



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

**STABILIZUJUĆI EFEKAT POLISAHARIDNIH
JEDINJENJA INDUSTRIJE ŠEĆERA U
PROIZVODNJI EMULZIJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Zita Šereš

Kandidat:
Nikola Maravić

Novi Sad, 2019.

Univerzitet u Novom Sadu

Tehnološki fakultet

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska publikacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada:

Doktorska disertacija

VR

Autor:

Nikola Maravić

AU

Mentor:

dr Zita Šereš, redovni profesor

MN

Naslov rada:

Stabilizujući efekat polisaharidnih jedinjenja industrije šećera u proizvodnji emulzija

NS

Jezik publikacije:

Srpski, latinica

JZ

Jezik izvoda:

Srpski/Engleski

JZ

Zemlja publikovanja:

Republika Srbija

ZP

Uže geografsko područje:

Vojvodina

UGP

Godina:

2019.

GO

Izdavač:

Tekst autora

IZ

Mesto i adresa:

21000 Novi Sad, Srbija, Bul. cara Lazara 1

MS

Fizički opis:

112 strana, 7 poglavlja, 12 tabela, 37 slika

FO

Naučna oblast:

Prehrambena tehnologija

NO

Naučna disciplina:

Tehnologija šećera

ND

Predmetna odrednica

/ključne reči:

polisaharidi, pektin, vlakna, maltodekstrin, emulzije, disperzione osobine, reologija.

PO/KR

UDK

547.458+664.161]:664.29:544.773.3(043.3)

Čuva se:

ČU

Važna napomena:

VN

Izvod:

IZ:

u biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Nema

Stabilizatori na bazi biopolimera postaju posebno povoljna prirodna rešenja za primenu u kompleksnim sistemima, kao što su emulzije tipa ulja u vodi. U ovoj disertaciji je ispitan individualni i kombinovani uticaj tri stabilizatora na bazi polisaharida (vlakna šećerne repe, pektin šećerne repe i OSA maltodekstrin) na formiranje i stabilnost emulzija kukuruznog ulja u vodi. Ispitan je uticaj četiri različite tehnike emulgovanja (ultrazvučna homogenizacija, visokopritisna homogenizacija, membransko emulgovanje i rotor-stator homogenizacija). Sveobuhvatna karakterizacija koja je obuhvatala ispitivanje fizičko-hemijskih, strukturnih, tenziometrijskih, konduktometrijskih, viskozimetrijskih osobina ispitivanih polisaharida je prikazana u ovoj disertaciji. Dobijeni rezultati veličine kapi emulzija i njihove fizičke stabilnosti ukazuju na dobra stabilizaciona svojstva ispitivanih polisaharida. Interakcije između primenjenih stabilizatora na bazi polisaharida rezultovale su značajnim promenama veličine kapi, zeta potencijala, kringing indeksa i strukture emulzije.

Datum prihvatanja teme:

DP

Datum odbrane:

DO

28.03.2019.

Članovi komisije:

KO

Predsednik: dr Ljubica Dokić, redovni profesor,
Tehnološki fakultet, Novi Sad

Mentor: dr Zita Šereš, redovni profesor,
Tehnološki fakultet, Novi Sad,

Član: dr Jaroslav Katona, vanredni profesor,
Tehnološki fakultet, Novi Sad

Član: dr Dragana Šoronja Simović, vanredni profesor,
Tehnološki fakultet, Novi Sad

Član: dr Veljko Krstonošić, vanredni profesor,
Medicinski fakultet, Novi Sad

University of Novi Sad
Faculty of Technology

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:
ANO
Identification number:
INO
Document type: Monographic publication
DT
Type of record: Textual material printed
TR
Contents code: PhD Thesis
CC
Author: Nikola Maravić
AU
Mentor: Zita Šereš, PhD, full professor
MN
Title: Stabilizing effect of sugar industry polysaccharide
compounds in the production of emulsions
TI
Language of text: Serbian
LT
Language of abstract: Serbian/English
LS
Country of publication: Serbia
CP
Locality of publication: Vojvodina
LP
Publication year: 2019
PY
Publisher: Author reprint
PB
Publication place: 21000, Novi Sad, Serbia, Blvd. Cara Lazara 1
PL
Physical description: 112 pages, 7 chapters, 12 tables, 37 figures
PD
Scientific field: Food Technology
SF
Scientific discipline: Sugar Technology
SD
Key words: polysaccharides, pectin, fibers, maltodextrin, emulsions,
dispersion properties, rheology.
KW
UC 547.458+664.161]:664.29:544.773.3(043.3)
Holding data: Library of Faculty of Technology Novi Sad
HD

Note:

None

N

Abstract:

AB

Biopolymer based stabilizers become particularly favorable natural solutions for use in complex systems, such as oil-in-water emulsions. In following dissertation, the individual and combined effects of three polysaccharide based stabilizers (sugar beet fibers, sugar beet pectin and OSA maltodextrin) on the formation and stability of corn oil emulsions in water were tested. The influence of four different emulsion techniques (ultrasonic homogenization, high-pressure homogenization, membrane emulsification and rotor-stator homogenization) were examined. A comprehensive characterization that included the examination of physico-chemical, structural, tensiometric, conductometric, viscometric characteristics of the polysaccharides examined is presented in this dissertation. The obtained results of the emulsion droplet size and their physical stability indicate good stabilization properties of the polysaccharides examined. The interactions between the applied polysaccharide-based stabilizers resulted in significant changes in the droplet size, zeta potential, creaming index and the structure of the emulsion.

Accepted by the Scientific Board on: 28.03.2019.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board:

DB

President: Ljubica Dokić, PhD, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad

Mentor: Zita Šereš, PhD, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad,

Member: Jaroslav Katona, PhD, associate professor, Faculty of Technology, Novi Sad

Member: Dragana Šoronja Simović, PhD, associate professor, Faculty of Technology, Novi Sad

Member: Veljko Krstonošić, PhD, associate professor, Faculty of Medicine, Novi Sad

PREDGOVOR

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1.
2. TEORIJSKI DEO.....	3.
2.1. Definicija emulzija i opšti pojmovi.....	3.
2.1.1. Stabilnost emulzija.....	5.
2.1.2. Emulgatori i stabilizatori.....	7.
2.2. Polisaharidni stabilizatori.....	10.
2.2.1. Oktenil sukcinat skroba i maltodekstrina.....	11.
2.2.2. Pektin šećerne repe.....	12.
2.2.3. Vlakna šećerne repe.....	14.
2.3. Tehnike proizvodnje emulzija.....	15.
2.3.1. Homogenizacija primenom rotor-stator tehnika.....	16.
2.3.2. Homogenizaciju visokopritisnim homogenizerom.....	19.
2.3.3. Ultrazvučna homogenizacija.....	21.
2.3.4. Membransko emulgovanje.....	24.
3. CILJ RADA SA TEORISKIM POSTAVKAMA.....	28.
4. MATERIJALI I METODE.....	30.
4.1. Materijali.....	30.
4.2. Metode.....	30.
4.2.1. Fizičko-hemijski sastav pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina.....	30.
4.2.2. FTIR analiza pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina.....	30.
4.2.3. Aminokiselinski sastav pektina šećerne repe i vlakana šećerne repe.....	31.
4.2.4. Priprema rastvora pektina šećerne repe.....	31.
4.2.5. Priprema rastvora OSA maltodekstrina.....	32.
4.2.6. Priprema rastvora vlakana šećerne repe.....	33.
4.2.7. Određivanje viskoziteta rastvora pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina.....	33.
4.2.8. Merenja konduktometrijskih osobina rastvora pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina.....	34.
4.2.9. Merenje površinskog napona rastvora pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina.....	34.
4.2.10. Priprema emulzija.....	35.
4.2.11. Merenje veličine i raspodele veličine kapi dobijenih emulzija i čestica polisaharida.....	37.
4.2.12. Merenje zeta potencijala formiranih emulzija.....	38.
4.2.13. Određivanje reoloških karakteristika emulzija.....	38.
4.2.14. Određivanje kringing indeksa emulzija.....	38.
4.2.15. Plan eksperimenta i statistička obrada podataka.....	39.
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	40.
5.1. Karakterizacija pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina.....	40.
5.1.1. Fizičko-hemijski sastav uzoraka polisaharida.....	40.
5.1.2. FTIR spektar uzoraka polisaharida.....	42.
5.1.3. Viskoziteti vodenih rastvora uzoraka polisaharida.....	46.
5.1.4. Specifična provodljivost vodenih rastvora uzoraka polisaharida.....	51.
5.1.5. Površinski napon vodenih rastvora uzoraka polisaharida.....	58.
5.1.6. Veličina čestica vlakana šećerne repe.....	60.

5.2. Osobine emulzija dobijenih stabilizacijom pektinom i vlaknima šećerne repe i OSA maltodekstrinom.....	61.
5.2.1. Veličina kapi emulzija.....	61.
5.2.1.1. Uticaj primenjene tehnike emulgovanja.....	62.
5.2.1.2. Uticaj koncentracije pojedinačnog stabilizatora.....	65.
5.2.1.3. Uticaj međusobnih interakcija stabilizatora.....	70.
5.2.2. Ispitivanje kringing indeksa emulzija.....	79.
5.2.2.1. Uticaj primenjene tehnike emulgovanja.....	79.
5.2.2.2. Uticaj koncentracije pojedinačnog stabilizatora.....	82.
5.2.2.3. Uticaj međusobnih interakcija stabilizatora.....	82.
5.2.3. Reološke karakteristike emulzija.....	90.
5.2.3.1. Uticaj koncentracije pojedinačnog stabilizatora.....	90.
5.2.3.2. Uticaj međusobnih interakcija stabilizatora.....	95.
6. ZAKLJUČAK.....	99.
7. LITERATURA.....	101.

1. UVOD

Polisaharidna jedinjenja, polisaharidi, čine najveći deo biomase u prirodi pa stoga, pri proizvodnji prehrambenih proizvoda iz sirovina prirodnog porekla, često zaostaju kao glavni deo sporednih proizvoda. Polisaharidi predstavljaju polimerne lance koji su sastavljeni iz monomernih jedinica različitih ugljenih hidrata. Primena polisaharida u formulaciji prehrambenih proizvoda je pre svega određena njihovim funkcionalnim karakteristikama, cenom ili željenom strukturom proizvoda. Istraživanja biopolimernih makromolekula na bazi ugljenih hidrata su usmerena u najvećoj meri ka definisanju izvora i karakterizaciji makromolekula sa ciljem zamene postojećih sintetskih aditiva u hrani „prirodnim“ sirovinama jednakih funkcionalnih osobina. Brojna polisaharidna jedinjenja su pronašla primenu u modifikaciji teksturalnih osobina i održivosti proizvoda ili inkapsulaciji bioaktivnih komponenti proizvoda, međutim, za neke od istraživanih polisaharida je ustanovljeno da mogu da formiraju i stabilizuju emulzije različitog tipa. Stabilizatori u vidu hidrokoloida na bazi skroba, pektina ili vlaknastih polisaharida su na taj način dobili novu komercijalnu vrednost u prehrambenoj industriji i povećali interesovanje za daljim istraživanjima u oblasti „prirodnih“ aditiva.

Ipak, emulzije predstavljaju izrazito osetljive nestabilne koloidne sisteme čije osobine u vidu trajnosti, strukture i primene veoma zavise od sastava emulzije i vrste emulgatora (stabilizatora). Veličina i raspodela veličine kapi emulzija i reološke osobine predstavljaju jedne od najbitnijih faktora koji utiču na pomenute karakteristike kako emulzija u prehrambenoj tako i u farmaceutskoj industriji. U cilju uspešne primene polisaharidnih jedinjenja u formulaciji emulzija, neophodno je jasno definisati sve parametre koji utiču na pomenute faktore stabilizacije. Fizičko-hemijski sastav, struktura, konformacija i pokretljivost stabilizatora u rastvoru predstavljaju osnovne osobine koje utiču na proces formiranja emulzionih sistema. Mogućnost kombinovane primene više različitih stabilizatora, sposobnih da pokažu specifične funkcionalne karakteristike u sinergijskom dejstvu, dodatno otežava proces definisanja i identifikacije primene polisaharidnih stabilizatora. Osim same prirode stabilizatora i sastava emulzija, postupak proizvodnje emulzija, koji se naziva emulgovanje, ima veliki uticaj na konačne osobine i ponašanje emulzija u različitim tehnološkim procesima. Upotreba različitih tehnika emulgovanja značajno utiče na vrstu, energiju i intenzitet primenjenih sila dispergovanja pri formiranju emulzije. Primenjene sile, koje za cilj imaju dispergovanje kapi ulja/vode u emulzionom sistemu, utiču i na osobine prisutnih stabilizatora i menjaju njihovu strukturu, konformaciju ili dostupnost određenih funkcionalnih grupa stabilizatora.

Stoga, u ovom radu su ispitana stabilizujuća svojstva tri različita polisaharidna stabilizatora: pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i oktenilsukcinata maltodekstrina. Karakterizacija tri polisaharida je obuhvatala ispitivanje fizičko-hemijskih i strukturalnih osobina, sa posebnim akcentom na definisanje prisutnih hidrofilnih i hidrofobnih funkcionalnih grupa. Sprovedena su ispitivanja tenziometrijskih, viskozimetrijskih i konduktometrijskih osobina vodenih rastvora navedenih polisaharida sa ciljem definisanja stabilizujućeg kapaciteta i mogućih intra- i intermolekulskih interakcija. Primenom četiri različite tehnike (ultrazvučna homogenizacija, visokopritisna homogenizacija, membransko emulgovanje i rotor-stator homogenizacija) formirane su emulzije tipa ulje u vodi stabilizovane jednim ili kombinacijom više polisaharidnih stabilizatora. Dobijene emulzije su ispitane sa stanovišta veličine i raspodele veličine kapi, kriming indeksa i reoloških karakteristika. Rezultatima ovog istraživanja će se otvoriti prostor za dalji razvoj polisaharidnih stabilizatora i samim tim doprineti povećanju tržišne i privredne vrednosti navedenih biopolimernih makromolekula.

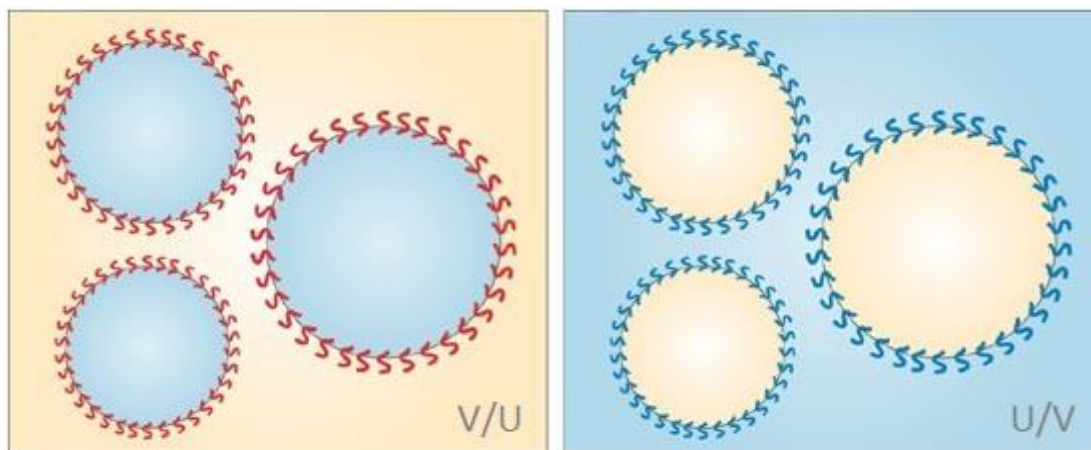
2. TEORIJSKI DEO

2.1. Definicija emulzija i opšti pojmovi

Emulzije kao višefazni sistemi, imaju veliku ulogu u hemijskoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Sastoje se od dve ili više tečnih faza, koje su međusobno nemešljive ali u emulziji stabilizovane upotrebom odgovarajućih jedinjenja - stabilizatora ili emulgatora. Uloga stabilizatora odnosno emulgatora ogleda se u obezbeđivanju stabilnosti i trajnosti formiranog disperznog sistema. Tečna faza (na primer voda) u kojoj su dispergovane kapi druge tečne faze zove se kontinualna faza ili disperzno sredstvo, a druga tečna faza koja je dispergovana u kontinualnoj fazi u obliku sitnih kapi (na primer ulje), naziva se diskontinualna ili disperzna faza (Đaković 1985; McClements, 1999).

Dvofazne emulzije se, prema polarnosti kontinualne i disperzne faze, mogu podeliti na dva tipa:

1. Emulzije tipa voda u ulju (V/U) – voda predstavlja disperznu fazu, a ulje disperzno sredstvo odnosno kontinualnu fazu.
2. Emulzije tipa ulje u vodi (U/V) – ulje predstavlja disperznu fazu, a voda disperzno sredstvo odnosno kontinualnu fazu (Slika 1).



Slika 1. Tipovi emulzija: voda u ulju (levo) i ulje u vodi (desno).

S obzirom da su istraživanja u okviru ovog rada obuhvatala samo emulzije tipa ulje u vodi, u nastavku će se pod pojmom emulzija podrazumevati U/V sistem, osim ako nije drugačije naglašeno.

Emulzije predstavljaju termodinamički nestabilne koloidne sisteme, koji imaju konstantnu težnju da se vremenom razdvoje na početne komponente. Labilna struktura sistema potiče od različitih fizičko-hemijskih osobina kontinualne i diskontinualne faze. Težnja molekula jedne faze da redukuju dodirnu površinu sa molekulima druge faze potiče od snažnih privlačnih međumolekulskih sila između pojedinačnih molekula faza. Pored toga, mešanje ulja i vode znatno otežava i značajno manja gustina ulja, koje u polju sile zemljine teže nastoji da se izdvoji na površini vode (Dokić, 2005; McClements, 2000).

Osnovne karakteristike emulzija su definisane fizičko-hemijskim parametrima kao što su: sastav emulzije (sadržaj ulja, sadržaj vode, količina i vrsta primenjenog emulgatora ili stabilizatora), veličina i raspodela veličine kapi emulzija i reološke osobine emulzija. Osim navedenih parametara, postupak proizvodnje emulzija, koji se naziva emulgovanje, u velikoj meri utiče na konačne osobine i ponašanje emulzija u različitim tehnološkim procesima (Dokić-Baucal, 2002).

Sadržaj ulja, odnosno vode, u emulziji značajno utiče kako na veličinu kapi tako i na reološke osobine emulzija ali i na ponašanje dodatog stabilizatora ili emulgatora. Sa promenom temperature ili povećanjem primenjenih sila smicanja, povećava se i uticaj sadržaja ulja na reološka svojstva emulzije. Rastvorljivost, orijentacija i konformacija kao i pokretljivost stabilizatora ili emulgatora veoma zavisi od odnosa količine ulja i vode (disperzne faze i disperznog sredstva). Primena mešanih emulgatora i stabilizatora može da rezultira u velikim strukturnim promenama u emulziji koje se ogledaju kroz viskozitet, veličinu i raspodelu veličine kapi emulzija kao i njihovoj stabilnosti uopšte (Walstra, 1993; Dokić-Baucal, 2002; Krstonošić, 2010).

Veličina kapi emulzije se opisuje njenim srednjim prečnikom. Srednji prečnici kapi emulzija se mogu odrediti različitim merenjima i različitim jednačinama, pa su tako u upotrebi brojni prosečni prečnik (Number mean diameter, d_n), površinski prosečni prečnik (eng. Sauter mean diameter, $d_{3,2}$), zapreminski prosečni prečnik (eng. De Brouckere mean diameter, $d_{4,3}$), težinski prosečni prečnik (Weighted mean diameter, d_w), itd.

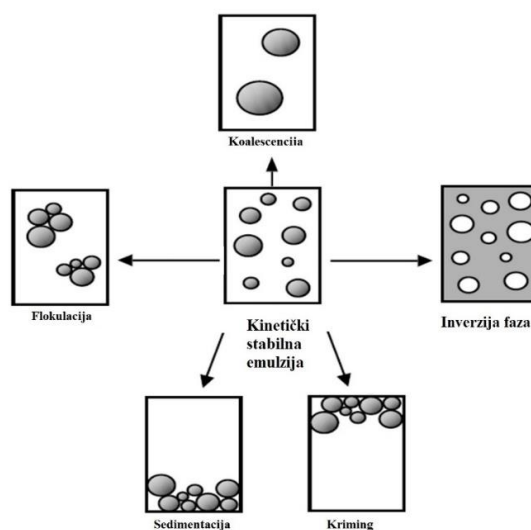
Osim veličine kapi emulzija, raspodela veličine kapi predstavlja jedan od najvažnijih parametara kvaliteta emulzija i njihovih osobina i primene. Veličina i raspodela veličine kapi emulzije predstavljaju parametre koji direktno ukazuju na stabilnost formiranog disperznog sistema tokom vremena ili nakon određenog tretmana. Tokom emulgovanja, promenu prečnika kapi disperzne faze prati konstantna promena njene specifične površine, definisane kao ukupna

površina disperzne faze u njenoj ukupnoj zapremini. Ove promene kao posledicu imaju različite reološke osobine dobijenih emulzija (Dokić i sar., 1999; McClements, 2000).

Reološke osobine emulzija definisane su kroz brojne parametre koji su od izuzetnog značaja sa aspekta stabilnosti, primene i ponašanja u različitim tehnološkim procesima. Zbog svoje kompleksnosti sastava i mogućih interakcija u strukturi, realni sistemi poput emulzija su izuzetno složeni i njihova reološka ponašanja vrlo često odstupaju od teorijskih zavisnosti i reoloških karakteristika pojedinačnih komponenti (Dokić, 2005; Yu i Gunasekaran, 2001). Viskozitet emulzija, kao najvažniji faktor u reološkim svojstvima, direktno zavisi od svih gorenavedenih fizičko-hemijskih parametara i vrlo se lako menja sa promenom sastava, veličine i raspodele veličine kapi ali i sa temperaturom i tipom primenjene tehnike emulgovanja. Od viskoziteta emulzija direktno zavisi i stabilnost emulzija, otpor koalescenciji (pojava spajanja više kapi ulja), aglomeraciji i flokulaciji (pojava grupisanja kapi ulja), sedimentaciji i na kraju inverziji faza (Đaković 1985).

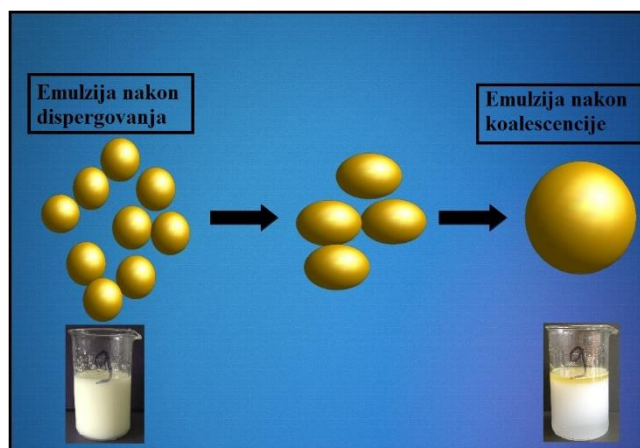
2.1.1. Stabilnost emulzija

Poznavanje i kontrolisanje različitih faktora koji imaju uticaj na stabilnost i razrušavanje disperznog sistema je izuzetno važno jer je u nekim slučajevima neophodno proizvesti emulziju koja je stabilna u dužem vremenskom periodu dok je u drugim slučajevima dovoljan sistem kontrolisane i ograničene stabilnosti. Stabilnost emulzije se kao pojam koristi u opisivanju sposobnosti jedne emulzije da se odupre promenama svojih osobina u toku određenog vremena. Na slici 2. prikazani su različiti fizički mehanizmi koalescencije, flokulacije, sedimentacije, kriminga i inverzije faza, koji su odgovorni za pojavu nestabilnosti emulzija.



Slika 2. Fizički mehanizmi koji utiču na stabilnost emulzija.

U slučaju creaming-a i sedimentacije kapi emulzije ne menjaju svoj oblik i veličinu već se jednostavno rečeno, redistribuiraju u prostoru i, uz primenjeno mešanje, mogu biti vraćene u prvobitno stanje raspodele u emulziji. Flokulacija ili aglomeracija proizilaze iz pojave učestalih fizičko-hemijskih interakcija između kapi emulzija ili njihovih stabilizatora i emulgatora. Grupe kapi, odnosno flokule, često se ne mogu opet redistribuirati u rastvoru i shodno tome mogu imati negativan efekat na kvalitet i trajnost emulzija a samim tim i proizvoda (supe, sosevi). Zbog pomenutih interakcija, struktura flokula je postojana i pri razrušavanju interakcija često dolazi do promena na samom adsorpcionom sloju između dve faze, a samim tim i do pojave koalescencije. Koalescencija predstavlja proces suprotan procesu dispergovanja koji se javlja i prilikom procesa emulgovanja i tokom skladištenja emulzije. U toku procesa emulgovanja, pri dejstvu sila koje dovode do deformacije i usitnjavanja kapi, dolazi i do sudaranja novonastalih kapi što može dovesti do pojave njihovog ponovnog spajanja, tj do nepoželjne pojave koalescencije (Slika 3) (Đaković, 1985; McClements, 2000; Tadros, 2004; Sjobolm, 2005).



Slika 3. Slika emulzije pre i posle pojave koalescencije.

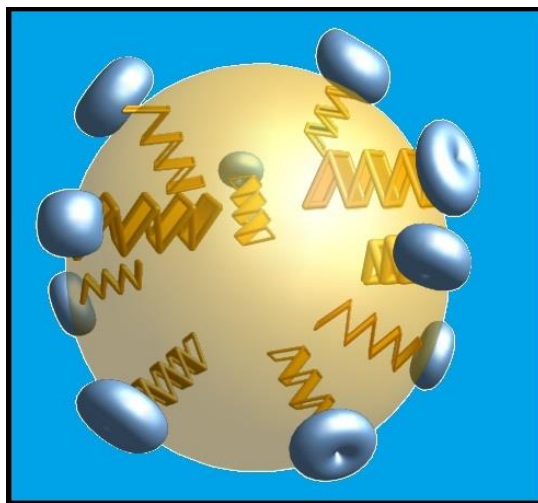
U zavisnosti od tipa emulzije, njenih osobina i primenjene tehnike emulgovanja, nakon određenog vremena dolazi do ravnotežnog stanja između procesa dispergovanja i koalescencije. Izuzetno jake sile smicanja kod nekih kapi uzrokuju usitnjavanje, a kod nekih koalescenciju. S obzirom da se procesi kao što su adsorpcija emulgatora ili stabilizatora na površini kapi emulzije, deformacija kapi, raspodela emulgatora i sudar kapi, odigravaju u milisekundama tokom procesa izrade emulzija, izuzetno je teško identifikovati sve fenomene prisutne na granici faza. Tokom skladištenja emulzija, brojni faktori utiču na pojavu koalescencije kao što su količina i priroda emulgatora, uspešnost procesa adsorpcije na granici faza u toku procesa

emulgovanja, odnosa količine ulje/voda u emulziji, itd. Stoga, gotovo je nemoguće predvideti kojom brzinom i kada će početi da odigrava proces koalescencije (Đaković, 1985; Dokić, 2005; Taisine i sar., 1997).

2.1.2. Emulgatori i stabilizatori

Emulgatori koji se koriste u prehrambenoj industriji se razlikuju na osnovu lipo- i hidrosolubilnosti, koeficienta razlivanja i površinske aktivnosti. Pod emulgatorima se podrazumeva širok spektar hemijskih jedinjenja sposobnih da pokažu amfifilan karakter: sapuni, amini, sulfati, estri masnih kiselina, proteini, itd. Sve suštinske osobine emulgatora potiču od udela lipofilnih i hidrofilnih grupa u molekulu. Broj koji bliže opisuje odnos hidrofilnih i lipofilnih grupa naziva se HLB broj (engleski: Hydrophilic-Lipophilic Balance). Niže HLB vrednosti ukazuju da emulgator ima veći udeo nepolarnih grupa (liposolubilnih), a emulgatori sa većim HLB vrednostima su hidrofilni sa većim udelom polarnih grupa. Stoga, upotreba emulgatora se može podeliti i na osnovu vrednosti HLB broja. Emulgatori sa HLB brojem u opsegu od 3-6 se koriste u proizvodnji emulzija vode u ulju, dok se emulgatori sa HLB brojem između 6-17 koriste kao sredstva za proizvodnju emulzija ulje u vodi. Deterdženti imaju HLB broj između 13-15 a sredstva za poboljšanje kvašenja u opsegu od 7-9 (Đaković, 1985).

Emulgatori tokom dispergovanja/emulgovanja imaju izuzetno veliku ulogu. Uloga i efikasnost emulgatora zavisi od prirode i koncentracije emulgatora, a kao najvažniji uslov postavlja se brzina kojom emulgator dospeva na graničnu površinu između dve faze. Brzina i ali i intenzitet smanjenja međupovršinskog napona predstavljaju važne osobine emulgatora koje utiču na stabilnost i karakteristike formirane emulzije. Emulgator sposoban da se adsorbuje na granici faza (Slika 4) snižava površinski napon i obrazuje zaštitni film koji sprečava pojave nestabilnosti emulzija pomenute u prethodnom poglavlju. Mehanizmom Gibbs-Marangoni efekta, koji se zasniva na prenosu mase u okviru graničnog sloja na osnovu gradijenta površinskog napona, možemo uspešno objasniti stabilizaciju sitnih kapi ulja tokom homogenizacije. Hidrofilni delovi molekula emulgatora se kreću prema graničnoj površini kapi, održavajući nisku vrednost površinskog napona, ali molekuli sa sobom nose i deo polarnog disperznog sredstva, koje ispunjava prostor između kapi sprečavajući koalescenciju. Na ovaj način možemo pretpostaviti uspešnost adsorpcije hidrosolubilnih emulgatora i formiranje sloja dovoljne koncentracije na graničnoj površini faza (Walstra i sar., 1997).



Slika 4. Ponašanje emulgatora u emulziji tipa ulje u vodi.

Prisutan Gibbs-Marangoni efekat deluje pozitivno na sprečavanje koalescencije emulzije u toku procesa izrade ali nema značajan uticaj na gotove emulzije kod kojih je adsorbovana ravnotežna koncentracija emulgatora. Važno je istaći da je za dobijanje stabilne emulzije neophodno postići minimalnu graničnu koncentraciju emulgatora u kontinualnoj fazi. Površinski napon na granici faza linearno opada sa porastom koncentracije emulgatora do postizanja granične koncentracije nakon koje je vrednost površinskog napona konstantna (McClements, 1999; Krstonošić, 2010).

Stoga, mehanizam kojim se može dostići stabilnost emulzija je najčešće adsorpcija, ali postoje i drugi mehanizmi, kao što je povećanje viskoziteta kontinualne faze pomoću makromolekula (hidrokoloida) koji deluju kao stabilizatori (Dickinson, 2009).

Stabilizatori emulzija mogu biti pojedinačna hemijska jedinjenja, ali i razne smeše koje daju stabilnost u dužem vremenskom intervalu i imaju više od jedne uloge u formiranom proizvodu (Dickinson, 2003).

Glavna osobina korišćena u cilju razlikovanja stabilizatora od emulgatora ogleda se u načinu na koji stabilizuju disperziju. Emulgatori su po pravilu površinski aktivne materije relativno malih molekulskih masa dok su stabilizatori uglavnom relativno veliki molekuli koji stabilizuju disperziju povećanjem viskoziteta kontinualne faze (po pravilu vode). Međutim, ova razlika nije uvek jasna jer neki stabilizatori pokazuju površinsku aktivnost dok neki emulgatori značajno povećavaju viskozitet disperznog sredstva u kome su rastvoreni (Dokić, 2005).

Pod pojmom stabilizatora se stoga najčešće podrazumevaju hidrokoloide koji obuhvataju širok spektar makromolekula od polisaharida ekstrahovanih iz biljaka ili mikrobioiloških izvora, preko biljnih guma i galaktomanana do biopolimera na bazi skroba ili celuloze modificovanih hemijskim ili enzimskim putem. Zbog svojih prirodnih osobina, biokompatibilnosti, netoksičnosti i niske cene, nalaze široku upotrebu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Dickinson, 2003; Dokić i sar, 2012; Agama-Acevedo i Bello-Perez, 2017).

Osim rastvornih hidrokoloida, kao stabilizatori, mogu se koristiti i čvrste čestice koloidnih veličina. Ovakve čestice, specifičnih dimenzija, se mogu adsorbovati na graničnoj površini između ulja i vode i tako stvoriti gusto pakovani film na površini disperzne faze. Na ovaj način, čestice formiraju čvrstu „ljusku“ oko kapi emulzije i sprečavaju pojavu koalescencije. Stabilizaciju emulzija čvrstim česticama je prvi istraživao Pickering, pa su po njemu i nazvane „Pickering“ emulzije (Pickering, 1907; Lam i sar., 2014).

Neadsorbujući stabilizatori (najčešće polimeri), koji stabilizuju emulziju samo povećanjem viskoziteta disperznog sredstva, mogu izazvati i negativni efekat destabilizacije emulzije deplecionom flokulacijom, kada koncentracija ovih stabilizatora prelazi nivo kritične flokulacione koncentracije (KFK). Do ovog fenomena dolazi kada između kapi diskontinualne faze nema dovoljne količine polimera, pa se rastojanje između kapi diskontinualne faze smanji ispod vrednosti prečnika slobodnog molekula polimera. Tada dolazi do pojave lokalnog gradijenta (osmotskog pritiska) koji uzrokuje privlačenje kapi disperzne faze i istiskivanje kontinualne faze, koja se nalazi između njih. Novostvorene flokule brže isplivavaju na površinu od pojedinačnih kapi i dalje destabilizuju emulziju. KFK opada sa porastom molekulske mase polimera i zapreminskog udela disperzne faze u emulziji. Međutim, ukoliko se koncentracija neadsorbovanog polimera poveća iznad kritične viskozitetne koncentracije (KVK) polimera, dolazi do smanjenja separacije, jer emulzija ostaje stabilnija zbog povećanog viskoziteta disperznog sredstva. U većini slučajeva, osim pojedinih izuzetaka, KVK je viša od KFK (McClements, 2000; Bai i sar., 2017a)

Na osnovu svega pomenutog, McClements (2000) je definisao četiri oblasti stabilnosti emulzija sa neadsorbujućim stabilizatorima:

1. Nestabilna – odsustvo flokulacije ($c < KFK$) sa niskim viskozitetom ($c < KVK$).

2. Izrazito nestabilna – pored niskog viskoziteta ($c < KVK$) dolazi do pojave flokulacije ($c > KFK$). Nizak viskozitet nije dovoljan da zaustavi isplivanje većih flokula koje se brže kreću.
3. Stabilna – odsustvo flokulacije ($c < KFK$) usled velikog viskoziteta ($c > KVK$) koji onemogućava kretanje kapi.
4. Stabilna – pojava flokulacije ($c > KFK$) ali uz povećan viskozitet ($c > KVK$) nema kretanja kapi.

2.2. Polisaharidni stabilizatori

Veliki broj identičnih monomera, kovalentno povezanih čini jedan makromolekul ili, kako se još naziva, polimer. Polimeri predstavljaju krupne molekule, relativno velike molekulске mase (preko 10000 Da). Prema stepenu polimerizacije (SP), tj, po broju monomera u lancu Štaudinger je podelio polimere na: niskomolekularne ($SP < 10$), hemikoloidne ($SP = 10-100$), mezokoloidne ($SP = 100-500$) i na kraju makromolekularne ($SP > 500$). Takođe, mogu se klasifikovati na osnovu naelektrisanja na: polielektrolite (naelektrisani polimeri) i nejonski polimeri (nenaelektrisani polimeri) (Đaković, 1985; Sun 2004).

Ukoliko su polimerni lanci sastavljeni od monomera iz klase ugljenih hidrata, nazivaju se polisaharidi. Polisaharidi predstavljaju najveći deo biomase u prirodi. Preko 90% svih ugljenih hidrata u prirodi se nalaze u obliku polisaharida. Polisaharidi koji su sastavljeni od samo jedne vrste monosaharida se nazivaju homoglukani (celuloza, skrob) a u slučaju da su sastavljeni od dva ili više monosaharida nazivaju se heteroglukani (hemiceluloza, pektin, guar guma). Homoglukani su najčešće linearni lanci dok su heteroglukani uglavnom razgranate strukture. Strukturalna karakterizacija polisaharida se vrši na osnovu: monosaharidnog sastava, tipa veza, sekvence monosaharida, anomernih konfiguracija, prisustva i pozicije supstituisanih grupa i stepena polimerizacije (BeMiller, 2018).

Primena odgovarajućih polisaharida u formulaciji hrane određena je specifičnim makromolekularnim i funkcionalnim karakteristikama, raspoloživošću, strukturom proizvoda ili cenom (Dickinson i Lorient, 2007).

Stalno rastuća potražnja za „prirodnim“ proizvodima bez sintetičkih aditiva snažno podržava dalja istraživanja u cilju uvođenja prirodnih sastojaka koji mogu zameniti sintetičke aditive. Poslednjih decenija, sa povećanjem cena hrane, brojne studije se bave različitim

sporednim proizvodima, niskih cena, iz raznih poljoprivredno-prehrambenih industrija sa ciljem da istraže i razrade moguće izvore specifičnog materijala, tačnije odgovarajućih biopolimernih makromolekula koji se mogu primeniti u već postojećim formulacijama hrane (Gómez-Guillen i sar., 2011; Šoronja-Simović i sar., 2016; Bai i sar., 2017a; Alipour i sar., 2018; Karnik i Vicker, 2018).

Za neke od istraživanih stabilizatora na bazi biopolimera, kao što su hidrokoloide na bazi skroba, pektina šećerne repe ili vlaknastih polisaharida, ustanovljeno je da mogu da formiraju i stabilizuju emulzije u hrani i drugim proizvodima (Dokić i sar., 2008; Moschakis i sar., 2010; Chen i sar., 2016; Agama-Acevedo i Bello-Perez, 2017; Bai i sar., 2017b; Zhai i sar., 2018).

2.2.1. Oktenil sukcinat skroba i maltodekstrina

Hidrokoloide na bazi skroba su već godinama predmet intenzivnih istraživanja i ispitivanja, verovatno najbrojnijih i najintenzivnijih u odnosu na bilo koju drugu vrstu biopolimera (Dokić i sar., 2008).

Da bi se zadovoljili zahtevi potrošača za sirovinama prirodnog porekla ali i da se istovremeno obezbede sve potrebne funkcionalne karakteristike biopolimera, predloženo je nekoliko modifikacija skroba (Dokić i sar., 1998; Hadnađev i sar., 2014; Fonseca-Florido i sar., 2018).

Modifikacija skroba sa anhidridom ćilibarne kiseline je patentirana još 1953.godine. Ova modifikacija obuhvata esterifikaciju skroba oktenil sukcinat anhidridom na jednom od tri ugljenikova atoma molekula glukoze (C2, C3 i C6) gde se po opisanom postupku dobijaju oktenil sukcinati skroba. Proces esterifikacije odnosno supstitucije se odigrava u najvećoj meri na razgranatim lancima glukoze (amilopektin) a stepen supstitucije (DS vrednost – engl. *degree of substitution*) iznosi od 1-3% i takvom skrobu je od strane nadležnih tela odobrena upotreba u prehrambenim proizvodima (Caldwell i Wurzburg, 1953; Shorgen, 2000; Nilsson i Bergenståhl, 2007; Varona, 2009).

Oktenil-sukcinatni skrobovi (OSAs) i maltodekstrini (OSAm) su prepoznati kao posebno efikasni stabilizatori u proizvodnji U/V emulzija. Amfifilna priroda OSAm dobija se uvođenjem hidrofobne (oktenilsukcinatne grupe) u strukturu skrobnih granula koja zatim prolazi enzimsku hidrolizu radi proizvodnje manjih molekula, maltodekstrina, rastvorljivih u hladnoj vodi. Osim hidrofobnosti, OSA grupa obezbeđuje skrobu i osobine slabog elektrolita

jer sadrži karboksilnu grupu koja može biti negativno naelektrisana. Dobijeni maltodekstrini su u stanju da ispolje specifične površinski aktivne i stabilizujuće osobine. Kratki nizovi oktenil sukcinata, koji su bočno vezani na lanac makromolekula, dovode skrob/maltodekstrin na granicu faza U/V gde se hidrofobni delovi pozicioniraju u uljanoj fazi a dugi lanci amilopektina u vodenoj fazi tako sprečavajući flokulaciju i koalescenciju kapi mehanizmom sternih smetnji (Nilsson i Bergenståhl, 2007; Dokić i sar., 2008; Hadnađev i sar., 2014; Li i sar., 2014).

