje (Boudet, 2007). Međutim, jedan od najvažnijih zaključaka je da je nizak rizik od pojave kancera usko povezan sa ishranom bogatom raznovrsnim antioksidantima. Kombinovanje antioksidanata sa različitim delovanjem povećava efikasnost i smanjuje toksičnost (Lee i Lee, 2006).

### *Flavonoidi*

Među polifenolima prisutnim u hrani biljnog porekla dominantnu grupu čine flavonoidi koji čine oko dve trećine dijetetskih polifenola (Robbins, 2003).

Flavonoidi su sekundarni biljni metaboliti, u vodi rastvorni pigmenti, koji se mogu naći u lišću, semenkama, korenju, cvetu viših biljaka, a najzastupljeniji su u pokožici voća i povrća (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Flavonoidi sadrže 15 atoma ugljenika, osnovna struktura je C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Slika 4). Ugljenikov skelet flavonoida sadrži dva benzenova prstena (A i B) međusobno povezana tročlanim ugljeničnim nizom, koji sa atomom kiseonika formira heterociklični prsten (prsten C) (Del Rio i sar., 2013).



**Slika 4.** Osnovni skelet flavonoida

Flavonoidi imaju veliki broj značajnih bioloških aktivnosti kao što je antioksidativna aktivnost (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Nalaze se u obliku glikozida rastvornih u vodi ili u sastavu tanina, dok se slobodni veoma retko nalaze. Pored šećera, kao supstituenti na osnovnom jezgru, mogu se naći hidroksilna grupa i metoksi grupa, što utiče na raznolikost ovih jedinjenja i doprinosi njihovom velikom broju.

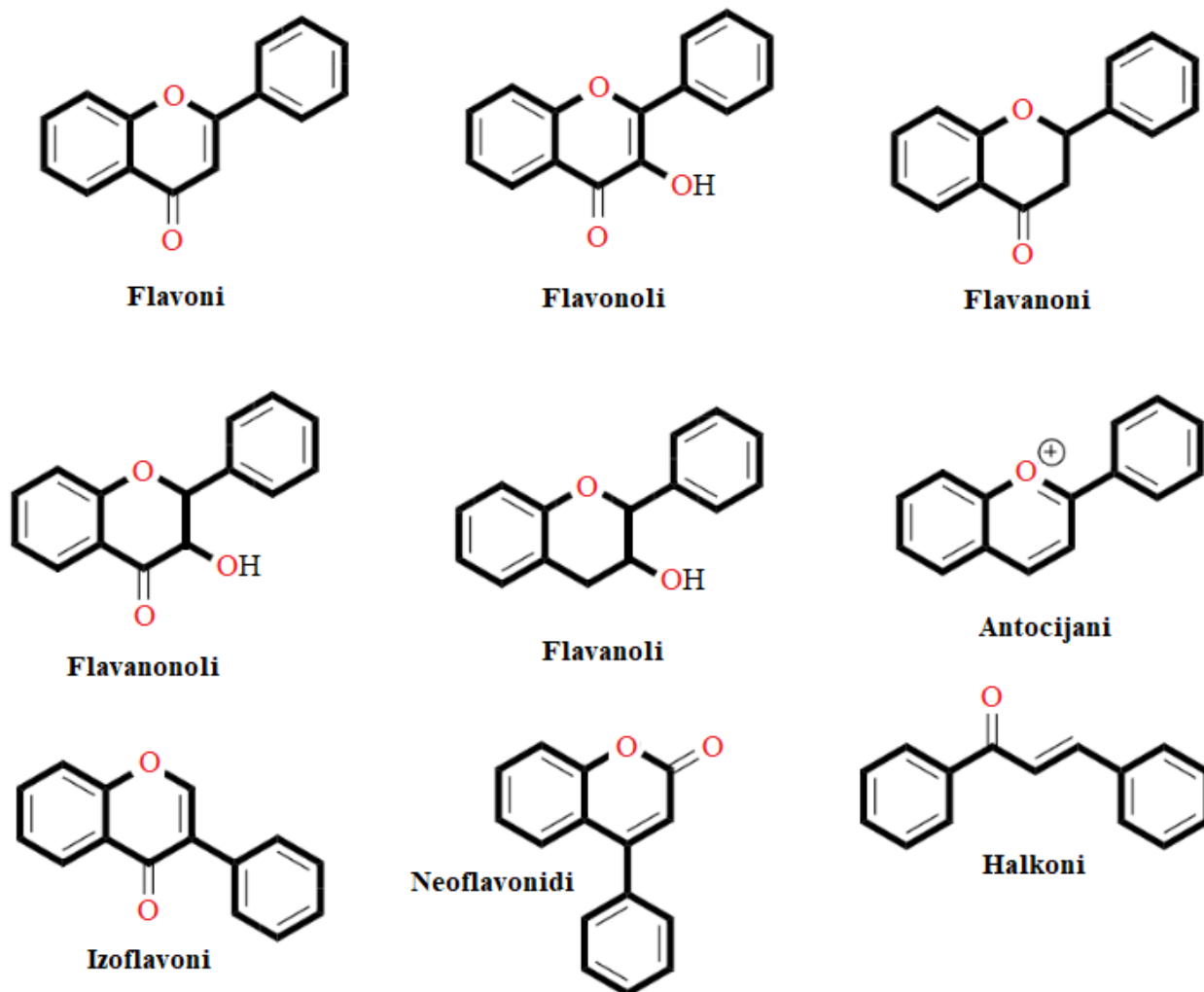
Osnovne klase flavonoida su: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli (katehini), antocijanidini i izoflavoni. Klase flavonoida se razlikuju po svojoj strukturi heterocikličnog prstena oko kiseonika, ali svi sadrže već pomenutu karakterističnu C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> strukturu (Del Rio i sar., 2013). Osnovne klase flavonoida date su na Slici 5.

Raznovrsnost i veliki broj struktura ovih jedinjenja je uzrokovana brojnim modifikacijama njihove osnovne strukture, kao što su:

- Dodatne hidroksilacije,
- Dimerizacije,
- Vezivanje neorganskog sulfata,
- O-metilacija hidroksilnih grupa,
- Glikozilacija hidroksilnih grupa ili flavonoidnog jezgra (Tumbas, 2010).

Flavonoidi su veoma bitni sastojci ljudske ishrane, upravo zbog posedovanja antioksidativnih svojstava. Ova jedinjenja deluju: imunostimulativno, antikancerogeno, antiinflamatorno, antimikrobno, antifungalno, diuretici, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antiaritmčno, anti-

koagulantno, spazmolitički, kardiotonično, antialergijski, analgetski, antimalarično, hipoglikemijski (Milenković, 2013).

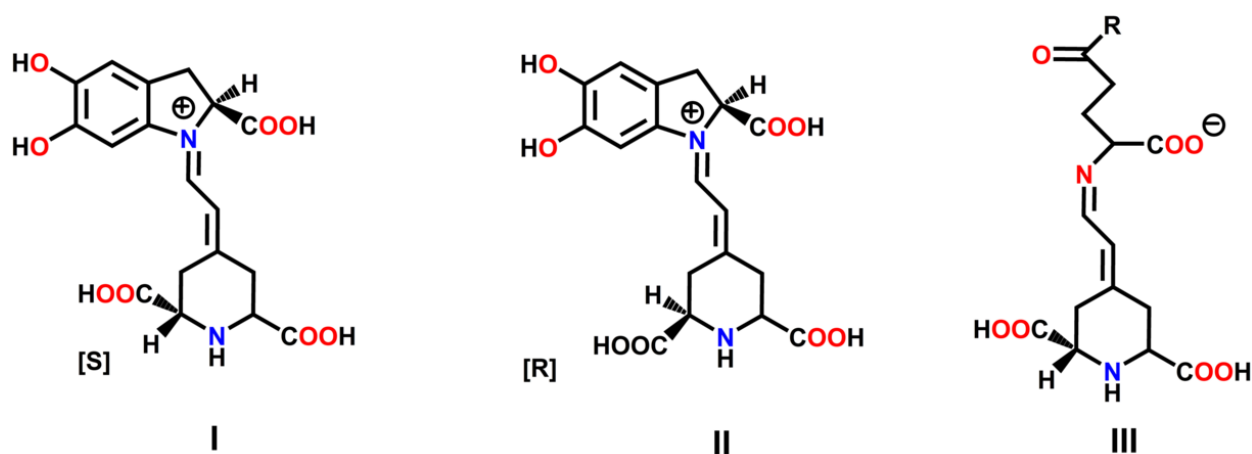


**Slika 5.** Osnovne klase flavonoida

Međutim, pored svog pozitivnog delovanja na zdravlje ljudi, flavonoidi mogu imati i prooksidativnu aktivnost ukoliko je njihov unos povećan i nekontrolisan, pri čemu pod uslovima oksidativnog stesa, umesto "hvatanja" slobodnih radikala dolazi do njihovog formiranja (Skibola i Smith, 2000).

### 2.4.2. Betalaini

Betalaini su biljni pigmenti koji pripadaju vrsti iz reda *Caryophyllales*. To su heterociklični pigmenti, derivati betalaminske kiseline, koji su rastvorni u vodi (Gengatharan i sar., 2015). Prema njihovoj hemijskoj strukturi, betalaini se dele na crveno-ljubičaste betacijane i narandžasto-žute betaksantine (Slika 6), a njihova boja se pripisuje rezonantnim dvostrukim vezama (Gengatharan i sar., 2015).



**Slika 6.** Strukturne formule betacijana (I - betanidin, II - izobetanidin) i betaksantina (III)

Izvori betalaina su mnogobrojni. Četiri najvažnija izvora su cvekla, amarant, kaktusov plod i pitaja. Glavni izvor betalaina je cvekla koja sadrži dva glavna pigmenta, betanin (crveni betacijan) i vulgaksantin I (žuti betaksantin) (Gengatharan i sar., 2015). Sadržaj ovih pigmenta u korenu cvekle zavisi od stepena zrelosti, sorte i klimatskih uslova. Betanin čini 75-78% od ukupnog sadržaja betacijana i sa izobetanimom čini 95% svih crvenih pigmenta koji se nalaze u soku cvekle, dok je od betaksantina najzastupljeniji vulgaksantin, prisutan u količini od oko 95% (Janiszewska-Turak, 2014). Faktori koji utiču na sintezu pigmenta iz cvekle su plodnost zemljišta, vlažnost zemljišta, vreme berbe, navodnjavanje i temperatura.

Iako su antocijanidini najrasprostranjeniji prirodni pigmenti i poseduju boje koje pokrivaju crveno-ljubičastu oblast, betalaini su stabilniji na uticaj pH i temperature pa se češće koriste kada se radi o hrani sa niskom kiselošću (Ravichandran i sar., 2013). Biljke ne mogu da sadrže i betalaine i antocijane, pri čemu se prisustvo betalaina smatra hemotaksonomskom karakteristikom.



Stabilnost betalaina u namirnicama je najveći problem, što ograničava njihovu primenu, jer su osetljivi na spoljašnje uticaje sredine, kao što su pH, svetlost, vlaga, visoka temperatura i kiseonik. Pod uticajima spoljašnje sredine crveni pigment betalaina se degradira do svetlo mrke boje (<http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/betalaini>). U Tabeli 6 prikazana je stabilnost betalaina pri različitim uslovima (Delgado-Vargas et al., 2000). U opsegu pH od 3,5 do 7 betalaini ostaju nepromenjeni, pri čemu je optimalna pH vrednost u opsegu pH 5-6, a pH preko 7 dovodi do promene boje u plavo. Zagrevanje betalaina takođe dovodi do gubitka boje, a ukoliko je uz to i pH nepovoljan, degradacija betalaina je brža. Vlaga takođe ima bitan uticaj na stabilnost betalaina, pri niskom sadržaju vlage stabilnost je povećana (<http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/betalaini>).

**Tabela 6.** Stabilnost betalaina u model sistemima

Faktor	Model sistem	Zapažanje
pH	Rastvori betalaina	Između pH 3,5 i 7 je maksimalna stabilnost boje, $\lambda_{\max}$ betacijana: 537-538 nm, $\lambda_{\max}$ betaksantina: 475-478 nm, pH<3,5, $\lambda_{\max}$ se pomera ka manjim talasnim dužinama, pri čemu se smanjuje molarna apsorptivnost, pH>7, $\lambda_{\max}$ se pomera ka manjim talasnim dužinama, pri čemu se molarna apsorptivnost smanjuje.
pH	Rastvori betalaina sa kiseonikom	Između pH 5,5 i 8, stabilnost boje je maksimalna.
pH	Rastvor cvekle	Na pH 5,5 je maksimalna stabilnost.
pH	Rastvor vulgaksantina	Maksimalna stabilnost je između pH 5 i 6.
Temperatura	Rastvor betanina	Crvena boja se umanjuje zagrevanjem, a reakcija se može povratiti hlađenjem.
Svetlost	Rastvor betanina	Pri izloženosti dnevnom svetlu na 15°C brzina degradacije betanina se povećava za 15,6%; degradacija prvog reda sa zavisnošću od pH većoj na pH 3 ( $k=0,35/\text{dan}$ ) nego na pH 5 ( $k=0,11/\text{dan}$ ) pod fluorescentnim svetlom. Do potpune razgradnje pigmenta dolazi pod uticajem UV ili $\gamma$ zračenja
Aktivnost vode	Betanin u različitim model sistemima	Stabilnost betalaina se povećava pri niskim $a_w$ , a sa porastom $a_w$ sa 0,32 na 0,75 stabilnost se smanjuje za jedan red veličine.
Kiseonik	Rastvor betanina	U prisustvu vazduha, na pH 7,0, razgradnja betanina je za 15% veća nego u atmosferi azota.

Karakteristična boja materijala se smatra pokazateljem svežine, visoke nutritivne vrednosti, ukusa i u velikoj meri utiče na prihvatljivost proizvoda. Jedinstvenost betalaina se ogleda u prisustvu njihove N-heterociklične strukture sa betalaminskom kiselinom kao zajedničkim biosintetičkim prekursorom, koja je vezana za *ciklo*-Dopa glukozid kod betacijana, i za amino-kiselinu ili imino grupu kod betaksantina (Stintzing i Carle, 2007). Tipični supstituenti za betalaine su: glukoza, glukuronska, malonska, kafena, *p*-kumarinska i ferulna kiselina (Strack i sar., 2003).

Betalaini su klasifikovani kao antioksidanti jer zaustavljaju ili odlažu proces oksidacije, pokazuju antitumorne i antisklerotične efekte, a takođe se koriste i kao preventiva kardiovaskularnih bolesti (Janiszewska-Turak, 2014).

Betalaini predstavljaju važnu prirodnu boju u prehrambenoj industriji i prodaju se u vidu praha ili koncentrata soka. Za proizvodnju praha sa 0,3-1,0% pigmenta primenjuje se liofilizacija, a koncentrovanje soka se vrši u vakuumu do postizanja 60-65% ukupne suve materije (<http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/betalaini>).

Prehrambena industrija koristi hiljade tona godišnje boje jer je ona jedan od najbitnijih atributa hrane i smatra se pokazateljem kvaliteta i prihvatljivosti hrane. Upotreba sintetičkih boja ograničena je zvaničnim propisima EU i SAD, zbog čega je sve veće interesovanje za novim, prirodnim izvorima pigmenta i za njihovu potencijalnu primenu u hrani (Vergara i sar., 2014). Upotreba betalaina je dozvoljena od strane EU. Betalain kao prehrambeni aditiv nosi oznaku E-162 (Ravichandran i sar., 2013). Ekstrakt betalaina se najčešće koristi za bojenje želea, jogurta, mlečnih proizvoda, suplemenata za sportiste, konditorskih proizvoda i pića (Janiszewska-Turak, 2014).

## 2.5. CVEKLA

### 2.5.1. Opis biljke

Cvekla (*Beta vulgaris*) je dvogodišnja, dikotiledona, zeljasta biljka, vretenastog korena, karakteristične crvene boje. Pripada porodici *Chenopodiaceae*. Cvekla potiče iz regiona Mediteranskog mora, a njen predak je *B. vulgaris subsp. Maritima* (Janiszewska-Turak, 2014). Za ishranu i preradu koristi se isključivo korenje cvekle.

Cvekla ima visok sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina, što ovu biljku svrstava u 10 najmoćnijih biljaka zbog velikog antioksidativnog kapaciteta. Ona je niskokalorična, lako probavljiva i nutritivno vrlo bogata hrana. Od prisutnih polifenolnih jedinjenja najznačajniji su: protokatehinska, vanilinska, ferulna, *p*-kumarinska, siringinska i *p*-hidroksibenzoeva kiselina. Sadržaj polifenola se smanjuje od kore ka mesu, gde je sadržaj polifenola u kori 50%, u nadzemnom delu 37%, a u mesu 13% (<http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/cvekla>). Cvekla je i veoma dobar izvor vitamina i minerala. Od vitamina, cvekla sadrži vitamin C (najviše ga ima u korenu), vitamin A (najveće količine su zastupljene u nadzemnom delu cvekle), E, K, B1, B2, B3 i B12, i njihov ukupni sadržaj iznosi oko 14 mg/100 g sveže cvekle. Pored pomenutih vitamina, cvekla je bogat izvor folne kiseline (15,8 mg/g suve materije), niacina, tiamina, riboflavina i piridoksina. Od minerala cvekla sadrži kalijum, natrijum, fosfor, magnezijum, kalcijum, gvožđe, sumpor, jod, litijum, fluor, rubidijum, stroncijum i cezijum, a u tragovima sadrži živu, bakar, selen, mangan i silicijum-dioksid (<http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/cvekla>).

Od ugljenih hidrata, cvekla sadrži u velikim količinama saharozu (15-20%), dok u manjim količinama sadrži glukozu, fruktozu, galaktozu, arabinozu i pektin (Bavec i sar., 2010).

Zemljani ukus cvekle potiče od geosmina, pri čemu se različitim programima gajenja cvekle može smanjiti njegov sadržaj i zemljani ukus. Cvekla sadrži 1,3% proteina (Vračar i sar., 2004).

Kod nas se gaji mali broj sorti cvekle. Najrasprostranjenije sorte su Bikor, Egipatska i Detroit. Od ukupne godišnje proizvodnje cvekle, 90% se koristi kao povrće, a preostali deo se prerađuje u prehrambene boje i sok (Kosseva i Webb, 2013). Cvekla je poznata kao lekovita biljka i najbolje je koristiti mladu cveklu. Koristi se osušena, pasterizovana i sok od cvekle, a najčešće u svežem stanju.

Cvekla je značajan antioksidant, detoksikant, diuretik i remineralizant, i koristi se u lečenju malokrvnosti. Posедуje antikancerogena, antibakterijska, antianemična i antisklerotična svojstva. Betanin iz cvekle podstiče razmenu materija, smanjuje nivo holesterola, održava krvne sudove, reguliše krvni pritisak, podstiče rad jetre (Kalušević i sar., 2012).

## 2.6. INKAPSULACIJA BIOAKTIVNIH JEDINJENJA

Inkapsulacija je postupak koji se koristi više od 60 godina, a može se definisati kao proces nanošenja fizičke barijere na aktivnu komponentu (enzimi, ćelije, biološki aktivne supstance itd). Inkapsulacija aktivne komponente vrši se unutar definisanih polupropustljivih, poroznih materijala primenom različitih metoda, u cilju povećanja stabilnosti i postizanju produženog ili kontrolisanog delovanja, pri čemu nastaju čestice veličine 1-1000  $\mu\text{m}$  koje se nazivaju mikrokapsule (Kostić i sar., 2012). Ovim postupkom se štiti jezgro od nepovoljnih spoljašnjih uslova i produžava rok trajanja inkapsuliranog materijala (Ezhilarasi i sar., 2013). Kapsule se mogu formirati kao mononuklearne kapsule ili kao agregati (Slika 7).

Upakovani materijal, ili kako se još naziva obloženi materijal, aktivno jezgro, unutrašnja faza ili punjenje, može biti čisto jedinjenje ili smeša. Dok, sa druge strane, materijali za pakovanje, koji se još nazivaju i materijali za oblaganje, kapsule, membrane, nosač ili omotač, mogu biti od šećera, guma, proteina, prirodnih i modifikovanih polisaharida, lipida, voskova i sintetičkih polimera (Fang i Bhandari, 2010).

Najčešće korišćeni materijali za oblaganje su guma arabika, maltodekstrin, škrob, protein surutke i dr. Protein surutke se odlikuje neprevaziđenim nutritivnim kvalitetom i poseduje neophodne osobine koje ispunjavaju zahteve inkapsulacije. Osobine kao što su rastvorljivost u vodi i niska viskoznost, svrstavaju maltodekstrin u veoma pogodan materijal za oblaganje, dok je upotreba guma arabike ograničena zbog velikih varijacija troškova, kao i zbog ograničene količine i kvaliteta gume arabike (Avaltroni i sar., 2004; You-Jin i sar., 2003).



**Slika 7.** Osnovne forme kapsula: mononuklearne (levo) i agregati (desno)

Karakteristike nosača kao što su rastvorljivost, stabilnost, kompatibilnost sa jezgrom, kohezivnost, hemijska inertnost, permeabilnost, optička svojstva i higroskopnost su veoma značajni pri odabiru materijala nosača jer njihov adekvatan odabir diktira fizičke i hemijske

karakteristike kapsula (Umer i sar., 2011). Materijali omotača biraju se u zavisnosti od svrhe inkapsulacije i mogu se koristiti sami ili u kombinaciji. U cilju poboljšanja karakteristika finalnog proizvoda često se kombinuju dva ili više materijala ili sa modifikatorima jer nemaju svi materijali sposobnost da ispune potrebne uslove (Wilson i Shah, 2007; Smith i Charter, 2010).

Proteini dobijeni iz semena povrća, kao što su grašak, soja i pšenica, su veoma zastupljeni u prehrambenoj industriji zbog svoje velike dostupnosti i dobrih karakteristika, predstavljaju odličnu alternativu proteini na bazi naftnih polimera i životinjskih tkiva, takođe su i biorazgradiva i obnovljiva sirovina sa značajnim fizičko-hemijskim i funkcionalnim karakteristikama (Nesterenko i sar., 2013).

Proteini soje su najčešće korišćeni i dobro izučeni materijal za oblaganje, mada se mogu koristiti i u kombinaciji sa polisaharidima (Augustin i sar., 2006). Proteini soje imaju funkcionalne osobine kao što su sposobnost apsorpcije vode i ulja, rastvorljivost, stabilizacija emulzija, penušanje, želiranje, sposobnost formiranja kvalitetnog filma i dobra organoleptička svojstva, što ga čini pogodnim materijalom za inkapsulaciju (Franzen i Kinsella, 1976).

### **2.6.1. Primena inkapsulacije**

Glavni cilj inkapsulacije je zaštita inkorporiranog materijala od neželjenih uticaja spoljašnje sredine, kao što su vlaga, svetlost i kiseonik, čime se doprinosi produženju roka trajanja proizvoda i kontrolisanom oslobađanju inkapsuliranog materijala (Shahidi i Han, 1993). Obogaćivanje prehrambenih proizvoda bioaktivnim jedinjenjima, uz istovremeno minimalan uticaj na kvalitet i organoleptička svojstva prehrambenih proizvoda, predstavlja jedan od važnijih ciljeva industrije (Thies, 2005). U nekim slučajevima, obloženi materijal mora biti izolovan od spoljašnje okoline, kao npr. izolacija vitamina od negativnog uticaja kiseonika, usporavanje isparavanja nestabilnog jezgra, olakšano rukovanje sa lepljivim materijalom ili izolovanje reaktivnog obloženog materijala od različitih hemijskih reakcija. U drugim slučajevima, cilj nije potpuna izolacija obloženog materijala, već kontrolisano oslobađanje kapsule, kao kontrolisano otpuštanje lekova i pesticida. Problemi koji mogu nastati tokom pakovanja različitih sastojaka hrane mogu se sprečiti inkapsulacijom, čime se postiže maskiranje mirisa i ukusa obloženog materijala ili kompleksa gde dolazi do selektivnog postupka adsorpcije ili ekstrakcije (Sunderlal i sar., 2010). Generalno, inkapsulacija se u prehrambenoj industriji primenjuje iz više razloga, kao što su:

- Zaštita inkapsuliranog materijala od degradacije, smanjenjem njegove aktivnosti prema spoljašnjoj sredini;
- Smanjenje isparavanja ili brzine prenosa upakovanog materijala u spoljašnju sredinu;
- Modifikacija fizičkih karakteristika originalnog materijala da bi se omogućilo lakše rukovanje;
- Kontrolisano otpuštanje inkorporiranog materijala jezgra tokom vremena ili u određenom trenutku;
- Prikriivanje neželjenih aroma ili ukusa inkapsuliranog materijala;
- Razblaživanje inkapsuliranog materijala kada se zahtevaju male količine, uz uspostavljanje ravnomerne disperzije u matriksu;
- Razdvajanje komponenata smeše koje bi inače reagovala međusobno.

Različiti sastojci hrane, kao što su zaslađivači, boje, modifikatori ukusa, vitamini i minerali, enzimi, lipidi i mikroorganizmi, mogu se upakovati primenom različitih metoda inkapsulacije (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

Polifenolna jedinjenja su veoma značajna, pre svega sa aspekta ljudskog zdravlja, i primenjuju se u velikoj količini u prehrambenoj industriji kao prirodni dodatak hrani (boje, konzervansi, antioksidanti itd). Pored široke primene u prehrambenoj industriji, mnogi biljni ekstrakti bogati polifenolnim jedinjenjima se koriste i u kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Nažalost, upotreba ovih jedinjenja je ograničena jer njihova efikasnost zavisi od biodostupnosti i stabilnosti pri proizvodnji, distribuciji i skladištenju hrane, kao i u gastrointestinalnom traktu (pH, enzimi, prisustvo drugih hranljivih materija). Stoga je njihova aktivnost i potencijalno pozitivno delovanje na zdravlje ljudi ograničeno. Polifenoli su osetljivi na faktore spoljašnje sredine, uključujući fizičke, hemijske i biološke uslove. Brzo se oksiduju, pri čemu dolazi do pojave smeđe boje, neprijatnih i neželjenih mirisa i ukusa, što dovodi do značajnog gubitka njihove aktivnosti (Desai i Park, 2005).

Upravo zbog ovih negativnih osobina osetljivih bioaktivnih jedinjenja, inkapsulacija je našla primenu, pri čemu se omogućava poboljšana ili potpuna stabilizacija bioaktivnih sastojaka, i povećanje njihove aktivnosti, smanjenje ili sprečavanje reakcija sa ostalim komponentama u proizvodu, i produžavanje roka upotrebe (Umer i sar., 2011; Wilson i Shah, 2007; Alexe i Dima, 2014).

Inkapsulacija bioaktivnih jedinjenja obuhvata tri koraka:

- Formiranje zida oko materijala koji se inkapsulira,
- Sprečavanje nepoželjnog curenja materijala,
- Sprečavanje prisustva neželjenih čestica u kapsuli (Gibbs i sar., 1999).

### 2.6.2. Metode inkapsulacije

Metode za inkapsulaciju se dele na fizičke, fizičko-hemijske i hemijske, a najčešće korišćene metode su date u Tabeli 7 (Mozafari i sar., 2008).

**Tabela 7.** Pregled najčešće korišćenih metoda inkapsulacije

Tehnologija	Tip kapsula	Veličina čestica (µm)	Komponente koje se inkapsuliraju
<i>Spray drying</i>	Matriks	10-400	Probiotici, arome, antioksidanti, lipidi
<i>Spray chilling/cooling</i>	Matriks	20-200	Probiotici, enzimi, arome, antioksidanti, vitamini
<i>Fluid bed coating</i>	Rezervoar	30-5000	Probiotici, čvrste čestice, minerali, soli, nutritijenti
<b>Liofilizacija</b>	Matriks	20-5000	Probiotici, lipidi, vitamini, arome, ćelije
<b>Emulgovanje</b>	Rezervoar i matriks	0,2-5000	Soli, gorka hidrofilna jedinjenja, dijetetske masti, antioksidanti, vitamini, enzimi, ćelije
<b>Inkluzija</b>	Molekulska inkluzija	0,001-0,01	Arome, esencijalna ulja, vitamini
<b>Koacervacija</b>	Rezervoar	10-800	Arome, esencijalna ulja, lekovi, antioksidanti
<b>Ekstruzija</b>	Matriks	50-2000	Probiotici, arome, proteini
<b>Inkapsulacija u lipozomima</b>	Rezervoar	0,2-1000	Masne kiseline, arome, vitamini, enzimi, proteini, minerali

#### *Spray drying*

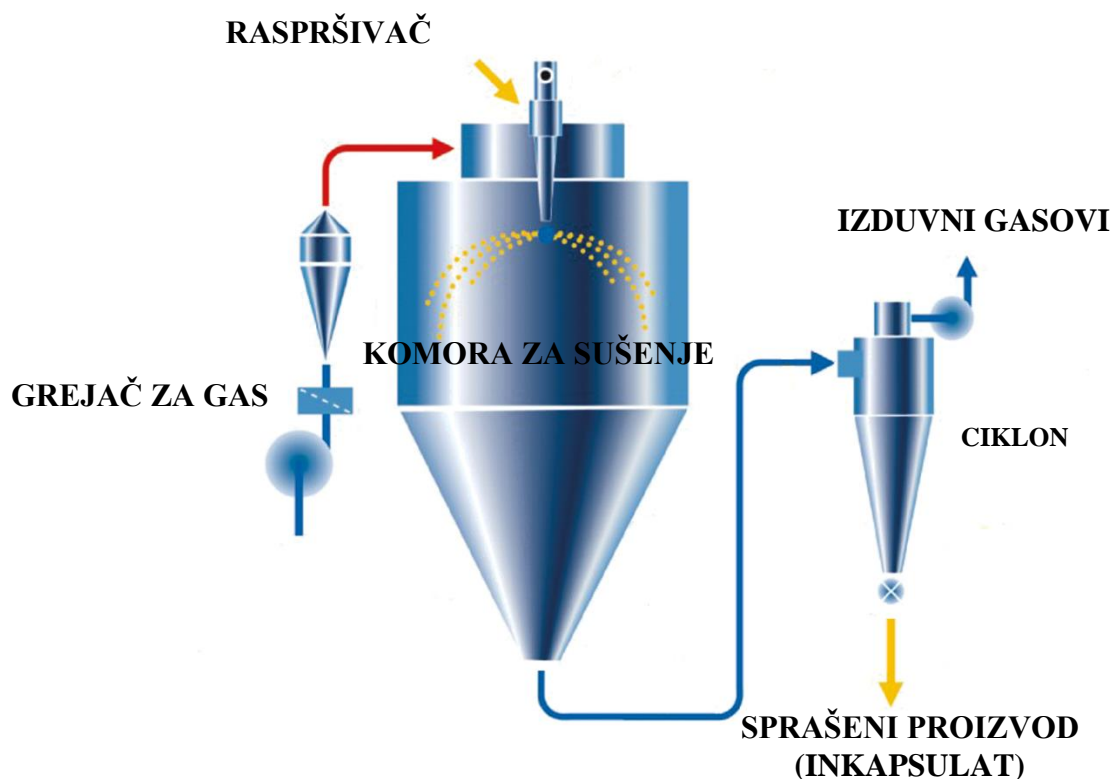
Više od 90% inkapsulacija se vrši *spray drying* tehnikom ili sušenjem raspršivanjem u struji toplog vazduha. *Spray drying* tehnika se koristi još od polovine XX veka. Ova tehnika se

ranije koristila za pripremu suvih i stabilnih aroma i aditiva i za sušenje čvrstih suspenzija, a danas se koristi i za inkapsulaciju bioaktivnih jedinjenja, enzima, vitamina, minerala, probiotika, boja i masti i ulja (Desai i Park, 2005; Alexe i Dima, 2014).

Ova tehnika je pre svega ekonomična, fleksibilna i kontinualna, pri čemu se dobijaju čestice dobrog kvaliteta i malih dimenzija, što je veoma bitno kada su u pitanju senzorne karakteristike prehrambenih proizvoda, pogotovo tekstura (Fang i Bhandari, 2010; Kalušević i sar., 2012).

Materijali za oblaganje moraju biti dobri emulgatori, da formiraju stabilnu emulziju, imaju adekvatnu rastvorljivost, da imaju mali viskozitet na visokim koncentracijama i da formiraju umrežene strukture (Gharsallaoui i sar., 2007; Hogan i sar., 2001; Hogan i sar., 2003). Kao materijali za oblaganje, najčešće se koriste modifikovani škrob, guma arabika, maltodekstrin i druge hidratizane materije. Takođe, kompleks protein-lipid (npr. natrijum-kazeinat-sojin lecitin) je pogodan materijal za oblaganje (Kosaraju i sar., 2008).

Proces sušenja raspršivanjem se sastoji od rastvaranja, emulgovanja aktivnog jedinjenja i raspršivanja u struji toplog vazduha (Slika 8) (Đorđević i sar., 2014).



**Slika 8.** Šematski prikaz spray drying metode



Sušenje kapi se vrši u struji toplog vazduha (160-220°C) i proces traje od nekoliko milisekundi do nekoliko sekundi što omogućava da se i termolabilna jedinjenja mogu sušiti ovom metodom uz smanjenu mogućnost gubitaka njihovih pozitivnih osobina.

Glavni nedostaci ove tehnike su neuniformna veličina i oblik čestica, sklonost čestica ka agregaciji, ograničen izbor materijala za inkapsulaciju i mali kapacitet inkapsulacije, tj. mala nosivost kapsula (20-30%) (Alexe i Dima, 2014; Desai i Park, 2005). Takođe, može doći do pojave udubljenja na spoljašnjoj površini čestica, što je posledica brzog isparavanja kapljica tečnosti tokom sušenja, kao i stvaranje pora na spoljašnjoj površini, što je posledica prisustva pritiska unutar kapsule (Đorđević i sar., 2014; Yang i sar., 2012).

### ***Spray cooling/ chilling***

*Spray-cooling/chilling* tehnika se zasniva na injektovanju hladnog vazduha u komoru sa ciljem očvršćavanja gela (Da Silva i sar., 2014). Aktivno jezgro mora biti u čvrstom obliku, u pokretu, u posebno dizajniranoj posudi u kojoj se injektuje hladan vazduh (Champagne i Fustier, 2007). Ova tehnika je suprotna od *spray drying* metode, jer se kod nje nosač/aktivno jezgro hlade. Nosači kod *spray cooling* metode rastopljena frakcionisana i hidrogenizovana biljna ulja sa tačkom topljenja 32-34°C, a kod *spray chilling* tehnike se kao nosači koriste biljna ulja i materijali sa temperaturom topljenja 45-122°C (Wilson i Shah, 2007; Poshadri i Kuna, 2010).

*Spray-cooling/chilling* je najjeftinija, ekološki povoljna, i kontinualna, čime se postiže jednostavnost proizvodnje (Đorđević i sar., 2014). Dobijene čestice su sferne, kompaktne i neprozirne, mehanički otporne i neosetljive na potres (Đorđević i sar., 2014). Ova metoda se koristi za inkapsulaciju suvih proizvoda, kao što su arome, proteini, minerali i vitamini, da bi se očувale termolabilne aktivne supstance, a može se koristiti i za inkapsulaciju enzima, velikog broja organskih i neorganskih kiselina i drugih jedinjenja (Poshadri i Kuna, 2010; Đorđević i sar., 2014).

### ***Fluid bed coating/spray coating***

*Fluid bed coating* ili oblaganje u fluidizovanom sloju se zasniva na odvojenom uvođenju materijala koji se inkapsulira i rastvora/rastopa/disperzije polimera za oblaganje, pri čemu se u komoru prvo uvodi materijal koji se inkapsulira. U prvoj fazi, čestice jezgra se suspenduju pomoću struje vazduha na unapred definisanoj temperaturi, a nakon toga se u komori uređaja,

pomoću specijalnih prskalica, uvodi rastvor/rastop/disperzija polimera za oblaganje. (Zuidam i Nedović, 2010; Nedović i sar., 2013; Teunou i Poncelet, 2005). Prednost ove metode se zasniva na sposobnosti da se polimer za oblaganje u vidu rastvora/rastopa/disperzije nanosi u više slojeva jer tokom procesa, čestice koje nosi struja vazduha vraćaju se dole i idu opet ka vrhu komore, čime se postiže potpuna prekrivenost i ravnomerno oblaganje čestica (Čalija, 2013).

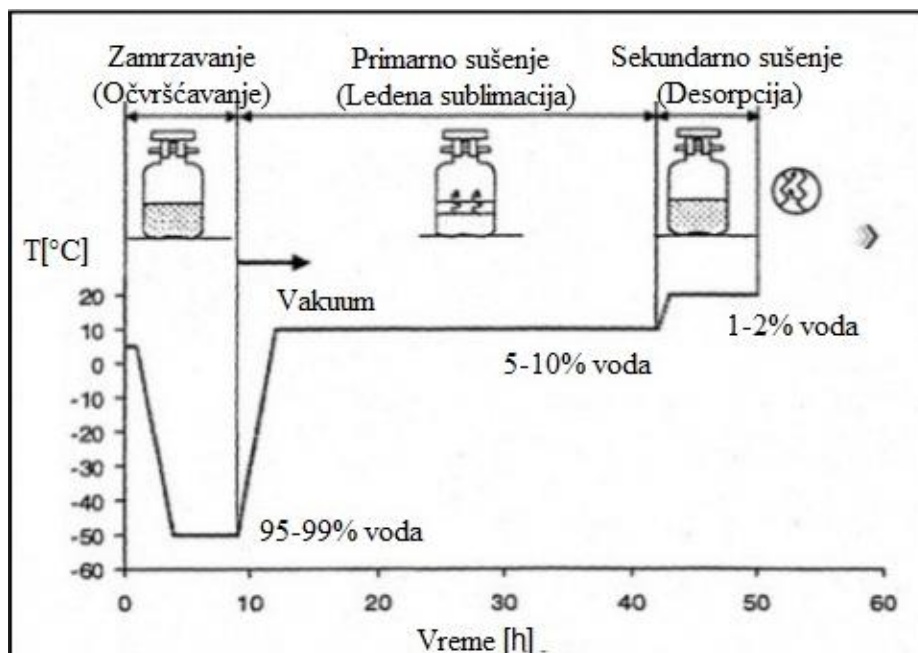
Nedostatak ove metode je nekontrolisana aglomeracija čestica koja se javlja kada je temperatura površine čestice iznad temperature staklastog prelaza materijala za oblaganje (Saleh i sar., 2003).

U poređenju sa *spray drying* metodom, ova metoda omogućava iskorišćenje šireg opsega materijala za oblaganje. Kao materijali za oblaganje, najčešće se koriste vodeni rastvor celuloze i skrobnih derivata, dekstrina, proteina i gume, a ukoliko se koristi rastvor koji očvršćava hlađenjem, onda se kao materijali za oblaganje mogu koristiti i hidrogenizovana biljna ulja, masne kiseline, stearini i voskovi (Poshadri i Kuna, 2010; Teunou i Poncelet, 2005).

### ***Liofilizacija***

Sušenje zamrzavanjem ili liofilizacija je najpogodnija metoda za sušenje materijala koji su termolabilni. Obuhvata tri operacije (Slika 9):

- Zamrzavanje materijala na  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- Primarno sušenje: sublimacija vode iz čvrste u gasovitu fazu snižavanjem pritiska i povećanjem temperature;
- Sekundarno (finalno) sušenje: desorpcija vode na povišenoj temperaturi (Desai i Park, 2005; Poshadri i Kuna, 2010).



**Slika 9.** Šema procesa liofilizacije

Liofilizacija predstavlja jednostavnu tehniku inkapsulacije materija rastvornih u vodi, prirodnih aroma i lekova, koja omogućava očuvanje prirodnih svojstava sirovine, i to oblika, ukusa, boje, dimenzije, biološke aktivnosti i teksture. Nedostatak ove metode je visoka cena i dugotrajnost procesa sušenja (Desai i Park, 2005; Da Silva i sar., 2014; Poshadri i Kuna, 2010; Ceballos i sar., 2012).

Efikasnost zaštite aktivnih komponenti i kontrola otpuštanja inkapsulata dobijenih liofilizacijom zavisi od sastava i strukture materijala za oblaganje (Ezhilarasi i sar., 2013).

### ***Kokristalizacija***

Kokristalizacija je postupak inkapsulacije kod koga se saharoza koristi kao nosač za inkorporaciju osnovnog materijala. Kristalna struktura saharoze se modifikuje u kristal aglomerata, kako bi se dobio porozan matriks gde se može ugraditi drugi aktivan sastojak (Chen i sar., 2006). Saharozni sirup se koncentruje do prezasićenog stanja i održava na dovoljno visokoj temperaturi kako bi se sprečila kristalizacija. Na temperaturi iznad 120°C i niskoj vlažnosti, od 95-97°Brix, postiže se spontana kristalizacija prezasićenog saharoznog sirupa. Zatim se određena

količina materijala koji se inkapsulira dodaje u koncentrovani sirup i vrši se intenzivno mešanje, obezbeđujući nukleaciju u rastvoru. Na kraju se inkapsulirani proizvod suši do željenog sadržaja vlage i ujednačene veličine. Tokom ovog procesa, veoma je važno kontrolisati faze nukleacije i kristalizacije, kao i toplotnu ravnotežu tokom različitih faza (Poshadri i Kuna, 2010).

