



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKE NAUKE

Iskorišćenje tropa borovnice i maline u formulaciji bezglutenskog keksa sa dodatkom vrednošću

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Sonja Đilas
Dr Anamarija Mandić

Kandidat:

Bojana Šarić, dipl.inž.

Novi Sad, 2016.

Univerzitet u Novom Sadu

Tehnološki fakultet

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Bojana Šarić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Sonja Đilas, redovni profesor Dr Anamarija Mandić, naučni savetnik
Naslov rada: NR	Iskorišćenje tropa borovnice i maline u formulaciji bezglutenskog keksa sa dodatom vrednošću
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	poglavlja: 7 / stranica: 153 / slika: 29 / tabela: 25/ referenci: 338 / priloga: 8
Naučna oblast: NO	Prehrambeno-biotehnološke nauke
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Sporedni proizvodi industrijske prerade voća; trop borovnice; trop maline; bezglutenski proizvodi; keks; RSM
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	nema

Izvod:
IZ

Sporedni proizvodi industrijske prerade voća, trop borovnice i maline, postupcima sušenja i mlevenja prevedeni su u oblik pogodan za aplikaciju u prehrambene proizvode. Ovako dobijeni sastojci imaju visok sadržaj prehrambenih vlakana, esencijalnih masnih kiselina poput linolne i α -linolenske, a karakteriše ih i izbalansiran odnos PUFA/SFA. Od makronutrijenata, u najvećoj koncentraciji prisutni su K, Mg i Ca. Imajući u vidu da su glavne fitohemikalije bobičastog voća polifenolna jedinjenja, u proizvedenim funkcionalnim sastojcima određen je sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola, antocijana i flavonoida, kao i sastav i sadržaj odabranih polifenolnih jedinjenja primenom LC/MS-MS tehnike.

Primena osušenih i samlevenih tropova kao sastojaka prehrambenih proizvoda ispitana je u formulaciji bezglutenskog keksa, sa ciljem njegovog funkcionalnog obogaćivanja. Za optimizaciju formulacije keksa korišćen je postupak odzivne površine (RSM), a formulacija u kojoj je bezglutenska smeša zamenjena sa 28,2% tropa borovnice i 1,8% tropa maline dobijena je kao optimalna, uzimajući u obzir sve zadate kriterijume. Dodatkom ova dva funkcionalna sastojka u gorenavedenom odnosu, postignuto je značajno poboljšanje nutritivnih svojstava bezglutenskog keksa, a dobijeni proizvod po kvalitetu može da parira komercijalno dostupnim funkcionalno obogaćenim keksovima, namenjenim zdravoj populaciji.

Rezultati dijetetske interventne studije sprovedene na 20 zdravih, normalno uhranjenih ispitanika ženskog pola, ukazuju da se konzumiranjem kreiranog bezglutenskog keksa u količini od 32 g dnevno, postiže značajna redukcije LDL holesterola, i povećanje nivoa adiponektina u krvi, a budući da se ovaj adipocitni-sekretorni protein dovodi u vezu sa antiinflamatornim i antiaterogenim potencijalom u tretmanu metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2, može se očekivati protektivno dejstvo kreiranog bezgutenskog keksa.

Datum prihvatanja teme od strane 22.01.2015.

Senata:
DP

Datum odbrane:
DO

Članovi komisije:
(ime i prezime / titula / zvanje / naziv
organizacije / status)
KO

1. Dr Vesna Tumbas Šaponjac, docent, Tehnološki fakultet, Novi Sad, predsednik
2. Dr Sonja Đilas, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, mentor
3. Dr Anamarija Mandić, naučni savetnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, mentor
4. Dr Jasna Čanadanović-Brunet, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, član
5. Dr Bojana Ikonić, docent, Tehnološki fakultet, Novi Sad, član

University of Novi Sad

Faculty of Technology

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph documentation
DT

Type of record: Textual printed material
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Bojana Šarić
AU

Mentor: Sonja Đilas, PhD, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad
MN
Anamarija Mandić, PhD, principal research fellow, Institute of Food Technology, Novi Sad

Title: Valorisation of blueberry and raspberry pomace through the formulation of value-added gluten-free cookie
TI

Language of text: Serbian, Latin
LT

Language of abstract: eng. / srp.
LA

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2016.
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP

Physical description: (chapters: 7/ pages: 153/ figures: 29/ tables: 25/
PD references: 338/ annex: 8)

Scientific field: Food and Biotechnical Sciences
SF

Scientific discipline: Food engineering
SD

Subject, Key words: Fruit processing by-products, blueberry pomace; raspberry pomace; gluten-free products; cookie; RSM
SKW

UC

Holding data:
HD

Library of Faculty of Technology, Novi Sad

Note:
N

/

Abstract:
AB

Blueberry and raspberry pomace, by-products from fruit juice industry, were processed into the new food ingredients by drying and grinding. The obtained functional ingredients are characterized by high content of dietary fibres and essential fatty acids (linoleic and α -linolenic acid), as well as by optimal ratio of PUFA/SFA. The main macronutrients in dried and ground pomace are K, Mg and Ca. The content of total phenolic compounds, anthocyanins and flavonoids were determined, as well as composition and content of individual phenolic compounds using LC/MS-MS in order to evaluate their antioxidant potential.

In the form of dried powder, blueberry and raspberry pomace were used as ingredients in formulation of gluten-free cookies. Response surface methodology (RSM) approach was applied to obtain optimal ingredients proportion. Formulation in which gluten-free flour mixture is substituted with 28.2% of the blueberry and 1.8% of the raspberry pomace was found to be optimal following the used optimization criteria. Addition of blueberry and raspberry pomace has led to a remarkable improvement in nutritional properties, and resulted in a product with similar nutritional profile with commercially available gluten containing cookies.

Dietary intervention study on a group of 20 healthy, normal weight female subjects was conducted to investigate the health effect of the created gluten-free cookies. The results showed a significant reduction in levels of LDL cholesterol, and an increase in plasma concentrations of adiponectin, suggesting a potential positive effect of the created product on human health.

Accepted on Senate on:
AS

22.01.2015.

Defended:
DE

Thesis Defend Board:
DB

1. Vesna Tumbas Šaponjac, PhD, assistant professor, Faculty of Technology, Novi Sad, president
2. Sonja Đilas, PhD, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, mentor
3. Anamarija Mandić, PhD, principal research fellow, Institute of Food Technology, Novi Sad, mentor
4. Jasna Čanadanović-Brunet, PhD, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, member
5. Bojana Ikonić, PhD, assistant professor, Faculty of Technology, Novi Sad, member

Zahvalnica

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	4
2.1. PREOSETLJIVOST NA HRANU	4
2.2. CELIJAKIJA.....	5
2.3. BEZGLUTENSKA ISHRANA	7
2.3.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA GLUTENA U NAMIRNICAMA.....	8
2.3.2. STRUKTURA GLUTENA I NJEGOVA ULOGA U TESTU.....	9
2.3.3. SIROVINE ZA PROIZVODNJU BEZGLUTENSKIH PROIZVODA.....	10
2.3.3.1. Bezglutenska brašna i skrobovi.....	10
2.3.3.2. Hidrokoloide.....	11
2.3.3.3. Proteini	12
2.3.3.4. Pseudocerealijske.....	13
2.3.4. BEZGLUTENSKI PROIZVODI NA BAZI ŽITA.....	14
2.3.5. NUTRITIVNI ASPEKT BEZGLUTENSKIH PROIZVODA.....	16
2.3.6. NOVI PRAVCI U KREIRANJU BEZGLUTENSKIH PROIZVODA.....	17
2.4. FUNKCIONALNA HRANA.....	17
2.4.1. DEFINICIJA I RAZVOJ KONCEPTA FUNKCIONALNE HRANE.....	17
2.4.2. FUNKCIONALNA JEDINJENJA	19
2.5. BOBIČASTO VOĆE KAO IZVOR FUNKCIONALNIH JEDINJENJA	20
2.5.1. FITOHEMIKALIJE BOBIČASTOG VOĆA.....	21
2.5.1.2. Polifenolna jedinjenja	21
2.5.2. NUTRIJENTI BOBIČASTOG VOĆA.....	27
2.5.2.1. Esencijalne masne kiseline.....	27
2.5.2.2. Prehrambena vlakna	28
2.5.2.3. Vitamini	30
2.5.2.4. Minerali.....	31
2.5.2.5. Normativi preporučenih potreba za nutrijentima.....	31
2.5.3. Borovnica (<i>Vaccinium myrtillus</i> L., Ericaceae).....	32
2.5.4. Malina (<i>Rubus idaeus</i> L., Rosacea)	33
2.6. SPOREDNI PROIZVODI INDUSTRIJSKE PRERADE VOĆA.....	34
2.6.1. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja.....	36
2.7. POSTUPAK ODZIVNE POVRŠINE (RSM) U OPTIMIZACIJI FORMULACIJE PROIZVODA	38
3. EKSPERIMENTALNI DEO	40
3.1. MATERIJAL.....	40
3.1.1. SIROVINE	40
3.1.2. HEMIKALIJE I REAGENSI.....	41
3.2. PROIZVODNJA BEZGLUTENSKOG KEKSA	42
3.3. METODE	45

3.3.1. ODREĐIVANJE NUTRITIVNIH KARAKTERISTIKA TROPA BOROVNICE I MALINE I PROIZVEDENOG BEZGLUTENSKOG KEKSA	45
3.3.1.1. Određivanje hemijskog sastava	45
3.3.1.2. Određivanje sadržaja mineralnih materija metodom atomske apsorpcione spektrometrije (AAS)	45
3.3.1.3. Određivanje sadržaja masnih kiselina metodom gasne hromatografije (GC-FID)	46
3.3.2. ODREĐIVANJE FUNKCIONALNIH KARAKTERISTIKA TROPA BOROVNICE I MALINE	47
3.3.2.1. Određivanje sadržaja antocijana (pH diferencijalna i „singl“ pH metoda)	47
3.3.2.2. Priprema ekstrakata za određivanje ukupnih rastvorljivih polifenola, flavonoida i antiradikalske aktivnosti na DPPH'	48
3.3.2.3. Određivanje sadržaja ukupnih rastvorljivih polifenola	49
3.3.2.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	49
3.3.2.5. LC-MS/MS analiza sadržaja polifenolnih jedinjenja	50
3.3.2.6. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja tropa borovnice rastvaračima pod povišenim pritiskom (ASE)	51
3.3.2.7. Određivanje antiradikalske aktivnosti ekstrakata na DPPH'	51
3.3.2.8. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata tropa borovnice na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala	52
3.3.2.9. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata tropa borovnice na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala	53
3.3.3. ODREĐIVANJE FUNKCIONALNIH KARAKTERISTIKA PROIZVEDENOG BEZGLUTENSKOG KEKSA	54
3.3.4. ODREĐIVANJE a_w VREDNOSTI TROPA BOROVNICE I MALINE I PROIZVEDENOG BEZGLUTENSKOG KEKSA	54
3.3.5. ODREĐIVANJE REOLOŠKIH OSOBINA TESTA ZA KEKS	55
3.3.6. ODREĐIVANJE FIZIČKIH OSOBINA BEZGLUTENSKOG KEKSA	56
3.3.6.1. Određivanje tehnoloških parametara kvaliteta bezglutenskog keksa	56
3.3.6.2. Instrumentalno određivanje teksturnih svojstava	56
3.3.6.3. Instrumentalno određivanje boje	57
3.3.7. SENZORSKA OCENA BEZGLUTENSKOG KEKSA UZ PRIMENU PANELA UTRENIRANIH OCENJIVAČA	59
3.3.8. MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST BEZGLUTENSKOG KEKSA	61
3.3.8.1. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama	61
3.3.8.2. Izolovanje i određivanje broja kserofilnih plesni	61
3.3.8.3. Izolovanje i određivanje broja osmofilnih kvasaca	61
3.3.9. DIJETETSKA INTERVENTNA STUDIJA	61
3.3.10. EKSPERIMENTALNI PLAN I STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	62
4. REZULTATI I DISKUSIJA	63
4.1. NUTRITIVNI PROFIL OSUŠENOG I SAMLEVENOG TROPA BOROVNICE I MALINE	63
4.2. FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE OSUŠENOG I SAMLEVENOG TROPA BOROVNICE I MALINE	68
4.2.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA ANTOCIJANA, UKUPNIH RASTVORLJIVIH POLIFENOLA I FLAVONOIDA	68
4.2.2. LC-MS/MS ANALIZA SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA	71
4.2.3. ANTIRADIKALSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA NA DPPH'	74

4.3. EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA OSUŠENOG I SAMLEVENOG TROPA BOROVNICE RASTVARAČIMA POD POVIŠENIM PRITISKOM	75
4.4. ODABIR OPTIMALNIH USLOVA PEČENJA BEZGLUTENSKOG KEKSA SA DODATKOM TROPA	77
4.5. REOLOŠKE OSOBINE TESTA ZA KEKS	80
4.6. OPTIMIZACIJA FORMULACIJE BEZGLUTENSKOG KEKSA	85
4.6.1. UTICAJ DODATKA TROPA BOROVNICE I MALINE NA FIZIČKE KARAKTERISTIKE BEZGLUTENSKOG KEKSA	87
4.6.1.1. Boja keksa	87
4.6.1.2. Teksturna svojstva keksa	89
4.6.1.3. Senzorska ocena keksa	90
4.6.2. UTICAJ DODATKA TROPA BOROVNICE I MALINE NA ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL BEZGLUTENSKOG KEKSA	93
4.6.3. REGRESIONE JEDNAČINE MODELOVANIH ODZIVA	94
4.6.4. ANALIZA VARIJANSE (ANOVA) MODELOVANIH ODZIVA	95
4.6.5. ODABIR OPTIMALNE FORMULACIJE BEZGLUTENSKOG KEKSA PRIMENOM FUNKCIJE POŽELJNOSTI	95
4.6.6. PROVERA (VERIFIKACIJA) MODELA	97
4.7. NUTRITIVNI PROFIL OPTIMALNE FORMULACIJE BEZGLUTENSKOG KEKSA	99
4.7.1. DOPRINOS KEKSA SA DODATKOM TROPA BOROVNICE I MALINE PREPORUČENIM DNEVNIM POTREBAMA ZA NUTRIJENTIMA	102
4.8. REZULTATI DIJETETSKE INTERVENTNE STUDIJE	106
5. ZAKLJUČAK	108
6. LITERATURA	114
7. PRILOG	143
Prilog 1. Preporučeni unosi za pojedince, makronutrijenti (NRC, 2004)	143
Prilog 2. Preporučeni unosi za pojedince, mikro- i makroelementi (NRC, 2004)	144
Prilog 3. LC/MS/MS analiza polifenolnih jedinjenja tropa borovnice	145
Prilog 4. LC/MS/MS analiza polifenolnih jedinjenja tropa maline	146
Prilog 5. Izgled ocenjivačkog lista korišćen prilikom senzorske ocene bezglutenskog keksa	148
Prilog 6. Optimizacija formulacije bezglutenskog keksa: vrednosti Pearsonovih koeficijenata korelacije između određivanih parametara	151
Prilog 7. Grafici normalne raspodele ostataka (reziduala)	152
Prilog 8. Lista komercijalno dostupnih keksova korišćenih za uporednu analizu nutritivnog profila	153

LISTA SKRAĆENICA

ACY	sadržaj monomernih antocijana
ADF	prehrambena vlakna sa antioksidativnim svojstvima (eng. <i>antioxidant dietary fibre</i>)
AI	adekvatan unos nutrijenata (eng. <i>adequate intake</i>)
AP	izgled keksa
ASE	ekstrakcija rastvaračima pod povišenim pritiskom (eng. <i>accelerated solvent extraction</i>)
BHA	2- <i>terc</i> -butil-4-hidroksianizol
BHT	butilovani hidroksitoluen
BMI	indeks telesne mase (eng. <i>body mass index</i>)
BWL	gubitak mase usled pečenja (eng. <i>baking weight loss</i>)
CMC	karboksimetil celuloza
DAD	detektor na bazi niza dioda (eng. <i>diode array detector</i>)
DAO	diamin oksidaza
DPPH·	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal
EAR	procenjena prosečna potreba za nutrijentima (eng. <i>estimated average requirement</i>)
F	aroma
FAMES	metil-estari masnih kiselina (eng. <i>fatty acid methyl esters</i>)
FC	Folin-Ciocalteu reagens
FDA	američka agencija za hranu i lekove (eng. <i>Food and Drug Administration</i>)
GAE	ekvivalent galne kiseline (eng. <i>gallic acid equivalent</i>)
H	čvrstoća keksa
HPMC	hidroksipropilmetil celuloza
IC₅₀	koncentracija ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50% DPPH·
K	kontrolni keks
KB	kvalitetni broj
L	prečnik keksa u pravcu normalnom na pravac laminiranja (eng. <i>length</i>)
LA	linolna kiselina, 18:2, n-6
LNA	α-linolenska kiselina, 18:3, n-3

LISTA SKRAĆENICA

M	vlaga keksa
MTF	tekstura pri žvakanju
MUFA	mononezasićene masne kiseline
NRC	National Research Council
O	miris
PUFA	polinezasićene masne kiseline
RDA	preporučena dnevna potreba za nutrijentima (eng. <i>recommended dietary allowance</i>)
RSM	postupak odzivne površine (eng. <i>response surface methodology</i>)
SFA	zasićene masne kiseline
SH	tekstura pri prvom zagrizu
T	ukus
TACY	sadržaj ukupnih antocijana
TB	trop borovnice
TIC	ukupni jonski hromatogram (eng. <i>total ion chromatogram</i>)
TM	trop maline
TPC	sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola (eng. <i>total phenolic content</i>)
UFA	nezasićene masne kiseline (ukupne)
W	prečnik keksa u pravcu laminiranja (eng. <i>width</i>)
WBC	sposobnost (kapacitet) vezivanja vode (eng. <i>water binding capacity</i>)
WHC	sposobnost (kapacitet) zadržavanja vode (eng. <i>water holding capacity</i>)
WHO	svetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World Health Organization</i>)
ΔE	razlika u boji

1. UVOD

Sve veća učestalost pojave alergija i intolerancija na hranu opredelila je jedan deo naučne i stručne javnosti ka intenzivnom razvoju proizvoda za potrošače sa ovim problemima. Celijakija je trajna bolest od koje boluje oko 1% populacije, a manifestuje se intolerancijom na gluten, proteinsku frakciju prisutnu u žitaricama kao što su pšenica, raž, ječam i ovas. Za normalan život obolelih od celijakije neophodno je dosledno sprovođenje dijeta koja podrazumeva potpuno isključivanje gorenavedenih žitarica iz ishrane. Rezultati brojnih studija ukazuju da bezglutensku ishranu karakteriše nizak unos vitamina, minerala i prehrambenih vlakana (Grehn i sar., 2001; Lohiniemi i sar., 2000), pa je kreiranje novih proizvoda, kojim bi se ciljano nadoknadio ovaj deficit, osnovna ideja mnogih savremenih studija (Dapčević Hadnađev i sar., 2013; Padalino i sar., 2011; Padalino i sar., 2013; Sabanis i sar., 2008; Sakač i sar., 2011).

U ishrani obolelih od celijakije keks je najzastupljenija komercijalno dostupna namirnica iz grupe finih pekarskih proizvoda, stoga je njegov kvalitet, kako nutritivni, tako i senzorski, od velike važnosti. Odabir nutritivno vrednih komponenata koje ne sadrže gluten i njihova primena u formulacijama bezglutenskog keksa, aktuelna je tema u naučnoj literaturi (de la Barca i sar., 2010; Gambuś i sar., 2009; Hadnađev i sar., 2013; Kaur i sar., 2015; Schoenlechner i sar., 2006). Ipak, broj komercijalno dostupnih nutritivno obogaćenih vrsta bezglutenskog keksa je mali, pa obogaćivanje ovih proizvoda u cilju poboljšanja njihovog nutritivnog profila i fiziološke funkcionalnosti

predstavlja jedan od potencijalnih pravaca razvoja ove kategorije finih pekarskih proizvoda.

Primenom različitih tehnoloških postupaka prerade voća nastaju velike količine otpadnog materijala, koji, osim ekonomskog deficita za samu industriju, predstavlja i značajan ekološki problem. Imajući u vidu da ovako dobijeni sporedni proizvodi predstavljaju značajan izvor bioaktivnih jedinjenja, velika pažnja posvećena je mogućnostima njihovog iskorišćenja, a jedan od mogućih pravaca je primena sporednih proizvoda industrijske prerade voća u proizvodnji funkcionalnih sastojaka namenjenih prehrambenoj industriji.

Sagledavajući ekonomsku opravdanost iskorišćenja sporednih proizvoda nastalih u industriji voćnog soka, kao i njihov izuzetan nutritivni potencijal, i uzimajući u obzir gorenavedene relevantne podatke koji se odnose na bezglutensku ishranu, postavljen je cilj ove doktorske disertacije – dobijanje funkcionalnog sastojka korišćenjem sporednih proizvoda industrijske prerade voća i njegova primena u kreiranju bezglutenskog keksa sa dodatkom vrednošću, kojim bi se potencijalno proširio asortiman bezglutenskih proizvoda na tržištu Republike Srbije.

Rad na izvođenju ove doktorske disertacije podeljen je u sledeće faze:

- 1) Sušenje i mlevenje tropa borovnice i maline u cilju prevođenja u oblik pogodan za aplikaciju u bezglutenski keks
- 2) Karakterizacija osušenih tropova sa aspekta kvaliteta, bezbednosti i antioksidativnog potencijala:
 - određivanje osnovnog hemijskog sastava, sadržaja prehrambenih vlakana, sastava masnih kiselina i minerala,
 - određivanje sadržaja antocijana, ukupnih rastvorljivih polifenola i flavonoida,
 - LC/MS-MS analiza sadržaja polifenolnih jedinjenja,
 - određivanje antiradikalske aktivnosti ekstrakata tropova,
 - ekstrakcija polifenolnih jedinjenja (rastvaračima pod povišenim pritiskom i konvencionalnim postupkom),
 - određivanje a_w vrednosti
- 3) Optimizacija formulacije bezglutenskog keksa sa dodatkom osušenih tropova borovnice i maline:
 - preliminarna senzorska ispitivanja u cilju definisanja maksimalne količine dodatka pojedinačnih tropova u bezglutensku smesu,
 - ispitivanje uticaja dodatka tropa na reološke osobine testa,
 - optimizacija uslova pečenja keksa na osnovu tehnoloških parametara kvaliteta,

- odabir i primena odgovarajućeg eksperimentalnog plana u cilju optimizacije odnosa sadržaja tropa borovnice i maline u keksu,
 - provera i validacija dobijenog matematičkog modela
- 4) Karakterizacija kreiranog finalnog proizvoda (bezglutenskog keksa sa dodatkom osušenih tropova borovnice i maline):
- određivanje osnovnog hemijskog sastava, sadržaja prehrambenih vlakana, masnih kiselina, minerala i mikrobiološke ispravnosti keksa,
 - određivanje sadržaja antocijana, ukupnih rastorljivih polifenola i antioksidativnog potencijala keksa,
 - ispitivanje senzorskih i teksturnih karakteristika keksa
- 5) Usporedni prikaz nutritivnog profila komercijalno dostupnih bezglutenskih vrsta keksa, keksova od celih zrna žitarica sa dodatkom borovnice i/ili maline i optimalnog keksa kreiranog u ovoj studiji i sagledavanje doprinosa konzumiranja novokreiranog proizvoda preporučenim dnevnim potrebama za nutrijentima
- 6) Ispitivanje zdravstvenih efekata kreiranog bezglutenskog keksa u okviru dijetetske interventne studije.

2. OPŠTI DEO

2.1. PREOSETLJIVOST NA HRANU

Mnogobrojna istraživanja u današnje vreme ukazuju na povećanu učestalost pojave alergija i intolerancija na hranu. Oko 2% odraslih širom sveta ima neki oblik reakcije preosetljivosti na hranu, koji se manifestuje nepredviđenim kliničkim odgovorom (Čučković, 2014). Reakcije preosetljivosti mogu biti imunološki posredovane i nazivaju se alergijom, dok se neimunološki posredovane reakcije preosetljivosti definišu kao intolerancija (Brostoff i sar., 1991). Kod alergije na hranu reč je o IgE-posredovanom imunom mehanizmu i karakteriše je brza uzročno-posledična reakcija. Sastojci hrane odgovorni za alergijske reakcije najčešće su proteinske prirode. Najčešći alergeni hrane, odgovorni za do 90% svih alergijskih reakcija su proteini kravljeg mleka, jaja, kikirikija, pšenice, soje, ribe, školjki i proteini koštunjavog voća (Sicherer i Sampson, 2006). Alergijske reakcije variraju između subjekata i zavise od stepena njihove izloženosti, i kreću se od blagih (osip), do reakcija opasnih po život (anafilaktički šok). Intolerancija na hranu odnosi se na bilo koju neželjenu reakciju, bez obzira na mehanizam. U poređenju sa alergijama, intoleranciju karakterišu manje jasne manifestacije, nekada i veoma teško uočljive, pa je ovaj vid reakcija preosetljivosti mnogo teže dijagnostifikovati. Postoji više vrsta intolerancije na hranu kao što su: enzimska, farmakološka i intolerancija neidentifikovanog mehanizma nastanka. Enzimska intolerancija podrazumeva deficit nekog enzima u probavnom traktu kao što je na

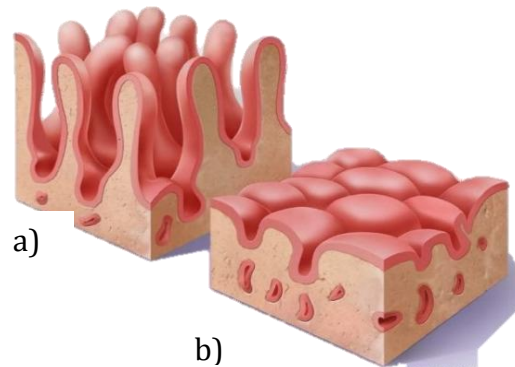
primer laktaza, enzim odgovoran za razgradnju laktoze na glukozu i galaktozu. Kod intolerancije na laktozu postoji nekoliko mogućih mehanizama koji uzrokuju simptome intolerancije, a manifestacije svojstvene za ovaj tip intolerancije uglavnom su lokalizovane i vezane za probleme u digestivnom traktu. Intenzitet simptoma zavisi od količine unete laktoze, stepena nedostatka laktaze, ali i oblika hrane u kojem se laktoza konzumira (Tonković i sar., 2012). Farmakološka intolerancija na hranu uzrokovana je vazoaktivnim aminima ili drugim sastojcima hrane koji pokazuju farmakološku aktivnost. U većini slučajeva ovaj tip intolerancije je zavisn od doze unete u organizam, a tipičan primer je intolerancija na histamin koja nastaje usled smanjene ili nedovoljne razgradnje histamina posredstvom enzima diamin oksidaze (DAO). Povećan rizik od histaminom posredovane intolerancije javlja se kod ljudi sa sniženom aktivnošću DAO i/ili povećanom permeabilnošću creva. Kod zdravih osoba, ingestija većih količina histamina ne dovodi do poteškoća, jer je ovaj enzim u stanju da brzo razgradi histamin unet putem hrane.

2.2. CELIJAKIJA

Celijakija ili gluten senzitivna enteropatija je doživotna bolest autoimune etiologije koju karakteriše intolerancija organizma na prolaminske frakcije glutena – glijadin iz pšenice, hordein iz ječma i sekalin iz raži. Uloga avenina, prolamina prisutnog u ovsu, u razvoju ovog oboljenja još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Ranije studije (Baker i Read, 1976; Dicke i sar., 1953; Moulton, 1959) ukazivale su da prolaminske frakcije ovsu takođe izazivaju gorenavedene simptome, dok neke studije novijeg datuma ukazuju na mogućnost bezbednog konzumiranja ove žitarice u umerenim količinama kod pacijenata sa intolerancijom na gluten (Picarelli i sar., 2001; Størsrud i sar., 2003; Tapsas i sar., 2014). Budući da se uzgajanje, skladištenje i transport ove žitarice često ukršta sa žitaricama koje sadrže gluten, postoje veliki rizici od kontaminacije, pa bi, prema novijim saznanjima, to bio glavni razlog za eliminisanje ovsu iz bezglutenske ishrane (Zannini i sar., 2012). Prema regulativi evropske komisije (EC No. 41/2009) ovas je uvršten u listu namirnica dozvoljenih u ishrani obolelih od celijakije, uz uslov da je sadržaj glutena u njemu manji od 20 ppm (mg/kg).

Celijakija se javlja kod osetljivih, genetski predisponiranih osoba, a manifestuje se različitim stepenom morfološkog i funkcionalnog oštećenja sluznice tankog creva. Uz promene izgleda sluznice creva, značajno se smanjuje visina enterocita, koji postaju kubičasti (normalno su cilindrični) (Slika 1). U klasičnoj kliničkoj slici celijačne bolesti

dominiraju gastrointestinalni simptomi kao što su dijareja, digestivne smetnje, bolovi i abdominalna distenzija. Krajnji ishod u slučaju nelečenja ove bolesti mogu biti potpuna atrofija crevnih resica i malapsorpcija. Malapsorpcijski sindrom nastaje ukoliko se bolest ne dijagnostifikuje duže vreme, a dovodi do različitih sistemskih komplikacija. Kod dece se javlja zaostajanje u telesnom rastu i razvoju, nastaje deficit minerala i vitamina, dok kod odraslih osoba nastaje čitav niz metaboličkih, endokrinih, mišićno-koštanih i drugih problema.

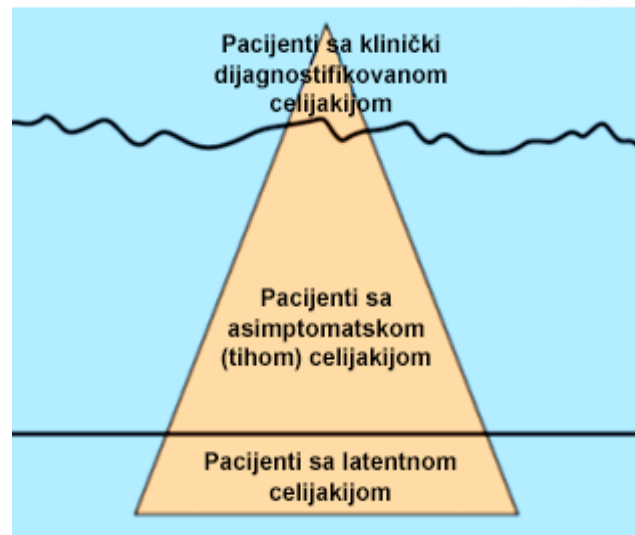


Slika 1. Izgled crevnih resica: a) zdrave osobe (cilindričan oblik); b) osobe sa neprepoznom/nelečenom celijakijom (kubičast oblik)

http://www.meridius.rs/o_celijakiji.html

Atipična forma ove bolesti poslednjih godina je u porastu (Celiloglu i sar., 2011). Karakterišu je odsustvo ili slab intenzitet gastrointestinalnih simptoma, izražene ekstraintestinalne manifestacije kao što su anemija, osteoporoza, neurološki problemi i neplodnost. Celijakija se stoga može smatrati ne samo oboljenjem gastrointestinalnog trakta, već i ozbiljnom multisistemskom bolešću. Celijakija je danas jedna od najzastupljenijih genetski predisponiranih bolesti čija je učestalost pojave u svetskoj populaciji oko 1% (Gujral i sar., 2012). Prevalenca ove bolesti slikovito je opisana tzv. *Iceberg* modelom (Slika 2) koji prikazuje kategorizaciju i udeo pojedinih oblika celijakije (Feighery i sar., 1999).

Ovakva kategorizacija ukazuje na to da je procenat klinički dijagnostifikovanih pacijenata mali, što objašnjava dugogodišnje netačne procene o prevalenci ove bolesti. Prema ovom modelu udeo pacijenata sa tzv. asimptomatskom (tihom) bolešću je najveći. Kod ove grupe pacijenata postoje serološke i patohistološke promene tipične za celijakiju, ali su simptomi slabo izraženi, pa se bolest najčešće dijagnostifikuje prilikom rutinskih sistematskih pregleda (Tomašić i Lerotić, 2013). Latentna celijakija se karakteriše normalnom mukoznom strukturom tankog creva, ali se dužim konzumiranjem hrane koja sadrži gluten direktno javlja atrofija crevnih resica (Kaukinen i sar., 2007).



Slika 2. *Iceberg* model – prikaz prevalence celijakije (Feighery i sar., 1999)

Celijakija je veoma specifično oboljenje. Može se javiti u bilo kojoj životnoj dobi i ukoliko se ne leči mogu nastupiti teške komplikacije. Izostanak pravovremenog lečenja, koje podrazumeva striktnu dijetu bez glutena, olakšava pojavu drugih oboljenja kojima su osobe sa celijakijom genetski sklone: maligna oboljenja digestivnog trakta, osteoporoza i diabetes melitus (Ciclitira i sar., 2005). Dijagnostifikacija ove bolesti podrazumeva biopsiju sluznice tankog creva i serološke testove (Di Sabatino i Roberto, 2009).

Striktno poštovanje principa bezglutenske ishrane dovodi do nestanka simptoma bolesti – postepenog oporavka sluznica tankog creva i poboljšanja opšteg stanja organizma. Ova činjenica dodatno doprinosi značaju svesti o važnosti svih činioca u lancu proizvodnje hrane bez glutena, ali i svesti samih pacijenata o rizicima koje nosi nameran ili nenameran unos glutena. Pravilno deklarisanje ovih proizvoda, njihovo adekvatno skladištenje, čuvanje i kontrola, od izuzetnog su značaja za normalan život osoba sa intolerancijom na gluten.

2.3. BEZGLUTENSKA ISHRANA

Sprovođenje bezglutenske ishrane otežava činjenica da se gluten nalazi „skriven“ u mnogim prehrambenim proizvodima, poput proizvoda od mesa, mlečnih i konditorskih proizvoda, ali i u mnogim dijetetskim suplementima i lekovima. Hrana za osobe intolerantne na gluten stoga mora biti pripremljena sa posebnom pažnjom i u skladu sa dobrom proizvođačkom praksom, kako bi se izbegla kontaminacija glutenom. Prema

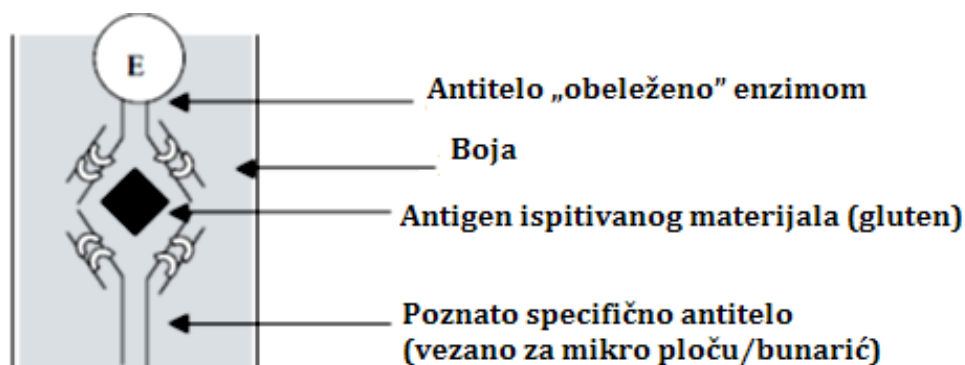
Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda (Sl. glasnik RS br. 45/10) oznaku "bez glutena" mogu nositi namirnice koje sadrže manje od 20 mg/kg glutena, dok oznaku "veoma nizak sadržaj glutena" mogu nositi namirnice koje sadrže manje od 100 mg/kg glutena. Pravilno deklarisanje ovih proizvoda od velikog je značaja i podrazumeva isticanje oznake "bez glutena" ili "sa veoma niskim sadržaj glutena" u neposrednoj blizini naziva namirnice.

Sirovine koje po svom prirodnom sastavu ne sadrže gluten, takođe mogu biti kontaminirane, a rotacija useva, žetva, transport, skladištenje, proces prerade i proizvodnje, ključne su tačke rizika za kontaminaciju. Upravo zbog ovih faktora rizika, posebnu pažnju treba obratiti i analizirati na sadržaj glutena žitarice koje ga prirodno ne sadrže, pseudocerealijske i njihove proizvode.

2.3.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA GLUTENA U NAMIRNICAMA

Prema preporuci američke agencije za hranu i lekove (FDA) i svetske zdravstvene organizacije (WHO) revidirani Codex Alimentarius (118/1979, amm. 1983, rev. 2008) apostrofira imunoenzimske (ELISA) metode, koje koriste R5 monoklonalna antitela, kao najpogodnije za detekciju glutena u namirnicama, s obzirom na njihovu izuzetno visoku osetljivost i specifičnost. Monoklonalna R5 antitela, prvobitno sintetisana za reakciju sa sekalinom, pokazala su isti stepen reaktivnosti sa gliadinom i hordeinom (Van Eckert i sar., 2010). Reaguju uglavnom sa onim fragmentima prolamina koji su direktno odgovorni za stimulaciju T-ćelija mukoze tankog creva (Spirić i sar., 2010).

U osnovi ELISA tehnike postoje dve reakcije: imunološka (reakcija antigena i antitela) i hemijska (reakcija enzima i supstrata). Imunološka reakcija nije vidljiva, dok u hemijskoj reakciji dolazi do bojenja bezbojnog supstrata, čime se omogućava detekcija ispitivanog analita. Za određivanje saržaja glutena u namirnicama najčešće se primanjuje tzv. „sendvič“ tip ELISA tehnike koja se sastoji iz nekoliko faza (Slika 3).



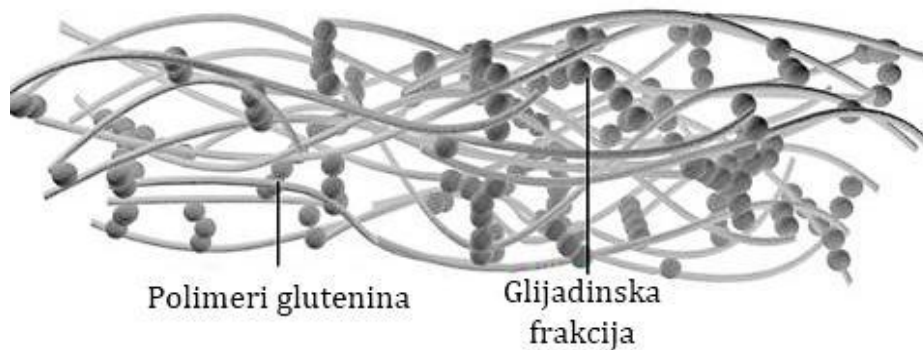
Slika 3. Šematski prikaz „sendvič“ ELISA tehnike (Đurišić i sar., 2003)

Reakcija počinje vezivanjem antigena (gluten iz uzorka/standarda) za specifično antitelo koje se nalazi na površini mikro ploče (bunarića). Dodatkom konjugata koga čine specifična antitela „obeležena” enzimom, ona se vezuju za ispitujući antigen (gluten). Do pojave boje, koja ukazuje na pozitivan nalaz, dolazi nakon dodatka supstrata, koji sa enzimom stupa u reakciju. Intenzitet razvijene boje proporcionalan je količini prisutnog antigena u materijalu koji se ispituje (Đurišić i sar., 2003).

2.3.2. STRUKTURA GLUTENA I NJEGOVA ULOGA U TESTU

Sadržaj proteina i njihova struktura najvažniji su faktori koji određuju, kako kvalitet brašna, tako i finalnog proizvoda (Unbehend i sar., 2003). Proteini pšenice bili su među prvim proučavanim proteinima, a početkom 20. veka Osborne je izveo klasifikaciju zasnovanu na njihovoj rastvorljivosti (Gianibelli i sar., 2001). Prema ovoj klasifikaciji proteini žitarica se dele na: albumine (rastvorljive u vodi i razblaženim rastvorima soli), globuline (rastvorljive u razblaženim rastvorima soli), glijadine (rastvorljive u vodenom rastvoru etanola) i glutenine (rastvorljive u razblaženim rastvorima kiselina ili baza). U proteinskoj frakciji pšeničnog brašna dominiraju proteini glutenskog kompleksa (glijadini i glutenini), koji čine 80% od ukupnih proteina (Shomer i sar., 1998). Ovi proteini imaju odlučujuću ulogu u proizvodnji i doprinose kvalitetnim atributima proizvoda iz kategorije pekarskih, finih pekarskih, testenina i srodnih proizvoda.

Tokom mešanja brašna sa vodom, dolazi do hidratacije proteina brašna i formiranja glutenskog kompleksa – mrežaste strukture (Slika 4) koja je stabilizovana disulfidnim vezama, vodoničnim vezama i hidrofobnim interakcijama (Chiang i sar., 2006). Karakteristična glutenska struktura obrazuje se u toku mešanja testa i to u nekoliko faza. Na početku mešanja dugački polimerni lanci glutenina međusobno su isprepletani i nasumično orijentisani. Kako se mešenje nastavlja, lanci glutenina se orijentišu u pravcu sila smicanja i istezanja i formira se struktura glutena, umrežena intermolekulskim kovalentnim disulfidnim vezama. Pri optimalnom razvoju testa interakcije između umreženih polimera su jake i takvo testo ispoljava maksimalni otpor na deformaciju. Mešenjem testa nakon njegovog optimuma razvoja, dolazi do raskidanja disulfidnih veza i glutenini postaju depolimerizovani, a testo lepljivo usled prisustva kraćih lanaca (Letang i sar., 1999). Upravo ovi procesi koji se dešavaju tokom procesa mešanja testa, odgovorni su za njegovu rastegljivost i elastičnost, sposobnost zadržavanja gasa i druge važne aspekte tehnološkog kvaliteta proizvoda.



Slika 4. Prikaz strukture glutena (Miguel i sar., 2013;
<http://dx.doi.org/10.5772/53168>)

Obe frakcije glutena od izuzetne su važnosti za reološke osobine testa: gluteninska frakcija doprinosi viskoelastičnim osobinama, dok glijadinska frakcija obezbeđuje jačinu i elastičnost testa, ostvarujući nekovalentne veze, kako međusobno tako i sa polimerima glutenina (Manu i Rao, 2008; Pérez i sar., 2005; Shewry i Tatham, 1997).

Imajući u vidu gorenavedene činjenice jasno je da se “eliminisanjem” glutena iz proizvoda na bazi žita, eliminiše zapravo glavna komponenta odgovorna za njihovu strukturu, pa sa tehnološkog aspekta, kreiranje bezglutenskih proizvoda iz ove kategorije predstavlja veliki izazov. Odsustvo glutena u proizvodima na bazi žita značajno utiče na reologiju testa. Bezglutensko testo je manje kohezivno i elastično u poređenju sa testom koje sadrži gluten, teško je za oblikovanje, lepljivo i retko, a u postupku odležavanja i narastanja slabije se zadržava ugljen dioksid, što rezultira manjom zapreminom krajnjeg proizvoda (Matos i Rosell, 2015). Nedostatak glutena otežava sam tehnološki postupak proizvodnje, dok gotov proizvod ima niz kvalitetnih nedostataka kao što su mrvljiva struktura, slab intezitet boje i suv/peskovit osećaj u ustima prilikom konzumiranja (Houben i sar., 2012). Po senzorskim i tehnološkim parametrima kvaliteta, bezglutenski proizvodi na bazi žita značajno se razlikuju od sličnih proizvoda namenjenih zdravoj populaciji.

2.3.3. SIROVINE ZA PROIZVODNJU BEZGLUTENSKIH PROIZVODA

2.3.3.1. Bezglutenska brašna i skrobovi

Kao zamena za pšenično i druga brašna koja sadrže gluten, u formulacijama bezglutenskih proizvoda najčešće se koriste brašna bogata skrobom, poput kukuruznog i pirinčanog. Za razliku od pseudocerealijskih, koje se u bezglutenske proizvode dodaju isključivo u formi brašna, pirinač i kukuruz se primenjuju i u vidu nativnih skrobova i njihovih modifikata.

U testu koje sadrži skrob, od ključnog značaja u procesu pečenja je njegova osobina da želira. Pri termičkom tretmanu dolazi do bubrenja granula skroba, povećanja njihove zapremine i promene mehaničkih svojstava. Hlađenjem ovakvog sistema, usled povezivanja amiloze i amilopektina vodoničnim vezama obrazuje se trodimenzionalna strukturu i formira se gel (Witczak i sar., 2016). Vrsta skroba, sadržaj amiloze, veličina i oblik granula, najznačajniji su faktori koji utiču na bubrenje i želiranje skroba. Od nativnih skrobova, najveću sposobnost vezivanja vode pokazuje krompirov, dok su kukuruzni i pirinčani značajno slabiji u pogledu sposobnosti bubrenja (Witczak i sar., 2016). Nativni skrobovi podložni su procesu retrogradacije koja rezultira lošijim osobinama krajnjeg proizvoda, tako da su sve češće u upotrebi modifikati skroba, kreirani tako da koriguju jedan ili više nedostataka nativnog skroba, a osnovno poboljšanje odnosi se na njihovu sposobnost formiranja stabilnijih struktura (Singh i sar., 2007).

Kukuruzno i pirinčano brašno nalaze se u sastavu većine komercijalnih bezglutenskih smeša. Kukuruzno brašno uspešno se primenjuje u kreiranju bezglutenskih proizvoda, uz obavezan dodatak guma poput ksantana, kako bi se pri zamesu formirala neophodna mrežasta struktura i dobio zames adekvatne konzistencije i obradivosti (Zannini i sar., 2012). Zbog svog blagog ukusa, dobre svarljivosti i neutralne boje, pirinčano brašno se takođe upotrebljava kao sastojak bezglutenskih proizvoda (Kadan i sar., 2011). Ipak, proizvodi poput hleba, sa udelom pirinčanog brašna preko 10% nisu zadovoljavajućih teksturnih svojstava, pa se ovaj nivo supstitucije uzima najčešće kao gornja granica za dodatak pirinčanog brašna (Gujral i Rosell, 2004).

2.3.3.2. Hidrokoloide

Funkcija koju gluten ima u testu od pšeničnog brašna, kod bezglutenskih proizvoda nadomeštena je adekvantnim supstytutentima iz grupe aditiva, kao što su hidrokoloide. Oni predstavljaju heterogenu grupu polimera dugačkih lanaca koji imaju svojstvo da u vodi obrazuju viskozne disperzije i/ili gelove. Po hemijskom sastavu su uglavnom polisaharidi, a njihov afinitet prema molekulima vode uslovljen je prisustvom velikog broja hidroksilnih grupa u molekulu. Ova jedinjenja imaju osobinu da zadržavaju vodu, a u prehrambene proizvode se dodaju najčešće kao stabilizatori i ugušćivači. Različite vrste hidrokoloide dodaju se u bezglutenske proizvode u cilju povećanja sposobnosti retencije gasa, stabilizacije gela koji formira skrob i poboljšanja teksturnih svojstava

(Gallagher i sar., 2004). Njihova podela izvedena je na osnovu porekla i načina dobijanja (Houben i sar., 2012), a prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1. Klasifikacija hidrokoloida koji se primenjuju u bezglutenskim proizvodima

Grupa hidrokoloida	Naziv
Prirodni (biljnog porekla)	
Biljni eksudati	guma arabika, tragakant
Gume iz semena biljaka	guar guma, karuba
Ekstrakti morskih algi	
a) crvenih	agar, karagenan
b) mrkih	alginati
Hidrokoloide dobijeni ekstrakcijom iz biljnog materala	pektin, β -glukan
Sintetički	
Derivati celuloze	HPMC (hidroksipropilmetil celuloza), CMC (karboksimetil celuloza), MC (metil celuloza)
Mikrobiološki sintetisani hidrokoloide	ksantan guma

Značajan napredak u senzorskim i teksturnim svojstvima bezglutenskih hlebova, postignut je dodatkom hidrokoloida (Biliaderis i sar., 1997; Hüttner i sar., 2010; Lazaridou i sar., 2007). Danas se oni često nalaze u sastavu komercijalno dostupnih bezglutenskih smeša, čime se postiže značajno povećanje viskoziteta i stabilizacija testa usled smanjenja difuzije molekula vode (Houben i sar., 2012).