Povećanje viskoziteta u kombinaciji sa aktivnošću OSA skroba/maltodekstrina na granici faza omogućava ovom makromolekulu da igra ulogu i stabilizatora i emulgatora u emulzionim sistemima. Takođe, vrlo mala koncentracija OSA skroba/maltodekstrina neophodna za proizvodnju stabilne emulzije omogućava široku upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Tesch, 2002; Modig, 2006).

Međutim, smanjenje molekulske mase skroba ima negativan uticaj na debljinu formiranog površinskog sloja na granici faza, a time se gubi i prednost skroba kao makromolekula. Zbog toga su neophodne dodatne studije koje imaju za cilj da umanje pomenuti negativni efekat, kao što je zaključeno u dosadašnjim istraživanjima (Agama-Acevedo i Bello-Perez, 2017).

2.2.2. Pektin šećerne repe

U procesu proizvodnje šećera iz šećerne repe, osim glavnog proizvoda – kristalne saharoze, dobijaju se i dva važna sporedna proizvoda – izluženi (ekstrahovani) rezanci šećerne repe i tamni mrki sirup – melasa (Asadi, 2007).

Rezanci šećerne repe se prvenstveno koriste kao osnova hrane za životinje, međutim, visok sadržaj pektina (20 do 30% suve materije čini pektin), i relativno niska cena i laka dostupnost, otvaraju nove načine valorizacije ovog sporednog proizvoda (Lv i sar., 2013).

Pektin šećerne repe se po svojim fizičko-hemijskim karakteristikama značajno razlikuje od ostalih biljnih i komercijalnih pektina. Razgranata struktura, mnoštvo bočnih lanaca, visok sadržaj acetil i metoksi grupa kao i sadržaj fenolnih kiselina i proteina razlikuje ovu vrstu pektina od ostalih biljnih pektina poput limunskog ili jabučnog. Važno je napomenuti da šećerna repa, za razliku od drugih biljnih izvora pektina, kod kojih u toku razvoja biljke i sazrevanja, dolazi do smanjenja količine pektina usled enzimskog omekšavanja ploda, sadrži

istu količinu pektina i u nezrelom i u zrelom plodu (Marry et al., 2000; Funami i sar., 2009; Morris i sar., 2010; Ochoa-Villarreal i sar., 2012; Ma i sar., 2013).

Strukturalne razlike pektina šećerne repe dovode i do funkcionalnih razlika pa tako, za razliku od drugih biljnih pektina, pektin šećerne repe, izuzetno teško formira gelove čak i pri niskoj pH vrednosi, prisustvu kalcijumovih jona ili u prisustvu visoke koncentracije šećera. Značajno smanjena gelirajuća moć potiče od velikog broja bočnih lanaca, acetil grupa, kao i generalno niže molekulske mase, u poređenju sa pektinima jabuke ili limuna. Visoko acetilovani pektin šećerne repe usled sternih smetnji sprečava formiranje jonskih unakrsnih veza, uz pomoć katjonskih dvovalentnih metala (npr. kalcijuma), između lanaca galakturonskih kiselina preko slobodnih karboksilnih grupa. Modifikacijom ovakvog pektina, najčešće, tretmanom sa zakišljenim metanolom, uklanjaju se bočne acetil grupe a postepeno se povećava stepen metilesterifikacije, ali se istovremeno smanjuje broj molekula galakturonske kiseline i na taj način se pospešuje upotreba pektina šećerne repe kao gelirajućeg sredstva (Funami i sar., 2009; Patova i sar., 2014).

Ugljenohidratni lanci u pektinu šećerne repe sastavljeni su od galakturonske kiseline (55%), glukoze (20%), arabinoze (15%), galaktoze (5%), ksiloze (2%), ramnoze (1%), fruktoze (1%) i zanemarljive količine manoze. Struktura pektinskih polisaharida uključuje homogalakturonske (HG), ramnogalakturonske I (RG-I) i ramnogalakturonske II (RG-II) lance u razgranatoj strukturi. Takođe, određeno je i prisustvo ksilogalakturonskog lanaca (KSGA). Pektin šećerne repe sadrži 7-8% metil i oko 7% acetil grupa (stepen acetilacije skoro 60%) kao i malu količinu (~0.5%) ferulne, hlorogene, p-kumarinske i ostalih fenolnih kiselina prisutnih u repi. Sadržaj proteina u zavisnosti od proizvodnog procesa varira od 3% do 10% što je slučaj i kod ostalih polisahardnih stabilizatora poput gume akacije. Zbog svega navedenog pektin šećerne repe se mnogo češće u prehrambenoj industriji upotrebljava kao stabilizator emulzija, nego kao gelirajuće sredstvo. U nekoliko prethodnih istraživanja je zaključeno da frakcije pektina koje formiraju stabilne emulzije, odnosno one koje se adsorbuju na granici faza ulje/voda, su bogatije proteinima, čije prisustvo nije uobičajno u pektinima jabuke ili limuna (Funami i sar., 2007; Ochoa-Villarreal i sar., 2012; Lv i sar., 2013; Wicker i sar., 2014; Babbar i sar., 2015; Chen, Fu i Luo, 2016; Bai i sar., 2017b).

Ipak, stabilizujuća svojstva pektina šećerne repe potiču od nekoliko strukturalnih činioca pektina. Emulgujuća efikasnost pre svega zavisi od hidrofobnih komponenata, posebno ferulne kiseline i hidrofobnih delova proteina koji su prisutni u pektinu, a ne od ugljenohidratnih delova pektina. Ove funkcionalne grupe omogućavaju adsorpciju pektina na površinu kapi ulja, tako

što se vezuju za kapi ulja usled svoje delimične hidrofobnosti u odnosu na hidrofilni ugljenohidratni lanac, i na taj način omogućavaju stvaranje emulzije. Međutim, u dosadašnjim istraživanjima nije uočena snažna korelacija između sadržaja proteina i emulgujuće aktivnosti. Tako da se može zaključiti da su dosadašnji literarni podaci prilično neusaglašeni po pitanju uloge proteina u emulgujućoj aktivnosti pektina šećerne repe. Takođe, priroda proteina i aminokiselinski sastav proteina, verovatno imaju uticaj na emulgujuću aktivnost i efikasnost pektina šećerne repe. Osim proteina, stepen acetil esterifikacije utiče na sveukupnu hidrofobnost molekula (Funami i sar., 2009; Wicker i sar., 2014).

Emulgujuća stabilnost se pre svega pripisuje i dominantnom ugljenohidratnom delu, koji kroz povećanje viskoziteta, sternih smetnji i elektrostatičkih interakcija usporava procese flokulacije i koalescencije kapi ulja. Povećanje viskoziteta rastvora upotrebom pektina šećerne repe je nekoliko puta intenzivnije, pri jednakim koncentracijama, u poređenju sa drugim polisaharidnim stabilizatorima poput gume arabike (Lv i sar., 2013; Bai i sar., 2017b).

U praksi se stoga predlaže upotreba hidrokoloida kao što je pektin šećerne repe u kombinaciji sa drugim emulgujućim agensima i stabilizatorima (McClements i sar., 2007; Wicker et al., 2014).

2.2.3. Vlakna šećerne repe

Industrija proizvodnje šećera iz šećerne repe proizvodi više od 10^7 tona ekstrahovanih rezanaca šećerne repe samo u zapadnoj Evropi. Vlaknasti polisaharidni materijal predstavlja najzastupljeniji i najobimniji sporedni proizvod u poljoprivredno-prehrambenoj industriji u Evropi uopšte (Dinand et al., 1996; Šoronja-Simović i sar., 2016).

Ekstrahovani rezanci šećerne repe se uglavnom koriste kao stočna hrana, ali u poslednjih nekoliko decenija naučna i stručna javnost se intenzivnije bavi istraživanjima u cilju njegove različite primene, od upotrebe u ljudskoj ishrani do proizvodnje fermentabilnih šećera za proizvodnju biogoriva. Najveća komercijalizacija ekstrahovanih rezanaca odnosno vlakana šećerne repe u prehrambenoj industriji je izvršena kroz ekstrakciju pektina šećerne repe, kao vrednog emulzionog sredstva koji je pronašao veliko tržište u poslednjim decenijama, što je opisano u prethodnom poglavlju (Leroux i sar., 2003; Gyura i sar., 2016; Šoronja-Simović i sar., 2017; Maravić i sar., 2018).

Međutim, istraživači kao što je *Bergenstahl* (1988) su još pre nekoliko decenija istakli sposobnost i ostalih polisaharida da deluju kao stabilizatori emulzija obloženih surfaktantima, kroz adsorpciju polisaharida na formiranoj međufaznoj površini kapi emulzije. Osim toga, potencijalno prisustvo kompleksa proteina i polisaharida u vlaknima šećerne repe predlaže dalje istraživanje primenljivosti ovog sporednog proizvoda u oblasti emulzionih sistema (Dickinson, 2007).

Vlakna šećerne repe u najvećoj meri čine nerastvorljiva vlakna (62%) odnosno celuloza i hemiceluloza a rastvorljiva vlakna (25%) potiču od sastava pektina šećerne repe i dela hemiceluloze rastvorljive u vodi. Osim sadržaja polisaharida, prisutan je i značajan udeo proteina (9%) čiji sastav obuhvataju aminokiseline sa hidrofilnim i hidrofobnim funkcionalnim grupama. S obzirom na nutritivna i funkcionalna svojstva, važno je navesti i značajan sastav fenolnih kiselina u vlaknima šećerne repe od kojih se najvećim sastavom ističu ferulna, p-kumarinska, hlorogena i gentizinska kiselina (van der Poel, 1998; Sakač i sar., 2004; Šoronja-Simović i sar., 2016; Maravić i sar., 2018; Maravić i sar., 2019).

Uprkos svim pomenutim osobinama vlakana šećerne repe, njihova upotreba u proizvodnji emulzija nije u velikoj meri ispitivana do sada. Osim nekoliko istraživanja, koja su se bavila pre svega dodatkom vlakana šećerne repe u specifične mesne proizvode u cilju zamene određene količine masti uz minimalne promene boje, teksture kao i ostalih senzorskih osobina proizvoda, u naučnoj bazi podataka nema detaljnijih istraživanja stabilizujućih svojstava pomenutih vlakana. *Ađar i sar.*, (2016) su ispitivali efekat dodatka vlakana šećerne repe u proizvodnji mesnih emulzija, u količini od 2 do 8g /100 g proizvoda, gde su ukazali na značajno povećanje viskoziteta i nenjutnovsko (pseudoplastično) proticanje dobijenog proizvoda. Takođe, zaključeno je da se dobijene emulzije mesa ponašaju kao slabi gelovi makromolekularnih disperzija (Javidipour i sar., 2005; Ađar i sar., 2016).

Stoga, ostaje veliki prostor za istraživanja o upotrebi vlakana šećerne repe u svom nativnom obliku u proizvodnji emulzija i njihovoj stabilizaciji.

2.3. Tehnike proizvodnje emulzija

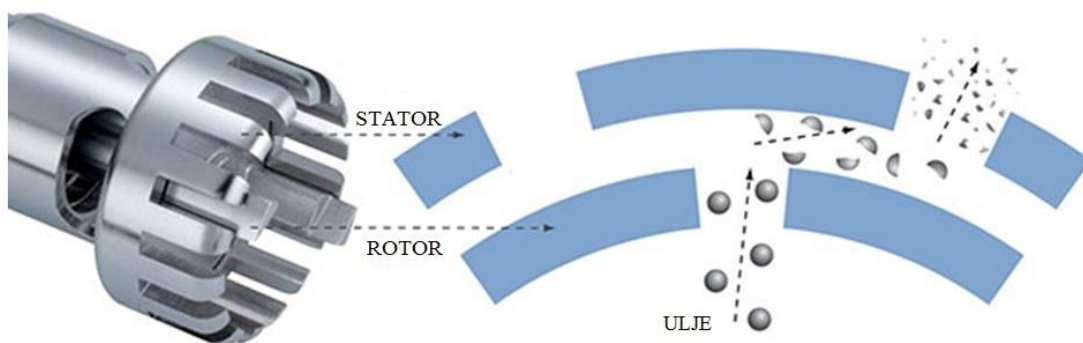
Tehnike mehaničke proizvodnje emulzija obuhvataju niz procesa u kojima se unošenjem izvesne količine energije disperguju kapi diskontinualne faze, najčešće ulja, u vodi

koja najčešće igra ulogu kontinualne faze. Prema obliku primenjene sile, energije i tehnike izvođenja procesa dispergovanja, neke od najčešće korišćenih tehnika emulgovanja se mogu podeliti na:

- a) Homogenizaciju primenom rotor-stator tehnika,
- b) Homogenizaciju visokopritisnim homogenizerom,
- c) Ultrazvučnu homogenizaciju i
- d) Membransko emulgovanje

2.3.1. Homogenizacija primenom rotor-stator tehnika

Homogenizeri na bazi rotor-stator tehnika predstavljaju mašine za intenzivno usitnjavanje čvrstih čestica ili tečnih faza, a još se nazivaju i „dispergatori“. Usitnjavanje se kod ovakvih uređaja ostvaruje primenom jakih sila smicanja između zubaca nazubljenog rotora i statora koji se nalaze na veoma bliskom rastojanju. Smeša kontinualne i diskontinualne faze se proteruje kroz prostor između zubaca, obrtanjem nazubljenog rotora, pri čemu dolazi do jake turbulencije izazvane poprečnim smicajnim silama i kao rezultat dolazi do intenzivnog usitnjavanja kapi diskontinualne faze (npr. ulja) (Slika 5). Brzina obrtanja rotora može da se kreće od 2000 do 20000 o/min. U ovakvim uređajima formiraju se disperzije veoma malih čestica, 0,2-5 μm , ali ipak znatno većih od veličina čestica pravih koloidnih rastvora (Đaković, 1985; Jafari i sar., 2008).



Slika 5. Prikaz glavnog dela uređaja za homogenizaciju na bazi rotor-stator tehnike.

U rotor – stator dispergatorima, prosečna brzina smicanja (γ) u razmaku između rotora i statora, od koje direktno zavise i prisutne smicajne sile, se može izračunati jednačinom (1) ako su brzina rotora i geometrija mešalice poznati:

$$\gamma = \pi \cdot D \cdot N / \delta = K_1 \cdot N \quad (1)$$

gde su: D - spoljašnji prečnik rotora, δ - širina razmaka između rotora i statora, N – brzina obrtanja rotora, K_1 – konstanta smicanja.

Teoretski, u ovom slučaju, nema potrebe za eksperimentalnim podacima. Međutim, rezultati su pokazali da K_1 značajno zavisi od reoloških svojstava tečnosti pa je prema tome, neophodno i eksperimentalno određivanje (Pacek i sar., 2013).

Usled izuzetno velikih brzina obrtanja rotora, stoga i specifično velike količine energije oslobođene u disperziji tokom procesa emulgovanja, u ovakvim uređajima je neophodno obezbediti hlađenje, odnosno temperiranje, celog sistema u cilju sprečavanja nepoželjnih termičkih promena. Termičke promene tokom izrade emulzija rotor-stator tehnikom mogu izazvati razne nutritivne, funkcionalne i tehničke probleme. Visoke temperature disperznog sistema mogu prouzrokovati denaturaciju ili strukturalnu promenu prisutnih bioaktivnih jedinjenja. Takođe, sa tehničke strane uspešnog izvođenja procesa emulgovanja, povećanje temperature utiče na smanjenje viskoziteta faza a samim tim i do manjih smicajnih sila u prostoru gde dolazi do usitnjavanja kapi što može rezultovati povećanjem prečnika kapi disperzne faze (Đaković, 1985; Jafari i McClements, 2018).

Rotor-stator tehnika se u procesu proizvodnje emulzija koristi i kao predtretman, u proizvodnji emulzija veoma sitnih kapi, nano- i koloidnih veličina, ali i kao glavni proces emulgovanja koji je do sada, u poređenju sa ostalim tehnikama emulgovanja, u najvećoj meri komercijalizovan u industrijskim postrojenjima (Pacek i sar, 2013).

Upotreba rotor-stator tehnike u proizvodnji emulzija sa stabilizatorima na bazi polisaharida je istraživana u proteklim decenijama. Studija sprovedena od strane *Matos i sar.* (2018) je pokazala da se emulzije stabilizovane granulama skroba iz raznih biljnih izvora (kinoa, pirinač, amarant) mogu uspešno dispergovati i stabilizovati tehnikom rotor-stator homogenizacije. U ovoj studiji je varirana brzina obrtanja rotora od 6500 – 20000 o/min u cilju dobijanja uvek istih prečnika kapi emulzije pri različitim količinama stabilizatora, emulgatora i odnosa kontinualne i disperzne faze. *Krstonošić i sar.*, (2015) su pokazali da veličina kapi emulzija dobijenih homogenizacijom pri konstantnoj brzini obrtaja rotora (9500 o/min) direktno zavisi od

koncentracije OSA modifikovanog skroba kao i koncentracije smeše OSA skroba i dodatnog polisaharidnog stabilizatora (ksantan gume). Pri izradi emulzija upotrebom OSA skroba i rotor – stator homogenizera ne dolazi do prividnog povećanja srednjeg prečnika kapi emulzija, izazvanog formiranjem adsorpcionog sloja makromolekula na površini kapi emulzija, usled izuzetnog malog udela debljine adsorpcionog sloja u ukupnom prečniku ovako dobijenih kapi za razliku od nekih drugih tehnika emulgovanja (Taherian i sar., 2006; Dokić i sar., 2012).

U dosadašnjim istraživanjima sprovedenim sa ciljem ispitivanja stabilizujućeg svojstva pektina šećerne repe homogenizacija rotor-stator tehnikom je prevashodno korišćena kao predtretman glavnom procesu dispergovanja upotrebom visokopritisne homogenizacije (Funami i sar, 2007; Nakauma i sar., 2008 Chen, Fu i Luo, 2015, 2016).

Međutim, u brojnim studijama se može pronaći i upotreba rotor-stator tehnike kao glavnog procesa emulgovanja sa pektinom šećerne repe. *Williams i sar.* (2005) su nakon prvih istraživanja ustanovili da pri homogenizaciji emulzija sa pektinom šećerne repe rotor-stator tehnikom, optimalno vreme dispergovanja iznosi 4 minuta, pri brzini obrtanja rotora većoj od 20000 o/min. *Siew i Williams* (2008) su upotrebom ove tehnike utvrdili da su kapi emulzija dobijenih upotrebom pektina šećerne repe, manje od kapi emulzija dobijenih stabilizacijom gumom arabikom pri jednakim koncentracijama hidrokoloida. *Yancheva i sar.* (2016) su dužim procesom homogenizacije i manjim brojem obrtaja rotora ispitivali emulgujuća svojstva pektina ekstrahovanih iz raličitih biljnih izvora.

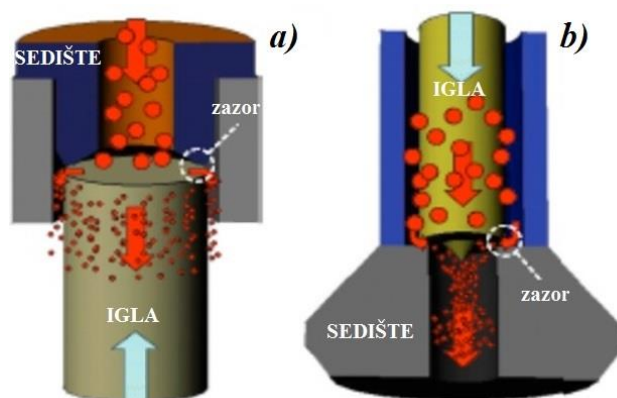
Rotor-stator tehnika je zbog svojih specifičnih karakteristika našla veliku upotrebu u formiranju disperzija stabilizovanih vlaknastim polisaharidima i kompleksima na bazi vlakna-protein. Korišćenjem ove tehnike, osim usitnjavanja disperzne faze (ulja), dolazi i do usitnjavanja samih čestica vlakana i boljeg efekta stabilizacije emulzija formiranim kompleksima vlakna-protein (Diftis i Kiosseoglou, 2003; de Castro Santana i sar, 2012; Desplanques i sar., 2012).

Ispitivanja koja su sproveli *de Castro Santana i sar.* (2012) pokazuju veliki uticaj primenjene tehnike emulgovanja pri izradi emulzija sa vlaknima kolagena, sa visokim sadržajem proteina, kao i glavne nedostatke rotor-stator tehnike u poređenju sa energetski intenzivnijim procesima emulgovanja. Takođe, pri upotrebi hidrokoloida na bazi vlakana i proteina i rotor-stator tehnike emulgovanja, nije moguće proizvesti monodisperzne emulzije sa prečnikom kapi manjim od 1 µm usled značajnog rasipanja mehaničke energije unesene u proces u obliku toplote (Anton, Benoit i Saulnier, 2008; de Castro Santana i sar, 2012).

2.3.2. Homogenizacija visokopritisnim homogenizerom

Visokopritisni homogenizeri (VPH) su specifični uređaji koji se primenjuju u širokom spektru tehnologije ultra- i visokopritisne obrade hrane. VPH su se razvili daljim usavršavanjem postojećih procesa homogenizacije povećanjem energije koja se unosi u sistem u procesu dispergovanja. Posebnom konstrukcijom uređaja, tretirani fluidi se prolaskom kroz zazor malih dimenzija (2-30 μm) izlažu pritiscima i do 400 MPa. Homogenizeri visokog pritiska obično se sastoje od pumpe visokog pritiska, uglavnom u obliku pumpe sa jednim ili tri klipa, koja se može električnim ili pneumatskim putem aktivirati, i jedinice (modula) za disperziju visokim pritiskom. Homogenizeri su obično opremljeni visokopritisnim i niskopritisnim ventilima. Procesne karakteristike najviše zavise od dizajna ventila (visina i oblik ventilskog razmaka, geometrijskih karakteristika, dizajna igle i sedišta), ali i od fizičko-hemijskih osobina fluida (viskozitet, gustina). Podešavanjem razdaljine između pomične igle (cilindrični klip) i fiksnog sedišta definiše se primenjeni pritisak na tretirani uzorak. Jedinice za disperziju visokog pritiska su podeljene na istostrujne (smer kretanja udarne igle i fluida) - radijalne i aksijalne ventilske dispergatore i protivstrujne dispergatore (Slika 6). (Burgaud, Dickinson i Nelson, 1990; Schultz i sar., 2004; Flourey, 2004).

U slučaju visokopritisne homogenizacije (*high pressure homogenization-HPH*) u toku procesa dispergovanja postižu se radni pritisci do 200 MPa, dok se u ultravisokopritisnoj homogenizaciji (*ultra high pressure homogenization-UHPH*) postižu radni pritisci i do 350-400 MPa. Radi poređenja, u primeni konvencionalnih tehnika homogenizacije ostvaruju se pritisci od 12-25 MPa, koji nastaju prolaskom tretiranog fluida kroz otvore veličina 250-300 μm (Flourey, 2004; Schultz i sar., 2004).



Slika 6. Tipovi VPH homogenizera: a) protivstrujni; b) istostrujni.

Specifična količina energije unesene u dati sistem se najčešće izražava kao Energetska gustina E_g (J/m^3) i računa se po jednačini (2):

$$E_g = P \cdot V = \Delta p \quad (2)$$

Gde je P – unos energije u emulziju (W), V – protok emulzije (m^3/s), Δp – pritisak homogenizacije (Karbstein, 1994).

Tehnologija visokopritisne homogenizacije se primenjuje u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji u cilju formiranja stabilnih emulzija, modifikovanja reoloških osobina fluida, ekstrakcije različitih metabolita i dekompozicije ćelija u cilju smanjivanja broja mikroorganizama ili u cilju iskorišćenja sastavnih delova ćelija (Floury, Desrumaux i Lardieres, 2000; Schultz i sar., 2004; Donsì i sar., 2010).

U dinamičkim sistemima VPH, veoma je teško rangirati uticaje različitih fenomena koji dovode do efekata homogenizacije i usitnjavanja čestica i kapi disperzne faze jer pojave kavitacije, smicanja i turbulencije mogu delovati istovremeno na čestice koje se nalaze u specifičnom visokopritisnom sistemu. Međutim, ovakvo kretanje fluida koje dovodi do usitnjavanja kapi disperzne faze, nekad dovodi nepoželjnih pojava, kao što su pojave koalescencije ili aglomeracije usled međusobnog sudaranja novoformiranih kapi u procesu izrade emulzija (Kleinig i Middelberg, 1998; Diels i Michiels, 2006; Jafari i sar., 2008).

U dosadašnjim istraživanjima koja su se bavila upotrebom polisaharidnih stabilizatora u izradi emulzija, VPH su, u poređenju sa ostalim tehnikama emulgovanja, najviše korišćeni zbog visoke efikasnosti i robusnosti u radu. U studiji koju su sprovedeli *Tesch, Gerhards i Schubert* (2002) ispitivane su karakteristike emulzija dobijenih upotrebom OSA skroba pri različitim radnim pritiscima VPH. Pri promeni pritiska od 50 – 250 bara nisu primećene značajne razlike u veličini kapi dobijenih emulzija pri jednakim koncentracijama, usled ograničenog efekta stabilizacije ovakvog polisaharida i mogućih procesa koalescencije u toku homogenizacije. Stoga, u većini radova u kojima su ispitivane karakteristike skrobnih modifikata, primenjeni pritisak nije prelazio 50 bara (MPa). Veličina kapi dobijenih emulzija u dosadašnjim istraživanjima upotrebe VPH su bile u opsegu od 0,3 μm do 3 μm (Drusch i Schwarz, 2006; Nilsson i Bergenståhl, 2007; Agama-Acevedo i Bello-Perez, 2017).

Pri izradi emulzija sa pektinom šećerne repe VPH se pokazao kao izuzetno pogodna tehnika za proizvodnju stabilnih emulzija. Kao i u slučaju OSA modifikovanog skroba, radni pritisak od 50 bara je korišćen u većini studija. Promena radnog pritiska u opsegu koji odgovara

visokopritisnoj homogenizaciji (50-150 bara) nije značajno doprineo promeni veličine kapi emulzija stabilizovanih pektinom šećerne repe. Ipak, *Bai i sar.* (2017) su u svojoj studiji, u kojoj radni pritisak odgovara opsegu ultravisokopritisne homogenizacije (<500 bara), pokazali da pri upotrebi pektina šećerne repe dolazi do linearnog smanjenja prečnika kapi sa 0.25 μm do 0.18 μm , pri povećanju radnog pritiska. S obzirom na dosadašnje studije, može se zaključiti da ne dolazi do gubitka emulgujućih svojstava funkcionalnih grupa u pektinu šećerne repe, koje prevashodno potiču od prisutnih proteina, pri značajnom povećanju pritiska homogenizera (*Funami i sar.*, 2007; *Chen, Fu, Luo*, 2016; *Juttulapa i sar.*, 2017; *Bai i sar.*, 2017b).

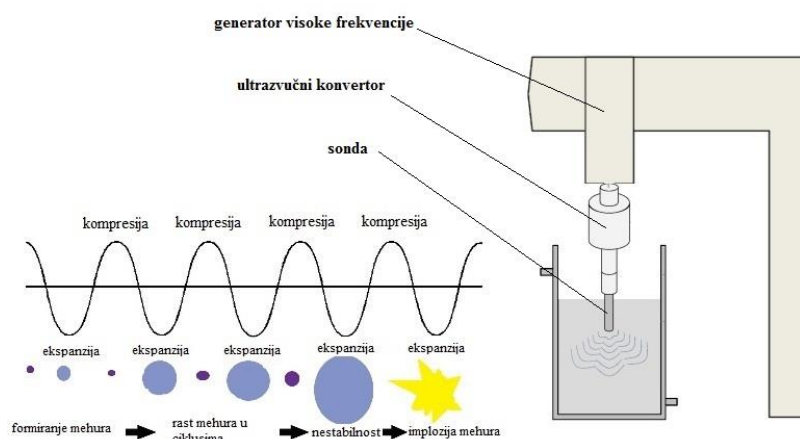
Uticaj visokopritisne tehnike dispergovanja je ispitivan i pri upotrebi polisaharidnih stabilizatora na bazi vlakana. *de Castro Santana i sar.* (2012) su u studiji ispitivanja vlakana kolagena zaključili da emulzije proizvedene homogenizacijom pod visokim pritiskom imaju visoku stabilnost, sa sličnim prečnikom kapi pri različitim uslovima pritiska homogenizacije (60 i 100 MPa), a jedine značajne razlike su primećene u reološkim rezultatima. Prečnik kapi emulzija stabilizovanih vlaknima kukuruza pokazuje negativnu linearnu zavisnost od povećanja radnog pritiska homogenizera, što je u skladu sa rezultatima drugih hidrokoloida (guma arabika, pektin šećerne repe). Upotreba celuloze i modifikovane celuloze, kao najpoznatijih vlaknastih stabilizatora, u proizvodnji emulzija VPH je ispitivana proteklih decenija. Povećanje radnog pritiska VPH značajno smanjuje viskozitet ovako dobijenih emulzija sa jednakim sadržajem celuloze. Ipak, različite studije su pokazale da fenomen „preterane obrade“ emulzija (previsok pritisak i temperatura, preveliki broj prolaza kroz VPH, itd.) dovodi do nepovoljnih rezultata pri upotrebi vlakana u izradi emulzija. Stoga, u cilju formiranja emulzija željenog prečnika kapi, viskoziteta ali i funkcionalnih karakteristika, odnos količine vlakana i primenjenog pritiska predstavlja najvažniji parametar (*Schulz i Daniels*, 2000; *Floury i sar.*, 2003; *Bai i sar.*, 2017b).

2.3.3. Ultrazvučna homogenizacija

Ultrazvukom visoke snage moguće je uzrokovati fizičke promene na biološkom materijalu i omogućiti ubrzavanje pojedinih hemijskih reakcija. Svoju primenu je našao u inaktivaciji mikroorganizama i enzima, procesima emulgovanja i homogenizacije, ekstrakciji i sušenju. Ultrazvučni talasi visokih frekvencija (preko 20000 Hz) nose veliku energiju i mogu izazvati veoma velike oscilacije pritiska (i do nekoliko hiljada bara) usled kavitacije, i stoga se mogu koristiti za raspršivanje ulja, boja, proteina i raznih hemijskih agenasa. Takođe, ultrazvuk se može koristiti i u cilju razrušavanja strukture raznih sistema poput pena ili aerosola.

Ultrazvučnim talasima se mogu modifikovati i strukture makromolekula u pravcu usitnjavanja ili cepanja lanaca (Đaković, 1985; Režek Jambrak i sar., 2009).

Ultrazvučni homogenizer sastoji se uglavnom od tri komponente (Slika 7): generatora visoke frekvencije, čija snaga može varirati, ultrazvučnog konvertora i funkcionalnog vrha – sonde, koji se uranja u uzorak za homogenizaciju. Generator visoke frekvencije prvo transformiše standardni mrežni napon od 50-60 Hz u visokofrekventni napon od preko 20 kHz. Ako se ovaj napon primeni na odgovarajući oscilator unutar ultrazvučnog pretvarača, on će modifikovati veličinu ovog oscilatora i oblikovati ga u skladu sa piezoelektričnim efektom, koji je poznat još od 1880. godine. Na taj način, električna energija se pretvaračem transformiše u mehaničke vibracije. Vibracije iz pretvarača se pojačavaju u sondi, koja emituje akustičnu energiju u fluid i tako stvara talase pritiska u tečnosti. Usled generisanja velike energije koja se unosi u sistem, dolazi do povećanja temperature medijuma koji se tretira, pa je stoga veoma važno obezbediti odgovarajuće hlađenje posude sa uzorkom, ukoliko je neophodno da temperatura bude konstantna tokom procesa homogenizacije. Dostupnost i jednostavnost ultrazvučnih homogenizatora olakšala je brzu tranziciju ove tehnologije iz laboratorije u potpuno operativne komercijalne procese prehrambene industrije širom sveta (Đaković, 1985; Patist i Bates, 2008; Zisu i Chandrapala, 2015).



Slika 7. Princip rada i dejstva ultrazvučnog homogenizera.

Pri upotrebi ultrazvučnog homogenizera u proizvodnji emulzija, glavni fenomen koji dovodi do usitnjavanja kapi disperzne faze je kavitacija. Zvučni talasi koji se emituju u disperzni sistem se sastoje se iz naizmeničnih ciklusa ekspanzije i kompresije (Slika 7). Faza kompresije vrši pozitivan pritisak u sistemu, dok ekspanzija nastaje iz faze negativnog pritiska. Ta pojava stvara milione mikroskopskih mehurića (šupljina) u disperznom sistemu tokom ekspanzionog ciklusa

(faza negativnog pritiska) i potom implodira tokom faze kompresije. Upravo ovaj fenomen, koji se naziva kavitacija, proizvodi snažne sile smicanja, uzrokujući da se molekuli u disperznom sistemu, intenzivno kreću. Intenzitet kojim se ove pojave odvijaju u tretiranom sistemu uveliko zavisi od karakteristika tečne faze, koji uključuju napon pare, površinski napon, viskozitet i gustinu, kao i bilo koju drugu osobinu koja se odnosi na broj atoma, jona, ili molekula prisutnih u sistemu. Energija potrebna za formiranje kavitacionog mehura u tečnoj fazi je proporcionalna površinskom naponu i naponu pare tečne faze. Sa povećanjem vrednosti površinskog napona tečnosti, potrebna je veća energija za formiranje mehura pa će time biti veća i energija udarnog talasa koji se proizvodi kada se mehur raspadne (implodira). Intenzitet ultrazvučne snage se obično meri radnim ciklusom, koji se meri frekvencijom ciklusa (Campbell i Long, 1949; Ramachandran i sar., 2006).

Ultrazvučno emulgovanje se pokazalo kao efikasna tehnika u proizvodnji emulzija i nanoemulzija stabilizovanih raznim polisaharidnim jedinjenjima. *Abbas i sar.*, (2014) su ispitivali stabilizaciju nanoemulzija upotrebom OSA modifikovanih skrobova u zavisnosti od primenjenog snage ultrazvučnog homogenizera i vremena emulgovanja. Takođe, zaključili su da se ultrazvučno emulgovanje može uspešno koristiti za pripremu nanoemulzija stabilizovanih OSA skrobom na nižim temperaturama (40–45 °C), primenjenom snagom u opsegu od 400 - 850 W i vremenom emulgovanja od 4 do 7 minuta. Prečnik kapi emulzija stabilizovanih OSA modifikovanim skrobom dobijenih ultrazvučnim emulgovanjem se smanjuje sa povećanjem primenjene snage. Međutim, smanjenje prečnika sa povećanjem snage je ograničeno količinom i vrstom primenjenog OSA modifikovanog skroba kao i količinom ulja (*Abbas i sar.*, 2014; *Silva, Rosa i Meireles*, 2015).

Emulgovanje ultrazvučnim talasima uz prisustvo pektina šećerne repe kao stabilizatora je ispitivano u značajno manjoj meri u poređenju sa brojem eksperimenata sa visokopritisnim homogenizerom. *Ma i sar.*, (2013) su pokazali značajne razlike u stabilnosti emulzija, formiranih ultrazvučnim talasima i stabilizovanih pektinom šećerne repe, u zavisnosti od načina ekstrakcije pektina i temperature skladištenja emulzija. Homogenizacija ultrazvučnim talasima može da utiče na značajno poboljšanje stabilnosti emulzija kod kojih su protein-polisaharid kompleksi glavni nosioci stabilizujućeg svojstva biopolimera (*Shamsara i sar.*, 2015).

Dea i Madden (1986) navode da je pektin šećerne repe bio površinski aktivniji od komercijalnih visoko-metoksilnih ili nisko-metoksilnih pektina zbog izrazitijeg hidrofobnog karaktera prisutnih acetil grupa, pa je stoga pokazao bolja stabilizujuća svojstva u proizvodnji finih U/V emulzija ultrazvučnim emulgovanjem.

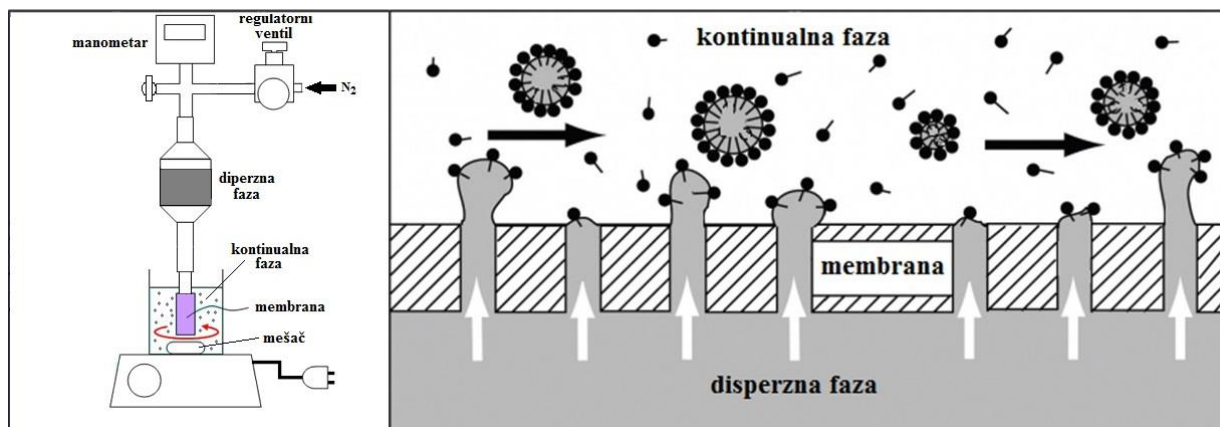
Upotreba ultrazvučnog emulgovanja je ispitivana i na uzorcima U/V emulzija u kojima je ulogu stabilizatora imala celuloza, hidroksipropilmetil celuloza (HPMC) ili neki drugi polisaharid na bazi vlakana. *Camino i sar.* (2012) su ispitivali uticaj pH vrednosti na formiranje emulzija i veličinu kapi dobijenih emulzija. U ovoj studiji su prikazani rezultati koji ukazuju da pri upotrebi HPMC nema značajne promene veličine kapi u zavisnosti od pH vrednosti pri formiranju emulzije ultrazvučnim homogenizerom u toku 20 minuta. Uniformna raspodela energije i vreme ultrazvučne homogenizacije su izuzetno značajni sa stanovišta raspodele veličine kapi emulzija dobijenih korišćenjem celuloznih vlakana. Površina kapi ulja dobijenih primenom ultrazvučnog homogenizera uslovljava dodatak dovoljne količine celuloznih vlakana koja može sprečiti proces koalescencije nastalih kapi. Ipak, imajući u vidu laku aglomeraciju i povezivanje celuloznih molekula Van der Walsovim i vodoničnim vezama, prevelika količina ovih vlakana može negativno uticati na stabilnost ovako dobijene emulzije. *Kalashnikova i sar.*, (2011) su utvrdili da je količina od 5,2 mg na 1 ml disperzne faze optimalna za proizvodnju stabilnih emulzija ultrazvučnim emulgovanjem (*Kalashnikova i sar.*, 2011; *Rein, Khalfin i Cohen*, 2012).

2.3.4. Membransko emulgovanje

Membransko emulgovanje je veoma jednostavna tehnika formiranja emulzija koja privlači sve veću pažnju u proteklih 20 godina zbog velikog potencijala primene u mnogim oblastima prehrambene industrije. U poređenju sa konvencionalnim metodama dispergovanja, kao što su rotor-stator sistemi i visokopritisna ili ultrazvučna homogenizacija, zasnovanim na jakim silama smicanja, turbulenciji i kavitaciji, tehnika membranskog emulgovanja zahteva značajno manje energije da bi se proizvele kapi emulzije odgovarajuće veličine (*Okonogi i sar.*, 1994; *Joscelyne i Trägårdh*, 2000; *Charcosset, Limayem i Fessi*, 2004).