Prednosti kokristalizacije su poboljšana rastvorljivost, homogenost, hidratacija, vlažnost, stabilnost, sprečavanje lepljenja čestica i protočnost obloženih materijala. Pored toga, velika prednost je to što se jezgro u tečnom stanju može prevesti u suvo stanje bez dodatnog sušenja, pri čemu su proizvodi spremni za direktno tabletiranje, što je od velikog značaja u farmaceutskoj industriji (Beristain i sar., 1996).

### ***Inkapsulacija u emulzijama***

Emulziona tehnologija se generalno primenjuje za inkapsulaciju bioaktivnih jedinjenja u vodenim rastvorima, koji se mogu koristiti u tečnom stanju ili se osuše (*spray drying* tehnikom ili liofilizacijom) do praškaste forme nakon emulgovanja, zbog čega emulgovanje predstavlja inkapsulacioni proces (Zuidam i Nedović, 2010).

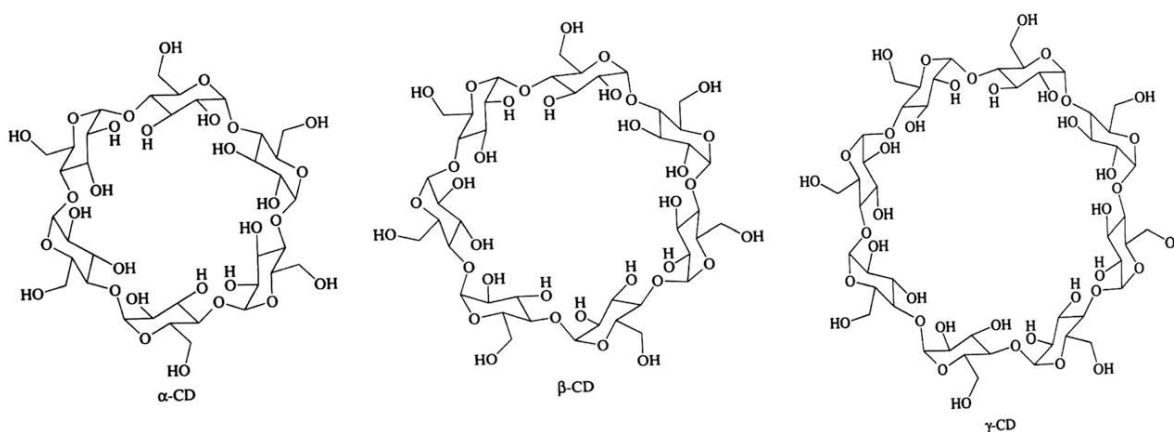
Američki patent pod nazivom “funkcionalna emulzija” se odnosi na emulzije tipa E/U ili E/U/V dobijene emulgovanjem etanolnog rastvora polifenola u biljnom ulju, koje se mogu koristiti u prehrambenoj industriji kao dodatak funkcionalnoj hrani i u farmaceutskoj industriji. Prednost ovih emulzija je mogućnost rastvaranja polifenola u vodi i ulju (Nakajima i sar., 2003). Najnovija istraživanja su pokazala da se ove emulzije koriste za smanjenje oksidacije lipida ili za povećanje njihove stabilnosti. Prečnici kapljica mikrokapsula se obično kreću između 0,1  $\mu\text{m}$  i 100  $\mu\text{m}$ . Za pripremu stabilne emulzije prisustvo surfaktanata je neophodno (Maswal i sar., 2014). Nanoemulzije su otpornije na oksidaciju od mikroemulzija, a veličina čestica od 20 nm do 200 nm (Rao i McClements, 2011).

### ***Inkluziona inkapsulacija***

Molekularna inkluzija je zasnovana na upotrebi materijala za inkapsulaciju koji poseduje tzv. aktivnu šupljinu. Ciklodekstrin (CD) se pokazao kao najbolji inkapsulirajući materijal za inkluzionu inkapsulaciju (Hedges, 1998; Szenté i Szejtli, 2004; Regiert, 2008).

Ciklodekstrini se smatraju praznim mikrokapsulama, određene molekulske veličine, pri čemu je spoljašnji deo molekula hidrofilan, a unutrašnji deo je hidrofoban. Upravo ovakva struktura CD omogućava inkluziju drugih molekula u nepolarnu unutrašnjost šupljine (Đorđević i sar., 2014).

Ciklodekstrini su prirodni ciklični oligosaharidi sa šest, sedam ili osam glukozidnih ostataka, povezanih sa  $\alpha(1\rightarrow4)$  glikozidnim vezama i označeni su kao  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ciklodekstrini (Slika 10). Dobijaju se degradacijom skroba pod dejstvom ciklodekstrin-glukozil-transferaze (Alexe i Dima, 2014; Poshadri i Kuna, 2010; Lucas-Abellán i sar., 2008).



**Slika 10.** Hemijska struktura  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD i  $\gamma$ -CD

Generalno, metode koje se koriste kod inkluzionih kompleksiranja se zasnivaju na principu koprecipitacije, a uslovi kompleksiranja su specifični za svaki pojedinačni molekul koji se inkapsulira (Dias i sar., 2010; Duchêne, 2011; Koontz i sar., 2009). Koprecipitacija se dešava nakon dodatka molekula koji se inkapsulira u vodenom rastvoru CD praćeno mešanjem/ultrazvučnim mešanjem i/ili zagrevanjem (Kalogeropoulos i sar., 2010; Karathanos i sar., 2007; Kfoury i sar., 2014).

U prehrambenoj industriji CD ima široku upotrebu kod stabilizacije ukusa, vitamina i eteričnih ulja, takođe se koriste za eliminaciju neželjenih ukusa, za zaštitu lipofilnih komponenti hrane i rastvaranja boja za hranu, polifenolnih jedinjenja i vitamina (Dima i Costin, 2009).

### ***Koacervacija***

Koacervacija poznata i pod nazivom „odvajanje faze“, smatra se pravom tehnikom inkapsulacije, jer je jezgro materijala potpuno obuhvaćeno matricom. Ova tehnika uključuje taloženje ili odvajanje koloidne faze od vodene faze (Poshadri i Kuna, 2010).

Kod jednostavne koacervacije se koristi samo jedan koloidni rastvor (npr. želatin), dok se kod složene koacervacije, kapsule formiraju jonskim interakcijama dva suprotno naelektrisana polimera. Obično je pozitivno naelektrisan molekul proteina, a od anjonskih makromolekula koriste se želatin i guma arabika. Ostali materijali koji se koriste kao premazi su glijadin, heparin, hitosan, sojin protein, polivinil alkohol, karboksimetilceluloza i drugi (Poshadri i Kuna, 2010). Kompleksna koacervacija nastaje kada se dva suprotna polimera međusobno neutrališu (Poshadri i Kuna, 2010).

Koacervacija podrazumeva razdvajanje tečne faze materijala za oblaganje iz polimernog rastvora, praćeno oblaganjem te faze u vidu jedinstvenog sloja oko suspendovanih čestica jezgra, nakon čega materijal za premazivanje očvrstne (Poshadri i Kuna, 2010). Formiranje depozita na jezgru postiže se promenom fizičko-hemijskih karakteristika medijuma, kao što su koncentracija, pH vrednost, jonska jačina, temperatura, polarnost, turbulencija sistema (Zuidam i Nedović, 2010; Da Silva i sar., 2014).

### ***Inkapsulacija u lipozomima***

Lipozomi su sferne lipidne čestice koje sve više nalaze primenu u proizvodnji funkcionalne hrane. Oni imaju sposobnost da zatvaraju vodene, lipidne ili amfifilne komponente, što ih čini pogodnim nosačem u prehrambenoj industriji. Lipozomi se formiraju na osnovu hidrofilno-hidrofobnih interakcija između polarnih jedinjenja lipida i molekula vode. Interakcija između hidrofilnih glava i lipofilnih ugljovodoničnih repova polarnih lipida dovodi do formiranja lipidnog dvosloja (Đorđević i sar., 2014; Fathi i sar., 2012). Dvosloj lipozoma se obično sastoji od fosfatidilholina, fosfatidilglicerola, holesterola, stearilamina, diacetilfosfata, dipalmitoil-fosfatidilholina, diacetilfosfata ili njihovih smeša. Istraživanja pokazuju da zasićeni fosfolipidi formiraju krute i nepropustljive dvosloje, dok nezasićeni fosfatidilholin formira permeabilnije i manje stabilne dvosloje, dok su najstabilniji lipozomi napravljeni od lecitina, holesterola i negativno naelektrisanih fosfolipida (Wilson i Shah, 2007; Akbarzadeh i sar., 2013).

Postoji veliki broj metoda inkapsulacije u lipozomima, kao što su metoda zagrevanja, zamrzavanja-odmrzavanja, ubrizgavanja rastvarača, isparavanja tankog filma i isparavanje reverznih faza, metoda liofilizacije dvostruke emulzije itd. (Zuidam i Nedović, 2010; Wilson i Shah, 2007; Đorđević i sar., 2014).

Lipozomi se koriste kao sistemi za isporuku enzima, proteina, vitamina, aroma, minerala, antioksidanata i antimikrobnih agenasa. Bioaktivna jedinjenja koja se nalaze unutar lipozoma, mogu se zaštititi od razgradnje u želucu, pri čemu se omogućava njihova apsorpcija u gastrointestinalnom traktu, čime se utiče na njihovu bioraspoloživost i biološku aktivnost (Takahashi i sar., 2007). Pogodni su za maskiranje neprijatnih, gorkih ukusa koja potiču od bioaktivnih jedinjenja. U farmaciji se koriste za isporuku lekova, dok je njihova upotreba u prehrambenoj industriji limitirana zbog fizičke i hemijske nestabilnosti tokom skladištenja. U prehrambenoj industriji se najčešće koriste za inkapsulaciju aromatičnih materija i poboljšanje zrelosti tvrdih sireva (Zuidam i Nedović, 2010; Wilson i Shah, 2007; Poshadri i Kuna, 2010; Đorđević i sar., 2014).

## 2.7. KREKERI

Konditorski proizvodi su hrana koncentrovanog slatkog i slanog ukusa. Visoka energetska vrednost, zbog visokog sadržaja masti, šećera i proteina, ima štetan uticaj na zdravlje ljudi, što predstavlja glavni nedostatak ovih proizvoda (Pajin, 2009).

Konditorski tradicionalni proizvodi su veoma popularni i konzumiraju se u velikoj količini širom sveta. Zbog svoje jedinstvene teksture, ukusa, dugog roka trajanja i relativno niske cene, sve generacije stanovništva ih obično konzumiraju kao užinu (Vitali i sar., 2009; Jihyun Park i sar., 2015; Villemejjane i sar., 2015; Zoulias i sar., 2002).

Glavni atributi krejera su tekstura, ukus i izgled, a mast predstavlja veoma važan sastojak koji utiče na teksturu, prijatan osećaj u ustima i na intenzitet arome. Međutim, krekeri se obično prave od belog pšeničnog brašna, sadrže velike količine šećera i masti, imaju visoke kalorijske vrednosti i nizak sadržaj vlakana (Villemejjane i sar., 2015; Zoulias i sar., 2002).

Sve veće interesovanje potrošača za zdravim, prirodnim i funkcionalnim proizvodima, dovodi do velikog interesa za istraživanja koja se zasnivaju na poboljšanju hranljive vrednosti i funkcionalnosti krejera izmenom njihovog hranljivog sastava. Dodatkom ili zamenom pojedinih sirovina krejera funkcionalnim komponentama (vitamini, minerali, prehrambena vlakna, antioksidanti, probiotici, prebiotici) krekeri mogu postati funkcionalna hrana. To se obično postiže povećanjem integralnog sastava, gde se, osim pšenice ili različitih vrsta dijetetskih vlakana u osnovnom sastavu, povećava i sadržaj i kvalitet proteina, mineralnih materija, povećanje dostupnosti vlakana i poboljšanje probiotičkih karakteristika finalnog proizvoda (Vitali i sar., 2009).

Pored pšeničnog brašna koriste se heljdino i ječmeno brašno. Obogaćivanje proteinima se vrši da bi se poboljšale nutritivne osobine proizvoda, povećala potrošnja proteina ili nadoknadile pojedine aminokiseline kao što su lizin, metionin ili triptofan (Jihyun Park i sar., 2015; Villemejjane i sar., 2015).

## 2.8. PRIMENA NUS-PRODUKATA I INKAPSULATA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Vizuelni izgled i boja hrane su prvi pokazatelji kvaliteta pri izboru hrane kod potrošača. Boja je veoma bitan faktor, čak i kada je reč o upakovanoj hrani, utiče na odabir i kupovinu hrane, a takođe utiče na percepciju hrane kao i na formiranje mirisa i ukusa (van der Laan i sar., 2011; van der Laan i sar., 2015; Spence i sar., 2010). Faktori koji još utiču na odabir proizvoda je slika proizvoda, prisustvo aditiva, posebno veštačkih, i u kojoj meri proizvodnja i potrošnja utiče na zdravlje ljudi, ali i na zaštitu životne sredine (McCann i sar., 2007; Nigg i sar., 2012).

Otpadni materijal koji nastaje preradom voća i povrća, najčešće u vidu tropa, može se koristiti kao stočna hrana. Međutim, zbog potencijalno visokog sadržaja bioaktivnih jedinjenja raste trend njihove upotrebe u proizvodnji hrane visoke vrednosti (Papaioannou i sar., 2012).

Cvekla (*Beta vulgaris*) je biljka bogata fenolnim jedinjenjima i prirodnim pigmentima, betalainima, koji se svrstavaju u jake antioksidante (Cordeiro de Azeredo i sar., 2009; Herbach i sar., 2004). Tokom industrijske prerade cvekle, nastaju velike količine otpadnog materijala, koji se može koristiti za prirodno bojenje hrane, sa zdravstvenim prednostima (Kaimainen i sar., 2015).

Međutim, na stabilnost polifenolnih jedinjenja i betalaina utiče nekoliko faktora kao što su visoka temperatura, svetlost, vlaga, prisustvo kiseonika, UV i  $\gamma$ -zračenje, prisustvo određenih metalnih jona i pH vrednost iznad 7 i ispod 3, što dovodi do degradacije ovih jedinjenja (Herbach i sar., 2006; Janiszewska-Turak, 2014). Takođe, „zemljani“ miris cvekle može u velikoj količini uticati na aromu doprinoseći lošem, neželjenom ukusu namirnica (Herbach i sar., 2006). Iz navedenog proizilazi da efikasnost ovih jedinjenja može bolje da se iskoristi upotrebom inkapsuliranog ekstrakta.

Postoji nekoliko tehničkih izazova i razloga kada je u pitanju dodavanje funkcionalnih sastojaka hrani. Oni moraju da zadovolje senzorske zahteve i zdravstvenu korist potrošača



(Augustin i Sanguansri, 2008). Primenom inkapsuliranog materijala, pored obezbeđivanja nutritivne i senzorske ispravnosti hrane, mogu se sprečiti neželjene reakcije u hrani, kvarenje hrane i obezbediti stabilnost dodatih komponenata (Sanguansri i Augustin, 2010).

U cilju očuvanja boje proizvoda, kada su pigmenti u hrani osetljivi na uticaj spoljašnjih faktora tokom proizvodnje, prerade, skladištenja i pripreme hrane, dodaju se inkapsulirani pigmenti.

Vitamini i minerali se dodaju u prehrambene proizvode da bi se nadoknadili gubici tokom obrade i skladištenja, u cilju ispunjavanja posebnih nutritivnih potreba (npr. hrana za bebe ili starije osobe), i radi sprečavanja pojave i razvoja bolesti kod potrošača. Međutim, oni su takođe osetljivi na uticaj spoljašnjih faktora, reaguju sa drugim komponentama u hrani i podložni su degradaciji pa se u praksi znatno veće količine ovih komponenata dodaju u proizvode. Količina inkapsuliranih komponenata može biti svakako manja (Sanguansri i Augustin, 2010).

Primena inkapsuliranog materijala ima prednost i kod isporuke gvožđa i kalcijuma u hrani. Direktni dodatak gvožđa u hranu može da smanji biodostupnost usled interakcije tanina, fitata i polifenola. Takođe, poznato je da gvožđe katalizuje oksidaciju masti, vitamina i aminokiselina što direktno utiče na senzorske karakteristike finalnog proizvoda i smanjenje nutritivne vrednosti hrane (Sanguansri i Augustin, 2010).

Kalcijum može da izazove neželjenu koagulaciju ili taloženja proteina, što se sprečava primenom inkapsuliranog minerala (Sanguansri i Augustin, 2010).

Funkcionalne masne kiseline su privukle veliku pažnju zbog potencijalnih zdravstvenih karakteristika, što dovodi do sve veće upotrebe omega-3 masnih kiselina u prehrambenoj industriji (Sanguansri i Augustin, 2010; Ohr, 2005). Omega-3 masne kiseline su podložne oksidaciji i prouzrokuju pojavu mirisa i ukusa na pokvarenu ribu, zbog čega je neophodna njihova zaštita primenom inkapsulacije (Ohr, 2005).

Nakon izolovanja fitohemikalija iz biljaka, veoma je važna njihova inkapsulacija, čime se postiže stabilizacija aktivnih komponenata i maskiranje neželjenih mirisa i ukusa. Fitohemikalije interesantne za prehrambenu industriju su fitosteroli, tokoferoli, karotenoidi, koenzim Q10, kurkumin i polifenoli (Sanguansri i Augustin, 2010). Kapsule pomažu isporuku pomenutih jedinjenja u hrani, stabilizuju ih i kontrolišu njihovo osobađanje tokom digestije (Augustin i sar., 2005).

Od svih funkcionalnih prehrambenih proizvoda koji su dostupni potrošačima, mlečni proizvodi čine 42,9%, proizvodi od žita 19,4%, napici 14,4%, masti i ulja 11,8%, dok pekarski proizvodi čine 1,7% ukupne prodaje funkcionalne hrane (Sanguansri i Augustin, 2010).

Funkcionalni prehrambeni proizvodi mogu da utiču pozitivno na različite funkcije organizma, ali se naglasak daje na zaštitu srca, krvnih sudova i smanjenje holesterola. Mlečni proizvodi, pića i pekarski proizvodi sa dodatkom biljnih sterola, omega-3 masnih kiselina, peptida i žitarica spadaju u kategoriju proizvoda za razvoj prehrambenih proizvoda sa pozitivnim zdravstvenim uticajem na srce (Sanguansri i Augustin, 2010).



### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije realizovan je u laboratorijama Odeljenja za Organsku hemiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu, Departmanu za nauku o hrani, ishrani i zaštiti životne sredine (DEFENS) Univerziteta u Milanu, Italija, i Institutu za istraživanja u poljoprivredi i agroekonomiji (CREA) u Sant Anđelu Lodiđijanu, Italija.

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Sirovine

Kao biljni materijal korišćen je koren cvekle (*Beta vulgaris L.*, sorta Bicolor), koja je ručno obrana u zreloj fazi na području Novog Sada. Cvekla je oprana, isečena na komade i sok isceden u sokovniku (model: Neo SK-400, TCL King Electrical Appliances Co. Ltd., Kina). Sok cvekle je odvojen od tropa filtracijom kroz filter papir na Bihnerovom levku. Trop cvekle je liofilizovan (Alpha 2-4 LSC, Martin Christ, Osterode, Nemačka) i do upotrebe čuvan na -20°C.

Kao proteinski nosač, korišćen je sojin izolat u prahu sa najmanje 90% proteina, koji je proizveden u “Macrobioic prom”, Beograd, Srbija.

Za proizvodnju krekeri korišćeno je brašno od pšenice (jednozrna (einkorn, *Triticum monococcum L. ssp. monococcum cv. Monlis*) i obična, *Triticum aestivum L. ssp. aestivum cv. Bramante*)), amaranta (*Amaranthus cruentus L. cv. MT-3*), heljde (*Polygonum fagopyrum Moench local population Seis*) i kinoe (*Chenopodium quinoa Willd*). Einkorn pšenica, obična pšenica, amarant i heljda proizvedeni su 2014. godine na oglednim poljima Instituta za istraživanja u poljoprivredi i agroekonomiji (CREA), a kinoa je kupljena u lokalnom supermarketu. Nakon žetve seme je držano na 5 °C. Neposredno pre mlevenja semena pšenice (Monlis) su oljuštena u uređaju Otake FC4S thresher (Satake, Japan). Brašno obe sorte pšenice dobijeno je u laboratorijskom mlinu (Bona, Italija), koje razdvaja brašno od klice i mekinja; brašna od tri vrste

pseudocerealijska pripremljena su u laboratorijskom mlinu Cyclotec 1093 (FOSS Tecator, Danska).

### 3.1.2. Hemikalije i reagensi

Folin-Ciocalteu reagens, galna kiselina, rutin, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH<sup>•</sup>), troloks, trihlorsirćetna kiselina, 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS) su proizvedeni u Sigma Chemical Co. (St Lois, MO, SAD); gvožđe(III) hlorid u JT Baker (Deventer, Holandija); natrijum nitrat u LACH-NER (Brno, Češka Republika). Ostale hemikalije i rastvarači koji su korišćeni, bili su najveće analitičke čistoće, a destilovana voda je proizvedena korišćenjem sistema za prečišćavanje vode - destilatora DESA 0081 Water Still (POBEL, Madrid, Španija).

### 3.1.3. Instrumenti

Za liofilizaciju uzoraka korišćen je laboratorijski liofilizator, model Alpha 2-4 LSC proizvođača Martin Christ (Osterode am Harc, Nemačka). Spektrofotometrijskim određivanjem apsorbance su određene na čitaču mikrotitar ploča Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD). Uzorci su centrifugirani u centrifugi model EBA 21 (Hettich Zentrifugen, Tutlingen, Nemačka). HPLC analize polifenolnih jedinjenja izvršene su na uređaju Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kjoto, Japan). Uzorci krepera su pripremljeni mlevenjem u mlinu (Gorenje, Velenje, Slovenija (B800E, UM-1036MSHG, 472416), a uzorci zamrznutog testa su usitnjeni u mlinu Knifetec 1095 (Foss, Hilleroed, Danska). Boja ispitivanih krepera je izmerena pomoću Minolta Chroma meter tristimulus colorimeter (Minolta Italia SpA, Italy) koji sadrži silikonske foto-ćelije visoke osetljivosti filtrirane u skladu sa standardnim rezultatima CIE (Commission Internationale de l'Eclairage).

## 3.2. ISPITIVANJE EKSTRAKTA, INKAPSULATA, TESTA I KREKERA

### 3.2.1. Ekstrakcija tropa cvekle i inkapsulacija ekstrakta

Ekstrakcija dobijenog tropa cvekle je izvršena sa 50% vodenim rastvorom etanola uz dodatak 0,5% glacijalne kiseline u ultrazvučnom vodenom kupatilu na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Ekstrakt je profiltriran kroz filter papir na Bihnerovom levku i koncentrovan na rotacionom vakuum uparivaču do potpunog uklanjanja etanola.

Priprema uzoraka inkapsulata obuhvatala je mešanje sojinog izolata u prahu sa (ne)razblaženim koncentrovanim ekstraktom tropa cvekle u odgovarajućim odnosima, mućkanjem na laboratorijskoj tresilici, model Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH (Kelhajm, Nemačka), na 200 o/min, u različitim vremenskim intervalima (Slika 11).



Slika 11. Priprema i liofilizacija uzoraka inkapsulata

Za optimizaciju parametara inkapsulacije korišćena je metoda odzivnih površina (*engl. response surface methodology*, RSM). Usvojeni eksperimentalni model bio je Box-Behnken dizajn za tri promenljive na tri nivoa. Tri nezavisno promenljive (parametri inkapsulacije) su bile: odnos nosač:sok (X1), razblaženje soka (X2) i vreme mućkanja (X3). Kodirane vrednosti

nezavisno promenljivih su bile -1, 0 i 1. Stvarne vrednosti, odabrane iz preliminarnih istraživanja, i odgovarajuće kodirane vrednosti tri nezavisno promenljive su prikazane u Tabeli 8. Kompletan model se sastojao od 15 eksperimenata, uključujući tri ponavljanja.

**Tabela 8.** Prikaz stvarnih i odgovarajućih kodiranih vrednosti nezavisno promenljivih

<b>Eksperiment</b>	<b>Odnos nosač:sok (X1, g/l)</b>	<b>Razblaženje soka (X2)</b>	<b>Vreme mućkanja (X3, min)</b>
<b>1</b>	50 (-1)	0 (-1)	15 (0)
<b>2</b>	150 (+1)	0 (-1)	15 (0)
<b>3</b>	50 (-1)	4 (+1)	15 (0)
<b>4</b>	150 (+1)	4 (+1)	15 (0)
<b>5</b>	50 (-1)	2 (0)	5 (-1)
<b>6</b>	150 (+1)	2 (0)	5 (-1)
<b>7</b>	50 (-1)	2 (0)	25 (+1)
<b>8</b>	150 (+1)	2 (0)	25 (+1)
<b>9</b>	100 (0)	0 (-1)	5 (-1)
<b>10</b>	100 (0)	4(+1)	5 (-1)
<b>11</b>	100 (0)	0 (-1)	25 (+1)
<b>12</b>	100 (0)	4 (+1)	25 (+1)
<b>13</b>	100 (0)	2 (0)	15 (0)
<b>14</b>	100 (0)	2 (0)	15 (0)
<b>15</b>	100 (0)	2 (0)	15 (0)

Kao zavisno promenljive koje će biti pojedinačno optimizovane (*engl. single response*), odabrani su efikasnost inkapsulacije (EI) i antioksidativna aktivnost na DPPH<sup>\*</sup> radikale (AA). Za odabir optimalnog uzorka koji će dalje biti ispitivan izvršena je optimizacija više odziva (*engl. multi response*), tj. efikasnosti inkapsulacije i antioksidativne aktivnosti na DPPH<sup>\*</sup> radikale istovremeno.

### 3.2.2. Priprema krekeri

Da bi se izbegle interferencije sa ostalim sastojcima (lipidi, šećeri i mleko u prahu), koji se koriste u formulaciji keksa, krekeri su pripremljeni sa dejonizovanom vodom i brašnom, obogaćeni ekstraktom tropa cvekke ili inkapsulatom ekstrakta tropa cvekke. Za pripremu krekeri 80 g brašna, vlage 14%, i 36 ml vode mešano je 90 s sa mikserom Hobart C-100 electric

(National MFG CO, Linkoln, Nebraska, SAD). Kod krekeri obogaćenih ekstraktom tropa cvekle dejonizovana voda zamenjena je sa 30,5 ml ekstrakta uz dodatak 12 ml vode. Krekeri obogaćeni inkapsulatom ekstrakta tropa cvekle dobijeni su mešanjem 68 g brašna, 12 g inkapsulata i 36 ml dejonizovane vode. Testo je valjano do debljine od 3,9 mm i isečeno sa modlom unutrašnjeg prečnika 35 mm, gde je dobijeno 16 okruglih krekeri iste veličine. Odmah nakon toga krekeri su pečeni u rotirajućoj pećnici Ovenlab (MFG CO National, Linkoln, Nebraska, SAD) na 205 °C u toku 11,5 min, zatim ohlađeni na sobnoj temperaturi u toku 30 min i ostavljeni na -20 °C. Dobijeni su krekeri sa pet različitih mešavina brašna: rafinirano brašno obične pšenice (P), rafinirano brašno einkorn pšenice (E), brašno sa 70% einkorn pšenice i 30% amaranta (E+A), brašno sa 70% einkorn pšenice i 30% kinoe (E+K), brašno sa 70% einkorn pšenice i 30% heljadinog brašna (E+H). Krekeri obogaćeni inkapsulatom ili ekstraktom pripremljeni su na isti način, koristeći navedenih pet mešavina brašna. Pre analize svi uzorci krekeri i zamrznutog testa su samleveni u laboratorijskom mlinu.

### 3.2.3. Ekstrakcija inkapsulata/testa/krekeri

*Ekstrakcija ukupnih bioaktivnih jedinjenja iz inkapsulata, testa i krekeri:*

1. korak: Usitnjen i homogenizovan uzorak (500 mg) ekstrahovan je sa 5 ml smeše metanol:voda:sirćetna kiselina (ekstragens 1) mućkanjem na vorteksu u toku 1 min i na ultrazvuku u toku 20 min. Postupak je ponovljen još jednom nakon čega je uzorak centrifugiran na 4000 o/min i supernatant odvojen.

2. korak: Preostali talog nakon odvajanja supernatanta u 1. koraku ekstrakcije ekstrahovan je sa 2,5 ml ekstragensa 1 na laboratorijskoj mućkalici (400 o/min) u toku 30 min i na ultrazvuku 20 min. Nakon toga je uzorak centrifugiran na 4000 o/min i supernatant odvojen.

3. korak: Preostali talog nakon odvajanja supernatanta u 2. koraku ekstrakcije ekstrahovan je sa 2,5 ml ekstragensa 1 mućkanjem na vorteksu u toku 1 min i na ultrazvuku 5 min. Nakon toga je uzorak centrifugiran na 4000 o/min i supernatant odvojen.

Odvojeni supernatanti su spojeni, profiltrirani kroz špric filter (0,45 µm, PTFE) i dalje analizirani.



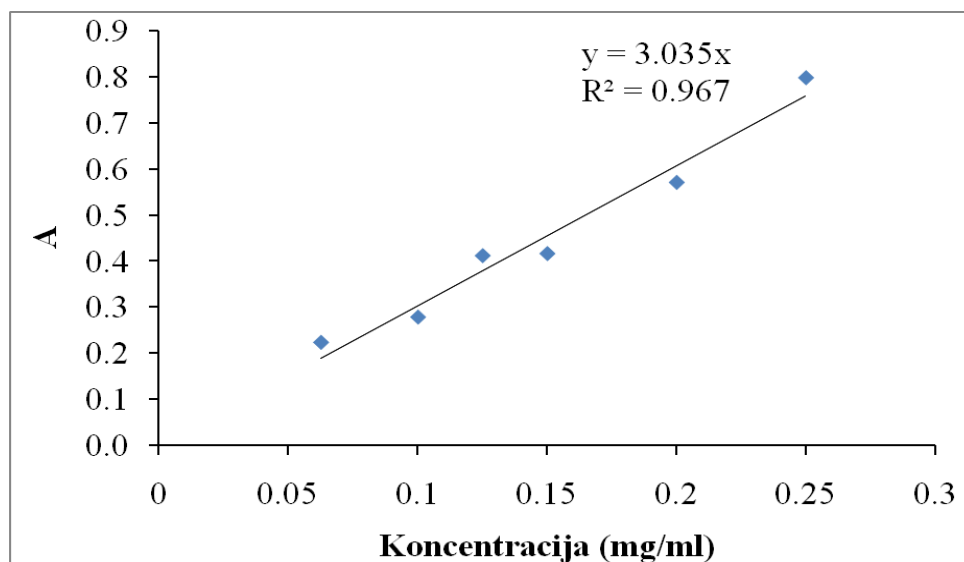
*Ekstrakcija površinskih bioaktivnih jedinjenja iz inkapsulata:*

Homogenizovani uzorak (inkapsulat) je preliven smešom etanol:metanol (ekstragens 2), smeša je promućkana na vorteksu i centrifugirana, nakon čega je odvojen supernatant i dalje analiziran.

**3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja**

Ukupna polifenolna jedinjenja su određena spektrofotometrijski po metodi koja se bazira na kolorimetrijskoj reakciji polifenola sa Folin-Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965), koja je modifikovana za mikrotitar ploče (Gaonkar i sar., 2014). Intenzitet plavog obojenja meri se na talasnoj dužini od 750 nm i proporcionalan je količini ukupnih polifenolnih jedinjenja u uzorku. Reakcione smeše su pripremljene na mikrotitar ploči sa 96 otvora mešanjem 170  $\mu$ l destilovane vode, 15  $\mu$ l centrifugiranog uzorka (ekstrakt tropa cvekle/inkapsulata/testa/kreker), 12  $\mu$ l 2M Folin-Ciocalteu reagensa, i 30  $\mu$ l 20%-tnog natrijum-karbonata. Pripremljene smeše su pažljivo izmešane i inkubirane u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi, u mraku, nakon čega su snimljene apsorbance na  $\lambda=750$  nm. Kao slepa proba korišćena je destilovana voda.

Na osnovu kalibracione krive (Slika 12) sa galnom kiselinom kao standardom, izvršeno je kvantitativno određivanje ukupnih polifenola, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) na 100 g uzorka (osušenog tropa cvekle/inkapsulata/testa/kreker).



**Slika 12.** Kalibraciona kriva standardnog rastvora galne kiseline

### 3.2.5. Efikasnost inkapsulacije polifenolnih jedinjenja

Folin-Ciocalteu metodom određen je sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u celom inkapsulatu (PU) i na površini inkapsulata (PP), a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline/100 g inkapsulata. Efikasnost inkapsulacije (EI) izračunata je pomoću jednačine:

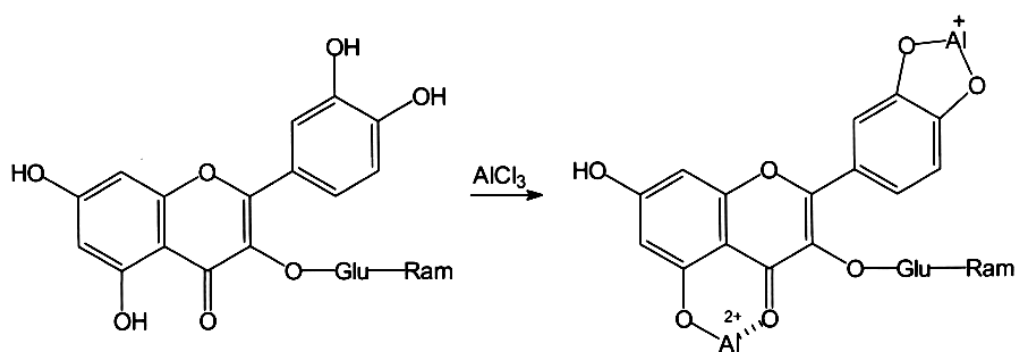
$$EI (\%) = ((PU-PP)/PU) \times 100$$

### 3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorku (trop cvekles/inkapsulat/testo/kreker) je određen spektrofotometrijski metodom po Markamu, koja je prilagođena za mikrotitar ploču sa 96 otvora (Zhishen i sar., 1999).

Flavonoidi iz biljnog materijala kompleksiraju metalne katjone, od kojih je posebno značajan kompleks sa  $Al^{3+}$ , gradeći helate (Slika 13). Za kvantitativno određivanje ukupnih flavonoida u uzorcima kao standard korišćen je rastvor rutina, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta rutina (RE) na 100 g uzorka.

Reagens  $AlCl_3$  pripremljen je rastvaranjem 13,3 mg  $AlCl_3 \times 6H_2O$  i 40 mg  $CH_3COONa$  u malo vode i dopunjeno do 10 ml.



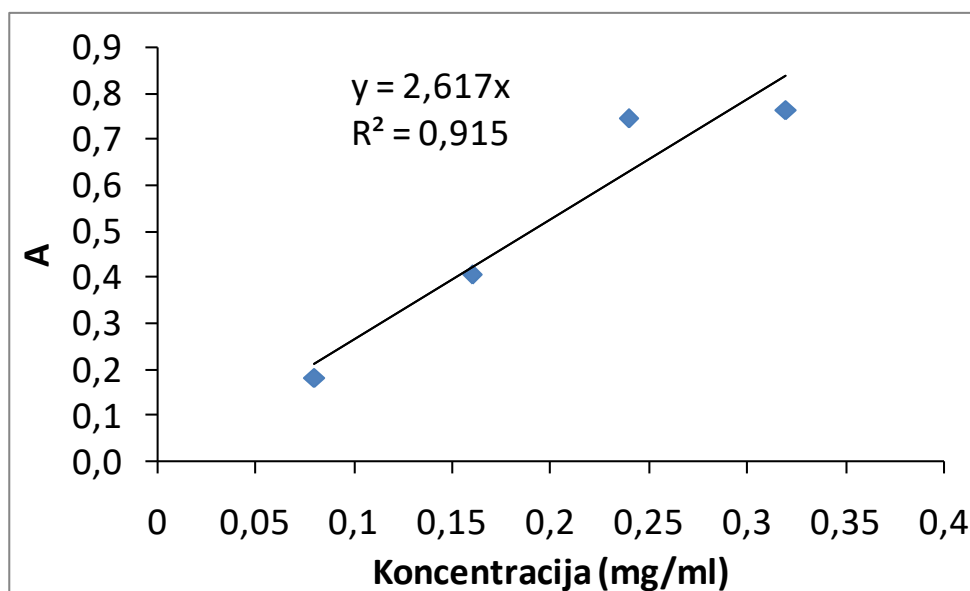
**Slika 13.** Struktura rutina i njegovog kompleksa sa aluminijumom

#### Postupak određivanja:

U 125  $\mu$ l uzorka (ekstrakt tropa cvekles/inkapsulata/testa/kreker) odmerenog u otvor mikrotitar ploče dodato je 25  $\mu$ l vode i 62,5  $\mu$ l reagensa  $AlCl_3$ . Paralelno je pripremljena i slepa

proba: 87,5  $\mu$ l vode i 125  $\mu$ l uzorka (ekstrakt tropa cvekle/inkapsulata/testa/kreker) (bez dodavanja  $\text{AlCl}_3$ ). Apsorbanca radne ( $A_R$ ) i slepe probe ( $A_S$ ) očitane su na  $\lambda_{\text{max}} = 430$  nm.

Na osnovu razlike apsorbanci radne i slepe probe ( $\Delta A = A_R - A_S$ ) sa kalibracione krive standardnog rastvora rutina (Slika 14) određena je koncentracija flavonoida (mg/ml), a zatim je sadržaj ukupnih flavonoida u uzorku izražen kao ekvivalent rutina (mg RE/100 g uzorka).



Slika 14. Kalibraciona kriva standardnog rastvora rutina

### 3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih betalaina

#### Princip metode:

Sadržaj ukupnih betalaina (betacijana i betaksantina) u uzorku (ekstrakt tropa cvekle/inkapsulat/testo/kreker) je određivan prema metodi Von Elbe (2003), prilagođenoj za mikrotitar ploču sa 96 otvora (Von Elbe, 2003).

Za analizu ukupnih betacijana i betaksantina su korišćene talasne dužine od 535 i 476 nm, respektivno. Apsorbanca je izmerena i na 600 nm zbog korekcije na prisutne nečistoće. Sadržaj betacijana je izražen kao mg ekvivalenta betanina u 100 g uzorka (mg BE/100 g), a betaksantina kao mg ekvivalenta vulgaksantina-I u 100 g uzorka (mg VE/100 g). Ukupni betalaini predstavljaju zbir ukupnih betacijana i betaksantina.

**Reagensi:**

- 0,05 M fosfatni pufer, pH 6,5 (0,3333 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  je rastvoreno u 30 ml destilovane vode i pomešano sa rastvorom  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  koji je dobijen rastvaranjem 0,4741 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u 70 ml destilovane vode);  
ili
- Rastvor A: 7,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  u 250 ml destilovane vode i rastvor B: 8,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  u 250 ml destilovane vode (62,5 ml rastvora A i 37,5 ml rastvora B);

**Postupak određivanja:**

U otvor mikrotitar ploče odmereno je  $x$   $\mu\text{l}$  rastvora uzorka (ekstrakt tropa cvekle/inkapsulata/testa/krekeri) i dodato u 250  $\mu\text{l}$  fosfatnog pufera pH 6,5. U dobijenom rastvoru izmerena je apsorbance na 538, 476 i 600 nm. Fosfatni pufer je korišćen kao slepa proba.

Tačne vrednosti apsorbanci betanina i vulgaksantina-I izračunate su prema sledećim formulama:

$$x = 1,095 \times (a - c)$$

$$y = b - z - x/3,1$$

$$z = a - x$$

gde su:

**a** - apsorbance uzorka na 538 nm

**b** - apsorbance uzorka na 476 nm

**c** - apsorbance uzorka na 600 nm

**x** - apsorbance betanina umanjena za vrednost apsorbance obojenih nečistoća

**y** - apsorbance vulgaksantina-I korigovana za vrednost apsorbance betanina i obojenih nečistoća

**z** - apsorbance nečistoća.

Koncentracije ukupnih betacijana i betaksantina u ekstraktima određene su prema formuli:

$$C \text{ (mg/100 ml)} = x(y) \times F \times 1000 / A^{1\%}$$

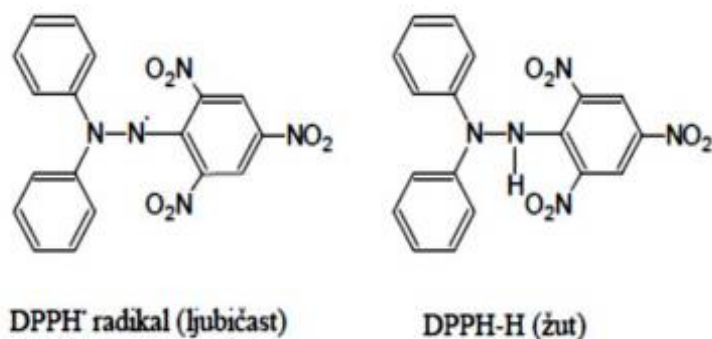
gde su:

F - faktor razblaženja

$A^{1\%}$  - koeficijent apsorbance (za betanin 1120, za vulgaksantin-I 750).

### 3.2.8. Određivanje antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale

Primenom spektrofotometrijske metode (Brand-Williams i sar., 1995), koja je zasnovana na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog azot-centriranog DPPH radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH-H (Slika 15) izvršeno je određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala.