2.3.3.3. Proteini

Jedan deo naučnih studija, koje se bave kreiranjem i unapređenjem kvaliteta bezglutenskih proizvoda, fokusiran je na mogućnosti primene proteina iz različitih izvora (proteini mleka, albumini iz jaja, proteini soje) u funkciji supstituenata glutena. Srodnost hemijske strukture, sposobnost bubrenja i formiranja mrežastih struktura sličnih glutenskim, izdvaja proteine mleka i čini ih jednim od najzastupljenijih u bezglutenskim proizvodima. Različiti kvalitetni parametri proizvoda mogu se poboljšati zavisno od vrste dodatih mlečnih proteina (Houben i sar., 2012). Njihovim dodatkom smanjuje se lepljivost, kao jedan od najvećih nedostataka bezglutenskog testa, postiže se povećanje zapremine finalnog proizvoda i poboljšava tekstura, ukus i boja proizvoda

(Cocup i Sanderson, 1987). Takođe, u proizvodima poput hleba i peciva proteini mleka pokazali su pozitivan uticaj na održivost proizvoda (Kenny i sar., 2000). Nedostatak primene mlečnih proteina u bezglutenskim proizvodima može biti postojanje intolerancije na laktozu, koje se javlja kao prateće oboljenje kod jednog broja celijačno obolelih pacijenata (Houben i sar., 2012). U tom smislu, veliki potencijal u formulacijama bezglutenskih proizvoda pokazali su proteini biljnog porekla, poput proteina soje i leguminoza (Crockett i sar., 2011; Miñarro i sar., 2012).

2.3.3.4. Pseudocerealije

Mogućnost upotrebe pseudocerealija u ishrani osoba sa intolerancijom na gluten potiče od činjenice da u sastavu njihovih proteina dominiraju globulini i albumini, dok su prolaminske frakcije zastupljene u izuzetno malom procentu, ili uopšte nisu prisutne (Drzewiecki i sar., 2003; Gorinstein i sar., 2002). Najčešće korišćene biljke iz kategorije pseudocerealija su amarantus, kinoa i heljda. Njih karakterišu određene sličnosti sa žitaricama, a razlike potiču od same strukture, s obzirom da su pseudocerealije dikotiledone biljke.

Upotreba pseudocerealija u ishrani celijačno obolelih smatra se izuzetno korisnom sa nutritivnog aspekta, budući da su one bogat izvor deficitarnih nutrijenata. Prisustvo značajnog udela esencijalnih aminokiselina čini nutritivni profil proteina pseudocerealija visokokvalitetnim (Aubrecht i Biacs, 2001; Drzewiecki i sar., 2003). Tako je, na primer, sadržaj lizina u proteinima heljde približno dvostruko veći nego u proteinima pšenice (Sedej, 2011). Proteini pseudocerealija odlikuju se znatno većom bioraspoloživostu u odnosu na proteine žitarica, a određeni postupci prerade zrna mogu dodatno poboljšati njihovu svarljivost (Bressani, 1994; Gamel i sar., 2004; Koziol, 1992). Sa sadržajem prehrambenih vlakana u zrnu od 29,5%, heljda se izdvaja od ostalih pseudocerealija, kod kojih se ovaj sadržaj kreće od 14,2% (kinoa) do 20,6% (amarantus), što je sličan nivo onom koji se javlja kod žitarica (Alvarez-Jubete i sar., 2009a). Izuzetan sastav minerala pseudocerealija, znatno bolji u poređenju sa većinom žitarica, kao i činjenica da su njihova zrna bogata upravo mineralima deficitarnim u ishrani celijačno obolelih, još jedan je od razloga njihove učestale primene u formulacijama bezglutenskih proizvoda. Po sadržaju kalcijuma, magnezijuma i gvožđa izdvaja se amarantus, koji sadrži u proseku 3-5 puta veću količinu ovih minerala u odnosu na pšenicu (Alvarez-Jubete i sar., 2009a). Ovakav mineralni sastav pseudocerealija od velikog je značaja, posebno ako se uzme u obzir podatak o povećanoj učestalosti pojave osteopenije i osteoporoze kod celijačno obolelih pacijenata (Chand i

Mihas, 2006; Fasano i Catassi, 2001). I u pogledu sastava masnih kiselina, pseudocerealijske se izdvajaju u odnosu na većinu žitarica. Linolenska kiselina je najdominantnija i čini više od 50% ukupnih masnih kiselina zrna amarantusa i kinoe, dok je u heljdi prisutna u udelu od oko 35% (Alvarez-Jubete i sar., 2009a, Bonafaccia i sar., 2003). Takođe, pseudocerealijske odlikuje i prisustvo značajne količine α -linolenske kiseline, koja se u mnogim studijama dovodi u vezu sa smanjenjem rizika od kardiovaskularnih i autoimunih oboljenja, kancera i osteoporoze (Simopoulos, 2001). Zahvaljujući prisustvu značajne količine polifenolnih jedinjenja (Dini i sar., 2004; Gallardo i sar., 2006), niskom glikemijskom indeksu (Berti i sar., 2004; Skrabanja i sar., 2001), kao i svim gorepomenutim nutritivnim karakteristikama, pseudocerealijske spadaju među funkcionalno najpotentnije sastojke bezglutenskih proizvoda. Ustanovljeno je da njihov dodatak doprinosi značajno boljim senzorskim osobinama, posebno proizvoda na bazi žita. Naime, skrobna brašna uzrokuju peskovit i suv osećaj pri konzumiranju, dok se dodatak pseudocerealijske vezuje za puniji ukus i aromu proizvoda.

2.3.4. BEZGLUTENSKI PROIZVODI NA BAZI ŽITA

Poslednjih decenija u razvijenim zemljama postoji trend širenja tržišta bezglutenskih proizvoda, koji je nastao iz opsežnih studija o povećanoj prevalenci ove bolesti (Gallager i sar., 2004). Vrednost tržišta bezglutenskih proizvoda u SAD u 2015. godini procenjen je na oko 1,6 milijardi dolara (Nijeboer i sar., 2013), dok je ova vrednost na globalnom nivou bila oko 6 milijardi dolara. Od ukupnog tržišta ovih proizvoda, 46% čine pekarski i konditorski proizvodi (Witczak i sar., 2016).

Srbija i zemlje u regionu još uvek nemaju u prodaji dovoljan broj raznovrsnih proizvoda i sirovina namenjenih osobama sa intolerancijom na gluten, a najveći deo asortimana čine proizvodi iz uvoza. Proizvođači bezglutenske hrane u našoj zemlji susreću se sa brojnim problemima koji otežavaju poštovanje rigoroznih zahteva u njihovoj proizvodnji, a najveći problem predstavlja nabavka osnovnih sirovina koje nisu kontaminirane glutenom. Ovo se posebno odnosi na proizvode iz kategorije pekarskih i finih pekarskih proizvoda, koji su sa velikim udelom zastupljeni u ishrani, a u čijoj osnovi se nalaze sirovine, koje su, s obzirom na uslove uzgoja, transporta i skladištenja, veoma podložne kontaminaciji. Neophodnost postojanja celokupne opreme i prostora namenski kreiranih za proizvodnju bezglutenskih proizvoda, tehnološki aspekt same proizvodnje, ali i već pomenuti problemi sa nabavkom sirovina, neki su od razloga za siromašan asortiman domaćih bezglutenskih proizvoda u Srbiji.

Uprkos savremenim dostignućima u kreiranju bezglutenskih proizvoda, zamena glutena u proizvodima na bazi žita, kao što su hleb, peciva, keks i testenina, i dalje predstavlja veliki tehnološki izazov (Gallagher i sar., 2004). Mogućnosti unapređenja kvaliteta i tehnoloških karakteristika bezglutenskih proizvoda detaljno su ispitivane u naučnoj literaturi, a najveći broj publikacija odnosi se na različite formulacije bezglutenskog hleba (Houben i sar., 2012; Matos i Rosell, 2015).

Istraživanja na polju kreiranja različitih vrsta bezglutenskog hleba mogu se svrstati u dve celine – studije bazirane na unapređenju nutritivnog i funkcionalnog profila (Alvarez-Jubete i sar., 2010b; Brites i sar., 2010; Cornejo i sar., 2015; Kim i Yokoyama, 2011; Torbica i sar., 2010; Wronkowska i sar., 2010) i studije zasnovane na poboljšanju tehnološkog kvaliteta i otklanjanju kvalitetnih nedostataka hleba, koji su posledica odsustva glutena (Capriles i sar., 2013; Martínez i sar., 2014). Imajući u vidu učestalost konzumiranja hleba i deficite određenih nutrijenata u ishrani celijačno obolelih, brojnost studija koje se bave nutritivnim aspektom ovog proizvoda potpuno je u saglasnosti sa trendovima uvođenja koncepta funkcionalne hrane, kao modela za unapređenje zdravlja ljudi.

U ishrani obolelih od celijakije najzastupljenija namirnica iz kategorije finih pekarskih proizvoda je keks, pa je stoga njegov kvalitet, kako nutritivni, tako i senzorski, od velike važnosti. Na tržištu naše zemlje asortiman bezglutenskih vrsta keksa uglavnom je baziran na korišćenju pirinčanog i kukuruznog brašna (umesto pšeničnog), skrobova različitog porekla, dok je funkcija koju gluten ima u testu od pšeničnog brašna, kod ovih proizvoda nadomeštena adekvantnim supstancijama iz grupe aditiva, kao što su hidrokoloidi. Postoje komercijalno dostupne bezglutenske smeše za keks, koje se, zajedno sa ostalim komponentama, koriste u njegovoj proizvodnji. Istraživanja novijeg datuma o ulozi skrobova i proteina u formulaciji bezglutenskog keksa ukazuju na potencijalne pravce daljeg razvoja gotovih smeša za bezglutenski keks. Mancebo i saradnici (2016) utvrdili su da se dodatkom proteina značajno menjaju reološke osobine testa u pravcu postizanja bolje konzistencije, što čini testo lakšim za oblikovanje i može biti od značaja u industrijskim uslovima proizvodnje.

Kako u savremenom društvu postoji veliko interesovanje potrošača za funkcionalnom hranom, širenje asortimana keksa usmereno je ka kreiranju proizvoda sa funkcionalnim svojstvima, što se najčešće postiže primenom brašna od celih zrna žitarica. Kada su u pitanju proizvodi namenjeni osobama sa intolerancijom na gluten, odabir nutritivno vrednih komponenata koje ne sadrže gluten i njihova primena u formulacijama bezglutenskog keksa, sa ciljem poboljšanja funkcionalnih svojstava,

aktuelna je tema u naučnoj literaturi. Najveći broj istraživanja zasniva se na primeni brašna amarantusa (de la Barca i sar., 2010; Gambuš i sar., 2009; Schoenlechner i sar., 2006) i heljde (Gambuš i sar., 2009; Hadnađev i sar., 2013; Kaur i sar., 2015) samih ili u kombinaciji sa pirinčanim, kukuruznim i drugim bezglutenskim vrstama brašna. Ipak, broj komercijalno dostupnih nutritivno obogaćenih vrsta bezglutenskog keksa je mali, pa bi budući pravci razvoja ove kategorije finih pekarskih proizvoda, trebali da budu bazirani upravo na njihovom funkcionalnom obogaćivanju.

2.3.5. NUTRITIVNI ASPEKT BEZGLUTENSKIH PROIZVODA

Žitarice kao glavni sastojci pekarskih, finih pekarskih proizvoda, testenina i srodnih proizvoda, u značajnom udelu učestvuju u zadovoljenju dnevnih potreba za energijom, mikronutrijentima i ugljenim hidratima (Whitton i sar., 2011). S obzirom na njihovo odsustvo u bezglutenskim proizvodima i činjenicu da bezglutenska brašna i skrobovi nisu dodatno obogaćeni nutrijentima, brašneno-konditorski proizvodi bez glutena znatno su slabijeg nutritivnog sastava u poređenju sa proizvodima namenjenim zdravoj populaciji (Gallager, 2008). Iako obezbeđuju dovoljan unos energije, bezglutenski brašneno-konditorski proizvodi su deficitarni po pitanju sadržaja vitamina B grupe, folata, gvožđa i prehrambenih vlakana (Thompson, 1999; Thompson, 2000). Generalno, celokupnu ishranu celijačno obolelih odlikuje smanjen unos vitamina, prehrambenih vlakana, kalcijuma, magnezijuma i gvožđa (Hallert i sar., 2002; Hopman i sar., 2006; Thompson i sar., 2005), kao i znatno lošiji balans makronutrijenata u poređenju sa ishranom zdravih ljudi (Bardella i sar., 2000). Od makronutrijenata u bezglutenskoj ishrani dominiraju masti, dok su ugljeni hidrati zastupljeni u znatno manjem procentu (Bardella i sar., 2000).

U cilju unapređenja nutritivnog profila i funkcionalnosti, sastojci poput prehrambenih vlakana, proteina i mikronutrijenata, već neko vreme se uspešno primenjuju u formulacijama različitih bezglutenskih proizvoda. Najveći broj studija odnosi se na obogaćivanje ovih proizvoda prehrambenim vlaknima, a izvori ovih važnih nutrijenata su veoma raznoliki i kreću se od vlakana iz kukuruza (Sabanis i sar., 2009), pseudocerealija (Alvarez-Jubete i sar., 2009a, 2009b, 2010a), preko bioaktivnih polisaharida kao što je inulin (Korus i sar., 2006) i rezistentni skrob (Korus i sar., 2009), do vlakana iz sporednih proizvoda industrijske prerade voća (Korus i sar., 2012; O'Shea i sar., 2013). Osim poboljšanja nutritivnog profila, dodatkom prehrambenih vlakana postiže se poboljšanje teksturnih i senzorskih svojstava, a produžava se i održivost bezglutenskih proizvoda (Phimolsiripol i sar., 2012).

2.3.6. NOVI PRAVCI U KREIRANJU BEZGLUTENSKIH PROIZVODA

Sagledavajući dosadašnja naučna i tehnološka dostignuća u oblasti kreiranja bezglutenskih proizvoda, potencijalni pravci unapređenja ovog tržišta mogli bi se grupisati u nekoliko celina:

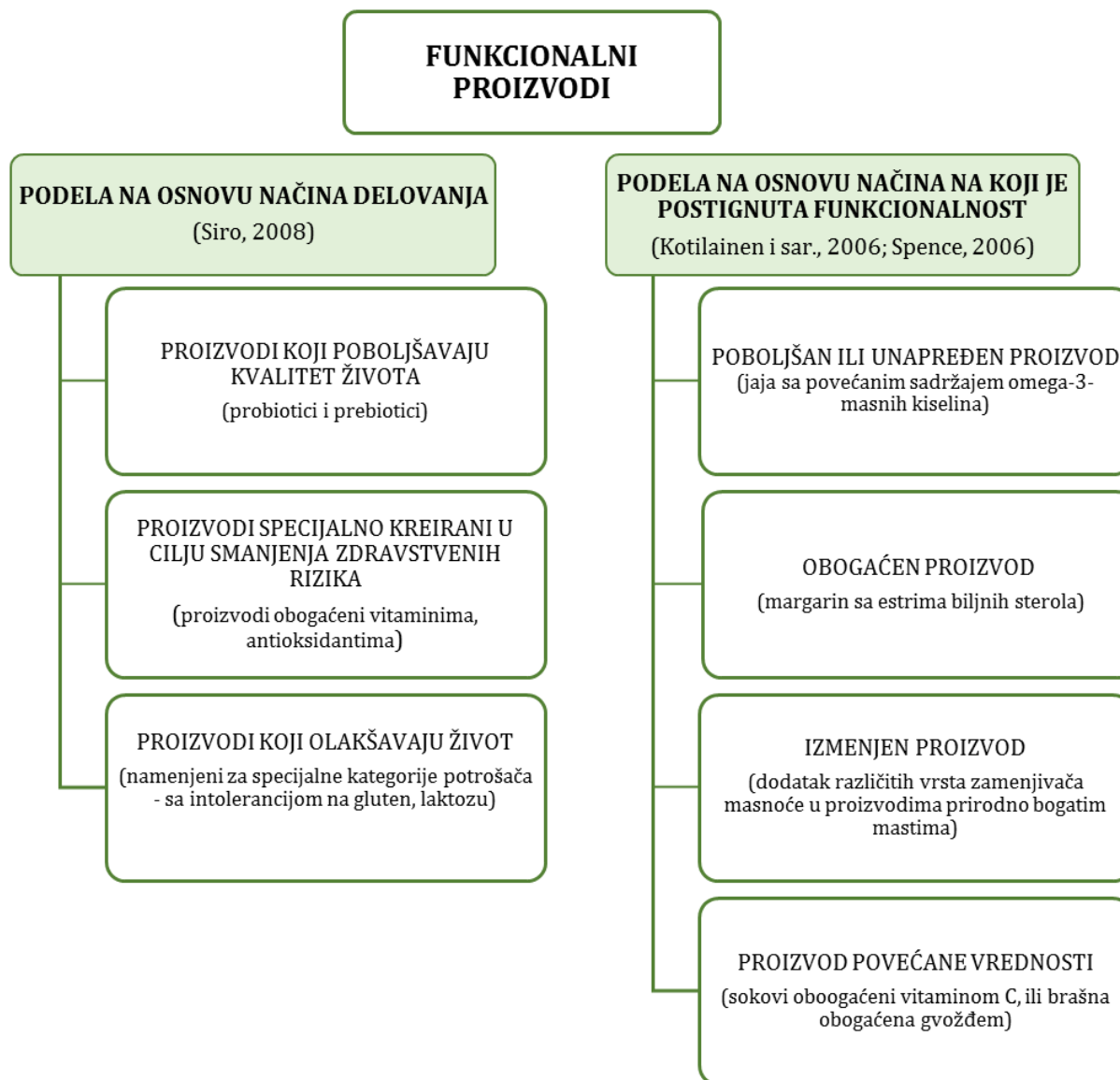
- pronalaženje novih izvora nutritivno vrednih jedinjenja iz prirodnih izvora kao što su sporedni proizvodi prerade voća i povrća,
- obogaćivanje komercijalno dostupnih smeša mikronutrijentima deficitarnim u ishrani celijačno obolelih,
- obogaćivanje proizvoda funkcionalno vrednim jedinjenjima koji doprinose poboljšanju opšteg zdravstvenog stanja (omega-3 masne kiseline, probiotici, fitosteroli),
- pronalaženje kombinacija sastojaka, kojim bi se poboljšala bioraspoloživost i apsorpcija nutrijenata unetih hranom, što je od posebnog značaja imajući u vidu da je malapsorpcija jedan od problema osoba sa intolerancijom na gluten,
- kreiranje proizvoda sa nižim glikemijskim indeksom kombinovanjem pogodnih sastojaka i odgovarajućih tehnoloških postupaka, imajući u vidu povećanu učestalost pojave dijabetesa tipa I kod osoba sa intolerancijom na gluten,
- optimizacija sastojaka u komercijalnim smešama, prvenstveno onih na bazi skroba, kombinovanjem različitih nativnih i modifikovanih skrobova, u cilju dobijanja što boljeg tehnološkog kvaliteta bezglutenskih proizvoda.

2.4. FUNKCIONALNA HRANA

2.4.1. DEFINICIJA I RAZVOJ KONCEPTA FUNKCIONALNE HRANE

Savremena naučna istraživanja daju brojne dokaze o povezanosti ishrane i zdravlja, čime se povećava interesovanje potrošača za funkcionalnom hranom, koja po definiciji obuhvata one namirnice za koje je dokazano da povoljno utiču na jednu ili više funkcija organizma, van okvira uobičajenih nutritivnih efekata i na način koji je značajan za opšte zdravstveno stanje ili za smanjenje rizika od nastanka bolesti. Ova definicija funkcionalne hrane usvojena je 1998. godine u koordinaciji sa *International Life Science Institute Europe* (ILSI Europe). Budući da se ovaj termin odnosi na jedan sveobuhvatni koncept, a ne specifično definisanu grupu prehrambenih proizvoda, postoji veći broj definicija funkcionalne hrane, ali je generalno prihvaćeno da se pojam funkcionalna

hrana odnosi na one namirnice koje imaju pozitivne efekte na zdravlje ljudi. Podela funkcionalnih proizvoda izvedena je na osnovu dva kriterijuma – aspekta njihovog delovanja i načina na koji je postignuta funkcionalnost (Slika 5).



Slika 5. Podela funkcionalnih proizvoda

Početak uvođenja koncepta funkcionalne hrane u praksu vezuje se uglavnom za fortifikaciju proizvoda ili nekih njihovih komponenata vitaminima, mineralima, mikronutrijentima poput omega-3 masnih kiselina, fitosterola i rastvorljivih vlakana, sa ciljem unapređenja zdravlja ljudi ili prevencije određenih bolesti (Sloan, 2000; Sloan 2002). Noviji pravci razvoja funkcionalnih proizvoda podrazumevaju kombinovanje više postupaka uvođenja funkcionalnih sastojaka, uz istovremeno eliminisanje i/ili smanjivanje količine sastojaka sa negativnim dejstvom, čime se postižu višestruki blagotvorni efekti po zdravlje ljudi (Sloan, 2004).

S obzirim da su nosioci funkcionalnosti brojni i veoma raznoliki, mogućnosti u osmišljavanju funkcionalne hrane su velike. Ipak, sa nutritivnog i zdravstvenog aspekta, najcelishodniji izbor su oni funkcionalni sastojci ili sirovine koji mogu da se upotrebe u nekoj formulaciji u dovoljno velikom udelu, pri čemu se ciljni proizvod učestalo konzumira. U tom smislu, proizvodima iz kategorije pekarskih i finih pekarskih proizvoda, kao i generalno proizvodima na bazi žita, pripada visoko pozicionirano mesto kada su u pitanju količine i učestalost konzumiranja, pa se ovi proizvodi smatraju izuzetno pogodnim za dodavanje funkcionalnih sastojaka.

Osnovni problem implementacije koncepta funkcionalne hrane u praksi jeste taj što razvoj ovih proizvoda predstavlja izuzetno složen i skup postupak, kome prethode sveobuhvatna ispitivanja na polju:

- identifikacije funkcionalnih jedinjenja i ispitivanja njihovih fizioloških efekata kroz klinička ispitivanja,
- pronalaženja adekvatnog matriksa za njihovo inkorporiranje i
- razvoja funkcionalnog proizvoda sa tehnološkog aspekta.

U plasiranju nekog proizvoda na tržište, glavni cilj jeste njegovo usaglašavanje sa zahtevima potrošača, što nije uvek lako obezbediti, posebno kada se on razlikuje od ustaljenih navika potrošača i njihovih očekivanja (Van Kleef i sar., 2002). U mnogim zemljama još uvek ne postoje zakonske regulative koje pokrivaju i definišu koncept funkcionalne hrane, zbog čega je prilično teško izvršiti procenu tržišta ovih proizvoda (Kotilainen i sar., 2006). Dostupni podaci ukazuju da Severna Amerika, Evropa i Japan, kao tri najdominantnija tržišta učestvuju sa preko 90% u ukupnoj prodaji funkcionalnih proizvoda (Benkouider, 2005). U Republici Srbiji, takođe, ne postoji posebna zakonska regulativa i nacionalni konsenzus za ovu grupu namirnica. Neke od njih mogu se svrstati u dijetetske proizvode prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda (Sl. glasnik RS br. 45/10).

2.4.2. FUNKCIONALNA JEDINJENJA

Funkcionalna jedinjenja su potencijalno korisni sastojci hrane, veoma raznoliki po svojoj strukturi, sa dokazanim pozitivnim zdravstvenim efektima, koji su posledica njihove biološke i fiziološke aktivnosti (Kruger i Mann, 2003). U funkcionalna jedinjenja ubrajaju se: polifenoli, prehrambena vlakna, karotenoidi, masne kiseline, biljni steroli, prebiotici i probiotici, fitoestrogeni, proteini soje, vitamini i minerali (IFICF, 2009).

Najveći broj funkcionalnih jedinjenja je biljnog porekla, a ova jedinjenja osnov su mnogih epidemioloških, *in vivo*, *in vitro* i kliničkih studija, koje ukazuju na povezanost ishrane bogate namirnicama biljnog porekla sa smanjenjem rizika od nastanka hroničnih oboljenja (Hasler, 2002). Najviše ispitivana funkcionalna jedinjenja su antioksidanti, koji osim pozitivnih zdravstvenih efekata imaju izuzetan tehnološki značaj, naročito u proizvodima sa visokim sadržajem masti, s obzirom na sposobnost sprečavanja ili usporavanja lipidne peroksidacije.

Ispitivanja funkcionalnosti neke grupe jedinjenja ili pojedinačnih predstavnika, izuzetno su opsežna i sastoje se iz: 1) analiza hemijskog sastava, strukture i toksičnosti; 2) ispitivanja na životinjama; 3) kliničkih/epidemioloških ispitivanja i 4) posebnih ispitivanja (interakcije sa hranom i lekovima) (Stajčić, 2012).

2.5. BOBIČASTO VOĆE KAO IZVOR FUNKCIONALNIH JEDINJENJA

Veliki broj savremenih studija ističe značaj konzumiranja voća u prevenciji bolesti, kao što su dijabetes, kancer, kardiovaskularna i neurodegenerativna oboljenja. Voćne vrste iz kategorije bobičastog voća se nalaze među najzastupljenijim u ljudskoj ishrani (Bazzano, 2005). Osim u svežem obliku, bobičasto voće se u značajnoj meri konzumira i kroz proizvode od voća, kao što su džemovi, sokovi, različiti drugi napici, sušeno i kandirano voće (Seeram, 2006). Sve veći trend u svetu ima i primena ekstrakata bobičastog voća u formulacijama različitih dijetetskih proizvoda i suplemenata, najčešće u kombinaciji sa ekstraktima lekovitog bilja.

Većina bobičastog voća pripada familijama Ericaceae i Rosaceae. Porodica vruševki, Ericaceae, obuhvata više od 1500 vrsta. Uglavnom su to drvenaste biljke, koje imaju oblik malih grmova, a borovnica (*Vaccinium* sp.) i brusnica (*Vaccinium macrocarpon*) su najpoznatiji predstavnici. Najrasprostranjenije voćne vrste, kako gajene, tako i divlje jesu biljke iz porodice ruža (Rosaceae), koja broji više od 3000 vrsta. Plodovi ovih biljaka veoma su raznolike građe, oblika i veličine, a mnoge samonikle vrste su kultivisane i danas se uspešno uzgajaju, najviše zbog specifičnog ukusa i izuzetnog nutritivnog sastava. Malina (*Rubus idaeus*), kupina (*Rubus* sp.) i jagoda (*Fragaria* L.) najvažniji su predstavnici ove porodice biljaka.

2.5.1. FITOHEMIKALIJE BOBIČASTOG VOĆA

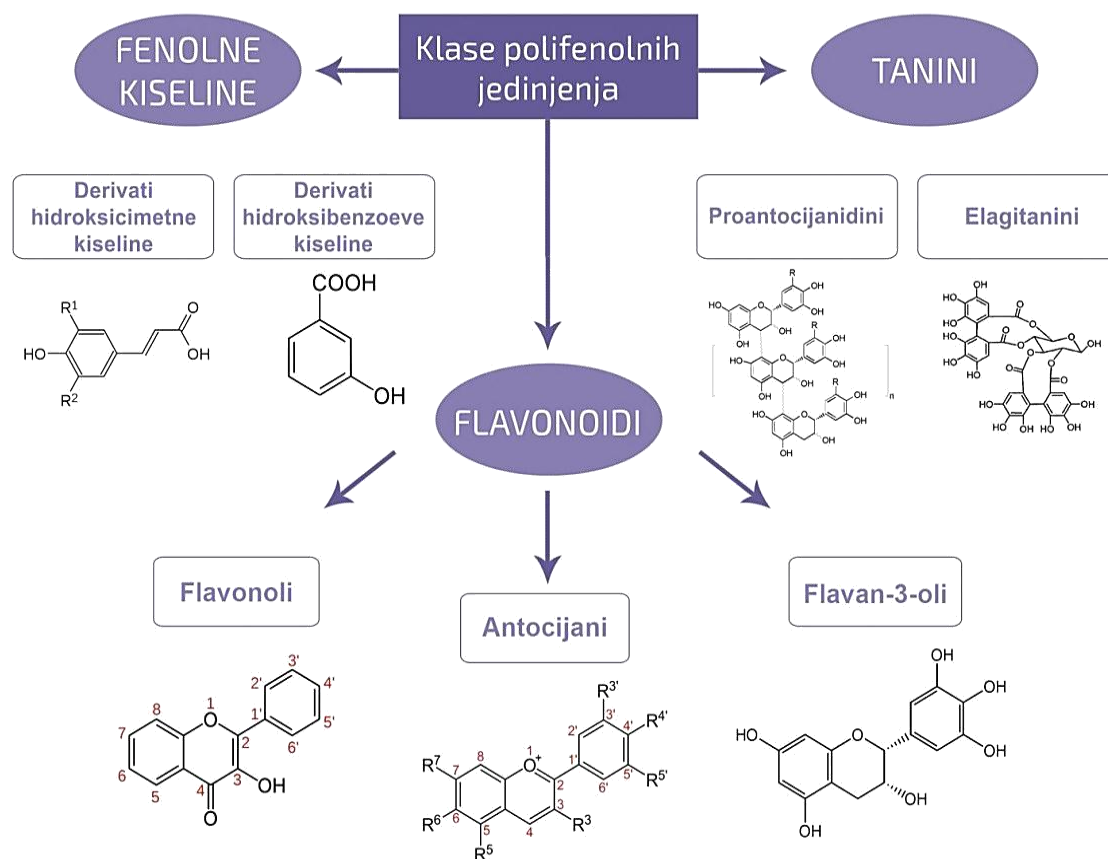
Fitohemikalije su supstance koje nisu esencijalni nutrijenti, ali se njihovim svakodnevnim unosom postižu pozitivni efekti po zdravlje ljudi (Liu, 2004). To su zapravo sekundarni metaboliti biljaka, koji ispoljavaju sledeća dejstva (Lampe, 1999):

- antioksidativnu aktivnost,
- modulaciju enzima koji učestvuju u detoksifikaciji,
- sprečavanje agregacije trombocita,
- promene u metabolizmu holesterola,
- kontrolu koncentracije steroidnih hormona i endokrinog metabolizma,
- redukciju krvnog pritiska,
- antibakterijsko i antivirusno dejstvo.

2.5.1.2. Polifenolna jedinjenja

Od fitohekalija prisutnih u bobičastom voću, najznačajnije mesto zauzimaju polifenolna jedinjenja, koja predstavljaju veliku i heterogenu grupu biološki aktivnih nenutrijenata. Polifenolna jedinjenja pokazuju snažno antioksidativno delovanje, zasnovano pre svega na njihovoj osobini da deluju kao redukujući agensi, „hvatači“ singletnog kiseonika, da otpuštaju vodonik i heliraju metale (Ivanova i sar., 2005). Na ovaj način polifenolna jedinjenja deluju protiv slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta, koji u povećanim koncentracijama mogu da dovedu do oštećenja ćelija i tkiva, uzrokujući brojna oboljenja (Nikolić i sar., 1998).

Polifenolna jedinjenja, iako veoma raznolika po svojoj strukturi, imaju zajedničku karakteristiku – prisustvo fenolnog jezgra kao osnovnog konstituenta. Najvažnija polifenolna jedinjenja bobičastog voća prikazana su na slici 6.



Slika 6. Klase najvažnijih polifenolnih jedinjenja bobičastog voća

Fenolne kiseline

Fenolne kiseline se sastoje od fenolnog jezgra i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzojeve kiseline) ili tri (derivati cimetne kiseline) ugljenikova atoma. Od fenolnih kiselina u bobičastom voću u najvećem udelu prisutne su *p*-kumarinska (porodica Ericaceae) i elaginska kiselina (porodica Rosaceae) (Häkkinen i sar., 1999; Hertog i Hollman, 1996). Ipak, ove kiseline se retko nalaze u slobodnom obliku, izuzev u vakuolama ili u kompleksu sa polisaharidima ćelijskog zida. Najčešće su prisutne u formi estara i glikozida.

Elaginska kiselina čini više od 50% ukupnih polifenolnih jedinjenja u jagodama i malinama (Häkkinen i sar., 1999) i jedno je od najviše proučavanih jedinjenja iz kategorije fenolnih kiselina. Antikancerogeno dejstvo ovog jedinjenja potvrđeno je brojnim *in vivo* i *in vitro* studijama (Akagi i sar., 1995; Juranić i sar., 2001; Khanduja i sar., 1999; Thiem i Berge, 2003), a u sinergizmu sa drugim konstituentima bobičastog voća pojačava se njeno antikancerogeno dejstvo (Bagchi i sar., 2004; Seeram i sar., 2004). Ovo jedinjenje pokazuje i antimutagena svojstva (Mertens-Talcott i sar., 2003; Narayanan i sar., 1999), što se pripisuje osobini da, vezivanjem za DNK i "hvatanjem"

reaktivnih kiseoničnih vrsta, sprečava oštećenja DNK. U bobičastom voću iz porodice Ericaceae dominiraju derivati hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska i kafena kiselina), a poseban značaj ima estar kafeine i kvinske kiseline – hlorogenska kiselina, koja je prisutna u najvećoj koncentraciji u plodu borovnice. Ovo jedinjenje pokazuje inhibitorno dejstvo u procesu karcinogeneze, posebno u slučaju kancera jetre i debelog creva (Cho i sar., 2010), deluje u prevenciji antioksidativnog stresa *in vivo* (Mori i sar., 1986; Tanaka i sar., 1993; Tsuchiya i sar., 1996), kao i u slučaju kardiovaskularnih oboljenja, snižavajući nivo ukupnog holesterola (Nardini i sar., 1995).

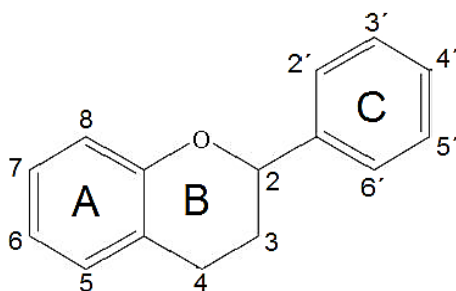
Tanini

Tanini biljaka se mogu podeliti u dve glavne grupe: hidrolizujuće tanine (estri galne i elaginske kiseline) i kondenzovane tanine (proantocijanidine), koji predstavljaju polikondenzovana jedinjenja velikih molekulskih masa. Termin kondenzovani tanini se u najvećem broju literaturnih navoda odnosi na oligomerne proantocijanidine (dimere, trimere, tetramere), iako se mogu naći tanini sa stepenom polikondenzacije 50 i više (Bravo, 1998). Oligomerni proantocijanidini su rastvorljivi u vodenim i organskim rastvaračima kao što su aceton, metanol i etilacetat, dok su oni velikih molekulskih masa nerastvorljivi. Nerastvorljivi su i oni tanini koji se nalaze u kompleksima sa proteinima ili polisaharidima u ćelijskom zidu.

Iz kategorije bobičastog voća, po sadržaju proantocijanidina sa visokim stepenom polimerizacije izdvaja se aronija, a u manjim koncentracijama ova jedinjenja se nalaze i u kupini (Nile i Park, 2014). Hidrolizujuće tanini prisutni su u značajnijim količinama u jagodi, malini i kupini (Shahidi i Naczka, 2004). U voću koje je bogato antocijanima tanini imaju značajnu ulogu u njihovoj stabilizaciji, delujući tako što formiraju kopolimere. Takođe, tanini su odgovorni za formiranje specifičnog oporog ukusa pojedinih vrsta voća i njihovih proizvoda.

Flavonoidi

Za determinaciju svih biljnih pigmenata koji imaju C₆-C₃-C₆ skelet, u kojima su dva benzenova prstena povezana preko C-3 jedinice (Slika 7), usvojen je termin "flavonoid", koga su 1952. godine predložili Geisman i Hinseinner.



Slika 7. Izgled C6-C3-C6 skeleta flavonoida

Raznovrsnost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija njihovih osnovnih struktura kao što su: dodatna hidroksilacija, O-metilacija hidroksilnih grupa, dimerizacija, glikozilacija hidroksilnih grupa (nastajanje O-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje C-glikozida). Pozitivni efekti flavonoida na zdravlje dokumentovani su u mnogim studijama (Hertog i sar., 1993; Hertog i sar., 1997; Knekt i sar., 1997; le Marchand i sar., 2000), a doprineli su naglom porastu upotrebe biljnih flavonoida kao konstituenata funkcionalne hrane.

Flavan-3-oli

Najznačajniji predstavnici ove grupe jedinjenja su katehin i epikatehin. Oni se u bobičastom voću mogu naći kako u svom monomernom obliku, tako i u formi dimera, trimera i polimera koji se nazivaju procijanidini. Po sadržaju katehina izdvaja se jagoda sa 2-9 mg katehina u 100 g svežeg ploda (Aaby i sar., 2005; Maatta-Riihinen i sar., 2004), dok je epikatehin prisutan u najvećoj koncentraciji u malini (2-5 mg/100g) i kupini (1-18 mg/100g) (Arts i sar., 2000; Määttä-Riihinen i sar., 2004). Flavanoli su pretežno zastupljeni u semenu bobičastog voća. Tako na primer seme kupine sadrži 4 puta veću koncentraciju epikatehina u poređenju sa celim plodom (Siriwoharn i sar., 2004 a,b).

Aktivnost fitohemikalija *in vivo* zavisi od njihove apsorpcije, intenziteta i načina njihovog metabolisanja u jetri i bubrezima i stepena njihove distribucije u tkivima. U tom smislu, utvrđeno je da se flavan-3-oli veoma efikasno apsorbuju iz gastrointestinalnog trakta u cirkulaciju, i to oko 37% od unete doze (Donovan i sar., 2002), što su značajno veće vrednosti procenta apsorpcije u poređenju sa flavanolima i antocijanima.

Flavonoli

Iz ove klase fenolnih jedinjenja u bobičastom voću najzastupljeniji su kvercetin, miricetin i kemferol (Häkkinen i sar., 1999). Ova tri jedinjenja se strukturno razlikuju po broju i poziciji OH grupa u B prstenu. Flavonoli se u biljkama nalaze u formi glikozida, a šećerna komponenta (najčešće glukoza i galaktoza) vezana je u C3 položaju B prstena. Borovnica se izdvaja od ostalih vrsta bobičastog voća po raznolikosti i brojnosti flavonola. Identifikovano je čak 14 derivata kvercetina, uključujući i acilovane forme sa kafenom kiselinom, a takođe su prisutni i derivati miricetina i kemferola (Zhao, 2007). Za razliku od ostalog bobičastog voća, kod koga se flavonoli nalaze u mezokarpu, u borovnici su oni prvenstveno zastupljeni u pokožici (egzokarpu), a tek u manjim količinama u ostatku ploda.

Flavonoli prisutni u bobičastom voću pokazali su inhibitorno delovanje na ciklooksigenazu i lipooksigenazu, enzime uključene u proces otpuštanja arahidonske kiseline, inicijatora inflamatornog odgovora u organizmu (Nijveldt i sar., 2001). U studiji koju su sprovedi Agullo i sar. (1994) utvrđeno je citotoksično dejstvo kvercetina na ćelije karcinoma creva, kao i njegova sposobnost da indukuje apoptozu i inhibira rast leukemičnih ćelija.

Antocijani

U sastavu polifenolnih jedinjenja bobičastog voća dominiraju antocijani, biljni pigmenti odgovorni za plavu, ljubičastu i crvenu boju različitih biljnih vrsta. Antocijani su podgrupa flavonoida koji nastaju kao metabolički produkti flavanona. Po strukturi, antocijani su glikozidi antocijanidina, a njihovu osnovnu strukturu čini 2-fenilbenzopirilijum ili flavilijum katjon (Bridle i Timberlake, 1997). Prema zastupljenosti u prirodi, izdvaja se šest antocijanidina: cijanidin (50%), pelargonidin, peonidin i delfinidin (12%), petunidin i malvidin (7%) (Castañeda-Ovando i sar., 2009). Razlike u antocijanima potiču od razlike u broju i poziciji hidroksilnih i/ili metil grupa, kao i od prirode, broja i mesta vezivanja šećerne komponente prisutne u njihovoj strukturi (Reque i sar., 2014).

Kod većine bobičastog voća utvrđena je pozitivna korelacija između antioksidativne aktivnosti i sadržaja antocijana (Castañeda-Ovando i sar., 2009). Antioksidativno delovanje antocijana dokazano je u raznim eksperimentalnim sistemima *in vitro*, što ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu u prevenciji bolesti povezanih sa oksidativnim stresom (Crozier i sar., 2010). Wang i sar. (1997) su utvrdili veću antioksidativnu aktivnost antocijana u poređenju sa antocijanidinima, ukazujući na pozitivan uticaj

prisustva šećerne komponente na aktivnost. Antocijanidini i antocijani pokazuju veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa vitaminima C i E. Ipak, jedan broj studija ukazuje na to da se antocijani pojavljuju u plazmi i izlučuju u urinu u daleko manjim količinama u odnosu na ostale flavonoide (McGhie i sar., 2003). Termin biološka raspoloživost odnosi se na *in vivo* količinu nekog molekula i njegovih metabolita koji se javljaju u cirkulaciji nakon unosa (Tumbas, 2010). Da bi se u cirkulaciji pojavila slobodna forma molekula ili nekog njegovog metabolita, neophodno je zasićenje metaboličkih puteva sa „farmakološkim“ dozama (Scalbert i Williamson, 2000). Slaba bioraspoloživost antocijana objašnjava se pre svega njihovom slabom resorpcijom, s obzirom da ne podležu hidrolizi pod uticajem β -glukozidaza, pa su kao takvi veliki da bi ušli u cirkulaciju (Nemeth i sar., 2003). Drugi faktor koji doprinosi maloj koncentraciji antocijana u humanim tečnostima je nizak pH, pri kojem se antocijani nalaze u obliku flavilijum katjona, pa su podložni strukturnim promenama (Clifford, 2000). Vrednosti pH koje su svojstvene tkivima i delu gastrointestinalnog trakta (pH oko 6), dodatno otežavaju identifikaciju i kvantifikaciju prisutnih antocijana, s obzirom na to da se pri ovim vrednostima oni nalaze u obliku halkona.

Antocijani se, kao sastojci prehrambenih proizvoda, dodaju sa ciljem poboljšanja različitih aspekata senzorskog kvaliteta, koriste kao zamena za sintetičke boje, a ova jedinjenja su značajna i po brojnosti boaktivnih svojstava koja poseduju. Podjednako značajan tehnološki i nutritivni aspekt primene antocijana doprinosi velikom interesovanju za: njihovo izolovanje, razvoj analitičkih metoda za identifikaciju i kvantifikaciju, ali i mogućnosti aplikacije u hrani i farmaceutskim proizvodima (Castañeda-Ovando i sar., 2009). Glavna ograničenja u primeni antocijana, kao alternative za veštačke pigmente, posledica su njihove nestabilnosti prema svetlosti i toploti i tendencije ka degradativnim reakcijama. Stoga je veliki broj istraživanja u današnje vreme fokusiran na mogućnost hemijske stabilizacije antocijana (Castañeda-Ovando i sar., 2009). Neka jedinjenja prirodno prisutna u biljnom materijalu, poput fenolnih kiselina, imaju zaštitni i stabilizacioni efekat na antocijane (Eiro i Heinonen, 2002), doprinoseći na taj način stabilnosti boje proizvoda. Kafena kiselina odgovorna je za stabilizaciju boje soka od crvene narandže (Maccarone i sar., 1985), sinapinska doprinosi stabilnosti boje soka od jagode, dok ferulna i sinapinska imaju ovu ulogu u soku od maline (Rein i Heinonen, 2004). Ovaj efekat je pripisan kopigmentaciji antocijana, kojom se stvaraju jedinjenja intenzivnije boje, koja su stabilnija od samih antocijana.

2.5.2. NUTRIJENTI BOBIČASTOG VOĆA

Hrana se sastoji iz niza nutrijenata, koji, osim što obezbeđuju potrebe organizma za energijom, učestvuju u izgradnji tkiva i organa, kao i u različitim metaboličkim procesima. Neke od nutrijenata ljudski organizam nije u stanju da sintetiše, pa se oni unose isključivo hranom. Nazivaju se esencijalnim i u ovu kategoriju spadaju: vitamini, minerali, pojedine aminokiseline i pojedine masne kiseline. Proteini, ugljeni hidrati i masti su nutrijenti iz kategorije neesencijalnih, s obzirom da je organizam u stanju da ih sintetiše. Ipak, oni se najvećim delom unose hranom, a svojom razgradnjom osiguravaju energetske potrebe organizma.

Prema potrebama organizma za unosom, nutrijenti se dele na:

- makronutrijente – proteini, aminokiseline, lipidi, masne kiseline, ugljeni hidrati,
- mikronutrijente – minerali i vitamini.

Unosom makronutrijenata osigurava se energija neophodna za obavljanje funkcija organizma, dok je uloga mikronutrijenata različita. Uneti u malim količinama putem hrane, mikronutrijenti deluju kao:

- kofaktori u metabolizmu – za moduliranje aktivnosti enzima (npr. cink i selen su kofaktori za mnoge enzime),
- koenzimi u metabolizmu – imaju aktivnu ulogu u složenim biohemijskim reakcijama (npr. folna kiseline učestvuje u reakcijama u kojima se prenosi metil grupa; riboflavin i niacin učestvuju u lančanom prenosu elektrona),
- kontrolni faktori u procesima transkripcije koji regulišu ekspresiju gena.

2.5.2.1. Esencijalne masne kiseline

Za ljudski organizam esencijalne su polinezasićene masne kiseline, a najvažniji predstavnici ove grupe su omega-6 i omega-3 masne kiseline (Plourde i Cunnane, 2007). Povećan unos polinezasićenih masnih kiselina dovodi se u vezu sa pozitivnim zdravstvenim efektima kao što su smanjenje koncentracije holesterola u krvi, čime se značajno smanjuje rizik od koronarnih bolesti, srčanog i moždanog udara (Gartside i sar., 1998; Siscovick i sar., 1995). Poslednjih decenija nedostatak esencijalnih masnih kiselina u ishrani dovodi se u vezu i sa pojavom različitih neuroloških poremećaja (Freeman, 2000). S obzirom na značaj njihovog unosa, potrebe za esencijalnim masnim kiselinama definisane su odgovarajućim normativima (NRC, 2004).

Seme bobičastih voćnih vrsta predstavlja važan izvor esencijalnih masnih kiselina. S obzirom na značajan udeo semena (20-26%) u delu biljnog materijala koji se prilikom proizvodnje soka tretira kao otpad, ovi nusproizvodi mogu se koristiti za dobijanje ulja

sa visokim udelom polinezasićenih masnih kiselina. Po sadržaju α -linolenske kiseline od voćnih vrsta iz kategorije bobičastog voća izdvajaju se kupina (35,2-35,3%) (Parry i Yu, 2004) i malina (29,1-32,4%) (Oomah i sar., 2000). Ipak, najveći broj studija odnosi se na sastav ulja iz semena grožđa, optimizaciju procesa njegove ekstrakcije i potencijalnu komercijalnu primenu (dos Santos Freitas i sar., 2013; Duba i Fiori, 2015; Fiori i sar., 2014; Yu i Ahmedna, 2013).

2.5.2.2. Prehrambena vlakna

Prema definiciji prehrambena vlakna su ostaci jestivih delova biljaka, biljni ekstrakti ili njihovi sintetski analozi koji ne podležu dejstvu enzima i ne apsorbuju se u tankom crevu, a delimično ili potpuno fermentišu u debelom crevu (Camire i sar., 2001). U prehrambena vlakna ubrajaju se: neskrobni polisaharidi, lignin i srodne supstance (voskovi, kutin, suberin), pojedini oligosaharidi (frukto-oligosaharidi i gluko-oligosaharidi) i rezistentni skrob (Phillips i Cui, 2011).