Šematski prikaz procesa membranskog emulgovanja je prikazan na slici 8. Disperzna faza se potiskuje kroz pore membrane, dok se kontinualna faza kreće duž zida membrane. Po izlazu iz kanala pore membrane, kapi disperzne faze rastu sve dok se ne dostigne određena kritična veličina. Ova kritična veličina je određena balansom između nekoliko sila: sile koju na kap vrši kontinualna faza koja teče, sile potiska kapi, sile međupovršinskog napona na granici faza i sile pogonskog pritiska koji pokreće disperznu fazu kroz sistem. Kap disperzne faze po izlasku iz pora membrane ima tendenciju da formira sferni oblik pod dejstvom međupovršinskog napona, ali može doći do izvesne distorzije oblika kapi u zavisnosti od brzine

protoka kontinualne faze i kontaktnog ugla između kapi i površine membrane. Konačna veličina i raspodela veličine kapi ne određuju se samo veličinom i raspodelom veličine pora membrane, već i stepenom koalescencije, kako na površini membrane tako i u formiranom disperznom sistemu (Schröder, Behrend i Schubert, 1998; Williams i sar., 1998).



Slika 8. Šematski prikaz procesa membranskog emulgovanja.

Stoga, eksperimentalne studije koje su se bavile membranskim emulgovanjem su se uglavnom fokusirale na istraživanja operativnih parametara procesa kao što su tip i vrsta membrane, poroznost i veličina pora membrane, fluks membrane, transmembranski pritisak i vrsta primenjenog emulgatora ili stabilizatora. Pažljivim izborom ovih parametara, proizvedene su emulzije sa uskim raspodelama veličine kapi emulzije, sa prosečnim veličinama kapi u rasponu od 2 do 10 puta većim od nominalnog prečnika pora membrane. Međutim, nekoliko ograničavajućih faktora usporavaju industrijsku komercijalizaciju ove tehnike. Jedan od glavnih ograničavajućih faktora u pogledu efikasne industrijske primene može biti često nizak fluks permeata disperzne faze kroz membranu, posebno u procesu proizvodnje kapi submikronske veličine kao i izuzetno velike površine membrane, a stoga i neophodnog prostora, koji treba da zadovolji industrijske kapacitete proizvodnje emulzija (Joscelyne i Trägårdh, 2000; Charcosset, Limayem i Fessi, 2004).

Membrane koje su korišćene u svrhu membranskog emulgovanja se pre svega razlikuju po materijalu od koga su izrađene. Korišćeni materijali potiču od raznih polimera, staklenih ili keramičkih izvora. Brojna istraživanja su napravljena pomoću tubularnih mikroporoznih staklenih membrana (MPG, Asahi Glass Company, Japan) i Shirasu poroznog stakla (SPG, SPG

Technology Ltd.). Ove membrane imaju cilindrične, međusobno povezane, ujednačene mikropore. Takođe, keramičke membrane (α -Al₂O₃, npr. Membraflow, Nemačka i Membralox, SCT Francuska) i keramičke membrane sa višeslojnim nanosima (titanijum i cirkonijum oksid) su korišćene u brojnim ispitivanjima emulgovanja membranama. Svi gore pomenuti tipovi membrana mogu se koristiti u različitim nominalnim veličinama pora, tipično u rasponu od oko 0.05–14 μm , i u zavisnosti od materijala od koga su izrađene, mogu se koristiti pri određenim pritiscima, temperaturama i protocima (Piacentini, Drioli i Giorno, 2014).

Proces membranskog emulgovanja sa polisaharidima kao stabilizatorima dobijenih emulzija je u najmanjoj meri istražen od svih tehnika emulgovanja. *Li i sar.* (2016) su koristili SPG membrane različitih veličina pora (9, 2,5 i 1 μm) u studiji formiranja mikrokapsula modifikovanim skrobom. Optimizacijom procesa uspeali su da formiraju mikrokapsule kontrolisanih veličina (0,7 μm , 1,7 μm i 4,8 μm) i relativno monodisperzne raspodele veličina čestica. Kao tehnika u proizvodnji mikrokapsula sa maltodekstrinom kao nosačem i stabilizatorom, membransko emulgovanje je pokazalo bolje rezultate u poređenju sa rotor-stator tehnikom u pogledu izgleda i strukture dobijenih kapsula. Pri upotrebi OSA modifikovanih skrobova u stabilizaciji V/U/V emulzija, metalnim membranama, veličina formiranih kapi kao i širina raspodele veličina kapi se smanjuje kada se koncentracija OSA skroba povećava sa 2% na 4%. Međutim dalje povećanje koncentracije nije omogućilo stvaranje emulzija uniformnih veličina, usled značajnog povećanja viskoziteta kontinualne faze (*Ramakrishnan i sar.*, 2013; *Pu, Wolf i Dragosavac*, 2019).

Metodom formiranja premiks emulzija moguće je formirati stabilne višeslojne omotače raznih biopolimera (proteina, polisaharida) na međufaznoj površini U/V emulzija tehnikom membranskog emulgovanja. Kompleks proteina i modifikovanih celuloznih vlakana formira stabilan sloj na međufaznoj površini emulzija dobijenih propuštanjem disperzne faze kroz SPG membrane sa porama prečnika 10 μm . Ovakvi disperzni sistemi imaju dimenzije kapi emulzije bliske dimenzijama pora membrane ali i prilično široku raspodelu veličina dobijenih kapi (*Berendsen i sar.*, 2014).

Kawakatsu, Trägårdh i Trägårdh (2001) su istraživali formiranje emulzija mikrokanalnom tehnikom uz prisustvo pektina u kontinualnoj fazi. Dobijeni rezultati su ukazali da sa povećanjem sadržaja pektina od 0 do 2% dolazi do značajnog rasta viskoziteta i prečnika kapi dobijenih emulzija.

Wang, Ma i Su (2005) su prvi ukazali na potencijal formiranja mikrokapsula (mikrosfera) linearnim polisaharidom – hitozanom, upotrebom membranskog emulgovanja. U svojoj studiji formirali su mikrosfere različite veličine korišćenjem membrana različitih dimenzija pora, i definisali linearnu vezu između prečnika mikrosfera i veličine pora membrane. Najmanje dobijene mikrosfere hitosana u ovoj studiji bile su prečnika 0,4 μm .

3. CILJ RADA SA TEORIJSKIM POSTAVKAMA

Na osnovu dosadašnjih ispitivanja iz oblasti upotrebe polisaharida kao stabilizatora emulzionih sistema, formirani su zadaci i ciljevi ovog istraživanja. Imajući u vidu trendove u ishrani i veliku tržišnu potražnju za prirodnim jedinjenjima koji mogu da zamene sve funkcije sintetičkih stabilizatora, kao i mogućnost uticaja više kombinovanih stabilizatora na osobine emulzija tipa ulje u vodi, odabrani polisaharidi, koji će biti ispitivani u ovom istraživanju, su: pektin šećerne repe, vlakna šećerne repe i OSA maltodekstrin.

Kako bi se ispitali uticaji različitih sila primenjenih u procesu formiranja emulzija, proizvodnja emulzija stabilizovanih nekim od navedenih polisaharida biće sprovedena sa četiri, do sada najčešće dostupne, tehnike emulgovanja: rotor-stator tehnikom, visokopritisnom homogenizacijom, ultrazvučnom homogenizacijom i membranskim emulgovanjem.

Stabilizujući efekat polisaharida će se istražiti na nekoliko nivoa koncentracija i u kombinaciji sa ostalim ispitivanim polisaharidima. Koncentracije koje će biti korišćene u procesu izrade emulzija kreću su u opsegu od 0,25 – 1,25% na masu emulzije. Pri navedenim koncentracijama polisaharida, u dobijenim emulzijama će biti ispitivane fizičke promene koje imaju uticaj na reološke i disperzione osobine emulzija. Pretpostavlja se da različite koncentracije polisaharida značajno utiču na viskozitet i strukturu dobijenih emulzija kao i na veličinu dobijenih kapi emulzija.

Posebno će biti istraženi i diskutovani mehanizmi stabilizacije emulzija upotrebom vlakana šećerne repe kao i kombinacijom vlakana sa makromolekulima različitih veličina i karakteristika: pektinom šećerne repe i OSA maltodekstrinom. Nedostatak prethodnih studija koje su se bavile emulzionim sistemima koji uključuju vlakna šećerne repe daje poseban značaj ovom istraživanju. Pretpostavlja se da vlakna šećerne repe zbog svog specifičnog sastava mogu stabilizovati emulziju na više različitih načina: modifikacijom reoloških osobina emulzija, stabilizacijom „Pickering“ efektom kao i emulgujućim sposobnostima prisutnih proteina.

Takođe, naučni značaj se ogleda i u karakterizaciji mogućih interakcija i kombinovanog dejstva pomenutih polisaharida na sisteme emulzija ulje u vodi. Različite vrste interakcija se očekuju u svim kombinacijama polisaharida usled mnoštva funkcionalnih grupa prisutnih u strukturi ovih biopolimera. Prema tome, može se očekivati formiranje kompleksih adsorpcionih slojeva na površini kapi ulja usled različitih osobina OSA maltodekstrina, pektina i vlakana šećerne repe. Kako bi se uspešno nadomestili prethodno definisani nedostaci samostalne

upotrebe navedenih polisaharida, ispitivanje interakcija koje se javljaju između polisaharida pri izradi emulzija predstavlja jedan od najvažnijih doprinosa ovog istraživanja.

Stoga, cilj istraživanja obuhvata i utvrđivanje funkcionalnih karakteristika primenjenih polisaharidnih jedinjenja pri samostalnoj ili kombinovanoj upotrebi kao osnov za njihovu uspešnu valorizaciju u prehrambenim proizvodima kao što su emulzije tipa ulje u vodi. Karakterizacija vodenih rastvora polisaharida, koji će biti upotrebljeni u procesima emulgovanja, obuhvata ispitivanje površinske aktivnosti na granici voda/vazduh, konduktometrijska ispitivanja, veličinu makromolekula kao i ispitivanje ostalih fizičko-hemijskih osobina navedenih polisaharida.

Evaluacijom dobijenih rezultata dobiće se optimalni uslovi proizvodnje emulzija odgovarajućih osobina (veličina kapi, reoloških osobina, stabilnosti, strukture) kao i rezultati na osnovu kojih je moguće nastaviti istraživanje sa posebnim akcentom na pojedine komponente različitih polisaharida iz industrije šećera. Očekivani rezultati sveobuhvatne analize dobijenih emulzija i upotrebljenih polisaharida se takođe mogu primeniti u cilju modifikacije procesa proizvodnje prehrambenog proizvoda shodno željenim karakteristikama i karakteristikama odgovarajućih ispitivanih polisaharida. Pored toga, ovim istraživanjima će se otvoriti prostor za dalji razvoj stabilizatora baziranih na polisaharidima sporednih proizvoda industrije šećera. Na ovaj način, značajno će se promeniti potencijal primene navedenih biopolimera a samim tim i njihova privredna i tržišna vrednost.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

Materijali koji su korišćeni u eksperimentalnoj izradi doktorske disertacije su:

- Komeričijalno dostupno rafinisano kukuruzno ulje „Olitalia“, Italija
- Bidestilovana voda
- Pektin šećerne repe, visokometilovani i visokoacetilovani, Betapec RU 301, Herbstreith & Fox KG, Nemačka
- Vlakna šećerne repe, Fibrex[®], Nordic Sugar A/S factory, Švedska
- Oktenil sukcinat maltodekstrin voštanog kukuruza, C*EmCap 12633, Cargill, SAD.
- Etanol 96%, Reahem, Srbija
- Natrijum-hidroksid, Centrohem, Srbija
- Hlorovodonična kiselina, Centrohem, Srbija

4.2. Metode

4.2.1. Fizičko-hemijski sastav pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina

Fizičko-hemijski sastav je određen standardnim AOAC metodama za određivanje sadržaja vode, proteina, ugljenih hidrata, masti, pepela kao i sadržaja vlakana (AOAC Official Methods, 2005). Analiza sadržaja fenolnih kiselina je određena visokopritisnom tečnom hromatografijom korišćenjem DAD detektora prema postupku opisanom u Mišan i sar. (2016).

4.2.2. FTIR analiza pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina

Spektrofotometrijska analiza svih korišćenih polisaharida u cilju identifikacije prisutnih hemijskih veza i grupa je izvedena na uređaju FTIR Spectrometer -ALPHA (Bruker, Nemačka) infracrveni spektroskop sa ATR modulom sa opsegom merenja od 4000 do 400 cm⁻¹. Dobijeni podaci su obrađeni upotrebom programskog paketa OPUS.

4.2.3. Aminokiselinski sastav pektina šećerne repe i vlakana šećerne repe

Sadržaj aminokiselina u pektinu i vlaknima šećerne repe je određivan u skladu sa *EN ISO 13903/2005* metodom visokopritisne tečne hromatografije (HPLC- *high pressure liquid chromatography*) koja se koristi za analize sadržaja aminokiselina (2005). Eksterni standard smeše aminokiselina omogućio je identifikaciju aminokiselina i korišćen je za verifikaciju rezultata HPLC analize (Tabela 1). Granica kvantifikacije (LoQ) je određena analizom 10 injektovanih standardnih rastvora mešanih aminokiselina i izračunata kao desetostruka vrednost relativne standardne devijacije 10 merenja. Za procenu ostalih parametara validacije, pripremljeni su uzorci odgovarajućeg biopolimera (pektina ili vlakana šećerne repe) obogaćenog dodavanjem referentnog standarda svake od aminokiselina na dva nivoa koncentracije (5xLoQ i 10xLoQ). Odgovarajući uzorci su pripremljeni i analizirani tokom dva dana, od strane različitih osoba, pod istim eksperimentalnim uslovima. Ponovljivost je izražena kao standardna devijacija u okviru rezultata iste grupe uzoraka analiziranih pod uslovima ponovljivosti (isti nivo koncentracije, ista osoba za pripremu uzorka, tokom jednog dana), dok je unutarlaboratorijska reproduktivnost predstavljena kao standardna devijacija u okviru svih analiziranih uzoraka i na različitim nivoima koncentracije, od strane različitih lica u različitim vremenskim intervalima (SRPS ISO 5725-5: 2011).

4.2.4. Priprema rastvora pektina šećerne repe

Rastvor pektina šećerne repe koji je korišćen u procesu emulgovanja ili pri ispitivanju karakteristika datog vodenog rastvora, je pripreman u normalnom sudu od 100 mL dodatkom određene mase praškastog uzorka pektina i bidestilovane vode. Nakon odmeravanja zadate mase pektina i bidestilovane vode, uzorak je homogenizovan magnetnom mešalicom u periodu od 4 sata, na temperaturi od 30 °C, nakon čega je skladišten na temperaturi od 4 °C. Svi rastvori pektina šećerne repe su pripremani 24h pre korišćenja u svrhe emulgovanja ili karakterizacije.

Tabela 1. Validacija rezultata HPLC analize (ULR – Unutar laboratorijska reproduktivnost, LoQ – granica kvantifikacije).

	LoQ (g/100g)	Tačnost (%)	Ponovljivost (%)	ULR (%)
Arginin	0,0089	106	0,111	0,141
Lizin	0,0074	104	0,185	0,196
Alanin	0,0045	105	0,084	0,094
Treonin	0,0061	106	0,157	0,182
Glicin	0,0038	105	0,075	0,082
Valin	0,0059	107	0,105	0,108
Serin	0,0053	103	0,251	0,289
Prolin	0,0058	103	0,290	0,309
Izoleucin	0,0067	106	0,072	0,079
Leucin	0,0067	105	0,193	0,222
Metionin	0,0076	102	0,191	0,218
Histidin	0,0080	105	0,130	0,142
Fenilalanin	0,0085	103	0,093	0,107
Glutaminska kiselina	0,0075	104	0,771	0,791
Asparaginska kiselina	0,0068	107	0,180	0,219
Cistein	0,0061	92	0,076	0,076
Tirozin	0,0092	102	0,067	0,073

4.2.5. Priprema rastvora OSA maltodektrina

Rastvor OSA maltodektrina koji je korišćen u procesu emulgovanja ili pri merenjima karakteristika datog vodenog rastvora, je pripreman u normalnom sudu od 100 mL dodatkom određene mase praškastog uzorka OSA maltodektrina i bidestilovane vode. Nakon odmeravanja zadate mase OSA maltodektrina i bidestilovane vode, uzorak je homogenizovan magnetnom mešalicom u periodu od 4 sata, na temperaturi od 30 °C, nakon čega je skladišten na temperaturi od 4 °C. Svi rastvori OSA maltodektrina su pripremani 24h pre korišćenja u svrhe emulgovanja ili karakterizacije.

4.2.6. Priprema rastvora vlakana šećerne repe

U cilju poboljšanja stabilizujućih svojstava i potpunije homogenizacije u vodenom rastvoru, veličina čestica vlakana šećerne je modifikovana pre upotrebe. Čestice vlakana su samlevene u kugličnom mlinu (Retsch, Nemačka) u toku 30 minuta (400 obrtaja u minuti), da bi se raspodela veličine čestica pomerila prema oblasti koloidnih veličina (Hajnal, 2018). Nakon opisane pripreme, dobijene čestice su korišćene za pripremu svih rastvora vlakana šećerne repe kao i za pripremu emulzija stabilizovanih vlaknima šećerne repe.

Rastvor vlakana šećerne repe koji je korišćen u procesu emulgovanja ili pri merenjima karakteristika datog vodenog rastvora, je pripreman u normalnom sudu od 100 mL dodatnog određene mase usitnjenih čestica vlakana i bidestilovane vode. Nakon odmeravanja zadate mase vlakana i bidestilovane vode, uzorak je homogenizovan magnetnom mešalicom u periodu od 4 sata, na temperaturi od 30 °C, nakon čega je skladišten na temperaturi od 4 °C. Svi rastvori vlakana šećerne repe su pripremani 24h pre korišćenja u svrhe emulgovanja ili karakterizacije.

4.2.7. Određivanje viskoziteta rastvora pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina

Merenje viskoziteta vodenih rastvora polisaharida je sprovedeno pomoću Ubbelohde-ovog kapilarnog viskozimetra, pri konstantnoj temperaturi od 25 ± 0.1 °C. Mereni uzorci su pripremljeni u skladu sa prethodno opisanom procedurom za formulaciju rastvora polisaharida. Gustina rastvora je merena direktno pomoću gustinometra Densito 30PX, Density Meter (Mettler Toledo, SAD). Vreme isticanja rastvarača i rastvora iz kapilare viskozimetra mereno je najmanje tri puta i u radu je predstavljeno kao srednja vrednost merenja. Vrednosti isticanja su izražene u sekundama i potom su po dole navedenim jednačinama (3), (4), (5), (6) izračunati relativni (η_{rel}), specifični (η_{sp}) i unutrašnji ($[\eta]$) viskoziteti:

$$\eta_{rel} = \frac{\rho_1 \cdot t_1}{\rho_0 \cdot t_0} \quad (3)$$

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (4)$$

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right) \quad (5)$$

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\ln(\eta_{rel})}{c} \right) \quad (6)$$

gde ρ_1 i ρ_0 predstavljaju gustinu ispitivanog rastvora i čistog rastvora vode, respektivno, odnosno t_1 i t_0 predstavljaju vreme isticanja ispitivanog rastvora i čistog rastvora vode, respektivno. Unutrašnji viskozitet ispitivanih polisaharida određena je prema Huggins (5) i Kraemer-ovoj jednačini (6):

4.2.8. Merenja konduktometrijskih osobina rastvora pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina

Sva konduktometrijska merenja su vršena u vodenom kupatilu gde je temperatura uzorka održavana na 25 ± 0.1 °C. Početna količina uzorka u čaši koja se nalazila u vodenom kupatilu je iznosila 20 mL. Uzorak je neprekidno homogenizovan magnetnom mešalicom u cilju reprezentativnosti merenja. Početni (osnovni) uzorak je u merenjima konduktometrijskih karakteristika samo jednog polisaharida bio bidestilovana voda, dok je u uzorcima gde je ispitivana mogućnost interakcije više polisaharida i uticaj interakcija na specifičnu provodljivost, početni uzorak predstavljao 0,5% rastvor određenog polisaharida (pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe ili OSA maltodekstrina).

U početni uzorak se pri svakom koraku (pojedinačnom merenju) mikropipetom unosio rastvor određenog polisaharida u količini od 500 - 1000 μ L. Nakon dodatog rastvora polisaharida u osnovni uzorak očitavane su vrednosti specifične provodljivosti, izražene u mS ili μ S, nakon uspostavljanja ravnoteže u merenom rastvoru.

U konduktometrijskim merenjima gde je početni uzorak predstavljao 0,5% rastvor polisaharida, pored 500 μ L 2% rastvora drugog polisaharida, u mereni uzorak je pri svakom koraku unošeno i 500 μ L 0,5% rastvora polisaharida koji se nalazio u početnom uzorku kako bi obezbedili konstantne uslove sadržaja osnovnog polisaharida.

4.2.9. Merenje površinskog napona rastvora pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina

Određivanje površinskog napona rastvora polisaharida je vršeno pomoću digitalnog Krüss Easy Dyne tenziometra (Hamburg, Nemačka), metodom prstena po du Noüy. Merenja na Krüss Easy Dyne tenziometru su automatska i srednja vrednost površinskog napona rastvora i standardna

devijacija su računati na osnovu najmanje 5 merenja. Sva merenja površinskog napona su vršena u vodenom kupatilu gde je temperatura uzorka održavana na 25 ± 0.1 °C. Dobljene vrednosti površinskog napona su izražene u mN/m.

4.2.10. Priprema emulzija

Emulzije su pripremane korišćenjem četiri različite tehnike emulgovanja u cilju sveobuhvatne analize stabilizujućih svojstava polisaharida industrije šećera. Sve proizvedene emulzije su sadržale 10% kukuruznog ulja i 90% vodenog rastvora polisaharida na ukupnu masu emulzije. Sve ostale vrednosti koje su izražene u % (procentima) odnose se na g/100mL, odnosno masu rastvorene komponente u 100 mL rastvora.

a) Priprema emulzija rotor-stator tehnikom

Odmerena količina vodenog rastvora polisaharida, koji je pripremljen po postupku opisanom u (3.2.2.), (3.2.3.) i (3.2.4.) je postavljena u vodeno kupatilo gde je uzorak temperiran na 25 ± 0.1 °C tokom celog procesa emulgovanja. Uzorak kukuruznog ulja, korišćenog u daljem procesu kao disperzna faza, temperiran je zajedno sa vodenim rastvorima u vodenom kupatilu. Sa dodatkom odgovarajuće količine kukuruznog ulja započet je proces emulgovanja i homogenizacije dve faze. Sa ciljem homogenizacije uzoraka ulja i vodene faze i proizvodnje emulzija, korišćen je rotor-stator homogenizer Ultra-Turrax T25 basic sa disperznom glavom S 25 N-18 G. Brzina obrtaja rotora je bila fiksna tokom celog procesa i iznosila je 6500 o/min. Uzorak je homogenizovan u periodu od 10 minuta. Tako pripremljena emulzija je korišćena za dalja merenja.

b) Priprema emulzija tehnikom visokopritisne homogenizacije

Odmerena količina vodenog rastvora polisaharida, koji je pripremljen po postupku opisanom u (3.2.2.), (3.2.3.) i (3.2.4.) postavljena je zajedno sa uzorkom kukuruznog ulja u vodeno kupatilo gde je uzorak temperiran na 25 ± 0.1 °C. Proces emulgovanja visokopritisnim homogenizerom je obuhvatao dva koraka – predtretman i glavnu homogenizaciju.

Predtretman, odnosno priprema “grube” emulzije, sproveden je rotor-stator tehnikom po gore navedenom postupku pri promenjenim uslovima (brzina obrtaja rotora 10000 o/min, sa

ukupnim vremenom trajanja homogenizacije od 60 sekundi). Nakon ovog postupka dobijena je emulzija čije karakteristike nisu ispitivane već je celokupna količina dobijenog uzorka dalje tretirana visokopritisnim homogenizerom.

Glavni tretman uzorka se odvijao u “FPG 11300:350” a ceo sistem se pokretao servisnim modulom “FPG 113” (Stansted Fluid Power Ltd, Engleska). Radni pritisak visokopritisnog homogenizera je iznosio 100 MPa u prvom stupnju i 10 MPa u drugom stupnju homogenizacije. Pritisak je regulisan ventilima visokog i niskog pritiska. “Gruba” emulzija koja je dobijena predtretmanom, transportovana je pumpom “BCSB 025-12” (Seepex, Nemačka) u glavni deo uređaja za visokopritisnu homogenizaciju – jedinicu za dispergovanje, opremljenu keramičkom iglom i keramičkim sedištem, gde je jednostavnim sužavanjem prostora između igle i sedišta modifikovan radni pritisak. Temperatura uzorka je pre ulaska u VPH iznosila 25 °C dok se nakon tretmana visokim pritiskom temperatura uzorka povećala na 44 °C, zbog nemogućnosti hlađenja u samoj jedinici za dispergovanje. Tako dobijene emulzije su dalje ispitivane sa stanovišta stabilnosti i fizičkih karakteristika.

c) Priprema emulzija ultrazvučnim homogenizerom

Odmerena količina vodenog rastvora polisaharida, koji je pripremljen po postupku opisanom u (3.2.2.), (3.2.3.) i (3.2.4.) postavljena je zajedno sa uzorkom kukuruznog ulja u vodeno kupatilo gde je uzorak temperiran na 25 ± 0.1 °C. Proces emulgovanja ultrazvučnim homogenizerom je obuhvatao dva koraka – predtretman i glavnu homogenizaciju.

Priprema “grube” emulzije, koja će biti podvrgnuta dejstvu ultrazvučnih talasa u glavnom delu procesa emulgovanja, je sprovedena rotor-stator tehnikom. U ovu svrhu korišćen je “OV5 Homogenizer” (VELP Scientifica) pri brzini obrtanja rotora od 10000 o/min a sam proces homogenizacije trajao je 2 minuta. Uzorak koji je dobijen ovim postupkom nije ispitivan sa stanovišta karakterizacije emulzija već je celokupna količina odmah nakon predtretmana (primarne homogenizacije) prebačena u posudu sa duplim dnom gde se odvijao proces ultrazvučnog emulgovanja.

Proces emulgovanja ultrazvučnim talasima je sproveden uređajem „Hielscher UP200S“ (Hielscher Ultrasonics) pri maksimalnoj snazi od 200W. Sonda uređaja je uronjena u uzorak koji se nalazio u staklenoj posudi koja je temperirana protokom hladne vode kroz plašt suda. Početna temperatura uzorka koji je tretiran ultrazvučnim talasima je iznosila 25 °C dok je

temperatura dobijene emulzije bila 30 °C. Proces emulgovanja ultrazvučnim homogenizerom je trajao 7 minuta. Tako pripremljena emulzija ulja u vodi je korišćena za dalja ispitivanja.

d) Priprema emulzija membranskim emulgovanjem

Odmerena količina vodenog rastvora polisaharida, koji je pripremljen po postupku opisanom u (3.2.2.), (3.2.3.) i (3.2.4.) postavljena je zajedno sa uzorkom kukuruznog ulja u vodeno kupatilo gde je uzorak temperiran na 25 ± 0.1 °C tokom celog procesa emulgovanja. Membransko emulgovanje je sprovedeno uređajem „Internal pressure Type Micro Kit (MN-20)“ (SPG Technology Ltd, Japan). Staklena membrana proizvođača SPG Technology Ltd, veličine pora od 1 μm , je korišćena u svim ekperimentima membranskog emulgovanja. Diskontinualna faza (kukuruzno ulje), koja se nalazila u rezervoaru iznad membrane je potiskivana komprimovanim azotom kroz aparaturu i na kraju kroz pore staklene membrane. Granični pritisak od 170 kPa je obezbedio dovoljnu pogonsku silu za kretanje disperzne faze kroz cevi aparature i kontinualni prolazak kapi ulja kroz pore staklene membrane. Membranski modul sa staklenom membranom se nalazio uronjen u čašu sa uzorkom a radijalno kretanje kontinualne faze (vodeni rastvor polisaharida) je obezbeđeno mešanjem magnetnim mešačem na dnu suda pri 1200 obrtaja u minuti. Proces emulgovanja je trajao između 15 - 18 minuta a kraj emulgovanja je označilo potpuno pražnjenje suda sa kukuruznim uljem. Dobijena emulzija je korišćena za dalja ispitivanja.

Na kraju svakog eksperimenta, membrana je tretirana rastvorima NaOH i HCl kao i 96% etanola, u cilju potpunog čišćenja pora membrane. Nakon čišćenja, ispitivan je fluks membrane bidestilovanom vodom. Ukoliko vrednost fluksa membrane nakon procesa čišćenja nije dostigao min 95% početne vrednosti fluksa, postupak čišćenja je ponovljen.

4.2.11. Merenje veličine i raspodele veličine kapi dobijenih emulzija i čestica polisaharida

Veličina i raspodela veličine kapi emulzija, kao i čvrstih čestica polisaharida, određena je uređajem „Mastersizer 2000“, metodom difrakcije laserske svetlosti odnosno merenjem intenziteta i rastojanja difrakcionih prstenova. „Mastersizer 2000“ čine optički instrument, jedinice za dispergovanje tečnih (Hydro 2000G) ili čvrstih (Scirocco 2000) uzoraka i računar sa odgovarajućim programskim paketom. Uzorak čestica, odnosno kapi emulzija,

dispergovanih u odgovarajućem medijumu, prolazi kroz fokusirani snop svetlosti i rasejava svetlost pod karakterističnim prostornim uglovima. Veličina čestica je izražena Sauterovim prečnikom ($d_{3,2}$) a raspodela veličine je prikazana krivom raspodele.

4.2.12. Merenje zeta potencijala formiranih emulzija

Zeta potencijal dobijenih emulzija je određen pomoću Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Emulzije su razblažene deset puta u bidestilovanoj vodi pre analize i pH je podešen na 6,2. Sva merenja su sprovedena u tri ponavljanja.

4.2.13. Određivanje reoloških karakteristika emulzija

Reološke karakteristike emulzija su ispitivane rotacionim viskozimetrom „HAAKE Rheo Stress 600“. Uzorak je temperiran na 25 ± 0.1 °C tokom svih merenja. Sva merenja su sprovedena priborom konus-ploča C60/1Ti sa rastojanjem konusa i ploče 0,052 mm, cilindrom sa dvostrukim zazorom DG41, ili koakcijalnim cilindrom Z20 DIN sa rastojanjem 4,2 mm. Krive proticanja su formirane na sledeći način: brzina smicanja koja je delovala na uzorak se postepeno povećavala od 0 do 100 s^{-1} tokom 180 s, potom je uzorak narednih 180 s bio izložen konstantnoj brzini smicanja od 100 s^{-1} i poslednjih 180 s se brzina smicanja smanjivala od 100 s^{-1} do 0. Krive proticanja koje su snimane u toku procesa merenja obrađene su programom HAAKE Rheo Win 4 Data Manager.

4.2.14. Određivanje kriming indeksa emulzija

Kriming indeks (CI – *creaming index*) predstavlja kvantitativni parameter koji ocenjuje pojavu raslojavanja emulzije na sloj koji je bogat disperznom (uljanom) fazom i sloj osiromašen disperznom fazom. Praćenje promena na uzorku, odnosno visini sloja, se vrši na sobnoj temperaturi u graduisanoj menzuri od 10 mL. Kriming indeks se izračunava jednačinom (7) a na osnovu vizuelnog očitavanja visine sloja, formiranog u donjem delu menzure u kojoj se nalazi uzorak:

$$CI = \frac{H_s}{H_e} \cdot 100 \quad (7)$$

gde je H_s - visina sloja osiromašenog disperznom fazom a H_e - ukupna visina uzorka emulzije.

4.2.15. Plan eksperimenta i statistička obrada podataka

Plan eksperimenta i opseg različitih variranih parametara je formiran na osnovu dosadašnjih naučnih rezultata iz oblasti istraživanja. Metoda odzivne površine je korišćena kao alat za dizajniranje plana i evaluaciju eksperimenata koji su obuhvatali mešanje više različitih stabilizatora – polisaharida na različitim nivoima koncentracija. Ostali eksperimenti su dizajnirani kao varijacija jednog parametra na više nivoa. Obrada podataka i regresiona analiza je izvršena programima: Design-Expert v.7 Trial, Statistica 12, Origin 9.1, Microsoft Excel, Rheo Win 4.0, Mastersizer 2000, OPUS, Paint.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Karakterizacija pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina

5.1.1. Fizičko-hemijski sastav uzoraka polisaharida

Fizičko-hemijski sastav praškastih uzoraka navedenih polisaharida je prikazan u tabeli 2. Iz tabele 2. možemo videti da se vlakna šećerne repe (VŠR) kao i pektin šećerne repe (PŠR) u najvećoj meri (preko 80%) sastoje od prehrambenih vlakana, dok OSA maltodekstrin (OSAm), kao produkt hidrolize skroba, ne sadrži vlakna, već samo vodorastvorne maltodekstrine.

Tabela 2. Fizičko-hemijski sastav polisaharida korišćenih u stabilizaciji emulzija (PŠR – pektin šećerne repe, VŠR – vlakna šećerne repe, OSAm – OSA maltodekstrin).

Parametar	PŠR	VŠR	OSAm
Vlaga (%)	8,72	6,69	7,7
Proteini (%)	4,39	9,71	0,35
Masti (%)	0,09	0,22	0,03
Ukupno vlakana (%)	86,33	80,04	0
Rastvorljiva vlakna (u vodi) (%)	86,31	40,72	0
Celuloza (%)	0	33	0
Pepeo (%)	0,95	3,93	0,74

Vlakna prisutna u PŠR gotovo kvantitativno predstavljaju rastvorljiva vlakna, odnosno razgranati lanac poligalakturonske kiseline koji je dobro rastvorljiv u vodi. VŠR u svom sastavu sadrže rastvorljiva ali i nerastvorljiva vlakna. U vodi rastvorljiva vlakna potiču najvećim delom (2/3) od pektina a manjim delom (1/3) od hemiceluloznog molekula koji se samo delimično rastvara u vodi. Nerastvorljiva vlakna su kao što je prikazano u tabeli 2. sastavljena uglavnom od celuloze (33%), lignina kao i dela hemiceluloze nerastvorljivog u vodi. Sadržaj masti je očekivano mali u svim uzorcima (<0.5%), dok sadržaj pepela varira od 3,93 do 0,74%. Značajan udeo proteina je prisutan u uzorcima PŠR, 4,39%, odnosno u VŠR, 9,71% . Imajući u vidu dosadašnja istraživanja koja su ukazala na značajan uticaj vezanog proteinskog dela na

emulgujuća svojstva biopolimera, neophodno je ispitati tačan aminokiselinski sastav prisutnih proteina. Sadržaj aminokiselina u uzorcima vlakana i pektina šećerne repe je prikazan u tabeli 3.

Tabela 3. Sadržaj aminokiselina u uzorcima vlakana i pektina šećerne repe (PŠR – pektin šećerne repe, VŠR – vlakna šećerne repe).

Amino kiselina		PŠR	VŠR
		g/100g	
hidrofilne	Asparaginska kiselina	0,26	1,75
	Treonin	0,15	0,33
	Serin	0,42	0,29
	Glutaminska kiselina	0,33	1,20
	Cistein	0,04	0,08
	Lizin	0,49	0,71
	Histidin	0,19	0,27
	Arginin	0,67	1,17
hidrofobne	Prolin	0,38	0,96
	Glicin	0,52	0,44
	Alanin	0,22	0,46
	Valin	0,06	0,36
	Metionin	0,05	0,16
	Izoleucin	0,11	0,29
	Leucin	0,09	0,46
	Tirozin	0,36	0,51
	Fenilalanin	0,05	0,27
Ukupno		4,39	9,71

S obzirom na značajno veći sadržaj proteina u vlaknima šećerne repe u odnosu na uzorak pektina, vrednosti apsolutnog sadržaja pojedinačnih aminokiselina su očekivano više u vlaknima nego u pektinu šećerne repe. Iako postoje značajne razlike u vrednostima ukupnog sastava aminokiselina, odnos hidrofilnih/lipofilnih aminokiselina je gotovo identičan u ispitivanim uzorcima, čime je potvrđeno poreklo iz istog biljnog materijala. Kod oba uzorka je sadržaj hidrofilnih aminokiselina za nijansu veći, 60:40% sa najvećim sadržajem asparaginske kiseline u vlaknima šećerne repe i arginina u pektinu šećerne repe. Prisustvo hidrofilnih i hidrofobnih grupa aminokiselina ukazuje na amfifilni karakter ovih proteina. Na osnovu dobijenih rezultata može se očekivati da se proteinski delovi iz oba uzorka nadju na granici faza u sistemima ulje/voda i da na taj način formiraju adsorpcioni sloj koji će stabilizovati dobijenu emulziju. Osim proteinskog dela molekula, pretpostavlja se da se amfifilan karakter vlaknima

i pektinu šećerne repe daju i fenolne kiseline prisutne u njihovoj strukturi. Sadržaj fenolnih kiselina ovih polisaharida je prikazan u tabeli 4.

Tabela 4. Sadržaj fenolnih kiselina u uzorcima vlakana šećerne repe (VŠR) i pektina šećerne repe (PŠR).

Fenolna kiselina	PŠR	VŠR
	mg/g	
Galna kiselina	0,070±0,014	0,047±0,003
Protokatehinska kiselina	0,037±0,001	0,049±0,003
p-hidroksibenzoeva kiselina	0,065±0,004	0,013±0,001
Vanilinska kiselina	0,057±0,003	0,055±0,019
Kafena kiselina	-	0,035±0,014
Sinapična kiselina	1,160±0,093	1,972±0,107
Ferulna kiselina	4,590±0,027	2,558±0,086
Ukupno	5,979	4,774

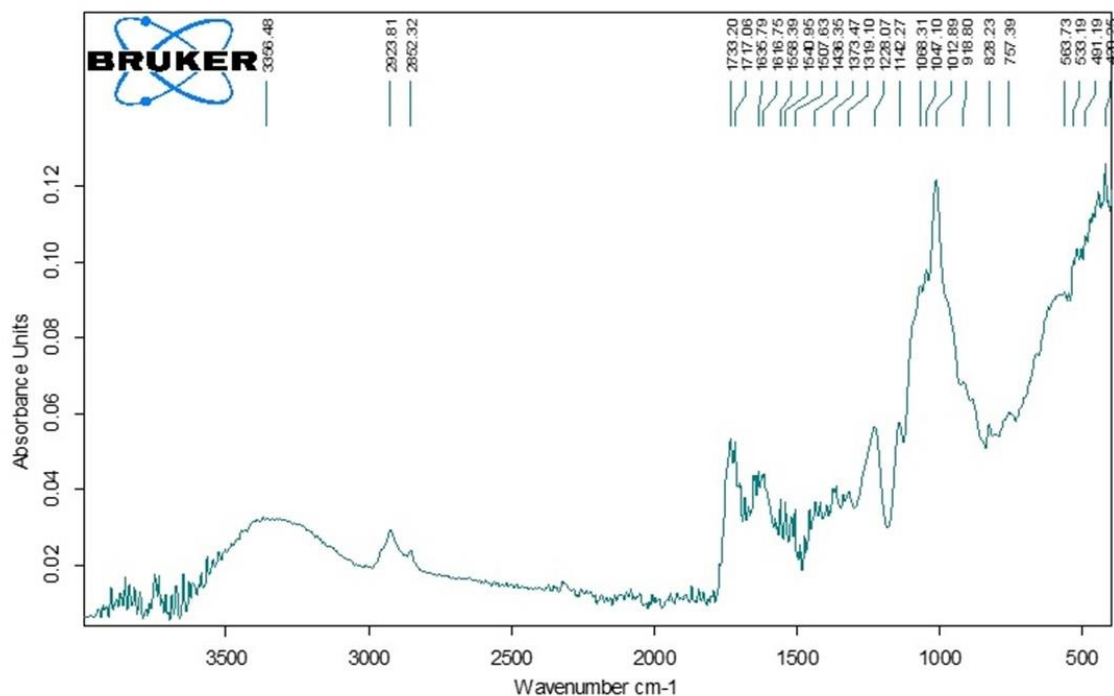
Od prisutnih fenolnih kiselina, najveći deo čine ferulna i sinapična kiselina u oba uzorka polisaharida. Relativno veliki ukupan sadržaj fenolnih kiselina naglašava veliki uticaj ovog dela strukture ispitivanih polisaharida u procesima kao što je emulgovanje, u kojima hidrofilnost, odnosno hidrofobnost, funkcionalnih grupa igra presudnu ulogu.