Slika 15. Strukture radikalske i redukovane forme DPPH

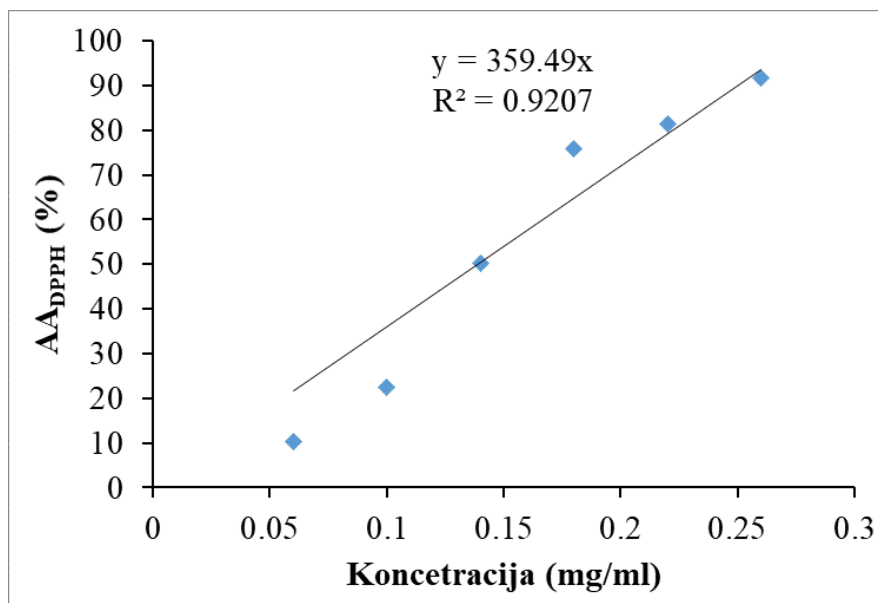
#### Reagensi:

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH<sup>•</sup>) - 0,0035 g radikala rastvoreno je u 10 ml metanola;
- Etanolni rastvor troloksa (10 mM) - 25 mg rastvoreno je u 10 ml etanola.

#### Postupak određivanja:

U otvore mikrotitar ploče dodato je 250  $\mu$ l rastvora DPPH<sup>•</sup> i 10  $\mu$ l uzorka (ekstrakt tropa cvekle/inkapsulata/testa/krekeri). Mikrotitar ploče su držane u mraku na sobnoj temperaturi u toku 50 min nakon čega su apsorbance očitane na 515 nm, koristeći metanol kao slepu probu. Za izradu kalibracione krive je korišćen troloks, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata troloksa u 100 g uzorka (mg TE/100 g).

Na Slici 16 prikazana je kalibraciona kriva troloksa.



**Slika 16.** Kalibraciona kriva standardnog rastvora troloksa

### 3.2.9. Određivanje antioksidativne aktivnosti na ABTS<sup>+</sup> radikale

Metoda se bazira na antioksidativnom kapacitetu uzorka da neutrališe slobodne ABTS<sup>+</sup> u hidrofilnom okruženju. Metoda je prilagođena za mikrotitar ploču sa 96 otvora (Mena i sar., 2011).

#### Reagensi:

- 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS)): 0,055 g u 10 ml bidestilovane vode;
- 0,1 M acetatni pufer, pH 5,0;
- mangan dioksid (MnO<sub>2</sub>)
- 10 ml troloksa u etanolu (25 mg u 10 ml)

#### Aktivacija ABTS<sup>+</sup>:

U 8 ml H<sub>2</sub>O dodato je 1 ml acetatnog pufera, 1 ml ABTS<sup>+</sup> rastvora i oko 35 mg MnO<sub>2</sub> nakon čega je rastvor filtriran i zaštićen od svetlosti.

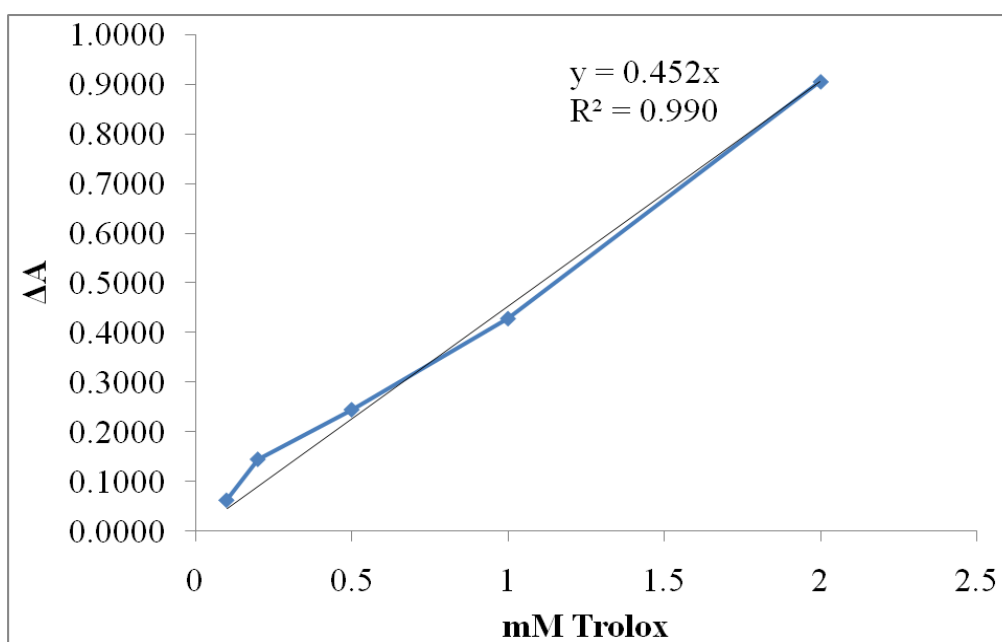
#### Postupak određivanja:

Alikvot rastvora aktiviranog ABTS<sup>+</sup> razblažen je acetatnim puferom do postizanja apsorbanca od oko 1,000. U otvor mikrotitar ploče dodato je 250 µl ovog rastvora i očitana je inicijalna apsorbanca na 414 nm. Nakon toga dodato je 2 µl uzorka (ekstrakt tropa cvekles/inkapsu-

lata/testa/krekeru) i mikrotitar ploča je poklopljena i inkubirana 35 min na 25 °C na tamnom mestu, nakon čega je izmerena apsorbancu na 414 nm.  $\Delta A$  izračunato je upotrebom jednačine:

$$\Delta A = A_0 - A_{\text{fin}} - A_{\text{blank}}$$

gde je  $A_0$  vrednost apsorbance rastvora ABTS<sup>•+</sup> pre dodatka uzorka,  $A_{\text{fin}}$  apsorbancu rastvora ABTS<sup>•+</sup> nakon dodatka uzorka, a  $A_{\text{blank}}$  apsorbancu slepe probe (vode). Za izradu kalibracione krive je korišćen trolox, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta troloksa u 100 g uzorka (mg TE/100 g) (Slika 17).



**Slika 17.** Kalibraciona kriva standardnog rastvora troloksa

### 3.2.10. Određivanje redukcionu sposobnosti

Metodom po Oyaizu (1986), podešenoj za mikrotitar ploču sa 96 otvora, određena je redukcionu sposobnost (*engl. Reducing power, RP*), koja se zasniva na praćenju redukcionu sposobnosti ispitivanog uzorka za transformaciju  $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ .

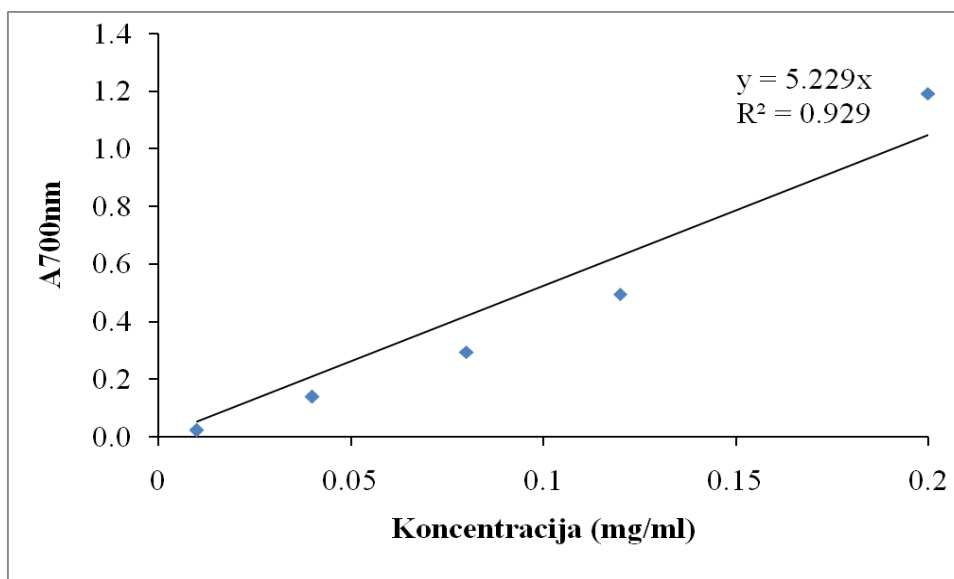
#### Rastvori i reagensi:

- 1% kalijum-fericijanid - 0,5 g  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  je rastvoreno u 50 ml destilovane vode;
- 10% trihlorsirćetna kiselina - 10 g  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  rastvoreno je u 100 ml destilovane vode;

- 0,1% ferihlorid - 0,01 g  $\text{FeCl}_3$  rastvoreno je u 10 ml destilovane vode;
- natrijum-fosfatni pufer pH 6,6 - 62,5 ml rastvora A pomešano je sa 37,5 ml rastvora B:
- rastvor A: 200 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (7,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  rastvoreno je u 250 ml destilovane vode);
- rastvor B: 200 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (17,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  rastvoreno je u 250 ml destilovane vode).

#### Postupak određivanja:

Pomešano je 25  $\mu\text{l}$  rastvora uzorka (ekstrakt tropa cvekle/inkapsulata/testa/kreker), adekvatno razblaženog (finalna apsorbanca po metodi treba da bude u opsegu od 0,2 do 0,8) ili 25  $\mu\text{l}$  ekstragensa (slepa proba), 25  $\mu\text{l}$  natrijum-fosfatnog pufera pH 6,6 i 25  $\mu\text{l}$  1% kalijum-fericijanida. Rastvori su temperirani u vodenom kupatilu 20 min na 50 °C. Prohlađeni su, a zatim je u rastvore dodato 25  $\mu\text{l}$  10% trihlorsirćetne kiseline. Potom su rastvori centrifugirani na 3000 o/min u toku 10 min. Nakon centrifugiranja, u 50  $\mu\text{l}$  pažljivo odvojenog supernatanta dodato je 50  $\mu\text{l}$  destilovane vode i 10  $\mu\text{l}$  0,1% ferihlorida. Apсорbance su izmerene odmah na talasnoj dužini od 700 nm. Za izradu kalibracione krive (Slika 18) je korišćen troloks kao standardni antioksidant, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata troloksa u 100 g uzorka (mg TE/100 g).



**Slika 18.** Kalibraciona kriva standardnog rastvora troloksa



### **3.2.11. Određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja polifenolnih jedinjenja i betalaina**

#### **3.2.11.1. Određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja polifenolnih jedinjenja**

Nakon ekstrakcije ispitivanih uzorka, izvršenoj po postupku navedenom u 3.2.3., dobijena ekstrakciona smeša je profiltrirana kroz 0,45  $\mu\text{m}$  špric filter sa PTFE membranom (Chromafil Xtra PTFE-45/13, Macherey-Nagel, Nemačka).

Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u uzorcima izvršena je tečnom hromatografijom visoke rezolucije (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) na uređaju Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kjoto, Japan), koji sadrži LC-20AT binarnu pumpu, CTO-20A termostat i SIL-20A automatski dozator povezan sa SPD-20AV UV/Vis detektorom. Razdvajanje polifenolnih jedinjenja izvršeno je na Luna C18 RP koloni, (250 mm  $\times$  4,6 mm, veličina čestica 5  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex, Torens, Kalifornija, SAD), koja je zaštićena pretkolonom C18, 4  $\times$  30 mm (Phenomenex, Torens, Kalifornija, SAD). Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A (acetonitril) i B (1% mravlja kiselina) pri protoku od 1 ml/min i primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0–10 min od 10 do 25% A; 10–20 min linearan porast do 60% A, od 20 do 30 min linearan porast do 70% A. Kolona je uravnotežena na početne uslove, 10% A, 10 min uz dodatnih 5 min za stabilizaciju. Standardi polifenolnih jedinjenja su rastvarani u 50% metanolu. Hromatogrami su snimljeni pri različitim talasnim dužinama: 280 nm za galnu, proto-katehinsku, vanilinsku, ružmarinsku, *p*-hidroksibenzoevu i siringinsku kiselinu, katehin i epikatehin, 320 nm za ferulnu, sinapinsku, kumarinsku, hlorogensku i kafenu kiselinu i 360 nm za flavonoide (rutin, apigenin, kvercetin i miricetin). Na osnovu dobijenih hromatograma i kalibracionih dijagrama standardnih rastvora polifenolnih jedinjenja izračunate su koncentracije identifikovanih fenolnih kiselina i flavonoida (mg/100g uzorka).

#### **3.2.11.2. Određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja betalaina**

Nakon ekstrakcije ispitivanih uzorka, izvršenoj po postupku navedenom u 3.2.3., dobijena ekstrakciona smeša je profiltrirana kroz 0,2  $\mu\text{m}$  PVDF filter (Supelco, Sigma-Aldrich, Sent Luis,

MO, SAD). Identifikacija i kvantifikacija betalaina je izvršena prema metodi Gandía-Herrero i sar. (2012).

Razdvajanje jedinjenja je izvršeno na C18 koloni (250 mm x 4,6 mm, veličina čestica 5 µm; Alltech, Bolonja, Italija) koja je zaštićena pretkolonom C18, 5 mm x 4,6 mm (Alltech, Bolonja, Italija). Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A (0,05% trifluorsirćetna kiselina) i B (0,05% acetonitril) pri protoku od 1 ml/min. Linearni gradijent se povećao za 15 minuta od 0% do 35% B; rastvarač B je održavan na 35% tokom 5 minuta, a zatim vraćen na početne uslove za dodatnih 5 minuta (ukupno vreme rada je 25 minuta). Betalaini su detektovani na 477 nm i 538 nm pomoću DAD detektora (L2450 Elite LaChrom, Hitachi, Tokio, Japan) podešenog na talasnim dužinama između 200 nm i 600 nm.

### 3.2.12. Određivanje sadržaja furozina i hidroksimetilfurfurala (HMF)

Sadržaj furozina u ispitivanim uzorcima je određen primenom HPLC metode po Resmini i Pellegrino (1991) sa hromatografskim uslovima opisanim kod Hidalgo i sar. (1995). U 400 mg uzorka odmerenog u vijalu od 10 ml dodato je 8 ml 8N HCl. Nakon propuštanja azota u toku 1 minuta vijale su zatvorene i temperirane na 110 °C u toku 23 časa. Nakon toga, uzorak je profiltriran kroz 0,45 µm PTFE špric filter. Zapremina filtrata od 0,5 ml je podvrgnuta ekstrakciji na čvrstoj fazi. Furozin je eluiran upotrebom 3ml 3 N HCl. Za analizu korišćen je tečni hromatograf Millipore Waters (Milford, MA, SAD).

Detekcija furozina izvršena je na C8 koloni (250 mm × 4,6 mm, Alltech, Bolonja, Italija). Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A (0,4% sirćetna kiselina) i B (0,3% kalijum-hlorid u rastvaraču A). Brzina protoka je bila 1,2 ml/min. Primenjen je sledeći gradijent elucije: početno stanje do 2% za 13,5 minuta; od 2% do 50% u 7 minuta; 50% za 1 minut; od 50% do 2% u 1,5 minuta i 2% za 10 minuta. Detekcija je izvršena na talasnoj dužini od 280 nm, a injektovana zapremina uzorka je bila 20 µl.

Sadržaj HMF (hidroksimetilfurfural) u ispitivanim uzorcima je određen primenom HPLC po modifikovanoj metodi Resmini i sar. (1993). Uzorak (0,5 g) je ekstrahovan sa 5 ml 1M boratnog pufera pH 8,2 primenom ultrazvuka, u toku 30 minuta na 35 °C, a nakon toga centrifugiran na 13000 g u toku 15 minuta. Supernatant je odvojen i ostatak je ekstrahovan još dva puta sa 2 ml vode, nakon čega su centrifugiranjem odvojeni supernatanti. Sakupljeni supernatanti iz svake

ekstrakcije spojeni su i profiltrirani kroz špric filter od najlona sa porama od 0,45  $\mu\text{m}$  (Diana Beck Scientific, Angera, Italija).

Detekcija HMF je izvršena na C18 koloni (250 mm  $\times$  4,6 mm, veličina čestica 5  $\mu\text{m}$ ; Grace Davison Discovey Sciences, Dirfild, IL, SAD) sa C18 pretkolonom 7,5 mm  $\times$  4,6 mm (Grace Davison Discovey Sciences, Dirfild, IL, SAD). Korišćena je metoda koju su saopštili Rufián-Henares i sar. (2006). Kao mobilna faza korišćen je acetonitril-voda (5:95, v/v), a brzina protoka je bila 1 ml/min. Zapremina injektovanog uzorka je bila 20  $\mu\text{l}$ , a HMF je detektovan na 280 nm pomoću DAD detektora (L2450 Elite LaChrom, Merck, Hitachi, Tokio, Japan).

### 3.2.13. Određivanje parametara boje CIELab metodom

Boja je određivana kod uzoraka kontrolnog krepera i krepera sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Ex) i inkapsuliranog tropa cvekle (I).  $L^*$  (svetloća),  $a^*$  (crveno-zeleno) i  $b^*$  (žuto-plavo) su određivani hromometrom *Iltristimuls colorimeter* (Minolta Italia SpA, Milano, Italija) sa visoko osetljivom silicijumskom foto-ćelijom filtriranom da odgovara CIE (*eng. Commission Internationale de l'Eclairage*) standardnom odgovoru posmatrača, koristeći standardnu belu ploču.

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

U ovoj doktorskoj disertaciji, istraživanja su fokusirana na izolovanje, odnosno ekstrakciju, koncentrovanje i stabilizaciju bioaktivnih jedinjenja iz tropa cvekle inkapsulacijom na proteinu soje, i njihovu primenu u odabranom prehrambenom proizvodu. Kvalitativnom i kvantitativnom karakterizacijom fitohemikalija u ekstraktu i inkapsulatu tropa cvekle, izvršena je potvrda efikasnosti inkapsulacije u cilju zaštite bioaktivnih jedinjenja iz tropa cvekle, kao i njihova bioaktivnost. Kao model sistem za ispitivanje primene dobijenih inkapsulata pripremljeni su krekeri na bazi brašna od pseudocerealija (kinoa, heljda i amarant) i cerealija (pšenica) sa dodatkom ekstrakta ili inkapsulata tropa cvekle. Ispitivanjem uticaja termičkog tretmana (pečenja) i uticaja skladištenja na sadržaj bioaktivnih jedinjenja u krekerima izvedeni su zaključci o efikasnosti inkapsulacije u očuvanju funkcionalnih karakteristika krajnjih proizvoda.

### **4.1. DOBIJANJE I FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE EKSTRAKTA TROPA CVEKLE**

#### **4.1.1. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida i betalaina u ekstraktu tropa cvekle**

Trop cvekle, sorte Bikor, koji je dobijen u laboratorijskim uslovima, okarakterisan je sa aspekta sadržaja bioaktivnih jedinjenja, tj. ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida, betalaina, kao i antioksidativne aktivnosti, i to na stabilne DPPH i ABTS<sup>+</sup> radikale i redukcione sposobnosti.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida i betalaina tj. betacijana i betaksantina, prikazani su u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u ekstraktu tropa cvekle

Bioaktivna jedinjenja	Sadržaj (mg/100 g)
Ukupni polifenoli <sup>a</sup>	424,14 ± 9,79
Ukupni flavonoidi <sup>b</sup>	46,30 ± 1,21
Ukupni betacijani <sup>c</sup>	42,84 ± 1,58
Ukupni betaksantini <sup>d</sup>	43,31 ± 1,60
Ukupni betalaini <sup>e</sup>	86,15 ± 3,18

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

<sup>a</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline u 100 g suvog ostatka ekstrakta (mg GAE/100g)

<sup>b</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta rutina u 100 g suvog ostatka ekstrakta (mg RE/100 g)

<sup>c</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta betanina u 100 g suvog ostatka ekstrakta (mg BE/100 g)

<sup>d</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta vulgaksantina-I u 100 g suvog ostatka ekstrakta (mg VE/100g)

<sup>e</sup> Zbir sadržaja betacijana i betaksantina u 100 g suvog ostatka ekstrakta (mg/100g)

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je udeo flavonoida u ukupnim polifenolnim jedinjenjima prisutnim u tropu cvekle mali (10,92%). Takođe, iz dobijenih rezultata se može videti da je sadržaj betaksantina (50,27%) zanemarljivo veći od sadržaja betacijana (49,73%), bez statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ).

Olumese i Oboh (2016) određivali su sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida u svežoj cvekli, soku cvekle, termički obrađenoj cvekli i cvekli sušenoj u pećnici. Ukupni sadržaj flavonoida u svežoj repi i u soku cvekle je bio 63,34 i 83,34 mg kvercetin ekvivalenta/g. Sadržaj ukupnih polifenola bio je 98,08 mg GAE/g kod termički obrađene cvekle i 83,34 mg GAE/g kod cvekle osušene u pećnici. Navedene vrednosti su veće od vrednosti prikazanih u Tabeli 14, što je svakako posledica razlike u pripremi uzorka i delova biljke koji su ispitivani.

Georgiev Georgiev i sar. (2010) su određivali sadržaj betalaina i polifenolnih jedinjenja u ekstraktu dobijenog od mesa cvekle i kore cvekle, sorte Detroit Dark Red. Njihovo istraživanje je pokazalo da ekstrakt dobijen iz kore cvekle ima veći sadržaj betacijana (16,33 mg/g suvog ekstrakta) i betaksantina (30,78 mg/g suvog ekstrakta) u odnosu na sadržaj betacijana (20,75 mg/g suvog ekstrakta) i betaksantina (19,01 mg/g suvog ekstrakta) u ekstraktu dobijenog od mesa cvekle. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja je takođe veći u ekstraktu dobijenog iz kore cvekle (944 mg ekvivalent ferulne kiseline/g suvog ekstrakta) nego kod ekstrakta dobijenog iz mesa cvekle (47 mg FAE/g suvog ekstrakta). Oni smatraju da su ove razlike možda posledice stresa kojem su ćelije kore bile izložene tokom njihovog gajenja u *in vitro* uslovima. Sadržaj betalaina, tj. betacijana i betaksantina prikazan u Tabeli 9 manji je od vrednosti dobijenih u mesu

i kori cvekle sorte Detroit Dark Red, što je svakako posledica razlike u sorti, ali i uslovima uzgoja i pripreme uzoraka za ispitivanje.

Kujala i sar. (2000) smatraju da sadržaj polifenolnih jedinjenja zavisi od dela repe koji se ekstrahuje i da varira od 4,2 do 15,5 mg GAE/g suvog ostatka, što je u saglasnosti sa sadržajem polifenola prikazanim u Tabeli 9. Na sadržaj polifenolnih jedinjenja utiču mnogi faktori, kao što su genotip, lokacija, tehnika gajenja, različita zrelost biljke, kao i uticaj svetlosti, temperature i prisutne hranljive materije u zemljištu tokom uzgoja cvekle (Orhan i sar., 2007). Caldwell i sar. (2005) smatraju da sadržaj flavonoida zavisi od izloženosti biljke UV zračenju i koncentracije ugljen-dioksida.

Vulić i sar. (2012) su ispitivali trop cvekle različitih sorti (Egipatska, Bikor, Cardeal-F1 i Kestrel). Rezultati su pokazali da je sadržaj polifenolnih jedinjenja varirao od 1,87 - 11,98 mg/g suvog ostatka, dok je sadržaj betalaina bio u rasponu od 0,75 - 3,75 mg/g suvog ostatka. Vrednosti sadržaja polifenolnih jedinjenja i ukupnih betalaina prikazanih u Tabeli 9 nalaze se u navedenom opsegu i u saglasnosti su sa saopštenjem Vulić i sar. (2012).

Wruss i sar. (2015) su ispitivali sadržaj betalaina i ukupnih polifenolnih jedinjenja u soku cvekle od sedam različitih sorti. Velike varijacije su se javljale u pogledu nitrata. Ukupni sadržaj betalaina se kretao u opsegu od 0,8 - 1,3 g/l, dok se odnos između betacijana i betaksantina kretao od 1 - 1,75 g/l. Sa druge strane, sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja je varirao od 0,9 - 1,3 g/l.

Istraživanja Janiszewske (2014) su pokazala da sok cvekle sadrži 42,6 mg/100g suve materije ljubičastog pigmenta (betanina), dok je sadržaj žutog pigmenta (vulgaksantin-I) 35,1 mg/100g suve materije, što su slične vrednosti kao u tropu cvekle korišćenom u ovom radu. Sadržaj betanina i vulgaksantina-I zavisi od stepena zrelosti i vrste cvekle, kao i od klimatskih uslova, pri čemu je betanin dominantni betalain u cvekli čineći najčešće 75-78% ukupnih betacijana, a sa izobetaninom čak 95% ukupnih crvenih pigmenata.

Smatra se da ukupni sadržaj polifenolnih jedinjenja određen metodom po Folin-Ciocalteu ne pruža kompletnu sliku o strukturi i kvantitetu pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktu zbog mogućeg prisustva interferirajućih jedinjenja (šećeri, vitamin C, organske kiseline, sumpor-dioksid, aromatični amini i druga jedinjenja koja nisu fenolnog porekla) koja doprinose nerealnom povećanju rezultata (Wruss i sar., 2015; Singleton i sar., 1999). Stoga je kompletna kvalitativna i kvantitativna identifikacija betalaina i polifenolnih jedinjenja u ekstraktu tropa cvekle izvršena primenom visokopritisne tečne hromatografije (HPLC).

#### 4.1.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih jedinjenja i betalaina u ekstraktu tropa cvekle

Tehnikom visokopritisne tečne hromatografije ili hromatografije visoke rezolucije (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) određen je kvalitativan i kvantitativan sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina u ekstraktu tropa cvekle. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Kvalitativan i kvantitativan sastav bioaktivnih jedinjenja u ekstraktu tropa cvekle

Jedinjenja	Sadržaj (mg/100 g tropa)
Galna kiselina	7,45 ± 0,24
Protokatehinska kiselina	11,53 ± 0,40
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	0,78 ± 0,02
Katehin	53,42 ± 1,53
Epikatehin	2,09 ± 0,08
Hlorogenska kiselina	0,30 ± 0,01
Kafena kiselina	0,18 ± 0,00
Ferulna kiselina	0,48 ± 0,02
Sinapinska kiselina	0,52 ± 0,03
Kumarinska kiselina	0,34 ± 0,01
Miricetin	3,52 ± 0,14
Luteolin	0,03 ± 0,00
Kvercetin	0,22 ± 0,10
Apigenin	0,10 ± 0,00
Izoramnetin	0,35 ± 0,01
Betanin	88,94 ± 3,57
Vulgaksantin-I	71,08 ± 1,33

*Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška*

Kvantitativnom HPLC analizom utvrđeno je da je katehin dominantno polifenolno jedinjenje u ekstraktu tropa cvekle (53,42 mg/100 g). Ostali flavonoidi se nalaze u značajno manjim količinama ( $\leq 3,52$  mg/100 g), dok je od fenolnih kiselina protokatehinska dominantna (11,53 mg/100 g).

Istraživanja Georgieva i sar. (2010) su pokazala da ekstrakt dobijen iz kore cvekle sadrži znatno veću koncentraciju identifikovanih polifenolnih jedinjenja nego ekstrakt dobijen iz mesa cvekle. Njihova istraživanja su takođe pokazala da je hlorogenska kiselina prisutna u ekstraktu mesa cvekle (0,19 mg/100 g sveže mase), dok u ekstraktu kore cvekle ona nije identifikovana. Nasuprot tome, rutin je identifikovan u ekstraktu kore cvekle (1,096 mg/g suvog ekstrakta), dok u ekstraktu mesa cvekle nije pronađen. Rezultati iz Tabele 10 ukazuju na odsustvo rutina u ekstraktu tropa cvekle Bikor.

Vulić i sar. (2012) su koristili HPLC analizu za identifikaciju i kvantifikaciju polifenolnih jedinjenja (ferulna, vanilinska, *p*-hidroksibenzoeva, kafena i protokatehinska kiselina) i betalaina (betanin, izobetanin i vulgaksantin-I) u ekstraktima tropa cvekle sorti Egipatska, Bikor, Cardeal-F1 i Kestrel. Rezultati su pokazali da su ferulna, kafena i protokatehinska kiselina prisutne u svim sortama cvekle, *p*-hidroksibenzoeva kiselina je identifikovana u Cardel-F1 (0,009 mg/g suve mase tropa cvekle) i Bikor (0,012 mg/g suve mase tropa cvekle), dok vanilinska kiselina nije identifikovana u sorti Egipatska. Rezultati dobijeni u ovom radu su u saglasnosti sa rezultatima Vulić i sar. (2012).

U ekstraktu tropa cvekle sorte Detroit identifikovane su fenolne kiseline (ferulna, vanilinska, *p*-hidroksibenzoeva, kafena i protokatehinska kiselina), flavonoidi (katehin, epikatehin i rutin) i betalaini (betanin, izobetanin i vulgaksantin-I) (Vulić i sar. 2014). Kvantitativnom analizom je potvrđeno dominantno prisustvo ferulne kiseline (132,52 mg/100g suve mase tropa cvekle), što je u saglasnosti sa rezultatima koje su objavili Kujala i sar. (2000). Od identifikovanih flavonoida u ekstraktu tropa cvekle, katehin je najdominantniji (37,96 mg/100g suve mase tropa cvekle). Sadržaji identifikovanih fenolnih kiselina i flavonoida prikazanih u Tabeli 10 nalaze se u navedenom opsegu i u saglasnosti su sa saopštenjem Vulić i sar. (2014) i Kujala i sar. (2000).

HPLC metodom je određen i sadržaj betalaina u ekstraktu tropa cvekle. Na osnovu dobijenih rezultata, prikazanih u Tabeli 10 može se zaključiti da je betanin zastupljeniji u odnosu na vulgaksantin-I.

Kvantitativnom HPLC analizom Vulić i sar. (2012) su identifikovali betanin (0,038 - 0,368 mg/g suve mase tropa cvekle) i izobetanin (0,021 - 0,177 mg/g suve mase tropa cvekle) u ekstraktima tropa sorti cvekle Egipatska, Bikor, Cardeal-F1 i Kestrel, dok se vulgaksantin-I nalazio u tragovima.



Istraživanja Vulić i sar. (2014) pokazuju da ekstrakt tropa cvekle sorte Detroit sadrži značajnu količinu betanina (37,22 mg/100g suve mase tropa cvekle). Takođe, njihovi rezultati su pokazali da ekstrakt tropa cvekle sorte Detroit ima veći sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina, nego što je identifikovano u prethodnim istraživanjima Vulić i sar. (2012.) u drugim sortama cvekle. Sadržaji betanina i vulgaksantina-I prikazani u Tabeli 10 su veći od onih koje su saopštili Vulić i sar. (2012, 2014), što je svakako posledica razlike u pripremi uzorka, ali i egzogenih faktora koji su navedeni da utiču na sadržaj polifenola (genotip, lokacija, tehnika gajenja, različita zrelost biljke, kao i uticaj svetlosti, temperature, prisutne hranljive materije u zemljištu tokom uzgoja cvekle itd).

Rezultati Stintzing i sar. (2006) su pokazali da su u cvekli betanin i C15-epimer izobetanin najzastupljeniji betalaini (80,8%), dok betanidin i izobetanidin čine 12% od ukupnog sadržaja betalaina, što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u Tabeli 10.

Stintzing i sar. (2005) su detektovali pet vrsta betaksantina i šest vrsta betacijana u cvekli. Posmatrajući betaksantine, njihovi rezultati su pokazali da se sadržaj kretao od 253 - 323 mg/kg jestive pulpe, dok se sadržaj betacijana kretao u intervalu od 345 - 593 mg/kg jestive pulpe.

#### **4.1.3. Antioksidativna aktivnost i redukciona sposobnost ekstrakta tropa cvekle**

Određivanje antioksidativne aktivnosti na stabilne DPPH radikale vrši se spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na merenju sposobnosti neutralizacije DPPH radikala u reakciji sa prisutnim antioksidantima, pri čemu ljubičasto obojeni DPPH radikal prelazi u žuto obojenu formu DPPH-H. Promena intenziteta boje je srazmerna broju uhvaćenih (stabilizovanih) radikala. Određivanje antioksidativne aktivnosti na stabilne ABTS<sup>+</sup> radikale vrši se spektrofotometrijskom metodom koja je bazirana na antioksidativnom kapacitetu uzorka da neutrališe slobodne ABTS<sup>+</sup> radikale u hidrofилnom okruženju. Ukupna redukciona sposobnost određena je metodom koja se zasniva na praćenju redukcije Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> jona koju izaziva prisustvo antioksidanata iz cvekle, tj. redukujući agensi. U Tabeli 11 su prikazani rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti i redukcionе sposobnosti ekstrakta tropa cvekle.

**Tabela 11.** Antioksidativna aktivnost i redukciona sposobnost ekstrakta tropa cvekle

Antioksidativna aktivnost	$\mu\text{mol TE}/100 \text{ g tropa}$
AA <sub>DPPH</sub> •	695,31 ± 52,69
AA <sub>ABTS</sub> •+	898,75 ± 1,03
RP	228,74 ± 15,14

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti 3 ponavljanja ± standardna greška

Georgieva i sar. (2010) su poredili antioksidativnu aktivnost ekstrakta betalaina iz kore cvekle i iz mesa cvekle. Na osnovu dobijenih rezultata su zaključili da je antioksidativna aktivnost šest puta veća u suvom ekstraktu betalaina dobijenog iz kore cvekle (90,7% inhibicije DPPH radikala,  $IC_{50} = 0,11 \text{ mg}$ ) nego u suvom ekstraktu betalaina dobijenog iz mesa cvekle (14,2% inhibicije DPPH radikala,  $IC_{50} = 0,70 \text{ mg}$ ), što je i očekivano jer je visoki sadržaj polifenolnih jedinjenja iz ekstrakta kore cvekle u korelaciji sa povećanjem antioksidativne aktivnosti.

Vulić i sar. (2014) su saopštili  $IC_{50}$  vrednosti za AA<sub>DPPH</sub> ekstrakata tropa dobijenih od pet sorti (Detroit, Egipatska, Bikor, Cardeal-F1 i Kestrel) u intervalu od 2,06 - 7,63  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pri čemu je ekstrakt tropa cvekle sorte Detroit pokazao najbolju antiradikalnu aktivnost, što je u saglasnosti sa vrednostima prikazanim u Tabeli 11.

Pedreño i sar. (2001) su ispitivali uticaj pH vrednosti i temperature na antioksidativnu aktivnost betalaina. Ispitivanje su vršili koristeći ekstremne pH vrednosti (3,5 i 8,5) i temperature od 25, 50 i 75 °C na početku tretmana i nakon 240 minuta. Njihovi rezultati pokazuju da u kiselim sredinama dolazi do povećanja antioksidativne aktivnosti betalaina, dok na temperaturama preko 75 °C dolazi do smanjenja, što ukazuje na njihovu termolabilnost.

Vulić i sar. (2012) su pokazali da su ekstrakti tropa cvekle sorti Egipatska, Bikor, Cardeal-F1 i Kestrel jači antioksidanti od sintetičkog antioksidanta BHA, gde je pri koncentraciji od 1,0 mg/ml ekstrakta tropa cvekle postignut AA<sub>DPPH</sub> = 100%, a pri istoj koncentraciji BHA aktivnost je bila 82,3%.

Ravichandran i sar. (2012) su prikazali da sazrevanje cvekle ima uticaj na sadržaj nekih fenolnih kiselina i povećanje antioksidativne aktivnosti. Takođe, povećanje antioksidativne aktivnosti primećeno je i nakon tretmana vakuumom, mikrotalasima i nakon pečenja.

Veće vrednosti antioksidativnih aktivnosti u poređenju sa vrednostima dobijenim u ovoj disertaciji saopštili su Sawicki i sar. (2016) koji su ispitivali antioksidativnu aktivnost trinaest

sorti cvekle, različitih delova korena cvekle. Njihovi rezultati su pokazali da je vrednost antioksidativne aktivnosti dobijena primenom ABTS testa bila veća za 30% u odnosu na DPPH test, što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u Tabeli 11. Određivanjem antioksidativne aktivnosti u ekstraktima različitih sorti cvekle, došli su do zaključka da se  $AA_{ABTS}$  kretala u intervalu od 37,68 - 49,71  $\mu\text{mol TE/g}$  suvog materijala, dok se  $AA_{DPPH}$  kretala u intervalima od 24,06 - 32,87  $\mu\text{mol TE/g}$  suvog materijala. Takođe, došli su do zaključka da se za različite delove cvekle dobijaju i različite vrednosti antioksidativne aktivnosti. U zavisosti od ispitivanog dela biljke  $AA_{ABTS}$  se kretala u intervalu 21,37 - 51,29  $\mu\text{mol TE/g}$  suvog materijala, dok je  $AA_{DPPH}$  bila 20,40 - 54,78  $\mu\text{mol TE/g}$  suvog materijala.

Olumese i Oboh (2016) su ispitivali antioksidativnu aktivnost sirove i prerađene Nigerijske cvekle.  $AA_{ABTS}$  termički tretirane cvekle (19,85 mmol/g) bila je najveća, dok je  $AA_{ABTS}$  sveže (11,33 mmol/g) i sušene cvekle (11,75 mmol/g) i soka od cvekle (11,94 mmol/g) bila niža, bez statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ). Sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida bio je u značajnoj korelaciji sa  $AA_{ABTS}$ . I redukciona sposobnost uzoraka cvekle pratila je sličan trend: aktivnosti sveže cvekle (16,67 mg/g) i soka cvekle (20,84 mg/g) bile su niže od termički tretirane cvekle (25,00 mg/g) i cvekle sušene u sušnici (33,33 mg/g). Redukciona sposobnost ekstrakta tropa cvekle je bila 228,74  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  (Tabela 11), odnosno 0,57 mg/g, što je značajno niže od redukcionne sposobnosti različitih uzoraka cvekle koje su saopštili Olumese i Oboh (2016).

Vulić i sar. (2014) su ispitivali redukcionu sposobnost ekstrakata tropa pet sorti cvekle, i zaključili da redukciona sposobnost ekstrakata tropa cvekle raste sa povećanjem koncentracije, pri čemu je najbolja redukciona sposobnost ekstrakta tropa zapažena kod cvekle sorte Detroit ( $IC_{50}=123,39\ \mu\text{g/ml}$ ).

Wruss i sar. (2015) su ispitivali redukcionu sposobnost sokova od sedam različitih sorti cvekle. RP se kretala u intervalu od 17,4 mM TE - 37,1 mM TE. Zaključeno je da se RP soka cvekle razlikuje među sortama i da zavisi od koncentracije fenolnih jedinjenja prisutne u njoj, npr. *Mona Lisa* ima najveći RP, što je u skladu sa sadržajem ukupnih polifenola i betalaina u ovoj sorti.

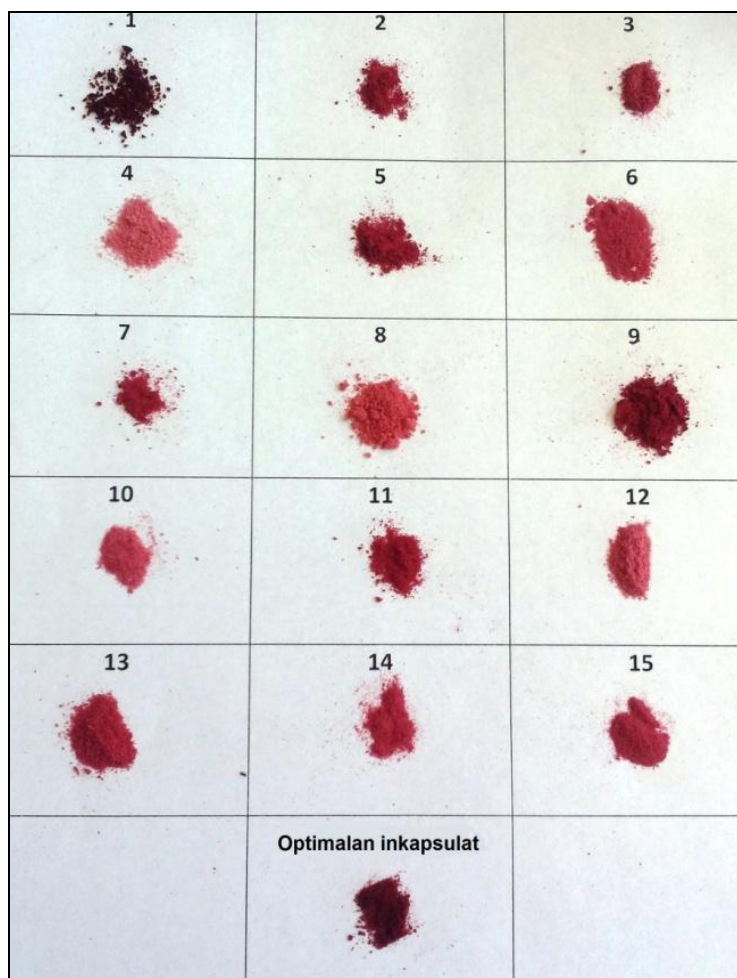
## 4.2. OPTIMIZACIJA PROCESA INKAPSULACIJE EKSTRAKTA TROPA CVEKLE

Optimizacija inkapsulacije ekstrakta tropa cvekle na nosač (protein soje) izvršena je metodom odzivnih površina (RSM) prateći Box-Behnken eksperimentalni dizajn za tri promenljive (odnos nosač:sok (X1), razblaženje soka (X2) i vreme mućkanja (X3)) na tri nivoa (Tabela 8). Efikasnost inkapsulacije (EI) i antioksidativna aktivnost na DPPH radikale ( $AA_{DPPH\cdot}$ ) odabrani su kao odzivi, a dobijene vrednosti su prikazane u Tabeli 12. Na Slici 19 prikazani su inkapsulati koji su dobijeni u eksperimentima 1-15 kao i uzorak optimalnog inkapsulata.