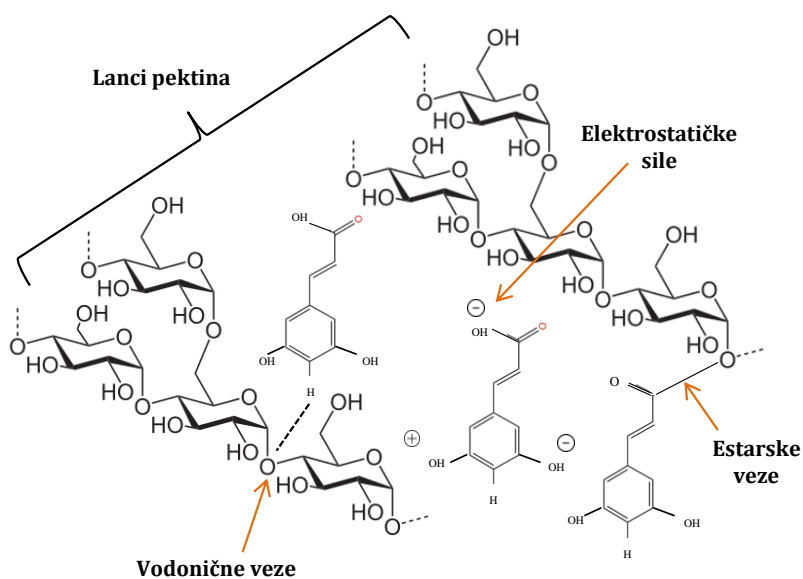
Na osnovu hemijske strukture i sposobnosti pojedinih frakcija da se ekstrahuju u definisanim uslovima (vrednost pH i temperatura primenjenog rastvarača), prehrambena vlakna se dele na nerastvorljiva (eng. *insoluble dietary fiber* – IDF) i rastvorljiva (eng. *soluble dietary fiber* – SDF). U nerastvorljiva prehrambena vlakna ubrajaju se neskrobni polisaharidi (celuloza, hemiceluliza), lignin iz membrana biljnih ćelija i rezistentni skrob (Jalili, 2001). Polisaharidi intracelularnog porekla, poput β -glukana, pektina i inulina, kao i različite vrste guma, nazivaju se rastvorljivim vlaknima.

Prehrambena vlakna se smatraju neizostavnim sastojkom pravilne ishrane, a njihov povećan unos povezuje se sa smanjenjem rizika od hroničnih oboljenja (Liu, 2007) koji je posledica višestrukog delovanja vlakana u digestivnom traktu (prebiotski efekat, stvaranje osjećaja sitosti, sporija drenaža želudca) kao i njihovog sistemskog delovanja (smanjenje nivoa holesterola i šećera u krvi).

U cilju zadovoljenja preporučenog dnevnog unosa od 25 g (NRC, 2004), kojim se postižu pozitivni zdravstveni efekti, mnogi prehrambeni proizvodi se dodatno obogaćuju vlaknima. Osim nutritivnog, prehrambena vlakna su značajna i sa tehnološkog aspekta, pa se u proizvode dodaju sa ciljem: smanjenja kalorijske vrednosti, zamene dela masti, stabilizacije proizvoda tipa emulzija, povećanja mase proizvoda i smanjenja upijanja ulja tokom prženja. Ipak, obogaćivanje nekog prehrambenog proizvoda vlaknima može se smatrati opravdanim samo u slučaju ako se njihovim dodatkom ne narušavaju tekstura, izgled i senzorska svojstva proizvoda. U tom smislu, najvažnija tehnološka karakteristika prehrambenih vlakana jesu hidrataciona svojstva,

koja određuju optimalnu količinu u kojoj se vlakna dodaju prilikom formulisanja nekog prehrambenog proizvoda (Thebaudin, 1997). Hidrataciona svojstva vlakana mogu se opisati pomoću sledećih parametara: sposobnost (kapacitet) zadržavanja vode (WHC, eng. *water holding capacity*), sposobnost (kapacitet) vezivanja vode (WBC, eng. *water binding capacity*), bubrenje i rastvorljivost.

Oko 50% od ukupne količine prehrambenih vlakana dospeva u organizam konzumiranjem cerealia i pseudocerealia. Ipak, poslednjih godina u fokusu naučnih istraživanja su vlakna iz voća, za koja je dokazano da imaju bolja nutritivna svojstva u poređenju sa vlaknima žitarica, zahvaljujući većem sadržaju rastvorljivih, ali i ukupnih vlakana, nižem sadržaju fitinske kiseline, većem kapacitetu vezivanja vode i ulja, boljoj fermentabilnosti u digestivnom traktu i nižoj kalorijskoj vrednosti (Chau i Huang, 2003). Brojne naučne publikacije ukazuju na još jedno važno svojstvo vlakana iz voća – postojanje interakcijskih veza sa drugim konstituentima kao što su polifenolna jedinjenja. Saura-Calixto (1998), analizirajući pomenute interakcije u tropu dobijenom iz grožđa, uvodi koncept prehrambenih vlakana sa antioksidativnim svojstvima (ADF, eng. *antioxidant dietary fibre*), koji se odnosi na biljni materijal sa sadržajem prehrambenih vlakana većim od 50% (izraženo na suhu materiju) i visokim sadržajem prirodnih antioksidanata koji su vezani za polisaharidne frakcije ćelijskog zida (Slika 8). Od fenolnih jedinjenja, najčešće su sa prehrambenim vlaknima iz voća povezani derivati hidrokiscimetne kiseline, i to u formi tanina, koji hidrolizom daju galnu i elaginsku kiselinu (Arranz i sar., 2009).



Slika 8. Vrste interakcija između polifenolnih jedinjenja i polisaharida ćelijskog zida

Ovaj koncept ispitan je na različitim vrstama voća i njihovih sporednih proizvoda (Chantaro i sar., 2008; Jiménez-Escrig i sar., 2001; Larrauri i sar., 1997b; Quirós-Sauceda i sar. 2014; Rufino i sar., 2011), a mogućnosti primene ovako dobijenih vlakana ispitivane su u proizvodima na bazi žita (Ajila i sar., 2008; Ajila i sar., 2010; Peng i sar., 2010; Vergara-Valencia i sar., 2007), mlečnim (Min i sar., 2012; Tseng i Zhao, 2013) i proizvodima od mesa (Sánchez-Alonso i sar., 2007; Vuorela i sar., 2005). Dodatkom ADF u prehrambene proizvode postiže se dvostruki efekat – povećanje sadržaja bioaktivnih jedinjenja i poboljšanje tehnoloških karakteristika proizvoda (Quirós-Sauceda i sar., 2014).

Bobičasto voće je bogat izvor prehrambenih vlakana, a njihov sadržaj u kultivisanim vrstama se kreće od 2% u jagodi, do 6,5% u malini (Zhao, 2007). Od prehrambenih vlakana bobičastog voća najvažniji su polisaharidi ćelijskog zida (celuloza, hemiceluloza i pektini) čiji se sadržaj menja tokom zrenja i skladištenja, utičući tako na kvalitet ovih voćnih vrsta (Brady, 1987; Fischer i Bennet, 1991.; Stewart i sar., 2001). Iako je poznato da se jedan deo polifenolnih jedinjenja bobičastog voća nalazi vezan estarskim vezama za polisaharide ćelijskog zida, koncept prehrambenih vlakana sa antioksidativnim svojstvima do sada je ispitan isključivo na različitim vrstama sporednih proizvoda prerade grožđa. Ostale vrste bobičastog voća i njihovi sporedni proizvodi ispitivani su sa aspekta ekstrakcije i izolovanja polifenolnih jedinjenja, dok su prehrambena vlakna sa antioksidativnim svojstvima i mogućnosti njihove primene za većinu voćnih vrsta iz porodica Ericaceae i Rosaceae još uvek neispitani.

2.5.2.3. Vitamini

Bobičasto voće je izuzetan izvor vitamina A, C i E, vitamina iz B grupe poput niacina i vitamina K, koji su od velikog značaja za ljudsko zdravlje (Zhao, 2007). Po sadržaju C vitamina izdvajaju se crna ribizla (181 mg/100 g) i jagoda (58 mg/100 g) (Pantelidis i sar., 2007). Ipak, treba napomenuti da sadržaj varira i zavisi od mnogih faktora, uključujući podvrstu, klimatske i uslove kultivacije, stepen zrelosti i uslove skladištenja (Nile i Park, 2014). Vitamin C je najefikasniji redukujući hidrosolubilni antioksidant, pa su za njegov unos vezani svi pozitivni zdravstveni efekti svojstveni antioksidantima, a tehnološki aspekt njegove primene u prehrambenoj industriji vezan je za osobinu da inhibira neenzimsko tamnjenje (Tumbas, 2010). Smatra se da je dnevna potreba ljudi za vitaminom C oko 75 mg (NRC, 2004), što ukazuje na to da se čak 100% preporučenog dnevnog unosa ovog vitamina može postići konzumiranjem porcije (oko 80 g) sveže crne ribizle.

2.5.2.4. Minerali

Od minerala prisutnih u bobičastom voću najzastupljeniji su makroelementi: kalijum, kalcijum i magnezijum (www.ars.usda.gov). Sadržaj kalijuma kreće se od 77 mg/100 g u borovnici, do 322 mg/100 g u crnoj ribizli, koja se među bobičastim voćem izdvaja i po sadržaju kalcijuma (55 mg/100 g). Magnezijum je prisutan u najvećoj koncentraciji u plodovima maline (22 mg/100 g) (www.ars.usda.gov).

Značaj makroelemenata za normalno funkcionisanje ljudskog organizma je veoma velik. Joni kalijuma, magnezijuma i kalcijuma se smatraju prirodnim antihipertenzivnim komponentama koje ispoljavaju diuretičko i vazodilatatorno delovanje, dok kalijum ima i efekat redukcije senzorne neuron-specifične (SNS) aktivnosti (Houston, 2005).

2.5.2.5. Normativi preporučenih potreba za nutrijentima

Ljudskom organizmu je za normalno funkcionisanje potreban veliki broj različitih hranljivih materija, a neophodna količina nutrijenata naziva se nutritivnom potrebom. Podaci o potrebama organizma za hranljivim materijama su informacije od velikog značaja, a koriste se za izradu informacija o nutritivnoj vrednosti proizvoda, koje se nalaze u sastavu deklaracije, kao i u medicinske svrhe kod planiranja ishrane pacijenata. Preporučene potrebe, kao kvantitativne procene unosa hranljivih materija, formulišu se u vidu normativa, a najpoznatiji, široko prihvaćen je normativ dat od strane Nacionalnog istraživačkog veća Nacionalne akademije nauka SAD (eng. *National Research Council of the Food and Nutrition Board of the National Academy of Sciences*) još 1941. godine. Normativ pod nazivom *Recommended Dietary Allowances* (RDAs) uveden je prvobitno sa ciljem definisanja količine određenih nutrijenata koju je neophodno unositi u organizam da bi se sprečila pojava nutritivne deficijencije.

Umesto jedne kategorije, kao što je bio slučaj kod RDAs normativa, uvođenjem nove vrste normativa poznate kao prehrambeni referentni unosi (eng. *dietary reference intakes* – DRIs) definisane su četiri kategorije preporuka (Otten i sar., 2006):

1. **Procenjena prosečna potreba (eng. *estimated average requirement* – EAR)**
koja predstavlja unos koji zadovoljava procenjenu potrebu za datim nutrijentom kod 50% pojedinaca koji pripadaju specifičnoj populacionoj grupi;
2. **Preporučena dnevna potreba (eng. *recommended dietary allowance* – RDA)**
koja predstavlja unos nutrijenta koji zadovoljava 97-98% potreba skoro svih zdravih pojedinaca određene starosne grupe i pola. Ovaj podatak namenjen je

opštoj zdravoj populaciji i ne uzima u obzir pojedince sa specifičnim nutritivnim potrebama;

3. **Adekvatan unos (eng. *adequate intake* – AI)** predstavlja vrednost koja se postavlja u slučaju kada ne postoji dovoljno naučnih podataka za uspostavljanje RDA vrednosti. AI vrednost se dobija iz ekperimentalnih podataka;
4. **Tolerantni gornji nivo unosa (eng. *tolerable upper intake level* – UL)** predstavlja maksimalan unos nutrijenta koji najverovatnije ne predstavlja zdravstveni rizik kod 98% pojedinaca jedne populacione grupe; ima za cilj sprečavanje unosa preterano velikih doza nutrijenata.

U prilogu 1 i 2 date su procene referentnih unosa za makro- i mikronutrijente preuzete iz normativa NRC (2004).

2.5.3. BOROVNICA (*VACCINIUM MYRTILLUS* L., ERICACEAE)



Borovnica je grm, visok do 50 cm, koji gradi prizemnu floru vlažnih i planinskih predela. Raste u blizini bukovih i četinarskih šuma, cveta od maja do juna, a upotrebljavaju se njeni plodovi, koji sazrevaju u periodu jun-septembar. Plod borovnice je okrugla bobica, veličine graška, sa mnoštvom semenki. U Srbiji se godišnje ubira i otkupljuje preko 1000 tona ove tzv. šumske borovnice (Leposavić, 2014).

Pored divljih, samoniklih vrsta, u svetu, ali i kod nas, na tržištu se može naći visokožbunasta borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.), koja u poslednje vreme beleži rast proizvodnje, s obzirom na veliku upotrebnu vrednost ploda i rentabilnost gajenja, koja je delom i posledica dugačkog eksploatacionog perioda njenih zasada (20-30 godina). Sve intenzivniji uzgoj visokožbunaste borovnice posledica je i interesovanja potrošača za ovu voćnu vrstu, s obzirom na dokazane zdravstvene dobrobiti njenog konzumiranja (Brazelton i Strik, 2007). Pored SAD, najveća ekspanzija proizvodnje beleži se u zemljama Južne Amerike.

Potencijal naše zemlje u pogledu proizvodnje i prerade ovog voća još uvek je neiskorišćen. Trenutno se u Srbiji visokožbunasta borovnica gaji na površini od oko 100 ha, sa tendencijom povećanja, a specifičnost agroekoloških uslova koji omogućavaju berbu i plasman proizvoda u periodu jun-jul, kada na evropskom tržištu nema plodova

iz drugih zemalja, proizvođačima nudi mogućnost postizanja boljih cena (Leposavić, 2014). Prinos ploda borovnice je sortna osobina koja u velikoj meri zavisi od agroekoloških uslova tokom godine (Oblak i sar., 1984), a godišnja proizvodnja visokožbunaste borovnice u Srbiji kreće se oko 14 t/ha (Leposavić, 2014).

Za borovnicu je dokazano da poseduje antiaterogeni efekat (Basu i sar., 2010), antikancerogenu aktivnost (Nichenametla i sar., 2006) i da povoljno deluje kod kognitivnih problema i oksidativnog stresa (Zafra-Stone i sar., 2007), što se dovodi u vezu sa njenim izuzetnim nutritivnim profilom (Tabela 2). Paralelno sa povećanjem proizvodnje borovnice rasla je i prodaja ovog voća usled težnje potrošača za unapređenjem zdravlja, a tome su doprineli i jedinstven ukus i njena hranljiva vrednost (Feng i sar., 1999; Reyes-Díaz i sar., 2011). Potražnja za borovnicom je u velikom porastu, a kao rezultat toga očekuje se ekspanzija tržišta sveže i prerađene borovnice širom sveta (Brazelton i Strik, 2007).

Tabela 2. Osnovni hemijski sastav, mineralni i polifenolni profil ploda borovnice

Osnovni hemijski sastav (g/100 g, osim energ.vrednosti-kcal)								
Proteini	Masti	Ugljeni hidrati	Prehrambena vlakna	Pepeo	Energetska vrednost	Referenca		
0,74	0,33	14,49	2,40	0,08	57	USDA, 2013		
Sastav minerala (mg/100 g)								
Ca	Mg	Fe	P	K	Na	Zn	Mn	Referenca
15-35	6-10	0,15-0,60	10-15	56-80	0,11-0,22	0,06-0,12	1,20-3,90	Nile i Park, 2014
Polifenolni profil (mg/g)								
Flavonoidi		Ukupni fenoli		Antocijani		Referenca		
50		261-585		25-495		Nile i Park., 2014		

2.5.4. MALINA (*RUBUS IDAEUS* L., ROSACEA)



Malina je zeljasta biljka iz porodice ruža koja formira grm visine i do 3,5 m. Dobro se prilagođava različitim klimatskim i zemljišnim uslovima, pa se može uspešno gajiti u brdsko-planinskim područjima. U našim uslovima gaji se do 800 m nadmorske visine.

Malina je desertno voće i može se koristiti u svežem stanju, ali je veoma cenjena sirovina za preradu u sokove, sirupe, kompote, slatka, džemove, vino, kao i dehidrirana (Kljajić, 2011). Posmatrano po kontinentima, najveća proizvodnja maline se ostvaruje u Evropi (preko 70%), a zatim u Severnoj i Južnoj Americi. Najveća proizvodnja maline na evropskom kontinentu ostvaruje se u Srbiji sa 84300 t/god. Nikolić i saradnici (2008) navode da se u Srbiji na 95% površina gaji malina sorte vilamet (Willamette), a preostalih 5% pripada sortama miker, tjulamin i polana. Nutritivni i polifenolni profil ploda maline prikazan je u tabeli 3.

Tabela 3. Osnovni hemijski sastav, mineralni i polifenolni profil ploda maline

Osnovni hemijski sastav (g/100 g, osim energ.vrednosti-kcal)								
Proteini	Masti	Ugljeni hidrati	Prehrambena vlakna	Pepeo	Energetska vrednost	Referenca		
1,20	0,65	11,94	6,5	/	52	USDA, 2013		
Sastav minerala (mg/100 g)								
Ca	Mg	Fe	P	K	Na	Zn	Mn	Referenca
15-30	1-5	0,4-0,6	20-22	200-225	0,5-1,0	0,32-0,61	1,50-2,0	Nile i Park, 2014
Polifenolni profil (mg/g)								
Flavonoidi		Ukupni fenoli		Antocijani		Referenca		
6,0		121		99		Nile i Park, 2014		

Malina (*Rubus idaeus* L.) je voćna vrsta specifična po svojim biološkim osobinama, ekonomskom značaju i agroekološkim zahtevima. Intenziviranje njene proizvodnje, nastalo kao posledica visoke rodnosti i dugogodišnjeg izvoza na svetsko tržište, dovelo je do toga da malina danas predstavlja najrentabilniju voćnu vrstu u Srbiji (Kljajić, 2011). Od proizvedenih količina maline, preko 90% se zamrzava u hladnjačama i dalje prerađuje.

2.6. SPOREDNI PROIZVODI INDUSTRIJSKE PRERADE VOĆA

Intenziviranje poljoprivrede i prerade hrane rezultira brzim porastom volumena poljoprivredne i industrijske otpadne biomase. Sporedni proizvodi industrijske prerade voća dospevaju u fokus interesovanja poslednjih godina, s obzirom da je dokazano da velike količine bioaktivnih jedinjenja zaostaju upravo u onom delu biljnog materijala koji

se, nakon prerade, tretira kao otpad. Dokazana funkcionalna svojstva i bogatstvo nutrijentima, glavne su odlike sporednih proizvoda industrijske prerade voća, koje ukazuju na višestruku dobrobit njihove potencijalne revalorizacije. Danas se u svetu sporedni proizvodi industrijske prerade voća koriste kao hrana za životinje, za proizvodnju biogoriva, ili za proizvodnju prirodnih aditiva namenjenih prehrambenoj industriji.

U ukupnoj proizvodnji prerađevina od voća u našoj zemlji najveći udeo (81,5%) imaju voćni sokovi (Lukač Bulatović, 2010). Imajuću u vidu podatak da količina sporednih proizvoda koji zaostaju nakon ceđenja soka može da iznosi i do 20% inicijalne mase voća (Khanal i sar., 2009), kao i da ovi nusproizvodi predstavljaju veliki ekonomski deficit i ekološki problem, imperativ je pronaći adekvatne načine za njihovo iskorišćenje. Sprovedenje ovakve ideje dodatno potkrepljuje činjenica da u voćnim tropovima zaostaju velike količine visokovrednih biološki aktivnih jedinjenja.

Koncept „industrijske simbioze“, koji se primenjuje u razvijenim zemljama Evrope podrazumeva iskorišćenje sporednih proizvoda jedne industrijske grane u novim proizvodnim procesima u drugoj oblasti industrije, i jedan je od najefikasnijih načina iskorišćenja potencijalno vrednih sporednih proizvoda (Costa i sar., 2010). Valorizacija tropa, dobijenog u postupku industrijske proizvodnje soka, u pravcu kreiranja funkcionalnih sastojaka za prehrambenu industriju, mogla bi predstavljati ideju za buduće strategije u rešavanju velikih količina otpadne biomase.

Osim ekstrakcije i izolovanja pektina iz jabučnog tropa i kore citrusa, jedan od značajnijih pravaca upotrebe sporednih proizvoda iz industrije voća jeste dobijanje koncentrata vlakana i prevođenje odgovarajućim tehnološkim postupcima u oblik pogodan za primenu u prehrambenoj industriji. Prema Larrauri (1999) ovaj postupak podrazumeva: vlažno mlevenje, ispiranje, sušenje i mlevenje do čestica željene veličine, kako bi se postigle odgovarajuće hidratacione karakteristike vlakana.

Bobičasto voće poznato je kao izuzetan izvor vlakana, vitamina, minerala, kao i jedinjenja sa snažnim antioksidativnim delovanjem. Ipak, sporedni proizvodi prerade ovih voćnih vrsta, mnogo su manje iskorišćeni u poređenju sa gorepomenutim tropom jabuke i korom citrusa. Od bobičastog voća, najviše je ispitivan trop od grožđa, dobijen u postupku proizvodnje vina, dok literaturni podaci o količinama i mogućnosti upotrebe sporednih proizvoda ostalog bobičastog voća, još uvek nisu dostupni. Trop bobičastog voća sastoji se od semena, pokožice i pulpe, a do sada je ispitan hemijski sastav sporednih proizvoda prerade brusnice (Holmes i Rha, 1978; White i sar., 2009) i grožđa (Bravo i Saura-Calixto, 1998; Schieber i sar., 2001; Valiente i sar., 1995). U tropu

brusnice u najvećem udelu zastupljeni su polisaharidi ćelijskog zida (celuloza, hemiceluloze i pektin), dok je sadržaj proteina, masti i skroba veoma mali. Bobičasto voće poput grožđa daje tropove sa većim sadržajem masti i proteina budući da je udeo semena u ovom tropu preko 20% (Saura-Calixto, 1998). Stoga, kod ovakve vrste tropa, važnu ulogu sa aspekta funkcionalnosti imaju i esencijalne masne kiseline.

Polazeći od podatka da su borovnica i malina voćne vrste sa izuzetnim nutritivnim profilom i visokim sadržajem bioaktivnih jedinjenja, valorizacija njihovih tropova u pravcu dobijanja novih funkcionalnih sastojaka i proizvoda sa dodatom vrednošću, bila je osnovna ideja ove doktorske disertacije. Izrazita antioksidativna aktivnost tropa borovnice (Lee i Wrolstad, 2004) objašnjava se činjenicom da u njemu zaostaje više od 50% procijanidina prisutnih u svežem voću (Khanal i sar., 2009). Dosadašnje studije o potencijalnoj primeni ovog tropa uglavnom se zasnivaju na inkapsulaciji ekstrakata ili dobijanju ekstrudiranih proizvoda (Khanal i sar., 2009). Trop maline pokazao se kao izuzetan izvor prehrambenih vlakana (Górecka i sar., 2010) i polifenola (Bobinaitė i sar., 2013), a dokazan je i snažan antioksidativni i antiproliferativni efekat njegovih ekstrakata (Četojević-Simin i sar., 2015). Iz kategorije fenolnih kiselina, najzastupljenija je elaginska kiselina, čiji su pozitivni aspekti delovanja dokumentovani u brojnim studijama (Zhao, 2007). Zahvaljujući značajnom udelu α -linolenske kiseline (54,5%) i tokoferola u semenu maline (Oomah i sar., 2000), kao i činjenici da je seme zastupljeno u velikom udelu u samom tropu, uloga u prevenciji srčanih oboljenja takođe može biti jedan od aspekata funkcionalnosti ovog tropa.

2.6.1. EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA

Ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja iz sporednih proizvoda industrijske prerade voća jedan je od načina njihovog iskorišćenja. Najveći praktični značaj imaju ekstrakti bogati polifenolnim jedinjenjima, a njihova dalja primena u najvećoj meri vezana je za kozmetičku i farmaceutsku industriju. U prehrambenoj industriji najčešće se koriste ekstrakti antocijana u svojstvu aditiva – boja.

Ekstrakcija polifenola iz tropa bobičastog voća i potencijalna primena dobijenih ekstrakata ispitivana je u mnogim studijama (Hang, 1988; King i sar., 2003; Mantell i sar., 2002; Metivier i sar., 1980). Ipak, proizvodnja ovih ekstrakata u industrijskim uslovima, koja bi obezbedila značajno smanjenje količine sporednih proizvoda, još nije na visokom nivou. Klasična čvrsto-tečna ekstrakcija zahteva utrošak velikih količina rastvarača i predstavlja vremenski zahtevan i skup proces (Ivanović i sar., 2014; Roseiro i sar., 2013), pa su poslednjih decenija, kao alternativa klasičnoj ekstrakciji, sve više u

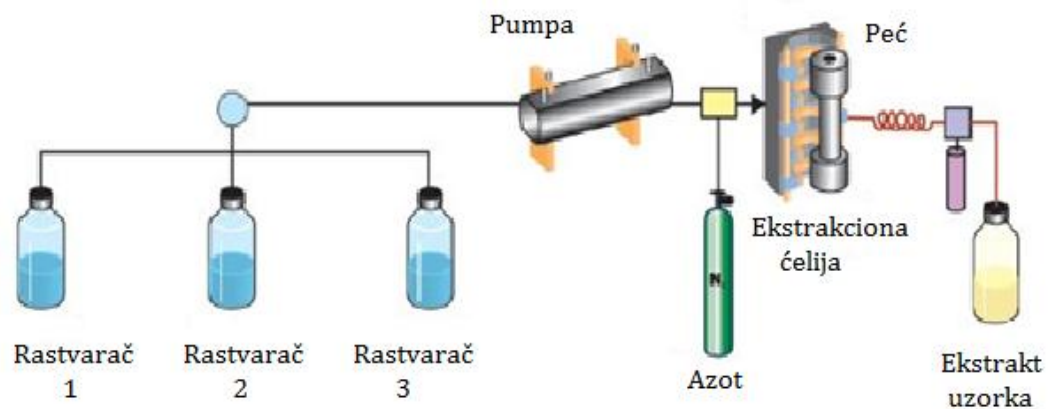
upotrebi tzv. *green* tehnologije, koje podrazumevaju smanjen utrošak rastvarača i znatno brži postupak ekstrakcije.

Ekstrakcija rastvaračima pod povišenim pritiskom (eng. *accelerated solvent extraction*, ASE) jedna je od tehnika sa sve većim potencijalom za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora. Imajući u vidu potencijalnu primenu ovih ekstrakata, ASE kao tehnika ekstrakcije, ispunjava neke od najvažnijih zahteva: smanjenje utroška rastvarača, mogućnost automatizacije procesa, kraće vreme ekstrakcije i dobijanje gotovog ekstrakta (bez potrebe za filtracijom) (Nieto i sar., 2009). Kao što sam naziv govori, ASE podrazumeva upotrebu rastvarača na povišenom pritisku (do 200 bar) i povišenoj temperaturi (do 200 °C), čime se značajno povećava efikasnost ekstrakcije u poređenju sa konvencionalnom ekstrakcijom pri ambijentalnim uslovima. Na povišenoj temperaturi dolazi do smanjenja viskoziteta rastvarača, odvija se njegova brža difuzija u matriks, prenos mase i desorpcija analita su efikasniji, a povećava se i rastvorljivost analita u samom rastvaraču. Povišen pritisak doprinosi boljem kontaktu rastvarača i matriksa, što takođe doprinosi većoj efikasnosti ekstrakcije (Monrad i sar., 2009).

Iako se, kao glavni nedostatak ekstrakcije na povišenoj temperaturi, navodi smanjenje selektivnosti i moguća degradacije bioaktivnih jedinjenja (Giergielewicz-Možajska i sar., 2001), polifenolna jedinjenja iz pojedinih matriksa kao što je grožđe, pokazala su se izuzetno stabilnim pri ovakvim uslovima ekstrakcije (Palma i sar., 2001, 2002). Takođe, ASE se pokazala kao veoma efiksna tehnika za dobijanje ekstrakata sa visokim antioksidativnim potencijalom i iz drugih, veoma raznolikih prirodnih izvora (Cha i sar., 2009; Herrero i sar., 2005; Ibañez i sar., 2006). Ipak, u ovim studijama istaknut je značaj optimizacije uslova za svaku vrstu matriksa. Optimizacija najčešće obuhvata odabir pritiska, temperature i mase uzorka iz kog se vrši ekstrakcija, pri kojima se ostvaruje visoka efikasnost ekstrakcije, uz zadovoljenje ostalih uslova (selektivnost i stabilnost analita), a sam postupak optimizacije najčešće je zasnovan na nekom multikriterijumskom pristupu.

Postupak ekstrakcije rastvaračima pod povišenim pritiskom dešava se u tzv. ekstrakcionoj ćeliji, u koju se prethodno stavlja materijal koji se ekstrahuje i koja se zagreva do odgovarajuće temperature, nakon čega se u nju uvodi rastvarač pod pritiskom (Slika 9). Pri tzv. statičkoj ekstrakciji, uzorak i rastvarač određene temperature i pritiska ostaju u kontaktu u samoj ekstrakcionoj ćeliji tokom vremena koje se definiše u programu samog uređaja, nakon čega se rastvarač, koji sadrži ekstrahovani materijal, ispumpava u odgovarajući prihvatni sud. Osim samih uslova, na efikasnost ekstrakcije utiče i predtretman uzorka. Sušenje, homogenizacija (mlevenje) i

prosejavanje u cilju postizanja ujednačenosti veličine čestica, neki su od zahtevanih predtretmana, kako bi se postigla maksimalna efikasnost ekstrakcije.



Slika 9. Šematski prikaz uređaja za ekstrakciju rastvaračima pod povišenim pritiskom

Primena ASE u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz sporednih proizvoda industrijske prerade voća, poslednjih godina sve više se izučava u naučnoj literaturi (Alonso-Salces i sar., 2001; Ju i Howard, 2003; Pinelo i sar., 2005).

2.7. POSTUPAK ODZIVNE POVRŠINE (RSM) U OPTIMIZACIJI FORMULACIJE PROIZVODA

U mnogim istraživanjima postupak odzivne površine (eng. *response surface methodology* – RSM) primenjuje se kao matematički model u optimizaciji bioprocenih tehnologija za postizanje maksimalnih kvalitativnih karakteristika proizvoda (Cajner, 2011). RSM ima važnu upotrebu u dizajnu i formulaciji novih proizvoda, kao i poboljšanju kvaliteta već postojećih. Primena matematičkog modela u optimizaciji formulacije prehrambenih proizvoda, osim što omogućava manji broj eksperimenata i time manji utrošak sirovina za probne formulacije, obezbeđuje i mogućnost uvođenja kriterijuma po kojima bi optimizacija bila sprovedena, kao i specificiranje značajnosti istih. Ovakav postupak kreiranja novog proizvoda donosi dodatan kvalitet samom procesu, imajući u vidu mogućnost istovremenog sagledavanja uticaja pojedinačnih faktora u postupku optimizacije, ali i njihovih međusobnih interakcija. Optimizacija se zasniva na odabiru optimalnih vrednosti nezavisno promenljivih veličina sa ciljem postizanja željenog izlaza, odnosno odziva. Najčešće postoji veliki broj mogućih

kombinacija vrednosti nezavisno promenljivih veličina procesa, pa je za optimizaciju procesa neophodno primeniti neku od multivarijabilnih statističkih tehnika.

Postupak odzivne površine prvi su opisali Box i Wilson (1951), a predstavlja empirijsku statističku tehniku koja se koristi za regresionu analizu podataka dobijenih iz adekvatno planiranih eksperimenata simultanim rešavanjem sistema jednačina (Allen, 2006; Myers i sar., 2016). Svaka od jednačina naziva se funkcija odziva, a njen geometrijski prikaz se naziva odzivna površina (Brereton, 2007; Montgomery i Runger, 2010). Ovaj postupak koristi se u većini studija koje obuhvataju optimizaciju, a primenjuje se za modelovanje i analizu problema u slučajevima kada je ispitivani odziv pod uticajem nekoliko promenljivih veličina (Myers i Montgomery, 1971).

Hemometrijski pristup optimizaciji, bilo da se radi o procesu, ili optimizaciji nekog proizvoda, uključuje sledeće korake (Mašković, 2013):

- definisanje cilja optimizacije,
- odabir faktora koji će biti optimizovani,
- odabir faktorskih nivoa,
- odabir eksperimentalnog plana,
- odabir odgovora koji će biti praćeni,
- kreiranje matematičkog modela,
- definisanje optimalnih uslova.

Ukoliko se kao cilj optimizacije postavi dobijanje proizvoda sa najboljim karakteristikama, tada se optimizacija ulaznih faktora može usmeriti u dva pravca:

- 1) optimizacija parametara procesa proizvodnje,
- 2) optimizacija odnosa sastojaka u formulaciji.

Za optimizaciju odnosa sastojaka koji daju optimalna svojstva nekog proizvoda, najčešće se koristi eksperimentalni plan poznat pod nazivom dizajn smeše (eng. *mixture design*). Ova vrsta eksperimentalnog plana uspešno je korišćena u optimizacijama mnogih prehrambenih proizvoda poput majoneza (Nikzade i sar., 2012), mlečnih proizvoda (Zhou i sar., 2007), mesnih proizvoda (Afshari i sar., 2015; Sarteshnizi i sar., 2015) i proizvoda iz kategorije brašneno-konditorskih (Kayacier i sar., 2014; Loubes i sar., 2016; Rezende i sar., 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u laboratorijama institucija koje su u sastavu Univerziteta u Novom Sadu. Najveći deo eksperimenata urađen je u Laboratoriji za tehnologiju, kvalitet i bezbednost hrane i pilot postrojenju za pekarske i fine pekarske proizvode Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu. LC/MS/MS analiza ekstrakata dobijenih iz tropa borovnice i maline izvršena je u laboratoriji za instrumentalnu analizu Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, dok je *scavenging* aktivnost primenom ESR spektrometrije određena u laboratorijama Odeljenja za Organsku hemiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Sušenje tropa sprovedeno je na Departmanu za poljoprivrednu tehniku Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Biohemijski parametri krvi za potrebe dijetetske interventne studije određeni u medicinskoj laboratoriji „Eurolab“, Novi Sad i laboratoriji Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu, a studija je sprovedena u saradnji sa Medicinskim fakultetom u Novom Sadu.

3.1. MATERIJAL

3.1.1. SIROVINE

Tropovi borovnice i maline dobijeni su kao sporedni proizvodi sa proizvodne linije sokova iz "BioUna", Novi Sad, Srbija. Za proizvodnju soka od maline korišćena je sorta maline vilamet, dok se u slučaju borovnice radilo o tzv. šumskoj borovnici sa područja Stare Planine (Republika Srbija).

Imajući u vidu da se na ovoj proizvodnoj liniji ceđenje soka odvija bez upotrebe enzima i tehnoloških postupaka dodatnog iscrpljivanja sirovine, ovakvim postupkom ceđenja dobija se značajna količina tropa. Naime, polazeći od 100 kg svežeg voća, dobijeno je 36 kg tropa borovnice, odnosno 33 kg tropa maline. Ovi tropovi su dalje postupcima sušenja i mlevenja prevedeni u oblik pogodan za aplikaciju u bezglutenski keks. Dobijene mase suvih tropova bile su 7,18 kg za borovnicu i 5,30 kg za malinu.

Za proizvodnju bezglutenskog keksa korišćene su sledeće sirovine:

- gotova bezglutenska smeša koja u svom sastavu sadrži kukuruzni skrob, kukuruzno brašno, krompirov skrob, pirinčano brašno, guar gumu, prašak za pecivo i so (Nutry Allergy Center, Zemun),
- biljna mast (AP 36/38 HF, Puratos, Beograd),
- šećer (Sunoko, Pećinci),
- glukozni sirup (Jabuka, Pančevo),
- jaja u prahu (Swisslion product, Indija),
- osušen i samleven trop borovnice i maline.

3.1.2. HEMIKALIJE I REAGENSI

Test kitovi za određivanje ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana, sastavljeni od termostabilne α -amilaze, proteaze i amiloglukozidaze, nabavljeni su iz kompanije Megazyme (Bray, Irska). Standardni rastvori Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn i Mn koncentracije 1000 $\mu\text{g/ml}$ nabavljeni su iz kompanije AccuStandard (New Haven, SAD).

Najveći broj specifičnih hemikalija i reagenasa korišćenih u eksperimentima nabavljen je od proizvođača Sigma-Aldrich Chemicals (Steinheim, Nemačka) i to: Folin-Ciocalteu's reagens, 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH[•]), butilovani hidroksitoluen (BHT), 2-*terc*-butil-4-hidroksianizol (BHA), 50% Bor(III)-fluorid (u metanolu), hinska kiselina, katehin, 5-O-kafeoilhinska kiselina (hlorogenska kiselina), galna kiselina, epikatehin, 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, siringinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, umbeliferon, skopoletin, viteksin, sinapinska kiselina, *o*-kumarinska kiselina, miricetin, kvercitrin, 3,4-dimetoksicimetna kiselina, bajkalin, daidzein, kvercetin, cimetna kiselina, genistein, izoramnetin. Vanilinska kiselina, ferulna kiselina, naringenin i rutin nabavljeni su od Fluka Chemie GmbH (Buchs, Švajcarska). Smeša standarda metil estara masnih kiselina (Supelco 37 FAME mix) je proizvod kompanije Supelco (Bellefonte, SAD). Metanol HPLC čistoće (gradient grade), mravlja kiselina HPLC čistoće su pribavljeni iz kompanija Merck

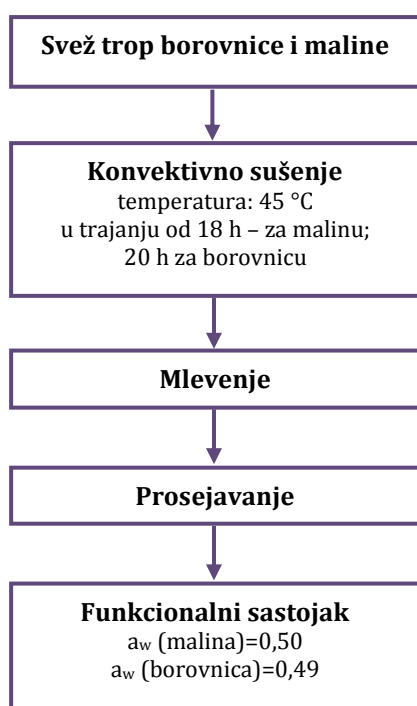
(Darmstadt, Nemačka). Dimetilformamid (DMF) i dimetilsulfoniloksid (DMSO), proizvodi su kompanije J. T. Baker (Deventer, Holandija).

Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće, poreklom od različitih proizvođača. Ultračista voda je dobijena u laboratoriji, korišćenjem Elix UV i Simplicity Water Purification Systema (Millipore, Molsheim, Francuska).

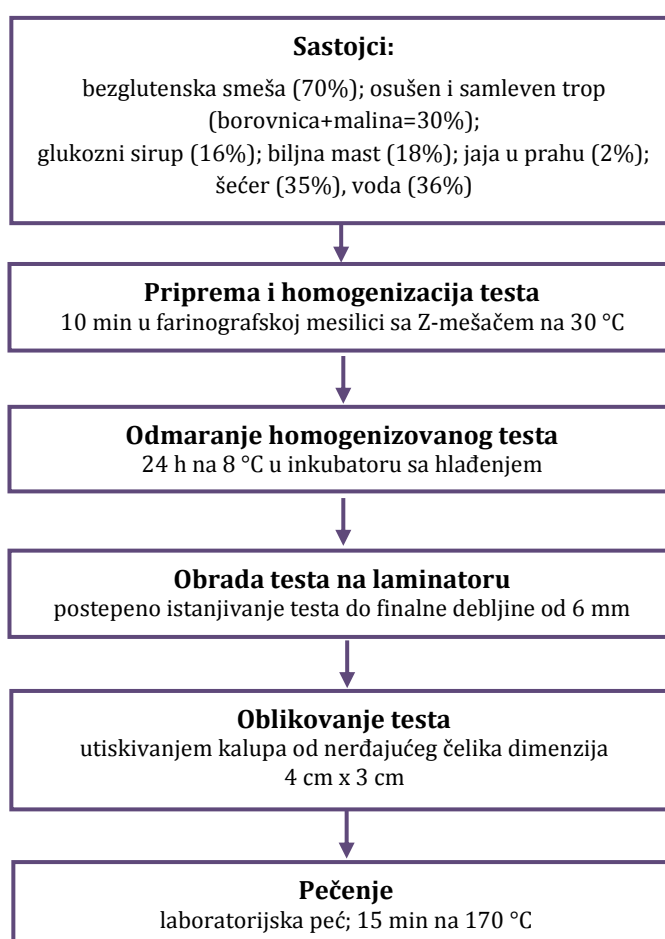
3.2. PROIZVODNJA BEZGLUTENSKOG KEKSA

Šematski prikaz tehnološkog postupka proizvodnje bezglutenskog keksa sa dodatkom osušenog i samlevenog tropa borovnice i maline prikazan je na slici 10.

a) Priprema funkcionalnog sastojka



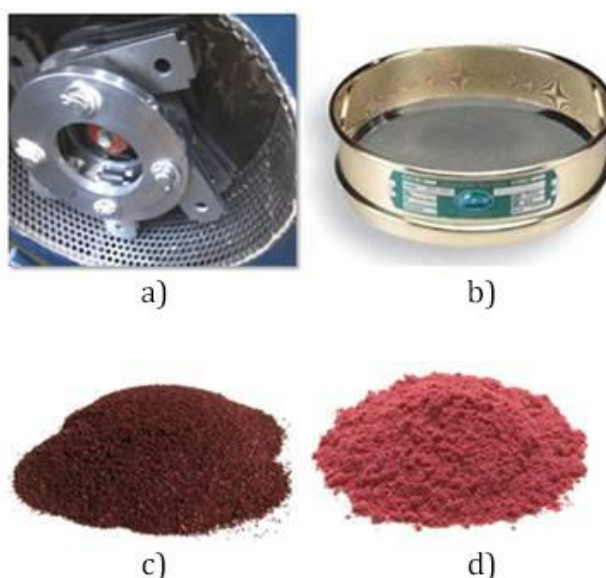
b) Proizvodnja bezglutenskog keksa



Slika 10. Šematski prikaz a) faza u tehnološkom postupku proizvodnje funkcionalnih sastojaka iz svežeg tropa borovnice i maline; b) faza u tehnološkom postupku proizvodnje bezglutenskog keksa

Priprema funkcionalnog sastojka iz svežeg tropa borovnice i maline obuhvatala je sledeće faze:

1. Sušenje u konvektivnoj sušari (AgrosKB, Novi Sad, Srbija) kapaciteta 1000 kg svežeg voća na dan pri blagim uslovima sušenja (45 °C), kako bi se sačuvala bioaktivna jedinjenja u što većem procentu;
2. Mlevenje osušenog tropa u mlinu čekićaru (Slika 11a) sledećih karakteristika: snaga motora – 2,2 kW, kapacitet – 200 kg materijala/h, frekvencija – 50 Hz, broj obrtaja motora – 2880 o/ min, prečnik sita – 31 cm, dužina jednog čekića – 10 cm, prečnik otvora 1 mm;
3. Prosejavanje osušenog tropa kroz sito prečnika otvora 0,8 mm (Endecotts, London, Velika Britanija) (Slika 11b).



Slika 11. Izgled a) laboratorijskog mlina čekićara; b) sita; osušenog i samlevenog tropa borovnice (c) i maline (d)

Proizvodnja bezglutenskog keksa

Polazeći od osnovne formulacije bezglutenskog keksa (bezglutenska smeša 100 g, glukozni sirup 16 g, biljna mast 18 g, jaja u prahu 2 g, šećer 35 g, voda 36 g), deo bezglutenske smeše zamenjen je funkcionalnim sastojcima, a maksimalan nivo supstitucije određen je u preliminarnim senzorskim ispitivanjima. Različite formulacije bezglutenskog keksa u kojima je 30% bezglutenske smeše zamenjeno funkcionalnim sastojcima, pripremljene su variranjem količine dodatih tropova (Tabela 4), dok su ostali sastojci (glukozni sirup, jaja u prahu, šećer i voda) dodati u istim količinama. Kontrolni keks (K) proizveden je po istoj recepturi, bez dodatka tropa borovnice i maline.

Tabela 4. Formulacije bezglutenskog keksa sa različitim udelima tropa borovnice i maline

Oznaka uzorka	Udeo TM (%)	Udeo TB (%)
1	15	15
2	0	30
3	22,5	7,5
4	30	0
5	30	0
6	15	15
7	0	30
8	7,5	22,5
9	0	30
K	0	0

*TM – trop maline; TB – trop borovnice

Proizvodnja bezglutenskog keksa sprovedena je u nekoliko faza.

1. **Priprema testa** po trofaznom postupku obuhvatala je:

- sjedinjavanje praškastih sirovina (bezglutenska smeša, šećer, jaja u prahu, trop borovnice/maline) i njihovo mešanje u trajanju od 1 minuta,
- dodavanje ukupne količine biljne masti i mešanje u trajanju od 3 minuta i
- sjedinjavanje svih sirovina dodavanjem ukupne količine vode (zagrejane na 30 °C) u kojoj je rastvoren glukozni sirup.

2. **Homogenizacija testa** u farinografskoj mesilici zagrejanom na 30 °C u trajanju od 10 minuta,

3. **Odmaranje homogenizovanog testa** na 8 °C u inkubatoru sa hlađenjem (FOC 225l, Velp, Scientifica) u trajanju od 24 časa,

4. **Obrada testa** na laminatoru (Mignon, Rimini, Italija) postepenim istanjivanjem testa propuštanjem između dva valjka, čiji se zazor postepeno smanjuje (14 mm, 10 mm, 6 mm),

5. **Oblikovanje testa** utiskivanjem odgovarajućeg kalupa,

6. **Pečenje** oblikovanog testa u etažnoj peći (MIWE Gusto CS, Arnštajn, Nemačka) na temperaturi 170 °C u trajanju od 15 minuta (Mišan i sar., 2014; Šarić i sar., 2014a) i

7. **Hlađenje** ispečenog bezglutenskog keksa u uslovima radne prostorije u trajanju od 1 časa.

Kontrolni keks proizveden je po istom tehnološkom postupku.

3.3. METODE

3.3.1. ODREĐIVANJE NUTRITIVNIH KARAKTERISTIKA TROPA BOROVNICE I MALINE I PROIZVEDENOG BEZGLUTENSKOG KEKSA

3.3.1.1. Određivanje hemijskog sastava

Osnovni hemijski sastav (sadržaj sirovih proteina, masti, ukupnih redukujućih šećera, pepela, vlage) određen je prema metodama propisanim u Pravilniku o metodima fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa (Sl. list SFRJ, 1988) i Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća ("Sl. list SFRJ", br. 29/83). Sadržaj sirovih proteina određen je metodom po Kjeldahlu, masti po Weibull-Stoldt, ukupnih redukujućih šećera po Luff-Schoorlu, vlage i pepela gravimetrijski. Ukupni ugljeni hidrati dobijeni su računski oduzimanjem vrednosti sadržaja sirovih proteina, masti, vlage i pepela od 100 (FAI, 2010). Sadržaj ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana određen je po standardnoj AOAC (2000) metodi (Official Method No. 991.43). U osušenom i samlevenom tropu borovnice i maline, kao karakteristika prehrambenih vlakana određen je kapacitet zadržavanja vode (WHC) prema sledećem postupku: u 1 g uzorka, dodato je 10 ml vode i nakon 30 minuta mešanja na magnetnoj mešalici na 30 °C, uzorak je centrifugiran 30 minuta na 3000 o/min. Količina vezane vode izračunata je kao razlika mase uzorka pre i nakon ovog postupka, a vrednost WHC izražena je u g vode po g uzorka.

3.3.1.2. Određivanje sadržaja mineralnih materija metodom atomske apsorpcione spektrometrije (AAS)

Sadržaj minerala (Na, K, Ca, Mg, Fe i Zn) određen je pomoću atomskog apsorpcionog spektrofotometra Varian SpectrAA-10 (Varian Techtron Pty Limited, Mulgrave Victoria, Australija) uz pozadinsku korekciju (D2-lampa). Priprema uzoraka podrazumevala je suvo spaljivanje na 550 °C.