S obzirom na fizičko-hemijski sastav, OSA maltodekstrin osim vezane oktenil sukcinatne grupe, ne sadrži komponente koje mogu pokazati površinsku aktivnost na granici faza. Substitucija oktenil sukcinatnom grupom u molekulu maltodekstrina je ograničena na <3% prema proizvođačkoj specifikaciji, i kao takav OSA maltodekstrin se može koristiti u proizvodnji prehrambenih proizvoda (C*EmCap 12633, Cargill). Međutim, visok sadržaj maltodekstrina male DE vrednosti (DE<5) može značajno uticati na povećanje viskoziteta kontinualne faze a samim tim i modifikovati stabilnost emulzije kao i sam proces emulgovanja.

5.1.2. FTIR spektar uzoraka polisaharida

Infracrvenom spektroskopijom uzoraka formirane su krive apsorbancije u zavisnosti od talasne dužine spektra svetlosti. Dobijeni FTIR spektri su prikazani na slikama 9, 10, 11. Na osnovu identifikacije dobijenih maksimuma prikazanih na slici, utvrđeno je da, u ispitivanim sistemima, postoji veliki potencijal uspostavljanja intermolekularnih veza kako između molekula istih polisaharida tako i između različitih polisaharida korišćenih u ovoj studiji.

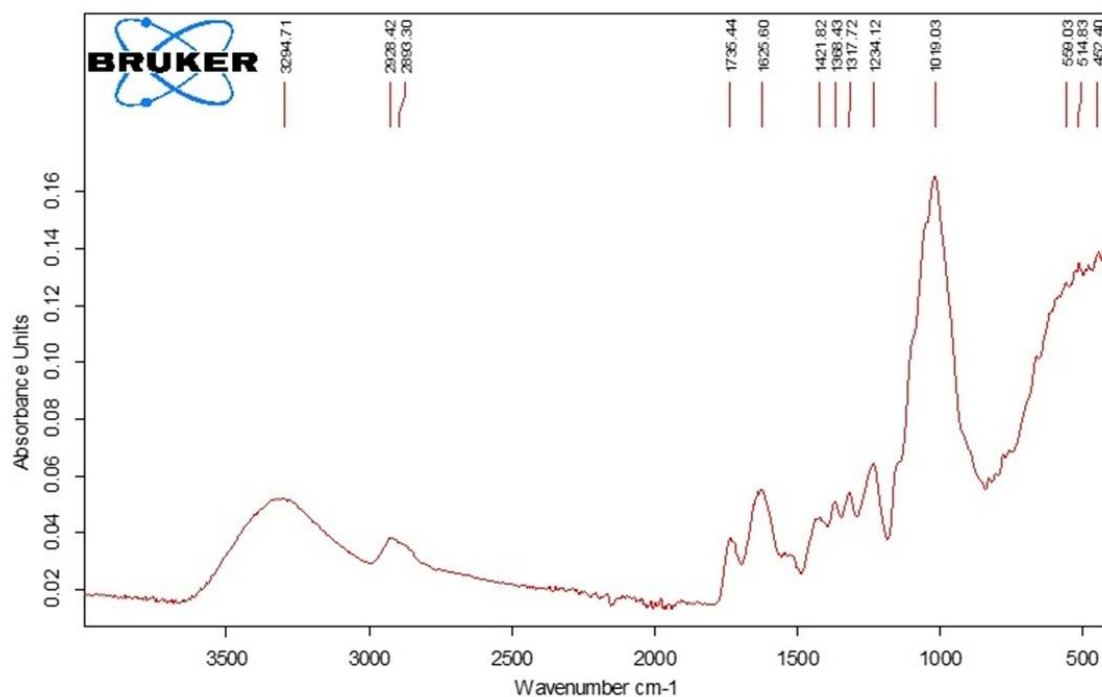
Na FTIR spektru uzorka pektina šećerne repe (slika 9) mogu se identifikovati različite hidrofilne i hidrofobne grupe. S obzirom da je korišćeni pektin po svojoj prirodi visokometilovan, prisustvo maksimuma na 2852 cm^{-1} kao i maksimuma u delu spektra od 1373 do 1436 cm^{-1} potvrdilo je prethodne pretpostavke o prisustvu metil grupa u razgranatoj strukturi pektina šećerne repe. Maksimum na 2923 cm^{-1} predstavlja istezanje C-H veza koje potiču iz metil grupa u metilovanom delu lanca poligalakturonske kiseline kao i iz metil grupa prisutnih u aminokiselinama. Veoma širok maksimum u oblasti oko 3350 cm^{-1} ukazuje na prisustvo –OH grupa koje značajno šire maksimum u ovom predelu krive apsorbancije pa je stoga identifikacija primarnih amida ili sekundarnih amina u ovom delu oblasti spektra znatno otežana. Međutim, jasan „otisk“ proteinskog ostatka, kao važnog interaktivnog dela pektina šećerne repe, je identifikovan maksimumima u predelu od 1142 - 1319 cm^{-1} i 1507 - 1616 cm^{-1} . Ovi maksimumi odgovaraju funkcionalnim grupama aminokiselina kao što su lizin, serin, glutaminska kiselina i arginin koje, kao što je prikazano u rezultatima aminokiselinskog sastava, imaju najveći udeo u strukturi prisutnih proteina pektina šećerne repe. Takođe, sa stanovišta mogućnosti interakcije sa drugim polisaharidima, važno je istaći maksimume na 1717 i 1733 cm^{-1} koji predstavljaju vibracije C=O veza iz estarski vezanih grupa. Kao što je prethodno navedeno, pektin šećerne repe pored velikog broja metil grupa, sadrži i izrazito visok broj esterifikovanih delova pektinskog lanca, aromatičnim i alifatičnim ugljovodonicima, koji daju ovom makromolekulu hidrofoban karakter. Maksimum na talasnoj dužini od 1635 cm^{-1} predstavlja vibraciju –NH₂ grupe karakteristične za arginin i lizin, dve najzastupljenije hidrofilne aminokiseline u pektinu šećerne repe. Osim toga, prisutni maksimumi u predelu oko 1650 cm^{-1} odgovaraju C=C dvostrukim vezama koje mogu poticati iz benzenovog prstena ili fenolnih kiselina. Najintenzivniji maksimum na krivoj apsorbancije ovog uzorka, 1012 cm^{-1} , označava C-O veze koje prevashodno čine vezane –OH grupe za C atome u pektinskom lancu (Stuart, 2004).



Slika 9. FTIR spektar uzorka pektina šećerne repe.

FTIR spektar vlakana šećerne repe (slika 10) je u velikom delu sličan spektru pektina šećerne repe. Međutim, može se primetiti da mnogi maksimumi nisu naglašeni kao u spektru pektina, već su razvučeni i stoga je identifikacija otežana. Najintenzivniji maksimum apsorpcije je, kao i kod pektina šećerne repe, na talasnoj dužini od 1019 cm^{-1} i predstavlja C-O veze iz vezanih -OH grupa u monosaharidnim monomerima koji čine celulozni, ili neki od prisutnih polisaharidnih lanaca. Osim ovih C-O veza, na talasnoj dužini od 1234 cm^{-1} identifikovane su C-O veze koje potiču iz karboksilnih grupa prisutnih u uzorku iz proteinskog ostatka ili pektinskog lanca poligalakturonske kiseline. Maksimumi prisutni na talasnim dužinama od 1317 do 1368 cm^{-1} odgovaraju savijanju veza karakterističnih funkcionalnih grupa, -OH i -CH₃, aminokiselina kao što su leucin, izoleucin, serin i alanin. Ovaj deo spektra od 1000 do 1500 cm^{-1} , koji najčešće predstavlja „fingerprint“ region, se u uzorcima pektina i vlakana šećerne repe gotovo poklapa ukazujući na veliku sličnost ovog biljnog materijala, prevashodno proteinskog dela, ali i na činjenicu da vlakna šećerne repe sadrže značajnu količinu pektina (i do 30%). Amino grupe iz primarnih amina pokazuju maksimum apsorpcije na 1625 cm^{-1} što odgovara bočnim grupama arginina i lizina. Detektovani maksimum na 1735 cm^{-1} , predstavlja vibracije C=O iz estarskih veza koje su značajno reaktivnije od C=O veza iz karboksilne grupe. Metil grupe su identifikovane maksimumima na 1421 cm^{-1} i 2893 cm^{-1} , a C-H veze iz prisutnih metil

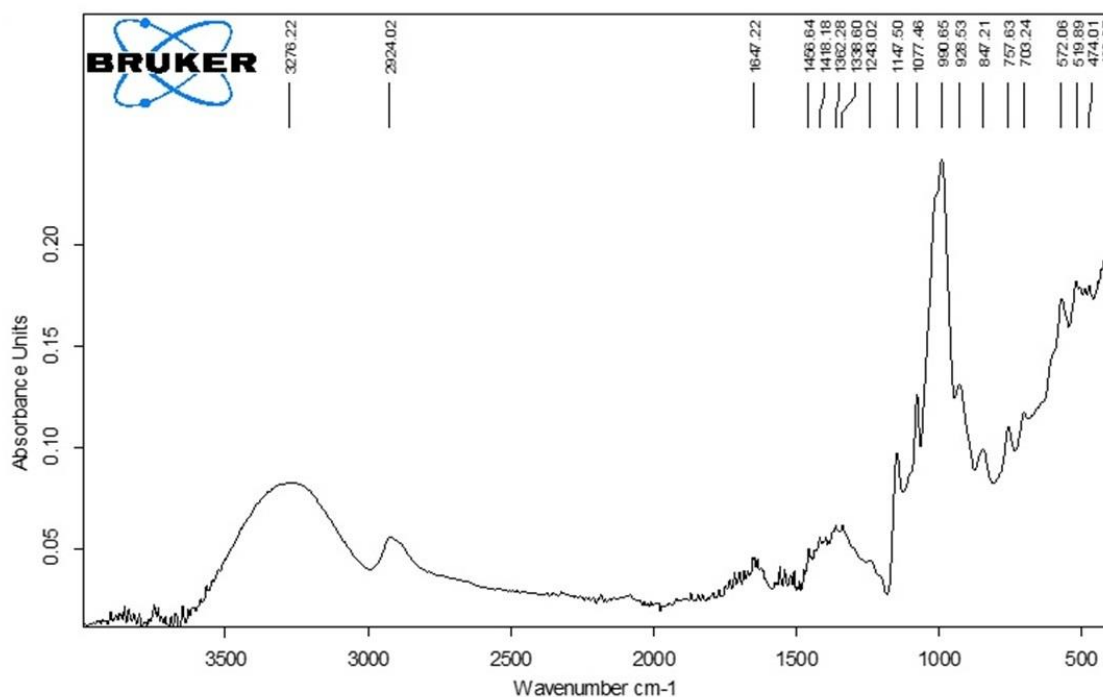
grupa su pokazale istežanje na talasnoj dužini od 2928 cm^{-1} . Kao i kod pektina šećerne repe izuzetno širok maksimum u oblasti oko 3300 cm^{-1} ukazuje na prisustvo $-\text{OH}$ grupa i brojnih vodoničnih veza koje šire maksimum u opsegu $3000 - 3500\text{ cm}^{-1}$ (Stuart, 2004).



Slika 10. FTIR spektar uzorka vlakana šećerne repe.

Za razliku od uzoraka pektina i vlakana šećerne repe, na FTIR spektru OSA maltodekstrina (slika 11) se ne mogu uočiti maksimumi koji odgovaraju proteinskom delu polisaharida čije odsustvo je potvrđeno i u hemijskom sastavu ovog polisaharida. Međutim, mogu se uočiti native hidrofилne kao i hidrofobne grupe koje potiču od OSA modifikacije maltodekstrina. Karboksilne grupe u uzorku su identifikovane sa nekoliko maksimuma. C-O veze koje potiču iz karboksilnih grupa su prikazane maksimumima na 928 cm^{-1} i 1243 cm^{-1} . Veze C=O koje potiču iz karboksilnih grupa su obeležene na talasnoj dužini od 1647 cm^{-1} . Takođe, vezane $-\text{OH}$ grupe iz karboksilne funkcionalne grupe su apsorbivale infracrveni spektar na 3276 cm^{-1} sa najširim maksimumom apsorbancije. Najintenzivniji maksimum na talasnoj dužini od 990 cm^{-1} odgovara $-\text{OH}$ grupama prisutnim u lancu maltodekstrina kao najbrojnijim grupama u ovom makromolekulu. Oktenil sukcinatna grupa, uvedena procesom modifikacije u strukturu maltodekstrina, se može identifikovati maksimumima na 1147 cm^{-1} , koji odgovara C-O vezama

u strukturi anhidrida (OC-O-CO), kao i estarskim vezama CO-O-C sa maksimumima apsorbanije u oblasti od 1077 do 1338 cm^{-1} . C=C veze iz molekula oktenila su na krivoj apsorbanije prikazane maksimumom oko 1647 cm^{-1} pored dominantnog maksimuma apsorbanije C=O veze. Prisustvo tragova amina sa C-N vezama potvrđeno je na talasnoj dužini od 1362 cm^{-1} . Maksimum apsorbanije na 2924 cm^{-1} u uzorku OSA maltodekstrina odgovara asimetričnom razvlačenju C-H veza u metilenskoj grupi usled postojanja dvostruke veze u neposrednoj blizini (Stuart, 2004).

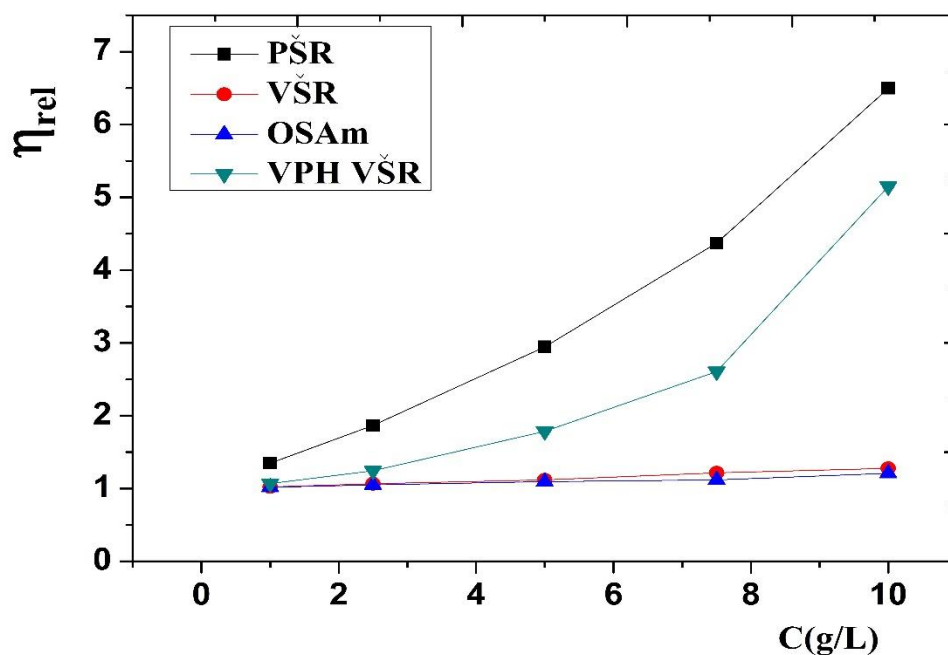


Slika 11. FTIR spektar uzorka OSA maltodekstrina.

5.1.3. Viskoziteti vodenih rastvora uzoraka polisaharida

Linearni polimeri i makromolekuli koji teže linearnoj strukturi ponašaju se na specifičan način u zavisnosti od odnosa njihovog viskoziteta prema njihovoj strukturi i konformaciji. U razblaženim rastvorima, ovaj odnos najviše zavisi od zapremine "istisnute" tečnosti, tačnije hidrodinamičke zapremine makromolekula dok se oni nalaze u konstantnom kontaktu u rastvoru. Kod prilično razgranatih makromolekula kao što su PŠR, VŠR i OSAm, dolazi do brojnih promena (viskoziteta, provodljivosti) sa povećanjem koncentracije u vodenom rastvoru, koje oslikavaju strukturu i konformaciju makromolekula. Male promene sastava i koncentracije

ovakvih polisaharida značajno menjaju viskozne osobine sistema. Merenjem relativnog viskoziteta vodenih rastvora formirane su krive prikazane na slici 12.



Slika 12. Zavisnost relativnog viskoziteta od koncentracije polisaharida (PŠR – pektin šećerne repe, VŠR – vlakna šećerne repe, OSAm – oktenil sukcinat maltodekstrin, VŠR VPH – vlakna šećerne repe nakon visokopritisne homogenizacije).

Na slici 12. se uočava da pri najnižim korišćenim koncentracijama (1 g/L) vrednosti viskoziteta vodenih rastvora su približno jednake za sve ispitivane polisaharide. Međutim, do značajne promene dolazi već pri povećanju sadržaja polisaharida na 2,5 g/L, gde najveći porast viskoziteta nastupa sa povećanjem koncentracije PŠR u vodenom rastvoru. Ovaj porast se nastavlja i pri daljem povećanju koncentracije PŠR sa gotovo eksponencijalnim trendom i maksimumom od 6,50, dostignutim pri koncentraciji od 10 g/L. Ovo povećanje se objašnjava prisustvom velikog broja bočnih lanaca sastavljenih od monosaharida (arabinoze, galaktoze, ksiloze, itd) kao i značajne količine proteina vezanih za bočne lance. Naime, pri povećanju koncentracije pektina u vodenom rastvoru dolazi do izuzetno intenzivnog inter- i intramolekulskog povezivanja lanaca pektina što se manifestuje kroz povećanje otpora proticanju ovakvog rastvora. VŠR i OSAm u vodenim rastvorima ne povećavaju značajnije viskozitet, u poređenju sa PŠR, u ispitivanoj oblasti koncentracije sa maksimalnom vrednošću od 1,28, odnosno 1,21 pri količini od 10 g/L. OSAm usled značajno manje veličine molekula, u poređenju sa ostalim ispitivanim polisaharidima, i dominantnih amilopektinskih razgranatih lanaca u njegovom sastavu (imajući u vidu da korišćeni maltodekstrin potiče od voštanog

kukuruzu sa izuzetno malim sadržajem amiloze) nema mogućnost značajnijeg povećanja viskoziteta vodenih rastvora u okviru korišćenog opsega koncentracija. Niske koncentracije relativno malog makromolekula ne favorizuju interakcije koje mogu značajno promeniti osobine proticanja rastvora. VŠR se u rastvoru ponašaju delimično kao čvrste nerastvorne čestice a jednim delom se rastvaraju i povezuju pa stoga takva neuređena struktura, bez jakih međumolekulskih veza, ne utiče značajnije na viskozitet rastvora.

Ipak, VŠR značajno menjaju ponašanje u sistemu nakon tretmana vodenog rastvora u visokopritisnom homogenizeru. Nakon tretmana, može se primetiti da je trend porasta viskoziteta sličan trendu PŠR ali sa nešto nižim vrednostima relativnog viskoziteta vodenih rastvora. Ova pojava povećanja viskoziteta se objašnjava posledicama tretmana ovog biopolimera (polisaharida) visokim pritiskom. Prvenstveno dolazi do usitnjavanja čestica nerastvornih vlakana kavitacijom i veoma jakim silama smicanja (rezultati ispitivanja veličine čestica prikazani u podnaslovu 5.1.6.). Bolje pakovanje manjih čestica značajno utiče na povećanje viskoziteta pri jednakim koncentracijama polisaharida. Osim toga, pretpostavlja se da tretman visokim pritiskom usled procesa istovremenog usitnjavanja i bolje ekstrakcije vodom delimično oslobađa pektin šećerne repe iz čestica vlakana koji po gore opisanom principu modifikuje viskozitet vodene faze.

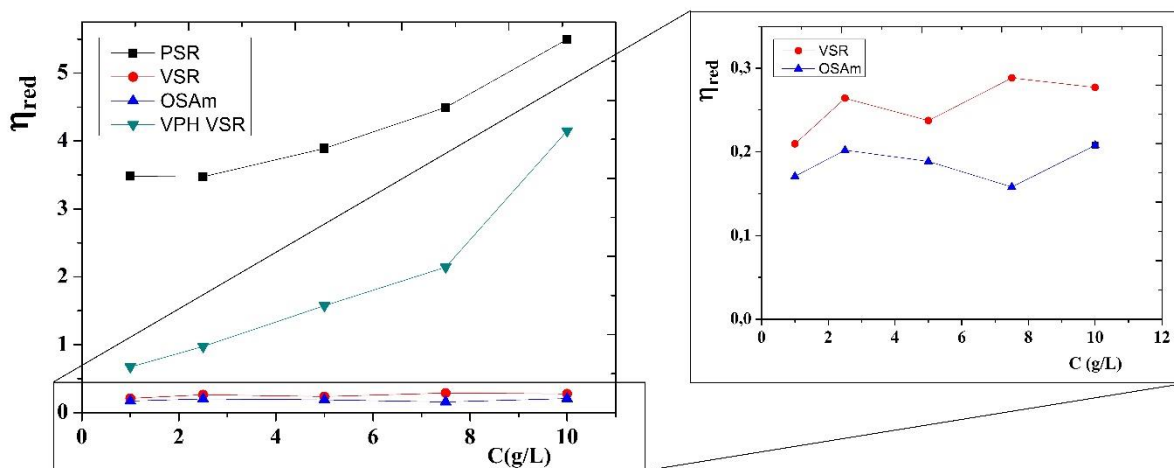
Na osnovu izračunatog specifičnog viskoziteta (tabela 5) mogu se izračunati redukovani i unutrašnji viskozitet koji isključuje faktor koncentracije i međudejstva u vodenom rastvoru pri određivanju frikcionih osobina datog polimera i omogućava određivanje prosečne molekulske mase polimera. Promena redukovanog viskoziteta sa povećanjem koncentracije polisaharida može biti uslovljena sa nekoliko faktora. Promena konformacije makromolekula, odnosno formiranje micela ili aglomerata, značajno menja zavisnost redukovanog viskoziteta od koncentracije. Pored toga, orijentacija hidrofilnih i hidrofobnih grupa u molekulu polisaharida utiče na brzinu proticanja kontinualne faze. Na kraju, pojava međusobnog povezivanja polisaharida različitim fizičkim i hemijskim vezama prividno menja oblik i način kretanja samog polisaharida pa stoga i vrednost samog otpora proticanju.

Tabela 5. Vrednosti relativnog, specifičnog i redukovanog viskoziteta ispitivanih polisaharida u zavisnosti od koncentracija.

C (g/L)	Relativni viskozitet	Specifični viskozitet	Redukovani viskozitet	Relativni viskozitet	Specifični viskozitet	Redukovani viskozitet
	Pektin šećerne repe			Vlakna šećerne repe		
10	6,4973	5,4973	5,4973	1,2773	0,2772	0,2772
7,5	4,3712	3,3712	4,4949	1,2163	0,2163	0,2884
5	2,9461	1,9461	3,8921	1,1188	0,1188	0,2375
2,5	1,8683	0,8683	3,4733	1,0661	0,0661	0,2643
1	1,3480	0,3479	3,4799	1,0210	0,0209	0,2097
	OSA maltodekstrin			VPH - Vlakna šećerne repe		
10	1,2079	0,2078	0,2078	5,1483	4,1482	4,1483
7,5	1,1186	0,1186	0,1581	2,6074	1,6073	2,1431
5	1,0944	0,0944	0,1887	1,7875	0,7875	1,5750
2,5	1,0505	0,0505	0,2022	1,2437	0,2437	0,9748
1	1,0171	0,0171	0,1709	1,0673	0,0673	0,6733

Na slici 13. možemo videti značajno povećanje vrednosti redukovanog viskoziteta sa porastom koncentracije PŠR i VPH VŠR. S obzirom na prisustvo značajne količine različitih hidrofilnih i hidrofobnih grupa u lancima ovih polisaharida, kao i prisustva funkcionalnih grupa podložnih promeni naelektrisanja, promena orijentacije ovih grupa sa povećanjem koncentracije je uslovljena silama međusobnog privlačenja i odbijanja. Kada koncentracija polisaharida poraste do kritične koncentracije, dolazi do preraspodele hidrofilnih grupa i njihovog intenzivnijeg kontakta sa molekulima rastvarača a time i do usporavanja kretanja molekula rastvarača, odnosno povećanja vrednosti viskoziteta. Ova promena nagiba krive se može videti i kod PŠR (2,5 g/L) i VPH VŠR (7.5 g/L). Pored pomenutog, može se pretpostaviti i da je pri kritičnoj koncentraciji došlo do aglomeracije molekula polisaharida, povezivanjem lanaca vodoničnim ili drugim vezama, čime je značajno povećan otpor proticanju i povećana vrednost viskoziteta. U slučaju VPH VŠR ova kritična koncentracija se dostiže na značajno višoj vrednosti usled prisustva velike količine u vodi nerastvornih polisaharida (celuloze, hemiceluloze, tabela 2) odnosno značajno manje količine rastvorljivih komponenata u ukupnoj masi uzorka. Na slici 13 prikazane su krive zavisnosti redukovanog viskoziteta VŠR i OSAm. Promene redukovanog viskoziteta kod uzoraka vodenih rastvora VŠR i OSAm su veoma male sa porastom koncentracije u ispitivanom opsegu i u proseku su za oko 10% više kod VŠR. Međutim, pri

tako malim razlikama viskoziteta nije moguće izvesti jasne zaključke o karakteristikama strukture ili konformacije polisaharada. S obzirom na izgled krive i poznavanjem hemijske prirode uzorka, može se pretpostaviti da je kritična micelarna koncentracija OSAm u predelu nižih vrednosti koncentracija dok se kod vlakana šećerne repe usled prisustva rigidnih čestica može govoriti samo o kritičnoj aglomeracionoj koncentraciji. Stoga je neophodno izvršiti dodatna merenja drugačijim tehnikama (npr konduktometrijski) kako bi se okarakterisali uzorci VŠR i OSA.



Slika 13. Redukovani viskozitet (PŠR – pektin šećerne repe, VŠR – vlakna šećerne repe, OSAm – oktenil sukcinat maltodekstrin, VŠR VPH – vlakna šećerne repe nakon visokopritisne homogenizacije).

Vrednost unutrašnjeg viskoziteta se računa grafički, ekstrapolacijom na nulu koncentracije, tačnije odsečkom na y-osi, jednačinama po Huggins i Kraemer-u kao što je prikazano na slici 14. Dobijene vrednosti unutrašnjeg viskoziteta su 300,14 L/g, 22,11 L/g i 17,97 L/g za VŠR, PŠR, odnosno OSAm (slika 14).

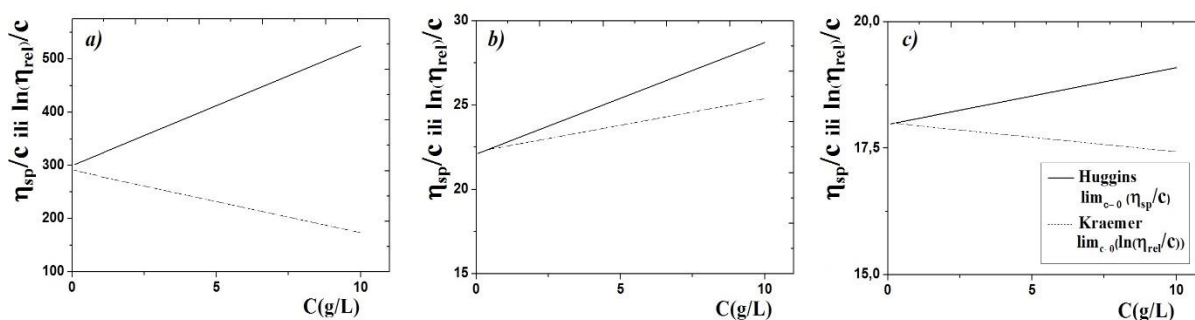
Na osnovu merenja unutrašnjih viskoziteta i podataka objavljenih u drugim studijama, prosečna molekulska masa (M) korišćenih polisaharida je izračunata pomoću modifikovane Štaudingerove jednačine (Đaković, 1985) (8):

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (8)$$

gde su $[\eta]$ - unutrašnji viskozitet, K i a - konstante karakteristične za mereni polimer-rastvarač, M – molekulska masa.

Konstante K i a koje su korišćene za određivanje prosečne molekulske mase PŠR su $K=0,3$ i $a=0,613$, dok su vrednosti konstanti K i a karakteristične za OSA maltodekstrin iznosile $K=0,00305$ i $a=1$ (Arslan, 1995; Dokić, Jakovljević i Dokić Baucal, 1998).

Izračunate prosečne molekulske mase PŠR i OSAm merenjem unutrašnjih viskoziteta bile su 78337 Da, odnosno 5892 Da. Rezultati koji se odnose na PŠR su u skladu sa specifikacijom proizvođača (Herbstreith & Fox KG, Nemačka), ali ne i u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima koje su objavili Bai et al. (2017a), 417 kDa, koji su koristili metodu „size exclusion“ hromatografije (Arslan, 1995; Dokić i sar., 2008).



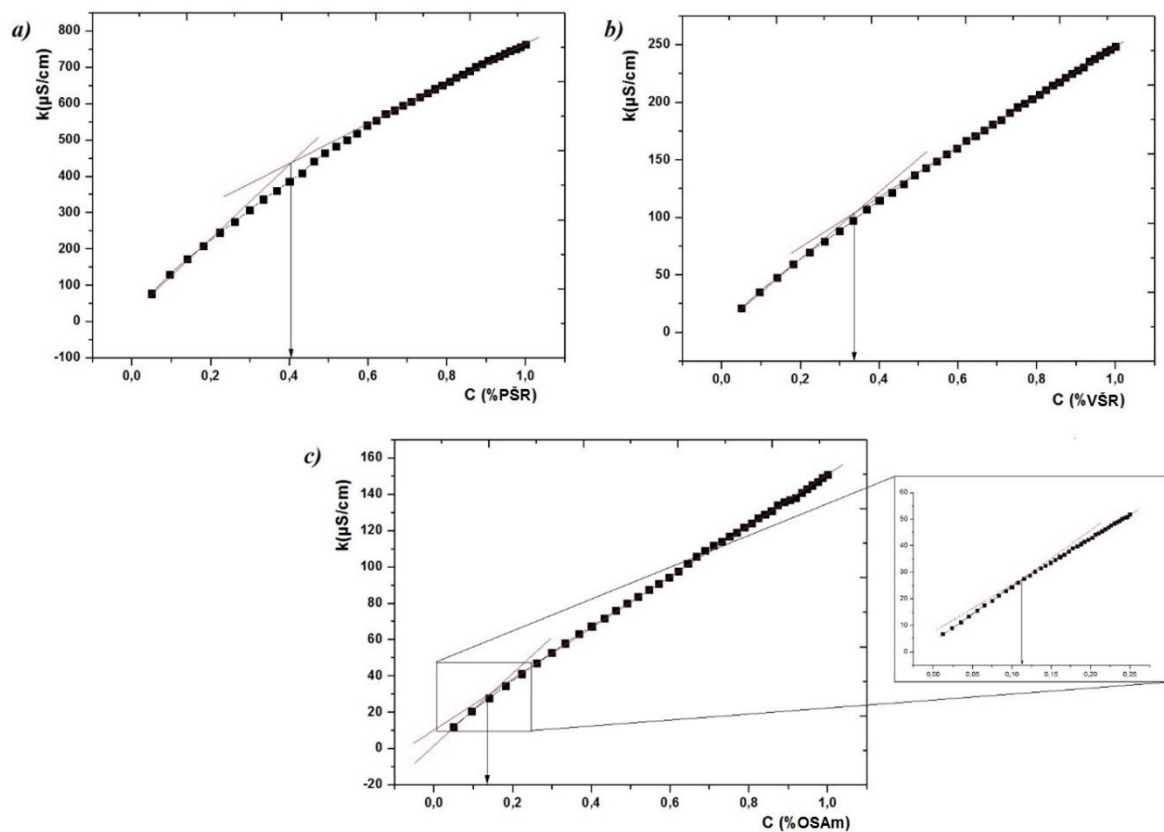
Slika 14. Određivanje unutrašnjeg viskoziteta pektina šećerne repe (a), vlakana šećerne repe (b) i OSA maltodekstrina (c).

5.1.4. Specifična provodljivost vodenih rastvora uzoraka polisaharida

Merenjem specifične provodljivosti vodenog rastvora nekog makromolekula u određenom opsegu koncentracija možemo odrediti koncentraciju makromolekula pri kojoj dolazi do formiranja micela u rastvoru ili drugih promena konformacije molekula. Koncentracija pri kojoj je došlo do formiranja micela predstavlja tačku pri kojoj je došlo do promene nagiba krive (smanjenja nagiba) koja je do te tačke imala linearnu zavisnost specifične provodljivosti od koncentracije. Do promene nagiba može doći i delovanjem raznih faktora koji za rezultat imaju smanjenje pokretljivosti makromolekula ili smanjenje broja funkcionalnih grupa koje nose naelektrisanje (međumolekulsko povezivanje, promena konformacije makromolekula, elektrolitička disocijacija, itd) (Đaković, 1985). Krive zavisnosti specifične provodljivosti od koncentracije tri vodena rastvora polisaharida su prikazane na slici 15.

Na ispitivanim uzorcima koji su predstavljeni krivama na slici 15. može se uočiti da promene nagiba nisu drastične, kao što je slučaj kod malih površinski aktivnih molekula, već da je prelaz

iz prve u drugu oblast linearnosti prilično blag. Međutim, nakon fitovanja tačaka koje formiraju krivu provodljivosti, ucrtani su linearni trendovi određenih oblasti koncentracija (crvene linije) i potom određene kritične koncentracije pri kojima je došlo do značajnog odstupanja od linearnog trenda.



Slika 15. Krive zavisnosti specifične provodljivosti od koncentracije pektina šećerne repe (a), vlakana šećerne repe (b) i OSA maltodekstrina (c).

U uzorku PŠR je na osnovu obrade rezultata utvrđeno da pri koncentraciji od 0,26% dolazi do prvog odstupanja od linearnog toka krive. Opseg od 0,26 do 0,54% karakteriše nelinearna promena provodljivosti sa promenom koncentracije, dok druga oblast linearnosti počinje od 0,54% pa do kraja ispitivanog područja. Usled specifične strukture PŠR, koja uključuje razgranati lanac poligalakturonske kiseline sa hidrofobnim i hidrofilnim funkcionalnim grupama koje nisu grupisane i polarizovane na jednom kraju lanca, ne dolazi do formiranja klasičnih molekularnih micela. Može se pretpostaviti da u oblasti od 0,26 – 0,54%, u samoj strukturi PŠR dolazi do promene konformacije usled težnje svake grupe da zauzeme poziciju sa najmanjom energijom pri konstantnom rastu koncentracije polisaharida u rastvoru. Takođe, ova oblast promene koncentracije predstavlja oblast u kojoj dolazi do aglomeracije lanaca PŠR sa početkom u kritičnoj aglomeracionoj koncentraciji (KAK) od 0,26% pri kojoj se

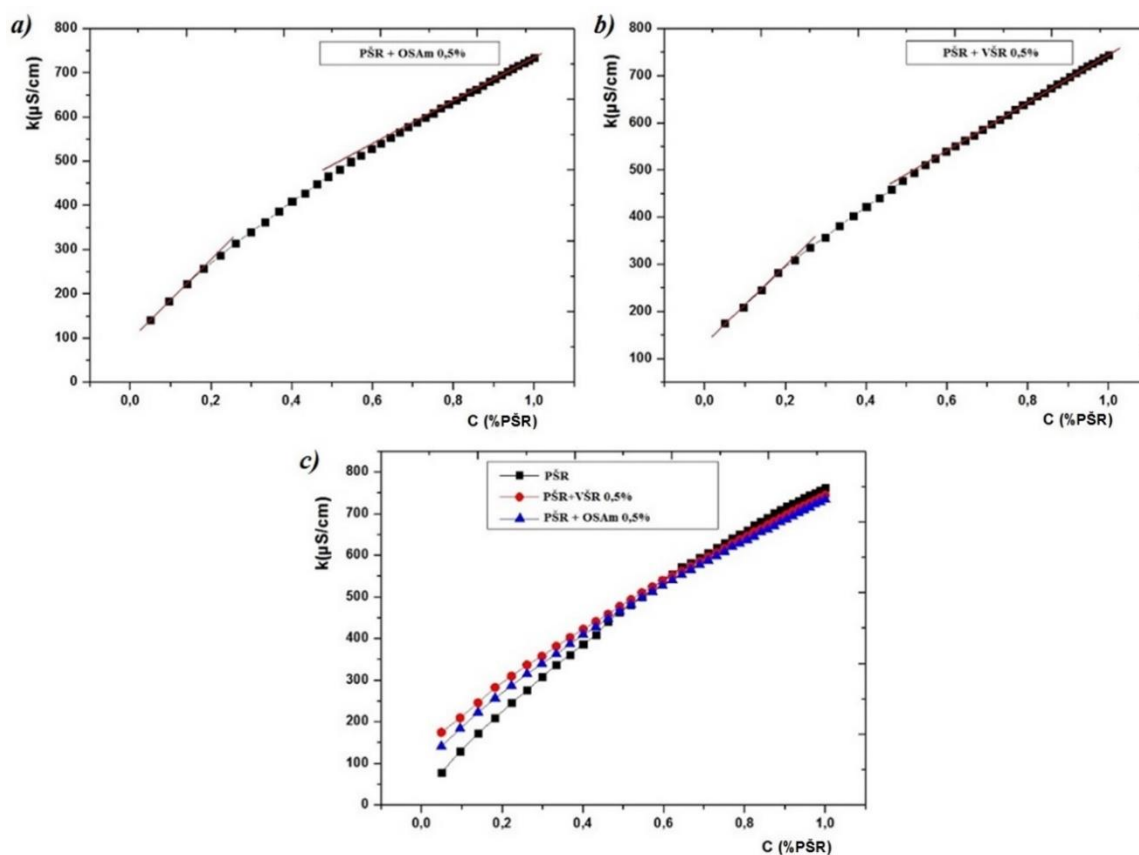
uspostavljaju međumolekularne veze između lanaca PŠR, odnosno njihovih funkcionalnih grupa. Formiranje vodoničnih veza preko karboksilnih grupa prisutnih u lancima poligalakturonske kiseline, kao i formiranje različitih Van der Valsovih veza između funkcionalnih grupa prisutnih aminokiselina u kojima je prisutno naelektrisanje pri datim uslovima, se odvija kako između lanaca dva makromolekula tako i u okviru jednog makromolekuskog lanca. Takođe, orijentacija prisutnih hidrofobnih grupa se stoga menja i značajno utiče na usporavanje kretanja makromolekula u polarnom rastvaraču (vodi) i na taj način utiče na smanjenje nagiba krive provodljivosti. Pri koncentraciji od 0,54% smatra se da je došlo do kritičnog zasićenja i da pri daljem dodatku PŠR ne dolazi do konformacionih promena u lancu ili do daljeg međusobnog povezivanja.

Za razliku od uzorka PŠR, u uzorku VŠR je veoma teško odrediti koncentraciju pri kojoj dolazi do promene nagiba linearnog rasta provodljivosti. Na osnovu fitovanja tačaka krive provodljivosti, koncentracija od 0,30% je identifikovana kao početak odstupanja linearnog rasta provodljivosti od koncentracije polisaharida. Nelinearni rast provodljivosti obuhvata malu oblast između 0,30% i 0,46%. Dalji linearan rast provodljivosti do 1% vlakana šećerne repe ne odstupa od uspostavljenog linearnog trenda. U poređenju sa PŠR, oblast pri kojoj dolazi do interakcija i promene konformacije makromolekula je uža iako VŠR u svom sastavu imaju i značajnu količinu pektina. Osim toga, na osnovu fizičko-hemijskog sastava i većeg sadržaja proteina u VŠR, kao glavnih nosioca površinski aktivnih i emulgujućih osobina, može se očekivati da do međumolekulskih interakcija na nivou funkcionalnih grupa dođe ranije, pri nižim koncentracijama. Međutim, usled značajno slabije dostupnosti funkcionalnih grupa (slika 9, FTIR spektri), kao i usled velike količine u vodi nerastvorljivih delova ovog biopolimera (celuloze i delova hemiceluloze), početak konformacionih promena u rastvoru VŠR je identifikovan pri nešto višim koncentracijama. Takođe, pri nižim koncentracijama VŠR dolazi do uspostavljanja ravnoteže u kompleksnom sistemu vodenog rastvora usled intenzivnijeg i dominantnog uticaja rigidnih nerastvorljivih lanaca. Ovu pretpostavku potvrđuje i činjenica da ukoliko bi krive specifične provodljivosti prikazali u zavisnosti od sadržaja proteina u vodenom rastvoru, umesto apsolutnog sadržaja PŠR i VŠR (tabela 2), ustanovili bi da se pomenute promene dešavaju na znatno nižim koncentracijama proteina u uzorku PŠR (0,011% i 0,024%) u poređenju sa uzorkom VŠR (0,025% i 0,045%).