**Tabela 12.** Efikasnost inkapsulacije (EI) i antioksidativna aktivnost ( $AA_{DPPH\cdot}$ )

<b>Eksperiment</b>	<b>EI (%)</b>	<b><math>AA_{DPPH\cdot}</math> (<math>\mu\text{mol TE}/100\text{ g}</math>)</b>
1	84,41 $\pm$ 1,56	1619,22 $\pm$ 58,64
2	77,54 $\pm$ 1,49	947,13 $\pm$ 29,74
3	69,69 $\pm$ 4,64	772,19 $\pm$ 11,40
4	74,18 $\pm$ 3,09	339,76 $\pm$ 3,96
5	82,72 $\pm$ 5,50	959,41 $\pm$ 18,98
6	77,69 $\pm$ 5,00	316,30 $\pm$ 10,47
7	75,40 $\pm$ 4,18	998,77 $\pm$ 47,09
8	60,26 $\pm$ 0,32	254,67 $\pm$ 24,62
9	85,03 $\pm$ 2,00	921,69 $\pm$ 14,62
10	76,36 $\pm$ 3,95	223,61 $\pm$ 14,17
11	78,16 $\pm$ 4,17	1077,27 $\pm$ 29,22
12	64,23 $\pm$ 0,15	166,96 $\pm$ 19,77
13	75,87 $\pm$ 4,75	630,29 $\pm$ 24,48
14	75,69 $\pm$ 3,46	604,68 $\pm$ 32,94
15	76,48 $\pm$ 0,90	776,99 $\pm$ 0,28

*Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja  $\pm$  standardna greška*



**Slika 19.** Inkapsulati ekstrakta tropa cvekle dobijeni u procesu optimizacije

Vrednosti EI u eksperimentima optimizacije kretale su se u intervalu od 60,26 - 85,03%, dok su se vrednosti za  $AA_{DPPH}$  kretale u intervalu od 223,61 - 1619,22  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ . Na osnovu dobijenih rezultata izvršena je pojedinačna (engl. *single response*) optimizacija za EI i  $AA_{DPPH}$ . Kao kriterijum optimizacije postavljen je maksimum odzivne površine koja prikazuje uticaj ispitivanih parametara na zavisno promenljivi odziv EI (tj. najveći EI), odnosno,  $AA_{DPPH}$  (tj. najveća  $AA_{DPPH}$ ). Za dobijanje optimalnog uzorka koji će biti ispitivan dalje, korišćena je optimizacija više odziva (engl. *multi response*). Ovom optimizacijom se u obzir uzimaju oba odziva istovremeno (EI i  $AA_{DPPH}$ ), a dobijeni rezultati pokazuju optimalne uslove za dobijanje maksimalnih vrednosti i za EI i za  $AA_{DPPH}$ . Rezultati pojedinačne i optimizacije oba odziva prikazani su u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Optimalni uslovi inkapsulacije i dobijene maksimalne vrednosti EI i AA<sub>DPPH</sub> optimizacijom pojedinačnih i oba odziva

Optimizacija	Kodirane vrednosti nezavisno promenljivih			Stvarne vrednosti nezavisno promenljivih			Optimalne vrednosti	
	X1	X2	X3	X1	X2	X3	EI (%)	AA <sub>DPPH</sub> (μmol TE/100 g)
Pojedinačni odziv EI	-0,99	-0,89	-0,09	50,50	0,22	14,1	86,16	-
Pojedinačni odziv AA <sub>DPPH</sub>	-0,98	-0,98	0,10	51,00	0,04	16,00	-	1676,17
Oba odziva (EI+AA <sub>DPPH</sub> )	-0,98	-0,98	0,36	51,00	0,04	18,60	86,14	1668,37

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 13 utvrđeno je da nizak odnos nosač:ekstrakt (50,50 g/l), malo razblaženje ekstrakta (0,22) i vreme mućkanja od 14,1 min daje optimalni uzorak sa najvećom EI, dok je za dobijanje optimalnog uzorka sa najvećom AA<sub>DPPH</sub> takođe potreban relativno nizak odnos nosač:ekstrakt (51,00 g/l), minimalno razblaženje ekstrakta (0,04) i vreme mućkanja 16 min.

Saénz i sar. (2009) su prikazali efikasnost i uticaj parametara inkapsulacije bioaktivnih jedinjenja pulpe i etanolnog ekstrakta ploda opuncije (*Opuntia ficus-indica*) na maltodekstrin (MD) i inulin (In) metodom sprej sušenja. Betacijani i indikaksantini iz pulpe su se u potpunosti inkorporirali na MD i In (*recovery* 100%), ukazujući na to da temperatura i tip nosača nisu uticali na inkapsulaciju ovih bioaktivnih jedinjenja. Polifenoli su pokazali takođe sposobnost potpune inkapsulacije (*recovery* >100%) i iz pulpe i iz etanolnog ekstrakta, i to na oba nosača. Inkapsulacija betacijana i indikantina iz etanolnog ekstrakta na MD rezultirala je gubitkom od 33 do 38% (*recovery* od 62% do 67%), a na In je gubitak bio manji tj. od 14 do 19% (*recovery* od 81% do 86%). Oni su veću degradaciju betalaina tokom inkapsulacije na MD pripisali visokoj ulaznoj temperaturi vazduha i njihovoj termolabilnosti. Veću efikasnost inkapsulacije betalaina iz pulpe u poređenju sa etanolnim ekstraktom objasnili su zaštitnim uticajem komponenata pulpe (sluz i vlakna). Antioksidativne aktivnosti inkapsulata su bile u opsegu 19,2 – 61,7 mmol TE/g, što je značajno više od vrednosti prikazanih u Tabeli 12, i može se objasniti većim sadržajem polifenola u pulpi i etanolnom ekstraktu opuncije (909,47 i 777,14 mg/100 g) nego u ekstraktu tropa cvekle (424,14 mg/100 g).

Bazaria i Kumar (2016) su određivali optimalnu temperaturu vazduha, brzinu mešanja i koncentraciju maltodekstrina za dobijanje inkapsulata soka cvekle. Njihova istraživanja su pokazala da je najveća retencija betalaina (70,46%) pronađena u inkapsulatu sa 15% maltodekstrina jer se on ponaša kao nosač koji sprečava oksidaciju na visokim temperaturama. Takođe, oni su pokazali da vreme mešanja nema uticaja na sadržaj betalaina u inkapsulatu, dok visoke temperature dovode do smanjenja retencije betalaina.

Cilj istraživanja Saikie i sar. (2015) je bio utvrđivanje optimalnih uslova ekstrakcije polifenola iz tropa voća karambole i inkapsulacije ekstrahovanih polifenola na MD koristeći sprej sušenje i liofilizaciju. Inkapsulacija je vršena sa tri različita odnosa polifenoli:nosač. Njihovi rezultati su pokazali da se vrednost ukupnih polifenola povećava sa povećanjem koncentracije MD, dok je vrednost polifenola na površini nosača bila veća kod liofilizacije (od 78 do 97%) nego kod sprej sušenja (od 63 do 79%).

### 4.3. FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE OPTIMALNOG INKAPSULATA

#### 4.3.1. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina u optimalnom inkapsulatu

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida i betalaina u optimalnom inkapsulatu prikazani su u Tabeli 14.

**Tabela 14.** Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u uzorku optimalnog inkapsulata

Bioaktivna jedinjenja	Sadržaj (mg/100 g)
Ukupni polifenoli <sup>a</sup>	584,74 ± 10,76
Ukupni flavonoidi <sup>b</sup>	14,20 ± 4,26
Ukupni betacijani <sup>c</sup>	108,89 ± 0,86
Ukupni betaksantini <sup>d</sup>	111,33 ± 0,82
Ukupni betalaini <sup>e</sup>	220,22 ± 1,68

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

<sup>a</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline u 100 g inkapsulata (mg GAE/100g)

<sup>b</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta rutina u 100 g inkapsulata (mg RE/100 g)

<sup>c</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta betanina u 100 g inkapsulata (mg BE/100 g)

<sup>d</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta vulgaksantina-I u 100 g inkapsulata (mg VE/100g)

<sup>e</sup> Zbir sadržaja betacijana i betaksantina u 100 g inkapsulata (mg/100g)

Na osnovu dobijenih rezultata u Tabeli 14, mogu se izvesti slični zaključci kao kod ekstrakta tropa cvekle (Tabela 9). Udeo flavonoida u ukupnim polifenolnim jedinjenjima prisutnim u optimalnom inkapsulatu je mali (2,43%). Takođe, sadržaj betaksantina (111,33 mg/100 g) je zanemarljivo veći od sadržaja betacijana (108,89 mg/100 g), bez statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ).

Saénz i sar. (2009) saopštili su da je sadržaj betacijana u inkapsulatima pulpe i etanolnog ekstrakta opuncije na maltodekstrinu i inulinu bio u opsegu 0,28 – 0,64 mg/g, što je značajno manje od sadržaja u optimalnom inkapsulatu (108,89 mg/100 g). Može se zaključiti da su se betacijani iz ekstrakta tropa cvekle (42,84 mg/100 g) efikasnije inkorporirali liofilizacijom na proteinima soje nego betacijani iz pulpe i etanolnog ekstrakta opuncije (28,09 i 21,54 mg/100 g) sprej sušenjem na maltodekstrinu i inulinu. Međutim, sadržaj polifenolnih jedinjenja u inkapsulatima opuncije (1812 - 2410 mg GAE/g) bio je značajno veći od sadržaja u optimalnom inkapsulatu (584,74 mg/100 g), što je u skladu sa većim sadržajem polifenola u pulpi i etanolnom ekstraktu opuncije (909,47 i 777,14 mg/100 g) nego u ekstraktu tropa cvekle (424,14 mg/100 g). Pitaula i sar. (2010) su saopštili da je retencija betacijana u inkapsulatu iz soka cvekle 88,2%, a retencija antioksidativne aktivnosti u inkapsulatu je 82% u odnosu na sok cvekle. Sličnu retenciju (88%) su saopštili Cai i Corke (2000) za betacijane dobijene sprej sušenjem. Vršili su sušenje raspršivanjem ekstrakta betacijana amaranta koristeći MD i skrob kao nosače. Njihova istraživanja su pokazala da je došlo do degradacije betacijana (2,77%-7,66%) sprej sušenjem za razliku od postupka sušenja zamrzavanjem. Cai i Corke (2000) su zaključili da visoka temperatura ulaznog i izlaznog vazduha uzrokuje veće gubitke betacijana, što je u saglasnosti sa istraživanjem Saénz i sar. (2009).

U saopštenju Janiszewska (2014) maltodekstrin (MD) i guma Arabika (AG) su korišćeni kao nosači za inkapsulaciju soka cvekle. Rezultati su pokazali da je sadržaj betanina najviši u inkapsulatima sa AG kao nosačem (129 mg/100 g), dok je sadržaj vulgaksantina-I bio najviši kod inkapsulata gde je MD korišćen kao nosač (61 mg/100 g). Zaključeno je da se sa povećanjem sadržaja AG povećava sadržaj ljubičastih pigmenata (betanina), a smanjuje sadržaj žutih pigmenata (vulgaksantina-I). Suprotno tome je primećeno da se kod inkapsulata sa MD povećava sadržaj žutih pigmenata (vulgaksantina-I). Iz Tabele 14 može se zaključiti da su se proteini soje pokazali kao bolji nosači za betaksantine (111,33 mg/100 g) nego za betacijane (108,89 mg/100 g). Vrednosti



sadržaja betacijana na proteinima soje u saglasnosti su sa sadržajima betacijana na nosaču AG u saopštenju Janiszewska (2014).

#### 4.3.2. Kvalitativan i kvantitativan sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina u optimalnom inkapsulatu

Kvalitativan i kvantitativan sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina u optimalnom inkapsulatu određen je tehnikom visokopritisne tečne hromatografije ili hromatografije visoke rezolucije (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Hromatogrami su snimljeni na 477 i 538 nm, a u Tabeli 15 su prikazani dobijeni rezultati.

**Tabela 15.** Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u optimalnom inkapsulatu

Jedinjenje	Sadržaj (mg/100 g)
Galna kiselina	26,54 ± 0,89
Protokatehinska kiselina	65,58 ± 2,65
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	30,18 ± 0,02
Katehin	156,04 ± 1,03
Epikatehin	3,88 ± 0,05
Hlorogenska kiselina	0,55 ± 0,01
Kafena kiselina	0,34 ± 0,00
Ferulna kiselina	0,89 ± 0,02
Sinapinska kiselina	0,97 ± 0,01
Kumarinska kiselina	0,64 ± 0,01
Miricetin	6,55 ± 0,09
Luteolin	0,06 ± 0,00
Kvercetin	0,41 ± 0,08
Apigenin	0,18 ± 0,00
Izoramnetin	0,65 ± 0,01
Betanin	65,36 ± 2,18
Vulgaksantin-I	59,29 ± 2,05

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

Na osnovu dobijenih rezultata iz Tabele 15, može se zaključiti da je katehin dominantno polifenolno jedinjenje dok su luteolin i apigenin najmanje zastupljeni, slično kao kod ekstrakta tropa cvekle.

Nemzer i sar. (2011) su određivali kvantitativni sastav inkapsuliranog ekstrakta cvekle koristeći sprej sušenje gde su kao nosač koristili MD. Vulgaksantin-I je identifikovan kao glavni i najistaknutiji betaksantin u cvekli (29,8%). Njihovi rezultati su pokazali da se koncentracija ukupnih betalaina kretala od 0,24% do 0,46%, pri čemu se koncentracija ukupnih betacijanina kretala do 0,32%, dok je koncentracija betaksantina bila do 0,18% u uzorku inkapsulata. Nakon inkapsulacije, u inkapsulatu je zadržano 74% betanina i 83% vulgaksantina-I, pri čemu je na osnovu rezultata iz Tabele 15 primećeno da su koncentracije betalaina bile više nego u istraživanjima Nemzer i sar. (2011). To se može objasniti korišćenjem različitih nosača, kao i razlike u metodi inkapsulacije.

Fang i Bhandari (2011) su inkapsulirali sok od borovnice na MD kao nosač koristeći metodu sprej sušenja. Nakon inkapsulacije identifikovana je galna kiselina (14,28 mg/100 g) kao i kvercetin-galaktozid (17,07 mg/100 g), kvercetin-glukozid (10,34 mg/100 g) i kvercetin-deoksiheksozid (14,45 mg/100 g). Sadržaj detektovanih jedinjenja se nije značajno promenio u odnosu na neinkapsuliran sok borovnice, tj. zadržano je 93-97% polifenolnih jedinjenja u inkapsulatu.

Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk (2011) su ispitivali koncentraciju bioaktivnih jedinjenja kao i zadržavanje polifenolnih jedinjenja iz soka crne ribizle nakon inkapsulacije sprej sušenjem. Koristili su pet sorti crne ribizle u kojima su identifikovani derivati miricetina i kvercetina. Njihovi rezultati su pokazali da je nakon inkapsulacije došlo do degradacije miricetina (od 27% do 66%) u zavisnosti od sorte crne ribizle, dok se sadržaj kvercetina povećao za 5% do 69%. U ranijim istraživanjima Mikkonen i sar. (2001) i Häkkinen i sar. (1999) navodi se da je miricetin glavni flavonol u crnoj ribizli a kvercetin glavni aglikon. Za razliku od istraživanja Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk (2011), rezultati ove disertacije ukazuju na povećanje oba flavonola (miricetin i kvercetin) za 86%. Na osnovu rezultata se može zaključiti da se postupak inkapsulacije pokazao kao zaštita ovih jedinjenja, a razlika u sadržajima ovih flavonola se može objasniti kao posledica otežane kvantifikacije miricetina zbog njegove nestabilnosti i osetljivosti na interferencije sa drugim jedinjenjima (Mikkonen i sar, 2001).

Vulić i sar. (2019) su vršili inkapsulaciju tropa paprike na izolatu proteina surutke liofilizacijom i utvrdili da su se sledeća polifenolna jedinjenja vezala za nosač u značajnoj koncentraciji: galna (130,6 mg/100 g), vanilinska (43,7 mg/100 g), prokatehinska (135,3 mg/100 g), hlorigenska (10,4 mg/100 g) i kafena kiselina (4,9 mg/100 g), rutin (1,3 mg/100 g) i miricetin (2,7 mg/100 g).

### 4.3.3. Antioksidativna aktivnost (AA) i redukciona sposobnost (RP) optimalnog inkapsulata

Određivanje antioksidativne aktivnosti na stabilne DPPH i ABTS<sup>+</sup> radikale i redukciona sposobnost optimalnog inkapsulata izvršena je spektrofotometrijskim metodama, a rezultati merenja su prikazani u Tabeli 16.

**Tabela 16.** Antioksidativna aktivnost i redukciona sposobnost optimalnog inkapsulata

Antioksidativna aktivnost	( $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ )
AA <sub>DPPH•</sub>	2089,55 ± 10,06
AA <sub>ABTS<sup>+</sup>•</sub>	2031,53 ± 20,72
RP	31,25 ± 7,02

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti 3 ponavljanja ± standardna greška

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su antioksidativne aktivnosti inkapsulata veće od aktivnosti tropa cvekle (Tabela 16), i to AA<sub>DPPH•</sub> oko tri puta, a AA<sub>ABTS<sup>+</sup>•</sub> dva puta. Sa druge strane, RP inkapsulata manji je za oko sedam puta u odnosu na RP ekstrakta tropa cvekle. Pretpostavka je da se na nosaču koncentrišu jedinjenja iz ekstrakta tropa cvekle koja imaju izraženu antioksidativnu aktivnost, ali ne i redukcionu sposobnost.

Rezultati Pitaula i sar. (2010) su pokazali da je retencija antioksidativne aktivnosti inkapsulata bila 82% u odnosu na sok cvekle, dok je sa druge strane, došlo do degradacije redukcionne sposobnosti u inkapsulatu u odnosu na sok cvekle, tj. RP je bio za 94% veći u soku cvekle nego u inkapsulatu. Njihova istraživanja su se zasnivala na uticaju različitih tretmana na antioksidativnu aktivnost inkapsulata. Rezultati su pokazali da je pri tretmanu mikrotalasima došlo do povećanja za 13% AA<sub>DPPH•</sub> i za 11% AA<sub>ABTS<sup>+</sup>•</sub>, dok je u slučaju metode sprej sušenja došlo do povećanja antioksidativne aktivnosti do 1,5 puta. Oni su došli do zaključka da primena visokih temperatura tokom sprej sušenja može dovesti do povećanja AA zbog stvaranja polifenolnih jedinjenja koja nastaju degradacijom drugih kompleksnijih jedinjenja.

Saénz i sar. (2009) su ispitivali antioksidativnu aktivnost inkapsuliranog etanolnog ekstrakta karambole i njenog tropa na maltodekstrinu i inulinu. Veća antioksidativna aktivnost zabeležena je kod mikrokapsula etanolnog ekstrakta karambole na inulinu (61,7 mmol TEAC/g) nego na maltodekstrinu (19,2 mmol TEAC/g), dok se maltodekstrin pokazao kao bolji nosač za anti-

oksidativna svojstva mikrokapsula ekstrakta tropa (34,0 mmol TEAC/g) nego inulin (24,0 mmol TEAC/g).

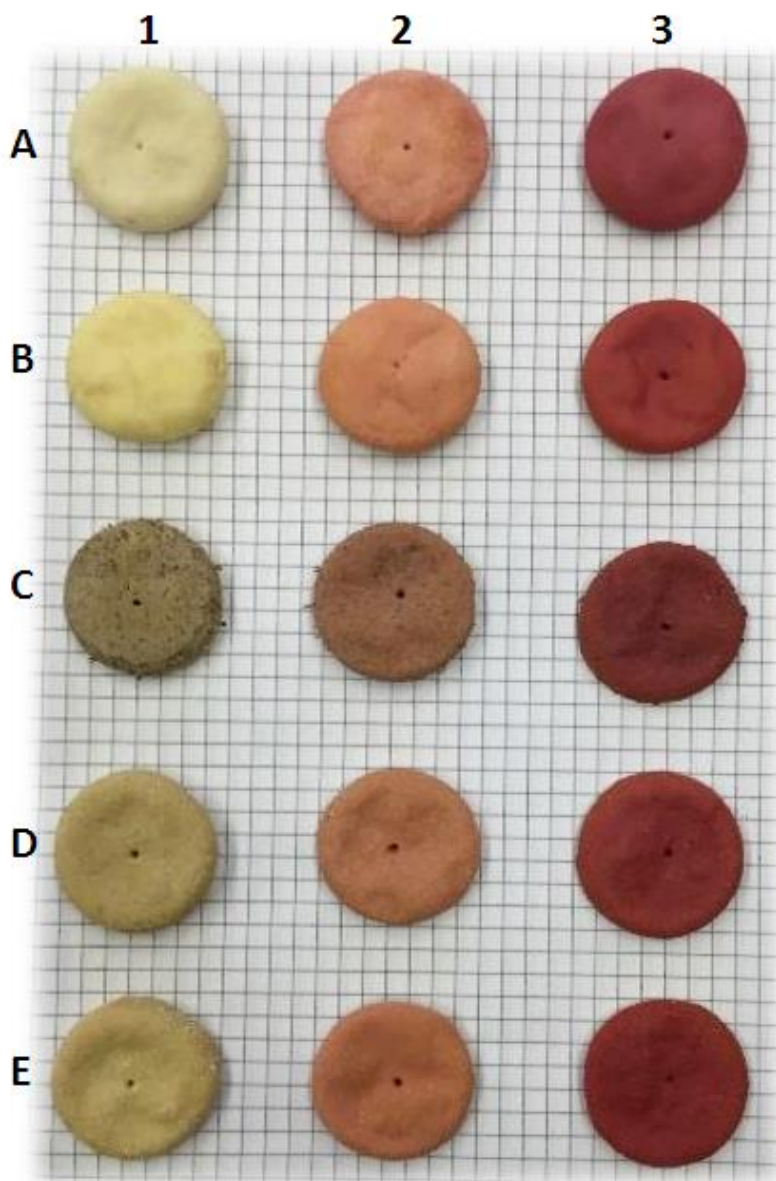
Antioksidativna aktivnost na DPPH radikale inkapsulata vodenog ekstrakta tropa kupine (67,33 µg/ml) i hidroalkoholnog ekstrakta tropa kupine (42,33 µg/ml), kao i njihova redukciona sposobnost (36,23 i 61,21 µg/ml) povećane su u odnosu na same ekstrakte. Pretpostavlja se da je povećanje rezultat primene visokih temperatura tokom inkapsulacije sprej sušenjem koje su uzrokovale povećanje sadržaja polifenolnih jedinjenja nastalih degradacijom drugih jedinjenja (dos Santos i sar., 2017).

## **4.4. FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE KREKERA**

### **4.4.1. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina**

Zamenom pojedinih sirovina funkcionalnim komponentama (minerali, vitamini, probiotici, prebiotici, antioksidanti i prehrambena vlakna) krekeri (fini pekrski proizvodi) mogu predstavljati funkcionalnu hranu. Inkapsulacijom ekstrakta tropa cvekle na sojinom proteinu, mogu se dobiti obogaćeni proteini koji se mogu primenjivati kao dodaci ishrani ili u prehrambenim proizvodima.

Krajnji cilj istraživanja u okviru ove disertacije je dizajniranje funkcionalnih krekeri na bazi brašna od cerealijskih (pšenica) i pseudocerealijskih (heljda, amarant i kino) dodavanjem ekstrakta ili inkapsulata tropa cvekle (Slika 20).



**Slika 20.** Funkcionalni krekeri na bazi brašna od cerealijskih namirnica (pšenično (red A) i einkorn (red B)) i pseudocerealijskih (heljda (red C), amarant (red D) i kino (red E)) bez dodatka (kolona 1) i sa dodatkom ekstrakta (kolona 2) ili inkapsulata tropa cvekle (kolona 3)

Pšenica je glavna komponenta ljudske ishrane i kao takva, izvor je lipofilnih antioksidanata, kao što su karotenoidi i tokoli. Preradom pšenice, dobija se belo brašno koje se koristi za pripremu hleba i pekarskih proizvoda (Hidalgo i sar., 2010).

Žitarice su takođe dobar izvor polifenola od kojih je ferulna kiselina najzastupljenija. Međutim, tokom prerade (mlevenja) smanjuje se sadržaj fenolnih kiselina jer se one u najvećim

količinama nalaze u aleuronskim slojevima, klicama i semenu koji se preradom odstranjuju. Stoga, proizvodi od ove vrste brašna su podoban matriks za obogaćivanje (Brandolini i sar., 2013).

Rezultati Alvarez-Jubete i sar. (2010) su pokazali da je ukupni sadržaj polifenola u hleбноj pšenici (53,10 mg GAE/100 g SM) bio znatno veći od sadržaja polifenola kod amaranta (21,20 mg GAE/100 g SM), niži od heljde (323,00 mg GAE/100 g SM) i bez značajne razlike u odnosu na sadržaj polifenola u kinoi (71,70 mg GAE/100 g SM).

U Tabeli 17 su prikazani rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja polifenola, flavonoida i betalaina u testu i krekerima pripremljenim od brašna hlebne pšenice (P), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (P+Ex) i inkapsulatom (P+I).

Testo za krekeru u koje su dodati ekstrakt ili inkapsulat tropa cvekle imalo je veći sadržaj polifenola od odgovarajućih krekeru, što ukazuje na činjenicu da je tokom termičkog tretmana (pečenja) došlo do degradacije određene količine polifenolnih jedinjenja. Testa obogaćena ekstraktom (397,18 mg GAE/100 g) i inkapsulatom tropa cvekle (355,03 mg GAE/100 g) imala su veći sadržaj polifenolnih jedinjenja od neobogaćenog krekeru (285,93 mg GAE/100 g). Najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja su imali krekeri obogaćeni inkapsulatom tropa cvekle (208,01 mg GAE/100 g) a najniži neobogaćeni krekeri (101,32 mg GAE/100 g). Udeo flavonoida u ukupnim polifenolima je bio nizak i kod krekeru je bio 1,41% za P+I i 3,81% za P+Ex i 7,86% za P. Kod testa je udeo flavonoida bio nešto veći (9,73% za P+I; 8,74% za P+Ex i 10,34% za P). Pretpostavlja se da je razlog ovog smanjenja udela flavonoida kod krekeru degradacija pojedinih komponenti tokom pečenja i različita otpornost prema temperaturnom tretmanu.

Sadržaj ukupnih betacijana u testu je znatno veći od sadržaja ukupnih betaksantina dok se njihova vrednost kod krekeru ne razlikuje značajno ( $p \leq 0,05$ ). Sadržaj betacijana se redukovao oko 4 puta nakon pečenja krekeru sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle, dok se kod krekeru sa dodatkom inkapsulata sadržaj betacijana smanjio oko 2,5 puta. Takođe, redukcija u sadržaju betaksantina je manja kod krekeru sa dodatkom inkapsulata (1,19 puta) nego kod krekeru sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (2 puta). Smanjenje ukupnog sadržaja betacijana i betaksantina je posledica degradacije ukupnih betalaina tokom pečenja, koji su evidentno bolje zaštićeni kada su inkapsulirani.

**Tabela 17.** Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u testu i krekerima pripremljenim od brašna hlebne pšenice (P), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (P+Ex) ili inkapsulata (P+I) i njihova retencija nakon pečenja

Bioaktivna jedinjenja	P		P+Ex		P+I	
	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri
Ukupna polifenolna jedinjenja <sup>a</sup>	285,93±0,19 <sup>A</sup>	101,32±5,27 <sup>B</sup>	397,18±16,80 <sup>C</sup>	206,03±0,84 <sup>D</sup>	355,03±6,43 <sup>E</sup>	208,01±1,91 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih polifenolnih jedinjenja <sup>f</sup>	35,43±1,75 <sup>A</sup>		51,87±2,57 <sup>B</sup>		58,59±2,90 <sup>C</sup>	
Ukupni flavonoidi <sup>b</sup>	29,56±0,13 <sup>A</sup>	7,96±0,01 <sup>B</sup>	34,71±0,89 <sup>A</sup>	7,85±0,37 <sup>C</sup>	34,55±1,14 <sup>D</sup>	2,94±0,06 <sup>C</sup>
Retencija ukupnih flavonoida <sup>f</sup>	26,93±1,31 <sup>A</sup>		22,62±1,13 <sup>B</sup>		8,51±0,40 <sup>C</sup>	
Ukupni betacijani <sup>c</sup>	-	-	20,03±1,76 <sup>A</sup>	4,81±0,16 <sup>B</sup>	19,30±0,01 <sup>A</sup>	7,85±0,17 <sup>C</sup>
Retencija ukupnih betacijana <sup>f</sup>	-		24,01±1,25 <sup>A</sup>		40,67±2,04 <sup>B</sup>	
Ukupni betaksantini <sup>d</sup>	-	-	9,89±0,86 <sup>A</sup>	4,87±0,16 <sup>B</sup>	9,49±0,006 <sup>A</sup>	7,97±0,26 <sup>C</sup>
Retencija ukupnih betaksantina <sup>f</sup>	-		49,24±2,43 <sup>A</sup>		83,98±3,99 <sup>B</sup>	
Ukupni betalaini <sup>e</sup>	-	-	29,92±2,26 <sup>A</sup>	9,68±0,32 <sup>B</sup>	28,79±0,016 <sup>A</sup>	15,82±0,43 <sup>C</sup>
Retencija ukupnih betalaina <sup>f</sup>	-		32,35±1,60 <sup>A</sup>		54,95±2,71 <sup>B</sup>	

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-E) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline u 100 g testa/krekeru (mg GAE/100 g)

<sup>b</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta rutina u 100 g testa/krekeru (mg RE/100 g)

<sup>c</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta betanina u 100 g testa/krekeru (mg BE/100 g)

<sup>d</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta vulgaksantina-I u 100 g testa/krekeru (mg VE/100 g)

<sup>e</sup> Zbir sadržaja betacijana i betaksantina u 100 g testa/krekeru (mg/100 g)

<sup>f</sup> Izraženo u %

Einkorn je stara sorta pšenice koja je privukla veliku pažnju zbog velike otpornosti na bolesti i kvalitet zrna. Ima odlične karakteristike za proizvodnju kekisa i pekarskih proizvoda bez potrebe za korišćenjem kvasca (Konvalina i sar., 2010). Ima visoku nutritivnu vrednost, visok sadržaj proteina, karotenoida i tokola. Brašno od einkorn pšenice sadrži veliku količinu polifenolnih jedinjenja. Dvogodišnje ispitivanje, pokazuje da einkorn pšenica ima maksimalnu koncentraciju

traciju konjugovanih fenolnih kiselina (50,5 mg/kg SM), dok sa vezanim fenolnim kiselinama njihov sadržaj je oko 562 mg/kg SM, tj. sadržaj fenolnih kiselina u ovoj pšenici se kreće od 449 mg/kg SM do 816 mg/kg SM (Hidalgo i Brandolini, 2013). HPLC analizom einkorn pšenice identifikovano je prisustvo sedam kiselina i to ferulne, *p*-kumarinske, vanilinske, siringinske, *p*-hidroksibenzoeve i kafene kiseline i siringaldehida, pri čemu je ferulna kiselina najzastupljenija, i u konjugovanom i u vezanom obliku (Brandolini i sar., 2013).

U Tabeli 18 prikazani su sadržaji bioaktivnih jedinjenja, tj. polifenola, flavonoida i betalaina, u testu i krekerima koji su napravljeni od einkorn brašna, sa i bez dodatka ekstrakta tropa cvekle i inkapsulata, kao i njihova retencija nakon pečenja.

**Tabela 18.** Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u testu i krekerima pripremljenim od einkorn brašna (E), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+Ex) ili inkapsulata (E+I) i njihova retencija nakon pečenja

Bioaktivna jedinjenja	E		E+Ex		E+I	
	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri
Ukupna polifenolna jedinjenja <sup>a</sup>	326,56±23,81 <sup>A,E</sup>	141,15±1,77 <sup>B</sup>	359,42±22,48 <sup>A,D</sup>	259,24±16,78 <sup>C</sup>	386,82±17,71 <sup>D</sup>	313,16±4,54 <sup>E</sup>
Retencija ukupnih polifenola <sup>f</sup>	43,22±1,96 <sup>A</sup>		72,13±3,24 <sup>B</sup>		80,96±3,58 <sup>C</sup>	
Ukupni flavonoidi <sup>b</sup>	18,61±0,41 <sup>A</sup>	4,48±0,51 <sup>B</sup>	33,42±1,47 <sup>C</sup>	13,93±0,01 <sup>D</sup>	51,78±3,18 <sup>A</sup>	2,78±0,28 <sup>E</sup>
Retencija ukupnih flavonoida <sup>f</sup>	24,07±1,86 <sup>A</sup>		41,68±1,75 <sup>B</sup>		5,37±0,20 <sup>C</sup>	
Ukupni betacijani <sup>c</sup>	-	-	10,44±0,001 <sup>A</sup>	4,48±0,15 <sup>B</sup>	19,38±0,24 <sup>C</sup>	10,30±0,09 <sup>A</sup>
Retencija ukupnih betacijana <sup>f</sup>	-		42,91±1,95 <sup>A</sup>		53,15±2,45 <sup>B</sup>	
Ukupni betaksantini <sup>d</sup>	-	-	5,12±0,001 <sup>A</sup>	4,52±0,11 <sup>A</sup>	9,56±0,11 <sup>B</sup>	10,11±0,62 <sup>B</sup>
Retencija ukupnih betaksantina <sup>f</sup>	-		88,28±3,86 <sup>A</sup>		105,75±6,26 <sup>B</sup>	
Ukupni betalaini <sup>e</sup>	-	-	15,56±0,002 <sup>A</sup>	9,00±0,26 <sup>B</sup>	28,94±0,35 <sup>C</sup>	20,41±0,71 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih betalaina <sup>f</sup>	-		57,84±2,63 <sup>A</sup>		70,53±3,22 <sup>B</sup>	

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-E) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline u 100 g testa/krekeru (mg GAE/100 g)

<sup>b</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta rutina u 100 g testa/krekeru (mg RE/100 g)

<sup>c</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta betanina u 100 g testa/krekeru (mg BE/100 g)

<sup>d</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta vulgaksantina-I u 100 g testa/krekeru (mg VE/100 g)

<sup>e</sup> Zbir sadržaja betacijana i betaksantina u 100 g testa/krekeru (mg/100 g)

<sup>f</sup> Izraženo u %



Najveći sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja zabeležen je kod testa sa dodatkom inkapsulata (386,82 mg GAE/100 g), i kod krekeru sa dodatkom inkapsulata (313,16 mg GAE/100g). Na osnovu rezultata iz Tabele 18 evidentno je da je sadržaj flavonoida u odnosu na ukupne polifenole veoma nizak kod krekeru i kreće se u intervalu od 0,89% (E+I) do 5,37% (E+Ex), dok je kod testa udeo flavonoida nešto viši (5,70% za E; 9,30% za E+Ex i 13,39% za E+I), slično kao i kod uzoraka pripremljenih od pšeničnog brašna. Sadržaj ukupnih betalaina je veći kod testa i krekeru sa dodatkom inkapsulata (28,94 i 20,41 mg/100 g) nego kod krekeru sa dodatkom ekstrakta (15,56 i 9,00 mg/100 g). Takođe, redukcija sadržaja ukupnih betalaina kod krekeru sa dodatkom inkapsulata manja je (1,4 puta) nego kod krekeru sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (1,73 puta).

Amarant spada u grupu pseudocerealija koja je otporna na sušu, visoke temperature i štetovina i ima male zahteve za uzgoj, zbog čega je privukla veliku pažnju u ishrani ljudi (Yawadio Nsimba i sar., 2008).

Još jedna prednost amaranta (i ostalih pseudocerealija) je to što ne sadrže gluten (Alvarez-Jubete i sar., 2010). Sadržaj ukupnih polifenola u amarantu (21,2 mg GAE/100 g SM) znatno je niži u odnosu na ostale pseudocerealije, kinou (71,70 mg GAE/100 g SM) i heljdu (323 mg GAE/100 g SM). HPLC analizom detektovano je prisustvo prokatehina i hidroksibenzojeve kiseline u amarantu. Gorinstein i sar. (2007) su takođe utvrdili da je sadržaj polifenola u amarantu (405 µg/g SM - 430 µg/g SM, u zavisnosti od sorte), niži nego kod kinoe (600 µg/g SM) i heljde (912 µg/g SM). Alvarez-Jubete i sar. (2010) nisu detektovali flavonoide u amarantu dok su Gorinstein i sar. (2007) utvrdili nizak sadržaj flavonoida u odnosu na ostale pseudocerealije (od 21,9 mg/100 g SM - 22,2 mg/100 g SM). Amarant sadrži veću koncentraciju proteina, kao i proteine boljeg kvaliteta u odnosu na žitarice. Sadrži lunasin, koji je pronađen u albuminu, globulinu i prolaminu amaranta a može se koristiti kao alternativni izvor bioaktivnih peptida. U krekerima pripremljenim od brašna einkorn pšenice i amaranta, sa i bez dodatka ekstrakta tropa cvekle ili inkapsulata ispitan je sadržaj bioaktivnih jedinjenja, kao i njihova retencija nakon pečenja, a rezultati su prikazani u Tabeli 19.

**Tabela 19.** Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u testu i krekerima pripremljenim od smeše einkorn i amarant brašna (E+A), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+A+Ex) ili inkapsulata (E+A+I) i njihova retencija nakon pečenja

Bioaktivna jedinjenja	E+A		E+A+Ex		E+A+I	
	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri
Ukupna polifenolna jedinjenja <sup>a</sup>	246,39±0,19 <sup>A</sup>	166,56±4,61 <sup>B</sup>	314,55±19,74 <sup>C</sup>	195,70±5,66 <sup>D</sup>	345,21±8,81 <sup>E</sup>	260,82±8,29 <sup>A</sup>
Retencija ukupnih polifenolnih jedinjenja <sup>f</sup>	47,31±2,03 <sup>A</sup>		62,22±2,59 <sup>B</sup>		75,55±3,38 <sup>C</sup>	
Ukupni flavonoidi <sup>b</sup>	22,23±1,31 <sup>A</sup>	13,43±0,47 <sup>B</sup>	80,45±2,50 <sup>C</sup>	37,47±0,84 <sup>D</sup>	143,80±4,44 <sup>C</sup>	33,17±0,41 <sup>E</sup>
Retencija ukupnih flavonoida <sup>f</sup>	60,41±2,75 <sup>A</sup>		46,57±2,07 <sup>B</sup>		23,07±1,07 <sup>C</sup>	
Ukupni betacijani <sup>c</sup>	-	-	14,44±0,45 <sup>A</sup>	4,79±0,01 <sup>B</sup>	23,08±0,05 <sup>C</sup>	8,67±0,21 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih betacijana <sup>f</sup>	-		33,17±1,45 <sup>A</sup>		37,56±1,76 <sup>B</sup>	
Ukupni betaksantini <sup>d</sup>	-	-	7,09±0,22 <sup>A</sup>	4,75±0,11 <sup>B</sup>	11,30±0,07 <sup>C</sup>	8,94±0,26 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih betaksantina <sup>f</sup>	-		66,99±3,13 <sup>A</sup>		79,12±3,52 <sup>B</sup>	
Ukupni betalaini <sup>e</sup>	-	-	21,53±0,67 <sup>A</sup>	9,54±0,21 <sup>B</sup>	34,38±0,12 <sup>C</sup>	17,61±0,47 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih betalaina <sup>f</sup>	-		44,31±1,91 <sup>A</sup>		51,22±2,20 <sup>B</sup>	

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-E) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline u 100 g testa/krekeri (mg GAE/100 g)

<sup>b</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta rutina u 100 g testa/krekeri (mg RE/100 g)

<sup>c</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta betanina u 100 g testa/krekeri (mg BE/100 g)

<sup>d</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta vulgaksantina-I u 100 g testa/krekeri (mg VE/100 g)

<sup>e</sup> Zbir sadržaja betacijana i betaksantina u 100 g testa/krekeri (mg/100 g)

<sup>f</sup> Izraženo u %

Slično kao i kod krekeri od einkorn brašna, sadržaj ukupnih polifenola je bio najviši kod testa (345,21 mg GAE/100 g) i krekeri (260, 82 mg GAE/100 g) sa dodatkom inkapsulata, kao i sadržaj betalaina (34,38 mg/100 g u testu i 17,61 mg/100 g u krekerima). Smanjenje sadržaja polifenola posledica je termičke degradacije tokom pečenja krekeri. Udeo flavonoida u ukupnim polifenolnim jedinjenjima je viši u odnosu na testa i krekeri od pšeničnog brašna i einkorn

brašna, pri čemu je najviši udeo flavonoida kod testa sa dodatkom inkapsulata (41,66%), dok je najniži udeo flavonoida kod krekerica od mešavine einkorn i amarant brašna bez dodataka ekstrakta i inkapsulata (8,06%).