3.3.1.3. Određivanje sadržaja masnih kiselina metodom gasne hromatografije (GC-FID)

Ekstrakcija masti za potrebe određivanja sadržaja masnih kiselina izvršena je rastvaračem n-heksanom pod visokim pritiskom pomoću uređaja Dionex ASE 350 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) primenom sledećih parametara:

- temperatura ekstrakcije: 90 °C,
- vreme statičke ekstrakcije: 10 minuta,
- ispiranje ćelije sa rastvaračem na nivou 30% zapremine,
- trajanje ispiranja: 30 s,
- broj ciklusa: 1.

Odmereni uzorci (oko 1 g) pomešani su sa dijatomejskom zemljom u odnosu 1:1 (w/w) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) i preneti u čelične kivete za ekstrakciju zapremine 22 ml, u koje je prethodno postavljen celulozni filter. Rastvarač iz ekstrakata uklonjen uparavanjem na vakuum uparivaču (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švajcarska).

Pripremljeni uzorci podvrgnuti su transesterifikaciji u prisustvu bor(III)-fluorida (BF_3) prema proceduri opisanoj od strane Karlović i Andrić (1996). Kao rastvarač upotrebljen je n-heptan, a za inertizaciju i oslobađanje metil estara masnih kiselina od ostataka rastvarača primenjivano je uparavanje u struji azota. Gasno-hromatografska analiza metil-estara masnih kiselina (FAMES) je izvršena na GC uređaju Agilent 7890A sa plameno jonizujućim detektorom (eng. *flame ionization detector*, FID) i autoinjektujućim sistemom za tečnosti, na kapilarnoj koloni od mešane silike (Supelco SP-2560 Capillary GC Column 100 m x 0.25 mm, d = 0,20 μm). Kao gas nosač upotrebljen je helijum čistoće 99,9997 vol %, pri protoku od 1,26 ml/min. Uzorci su ubrizgavani u kolonu u takozvanom split režmu, čiji je odnos iznosio 30:1. Primenjeni temperaturni režim prikazan je na slici 12.

Pikovi metil estara masnih kiselina identifikovani su poređenjem retencionih vremena iz uzoraka sa retencionim vremenima smeše standarda "Supelco 37 component FAME mix" (Supelco, Bellefonte, SAD) kao i sa internim podacima dobijenim u prethodnim ispitivanjima masnih kiselina na gasnom hromatografu sa masenim detektorom. Količina pojedinih masnih kiselina dobijena je poređenjem površine pikova uzorka sa površinama pikova standarda masnih kiselina poznate koncentracije uz primenu korekcionih faktora (MAFF, 1998). Sadržaj masnih kiselina izražen je kao maseni udeo pojedine masne kiseline.

	Rate °C/min	Value °C	Hold Time min	Run Time min
▶ (Initial)		40	0.5	0.5
Ramp 1	25	195	5	11.7
Ramp 2	3	205	8.5	23.533
Ramp 3	9	230	15	41.311
*				

Slika 12. Temperaturni režim rada GC-FID pri analizi sastava masnih kiselina uzoraka

3.3.2. ODREĐIVANJE FUNKCIONALNIH KARAKTERISTIKA TROPA BOROVICE I MALINE

3.3.2.1. Određivanje sadržaja antocijana (pH diferencijalna i „singl“ pH metoda)

Ekstrakcija uzoraka za potrebe određivanja sadržaja monomernih i ukupnih antocijana sprovedena je prema proceduri opisanoj u radu De Brito i saradnika (2007) sa modifikacijom koja se odnosila na primenu 1% HCl u metanolu kao ekstragensa i korišćenje molarnog koeficijenta apsorpcije cijanidin-3-glukozida definisanog za ovaj ekstragens.

Sadržaj monomernih antocijana (ACY) određen je spektrofotometrijski primenom pH diferencijalne metode (Fuleki i Francis, 1968), koja se zasniva na osobini monomera antocijana da se pri pH 1,0 nalaze u obliku oksonijum jona (crveno obojeni), dok su pri pH 4,5 antocijani u poluketalnom obliku (bezbojni). Spektrofotometrijska merenja sprovedena su na spektrofotometru Jenway, 6405 UV/Vis (Bibby Scientific Ltd, Stone, Velika Britanija). Sam postupak sastojao se u sedećem: odmerena zapremina od 0,25 ml ekstrakta preneti je u dva odmerni suda od 10 ml, koji su zatim dopunjeni puferom pH 1, odnosno pH 4,5. Nakon 15 minuta izmerene su apsorbanije na 515 nm i 700 nm (zbog korekcije zamućenja). Puferi korišćeni u ovoj proceduri pripremljeni su na sledeći način:

- **pH 1**– mešanjem 50 ml 0,2 M rastvora HCl sa 97 ml 0,2 M rastvora KCl i dopunom do 200 ml destilovanom vodom;
- **pH 4,5** – rastvaranjem 1,64 g anhidrovanog CH₃COONa u 160 ml destilovane vode i dodatkom 1,15 ml glacijalne CH₃COOH;
 - podešavanjem pH i dopunom odmernog suda od 200 ml destilovanom vodom do crte.

Koncentracija monomernih antocijana (C_{mon}) u ekstraktima izračunata je kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida prema formuli:

$$C_{\text{mon}} = (A_{\text{mon}} \times M \times F \times 1000) / \varepsilon \times l \text{ (mg/l)} \quad (1)$$

gde je:

A_{mon} – apsorbanca razblaženog ekstrakta, koja je izračunata prema formuli:

$$A_{\text{mon}} = (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad (2)$$

$M = 449,2 \text{ g/mol}$ (molekulska masa cijanidin-3-glukozida)

F = faktor razblaženja ekstrakta

$\varepsilon = 34300 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (molarni koeficijent apsorpcije cijanidin-3-glukozida)

$l = 1 \text{ cm}$ (debljina kivete).

Određivanje sadržaja ukupnih antocijana (TACY) zasniva se na činjenici da je izmerena apsorbanca rastvora antocijana pri pH 1 proporcionalna sadržaju ukupnih antocijana. Princip određivanja zasnivao se na primeni tzv. „singl“ metode, čiji je postupak izvođenja identičan onom koji je opisan za određivanje sadržaja monomernih antocijana. Koncentracija ukupnih antocijana (C_{uk}) u ekstraktima izračunata je kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida prema formuli:

$$C_{\text{uk}} = (A_{\text{uk}} \times M \times F \times 1000) / \varepsilon \times l \text{ (mg/l)} \quad (3)$$

gde je:

$$A_{\text{uk}} = (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 1} \quad (4)$$

$M = 449,2 \text{ g/mol}$ (molekulska masa cijanidin-3-glukozida)

F = faktor razblaženja ekstrakta

$\varepsilon = 34300 \text{ lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (molarni koeficijent apsorpcije cijanidin-3-glukozida)

$l = 1 \text{ cm}$ (debljina kivete).

3.3.2.2. Priprema ekstrakata za određivanje ukupnih rastvorljivih polifenola, flavonoida i antiradikalske aktivnosti na DPPH[•]

Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz osušenog i samlevenog tropa borovnice i maline sprovedena je prema postupku definisanom od strane Larrauri i saradnika (1997a). Ukratko, 0,1 g uzorka ekstrahovan je sa 40 ml smeše metanol:voda (50:50, v:v) na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta. Nakon centrifugiranja na 2500 o/min u

trajanju od 15 minuta na Eppendorf Centrifuge 5804R (Hamburg, Nemačka), supernatant je prebačen u odmerni sud od 100 ml. Ekstrakcija je ponovljena na isti način sa 40 ml smeše aceton:voda (70:30, v:v), a dobijeni supernatant spojen je sa prethodnim i odmerni sud dopunjen do 100 ml destilovanom vodom.

3.3.2.3. Određivanje sadržaja ukupnih rastvorljivih polifenola

Sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola (TPC) u ekstraktima određen je spektrofotometrijski, primenom metode Singletona i saradnika (1999). Ova metoda zasnovana je na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon, koji redukuje Folin-Ciocalteu (FC) reagens (smeša Na_2WO_4 , Na_2MoO_4 , HCl , H_3PO_4 i LiSO_4) do plavo obojenog kompleksa.

Za potrebe određivanja ukupnih polifenola pripremljeni su vodeni rastvori Na_2CO_3 (20% w/w) i FC reagensa ($0,67 \text{ mol/dm}^3$). Postupak određivanja zasnivao se na pripremi sledećih reakcionih smeša:

- radna proba: 0,1 ml ekstrakta dobijenog prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.3.2.2., 7,9 ml destilovane vode, 0,5 ml FC reagensa i 1,5 ml rastvora Na_2CO_3 ;
- slepa proba: 8 ml destilovane vode, 0,5 ml FC reagensa i 1,5 ml rastvora Na_2CO_3 .

Nakon 2h izmerena je apsorbanca reakcione smeše na 750 nm (spektrofotometar Jenway, 6405 UV/Vis, Bibby Scientific Ltd, Stone, Velika Britanija).

Na osnovu izmerenih apsorbaneci, sa kalibracione krive konstruisane primenom serije rastvora galne kiseline (200-800 $\mu\text{g/ml}$) određena je masena koncentracija (mg/ml) polifenolnih jedinjenja u ekstraktima, a zatim je sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola u uzorcima izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE).

3.3.2.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u osušenom i samlevenom tropu borovnice i maline određen je metodom po Markhamu (1989). Ova metoda zasnovana je na osobini flavonoida da sa metalima daju odgovarajuće metalo-komplekse.

Za potrebe određivanja ukupnih flavonoida pripremljen je rastvor AlCl_3 (13,3 mg $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ i 40 mg CH_3COOH), kao i standardni rastvor rutina sledećih koncentracija: 0,5, 1,0, 2,5 i 5 $\mu\text{g/ml}$. Postupak određivanja zasnivao se na pripremi sledećih reakcionih smeša:

- radna proba: 5 ml ekstrakta dobijenog po proceduri opisanoj u 3.3.2.2., 1 ml destilovane vode i 2,5 ml reagensa AlCl_3 ;

- slepa proba: 3,5 ml vode i 5 ml ekstrakta (bez dodavanja reagensa AlCl_3).

Apsorbanca reakcione smeše izmerena je na 430 nm (spektrofotometar Jenway, 6405 UV/Vis, Bibby Scientific Ltd, Stone, Velika Britanija). Na osnovu razlike apsorbanci radne i slepe probe, sa kalibracione krive rutina, određena je koncentracija flavonoida. Dobijeni rezultati izraženi su u mg ekvivalenta rutina (RE) po 100 g uzorka.

3.3.2.5. LC-MS/MS analiza sadržaja polifenolnih jedinjenja

Priprema uzoraka za kvantifikaciju polifenolnih jedinjenja podrazumevala je maceraciju 1 g biljnog materijala sa 10 ml 80% (v/v) metanola u vodi uz konstantno mućkanje. Nakon 6h, ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir (Whatman No. 1, Whatman International Ltd., Maidstone, UK) da bi se uklonio biljni materijal. Rastvarač je uparen do suva na vakuum uparivaču (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švajcarska) pri temperaturi do 45 °C.

Kvantifikacija odabranih polifenolnih jedinjenja u funkcionalnim sastojcima dobijenim iz tropa borovnice i maline primenom LC-MS/MS tehnike sprovedena je po metodi koja je validovana i objavljena u radu Orčića i saradnika (2014). Ovom metodom obuhvaćeno je 45 polifenolnih jedinjenja iz sledećih klasa: derivati benzoeve i cimetine kiseline, aglikoni flavonoida, C- i O- glikozidi, kumarini i lignani. Korišćen je Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution tečni hromatograf (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, USA), kuplovan sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 4,6 mm x 50 mm x 1,8 μm (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, USA) reverzo-fazna kolona pri temperaturi od 45 °C. Mobilna faza sastojala se od 0,05% (v/v) mravlje kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 1ml/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, *post time* od 3 min.

Suvi ostatak dobijen prema gorenavedenoj proceduri, rekonstituisan je u 50% (v/v) metanolu u vodi do koncentracije 20 mg/ml i neposredno pre analize ekstrakti su profiltrirani kroz membranske filtere od regenerisane celuloze (dijametar 25 mm, veličina pora 0,45 μm , Econofilters, Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, USA). Injektovana zapremina uzoraka bila je 5 μL . Parametri jonskog izvora bili su:

- temperatura gasa za sušenje (N_2): 350 °C,
- protok gasa za sušenje: 9 l/min,
- pritisak gasa nebulajzera: 40 psi,
- napon na kapilari: 4 kV,

- polaritet: negativan.

Jedinjenja su praćena u dinamičkom MRM (eng. *multiple reactions monitoring*) modu. Ostali optimizovani parametri (napon fragmentora, napon kolizione ćelije), za jedinjenja detektovana u uzorcima, dati su u prilogu 3 i 4.

3.3.2.6. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja tropa borovnice rastvaraćima pod povišenim pritiskom (ASE)

Kao tehnika sa sve većim potencijalom za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora, ekstrakcija rastvaraćima pod povišenim pritiskom primenjena je na osušenom i samlevenom tropu borovnice u cilju ispitivanja potencijala za dobijanje ekstrakata sa mogućnošću primene u prehrambenoj i/ili farmaceutskoj industriji.

Odmereni uzorci (oko 0,2 g) pomešani su sa dijatomejskom zemljom u odnosu 1:1 (w/w) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) i preneti u ćelićne kivete za ekstrakciju zapremine 22 ml, u koje je prethodno postavljen celulozni filter. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja izvršena je rastvaraćima pod povišenim pritiskom pomoću uređaja Dionex ASE 350 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) primenom sledećih parametara:

- rastvarać: voda,
- temperatura ekstrakcije: 100 °C,
- vreme statičke ekstrakcije: 10 minuta,
- ispiranje ćelije sa rastvaraćem na nivou 30% zapremine,
- trajanje ispiranja: 30 s,
- broj ciklusa: 1.

3.3.2.7. Određivanje antiradikalske aktivnosti ekstrakata na DPPH'

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH') je stabilan radikal sa maksimumom apsorpcije na 517 nm. Antioksidanti, donori vodonika u reakciji sa DPPH radikalima vrše njihovu redukciju do žuto obojenog difenilpikrilhidrazina, što dovodi do smanjenja apsorpcije na 517 nm. Antiradikalska aktivnost ekstrakata na DPPH' određena je spektrofotometrijski primenom metode Sedej i saradnici (2011).

Ekstrakti pripremljeni prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.3.2.2. razblaženi su metanolom, pri čemu je dobijena serija razblaženja 5-20 puta. Postupak određivanja antiradikalske aktivnosti ekstrakata zasnivao se na pripremi sledećih reakcionih smeša:

- radna proba: 0,1 ml ekstrakta, 2,9 ml metanola i 1 ml rastvora DPPH' (90 µM);

- kontrola: 3 ml metanola i 1 ml rastvora DPPH[•] (90 μM);
- slepa proba: 0,1 ml ekstrakta, 3 ml metanola.

Reakciona smeša je ostavljena na tamnom mestu, na sobnoj temperaturi, 60 min. Absorbanca je očitana na 517 nm (spektrofotometar Jenway, 6405 UV/Vis, Bibby Scientific Ltd, Velika Britanija). Na osnovu izmerenih apsorbanci uzorka (A_{uz}), kontrole (A_{kont}) i slepe probe (A_{sp}), određena je antiradikalska aktivnost na DPPH[•] ($AA_{DPPH^{\bullet}}$) prema jednačini:

$$AA_{DPPH^{\bullet}}(\%) = 100 - [100 \times (A_{uz} - A_{sp}) / A_{kont}] \quad (5)$$

Konstruisana je kriva zavisnosti između $AA_{DPPH^{\bullet}}$ (%) i koncentracije rastvora ekstrakta u cilju određivanja vrednosti IC_{50} (mg/ml), koja predstavlja koncentraciju ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50% DPPH[•].

3.3.2.8. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata tropa borovnice na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Za potrebe ESR spektralne analize, ekstrakti osušenog i samlevenog tropa borovnice pripremljeni su prema proceduri 3.3.2.5. i 3.3.2.6 i upareni do suva na vakuum uparivaču (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švajcarska) pri temperaturi do 45 °C. Rastvor koji sadrži superoksid anjon radikale pripremljen je rastvaranjem KO_2 /kraunetar (10 mM/20 mM) u bezvodnom dimetilsulfoksidu (DMSO). Reakciona smeša se sastojala od 5 μl ove smeše, 0,5 ml osušenog DMSO i 5 μl rastvora DMPO u DMSO (2 M) (slepa proba). Uticaj ekstrakata na formiranje i transformaciju njihovih DMPO-OOH „spin adukata“ ispitana je dodavanjem dimetilformamidnih (DMF) rastvora ekstrakata tropa borovnice, u reakcionu sistem u opsegu koncentracija 1 – 3,5 mg/ml.

Paralelno je ispitan i uticaj sintetičkog antioksidanta BHA na transformaciju superoksid anjon radikala, u opsegu koncentracija 0,1 – 3,0 mg/ml.

Reakcione smeše su prenete u Bruker ER-160FC kvarcnu kivetu. ESR spektri su snimani na sobnoj temperaturi na ESR spektrometru Bruker 300E (Rheinstetten, Nemačka), pri sledećim uslovima:

- frekvencija modulacije 100 kHz,
- amplituda modulacije 4,00 G,
- vremenska konstanta 40,96 ms,
- vremenski opseg merenja 327,68 ms,
- centar polja 3440,00 G,

- ukupan opseg merenja 100,00 G,
- frekvencija mikrotalasnog područja 9,64 GHz,
- jačina struje 1,00 x 10⁴,
- snaga mikrotalasnog područja 20 mW,
- temperatura merenja 23 °C.

Antiradikalska aktivnost (AA_{02••}) ekstrakata tropa borovnice definisana je izrazom:

$$AA_{02\bullet\bullet} = (h_0 - h_x) / h_0 \times 100 (\%) \quad (6)$$

gde je:

h_0 – visina drugog pika ESR signala slepe probe;

h_x – visina drugog pika ESR signala uzorka sa ekstraktom ili sa BHA.

3.3.2.9. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata tropa borovnice na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala

Za potrebe ESR spektralne analize, ekstrakti osušenog i samlevenog tropa borovnice pripremljeni su prema proceduri 3.3.2.5. i 3.3.2.6 i upareni do suva na vakuum uparivaču (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švajcarska) pri temperaturi do 45 °C. Hidroksil radikali dobijeni su u Fentonovoj reakciji i detektovani „spin trapping“ metodom u sistemu koji se sastojao od: 0,2 ml DMPO (112 mM) kao „spin trapa“, 0,2 ml N,N-dimetilformamida (DMF), 0,2 ml H₂O₂ (2 mM) i 2 µl FeCl₂ (0,3 mM) (slepa proba). Uticaj ekstrakata tropa borovnice na koncentraciju „spin adukata“ hidroksil radikala ispitan je dodavanjem njihovih dimetilformamidnih rastvora ekstrakata tropa borovnice u reakcioni sistem u opsegu koncentracija 0 – 5 mg/ml.

Paralelno je ispitan i uticaj sintetičkog antioksidanta BHA na transformaciju „spin adukata“ hidroksil radikala, u opsegu koncentracija 0,01 – 3,0 mg/ml.

Smeša je prenetu u Bruker ER-160 FC kvarcnu kivetu. ESR spektri su snimani na sobnoj temperaturi na ESR spektrometru Bruker 300E (Rheinstetten, Nemačka), pri sledećim uslovima:

- frekvencija modulacije 100 kHz,
- amplituda modulacije 0,226 G,
- vremenska konstanta 80,72 ms,
- vremenski opseg merenja 327,68 ms,
- centar polja 3440,00 G,

- ukupan opseg merenja 100,00 G,
- frekvencija mikrotalasnog područja 9,64 GHz,
- jačina struje 5,00 x 10⁵,
- snaga mikrotalasnog područja 20 mW,
- temperatura merenja 23 °C.

Antiradikalska aktivnost (AA_{•OH}) ekstrakata tropa borovnice definisana je izrazom:

$$AA_{\bullet OH} = (h_o - h_x)/h_o \times 100 (\%) \quad (7)$$

gde je:

h_o – visina drugog pika ESR signala slepe probe;

h_x – visina drugog pika ESR signala uzorka sa ekstraktom ili sa BHA.

3.3.3. ODREĐIVANJE FUNKCIONALNIH KARAKTERISTIKA PROIZVEDENOG BEZGLUTENSKOG KEKSA

U proizvedenim uzorcima bezglutenskog keksa (formulacije 1-9), kao i u kontrolnom keksu određen je: sadržaj monomernih antocijana prema postupku definisanom u poglavlju 3.3.2.1., sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola prema postupku datom u poglavlju 3.3.2.3. i antiradikalska aktivnost na DPPH' prema postupku iz poglavlja 3.3.2.7. U poslednjoj proceduri jedina izmena odnosila se na pripremu serije razblaženja 1-4 puta, u odnosu na tropove kod kojih je pripremljena serija razblaženja 5-20 puta.

3.3.4. ODREĐIVANJE a_w VREDNOSTI TROPA BOROVNICE I MALINE I PROIZVEDENOG BEZGLUTENSKOG KEKSA

Glavni uzročnici kvarenja hrane su mikroorganizmi, a njihov rast i razvoj u potpunosti zavisi od količine vode u tečnom stanju. Voda se u namirnicama nalazi u slobodnom i "vezanom" obliku. Slobodnom vodom naziva se deo ukupne vode koja se ponaša kao rastvarač i koja je time na raspolaganju mikroorganizmima za hemijske/biohemijske reakcije u njihovim ćelijama (Duraković i sar., 2002). Vrednost aktivnosti vode (a_w) nekog proizvoda pokazuje u kojoj meri je voda dostupna mikroorganizmima za rast i umnožavanje, odnosno za njihove metaboličke procese.

a_w vrednost tropa borovnice i maline, kao i proizvedenog bezglutenskog keksa određena je pomoću a_w -metra Testo 650 (Testo AG, Sparta, NJ, SAD), koji se sastoji iz sonde, merne ćelije i plastične merne posude, a merenje se zasniva na očitavanju vrednosti na displeju uređaja.

3.3.5. ODREĐIVANJE REOLOŠKIH OSOBINA TESTA ZA KEKS

Nakon pripreme i homogenizacije, reološko ponašanje testa za keks praćeno je uz pomoć reometra HAAKE Mars (Thermo Scientific, Dreieich, Nemačka) na temperaturi od $23 \pm 0,1$ °C. U cilju prevencije efekta proklizavanja uzorka korišćen je nazubljeni merni pribor ploča/ploča PP35S (prečnika 35 mm). Uzorci testa za keks, koji su prethodno odležavali 24 h na temperaturi od 8 °C, uzimani su iz centralnog dela testane mase i komprimovani brzinom od 0,3 mm/min do razmaka između ploča od 2 mm. Višak uzorka je odstranjen, a na izložene ivice naneto je parafinsko ulje kako bi se sprećilo isušivanje uzorka u toku merenja.

Dinamićka oscilatorna merenja, koja su korišćena za reološku karakterizaciju testa za keks, izvođena su 600 s nakon nanošenja uzorka između ploča reometra kako bi došlo do relaksacije uzorka, usled stresa unetog spuštanjem gornje ploče. U cilju određivanja linearnog viskoelastićnog regiona, primenjen je tzv. *stress sweep* test koji je podrazumevao ciklično povećavanje napona pri konstantnoj frekvenciji od 1 Hz. Kao granica linearnog viskoelastićnog regiona uzeta je vrednost pri kojoj se dinamićki viskoelastićni moduo nije promenio za više od 10% od svoje konstantne vrednosti. Korišćenjem konstantne vrednosti napona koja je bila u linearnom viskoelastićnom regionu (10 Pa), izvršeno je praćenje promene elastićnog (G') i viskoznog (G'') modula u rasponu frekvencija od 0,1 do 10 Hz (tzv. *frequency sweep* test).

Rezultati *frequency sweep* testa, tj. zavisnost modula od frekvencije (logaritamski prikaz) modelovani su jednaćinom stepenog zakona:

$$G' = K' f^{n'} \quad (8)$$

$$G'' = K'' f^{n''} \quad (9)$$

gde su K' i K'' – koeficijenti koji odgovaraju vrednosti modula G' , odnosno G'' na 1 Hz (Peressini i sar., 2000), a n' i n'' – koeficijenti koji predstavljaju nagib krive (Sivaramakrishnan i sar., 2004).

3.3.6. ODREĐIVANJE FIZIČKIH OSOBINA BEZGLUTENSKOG KEKSA

3.3.6.1. Određivanje tehnoloških parametara kvaliteta bezglutenskog keksa

Tehnološki parametri kvaliteta određeni su na uzorcima bezglutenskog keksa specijalno proizvedenih za potrebe izvođenja ovih merenja, kako bi se zadovoljili zahtevi dati u metodi AACC 10-50D (1999). Merenja dimenzija sprovedena su na uzorcima keksa dobijenim primenom okruglog kalupa, a obuhvatala su merenje prečnika keksa u pravcu laminiranja (eng. *length* – L), normalnom na pravac laminiranja (eng. *width* – W) i merenje debljine (eng. *thickness* – T). Merene su dimenzije šest keksova iz svake grupe uzoraka, a iz izmerenih veličina izračunati su parametri koji ukazuju na deformacije nastale pečenjem:

- odnos W/T (širenje),
- odnos W/L koji je merilo odstupanja od idealno kružnog oblika,
- kontrakcija testa u pravcu laminiranja (%L),
- širenje u pravcu normalnom na pravac laminiranja (%W).

Poslednja dva parametra izračunata su primenom sledećih formula (Pedersen i sar., 2005):

$$\% L = (D_m - L) / D_m \times 100 \quad (10)$$

$$\% W = (W - D_m) / D_m \times 100 \quad (11)$$

gde je D_m prečnik kalupa (60 mm).

Gubitak mase usled pečenja (eng. *baking weight loss* – BWL) određen je merenjem mase keksa (n=8) pre i nakon pečenja, a izračunat je po formuli:

$$BWL(\%) = ((m_0 - m_t) / m_0) \times 100 \quad (12)$$

gde je:

m_0 – inicijalna masa keksa pre pečenja (g);

m_t – masa keksa nakon pečenja (g).

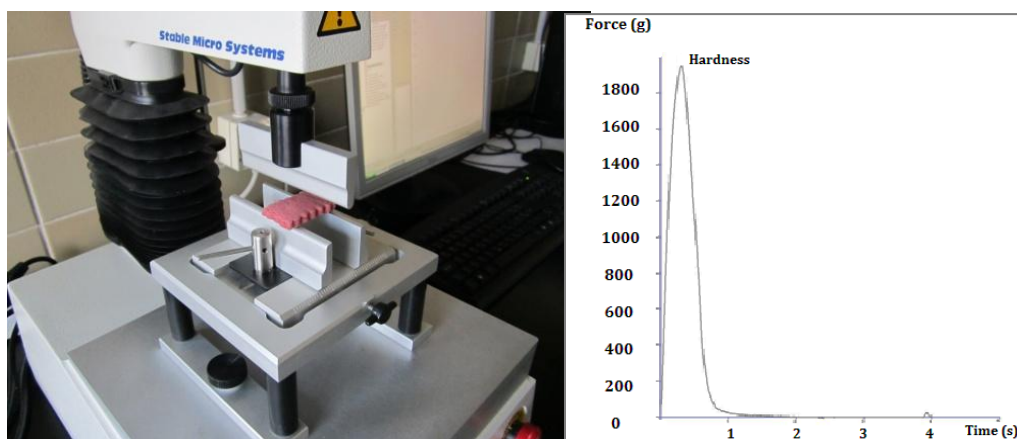
3.3.6.2. Instrumentalno određivanje teksturnih svojstava

Teksturne karakteristike bezglutenskog keksa određene su primenom analizatora teksture TA-XTPlus Texture Analyzer TA.XT2 (Stable Micro Systems, Surrey, Velika Britanija) korišćenjem nastavka 3-Point Bending Rig HDP/3PB (Slika 13a). Uzorci su

izloženi sili kompresijske sonde, primenom merne ćelije od 30 kg, podešavanjem sledećih parametara:

- brzina sonde pre analize 1,0 mm/s,
- brzina sonde tokom analize 3,0 mm/s,
- brzina sonde nakon analize 10,0 mm/s,
- rastojanje 7,0 mm,
- sila okidanja 50 g.

Primenom računarskog programa (Exponent Stable Micro Systems, version 6.0), snimljena je zavisnost sile potrebne za kompresiju uzorka u funkciji od vremena. Za poređenje teksturnih svojstava različitih formulacija bezglutenskog keksa korišćen je parametar čvrstoća (eng. *hardness* – H) koja predstavlja visinu pika (Slika 13b) izraženu u jedinicama sile (N) ili mase (g) u funkciji od vremena (s). Merenja su sprovedena u 7 ponavljanja, 24h nakon pečenja keksa.



Slika 13. Određivanje teksturnih svojstava bezglutenskog keksa: a) Izgled analizatora teksture TA-XTPlus Texture Analyzer TA.XT2; b) Izgled krive

3.3.6.3. Instrumentalno određivanje boje

Boja funkcionalnih sastojaka (osušenog i samlevenog tropa) i proizvedenog bezglutenskog keksa određena je u deset ponavljanja upotrebom kolorimetra Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) i odgovarajućeg nastavka (CR-A33b) sa staklenom zaštitom, prilagođenog za merenja ovakve vrste uzoraka (Slika 14b). Pre merenja izvršena je kalibracija kolorimetra standardom bele boje. Rezultati su prezentovani prema CIELab sistemu boja (Slika 14a), gde su koordinate definisane na sledeći način: L^* je koordinata svetloće boje (gde 0 označava crno, a 100 belo), a^* je udeo crvene/zelene boje (gde $a^* > 0$ označava crvenu i $a^* < 0$

označava zelenu boju) i b^* je udeo žute/plave boje (gde $b^* > 0$ označava žutu i $b^* < 0$ označava plavu boju).

Imajući u vidu moguće promene boje tokom skladištenja, parametri boje keksa mereni su 24h nakon pečenja (L^*_1 , a^*_1 i b^*_1), kao i nakon šest meseci skladištenja u metaliziranoj polipropilenskoj ambalaži pri ambijentalnim uslovima (L^*_2 , a^*_2 i b^*_2). Na osnovu merenja navedenih parametara izračunata je ukupna razlika boje (ΔE) prema sledećoj formuli:

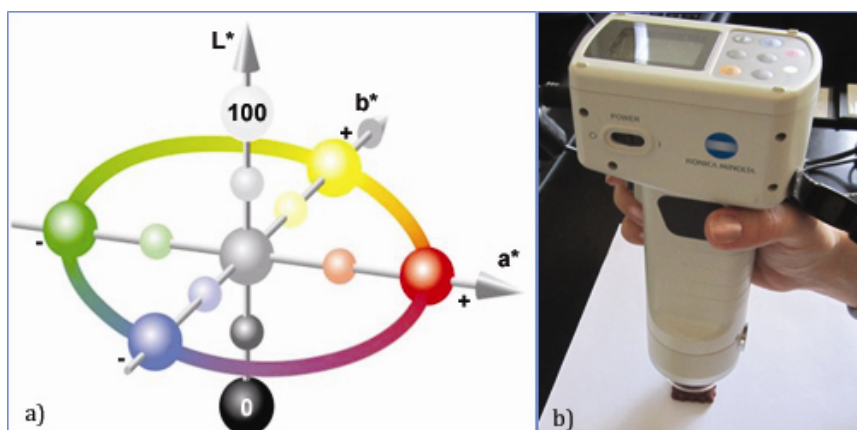
$$\Delta E = \sqrt{(L^*_2 - L^*_1)^2 + (a^*_2 - a^*_1)^2 + (b^*_2 - b^*_1)^2} \quad (13)$$

Na osnovu vrednosti ΔE , Francis i Clydesdale (1975) kategorizovali su razlike u boji na sledeći način:

- $\Delta E < 1$ – razlika u boji nije uočljiva ljudskim okom,
- $1 < \Delta E < 3$ – razlika u boji nije značajna za ljudsko oko,
- $\Delta E > 3$ – razlika u boji je uočljiva ljudskim okom.

Popov Raljić i sar. (2013) definisali su užu skalu vrednosti ΔE , pa su, prema ovim autorima razlike u boji kategorizovane na sledeći način:

- neprimetna (0–0,5),
- slabo primetna (0,5–1,5),
- primetna (1,5–3,0),
- jače primetna (3,0–6,0),
- veoma primetna (6,0–12,0) i
- očigledno odstupanje u boji ($> 12,0$).



Slika 14. a) Prikaz CIELab sistema boja; b) Merenje boje bezglutenskog keksa pomoću kolorimetra Minolta Chroma Meter CR-400

3.3.7. SENZORSKA OCENA BEZGLUTENSKOG KEKSA UZ PRIMENU PANELA UTRENIRANIH OCENJIVAČA

Senzorska ocena uzoraka bezglutenskog keksa sprovedena je u Laboratoriji za senzorske i tehničke analize Laboratorije za tehnologiju, kvalitet i bezbednost hrane, koja je opremljena u skladu sa važećim standardom (ISO 8589:2007) i koja je pod konstantnim i kontrolisanim uslovima temperature, vlage, buke i mirisa, kako bi uticaj psiholoških činilaca na sposobnosti rada ocenjivača bio minimalan.

U cilju dobijanja senzorskog profila novokreiranih uzoraka bezglutenskog keksa, sprovedena je objektivna senzorska ocena uz primenu panela utreniranih ocenjivača. Budući da u senzorskoj oceni panel predstavlja „merni instrument“, odabir potencijalnih ocenjivača napravljen je nakon obuke i testiranja kandidata prema važećim standardima za odabir, obuku i proveru čula članova panela (ISO 6658:2005, SRPS EN ISO 8586:2015, SRPS ISO 3972:2011, ISO 5496:2006, SRPS ISO 11037:2013, SRPS ISO 11036:2002, ISO 8587:2006). Panel ocenjivača sastojao se od sedam članova starosne kategorije između 35 i 50 godina. Ocenjivačima su uzorci dostavljani u zasebne kabine (Slika 15d), u kojima se pored uzoraka nalazio i pribor za ocenjivanje (ocenjivački list, pribor za pisanje, tacna, ubrus) i čaša sa destilovanom vodom za ispiranje usta između dva uzastopna uzorka. Uzorci su dostavljani svim ocenjivačima u isto vreme i bili su označeni nasumično odabranim trocifrenim šiframa, što je sa jedne strane obezbedilo identifikaciju i sledljivost rezultata ocenjivanja, a sa druge strane omogućilo da se izbegne potencijalna pristrasnost pri oceni. Ocenjivačima su tokom sesija prezentovani ocenjivački listovi dati u prilogu 5. koji su sadržali i detaljno definisan postupak senzorske ocene.

Senzorska ocena sprovedena je uz primenu metode bodovanja. Odabir svojstava za senzorsko profilisanje novokreiranih uzoraka bezglutenskog keksa prethodno je utvrđen od strane vođe panela, u skladu sa odgovarajućim standardom (SRPS EN ISO 13299:2012) i literaturnim podacima. Kako bi senzorska ocena bila sprovedena na isti način od strane svih članova panela, organizovan je odgovarajući broj sesija (3 x 1,5 h) na kojima su prezentovani nivoi kvaliteta za svako pojedinačno svojstvo (izgled celog keksa, izgled na prelomu, tekstura pri prvom zagrizu, tekstura pri žvakanju, miris, ukus, aroma) i pojedinačnu vrednost boda, uz prezentovanje odgovarajućih referentnih uzoraka (Slika 15 a,b).

Za izražavanje intenziteta odabranih svojstava, korišćena je skala sa rasponom 1-5. S obzirom da od odabranih svojstava ne doprinose sva u istoj meri krajnjoj oceni proizvoda, utvrđeni su i koeficijenti važnosti (KV) za svako pojedinačno svojstvo (1 za

izgled celog keksa; 1 za izgled na prelomu; 1,5 za teksturu pri prvom zagrizu; 2 za teksturu pri žvakanju; 1,5 za miris; 1,5 za ukus i 2,5 za aromu). Srednje vrednosti ocene svakog svojstva, pomnožene sa koeficijentom važnosti, služile su za dobijanje krajnje ocene keksa, koja je izražena kao kvalitetni broj (KB) i izračunata je po sledećoj formuli:

$$KB = \frac{\sum x_i \times KV}{10} \quad (14)$$

gde je:

X_i – srednja vrednost ocene senzorskog svojstva od strane panela; $i=1-7$,

KV – koeficijent važnosti za svako ispitivano svojstvo.

Senzorska ocena ponovljena je 2 puta u razmaku od jednog dana, a rezultat je izražen kao srednja vrednost KB iz dve sesije \pm standardna devijacija.

Na osnovu vrednosti KB i prethodno utvrđenih kriterijuma, keksovi su podeljeni u četiri kvalitetne kategorije: KB < 2,5 *nezadovoljavajuć kvalitet*; KB od 2,5 do 3,5 – *dobar kvalitet*; KB od 3,5 do 4,5 – *vrlo dobar kvalitet*; KB 4,5 do 5,0 – *odličan kvalitet*.



Slika 15. Senzorska ocena bezglutenskog keksa: a) referentni uzorci i pribor za ocenjivanje; b) šifrirani uzorci; c) panel utreniranih ocenjivača u radu; d) izgled kabina u kojima je sprovedena senzorska ocena

3.3.8. MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST BEZGLUTENSKOG KEKSA

3.3.8.1. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama

Ukupan broj mikroorganizama je određen prema standardnoj metodi SRPS EN ISO 4833-1:2014. Metoda se zasniva na zasejavanju pripremljenih razređenja uzoraka u sterilne Petri ploče, nalivanju agara za ukupan broj bakterija i inkubiranju na 30 ± 1 °C, tokom 72 h.

Nakon završetka inkubiranja selektuju su ploče koje sadrže manje od 300 kolonija i na osnovu broja izraslih kolonija izračunava se broj mikroorganizama u 1 g uzorka.

3.3.8.2. Izolovanje i određivanje broja kserofilnih plesni

Određivanje broja kserofilnih plesni (koje rastu pri $a_w < 0,70$) je izvršeno primenom podloge – Sladni ekstrakt kvasac ekstrakt 50% glukoza agar (MY50G) (Pitt i Hocking, 2009; Samson i sar., 2004). 0,1 ml pripremljenih razređenja uzoraka u 0,1% sterilnom rastvoru peptonske vode je zasejan na površinu MY50G agara. Zasejane podloge su inkubirane na 25 °C, tokom 7 dana.

Nakon završetka inkubiranja selektovane su ploče koje sadrže manje od 150 kolonija plesni i na osnovu broja izraslih kolonija plesni izračunat je broj kserofilnih plesni u 1 g uzorka.

3.3.8.3. Izolovanje i određivanje broja osmofilnih kvasaca

Određivanje broja osmofilnih kvasaca je izvršeno primenom podloge – MY40 Agar (Osmophilic Agar) (Himedia, Mumbai, Indija). 0,1 ml pripremljenih razređenja uzoraka u 0,1% sterilnom rastvoru peptonske vode zasejan je na površinu MY40 agara. Zasejane podloge su inkubirane na 25 °C tokom 3 dana.

Nakon završetka inkubiranja selektovane su ploče koje sadrže manje od 150 kolonija kvasaca i na osnovu broja izraslih kolonija izračunat je broj osmofilnih kvasaca u 1 g uzorka.

3.3.9. DIJETETSKA INTERVENTNA STUDIJA

Ispitivanje efekta kreiranog bezglutenskog keksa sprovedeno je u okviru dijetetske interventne studije na grupi od 20 zdravih, normalno uhranjenih ispitanika ženskog pola, starosne dobi od 30-50 godina ($41,35 \pm 8,58$ god). Režim ishrane se tokom trajanja studije (4 nedelje) nije menjao, osim što su ispitanice u ishranu uvrstile i kreirani keks.

Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom i odobrena je od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Vojvodine, Novi Sad, Srbija (broj odobrenja 00-01/825/2011).

Antropometrijska merenja (visina, težina) služila su za određivanje indeksa telesne mase (BMI) pre i nakon studije. Biohemijski parametri krvi: ukupni, LDL- i HDL-holesterol, trigliceridi, glukoza, AST, ALT, urea, kreatinin i adiponektin određeni u medicinskoj laboratoriji „Eurolab“, Novi Sad i laboratoriji Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu.

3.3.10. EKSPERIMENTALNI PLAN I STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi eksperimenti u okviru disertacije izvedeni su u dovoljnom broju ponavljanja (tri i više), a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Utvrđivanje statističke značajnosti razlika između aritmetičkih sredina sprovedeno je primenom analize varijanse (ANOVA) i Tukey HSD (*Honest Significant Difference*) testa sa pragom značajnosti 0,05. Podaci su obrađeni primenom softverskih paketa Microsoft Excel 2007 for Windows i StatSoft Statistica (data analysis software system), version 9.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, SAD).

Analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis* – PCA) sprovedena je na pojedinim podacima u cilju vizuelizacije korelativnih odnosa između odabranih promenljivih i ispitivanih uzoraka, primenom softvera StatSoft Statistica i softvera XLSTAT (Addinsoft, 2013. NY, SAD).

Optimizacija formulacije bezglutenskog keksa sprovedena je primenom *Simplex lattice* dizajna smeše kao eksperimentalnog plana, a optimalan odnos funkcionalnih sastojaka – tropa borovnice i maline utvrđen je primenom funkcije poželjnosti (eng. *desirability function*) u softverskom paketu DESIGN-EXPERT 7.0 (Stat-Ease, Minneapolis, Inc., USA).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. NUTRITIVNI PROFIL OSUŠENOG I SAMLEVENOG TROPA BOROVNICE I MALINE

Uporedo sa porastom interesovanja ljudi za pravilnu ishranu i prevenciju različitih bolesti, raste i trend obogaćivanja prehrambenih proizvoda funkcionalnim sastojcima, koji kroz različite fiziološke funkcije u ljudskom organizmu, unapređuju zdravstveni aspekt ishrane. Sporedni proizvodi industrijske prerade voća i povrća, kao jeftini izvori visokovrednih biološki aktivnih jedinjenja i njihova revalorizacija u pravcu dobijanja funkcionalnih sastojaka, jedne su od savremenih tema u naučnoj literaturi. Poseban akcenat stavlja se na iskorišćenje ovih sporednih proizvoda za dobijanje funkcionalnih sastojaka bogatih prehrambenim vlaknima.

Sušenjem i mlevenjem industrijskog tropa borovnice i maline, dobijeni su funkcionalni sastojci sa veoma visokim sadržajem prehrambenih vlakana, a rezultati osnovnog hemijskog sastava sumirani su u tabeli 5. Poređenjem nutritivnog profila ova dva funkcionalna sastojka može se zaključiti da je sadržaj većine nutrijenata u njima sličan, s tom razlikom što je trop borovnice bogatiji prehrambenim vlaknima, dok je u tropu maline značajno veći sadržaj masti (za oko 60%), što je posledica visokog udela semena (57 do 76%) u ovom tropu (Buckley, 1985).

Tabela 5. Hemijski sastav (g/100 g) i energetska vrednost (kcal/100 g) osušenog i samlevenog tropa borovnice i maline

Parametar	TB	TM
Sirovi proteini	9,77 ± 0,04	9,76 ± 0,03
Masti	6,59 ± 0,01	10,57 ± 0,21
Zasićene masne kiseline	0,67 ± 0,08	0,87 ± 0,06
Ukupni ugljeni hidrati	75,31 ± 0,06	71,30 ± 0,17
Šećeri	19,41 ± 0,07	18,60 ± 0,72
Prehrambena vlakna	52,50 ± 1,03	49,10 ± 1,25
Vlaga	6,92 ± 0,05	6,55 ± 0,02
Pepeo	1,40 ± 0,01	1,47 ± 0,04
Energetska vrednost	294,70 ± 1,89	321,00 ± 1,65

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija

TB – trop borovnice; TM – trop maline

U cilju potencijalne primene u ishrani životinja, McDougall i Beames (1994) su ispitivali nutritivni profil tropa maline, a dobijeni rezultati (11,1% masti, 10,0% proteina i 59,5% prehrambenih vlakana, izraženo na suhu materiju) veoma su bliski vrednostima dobijenim u okviru ove teze. Koristeći trop maline za obogaćivanje prehrambenih proizvoda, Górecka i saradnici (2010) ustanovili su značajno veći sadržaj prehrambenih vlakana u odnosu na vrednost dobijenu u okviru ove teze ($77,5 \pm 0,2\%$ s.m. u poređenju sa $52,50 \pm 1,34\%$ s.m.), što može biti posledica različitog načina dobijanja tropa i/ili sortnih razlika same maline. Ipak, u sastavu prehrambenih vlakana nema značajnijih razlika, s obzirom da je udeo nerastvorljivih (IDF) u ukupnim (TDF) prehrambenim vlaknima iznosio 96% (Tabela 6), dok je u radu Górecka i saradnika (2010) ova vrednost iznosila 97%.

U dostupnoj naučnoj literaturi funkcionalna svojstva tropa borovnice ispitivana su sa aspekta njegove antioksidativne aktivnosti (Gao i Er-Feng, 2010; Khanal i sar., 2010), dok podaci o sadržaju prehrambenih vlakana i nutritivnom profilu ovog tropa nisu do sada objavljeni. Osušen i samleven trop borovnice sadrži za oko 7,5% više prehrambenih vlakana u odnosu na trop maline, a IDF čine 97% od ukupnih prehrambenih vlakana. Ipak, u ovom tropu utvrđena je značajno veća vrednost kapaciteta zadržavanja vode –

WHC (za oko 46%), u poređenju sa osušenim i samlevenim tropom maline (Tabela 6). Hidrataciona svojstva prehrambenih vlakana zavise od hemijske strukture, broja hidroksilnih grupa, veličine i poroznosti čestica, ali pre svega od izvora iz kog su izolovana (Elleuch i sar., 2011). Primenujući isti postupak mlevenja na koncentrate sa približno istim sadržajem vlakana dobijene iz različitih biljnih materijala, Rabetafika i saradnici (2014) utvrdili su značajnu razliku u njihovim hidratacionim svojstvima. U tom smislu, različit kapacitet zadržavanja vode ispitivanih funkcionalnih sastojaka dobijenih iz tropa borovnice i maline, najverovatnije je posledica razlika u hemijskoj strukturi polisaharidnih komponenti prehrambenih vlakana, tj. u broju hidroksilnih grupa koje mogu da formiraju vodonične veze sa molekulima vode. Analizirajući koncentrate vlakana dobijenih postupcima sušenja i mlevenja kore citrusa i tropa jabuke, Figuerola i saradnici (2004) dobili su vrednosti WHC u opsegu od 1,62 do 2,20 g/g. Kako su postupak dobijanja i veličina čestica u ovim koncentratima bili veoma slični postupku dobijanja, odnosno granulaciji osušenog i samlevenog tropa borovnice i maline, moguće je bilo uporediti njihova hidrataciona svojstva. Trop borovnice pokazao je bolja hidrataciona svojstva u poređenju sa vlaknima iz kore citrusa i tropa jabuke, što je od velikog značaja sa tehnološkog aspekta i čini ovaj funkcionalni sastojak pogodnim za aplikaciju u mnoge prehrambene proizvode.

Tabela 6. Sadržaj ukupnih (TDF), rastvorljivih (SDF) i nerastvorljivih (IDF) prehrambenih vlakana i kapacitet zadržavanja vode (WHC) osušenog i samlevenog tropa borovnice i maline

Parametar	TB	TM
TDF (g/100 g s.m.)	56,41 ± 1,11	52,51 ± 1,34
SDF (g/100 g s.m.)	1,70 ± 0,43	2,12 ± 0,37
IDF (g/100 g s.m.)	54,72 ± 0,43	50,41 ± 1,42
WHC (g/g)	3,07 ± 0,06	2,10 ± 0,07

TB – trop borovnice; TM – trop maline

Komercijalno dostupne funkcionalne sastojke bogate vlaknima dobijene iz voća karakterišu: sadržaj prehrambenih vlakana >50%, sadržaj vlage <9%, sadržaj masti <10% i niska energetska vrednost (<300 kcal/100g) (Larrauri, 1999). U tom smislu, osušen i samleven trop borovnice u potpunosti zadovoljava navedene kriterijume, dok se sušenjem i mlevenjem tropa maline dobija proizvod koji od navedenih kriterijuma

odstupa po sadržaju masti ($10,57 \pm 0,21\%$) i energetskej vrednosti ($321,0 \pm 1,65$ kcal/100 g). Ipak, analiza sastava masnih kiselina ovog funkcionalnog sastojka (Tabela 7) pokazala je visok procenat polinezasićenih masnih kiselina (77,9% u ukupnim mastima), koje se, imajući u vidu dokazane pozitivne zdravstvene efekte, takođe ubrajaju u grupu funkcionalnih jedinjenja.