Vodeni rastvor OSA maltodekstrina predstavlja mnogo jednostavniji sistem za ispitivanje konduktometrijskih osobina ali ipak usled veličine makromolekula nagla promena nagiba nije lako vizuelno uočljiva. Za razliku od PŠR i VŠR, u ovom uzorku se može identifikovati jedna

koncentracija pri kojoj dolazi do promene nagiba i završetka jednog linearnog odnosno početka drugog linearnog trenda rasta provodljivosti bez intermedijarne nelinearne zone. Jasna promena nagiba linearnosti u jednoj tački označava formiranje kompleksa u rastvoru i kritičnu micelarnu koncentraciju (KMK). Ipak, micle formirane od strane OSAm makromolekula predstavljaju nespecifične micle koje se mogu smatrati i agregatima makromolekula. U ispitivanom uzorku OSAm, KMK iznosi 0,112%. Ova vrednost KMK-a je viša od vrednosti koju su prethodni istraživači dobili pri ispitivanju OSA skroba (0,073%) što se može smatrati posledicom enzimske modifikacije skrobne granule i hidrolize do maltodekstrina (Krstonošić, 2010).

Interakcije između različitih polisaharida su ispitivane postepenim povećavanjem koncentracije jednog polisaharida dok je koncentracija drugog polisaharida održavana na konstantnoj vrednosti (0,5%) tokom celokupnog procesa merenja specifične provodljivosti. Koncentracija od 0,5% je izabrana kao konstantna jer je u daljim eksperimentima emulgovanja predstavljala minimalnu koncentraciju polisaharida pri kojoj su ispitivani uticaji međusobnih interakcija stabilizatora. Na slici 16. prikazane su krive specifične provodljivosti smeša PŠR-OSAm i



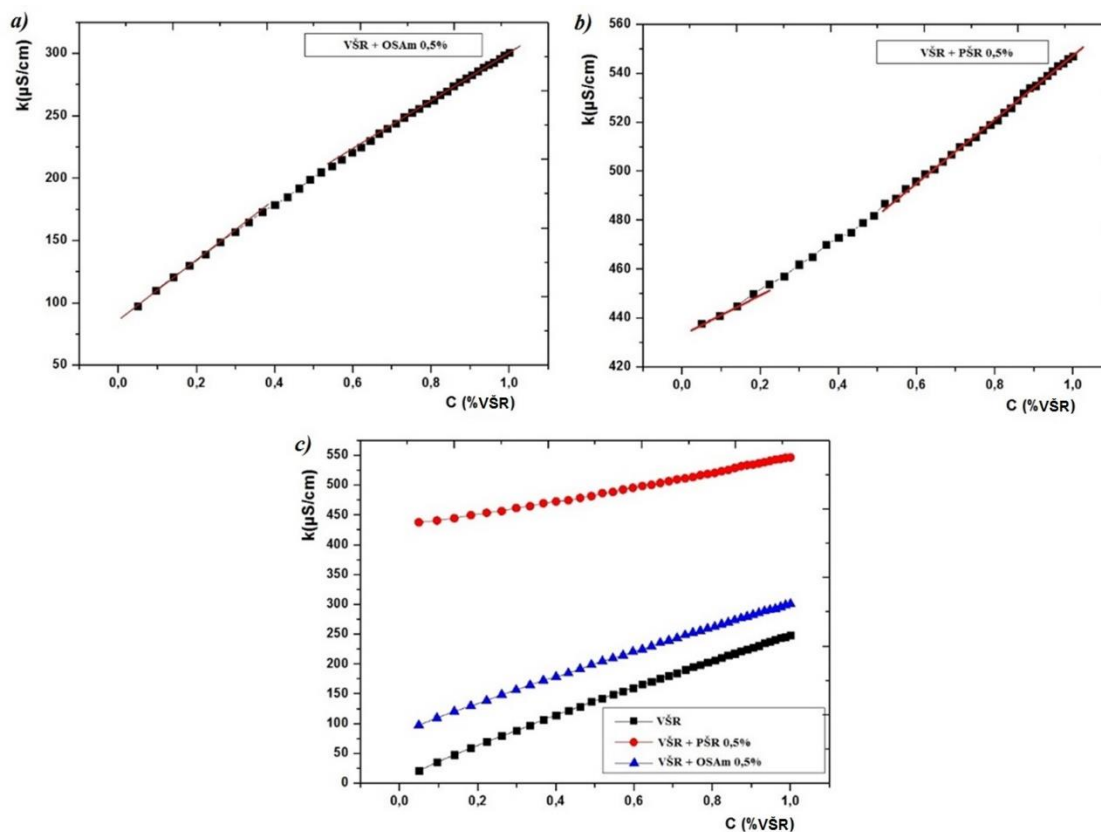
Slika 16. Promena specifične provodljivosti smeše pektina šećerne repe (PŠR) i OSA maltodekstrina (a) i smeše pektina i vlakana šećerne repe (VŠR) (b) u zavisnosti od koncentracije pektina šećerne repe.

PŠR-VŠR u zavisnosti od koncentracije PŠR. Krive provodljivosti ne pokazuju velika odstupanja od krive dobijene ispitivanjem vodenog rastvora PŠR usled dominantnog uticaja PŠR na vrednosti specifične provodljivosti. Ipak, može se primetiti da pri dodatku OSAm i VŠR dolazi do smanjenja nagiba krive usled međusobnih interakcija makromolekula (slika 16c).

Koncentracija PŠR, pre prve prelomne tačke, u kojoj dolazi do odstupanja krive od početnog linearnog trenda (crvena linija) se označava kao KAK, odnosno koncentracija nakon koje se u sistemu, osim pojedinačnih makromolekula PŠR, nalaze i aglomerati PŠR-OSAm i PŠR-VŠR. Veće vrednosti specifične provodljivosti u predelu koncentracije PŠR (slika 16c) do prelomne tačke predstavljaju rezultat kumulativne provodljivosti apsolutnih vrednosti dobijenih ispitivanjem pojedinačnih vodenih rastvora polisaharida. Međutim, do odstupanja od ovog trenda dolazi nakon prelomne tačke PŠR (0,41%), kada se vrednosti provodljivosti smeša PŠR-OSAm i PŠR-VŠR nalaze ispod krive provodljivosti čistog rastvora PŠR. Stoga, u ovom predelu se može pretpostaviti da je došlo do značajnih promena u konformaciji makromolekula usled njihovog povezivanja i ugrađivanja u prostorni matriks koji ima značajno manju pokretljivost. Osim toga, može se pretpostaviti da je usled povećanja koncentracija određenih funkcionalnih grupa a samim tim i njihovog međusobnog kontakta došlo i do suzbijanja disocijacije na određenim delovima makromolekula što je rezultovalo u smanjenju rasta ukupne električne aktivnosti makromolekula. U predelu nakon druge prelomne tačke, dolazi do ponovnog uspostavljanja linearnog trenda, odnosno do zasićenja polisaharida i dalje provodljivost raste linearnim trendom sa povećanjem koncentracije PŠR.

Na slici 17. prikazane su krive specifične provodljivosti smeša VŠR-OSAm i VŠR-PŠR u zavisnosti od koncentracije VŠR. Povećanje ukupnih vrednosti provodljivosti, u odnosu na čist rastvor VŠR, kod uzoraka vodenih rastvora VŠR-OSAm i VŠR-PŠR predstavlja rezultat kumulativne provodljivosti polisaharida koji se nalaze u rastvoru, pa se tako najveći skok provodljivosti u odnosu na čist rastvor VŠR može primetiti kod uzorka sa 0,5% PŠR (slika 17c). U uzorku smeše VŠR-OSAm (slika 17a) se može primetiti blago smanjenje nagiba rastuće krive provodljivosti sa povećanjem koncentracije VŠR kao i jasan prestanak linearne zavisnosti specifične provodljivosti od C (%VŠR) (crvene linije) nakon dostizanja KAK. Ipak, ovo smanjenje nagiba je značajno manje nego kod uzorka PŠR-OSAm što ukazuje na različitu vrstu i manji uticaj uspostavljenih VŠR-OSAm interakcija. Manji uticaj se može objasniti drugačijom prirodom veza koje se uspostavljaju u sistemu VŠR-OSAm kao i značajno većim i rigidnijim

lancima VŠR. Stoga, za značajniju promenu provodljivosti vodenog rastvora VŠR je neophodno specifično više OSAm molekula u poređenju sa rastvorom PŠR. Nakon kratkog nelinearnog područja i zasićenja VŠR OSAm makromolekulima, provodljivost nastavlja ponovo da raste linearno.

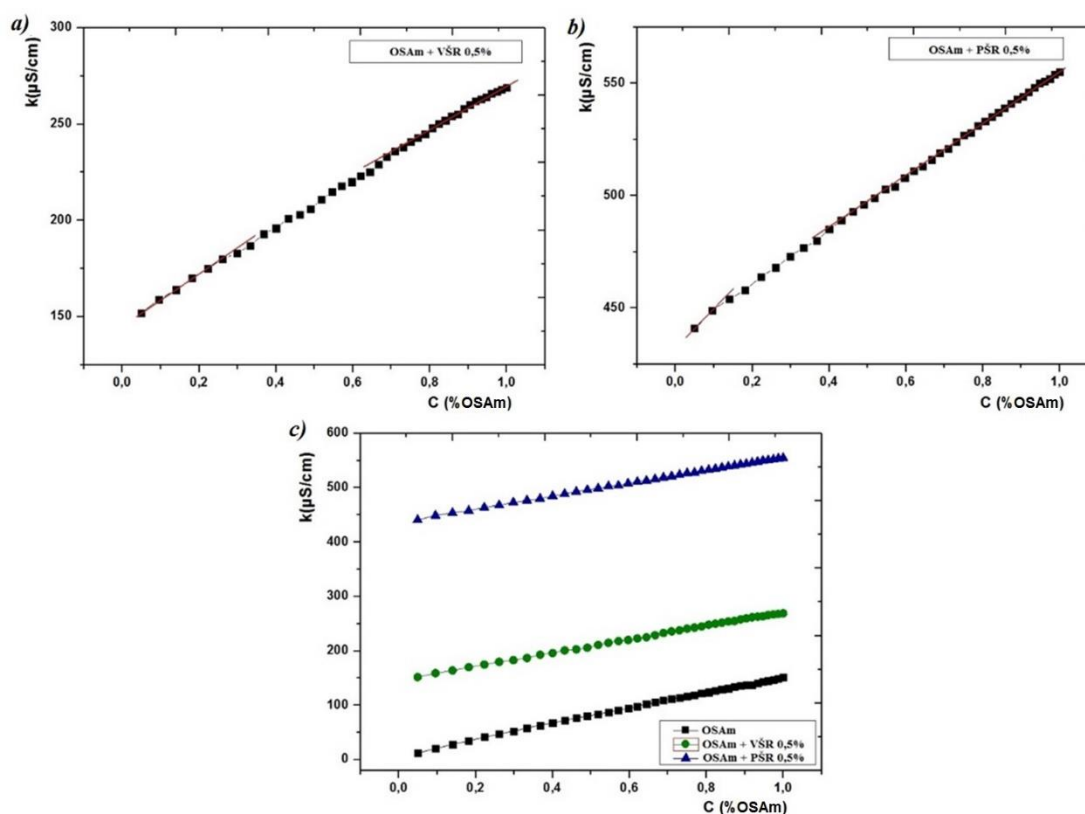


Slika 17. Promena specifične provodljivosti smeše vlakana šećerne repe (VŠR) i OSA maltodekstrina (a) i smeše vlakana i pektina šećerne repe (PŠR) (b) u zavisnosti od koncentracije vlakana šećerne repe.

U sistemu VŠR-PŠR dolazi do najznačajnije promene trenda rasta specifične provodljivosti a samim tim i do najveće promene u konformaciji prisutnih makromolekula. Za razliku od ostalih uzoraka, kod kojih pri povećanju koncentracije polisaharida dolazi do smanjenja rasta specifične provodljivosti (smanjuje se nagib krive), u uzorku smeše VŠR-PŠR dolazi do suprotnog efekta. Sa povećanjem koncentracije VŠR, pri konstantnoj koncentraciji PŠR od 0,5%, dolazi do ubrzanog rasta specifične provodljivosti, gotovo eksponencijalnim karakterom. Ova pojava ukazuje na formiranje strukture koja ima veći potencijal provodljivosti nakon međusobnih interakcija. Pretpostavlja se da sa dodatkom VŠR u rastvor koji sadrži 0.5% PŠR, dolazi do intenzivnije elektrolitičke disocijacije aktivnih grupa pomeranjem ravnoteže ka formiranju naelektrisanja usled unošenja dodatne količine elektrolita u sistem. Kao bitan faktor

u evaluaciji procesa povećanja provodljivosti treba napomenuti i aminokiselinski sastav VŠR i PŠR kroz odnos sadržaja hidrofilnih naelektrisanih aminokiselina. VŠR imaju značajno veći sadržaj negativno naelektrisanih aminokiselina (asparaginska i glutaminska kiselina) dok je u sastavu proteina PŠR primetan veći sadržaj pozitivno naelektrisanih aminokiselina (lizin, arginin, histidin) (tabela 3). Stoga, sa povećanjem koncentracije negativno naelektrisanih jona u rastvoru koji potiču iz VŠR dolazi do promene u konformaciji PŠR, koji, kao u vodi pokretljiviji makromolekul, teži da preorijentacijom svojih pozitivnih grupa suzbije rastuću koncentraciju negativnih jona i time značajno menja provodljivost smeše. Još jedan efekat koji može dovesti do povećanja provodljivosti je stvaranje makromolekularne „gužve“ u kojoj se, usled velikog afiniteta VŠR ka apsorpciji vode iz rastvora, povećava efektivna koncentracija PŠR što rezultira u intenzivnijem rastu specifične provodljivosti usled dominantnog uticaja veće provodljivosti PŠR (Mittal, Chowhan & Singh, 2015).

Promene specifične provodljivosti u smešama vodenog rastvora OSAm-VŠR i OSAm-PŠR u zavisnosti od koncentracije OSAm prikazane su na slici 18.

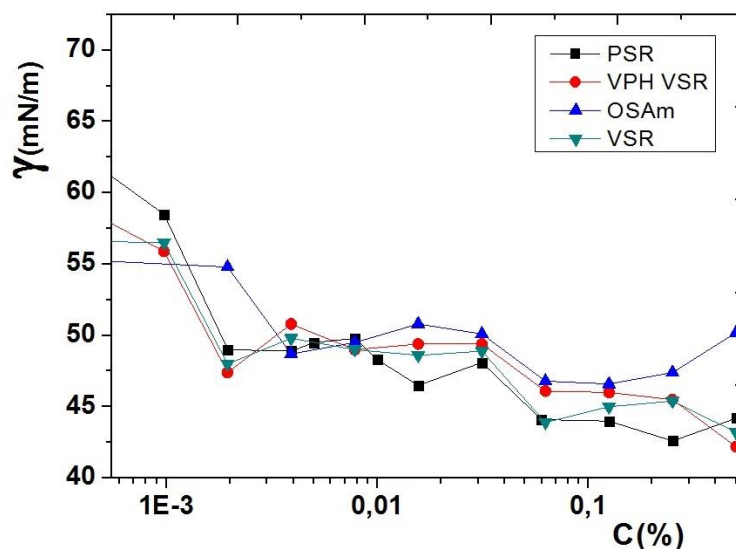


Slika 18. Promena specifične provodljivosti smeše OSA maltodekstrina (OSAm) i vlakana šećerne repe (VŠR) (a) i smeše OSA maltodekstrina i pektina šećerne repe (PŠR) (b) u zavisnosti od koncentracije OSA maltodekstrina.

Merenjem specifične provodljivosti smeše OSAm-VŠR (slika 18a) može se primetiti odstupanje od linearnog trenda rasta provodljivosti nakon dostizanja KAK. Prikazano odstupanje predstavlja rezultat početka međumolekulske interakcije ova dva polisaharida. Nakon dostizanja kritične koncentracije OSAm molekula (0,26%) pojava aglomerata sa VŠR traje do potpunog zasićenja prisutnih VŠR pri koncentraciji OSAm od 0,73%. Nakon nelinearnog rasta i dostizanja koncentracije zasićenja VŠR, sistem opet podleže linearnom rastu na koji dalje utiče samo povećanje količine OSAm molekula u rastvoru. U sistemu OSAm-PŠR (slika 18b), do pojave aglomerata dolazi na značajno nižim koncentracijama usled mnogo veće reaktivnosti PŠR koji je potpuno solvatisan u rastvoru. Međumolekulske interakcije počinju već pri koncentraciji od 0,10% OSAm molekula i traju do potpunog zasićenja lanca PŠR (0,43%). U odnosu na sve ispitivane smeše, OSAm-PŠR je pokazala najnižu KAK. S obzirom na prethodno određenu veličinu ovih makromolekula i raspoloživost funkcionalnih grupa, može se pretpostaviti da se OSAm molekuli ugrađuju u strukturu pektina najverovatnije vodoničnim vezama kao i sternim uvijanjem lanaca usled privlačnih i odbojnih sila koje se javljaju u formiranom matriksu (Krstonošić, Dokić & Milanović, 2011).

5.1.5. Površinski napon vodenih rastvora uzoraka polisaharida

Merenjem površinskih napona metodom prstena po du Noüy-u vodenih rastvora uzoraka PŠR, VŠR, VPH VŠR i OSAm formirane su krive zavisnosti površinskog napona od koncentracije polisaharida prikazane na slici 19. Svi primenjeni polisaharidi su pokazali površinsku aktivnost, odnosno pozitivnu adsorpciju u graničnom sloju voda-vazduh. Površinska aktivnost ispitivanih polisaharida, koja se ogleda u značajnom padu vrednosti površinskog napona, se može primetiti već pri izuzetno malim koncentracijama. Do koncentracije od 0,0019%, PŠR, VŠR, VPH VŠR i OSAm su redom snizili vrednost površinskog napona na 49 mN/n, 48 mN/m, 47,4 mN/m i 54,8 mN/m.



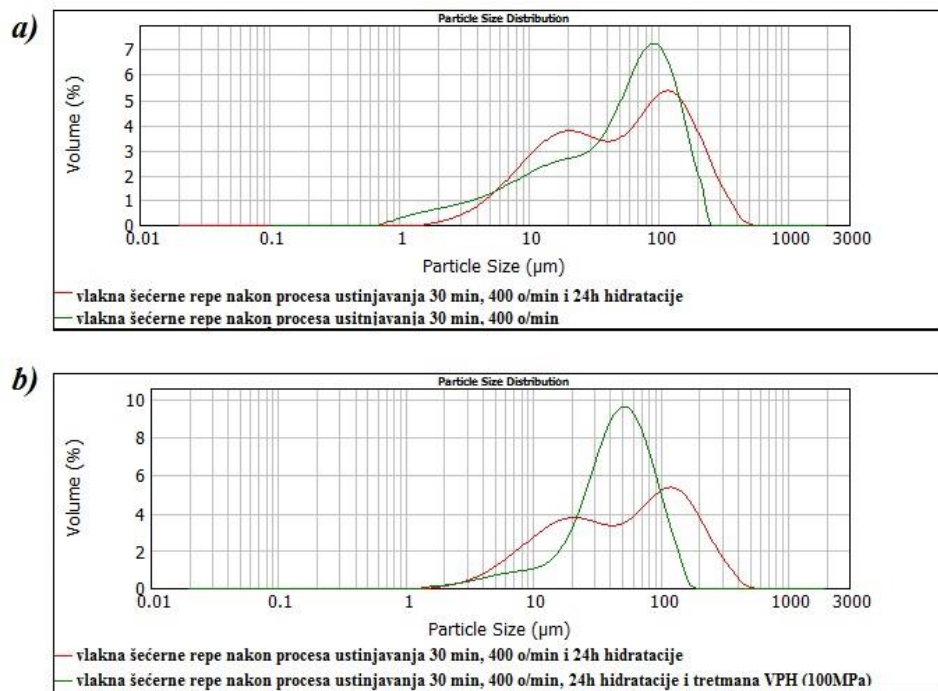
Slika 19. Zavisnost promene površinskog napona vodenog rastvora polisaharida sa povećanjem koncentracije (PŠR – pektin šećerne repe, VŠR – vlakna šećerne repe, OSAm – oktenil sukcinat maltodekstrin, VŠR VPH – vlakna šećerne repe nakon visokopritisne homogenizacije).

U narednom području koncentracija od 0,0019-0,25% očigledno je da PŠR pokazuje najveću aktivnost na graničnoj površini voda-vazduh i najnižu dostignutu vrednost površinskog napona od 42,6 mN/m pri koncentraciji od 0,25% dok VŠR pokazuju najveću površinsku aktivnost, 56,9 mN/m, pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji. VŠR, VPH VŠR i OSAm u području koncentracija od 0,0019-0,25% pokazuju veoma bliske vrednosti površinskog napona a minimalna vrednost koju dostižu iznosi 43,2 mN/m, 45,5 mN/m, odnosno 46,6 mN/m. Pretpostavlja se da površinska aktivnost PŠR, VŠR i VPH VŠR potiče od hidrofobnih komponenata koji čine ove biopolimere, posebno ferulne kiseline (tabela 4) i proteina (tabela 2 i 3), ali i od ukupnog stepena acetil esterifikacije lanaca polisaharida, kao što je prethodno opisano u delu 3.2. i 3.3. Površinska aktivnost OSAm makromolekula potiče od oktenilsukcinatnog dela, koji predstavlja izrazito hidrofobni deo strukture OSAm makromolekula (detaljnije opisano u delu 3.1.) i teži da se adsorbuje na granici faza voda-vazduh, odnosno da poveća koncentraciju OSAm u graničnom sloju.

5.1.6. Veličina čestica vlakana šećerne repe

S obzirom da se VŠR u vodenom rastvoru najvećim delom nalaze u obliku nerastvornih čestica, neophodno je ispitati veličinu i raspodelu veličine prisutnih čestica. Nakon tretmana praškastog uzorka vlakana šećerne repe u kugličnom mlinu, kao i tretmana vodenog rastvora VŠR u

visokopritisnom homogenizeru, dolazi do promene veličine i raspodele veličine čestica, što je prikazano na slici 20.



Slika 20. Raspodela veličine čestica vlakana šećerne repe nakon tretmana koloidnim mlinom (a) i visokopritisnim homogenizerom (b).

VŠR dobijena procesom usitnjavanja koloidnim mlinom imaju prosečnu veličinu čestica ($d_{3,2}$) oko $15,5 \mu\text{m}$. Nakon procesa hidratacije u toku 24h srednji Sauterov prečnik čestica se povećava usled apsorpcije značajne količine vode iz rastvora i iznosi $23,1 \mu\text{m}$. Na krivoj koja prikazuje VŠR nakon hidratacije (crvena linija) možemo videti bimodalnu krivu raspodele veličine čestica jer sitnije čestice, sa većom aktivnom površinom, podležu efikasnijem procesu hidratacije i bubrenja od krupnijih čestica. Nakon tretmana vodenog rastvora VŠR u visokopritisnom homogenizeru dolazi do značajne promene veličine a naročito raspodele veličine čestica. Kao što se može videti na slici 18b, vlakna šećerne repe nakon tretmana na 100 MPa formiraju monomodalnu usku raspodelu, veoma uniformnih veličina čestica. Osim toga, bitno je naglasiti da ovako dobijen rastvor VŠR ne obrazuje talog, što je slučaj kod vodenog rastvora VŠR pre VPH tretmana, već se nalazi u homogenom rastvoru koji ni nakon dužeg vremena skladištenja (6 meseci) ne pokazuje promene u stabilnosti rastvora. Međutim, srednji Sauterov prečnik ovako dobijenog rastvora VŠR iznosi $26,3 \mu\text{m}$ što je za oko $3 \mu\text{m}$ veće od početnog uzorka netretiranog visokim pritiskom. Pri uslovima koji vladaju u VPH može se

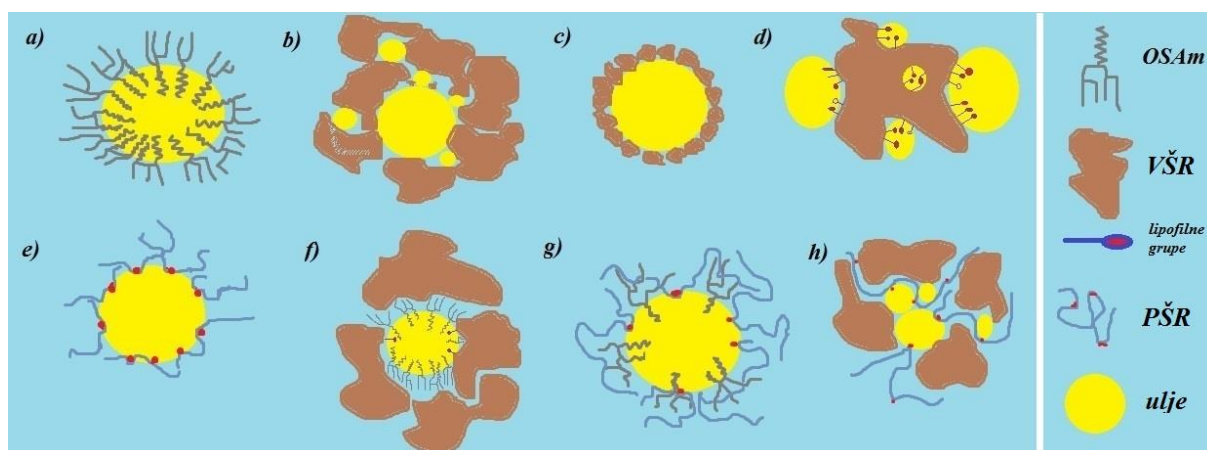
pretpostaviti da je u rastvoru, sa istovremenim smanjenjem veličina čestica, formiran i veliki broj aglomerata čestica VŠR koji utiče na specifično povećanje srednjeg izmerenog prečnika.

5.2. Osobine emulzija dobijenih stabilizacijom pektinom i vlaknima šećerne repe i OSA maltodekstrinom

Svi eksperimenti i naknadna karakterizacija dobijenih emulzija odvijali su se prema unapred određenom planu eksperimenta. Eksperimenti izrade emulzija rotor-stator tehnikom (RS), ultrazvučnim homogenizerom (UH) i membranskim emulgovanjem (ME) sprovedeni su prema *central-composite* eksperimentalnom dizajnu metode odzivne površine. Statistička analiza zavisno promenljivih istakla je poseban uticaj ulaznih faktora i njihovih interakcija (Tabela 8). Kao što je prikazano, svi dobijeni modeli bili su statistički značajni ($p < 0,05$) što ukazuje na dobro uklapanje eksperimentalno dobijenih rezultata. U ekperimentima izrade emulzija tretmanom visokopritisnim homogenizerom (VPH) nisu ispitivane međusobne interakcije PŠR, VŠR i OSAm, te je stoga eksperimentalni dizajn obuhvatao 15 eksperimenata, odnosno 3 nezavisno promenjive (stabilizatora) na 5 nivoa koncentracija. Sa stanovišta stabilnosti emulzija u daljem tekstu biće ispitivani: veličina kapi emulzija, reološke karakteristike i kriming.

5.2.1. Veličina kapi emulzija

Da bi se u potpunosti procenili i opisali svi efekti različitih stabilizatora (i njihovih mogućih interakcija) na posmatrane karakteristike emulzija, pretpostavlja se i ilustruje nekoliko mogućih načina stabilizacija emulzije (slika 21).



Slika 21. Ilustracija mogućih načina stabilizacije emulzija polisaharidima industrije šećera (OSAm – oktenil sukcinat maltodekstrin, VŠR – vlakna šećerne repe, PŠR – pektin šećerne repe).

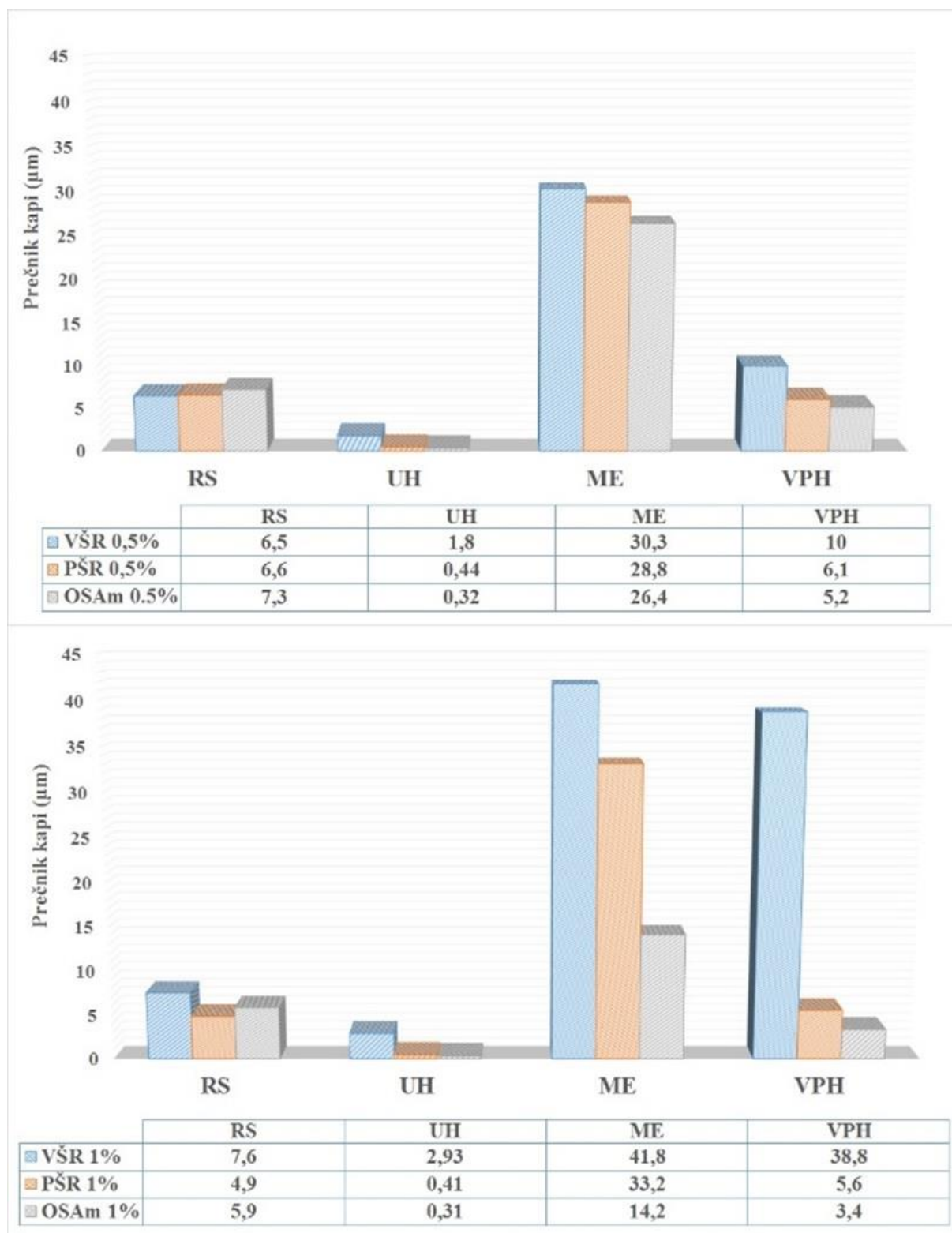
Ilustrovani načini stabilizacije emulzija obuhvataju sve eksperimente izrade U/V emulzija sprovedene po uspostavljenom eksperimentalnom planu i predstavljaju rezultat kako pregleda dosadašnjih ispitivanja tako i zaključaka izvedenih u toku izrade ove disertacije. Dobijeni rezultati merenja veličina kapi proizvedenih emulzija ($d_{3,2}$) prikazani su u Tabeli 6 i X2.

5.2.1.1. Uticaj primenjene tehnike emulgovanja

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 6. može se zaključiti da je uticaj primenjene tehnike emulgovanja izuzetno značajan sa stanovišta veličine kapi dobijenih emulzija. Najmanji prečnici kapi emulzija su dobijeni upotrebom ultrazvučnog homogenizera dok su prosečno najveće kapi emulzija proizvedene tehnikom membranskog emulgovanja. Veličine kapi emulzija dobijenih korišćenjem visokopritisnog homogenizera i rotor-stator tehnike su u proseku slične ali se značajno razlikuju pri upotrebi pojedinih stabilizatora. Na slici 22. prikazan je uporedni pregled veličina kapi emulzija pri konstantnim uslovima količine i vrste stabilizatora sa promenom tehnike emulgovanja.

Tabela 6. Veličine kapi emulzija dobijenih različitim tehnikama emulgovanja (RS – rotor-stator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje, VPH – visokopritisni homogenizer).

PŠR	VŠR	OSAm	RS	UH	ME	VPH
(%)			Prečnik kapi (μm)			
0,25	0	0	-	-	-	4,8
0,5	0	0	6,6	0,44	28,8	6,1
0,75	0	0	-	-	-	7,5
1	0	0	4,9	0,41	33,2	5,6
1,25	0	0	-	-	-	3,3
0	0,25	0	-	-	-	11,9
0	0,5	0	6,5	1,8	30,3	10
0	0,75	0	-	-	-	12,5
0	1	0	7,6	2,93	41,8	38,8
0	1,25	0	-	-	-	39
0	0	0,25	-	-	-	5,1
0	0	0,5	7,3	0,32	26,4	5,2
0	0	0,75	-	-	-	3,3
0	0	1	5,9	0,31	14,2	3,4
0	0	1,25	-	-	-	3,7



Slika 22. Prečnik kapi emulzija dobijenih različitim tehnikama emulgovanja (RS – rotor-stator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje, VPH – visokopritisni homogenizer).

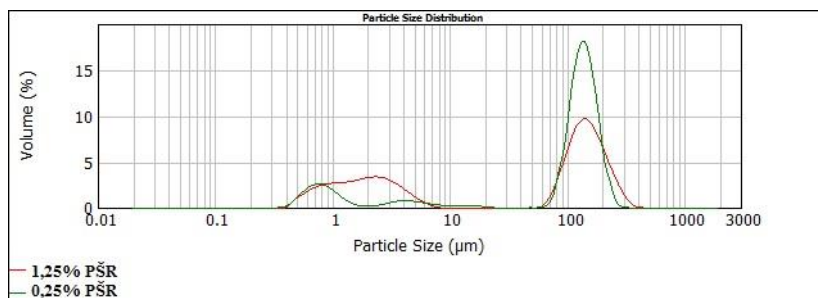
5.2.1.2. Uticaj koncentracije pojedinačnog stabilizatora

Osim uticaja primenjene tehnike emulgovanja na veličinu kapi, odnosno na prosečni prečnik kapi, mogu se primetiti i značajne razlike u prečnicima koje se javljaju pri promeni koncentracije stabilizatora u emulziji. Pri izradi emulzija RS tehnikom dolazi do promene trenda veličine prečnika kapi od $V\check{S}R < P\check{S}R < OSAm$, pri koncentraciji stabilizatora od 0,5%, ka $P\check{S}R < OSAm < V\check{S}R$ sa povećanjem koncentracije stabilizatora na 1% (slika 22). Do smanjenja prečnika kapi, pri jednakim uslovima dispergovanja RS tehnikom, dolazi usled veće količine dostupnih makromolekula (veća koncentracija u rastvoru), koji samim tim imaju i veći kapacitet stabilizacije sa specifično većim brojem makromolekula adsorbovanih na površini mehanički dispergovanih kapi ulja. Pomenuto smanjenje prečnika kapi je naročito izraženo u uzorcima u kojima se nalaze vodorastvorni PŠR i OSAm koji su, zbog povoljnijih fizičko hemijskih osobina (veličina, molekulska masa, rastvorljivost, struktura), znatno pokretljiviju u rastvoru pri kretanju rotora dispergatora, u poređenju sa VŠR, i uspešnije se adsorbuju na granici faza.

Takođe, razlike u vrednostima prečnika kapi emulzija su jasno vidljive pri proizvodnji emulzija membranskim emulgovanjem. Povećanje koncentracije PŠR i VŠR imalo je nepovoljan uticaj na emulziju sa приметnim porastom veličine prečnika kapi. Međutim, sa povećanjem količine dodatog OSAm dolazi do smanjenja prečnika za skoro 50%. Imajući u vidu mehanizam proizvodnje disperzije tehnikom ME (opisano u 2.3.4.), pretpostavlja se da sa povećanjem količine PŠR i VŠR negativni uticaj rastućeg viskoziteta kontinualne faze prevazilazi pozitivni efekat povećanja količine stabilizatora. Sa povećanjem viskoziteta dolazi do smanjenja ugaone brzine kontinualne faze, pri konstantnoj brzini obrtanja mešalice, pa se sila neophodna za otkidanje kapi sa površine membrane postiže kasnije u odnosu na rastvor sa manjom količinom makromolekula. Ova pojava rezultuje većim prečnicima usled dužeg perioda rasta kapi pri izlasku iz pore membrane. Osim toga, veći viskozitet kontinualne faze negativno utiče i na brzinu kretanja stabilizatora u rastvoru u toku procesa emulgovanja. S obzirom da se formiranje kapi ulja odvija samo u centralnom delu suda gde se nalazi membrana, prisutni stabilizator, pod dejstvom koncentracionog gradijenta kao pogonske sile, mora da pređe određeni put u rastvoru do površine membrane. Sa povećanjem viskoziteta produžava se i vreme koje je potrebno molekulu da pređe dati put (slika 8) i adsorbuje se na granici faza. Stoga, pretpostavlja se da dolazi do koalescencije usled nedovoljne količine stabilizatora na površini formirane kapi emulzije pa su i prosečni prečnici kapi shodno tome veći.

U eksperimentima u kojima je proces dispergovanja sproveden u visokopritisnom homogenizeru uticaj koncentracije VŠR na veličinu kapi se pokazao kao najznačajniji, dok su uticaji povećanja koncentracije PŠR i OSAm veoma mali.

Međutim, uticaj PŠR na raspodelu veličine kapi se pokazao kao najznačajniji kao što se može videti iz prikazane slike 23.



Slika 23. Raspodela veličine kapi emulzija stabilizovanih pektinom šećerne repe (PŠR) tehnikom visokopritisne homogenizacije.