Kinoa takođe spada u grupu pseudocerealijskih. Zbog visokog sadržaja proteina, kao i njihovog velikog nutritivnog kvaliteta, sve je veće interesovanje za kinoo. S obzirom na to da su bogate proteinima, mastima, dijetetskim vlaknima i mineralima (kalcijum i natrijum), kao i zbog visokog sadržaja lizina, kinoa se koristi kao važna sirovina u pekarstvu, testeničarstvu i u proizvodnji dečije hrane. Sadržaj polifenola u kinoi kreće se u opsegu 94,3 - 148,0 mg ekvivalenta taninske kiseline/g suvog uzorka (Yawadio Nsimba i sar., 2008).

Alvarez-Jubete i sar. (2010) su saopštili da je sadržaj polifenola u kinoi 71,7 mg GAE/100g SM, gde su najzastupljeniji kvercetin i kempferol glukozid, dok su Gorinstein i sar. (2007) saopštili 600 µg/g SM polifenola i 38,6 mg/100 g SM flavonoida u kinoi. Takođe su identifikovane i dve benzojeve kiseline, prokatehin i derivati vanilinske kiseline, a neki spektri su ukazivali i na prisustvo hidroksibenzojeve kiseline.

U Tabeli 20 prikazani su sadržaji ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida i betalaina u krekerima koji su napravljeni od mešavine einkorn brašna i kinoa, sa ili bez funkcionalnih dodataka (ekstrakt ili inkapsulat tropa cvekle), kao i njihova retencija nakon pečenja.

Udeo flavonoida u ukupnim polifenolima u testu i krekerima pripremljenim od smeše einkorn i kinoa brašna kreće se u intervalu od 9,61% (E+K) do 19,04% (E+K+Ex) za testo i od 2,49% (E+K) do 18,32% (E+K+I) za krekerice. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i betalaina je kod testa i krekerica sa dodatkom inkapsulata bio najveći, u odnosu na kontrolne krekerice i krekerice sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle. Sadržaj betacijana je viši od sadržaja betaksantina u svim uzorcima, osim kod krekerica sa dodatkom inkapsulata, gde je sadržaj betaksantina (9,33 mg VE/100 g) veći od sadržaja betacijana (9,18 mg BE/100 g), bez statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ).

Heljda je pseudocerealijska koja se smatra hranom visoke hranljive vrednosti. Bogata je vitaminom B1 i B2, kao i antioksidantima poput tokoferola i polifenolnih jedinjenja kao što su rutin, fenolne kiseline i njihovi derivati (Holasova i sar., 2002).

Varijacije u antioksidativnoj aktivnosti heljde zavise od sorte i uticaja spoljašnje sredine. U heljdi su identifikovani *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, *p*-kumarinska i siringinska kiselina. Od flavonoida u heljdi su identifikovani rutin, orientin, viteksin, kvercetin, izoviteksin i izoorientin.

Najviše koncentracije flavonoida su određene u semenu i ljusci heljde i to 18,8 mg/100 g, odnosno 74 mg/100 g (Sun i Ho, 2005).

Heljda sadrži najviše polifenola (912 µg/g SM) i flavonoida (76,8 mg/100 g SM) u poređenju sa ostalim pseudocerealijskim (amarantom i kinoom) i hlebnom pšenicom. Sadržaj rutina u heljdi je u intervalu od 3,8 - 10,1 mg/100 g (Gorinstein i sar., 2007).

**Tabela 20.** Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u testu i krekerima pripremljenim od smeše einkorn i kinoa brašna (E+K), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+K+Ex) ili inkapsulata (E+K+I) i njihova retencija nakon pečenja

Bioaktivna jedinjenja	E+K		E+K+Ex		E+K+I	
	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri
Ukupna polifenolna jedinjenja <sup>a</sup>	202,77±5,87 <sup>B</sup>	125,73±3,91 <sup>A</sup>	304,89±10,96 <sup>C</sup>	237,48±15,07 <sup>D</sup>	365,34±5,87 <sup>E</sup>	254,73±5,17 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih polifenolnih jedinjenja <sup>f</sup>	62,01±2,82 <sup>A</sup>		77,89±3,45 <sup>B</sup>		69,72±3,31 <sup>C</sup>	
Ukupni flavonoidi <sup>b</sup>	12,08±2,08 <sup>A</sup>	5,05±0,97 <sup>B</sup>	58,05±0,89 <sup>C</sup>	31,33±0,52 <sup>D</sup>	65,40±0,56 <sup>E</sup>	46,68±4,11 <sup>F</sup>
Retencija ukupnih flavonoida <sup>f</sup>	41,80±1,90 <sup>A</sup>		53,97±2,35 <sup>B</sup>		71,38±3,33 <sup>C</sup>	
Ukupni betacijani <sup>c</sup>	-	-	15,45±0,21 <sup>A</sup>	6,40±0,12 <sup>B</sup>	22,15±0,09 <sup>C</sup>	9,18±0,08 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih betacijana <sup>f</sup>	-		41,42±1,84 <sup>A</sup>		41,44±1,76 <sup>A</sup>	
Ukupni betaksantini <sup>d</sup>	-	-	7,79±0,18 <sup>A</sup>	6,25±0,24 <sup>B</sup>	10,84±0,08 <sup>C</sup>	9,33±0,09 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih betaksantina <sup>f</sup>	-		80,23±3,63 <sup>A</sup>		86,07±4,12 <sup>B</sup>	
Ukupni betalaini <sup>e</sup>	-	-	23,24±0,38 <sup>A</sup>	12,65±0,36 <sup>B</sup>	32,99±0,17 <sup>C</sup>	18,51±0,17 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih betalaina <sup>f</sup>	-		54,43±2,16 <sup>A</sup>		56,11±2,53 <sup>B</sup>	

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-F) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline u 100 g testa/krekeru (mg GAE/100 g)

<sup>b</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta rutina u 100 g testa/krekeru (mg RE/100 g)

<sup>c</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta betanina u 100 g testa/krekeru (mg BE/100 g)

<sup>d</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta vulgaksantina-I u 100 g testa/krekeru (mg VE/100 g)

<sup>e</sup> Zbir sadržaja betacijana i betaksantina u 100 g testa/krekeru (mg/100 g)

<sup>f</sup> Izraženo u %

Na isti način kao i krekeri sa einkorn brašnom i amarantom ili kinoom, pripremljeni su i krekeri sa dodatkom heljdnog brašna, sa ili bez funkcionalnih dodataka (ekstrakt i inkapsulat tropa cvekle). Sadržaj bioaktivnih jedinjenja (ukupni polifenoli, flavonoidi, betacijani, betaksantini i ukupni betalaini) i njihova retencija nakon pečenja u ovim krekerima sa smešom einkorn i heljdnog brašna prikazani su u Tabeli 21.

**Tabela 21.** Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u testu i krekerima pripremljenim od smeše einkorn i heljdnog brašna (E+H), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+H+Ex) ili inkapsulata (E+H+I) i njihova retencija nakon pečenja

Bioaktivna jedinjenja	E+H		E+H+Ex		E+H+I	
	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri
Ukupna polifenolna jedinjenja <sup>a</sup>	391,01±11,88 <sup>A</sup>	231,30±2,24 <sup>B</sup>	444,73±13,21 <sup>C</sup>	254,93±14,73 <sup>B</sup>	502,64±17,66 <sup>D</sup>	334,10±2,14 <sup>E</sup>
Retencija ukupnih polifenolnih jedinjenja <sup>f</sup>	59,15±2,72 <sup>A</sup>		57,32±2,66 <sup>B</sup>		66,47±3,17 <sup>C</sup>	
Ukupni flavonoidi <sup>b</sup>	18,79±0,85 <sup>A</sup>	4,14±0,58 <sup>B</sup>	54,17±1,43 <sup>C</sup>	27,32±0,96 <sup>D</sup>	63,46±3,49 <sup>E</sup>	46,04±1,32 <sup>F</sup>
Retencija ukupnih flavonoida <sup>f</sup>	22,03±1,01 <sup>A</sup>		50,43±2,21 <sup>B</sup>		72,55±3,27 <sup>C</sup>	
Ukupni betacijani <sup>c</sup>	-	-	22,94±0,25 <sup>A</sup>	5,24±0,10 <sup>B</sup>	21,23±0,09 <sup>C</sup>	8,48±0,15 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih betacijana <sup>f</sup>	-		22,84±1,05 <sup>A</sup>		39,94±1,73 <sup>B</sup>	
Ukupni betaksantini <sup>d</sup>	-	-	11,30±0,12 <sup>A</sup>	5,26±0,10 <sup>B</sup>	10,41±0,05 <sup>C</sup>	8,67±0,11 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih betaksantina <sup>f</sup>	-		46,55±2,12 <sup>A</sup>		83,29±3,69 <sup>B</sup>	
Ukupni betalaini <sup>e</sup>	-	-	34,24±0,37 <sup>A</sup>	10,50±0,20 <sup>B</sup>	31,64±0,14 <sup>C</sup>	17,15±0,26 <sup>D</sup>
Retencija ukupnih betalaina <sup>f</sup>	-		30,67±1,29 <sup>A</sup>		54,20±2,61 <sup>B</sup>	

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-F) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline u 100 g testa/krekeru (mg GAE/100 g)

<sup>b</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta rutina u 100 g testa/krekeru (mg RE/100 g)

<sup>c</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta betanina u 100 g testa/krekeru (mg BE/100 g)

<sup>d</sup> Sadržaj izražen kao mg ekvivalenta vulgaksantina-I u 100 g testa/krekeru (mg VE/100 g)

<sup>e</sup> Zbir sadržaja betacijana i betaksantina u 100 g testa/krekeru (mg/100 g)

<sup>f</sup> Izraženo u %

Iz Tabele 21 može se zaključiti da je sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja i u testu i u krekerima najviši kod E+H+I (502,64 mg GAE/100 g i 334,10 mg GAE/100 g), a najniži kod E+H (391,01 mg GAE/100 g i 231,30mg/100 g). Sadržaj ukupnih flavonoida je viši kod testa nego kod krekeri što je verovatno posledica degradacije flavonoida tokom pečenja. Udeo flavonoida u ukupnim polifenolima se kretao u intervalu od 4,80 - 12,62% kod testa, dok je kod krekeri bio u intervalu od 1,79 - 13,78%. Sadržaj ukupnih betalaina se značajnije redukovao kod uzoraka sa ekstraktom tropa cvekle (za 69,33%) nego kod uzoraka sa inkapsulatom (za 45,80%). Niži sadržaj betalaina kod krekeri u odnosu na testo je posledica degradacije betalaina usled pečenja, dok manja redukcija sadržaja betalaina kod uzoraka sa inkapsulatom potvrđuje zaštitno dejstvo ovog postupka. Kao i kod uzoraka krekeri sa kinoom, sadržaj betacijana je veći od sadržaja betaksantina kod testa, dok je kod krekeri sadržaj betaksantina veći od ukupnog sadržaja betacijana, bez statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ). Moguće objašnjenje za ove razlike u stepenu degradacije betacijana i betaksantina je njihova različita osetljivost na temperaturni tretman.

Poređenjem rezultata iz Tabela 17, 18, 19, 20 i 21 evidentno je da je najviši sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja bio kod testa (502,64 mg GAE/100g) i krekeri (334,10 mg GAE/100g) od smeše einkorn i heljdinog brašna sa dodatkom inkapsulata (Tabela 21). Heljda je bogat izvor polifenolnih jedinjenja pa je stoga u ovim uzorcima, pored funkcionalnih dodataka, tj. ekstrakta i inkapsulata tropa cvekle, i heljdino brašno doprinelo da sadržaj polifenola bude visok. (Holasova i sar., 2002) su saopštili da je sadržaj polifenola u heljdi od 1138 - 39514 mg/kg SM dok su Alvarez-Jubete i sar. (2010) saopštili da su polifenoli prisutni u heljdi u koncentraciji od 323,4 mg GAE/100 g.

Najviši sadržaj flavonoida u krekerima utvrđen je kod uzoraka od E+K+I brašna (46,68 mg RE/100g) (Tabela 20), dok je najveći sadržaj flavonoida u uzorcima testa bio kod testa od E+A+I brašna (143,80 mg RE/100g) (Tabela 20). Najviši sadržaj betalaina u testu je bio kod uzoraka pripremljenih od smeše einkorn brašna i amaranta sa dodatkom inkapsulata (34,38 mg/100 g) (Tabela 19), dok je najviši sadržaj ukupnih betalaina u krekerima zabeležen kod krekeri od einkorn brašna sa dodatkom inkapsulata (20,41 mg/100 g) (Tabela 18). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su bioaktivna jedinjenja u inkapsulatu tropa cvekle u većoj meri zaštićena nego u samom ekstraktu tropa cvekle.

de Camargo i sar. (2014) su dodavali 1,3%, 1,8% i 2,5% kikirikijeve ljuške u kreker radi povećanja sadržaja polifenola. Njihovi rezultati su pokazali da se sadržaj polifenolnih jedinjenja povećao od 61,2 mg katehin ekvivalenata (CE)/g (kontrolni kreker) do 91,4 mg CE/g (krekeri sa 2,5% dodate ljuške kikirikija), odnosno za maksimalno 50%. U krekerima koji su obogaćeni ekstraktom tropa cvekle povećanje polifenolnih jedinjenja se kretalo u intervalu od 10,22 do 103,35%, dok je obogaćivanje inkapsuliranim ekstraktom cvekle doprinelo povećanju sadržaja polifenola od 25,63 do 122% (Tabela 17 - 21), pri čemu je najveće povećanje zabeleženo u krekerima pripremljenim od einkorn brašna sa dodatkom inkapsulata, što je značajno veće od rezultata de Camargo i sar. (2014).

Bertagnolli i sar. (2014) su pripremali kreker koristeći različite količine brašna od kore guave (30%, 50% i 70%) i ispitivali sadržaj i sastav polifenola. Njihovi rezultati su pokazali da je brašno imalo visok sadržaj polifenola (827,0 mg GAE/100g), dok se tokom pripreme kreker njihov sadržaj smanjio zbog fizičkih i hemijskih procesa pripreme. Međutim, povećanje količine brašna od kore guave doprinelo je značajnom povećanju polifenolnih jedinjenja (do 49%) pri čemu je kreker sa najmanjim dodatkom brašna (30%) imao 68,7 mg GAE/100g, dok je kreker sa najvišim dodatkom brašna (70%) imao 136,2 mg GAE/100g. Sadržaj polifenola u krekerima obogaćenih ekstraktom (195,70 – 259,24 mg GAE/100 g) i inkapsulatom ekstrakta cvekle (101,32 - 334,10 mg GAE/100 g) je viši nego kod kreker obogaćenih brašnom od kore guave. Takođe, maksimalno povećanje sadržaja polifenola obogaćivanjem je značajno veće (122%).

Rezultati Srivastava i Singh (2016) su pokazali da krekeri obogaćeni sa 15% cveklinog praha sadrže 7,23 mg/100 g betalaina, što je manje od sadržaja betalaina u svim krekerima koji su dobijeni u ovoj disertaciji (Tabela 17-21).

Varastegani i sar. (2015) su zamenom 50% pšeničnog brašna u recepturi kreker sa brašnom od papaje postigli povećanje polifenolnih jedinjenja u krekerima za čak 137 puta, tj. od 0,01 g/100g u kontrolnim krekerima do 1,37 g/100 g u obogaćenim krekerima. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u obogaćenim krekerima je viši 3 do 4 puta nego kod kreker obogaćenih ekstraktom i inkapsulatom tropa cvekle (Tabela 17-21).

U saopštenju Vitali i sar. (2009) funkcionalni krekeri su pripremljeni od pšeničnog brašna, inulina (10,5%) uz dodatak sojinog brašna, amaranta, rogača, vlakna jabuke i ovsenih vlakana. Ispitivanjem sadržaja ukupnih polifenola u testu i krekerima, najviši sadržaj zabeležen je kod testa (1333 mg ekvivalenta ferulne kiseline/100 g) i kreker obogaćenih rogačem (1395 mg

ekvivalenta ferulne kiseline/100 g). Međutim, sadržaj ukupnih polifenola u testu bio je manji od sadržaja polifenola u krekerima. Kontrolni uzorci su imali znatno manji sadržaj polifenolnih jedinjenja, i to do 50%. Nižim sadržajem polifenola u kontrolnim uzorcima se potvrđuje zaštitni efekat inkapsulacije. Sa druge strane, razlog povećanja sadržaja polifenola u krekerima nakon pečenja je povećana rastvorljivost vezanih oblika fenolnih kiselina kao i stvaranje proizvoda Maillard reakcija tokom pečenja, što je u saglasnostima sa rezultatima Žilić i sar. (2016) i sa rezultatima ove disertacije.

Žilić i sar. (2016) su ispitivali efekte pečenja i pripreme testa na sadržaj polifenolnih jedinjenja i flavonoida u krekerima pripremljenih od brašna plavog kukuruza kokičara (*Zea mays L. spp. Everta*), tamno-crvenog kukuruza kokičara (*Z. Mays L. Ssp. Everta*) i standardnog plavog kukuruza (*Z. Mays L.*) dok je kontrolni kreker pripremljen od kukuruznog brašna. Pečenje kontrolnog krekeru je vršeno na 200 °C u trajanju od 7 do 10 minuta, dok su ispitivani krekeri pečeni na 200 °C u trajanju od 10 minuta. Zaključeno je da temperatura i vreme pečenja utiču na smanjenje sadržaja polifenolnih jedinjenja i ukupnih flavonoida što potvrđuju i rezultati dobijeni u ovoj disertaciji (Tabela 17-21). Sadržaj polifenolnih jedinjenja bio je najviši kod testa (od 3976,3 - 7368,2 mg GAE/kg brašna) dok se kod krekeru sadržaj znatno smanjio (od 1809,0 mg GAE/kg - 53,5 mg GAE/kg krekeru). Slično je zaključeno i za sadržaj flavonoida u testu (od 33,4 - 162,7 mg CE/kg brašna) i u krekerima (od 15,2 - 74,0 mg katehin ekvivalenata/kg krekeru). Posmatrajući Tabele 17-21, može se zaključiti da su sadržaji polifenolnih jedinjenja i flavonoida znatno viši od sadržaja pomenutih jedinjenja u istraživanju Žilić i sar. (2016). To je svakako posledica različitih biljaka kao i pripreme uzoraka koji su ispitivani.

Generalno, temperaturni tretmani mogu uticati negativno na sadržaj bioaktivnih jedinjenja. Pored pečenja polifenolna jedinjenja se mogu degradirati i ekstruzijom. Tako su Ivanišova i sar. (2018) pokazali da se sadržaj flavonoida i polifenola u testenini obogaćenoj zelenim ječmom degradirao za 16% do 80% (flavonoidi), odnosno za 12% do 33% (polifenoli) nakon kuvanja, u zavisnosti od stepena obogaćenosti zelenim ječmom.

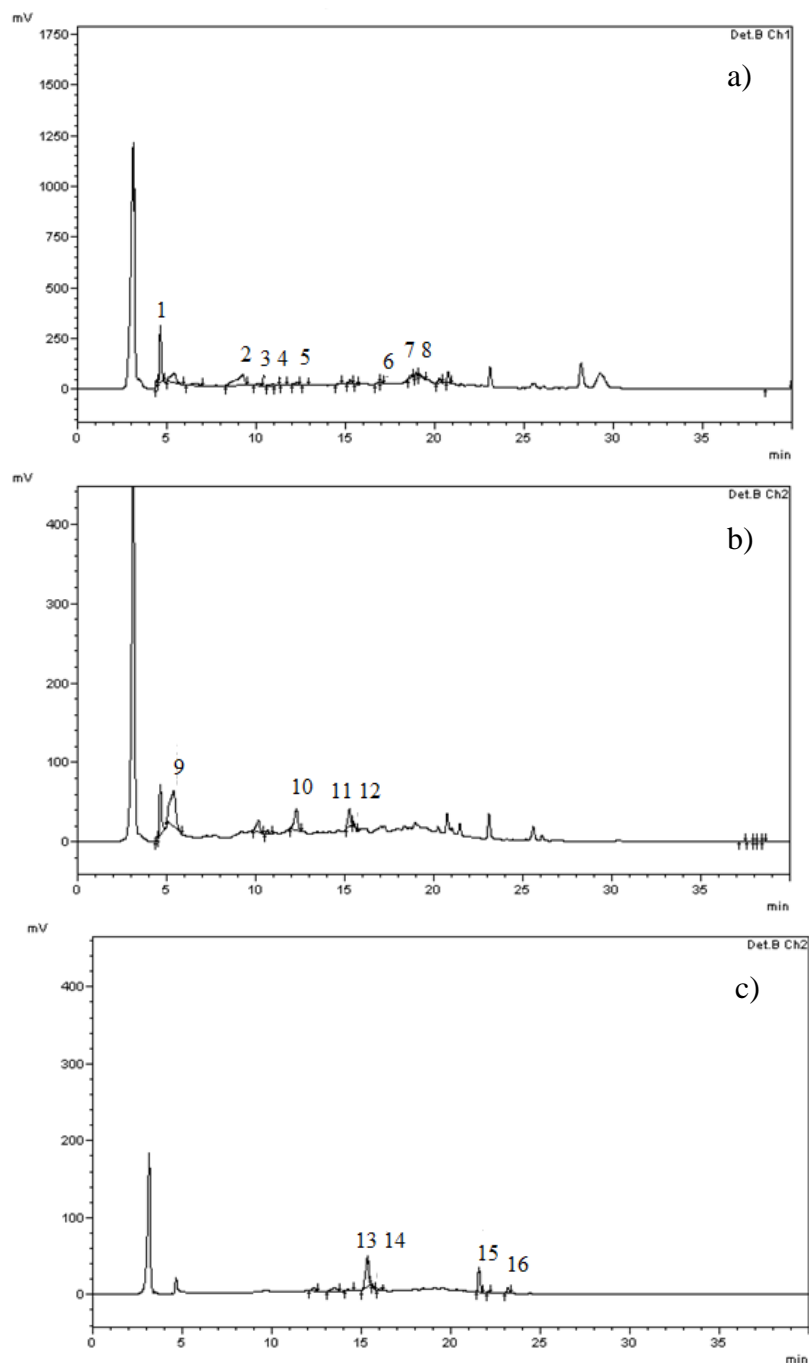


#### 4.4.2. Kvalitativan i kvantitativan sadržaj polifenolnih jedinjenja i betalaina u krekerima

U okviru doktorske disertacije, identifikovano je i kvantifikovano sedamnaest polifenolnih jedinjenja u kontrolnim krekerima (od brašna hlebne pšenice, einkorna, smeše einkorna i amaranta, kinoe i heljdinog brašna) i krekerima, sa dodatkom ekstrakta ili inkapsulata tropa cvekle.

Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja i betalaina u ispitivanim krekerima izvršena je tehnikom tečne hromatografije visoke rezolucije (*engl. High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), a hromatogrami su snimljeni na 280, 320 i 360 nm za polifenole i 538 nm za betalaine.

Na Slici 21 prikazani su hromatogrami krekeri pripremljenog od smeše einkorn i heljdinog brašna sa dodatkom inkapsulata (E+H+I), snimljeni na 280 (a), 320 (b) i 360 nm (c).



**Slika 21.** HPLC hromatogrami E+H+I:

- a) 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – *p*-hidroksibenzoeva kiselina, 7 – siringinska kiselina, 8 – ružmarinska kiselina  
razdvojene komponente detektovane su na 280 nm;
- b) 9 - hlorogenska kiselina, 10 - kumarinska kiselina, 11 – sinapinska kiselina i 12 – ferulna kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm;
- c) 13 – rutin, 14 - miricetin, 15 – luteolin, 16 - apigenin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm.

Identifikovana bioaktivna jedinjenja se mogu svrstati u tri grupe jedinjenja i to: derivate hidroksibenzoeve kiseline (galna, prokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska i siringinska kiselina), derivati cimetine kiseline (ferulna, ruzmarinska, sinapinska, kumarinska, hlorogenska i kafena kiselina) i flavonoide (epikatehin, katehin, miricetin, kvercetin, rutin i apigenin).

Na osnovu dobijenih hromatograma, izvršena je identifikacija i kvantifikacija bioaktivnih jedinjenja u ispitivanim krekerima, a u Tabelama 22 - 26 prikazani su dobijeni rezultati kvalitativnog i kantitativnog sastava polifenolnih jedinjenja.

**Tabela 22.** Kvalitativan i kvantitativan sastav polifenolnih jedinjenja u krekerima pripremljenim od brašna hlebne pšenice (P), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (P+Ex) ili inkapsulata (P+I)

Polifenolna jedinjenja	Krekeri		
	<i>P</i>	<i>P+Ex</i>	<i>P+I</i>
<i>Galna kiselina</i>	1,073±0,051 <sup>A</sup>	0,950±0,032 <sup>A</sup>	7,623±0,362 <sup>B</sup>
<i>p-Hidroksibenzoeva kiselina</i>	2,065±0,009 <sup>A</sup>	0,933±0,038 <sup>B</sup>	1,906±0,082 <sup>C</sup>
<i>Vanilinska kiselina</i>	0,605±0,023 <sup>A</sup>	0,955±0,040 <sup>B</sup>	-
<i>Protokatehinska kiselina</i>	-	0,734±0,029 <sup>A</sup>	7,115±0,322 <sup>B</sup>
<i>Siringinska kiselina</i>	0,408±0,020 <sup>A</sup>	0,753±0,034 <sup>B</sup>	0,621±0,025 <sup>C</sup>
<i>Ruzmarinska kiselina</i>	0,214±0,008 <sup>A</sup>	0,131±0,005 <sup>B</sup>	0,449±0,018 <sup>C</sup>
<i>Hlorogenska kiselina</i>	-	0,110±0,004 <sup>A</sup>	2,062±0,101 <sup>B</sup>
<i>Sinapinska kiselina</i>	0,079±0,003 <sup>A</sup>	-	-
<i>Ferulna kiselina</i>	0,024±0,001 <sup>A</sup>	-	-
<i>Kumarinska kiselina</i>	0,021±0,001 <sup>A</sup>	-	-
<i>Rutin</i>	0,098±0,004 <sup>A</sup>	0,568±0,021 <sup>B</sup>	2,105±0,104 <sup>C</sup>
<i>Apigenin</i>	-	-	0,291±0,012 <sup>A</sup>
<i>Kvercetin</i>	-	-	0,244±0,011 <sup>A</sup>
<i>Miricetin</i>	-	0,097±0,004 <sup>A</sup>	0,053±0,002 <sup>B</sup>
<i>Epikatehin</i>	-	-	-
<i>Katehin</i>	-	-	-
<b>Ukupno</b>	<b>4,587</b>	<b>5,230</b>	<b>22,178</b>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška, izraženi kao mg/100 g krekeri. Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-C) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

**Tabela 23.** Kvalitativan i kvantitativan sastav polifenolnih jedinjenja u krekerima pripremljenim od einkorn brašna (E), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+Ex) i inkapsulata (E+I)

Polifenolna jedinjenja	Krekeri		
	<i>E</i>	<i>E+Ex</i>	<i>E+I</i>
<i>Galna kiselina</i>	1,343±0,062 <sup>A</sup>	2,252±0,110 <sup>B</sup>	7,414±0,345 <sup>C</sup>
<i>p-Hidroksibenzoeva kiselina</i>	1,304±0,062 <sup>A</sup>	5,817±0,267 <sup>B</sup>	0,812±0,035 <sup>C</sup>
<i>Siringinska kiselina</i>	1,690±0,076 <sup>A</sup>	1,768±0,078 <sup>A</sup>	0,523±0,023 <sup>B</sup>
<i>Hlorogenska kiselina</i>	0,139±0,005 <sup>A</sup>	1,052±0,047 <sup>B</sup>	3,330±0,156 <sup>C</sup>
<i>Sinapinska kiselina</i>	0,102±0,004 <sup>A</sup>	0,130±0,005 <sup>B</sup>	0,153±0,006 <sup>C</sup>
<i>Kumarinska kiselina</i>	-	-	0,616±0,026 <sup>A</sup>
<i>Ruzmarinska kiselina</i>	-	-	0,244±0,010 <sup>A</sup>
<i>Protokatehinska kiselina</i>	-	-	-
<i>Vanilinska kiselina</i>	-	-	-
<i>Ferulna kiselina</i>	-	-	-
<i>Epikatehin</i>	6,113±0,301 <sup>A</sup>	11,471±0,562 <sup>B</sup>	18,577±0,923 <sup>C</sup>
<i>Rutin</i>	-	0,150±0,006 <sup>A</sup>	0,705±0,031 <sup>B</sup>
<i>Miricetin</i>	0,091±0,004 <sup>A</sup>	0,043±0,002 <sup>B</sup>	0,058±0,001 <sup>C</sup>
<i>Katehin</i>	-	-	-
<i>Kvercetin</i>	-	-	-
<i>Apigenin</i>	-	-	-
<b>Ukupno</b>	<b>10,781</b>	<b>22,684</b>	<b>32,431</b>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška, izraženi kao mg/100 g krekeri  
Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-C) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

**Tabela 24.** Kvalitativan i kvantitativan sastav polifenolnih jedinjenja u krekerima pripremljenim od smeše einkorn i amarant brašna (E+A), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+A+Ex) ili inkapsulata (E+A+I)

Polifenolna jedinjenja	Krekeri		
	E+A	E+A+Ex	E+A+I
Galna kiselina	4,354±0,201 <sup>A</sup>	3,538±0,156 <sup>B</sup>	11,319±0,562 <sup>C</sup>
Hlorogenska kiselina	0,883±0,040 <sup>A</sup>	1,197±0,0053 <sup>B</sup>	2,398±0,112 <sup>C</sup>
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	0,702±0,024 <sup>A</sup>	2,383±0,111 <sup>B</sup>	0,803±0,032 <sup>A</sup>
Siringinska kiselina	0,387±0,014 <sup>A</sup>	0,759±0,035 <sup>B</sup>	1,012±0,046 <sup>C</sup>
Ruzmarinska kiselina	0,257±0,011 <sup>A</sup>	0,250±0,011 <sup>A</sup>	1,210±0,056 <sup>B</sup>
Vanilinska kiselina	0,337±0,013 <sup>A</sup>	-	0,607±0,023 <sup>B</sup>
Sinapinska kiselina	0,094±0,003 <sup>A</sup>	0,132±0,005 <sup>B</sup>	-
Ferulna kiselina	0,065±0,002 <sup>A</sup>	0,110±0,005 <sup>B</sup>	-
Kumarinska kiselina	-	-	0,361±0,014 <sup>A</sup>
Protokatehinska kiselina	-	-	0
Rutin	0,972±0,042 <sup>A</sup>	0,150±0,006 <sup>B</sup>	0,687±0,032 <sup>C</sup>
Miricetin	-	0,023±0,001 <sup>A</sup>	0,022±0,001 <sup>A</sup>
Epikatehin	-	-	-
Katehin	-	-	-
Kvercetin	-	-	-
Apigenin	-	-	-
<b>Ukupno</b>	<b>8,051</b>	<b>8,543</b>	<b>18,420</b>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška, izraženi kao mg/100 g krekeri. Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-C) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

**Tabela 25.** Kvalitativan i kvantitativan sastav bioaktivnih jedinjenja u krekerima pripremljenim od smeše einkorn i kinoa brašna (E+K), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+K+Ex) ili inkapsulata (E+K+I)

Polifenolna jedinjenja	Krekeri		
	<i>E+K</i>	<i>E+K+Ex</i>	<i>E+K+I</i>
<i>Galna kiselina</i>	8,063±0,401 <sup>A</sup>	8,276±0,411 <sup>A</sup>	14,548±0,722 <sup>B</sup>
<i>Hlorogenska kiselina</i>	3,203±0,154 <sup>A</sup>	2,213±0,106 <sup>A</sup>	10,804±0,523 <sup>B</sup>
<i>p-Hidroksibenzoeva kiselina</i>	0,973±0,034 <sup>A</sup>	1,085±0,051 <sup>B</sup>	0,944±0,041 <sup>C</sup>
<i>Ferulna kiselina</i>	0,333±0,014 <sup>A</sup>	0,331±0,012 <sup>A</sup>	0,761±0,032 <sup>B</sup>
<i>Kumarinska kiselina</i>	0,297±0,012 <sup>A</sup>	0,295±0,013 <sup>A</sup>	0,678±0,031 <sup>B</sup>
<i>Sinapinska kiselina</i>	0,081±0,003 <sup>A</sup>	0,193±0,007 <sup>B</sup>	0,491±0,023 <sup>C</sup>
<i>Ruzmarinska kiselina</i>	-	0,504±0,021 <sup>A</sup>	0,308±0,011 <sup>B</sup>
<i>Vanilinska kiselina</i>	-	-	0,691±0,027 <sup>A</sup>
<i>Protokatehinska kiselina</i>	-	-	-
<i>Siringinska kiselina</i>	-	-	-
<i>Rutin</i>	13,262±0,660 <sup>A</sup>	13,366±0,654 <sup>A</sup>	10,107±0,501 <sup>B</sup>
<i>Miricetin</i>	0,183±0,005 <sup>A</sup>	0,217±0,005 <sup>A</sup>	0,897±0,032 <sup>B</sup>
<i>Apigenin</i>	-	0,152±0,006 <sup>A</sup>	0,153±0,006 <sup>A</sup>
<i>Epikatehin</i>	-	-	-
<i>Katehin</i>	-	-	-
<i>Kvercetin</i>	-	-	-
<b>Ukupno</b>	<b>26,394</b>	<b>26,481</b>	<b>40,230</b>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška, izraženi kao mg/100 g krekeri  
Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-C) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

**Tabela 26.** Kvalitativan i kvantitativan sastav polifenolnih jedinjenja u krekerima pripremljenim od smeše einkorn i heljadinog brašna (E+H), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+H+Ex) ili inkapsulata (E+H+I)

Polifenolna jedinjenja	Krekeri		
	<i>E+H</i>	<i>E+H+Ex</i>	<i>E+H+I</i>
<i>Protokatehinska kiselina</i>	2,731±0,129 <sup>A</sup>	4,215±0,201 <sup>B</sup>	11,568±0,572 <sup>C</sup>
<i>Galna kiselina</i>	2,752±0,131 <sup>A</sup>	3,055±0,145 <sup>A</sup>	9,395±0,460 <sup>B</sup>
<i>Hlorogenska kiselina</i>	1,052±0,050 <sup>A</sup>	0,545±0,021 <sup>B</sup>	4,179±0,203 <sup>C</sup>
<i>Siringinska kiselina</i>	1,057±0,046 <sup>A</sup>	0,136±0,005 <sup>B</sup>	0,942±0,041 <sup>C</sup>
<i>Ferulna kiselina</i>	0,082±0,003 <sup>A</sup>	0,690±0,031 <sup>B</sup>	0,541±0,023 <sup>C</sup>
<i>Kumarinska kiselina</i>	0,073±0,002 <sup>A</sup>	0,615±0,024 <sup>B</sup>	0,482±0,021 <sup>C</sup>
<i>Ruzmarinska kiselina</i>	0,233±0,011 <sup>A</sup>	0,538±0,023 <sup>B</sup>	0,260±0,013 <sup>C</sup>
<i>Vanilinska kiselina</i>	-	0,487±0,022 <sup>A</sup>	1,531±0,069 <sup>B</sup>
<i>p-Hidroksibenzoeva kiselina</i>	-	0,238±0,010 <sup>A</sup>	0,097±0,004 <sup>B</sup>
<i>Sinapinska kiselina</i>	-	0,107±0,004 <sup>A</sup>	0,095±0,003 <sup>B</sup>
<i>Rutin</i>	4,253±0,211 <sup>A</sup>	4,344±0,213 <sup>B</sup>	4,227±0,211 <sup>C</sup>
<i>Katehin</i>	0,968±0,044 <sup>A</sup>	3,030±0,144 <sup>B</sup>	2,917±0,141 <sup>B</sup>
<i>Kvercetin</i>	2,795±0,134 <sup>A</sup>	2,071±0,100 <sup>B</sup>	2,712±0,131 <sup>A</sup>
<i>Epikatehin</i>	0,300±0,014 <sup>A</sup>	0,391±0,013 <sup>B</sup>	0,388±0,016 <sup>B</sup>
<i>Miricetin</i>	0,187±0,007 <sup>A</sup>	0,180±0,007 <sup>A</sup>	0,062±0,003 <sup>B</sup>
<i>Apigenin</i>	0,041±0,002 <sup>A</sup>	0,033±0,001 <sup>A</sup>	0,276±0,012 <sup>B</sup>
<b>Ukupno</b>	<b>16,482</b>	<b>20,642</b>	<b>39,397</b>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standarda greška, izraženi kao mg/100 g krekeri. Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-C) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

Na osnovu rezultata HPLC analiza prikazanih u Tabelama 22-26 može se zaključiti da je galna kiselina najzastupljenije polifenolno jedinjenje, prisutno u svim vrstama ispitivanih krekeri. Najviši sadržaj galne kiseline zabeležen je kod krekeri pripremljenih od smeše einkorn i kiinoa brašna sa dodatkom inkapsulata (E+K+I) i iznosi 14,548 mg/100 g. Pored toga, sadržaj epikatehina je bio najveći od svih identifikovanih polifenolnih jedinjenja, i to kod uzorka E+H+I (18,577 mg/100g), ali on nije identifikovan u svim krekerima od brašna hlebne pšenice i od smeše einkorn i amarant brašna. Hlorogenska kiselina (od 0,110 mg/100 g kod P+Ex krekeri do 10,804 mg/100 g kod E+K+I krekeri), *p*-hidroksibenzoeva kiselina (od 0,097 mg/100 g kod E+H+I krekeri do 5,817 mg/100 g kod E+Ex krekeri) i rutin (od 0,033 mg/100 g kod E+H+Ex krekeri do 13,366 mg/100 g kod E+K+Ex krekeri) su takođe prisutni u većini uzoraka.

Značajne količine epikatehina (355,6 - 426,0 µg/g), katehina (219,2 - 241,7 µg/g) i prokatehinske kiseline (55,96 - 58,14 µg/g) utvrdili su i de Camargo i sar. (2014) u krekerima u koje je dodata kikirikijeva ljuska (1,3; 1,8 i 2,5%).

Abdel-Aal i Rabalski (2013) su ispitivali sadržaj polifenola u hlebu, krekerima i mafinima od celog zrna einkorna. Najzastupljenija je bila sinapinska kiselina, pri čemu je najviši sadržaj zabeležen kod kontrolnog mafina, a najniži sadržaj je kod testa krekerera. Pored toga, identifikovali su i ferulnu, kafenu, vanilinsku i *p*-kumarinsku kiselinu.

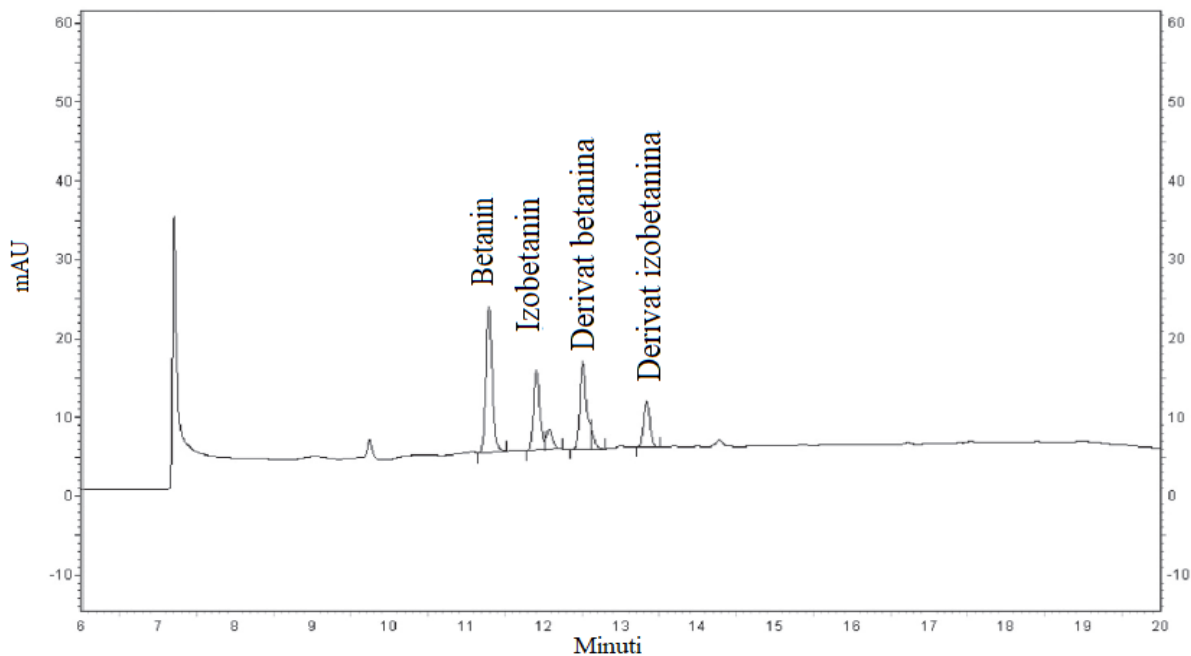
Prirodni polifenoli se najčešće sreću u konjugovanom obliku sa jednim ili više ostataka šećera vezanim za hidrosilne grupe (što ih čini rastvorljivim u vodi) ili direktno za aromatični prsten. Česte su i veze sa drugim jedinjenjima kao što su lipidi, amini, organske kiseline, i veze sa drugim fenolima (Krimer Malešević, 2016).