Tabela 7. Sadržaj masnih kiselina (g/100 g) osušenog i samlevenog tropa borovnice i maline

Masna kiselina	TB	TM
C12:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
C14:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
C16:0	0,48 ± 0,01	0,39 ± 0,04
C16:1	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00
C18:0	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,02
C18:1t	-	-
C18:1c	1,55 ± 0,01	1,43 ± 0,10
C18:2t	-	-
C18:2c (LA)	2,41 ± 0,01	5,40 ± 0,73
C20:0	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,00
C18:3n3 (LNA)	1,90 ± 0,05	2,63 ± 0,35
C20:1	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01
C21:0	-	0,25 ± 0,03
C22:0	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
C20:5n3	0,05 ± 0,01	0,20 ± 0,01
MUFA	1,57 ± 0,09	1,47 ± 0,02
PUFA	4,35 ± 0,06	8,23 ± 0,09
UFA (MUFA+PUFA)	5,92 ± 0,07	9,70 ± 0,04
SFA	0,67 ± 0,08	0,87 ± 0,06
PUFA/SFA	6,49 ± 0,12	9,46 ± 0,15

TB – trop borovnice; TM – trop maline; MUFA – mononezasićene masne kiseline; PUFA – polinezasićene masne kiseline; UFA – nezasićene masne kiseline (ukupne); SFA – zasićene masne kiseline

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija

Poznato je, naime da masne kiseline poput linolne i α -linolenske utiču na porast nivoa HDL-holesterola u krvi (Kesavulu i sar., 2002), pa su mnoge studije koncipirane upravo u pravcu funkcionalnog obogaćivanja prehrambenih proizvoda ovim jedinjenjima (Gambuš i sar., 2009; Gouveia i sar., 2008). Visok udeo ukupnih nezasićenih masnih kiselina (UFA) u osušenom i samlevenom tropu maline (91,8% u ukupnim

mastima) u saglasnosti je sa rezultatima publikovanim u radu Parry i saradnika (2005), koji su, ispitujući sastav ulja iz semena maline, ustanovili da čak 98% ovog ulja čine nezasićene masne kiseline. Najzastupljenija masna kiselina u sastavu ovog ulja bila je linolna sa $53,0 \pm 1,90\%$, što je takođe u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u okviru ove teze, gde je ovaj udeo iznosio $51,1 \pm 6,91\%$. Izuzetnost sastava masnih kiselina ovog funkcionalnog sastojka ogleda se i u odnosu PUFA/SFA koji je daleko iznad preporučenog odnosa (minimum 0,4), koji je u okviru preporuka o „balansiranoj ishrani” definisala Svetska zdravstvena organizacija (WHO/FAO) (HMSO, 1994; Wood i sar., 2008).

U sastavu masnih kiselina osušenog i samlevenog tropa borovnice u najvećem procentu zastupljene su linolna, α -linolenska i oleinska kiselina, sa udelima u ukupnim mastima od 36,6%, 28,8% i 23,5%, respektivno. Rezultati studije u kojoj je ispitano ulje iz semena borovnice (Parry i sar., 2005) ukazuju na sličan profil i sadržaj masnih kiselina, sa udelima linolne, α -linolenske i oleinske kiseline od 43,5%, 25,1% i 22,9%, respektivno.

Sagledavajući potencijal primene osušenih i samlevenih tropova kao izvora esencijalnih masnih kiselina može se zaključiti da, iako u sastavu masnih kiselina oba tropa dominiraju linolna i α -linolenska kiselina koje pripadaju ovoj grupi, malina ima veći potencijal kao funkcionalni sastojak prehrambenih proizvoda, s obzirom na znatno veći udeo masti u tropu, kao i veći sadržaj ovih masnih kiselina.

U mineralnom sastavu oba funkcionalna sastojka dominiraju makroelementi K i Mg, a najveća razlika javlja se u sadržaju Ca, koga u osušenom i samlevenom tropu borovnice ima oko 5,5 puta više (Tabela 8). Distribucija minerala u različitim delovima ploda bobičastog voća analizirana je od strane Possner i Kliewera (1985) na primeru crnog grožđa i utvrđeno je da se Ca u najvećoj koncentraciji nalazi u pokožici. Ceđenjem soka borovnice, trop koji zaostaje kao sporedni proizvod sastoji se u najvećem procentu upravo od pokožice, a njegovim sušenjem postiže se višestruko koncentrisanje kalcijuma. Time se mogu objasniti značajne razlike u sadržaju ovog makroelementa u dva ispitivana funkcionalna sastojka, iako je, prema literaturnim podacima, sadržaj kalcijuma u polaznim voćnim vrstama veoma sličan (Nile i Park, 2014).

Tabela 8. Mineralni sastav osušenog i samlevenog tropa borovnice i maline

	Sadržaj minerala (mg/kg)					
	Na	K	Ca	Mg	Fe	Zn
TB	145,54 (2,31)	4060,25 (9,00)	2170,08 (19,71)	1214,06 (32,62)	50,20 (0,71)	20,62 (0,82)
TM	151,02 (12,50)	5193,18 (20,92)	395,43 (7,91)	1133,07 (67,01)	46,11 (1,81)	30,31 (0,78)

TB – trop borovnice; TM – trop maline

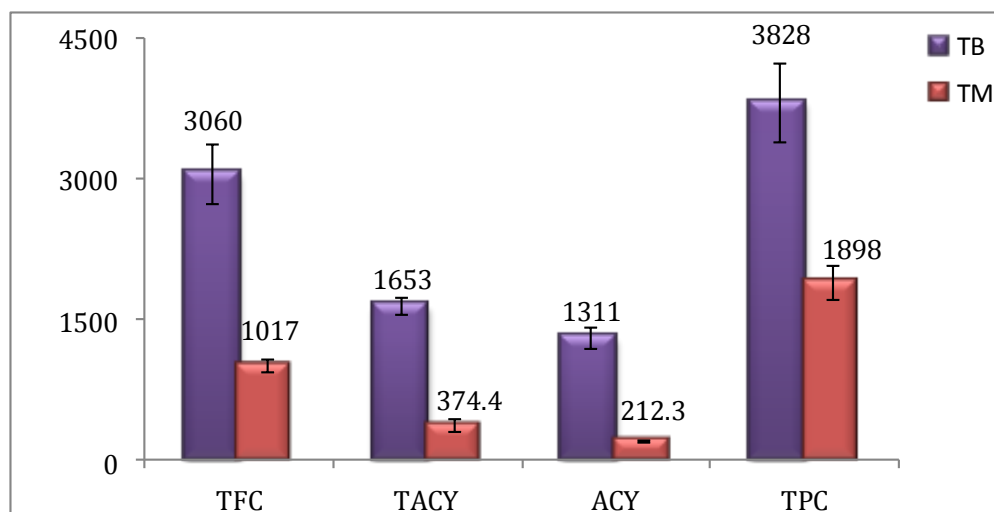
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina, a vrednosti date u zagradama predstavljaju standardnu devijaciju

4.2. FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE OSUŠENOG I SAMLEVENOG TROPA BOROVNICE I MALINE

Polazeći od činjenice da od fitohemikalija bobičastog voća najznačajnije mesto zauzimaju polifenolna jedinjenja i uzimajući u obzir podatke koji ukazuju na izuzetan antioksidativni potencijal tropa borovnice (Khanal i sar., 2009) i maline (Bobinaité i sar., 2013; Četojević-Simin i sar., 2015; Tumbas Šaponjac i sar., 2014), ove dve vrste tropa su, nakon sušenja i mlevenja, ispitane sa aspekta sastava i sadržaja polifenolnih jedinjenja, a određena je i njihova antiradikalska aktivnost na DPPH'.

4.2.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA ANTOCIJANA, UKUPNIH RASTVORLJIVIH POLIFENOLA I FLAVONOIDA

Rezultati određivanja sadržaja antocijana (ukupnih i monomernih), ukupnih rastvorljivih polifenola i flavonoida u osušenom i samlevenom tropu borovnice i maline prikazani su na slici 16. Po svim navedenim parametrima, trop borovnice pokazao je veći antioksidativni potencijal. Sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola (TPC) bio je oko 3 puta veći, sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) oko 1,7 puta veći, dok je najveća razlika utvrđena u pogledu sadržaja ukupnih antocijana, koji su u tropu borovnice bili prisutni u oko 4,5 puta većoj količini u odnosu na trop maline.



Slika 16. Rezultati spektrofotometrijskih određivanja sadržaja polifenolnih jedinjenja (mg/100 g s.m.) u osušenom i samlevenom tropu borovnice (TB) i maline (TM)

TFC – sadržaj ukupnih flavonoida; TACY – sadržaj ukupnih antocijana; ACY – sadržaj monomernih antocijana; TPC – sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola

U osušenom i samlevenom tropu borovnice od ukupnih rastvorljivih polifenola flavonoidi su činili 79,9%, a ukupni antocijani 43,2%. Imajući u vidu da polifenolni profil borovnice veoma zavisi od klimatskih i drugih uslova, rezultati dobijeni u okviru ove teze upoređeni su sa rezultatima ispitivanja sprovedenim na osušenom plodu borovnice, sakupljene takođe na teritoriji Republike Srbije. U polifenolnom profilu suvih ekstrakata ispitanih od strane Tumbas (2010) ustanovljeno je da antocijani čine 28,7% ukupnih rastvorljivih polifenola osušenog ploda, dok je udeo flavonoida bio približan vrednosti dobijenoj u okviru ove teze i iznosio je 82,2%. Veći udeo antocijana u ukupnim polifenolima u osušenom i samlevenom tropu u poređenju sa osušenom polodom borovnice, može se objasniti činjenicom da je u postupku ceđenja soka, iz ploda odstranjen najveći deo mezokarpa, te da trop u najvećem udelu sadrži pokožicu u kojoj se nalazi više od 80% antocijana iz ploda (Lee i Wrolstad, 2004). U studiji Aaby i saradnika (2013), sprovedenoj na sporednim proizvodima dobijenim iz industrije soka, u tropu borovnice utvrđeno je da 31,7% ukupnih polifenolnih jedinjenja čine monomerni antocijani, što je vrednost veoma bliska vrednosti dobijenoj u okviru ove teze (34,2%). Ipak, apsolutne vrednosti TPC i ACY nije bilo moguće uporediti, s obzirom da su u gorenavedenoj studiji rezultati izraženi na masu svežeg tropa i da ne postoji podatak o sadržaju vlage.

U ukupnim rastvorljivim polifenolima osušenog i samlevenog tropa maline u najvećem udelu (53,6%) zastupljeni su flavonoidi, a sličan rezultat dobijen je u radu

Četojević-Simin i saradnika (2015), gde je ustanovljeno da u ekstraktima tropa maline sorte vilamet flavonoidi čine 50,3% ukupnih polifenolnih jedinjenja. Udeo antocijana u ukupnim rastvorljivim polifenolima iznosio je 19,7%, što je znatno veća vrednost u poređenju sa rezultatom gorenavedene studije. Iako se radilo o istoj sorti maline, različiti udeo antocijana verovatno je posledica klimatskih i drugih uslova tokom uzgoja maline, s obzirom da su ispitujući veći broj sorti, Mazur i saradnici (2014) utvrdili značajne međusezonske varijacije u sadržaju antocijana istih sorti.

Imajući u vidu trend proizvodnje funkcionalnih sastojaka dobijenih iz sporednih proizvoda prerade voća, antioksidativni potencijal osušenog i samlevenog tropa borovnice i maline upoređen je sa sličnim funkcionalnim sastojcima dobijenim iz drugih voćnih vrsta. U radu García i saradnika (2009) ispitan je polifenilni profil tropa jabuke različitih sorti, a vrednosti TPC iznosile su do 1500 mg GAE/100 g s.m. Ispitujući tropove različitih sorti grožđa, nastale u postupku proizvodnje vina, Deng i saradnici (2011) su ustanovili visok antioksidativni potencijal ovih sporednih proizvoda (vrednosti TPC od 2140 do 2670 mg GAE/100 g s.m.). U gorenavedenim studijama kao jedan od potencijalnih pravaca primene, navodi se iskorišćenje ovih sporednih proizvoda u različitim formulacijama prehrambenih proizvoda. Vrednost TPC u osušenom i samlevenom tropu borovnice iznosila je $3828,12 \pm 416,07$ mg GAE/100 g s.m., pa se, imajući u vidu ovako visok sadržaj polifenolnih jedinjenja, može očekivati da bi se dodatkom ovog tropa u prehrambene proizvode, postiglo značajno unapređenje funkcionalnosti proizvoda sa aspekta antioksidativnog potencijala. Trop maline, iako ima niži sadržaj TPC u poređenju sa tropom borovnice, takođe predstavlja značajan izvor polifenolnih jedinjenja. Dodatna vrednost ovih funkcionalnih sastojaka ogleda se u činjenici da je sadržaj prehrambenih vlakana u njima veći od 50% (na s.m.), pa se mogu očekivati pozitivni zdravstveni efekti svojstveni za tzv. *antioxidant dietary fiber* (ADF). Pretpostavlja se, naime da polifenolna jedinjenja vezana za polisaharidne strukture vlakana zajedno sa njima, u neizmenjenom obliku, dospevaju do kolona, gde pod dejstvom bakterijske mikroflore dolazi do fermentacije vlakana i oslobađenja jedinjenja sa antioksidativnim delovanjem (Quirós-Sauceda i sar., 2014). Ovakav mehanizam delovanja ADF potvrđen je u epidemiološkim studijama, koje ukazuju na postojanje značajne veze između povećanog unosa ADF i smanjenja rizika od nastanka kancera debelog creva (Quirós-Sauceda i sar., 2014; Tang i sar., 2011).

4.2.2. LC-MS/MS ANALIZA SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA

Imajući u vidu veliku raznovrsnost polifenolnih jedinjenja i činjenicu da njihova aktivnost *in vivo* zavisi od hemijske strukture, u analizi antioksidativnog potencijala nekog biljnog materijala sa ciljem utvrđivanja potencijalnih zdravstvenih efekata, sve veću primenu imaju hromatografske metode, kojima se utvrđuje sastav pojedinačnih polifenolnih jedinjenja. Poznato je, takođe, da spektrofotometrijske metode pokazuju nejednaku selektivnost prema jedinjenjima iz klase polifenola, što dodatno potvrđuje značaj detaljne analize ovih jedinjenja u cilju utvrđivanja antioksidativnog potencijala nekog biljnog materijala.

Kvantitativnom LC-MS/MS analizom sastava polifenolnih jedinjenja u osušenom i samlevenom tropu borovnice utvrđeno je prisustvo 10 jedinjenja u koncentracijama iznad granice kvantifikacije metode (Tabela 9, Slika 17).

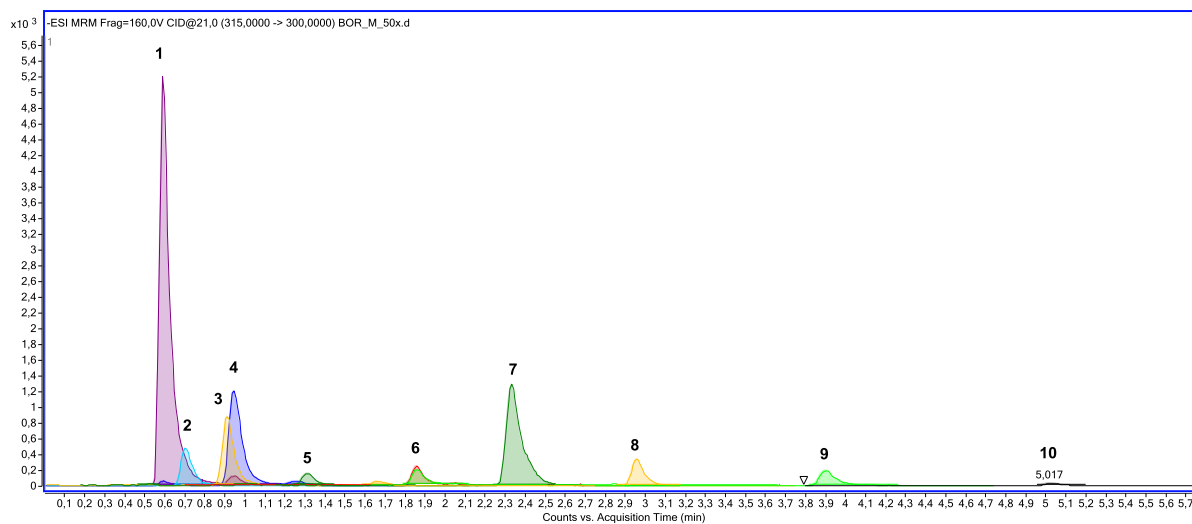
Tabela 9. Rezultati kvantitativnog sastava polifenolnih jedinjenja u osušenom i samlevenom tropu borovnice

Pik	Jedinjenje	t _R (min)	Koncentracija (mg/100 g s.m.)
1*	hinska kiselina	0,59	2136,91 ± 108,61
2	galna kiselina	0,70	27,93 ± 1,69
3	protokatehinska kiselina	0,91	17,50 ± 1,23
4	hlorogenska kiselina	0,94	61,12 ± 4,32
5	kafena kiselina	1,31	3,40 ± 0,31
6	<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,85	4,70 ± 0,48
7	hiperozid	2,33	32,12 ± 2,22
8	kvercitrin	2,95	9,53 ± 0,98
9	kvercetin	3,90	57,40 ± 2,01
10	izoramnetin	5,02	18,31 ± 1,08

1* – hinska (C6-C1) kiselina, jedinjenje određeno u okviru metode Orčić i saradnika (2014), koje ne sadrži fenolno jezgro i ne pripada klasi polifenola

Hinska kiselina se svrstava u grupu organskih kiselina, a u plodu borovnice prisutna je u značajnoj količini 16 - 24 g/100 g (Kalt i sar., 1996). Činjenica da je koncentracija ove kiseline u osušenom i samlevenom tropu manja, ukazuje na značajnu distribuciju ovog jedinjenja u sok. Od polifenola određenih ovom metodom, najveći procenat

(50,6%) činili su flavonoli i flavonol-glikozidi (hiperozid, kvercitrin, kvercetin i izoramnetin), a najzastupljenija jedinjenja iz ove klase bili su kvercetin i hiperozid, čiji je sadržaj iznosio $57,40 \pm 2,01$ i $32,12 \pm 2,22$ mg/100 g s.m., respektivno. Udeo derivata hidroksicimetne kiseline u ukupnim fenolnim jedinjenjima određenim ovom metodom iznosio je 29,9%, a hlorogenska kiselina prisutna u količini od $61,12 \pm 4,32$ mg/100 g s.m. bila je najdominantnije jedinjenje iz ove klase. Od derivata hidroksicimetne kiseline detektovane su galna i protokatehinska kiselina.



Slika 17. Ekstrahovani MRM hromatogrami polifenolnih jedinjenja tropa borovnice

Pregledom dostupne literature koja se odnosi na sadržaj fenolnih kiselina i flavonoida šumske borovnice, utvrđeno je da jedan deo studija označava derivate hidrokiscimetne kiseline kao glavna polifenolna jedinjenja, sa udelom i do 64% (Häkkinen i sar., 1999, Lee i Wrolstad, 2004). Sa druge strane, ispitujući svežu, odnosno sušenu šumsku borovnicu, Määttä-Riihinen i saradnici (2004) i Tumbas Šaponjac i saradnici (2015), utvrdili su veći udeo flavonola (oko 63%) u odnosu na fenolne kiseline.

Rezultati dobijeni u okviru ove teze ukazuju da su u ispitivanom tropu borovnice flavonoli i flavonol-glikozidi zastupljeni u većem procentu u odnosu na fenolne kiseline, iako je, posmatrajući udeo pojedinačnih jedinjenja, hlorogenska kiselina najdominantnije jedinjenje sa 26,3%. U mnogim *in vivo* studijama utvrđeno je antihiperlipidemično delovanje hlorogenske kiseline (Karthikesan i sar., 2010; Ong i sar., 2013), a ovo jedinjenje se, u brojnim studijama sprovedenim na pacovima, dovodi u vezu sa smanjenjem gojaznosti i poboljšanjem lipidnog statusa (Cho i sar., 2010; de Sotillo i sar., 2002). Po udelu u ukupnim ispitivanim polifenolinim jedinjenjima, izdvaja se i kvercetin (24,8%), čije je citotoksično dejstvo na ćelije karcinoma creva, kao i njegova sposobnost da indukuje apoptozu i inhibira rast leukemičnih ćelija dokazano u studiji

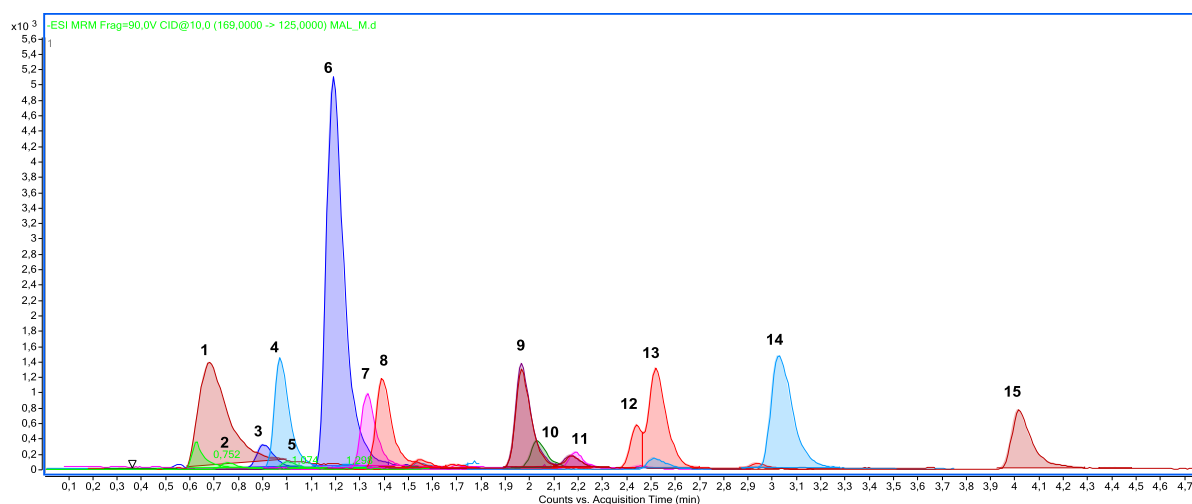
Agulloi saradnika (1994). Na osnovu gorenavedenih podataka, može se zaključiti da u tropu borovnice analiziranom u ovoj tezi postoji obilje biološki aktivnih jedinjenja, koja samostalno ili u sinergizmu mogu pozitivno uticati na zdravlje ljudi, pa se ovako dobijen sastojak namenjen primeni u prehrambenoj industriji, može okarakterisati kao visokovredan funkcionalni sastojak.

Kvantitativnom LC-MS/MS analizom sadržaja polifenolnih jedinjenja u tropu maline utvrđeno je prisustvo 15 jedinjenja u koncentracijama iznad granice kvantifikacije primenjene metode, a najdominantnije jedinjenje bio je epikatehin sa sadržajem $31,39 \pm 1,89$ mg/100 g s.m. (Tabela 10, Slika 18).

Tabela 10. Rezultati kvantitativnog sastava polifenolnih jedinjenja u osušenom i samlevenom tropu maline

Pik	Jedinjenje	t_R (min)	Koncentracija (mg/100 g s.m.)
1*	hinska kiselina	0,67	$19,25 \pm 1,13$
2	galna kiselina	0,75	$0,11 \pm 0,03$
3	katehin	0,9	$1,25 \pm 0,89$
4	protokatehinska kiselina	0,97	$0,45 \pm 0,05$
5	hlorogenska kiselina	1	$0,07 \pm 0,00$
6	epikatehin	1,19	$31,39 \pm 1,89$
7	<i>p</i> -OH-benzoeva kiselina	1,32	$1,23 \pm 0,05$
8	kafena kiselina	1,39	$0,37 \pm 0,01$
9	<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,96	$0,45 \pm 0,02$
10	sinapinska kiselina	2,16	$0,17 \pm 0,00$
11	ferulna kiselina	2,19	$0,42 \pm 0,01$
12	hiperozid	2,44	$0,58 \pm 0,03$
13	izokvercetin (kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid)	2,51	$0,72 \pm 0,04$
14	kvercitrin	3,02	$0,84 \pm 0,07$
15	kvercetin	4,01	$0,79 \pm 0,03$

1* - hinska (C6-C1) kiselina, jedinjenje određeno u okviru metode Orčić i saradnika (2014), koje ne sadrži fenolno jezgro i ne pripada klasi polifenola



Slika 18. Ekstrahovani MRM hromatogrami polifenolnih jedinjenja tropa maline

Prema većini literaturnih podataka, jedno od najznačajnijih jedinjenja iz klase polifenola u plodu maline jeste elaginska kiselina. S obzirom da primenjena metoda nije obuhvatala elaginsku kiselinu, kvantifikacija ovog jedinjenja nije izvršena. Ipak, na DAD hromatogramu (Prilog 4) je na osnovu izgleda spektra identifikovan pik koji pripada ovom jedinjenju ($t_R = 2,64$ min). Generalno, kvantifikacija svih polifenolnih jedinjenja u nekom biljnom materijalu gotovo da nije moguća, pogotovu ako se radi o sirovinama poput bobičastog voća, sa izuzetno visokim sadržajem raznorodnih polifenolnih jedinjenja. Tako se većina studija bavi kvantifikacijom pojedine grupe ili čak podgrupe polifenolnih jedinjenja, a neka od njih čak nije moguće u potpunosti pouzdano kvantifikovati, s obzirom na nedostupnost standarda.

4.2.3. ANTIRADIKALSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA NA DPPH'

Stabilan DPPH' često se koristi kao supstrat u model sistemima za procenu antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata, a nivo dekolracije rastvora DPPH' ukazuje na antiradikalni potencijal prisutnih polifenolnih jedinjenja (Liu i sar., 2004). Manje vrednosti IC_{50} ukazuju na bolju antiradikalnu aktivnost ekstrakta na DPPH'.

Niska IC_{50} vrednost ($0,68 \pm 0,06$ mg/ml), veoma slična IC_{50} vrednosti referentne supstance BHT-a ($0,50 \pm 0,01$ mg/ml), svedoči o visokom antioksidativnom potencijalu sastojka dobijenog iz tropa borovnice. IC_{50} vrednost ekstrakta tropa maline iznosila je $0,98 \pm 0,01$ mg/ml, što ukazuje na slabiju antiradikalnu aktivnost ovog tropa prema DPPH', u poređenju sa tropom borovnice.

4.3. EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA OSUŠENOG I SAMLEVENOG TROPA BOROVNICE RASTVARAČIMA POD POVIŠENIM PRITISKOM

S obzirom na značajno veći antioksidativni potencijal u odnosu na trop maline, osušen i samleven trop borovnice odabran je za ispitivanje mogućnosti proizvodnje ekstrakata bogatih polifenolnim jedinjenjima, koji bi potencijalno mogli naći primenu u prehrambenoj i/ili farmaceutskoj industriji. Imajući u vidu prednosti ekstrakcije rastvaračima pod povišenim pritiskom (ASE) u odnosu na klasičnu čvrsto-tečnu ekstrakciju, i veliki potencijal primene ove tehnike u industrijskim uslovima, izvedena je uporedna analiza antioksidativnog potencijala ekstrakata dobijenih od iste količine polaznog materijala primenom ASE uz korišćenje vode kao ekstragensa (postupak opisan u poglavlju 3.3.2.6.) i ekstrakata dobijenih postupkom čvrsto-tečne ekstrakcije primenom 80% metanola kao ekstragensa (poglavlje 3.3.2.5.) uz modifikaciju zapremine ekstragensa na 22ml.

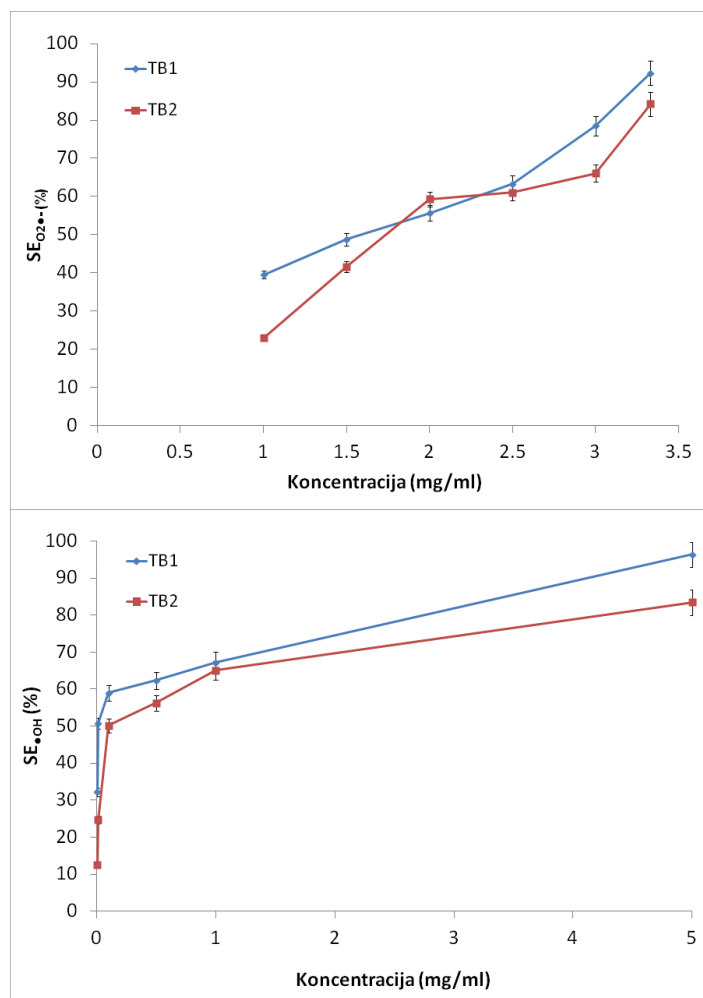
U ispitivanim ekstraktima određena je antiradikalska aktivnost na DPPH[•] primenom spektrofotometrijske metode opisane u poglavlju 3.3.2.7. i ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata na stvaranje i transformaciju hidroksil i superoksid anjon radikala (poglavlja 3.3.2.8. i 3.3.2.9.). Na osnovu IC₅₀ vrednosti datih u tabeli 11, evidentno je da su oba ekstrakta pokazala veću aktivnost prema svim ispitivanim radikalima u poređenju sa sintetičkim antioksidantom BHA.

Tabela 11. Antiradikalska aktivnost ekstrakata tropa borovnice

	IC ₅₀ (mg/ml)		
	DPPH [•]	•OH	O ₂ ^{•-}
TB ₁	0,22 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,59 ± 0,13
TB ₂	0,40 ± 0,12	0,10 ± 0,01	1,74 ± 0,05
BHA	0,65 ± 0,04	1,51 ± 0,06	2,68 ± 0,13

TB₁ – ekstrakt dobijen konvencionalnim postupkom ekstrakcije; TB₂ – ekstrakt dobijen primenom ASE postupka ekstrakcije

Manju IC₅₀ vrednost, odnosno veću antiradikalsku aktivnost pokazao je ekstrakt TB₁ dobijen postupkom klasične ekstrakcije čvrsto-tečno (Slika 19), što je u saglasnosti sa studijama u kojima je sprovedena komparativna analiza ova dva načina ekstrakcije na drugim biljnim sirovinama.



Slika 19. Antiradikalska aktivnost ekstrakata TB₁ i TB₂ tropa borovnice na superoksid anjon (a) i hidroksil radikal (b) u definisanom koncentracionom opsegu

Ispitujući ekstrakciju antocijana i flavan-3-ola iz sporednih proizvoda prerade grožđa, Monrad i saradnici (2014) su utvrdili da se primenom vode kao ekstragensa, pod uslovima povišenog pritiska i temperature, postigla za oko 60% slabija ekstrakcija monomernih antocijana iz polaznog materijala u poređenju sa konvencionalnim postupkom ekstrakcije. Ipak, autori navode mogućnost primene ovih vodenih ekstrakata u svojstvu aditiva za prehrambenu industriju. García-Marino i saradnici (2006), poredeći metanolne ekstrakte sporednih proizvoda vinske industrije sa vodenim ekstraktima dobijenim primenom ASE tehnike, utvrdili su sličnu efikasnost ekstrakcije kada su u pitanju proantocijanidini i značajno bolju ekstrakciju nekih fenolnih kiselina poput galne primenom ASE tehnike. Za postizanje veće efikasnosti ekstrakcije polifenolnih jedinjenja rastvaračima pod povišenim pritiskom, za svaki ispitivani biljni materijal bilo bi neophodno sprovesti optimizaciju parametara, za šta se u najvećem broju studija primenjuje postupak odzivne površine.

Rezultati dobijeni u okviru ovog rada ukazuju na značajan antioksidativni potencijal vodenog ekstrakta dobijenog iz tropa borovnice (veći u odnosu na BHA) i predstavljaju polaznu osnovu za dalja ispitivanja sa ciljem utvrđivanja optimalnih uslova ASE. Proizvodnja ovih ekstrakata u industrijskim uslovima, koja bi obezbedila značajno smanjenje količine sporednih proizvoda i dobijanje proizvoda sa potencijalom primene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, moguća je, uz prethodnu maksimizaciju prinosa i antioksidativnog potencijala kroz postupak optimizacije. Ekstrakcija vodom pod povišenim pritiskom, kao ekološki podoban, *green* postupak ekstrakcije, osim prednosti u pogledu bezbednosti po zdravlje ljudi, predstavlja i tehniku, koja potpunom automatizacijom procesa, omogućava i znatno manji utrošak vremena i resursa.

4.4. ODABIR OPTIMALNIH USLOVA PEČENJA BEZGLUTENSKOG KEKSA SA DODATKOM TROPA

Sa tehnološkog aspekta, formulacija novog proizvoda predstavlja veoma zahtevan proces koji podrazumeva optimizaciju same recepture i tehnoloških parametara proizvodnje. Odsustvo glutena, kao glavne strukturne komponente, dodatno otežava postizanje odgovarajućih kvalitetnih karakteristika bezglutenskih proizvoda, pa je optimizacija svakog koraka i svih parametara procesa proizvodnje od izuzetne važnosti.

Odabir uslova pečenja jedan je od važnih aspekata proizvodnje bezglutenskog keksa, imajući u vidu složenost fizičko-hemijskih i koloidnih promena koje se, tokom ovog procesa, dešavaju na testu. Fenomeni prenosa mase i toplote zavise pre svega od temperature i vremena pečenja (Sablani i sar., 1998), a variranjem ovih parametara procesa, značajno se menjaju tekstura i boja finalnog proizvoda, a samim tim i njegov kvalitet.

Na osnovu eksperimenata sprovedenih na kontrolnoj formulaciji (K) u okviru kojih je utvrđeno da za ovu vrstu keksa pečenje treba sprovesti u opsegu temperature od 160-170 °C (Šarić i sar., 2014b), i imajući u vidu moguće promene u ovom tehnološkom postupku uslovljene dodatkom tropa, za optimizaciju uslova pečenja bezglutenskog keksa sa dodatim tropom, odabrane su dve temperature u okviru kojih je varirana dužina trajanja procesa pečenja. Eksperiment je sproveden na formulaciji keksa u kojoj je 30% bezglutenske smeše zamenjeno tropom borovnice, a odabir optimalnih uslova pečenja izvršen je na osnovu fizičkih karakteristika (boje i senzorske ocene), parametara tehnološkog kvaliteta, vlage i a_w vrednosti proizvoda (Tabela 12).

Tabela 12. Uticaj temperature i vremena pečenja na parametre tehnološkog kvaliteta, boju, vlagu i a_w vrednost keksa sa dodatim tropom

Oznaka keksa	Temperatura (°C)	Vreme (min)	W/T	W/L	BWL (%)	a_w	M (%)	ΔE
1	170	10	6,38 ^a (0,03)	1,02 ^a (0,00)	10,32 ^d (0,36)	0,61 ^e (0,00)	10,01 ^e (0,04)	5,57 ^b (0,03)
2	170	13	6,38 ^a (0,03)	1,04 ^b (0,01)	14,41 ^e (0,22)	0,43 ^a (0,00)	6,68 ^a (0,01)	6,41 ^a (0,01)
3	170	15	6,41 ^a (0,03)	1,04 ^b (0,00)	15,43 ^a (0,20)	0,43 ^a (0,00)	6,64 ^a (0,04)	6,49 ^a (0,04)
4	170	16	6,39 ^a (0,02)	1,05 ^c (0,01)	15,90 ^{b,c} (0,03)	0,36 ^c (0,00)	5,76 ^c (0,02)	6,67 ^c (0,05)
5	160	16	6,71 ^b (0,04)	1,06 ^c (0,01)	15,61 ^{a,b} (0,31)	0,41 ^d (0,00)	6,15 ^d (0,02)	6,49 ^a (0,01)
6	160	17	6,84 ^c (0,07)	1,07 ^c (0,01)	16,21 ^c (0,10)	0,32 ^b (0,00)	5,12 ^b (0,01)	6,88 ^d (0,06)

W/T – širenje; W/L – ekscentričnost; BWL – gubitak mase tokom pečenja; a_w – aktivnost vode; M – sadržaj vlage; ΔE – razlika u boji gornje i donje površine keksa

Vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina, a vrednosti date u zagradama predstavljaju standardnu devijaciju.

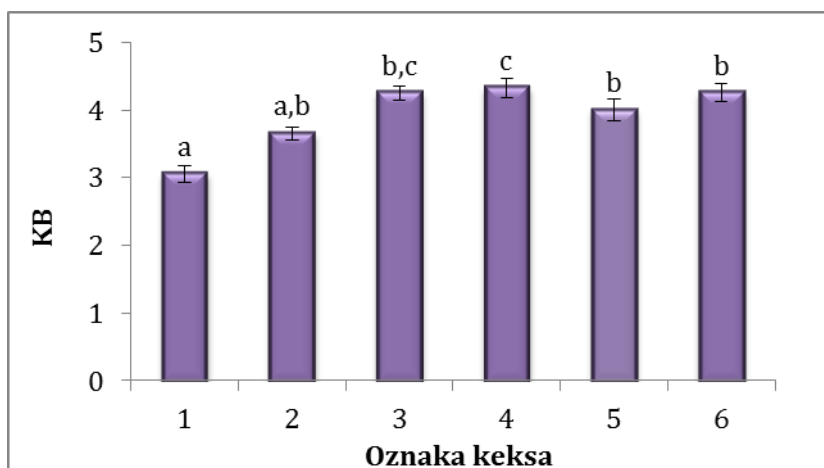
Tokom procesa pečenja oblikovano testo menja svoj spoljašnji izgled i dimenzije. Visina testa (T) se povećava u odnosu na visinu pre pečenja, a od dimenzija finalnog proizvoda, kao najvažniji parametri za procenu adekvatnosti uslova pečenja, izdvojeni su širenje (W/T) i ekscentričnost (W/L). Pečenjem na temperaturi od 170 °C, bez obzira na trajanje ovog procesa, nije dobijena statistički značajna razlika u vrednostima W/T, dok je sniženje temperature pečenja na 160 °C uticalo na značajno veće širenje testa. Veće vrednosti ovog parametra pri nižim temperaturama pečenja, dobijene su i u drugim studijama (Suas, 2008). U cilju određivanja tehnoloških parametara kvaliteta sprovedena su merenja na keksovima okruglog oblika, a ekscentričnost (W/L), koja predstavlja odstupanje oblika finalnog proizvoda od idealnog kružnog, odabrana je kao važan kriterijum u proceni adekvatnosti uslova pečenja. Analizom dobijenih rezultata može se zaključiti da temperatura pečenja od 160 °C doprinosi dobijanju keksa veće ekscentričnosti.

Osim dimenzija i oblika keksa, pri analizi tehnoloških karakteristika, značajan parametar je i gubitak mase tokom pečenja (BWL). Iako značajan sa aspekta prinosa

proizvoda (manja vrednost ovog parametra ukazuje na veću masu dobijenog proizvoda), ovaj parametar ne može biti uzet kao jedini kriterijum u odabiru uslova pečenja, već se ekonomski aspekt proizvodnje mora uskladiti sa parametrima kvaliteta i bezbednosti proizvoda. U tom smislu, u uzorcima keksa dobijenim pečenjem pri različitim uslovima (Tabela 12) određene su vlaga (M) i aktivnost vode (a_w). Od ispitivanih uzoraka, svi osim uzorka broj 1, imali su prihvatljive vrednosti vlage ($<7\%$) i a_w ($<0,60$).

Parametri boje keksa (L^* , a^* i b^*) određeni su instrumentalno, primenom postupka opisanog u poglavlju 3.3.6.3. Kako bi se odredila uniformnost boje keksa pri različitim uslovima pečenja, izmerene su vrednosti navedenih parametra gornje i donje površine, a vrednost ΔE određena je prema formuli 9. Veće vrednosti ΔE ukazuju na veće razlike u boji, a dobijeni rezultati pokazuju da se kraćim pečenjem, na obe radne temperature, postiže veća uniformnost boje keksa.

Ipak, kao glavni parametar u odabiru uslova pečenja uzet je senzorski kvalitet keksa, čija je ocena sprovedena prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.3.6. i čiji su rezultati prikazani grafički (Slika 20). Kako između najbolje ocenjenih uzoraka (3 i 4) nije utvrđena statistički značajna razlika u senzorskom kvalitetu i kvalitet keksa je generalno ocenjen kao vrlo dobar (KB od 3,5 do 4,5), značajno veća ujednačenost boje gornje i donje površine, kao i značajno veća ujednačenost oblika keksa sa oznakom 3, uzeti su kao kriterijumi za odabir optimalnih uslova pečenja. Temperatura od 170 °C i vreme pečenja od 15 minuta odabrani kao najbolji za dalja ispitivanja.



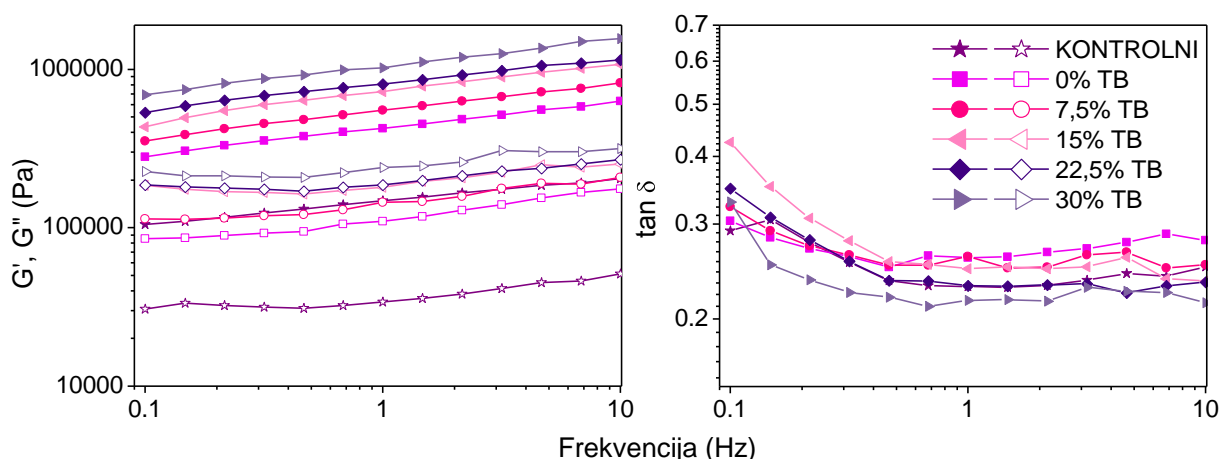
Slika 20. Grafički prikaz rezultata senzorske ocene bezglutenskog keksa sa dodatim tropom dobijenog pečenjem pri različitim uslovima

*Različita slova na grafikonu označavaju vrednosti koje se ststistički značajno razlikuju ($p < 0,05$)

4.5. REOLOŠKE OSOBINE TESTA ZA KEKS

Ispitivanje reoloških parametara još jedan je od važnih aspekata u kreiranju novog proizvoda, s obzirom da oni predstavljaju pokazatelj obradivosti i ponašanja testa tokom procesa proizvodnje. Brojna istraživanja ukazuju da dodatak prehrambenih vlakana u pekarske proizvode negativno utiče na obradivost testa i kvalitet krajnjeg proizvoda (Gómez i sar., 2003; Sudha i sar., 2007). Imajući u vidu da je sadržaj vlakana u tropu borovnice i maline veoma visok, bilo je značajno ispitati uticaj dodatka različitih udela ovih dveju vrsta tropa na reološke osobine testa za keks.

U postupku optimizacije formulacije, koji će biti prikazan u sledećem poglavlju, korišćen je odgovarajući eksperimentalni plan, iz koga su, za potrebe reoloških ispitivanja izuzeti svi replikati, tako da su ispitane formulacije sa oznakama 1, 2, 3, 4 i 8 (Tabela 4). Uticaj dodatka tropa borovnice i maline na reološko ponašanje testa prikazan je na slici 21.



Slika 21. Reološke osobine testa za bezglutenski keks sa dodatkom različitih udela tropa borovnice (TB) i maline (TM) u poređenju sa kontrolnim

Veća vrednost elastičnog (G') u odnosu na viskozni (G'') moduo u definisanom rasponu frekvencija ukazala je na dominantnost elastičnih u odnosu na viskozne osobine testa, što je karakteristika viskoelastičnih sistema. Vrednosti parametra $\tan \delta$ (G''/G') koje su bile između 0,1 i 1 i slaba zavisnost oba modula od primenjenih vrednosti frekvencija ukazivale su da su sva ispitivana testa za keks ispoljavala ponašanje koje odgovara slabom gelu. U opsegu frekvencija od 0,1 do 10 Hz, vrednosti parametra G' mogle su sa zadovoljavajućom vrednošću koeficijenta determinacije ($r^2 \geq 0,994$) biti modelovane jednačinom stepenog zakona, dok je modelovanje vrednosti parametra G''

bilo nešto slabijeg kvaliteta ($r^2 = 0,789 - 0,977$). Vrednosti koeficijenta stepenog zakona (K' , K'' , n' i n'') prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13. Reološke osobine testa za bezglutenski keks sa dodatkom različitih udela tropa borovnice (TB) i maline (TM) izražene vrednostima koeficijenta jednačine stepenog zakona

Uzorak	$G' = K' f^{n'}$		$G'' = K'' f^{n''}$	
	K' (kPa)	n'	K'' (kPa)	n''
Kontrolni	143,76 ^a (4,69)	0,16 ^a (0,01)	36,32 ^a (0,40)	0,12 ^{ab} (0,01)
4 (0% TB)	409,55 ^b (22,52)	0,18 ^a (0,01)	114,12 ^b (1,26)	0,17 ^b (0,01)
3 (7,5% TB)	533,60 ^c (21,13)	0,18 ^a (0,01)	145,22 ^c (0,91)	0,15 ^b (0,00)
1 (15% TB)	717,04 ^d (5,08)	0,18 ^a (0,00)	195,17 ^d (1,55)	0,12 ^{ab} (0,02)
8 (22,5% TB)	791,42 ^e (25,51)	0,18 ^a (0,03)	212,48 ^d (14,82)	0,08 ^a (0,03)
2 (30% TB)	1046,64 ^f (1,24)	0,17 ^a (0,01)	243,54 ^e (6,74)	0,11 ^{ab} (0,01)

Vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina, a vrednosti date u zagradama predstavljaju standardnu devijaciju.