Povećanje koncentracije PŠR je značajno doprinelo pomeranju krive raspodele u oblast manjih vrednosti prosečnog prečnika. Veća količina PŠR u rastvoru značajno utiče na bolju stabilnost emulzije tokom skladištenja jer se povećanjem viskoziteta usporava proces koalescencije dispergovanih kapi u formiranoj emulziji. Takođe, veća količina raspoloživog makromolekula omogućava efikasnu pokrivenost veće ukupne površine svih kapi u emulziji i smanjenje koalescencije kapi u VPH zbog brže adsorpcije molekula PŠR na površinu kapi pa je samim tim moguće stabilizovati manje kapi formirane tretmanom visokim pritiskom. Ovaj efekat se pojavljuje i u slučaju uzoraka sa OSAm makromolekulom ali sa značajno manjim uticajem na konačnu raspodelu ukazujući na značaj povišenog viskoziteta rastvora PŠR. Za razliku od uzoraka emulzija stabilizovanih sa PŠR i OSAm kod kojih je sa povećanjem koncentracije makromolekula došlo do smanjenja prečnika kapi, u uzorku emulzije stabilizovane sa VŠR tehnikom VPH, primećuje se značajan rast prečnika kapi sa povećanjem koncentracije VŠR. Do ove pojave dolazi nakon postizanja kritične koncentracije, odnosno koncentracije nakon koje dolazi do značajnog rasta veličine kapi. Pri koncentracijama VŠR ispod 1% prečnik kapi emulzija dobijenih tretmanom visokim pritiskom ne odstupa sa promenom koncentracije i nalazi se u opsegu od 10-12,5 µm. Međutim, pri koncentracijama od 1% i 1,25%, prečnik kapi emulzija se povećava približno tri puta i iznosi 38,8 µm, odnosno 39 µm. Izmereno povećanje

predstavlja rezultat aglomeracije čestica u složenom sistemu ulje - VŠR -voda. Pri postizanju kritične koncentracije, a pod uticajem ekstremnih uslova u visokopritisnom homogenizeru (visok pritisak, povišena temperatura), dolazi do formiranja intermolekularnih veza između čestica VŠR koje se međusobno približavaju pod uticajem uspostavljenih interakcija i formiraju aglomerate. Formirani aglomerati se u toku merenja veličine (metodom opisanom u 4.2.11) ponašaju kao jedna čestica sa značajno većim izmerenim prečnikom od stvarnih prečnika kapi stabilizovanih VŠR koji čine dati aglomerat (slika 21b). Dominantna pojava aglomeracije, a ne koalescencije, se može pretpostaviti na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem kringing indeksa, u kojima se nakon 7 dana skladištenja može primetiti odsustvo brzog raslojavanja ulja i vode, a koje se može očekivati u emulzijama sa stvarnim prečnikom kapi ovog reda veličine. Takođe, prisustvo aglomerata u disperziji se može potvrditi i manjim $d_{(0,5)}$ prečnikom (prosečan prečnik čestica koje čine 50% zapremine uzorka) kod uzorka sa 1% VŠR, koji iznosi $46,9 \mu\text{m}$ naspram $61,7 \mu\text{m}$ u uzorku sa 0,25% VŠR. Ova razlika ukazuje da se u uzorku sa 1% VŠR, u odnosu na uzorak sa 0,25% VŠR, nalazi veći broj sitnijih kapi emulzije ali i određena količina krupnijih aglomerata koji povećavaju vrednost prosečnog $d_{3,2}$ prečnika. Pojava aglomerata u emulzijama dobijenim korišćenjem VPH je česta pojava i predstavlja jednu od poznatih mana ove tehnike emulgovanja (Köhler i sar., 2010).

U uzorcima emulzija dobijenim korišćenjem ultrazvučnog homogenizera, u kojima su izmereni najmanji prečnici kapi emulzija u poređenju sa ostalim tehnikama emulgovanja, ne dolazi do značajnih promena u veličini kapi sa promenom koncentracije stabilizatora. Ovim rezultatom je potvrđena pretpostavka da se upotrebom polisaharidnih stabilizatora mogu formirati emulzije izuzetne stabilnosti i submikronskih prečnika kapi emulzija pri koncentraciji polisahrida već od 0,5%. Daljim povećavanjem koncentracije polisaharida ne dolazi do promene prečnika kapi emulzija usled ograničene efikasnosti dispergovanja ulja pri korišćenim radnim parametrima uređaja.

Rezultati eksperimenata u kojima je OSAm korišćen kao jedini stabilizator u procesu emulgovanja (slika 21a) ukazuju na njegova dobra emulgujuća svojstva. Prosečan prečnik kapi emulzija u eksperimentima u kojima je korišćen samo OSAm se nalazi u opsegu od $0,31 \mu\text{m}$ (emulzije proizvedene ultrazvučnim homogenizerom) do $26,4 \mu\text{m}$ (emulzije proizvedene membranskim emulgovanjem). Iako su u većini uzoraka emulzija stabilizovanih OSAm izmerene relativno niže vrednosti prečnika kapi u odnosu na ostale polisaharide, pa se samim tim mogla očekivati i bolja svojstva datih emulzija, dobijene emulzije su pokazale manju stabilnost od ostalih emulzija. Štaviše, u uzorcima emulzija dobijenim tehnikama ME i RS, u

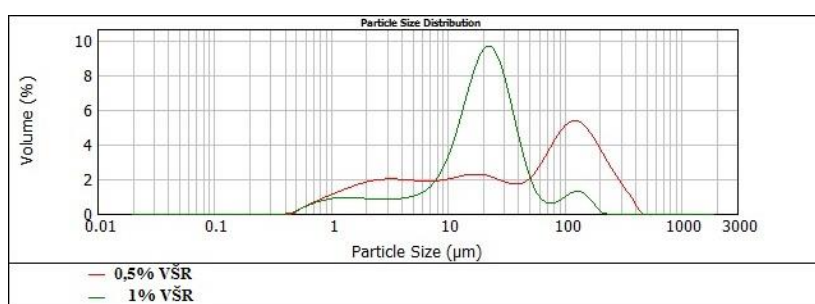
kojima je korišćen OSAm u količini od 0,5%, tanak sloj kukuruznog ulja je bio vidljiv na površini emulzije već nakon 48 sati skladištenja, što ukazuje na visoku nestabilnost proizvedene emulzije zbog nedovoljne količine OSAm i niske gustine formiranog površinskog sloja.

Osim navedenog, na veličinu kapi utiče i brzina dezintegracije micela, jer se može pretpostaviti da su micidele prisutne u kontinualnoj fazi u svim korišćenim koncentracijama (KMK = 0,112%, podnaslov 5.1.4.). Ipak, dobijene vrednosti prečnika kapi su znatno niže u odnosu na rezultate prethodnih istraživača u kojima je korišćen OSA modifikovani skrob (Dokić i sar., 2008; Timgren i sar., 2013). Pretpostavlja se da su manje kapi emulzija postignute kao rezultat bolje prostorne organizacije OSAm molekula u procesu stabilizacije (veličina čestica: OSAm << OSA skrob). Imajući u vidu veličinu makromolekula, potencijalno više OSAm molekula se adsorbuje na specifično većoj površini kapi ulja sa manjim intermolekularnim smetnjama, i na taj način sprečavaju koalescenciju formiranih kapi i druge faktore nestabilnosti (Agama-Acevedo & Bello-Perez, 2017). Pozitivan efekat dodatka OSAm na stabilnost emulzije potvrđuje niska vrednost ζ -potencijala (Tabela 7) u svim eksperimentima gde je korišćen OSAm (ispitivane emulzije dobijene RS tehnikom). Prikazane vrednosti ukazuju na znatno veću adsorpciju OSAm molekula na granici faza ulje/voda u odnosu na PŠR i VŠR.

Rezultati dobijeni u eksperimentima gde je PŠR korišćen kao jedini stabilizator emulzija potvrdili su veliki potencijal primene ovog sporednog proizvoda industrije šećera u oblasti proizvodnje prehrambenih sistema baziranih na U/V emulzijama. Najmanji prosečni prečnik kapi (0,41 μm) pri upotrebi PŠR je ostvaren pri proizvodnji emulzija tehnikom UH dok je najveći prečnik kapi (33,2 μm) formiran u emulzijama dobijenim ME. Pri upotrebi RS i VPH tehnike emulgovanja, emulzije stabilizovane PŠR su imale najmanje prosečne prečnike kapi u poređenju sa emulzijama dobijenim RS i VPH tehnikama stabilizovanim VŠR i OSAm makromolekulima. Osim toga, za razliku od emulzija stabilizovanih ostalim polisaharidima, ni u jednom eksperimentu nije došlo do pojave raslojavanja uljane faze u toku skladištenja od 48h. Stabilizacija emulzija PŠR ima dvostruki efekat. Adsorpcijom proteinskog dela PŠR, i drugih grupa koji daju PŠR amfifilan karakter, na granici faza obezbeđuje se pokrivenost kapi ulja primarnim omotačem koji sprečava koalescenciju kapi. Potom, polisaharidni lanci PŠR formiraju relativno čvrst sloj iznad proteinskog omotača i međusobnim umrežavanjem formiraju stabilan matriks koji značajno smanjuje mobilnost formiranih kapi emulzije povećanjem viskoziteta (slika 21e). Takođe, bitno je istaknuti pozitivan uticaj kombinacije PŠR i OSAm (slika 21g) na veličinu kapi formiranih emulzija. Kombinovana upotreba PŠR i OSAm je rezultovala najmanjim prosečnim prečnikom kapi pri upotrebi UH u proizvodnji emulzija,

kao i najniže vrednosti prečnika pri upotrebi tehnika RS i ME (osim eksperimenata RS: PŠR 1% i ME: OSAm 1%) (tabela 6 i tabela 9).

Upotreba VŠR u stabilizaciji emulzija rezultovalo je proizvodnjom prosečnih prečnika kapi emulzije od 1,8 do 41,8 μm . I u slučaju stabilizacije emulzija VŠR najmanje kapi emulzija su dobijene pri tretmanu disperzije ultrazvukom. Iako su manje kapi dobijene u emulzijama koje sadrže manju količinu VŠR (0.5%), u svim primenjenim tehnikama, značajno uža raspodela veličine kapi emulzija postignuta je sa povećanjem koncentracije VŠR (1%). Takođe, veća koncentracija VŠR značajno je doprinela tranziciji bimodalnog prema monomodalnoj raspodeli veličine čestica naročito u eksperimentima u kojima je korišćena RS tehnika (Slika 24).



Slika 24. Raspodela veličine kapi emulzija stabilizovanih vlaknima šećerne repe (VŠR) upotrebom rotor-stator tehnike.

Budući da se VŠR uglavnom sastoje od vlakana koja su slabo rastvorljiva u vodi i koja imaju tendenciju da se talože u vodenom rastvoru, ali su takođe u stanju da adsorbuju kapi ulja (lipofilni delovi aminokiselina) na površini čestica, može doći do uspostavljanja ravnoteže između gravitacione sile koja izdvaja ulje na površini i sile taloženja nerastvornih polisaharida. Takođe, na ovaj način, jedan deo nerastvornih VŠR, čija težina prevazilazi silu potiska adsorbovanih kapi ulja, formira talog, dok druge čestice (manje veličine) sa vezanim kapima ulja silom potiska formiraju sloj bogat uljanom fazom u gornjem delu suda. Povećani viskozitet kontinualne faze indukovano dodatkom veće količine VŠR takođe je doprineo užoj raspodeli veličine kapi. Prema tome, stabilizacija emulzije VŠR u svim uzorcima mogla bi biti rezultat formiranja gel-strukture (krem) hidratizanih elementarnih činioca VŠR (vlakna, pektin i proteini) u koje su ugrađene kapi kukuruznog ulja (slika 21b,c,d). Takođe, fenomen stabilizacije pripisuje se i višestrukoj adsorpciji kapi kukuruznog ulja na hidrofobne grupe čestica VŠR, koji potiču od aminokiselinskih (AA) hidrofobnih ostataka (Tabela 3). Sposobnost VŠR da hidrofobnim ostacima AA veže kapi uljane faze daje VŠR amfifilni karakteru sličan PŠR.

Prisustvo i polarnih i nepolarnih delova u VŠR naglašava jaku tendenciju adsorbovanja na granici faza ulje/voda, a samim tim i uspešnog formiranja stabilizujućeg sloja oko dispergovanih kapi ulja. Relativno niska vrednost dobijenog ζ -potencijala uzoraka emulzija stabilizovanih VŠR, potvrdila je gore pomenutu pretpostavku (Tabela 7). Takvo ponašanje je karakteristično za komplekse polisaharida i proteina koji su u stanju da iskažu i stabilizujuće i emulgujuće uloge (Dickinson, 2003). Stoga se može zaključiti da su VŠR stabilizovala emulziju sa tri moguća scenarija: kapi kukuruznog ulja ugrađene su u “školjke” VŠR (veće čestice) (slika 21b), “pickering” efektom najmanjih čestica VŠR (slika 21c) (Binks, 2002; Pickering, 1907) i emulgujućim sposobnostima lipofilnih proteinskih delova na površini VŠR (19d). Uočeni efekti su istakli mogućnosti primene VŠR u prehrambenoj industriji kao agensa za stabilizaciju i želiranje ili zgušnjavanje koji mogu da usporavaju procese koji dovode do nestabilnosti emulzije i istovremeno pružaju funkcionalne benefite u ishrani.

Tabela 7. Zeta potencijal emulzija dobijenih rotor-stator tehnikom.

Pektin šećerne repe (%)	Vlakna šećerne repe (%)	OSA maltodekstrin (%)	ζ -potencijal (mV)
1	0	0	-21.93
0	1	0	-26.60
0	0	1	-15.17
0.5	0.5	0	-22.63
0	0.5	0.5	-15.70
0.5	0	0.5	-18.03
1	1	0	-18.37
0	1	1	-13.97
1	0	1	-13.93

5.2.1.3. Uticaj međusobnih interakcija stabilizatora

OSA maltodekstrin – Pektin šećerne repe

Uticaj interakcija dva ili više različitih polisaharida se pokazao kao izuzetno značajan u procesu emulgovanja (tabela 8 i tabela 9). Kombinovani uticaj OSAm i PŠR na karakteristike emulzija ispitan je kroz central-composite eksperimentalni dizajn sa dva nivoa koncentracija polisaharida (slika 25, tabela 9). Dobijene emulzije karakterišu relativno niske vrednosti prečnika kapi u rasponu od 0,3 μm do 31,7 μm kao i visok nivo uniformnosti raspodele veličine kapi.

Tabela 8. Statistički uticaj ulaznih faktora i njihovih interakcija na dobijene zavisno promenljive izražen preko p – vrednosti (RS – rotor-stator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje).

	Prečnik kapi			Kriming indeks		
	UH	ME	RS	UH	ME	RS
	p-vrednost			p-vrednost		
Model	0,0001 ^a	0,0194 ^a	0,0047 ^a	0,0001 ^a	0,0129 ^a	0,0121 ^a
A-PŠR (%)	0,0001 ^a	0,1916	0,7225	0,2909	0,5103	0,0370 ^a
B-VŠR (%)	0,0001 ^a	0,1204	0,0003 ^a	0,0001 ^a	0,0024 ^a	0,0002 ^a
C-OSAm (%)	0,0001 ^a	0,0019 ^a	0,4307	0,0022 ^a	0,0360 ^a	0,9404
AB	0,0001 ^a	0,6335	0,0102 ^a	0,3447	0,0848 ^b	0,1273
AC	0,0043 ^a	0,1736	0,1806	0,3619	0,1232	0,3828
BC	0,0002 ^a	0,7960	0,0416 ^a	0,0725 ^b	0,0673 ^b	0,2972
A ²	0,5580	0,1838	0,9380	0,6402	0,5075	0,5422
B ²	0,0534 ^b	0,5788	0,9604	0,1822	0,2890	0,1367
C ²	0,1288	0,0707 ^b	0,7625	0,5983	0,0853 ^b	0,4709
Lack of Fit	0,5007	0,3520	0,3297	0,5740	0,4257	0,0633 ^b

^a Faktor statistički značajan, $p < 0,05$

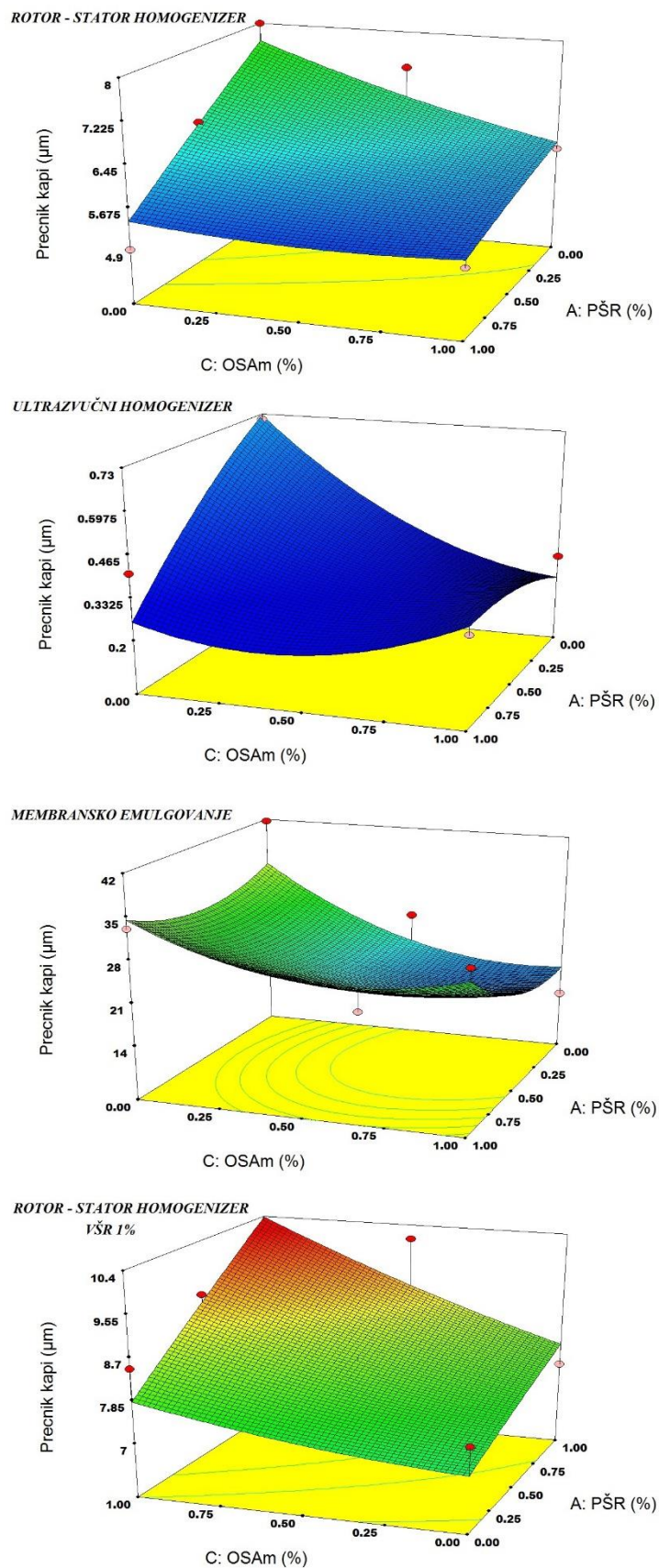
^b Faktor statistički značajan, $p < 0,10$

Pozitivan efekat makromolekularne interakcije je naglašen kroz visoku stabilnost dobijenih emulzija čak i na nižem nivou koncentracija polisaharida (0,5%), gde je veličina i raspodela veličina kapi pokazala veoma male promene nakon 48 sati skladištenja. Pri upotrebi RS tehnike dolazi do smanjenja veličina kapi ulja sa istovremenim povećavanjem koncentracija PŠR i OSAm. Najmanja vrednost prečnika kapi emulzija iznosi 5,2 μm , koja ostvarena je pri količini PŠR i OSAm od 1%. Pri upotrebi kombinacije PŠR i OSAm u izradi emulzija ME može se primetiti ograničen pozitivan uticaj usled izrazitog povećanja viskoziteta pri višim koncentracijama PŠR. Pri konstantnoj količini OSAm, sa povećanjem koncentracije PŠR preko 0,5% dolazi do povećanja prosečnog prečnika kapi usled negativnog uticaja povišenog viskoziteta rastvora kao što je prethodno opisano u delu pojedinačnog uticaja upotrebe PŠR. U eksperimentima dispergovanja uljane faze UH može se primetiti pozitivan uticaj zajedničkog delovanja PŠR i OSAm. Značajno intenzivnije smanjenje veličine kapi emulzije (ilustrovano većim nagibom površine, slika 25) je primećeno u eksperimentima kombinovane upotrebe PŠR-OSAm u poređenju sa upotrebom pojedinačnih polisaharida. Pretpostavlja se da je formiranje jakog makromolekularnog sloja na površini kapi sprečilo moguću koalescenciju dispergovanih kapi ulja (Dickinson, 1988), zajedno sa značajnim povećanjem viskoziteta

izazvanog uglavnom uvođenjem PŠR u formulaciju emulzija. Molekulske mase OSAm i PŠR, određene u delu 5.1.3. , potvrđuju pretpostavku da manji OSAm molekuli mogu biti upleteni u „šupljine” većih lanaca molekula PŠR i kako sternim tako i hemijskim interakcijama formiraju stabilan površinski sloj (slika 21g).

Tabela 9. Veličine kapi emulzija dobijenih različitim tehnikama emulgovanja i kombinacijom više stabilizatora (RS – rotor-stator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje, VPH – visokopritisni homogenizer).

PŠR	VŠR	OSAm	RS	UH	ME
(%)			Prečnik kapi (µm)		
0,5	0,5	0	8	1,24	29,1
1	1	0	7,6	1,47	43,2
0	0,5	0,5	5,9	1,27	18,7
0	1	1	8,5	1,48	27,5
0,5	0	0,5	5,9	0,3	15,2
1	0	1	5,2	0,32	31,7
0,5	0,5	0,5	7,8	0,93	28,3
0,5	0,5	0,5	7,3	0,71	25,5
0,5	0,5	0,5	6,7	0,8	21,1
1	0,5	0,5	7,7	0,45	28,1
0,5	1	0,5	7,1	1,91	25,2
0,5	0,5	1	7,3	0,73	24
1	1	0,5	10,1	0,96	27,5
0,5	1	1	9,3	1,18	25,1
1	0,5	1	8,3	0,38	31,2
1	1	1	9,6	0,82	26,6
0	0	0	8	0,71	41,7



Slika 25. Kombinovani uticaj OSAm i PŠR na veličinu prečnika kapi emulzija (OSAm – oktenil sukcinat maltodekstrin, PŠR – pektin šećerne repe, VŠR – vlakna šećerne repe).

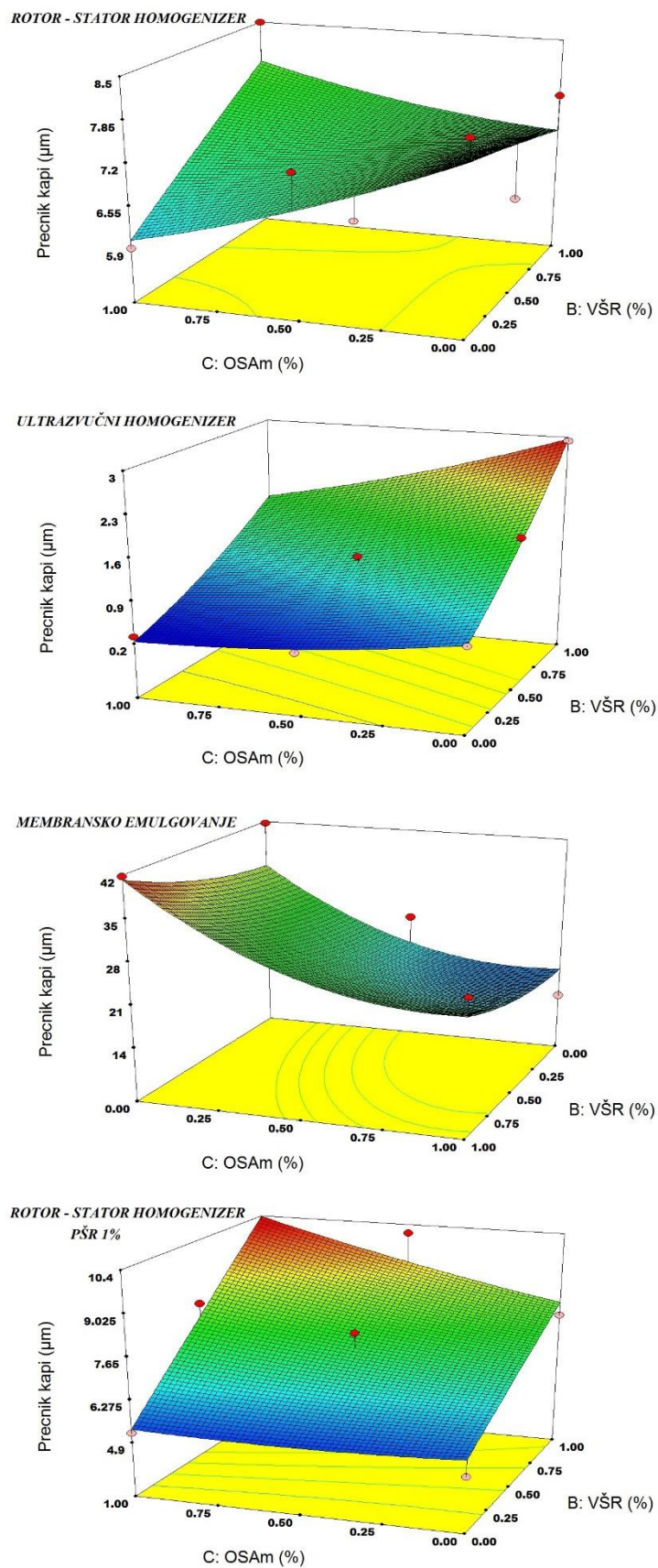
Sa uvođenjem VŠR u formulaciju emulzije, formiranu RS tehnikom, dolazi do pojave obrnutog trenda u kojem, pri konstantnom sadržaju VŠR od 1%, sa povećavanjem količine OSAm i PŠR dolazi do rasta prosečnog prečnika kapi (Tabela 9, slika 25). Ova pojava ukazuje na moguću interakciju između molekula polisaharida koji pri povećanju koncentracija intenzivno formiraju rastući makromolekularni sloj na površini dispergovane kapi što može rezultovati formiranjem aglomerata kapi ulja kroz „bridging“ efekat. Takođe, formiranje izuzetno stabilnog matriksa kao gel-strukture VŠR pri procesu emulgovanja, značajno usporava brzinu kretanja PŠR i OSAm, a samim tim i procesa adsorpcije, pa je proces koalescencije kapi dominantniji nad procesom dispergovanja. Pomenuta pojava nije primećena u eksperimentima formiranja emulzija tehnikama UH i ME usled različitih fenomena dispergovanja uljane faze. Pri korišćenju UH do pojave dispergovanja kapi ulja dolazi ravnomerno u svim delovima suda pa je uticaj brzine kretanja stabilizatora i pređenog puta izuzetno mali. U ME je dominantan negativni uticaj povećanja viskoziteta pri povećanju koncentracije PŠR pa stoga nije moguće detektovati ovu pojavu u datim eksperimentima.

Stoga, kombinovanom primenom PŠR i OSAm u stabilizaciji emulzija, bez dodatka VŠR, formira se specifično snažniji makromolekularni sloj na površini kapi ulja koji ima osobine i manjeg površinski aktivnog molekula sa sposobnošću brzog adsorbovanja na granici faza ali i značajno većeg molekula stabilizatora koji obezbeđuje dugotrajnu stabilnost emulzije. Odgovarajući pozitivni efekat kombinovanog stabilizacionog efekta OSAm-PŠR mogao bi se dalje valorizovati u prethodno enkapsuliranim emulzionim sistemima prilagođenim za sušenje raspršivanjem ili drugim tehnikama brzog isparavanja vode, gde se u formulaciju mora uvesti odgovarajući prirodni nosač.

OSA maltodekstrin – Vlakna šećerne repe

Ispitivanjem kombinovanog uticaja makromolekula OSAm i VŠR dobijene su vrednosti prosečnog prečnika kapi od 1,27 μm do 27,5 μm . Značajne razlike u vrednostima prečnika kapi u okviru iste grupe eksperimenata (ista tehnika emulgovanja) ukazuje na statistički značajan uticaj makromolekula i njihovih interakcija na dobijene vrednosti, koji je potvrđen i niskim p-vrednostima (Tabela 8). Snažan uticaj svojstava VŠR u ukupnom uticaju OSAm-VŠR odražava se u značajno široj raspodeli veličine kapi emulzija pri uvođenju VŠR u koncentracijama većim od 0,5%, ali i značajno boljoj stabilnosti emulzija. U eksperimentima u kojima je pored količine od 0,5% OSAm (koja u samostalnom dodatku nije bila dovoljna da se spreči proces razdvajanja

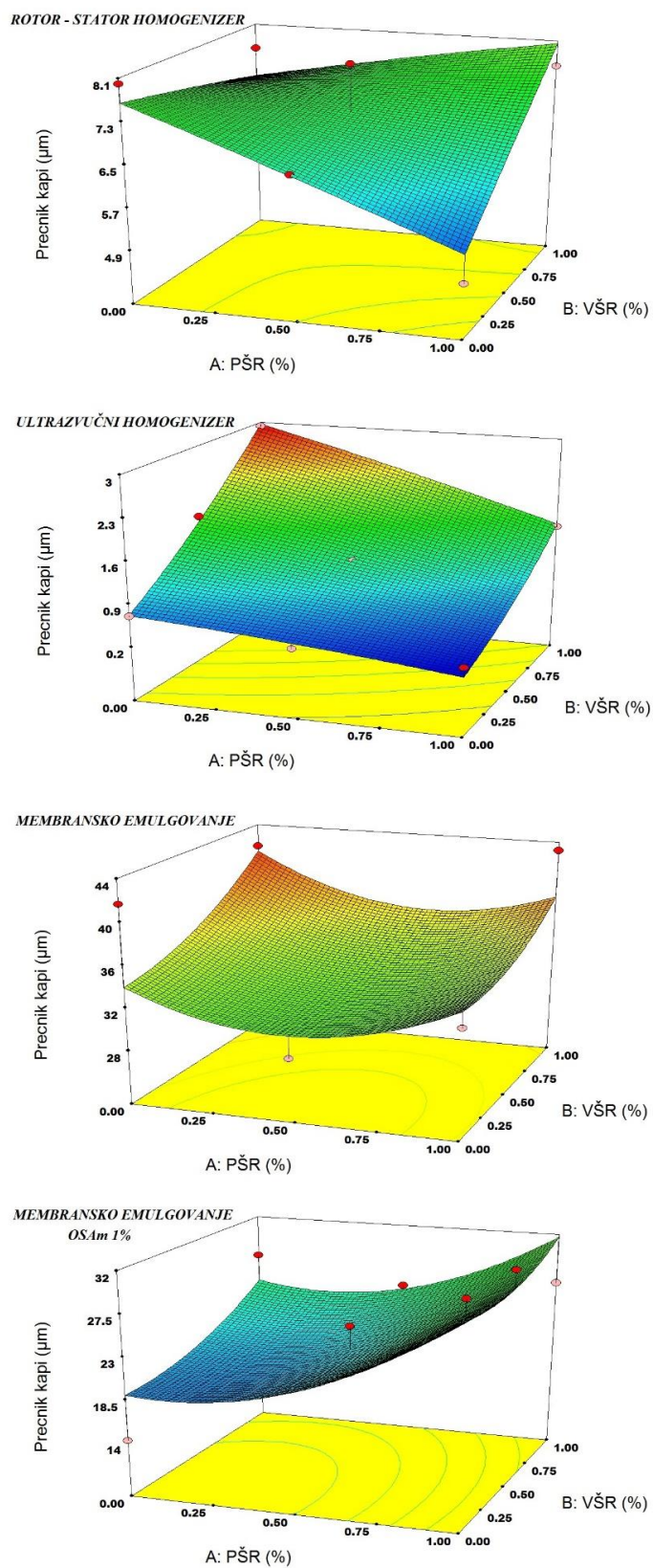
faza), uvedena i količina VŠR od 0,5%, dolazi do značajnog poboljšanja stabilnosti i do sprečavanja pojave sloja ulja na površini emulzije posle 48h. Štaviše, ove emulzije su pokazale optimalne ukupne karakteristike u smislu veličine kapi, kriming indeksa, dugoročne stabilnosti. Pored toga, vrednost ζ -potencijala, odgovarajuće emulzije dobijene RS tehnikom, je značajno niža u poređenju sa emulzijama gde su na istom nivou kombinovani VŠR-PŠR i PŠR-OSAm (Tabela 7). Međutim, veće količine VŠR, u kombinaciji sa OSAm, naglašavaju snažan uticaj VŠR na povećanje viskoziteta disperzije i formiranja gel strukture, čime se smanjuje pokretljivost OSAm makromolekula u toku procesa emulgovanja. Pa tako, sa povećanjem količine VŠR slabi pozitivan uticaj OSAm, kojeg odlikuje stabilizacija relativno malih kapi emulzija, i kao rezultat se dobijaju veći prosečni prečnici u poređenju sa eksperimentima gde količina VŠR ne prelazi 0,5% (Slika 26). Ipak, OSAm je značajno doprineo nižim vrednostima prosečnih prečnika već pri količini makromolekula od 0,5%, što je naročito izraženo kod eksperimenata ME. Važno je napomenuti prisustvo male količine sedimenta koja se pojavila u svim eksperimentima u kojima su se u formulaciji emulzija nalazili i OSAm i VŠR. Moguće objašnjenje za ovaj fenomen je formiranje matriksa VŠR sa relativno malim kapima emulzije sa primarnim tankim OSAm omotačem koji se nalazi unutar mreže većih nerastvornih čestica VŠR, koje su se usled gravitacione sile istaložile na dnu suda. Sedimentacija kompleksa polisaharida u proizvodnji U/V emulzija je prijavljena i u prethodnim studijama (Moschakis et al., 2010).



Slika 26. Kombinovani uticaj OSAm i VŠR na veličinu prečnika kapi emulzija (OSAm – oktenil sukcinat maltodekstrin, VŠR – vlakna šećerne repe).

Pektin šećerne repe – vlakna šećerne repe

U eksperimentima ispitivanja kombinovanog uticaja PŠR i VŠR vrednosti prosečnih prečnika kapi su se kretale od 1,24 μm do 43,2 μm . Sa povećanjem količine stabilizatora ne dolazi do značajnih promena u veličinama kapi u okviru različitih tehnika emulgovanja. Ipak, sa povećanjem količine stabilizatora dolazi do značajnog smanjenja uniformnosti veličine i šire krive raspodele veličina kapi emulzija. Širenje krive raspodele veličina kapi emulzija sa povećanjem sadržaja PŠR i VŠR je najverovatnije rezultat značajnog povećanja viskoziteta i jakih sternih smetnji u formiranju stabilnog omotača oko kapi emulzija usled relativno velikih molekulskih masa polisaharidnih molekula. Manje kapi emulzija formirane unutar matriksa VŠR nisu dovoljno stabilizovane i stoga su podložne koalescenciji. Koncept ovakve inkapsulacije kapi ulja sličan je onom u eksperimentima u kojima su ispitivane interakcije OSAm-VŠR. Međutim, znatno veći molekuli PŠR nisu u stanju da se ugrade u formiranu strukturu VŠR tako dobro kao relativno mali OSAm molekuli (slika 21h). Ovaj efekat se takođe kvantifikuje kroz relativno veće vrednosti ζ -potencijala u emulzijama u kojima su korišćeni zajedno PŠR i VŠR u poređenju sa emulzijama gde su PŠR i VŠR kombinovani sa manjim makromolekulima OSAm (Tabela 7), ukazujući na znatno manje prisustvo polisaharida na granici faza. Kao što se može primetiti u eksperimentima gde je pored PŠR i VŠR, u istraživani sistem uveden OSAm (Slika 27), došlo je do značajnog smanjenja veličine kapi, što je najviše izraženo u eksperimentima ME. Međutim, kod upotrebe RS tehnike, ovaj efekat je izražen samo u eksperimentima u kojima su najmanje dva faktora (PŠR, VŠR, OSAm) postavljena na srednji nivo (0,5%), dok su drugi eksperimenti pokazali suprotan efekat dodatkom OSAm i očiglednim povećanjem prečnika kapi. Povećana količina stabilizatora u rastvoru može nepovoljno da utiče na veličinu kapi intenzivnijim formiranjem aglomerata makromolekula pre adsorpcije na površinu kapi, nakon prelaska kritične aglomeracione koncentracije. Formiranjem aglomerata makromolekulskih lanaca, PŠR i VŠR, pre procesa emulgovanja, značajno se smanjuje potencijal za adsorpciju na granici faza usled specifično veće molekulske mase nastalog biopolimera. Na osnovu dobijenih rezultata veličine kapi a i konduktometrijskih ispitivanja (5.1.4.) može se zaključiti da OSAm stupa u slabije intermolekulske interakcije od molekula PŠR i VŠR i time ostaje dostupan za proces adsorpcije na površini kapi. Takođe, moguće objašnjenje za ovaj efekat je očigledna kompeticija lipofilnih grupa PŠR i VŠR, koja se odigrava u procesu adsorpcije na površinu kapi ulja. S obzirom da su proteinski ostaci u najvećoj meri odgovorni za emulgujuća svojstva i adsorpciju na graničnoj površini PŠR i VŠR, a imajući u vidu značajne razlike u polisaharidnom sastavu ovih makromolekula, pretpostavlja se da dolazi do međusobnih interferencija pri procesu emulgovanja.



Slika 27. Kombinovani uticaj PŠR i VŠR na veličinu prečnika kapi emulzija (PŠR – pektin šećerne repe, VŠR – vlakna šećerne repe, OSAm – oktenil sukcinat maltodekstrin).

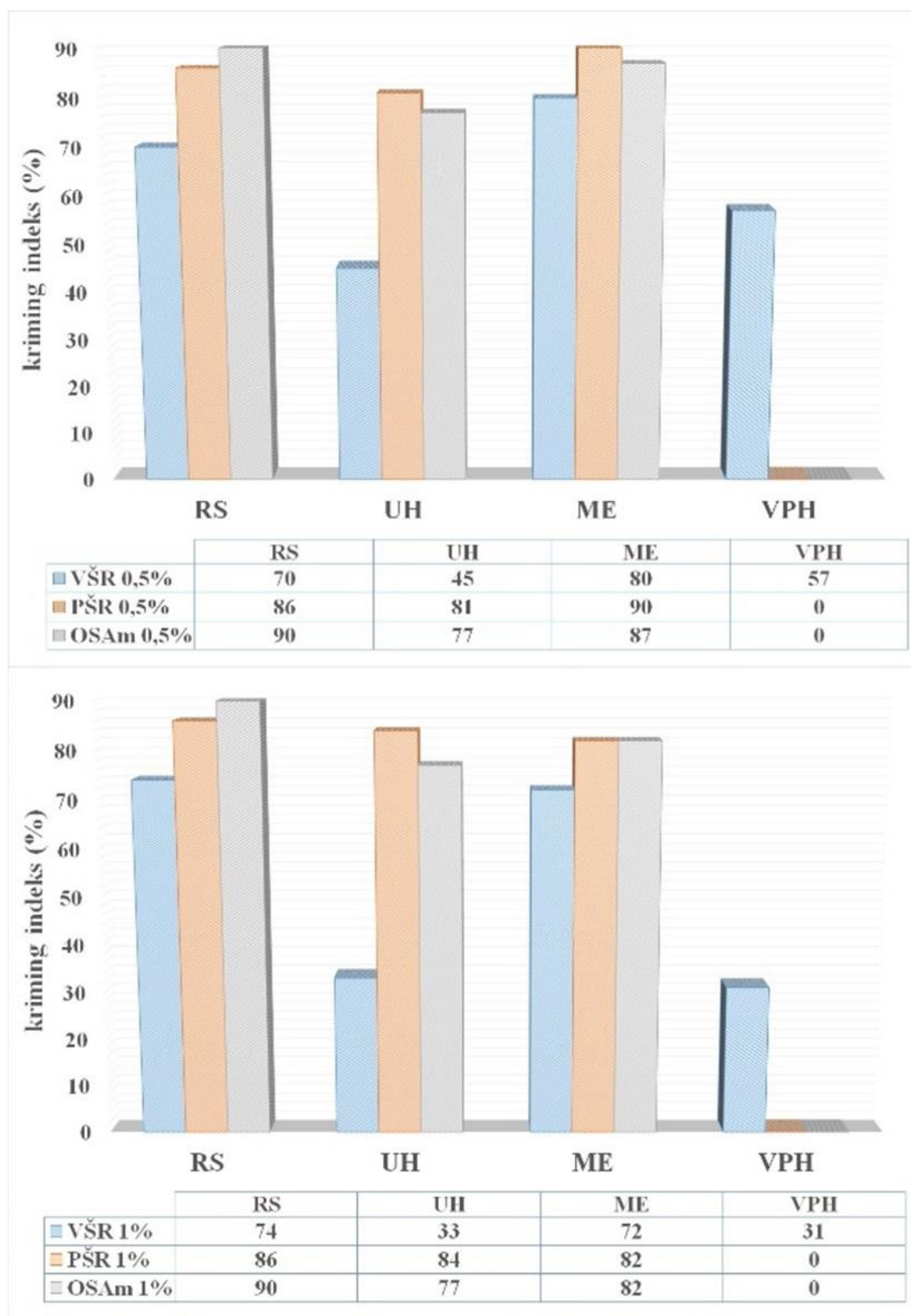
Prikazane razlike u fizičko-hemijskom sastavu (tabela 2 i tabela 3) ukazuju na potencijalno različite hemijske veze između molekula proteina i polisaharida, te stoga drugačije biopolimerne komplekse koji imaju stabilizaciona svojstva (Dickinson, 2008). Pored pomenutih kompleksa, VŠR sadrže i značajnu količinu celuloze i hemiceluloze koje nemaju amfifilne karakteristike i na taj način jače inhibiraju emulgujuća svojstva relativno velikog molekula PŠR i proteinskog dela VŠR, a manje relativno manjih molekula OSAm. Efekat stabilizacije emulzije celulozom i hemicelulozom se ogleda kroz povećanje viskoziteta, kroz "Pickering" efekat i formiranje čvrstog matriksa („školjki“) kao što je prethodno opisano.