Hidalgo i sar. (2015) su ispitivali uticaj pripreme i pečenja krekerera, kao i sastav rastvorljivih konjugovanih i nerastvorljivih vezanih polifenolnih kiselina u krekerima pripremljenim od celog zrna einkorn brašna i od brašna hlebne pšenice sa dodatkom brašna prokljalih zrna. Smanjenje sadržaja fenolnih kiselina tokom pripreme i pečenja zabeleženo je kod rastvorljivih konjugovanih *p*-hidroksibenzojeve kiseline (za 23%) i siringaldehida (za 12%) tokom pripreme krekerera (u testu), dok je tokom pečenja krekerera zabeležen porast konjugovanih kiselina kao što su vanilinska i siringinska i siringaldehid, a od vezanih kiselina je identifikovan porast *p*-hidroksibenzojeve, kafene i vanilinske kiseline.

Povećanje sadržaja polifenolnih kiselina tokom pečenja saopštili su i Žilić i sar. (2016) u krekerima pripremljenim od brašna plavog kukuruza kokičara (*Zea mays L. spp. Everta*), tamno-crvenog kukuruza kokičara (*Z. Mays L. Ssp. Everta*) i standardnog plavog kukuruza (*Z. Mays L.*). U poređenju sa brašnom, nakon pečenja krekerera povećao se sadržaj ferulne kiseline (22% - 48%) i *p*-kumarinske kiseline (24% - 55%). Autori su zaključili da je postupak pečenja povećao sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja utičući na rastvorljivost vezanih oblika polifenolnih kiselina. Takođe, tokom pečenja, dolazi do stvaranja proizvoda Maillard reakcije što doprinosi povećanju ukupnih polifenolnih jedinjenja.

Na slici 22 prikazan je hromatogram krekerera pripremljenog od smeše einkorn i heljadinog brašna sa dodatkom inkapsulata (E+H+I), snimljen na 538 nm.





**Slika 22.** HPLC hromatogram E+H+I krejera.

Razdvojene komponente detektovane su na 538 nm

U Tabeli 27 prikazani su rezultati HPLC analize betalaina prisutnih u krekerima obogaćenim ekstraktom tropa cvekle ili inkapsulatom.

**Tabela 27.** Kvalitativan i kvantitativan sastav betalaina u ispitivanim krekerima

Krekeri	Betalaini				Ukupno
	Betanin	Izobetanin	Derivat betanina	Derivat izobetanina	
<i>P+Ex</i>	2,29±0,29 <sup>A</sup>	1,34±0,14 <sup>B</sup>	0,51±0,06 <sup>C</sup>	1,75±0,29 <sup>D</sup>	5,91±0,70
<i>P+I</i>	4,89±0,78 <sup>A</sup>	2,17±0,60 <sup>B</sup>	2,35±0,19 <sup>B</sup>	0,83±0,07 <sup>C</sup>	10,24±1,61
<i>E+Ex</i>	1,92±0,33 <sup>A</sup>	1,32±0,37 <sup>B</sup>	0,35±0,05 <sup>C</sup>	2,05±0,15 <sup>A</sup>	5,68±0,81
<i>E+I</i>	4,08±1,10 <sup>A</sup>	1,99±0,56 <sup>B</sup>	3,19±0,20 <sup>A, B</sup>	0,82±0,13 <sup>B</sup>	10,08±1,94
<i>E+A+Ex</i>	2,04±0,18 <sup>A</sup>	1,43±0,17 <sup>B</sup>	0,45±0,02 <sup>C</sup>	1,38±0,14 <sup>B</sup>	5,33±0,45
<i>E+A+I</i>	3,80±1,17 <sup>A</sup>	2,37±0,23 <sup>B</sup>	3,44±0,27 <sup>A, B</sup>	0,64±0,19 <sup>C</sup>	10,24±1,84
<i>E+K+Ex</i>	1,94±0,11 <sup>A</sup>	1,06±0,16 <sup>B</sup>	0,45±0,03 <sup>C</sup>	1,32±0,43 <sup>B</sup>	4,92±0,61
<i>E+K+I</i>	4,13±0,06 <sup>A</sup>	2,42±0,16 <sup>B</sup>	3,58±0,10 <sup>C</sup>	0,65±0,12 <sup>D</sup>	10,78±0,38
<i>E+H+Ex</i>	2,22±0,18 <sup>A</sup>	1,48±0,18 <sup>B</sup>	0,54±0,08 <sup>C</sup>	1,45±0,26 <sup>B</sup>	5,77±0,56
<i>E+H+I</i>	4,12±0,15 <sup>A</sup>	2,39±0,03 <sup>B</sup>	3,26±0,36 <sup>C</sup>	0,63±0,13 <sup>D</sup>	10,9±0,51

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška, izraženi kao mg/100 g krejera  
Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-D) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

HPLC analizom su u uzorcima krekeru indentifikovani betacijani, dok betaksantini nisu. Od betacijana, indentifikovani su betanin i njegov epimer. Pored toga, HPLC analiza obogaćenih krekeru ukazala je na prisustvo još dva jedinjenja koja imaju spektar betanina, na retencionim vremenima 12,5 i 13,3 minuta (Slika 22). Pretpostavlja se da su ova jedinjenja nastala termičkom degradacijom betanina i izobetanina (Gokahle i Lele, 2012). Mehanizmi degradacije tokom termičke obrade uključuju deglikozilaciju, hidrolizu, dekarboksilaciju i dehidrogenovanje, a njihov intenzitet zavisi od intenziteta termičkog tretmana, pH i aktivnosti vode (Herbach, Stintzing i Carle, 2006). Hidrolizom se stvara betalaminska kiselina svetlo-žute boje i ciklo-DOPA 5-O-glukozid koji je bezbojan, dok dehidrogenovanjem nastaje žuto obojeni neobetanin. Međutim, u ispitivanim krekerima nisu pronađena ova bezbojna ili žuto obojena jedinjenja (maksimumi apsorpcije na 470 i 477 nm) stoga se može pretpostaviti da se odigravaju deglikozilacija, gde se u prisustvu  $\alpha$ -glukozidaze stvaraju ljubičasto obojeni aglikoni betanidin i izobetanidin, ili dekarboksilacija, tokom koje nastaju dekarboksibetacijani. Prisustvo aglikona betanidina i izobetanidina potvrđuju retencionna vremena koja su veća od odgovarajućih glikozida. Paganga i Rice-Evans (1997) saopštili su da glikozidi polifenola imaju kraća retencionna vremena od njihovih aglikona zbog veće polarnosti što omogućava njihovu indentifikaciju. Stoga, pik na 12,5 min tentativno potiče od betanidina, a pik na 13,3 min od izobetanidina. Iz rezultata datih u Tabeli 27 može se videti da je sadržaj indentifikovanih jedinjenja veći kod krekeru obogaćenih inkapsulatom nego kod krekeru obogaćenih ekstraktom tropa cvekle, što dokazuje da inkapsulacija tropa cvekle ima zaštitni uticaj na ova jedinjenja. Takođe, može se zaključiti da je betanin najzastupljeniji u uzorcima krekeru, i to u većoj meri u krekerima obogaćenim inkapsulatom tropa cvekle (37-48%) nego u krekerima obogaćenim ekstraktom (33-39%). Međutim, razlika u sadržaju izobetanina u krekerima obogaćenih ekstraktom tropa cvekle (21-26%) i krekerima obogaćenih inkapsulatom (19-22%) nije tako značajna što ukazuje na slabiju zaštitu ovog jedinjenja postupkom inkapsulacije.

Sadržaj derivata betanina povećan je u uzorcima krekeru obogaćenih inkapsulatom, dok je sadržaj derivata izobetanina smanjen u odnosu na krekeru obogaćene ekstraktom tropa cvekle. Može se pretpostaviti da je različito ponašanje ovih derivata betacijana posledica prisustva proteina iz soje koji su nosači u inkapsulatu i utiču na hemijske reakcije tokom termičke obrade krekeru.

#### 4.4.3. Antioksidativna aktivnost (AA) i redukciona sposobnost (RP) krekeri

Antioksidativna aktivnost ispitivanih krekeri određena je spektrofotometrijskim metodama koje se zasnivaju na neutralizaciji slobodnih DPPH radikala i ABTS katjon radikala u hidrofilnom okruženju, i na sposobnosti jedinjenja prisutnih u uzorku da redukuju  $\text{Fe}^{3+}$  jone. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabelama 28-32.

**Tabela 28.** Antioksidativna aktivnost testa i krekeri pripremljenih od brašna hlebne pšenice (P), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (P+Ex) ili inkapsulata (P+I)

Antioksidativna aktivnost (mmol TE/100 g)	P		P+Ex		P+I	
	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri
$AA_{DPPH\cdot}$	186,28±0,65 <sup>A</sup>	926,93±20,32 <sup>B</sup>	200,17±5,06 <sup>A</sup>	1138,74±0,00 <sup>C</sup>	348,51±15,54 <sup>D</sup>	1307,01±13,51 <sup>E</sup>
$AA_{ABTS^{+\cdot}}$	270,08±0,00 <sup>A</sup>	396,14±12,77 <sup>B</sup>	78,73±0,00 <sup>C</sup>	1004,55±13,61 <sup>D</sup>	375,36±0,00 <sup>B</sup>	1409,34±59,53 <sup>E</sup>
RP	67,55±2,05 <sup>A</sup>	149,90±4,63 <sup>B</sup>	82,37±0,43 <sup>A</sup>	330,52±10,47 <sup>C</sup>	70,45±0,97 <sup>A</sup>	578,85±19,32 <sup>D</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-D) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

**Tabela 29.** Antioksidativna aktivnost testa i krekeri pripremljenih od einkorn brašna (E), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+Ex) ili inkapsulata (E+I)

Antioksidativna aktivnost (mmol TE/100 g)	E		E+Ex		E+I	
	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri
$AA_{DPPH\cdot}$	125,24±0,66 <sup>A</sup>	533,90±0,00 <sup>B</sup>	105,71±5,40 <sup>A</sup>	1236,75±22,59 <sup>C</sup>	376,53±9,02 <sup>D</sup>	1302,98±1,67 <sup>E</sup>
$AA_{ABTS^{+\cdot}}$	121,31±0,00 <sup>A</sup>	423,72±0,69 <sup>B</sup>	204,58±0,00 <sup>C</sup>	1304,76±25,38 <sup>D</sup>	320,43±0,00 <sup>E</sup>	1980,55±31,15 <sup>F</sup>
RP	65,98±2,16 <sup>A</sup>	105,38±4,90 <sup>B</sup>	60,10±2,27 <sup>A</sup>	403,71±5,82 <sup>C</sup>	69,23±3,24 <sup>A</sup>	716,91±24,93 <sup>D</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-F) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

**Tabela 30.** Antioksidativna aktivnost testa i krekeri pripremljenih od smeše einkorn brašna i amaranta (E+A), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+A+Ex) ili inkapsulata (E+A+I)

Antioksidativna aktivnost (mmol TE/100 g)	E+A		E+A+Ex		E+A+I	
	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri
$AA_{DPPH\cdot}$	40,82±1,06 <sup>A</sup>	884,32±11,01 <sup>B</sup>	205,82±3,48 <sup>C</sup>	1108,82±0,00 <sup>D</sup>	187,71±4,46 <sup>C</sup>	1208,00±52,72 <sup>E</sup>
$AA_{ABTS^{+\cdot}}$	18,77±0,00 <sup>A</sup>	819,04±18,46 <sup>B</sup>	355,22±0,00 <sup>C</sup>	1603,17±39,41 <sup>D</sup>	220,18±0,00 <sup>E</sup>	2155,69±26,59 <sup>F</sup>
RP	8,86±0,46 <sup>A</sup>	315,26±17,38 <sup>B</sup>	20,25±0,75 <sup>A</sup>	382,32±17,73 <sup>C</sup>	30,56±0,43 <sup>A</sup>	744,02±32,20 <sup>D</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-F) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

**Tabela 31.** Antioksidativna aktivnost testa i krekeri pripremljenih od smeše einkorn brašna i kinoe (E+K), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+K+Ex) ili inkapsulata (E+K+I)

Antioksidativna aktivnost (mmol TE/100 g)	E+K		E+K+Ex		E+K+I	
	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri
AA <sub>DPPH</sub> •	107,83±5,19 <sup>A</sup>	903,31±31,74 <sup>B</sup>	189,15±0,76 <sup>C</sup>	1177,07±0,00 <sup>D</sup>	306,72±1,99 <sup>E</sup>	1261,46±39,46 <sup>F</sup>
AA <sub>ABTS</sub> ••	46,69±0,0 <sup>A</sup>	1126,10±39,69 <sup>B</sup>	90,64±0,00 <sup>A</sup>	1551,86±34,27 <sup>C</sup>	435,79±0,00 <sup>D</sup>	2283,04±48,69 <sup>E</sup>
RP	10,00±0,25 <sup>A</sup>	400,38±16,28 <sup>B</sup>	23,50±0,70 <sup>A</sup>	587,82±3,14 <sup>C</sup>	25,65±0,38 <sup>A</sup>	795,81±21,98 <sup>D</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-F) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

**Tabela 32.** Antioksidativna aktivnost testa i krekeri pripremljenih od smeše einkorn i heljadinog brašna (E+H), sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+H+Ex) ili inkapsulata (E+H+I)

Antioksidativna aktivnost (mmol TE/100 g)	H		H+Ex		H+I	
	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri	Testo	Krekeri
AA <sub>DPPH</sub> •	700,67±0,50 <sup>A</sup>	981,01±2,13 <sup>B</sup>	727,94±3,23 <sup>C</sup>	976,18±16,88 <sup>B</sup>	721,10±9,59 <sup>A,C</sup>	1143,79±11,41 <sup>D</sup>
AA <sub>ABTS</sub> ••	403,29±0,00 <sup>A</sup>	1820,17±48,46 <sup>B</sup>	429,38±0,00 <sup>A</sup>	2068,33±47,76 <sup>C</sup>	757,59±0,00 <sup>D</sup>	2304,42±45,53 <sup>E</sup>
RP	71,87±1,07 <sup>A</sup>	386,76±15,38 <sup>B</sup>	73,50±1,03 <sup>A</sup>	465,31±8,28 <sup>C</sup>	51,19±0,54 <sup>A</sup>	828,07±23,57 <sup>D</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti 3 ponavljanja ± standardna greška

Rezultati obeleženi sa istim slovom u supskriptu (A-E) u istom redu nisu značajno različiti ( $p \leq 0,05$ )

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je AA<sub>DPPH</sub>• manja kod neobogaćenih krekeri nego u krekerima obogaćenih ekstraktom tropa cvekle ili inkapsulatom, pri čemu je najviša AA<sub>DPPH</sub>• zabeležena kod krekeri pripremljenih od hlebne pšenice sa dodatkom inkapsulata (1307,01 mmol TE/100 g). AA<sub>ABTS</sub>•• je najviša kod krekeri pripremljenih od heljadinog brašna sa dodatkom inkapsulata (2304,42 mmol TE/100 g). AA<sub>ABTS</sub>•• kod neobogaćenih krekeri je za više od tri puta manja nego kod krekeri obogaćenih ekstraktom i inkapsulatom tropa cvekle. Testo pripremljeno od smeše einkorn brašna i kinoe nije pokazalo redukcionu sposobnost, dok je najviša vrednost RP zabeležena kod krekeri pripremljenih od heljadinog brašna sa dodatkom inkapsulata (828,07 mmol TE/100 g), a najniža vrednost RP je zabeležena kod neobogaćenog krekeri pripremljenog od brašna hlebne pšenice (149,9 mmol TE/100 g). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se AA<sub>DPPH</sub>•, AA<sub>ABTS</sub>•• i RP povećava sa dodatkom Ex i I u odnosu na neobogaćene krekeri.

Takođe, evidentno je da je antioksidativna aktivnost krekeri kod svih uzoraka veća u odnosu na testo, što se može objasniti pojavom proizvoda Mailardovih reakcija kao i oslobađanjem vezanih polifenola. U saglasnosti sa pomenutim rezultatima ove disertacije su i istraživanja

Žilić i sar. (2016). Oni su povećanje AA kontrolnih krekeri sa blago alkalnim pH vrednostima delimično objasnili povećanim oslobađanjem vezanih polifenola. Pored toga, zaključili su da Mailardove reakcija koja se brže odvija u alkalnim uslovima, presudno utiče na povećanje antioksidativnog kapaciteta kontrolnog krekeri.

de Camargo i sar. (2014) su zaključili da dodavanje kikirikijeve ljuske u krekerima povećava  $AA_{DPPH}$  do 250% i da toplota ne samo da nema štetnog uticaja već može i da utiče na povećanje  $AA_{DPPH}$ . Njihovi rezultati, takođe pokazuju da se dodavanjem kikirikijeve ljuske vrednost  $AA_{ABTS}$  povećavala od 1119  $\mu\text{mol TE/g}$  do 2579  $\mu\text{mol TE/g}$ . Dodavanjem 2,5% kikirikijeve ljuske u krekeri dovelo je do povećanja vrednosti RP za 136% (od 57,14  $\mu\text{mol TE/g}$  kod kontrolnog krekeri do 134,9  $\mu\text{mol TE/g}$  kod krekeri obogaćenog sa 2,5% kikirikijeve ljuske).

Rezultati Moore i sar. (2009) su pokazali da fermentacija testa nije imala značajan uticaj na antioksidativna svojstva testa pice, dok je pečenje testa značajno uticalo na antioksidativnu aktivnost pice.  $AA_{ABTS}$  se povećavala između 42% i 47% pri povećanju temperature pečenja sa 204 °C na 288 °C. Pri istom povećanju temperature vrednosti  $AA_{DPPH}$  su se takođe povećavale između 50% i 82%. Rezultati iz Tabela 28-32 pokazuju značajno povećanje AA nakon pečenja, i smatra se da je to posledica pojave produkata Mailardovih reakcija i oslobađanja vezanih polifenola tokom termičkog procesa. Leenhardt i sar. (2006) su takođe povećanje AA nakon pečenja pripisali pojavi proizvoda Mailardovih reakcija što je u saglasnosti sa rezultatima ove disertacije.

Mridula i sar. (2015) su ispitivali uticaj koncentracije soka cvekle na antioksidativnu aktivnost paste koja je obogaćena sokom cvekle. Njihovi rezultati su pokazali da sa povećanjem koncentracije soka cvekle, raste i  $AA_{DPPH}$  vrednost obogaćene paste. Varastegani i sar. (2015) su koristili brašno papaje kao zamenu za pšenično brašno, i to 15%, 30% i 50%, a zatim ispitivali  $AA_{DPPH}$  dobijenih krekeri. Njihovi rezultati su pokazali da se  $AA_{DPPH}$  povećavao sa povećanjem količine papajinog brašna. Kod krekeri sa 50% papajinog brašna  $AA_{DPPH}$  je uvećana za oko 30 puta u odnosu na kontrolni kreker. Istraživanja Mridula i sar. (2015) i Varastegani i sar. (2015) su u saglasnosti sa rezultatima u Tabelama 18-32 koji pokazuju povećanje AA usled dodavanja ekstrakta i inkapsulata u dobijenim krekerima.

Rafiq i sar. (2018) su ispitivali uticaj temperature, vlage i brzine obrtanja tokom ekstruzije preželatinizovane testenine na sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida. Najviši sadržaj polifenola

i flavonoida je zabežen kod testenine koja je ekstrudirana na najnižoj temperaturi (60 °C). Autori pretpostavljaju da je do smanjenja sadržaja polifenola došlo zbog osetljivosti i degradacije polifenola na visokim temperaturama.

U literaturi je pronađeno još primera obogaćivanja krekeri sa funkcionalnim dodacima koji su uticali pozitivno na antioksidativnu aktivnost finalnog proizvoda. Tako naprimer, Žilić i sar. (2016) su pripremali kekere sa brašnom crvenog i plavog kukuruza. Molnar i sar. (2015) su u cilju poboljšanja bioaktivnog sastava krekeri dodavali prah crne ribizle i joste u kekere, sa ili bez dodatka čokolade kao nosača. Msaddak i sar. (2015) su ispitivali antioksidativnu aktivnost i redukcionu sposobnost krekeri koji su obogaćeni listom kaktusovog ploda.

#### **4.4.4. Utvrđivanje sadržaja furozina i hidroksimetilfurfurala tokom termičkog tretmana**

Maillard reakcije ili reakcije neenzimskog tamnjenja su hemijske reakcije koje se odigravaju kod temperaturno tretirane i uskladištene hrane. Odigravaju se između aminokiselina i redukovanih šećera i praćene su stvaranjem konstituenata prepoznatljive arome, žutih, crvenih i mrkih pigmenata.

Fizičke i organoleptičke karakteristike krekeri su rezultat hemijskih promena tokom obrade. Furozin je jedinjenje koje se formira hidrolizom Amadori jedinjenja, nastalih kao intermedijernih proizvoda tokom Maillardovih reakcija, i predstavlja indeks oštećenja toplotom u prehrambenim proizvodima. Hidroksimetilfurfural (HMF) se formira degradacijom šećera i Amadori proizvoda. Koristi se u analizi žitarica za bebe, testenine i hleba kao merilo razvitka procesa neenzimskog tamnjenja. Furozin i HMF se koriste za praćenje i optimizaciju uslova prerade hrane, u cilju smanjenja gubitaka aminokiselina (Hidalgo i Brandolini, 2011).

Rezultati merenja sadržaja furozina i hidroksimetilfurfurala u ispitivanim kekerima su prikazani u Tabeli 33.

**Tabela 33.** Sadržaj furozina i HMF u kontrolnim krekerima (P, E, E+A, E+K i E+H) i krekerima sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Ex) i inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle (I)

Uzorak	Furozin (mg/100 g proteina)	HMF (mg/kg)
P	105,64±5,20 <sup>A</sup>	0,00
E	41,86±3,88 <sup>B</sup>	0,00
E+A	211,78±6,75 <sup>C</sup>	3,88±0,27 <sup>A</sup>
E+K	284,95±3,19 <sup>D</sup>	1,64±0,12 <sup>B</sup>
E+H	156,55±1,66 <sup>E</sup>	3,22±0,06 <sup>C</sup>
P+Ex	41,55±1,37 <sup>B</sup>	0,94±0,04 <sup>D</sup>
E+Ex	37,00±0,80 <sup>B</sup>	2,16±0,18 <sup>E</sup>
E+A+Ex	122,38±4,95 <sup>A</sup>	5,55±0,29 <sup>F</sup>
E+K+Ex	189,41±6,33 <sup>C</sup>	2,78±0,08 <sup>G</sup>
E+H+Ex	92,16±0,85 <sup>A</sup>	4,40±0,14 <sup>H</sup>
P+I	86,05±2,43 <sup>A</sup>	2,78±0,10 <sup>G</sup>
E+I	57,76±5,47 <sup>B</sup>	3,54±0,06 <sup>I</sup>
E+A+I	205,24±18,81 <sup>C</sup>	4,69±0,26 <sup>H</sup>
E+K+I	228,54±16,80 <sup>F</sup>	4,27±0,05 <sup>H</sup>
E+H+I	106,09±3,14 <sup>A</sup>	4,32±0,08 <sup>H</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška

Vrednosti koje su obeležene istim slovom (A-I) u istoj koloni ne razlikuju se statistički značajno ( $p \leq 0,05$ ).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je sadržaj furozina bio manji u krekerima sa dodatkom ekstrakta nego u krekerima bez dodataka ili sa dodatkom inkapsulata. Najniža vrednost sadržaja furozina je zabeležena kod krekerima pripremljenih od einkorn brašna sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+Ex) (37 mg/100 g proteina), dok je sadržaj furozina u neobogaćenim krekerima od istog brašna (E) bila skoro tri puta viša (105,64 mg/100 g proteina), što ukazuje na zaštitno dejstvo bioaktivnih jedinjenja iz ekstrakta tropa cvekle tokom pečenja. Najviša vrednost sadržaja furozina zabeležena je kod neobogaćenih krekerima pripremljenih od smeše einkorn i kinoa brašna (E+K) (284,95 mg/100 g proteina). Najviši sadržaj HMF je zabeležen kod krekerima pripremljenih od smeše einkorn i amarant brašna sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+A+Ex) (5,55 mg/kg), dok kod neobogaćenih krekerima pripremljenih od brašna hlebne pšenice (P) i kod krekerima pripremljenih od einkorn brašna nije indentifikovano prisustvo HMF.

Rezultati Hidalgo i Brandolini (2011) su pokazali da se sadržaj furozina povećavao u krekerima tokom pečenja. Sadržaj furozina kod različitih sorti pšenice je bio u intervalu 16,5-81,5 mg/100 g proteina, dok su kod krekerima vrednosti rasle povećanjem vremena pečenja. Njihovi

rezultati su takođe pokazali da vreme pečenja povećava i sadržaj HMF-a koji je varirao između 0,16 i 0,32 mg/kg. Rezultati Hidalgo i Brandolini (2011) su u saglasnosti sa rezultatima ove disertacije za kontrolne krekerne (Tabela 33), čime se dokazuje da postupak inkapsulacije ima zaštitni efekat u sprečavanju pojave pomenutih jedinjenja tokom pečenja.

Rufián-Henares i sar. (2006) su ispitivali sadržaj HMF i furozina u cerealijama za doručak pripremljenih od četiri vrste brašna (kukuruz, pšenica, pirinač i smeša ova tri brašna) sa ili bez dodataka biljnih vlakana, kakao praha i meda. Rezultati dobijeni za HMF su pokazali da su se vrednosti kretale od 6,91 do 240,51 mg/kg, dok je srednji sadržaj HMF bio 36,24 mg/kg. Njihovi rezultati su pokazali da na sadržaj HMF ne utiče vrsta brašna, kao ni dodate sirovine. Sadržaj furozina kretao se u rasponu od 0,051 do 0,603 mg/kg. Na sadržaj furfurala su uticali vrsta brašna i dodataka. Veći sadržaj furozina je zabeležen kod žitarica sa dodatkom biljnih vlakana i meda (0,255 i 0,158 mg/kg), dok je dodatak kakao praha smanjio sadržaj furfurala (0,084 mg/kg). Oni smatraju da je do povećanja sadržaja furozina kod uzorka sa dodatkom biljnih vlakana i meda došlo zbog višeg sadržaja proteina i šećera u obogaćenim uzorcima koji ubrzavaju Mailardove reakcije stvaranja furozina, a usporavaju formiranje HMF, što je u saglasnosti sa rezultatima ove disertacije (Tabela 33).

Capuano i sar. (2009) su ispitivali uticaj temperature (140 °C, 160 °C i 180 °C) i vremena tostiranja (13-25 minuta) hleba (od pšeničnog brašna, raženog brašna i brašna od celog zrna pšenice) na formiranje HMF. Njihova istraživanja su pokazala da je sadržaj HMF najveći kod primene najviše temperature (180 °C) u najdužem vremenskom intervalu (25 minuta) (46,69 mg/kg (tost od raženog brašna); 47,02 mg/kg (tost od pšeničnog brašna) i 17,25 mg/kg (tost od brašna od celog pšeničnog zrna)).

Rufián-Henares i Delgado-Andrade (2009) su ispitali sadržaj HMF i furozina u žitaricama za doručak od kukuruza i u žitaricama od kukuruza koje su obogaćene biljnim vlaknima. Sadržaj HMF se kretao u intervalu od 63 mg/kg (obogaćeni uzorci) do 133 mg/kg (standardni uzorak) što ukazuje na to da prisustvo dijetetskih vlakana ima veliku ulogu tokom proizvodnje na smanjenje sadržaja HMF u žitaricama za doručak. Obogaćeni uzorci su imali viši sadržaj furozina (103 mg/kg) nego standardni uzorci (14 mg/kg). Ovo povećanje količine furozina objašnjava se povećanjem sadržaja proteina i smanjenjem količine redukovanih šećera dodavanjem biljnih vlakana, što ubrzava Maillardove reakcije koje su odgovorne za formiranje furozina, a uspora-



vaju brzinu karamelizacije koja je odgovorna za formiranje HMF, što je u saglasnosti sa rezultatima u Tabeli 33.

#### 4.5. ODREĐIVANJE PARAMETARA BOJE DOBIJENIH KREKERA

Boja je jedna od najvažnijih karakteristika hrane i smatra se indikatorom kvaliteta određene namirnice. Ona je rezultat interakcije između svetlosti, posmatranog objekta, oka i mozga i smatra se psiho-fizičkim fenomenom. Boja prehrambenih proizvoda se može odrediti pomoću CIEL\*a\*b\* sistema, na osnovu  $L^*$  (svetloća),  $a^*$  (udeo crvene/zelene boje) i  $b^*$  (udeo žute/plave boje) parametara. Nakon pečenja određena je površinska boja kreker sa i bez funkcionalnih dodataka tj. ekstrakta i inkapsulata ekstrakta tropa cvekle. U Tabeli 34 su prikazane dobijene vrednosti za parametre  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ .

**Tabela 34.** Površinska boja uzorka kontrolnih kreker (P, E, E+A, E+K i E+H) i kreker sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Ex) i inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle (I)

Uzorak	$L^*$	$a^*$	$b^*$
P	83,00±4,15 <sup>A</sup>	-0,50±0,02 <sup>D</sup>	28,50±1,42 <sup>D</sup>
E	82,00±4,10 <sup>A</sup>	-2,00±0,10 <sup>E</sup>	31,00±1,55 <sup>C</sup>
E+A	71,00±3,55 <sup>A</sup>	5,00±0,25 <sup>E</sup>	30,00±1,50 <sup>D</sup>
E+K	72,00±0,60 <sup>A</sup>	3,00±0,15 <sup>E</sup>	21,00±1,05 <sup>D</sup>
E+H	64,00±3,20 <sup>A</sup>	4,00±0,20 <sup>E</sup>	33,50±1,67 <sup>B</sup>
P+Ex	58,00±2,90 <sup>C</sup>	24,00±1,20 <sup>B</sup>	37,00±1,85 <sup>B</sup>
E+Ex	57,50±2,87 <sup>C</sup>	24,00±1,20 <sup>C</sup>	32,50±1,62 <sup>B</sup>
E+A+Ex	55,00±2,75 <sup>C</sup>	21,5±1,07 <sup>B</sup>	31,00±1,55 <sup>C</sup>
E+K+Ex	56,00±2,80 <sup>C</sup>	22,50±1,12 <sup>B</sup>	32,30±1,61 <sup>B</sup>
E+H+Ex	50,00±2,50 <sup>C</sup>	14,00±0,70 <sup>A</sup>	23,50±1,17 <sup>C</sup>
P+I	49,00±2,45 <sup>D</sup>	32,00±1,60 <sup>A</sup>	27,50±1,37 <sup>B</sup>
E+I	51,00±2,55 <sup>D</sup>	31,00±1,55 <sup>B</sup>	33,50±1,67 <sup>B</sup>
E+A+I	50,00±2,50 <sup>D</sup>	27,50±1,37 <sup>B</sup>	32,00±1,60 <sup>B</sup>
E+K+I	50,00±2,50 <sup>D</sup>	28,50±1,42 <sup>B</sup>	33,00±1,65 <sup>B</sup>
E+H+I	48,00±2,40 <sup>C</sup>	21,60±1,08 <sup>A</sup>	28,50±1,42 <sup>A</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja ± standardna greška  
Vrednosti koje su obeležene istim slovom (A-E) u istoj koloni ne razlikuju se statistički značajno ( $p \leq 0,05$ ).

Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da su kontrolni krekeri pokazali najveće  $L^*$  vrednosti, odnosno svetloću, a najniže  $a^*$  vrednosti, pri čemu je najveća  $L^*$  vrednost bila kod krekeru od pšeničnog brašna (83,00) a najniža kod krekeru od smeše einkorn i heljdinog brašna (64,00), jer je heljdino brašno tamnije u odnosu na pšenično. Takođe, ovaj rezultat je u skladu sa visokim sadržajem HMF (Tabela 33), koji je indikator Maillardovih reakcija u toku kojih se formiraju smeđi i mrki pigmenti. Suprotno od toga,  $a^*$  je bila najniža kod krekeru od pšeničnog brašna (-0,50), a najviša kod krekeru od smeše einkorn i heljdinog brašna (4,00). Najniža  $b^*$  vrednost je zabeležena kod krekeru od smeše einkorn i kinoa brašna (21,00). Dodatkom ekstrakta tropa i inkapsulata u krekeru, dolazi do povećanja crvene komponente ( $a^*$ ) i smanjenja svetloće ( $L^*$ ). Kao i kod kontrolnih krekeru, i kod obogaćenih krekeru su najviše vrednosti za  $L^*$  zabeležene kod krekeru od pšeničnog brašna sa ekstraktom tropa cvekle (58,00) i od einkorn brašna sa inkapsulatom tropa cvekle (51,00), dok su najniže vrednosti zabeležene kod krekeru od smeše einkorn i heljdinog brašna sa dodatkom ekstrakta (50,00) i inkapsulata ekstrakta tropa cvekle (48,00).

Petrović i sar. (2016) su određivali boju krekeru dobijenog od pšeničnog brašna sa bioaktivnim jedinjenjima ekstrahovanim iz tropa višnje koji su inkapsulirani na sojinom proteinu (SP) i proteinu surutke (WP). Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da dodatkom SP i WP, sa povećanjem količine inkapsulata u krekeru, zbog visokog sadržaja šećera i proteina u njima, dolazi do Maillard reakcija što doprinosi smanjenju svetloće ( $L^*$ ) i povećanju  $a^*$  vrednosti. Ovi zaključci su u saglasnosti sa unetim sadržajem crvenih pigmenta iz tropa višnje (antocijana) sa inkapsulatom, ali i Maillard reakcijama koje se odigravaju tokom pečenja, imajući u vidu da je WP imao niži sadržaj proteina (11%) od SP (90%). Boja pigmenta u finalnom proizvodu, naročito antocijana, zavisi i od pH matriksa. Tako je u saopštenju Tumbas Šaponjac i sar. (2016) kreker sa dodatkom surutke bio svetlo crvene boje zbog kiselosti ovih proteina, dok su keksi sa sojinim proteinom ljubičasto-plavi zbog baznog karaktera ovog nosača.

Istraživanja Park i sar. (2015) su se bazirala na formulisanju krekeru sa svežom okarom (O) i okarom sa dodatkom skroba (OS), sojinog brašna (OB) i hidropsipropilmetilceluloze (OH) kao aditiva. Njihovi rezultati su pokazali da su krekeri sa sojinim brašnom bili najtamniji ( $L^* = 77,8$ ) i sa najviše crvenih tonova ( $a^* = 33$ ). Ipak, vrednosti  $b^*$  parametra su bile najviše kod uzoraka O (30,7). Autori smatraju da je promena boje kod krekeru sa sojinim brašnom posledica neenzimskog tamnjenja tj. Maillard reakcija.

Jung i sar. (2015) su ispitivali karakteristike krepera i mafina kod kojih je 15% i 20% brašna zamenjeno brašnom tropa jabuke. Dobijeni proizvodi su imali znatno tamniju boju, tj. nižu  $L^*$  vrednost u odnosu na kontrolne proizvode, pri čemu se  $L^*$  vrednost smanjivala sa povećanjem sadržaja tropa. Vrednosti  $a^*$  i  $b^*$  parametara su bili najveći kod krepera sa 20% tropa (14,3 i 29,1) a najniža kod kontrolnog krepera (0,9 i 27,7). Kod uzoraka mafina rezultati su bili slični - sa povećanjem tropa, smanjivale su se  $L^*$  i  $b^*$  vrednosti, dok se vrednost parametra  $a^*$  povećavala.

Ispitivanja Varastegani i sar. (2015) u kojima je u formulaciji nutritivno obogaćenih krepera pšenično brašno zamenjeno brašnom papaje (15%, 30% i 50%) su takođe pokazali da se vrednost svetloće smanjuje sa povećanjem sadržaja papajinog brašna (od 66,00 kod kontrolnih krepera do 48,25 kod 50% supstitucije). Smatra se da je razlog toga povećanje prisustva vlakana u krekerima. Takođe, dodatak papajinog brašna uticao je na povećanje  $a^*$  vrednosti, ali ne značajno.

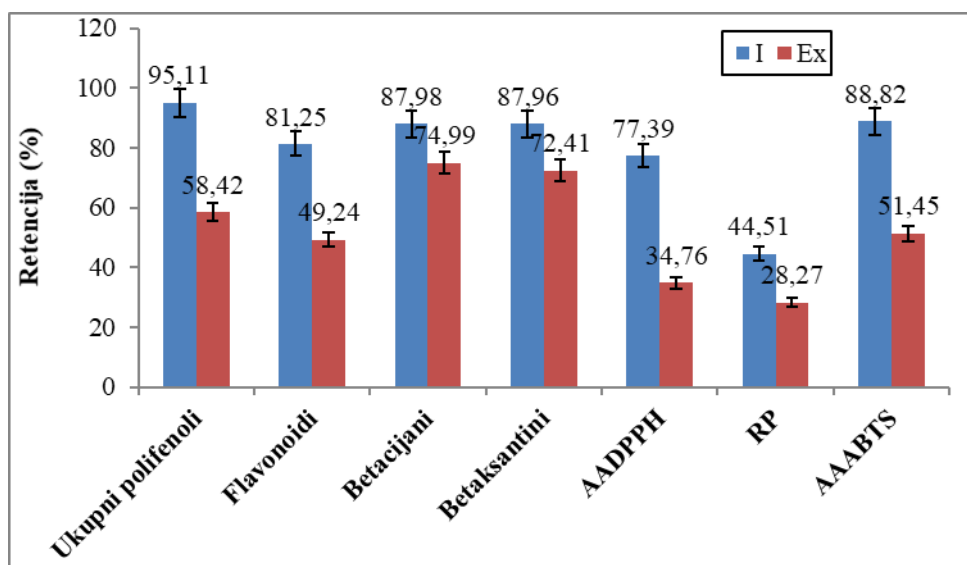
Smanjenje svetloće krepera od pšeničnog brašna ( $L^* = 68,783$ ) sa dodatkom različitih koncentracija praha cvekle ( $L^* = 56,770 - 51,54$ ) saopštili su i Ingle i sar. (2017). Razlog ovog smanjenja je gubitak bele boje brašna dodavanjem cveklinog praha. Vrednost  $a^*$  se povećavala sa dodatkom cveklinog praha (od 5,698 do 7,747), u odnosu na vrednost kontrolnog krepera (4,677). Vrednosti  $b^*$  parametra su se smanjivale dodavanjem praha cvekle, i to od 22,853 do 10,131.

#### **4.6. ODRŽIVOST FUNKCIONALNIH KARAKTERISTIKA KREKERA TOKOM SKLADIŠTENJA**

Ekstrakt i inkapsulat tropa cvekle, kao i ispitivani uzorci krepera su skladišteni na sobnoj temperaturi (25 °C) u trajanju od šest meseci. Tokom skladištenja ispitivana je stabilnost polifenola, flavonoida, betalaina, AA i redukciona sposobnost ekstrakta, inkapsulata tropa cvekle i ispitivanih krepera.

#### 4.6.1. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja, antioksidativna aktivnost i redukciona sposobnost ekstrakta i inkapsulata tropa cvekle tokom skladištenja

Poređenjem sadržaja polifenola, flavonoida, betacijana i betaksantina, antioksidativne aktivnosti i redukcionne sposobnosti ekstrakta i inkapsulata tropa cvekle pre i posle 6 meseci skladištenja na sobnoj temperaturi određena je retencija ovih funkcionalnih parametara, a rezultati su prikazani na Slici 23.



**Slika 23.** Retencija bioaktivnih jedinjenja, antioksidativne aktivnosti i redukcionne sposobnosti tokom skladištenja u ekstraktu i inkapsulatu tropa cvekle

Dobijeni rezultati su pokazali da je nakon skladištenja retencija bioaktivnih jedinjenja veća kod inkapsulata tropa cvekle nego kod ekstrakta tropa cvekle.

Najveću retenciju, odnosno stabilnost, pokazala su polifenolna jedinjenja koja su inkapsulirana (95,11%), dok je najveća degradacija, odnosno najmanja retencija, zabeležena za flavonoide u ekstraktu tropa cvekle (49,24%). Retencija betacijana i betaksantina u ekstraktu tropa cvekle bila je bez statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ). Isti zaključak se može izvesti i za retenciju ovih jedinjenja u inkapsulatu tropa cvekle. Retencija svih bioaktivnih jedinjenja je bila značajno veća ( $p \leq 0,05$ ) u inkapsulatu nego u ekstraktu, što potvrđuje zaštitni efekat procesa inkapsulacije.

Tokom skladištenja došlo je i do smanjenja antioksidativne aktivnosti na obe slobodnora-dikalnske vrste (DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>•+</sup>) i redukcionne sposobnosti, i to značajnije ( $p \leq 0,05$ ) u ekstraktu

tropa cvekle nego u inkapsulatu. Redukciona sposobnost je imala najmanju retenciju, i to u ekstraktu tropa cvekle (28,27%), dok je sposobnost eliminisanja slobodnih ABTS<sup>+</sup> radikala najznačajnije očuvana aktivnost, sa retencijom u inkapsulatu od 88,82% nakon 6 meseci skladištenja. Ove činjenice dokazuju pozitivno delovanje inkapsulacije na očuvanje biološke aktivnosti.