Različite formulacije testa za keks pokazivale su sličnu zavisnost oba modula (G' i G'') od frekvencije oscilovanja, što je uticalo da razlike u vrednostima koeficijenta n' i n'' ne budu statistički značajne ($p > 0,05$). Na osnovu vrednosti koeficijenta K' i K'' može se zaključiti da je zamena dela bezglutenske smeše tropom borovnice i maline dovela do jačanja strukture testa, što se ogledalo u porastu vrednosti koeficijenta K' i K'' u testima u koja su dodati tropovi u odnosu na kontrolni uzorak testa. Najveću vrednost parametara K' i K'' ispoljavalo je testo u formulaciji 2, u kojoj je 30% bezglutenske smeše zamenjeno tropom borovnice.

S obzirom da su voda i mast, kao komponente koje se smatraju najzaslužnijim za obradivost testa, bile dodate u istoj količini u sve formulacije, razlike u reološkom ponašanju testa za keks bile su posledica sastava i sadržaja tropa borovnice ili maline u zamesu. Oba tropa karakterisala je visoka vrednost ukupnih prehrambenih vlakana, sa velikim udelom nerastvornih vlakana (Tabela 6).

Vlakna iz tropa borovnice prisutna su u većoj količini u poređenju sa tropom maline i pokazala su znatno bolja hidrataciona svojstva – veći kapacitet zadržavanja vode (WHC) (Tabela 6). Razlike u vrednostima kapaciteta zadržavanja vode mogu se objasniti razlikama u hemijskom sastavu vlakana – njihovoj distribuciji, molekulskim masama, stepenu razgranatosti i dr. Generalno, veće vrednosti WHC dovode se u vezu sa prisustvom velikog broja hidroksilnih grupa koje mogu da formiraju vodonične veze sa molekulima vode (Rosell i sar., 2001). Drugi mehanizam odgovoran za zadržavanje vode je migracija vode u kapilarnu strukturu vlakana usled postojanja površinskog napona (López i sar., 1996).

Dodatak tropa borovnice na nivou supstitucije od 30% rezultovao je dobijanjem reološki najjačeg sistema, tj. testa koje je ispoljavalo najveću tvrdoću i najmanju obradivost – rastegljivost. Velika sposobnost zadržavanja vode od strane tropa borovnice dovela je do smanjenja količine slobodne vode u sistemu, odnosno smanjene mobilnosti i dostupnosti vode za hidrataciju ostalih komponenata sistema (hidrokoloida, skroba) i posledično obrazovanja suvljeg, tvrdog testa u odnosu na kontrolno testo i testo sa tropom maline. Slične fenomene vezane za promene u reološkom ponašanju testa za keks obogaćenog vlaknima ustanovili su i Laguna i saradnici (2011) ispitujući reološke osobine testa sa rezistentnim skrobom.

Uporedo sa ispitivanjem reoloških osobina testa, ispitani su i parametri tehnološkog kvaliteta keksa nakon pečenja, kako bi se sagledao uticaj dodatka funkcionalnih sastojaka u različitim udelima na parametre definisane u poglavlju 3.3.6.1.

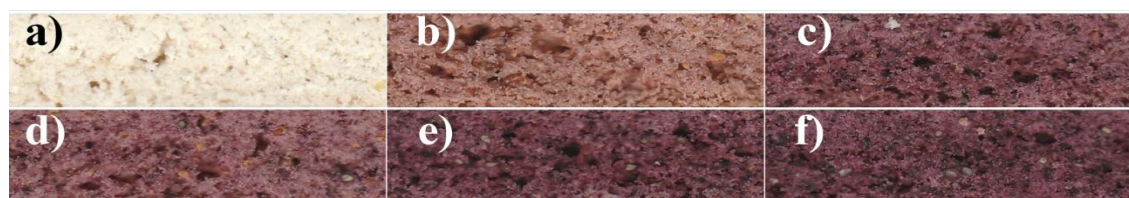
Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 14 može se zaključiti da bez obzira na udeo tropa borovnice i maline u formulaciji, dobijeni proizvod ima vrednosti W/L bliske vrednosti 1, što ukazuje da obogaćivanje keksa ovim funkcionalnim sastojcima nije doprinelo značajnoj promeni oblika tokom pečenja. Ovaj podatak od izuzetnog je značaja imajući u vidu da pravilan oblik keksa ima veliki uticaj na njegovu vizuelnu prihvatljivost od strane potrošača.

Tabela 14. Parametri tehnološkog kvaliteta keksa obogaćenog različitim udelima tropa borovnice (TB) i maline (TM)

Oznaka uzorka	% W	% L	W/T	W/L
4 (0% TB)	0,67 ^a (0,13)	1,59 ^c (0,41)	5,44 ^a (0,05)	1,02 ^a (0,01)
3 (7,5% TB)	1,67 ^b (0,13)	1,05 ^b (0,42)	5,75 ^b (0,07)	1,03 ^{ab} (0,01)
1 (15% TB)	1,62 ^b (0,14)	0,94 ^b (0,27)	6,00 ^c (0,05)	1,03 ^{ab} (0,00)
8 (22,5% TB)	1,44 ^b (0,19)	0,78 ^{ab} (0,13)	6,02 ^c (0,05)	1,02 ^a (0,00)
2 (30% TB)	2,59 ^c (0,27)	0,40 ^a (0,16)	6,34 ^d (0,09)	1,03 ^b (0,00)
Kontrolni	3,17 (0,24)	1,06 (0,49)	5,71 (0,02)	1,04 (0,01)

Vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina, a vrednosti date u zagradama predstavljaju standardnu devijaciju.

Najmanju tendenciju za kontrakcijom u pravcu laminiranja (%L) ispoljavalo je testo u formulaciji 2, što je u saglasnosti sa rezultatima reoloških testova koji su ukazali na postojanje najjače strukture testa (najmanja vrednost parametra $\tan \delta$) kod ovog sistema. Keks sa 30% tropa borovnice imao je i najveću vrednost širenja tokom pečenja (W/T) usled velike tendencije ka širenju testa normalno na pravac laminiranja (%W), što se odrazilo na dobijanje keksa najmanje visine. Ovi fenomeni mogu se objasniti smanjenom mobilnošću i distribucijom slobodne vode među komponentama, usled velikog kapaciteta zadržavanja vode tropa borovnice, što je dovelo do slabe vertikalne ekspanzije testa tokom pečenja i posledično gustog pakovanja strukture krajnjeg proizvoda (Slika 22).



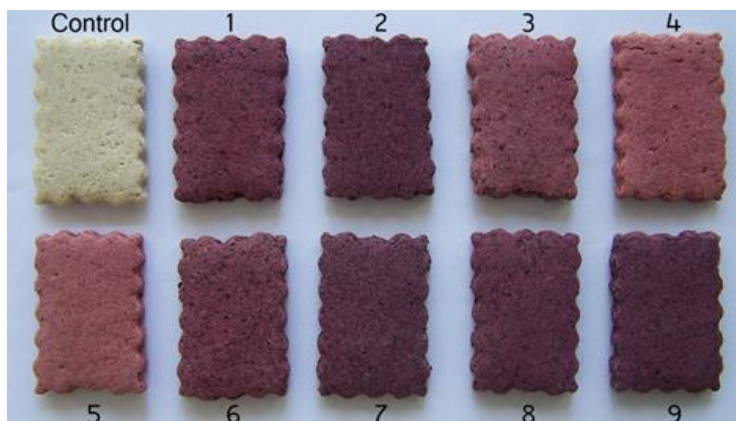
Slika 22. Izgled poprečnog preseka keksa: a) kontrolni uzorak, b) 0% TB, c) 7,5% TB, d) 15% TB, e) 22,5% TB i f) 30% TB

Nasuprot tome, uzorak 4 (30% tropa maline) ispoljio je najveću vrednost kontrakcije u pravcu laminiranja (%L). Manji kapacitet zadržavanja vode tropa maline u poređenju sa tropom borovnice, doprineo je da u formulaciji 4 veća količina raspoložive vode bude dostupna za hidrataciju ostalih komponenta, što je rezultovalo mekšim testom u odnosu na testo sa tropom borovnice (niže vrednosti koeficijenata K' i K'' u tabeli 13). Prema istraživanjima Laguna i saradnika (2011) veća količina slobodne vode u sistemu utiče na bolju rastvorljivost šećera, kao jedne od najzastupljenijih komponenta sistema i posledično do veće ekspanzije zapremine sistema tokom pečenja. Takođe, prisustvo veće količine slobodne vode u testu sa 30% tropa maline u odnosu na ostale sisteme, omogućilo je penetraciju vode i bubrenje amorfnih regiona skrobnih granula. Kao rezultat toga došlo je do intenziviranja raskidanja intramolekulskih veza i mobilnosti molekula amiloze (Larrosa i sar., 2012), što je dovelo do obrazovanja rastresitije strukture sredine keksa (Slika 22b).

Zamena dela bezglutenske smeše tropom borovnice i maline u preostalim formulacijama (7,5, 15 i 22,5% TB) nije dovela do značajnijih sinergističkih ili antagonističkih interakcija među komponentama sistema, pa su vrednosti tehnoloških parametara kvaliteta keksa bile između vrednosti parametara koji su opisivali keksove sa 30% čistog tropa (Tabela 14).

4.6. OPTIMIZACIJA FORMULACIJE BEZGLUTENSKOG KEKSA

Izuzetan nutritivni i funkcionalni profil sastojaka dobijenih preradom industrijskog tropa borovnice i maline i koncept revalorizacije ovih sporednih proizvoda, bili su osnov ideje o obogaćivanju keksa, kao najzastupljenije namirnice iz kategorije finih pekarskih proizvoda u ishrani obolelih od celijakije. Primena postupka odzivne površine (RSM) u dizajnu i formulaciji novog proizvoda, osim smanjenja utroška sirovina, omogućila je i uvođenje kriterijuma po kojima je optimizacija sprovedena. Odabirom *Simplex lattice* dizajna smeše kao eksperimentalnog plana, udeli funkcionalnih sastojaka – tropa borovnice (TB) i tropa maline (TM) varirani su na tri nivoa, sa dva ponavljanja u centralnoj tački, dajući ukupno devet eksperimenata – formulacija (Tabela 4, Slika 23).



Slika 23. Izgled različitih formulacija bezglutenskog keksa sa dodatim tropom borovnice i maline (1-9) i kontrolnog keksa

Kao izlazne veličine (odzivi) odabrani su parametri keksa koji ukazuju na:

- fizičke osobine (senzorska svojstva, tekstura i boja),
- funkcionalna svojstva (sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola, monomernih antocijana i antiradikalska aktivnost na DPPH'),
- stabilnost sa aspekta mikrobiološkog kvara (a_w vrednost).

Rezultati dobijeni primenom pomenutog eksperimentalnog plana dati su u tabeli 15, koja osim rezultata za formulacije sa različitim udelima tropova (oznake 1-9), sadrži i podatke za kontrolni keks (K).

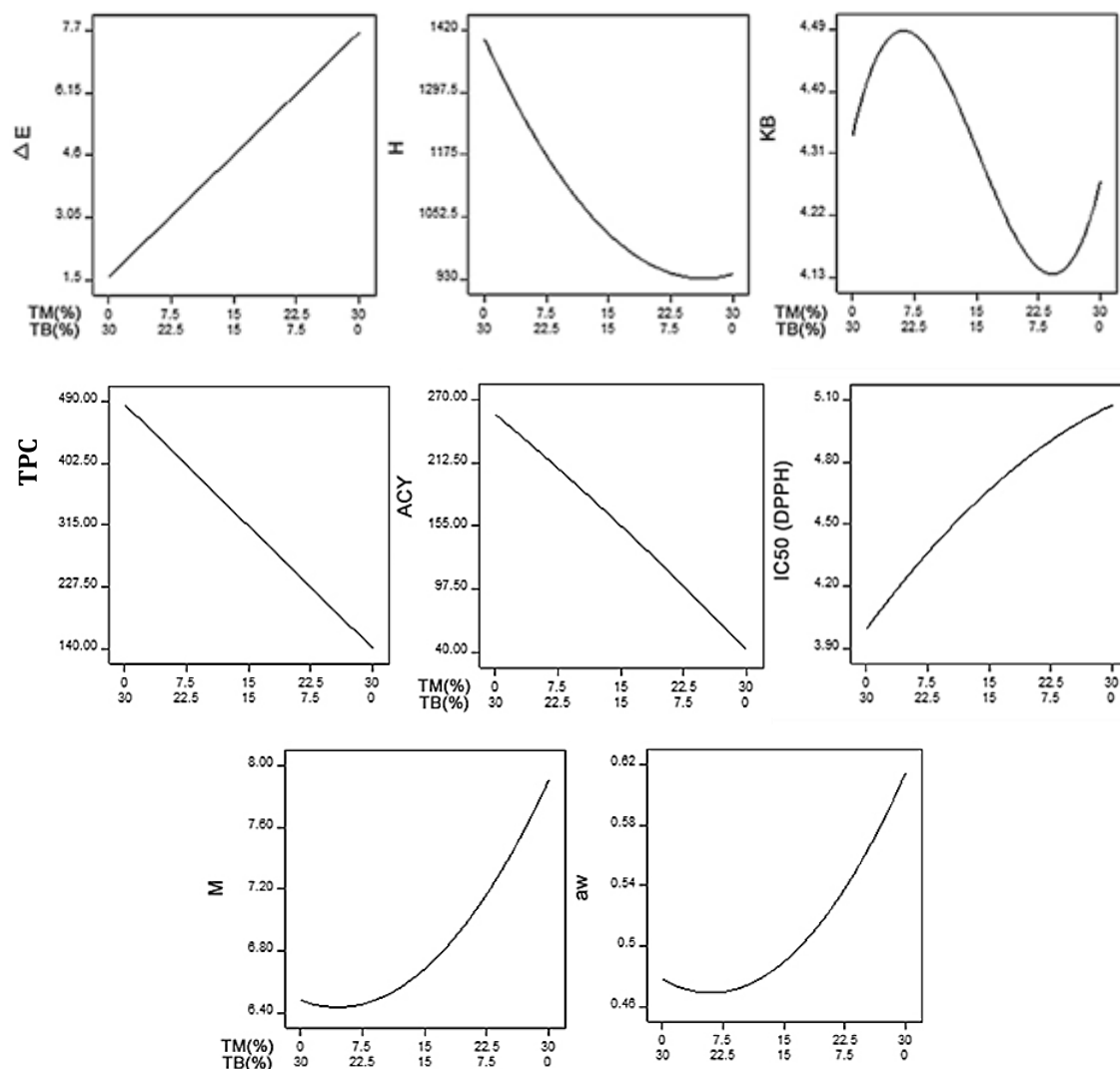
Tabela 15. Optimizacija formulacije bezglutenskog keksa: vrednosti dobijenih odziva za kontrolni (K) i različite formulacije keksa sa dodatim tropom borovnice i maline (1-9)

Vrednosti dobijenih odziva										
	TM (%)	TB (%)	ΔE	H	KB	TPC	ACY	IC ₅₀	M	a _w
1	15	15	4,74 ^b (0,03)	1018,11 ^c (13,32)	4,31 ^a (0,01)	320,11 ^c (21,51)	156,21 ^c (14,54)	4,73 ^{b,c,d} (0,21)	6,70 ^b (0,03)	0,48 ^a (0,00)
2	0	30	1,63 ^a (0,04)	1402,02 ^b (2,12)	4,33 ^a (0,00)	481,01 ^a (12,02)	260,73 ^a (2,36)	4,05 ^a (0,08)	6,47 ^a (0,02)	0,47 ^a (0,00)
3	22,5	7,5	6,02 ^e (0,04)	940,01 ^a (46,71)	4,15 ^b (0,00)	215,52 ^d (4,48)	98,31 ^d (5,93)	4,90 ^{b,c} (0,14)	7,16 ^d (0,05)	0,54 ^d (0,00)
4	30	0	7,62 ^c (0,04)	938,41 ^a (11,61)	4,26 ^a (0,01)	145,51 ^b (5,43)	43,41 ^b (2,31)	5,07 ^{b,c} (0,04)	7,90 ^c (0,02)	0,61 ^b (0,00)
5	30	0	7,69 ^c (0,05)	940,32 ^a (10,11)	4,27 ^a (0,01)	140,53 ^b (10,91)	40,92 ^b (0,07)	5,08 ^c (0,00)	7,92 ^c (0,09)	0,62 ^b (0,00)
6	15	15	4,68 ^b (0,03)	1020,08 ^c (9,25)	4,31 ^a (0,03)	311,01 ^c (13,01)	150,71 ^c (1,54)	4,60 ^{b,d} (0,04)	6,67 ^b (0,02)	0,49 ^c (0,00)
7	0	30	1,59 ^a (0,02)	1410,03 ^b (2,91)	4,34 ^a (0,01)	487,71 ^a (18,52)	250,02 ^a (4,01)	3,97 ^a (0,01)	6,48 ^a (0,01)	0,48 ^a (0,00)
8	7,5	22,5	2,99 ^d (0,01)	1171,13 ^d (5,61)	4,49 ^c (0,00)	400,12 ^e (11,11)	212,52 ^e (1,58)	4,36 ^{a,d} (0,25)	6,46 ^a (0,01)	0,48 ^d (0,00)
9	0	30	1,50 ^a (0,02)	1399,01 ^b (11,50)	4,34 ^a (0,01)	489,11 ^a (10,01)	257,22 ^a (1,44)	3,96 ^a (0,03)	6,48 ^a (0,02)	0,48 ^a (0,00)
K	0	0	1,33 (0,04)	576,21 (35,89)	3,85 (0,03)	0,20 (0,01)	ND	153,11 (0,64)	6,43 (0,02)	0,48 (0,00)

TM – trop maline; TB – trop borovnice; ΔE – razlika u boji keksa nakon 6 meseci skladištenja; H (g) – čvrstoća keksa; KB – kvalitetni broj; TPC (mg/100 g s.m.) – sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola; ACY (mg/100 g s.m.) – sadržaj monomernih antocijana; IC₅₀ (mg/ml) – koncentraciju ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50% DPPH^{*}; M (%) – vlaga keksa; a_w – aktivnost vode

Vrednosti u istoj koloni označene različitim slovima statistički se značajno ($p < 0,05$) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina, a vrednosti date u zagradama predstavljaju standardnu devijaciju.

U cilju lakšeg sagledavanja uticaja dodatih tropova na ispitivane parametre (odzive), dobijeni rezultati prikazani su i grafički na slici 24.



Slika 24. Uticaj dodatka tropa borovnice i maline na izlazne parametre (odzive)

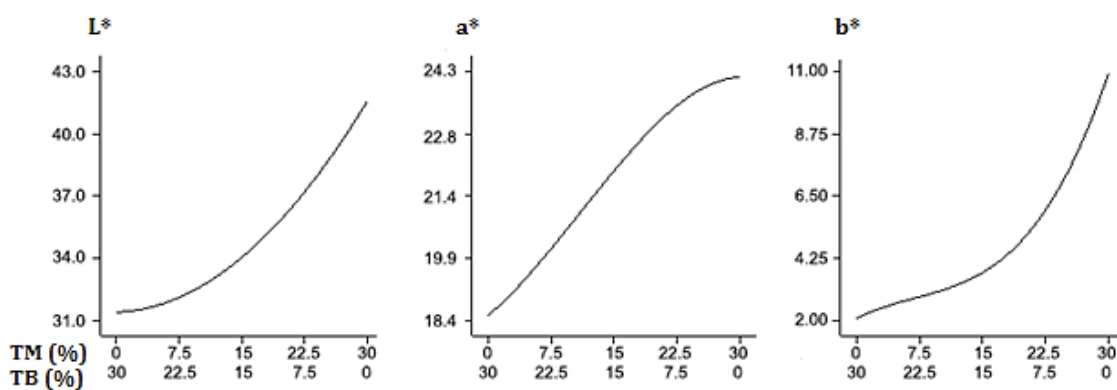
TM – trop maline; TB – trop borovnice; ΔE – razlika u boji keksa nakon 6 meseci skladištenja; H – čvrstoća keksa; KB – kvalitetni broj; TPC – sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola; ACY – sadržaj monomernih antocijana; IC_{50} – koncentraciju ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50% DPPH; M – vlaga keksa; a_w – aktivnost vode

4.6.1. UTICAJ DODATKA TROPA BOROVICE I MALINE NA FIZIČKE KARAKTERISTIKE BEZGLUTENSKOG KEKSA

4.6.1.1. Boja keksa

Boja, kao parametar koji u značajnoj meri doprinosi prihvatljivosti proizvoda od strane potrošača, određena je u uzorcima bezglutenskog keksa instrumentalno, a vrednosti L^* , a^* i b^* poređene su za različite formulacije. Zamena 30% bezglutenske smeše funkcionalnim sastojcima dobijenim iz tropa borovnice i maline, rezultirala je, bez

obzira na odnos ovih sastojaka, dobijanjem keksa tamnije boje (veće vrednosti L^*), sa manjim udelom žute boje (veće vrednosti b^*) i većim udelom crvene boje (veće vrednosti a^*) u poređenju sa kontrolnim keksom. Pokazalo se, takođe, da promene u boji keksa, nastale dodatkom tropa borovnice i maline, odražavaju sastav antocijana u ovim dvema voćnim vrstama. Tako je, povećanjem udela tropa borovnice u keksu, došlo do smanjenja vrednosti b^* (Slika 25), što ukazuje na povećanje udela plave boje usled prisustva karakterističnih plavih pigmenata (glikozidi delfinidina, malvidina i petunidina) (Routray i Orsat, 2011). U formulacijama sa većim udelom tropa maline (oznake 3, 4, 5) dominira crvena boja, tako da su ovi keksovi imali veće vrednosti a^* u poređenju sa ostalim formulacijama, a ovakav profil boje posledica je prisustva pigmenata poput cijaninid-3-soforozida, svojstvenih za malinu (Chen i sar., 2007). Vrednost L^* takođe je rasla sa povećanjem udela tropa maline u formulaciji.



Slika 25. Uticaj dodatka tropa borovnice i maline na parametre boje keksa

Utvrđivanjem korelacionih odnosa između parametara određenih na uzorcima keksa, može se zaključiti da postoji statistički značajna ($p < 0,05$) negativna korelacija između sadržaja monomernih antocijana i parametara boje keksa. Pearsonovi koeficijenti korelacije između ACY i L^* , a^* i b^* iznosili su, -0,9524, -0,9591 i -0,9369, respektivno. Statistički značajna negativna korelacija između ovih parametara utvrđena je i u studijama sprovedenim na uzorcima višnje različitih sorti (Gonçalves i sar., 2007).

Iako se koncentracije bogati antocijanima primenjuju kao aditivi u prehrambenoj industriji, ograničenja po pitanju njihove upotrebe posledica su nestabilnosti i promene boje tokom skladištenja, što se odražava na održivost i senzorski kvalitet proizvoda u koji su dodati (Šarić i sar., 2016). Imajući u vidu da se dodatkom tropa borovnice i maline, može očekivati nestabilnost boje finalnog proizvoda, određivanje boje keksa sprovedeno je nakon šest meseci skladištenja u uslovima koji imitiraju uslove skladištenja u marketima (ambijentalna temperatura, upakovani u metaliziranu polipropilensku ambalažu). Na osnovu vrednosti ΔE datih u tabeli 15, može se zaključiti

da se, nakon šest meseci skladištenja, u uzorcima keksa koji sadrže trop maline u većem udelu (oznake 3, 4 i 5) javlja razlika u boji koja je uočljiva ljudskim okom ($\Delta E > 3$), dok se sa povećanjem udela tropa borovnice, vrednost ΔE smanjuje. Kod uzoraka 8 (22,5% tropa borovnice) i 2, 7 i 9 (30% tropa borovnice) ova vrednost bila je manja od 3, što predstavlja granicu ispod koje razlika u boji nije značajna za ljudsko oko (Francis i Clydesdale, 1975). Degradacija antocijana i značajna promena boje tropa maline utvrđena je i od strane Ochoa i saradnika (1999) pri skladištenju na 37 °C tokom 50 dana.

4.6.1.2. Teksturna svojstva keksa

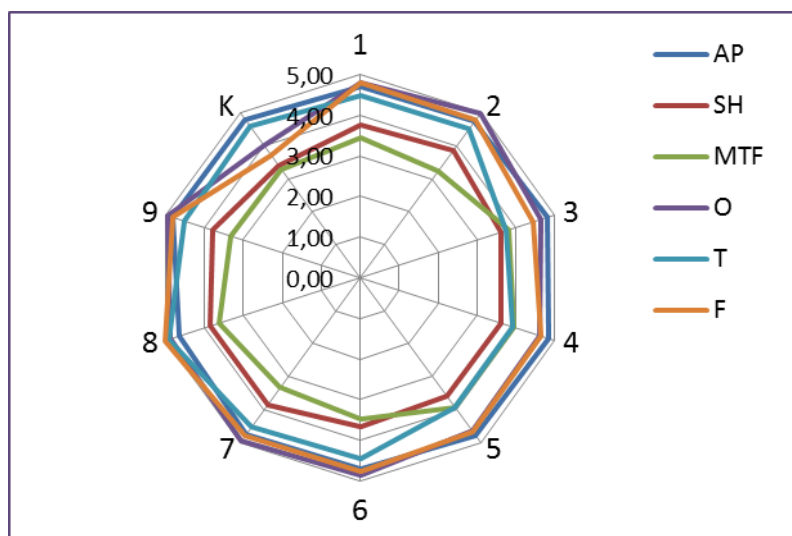
Voda i mast, kao glavni sastojci odgovorni za teksturna svojstva proizvoda, dodati su u istoj količini u ispitivane formulacije 1-9, pa se razlike u vrednostima čvrstoće keksa (H) mogu pripisati različitom sadržaju i različitim funkcionalnim karakteristikama prehrambenih vlakana, poreklom iz tropa. Brojne studije, čiji su rezultati obuhvaćeni preglednim radom Elleuch i saradnika (2011) ukazuju na značajan uticaj dodatka vlakana na teksturna svojstva proizvoda na bazi žita. U studiji koju su sprovedli Uysal i saradnici (2007), dodatak prehrambenih vlakana iz voća značajno je uticao na povećanje čvrstoće keksa, a sličan efekat na teksturna svojstva utvrdili su Singh i saradnici (2003) primenom vlakana iz povrća. Supstitucijom dela bezglutenske smeše tropom borovnice i maline u različitim odnosima, dobijeni su proizvodi (1-9) značajno veće čvrstoće u poređenju sa kontrolnim (Tabela 15), a rezultati ukazuju i na statistički značajnu negativnu korelaciju ($r = -0,734$, $p < 0,05$) između čvrstoće i sadržaja vlage u keksu (Prilog 6). Formulacije 4 i 5, u kojima je 30% bezglutenske smeše zamenjeno tropom maline, imale su najveći sadržaj vlage i najmanje vrednosti H, što se može pripisati sposobnosti tropa maline da tokom pečenja zadrži veći udeo vode (Šarić i sar., 2016). Nasuprot tome, sadržaj vlage u uzorcima 2, 7 i 9 (30% tropa borovnice) bio je najmanji, a vrednosti H najveće.

Tekstura prehrambenih proizvoda može biti ocenjena kako instrumentalno, tako i upotrebom ljudskih čula, pa su utvrđeni i korelacioni odnosi između vrednosti H i vrednosti senzorski ocenjene tekture (SH). Vrednosti Pearsonovih koeficijenata od 0,961 ukazuju na postojanje statistički značajne ($p < 0,05$) korelacije između ovih parametara (Prilog 6).

4.6.1.3. Senzorska ocena kekxa

Dodatkom tropa borovnice i maline u formulaciju bezglutenskog kekxa dobijeni su proizvodi boljih senzorskih svojstava (KB od 4,15 do 4,49) u poređenju sa kontrolnim kekksom (KB = $3,85 \pm 0,03$), što predstavlja izuzetan rezultat, imajući u vidu visok nivo (30%) supstitucije bezglutenske smeše funkcionalim sastojcima bogatim vlaknima, što se u mnogim studijama pokazalo nepovoljnim sa aspekta izgleda, senzorskih i teksturnih svojstava proizvoda (Ajila i sar., 2008; Vratana i Zabik, 1978).

Analizirajući senzorski profil ispitivanih formulacija bezglutenskog kekxa (Slika 26), može se zaključiti da su najmanje ocene ostvarene za parametre koji opisuju teksturna svojstva (SH i MTF), što ukazuje na generalni problem bezglutenskih vrsta kekxa, kod kojih se javlja izdvajanje čestica uslovljeno odsustvom glutena, i adhezivnost, uslovljana značajnim udelom skroba u proizvodu (Ylimaki i sar., 1991). Ipak, imajući u vidu da je i osnovna formulacija (K) ocenjena nižim ocenama kada su u pitanju ova dva parametra, može se zaključiti da dodatak tropa nije dodatno uticao na pogoršanje teksturnih svojstava bezglutenskog kekxa.



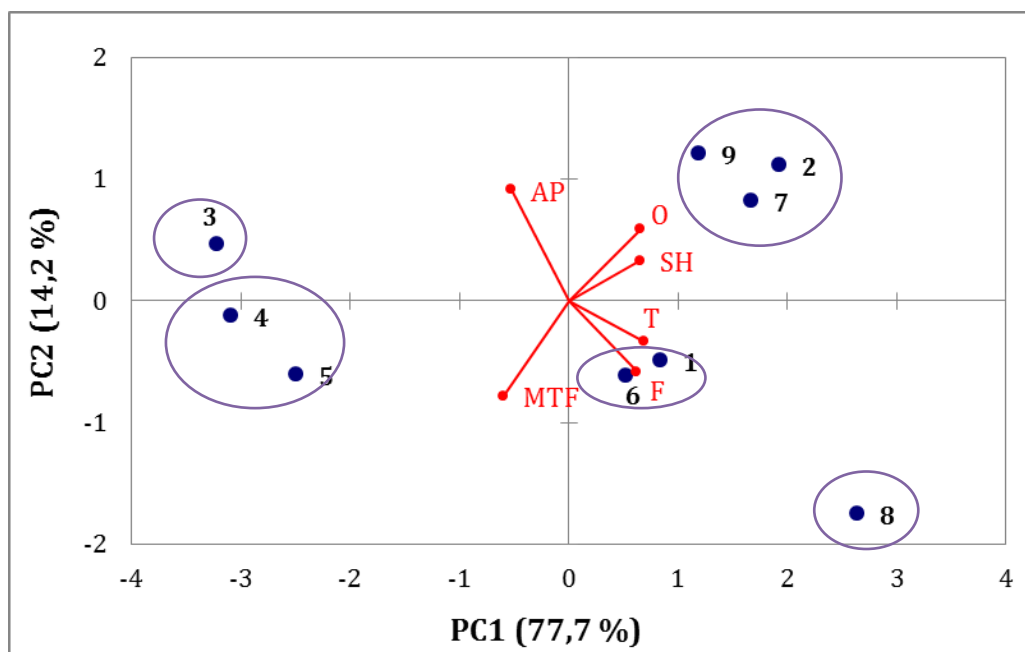
Slika 26. Senzorski profil različitih formulacija bezglutenskog kekxa sa dodatkom tropa borovnice i maline

*AP – izgled kekxa; SH – tekstura pri prvom zagrizu; MTF – tekstura pri žvakanju; O – miris; T – ukus; F – aroma

Podaci dobijeni za svako pojedinačno svojstvo u senzorskoj oceni bezglutenskog kekxa, analizirani su metodom glavnih komponenti (PCA). Ova vrsta statističke analize zasniva se na redukciji dimenzionalnosti skupa podataka (Rančić, 2013) izračunavanjem novog skupa nekorelisanih promenljivih, zvanih glavne komponente (principal

component - PC). PCA omogućava dobijanje sažetog prikaza rezultata i vizuelizaciju korelativnih odnosa između merenih veličina (varijabli) i ispitivanih uzoraka (Šimurina, 2013).

Dobijeni rezultati dati su u vidu biplot dijagrama, koji prikazuje pozicije uzoraka (1-9) u PC prostoru u odnosu na rezultate senzorske analize (Slika 27).



Slika 27. Biplot dijagram pozicije uzoraka bezglutenskog keksa sa dodatim tropom borovnice i maline u PC prostoru u odnosu na rezultate senzorske analize

*AP – izgled keksa; SH – tekstura pri prvom zagrizu; MTF – tekstura pri žvakanju; O – miris; T – ukus; F – aroma

Sa dijagrama se vidi da je PC analizom objašnjeno 91,9% ukupne varijanse. Prva glavna komponenta (PC1) objašnjava 77,7% ukupne varijanse i pozitivno korelira sa sledećim varijablama: ukusom (T), teksturom pri prvom zagrizu (SH), mirisom (O) i aromom (F), dok je negativna korelacija utvrđena za teksturu pri žvakanju (MTF) i izgled keksa (AP). Koeficijenti korelacije (*loadings*) glavnih komponenti i varijabli, doprinosi varijabli, kao i svojstvena vrednost (eng. *eigenvalue*) za glavne komponente dati su u tabeli 16.

Tabela 16. PCA analiza parametara senzorske ocene keksa: vrednosti koeficijenta korelacije glavnih komponenti i varijabli, doprinosi varijabli i svojstvena vrednost (*eigenvalue*) za PC1 i PC2

Varijable	Koeficijenti korelacije		Doprinosi (%)	
	PC1	PC2	PC1	PC2
AP	-0,736	0,548	11,62	35,28
SH	0,927	0,201	18,42	4,72
MTF	-0,841	-0,471	15,15	26,03
O	0,924	0,353	18,30	14,60
T	0,970	-0,203	20,19	4,84
F	0,872	-0,352	16,32	14,52
<i>Eigenvalue</i>	4,66	0,85		

AP – izgled keksa; SH – tekstura pri prvom zagrizu; MTF – tekstura pri žvakanju; O – miris; T – ukus; F – aroma

Pozicija uzoraka keksa (1-9) u koordinatnom sistemu dve glavne komponente, ukazuje da su oni jasno diferencirani u pet grupa. Formulacije u kojima je 30% bezglutenske smeše zamenjeno tropom borovnice (oznake 2, 7, 9) pokazali su pozitivnu korelaciju sa obe glavne komponente, a ovi uzorci izdvojili su se na osnovu mirisa i teksture pri prvom zagrizu. Formulacija 8 (22,5% tropa borovnice i 7,5% tropa maline) izdvojena je u posebnu grupu, a njena pozicija uslovljena je najvećim vrednostima ocena za ukus i aromu. Na osnovu ovih rezultata, može se izvesti generalni zaključak da dodatak tropa borovnice u većem procentu rezultira dobijanjem formulacija boljeg ukusa, mirisa, arome i teksture pri prvom zagrizu. Sa druge strane uzorci 3, 4 i 5 se razdvajaju po PC1 na osnovu izgleda i teksture prilikom žvakanja. Adhezivnost i izdvajanje čestica, kao odlike ponašanja proizvoda prilikom žvakanja, najbolje su ocenjeni u formulaciji koja sadrži samo trop maline.

Poredeći dva granična slučaja – formulacije koje sadrže samo jedan od tropova na nivou supstitucije od 30% (krajnje tačke u dizajnu), može se zaključiti da nema statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u pogledu vrednosti ukupne senzorske ocene (KB), iako su pojedinačni parametri uslovlili značajnu diferencijaciju ovih formulacija prilikom PC analize. Od formulacija definisanih eksperimentalnim planom, najveću vrednost KB ostvarila je ona u kojoj je deo bezglutenske smeše zamenjen sa 22,5% tropa borovnice i

7,5% tropa maline (oznaka 8) i čija je vrednost KB iznosila $4,49 \pm 0,00$. Ovaj uzorak dobio je najveće ocene za ukus i aromu, što ga je značajno izdvojilo u ukupnoj oceni.

4.6.2. UTICAJ DODATKA TROPA BOROVNICE I MALINE NA ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL BEZGLUTENSKOG KEKSA

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih rastvorljivih polifenola i monomernih antocijana za različite formulacije bezglutenskog keksa, uključujući i kontrolni, prikazani su u tabeli 15. Singletonova metoda koja koristi Folin-Ciocalteu reagens za određivanje TPC, zasnovana je na redukcionoj sposobnosti hidroksilnih grupa, pa kao takva podrazumeva detekciju svih polifenolnih jedinjenja. Poredeći vrednosti TPC i ACY za dva granična slučaja – formulacije keksa u kojima je supstitucija izvršena samo jednom vrstom tropa, utvrđena je statistički ($p < 0,05$) značajna razlika. Naime, srednja vrednost TPC bila je čak oko 6 puta veća u formulaciji koja je sadržala samo trop borovnice, u poređenju sa onom koja je sadržala trop maline, dok je sadržaj monomernih antocijana bio 1,6 puta veći. Dobijene vrednosti TPC su u saglasnosti sa prethodnim studijama sprovedenim na različitim vrstama bobičastog voća. Naime, Nile i Park (2014) utvrdili su znatno veći sadržaj TPC u borovnici (261-585 mg/g) u poređenju sa malinom (99 mg/g), dok je vrednost ACY ovih dveju voćnih vrsta poređena u radu Souza i saradnika (2014) i dobijene su dva puta veće vrednosti ovog parametra u borovnici. Statistički značajna korelacija utvrđena je između TPC i IC_{50} (DPPH), kao i između ACY i IC_{50} (DPPH), sa vrednostima Pearsonovih koeficijenata korelacije -0,987 i -0,980, respektivno (Prilog 6). Takođe, utvrđeno je da sa povećanjem udela tropa borovnice u formulaciji, dolazi do linearnog povećanja vrednosti TPC.

Poređenjem rezultata za TPC u keksu sa rezultatima za osušene i samlevene tropove, uočava se da tokom pečenja dolazi do veće degradacije polifenolnih jedinjenja tropa maline, s obzirom da je odnos TPC u funkcionalnim sastojcima bio oko 2 (Slika 16), a da je TPC u keksu sa 30% tropa borovnice bio oko 6 puta veći u odnosu na formulaciju koja je sadržala samo trop maline.

Imajući u vidu da je glavni cilj dodatka tropova u formulaciju bezglutenskog keksa bilo njegovo funkcionalno obogaćivanje, vrednosti TPC, ACY i IC_{50} (DPPH) dobijene za keksove sa tropom upoređene su sa vrednostima ovih parametara u kontrolnom keksu. Bez obzira na odnos funkcionalnih sastojaka, u svim formulacijama je postignuto višestruko povećanje antioksidativnog potencijala, usled dodatka tropa.

4.6.3. REGRESIJE JEDNAČINE MODELOVANIH ODZIVA

Primena RSM tehnike u optimizaciji formulacije ne zasniva se na jednostavnoj analizi dobijenih rezultata, već podrazumeva definisanje ciljeva optimizacije, tj. kriterijuma i njihove značajnosti, pa se do optimalnog rešenja dolazi primenom odgovarajućih statističkih principa. U cilju fitovanja eksperimentalnih rezultata sprovedena je višestruka regresiona analiza, pri čemu su za različite odzive (Y), dobijene zavisnosti koje se mogu aproksimirati polinomima različitog reda (Tabela 17).

Tabela 17. Optimizacija formulacije bezglutenskog keksa: regresione jednačine i pokazatelji adekvatnosti fitovanih modela

	Jednačina modela	R ²	R ² _{adj}	R ² _{pred}	p-vrednost	P (LoF)
ΔE	$Y=0,255X_1+0,052X_2$	0,9989	0,9987	0,9984	<0,0001	0,0968
H	$Y=31,310X_1+46,755X_2-0,678X_1X_2$	0,9997	0,9996	0,9994	<0,0001	0,8895
KB	$Y=0,143X_1+0,145X_2-5,935*10^{-5}X_1X_2-6,061*10^{-5}X_1X_2(X_1-X_2)$	0,9958	0,9933	0,9770	0,0001	0,0644
TPC	$Y=4,671X_1+16,199X_2$	0,9985	0,9983	0,9976	<0,0001	0,2292
ACY	$Y=1,385X_1+8,619X_2+0,0257X_1X_2$	0,9982	0,9976	0,9962	<0,0001	0,4600
IC ₅₀ (DPPH)	$Y=0,169X_1+0,133X_2+5,869*10^{-4}X_1X_2$	0,9924	0,9899	0,9835	<0,0001	0,9992
M	$Y=0,263X_1+0,216X_2-2,260*10^{-3}X_1X_2$	0,9997	0,9996	0,9993	<0,0001	0,6506
a _w	$Y=0,020X_1+0,016X_2-2,518*10^{-4}X_1X_2$	0,9884	0,9846	0,9745	<0,0001	0,2606

ΔE – razlika u boji keksa nakon 6 meseci skladištenja; H – čvrstoća keksa; KB – kvalitetni broj; TPC – sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola; ACY – sadržaj monomernih antocijana; IC₅₀ – koncentracija ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50% DPPH; M – vlaga keksa; a_w – aktivnost vode

Za većinu odziva (H, M, a_w, ACY i IC₅₀(DPPH)) zavisnost dobijenih eksperimentalnih podataka aproksimirana je polinomom drugog reda. Rezultati određivanja TPC i ΔE opisani su primenom linearnog modela, dok se primena kubnog modela pokazala kao najbolja za aproksimaciju rezultata senzorske ocene (KB).

4.6.4. ANALIZA VARIJANSE (ANOVA) MODELOVANIH ODZIVA

U cilju procene adekvatnosti postavljenih fitovanih modela korišćena je analiza varijanse (ANOVA), a dobijeni rezultati za sve modelovane odzive dati su u tabeli 17. Od statističkih parametara koji služe za proveru adekvatnosti modela, prikazani su:

- koeficijent determinacije (R^2),
- korigovani koeficijent determinacije (R^2_{adj}),
- predikcioni koeficijent determinacije (R^2_{pred}),
- p -vrednost,
- *Lack of fit* vrednost (LoF).

Koeficijent determinacije predstavlja statistički kriterijum koji pokazuje koliki je deo varijacija zavisne promenljive objašnjen regresionim modelom, a njegova vrednost kreće se u opsegu $0 \leq R^2 \leq 1$. Za sve ispitivane odzive dobijena je vrednost R^2 veća od 0,98 (Tabela 17), što praktično znači da se više od 98% varijacija ispitivanih odziva može objasniti predloženim regresionim jednačinama, čime je zadovoljen kriterijum prihvatljivosti postavljenih fitovanih modela ($R^2 > 0,80$) predložen od strane Joglekar i May (1987). Predikcioni koeficijent determinacije pokazuje koliko dobro predloženi regresioni model može da predvidi odzive za definisani set ulaznih parametara. U eksperimentalnom planu primenjenom u optimizaciji formulacije bezglutenskog keksa, utvrđeno je, za sve odzive, da su vrednosti R^2_{pred} veoma bliske vrednostima R^2_{adj} (razlika manja od 0,2), čime je ispunjen kriterijum prihvatljivosti za vrednosti ovog parametra definisan od strane Alao i Konneh (2009). LoF test poredi rezidualnu grešku (grešku ostataka) sa „čistom“ eksperimentalnom greškom izračunatom iz ponavljanja u centralnoj tački, pri čemu ukoliko je LoF značajna ($p < 0,05$), odabrani model nije adekvatan. Kako su sve vrednosti p (LoF) date u tabeli 17 veće od 0,05, može se zaključiti da LoF nije značajna, te da su pretpostavljeni regresioni modeli za sve odzive adekvatni. Takođe, za proveru validnosti modela korišćeni su i grafici normalne raspodele ostataka (reziduala) koji su dati u prilogu 7.

4.6.5. ODABIR OPTIMALNE FORMULACIJE BEZGLUTENSKOG KEKSA PRIMENOM FUNKCIJE POŽELJNOSTI

Postupak optimizacije podrazumeva odabir optimalnih vrednosti nezavisno promenljivih veličina sa ciljem postizanja željenog izlaza, odnosno odziva. S obzirom da se veoma često zahteva pronalaženje uslova koji istovremeno zadovoljavaju više postavljenih ciljeva, neophodno je primeniti neku od tehnika višekriterijumskog odlučivanja. Primena tzv. koncepta funkcije poželjnosti (eng. *desirability function*) u

optimizaciji formulacije keksa, sastojala se u transformaciji odziva u individualne funkcije poželjnosti, čije se vrednosti kreću od 0 do 1. Ukupna funkcija poželjnosti (D) dobijena je kao geometrijska sredina pojedinačnih funkcija, a za optimalno rešenje posmatranog sistema uzeta je ona kombinacija nezavisno promenljivih, kojom je dobijena najveća vrednost D . Imajući u vidu različitu značajnost pojedinih odziva, svakom od njih dodeljena je određena vrednost prioriteta (nivo značajnosti) u skladu sa zadatim kriterijumima optimizacije (Tabela 18).

Tabela 18. Prikaz kriterijuma zadatih u optimizaciji formulacije bezglutenskog keksa

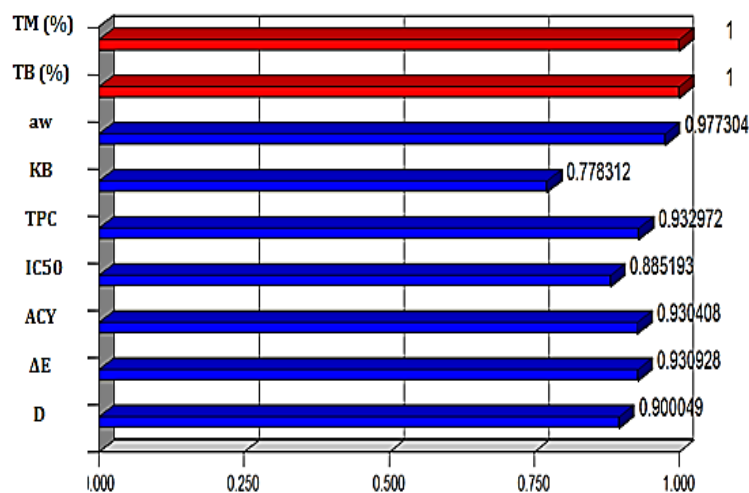
Faktori i odzivi	Kriterijum	
	Cilj	Nivo značajnosti
TM (%)	u rasponu	3
TB (%)	u rasponu	3
ΔE	minimum	4
H	u rasponu	3
KB	maksimum	5
TPC	maksimum	5
ACY	maksimum	5
IC ₅₀ (DPPH')	minimum	5
M	u rasponu	3
a _w	minimum	4

TM – trop maline; TB – trop borovnice; ΔE – razlika u boji keksa nakon 6 meseci skladištenja; H – čvrstoća keksa; KB – kvalitetni broj; TPC – sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola; ACY – sadržaj monomernih antocijana; IC₅₀ – koncentracija ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50% DPPH'; M – vlaga keksa; a_w – aktivnost vode

Budući da plasman nekog novokreiranog proizvoda u velikoj meri zavisi od njegovih senzorskih karakteristika, i da je prihvatljivost proizvoda sa ovog aspekta imperativ koji se postavlja proizvođačima, u optimizaciji formulacije bezglutenskog keksa najveći nivo značajnosti (5) dat je upravo postizanju što veće vrednosti KB. Dobijanje bezglutenskog keksa dobrih senzorskih svojstava od posebnog je značaja, imajući u vidu i činjenicu da odsustvo glutena kod proizvoda iz ove kategorije rezultira lošim tehnološkim kvalitetom i direktno se odražava na teksturu proizvoda, a time i na njegovu senzorsku prihvatljivost. U mnogim studijama se pokazalo i da dodatak funkcionalnih sastojaka poput vlakana dodatno utiče na parametre tehnološkog i senzorsog kvaliteta bezglutenskih proizvoda (Gómez i sar., 2003; Sudha i sar., 2007).

Polazeći od osnovne ideje – kreiranja proizvoda sa dodatom vrednošću, kao drugi, podjednako važan kriterijum optimizacije (nivo značajnosti 5), postavljena je maksimizacija antioksidativnog potencijala proizvoda. Nivo značajnosti 4 definisan je za parametre ΔE i a_w , koji se odnose na stabilnost boje, odnosno mikrobiološku stabilnost, kao izuzetno važne parametre kvaliteta i bezbednosti finalnog proizvoda.

Definisani kriterijumi i koeficijenti značajnosti za ispitivane faktore i posmatrane odzive sistema, obrađeni su primenom Design-Expert® softvera i na taj način utvrđena je kombinacija faktora koja daje najbolji globalni optimum D . Kao optimalno rešenje sa vrednošću D od 0,900 dobijena je formulacije sa sledećim udelima funkcionalnih sastojaka: 28,2% tropa borovnice i 1,8% tropa maline. Grafički prikaz pojedinačnih funkcija poželjnosti prikazan je na slici 28.