5.2.2. Ispitivanje kringing indeksa emulzija

Rezultati ispitivanja kringing indeksa dobijenih emulzija su prikazani u Tabeli 10. Niže vrednosti kringing indeksa ukazuju na veću stabilnost dobijene emulzije. Dobijene vrednosti predstavljaju rezultate očitavanja 24h nakon izrade emulzija, osim u slučaju eksperimenata UH u kojima nije došlo do vidljivog raslojavanja posle 24h, ni nakon 7 dana, pa su merenja izvršena 30 dana nakon ultrazvučnog tretmana. Shodno prethodno diskutovanim veličinama kapi emulzija, uzorci dobijeni upotrebom UH su se pokazali kao najstabilniji sa stanovišta gravitacionog razdvajanja, odnosno formiranja sloja bogatog i sloja siromašnog disperznom fazom.

5.2.2.1. Uticaj primenjene tehnike emulgovanja

Kao što se može videti u tabeli 10 i slici 28, uticaj primenjene tehnike emulgovanja na konačnu vrednost kringing indeksa je značajno manji u odnosu na prethodno ispitivani uticaj na veličinu kapi emulzija. Vrednosti kringing indeksa su se kretale u opsegu od 7% do 90% ukazujući na jak uticaj promene operativnih parametara na fizičku stabilnost emulzija. Ipak, može se zaključiti da su emulzije dobijene upotrebom UH pokazale daleko veću fizičku stabilnost u poređenju sa ostalim tehnikama jer je pojava kringinga bila odložena za mnogo duži vremenski period. Razlog veće stabilnosti ovako dobijenih emulzija je manji prečnik kapi koji je, prema Stoksovom zakonu značajno smanjio terminalnu brzinu kretanja kapi ulja kroz vodenu fazu. Osim toga, veća gustina pakovanja sitnijih kapi ulja je takođe doprinela sporijem razlaganju na sloj krema (bogat kapima ulja) i seruma na dnu odmernog suda (bogat vodenom fazom) i samim tim je doprinela homogenom izgledu formirane emulzije.



Slika 28. Kriming indeks emulzija dobijenih različitim tehnikama emulgovanja (RS – rotor-stator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje, VPH – visokopritisni homogenizer).

Tabela 10. Kriming indeks emulzija dobijenih različitim tehnikama emulgovanja (RS – rotorstator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje, VPH – visokopritisni homogenizer).

PŠR	VŠR	OSAm	RS	UH	ME	VPH
(%)			Kriming indeks (%)			
0,25	0	0	-	-	-	-
0,5	0	0	86	81	90	-
0,75	0	0	-	-	-	-
1	0	0	86	84	82	-
1,25	0	0	-	-	-	-
0	0,25	0	-	-	-	77
0	0,5	0	70	45	80	57
0	0,75	0	-	-	-	50
0	1	0	74	33	72	31
0	1,25	0	-	-	-	17
0	0	0,25	-	-	-	-
0	0	0,5	90	77	87	-
0	0	0,75	-	-	-	-
0	0	1	90	77	82	-
0	0	1,25	-	-	-	-
0,5	0,5	0	75	52	80	-
1	1	0	74	52	76	-
0	0,5	0,5	54	58	80	-
0	1	1	60	7	80	-
0,5	0	0,5	82	78	87	-
1	0	1	88	74	88	-
0,5	0,5	0,5	75	50	74	-
0,5	0,5	0,5	78	56	80	-
0,5	0,5	0,5	78	43	76	-
1	0,5	0,5	82	59	74	-
0,5	1	0,5	68	38	74	-
0,5	0,5	1	78	43	90	-
1	1	0,5	80	24	85	-
0,5	1	1	72	26	85	-
1	0,5	1	84	40	88	-
1	1	1	72	15	85	-
0	0	0	90	90	90	-

Pored emulzija dobijenih tretmanom ultrazvukom, zapaženu fizičku stabilnost, odnosno otpor formiranju krem sloja na vrhu odmernog suda, pokazale su i emulzije dobijene tretmanom visokim pritiskom kod kojih nakon 24h nije zapažena pojava kriminga osim u uzorcima emulzija stabilizovanih VŠR.

5.2.2.2. Uticaj koncentracije pojedinačnog stabilizatora

Pri ispitivanju uticaja primene samo jednog stabilizatora u proizvodnji emulzija može se primetiti značajna promena vrednosti konačnog kriming indeksa sa promenom vrste i koncentracije primenjenog stabilizatora. Najniže vrednosti kriming indeksa su ostvarene u emulzijama u kojima su VŠR korišćena za stabilizaciju sistema. Kao što se može videti u tabeli 10, sa povećanjem količine VŠR u emulziji, opada vrednost kriming indeksa, odnosno smanjuje se visina sloja seruma na dnu odmernog suda. Ova pojava predstavlja rezultat formiranja trodimenzionalne strukture složenog biopolimera, kao što je VŠR, u sistemu U/V, koja predstavlja glavni inhibitor kretanja formiranih kapi emulzije ka površini. Na ovaj način, iako su kapi emulzije dobijene stabilizacijom VŠR značajno veće, njihovo kretanje u sistemu je ograničeno sternim smetnjama prisutnih polisaharidnih lanaca VŠR. Takođe, formiranjem strukture koja obuhvata kapi ulja, vezanu vodu, rastvorne i nerastvorne čestice polisaharida i adsorbovane proteine na granici faza, dolazi do izrazitog povećanja viskoziteta koji nije bio prisutan u vodenom rastvoru VŠR. Postignuto povećanje viskoziteta pozitivno utiče na stabilnost emulzija tokom skladištenja. Međutim, samo povećanje viskoziteta vodene faze, kao što je slučaj u vodenim rastvorima PŠR, nije dovoljno da se postigne zadovoljavajuća fizička stabilnost i otpor formiranju nehomogene strukture emulzije. Slično PŠR, OSAm nije u stanju da samostalno formira snažnu strukturu u ispitivanom sistemu pa se formirane kapi emulzija zajedno sa adsorbovanim slojem OSAm relativno brzo pomeraju ka gornjem sloju odmernog suda gde formiraju krem sloj.

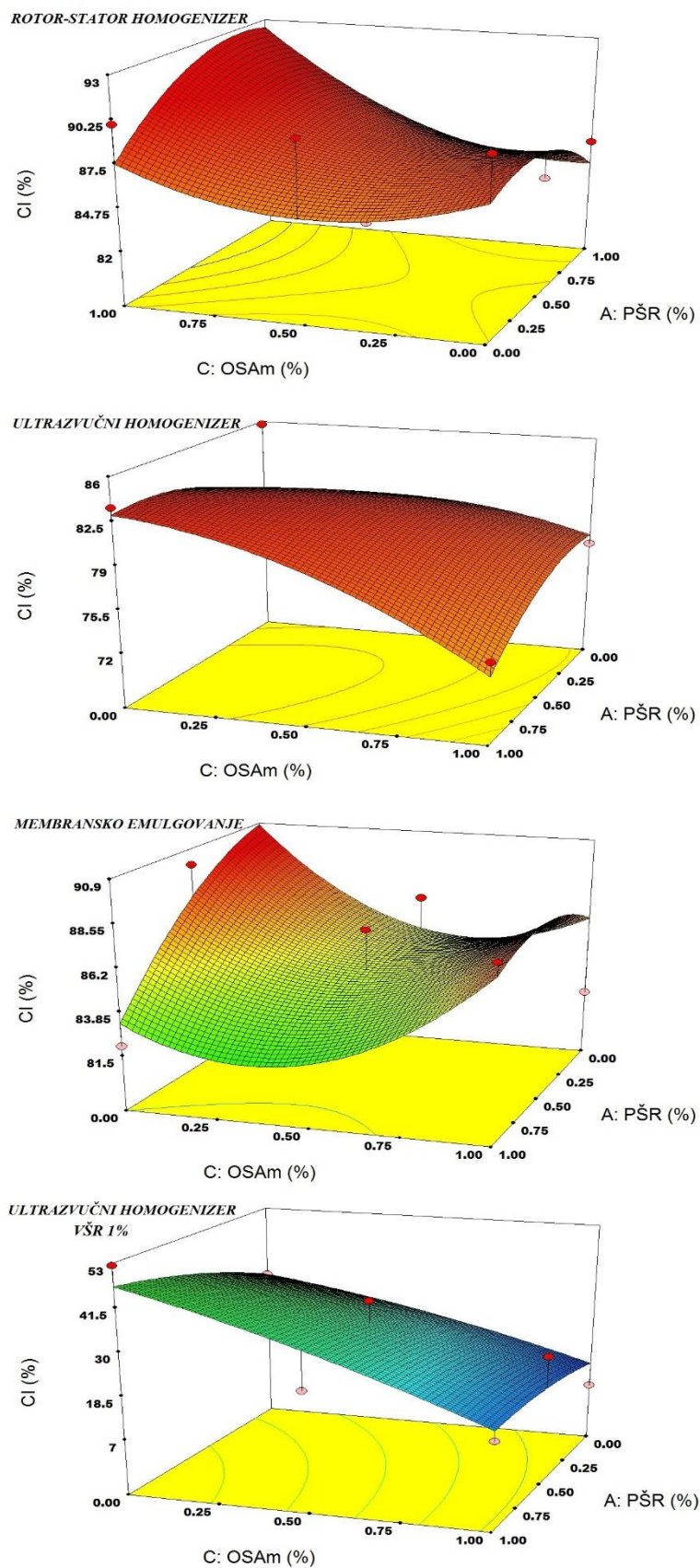
5.2.2.3. Uticaj međusobnih interakcija stabilizatora

Uticaj interakcija polisaharida u emulziji je bio veoma značajan u ispitivanju kriming indeksa (Tabela 8). Najniže vrednosti kriming indeksa su ostvarene u eksperimentima u kojima su korišćeni kombinovani polisaharidni stabilizatori.

Pektin šećerne repe - OSA maltodekstrin

Ilustracija kombinovanog uticaja PŠR i OSAm je prikazana na slici 29. Vrednosti kriming indeksa u eksperimentima u kojima su korišćeni samo PŠR i OSAm se kreću od 74% do 88%.

Najniže vrednosti su dobijene dispergovanjem uljane faze UH-om, dok se vrednosti kriming indeksa u ekperimentima korišćenja RS i ME tehnike ne razlikuju značajno.



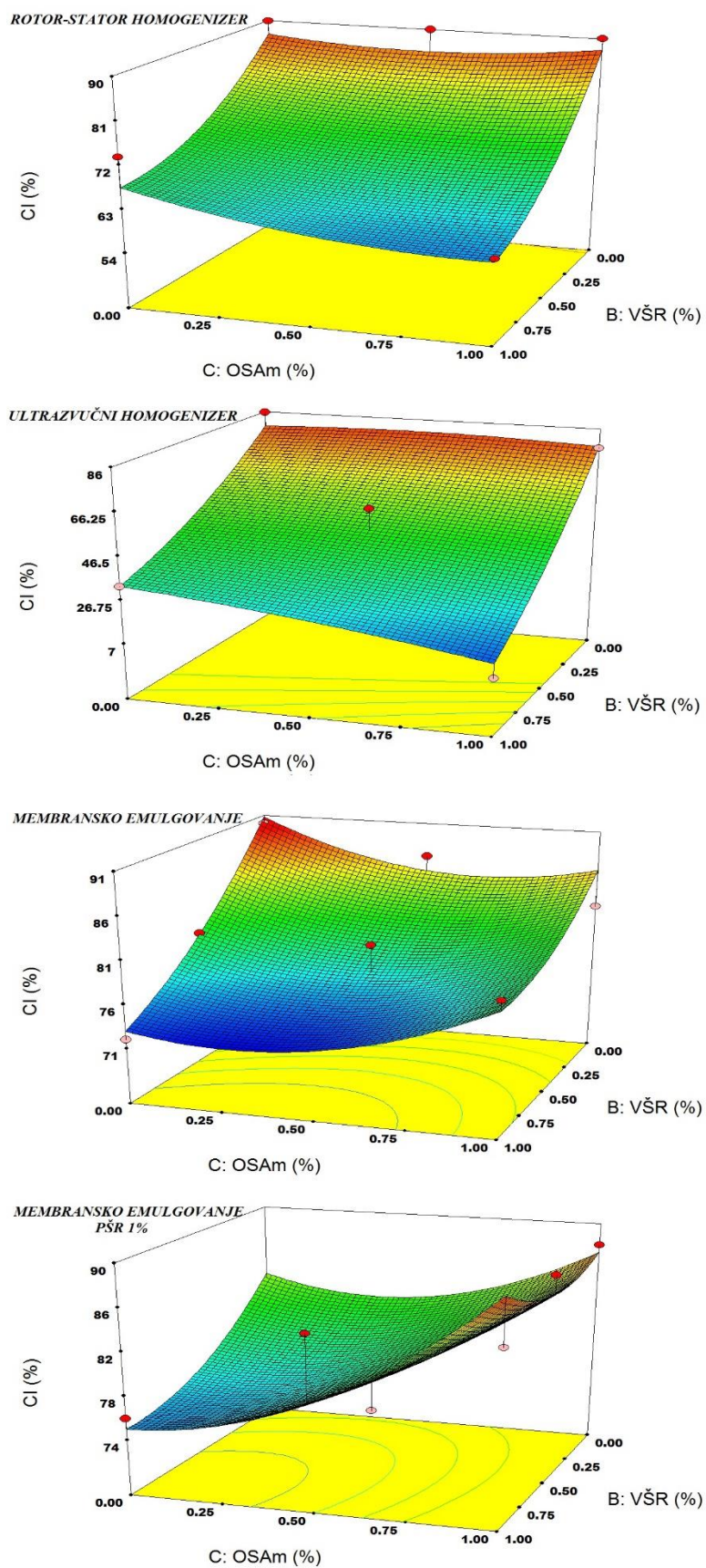
Slika 29. Kombinovani uticaj PŠR i OSAm na kringing indeks emulzija (PŠR – pektin šećerne repe, VŠR – vlakna šećerne repe, OSAm – oktenil sukcinat maltodekstrin).

Međutim, mogu se primetiti različiti trendovi povećanja, odnosno smanjenja, vrednosti kriming indeksa pri poređenju rezultata različitih tehnika emulgovanja. U eksperimentima u kojima je korišćena RS tehnika i nekim eksperimentima ME, primetan je pad vrednosti kriming indeksa sa smanjenjem količine OSAm. Suprotno toj pojavi, u eksperimentima proizvodnje emulzija UH dolazi do smanjenja vrednosti kriming indeksa sa povećanjem količine OSAm u emulziji. Ova pojava se može objasniti fenomenom deplecije flokulacije do koje dolazi u slučaju prevelike količine neadsorbovanog emulgatora koja se nalazi u emulziji. Naime, u eksperimentima UH formirane kapi su izuzetno male, pa je ukupna površina na koju se mogu adsorbavati prisutni stabilizatori veoma velika i celokupna količina oba stabilizatora se nalazi u graničnom sloju. Smanjenje kriming indeksa sa povećanjem količine OSAm ukazuje da postoji dodatni prostor za stabilizaciju emulzije odnosno za adsorpciju na površini kapi ulja i da se u emulziji nalazi jako mala količina makromolekula koja nije adsorbovana. Sa druge strane, u eksperimentima emulgovanja RS i ME, pri većim sadržajima OSAm i PŠR, relativno veće kapi proizvedene datim tehnikama ukazuju da je neophodna specifično manja količina pomenutih stabilizatora, da pokriju celokupnu površinu disperzne faze. Pa tako, u emulziji zaostaje veća količina neadsorbovanih polisaharida koji osmotskim pritiskom teže da vežu i privuku vodu koja se nalazi u prostoru između dve formirane kapi emulzije i na taj način pozitivno utiču na spajanje kapi i njihovu flokulaciju i isplivavanje. Međutim, kada se u date eksperimente uvede određena količina VŠR dolazi da smanjenja kriming indeksa za 50% i kao što se može videti u tabeli 10 značajno niže vrednosti kriming indeksa su ostvarene u emulzijama u kojima su bila zastupljena sva tri stabilizatora u poređenju sa OSAm-PŠR emulzijama. U datom sistemu sva tri polisaharida iskazuju svoje pozitivno dejstvo kroz veličinu kapi emulzije (OSAm), povećanje viskoziteta (PŠR) i formiranje trodimenzionalnog matriksa (VŠR), što rezultuje u optimalnim kriming karakteristikama emulzija.

OSA maltodekstrin - Vlakna šećerne repe

Kombinovani uticaj OSAm i VŠR nakon statističke analize, metodom odzivne površine, je prikazan na slici 30. Vrednosti kriming indeksa u emulzijama koje su stabilizovane kombinovanim korišćenjem OSAm i VŠR su se kretale u opsegu od 7% do 80%. U svim eksperimentima ove grupe, bez obzira na primenjenu tehniku, se može jasno videti smanjenje kriming indeksa sa povećanjem količine VŠR uvedene u formulaciju emulzije. Istovremena upotreba OSAm i VŠR u stabilizaciji emulzija rezultovala je u najnižim vrednostima kriming indeksa. Ova pojava se objašnjava dominantnim efektom VŠR koji značajno povećava

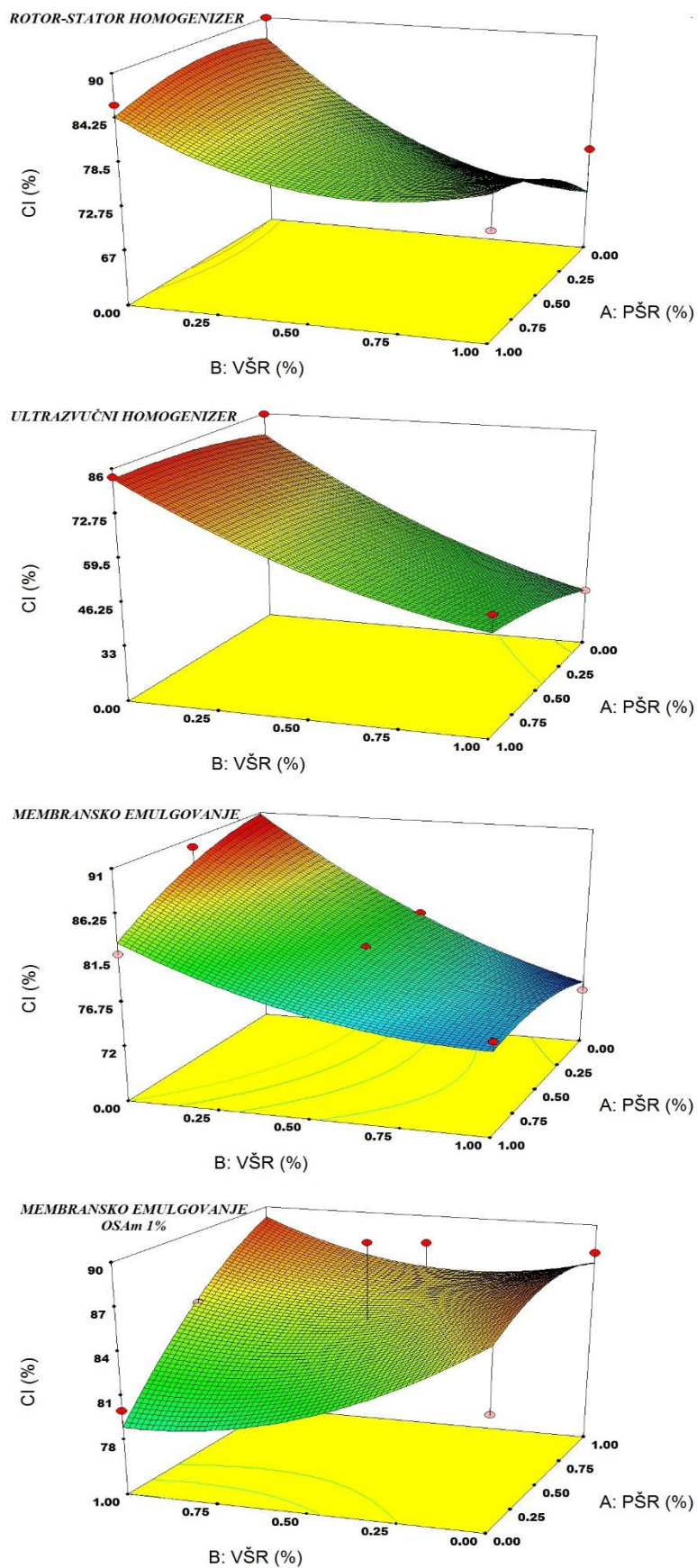
viskozitet formirane emulzije i gradi snažan matriks unutar koga mogu da se ugrađuju sitnije kapi stabilizovane OSAm makromolekulima značajno manjih molekulskih masa (slika 21f). Na ovaj način se sprečava negativni uticaj pojave koalescencije unutar formirane trodimenzionalne strukture VŠR i pojave bržeg isplivavanja kapi usled većih prečnika kapi (Stouksov zakon). Stoga, gusto pakovanje kapi emulzije, pod uticajem interakcije OSAm-VŠR, negativno utiče na brzinu kriminga povećanjem specifične koncentracije kapi u svim delovima emulzije, smanjenjem prečnika formiranih kapi i samim tim manjeg stepena aglomeracije i flokulacije. Dodatno uvođenje PŠR, pored OSAm i VŠR, u formulaciju emulzije je negativno uticalo na kriming osobine emulzije. Povećanje vrednosti kriming indeksa je primećeno kod svih eksperimenata u kojima je pored OSAm i VŠR, dodata i određena količina PŠR. PŠR, kao makromolekul sa nekoliko puta većom molekulskom masom od OSAm, ali sa velikim afinitetom za adsorpciju na granici faza, stabilizuje kapi emulzije sa specifično većim adsorpcionim slojem u odnosu na OSAm. Ovako stabilizovane kapi se teško ugrađuju u strukturu VŠR i mnogo lakše isplivavaju na površinu u poređenju sa kapima stabilizovanim OSAm makromolekulom.



Slika 30. Kombinovani uticaj VŠR i OSAm na kriming indeks emulzija (PŠR – pektin šećerne repe, VŠR – vlakna šećerne repe, OSAm – oktenil sukcinat maltodekstrin).

Pektin šećerne repe – Vlakna šećerne repe

Kroz ispitivanje uticaja istovremene upotrebe PŠR i VŠR naglašene su pozitivne i negativne strane kombinovane upotrebe relativno velikih makromolekula kao stabilizatora emulzija. Pri kombinovanoj upotrebi PŠR i VŠR mogu se primetiti slični trendovi različitih intenziteta u promeni kringing indeksa u zavisnosti od primenjene tehnike emulgovanja i koncentracije stabilizatora. Sa povećanjem sadržaja VŠR bez obzira na količinu PŠR koja se nalazi u sistemu, dolazi do značajnog pada vrednosti kringing indeksa (slika 31). Povećana stabilnost koja potiče od pozitivnog efekta trodimenzionalne strukture VŠR je naročito izražena u uzorcima dobijenim ultrazvučnom homogenizacijom u kojima se vrednost kringing indeksa smanjila sa najvećim nagibom sa unošenjem 1% VŠR u formulaciju emulzija. U eksperimentima pripreme emulzija RS tehnikom, može se primetiti negativan uticaj dodatka PŠR pri količini VŠR od 1%, koji je rezultovao u manjoj stabilnosti sistema sa povećanjem količine PŠR.



Slika 31. Kombinovani uticaj VŠR i PŠR na kringing indeks emulzija (PŠR – pektin šećerne repe, VŠR – vlakna šećerne repe, OSAm – oktenil sukcinat maltodekstrin).

Ova pojava ukazuje na moguću kompeticiju u procesu adsorpcije na graničnoj površini između aktivnih mesta ova dva makromolekula usled nedovoljne ukupne površine dispergovanih kapi ulja na koje bi se adsorbovali svi prisutni makromolekuli. Osim toga, povećanje količine kapi stabilizovanih PŠR, a koje se teško ugrađuju u matriks VŠR, umanjuju ukupan pozitivan efekat prisutnih VŠR na stabilnost emulzije. Takođe, kao što je prethodno diskutovano, pretpostavlja se da neadsorbovani makromolekuli pospušuju proces aglomeracije i potom flokulacije što se odražava na vrednosti kringing indeksa. Međutim, ova pojava negativnog uticaja PŠR nije primećena u eksperimentima ME. U eksperimentima ME, usled niske efikasnosti stabilizacije dispergovanih kapi ulja relativno velikim makromolekulima (kao što je prethodno opisano), dominantna pojava koalescencije (i naknadne flokulacije takvih kapi) nastupa u eksperimentima sa nižim sadržajem stabilizatora. Stoga, svako povećanje količine VŠR i PŠR pozitivno utiče na sprečavanje koalescencije i brzog izdvajanja uljane faze na površini emulzija pa je negativni efekat dodatka PŠR uz VŠR zanemarljivo mali.

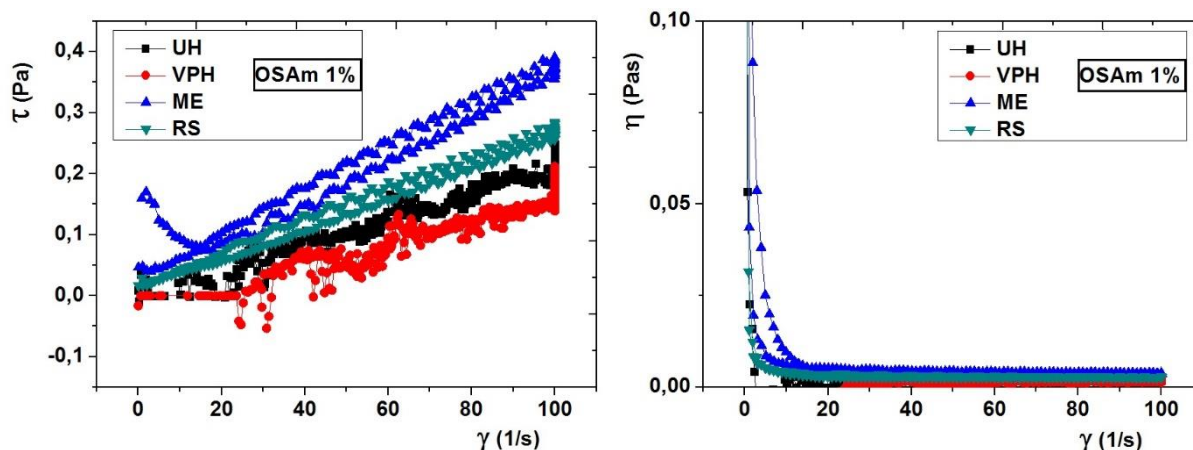
5.2.3. Reološke karakteristika emulzija

Ispitivanje reoloških karakteristika dobijenih emulzija je sprovedeno snimanjem krivih proticanja metodom histerziske petlje. Uticaj primenjene tehnike emulgovanja pri konstantnim sadržajem određenog polisaharidnog stabilizatora je prikazan na slikama 31, 32, 33.

5.2.3.1. Uticaj koncentracije pojedinačnog stabilizatora

Krive proticanja uzoraka emulzija stabilizovanih OSAm (slika 32) ukazuju na relativno mali uticaj promene tehnike emulgovanja na reološke karakteristike ovako stabilizovanih emulzija (krive proticanja). Kod svih uzoraka emulzija stabilizovanih samo OSAm je evidentan pseudoplastični tip proticanja i veoma male vrednosti prividnog viskoziteta (pri 50 s^{-1} : UH=0,002 Pa·s, HPH=0,001 Pa·s, ME=0,004 Pa·s, RS=0,001 Pa·s). Dobijene vrednosti ukazuju na slabu strukturaciju sistema koji se formira sa dodatkom 1% OSAm. Relativno mali molekuli OSAm pri maksimalnoj koncentraciji od 1% nisu u stanju da formiraju snažniju strukturu i da značajno utiču na povećanje viskoziteta vodene faze, pa se od ovakve emulzije očekuje prilično brzo raslojavanje koje primarno zavisi od veličine dispergovanih i stabilizovanih kapi emulzija a mnogo manje od strukture makromolekula. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno izmerenim vrednostima relativnog viskoziteta kontinualne faze koja

sadrži OSAm u kojima je izmereno relativno malo povećanje viskoziteta sa dodatkom OSAm u ispitivanom opsegu od 0,25-1,25%.



Slika 32. Krive proticanja emulzija stabilizovanih sa 1% OSA maltodekstrina (OSAm) (RS – rotor-stator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje, VPH – visokopritisni homogenizer).

Dobijene krive su fitovane Ostwald-ovim reološkim modelom proticanja po jednačini:

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad (10)$$

gde su: τ -napon smicanja (Pa), K ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$) – indeks konzistencije koji je u direktnoj korelaciji sa viskozitetom, n – stepen odstupanja od nenjutnovskog proticanja.

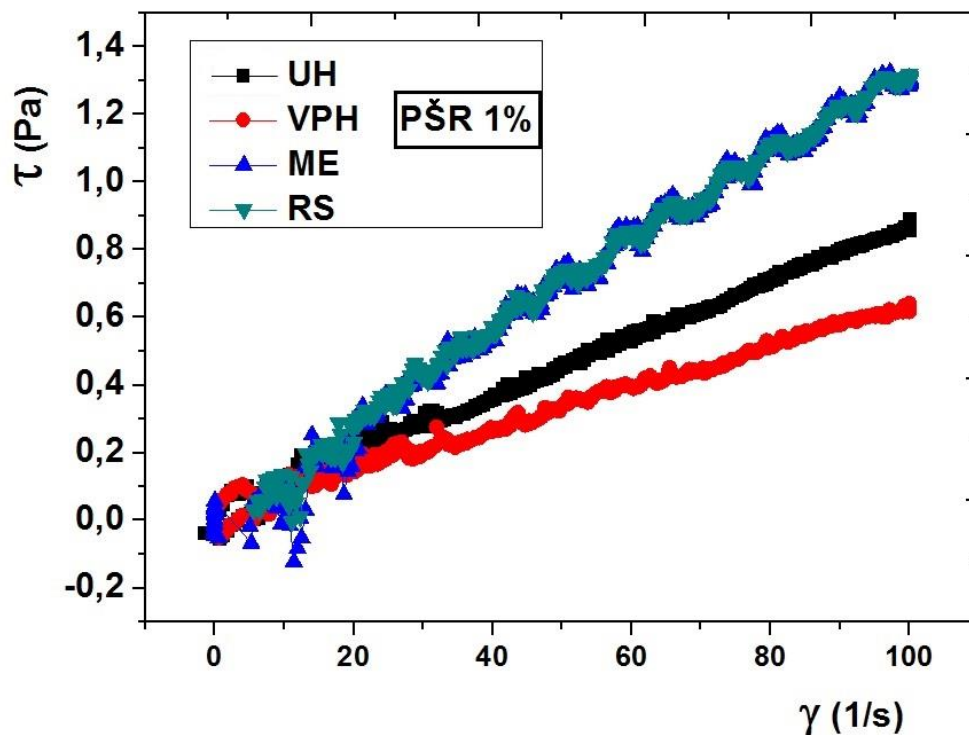
Vrednosti parametara Ostwald-ovog modela dobijenih fitovanjem krivih proticanja su predstavljene u tabeli 11. Prikazane vrednosti ukazuju na najveće razlike u eksperimentima VPH i ME što se može videti i na slici 32. U uzorku emulzije dobijene ME je prisutna složenija struktura u odnosu na emulzije dobijene VPH. Pojava tiksotropne petlje pri proticanju uzoraka ME delimično je i posledica polidisperznosti prisutnih kapi emulzija (Span = 8,550) za razliku od mnogo uže raspodele veličine kapi uzorka dobijenog VPH (Span = 1,818). U emulzijama formiranim ME, s obzirom na blage uslove emulgovanja sa stanovišta primenjenih smicajnih sila i temperature, struktura sistema zavisi prevashodno od efikasnosti stabilizacije, veličine kapi i količine prisutnog makromolekula. Prisustvo slabe gel strukture kvantifikovane kroz pojavu tiksotropne petlje je primećeno i u emulzijama dobijem RS tehnikom emulgovanja. Za razliku od uzoraka dobijenih ME i RS tehnikom, kod uzoraka dobijenih visokointenzivnim dispergatorima nije se formirala snažnija struktura sa prisutnim OSAm jer su kapi emulzija bile daleko manje ali i monodisperznije. Takođe, svaka struktura formirana relativno malim OSAm

makromolekulima se razrušava pod dejstvom izuzetno snažnih sila smicanja i kavitacije indukovanih ovim tehnikama.

Tabela 11. Parametri K i n dobijeni fitovanjem krivih proticanja emulzija stabilizovanih OSAm makromolekulom.

Tehnika emulgovanja	$K(\text{Pa}\cdot\text{s}^n)$	n	r
Ultrazvučno emulgovanje	0,00139	1,0820	0,95
Visokopritisna homogenizacija	$8,35\cdot 10^{-5}$	1,6470	0,91
Membransko emulgovanje	0,00768	0,8405	0,96
Rotor – stator tehnika	0,00453	0,8847	0,99

Krive proticanja emulzija stabilizovanih PŠR su prikazane na slici 33. Za razliku od prethodno diskutovanih emulzija stabilizovanih OSAm, u uzorcima emulzija PŠR može se primetiti značajna razlika u formiranim krivama u zavisnosti od primenjene tehnike emulgovanja. Dobijene krive su takođe fitovane Ostwald-ovim reološkim modelom proticanja po jednačini (10).



Slika 33. Krive proticanja emulzija stabilizovanih sa 1% pektina šećerne repe (PŠR) (RS – rotor-stator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje, VPH – visokopritisni homogenizer).

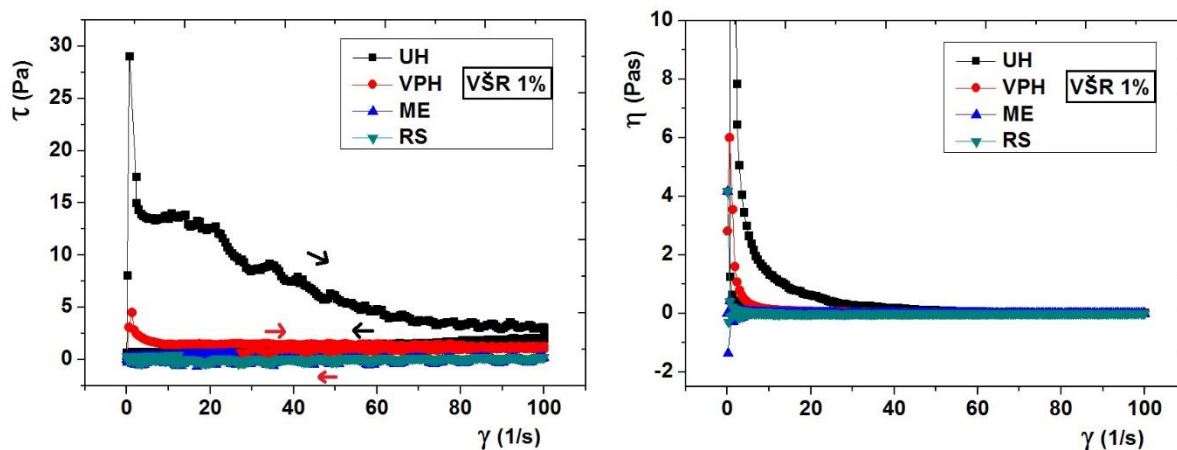
Nakon fitovanja krivih proticanja i prikazanih rezultata (tabela 12) može se zaključiti da su svi uzorci pokazali pseudoplastičan tip proticanja sa veoma sličnim reološkim karakteristikama. Sa povećanjem brzine smicanja dolazi do značajnog povećanja napona smicanja kod svih uzoraka. Takođe, pri nižim brzinama smicanja dolazi do naglog pada viskoziteta uzoraka koji, u svim ispitivanim slučajevima, veoma brzo dostiže konstantnu vrednost i pri daljem povećanju brzine smicanja ne dolazi do značajnije promene viskoziteta uzoraka. Ova pojava se može objasniti razrušavanjem dela aglomerata prisutnih u sistemu, koji doprinose višim vrednostima viskoziteta, međusobno vezanih slabim sekundarnim vezama, pri početnim brzinama smicanja (Pal, 1996).

Tabela 12. Parametri K i n dobijeni fitovanjem krivih proticanja emulzija stabilizovanih PŠR.

Tehnika emulgovanja	K(Pa·s ⁿ)	n	r
Ultrazvučno emulgovanje	0,01283	0,9165	0,99
Visokopritisna homogenizacija	0,01070	0,8838	0,99
Membransko emulgovanje	0,01660	0,9487	0,99
Rotor – stator tehnika	0,01772	0,9353	0,99

Dobijeni rezultati ukazuju da sa primenom energetski intenzivnije tehnike emulgovanja dolazi do pada viskoziteta emulzija stabilizovanih PŠR. Imajući u vidu relativno jaku strukturu koja se formira u vodenim rastvorima PŠR, potvrđenu visokim vrednostima viskoziteta vodenih rastvora PŠR, pretpostavlja se da sa primenom velikih sila smicanja i kavitacije, koje se javljaju u procesima VPH i UH, dolazi do delimičnog razrušavanja ovakve strukture i do smanjenja ukupnog broja sekundarnih veza između makromolekula PŠR. Pretpostavlja se da do pojave delimičnog razrušavanja strukture PŠR ne dolazi u značajnoj meri u uzorcima emulzija dobijenih ME i RS tehnikama, u kojima je značajno manje energije uneto u sistem u procesu emulgovanja. U uzorcima dobijenim ME i RS tehnikama viskozitet emulzija najviše zavisi upravo od viskoziteta kontinualne faze a manje od relativno većih prečnika kapi (u poređenju sa uzorcima UH i VPH) ovako dobijenih emulzija, čiji efekat snižava vrednosti viskoziteta emulzija. Međutim, efekat povećanja viskoziteta emulzija sa smanjenjem prečnika kapi je evidentan u poređenju rezultata visokointenzivnih tehnika, UH i VPH. Značajno niže vrednosti prosečnih prečnika kapi emulzija (tabela 6) dobijenih UH su doprinele višim vrednostima viskoziteta u poređenju sa rezultatima ispitivanja uzoraka VPH (Pal, 1996).

Krive proticanja emulzija stabilizovanih VŠR primenom različitih tehnika emulgovanja su prikazane na slici 35. Izuzetno značajan uticaj promene tehnike emulgovanja se prevashodno ogledao u pojavi tiksotropnog proticanja kod uzoraka tretiranih ultrazvukom i visokim pritiskom. Uzorci emulzija homogenizovani ultrazvukom i visokim pritiskom uz stabilizaciju VŠR, su pokazali prisustvo relativno snažne strukture u novoformiranom sistemu kvantifikovane pojavom tiksotropne petlje pri proticanju. Kao što je prethodno opisano, pretpostavlja se da VŠR formiraju složenu trodimenzionalnu strukturu u sistemu ulje/voda. U takvom sistemu, količina dispergovanih kapi ulja koja će se uspešno ugraditi u postojeću strukturu u velikoj meri zavisi od prečnika datih kapi usled slabe rastvorljivosti velikog dela VŠR kao i generalno slabije pokretljivosti VŠR u rastvoru, u poređenju sa PŠR i OSAm.