Na stabilnost bioaktivnih jedinjenja značajan uticaj imaju temperatura, vreme skladištenja, kao i matriks. Istraživanja Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk (2011) su pokazala da je ukupan sadržaj polifenola u zamrznutim uzorcima crne ribizle pri skladištenju u toku 9 meseci na -20°C umanjen za oko 7%, dok se sadržaj flavonoida nije značajno smanjio. Takođe, utvrđeno je da je sadržaj polifenola u mikrokapsulama sa maltodekstrinom i inulinom smanjen za 2 - 5% u periodu od 12 meseci na 8 °C, dok je pri skladištenju na temperaturi od 25 °C gubitak ukupnih polifenola bio 8 - 11%. Njihova istraživanja su pokazala da je inulin stvorio stabilnije mikrokapsule od maltodekstrina.

Saénz i sar. (2009) su ispitivali stabilnost polifenola i betalaina iz pulpe i etanolnog ekstrakta opuncije (indijske smokve) inkapsuliranih na maltodekstrinu i na inulinu. Tokom skladištenja (44 dana) na 60 °C došlo je do degradacije betacijana (37% do 46%) dok se sadržaj polifenola u inkapsulatima povećavao (33% do 58%) tokom skladištenja. Zaključeno je da nosači koji su korišćeni imaju veći afinitet prema polifenolima. U saglasnosti sa ovim zaključkom su i rezultati prikazani na Slici 23, gde su najveći afinitet ka polifenolima pokazali i proteini soje, zbog veće retencije ovih jedinjenja nakon 6 meseci skladištenja.

Međutim, u suprotnosti sa rezultatima retencije betalaina i polifenola u ekstraktu tropa cvekle prikazanim na Slici 23, Kujala i sar. (2000) su saopštili da se sadržaj betanina i izobetanina značajno smanjio u liofiliziranoj kori cvekle, dok sadržaj ukupnih polifenola nije značajno promenjen.

Pored temperature i trajanja skladištenja, na održivost bioaktivnih jedinjenja veoma važan uticaj ima i vlaga. Pitalua i sar. (2010) su ispitivali održivost betalaina iz soka cvekle inkapsuliranim na guma arabiki kao nosaču pri različitim  $a_w$  vrednostima. Inkapsulati su skladišteni na 30 °C tokom 44 dana. Nakon dva dana pri  $a_w$  vrednostima od 0,110, 0,326 i 0,521 koncentracija betalaina se smanjivala za 20%, 13% i 16%, redom. Viša degradacija betalaina (65% i 75%) je utvrđena pri skladištenju inkapsulata sa  $a_w$  od 0,748 i 0,898 nakon 20 dana skladištenja.

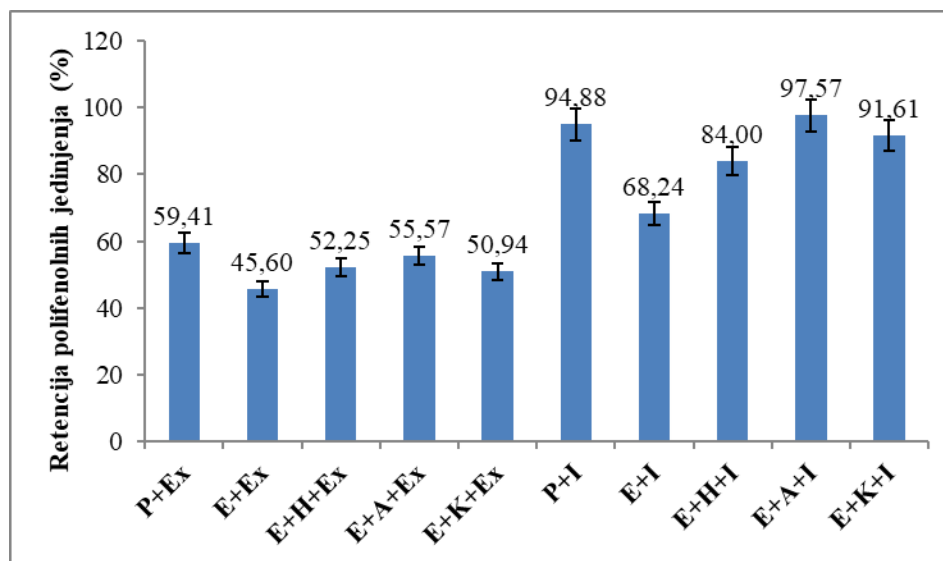
Gokhale i Lele (2012) su skladištili ekstrakt cvekle na 27 °C tokom pet meseci. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je za pet meseci došlo do degradacije betacijana 50% i beta-

ksantina 60%, dok je sadržaj polifenola bio blago povećan. Autori pretpostavljaju da se razlaganjem betalaina stvaraju jedinjenja polifenolne strukture, koji su izazvali povećanje sadržaja ukupnih polifenola nakon skladištenja. Takođe, pokazali su da se  $AA_{DPPH}$  cveklinog praha na 50 °C smanjila, ali se sa povećanjem temperature povećavala. Oni smatraju da je razlog degradacija betacijana na temperaturi 50 °C, a da pri višim temperaturama dolazi do degradacije betacijana i formiranja novih jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću.

Rezultati Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk (2011) su pokazali da nakon 12 meseci skladištenja uzoraka crne ribizle na 8 °C nije došlo do promene AA, dok je na 25 °C AA polako opadala. Rezultati Tonon i sar. (2010) su takođe pokazala da se  $AA_{DPPH}$  u inkapsulatu soka acai bobice smanjivala u prvih 40 do 60 dana skladištenja.

#### 4.6.2. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja, antioksidativna aktivnost i redukciona sposobnost krekeri

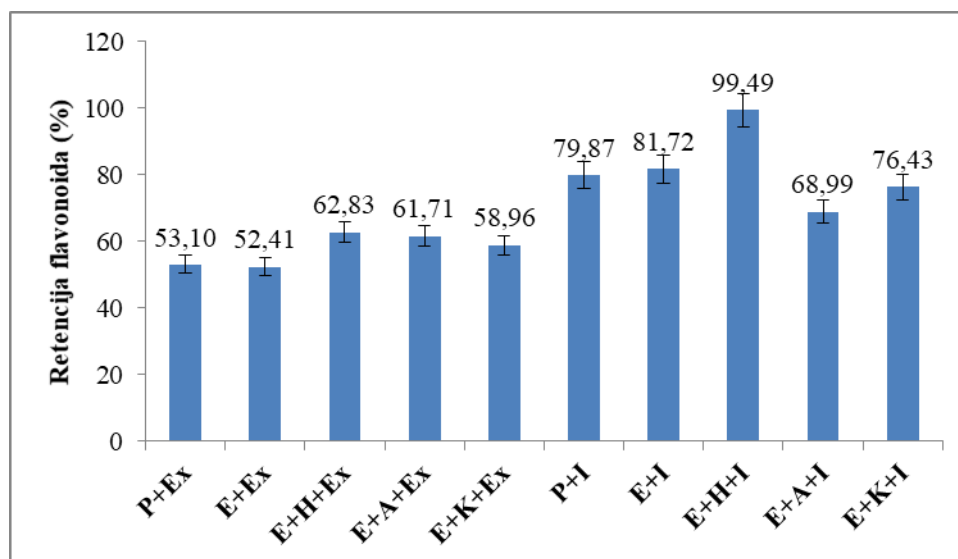
Retencija, odnosno stepen zadržavanja, polifenolnih jedinjenja u krekerima nakon 6 meseci prikazana je na Slici 24.



**Slika 24.** Retencija polifenolnih jedinjenja u krekerima sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Ex) i inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle (I) nakon skladištenja

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je retencija polifenola bila niža kod krekeri sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle nego kod krekeri koji su obogaćeni sa inkapsulatom. Najniža retencija polifenola je bila kod krekeri pripremljenog od einkorn brašna (E+Ex), dok se kod krekeri pripremljenog od smeše einkorn i amarant brašna sa dodatkom inkapsulata (E+A+I) zadržalo najviše polifenola.

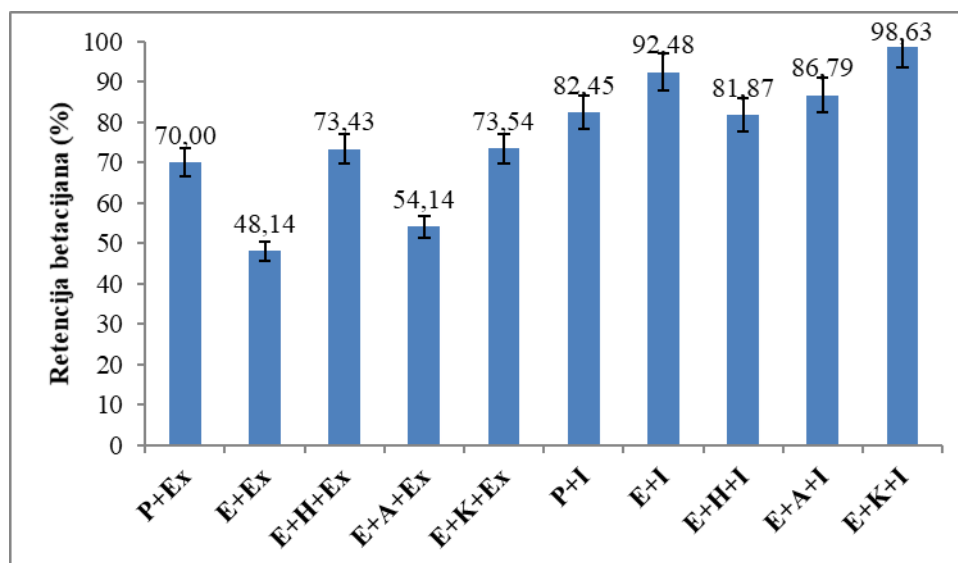
Rezultati retencije flavonoida u krekerima tokom skladištenja prikazani su na Slici 25.



**Slika 25.** Retencija flavonoida u krekerima sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Ex) i inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle (I) nakon skladištenja

U skladu sa rezultatima retencije polifenola, i flavonoidi su se degradirali u manjoj meri kod krekeri koji su obogaćeni inkapsulatom tropa cvekle (retencija u opsegu 68,99 – 99,49%) nego kod krekeri koji su obogaćeni ekstraktom tropa cvekle (retencija u opsegu 52,41 – 62,83%) čime je potvrđena efikasnost inkapsulacije kao metode za zaštitu bioaktivnih jedinjenja od spoljašnjih uticaja. Najviša retencija flavonoida, gde je zadržavanje flavonoida bilo >99%, bila je kod krekeri dobijenog od smeše einkorn i heljadinog brašna sa dodatkom inkapsulata tropa cvekle (E+H+I). Najniža retencija, gde se oko polovine flavonoida degradiralo, zabeležena je kod krekeri dobijenog od einkorn brašna sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+Ex).

Otpornost betacijana u krekerima na degradaciju tokom skladištenja prikazana je kao retencija i rezultati su prikazani na Slici 26.

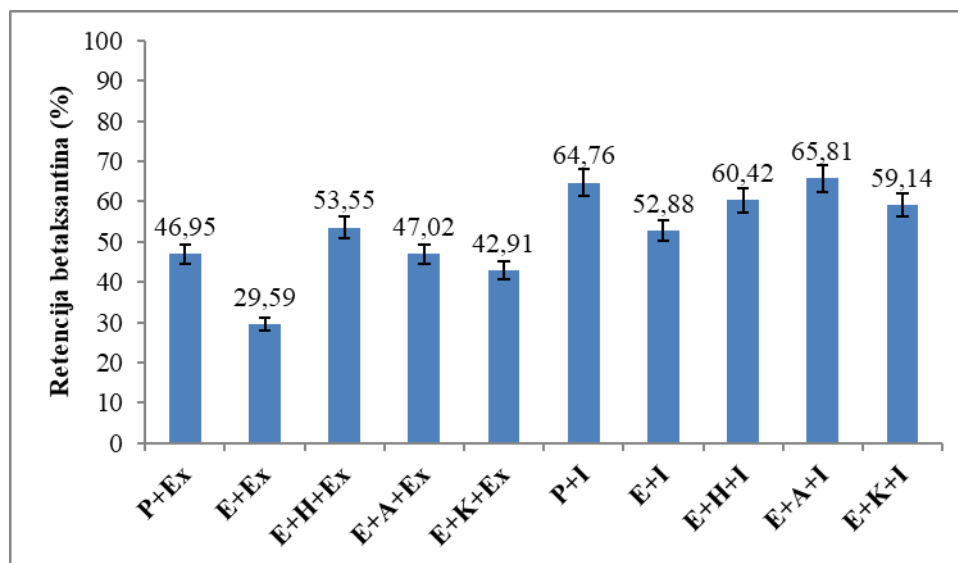


**Slika 26.** Retencija betacijana u krekerima sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Ex) i inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle (I) nakon skladištenja

Na osnovu retencija prikazanih na Slici 26 može se zaključiti da su inkapsulirani betacijani u krekerima koji su skladišteni tokom 6 meseci bili bolje zaštićeni od degradacije. Retencija betacijana u uzorcima krekerima koji su obogaćeni ekstraktom tropa cvekle kretala se u opsegu 48,14 – 73,54%, dok su uzorci obogaćeni inkapsulatom imali retencije betacijana u opsegu 81,87 – 98,63%. Najefikasnija zaštita betacijana zabeležena je kod krekerima sa dodatkom inkapsulata pripremljenih od einkron brašna i njegove smeše sa kinoa brašnom (retencija >90%). Više od polovine betacijana (51,86%) degradiralo se u uzorcima krekerima sa einkorn brašnom i ekstraktom tropa cvekle.

Rezultati retencije betaksantina u krekerima tokom skladištenja prikazani su na Slici 27.



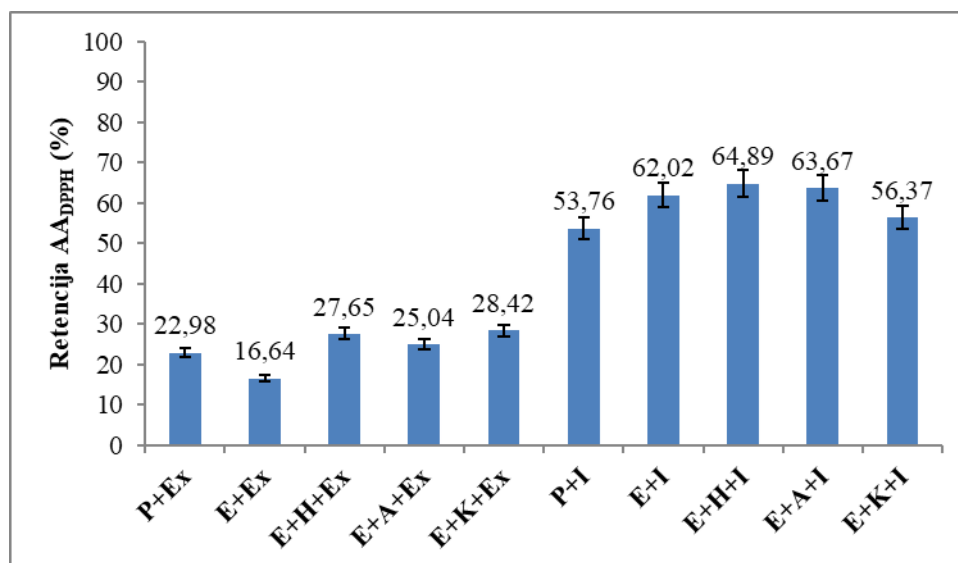


**Slika 27.** Retencija betaksantina u krekerima sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Ex) i inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle (I) nakon skladištenja

Posmatrajući dobijene rezultate, tokom skladištenja je došlo do značajnog pada u sadržaju betaksantina nakon 6 meseci skladištenja kod krekeri obogaćenih i ekstraktom i inkapsulatom tropa cvekle. Retencije betaksantina su se kretale u opsegu 29,59 – 53,55% kod krekeri obogaćenih ekstraktom tropa cvekle, a u krekerima obogaćenim inkapsulatom retencije su bile u opsegu 52,88 – 65,81%.

Generalno, retencije betacijana nakon skladištenja (Slika 26) bile su veće od retencija nakon pečenja (Tabele 17-21), dok su se betaksantini više degradirali nakon skladištenja (Slika 27) nego nakon pečenja (Tabele 17-21). Ovo ukazuje na bolju stabilnost betaksantina od betacijana tokom termičkog tretmana, dok je tokom skladištenja stabilnost betacijana veća od betaksantina.

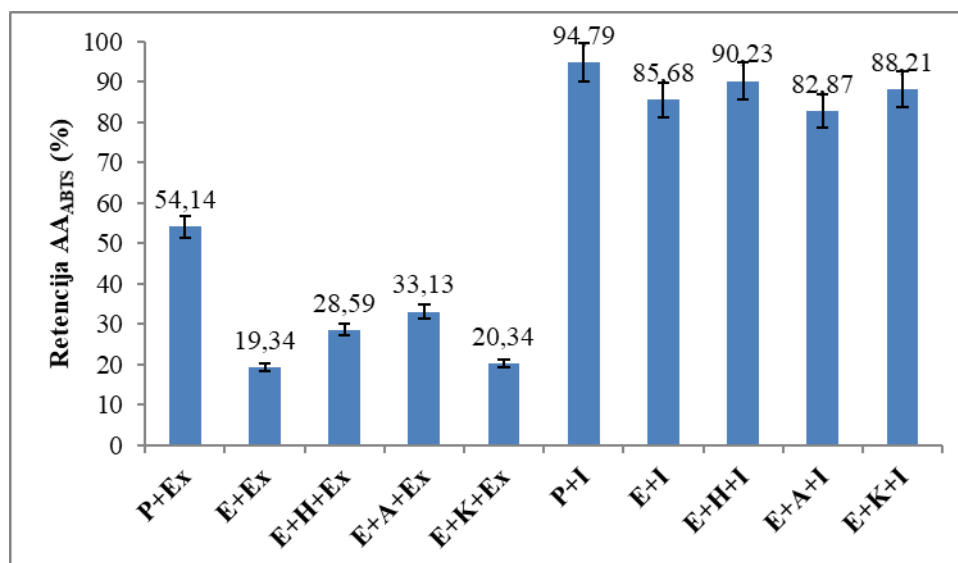
Očuvanje antioksidativne aktivnosti na DPPH• ( $AA_{DPPH\cdot}$ ) nakon skladištenja krekeri prikazano je kao retencija, a rezultati prikazani na Slici 28.



**Slika 28.** Retencija AA<sub>DPPH</sub>• krekerâ dobijenih sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Ex) i inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle (I) nakon skladištenja

Antioksidativna aktivnost na DPPH• u krekerima značajno je opala nakon 6 meseci skladištenja, naročito u krekerima obogaćenim ekstraktom tropa cvekle, gde retencija ove funkcionalne karakteristike nije prešla 30% (16,64 – 28,42%). U krekerima obogaćenim inkapsulatom se AA<sub>DPPH</sub>• očuvala nešto iznad 50% (53,76 – 64,89%). Najveća retencija je zabeležena kod krekerâ sa smešom einkorn i heljadinog brašna i inkapsulatom (E+H+I), što je u skladu sa najvećim sadržajem ukupnih polifenola (Tabela 21), AA<sub>ABTS</sub>•+ i RP (Tabela 32), ali i visokim sadržajem ukupnih polifenola, protokatehinske i galne kiseline određenih HPLC analizom ovog uzorka (Tabela 26). Pored toga, prisustvo protokatehinske kiseline je utvrđeno samo u uzorcima koji sadrže heljdino brašno. Protokatehinska kiselina je *o*-difenol sa katehol strukturom. Utvrđeno je da ovaj tip jedinjenja pokazuje visoku antioksidativnu aktivnost jer se lako konvertuju prvo u *o*-hinone i dalje u kompleksnije stabilne produkte. Saopšteno je da protokatehinska kiselina balansira endogeni antioksidativni sistem u ćelijskim linijama feohromocitoma PC12 (benigni tumor koji potiče od hromafilnih ćelija simpatičkog nervnog sistema) kao i u slezini i jetri pacova (Kadivec i sar., 2013). Takođe, protokatehinska kiselina je, pored kvercetina, najstabilnije polifenolno jedinjenje (D'Archivio i sar., 2014).

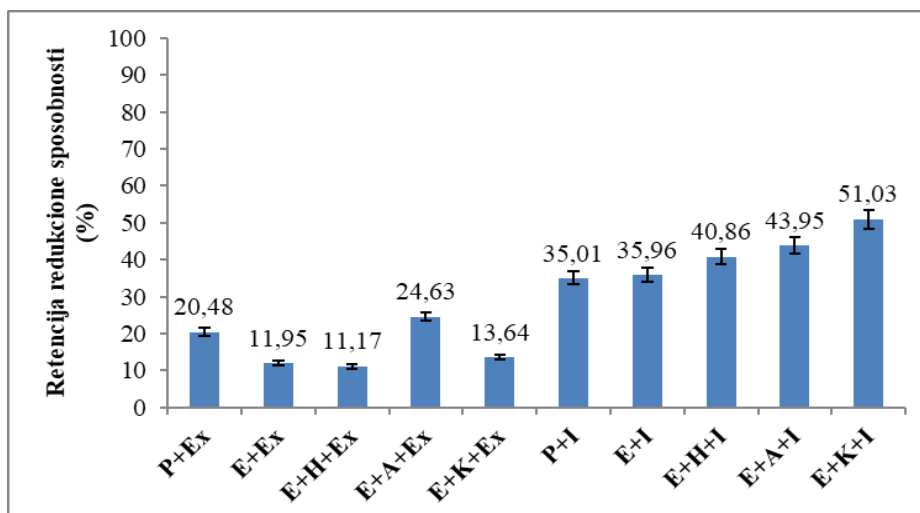
Tokom skladištenja od 6 meseci praćen je i pad antioksidativne aktivnosti na ABTS•+ (AA<sub>ABTS</sub>•+), gde je pad aktivnosti izražen kao retencija (Slika 29).



**Slika 29.** Retencija AA<sub>ABTS</sub><sup>+</sup> krekeri sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Ex) i inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle (I) nakon skladištenja

Imajući u vidu da su krekeri obogaćeni sa ekstraktom tropa cvekle imali daleko značajniji pad AA<sub>ABTS</sub><sup>+</sup> nakon 6 meseci skladištenja (retencija u opsegu 19,34 – 54,14%) od pada aktivnosti krekeri obogaćenih inkapsulatom (retencija u opsegu 82,87 – 94,97%) može se zaključiti da je postupak inkapsulacije veoma efikasan za zaštitu ove funkcionalne karakteristike. Najniža retencija AA<sub>ABTS</sub><sup>+</sup> (19,34%) krekeri od einkorn brašna sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+Ex) u skladu je sa najnižim retencijama polifenola, flavonoida, betacijana, betaksantina, kao i AA<sub>DPPH</sub> u ovom uzorku.

Redukciona sposobnost (RP) nakon skladištenja krekeri prikazana je kao retencija, a rezultati prikazani na Slici 30.



**Slika 30.** Retencija RP krekeri sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Ex) i inkapsuliranog ekstrakta tropa cvekle (I) nakon skladištenja

Skladištenje je najznačajnije uticalo na pad redukcione sposobnosti krekeri. Krekeri obogaćeni ekstraktom tropa cvekle zadržali su 11,17 – 24,63% inicijalne redukcione sposobnosti, dok je kod krekeri sa dodatkom inkapsulata očuvano 35,01 – 51,03% ove funkcionalne osobine krekeri. Ovo je u skladu sa nižim sadržajem svih bioaktivnih jedinjenja u krekerima sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Tabela 17-27).

Tumbas Šaponjac i sar. (2016) su pratili sadržaj polifenola i AA u biskvitima bez i sa dodatkom 10 ili 15% inkapsulata ekstrakta tropa višnje inkapsuliranog na surutki (WE10 i WE15) i proteinu soje (SE10 i SE15) nakon četiri meseca skladištenja. U kontrolnim krekerima stepen degradacije polifenola bio je 66,67%, dok je kod krekeri obogaćenih inkapsulatom povećanje sadržaja polifenola bilo u opsegu 1,16-42,00%. Sa druge strane, vrednost AA u kontrolnim krekerima smanjila se za 77,69%, dok je gubitak AA tokom četiri meseca skladištenja obogaćenih krekeri bio u opsegu 9,31-24,30%. Niža degradacija polifenola i AA obogaćenih krekeri u odnosu na kontrolne krekeri (istraživanja Tumbas Šaponjac i sar., 2016)) tokom skladištenja su u saglasnosti sa rezultatima prikazanim na Slici 24, 28, i 29, čime se potvrđuje efikasnost inkapsulacije kao metode za zaštitu bioaktivnih jedinjenja od spoljašnjih uticaja.

U saglasnosti sa rezultatima ovog rada su istraživanja Robert i sar. (2010). Autori su saopštili da se retencija polifenola tokom skladištenja (35 dana) povećavala kod nara inkapsuliranog na izolatu sojinog proteina. Oni smatraju da je do povećanja došlo usled hidrolize konjugovanih polifenola prisutnih u naru, a zatim je došlo do njihove degradacije (između 35. i 56. dana skladištenja).

Povećanje sadržaja polifenola i  $AA_{DPPH}$  u biskvitima obogaćenih medom (5, 10 i 15%) nakon skladištenja zabeležili su i Neeta i sar. (2014). Tokom skladištenja od 30 dana, kod kreker sa 10 mg dodatog meda došlo je do povećanja polifenola za 19% u odnosu na kontrolni kreker, dok se sadržaj polifenola kod kreker sa 5 mg i 15 mg dodatog meda nije znatno povećao (7% i 9%).  $AA$  obogaćenih kreker određena je FRAP (*engl. Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodom. Rezultati su pokazali sličan trend povećanja  $AA$  kao što je bio slučaj kod polifenola, najviše povećanje  $AA$  je kod kreker sa 15% dodatog meda (116%).

Gokhale i Lele (2012) su pokazali da se sadržaj betacijana u cvekli smanjio za 50% tokom pet meseci skladištenja, a sadržaj betaksantina za 60% dok su se sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost postepeno povećavale tokom skladištenja kao posledica razlaganja betalaina do polifenolnih jedinjenja koja imaju takođe antioksidativno delovanje. Bolja stabilnost betacijana tokom skladištenja u odnosu na stabilnost betaksantina je prikazana na Slikama 26 i 27, što je u saglasnosti sa rezultatima Gokhale i Lele (2012).

Rezultati Msaddak i sar. (2015) su ispitivali održivost antioksidativne aktivnosti u krekerima od pšeničnog brašna sa i bez dodatka 7,5% lista opuncije. Gubitak  $AA_{DPPH}$  i FRAP kod kreker od pšeničnog brašna tokom trideset dana skladištenja bio je 24 i 31%, dok su obogaćeni krekeri imali gubitke 7 i 16%. Istraživanja Msaddak i sar. (2015) pokazuju da obogaćeni krekeri imaju zaštitni efekat na retenciju  $AA$  i redukcionu sposobnost, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenih sa krekerima obogaćenih inkapsulatom (Slike 28-30).

Molnar i sar. (2015) su posmatrali vrednosti  $AA_{DPPH}$  i redukcione sposobnosti tokom mesec dana skladištenja u krekerima bez i sa dodatkom praha crne ribizle i sa josta prahom, kao i kreker kod kojih je čokolada nosač bez i sa dodatkom praha crne ribizle i sa josta prahom. Autori su zaključili da se tokom skladištenja značajno smanjuje  $AA_{DPPH}$  kod kreker sa čokoladnim nosačem bez i sa prahom crne ribizle, dok je sa druge strane gubitak RP veći kod kreker bez čokoladnog nosača bez i sa prahom crne ribizle.

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem stabilnosti funkcionalnih karakteristika kreker od cerealija i pseudocerealija, bez i sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle, odnosno inkapsulata, može se zaključiti da je tokom skladištenja došlo do veće degradacije bioaktivnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti kod kreker koji su obogaćeni ekstraktom tropa cvekle, nego što je to slučaj kod kreker koji su obogaćeni inkapsulatom tropa cvekle, što ukazuje na zaštitni efekat inkapsulacije bioaktivnih jedinjenja na proteinu soje.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju dobijen je trop cvekle ceđenjem u laboratorijskim uslovima, definirani su uslovi ekstrakcije dobijenog tropa, određivan je ukupan sadržaj bioaktivnih jedinjenja (ukupnih polifenola, flavonoida i betalaina), kao i pojedinačan sadržaj ovih jedinjenja. Takođe, izvršena je i inkapsulacija na proteinima soje i istaknut je značaj inkapsulacije bioaktivnih jedinjenja, kao i njihov kvalitativan i kvantitativan sadržaj u inkapsulatu.

Dalje u radu je sprovedena optimizacija formulacije funkcionalnih krepera na bazi cerealijskih (einkorn pšenica (E) i hlebna pšenica (P)) i pseudocerealijskih (heljda (H), amarant (A) i kinoa (K)) bez dodataka, sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (Ex) i sa dodatkom inkapsulata tropa cvekle (I). Određen je funkcionalni kvalitet (sadržaj ukupnih i pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, betalaina i antioksidativni potencijal) ekstrakta, inkapsulata i krepera bez dodataka, sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle i sa dodatkom inkapsulata tropa cvekle i njihova održivost tokom 6 meseci skladištenja.

Deo istraživanja posvećen je određivanju stepena neenzimskog tamnjenja (Maillard reakcije) u krekerima utvrđivanjem sadržaja furozina i hidrosimetilfurfurala (HMF) kao indikatora inteziteta termičke degradacije. Određivani su i parametri boje dobijenih krepera.

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci koji se odnose na dobijanje i funkcionalne karakteristike ekstrakta tropa cvekle:

- Udeo flavonoida u ukupnim polifenolnim jedinjenjima prisutnim u tropu cvekle je mali (10,92%), takođe, sadržaj betaksantina (50,27%) je zanemarljivo veći od sadržaja betacijana (49,73%), bez statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ).
- Kvalitativnom i kvantitativnom HPLC analizom utvrđeno je da dobijeni ekstrakt tropa cvekle sadrži fenolne kiseline (derivate hidroksibenzojeve kiseline: galna, prokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva; derivati cimetine kiseline: ferulna, sinapinska, kumarinska, hlorogenska i kafena kiselina) i flavonoide (epikatehin, katehin, miricetin, kvercetin, luteolin, apigenin i izoramnetin). Katehin je najdominantnije polifenolno jedinjenje u ekstraktu tropa cvekle (53,42 mg/100 g), ostali flavonoidi se nalaze u značajno manjim

količinama ( $\leq 3,52$  mg/100 g), dok je od fenolnih kiselina protokatehinska dominantna (11,53 mg/100 g).

- Kvalitativnom i kvantitativnom HPLC metodom je određen i sadržaj betalaina u ekstraktu tropa cvekle, pri čemu je betanin zastupljeniji u odnosu na vulgaksantin-I.
- Vrednost antioksidativne aktivnosti dobijena primenom ABTS testa iznosi 898,75  $\mu\text{mol TE}/100$  g tropa, vrednost dobijena DPPH testom iznosi 695,31  $\mu\text{mol TE}/100$  g tropa, dok je vrednost RP tropa cvekle bila 228,74  $\mu\text{mol TE}/100$  g tropa.

Rezultati dobijeni optimizacijom procesa inkapsulacije ekstrakta tropa cvekle i određivanjem funkcionalnih karakteristika optimalnog inkapsulata upućuju na sledeće zaključke:

- Za dobijanje optimalnog uzorka korišćena je optimizacija više odziva (*engl. multi response*). Utvrđeno je da nizak odnos nosač:ekstrakt (50,50 g/l), malo razblaženje ekstrakta (0,22) i vreme mućkanja od 14,1 min daje optimalni uzorak sa najvećom efikasnošću inkapsulacije, dok je za dobijanje optimalnog uzorka sa najvećom  $AA_{\text{DPPH}}$  takođe potreban relativno nizak odnos nosač:ekstrakt (51,00 g/l), minimalno razblaženje ekstrakta (0,04) i vreme mućkanja 16 min.
- Na osnovu rezultata spektrofotometrijski određenog sadržaja polifenolnih jedinjenja i betalaina u optimalnom inkapsulatu, zaključuje se da proces inkapsulacije dovodi do povećanja koncentracije ukupnih polifenolnih jedinjenja (27%) i betalaina (57%) u inkapsulatu u odnosu na njihov sadržaj u ekstraktu tropa cvekle. Izuzetak je sadržaj flavonoida koji je za 3 puta manji u inkapsulatu nego kod ekstrakta.
- Kvalitativnom i kvantitativnom HPLC analizom utvrđeno je da je procesom inkapsulacije došlo do povećanja koncentracije fenolnih kiselina i flavonoida. Kao i kod ekstrakta tropa cvekle, u optimalnom inkapsulatu su identifikovani derivati hidroksibenzoeve kiseline (galna, prokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva), derivati cimetne kiseline (ferulna, sinapinska, kumarinska, hlorogenska i kafena kiselina) i flavonoidi (epikatehin, katehin, miricetin, kvercetin, luteolin, apigenin i izoramnetin). Katehin je najdominantnije polifenolno jedinjenje u optimalnom inkapsulatu dok su luteolin i apigenin najmanje zastupljeni.
- Kvalitativnom i kvantitativnom HPLC metodom je određen i sadržaj betalaina u optimalnom inkapsulatu tropa cvekle. Nakon procesa inkapsulacije došlo je do smanjenja u sadržaju betalaina u inkapsulatu u odnosu na ekstrakt tropa cvekle.

- Antioksidativne aktivnosti inkapsulata veće su od aktivnosti ekstrakta tropa cvekle ( $AA_{DPPH}$  oko tri puta, a  $AA_{ABTS}$  dva puta), dok sa druge strane, RP inkapsulata je manji za oko sedam puta u odnosu na RP ekstrakta tropa cvekle. Pretpostavka je da se na nosaču koncentrišu jedinjenja iz ekstrakta tropa cvekle koja imaju izraženu antioksidativnu aktivnost, ali ne i redukcionu sposobnost.

Ispitivanje funkcionalnih karakteristika krekerica dovela su do sledećih zaključaka:

- Veći sadržaj polifenola je zastupljen u testu za krekerice u koje su dodati ekstrakt ili inkapsulat tropa nego što je to u krekerima. Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da je tokom termičkog tretmana (pečenja) došlo do degradacije određene količine polifenolnih jedinjenja. Testa obogaćena ekstraktom i inkapsulatom tropa cvekle imala su veći sadržaj polifenolnih jedinjenja od testa neobogaćenih krekerica. Kod krekerica, udeo flavonoida u ukupnim polifenolima je bio nizak, dok je kod testa udeo flavonoida bio nešto veći. Razlog smanjenja udela flavonoida kod krekerica je degradacija pojedinih komponenti tokom pečenja i različita otpornost prema temperaturnom tretmanu. Sadržaj ukupnih betacijana u testu je bio znatno veći od sadržaja ukupnih betaksantina dok se njihova vrednost kod krekerica ne razlikuje značajno ( $p \leq 0,05$ ). Sa druge strane, sadržaj betacijana se redukovao nakon pečenja krekerica u odnosu na testo, pri čemu je redukcija u sadržaju betaksantina manja kod krekerica sa dodatkom inkapsulata nego kod krekerica sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle. Smanjenje ukupnog sadržaja betacijana i betaksantina je posledica degradacije ukupnih betalaina tokom pečenja, koji su evidentno bolje zaštićeni kada su inkapsulirani.
- Najviši sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja bio je kod testa (502,64 mg GAE/100g) i krekerica (334,10 mg GAE/100g) od smeše einkorn i heljdinog brašna sa dodatkom inkapsulata. Heljda predstavlja bogat izvor polifenolnih jedinjenja pri čemu u uzorcima testa i krekerica sa heljdinim brašnom, pored funkcionalnih dodataka, tj. ekstrakta i inkapsulata tropa cvekle, i heljdino brašno je doprinelo da sadržaj polifenola bude visok. Sa druge strane, najviši sadržaj betalaina u krekerima je zabeležen kod krekerica od smeše einkorn brašna sa dodatkom inkapsulata (20,41 mg/100 g). Dobijeni rezultati pokazuju da su bioaktivna jedinjenja u inkapsulatu tropa cvekle u većoj meri zaštićena nego u samom ekstraktu tropa cvekle.



- HPLC analizom je identifikovano i kvantifikovano sedamnaest polifenolnih jedinjenja u kontrolnim krekerima (od brašna hlebne pšenice, einkorna, smeše einkorna i amaranta, kinoe i heljdinog brašna) i krekerima, sa dodatkom ekstrakta ili inkapsulata tropa cvek-le. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je galna kiselina najzastupljenije polifenolno jedinjenje, prisutno u svim vrstama ispitivanih krekeri. Takođe, sadržaj epikatehina je bio najveći od svih identifikovanih polifenolnih jedinjenja, i to kod uzroka E+H+I (18,577 mg/100g), međutim, nije identifikovan u svim krekerima od brašna hlebne pšenice i od smeše einkorn i amarant brašna. Hlorogenska kiselina, *p*-hid-roksibenzoeva kiselina i rutin su takođe prisutni u većini uzoraka.
- Kvalitativnom i kvantitativnom HPLC analizom su u uzorcima krekeri indentifikovani betacijani (betanin i njegov epimer), dok betaksantini nisu. Sadržaj identifikovanih jedinjenja veći je kod krekeri obogaćenih inkapsulatom nego kod krekeri obogaćenih ekstraktom tropa cvek-le, što dokazuje da inkapsulacija tropa cvek-le ima zaštitni uticaj na ova jedinjenja. Zaključuje se da je betanin najzastupljeniji u uzorcima krekeri, i to u većoj meri u krekerima obogaćenih inkapsulatom tropa cvek-le (od 3,80 mg/100 g krekeri do 4,89 mg/100 g krekeri) nego u krekerima obogaćenih ekstraktom (od 1,92 mg/100 g krekeri do 2,29 mg/100 g krekeri), dok razlika u sadržaju izobetanina u krekerima obogaćenih ekstraktom tropa cvek-le (od 1,06 mg/100 g krekeri do 1,48 mg/100 g krekeri) i krekerima obogaćenih inkapsulatom (od 1,99 mg/100 g krekeri do 2,42 mg/100 g krekeri) nije tako značajna, što ukazuje na slabiju zaštitu ovog jedinjenja postupkom inkapsulacije. Povećanje sadržaja derivata betanina u uzorcima krekeri obogaćenih inkapsulatom i smanjenje sadržaj derivata izobetanina u odnosu na krekeri obogaćene ekstraktom tropa cvek-le može se objasniti različitim ponašanjem ovih derivata betacijana u prisustvu proteina iz soje koji su nosači u inkapsulatu i utiču na hemijske reakcije tokom termičke obrade krekeri.
- AA<sub>DPPH</sub>• je bila manja kod neobogaćenih krekeri nego u krekerima obogaćenih eks-traktom tropa cvek-le ili inkapsulatom. Najviša vrednost AA<sub>DPPH</sub>• zabeležena je kod krekeri pripremljenih od hlebne pšenice sa dodatkom inkapsulata (1307,01 mmol TE/100 g). Najviša vrednost AA<sub>ABTS</sub>•+ zabeležena je kod krekeri pripremljenih od heljdinog brašna sa dodatkom inkapsulata (2304,42 mmol TE/100 g), dok je ta vrednost kod neobogaćenih krekeri za više od tri puta manja nego kod krekeri obogaćenih

ekstraktom i inkapsulatom tropa cvekle. Redukciona sposobnost nije zabeležena u testu pripremljenog od smeše einkorn brašna i kinoe, dok je kod krekerica pripremljenih od smeše einkorn i heljdinog brašna sa dodatkom inkapsulata zabeležena najviša vrednost RP (828,07 mmol TE/100 g). Zaključuje se da se  $AA_{DPPH\cdot}$ ,  $AA_{ABTS\cdot+}$  i RP povećava sa dodatkom Ex i I u odnosu na neobogaćene krekerice. Takođe, evidentno je da je antioksidativna aktivnost krekerica kod svih uzoraka veća u odnosu na testo, što se može objasniti pojavom proizvoda Maillard reakcija kao i oslobađanjem vezanih polifenola.

- Sadržaj furozina je najniži u krekerima sa dodatkom ekstrakta, što ukazuje na zaštitno dejstvo bioaktivnih jedinjenja iz ekstrakta tropa cvekle tokom pečenja. Sadržaj furozina u neobogaćenim krekerima i krekerima sa dodatkom inkapsulata je za skoro tri puta veća u odnosu na krekerice obogaćene ekstraktom tropa cvekle. Sa druge strane, sadržaj HMF u nekim uzorcima neobogaćenih krekerica (P i E) nije identifikovan, a najviše vrednosti su zabeležene kod krekerica sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle (E+A+Ex) (5,55 mg/kg).
- Kontrolni krekeri su pokazali najveće  $L^*$  vrednosti, odnosno svetloću (kod krekerica od pšeničnog brašna 83,00), dok je najniža kod krekerica od smeše einkorn i heljdinog brašna (64,00), jer je heljdino brašno tamnije u odnosu na pšenično. Kontrolni krekeri su takođe pokazali najnižu  $a^*$  vrednost. Međutim, dodatkom ekstrakta tropa i inkapsulata u krekerice, dolazi do povećanja crvene komponente ( $a^*$ ) i smanjenja svetloće ( $L^*$ ), najviše vrednosti za  $L^*$  zabeležene su kod krekerica od pšeničnog brašna sa ekstraktom tropa cvekle (58,00) i od einkorn brašna sa inkapsulatom tropa cvekle (51,00), a najniže vrednosti su zabeležene kod krekerica od smeše einkorn i heljdinog brašna sa dodatkom ekstrakta (50,00) i inkapsulata ekstrakta tropa cvekle (48,00) .