Slika 28. Optimizacija formulacije bezglutenskog keksa: prikaz vrednosti pojedinačnih funkcija poželjnosti i ukupne funkcije poželjnosti (D)

TM – trop maline; TB – trop borovnice; ΔE – razlika u boji keksa nakon 6 meseci skladištenja; H – čvrstoća keksa; KB – kvalitetni broj; TPC – sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola; ACY – sadržaj monomernih antocijana; IC₅₀ – koncentracija ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50% DPPH^{}; M – vlaga keksa; a_w – aktivnost vode

4.6.6. PROVERA (VERIFIKACIJA) MODELA

Poslednji korak u primeni RSM u procesu optimizacije jeste eksperimentalna provera predviđenih vrednosti modelovanih odziva za proizvoljno odabrane kombinacije ulaznih parametara. Postupak provere regresionih jednačina sproveden je na optimalnoj formulaciji bezglutenskog keksa na tri nezavisna seta eksperimenata, a srednje vrednosti dobijenih rezultata date su u tabeli 19.

Slaganje dobijenih rezultata sa predviđenim vrednostima dobijenim iz pretpostavljenih regresionih jednačina može se definisati kao zadovoljavajuće, a

ispitivani model kao adekvatan, s obzirom da se svi dobijeni rezultati nalaze unutar intervala poverenja (CI) od 95%. Ovim su postavljene regresione jednačine proverene, a model verifikovan.

Tabela 19. Prikaz softverski predviđenih i dobijenih vrednosti odziva

Odziv	Dobijena vrednost	Predviđena vrednost	95% CI low	95% CI high	95% PI low	95% PI high
ΔE	1,89 \pm 0,05	1,93	1,83	2,03	1,70	2,16
H	1343,08 \pm 11,62	1342	1337	1347	1331	1353
KB	4,42 \pm 0,02	4,41	4,40	4,43	4,39	4,44
ACY	246,81 \pm 10,11	245,4	240,3	250,5	233,6	257,2
TPC	462,12 \pm 12,81	465,7	459,2	472,3	450,3	481,1
IC ₅₀ (DPPH')	4,05 \pm 0,14	4,09	4,03	4,14	3,96	4,21
M	6,46 \pm 0,02	6,45	6,44	6,46	6,42	6,48
a _w	0,47 \pm 0,02	0,47	0,46	0,48	0,45	0,49

ΔE – razlika u boji keksa nakon 6 meseci skladištenja; H – čvrstoća keksa; KB – kvalitetni broj; TPC – sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola; ACY – sadržaj monomernih antocijana; IC₅₀ – koncentracija ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50% DPPH'; M – vlaga keksa; a_w – aktivnost vode

95% CI low – donja granica intervala poverenja od 95%; 95% CI high – gornja granica intervala poverenja od 95%; 95% PI low – donja granica predikcionog intervala od 95%; 95% PI high – gornja granica predikcionog intervala od 95%

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da optimalnu formulaciju bezglutenskog keksa karakterišu male promene u boji tokom skladištenja, budući da je ustanovljena vrednost $\Delta E = 1,89 \pm 0,05$ znatno ispod vrednosti koja je značajna za ljudsko oko ($\Delta E < 3$). Takođe, a_w vrednost ovog proizvoda od $0,47 \pm 0,02$, ukazivala je na potencijalnu stabilnost sa aspekta mikrobiološkog kvara. Optimalna formulacija bezglutenskog keksa, upakovana u metaliziranu polipropilensku ambalažu, skladištena je na ambijentalnoj temperaturi tokom šest meseci, nakon čega su određeni pokazatelji mikrobiološkog kvaliteta navedeni u poglavlju 3.3.8. Izmerena a_w vrednost optimalnog bezglutenskog keksa se nije značajno promenila tokom skladištenja ($0,48 \pm 0,00$), a ova vrednost bila je daleko ispod granice minimalne aktivnosti vode supstrata neophodne za rast kserofilnih plesni (0,65-0,75) i osmofilnih kvasaca (0,60), koji su glavni kontaminanti namirnica sa malim sadržajem vlage. Nakon šest meseci skladištenja, ukupan broj mikroorganizama bio je ispod granice detekcije metode (<10 CFU/g), kao i ukupan broj osmofilnih kvasaca (<100 CFU/g) i kserofilnih plesni (<100 CFU/g), pa se

može zaključiti da optimalna formulacija bezglutenskog keksa predstavlja mikrobiološki stabilan proizvod, koji se, adekvatno upakovan, može bezbedno skladištiti na sobnoj temperaturi tokom dužeg vremenskog perioda. Sa aspekta funkcionalnosti i senzorskih svojstava, optimalna formulacija bezglutenskog keksa (Tabela 19) može se smatrati značajno unapređenom u odnosu na kontrolnu (Tabela 15).

4.7. NUTRITIVNI PROFIL OPTIMALNE FORMULACIJE BEZGLUTENSKOG KEKSA

Polazeći od toga da je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bilo obogaćivanje postojeće (kontrolne) formulacije bezglutenskog keksa i dobijanje nutritivno vrednog funkcionalnog proizvoda, u optimalnoj i kontrolnoj formulaciji određen je sadržaj makronutrijenata (proteina, ugljenih hidrata i masti), sa posebnim akcentom na prehrambena vlakna i esencijalne masne kiseline, kao i sadržaj mikronutrijenata (minerala), u okviru kojih su posebno izdvojeni kalcijum i gvožđe, kao deficitarni u bezglutenskoj ishrani.

Keks je generalno poznat kao namirnica sa visokim sadržajem masti i šećera, koji se u ove proizvode dodaju sa ciljem postizanja odgovarajućih kvalitetnih karakteristika: adekvatne obradivosti testa, postizanja strukturnih i teksturnih karakteristika svojstvenih ovoj grupi proizvoda i postizanja punijeg ukusa i arome. Poslednji aspekt posebno je važan kod bezglutenskih vrsta keksa, kod kojih se, dodatkom masti i šećera maskira peskovit i suv ukus, koji se javlja prilikom žvakanja (Lazaridou i Biliaderis, 2009).

Rezultati određivanja hemijskog sastava optimalnog i kontrolnog bezglutenskog keksa dati su u tabeli 20, a poređenjem dobijenih vrednosti za sastav makronutrijenata, može se zaključiti da se supstitucijom dela bezglutenske smeše tropom borovnice i maline dobija proizvod značajno obogaćen prehrambenim vlaknima, sa manjim sadržajem zasićenih masnih kiselina i nižom energetsom vrednošću.

Tabela 20. Hemijski sastav (g/100 g) i energetska vrednost (kcal/100 g) optimalnog i kontrolnog bezglutenskog keksa

Parametar	Optimalan bezglutenski keks	Kontrolni bezglutenski keks
Sirovi proteini	3,72 ± 0,05	2,20 ± 0,03
Masti	10,97 ± 0,22	11,21 ± 0,09
Zasićene masne kiseline	4,85 ± 0,56	8,26 ± 0,98
Ukupni ugljeni hidrati	77,91 ± 0,29	79,61 ± 0,89
Šećeri	25,72 ± 1,02	25,50 ± 0,11
Prehrambena vlakna	7,83 ± 0,89	0,15 ± 0,03
Vlaga	6,46 ± 0,02	6,43 ± 0,02
Pepeo	0,95 ± 0,01	0,56 ± 0,03
Energetska vrednost	409,60 ± 1,45	427,71 ± 2,09

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija

Specifične preporuke vezane za ishranu ističu značaj konzumiranja hrane bogate vlaknima i smanjenja unosa zasićenih masti (Lichtenstein i sar., 2006). Iako su pre svega značajne za podmirivanje energetske potrebe organizma, masti su takođe i važan deo svakodnevne izbalansirane ishrane. Prisustvo zasićenih masnih kiselina u velikim količinama u ishrani smatra se jednim od uzročnika koronarnih oboljenja i pojedinih vrste kancera (Wood i sar., 2008). Sa druge strane, polinezasićene masne kiseline poput linolne (LA, 18:2, n-6) i α -linolenske kiseline (LNA, 18:3, n-3) važne su za odvijanje brojnih bioloških funkcija kod sisara, a mnoge studije ih povezuju i sa smanjenjem rizika od srčanih oboljenja, s obzirom da dokazano utiču na porast nivoa HDL čestica i snižavaju koncentraciju triglicerida u krvi (Kesavulu i sar., 2002). Prema preporukama britanskog ministarstva zdravlja, odnos sadržaja polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina (PUFA/SFA) u namirnicama trebalo bi da iznosi više od 0,45, dok je Svetska zdravstvena organizacija (WHO/FAO) izdala smernice za "balansiranu ishranu" u kojoj je preporučeni odnos PUFA/SFA iznad 0,4 (HMSO, 1994; Wood i sar., 2008).

U keksu sa dodatim tropom u najvećem udelu prisutne su mononezasićene masne kiseline, pre svega oleinska (C18:1c), a glavna razlika u odnosu na kontrolnu formulaciju odnosi se na povećanje sadržaja polinezasićenih kiselina (Tabela 21). Optimalna formulacija sadržala je oko dva puta veću količinu LA i čak oko 25 puta veću količinu

LNA. Odnos PUFA/SFA u optimalnom keksu iznosio je $0,51 \pm 0,07$, dok je u kontrolnom iznosio $0,13 \pm 0,00$.

Tabela 21. Sadržaj masnih kiselina (g/100 g) optimalnog i kontrolnog keksa

Masna kiselina	Optimalan keks	Kontrolni keks
C12:0	$0,01 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$
C14:0	$0,12 \pm 0,00$	$0,26 \pm 0,01$
C16:0	$3,95 \pm 0,12$	$5,21 \pm 0,03$
C16:1	$0,02 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$
C18:0	$0,67 \pm 0,01$	$1,88 \pm 0,01$
C18:1t	-	-
C18:1c	$4,39 \pm 0,08$	$3,41 \pm 0,01$
C18:2t	-	-
C18:2c (LA)	$1,70 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,01$
C20:0	$0,05 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,00$
C18:3n3 (LNA)	$0,76 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,00$
C20:1	$0,03 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,01$
C22:0	$0,04 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,00$
C20:5n3	$0,01 \pm 0,00$	-
C23:0	$0,01 \pm 0,00$	-
C24:0	-	-
MUFA	$4,45 \pm 0,39$	$3,53 \pm 0,09$
PUFA	$2,47 \pm 0,12$	$0,97 \pm 0,01$
UFA (MUFA+PUFA)	$6,92 \pm 0,14$	$4,49 \pm 0,08$
SFA	$4,85 \pm 0,21$	$7,63 \pm 0,18$
PUFA/SFA	$0,51 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,00$

MUFA – mononezasićene masne kiseline; PUFA – polinezasićene masne kiseline; UFA – nezasićene masne kiseline (ukupne); SFA – zasićene masne kiseline

Na osnovu dobijenih rezultata, a uzimajući u obzir gorenavedene preporuke, može se zaključiti da optimalna formulacija keksa predstavlja “proizvod sa visokim sadržajem vlakana“, s obzirom da sadrži više od 6 g prehrambenih vlakana u 100 g proizvoda (EC, 2006), dok se sa aspekta sadržaja i sastava masti pokazalo da dodatak tropa u formulaciju doprinosi smanjenju sadržaja zasićenih i povećanju sadržaja mono- i polinezasićenih masnih kiselina, pa se može reći da optimalna formulacija ima izbalansiran odnos PUFA/SFA.

Pozato je da minerali imaju veliki značaj u ljudskoj ishrani. Od ispitivanih minerala, kategoriji makroelemenata pripadaju Na, K, Ca i Mg, a njihova uloga u ljudskom

organizmu vezuje se, pre svega, za održavanje osmotskog pritiska, kiselo-bazne ravnoteže i permeabilnosti ćelija. Takođe, svaki od makroelemenata ima i neke specifične funkcije u ljudskom organizmu. Sa druge strane, mikroelementi (Fe i Zn), predstavljaju aktivatore mnogih važnih enzima. Iako postoje brojni dijetetski suplementi koji omogućavaju zadovoljenje potreba organizma za mineralima, mnoge zdravstvene organizacije daju prednost hrani, kao primarnom izvoru mineralnih materija. U tom smislu, brojne studije se bave unapređenjem mineralnog sastava prehrambenih proizvoda dodatkom sirovina bogatih makro- i mikroelementima.

Dodatkom tropa borovnice i maline postiglo se višestruko povećanje količine svih ispitivanih minerala u bezglutenskom keksu (Tabela 22). Najveći porast ostvaren je u sadržaju Ca, Mg i Fe i iznosio je 204,7%, 297,7% i 360,9%, respektivno. Ovakav rezultat posebno je značajan imajući u vidu da mnoge kliničke studije sprovedene na pacijentima sa celijakijom ukazuju na deficit Ca i Fe u ishrani (Hallert i sar., 2002; Hopman i sar., 2006; Thompson i sar., 2005).

Tabela 22. Mineralni sastav optimalnog i kontrolnog bezglutenskog keksa

Formulacija keksa	Sadržaj minerala (mg/kg)					
	Na	K	Ca	Mg	Fe	Zn
Optimalni	910,80 (7,27)	2036,05 (23,12)	1339,14 (13,63)	476,82 (14,81)	15,90 (0,57)	15,28 (1,49)
Kontrolni	875,84 (7,57)	839,04 (12,32)	439,41 (25,11)	119,92 (5,64)	3,45 (0,08)	8,46 (0,93)

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina, a vrednosti date u zagradama predstavljaju standardnu devijaciju

4.7.1. DOPRINOS KEKSA SA DODATKOM TROPA BOROBNICE I MALINE PREPORUČENIM DNEVNIM POTREBAMA ZA NUTRIJENTIMA

S obzirom da funkcionalni sastojci dobijeni sušenjem tropa borovnice i maline predstavljaju na neki način koncentrate makro- i mikronutrijenata, kao i fitohemikalija poput antioksidanata, moglo se očekivati da će se njihovim dodatkom u formulaciju bezglutenskog keksa ostvariti značajno veći doprinos preporučenim potrebama za nutrijentima. U tabeli 23 data je procena dnevnog unosa makronutrijenata i mikronutrijenata za populaciju odraslog stanovništva (30-50 godina) konzumiranjem 50 g bezglutenskog keksa (optimalnog i kontrolnog).

Tabela 23. Procena dnevnog unosa makronutrijenata i mikronutrijenata za populaciju odraslog stanovništva (30-50 godina) konzumiranjem 50 g bezglutenskog keksa (optimalnog i kontrolnog)

	Pol	RDA/ AI*	Doprinos RDA (%)	
			Kontrolni	Optimalni
Makronutrijenti (g/dan)				
Proteini	Muškarci	56	1,96	3,32
	Žene	46	2,39	4,04
Ugljeni hidrati	Oba	130	30,6	30,0
Masti	Oba	65**	8,44	8,62
Prehrambena vlakna	Muškarci	38*	0,20	10,3
	Žene	25*	0,30	15,6
LA (n-6)	Muškarci	17*	2,68	5,00
	Žene	11*	4,14	7,73
LNA (n-3)	Muškarci	1,6*	0,94	23,6
	Žene	1,1*	1,36	34,3
Mikronutrijenti (mg/dan)				
Ca	Oba	1000	2,2	6,7
Fe	Muškarci	8	2,16	9,94
	Žene	18	0,96	4,42

LA – linolna kiselina; LNA – α -linolenska kiselina; RDA – preporučena dnevna potreba; AI – adekvatan unos (označen zvezdicom); **USDA Food Guide (<http://www.cnpp.usda.gov/>)

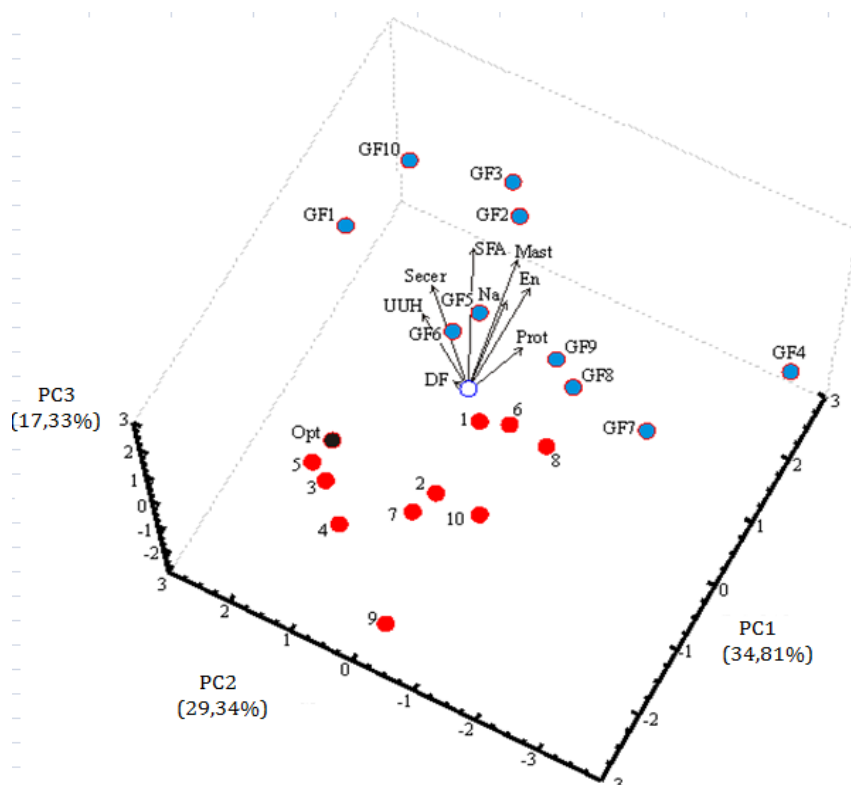
Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da 50 g optimalnog bezglutenskog keksa zadovoljava 10,3%, odnosno 15,6% adekvatnog unosa (AI) prehrambenih vlakana (za muškarce, odnosno žene, respektivno), čime je ostvaren značajno veći doprinos zadovoljenju dnevnih potreba u poređenju sa kontrolnim keksom.

Dnevnim unosom 50 g optimalnog bezglutenskog keksa zadovoljava se 5,00% odnosno 7,73% AI za linolnu kiselinu i 23,6% odnosno 34,3% AI za α -linolensku kiselinu (za muškarce, odnosno žene, respektivno). Rezultati studija (Gambuś i sar., 2009; Gouveia i sar., 2008) u okviru kojih su proizvodi ciljano obogaćivani esencijalnim masnim kiselinama, ukazuju na sličan nivo LNA kao i u optimalnom keksu analiziranom u okviru ove teze. Značaj ovakvog rezultata tim je veći, što je dodatkom tropa u

formulaciju bezglutenskog keksa ostvareno ne samo unapređenje profila masnih kiselina, već i značajno povećanje sadržaja svih prisutnih fitohemikalija i nutrijenata.

Dodatkom tropa borovnice i maline u formulaciju bezglutenskog keksa povećan je višestruko i doprinos RDA/AI za mikronutrijente: sa 2,2 na 6,7% (za Ca), sa 2,16% na 9,94% (za Fe, za muškarce) i sa 0,96% na 4,42% (za Fe, za žene).

Imajući u vidu da je krajnji cilj u kreiranju novog prehrambenog proizvoda njegov plasman na tržište, urađen je uporedni prikaz nutritivnog profila komercijalno dostupnih bezglutenskih vrsta keksa, keksova od celih zrna žitarica sa dodatkom borovnice i/ili maline i optimalnog keksa kreiranog u ovoj studiji. U cilju što boljeg vizuelnog prikaza, podaci o nutritivnim vrednostima, preuzeti sa deklaracija proizvoda (lista data u prilogu 8), obrađeni su primenom PCA i prikazani u vidu 3D dijagrama (Slika 29). Ova vrsta prikaza rezultata odabrana je s obzirom da sve tri glavne komponente imaju značajan udeo u objašnjavanju ukupne varijanse: PC1 (34,8%), PC2 (29,3%) i PC3 (17,3%).



Slika 29. 3D dijagram pozicije uzoraka keksa u PC prostoru u odnosu na vrednosti parametara nutritivnog profila

*UH – ukupni ugljeni hidrati; DF – prehrambena vlakna; SFA – zasićene masne kiseline; Prot – proteini; En – energetska vrednost proizvoda

Sa dijagrama se uočava jasna diferencijacija uzoraka po PC1 i to u dve grupe: prva, u kojoj se nalaze svi bezglutenski keksovi (oznake GF1-GF10) i druga, u kojoj se pored keksova od celih zrna žitarica (oznake 1-10) nalazi i optimalni keks (Opt). Od analiziranih varijabli najveći doprinos PC1 pokazuju ukupne masti (30,6%), prehrambena vlakna (20,0%) i zasićene masne kiseline (18,2%), pa je jasno da razlika između dve grupe uzoraka i njihova diferencijacija po PC1 potiče pre svega od razlika u vrednostima ovih varijabli (Tabela 24). Najvažnija odlika grupe bezglutenskih keksova jeste značajno veći sadržaj masti i udeo SFA, a znatno niži sadržaj prehrambenih vlakana u poređenju sa keksovima od celih zrna žitarica. Ovakav nutritivni sastav uslovio je pozicioniranje GF1-GF10 uzoraka u pozitivnom delu PC1, dok su 1-10 uzorci i optimalni keks pozicionirani u negativnom delu PC1.

Tabela 24. PCA analiza nutritivnog profila komercijalno dostupnih keksova i optimalnog bezglutenskog: vrednosti koeficijenta korelacije (*loadings*), doprinosi varijabli i svojstvena vrednost (*eigenvalue*) za glavne komponente

Varijable	Koeficijenti korelacije			Doprinosi (%)		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
Energ.vrednost	0,638	0,551	-0,116	14,61	12,93	0,96
Ukupne masti	0,923	0,184	0,000	30,56	1,44	0,00
SFA	0,711	-0,373	-0,316	18,15	5,94	7,23
Na	0,613	0,206	0,680	13,51	1,82	33,32
Ukupni ugljeni hidrati	-0,059	-0,712	0,548	0,12	21,62	21,64
Prehrambena vlakna	-0,745	0,357	0,318	19,95	5,42	7,30
Šećeri	0,284	-0,756	0,407	2,90	24,35	11,94
Proteini	0,072	0,788	0,494	0,19	26,48	17,61
<i>Eigenvalue</i>	2,785	2,347	1,386			

Vrednosti sadržaja masti u bezglutenskim keksovima kretale su se od 18,8% do 32,1%, dok je ovaj sadržaj u grupi keksova od celih zrna žitarica iznosio 3% do 18%. Kako je sadržaj SFA u optimalnoj formulaciji najmanje za 40% manji u odnosu na ostale keksove iz kategorije bezglutenskih, jasno je da se i sa ovog aspekta postiglo značajno poboljšanje nutritivnog profila. Bezglutenske keksove karakterisao je i veći sadržaj Na

(200-750 mg/100 g) u odnosu na keksove sa celim zrnom žitarica (170-380 mg/100 g). Iako ne postoje maksimalne preporučene vrednosti u pojedinim namirnicama, generalno se preporučuje redukcija Na u ishrani (WHO, 2003). U tom smislu, od svih keksova koji su obrađeni u cilju uporedne analize nutritivnog profila, optimalna formulacija kreirana u okviru ove teze imala je najniži sadržaj Na, čak 2-8 puta niži od ostalih bezglutenskih keksova. Činjenica da je, po nutritivnim parametrima, optimalni keks sličniji keksovima od celih zrna žitarica (pogotovu po sadržaju vlakana) ukazuje na to, da se dodatkom tropa borovnice i maline postigao izuzetan pomak u nutritivnim svojstvima i da se dobio proizvod koji može da parira komercijalno dostupnim keksovima namenjenim zdravoj populaciji.

4.8. REZULTATI DIJETETSKE INTERVENTNE STUDIJE

Ispitivanje efekta kreiranog bezglutenskog keksova sprovedeno je u okviru dijetetske interventne studije u trajanju od 4 nedelje, tokom kojih se režim ishrane nije menjao, osim što su ispitanice u ishranu uvrstile i kreirani keks (4 keksova, 32 g/dnevno).

Nakon svakodnevnog konzumiranja keksova, po završetku studije u odnosu na parametre pre ispitivanja, došlo je do signifikantnog sniženja nivoa LDL-holesterola u krvi za 21% ($p < 0,01$), dok se sadržaj ukupnog holesterola, HDL-holesterola i triglicerida nije značajno promenio (Tabela 25).

Prema preporukama Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja (<http://www.zdravlje.gov.rs>), prosečan nivo LDL-holesterola pre studije ($3,72 \pm 0,99$ mmol/l) može se kategorisati kao granično povišen rizik za prevremenu aterosklerozu (3,40 – 4,10 mmol/l). Nakon sprovedene studije koncentracija LDL-holesterola iznosila je $2,96 \pm 0,64$ mmol/l, a ovaj nivo može se kategorisati kao poželjan lipidski status (vrednosti do 3,40 mmol/l). Nivoi ukupnog holesterola, HDL-holesterola i triglicerida se i pre i nakon studije mogu kategorisati kao poželjan lipidski status. Pre i nakon interventne studije, vrednosti koncentracije glukoze na tašte i postprandijalno bile su u granicama referentnih vrednosti. Takođe, nisu zabeležene signifikantne promene parametara relevantnih za funkcije jetre (AST i ALT) i bubrega (urea i kreatinin). Indeks telesne mase (BMI) se tokom trajanja studije nije značajno promenio.

Tabela 25. Vrednosti relevantnih biohemijskih parametara u krvi pre i nakon dijetetske interventne studije

Parameter	Pre	Nakon	<i>p</i>
telesna masa (kg)	65,54 ± 10,26	65,59 ± 10,36	0,9676
BMI (kg/m ²)	23,10 ± 3,58	23,12 ± 3,59	0,9246
glukoza (na tašte) (mmol/l)	4,65 ± 0,35	4,65 ± 0,38	0,9031
glukoza (postprandijalno) (mmol/l)	4,57 ± 0,43	4,58 ± 0,45	0,9892
trigliceridi (mmol/l)	1,07 ± 0,55	0,96 ± 0,41	0,5160
holesterol (mmol/l)	5,99 ± 1,05	5,65 ± 0,94	0,2976
HDL (mmol/l)	1,91 ± 0,48	1,87 ± 0,45	0,8286
LDL (mmol/l)	3,72 ± 0,99	2,97 ± 0,64	0,0080*
kreatinin (μmol/l)	60,72 ± 6,24	60,61 ± 6,42	0,7553
urea (mmol/l)	4,01 ± 1,19	3,64 ± 1,22	0,2914
mokraćna kiselina (nmol/l)	232,49 ± 38,19	234,47 ± 37,21	0,9138
ALT (IU/l)	13,89 ± 3,32	11,67 ± 3,13	0,0424*
AST (IU/l)	19,78 ± 3,97	17,37 ± 4,09	0,0133*
adiponektin (mg/ml)	11,99 ± 3,29	15,05 ± 5,47	0,0439*

*označava vrednosti koje se signifikantno ($p < 0.01$) razlikuju

U okviru studije određen je i nivo adiponektina, za koji se pretpostavlja da ima ulogu u razvoju insulinske rezistencije i ateroskleroze. Adiponektin je specifični adipocitni-sekretorni protein. U dosada sprovedenim studijama, utvrđena je obrnuta proporcionalnost koncentracije adiponektina u krvi i metaboličkog sindroma, a pripisuju mu se antiinflamatorni i antiaterogeni potencijal u tretmanu metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2 (Lihn i sar., 2005). U okviru ove studije, tokom 4 nedelje, došlo je do signifikantnog povećanja nivoa adiponektina sa $11,99 \pm 3,29$ mg/ml na $15,05 \pm 5,47$ mg/ml, što ukazuje na potencijalno protektivno dejstvo keksa.

5. ZAKLJUČAK

Tropovi borovnice i maline, sporedni proizvodi dobijeni u postupku proizvodnje voćnog soka, sušenjem i mlevenjem se mogu prevesti u oblik pogodan za aplikaciju u prehrambene proizvode. Ovako dobijeni sastojci predstavljaju koncentrate nutrijenata i različitih jedinjenja sa funkcionalnim svojstvima, pa dodati u malim količinama u prehrambene proizvode mogu značajno doprineti njihovoj funkcionalnosti.

U nutritivnom profilu ova dva funkcionalna sastojka sa više od 50 g/ 100 g s.m. dominiraju prehrambena vlakna. Po nizu osobina ovi sastojci mogu se kategorisati kao idealna prehrambena vlakna:

- stabilni su sa aspekta mikrobiološkog kvara s obzirom na nisku a_w vrednost;
- sadrže vezana bioaktivna jedinjenja poput polifenola koja dodatno doprinose njihovoj funkcionalnosti;
- pogodni su za različite tehnološke postupke i aplikaciju u proizvode;
- imaju nisku cenu.

Poređenjem nutritivnog profila osušenog i samlevenog tropa borovnice i maline može se zaključiti da je:

- sadržaj većine nutrijenata u njima sličan;
- trop borovnice bogatiji prehrambenim vlaknima za oko 7,5%;
- udeo nerastvorljivih u ukupnim prehrambenim vlaknima sličan i iznosi oko 96%;

- sadržaj masti u tropu maline veći za oko 60%, što doprinosi i većoj energetske vrednosti.

Poređenjem hidratacionih svojstava osušenog i samlevenog tropa borovnice i maline može se zaključiti da trop borovnice pokazuje za oko 46% veći kapacitet zadržavanja vode, što je posledica razlika u hemijskoj strukturi polisaharidnih komponenti vlakana, budući da su granulacija i primenjeni postupak pripreme za oba tropa isti.

Sagledavajući potencijal primene osušenih i samlevenih tropova borovnice i maline kao izvora esencijalnih masnih kiselina može se zaključiti sledeće:

- linolna i α -linolenska zastupljene su u najvećem udelu u oba funkcionalna sastojka;
- odnos PUFA/SFA daleko je iznad preporučenog minimuma od 0,4 i iznosi $6,49 \pm 0,12$ u tropu borovnice, odnosno $9,46 \pm 0,15$ u tropu maline;
- s obzirom na znatno veći udeo masti i veći sadržaj esencijalnih masnih kiselina, osušen i samleven trop maline ima veći potencijal kao funkcionalni sastojak prehrambenih proizvoda.

U mineralnom sastavu oba funkcionalna sastojka dominiraju makroelementi K i Mg, a najveća razlika javlja se u sadržaju Ca, koga u osušenom i samlevenom tropu borovnice ima oko 5,5 puta više. Ovakva distribucija Ca u tropu borovnice, može se objasniti visokim udelom pokožice, koja sadrži najveći procenat Ca prisutnog u plodu, pa se postupkom sušenja tropa, ostvaruje višestruko koncentrisanje ovog makroelementa.

Polazeći od činjenice da od fitohemikalija bobičastog voća najznačajnije mesto zauzimaju polifenolna jedinjenja, detaljno je ispitan antioksidativni potencijal osušenog i samlevenog tropa borovnice i maline i zaključeno je sledeće:

- sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola (TPC) u tropu borovnice je oko 3 puta veći, sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) oko 1,7 puta veći, dok je najveća razlika utvrđena u pogledu sadržaja ukupnih antocijana, za koje je u tropu borovnice utvrđen oko 4,5 puta veći sadržaj u odnosu na trop maline;
- najdominantnija polifenolna jedinjenja u oba tropa su flavonoidi, koji čine 79,9% ukupnih polifenolnih jedinjenja tropa borovnice, odnosno 53,6% ukupnih polifenolnih jedinjenja tropa maline;

- LC-MS/MS analizom sadržaja polifenolnih jedinjenja, u tropu borovnice utvrđeno je prisustvo 10 jedinjenja u koncentracijama iznad granice kvantifikacije primenjene metode, a najzastupljenija jedinjenja iz klase flavonoida bili su kvercetin i hiperozid, čiji sadržaj iznosi $57,40 \pm 2,01$ i $32,12 \pm 2,22$ mg/100 g s.m., respektivno. Hlorogenska kiselina prisutna u količini od $61,12 \pm 4,32$ mg/100 g s.m. najdominantnije je jedinjenje iz klase fenolnih kiselina;
- LC-MS/MS analizom sadržaja polifenolnih jedinjenja, u tropu maline utvrđeno je prisustvo 15 jedinjenja u koncentracijama iznad granice kvantifikacije primenjene metode, a najdominantnije jedinjenje je epikatehin sa sadržajem $31,39 \pm 1,89$ mg/100 g s.m.;
- koristeći DPPH[·] za procenu antiradikalske aktivnosti ekstrakata, utvrđena je veoma niska IC₅₀ vrednost za trop borovnice ($0,68 \pm 0,06$ mg/ml), skoro na nivou vrednosti referentne supstance BHT ($0,50 \pm 0,01$ mg/ml). Ekstrakt dobijen iz tropa maline pokazuje slabiju aktivnost prema DPPH[·] (IC₅₀ = $0,98 \pm 0,01$ mg/ml).

Imajući u vidu visok sadržaj polifenolnih jedinjenja, može se očekivati da bi dodatak funkcionalnih sastojaka u prehrambene proizvode, omogućio značajno unapređenje funkcionalnosti sa aspekta antioksidativnog potencijala. Dodatna vrednost ogleda se u činjenici da je sadržaj prehrambenih vlakana u njima veći od 50 g/100 g s.m., pa se mogu očekivati pozitivni zdravstveni efekti svojstveni za tzv. *antioxidant dietary fiber* (ADF).

Kao još jedan od potencijalnih pravaca iskorišćenja tropa borovnice ispitana je mogućnost proizvodnje ekstrakata bogatih polifenolnim jedinjenjima, koji bi potencijalno mogli naći primenu u prehrambenoj i/ili farmaceutskoj industriji. Primenom ASE tehnike i vode kao ekstragensa, dobijen je ekstrakt sa izuzetnim antioksidativnim potencijalom, koji pokazuje manju IC₅₀ vrednost, odnosno veću antiradikalnu aktivnost prema DPPH[·], O₂^{·-} i [·]OH u poređenju sa sintetičkim antioksidantom BHA.

U cilju unapređenja nutritivnog profila i funkcionalnosti bezglutenskog keksa, sastojci dobijeni sušenjem i mlevenjem tropa borovnice i maline, primenjeni su u kreiranju nove formulacije. Kako je formulacija novog proizvoda veoma zahtevan proces, u ovom delu ispitano je više aspekata tehnološkog postupka proizvodnje i izvedeni su sledeći zaključci:

- temperatura od 170 °C i vreme pečenja od 15 minuta pokazali su se optimalnim za dobijanje proizvoda zadovoljavajućih tehnoloških i senzorskih karakteristika;
- razlike u reološkom ponašanju testa za keks u formulacijama sa različitim udelima tropa borovnice i maline, posledica su različitih hidaratacionih svojstava vlakana prisutnim u njima.

Primena postupka odzivne površine (RSM) u dizajnu i formulaciji novog proizvoda omogućava višekriterijumski pristup optimizaciji, a formulacija sa sledećim udelima funkcionalnih sastojaka: 28,2% tropa borovnice i 1,8% tropa maline dobijena je kao optimalna primenom funkcije poželjnosti. Praćenjem uticaja dodatka tropova borovnice i maline na fizičke karakteristike i antioksidativni potencijal bezglutenskog keksa zaključeno je sledeće:

- promene u boji keksa, nastale dodatkom tropa borovnice i maline, odražavaju sastav antocijana u ovim dvema voćnim vrstama. Povećanjem udela tropa borovnice u keksu, došlo je do smanjenja vrednosti b^* , što ukazuje na povećanje udela plave boje usled prisustva karakterističnih plavih pigmenata (glikozidi delfinidina, malvidina i petunidina). U formulacijama keksa sa većim udelom tropa maline dominira crvena boja, a ovakav profil boje posledica je prisustva pigmenata poput cijaninid-3-soforozida, svojstvenih za malinu;
- budući da su voda i mast, kao glavni sastojci odgovorni za teksturna svojstva proizvoda, dodati u istoj količini u sve ispitivane formulacije, razlike u vrednostima čvrstoće keksa (H) mogu se pripisati različitom sadržaju i različitim funkcionalnim karakteristikama prehrambenih vlakana, poreklom iz tropa. Formulacije u kojima je 30% bezglutenske smeše zamenjeno tropom maline, imaju najveći sadržaj vlage i najmanje vrednosti H, nasuprot tome, sadržaj vlage u uzorcima u kojima je 30% bezglutenske smeše zamenjeno tropom borovnice je najmanji, a vrednosti H najveće;
- analizirajući senzorski profil ispitivanih formulacija bezglutenskog keksa, može se zaključiti da su najmanje ocene ostvarene za parametre koji opisuju teksturna svojstva, što ukazuje na generalni problem bezglutenskih vrsta keksa, kod kojih se javlja izdvajanje čestica uslovljeno odsustvom glutena, i adhezivnost, uslovljena značajnim udelom skroba u proizvodu. Poredeći dva granična slučaja – formulacije koje sadrže samo jedan od tropova na nivou supstitucije od 30%, utvrđeno je da nema statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u pogledu vrednosti ukupne senzorske

ocene (KB), iako su pojedinačni parametri usloveli značajnu diferencijaciju ovih formulacija prilikom PC analize;

- rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih rastvorljivih polifenola i monomernih antocijana za različite formulacije bezglutenskog keksa ukazuju da sa povećanjem udela tropa borovnice u formulaciji, dolazi do linearnog povećanja vrednosti TPC. Bez obzira na odnos funkcionalnih sastojaka, u svim formulacijama je postignuto višestruko povećanje antioksidativnog potencijala usled dodatka tropa;
- optimalnu formulaciju bezglutenskog keksa karakterišu male promene u boji tokom skladištenja, s obzirom da je ustanovljena vrednost $\Delta E = 1,89 \pm 0,05$ znatno ispod vrednosti koja je značajna za ljudsko oko ($\Delta E < 3$). Nakon skladištenja od 6 meseci na ambijentalnoj temperaturi u metaliziranoj polpropilenskoj ambalaži, ukupan broj mikroorganizama u keksu bio je ispod granice detekcije metode (<10 CFU/g), kao i ukupan broj osmofilnih kvasaca (<100 CFU/g) i kserofilnih plesni (<100 CFU/g), pa se može zaključiti da optimalna formulacija bezglutenskog keksa predstavlja mikrobiološki stabilan proizvod.

Polazeći od toga da je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bilo obogaćivanje postojeće (kontrolne) formulacije bezglutenskog keksa i dobijanje nutritivno vrednog funkcionalnog proizvoda, na osnovu uporedne analize optimalne i kontrolne formulacije bezglutenskog keksa zaključeno je sledeće:

- poređenjem dobijenih vrednosti za sastav makronutrijenata, utvrđeno je da se supstitucijom dela bezglutenske smeše tropom borovnice i maline dobija proizvod značajno obogaćen prehrambenim vlaknima, sa manjim sadržajem zasićenih masnih kiselina i nižom energetsom vrednošću;
- optimalna formulacija sadrži oko dva puta veću količinu linolne i čak oko 25 puta veću količinu α -linolenske kiseline. Odnos PUFA/SFA u optimalnom keksu iznosi $0,51 \pm 0,07$, što se kategoriše kao izbalansiran odnos masnih kiselina;
- optimalna formulacija keksa predstavlja "proizvod sa visokim sadržajem vlakana", s obzirom da sadrži više od 6 g prehrambenih vlakana u 100 g proizvoda;
- dodatkom tropa borovnice i maline postiglo se višestruko povećanje količine svih ispitivanih minerala u bezglutenskom keksu, a najveći porast u odnosu na kontrolni keks, ostvaren je u sadržaju Ca, Mg i Fe i iznosi 204,7%, 297,7% i 360,9%,

- respektivno. Ovakav rezultat posebno je značajan imajući u vidu da mnoge kliničke studije sprovedene na pacijentima sa celijakijom ukazuju na deficit Ca i Fe u ishrani;
- dnevnim unosom 50 g optimalnog bezglutenskog keksa zadovoljava se: 10,3%, odnosno 15,6% adekvatnog unosa (AI) prehrambenih vlakana (za muškarce, odnosno žene, respektivno); 5,00% odnosno 7,73% AI za linolnu kiselinu i 23,6% odnosno 34,3% AI za α -linolensku kiselinu (za muškarce, odnosno žene, respektivno), a značajno je povećan i doprinos RDA/AI za mikronutrijente – sa 2,2 na 6,7% (za Ca), sa 2,16% na 9,94% (za Fe, za muškarce) i sa 0,96% na 4,42% (za Fe, za žene).

Imajući u vidu da je krajnji cilj u kreiranju novog prehrambenog proizvoda njegov plasman na tržište, urađen je uporedni prikaz nutritivnog profila komercijalno dostupnih bezglutenskih vrsta keksa, keksova od celih zrna žitarica sa dodatkom borovnice i/ili maline i optimalnog keksa kreiranog u ovoj studiji. Po nutritivnim parametrima, optimalni keks sličniji keksovima od celih zrna žitarica (pogotovu po sadržaju vlakana), što ukazuje na to, da se dodatkom tropa borovnice i maline postigao izuzetan pomak u nutritivnim svojstvima i da se dobio proizvod koji može da parira komercijalno dostupnim keksovima namenjenim zdravoj populaciji.

Rezultati ispitivanja efekta kreiranog bezglutenskog keksa u okviru dijetetske interventne studije na grupi od 20 zdravih, normalno uhranjenih ispitanika ženskog pola, starosne dobi od 30-50 godina ukazuju na sledeće:

- koncentracija LDL-holesterola je nakon sprovedene studije značajno ($p < 0,01$) smanjena (za 21%), a lipidski status, kategorisan na početku kao “granično povišen rizik za prevremenu aterosklerozu” promenjen je u kategoriju “poželjan lipidski status”;
- tokom studije došlo je do signifikantog povećanja nivoa adiponektina sa $11,99 \pm 3,29$ mg/ml na $15,05 \pm 5,47$ mg/ml, a budući da se ovaj adipocitni-sekretorni protein dovodi u vezu sa antiinflamatornim i antiaterogenim potencijalom u tretmanu metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2, može se očekivati protektivno dejstvo kreiranog bezgutenskog keksa.

6. LITERATURA

- Aaby, K., Grimmer, S., & Holtung, L. (2013). Extraction of phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) press residue: Effects on phenolic composition and cell proliferation. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 257-264.
- Aaby, K., Skrede, G., & Wrolstad, R. E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4032-4040.
- AACC 10-50D (1999). Approved methods of the American Association of Cereal Chemists (edition no. 10), Minnesota, USA.
- Afshari, R., Hosseini, H., Khaksar, R., Mohammadifar, M. A., Amiri, Z., Komeili, R., & Khaneghah, A. M. (2015). Investigation of the Effects of Inulin and β -Glucan on the Physical and Sensory Properties of Low-Fat Beef Burgers Containing Vegetable Oils: Optimisation of the Formulation Using D-Optimal Mixture Design. *Food Technology and Biotechnology*, 53(4), 436-445.
- Agullo, G., Gamet, L., Besson, C., Demigné, C., & Rémésy, C. (1994). Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells. *Cancer Letters*, 87(1), 55-63.
- Ajila, C. M., Aalami, M., Leelavathi, K., & Rao, U. P. (2010). Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 219-224.

- Ajila, C. M., Leelavathi, K., & Rao, U. P. (2008). Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 319-326.
- Akagi, K., Hirose, M., Hoshiya, T., Mizoguchi, Y., Ito, N., & Shirai, T. (1995). Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model. *Cancer letters*, 94(1), 113-121.
- Alao, A. R., & Konneh, M. (2009). A response surface methodology based approach to machining processes: modelling and quality of the models. *International Journal of Experimental Design and Process Optimisation*, 1(2-3), 240-261.
- Allen, T. T. (2006). *Introduction to engineering statistics and six sigma: statistical quality control and design of experiments and systems*. Springer Science & Business Media.
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2001). Determination of polyphenolic profiles of Basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3761-3767.
- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2009a). Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup4), 240-257.
- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2010a). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 21(2), 106-113.
- Alvarez-Jubete, L., Auty, M., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2010b). Baking properties and microstructure of pseudocereal flours in gluten-free bread formulations. *European Food Research and Technology*, 230(3), 437-445.
- Alvarez-Jubete, L., Hulse, M., Hansen, Å., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2009b). Impact of baking on vitamin E content of pseudocereals amaranth, quinoa, and buckwheat. *Cereal Chemistry*, 86(5), 511-515.
- AOAC (2000). *Official Methods of Analysis*, 17th ed., Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S., & Kroon, P. A. (2009). High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7298-7303.

- Arts, I. C., van de Putte, B., & Hollman, P. C. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1746-1751.
- Aubrecht, E., & Biacs, P. A. (2001). Characterization of buckwheat grain proteins and its products. *Acta Alimentaria*, 30(1), 71-80.
- Bagchi, D., Sen, C. K., Bagchi, M., & Atalay, M. (2004). Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Moscow)*, 69(1), 75-80.
- Baker, P. G., & Read, A. E. (1976). Oats and barley toxicity in coeliac patients. *Postgraduate Medical Journal*, 52(607), 264-268.
- Bardella, M. T., Fredella, C., Prampolini, L., Molteni, N., Giunta, A. M., & Bianchi, P. A. (2000). Body composition and dietary intakes in adult celiac disease patients consuming a strict gluten-free diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(4), 937-939.
- Basu, A., Rhone, M., & Lyons, T. J. (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews*, 68(3), 168-177.
- Bazzano L A. (2005). Dietary intake of fruit and vegetables and risk of diabetes mellitus and cardiovascular diseases In background paper of the joint FAO/WHO workshop on Fruit and Vegetables for health. Kobe, Japan: World Health Organization, 1-65.
- Benkouider, C. (2005). The world's emerging markets. *Functional Foods and Nutraceuticals*, 44, 8-11.
- Berti, C., Riso, P., Monti, L. D., & Porrini, M. (2004). In vitro starch digestibility and in vivo glucose response of gluten-free foods and their gluten counterparts. *European Journal of Nutrition*, 43(4), 198-204.
- Biliaderis, C. G., Arvanitoyannis, I., Izydorczyk, M. S., & Prokopowich, D. J. (1997). Effect of hydrocolloids on gelatinization and structure formation in concentrated waxy maize and wheat starch gels. *Starch-Stärke*, 49(7-8), 278-283.
- Bobinaitė, R., Viškelis, P., Šarkinas, A., & Venskutonis, P. R. (2013). Phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of raspberry fruit, pulp, and marc extracts. *CyTA-Journal of Food*, 11(4), 334-342.
- Bonafaccia, G., Marocchini, M., & Kreft, I. (2003). Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry*, 80(1), 9-15.
- Brady, C. J. (1987). Fruit ripening. *Annual review of plant physiology*, 38(1), 155-178.

- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(2), 135-141.
- Brazelton, D., & Strik, B. C. (2007). Perspective on the US and global blueberry industry. *Journal-American Pomological Society*, 61(3), 144.
- Brereton, R. G. (2007). *Applied chemometrics for scientists*. John Wiley & Sons.
- Bressani, R. (1994). Composition and nutritional properties of amaranth. *Amaranth: biology, chemistry and technology*. CRC Press, Boca Raton, 185-205.
- Bridle, P., & Timberlake, C. F. (1997). Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. *Food Chemistry*, 58(1), 103-109.
- Brites, C., Trigo, M. J., Santos, C., Collar, C., & Rosell, C. M. (2010). Maize-based gluten-free bread: influence of processing parameters on sensory and instrumental quality. *Food and Bioprocess Technology*, 3(5), 707-715.
- Brostoff, J. (1991). Food allergy and intolerance. *Clinical & Experimental Allergy*, 21(s1), 325-329.
- Buckley, K., 1985. Preservation and utilization of wastes from the food processing industry. A final report. Canada Works Project No. 5148 B×S. In cooperation with East Chilliwack Agricultural Coop, Chilliwack, B.C. and Agriculture Canada Research Station, Agassiz, B.C.
- Cajner, H. (2011). Višekriterijsko adaptivno oblikovanje planova pokusa, *Doktorska disertacija*, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 1-144.
- Camire, M. E., Cho, S., Craig, S., Devrie, J., Gordon, D., Jones, J, Li, B., Lineback, D., Prosky, L., & Tunland B. (2001). The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46(3), 112-124.
- Capriles, V. D., & Arêas, J. A. (2013). Effects of prebiotic inulin-type fructans on structure, quality, sensory acceptance and glycemic response of gluten-free breads. *Food & Function*, 4(1), 104-110.
- Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.
- Celiloglu, C., Karabiber, H., & Selimoglu, M. A. (2011). Atypical presentations of celiac disease. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 53(3), 241.