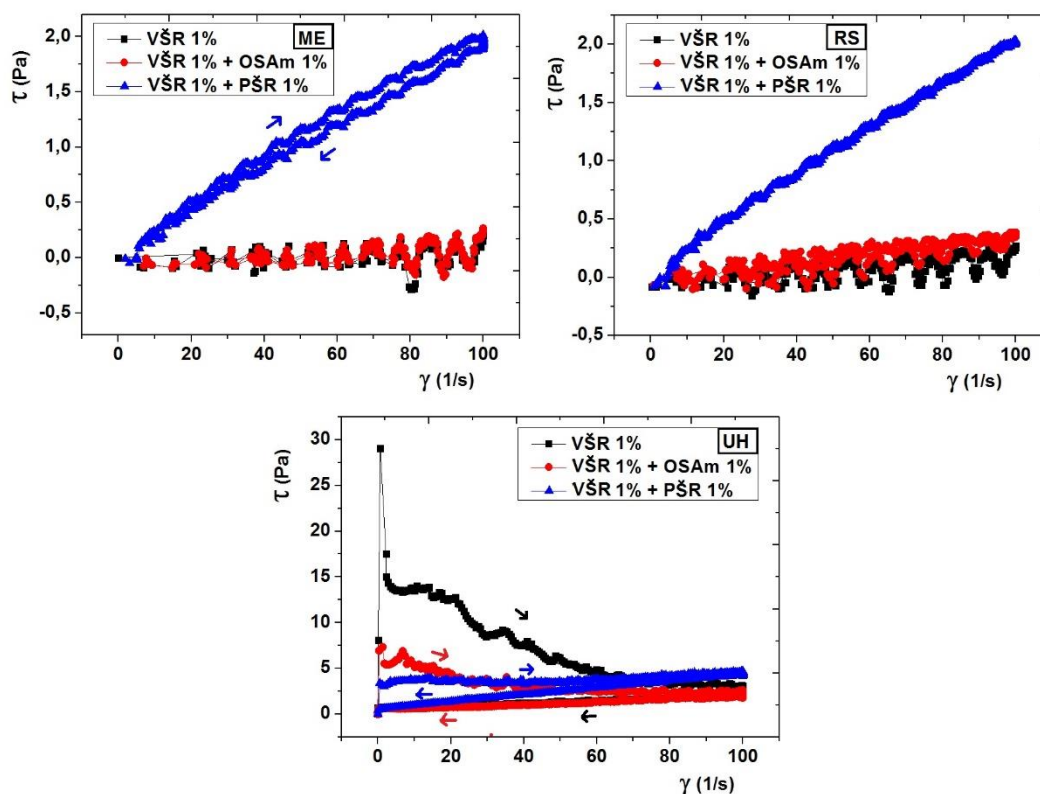
Slika 34. Krive proticanja emulzija stabilizovanih sa 1% vlakana šećerne repe (VŠR) (RS – rotor-stator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje, VPH – visokopritisni homogenizer).

Kao što se može videti na slici 34, emulzije sa kapima manjeg prečnika (UH) grade snažniju strukturu, odnosno kapi su bolje “upakovane” u matriks VŠR i samim tim je energija tiksotropne petlje značajno veća. Pri većim brzinama smicanja dolazi do razrušavanja ove strukture, a postupak razrušavanja se nastavlja, sa manjim intenzitetom, i posle perioda relaksacije od 180s, odnosno tokom perioda smanjivanja brzine smicanja do nulte vrednosti ukazujući na osobine “sporooporavljajućeg” sistema. Na osnovu krivih prikazanih na slici 34, prividni viskozitet u uzorcima stabilizovanim samo VŠR najviše zavisi od veličine kapi emulzije, pa tako emulzije sa najmanjim prečnikom kapi pokazuju najveće vrednosti viskoziteta. Emulzije stabilizovane VŠR pokazuju najveće povećanje vrednosti viskoziteta u odnosu na vodeni rastvor istog stabilizatora. Izrazito povećanje viskoziteta uzorka nakon

procesa dispergovanja kapi ulja ukazuje na značajan proces strukturiranja i fizičko-hemijskih promena u ispitivanom sistemu u kome značajnu ulogu imaju i molekuli ulja. U toku procesa stabilizacije kapi ulja, formira se struktura u kojoj molekuli ulja, vezani za hidrofobna mesta VŠR (proteinske grupe, fenolne kiseline), aktivno učestvuju u orijentaciji i konformaciji kao i međusobnom povezivanju prisutnih polisaharida i proteina, rezultujući u karakterističnoj gel strukturi dobijenih emulzija.

5.2.3.2. Uticaj međusobnih interakcija stabilizatora

Kroz krive proticanja prikazane na slici 35. ilustruje se kombinovani uticaj OSAm i PŠR sa VŠR sa stanovišta reoloških osobina dobijenih emulzija. Reološke osobine emulzija stabilizovanih PŠR i VŠR pokazuju veliki uticaj dodatka PŠR u svim dobijenim uzorcima. U eksperimentima manje intenzivnih tehnika, ME i RS, dominantan uticaj PŠR se ogleda u značajnom povećanju vrednosti napona smicanja, a samim tim i vrednosti prividnog viskoziteta emulzija, sa povećanjem brzine smicanja. U datim eksperimentima ME i RS, u kojima je mala količina energije uvedena u sistem, struktura emulzije i njene reološke osobine najviše zavise od povećanja viskoziteta indukovanog dodatkom PŠR, dok je uticaj procesa strukturiranja zajedno sa VŠR daleko manji. Međutim, sa povećanjem količine energije uvedene u sistem, (eksperimenti UH) dolazi do pojave značajnog strukturiranja emulzija PŠR i VŠR i do pojave tiksotropne petlje pri proticanju. Za razliku od eksperimenata u kojima su samo VŠR korišćena za stabilizaciju emulzija, pri kombinovanoj upotrebi PŠR i VŠR ne dolazi do konstantnog razrušavanja strukture sistema sa povećanjem brzina smicanja. Nakon postignutog prinosnog napona neophodnog za proticanje ovakvog gel sistema, pri nižim brzinama smicanja ne dolazi do značajne promene napona smicanja. Sa daljim povećanjem brzine smicanja dolazi do povećanja napona smicanja, odnosno do daljeg strukturiranja sistema.

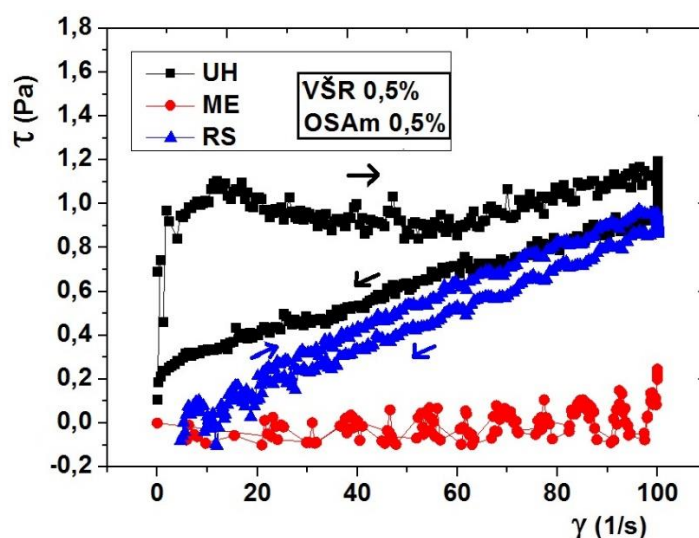


Slika 35. Krive proticanja emulzija stabilizovanih kombinacijom 1% vlakana šećerne repe i 1% pektina šećerne repe (PŠR) ili 1% OSA maltodekstrina (OSAm) (RS – rotor-stator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje).

Karakteristična tiksotropna petlja kod uzoraka emulzija dobijenih UH se stoga može podeliti na dva segmenta. Prvi segment obuhvata razrušavanja strukture sistema do brzine smicanja od 50 o/s. Usled usmerenog kretanja polisaharida, dolazi do razrušavanja trodimenzionalne strukture formirane prevashodno od strane VŠR i opadanja vrednosti napona smicanja. Drugi segment predstavlja opseg brzina smicanja od 50 – 100 o/s kada se iz razrušene strukture VŠR oslobađa PŠR koji svojim dominantnim uticajem pri višim brzinama smicanja povećava vrednosti napona smicanja. Nakon perioda relaksacije, sa smanjivanjem brzine smicanja, dolazi do očekivanog linearnog opadanja vrednosti napona smicanja uz blago razrušavanje uspostavljene strukture emulzije kao i u prethodno diskutovanim slučajevima.

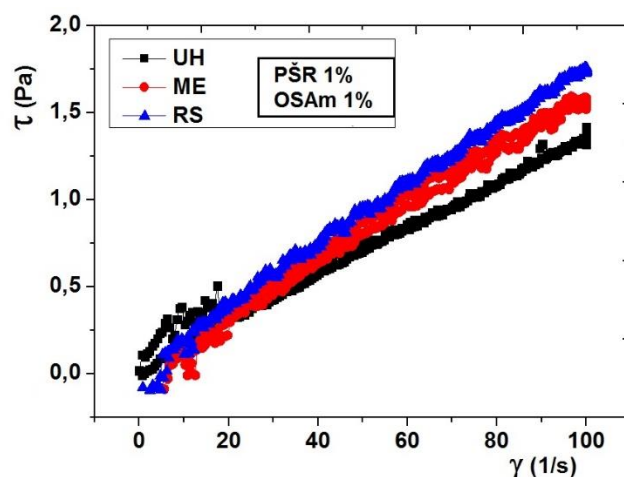
Emulzije u kojima su dispergovane kapi ulja stabilizovane kombinacijom OSAm i VŠR su takođe pokazale reološke karakteristike koje su karakteristične za gel strukture. Tiksotropni tip proticanja je evidentan u emulzijama proizvedenim RS i UH tehnikama. U skladu sa prethodno diskutovanim rezultatima, površina tiksotropne petlje, odnosno energija neophodna za razrušavanje uspostavljene strukture, je najviša u emulzijama dobijenim UH. Emulzije proizvedene UH i RS tehnikama, koje su sadržale po 0,5% OSAm i VŠR, nakon postizanja

prinosnog napona (slika 36), nisu pokazale pojavu razrušavanja strukture sistema, kvantifikovane kao pad vrednosti napona smicanja, u ispitivanom opsegu brzina smicanja ukazujući na dobru stabilnost uspostavljene strukture. Ovi rezultati potvrđuju prethodnu pretpostavku da se relativno manji makromolekuli OSAm uspešno ugrađuju u trodimenzionalnu strukturu VŠR i pritom stabilizuju celokupnan sistem očuvanjem integriteta formiranih kapi emulzije. Činjenica da pri proticanju ne dolazi do razrušavanja, već zajedničkog proticanja celokupne strukture ukazuje i na postojanje međusobnih interakcija ili sekundarnih veza između VŠR i OSAm, koje sprečavaju negativni uticaj primenjenih smicajnih sila na strukturu sistema.



Slika 36. Krive proticanja emulzija stabilizovanih kombinacijom 0,5 % vlakana šećerne repe (VŠR) i 0,5% OSA maltodekstrina (OSAm) (RS – rotor-stator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje).

Uticaj kombinacije PŠR i OSAm na reološke osobine dobijenih emulzija je prikazan kroz krive proticanja na slici 37. Mogu se primetiti male razlike u izgledu krivih proticanja sa promenom primenjene tehnike emulgovanja. Ipak, na osnovu prikazanih rezultata dominantan uticaj PŠR u reološkom ponašanju ovako stabilizovanih uzoraka emulzija je evidentan. Male razlike u formiranoj strukturi nastaju u toku procesa emulgovanja i najviše zavise od intenziteta primenjenih sila smicanja. Dodatkom OSAm u formulaciju emulzija, pored PŠR, povećavaju se vrednosti napona smicanja sa brzinom smicanja u svim uzorcima, u poređenju sa emulzijama stabilizovanim samo PŠR. Osim toga, u emulzijama je primećena i pojava tiksotropne petlje, ali sa veoma malim razlikama vrednosti napona smicanja uzlazne i silazne krive proticanja.



Slika 37. Krive proticanja emulzija stabilizovanih kombinacijom 1% pektina šećerne repe (PŠR) i 1% OSA maltodekstrina (OSAm) (RS – rotor-stator, UH – ultrazvučni homogenizer, ME – membransko emulgovanje).

Značajno manje površine tiksotropne petlje, u poređenju sa emulzijama koje sadrže VŠR, ukazuju na generalno jednostavniju strukturu koja se formirala u emulzionom sistemu PŠR-OSAm. Očigledno najveća površina tiksotropne petlje je prisutna u uzorku dobijenom ME. Strukturu emulzije dobijenu ME karakteriše visok stepen polidisperznosti veličine kapi, u poređenju sa uzorcima dobijenim RS i UH tehnikom. Usled veće polidisperznosti uzorka dobijenog ME (Span = 4,470), formirana struktura pokazuje izraženije gel osobine, u odnosu na mnogo monodisperznije emulzije dobijene RS (Span = 1,671) i UH (Span = 2,321) tehnikom. Uzorak emulzije dobijene UH, sa značajno sitnijim kapima u poređenju sa uzorcima emulzija dobijenih tehnikama RS i ME, očekivano pokazuje najniže vrednosti očitnog napona smicanja kao rezultat relativno slabijeg otpora proticanju monodisperznih kapi izuzetno malih veličina (Tabela 6).

6. ZAKLJUČAK

Istraživanjima sprovedenim u okviru ove disertacije definisane su fundamentalne emulgujuće, odnosno stabilizujuće osobine tri polisaharidna jedinjenja. Kroz ispitivanje uticaja pektina šećerne repe, vlakana šećerne repe i OSA maltodekstrina na disperzione i reološke osobine emulzionih sistema tipa ulje u vodi primenom različitih tehnika emulgovanja (ultrazvučna homogenizacija, visokopritisna homogenizacija, membransko emulgovanje i rotor-stator tehnika) utvrđena su osnovna saznanja o proizvodnji emulzija stabilizovanih navedenim polisaharidima koja se mogu primeniti u realnim industrijskim sistemima i budućim istraživanjima.

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Karakterizacijom fizičko-hemijskih osobina PŠR i VŠR utvrđeno je prisustvo hidrofилnih i hidrofobnih grupa amino- i fenolnih kiselina, u okviru proteinskog dela, što ukazuje na mogućnost amfifilnog karaktera i sposobnost da se nađu na granici faza u sistemima ulje/voda.
2. Snimanjem FTIR spektra uzoraka PŠR, VŠR i OSAm i identifikacijom dobijenih maksimuma potvrđen je veliki potencijal uspostavljanja inter- i intramolekularnih veza navedenih polisaharida prisutnim funkcionalnim grupama kako u polisaharidnom lancu tako i u proteinskom delu makromolekula.
3. Viskozimetrijskim ispitivanjima je utvrđeno da primenjeni polisaharidi pokazuju različiti otpor proticanju sa povećanjem koncentracije u vodenom rastvoru, gde vodeni rastvor PŠR pokazuje znatno više vrednosti viskoziteta (i do 6 puta više) od VŠR i OSAm.
4. Nakon tretmana visokim pritiskom, relativni viskozitet vodenog rastvora VŠR se povećao za preko 400% usled usitnjavanja čestica i delimične ekstrakcije u prisutnog PŠR u vodeni rastvor.
5. Merenjem unutrašnjeg viskoziteta izračunata je molekulska masa PŠR i OSAm koje iznose 78337 Da i 5892 Da, respektivno.
6. Postojanje interakcija između ispitivanih polisaharida u vodenim rastvorima je utvrđeno konduktometrijskim merenjima. Rast specifične provodljivosti vodenog rastvora jednog ili više polisaharida sa povećanjem koncentracije u rastvoru se blago smanjuje kod svih uzoraka osim u slučaju rastvora VŠR-PŠR.

7. Sa povećanjem koncentracije VŠR, pri konstantnoj količini PŠR u rastvoru (0,5%), dolazi do gotovo eksponencijalnog rasta specifične provodljivosti rastvora usled efekta makromolekularne “gužve” i intenzivnije elektrolitičke disocijacije izazvane međusobnim interakcijama polisaharida.
8. Površinska aktivnost ispitivanih polisaharida je potvrđena tenziometrijskim merenjima. Pri koncentraciji od 0,5% u vodenom rastvoru, PŠR, VŠR, VPH VŠR i OSAm su snizili vrednost površinskog napona na 44 mN/n, 43,2 mN/m, 42,2 mN/m i 50,2 mN/m, respektivno.
9. Uticaj primenjene tehnike emulgovanja je izuzetno značajan sa stanovišta veličine kapi emulzija i reoloških karakteristika dok je na kriming indeks promena tehnike emulgovanja imala mnogo manji uticaj.
10. Najmanji prosečni prečnici kapi emulzija su ostvareni upotrebom ultrazvučnog emulgovanja a najveći korišćenjem membranskog emulgovanja. Prosečni prečnici kapi dobijenih viskopritisnom i rotor-stator homogenizacijom su veoma slični ali se značajno razlikuju pri upotrebi pojedinih stabilizatora.
11. Najniže vrednosti kriming indeksa su izmerene u emulzijama u kojima je korišćeno više od jednog polisaharidnog stabilizatora.
12. Povećanje količine VŠR je imalo najveći uticaj na smanjenje vrednosti kriming indeksa i na formiranje snažnije strukture (trodimenzionalnog matriksa) emulzija.
13. Uticaj interakcija primenjenih polisaharida na proces emulgovanja se pokazao kao veoma značajan sa najvećim uticajem na strukturu sistema i reološke osobine.
14. Pojava tiksotropnog proticanja je odlikovala gotovo sve emulzije u čijem sastavu su se nalazila VŠR.

7. LITERATURA

Abbas, S., Bashari, M., Akhtar, W., Li, W. W., & Zhang, X. (2014). Process optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(4), 1265-1274.

Agama-Acevedo, E., & Bello-Perez, L. A. (2017). Starch as an emulsions stability: the case of octenyl succinic anhydride (OSA) starch. *Current Opinion in Food Science*, 13, 78-83.

Ağar, B., Gençcelep, H., Sarıcaoğlu, F. T., & Turhan, S. (2016). Effect of sugar beet fiber concentrations on rheological properties of meat emulsions and their correlation with texture profile analysis. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 118-131.

Alipour, H. J., Rezaei, M., Shabanpour, B., & Tabarsa, M. (2018). Effects of sulfated polysaccharides from green alga *Ulva intestinalis* on physicochemical properties and microstructure of silver carp surimi. *Food Hydrocolloids*, 74, 87-96.

Anton, N., Benoit, J. P., & Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. *Journal of Controlled Release*, 128(3), 185-199.

AOAC International (2005) Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International, Gaithersburg.

Arslan, N. (1995). Extraction of pectin from sugar-beet pulp and intrinsic viscosity molecular weight relationship of pectin solutions. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 32(5), 381-385.

Asadi, M. (2006). *Beet-sugar handbook*. John Wiley & Sons.

Babbar, N., Van Roy, S., Wijnants, M., Dejonghe W., Caligiani, A., Sforza, S., Elst, K. (2015) Effect of Extraction Conditions on the Saccharide (Neutral and Acidic) Composition of the Crude Pectic Extract from Various Agro-Industrial Residues, *Agricultural and Food Chemistry*, 64, 268-275.

- Bai, L., Huan, S., Li, Z., & McClements, D. J. (2017b). Comparison of emulsifying properties of food-grade polysaccharides in oil-in-water emulsions: Gum arabic, beet pectin, and corn fiber gum. *Food Hydrocolloids*, 66, 144-153.
- Bai, L., Liu, F., Xu, X., Huan, S., Gu, J., & McClements, D. J. (2017a). Impact of polysaccharide molecular characteristics on viscosity enhancement and depletion flocculation. *Journal of Food Engineering*, 207, 35-45.
- BeMiller, J. N. (2018). *Carbohydrate chemistry for food scientists*. 3rd Ed. USA. Elsevier.
- Berendsen, R., Güell, C., Henry, O., & Ferrando, M. (2014). Premix membrane emulsification to produce oil-in-water emulsions stabilized with various interfacial structures of whey protein and carboxymethyl cellulose. *Food Hydrocolloids*, 38, 1-10.
- Bergenthal B (1988) *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, Vol 4, ed by Phillips GO, Wedlock JD and Williams AP. IRL Press, Oxford, pp 363–369.
- Binks, B. P. (2002). Particles as surfactants—similarities and differences. *Current opinion in colloid & interface science*, 7(1), 21-41.
- Burgaud, I., Dickinson, E., & Nelson, P. V. (1990). An improved high-pressure homogenizer for making fine emulsions on a small scale. *International journal of food science & technology*, 25(1), 39-46.
- Caldwell, C. G., & Wurzburg, O. B. (1953). 'Modification of starch with octenyl succinic anhydride. US Pat, 2661349.
- Camino, N. A., Sanchez, C. C., Patino, J. M. R., & Pilosof, A. M. (2012). Hydroxypropylmethylcellulose- β -lactoglobulin mixtures at the oil-water interface. Bulk, interfacial and emulsification behavior as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 464-474.
- Campbell, H., & Long, C. A. (1949). Emulsification by ultrasonics. *The Pharmaceutical journal*, 109(4476), 127-127.
- Charcosset, C., Limayem, I., & Fessi, H. (2004). The membrane emulsification process—a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 79(3), 209-218.
- Chen, H. M., Fu, X., & Luo, Z. G. (2015). Esterification of sugar beet pectin using octenyl succinic anhydride and its effect as an emulsion stabilizer. *Food Hydrocolloids*, 49, 53-60.

- Chen, H. M., Fu, X., & Luo, Z. G. (2016). Effect of molecular structure on emulsifying properties of sugar beet pulp pectin. *Food Hydrocolloids*, 54, 99-106.
- Chen, H., Qiu, S., Gan, J., Liu, Y., Zhu, Q., & Yin, L. (2016). New insights into the functionality of protein to the emulsifying properties of sugar beet pectin. *Food Hydrocolloids*, 57, 262-270.
- de Castro Santana, R., Sato, A. C. K., & Da Cunha, R. L. (2012). Emulsions stabilized by heat-treated collagen fibers. *Food hydrocolloids*, 26(1), 73-81.
- Dea, I. C. M., & Madden, J. K. (1986). Acetylated pectic polysaccharides of sugar beet. *Food hydrocolloids*, 1(1), 71-88.
- Desplanques, S., Renou, F., Grisel, M., & Malhiac, C. (2012). Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 401-410.
- Dickinson, E. (1988) *Gums and Stabilisers for the Food Industry*. G.O. Phiffips, D.J. Wedlock, P.A. Williams (Eds.), Vol. 4, IRL Press, Oxford, pp. 249-263
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food hydrocolloids*, 17(1), 25-39.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food hydrocolloids*, 23(6), 1473-1482.
- Dickinson, E., & Lorient, D. (Eds.). (2007). *Food macromolecules and colloids*. Royal Society of Chemistry.
- Diels, A. M., & Michiels, C. W. (2006). High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical reviews in microbiology*, 32(4), 201-216.
- Diftis, N., & Kiosseoglou, V. (2003). Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugation with carboxymethyl cellulose. *Food Chemistry*, 81(1), 1-6.
- Dinand, E., Chanzy, H., & Vignon, M. R. (1996). Parenchymal cell cellulose from sugar beet pulp: preparation and properties. *Cellulose*, 3(1), 183-188.
- Dokić, P., Jakovljević, J., & Dokić-Baucal, L. (1998). Molecular characteristics of maltodextrins and rheological behaviour of diluted and concentrated solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 141(3), 435-440.

Dokić, L., Krstonošić, V., & Nikolić, I. (2012). Physicochemical characteristics and stability of oil-in-water emulsions stabilized by OSA starch. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 185-192.

Dokić, P. (2005) Emulzije, pene, aerosoli, Wus Austria, Novi Sad.

Dokić, P. P., Đaković, L. M., Radivojević, P. P., Sovilj, V. J., & Šefer, I. B. (1999). Dynamics of emulsion formation. *Journal of dispersion science and technology*, 20(1-2), 215-234.

Dokić, P., Dokić, L., Dapčević, T., & Krstonošić, V. (2008). Colloid characteristics and emulsifying properties of OSA starches. *Colloids for nano-and biotechnology*, 48-56.

Dokić-Bauca, Lj. (2002) Uticaj molekularnih svojstava maltodekstrina na tehnološko ponašanje niskoenergetskih prehrambenih emulzija. Doktorska disertacija. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.

Donsì, F., Wang, Y., Li, J. I., & Huang, Q. (2010). Preparation of curcumin sub-micrometer dispersions by high-pressure homogenization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(5), 2848-2853.

Drusch, S., & Schwarz, K. (2006). Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatised starch. *European Food Research and Technology*, 222(1-2), 155-164.

Đaković, Lj. (1985): Koloidna hemija. Tehnološki fakultet u Novom Sadu, Zavod za izdavanje udžbenika u Novom Sadu.

EN ISO 13903:2005 (2005). Animal feeding stuff — Determination of amino acids content.

Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59(4), 843-853.

Floury, J., Desrumaux, A., & Lardieres, J. (2000). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(2), 127-134.

Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M. A., & Legrand, J. (2003). Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. *Journal of food engineering*, 58(3), 227-238.

- Fonseca-Florido, H. A., Vázquez-García, H. G., Méndez-Montevalvo, G., Basilio-Cortés, U. A., Navarro-Cortés, R., Rodríguez-Marín, M. L., ... & Gómez-Aldapa, C. A. (2018). Effect of acid hydrolysis and OSA esterification of waxy cassava starch on emulsifying properties in Pickering-type emulsions. *LWT*, 91, 258-264.
- Funami, T., Nakauma, M., Ishihara, S., Tanaka, R. Inoue, T., Phillips, G.O. (2009) Structural modifications of sugar beet pectin and the relationship of structure to functionality, *Food Hydrocolloids*, 25 , 221–229.
- Funami, T., Zhang, G., Hiroe, M., Noda, S., Nakauma, M., Asai, I., ... & Phillips, G. O. (2007). Effects of the proteinaceous moiety on the emulsifying properties of sugar beet pectin. *Food Hydrocolloids*, 21(8), 1319-1329.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. A., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.
- Gyura J, Šereš Z, Pajin B, Šoronja Simović D (2016) Proizvodnja i primena prehrambenih vlakana, Deo 1. Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, Srbija.
- Hadnađev, T. R. D., Dokić, L. P., Hadnađev, M. S., Pojić, M. M., & Torbica, A. M. (2014). Rheological and breadmaking properties of wheat flours supplemented with octenyl succinic anhydride-modified waxy maize starches. *Food and Bioprocess Technology*, 7(1), 235-247.
- Hajnal, B. (2018) Fizičke karakteristike usitnjenih vlakana šećerne repe, šećera i inulina na nanomlinu tipa Retsch, Novi Sad: Tehnološki fakultet.
- Jafari, S. M., & McClements, D. J. (Eds.). (2018). *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*. Academic Press.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food hydrocolloids*, 22(7), 1191-1202.
- Javidipour, I., Vural, H., Özbaş, Ö. Ö., & Tekin, A. (2005). Effects of interesterified vegetable oils and sugar beet fibre on the quality of Turkish-type salami. *International journal of food science & technology*, 40(2), 177-185.
- Joscelyne, S. M., & Trägårdh, G. (2000). Membrane emulsification—a literature review. *Journal of Membrane Science*, 169(1), 107-117.

- Juttulapa, M., Piriyaprasarth, S., Takeuchi, H., & Sriamornsak, P. (2017). Effect of high-pressure homogenization on stability of emulsions containing zein and pectin. *asian journal of pharmaceutical sciences*, 12(1), 21-27.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Cathala, B., & Capron, I. (2011). New Pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals. *Langmuir*, 27(12), 7471-7479.
- Karbstein, H. (1994). Untersuchungen zum Herstellen und Stabilisieren von O/W Emulsionen (Doctoral dissertation, Dissertation University of Karlsruhe).
- Karnik, D., & Wicker, L. (2018). Emulsion stability of sugar beet pectin fractions obtained by isopropanol fractionation. *Food Hydrocolloids*, 74, 249-254.
- Kawakatsu, T., Trägårdh, G., & Trägårdh, C. (2001). The formation of oil droplets in a pectin solution and the viscosity of the oil-in-pectin solution emulsion. *Journal of food engineering*, 50(4), 247-254.
- Kleinig, A. R., & Middelberg, A. P. (1998). On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. *Chemical Engineering Science*, 53(5), 891-898.
- Köhler, K., Santana, A. S., Braisch, B., Preis, R., & Schuchmann, H. P. (2010). High pressure emulsification with nano-particles as stabilizing agents. *Chemical Engineering Science*, 65(10), 2957-2964.
- Krstonošić, V. (2010) Uticaj oktenil sukcinata skroba na reološke i disperzione osobine emulzija ulja u vodi. Doktorska disertacija. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- Krstonošić, V., Dokić, L., & Milanović, J. (2011). Micellar properties of OSA starch and interaction with xanthan gum in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 361-367.
- Krstonošić, V., Dokić, L., Nikolić, I., & Milanović, M. (2015). Influence of xanthan gum on oil-in-water emulsion characteristics stabilized by OSA starch. *Food Hydrocolloids*, 45, 9-17.
- Lam, S., Velikov, K. P., & Velev, O. D. (2014). Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(5), 490-500.
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 455-462.

- Li, D., Liu, B., Yang, F., Wang, X., Shen, H., & Wu, D. (2016). Preparation of uniform starch microcapsules by premix membrane emulsion for controlled release of avermectin. *Carbohydrate polymers*, 136, 341-349.
- Li, Z., Hong, Y., Gu, Z., Tian, Y., Li, Z., & Cheng, L. (2014). Emulsification properties of enzymatically treated octenyl-succinic anhydride starch. *Starch-Stärke*, 66(11-12), 1089-1095.
- Lv, C., Wang, Y., Wang, L. J., Li, D., & Adhikari, B. (2013). Optimization of production yield and functional properties of pectin extracted from sugar beet pulp. *Carbohydrate polymers*, 95(1), 233-240.
- Ma, S., Yu, S. J., Zheng, X. L., Wang, X. X., Bao, Q. D., & Guo, X. M. (2013). Extraction, characterization and spontaneous emulsifying properties of pectin from sugar beet pulp. *Carbohydrate polymers*, 98(1), 750-753.
- Maravić, N., Šereš, Z., Nikolić, I., Dokić, P., Kertesz, S., & Dokić, L. (2019). Emulsion stabilizing capacity of sugar beet fibers compared to sugar beet pectin and octenyl succinate modified maltodextrin in the production of O/W emulsions: individual and combined impact. *LWT*, 108, 392-399.
- Maravić, N., Šereš, Z., Vidović, S., Mišan, A., Milovanović, I., Radosavljević, R., & Pavlić, B. (2018). Subcritical water hydrolysis of sugar beet pulp towards production of monosaccharide fraction. *Industrial Crops and Products*, 115, 32-39.
- Marry, M., McCann, M. C., Kolpak, F., White, A. R., Stacey, N. J., & Roberts, K. (2000). Extraction of pectic polysaccharides from sugar-beet cell walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(1), 17-28.
- Matos, M., Laca, A., Rea, F., Iglesias, O., Rayner, M., & Gutiérrez, G. (2018). O/W emulsions stabilized by OSA-modified starch granules versus non-ionic surfactant: Stability, rheological behaviour and resveratrol encapsulation. *Journal of Food Engineering*, 222, 207-217.
- McClements, D. J. (1999): *Food emulsions: Principles, practice and techniques*. Boca Raton, London : CRC Press.
- McClements, D. J. (2000). Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 14(2), 173-177.

McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of food science*, 72(8), R109-R124.

Mišan, A., Sakač, M., Medić, Đ., Tadić, V., Marković, G., Gyura, J., ... & Milovanović, I. (2016). Antioxidant and Physicochemical Properties of Hydrogen Peroxide-Treated Sugar Beet Dietary Fibre. *Phytotherapy Research*, 30(5), 855-860.

Modig, G., Nilsson, L., Bergenståhl, B., & Wahlund, K. G. (2006). Homogenization-induced degradation of hydrophobically modified starch determined by asymmetrical flow field-flow fractionation and multi-angle light scattering. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 1087-1095.

Morris, G. A., Ralet, M. C., Bonnin, E., Thibault, J. F., & Harding, S. E. (2010). Physical characterisation of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1161-1167.

Moschakis, T., Murray, B. S., & Biliaderis, C. G. (2010). Modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 8-17.

Moschakis, T., Murray, B. S., & Biliaderis, C. G. (2010). Modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 8-17.

Nakauma, M., Funami, T., Noda, S., Ishihara, S., Al-Assaf, S., Nishinari, K., & Phillips, G. O. (2008). Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble polysaccharide, and gum arabic as food emulsifiers. 1. Effect of concentration, pH, and salts on the emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1254-1267.

Nilsson, L., & Bergenståhl, B. (2007). Adsorption of hydrophobically modified anionic starch at oppositely charged oil/water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 308(2), 508-513.

Ochoa-Villarreal, M., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I., & Martínez-Téllez, M. Á. (2012). Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives. In *Polymerization*. IntechOpen.

Okonogi, S., Kato, R., Asano, Y., Yuguchi, H., Kumazawa, R., Sotoyama, K., ... & Fujimoto, M. (1994). Methods for producing emulsions, low-fat spread and oil-in-water-in-oil type spread. U.S. Patent No. 5,279,847. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Pacek, A. W., Hall, S., Cooke, M., & Kowalski, A. J. (2013). Emulsification in Rotor–Stator Mixers. *Emulsion Formation and Stability*, 127-167.

Pal, R. (1996). Effect of droplet size on the rheology of emulsions. *AIChE Journal*, 42(11), 3181-3190.

Patist, A., & Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative food science & emerging technologies*, 9(2), 147-154.

Patova, O., Golovchenko, V., Ovodov, S. (2014) Pectic polysaccharides: structure and properties, *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, 63, 1901-1924.

Piacentini, E., Drioli, E., & Giorno, L. (2014). Membrane emulsification technology: Twenty-five years of inventions and research through patent survey. *Journal of membrane science*, 468, 410-422.

Pickering S.U. (1907) *Emulsions*. *Journal of Chemical Society*, 91 (1907), pp. 2001-2021
Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1191–1202.

Pu, X., Wolf, B., & Dragosavac, M. (2019). Generation of magnesium enriched water-in-oil-in-water food emulsions by stirred cell membrane emulsification. *Journal of Food Engineering*, 247, 178-187.

Ramachandran, K. B., Al-Zuhair, S., Fong, C. S., & Gak, C. W. (2006). Kinetic study on hydrolysis of oils by lipase with ultrasonic emulsification. *Biochemical Engineering Journal*, 32(1), 19-24.

Ramakrishnan, S., Ferrando, M., Aceña-Muñoz, L., De Lamo-Castellví, S., & Güell, C. (2013). Fish oil microcapsules from O/W emulsions produced by premix membrane emulsification. *Food and bioprocess technology*, 6(11), 3088-3101.

Rein, D. M., Khalfin, R., & Cohen, Y. (2012). Cellulose as a novel amphiphilic coating for oil-in-water and water-in-oil dispersions. *Journal of colloid and interface science*, 386(1), 456-463.

Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Batur, V., & Muža, M. (2009). Prednosti i nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 59(4), 267-281.

Sakač, M. B., Peričin, D. M., Mandić, A. I., & Kormanjoš, Š. M. (2004). Antioxidant properties of ethanolic extract of sugar beet pulp. *Acta Periodica Technologica*, 2004(35), 255-264.

Schröder, V., Behrend, O., & Schubert, H. (1998). Effect of dynamic interfacial tension on the emulsification process using microporous, ceramic membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 202(2), 334-340.

Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., & Ulrich, J. (2004). High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chemical Engineering & Technology*, 27(4), 361-368.

Schulz, M. B., & Daniels, R. (2000). Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49(3), 231-236.

Shamsara, O., Muhidinov, Z. K., Jafari, S. M., Bobokalonov, J., Jonmurodov, A., Taghvaei, M., & Kumpugdee-Vollrath, M. (2015). Effect of ultrasonication, pH and heating on stability of apricot gum–lactoglobuline two layer nanoemulsions. *International journal of biological macromolecules*, 81, 1019-1025.

Shogren, R. L., Viswanathan, A., Felker, F., & Gross, R. A. (2000). Distribution of octenyl succinate groups in octenyl succinic anhydride modified waxy maize starch. *Starch-Stärke*, 52(6-7), 196-204.

Siew, C. K., & Williams, P. A. (2008). Role of protein and ferulic acid in the emulsification properties of sugar beet pectin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(11), 4164-4171.

Silva, E. K., Rosa, M. T. M., & Meireles, M. A. A. (2015). Ultrasound-assisted formation of emulsions stabilized by biopolymers. *Current Opinion in Food Science*, 5, 50-59.

Sjoblom, J. (2005). *Emulsions and emulsion stability: Surfactant science series/61*. crc press.

SRPS ISO 5725-5:2011 (2011) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method.

Stuart B. (2004) *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, Ltd ISBNs: 0-470-85427-8.

Sun, S. F. (2004). *Physical chemistry of macromolecules: basic principles and issues*. 2nd Ed. New Jersey, USA. John Wiley & Sons Inc.

Šoronja-Simović, D., Maravić, N., Šereš, Z., Mišan, A., Pajin, B., Jevrić, L. R., ... & Kovačević, S. Z. (2017). Antioxidant capacity of cookies with non-modified and modified sugar beet fibers: chemometric and statistical analysis. *European Food Research and Technology*, 243(2), 239-246.

Šoronja-Simović, D., Šereš, Z., Maravić, N., Djordjević, M., Djordjević, M., Luković, J., & Tepić, A. (2016). Enhancement of physicochemical properties of sugar beet fibres affected by chemical modification and vacuum drying. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 432-439.

Tadros, T. (2004). Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in colloid and interface science*, 108, 227-258.

Taherian, A. R., Fustier, P., & Ramaswamy, H. S. (2006). Effect of added oil and modified starch on rheological properties, droplet size distribution, opacity and stability of beverage cloud emulsions. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 687-696.

Taisine, L., Walstra, P., Cabane, B. (1997). Recoalescence during emulsification. *Proceedings of 2nd World Congress on Emulsions 1*, 1-2.

Tesch, S., Gerhards, C., & Schubert, H. (2002). Stabilization of emulsions by OSA starches. *Journal of Food Engineering*, 54(2), 167-174.

Timgren, A., Rayner, M., Dejmek, P., Marku, D., & Sjöö, M. (2013). Emulsion stabilizing capacity of intact starch granules modified by heat treatment or octenyl succinic anhydride. *Food science & nutrition*, 1(2), 157-171.

Van der Poel, P. W., Schiweck, H., & Schwartz, T. (1998). *Sugar technology. Beet and Cane Sugar Manufacture*. Berlin: Bartens, 88-107.

Varona, S., Martín, Á., & Cocero, M. J. (2009). Formulation of a natural biocide based on lavandin essential oil by emulsification using modified starches. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1121-1128.

Walstra, P. (1993). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, 48(2), 333-349.

Wang, L. Y., Ma, G. H., & Su, Z. G. (2005). Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug. *Journal of Controlled Release*, 106(1-2), 62-75.

Wicker, L., Kim, Y., Kim, M., Thirkield, B., Lin, Z., Jung, J. (2014) Pectin as a bioactive polysaccharide-extracting tailored function from less, *Food Hydrocolloids*, 42 , 251-259.

Williams, P. A., Sayers, C., Viebke, C., Senan, C., Mazoyer, J., & Boulenguer, P. (2005). Elucidation of the emulsification properties of sugar beet pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3592-3597.

Williams, R. A., Peng, S. J., Wheeler, D. A., Morley, N. C., Taylor, D., Whalley, M., & Houldsworth, D. W. (1998). Controlled production of emulsions using a crossflow membrane: part II: industrial scale manufacture. *Chemical Engineering Research and Design*, 76(8), 902-910.

Yancheva, N., Markova, D., Murdzheva, D., Vasileva, I., & Slavov, A. (2016). Foaming and emulsifying properties of pectin isolated from different plant materials. *Acta Scientifica Naturalis*, 3(1), 7-12.

Yu, C., & Gunasekaran, S. (2001). Correlation of dynamic and steady flow viscosities of food materials. *Applied Rheology*, 11(3), 126.

Zhai, X., Lin, D., Liu, D., & Yang, X. (2018). Emulsions stabilized by nanofibers from bacterial cellulose: New potential food-grade Pickering emulsions. *Food research international*, 103, 12-20.

Zisu, B., & Chandrapala, J. (2015). High power ultrasound processing in milk and dairy products. *Emerging Dairy Processing Technologies—Opportunities for the Dairy Industry*; Datta, N., Tomasula, PM, Eds, 149-180.

Mittal, S., Chowhan, R. K., & Singh, L. R. (2015). Macromolecular crowding: Macromolecules friend or foe. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(9), 1822-1831.