Na osnovu dobijenih rezultata koji se odnose na održivost ekstrakta tropa cvekle, inkapsulata i funkcionalnih karakteristika krekerica tokom skladištenja, mogu se izvesti zaključci o uticaju skladištenja na funkcionalne karakteristike ekstrakta tropa cvekle, inkapsulata i krekerica:

- Poređenjem sadržaja polifenola, flavonoida, betacijana i betaksantina, antioksidativne aktivnosti i redukcione sposobnosti ekstrakta i inkapsulata tropa cvekle pre i posle 6 meseci skladištenja, možemo zaključiti da su najveću retenciju, odnosno stabilnost, pokazala polifenolna jedinjenja koja su inkapsulirana (95,11%), dok je najveća degradacija zabeležena kod flavonoida u ekstraktu tropa cvekle (49,24%). Retencija inkap-

suliranih betacijana (87,98%) i betaksantina (87,96%) bila je bez statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ), kao i kod ekstrakta tropa cvekle (retencija betacijana 74,99% i betaksantina 72,41%). Zaštitni efekat procesa inkapsulacije je potvrđen znatno većom retencijom bioaktivnih jedinjenja u inkapsulatu nego u ekstraktu tropa cvekle ( $p \leq 0,05$ ).

- Sposobnost eliminisanja slobodnih ABTS<sup>+</sup> radikala je najznačajnije očuvana aktivnost, sa retencijom u inkapsulatu od 88,82%, dok je redukciona sposobnost imala najmanju retenciju, i to u ekstraktu tropa cvekle (28,27%). Do smanjenja antioksidativne aktivnosti na obe slobodnoradikalske vrste (DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>•+</sup>) i redukcionu sposobnost ( $p \leq 0,05$ ) došlo je tokom 6 meseci skladištenja, i to značajnije u ekstraktu tropa cvekle nego u inkapsulatu. Dobijeni rezultati pokazuju pozitivno delovanje inkapsulacije na očuvanje biološke aktivnosti.
- Na osnovu rezultata može se zaključiti da su se polifenoli i flavonoidi manje degradirali, odnosno retencija je veća, kod krekeri koji su obogaćeni inkapsulatom tropa cvekle (retencija u opsegu 68,99 – 99,49%) nego što je to slučaj kod krekeri koji su obogaćeni ekstraktom tropa cvekle (retencija u opsegu 52,41 – 62,83%). Takođe, krekeri obogaćeni sa inkapsulatom su pokazali veću retenciju betacijana i betaksantina u odnosu na krekeri koji su obogaćeni ekstraktom tropa cvekle. Iz navedenog može se potvrditi efikasnost inkapsulacije kao metode za zaštitu bioaktivnih jedinjenja od spoljašnjih uticaja.
- Antioksidativne aktivnosti na obe slobodnoradikalske vrste (DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>•+</sup>) i redukcionu sposobnost u krekerima značajno su opale nakon 6 meseci skladištenja. Krekeri obogaćeni inkapsulatom tropa cvekle su pokazali znatno veću retenciju u odnosu na krekeri obogaćene ekstraktom tropa cvekle. Niža retencija koja je zabeležena kod krekeri sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle potvrđuje da je postupak inkapsulacije veoma efikasan za zaštitu funkcionalnih karakteristika. Posmatrajući dobijene rezultate može se zaključiti da je najveća retencija zabeležena kod krekeri sa smešom einkorn i heljdinog brašna i inkapsulata (E+H+I). S obzirom na to da je heljda bogat izvor polifenolnih jedinjenja, protokatehinske i galne kiseline, zaključuje se da pored dodataka inkapsulata tropa cvekle, i heljdino brašno doprinosi visokoj retenciji antioksidativne aktivnosti (DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>•+</sup>) i redukcionu sposobnost u krekerima.

Sagledavajući dosadašnje zaključke, finalni zaključak ove disertacije je:

Posmatrajući ispitivane parametre ekstrakta, inkapsulata i krejera bez dodatka i sa dodatkom ekstrakta ili inkapsulata tropa cvekle, zaključuje se da postupak inkapsulacije ima zaštitni efekat na bioaktivna jedinjenja i antioksidativnu aktivnost. Krekeri obogaćeni inkapsulatom tropa cvekle pokazali su bolje funkcionalne karakteristike od krejera sa dodatkom ekstrakta tropa cvekle i krejera bez dodataka, što je upravo dokaz efikasnosti inkapsulacije. Pored toga, krekeri su pripremljeni od različitih vrsta brašna (P, E, E+H, E+A, E+K), evidentna je i razlika u pogledu nutritivnih i funkcionalnih osobina, pri čemu su se krekeri od heljdinog brašna najbolje pokazali u pogledu ovih osobina.



## 6. LITERATURA

- Alexe, P., Dima, C. (2014). Microencapsulation in food products. *AgroLife Scientific Journal*, 3, 9-14.
- Alfadda, A. A., Sallam R. M. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 936486, 1-14.
- Alvarez-Jubete, L., Wijngaard, H., Arendt, E. K., Gallagher, E. (2010). Polyphenol composition and *in vitro* antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Journal of Food Chemistry*, 119, 770–778.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, W. S., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K. (2013). *Liposome: Classification, preparation, and applications. Nanoscale Res Lett*, 8, 102.
- Aruoma, O. I. (1996). Assessment of potencial prooxidant and antioxidant actions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 1617-1625.
- Augustin, M. A., & Sanguansri, L. (2008). Encapsulation of bioactives. *Food Materials Science*, 577–601.
- Augustin, M. A., Sanguansri, L., Bode, O. (2006). Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders. *Journal of Food Science*, 71, E25-E32.
- Avaltroni, F., Bouquerand, P.E., Normand, V. (2004). Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 58, 323–324.
- Bakowska-Barczak, A. M., Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34, 1301– 1309.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Bavec, M., Turinek, M., Grobelnik-Mlakar, S., Slatnar, A., Bavec, F. (2010). Influence of industrial and alternative farming systems on contents of sugars, organic acids, total phenolic content, and the antioxidant activity of red beet (*Beta vulgaris L. ssp. vulgaris* Rote Kugel). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11825–11831.

- Bazaria, B., Kumar, P. (2018). Optimization of spray drying parameters for beetroot juice powder using response surface methodology (RSM). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17, 408-415.
- Beristain, C. I., Vázquez, A., García, H. S., Vernon-Carter, E. J. (1996). Encapsulation of orange peel oil by co-crystallization. *LWT – Food Science and Technology*, 29, 645-647.
- Bertagnolli, S. M. M., Silveira, M. L. R., Fogaça A. O., Umann, L., Penna, N. G. (2014). Bioactive compounds and acceptance of *cookies* made with Guava peel flour. *Food Science and Technology*, 34, 303-308.
- Bigliardi, B., Galati F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31, 118–129.
- Bocco A., Cuvelier, ME., Richard H., Berset C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2123-2129.
- Boudet, AM. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68, 2722–2735.
- Brandolini, A., Castoldi, P., Plizzari, L., Hidalgo, A. (2013). Phenolic acids composition, total polyphenols content and antioxidant activity of *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*: A two-years evaluation. *Journal of Cereal Science*, 58, 123-131.
- Brand-Williams W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*, 28, 25-30.
- Cai, Y., Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, 65, 1248-1252.
- Caldwell, C. R., Britz, S. J., Mirecki, R. M. (2005). Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) grown in controlled environments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1125–1129.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Ciric, A., Sokovic, M., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. *Journal of Functional Foods*, 12, 428–438.

- Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Serpen, A., Acar, O. C., Gokmen, V., Fogliano, V. (2009). Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Research International*, 42, 1295–1302.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P. & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Food Science and Food Safety*, 13, 377–399.
- Ceballos, A. M., Giraldo, G. I., Orrego, C. E. (2012). Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *Journal of Food Engineering*, 111, 360–365.
- Chen, L., Remondetto, G. E., Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery system. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 272–283.
- Champagne, C. P., Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 184–190.
- Cort A., Ozben T. (2014.). Free radicals: The role of antioxidants and pro-oxidants in cancer development and therapy. *Free Radicals*, ISBN: 978-1-63117-177-2
- Čalija, R., B. (2013). Funkcionalnost hitozana u formulaciji alginat-hitozan mikročestica kao nosača za nesteroidne antiinflamatorne lekove. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- D'Archivio, M., Sczzocchio, B., Giovannini, C., and Masella, R. (2014). Chapter 15 – role of protocatechuic acid in obesity-related pathologies. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, 177–189.
- Dasgupta A., Klein K. (2014). Antioxidants in food, vitamins and supplements: Prevention and treatment of disease. *Elsevier*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405872-9.00001-X>. ISBN: 978-0-12-405872-9.
- Da Silva, P. T., Friesl, L. L. M., de Menezes, C. R., Holkem. A. T., Schwan, C. L., Wigmann, É. F., de Oliveira Bastos, J., de Bona da Silva, C. (2014). Microencapsulation: Concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciencia Rural*, 44, 1304–1311.
- Dave, N., Patel, I., Patel, V. (2014). Antioxidant activity, textural properties and storage stability of honey fortified biscuits. *Journal of Advances in BioResearch*, 5, 93–101.



- de Azeredo, H. M. C., Pereira, A. C., de Souza, A. C. R., Gouveia, S. T., & Mendes, K. C. B. (2009). Study on efficiency of betacyanin extraction from red beetroots. *International Journal of Food Science and Technology*, *44*, 2464–2469.
- de Camargo, A. C., Vidal, C. M. M., Canniatti-Brazaca, S. G., Shahidi, F. (2014). Fortification of cookies with peanut skins: effects on the composition, polyphenols, antioxidant properties, and sensory quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 11228–11235.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40*, 173-289.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., and Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*, 1818-1892.
- Desai, K. G. H., Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Journal of Drying Technology*, *23*, 1361–1394.
- Dias, H. M. A. M., Berbicz, F., Pedrochic, F., Baesso, M. L., Matioli, G. (2010). Butter cholesterol removal using different complexation methods with beta-cyclodextrin, and the contribution of photoacoustic spectroscopy to the evaluation of the complex. *Food Research International*, *43*, 1104–1110.
- Diplock A. T., Aggett P. J., Ashwell M., Bornet F., Fern E. B., Roberfroid M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, *81*, S1-S27.
- dos Santos, S. S., Rodrigues, L. M., da Costa, S. C., de Cassia Bergamasco, R., Madrona, G. S. (2017). Microencapsulation of bioactive compounds from blackberry pomace (*Rubus fruticosus*) by spray drying technique. *International Journal of Food Engineering*, *13*, 20170047.
- Duchêne, D. (2011). Cyclodextrins and their inclusion complexes. *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine*, 1-18.
- Duh, PD., Tu, YY., Yen, GC. (1999). Antioxidant activity of the water extract of harn g jyr (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT-Food Science and Technology*, *32*, 269-277.

- Dziezak, J. D. (1986). Preservatives: antioxidants. The ultimate answer to oxidation. *Food Technology*, 40, 94-102.
- Dilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M., Tumbas, V. T. (2008). *Hemija hrane, Praktikum sa radnom sveskom*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Dorđević, 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. *Journal of Food Engineering Reviews*, 7, 452-490.
- Abdel-Aal, ES. M., Rabalski, I. (2013). Effect of baking on free and bound phenolic acids in wholegrain bakery products. *Journal of Cereal Science*, 57, 312-318.
- Erdamar, H., Demirci, H., Yaman, H., Erbil, M. K., Yakar, T., Sancak, B., Elberg, S., Biberoglu, G., Yetkin I. (2008). The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and their treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46, 1004- 1010.
- Ezhilarasi, P.N., Indrani, D., Jena, B. S., Anandharamakrishnan, C. (2013.). Freeze drying technique for microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread quality. *Jouranal of Food Engineering*, 117, 513-520.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129, 1139–1147
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols- A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 510-523.
- Fathi, M., Mozafari. M. R., Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 23, 13–27.
- Florea T., Dima St., Costin G.M. (2009). Microincapsularea pentru sisteme alimentare. *Academica*, Galati, 2-105.
- Franzen, K., L., Kinsella, J., E. (1976). Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 788-795.
- Gandía-Herrero, F., Simón-Carrillo, A., Escribano, J., García-Carmona, F. (2012). Determination of Beet Root betanin in dairy products by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Chemical Education*, 89, 660–664.

- Gaonkar, A. G., Vasisht, N., Khare, A. R., Sobel, R. (2014). Microencapsulation in the Food Industry. *A Practical Implementation Guide*, 267-282.
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 645-649.
- Georgiev, V. G., Weber, J., Kneschke, EM., Denev, P. N., Bley, T., Pavlov, A. I. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beetroot *Beta Vulgaris* cv. Detroit Dark Red. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 105–111.
- Gokhale, S. V., Lele S. S. (2014). Betalain Content and antioxidant activity of *Beta vulgaris*: Effect of hot air convective drying and storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38, 585-590.
- Gorinstein, S., Medina Vargas, O. J. M, Jaramillo, N. O., Arnao Salas, I., Martinez Ayala, A. L., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Katrich, E., Trakhtenberg, S. (2007). The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research Technology*, 225, 321–328.
- Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40,1107–1121.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 213-224.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1887- 1892.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280, 1-8.
- Hasler C. M. (2002). Functional Foods: Benefits, concerns and challenges – A position paper from the American Council on Science and Health. *Journal of Nutrition*, 132, 3772-3781.

- Head, R., Sanguansri, L., Augustin, M. A. (2005). GI tract delivery systems. United States Patent, US 9,592,2901 B2
- Hedges, A. R. (1998). Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Review*, 98, 2035–2044.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, 71, R41–R50.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., Carle, R. (2004). Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris L.*) preparations. *Journal of Food Science*, 69, C491–C498.
- Hernández-Carrión, M., Hernando, I., Quiles, A. (2014). High hydrostatic pressure treatment as an alternative to pasteurization to maintain bioactive compound content and texture in red sweet pepper. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 76–85.
- Hidalgo, A., Yilmaz, V. A., Brandolini, A. (2015). Influence of water biscuit processing and kernel puffing on the phenolic acid content and the antioxidant activity of einkorn and bread wheat. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 541-550.
- Hidalgo, A., Brandolini, A. (2014). Nutritional properties of einkorn wheat (*Triticum monococcum L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 601-61.
- Hidalgo, A., Brandolini, A. (2011). Heat damage of water biscuits from einkorn, durum and bread wheat flours. *Food Chemistry*, 128, 471–478.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C. (2010). Carotenoids evolution during pasta, bread and water biscuit preparation from wheat flours. *Food Chemistry*, 121, 746–751.
- Hidalgo, A., Rossi, M., & Pompei, C. (1995). Furosine as a freshness parameter of shell eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1673–1677.
- Hofstrand D. 2008. Domestic perspectives on food versus fuel. Agriculture Marketing Resource Center. Available from: [www.agmrc.org](http://www.agmrc.org).
- Hogan, S. A., O’Riordan, E. D., O’Sullivan, M. (2003). Microencapsulation and oxidative stability of spray-dried fish oil emulsions. *Journal of Microencapsulation*, 20, 675–688.
- Hogan, S. A., McNamee, B. F., O’Riordan, E. D., O’Sullivan, M. (2001). Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends. *International Dairy Journal*, 11, 137–144.

- Holasova, M., Fiedlerova, V., Smrcinova, H., Orsak, M., Lachman, J., Vavreinova, S. (2002). Buckwheat-the source of antioxidant activity in functional foods. *Journal of Food Research International*, 35, 207–211.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., Razavi, S. H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chem*, 111, 50–55.
- <http://nadijeti.com/2011/02/07/funkcionalna-hrana/>
- [http://www.functional-food\\_en](http://www.functional-food_en) (2)
- <http://www.pharmamedica.rs/ishrana/funkcionalna-hrana-i-lekovito-bilje/>
- <http://www.studpol.rs/dokumenta/bilten/Funkcionalna%20hrana.pdf>
- <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/cvekla>
- <http://www.zdravaishrana.net/dobrozdravlje.htm>
- Hussain, A. I., Anwar F., Iqbal T., Bhatti I. A. (2011). Antioxidant attributes of four *Lamiaceae* essential oils. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 1315-1321.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126,1821–1835.
- Ingle, M., Ingle, M. P., Thorat, S.S., Nimbalkar, C. A., Nawkar, R.R. (2017). Nutritional evaluation of cookies enriched with beetroot (*Beta vulgaris* L.) powder. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 1888-1896.
- Ivanišova, E., Košec, M., Brindza, J., Grygorieva, O., and Tokár, M. (2018). Green barley as an ingredient in pasta: Antioxidant activity and sensory characteristics evaluation. *The Serbian Journal of Agricultural Sciences*, 67, 81-86.
- Janiszewska, E. (2014). Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain. *Powder Technology*, 264, 190–196.
- Jeon, Y. J., Vasanthan, T., Temelli, F., Song, B. K., (2003). The suitability of barley and corn starches in their native and chemically modified forms for volatile meat flavor encapsulation. *Journal of Food Research International*, 36, 349–355.
- Jimenez, T., Turchiuli, C., Dumoulin, E. (2006). Particles agglomeration in a conical fluidized bed in relation with air temperature profiles. *Chemical Engineering Science*, 61, 5954–5961.

- Jung, J., Cavender, G., Zhao, Y. (2015). Impingement drying for preparing dried apple pomace flour and its fortification in bakery and meat products. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 5568–5578.
- Kadivec, M., Može Bornšek, Š., Polak, T., Demšar, L., Hribar, J., Požrl, T. (2013). Phenolic content of strawberry spreads during processing and storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61, 9220–9229.
- Kaimainen, M., Laaksonen, O., Järvenpää, E., Sandell, M., Huopalahti R. (2015). Consumer acceptance and stability of spray dried betanin in model juices. *Food Chemistry*, 187, 398–406.
- Kalogeropoulos, N., Yannakopoulou, K., Gioxari, A., Chiou, A., Makris, D. P. (2010). Polyphenol characterization and encapsulation in  $\beta$ -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 882–889.
- Kalušević, A., Lević, S., Bugarski, B., Nedović, V. (2012). Mikroinkapsulacija i njena primena u funkcionalnim proizvodima, Smotra naučnih radova studenata agronomije, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Banja Luci, 17-21.
- Karathanos, V. T., Mourtzinou, I., Yannakopoulou, K., Andrikopoulos, N. K. (2007). Study of the solubility, antioxidant activity, and structure of inclusion complex of vanillin with beta-cyclodextrin. *Food Chemistry*, 101, 652–658.
- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Ruellan, S., Fourmentin, S. (2014). Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. *Food Chem*, 164, 454–461
- Konvalina, P., Capouchová, I., Stehno, Z., Moudrý, J. (2010). Agronomic characteristics of the spring forms of the wheat landraces (einkorn, emmer, spelt, intermediate bread wheat) grown in organic farming. *Journal of Agrobiological Sciences*, 27, 9–17.
- Koontz, J. L., Marcy, J. E., O'Keefe, S. F., Duncan, S. E. (2009). Cyclodextrin inclusion complex formation and solid-state characterization of the natural antioxidants  $\alpha$ -tocopherol and quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1162–1171.
- Kosaraju, S. L., Labbett, D., Emin, M., Konczak, I., Lundin, L. (2008). Delivering polyphenols for healthy ageing. *Nutrition & Dietetics*, 65, S48-S52.

- Kosseva, M., Webb, C. (2013). Food Industry Wastes. Assessment and Recuperation of Commodities. *Food Science and Technology, International Series*. ISBN: 978-0-12-391921-2.
- Kostić, I. T., Isailović, B. D., Đorđević, V. B., Lević, S. M., Nedović, V. A., Bugarski, B. M. (2012). Elektrostatička ekstruzija kao disperziona tehnika za inkapsulaciju ćelija i bioloških aktivnih supstanci. *Hemijska industrija*, 66, 505-517.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., Pehu, E. (2006). Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. *Agriculture and Rural Development Discussion Paper 30*.
- Krimer Malešević, V. (2016). Fenolni potencijal uljanih pogača, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Kujala, T. S., Loponen, J. M., Klika, K. D., Pihlaja, K. (2000.). Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5338–5342.
- Lee, K. W., Lee, H. J. (2006). The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors*, 26, 105–121.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E., Remesy, C. (2006). Wheat lipoxygenase activity induces greater loss of carotenoids than vitamin E during breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1710–1715.
- Liu, J.K., Hu, L., Dong, Z.J., Hu, Q. (2004). DPPH radical scavenging activity of ten natural *p*-terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous to China. *Chemistry and Biodiversity*, 1, 601-605.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, I., Gabaldón J. A., Núñez-Delicado, E. (2008). Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 255–259.
- Marsanasco, M., Marquez, A. L., Wagner, J. R., Chiaramoni, N. S., Alonso, S. del V. (2015). Bioactive compounds as functional food ingredients: characterization in model system and sensory evaluation in chocolate milk. *Journal of Food Engineering*, 166, 55-63.
- Massaad, C. A., Klann, E. (2011). Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14, 2013- 2054.

- Maswal, M., Dar, A. A. (2014). Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for improved food quality. *Food Hydrocolloids*, 37, 182–195.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner, J. O., Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: A randomised, double-blinded, placebocontrolled trial. *The Lancet*, 370, 1560–1567.
- Mena, P., Garcia-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, A. D., Bartual, J., Saura, D., Marti, N. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1893–1906.
- Mikkonen, T. P., Määttä, K. R., Hukkanen, A. T., Kokko, H. I., Törrönen, A. R., Kärenlampi, S. O., Karjalainen, R. O. (2001). Flavonol content varies among black currant cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3274–3277.
- Milenković, M. (2013). Fenolni sastav, antioksidativna i antimikrobna aktivnost delova ploda i lišća *Prunus spinosa L.* iz jugoistočne Srbije. Master rad, Prirodno-matematički fakultet, Niš. 4-7.
- Mitić, M. N. (2011). Kinetika degradacije fenolnih jedinjenja hidrosil radikalima, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Niš, 37-48.
- Molnar, D., Rimac Brnčić, S., Vujić, L., Gyimes, E., Krisch, J. (2015). Characterization of biscuits enriched with black currant and jostaberry powder. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 10, 31-36.
- Moore, J., Luther, M., Cheng, Z., Yu, L. L. (2009). Effects of baking conditions, dough fermentation, and bran particle size on antioxidant properties of whole-wheat pizza crusts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 832-839.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Parajo, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11, 833-844.



- Mridula, D., Gupta R. K., Bhadwal, S., Khaira, H., Tyagi, S. K. (2016). Optimization of food materials for development of nutritious pasta utilizing groundnut meal and beetroot. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 1834–1844.
- Msaddak, L., Siala, R., Fakhfakh, N., Ayadi, M. A., Nasri, M., Zouari, N. (2015). Cladodes from prickly pear as a functional ingredient: Effect on fat retention, oxidative stability, nutritional and sensory properties of cookies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66, 851-857.
- Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds - A review. *Journal of Pharmaceutics*, 3, 793-829.
- Naczka, M., Shahidi, F. (2006). *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analyses*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-42.
- Naczka, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analyses of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.
- Nakajima, M., Nabetani, H., Ichikawa, S., Xu, Q.Y. (2003). Functional emulsions. US Patent, US6538019B1.
- Nedović, V., Kalusevic, A., Manojlović, V., Petrovic, T., Bugarski, B. (2013). Encapsulation systems in the food industry. *Advances in Food Process Engineering Research and Applications*, 229-253.
- Nemzer, B., Pietrzowski, Z., Spórna, A., Stalica, P., Thresher, W., Michalowski, T., Wybraniec, S. (2011). Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris L.*) dried extracts. *Food Chemistry*, 127, 42-53.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. *Journal of Industrial Crops and Products*, 42, 469-479.
- Nigg, J. T., Lewis, K., Edinger, T., Falk, M. (2012). Meta-analysis of attention-deficit/hyperactivity disorder or attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms, restriction diet, and synthetic food color additives. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 51, 86–97.

- Nsimba, R. Y., Kikuzaki, H., Konishi, Y. (2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus spp.* Seeds. *Journal of Food Chemistry*, 106, 760–766.
- Ohama, H., Ikeda, H., Moriyama, H. (2008). Health foods and foods with health claims in Japan. *Food Science and Technology*, 249-280.
- Ohr, L.M. (2005). Functional fatty acids. *Food Technology*, 59, 63–65.
- Okuro, P. K., de Matos Junior, F. E., Favaro-Trindade, C. S. (2013). Technological challenges for spray chilling encapsulation of functional food ingredients. *Journal of Food Technology and Biotechnology*, 51, 171-182.
- Olumese, F. E., Oboh, H. A. (2016). Antioxidant and antioxidant capacity of raw and processed Nigerian Beetroot (*Beta vulgaris*). *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*, 24, 35-40.
- Orhan, D.D., Harteviöglu, A., Küpeli, E., Yesilada, E. (2007). *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 394–400.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction from glucose amine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44, 307-315.
- Paganga, G, Rice-Evans, A. C. (1997): The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Letters*, 401, 78-82.
- Pajin, B. (2009). Praktikum iz tehnologije konditorskih proizvoda. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Papaoannou, E. H., Liakopoulou-Kyriakides, M. (2012). Agro-food wastes utilization by *Blakeslea trispora* for carotenoids production. *Acta Biochimica Polonica*, 59, 151–153.
- Park, J., Choi, I., Kim, Y. (2015). Cookies formulated from fresh okara using starch, soy flour and hydroxypropyl methylcellulose have high quality and nutritional value. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 660-666.
- Pedreño, MA., Escribano, J. (2001). Correlation between antiradical activity and stability of betanine from *Beta vulgaris* L roots under different pH, temperature and light conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 627-631.
- Petrović, J., Lončarević, I., Tumbas Šaponjac, V., Pajin, B., Zarić, D. (2016). Physical characteristics of cookies enriched with microencapsulated cherry pomace extract, world

- academy of science, engineering and technology. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 10.
- Pitalua, E., Jimenez, M., Vernon-Carter, E. J., Beristain, C. I. (2010). Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. *Food and Bioproducts Processing*, 8, 253–258.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon M. (2001). Antioxidants in Food. Woodhead Publishing Ltd., England and CRC Press LLC, USA.
- Poshadri, A., Aparna, K. (2010). Microencapsulation technology: A review. *The Journal of Research ANGRAU*, 38, 86-102.
- Prata, A. S., Maudhuit, A., Boillereaux, L., Poncelet, D. (2012). Development of a control system to anticipate agglomeration in fluidised bed coating. *Powder Technology*, 224, 168–174.
- Radojković, M. (2012). Ekstrakti duda (*Morus spp.*, *Morasceae*), sastav, delovanje i primena. Doktorska Disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,
- Rafiq, A., Sharma, S., Singh, B. (2018). Effect of pregelatination on rheology, cooking and antioxidant activity of pasta. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 1756–1766.
- Rajendran, R., Garva, R., Krstic-Demonacos, M., Demonacos, C. (2011). Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1- 17.
- Rao, J., McClements, D. J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: fabrication from sucrose monopalmitate and lemon oil. *Food Hydrocolloids*, 25, 1413–1423.
- Ravichandran, K., Saw, N. M. M. T., Mohdaly, A. A. A., Gabr, A. M. M., Kastell, A., Riedel, H., Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I. (2013). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Research International*, 50, 670–675.
- Ravichandran, K., Ahmed, A. R., Knorr, D., Smetanska, I. (2012.). The effect of different processing methods on phenolic acid content and antioxidant activity of red beet. *Food Research International*, 48, 16–20.
- Regiert, M. (2008). Molecular encapsulation in cyclodextrins. *Speciality Chemicals Magazine*, 22–24.

- Resmini, P., Pellegrino, L., Pagani, M. A., De Noni, I. (1993). Formation of 2-acetyl-3-D-glucopyranosylfuran (glucosylisomaltol) from nonenzymatic browning in pasta drying. *Italian Journal of Food Science*, 4, 341–353.
- Resmini, P., Pellegrino, L. (1991). Analysis of food heat damage by direct HPLC of furosine. *International Chromatography Laboratory*, 6, 7–11.
- Roberfroid, M.B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88, S133-S138.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1386–1394.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866–2887.
- Rodríguez-Fragoso, L., Osuna-Martínez, U., Gonzaga-Morales A., I., Reyes-Esparza, J. (2014). Potential Antioxidant Benefits of Commonly Used Fruits and Vegetables around the World. Medicinal Plants, ISBN: 978-1-62948-219-4.
- Rufián-Henares, J. A., Delgado-Andrade, C. (2009). Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. *Food Research International*, 42, 394–400.
- Rufián-Henares, J. A., Delgado-Andrade, C., Morales, F. J. (2006). Analysis of heat-damage indices in breakfast cereals: Influence of composition. *Journal of Cereal Science*, 43, 63–69.
- Rufián-Henares, J. A., Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2006). Application of a fast high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosyl somaltol in breakfast cereals. *Journal of AOAC International*, 89, 161–165.
- Saézn, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114, 616–622.
- Saikia, S., Mahnot, N, K., Mahanta C. L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food Chemistry*, 171, 144–152.

- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 571–581.
- Saleh, K., Steinmetz, D., Hemati, M. (2003). Experimental study and modelling of fluidized bed coating and agglomeration. *Powder Technology*, 130, 116–123.
- Salminen, A., Kaarniranta, K. (2012). AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Research Reviews*, 11, 230- 241.
- Sandström, M. E., Zhang, S. J., Bruton, J., Silva, J. P., Reid, M. B., Westerblad, H., Katz, A. (2006). Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 575, 251- 262.
- Sanguansri, L., Augustin, M. A. (2010). New technologies for functional food manufacture. Microencapsulation in functional food product development. Functional Food Product Development. ISBN 978-1-4051-7876-1
- Sarig, Y., De Baerdemaker, J., Marchal, P., Auernhammer, H., Bodria, L., de Alencar Nääs, I., Centrangolo, H. (2003). Traceability of food products. *International Commission of Agricultural Engineering*, 5, 1–17.
- Sawicki, T., Bączek, N., Wiczkowski, W. (2016). Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. *Journal of Functional Foods*, 27, 249–261.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130, 2073S–2085S.
- Schieber, A. (2009). Nutraceuticals from by-products of plant food processing. *Can. Chem. News*.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects –A review. *Journal of Functional Food*, 18, 820-897.
- Shahidi, F., Naczki, M. (2004). Phenolics in food and nutraceuticals (pp. 1–558). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Shahidi, F., Han, X.Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501-547.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Skibola C. F., Smith M. T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 375-383.
- Skinner, M., Hunter, D. (2013). *Bioactives in Fruit, Health Benefits and Functional Foods*, John Wiley and sons, Ltd, UK.
- Smith, J., Charter, E. (2010). *Functional Food Product Development*. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 9-10.
- Spence, C., Levitan, C. A., Shankar, M. U., Zampini, M. (2010). Does food color influence taste and flavor perception in humans? *Chemosensory Perception*, 3, 68–84.
- Spence, J.T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S4-S6.
- Stanković, S., M. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Journal of Mathematics*, 33, 63-72.
- Stintzing, F. C., Carle, R. (2007). Betalains-emerging prospects for food scientist. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 514-525.
- Stintzing, F. C., Trichterborn, J., Carle R. (2006.). Characterisation of anthocyanin–betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry*, 94, 296–309.
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R., Felker, P. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia spp.*) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 442-451.
- Strack, D., Vogt, T., Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247-269.
- Sun, T., Ho, CT. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, 90, 743–749.

- Szente, L., Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 137–142.
- Takahashi, M., Inafuku, Ki., Miyagi, T., Oku, H., Wada, K., Imura, T., Kitamoto, D. (2007). Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. *Journal of Oleo Science*, 56, 35-42.
- Teunou, E., Poncelet, D. (2005). Encapsulated and powdered foods. CRC Press, Boca Raton, ISBN-13: 978-1-4200-2830-0
- Thies, C. (2005). A survey of microencapsulation processes. Benita S (ed) Microencapsulation. Marcel Dekker Inc, New York
- Tiwari, S., Goel, A., Jha, K. K., Sharma, A. (2010). Microencapsulation techniques and its application: A review. *The Pharma Research*, 3, 112-116.
- Tommasini, S., Calabro, M., L., Stancanelli, R., Donato, P., Costa, C., Catania, S., Villari, V., Ficarra, P., Ficarra, R. (2005). The inclusion complexes of hesperetin and its 7-rhamnoglucoside with (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 572-580.
- Tonon, R. V., Brabet, C., Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried acai (*Euterpe oleracea Mart.*) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43, 907–914.
- Tumbas V. (2010). Antiradikalska i antiproliferativnaaktivnost ekstrakta odabranih biljaka iz familija *Rosaceae* i *Ericaceae*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2010.
- Tumbas Šaponjac V., Čanadanović-Brunet J., Četković G., Jakišić M., Djilas S., Vulić J. and Stajčić S. (2016). Encapsulation of Beetroot Pomace Extract: RSM Optimization, Storage and Gastrointestinal Stability. *Journal of Molecules*, 21, 584.
- Tumbas Šaponjac, V., Četković, 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.
- Umer, H., Nigam, H., Tamboli, A. M., Nainar, S. M. (2011). Microencapsulation: Process, techniques and applications. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2, 474-481.

- van der Laan, L. N., Hooge, I. T. C., de Ridder, D. T. D., Viergever, M. A., Smeets, P. A. M. (2015). Do you like what you see? The role of first fixation and total fixation duration in consumer choice. *Food Quality and Preference*, 39, 46–55.
- van der Laan, L. N., de Ridder, D. T. D., Viergever, M. A., Smeets, P. A. M. (2011). The first taste is always with the eyes: A meta-analysis on the neural correlates of processing visual food cues. *NeuroImage*, 55, 296–303.
- Varastegani, B., Zzaman, W., Yang, T. A. (2015). Investigation on physicochemical and sensory evaluation of cookies substituted with papaya pulp flour. *Journal of Food Quality*, 38, 175-183.
- Vaya, J., Aviram, M. (2001). Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Current Medicinal Chemistry-Imunology, Endocrine and Metabolic Agents*, 1, 99-117.
- Vergara, C., Saavedra, J., Sáenz, C., García, P., Robert, P. (2014). Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage. *Food Chemistry*, 157, 246–251.
- Villemejeane, C., Wahl, R., Aymard, P., Denis, S., Michon, C. (2015). In vitro digestion of short-dough biscuits enriched in proteins and/or fibres, using a multi-compartmental and dynamic system (1): Viscosity measurement and prediction. *Food Chemistry*, 182, 55–63.
- Vitali, D., Dragojević, V. I., Šebečić, B. (2009.). Effects of incorporation of integral raw materials and dietary fibre on the selected nutritional and functional properties of biscuits. *Food Chemistry*, 114, 1462–1469.
- Von Elbe, J. H. (2003). Current Protocols in Food Analytical Chemistry. In John Wiley & Sons, Inc. Betalains, Unit F3.1.1-F3.1.7.
- Vračar, Lj., Tepić A., Letić A, Palinka M. (2004). Sušenje maline postupkom liofilizacije. *Jugosl. voćar.*, 38, 209-214.
- Vulić, J., Šeregelj, V., Kalušević, A., Lević, S., Nedović, V., Tumbas Šaponjac, V., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G. (2019). Bioavailability and bioactivity of encapsulated phenolics and carotenoids isolated from red pepper waste. *Molecules*, 24, 2837.



- Vulić, J. J., Veličanski, A. S., Četojević-Simin, D. D., Tumbas Šaponjac, V. T., Đilas, S. M., Cvetković, D. D., Markov, S. L. (2014). Antioxidant, antiproliferative and antimicrobial activity of freeze-dried raspberry. *Acta Periodica Technologica*, 45, 1-283.
- Vulić, J. J., Čebović, T. N., Čanadanović-Brunet, J. M., Četković, G. S., Čanadanović, V. M., Djilas, S. M., Tumbas Šaponjac, V. T. (2014). *In vivo* and *in vitro* antioxidant effects of beetroot pomace extracts. *Journal of Functional Foods*, 6, 168-175.
- Vulić, J., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Tumbas, V., Djilas, S., Četojević-Simin, D., Čanadanović, V. (2012). Antioxidant and cell growth activities of beet root pomace extracts. *Journal of Functional Foods*, 4, 670–678.
- Wilson, N., Shah, N., P. (2007). Microencapsulation of Vitamins. *ASEAN Food Journal*, 14, 1-14.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.
- Wruss, J., Waldenberger, G., Huemer, S., Uygun, P., Lanzerstofer, P., Müller, U., Höglinger, O., Weghuber, J. (2015). Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42, 46-55.
- [www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/betalaini](http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/betalaini)
- Yang, S., Mao, X. Y., Li, F. F., Zhang, D., Leng, X. J., Ren, F. Z., Teng, G. X. (2012). The improving effect of spray-drying encapsulation process on the bitter taste and stability of whey protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*, 235, 91-97.
- Yawadio Nsimba, R., Kikuzaki, H., Konishi, Y. (2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. Seeds. *Journal of Food Chemistry*, 106, 760–766
- Zeisel, S.H. (1999). Regulation of “Nutraceuticals”. *Journal of Science*, 285, 1853-1855.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
- Zoulias, E. I., Oreopoulou, V., Tzia, C. (2002.). Textural properties of low-fat cookies containing carbohydrate- or protein-based fat replacers. *Journal of Food Engineering*, 55, 337-342.

- Zuidam, N. J., Nedović, V. A. (2010). Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, Springer, Verlag New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0>
- Žilić, S., Kocadağlı, T., Vančetović, J., Gökmen, V. (2016). 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 and Technology*, 65, 597-603.



Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

### План третмана података

<b>Назив пројекта/истраживања</b>
<b>Функционални производи на бази цереалија и псеудоцереалија са додатком инкапсулираног екстракта тропца цвекле</b>
<b>Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање</b>
а) Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад, лабораторије на предметима Хемија хране и Органска хемија. б) Универзитет у Милану, Департман за науку о храни, заштити животне средине и нутриционизму (ДеФЕНС), Милано, Италија. в) Савет за истраживања у пољопривреди и анализу аграрне економије (Цреа) - истраживачко одељење за селекцију житарица и унапређење биљних сорти, Сант Анђело Лодиђиано, Италија.
<b>Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање</b>
Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом финансирана су од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, кроз пројекат “Развој производа и адитива од воћа и поврћа са високим садржајем биоактивних једињења” Евиденциони број пројекта: ТР 31044
<b>1. Опис података</b>
<b>1.1 Врста студије</b>
<i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> <u>Докторска дисертација</u>
<b>1.2 Врсте података</b>
а) квантитативни б) квалитативни
<b>1.3. Начин прикупљања података</b>
а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ д) узорци ткива: навести врсту <u>тропца цвекле <i>Beta vulgaris L.</i>, сорта <i>Висор</i></u> ђ) снимци, фотографије: навести врсту <u>фотографије уређаја за сушење и испитивани узорци</u>

- е) текст, навести врсту литература
- ж) мапа, навести врсту \_\_\_\_\_
- з) остало: описати web садржај

### 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

#### 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- а) Excel фајл, датотека .xls
- б) SPSS фајл, датотека \_\_\_\_\_
- с) PDF фајл, датотека \_\_\_\_\_
- д) Текст фајл, датотека .doc
- е) JPG фајл, датотека .jpeg
- ф) Остало, датотека статистички софтвер OriginPro 8 SRO

#### 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли велики број
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број

#### 1.3.3. Поновљена мерења

- а) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је између неколико минута и неколико дана
- б) варијабле које се више пута мере односе се на све експерименталне анализе (укупан садржај полифенолних једињења, флавоноида, беталаина, антиоксидативна активност, итд.)
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као \_\_\_\_\_

Напомене: \_\_\_\_\_

*Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?*

- а) Да
- б) Не

*Ако је одговор не, образложити* \_\_\_\_\_

## 2. Прикупљање података

### 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип хемијска анализа
- б) корелационо истраживање, навести тип Box-Behnken експериментални дизајн
- ц) анализа текста, навести тип тумачење добијених резултата, извођење закључака и поређење са литературним подацима
- д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

- Лабораторијски лиофилизатор, модел Alpha 2-4 LSC
- Спектрофотометар, Multiscan GO
- HPLC анализа, уређај Shimadzu Prominence
- Обрада података статистички софтвер OriginPro 8 SRO.

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? \_\_\_\_\_
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан применом различитих статистичких тестова и одбацивањем екстремних вредности.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Поређењем добијених резултата истраживања са литературним подацима извршена је контрола уноса података у матрицу.

### 3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијум Универзитета Нови Сад.

3.1.2. URL адреса накнадно

3.1.3.

DOI

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? \_\_\_\_\_

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? \_\_\_\_\_

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром?  Да  Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача?  Да  Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да  Не

Образложити

#### 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити \_\_\_\_\_ података \_\_\_\_\_ о \_\_\_\_\_ личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да  Не   
Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да  Не   
Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- a) Подаци нису у отвореном приступу
- b) Подаци су анонимизирани
- c) Остало, навести шта

## 5. Доступност података

### 5.1. Подаци ће бити

- а) јавно доступни
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

### 5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

## 6. Улоге и одговорност

### 6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Мирјана Јакишић, jakisicmirjana@gmail.com

### 6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Мирјана Јакишић, jakisicmirjana@gmail.com

### 6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Мирјана Јакишић, jakisicmirjana@gmail.com