- Cha, K. H., Lee, H. J., Koo, S. Y., Song, D. G., Lee, D. U., & Pan, C. H. (2009). Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), 793-797.
- Chand, N., & Mihas, A. A. (2006). Celiac disease: current concepts in diagnosis and treatment. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(1), 3-14.
- Chantaro, P., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2008). Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1987-1994.
- Chau, C. F., & Huang, Y. L. (2003). Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. Cv. Liucheng. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2615-2618.
- Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., & Wang, Z. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6), 767-778.
- Chiang, S. H., Chen, C. S., & Chang, C. Y. (2006). Effect of wheat flour protein compositions on the quality of deep-fried gluten balls. *Food Chemistry*, 97(4), 666-673.
- Cho, A. S., Jeon, S. M., Kim, M. J., Yeo, J., Seo, K. I., Choi, M. S., & Lee, M. K. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 937-943.
- Ciclitira, P. J., Ellis, H. J., & Lundin, K. E. (2005). Gluten-free diet—what is toxic? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19(3), 359-371.
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063-1072.
- Cocup, R. O., & Sanderson, W. B. (1987). Functionality of dairy ingredients in bakery products. *Food Technology (USA)*, 41, 86–90.
- Commission regulation (EC) No. 41/2009 (2009). The composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten. *Official Journal of the European Union*, 52, 3-5.
- Cornejo, F., & Rosell, C. M. (2015). Physicochemical properties of long rice grain varieties in relation to gluten free bread quality. *LWT-Food Science and Technology*, 62(2), 1203-1210.

- Costa, I., Massard, G., & Agarwal, A. (2010). Waste management policies for industrial symbiosis development: case studies in European countries. *Journal of Cleaner Production*, 18(8), 815-822.
- Crockett, R., Ie, P., & Vodovotz, Y. (2011). Effects of soy protein isolate and egg white solids on the physicochemical properties of gluten-free bread. *Food Chemistry*, 129(1), 84-91.
- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446-467.
- Četojević-Simin, D., Velićanski, A., Cvetković, D., Markov, S., Četković, G., Tumbas Šaponjac, V., Vulić, J., Čanadanović-Brunet, J., & Djilas, S. (2015). Bioactivity of Meeker and Willamette raspberry (*Rubus idaeus* L.) pomace extracts. *Food Chemistry*, 166, 407-413.
- Čučković, F. (2014). Reakcije preosjetljivosti na hranu. Završni rad - preddiplomski studij, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 1-28.
- Dapčević Hadnađev, T., Torbica, A., & Hadnađev, M. (2013). Influence of buckwheat flour and carboxymethyl cellulose on rheological behaviour and baking performance of gluten-free cookie dough. *Food and Bioprocess Technology*, 6(7), 1770-1781.
- De Brito, E. S., De Araujo, M. C. P., Alves, R. E., Carkeet, C., Clevidence, B. A., & Novotny, J. A. (2007). Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9389-9394.
- De Castro, M. L., & Jiménez-Carmona, M. M. (2000). Where is supercritical fluid extraction going?. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(4), 223-228.
- de la Barca, A. M. C., Rojas-Martínez, M. E., Islas-Rubio, A. R., & Cabrera-Chávez, F. (2010). Gluten-free breads and cookies of raw and popped amaranth flours with attractive technological and nutritional qualities. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 241-246.
- de Sotillo, D. V. R., & Hadley, M. (2002). Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(12), 717-726.
- Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44(9), 2712-2720.
- Di Sabatino, A., & Corazza, G. R. (2009). Coeliac disease. *The Lancet*, 373(9673), 1480-1493.

- Dicke, W. K., Weijers, H. A., & Kamer, J. H. (1953). Coeliac disease: the presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatrica*, 42(1), 34-42.
- Dini, I., Tenore, G. C., & Dini, A. (2004). Phenolic constituents of Kancolla seeds. *Food chemistry*, 84(2), 163-168.
- Donovan, J. L., Lee, A., Manach, C., Rios, L., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2002). Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B 3. *British Journal of Nutrition*, 87(04), 299-306.
- dos Santos Freitas, L., Dariva, C., Jacques, R. A., & Caramão, E. B. (2013). Effect of experimental parameters in the pressurized liquid extraction of Brazilian grape seed oil. *Separation and Purification Technology*, 116, 313-318.
- Drzewiecki, J., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Pawelzik, E., Martin-Belloso, O., Park, Y. S., Jung, S. T., Trakhtenberg, S., & Gorinstein, S. (2003). Identification and differences of total proteins and their soluble fractions in some pseudocereals based on electrophoretic patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7798-7804.
- Duba, K. S., & Fiori, L. (2015). Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: effect of process parameters on the extraction kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*, 98, 33-43.
- Duraković, S., Delaš, F., Stilinović, B., & Duraković, L. (2002). *Moderna mikrobiologija namirnica. Knjiga druga. Udžbenik.*
- Đurišić, S., Lazić, S., Petrović, T., Savić-Jevđenić, S., & Lupulović, D. (2003). Immunoenzyme: Elisa diagnostics in veterinary medicine. *Veterinarski glasnik*, 57(1-2), 63-72.
- EC (2006). Regulation (EC) No. 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Official Journal of the European Union*, L 12, 3–18.
- Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7461-7466.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 411-421.

- Fasano, A., & Catassi, C. (2001). Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120(3), 636-651.
- Feighery, C. (1999). Fortnightly review: coeliac disease. *BMJ: British Medical Journal*, 319(7204), 236.
- Feng, H., Tang, J., Mattinson, D. S., & Fellman, J. K. (1999). Microwave and spouted bed drying of frozen blueberries: the effect of drying and pretreatment methods on physical properties and retention of flavor volatiles. *Journal of Food Processing and Preservation*, 23(6), 463-479.
- Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I., & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91(3), 395-401.
- Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K. S., Harsha, P. S. C. S., Mohamed, H. B., & Guella, G. (2014). Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 71-80.
- Fischer, R. L., & Bennett, A. B. (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 42(1), 675-703.
- Francis, F. J., Clydesdale, F. M. (1975). *Food colorimetry: Theory and applications*. The Avi publishing company, INC, Westport, Connecticut, USA.
- Freeman, M. P. (2000). Omega-3 fatty acids in psychiatry: A review. *Annals of Clinical Psychiatry*, 12(3), 159-165.
- FSAI (2010). The Food Safety Authority of Ireland. Accuracy of Nutrition Labelling of Pre-Packaged Food in Ireland. <http://www.thehealthwell.info/node/90534> (pristupljeno 19.juna 2016.).
- Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968). Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Food Science*, 33(1), 78-83.
- Gallagher, E., Gormley, T. R., & Arendt, E. K. (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3), 143-152.
- Gallardo, C., Jimenez, L., & Garcia-Conesa, M. T. (2006). Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chemistry*, 99(3), 455-463.
- Gambuś, H., Gambuś, F., Pastuszka, D., Wrona, P., Ziobro, R., Sabat, R., Mickowska, B., Nowotna, A., & Sikora, M. (2009). Quality of gluten-free supplemented cakes and biscuits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup4), 31-50.

- Gamel, T. H., Linssen, J. P., Alink, G. M., Mosallem, A. S., & Shekib, L. A. (2004). Nutritional study of raw and popped seed proteins of *Amaranthus caudatus* L and *Amaranthus cruentus* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10), 1153-1158.
- Gao, G. C. C. D. H., & Er-Feng, X. Z. (2010). Total Phenolic Content and Antioxidant Activities of Blueberry Pomace Extracts [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2, 023.
- García, Y. D., Valles, B. S., & Lobo, A. P. (2009). Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace. *Food Chemistry*, 117(4), 731-738.
- García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Ibáñez, E., & García-Moreno, C. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, 563(1), 44-50.
- Gartside, P. S., Wang, P., & Glueck, C. J. (1998). Prospective assessment of coronary heart disease risk factors: the NHANES I epidemiologic follow-up study (NHEFS) 16-year follow-up. *Journal of the American College of Nutrition*, 17(3), 263-269.
- Gianibelli, M. C., Larroque, O. R., MacRitchie, F., & Wrigley, C. W. (2001). Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chemistry*, 78(6), 635-646.
- Giergielewicz-Możajska, H., Dąbrowski, Ł., & Namieśnik, J. (2001). Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples—some aspects of theory and practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31(3), 149-165.
- Gómez, M., Ronda, F., Blanco, C. A., Caballero, P. A., & Apesteguía, A. (2003). Effect of dietary fibre on dough rheology and bread quality. *European Food Research and Technology*, 216(1), 51-56.
- Gonçalves, B., Silva, A. P., Moutinho-Pereira, J., Bacelar, E., Rosa, E., & Meyer, A. S. (2007). Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 103(3), 976-984.
- Górecka, D., Pacholek, B., Dziedzic, K., & Górecka, M. (2010). Raspberry pomace as a potential fiber source for cookies enrichment. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9(4), 451-461.
- Gorinstein, S., Pawelzik, E., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Weisz, M., & Trakhtenberg, S. (2002). Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(8), 886-891.
- Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonça, E., Batista, A. P., Sousa, I., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2008). Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(5), 891-896.

- Grehn, S., Fridell, K., Lilliecreutz, M., & Hallert, C. (2001). Dietary habits of Swedish adult coeliac patients treated by a gluten-free diet for 10 years. *Scandinavian Journal of Nutrition/Næringsforskning*, 45(4), 178-182.
- Gujral, H. S., & Rosell, C. M. (2004). Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase. *Food Research International*, 37(1), 75-81.
- Gujral, N., Freeman, H. J., & Thomson, A. B. (2012). Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 18(42), 6036-6059.
- Häkkinen, S., Heinonen, M., Kärenlampi, S., Mykkänen, H., Ruuskanen, J., & Törrönen, R. (1999). Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, 32(5), 345-353.
- Hallert, C., Grant, C., Grehn, S., Grännö, C., Hultén, S., Midhagen, G., Ström, M., Svensson, H., & Valdimarsson, T. (2002). Evidence of poor vitamin status in coeliac patients on a gluten-free diet for 10 years. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16(7), 1333-1339.
- Hang, Y. D. (1988). Recovery of food ingredients from grape pomace. *Process biochemistry*.
- Hasler, C. M. (2002). Functional foods: Benefits, concerns and challenges—A position paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition*, 132(12), 3772-3781.
- Herrero, M., Martín-Álvarez, P. J., Senorans, F. J., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2005). Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chemistry*, 93(3), 417-423.
- Hertog, M. G., & Hollman, P. C. (1996). Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *European Journal of Clinical Nutrition*, 50(2), 63-71.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., & Kromhout, D. (1997). Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *The Lancet*, 349(9053), 699.
- HMSO, U. (1994). Nutritional aspects of cardiovascular disease (report on health and social subjects No. 46).
- Holmes, A. B., & Rha, C. (1978). Structure and chemical composition of cranberry cell wall material. *Journal of Food Science*, 43(1), 112-115.
- Hopman, E. G., le Cessie, S., von Blomberg, B. M. E., & Mearin, M. L. (2006). Nutritional management of the gluten-free diet in young people with celiac disease in the Netherlands. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 43(1), 102-108.

- Houben, A., Höchstötter, A., & Becker, T. (2012). Possibilities to increase the quality in gluten-free bread production: an overview. *European Food Research and Technology*, 235(2), 195-208.
- Houston, M. C. (2005). Nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Progress in cardiovascular diseases*, 47(6), 396-449.
- Hüttner, E. K., & Arendt, E. K. (2010). Recent advances in gluten-free baking and the current status of oats. *Trends in Food Science & Technology*, 21(6), 303-312.
- Ibañez, E., Herrero, M., Martin-Alvarez, P. J., Javier Señoráns, F., Reglero, G., Cifuentes, A., & Turner, C. (2006). Accelerated solvent extraction: a new procedure to obtain functional ingredients from natural sources. In *Modern extraction techniques for food and agricultural samples: proceedings of a symposium arranged by the Division of Agricultural and Food Chemistry during the American Chemical Society's 227th national meeting, Anaheim, California, USA, 28 March-2 April, 2004.* (pp. 65-78). American Chemical Society.
- IFICF (2009) International Food Information Council Foundation Food & Health Survey, Washington, DC.
http://www.foodinsight.org/Resources/Detail.aspx?topic=2009_Food_Health_Survey_Consumer_Attitudes_toward_Food_Nutrition_and_Health
- ISO 5496:2006. Sensory analysis – Methodology – Initiation and training of assessors in the detection and recognition of odours.
- ISO 6658:2005. Sensory analysis – Methodology – General guidance.
- ISO 8587:2006. Sensory analysis – Methodology – Ranking.
- ISO 8589:2007. Sensory analysis – General guidance for the design of test rooms.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., & Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1), 145-150.
- Ivanović, J., Tadić, V., Dimitrijević, S., Stamenić, M., Petrović, S., & Zizović, I. (2014). Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar "Čačanska Bestrna". *Industrial Crops and Products*, 53, 274-281.
- Jalili, T., Wildman, R. E. C., & Medeiros, D. M. (2001). Dietary fiber and coronary heart disease. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*, 131-144.

- Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5489-5493.
- Joglekar, A. M., & May, A. T. (1987). Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World*, 32(12), 857.
- Ju, Z. Y., & Howard, L. R. (2003). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5207-5213.
- Juranić, Z., Žižak, Z., Tasić, S., Petrović, S., Nidžović, S., Leposavić, A., & Stanojković, T. (2005). Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars. *Food Chemistry*, 93(1), 39-45.
- Kadan, R. S., Robinson, M. G., Thibodeaux, D. P., & Pepperman, A. B. (2001). Texture and other physicochemical properties of whole rice bread. *Journal of Food Science*, 66(7), 940-944.
- Karlović Đ., Andrić N. (1996). Kontrola kvaliteta semena uljarica. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Savezno ministarstvo za nauku tehnologiju i razvoj, Savezni zavod za standardizaciju, Beograd.
- Karthikesan, K., Pari, L., & Menon, V. P. (2010). Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. *Chemico-biological interactions*, 188(3), 643-650.
- Kaukinen, K., Collin, P., & Mäki, M. (2007). Latent coeliac disease or coeliac disease beyond villous atrophy? *Gut*, 56(10), 1339-1340.
- Kaur, M., Sandhu, K. S., Arora, A., & Sharma, A. (2015). Gluten free biscuits prepared from buckwheat flour by incorporation of various gums: physicochemical and sensory properties. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 628-632.
- Kayacier, A., Yüksel, F., & Karaman, S. (2014). Simplex lattice mixture design approach on physicochemical and sensory properties of wheat chips enriched with different legume flours: An optimization study based on sensory properties. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 639-648.
- Kenny, S., Wehrle, K., Stanton, C., & Arendt, E. K. (2000). Incorporation of dairy ingredients into wheat bread: effects on dough rheology and bread quality. *European Food Research and Technology*, 210(6), 391-396.
- Kesavulu, M. M., Kameswararao, B., Apparao, C., Kumar, E. G. T. V., & Harinarayan, C. V. (2008). Effect of ω -3 fatty acids on lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetic patients. *Diabetes & metabolism*, 28, 20-26.

- Khanal, R. C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2009). Procyanidin composition of selected fruits and fruit byproducts is affected by extraction method and variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8839-8843.
- Khanal, R. C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2010). Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Research International*, 43(5), 1464-1469.
- Khanduja, K. L., Gandhi, R. K., Pathania, V., & Syal, N. (1999). Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 37(4), 313-318.
- Kim, Y., & Yokoyama, W. H. (2010). Physical and sensory properties of all-barley and all-oat breads with additional hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) β -glucan. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 59(2), 741-746.
- King, J. W., Grabel, R. D., & Wightman, J. D. (2003). Subcritical water extraction of anthocyanins from fruit berry substrates. In *Proceedings of the 6th Intl. Symposium on Supercritical Fluids (Vol. 1, 28-30)*.
- Kljajić, N. (2011). Ekonomska efikasnost investicija u različitim uslovima proizvodnje maline. *Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1-201*.
- Knekt, P., Järvinen, R., Seppänen, R., Heliövaara, M., Teppo, L., Pukkala, E., & Aromaa, A. (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology*, 146(3), 223-230.
- Korus, J., Grzelak, K., Achremowicz, K., & Sabat, R. (2006). Influence of prebiotic additions on the quality of gluten-free bread and on the content of inulin and fructooligosaccharides. *Food Science and Technology International*, 12(6), 489-495.
- Korus, J., Juszczak, L., Ziobro, R., Witczak, M., Grzelak, K., & Sójka, M. (2012). Defatted strawberry and blackcurrant seeds as functional ingredients of gluten-free bread. *Journal of Texture Studies*, 43(1), 29-39.
- Korus, J., Witczak, M., Ziobro, R., & Juszczak, L. (2009). The impact of resistant starch on characteristics of gluten-free dough and bread. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 988-995.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., & Pehu, E. (2006). Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. *Agriculture and Rural Development Discussion Paper 30*.

- Koziol, M. J. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 5(1), 35-68.
- Kruger, C. L., & Mann, S. W. (2003). Safety evaluation of functional ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 793-805.
- Laguna, L., Salvador, A., Sanz, T., & Fiszman, S. M. (2011). Performance of a resistant starch rich ingredient in the baking and eating quality of short-dough biscuits. *LWT-Food Science and Technology*, 44(3), 737-746.
- Lampe, J. W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 475s-490s.
- Laroze, L. E., Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Zúñiga, M. E., & Domínguez, H. (2010). Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *European Food Research and Technology*, 231(5), 669-677.
- Larrauri, J. A. (1999). New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 10(1), 3-8.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (1997a). Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1390-1393.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., Borroto, B., & Saura-Calixto, F. (1997b). Seasonal changes in the composition and properties of a high dietary fibre powder from grapefruit peel. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(3), 308-312.
- Larrosa, V. J., Lorenzo, G., Zaritzky, N. E., & Califano, A. N. (2012). Effect of the addition of proteins and hydrocolloids on the water mobility in gluten-free pasta formulations. *Water*, 4, 1-17.
- Lazaridou A, Biliaderis CG (2009) Gluten-free doughs: rheological properties, testing procedures – methods and potential problems. In: *Gluten-Free Food Science and Technology*, Gallagher E. (ed), Blackwell Pub. Professional, Chichester, UK, p 52-82
- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., & Biliaderis, C. G. (2007). Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*, 79(3), 1033-1047.
- Le Marchand, L., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Wilkens, L. R., & Kolonel, L. N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(2), 154-160.

- Lee, J., & Wrolstad, R. E. (2004). Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *Journal of Food Science*, 69(7), 564-573.
- Leposavić, A. (2014). Pomološke osobine novointrodotovanih sorti visokožbunaste borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.). Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1-126.
- Letang, C., Piau, M., & Verdier, C. (1999). Characterization of wheat flour–water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. *Journal of Food Engineering*, 41(2), 121-132.
- Lichtenstein A. H., Appel L. J., Brands M. (2006), Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American heart association nutrition committee, *Circulation*, 114, 82–96.
- Lihn, A. S., Pedersen, S. B., & Richelsen, B. (2005). Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obesity reviews*, 6(1), 13-21.
- Liu, J. K., Hu, L., Dong, Z. J., & Hu, Q. (2004). DPPH Radical Scavenging Activity of Ten Natural p-Terphenyl Derivatives Obtained from Three Edible Mushrooms Indigenous to China. *Chemistry & biodiversity*, 1(4), 601-605.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479S-3485S.
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207-219.
- Lohiniemi, S., Mäki, M., Kaukinen, K., Laippala, P., & Collin, P. (2000). Gastrointestinal symptoms rating scale in coeliac disease patients on wheat starch-based gluten-free diets. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 35(9), 947-949.
- López, G., Ros, G., Rincón, F., Periago, M. J., Martínez, M. C., & Ortuno, J. (1996). Relationship between physical and hydration properties of soluble and insoluble fiber of artichoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2773-2778.
- Loubes, M. A., Flores, S. K., & Tolaba, M. P. (2016). Effect of formulation on rice noodle quality: Selection of functional ingredients and optimization by mixture design. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 280-286.
- Lukač Bulatović, M. (2010). Ekonomska efikasnost proizvodnje i prerade važnijih voćnih vrsta u Republici Srbiji. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1-189.
- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, A. R. (2004). Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6178-6187.

- Maccarone, E., Maccarrone, A., & Rapisarda, P. (1985). Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *Journal of Food Science*, 50(4), 901-904.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) (1998). Fatty acids. In: McCance and Widdowson's – The composition of foods, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK, seventh supplement.
- Mancebo, C. M., Rodriguez, P., & Gómez, M. (2016). Assessing rice flour-starch-protein mixtures to produce gluten free sugar-snap cookies. *LWT-Food Science and Technology*, 67, 127-132.
- Mantell, C., Rodriguez, M., & de la Ossa, E. M. (2002). Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modelling. *Chemical Engineering Science*, 57(18), 3831-3838.
- Manu, B. T., & Rao, U. P. (2008). Influence of size distribution of proteins, thiol and disulfide content in whole wheat flour on rheological and chapati texture of Indian wheat varieties. *Food Chemistry*, 110(1), 88-95.
- Martínez, M. M., Oliete, B., Román, L., & Gómez, M. (2014). Influence of the addition of extruded flours on rice bread quality. *Journal of Food Quality*, 37(2), 83-94.
- Mašković, M. (2012). Multikriterijumski pristup optimizaciji hromatografskih metoda za farmaceutsku analizu perindopril t-butilamina, Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1-153.
- Matos, M. E., & Rosell, C. M. (2015). Understanding gluten-free dough for reaching breads with physical quality and nutritional balance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(4), 653-661.
- Mazur, S. P., Nes, A., Wold, A. B., Remberg, S. F., & Aaby, K. (2014). Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food chemistry*, 160, 233-240.
- McDougall, N. R., & Beames, R. M. (1994). Composition of raspberry pomace and its nutritive value for monogastric animals. *Animal feed science and technology*, 45(2), 139-148.
- McGhie, T. K., Ainge, G. D., Barnett, L. E., Cooney, J. M., & Jensen, D. J. (2003). Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4539-4548.
- Mertens-Talcott, S. U., Talcott, S. T., & Percival, S. S. (2003). Low Concentrations of Quercetin and Ellagic Acid Synergistically Influence Proliferation, Cytotoxicity and

- Apoptosis in MOLT-4 Human Leukemia Cells-. *The Journal of Nutrition*, 133(8), 2669-2674.
- Metivier, R. P., Francis, F. J., & Clydesdale, F. M. (1980). Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, 45(4), 1099-1100.
- Miguel, Â. S. M., Lobo, B. W. P., da Costa Figueiredo, É. V., Dellamora-Ortiz, G. M., & Martins-Meyer, T. S. (2013). *Enzymes in bakery: current and future trends*. INTECH Open Access Publisher.
- Min, Y. W., Park, S. U., Jang, Y. S., Kim, Y. H., Rhee, P. L., Ko, S. H., Joo, N., Im Kim, S., Kim, C. H., & Chang, D.K., (2012). Effect of composite yogurt enriched with acacia fiber and *Bifidobacterium lactis*. *World Journal of Gastroenterology*, 18(33), 4563.
- Miñarro, B., Albanell, E., Aguilar, N., Guamis, B., & Capellas, M. (2012). Effect of legume flours on baking characteristics of gluten-free bread. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 476-481.
- Mišan A., Šarić B., Nedeljković N., Pestorić M., Jovanov P., Pojić M., Tomić J., Filipčev B., Hadnađev M., Mandić A. (2014). Gluten-free cookies enriched with blueberry pomace: optimization of baking process. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 8(4), 340-343.
- Monrad, J. K., Howard, L. R., King, J. W., Srinivas, K., & Mauromoustakos, A. (2009). Subcritical Solvent Extraction of Procyanidins from Dried Red Grape Pomace†. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(7), 4014-4021.
- Monrad, J. K., Suárez, M., Motilva, M. J., King, J. W., Srinivas, K., & Howard, L. R. (2014). Extraction of anthocyanins and flavan-3-ols from red grape pomace continuously by coupling hot water extraction with a modified expeller. *Food Research International*, 65, 77-87.
- Montgomery, D. C., & Runger, G. C. (2010). *Applied statistics and probability for engineers*. John Wiley & Sons.
- Mori, H., Tanaka, T., Shima, H., Kuniyasu, T., & Takahashi, M. (1986). Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxymethanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of hamsters. *Cancer Letters*, 30(1), 49-54.
- Moulton, A. L. C. (1959). The place of oats in the coeliac diet. *Archives of Disease in Childhood*, 34(173), 51.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons.

- Myers, R., & Montgomery, D. C. (1971). *Response surface methods*. ed: Allyn-Bacon, Boston, Mass.
- Narayanan, B. A., Geoffroy, O., Willingham, M. C., Re, G. G., & Nixon, D. W. (1999). p53/p21 (WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Letters*, 136(2), 215-221.
- Nardini, M., D'Aquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Di Felice, M., & Scaccini, C. (1995). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(5), 541-552.
- Németh, K., Plumb, G. W., Berrin, J. G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H. Y., ... & Kroon, P. A. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition*, 42(1), 29-42.
- Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L., & Exon, J. H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 161-183.
- Nieto, A., Borrull, F., Marcé, R. M., & Pocurull, E. (2009). Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(30), 5619-5625.
- Nijeboer, P., Bontkes, H. J., Mulder, C. J., & Bouma, G. (2013). Non-celiac gluten sensitivity. Is it in the gluten or the grain. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 22(4), 435-40.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nikolić, G., Nikolić, S., Milić, B. & Čanadanović-Brunet, J. (1998). Primena metode elektronske spinske rezonance za proučavanje antioksidantnih svojstava prirodnih fenolnih jedinjenja, *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 15 (4), 183-188.
- Nikzade, V., Tehrani, M. M., & Saadatmand-Tarzjan, M. (2012). Optimization of low-cholesterol–low-fat mayonnaise formulation: Effect of using soy milk and some stabilizer by a mixture design approach. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 344-352.
- Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134-144.

- NRC (National Research Council) (2004) Recommended Dietary Allowances. 10th edn, National Academy Press, Washington, DC.
- Oblak, M., Petronijević, M., Krgović, L., & Milutinović, M. (1984). The problems in blueberry growing and blueberry cultivars for Yugoslavia. *Jugoslovensko voćarstvo (Yugoslavia)*.
- Ochoa, M. R., Kessler, A. G., Vullioud, M. B., & Lozano, J. E. (1999). Physical and chemical characteristics of raspberry pulp: storage effect on composition and color. *LWT-Food Science and Technology*, 32(3), 149-153.
- Ong, K. W., Hsu, A., & Tan, B. K. H. (2013). Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical pharmacology*, 85(9), 1341-1351.
- Oomah, B. D., Ladet, S., Godfrey, D. V., Liang, J., & Girard, B. (2000). Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 69(2), 187-193.
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M. & Mimica-Dukić N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143, 48-53.
- O'Shea, N., Doran, L., Auty, M., Arendt, E., & Gallagher, E. (2013). The rheology, microstructure and sensory characteristics of a gluten-free bread formulation enhanced with orange pomace. *Food & Function*, 4(12), 1856-1863.
- Otten, J. J., Hellwig, J. P., & Meyers, L. D. (Eds.). (2006). Dietary reference intakes: The essential guide to nutrient requirements. National Academies Press.
- Padalino, L., Mastromatteo, M., Sepielli, G., & Nobile, M. A. D. (2011). Formulation optimization of gluten-free functional spaghetti based on maize flour and oat bran enriched in b-glucans. *Materials*, 4(12), 2119-2135.
- Palma, M., Piñeiro, Z., & Barroso, C. G. (2001). Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *Journal of Chromatography A*, 921(2), 169-174.
- Palma, M., Piñeiro, Z., & Barroso, C. G. (2002). In-line pressurized-fluid extraction–solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes. *Journal of Chromatography A*, 968(1), 1-6.
- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., & Diamantidis, G. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102(3), 777-783.

- Parry, J., & Yu, L. (2004). Fatty acid content and antioxidant properties of cold-pressed black raspberry seed oil and meal. *Journal of Food Science*, 69(3), FCT189-FCT193.
- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M. P., Whittaker, P., & Yu, L. (2005). Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 566–573.
- Pedersen, L., Kaack, K., Bergsøe, M. N., & Adler-Nissen, J. (2005). Effects of chemical and enzymatic modification on dough rheology and biscuit characteristics. *Journal of food science*, 70(2), E152-E158.
- Peng, X., Ma, J., Cheng, K. W., Jiang, Y., Chen, F., & Wang, M. (2010). The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. *Food Chemistry*, 119(1), 49-53.
- Peressini, D., Sensidoni, A., Pollini, C. M. & De Cindio, B. (2000). Rheology of wheat doughs for fresh pasta blends and salt content production: influence of semolina-flour blends and salt content. *Journal of Texture Studies*, 31(2), 163–182.
- Pérez, G., Bonet, A., & Rosell, C. M. (2005). Relationship between gluten degradation by *Aelia* spp and *Eurygaster* spp and protein structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(7), 1125-1130.
- Phillips, G. O., & Cui, S. W. (2011). An introduction: evolution and finalisation of the regulatory definition of dietary fibre. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 139-143.
- Phimolsiripol, Y., Mukprasirt, A., & Schoenlechner, R. (2012). Quality improvement of rice-based gluten-free bread using different dietary fibre fractions of rice bran. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 389-395.
- Picarelli, A., Di Tola, M., Sabbatella, L., Gabrielli, F., Di Cello, T., Anania, M. C., Mastracchio, A., Silano, M., & De Vincenzi, M. (2001). Immunologic evidence of no harmful effect of oats in celiac disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(1), 137-140.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2111-2117.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.
- Plourde, M., & Cunnane, S. C. (2007). Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*, 32(4), 619-634.

- Popov-Raljić, J. V., Mastilović, J. S., Laličić-Petronijević, J. G., Kevrešan, Ž. S., & Demin, M. A. (2013). Sensory and color properties of dietary cookies with different fiber sources during 180 days of storage. *Hemijska industrija*, 67(1), 123-134.
- Possner, D. R. E., & Kliwer, W. M. (1985). The localization of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis*, 24(4), 229-40.
- Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda (2010). Sl. Glasnik RS br. 45/2010.
- Quirós-Sauceda, A. E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S. G., Ayala-Zavala, J. F., Bello-Perez, L. A., Álvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., González-Córdova, A. F. & González-Aguilar, G. A. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & function*, 5(6), 1063-1072.
- Rabetafika, H. N., Bchir, B., Aguedo, M., Paquot, M., & Blecker, C. (2014). Effects of processing on the compositions and physicochemical properties of fibre concentrate from cooked fruit pomaces. *Food and bioprocess technology*, 7(3), 749-760.
- Rančić, V. (2013). Metode za smanjenje dimenzionalnosti podataka i njihova primena u prirodnim naukama. Master rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1-89.
- Rein, M. J., & Heinonen, M. (2004). Stability and enhancement of berry juice color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3106-3114.
- Reque, P. M., Steffens, R. S., Jablonski, A., Flôres, S. H., Rios, A. D. O., & de Jong, E. V. (2014). Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 111-116.
- Reyes-Díaz, M., Meriño-Gergichevich, C., Alarcón, E., Alberdi, M., & Horst, W. J. (2011). Calcium sulfate ameliorates the effect of aluminum toxicity differentially in genotypes of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 11(4), 59-78.
- Rezende, N. V., Benassi, M. T., Vissotto, F. Z., Augusto, P. P., & Grossmann, M. V. (2015). Mixture design applied for the partial replacement of fat with fibre in sucrose-free chocolates. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 598-604.
- Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Oliveira, D. L., Roque, R., Bernardo-Gil, M. G., Martins, A. I., Sepúlveda, C., Almeida, J., Meireles, M., Gírio, F. M., & Rauter, A. P. (2013). Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua*

- L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Industrial Crops and Products*, 47, 132-138.
- Rosell, C. M., Rojas, J. A., & De Barber, C. B. (2001). Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food hydrocolloids*, 15(1), 75-81.
- Routray, W., & Orsat, V. (2011). Blueberries and their anthocyanins: factors affecting biosynthesis and properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(6), 303-320.
- Rufino, M. S., Alves, R. E., Fernandes, F. A., & Brito, E. S. (2011). Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. *Food Research International*, 44(7), 2072-2075.
- Sabanis, D., Lebesi, D., & Tzia, C. (2009). Effect of dietary fibre enrichment on selected properties of gluten-free bread. *LWT-Food Science and Technology*, 42(8), 1380-1389.
- Sablani, S. S., Marcotte, M., Baik, O. D., & Castaigne, F. (1998). Modeling of simultaneous heat and water transport in the baking process. *LWT-Food Science and Technology*, 31(3), 201-209.
- Sakač, M., Torbica, A., Sedej, I., & Hadnađev, M. (2011). Influence of breadmaking on antioxidant capacity of gluten free breads based on rice and buckwheat flours. *Food Research International*, 44(9), 2806-2813.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). Introduction to food-and airborne fungi (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., & Borderías, A. J. (2007). Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: evaluation by different methodologies. *Food Chemistry*, 101(1), 372-378.
- Sarteshnizi, R. A., Hosseini, H., Bondarianzadeh, D., & Colmenero, F. J. (2015). Optimization of prebiotic sausage formulation: Effect of using β -glucan and resistant starch by D-optimal mixture design approach. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 704-710.
- Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4303-4306.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.

- Schieber, A., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 401-413.
- Schoenlechner, R., Linsberger, G., Kaczyc, L., & Berghofer, E. (2006). Production of short dough biscuits from the pseudocereals amaranth, quinoa and buckwheat with common bean. *Ernahrung*, 30, 101-107.
- Sedej, I. (2011). Funkcionalna i antioksidativna svojstva novih proizvoda od heljde. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1–165.
- Sedej, I., Sakač, M., Mandić, A., Mišan, A., Pestorić, M., Šimurina, O., & Čanadanović-Brunet, J. (2011). Quality assessment of gluten-free crackers based on buckwheat flour. *LWT-Food Science and Technology*, 44(3), 694-699.
- Seeram N.P. (2006). Berries. In: Heber D, Blackburn G, Go VLW, Milner J, editors. *Nutritional oncology*. 2nd edition. London, UK: Academic Press; 615–625.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Hardy, M. L., & Heber, D. (2004). Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2512-2517.
- Shahidi F., Naczki M. (2004). Phenolic compounds in fruits and vegetables. In: *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton, FL: CRC Press; 131–56.
- Shewry, P. R., Halford, N. G., & Tatham, A. S. (1992). High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 15(2), 105-120.
- Shomer, I., Lookhart, G. L., Vasiliver, R., & Bean, S. (1998). Ultrastructure of consecutively extracted and flocculated gliadins and glutenins. *Journal of Cereal Science*, 27(1), 27-36.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2006). Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(2), S470-S475.
- Simopoulos, A. P. (2001). The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *The Journal of Nutrition*, 131(11), 3065S-3073S.
- Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 1-22.
- Singh, J., Singh, N., Sharma, T. R., & Saxena, S. K. (2003). Physicochemical, rheological and cookie making properties of corn and potato flours. *Food chemistry*, 83(3), 387-393.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Siriwoharn, T. S., & Wrolstad, R. E. (2004b). Polyphenolic composition of Marion and Evergreen blackberries. *Journal of food science*, 69(4), FCT233-FCT240.
- Siriwoharn, T. S., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., & Pereira, C. B. (2004a). Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus L. Hybrids*) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8021-8030.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. *Appetite*, 51(3), 456-467.
- Siscovick, D. S., Raghunathan, T. E., King, I., Weinmann, S., Wicklund, K. G., Albright, J., Bovbjerg, V., Arbogast, P., Smith, H., Kushi, L. H., & Cobb, L. A. (1995). Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Jama*, 274(17), 1363-1367.
- Sivaramakrishnan, H. P., Senge, B. & Chattopadhyay, P. K. (2004). Rheological properties of rice dough for making rice bread. *Journal of Food Engineering*, 62, 37-45.
- Skrabanja, V., Liljeberg Elmståhl, H. G., Kreft, I., & Björck, I. M. (2001). Nutritional properties of starch in buckwheat products: studies in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 490-496.
- Sl. list SFRJ (1988). Pravilnik o metodima fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa. Službeni list SFRJ, 74.
- Sloan, E. (2000). The top ten functional food trends. *Food Technology*, 54, 33-62.
- Sloan, E. (2002). The top 10 functional food trends. The next generation. *Food Technology*, 56, 32-57.
- Sloan, E. (2004). The top ten functional food trends. *Food Technology*, 58, 28-51.
- Souza, V. R., Pereira, P. A., Silva, T. L. T., Lima, L. C., Pio, R., Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362-368.
- Spence, J. T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S4-S6.

- Spirić D., Borović B., Velebit B., Lakićević B., Babić J., Milijašević M., Janković V., (2010). Studija o nalazu pšeničnog glutena u različitim životnim namirnicama. *Tehnologija mesa*, 51(2), 169-176.
- SRPS EN ISO 13299:2012. Sensory analysis – Methodology – General guidance for establishing a sensory profile.
- SRPS EN ISO 4833-1:2014. Mikrobiologija lanca hrane — Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama — Deo 1: Brojanje kolonija na 30 °C tehnikom nalivanja ploča.
- SRPS EN ISO 8586:2015. Sensory analysis – General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors.
- SRPS ISO 11036:2002. Senzorske analize – Metodologija – Profil teksture.
- SRPS ISO 11037:2013. Senzorske analize – Uputstva za senzorsko ocenjivanje boje proizvoda.
- SRPS ISO 3972:2011. Senzorske analize – Metodologija – Metoda utvrđivanja osetljivosti čula ukusa.
- Stajčić, S. (2012). Visokovredna funkcionalna jedinjenja iz sporednih proizvoda prerade paradajza, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1-167.
- Stewart, D., Iannetta, P. P., & Davies, H. V. (2001). Ripening-related changes in raspberry cell wall composition and structure. *Phytochemistry*, 56(5), 423-428.
- Størsrud, S., Olsson, M., Lenner, R. A., Nilsson, L. A., Nilsson, O., & Kilander, A. (2003). Adult coeliac patients do tolerate large amounts of oats. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(1), 163-169.
- Suas, M. (2008). *Advanced bread and pastry*. Nelson Education.
- Sudha, M. L., Srivastava, A. K., Vetrmani, R., & Leelavathi, K. (2007). Fat replacement in soft dough biscuits: Its implications on dough rheology and biscuit quality. *Journal of Food Engineering*, 80 (3), 922-930.
- Šaponjac, V. T., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Djilas, S., & Četojević-Simin, D. (2015). Dried bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract fractions as antioxidants and cancer cell growth inhibitors. *LWT-Food Science and Technology*, 61(2), 615-621.
- Šarić B., Šimurina O., Nedeljković N., Milovanović I., Kos J., Pojić M., Mandić, A., Sakač M., Šarić Lj., Jovanov P., Pestorić M., Jambrec D., Ilić N., Mišan A. (2014b) Bezglutenski keks sa antiaterogenim efektom, Novi proizvod je prihvaćen i koristi se u „Nutry allergy center“, Zemun.

- Šarić, B., Mišan, A., Mandić, A., Nedeljković, N., Pojić, M., Pestorić, M., & Đilas, S. (2016). Valorisation of raspberry and blueberry pomace through the formulation of value-added gluten-free cookies. *Journal of food science and technology*, 53(2), 1140-1150.
- Šarić, B., Nedeljković, N., Šimurina, O., Pestorić, M., Kos, J., Mandić, A., Sakač, M., Šarić, Lj. & Mišan, A. (2014a). The influence of baking time and temperature on characteristics of gluten free cookies enriched with blueberry pomace. *Food and Feed Research*, 41(1), 39-46.
- Šimurina, O. (2013). Optimizacija koncentracije organskih kiselina i enzimskih preparata u biohemijskom matriksu substandardnog kvaliteta. *Doktorska disertacija*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1-159.
- Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Wang, A., Suzui, M., Okamoto, K., & Mori, H. (1993). Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis*, 14(7), 1321-1325.
- Tang, Y., Chen, Y., Jiang, H., & Nie, D. (2011). The role of short-chain fatty acids in orchestrating two types of programmed cell death in colon cancer. *Autophagy*, 7(2), 235-237.
- Tapsas, D., Fälth-Magnusson, K., Högborg, L., Hammersjö, J. Å., & Hollén, E. (2014). Swedish children with celiac disease comply well with a gluten-free diet, and most include oats without reporting any adverse effects: a long-term follow-up study. *Nutrition Research*, 34(5), 436-441.
- Thebaudin, J. Y., Lefebvre, A. C., Harrington, M., & Bourgeois, C. M. (1997). Dietary fibres: nutritional and technological interest. *Trends in Food Science & Technology*, 8(2), 41-48.
- Thiem, B., & Berge, V. (2003). Cloudberry: an important source of ellagic acid, an antioxidant. *Journal of the Norwegian Medical Association*, 123(13-14), 1856-1857.
- Thompson, T. (1999). Thiamin, riboflavin, and niacin contents of the gluten-free diet: is there cause for concern?. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(7), 858-862.
- Thompson, T. (2000). Folate, iron, and dietary fiber contents of the gluten-free diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 100(11), 1389-1396.
- Thompson, T., Dennis, M., Higgins, L. A., Lee, A. R., & Sharrett, M. K. (2005). Gluten-free diet survey: are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts

- of fibre, iron, calcium and grain foods? *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 18(3), 163-169.
- Tomašić, V., Lerotić, I. (2013). Celijakija. Zbornik radova XIII Kongresa Hrvatskog društva obiteljskih doktora Hrvatskog liječničkog zbora, Rovinj, 171-182.
- Tonković K, Gregurek Lj, Kršev, & Šurić Ž. (2012). Laktoza intolerancija–mliječni proizvodi sa smanjenim sadržajem laktoze. Stručni skup Funkcionalna hrana u Hrvatskoj; Zbornik radova, Zagreb, 18-21.
- Torbica, A., Hadnađev, M., & Dapčević, T. (2010). Rheological, textural and sensory properties of gluten-free bread formulations based on rice and buckwheat flour. *Food Hydrocolloids*, 24(6), 626-632.
- Tseng, A., & Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*, 138(1), 356-365.
- Tsuchiya, T., Suzuki, O., & Igarashi, K. (1996). Protective effects of chlorogenic acid on paraquat-induced oxidative stress in rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60(5), 765-768.
- Tumbas Šaponjac, V., Gironés-Vilaplana, A., Djilas, S., Mena, P., Ćetković, G., Moreno, D. A., Čanadanović-Brunet, J., Vulić, J., Stajčić, S. & Krunić, M. (2014). Anthocyanin profiles and biological properties of caneberry (*Rubus* spp.) press residues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2393-2400.
- Tumbas, V. (2010). Antiradikalska i antiproliferativna aktivnost ekstrakata odabranih biljaka iz familija Rosaceae i Ericaceae. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1-156.
- Unbehend, L., Unbehend, G., & Lindhauer, M. G. (2003). Protein composition of some Croatian and German wheat varieties and their influence on the loaf volume. *Food/Nahrung*, 47(2), 145-148.
- USDA (2013). The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Team, Greensboro. North Carolina, 27401-4901.
- Uysal, H., Bilgiçli, N., Elgün, A., İbanoğlu, Ş., Herken, E. N., & Demir, M. K. (2007). Effect of dietary fibre and xylanase enzyme addition on the selected properties of wire-cut cookies. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 1074-1078.
- Valiente, C., Arrigoni, E., Esteban, R. M., & Amado, R. (1995). Grape pomace as a potential food fiber. *Journal of Food Science*, 60(4), 818-820.

- Van Eckert, R., Bond, J., Rawson, P., Klein, C. L., Stern, M., & Jordan, T. W. (2010). Reactivity of gluten detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material. *Journal of Cereal Science*, 51(2), 198-204.
- Van Kleef, E., Van Trijp, H. C., Luning, P., & Jongen, W. M. (2002). Consumer-oriented functional food development: how well do functional disciplines reflect the 'voice of the consumer'? *Trends in Food Science & Technology*, 13(3), 93-101.
- Vatai, T., Škerget, M., & Knez, Ž. (2009). Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 246-254.
- Vergara-Valencia, N., Granados-Pérez, E., Agama-Acevedo, E., Tovar, J., Ruales, J., & Bello-Pérez, L. A. (2007). Fibre concentrate from mango fruit: Characterization, associated antioxidant capacity and application as a bakery product ingredient. *LWT-Food Science and Technology*, 40(4), 722-729.
- Vratanina, D. L., & Zabik, M. E. (1978). Dietary fiber sources for baked products: bran in sugar – snap cookies. *Journal of Food Science*, 43(5), 1590-1594.
- Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M., & Heinonen, M. (2005). Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8492-8497.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(2), 304-309.
- White, B. L., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2009). Proximate and polyphenolic characterization of cranberry pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4030-4036.
- Whitton, C., Nicholson, S. K., Roberts, C., Prynne, C. J., Pot, G. K., Olson, A., Fitt, E., Cole, D., Teucher, B., Bates, B., & Henderson, H. (2011). National Diet and Nutrition Survey: UK food consumption and nutrient intakes from the first year of the rolling programme and comparisons with previous surveys. *British Journal of Nutrition*, 106(12), 1899-1914.
- Witczak, M., Ziobro, R., Juszcak, L., & Korus, J. (2016). Starch and starch derivatives in gluten-free systems—A review. *Journal of Cereal Science*, 67, 46-57.
- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., ... & Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat science*, 78(4), 343-358.
- Wronkowska, M., Zielińska, D., Szawara-Nowak, D., Troszyńska, A., & Soral-Śmietana, M. (2010). Antioxidative and reducing capacity, macroelements content and sensorial

properties of buckwheat-enhanced gluten-free bread. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(10), 1993-2000.

www.ars.usda.gov

Ylimaki, G., Hawrysh, Z. J., Hardin, R. T., & Thomson, A. B. R. (1991). Response surface methodology in the development of rice flour yeast breads: sensory evaluation. *Journal of Food Science*, 56(3), 751-755.

Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2), 221-237.

Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. A., & Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 675-683.

Zannini, E., Jones, J. M., Renzetti, S., & Arendt, E. K. (2012). Functional replacements for gluten. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 227-245.

Zhao, Y. (Ed.). (2007). *Berry fruit: value-added products for health promotion*. CRC Press.

Zhou, J. Z., Liu, X. L., Huang, K. H., Dong, M. S., & Jiang, H. H. (2007). Application of the mixture design to design the formulation of pure cultures in Tibetan kefir. *Agricultural Sciences in China*, 6(11), 1383-1389.

7. PRILOG

Prilog 1. Preporučeni unosi za pojedince, makronutrijenti (NRC, 2004)

Starosno doba	RDA (g/dan) AI* (g/dan)					
	UH	DF	Masti	LA	LNA	Proteini
Odojčad (meseći)						
0-6	60*	ND	31*	4,4*	0,5*	9,1*
7-12	95*	ND	30*	4,6*	0,5*	11,0
Deca (godine)						
1-3	130	19*	ND	7*	0,7*	13
4-8	130	25*	ND	10*	0,9*	19
Muškarci (godine)						
9-13	130	31*	ND	12*	1,2*	34
14-18	130	38*	ND	16*	1,6*	52
19-30	130	38*	ND	17*	1,6*	56
31-50	130	38*	ND	17*	1,6*	56
50-70	130	30*	ND	14*	1,6*	56
> 70	130	30*	ND	14*	1,6*	56
Žene (godine)						
9-13	130	26*	ND	10*	1,0*	34
14-18	130	26*	ND	11*	1,1*	46
19-30	130	25*	ND	12*	1,1*	46
31-50	130	25*	ND	12*	1,1*	46
50-70	130	21*	ND	11*	1,1*	46
> 70	130	21*	ND	11*	1,1*	46
Trudnice (godine)						
≤ 18	175	28*	ND	13*	1,4*	71
19-30	175	28*	ND	13*	1,4*	71
31-50	175	28*	ND	13*	1,4*	71
Dojilje (godine)						
≤ 18	210	29*	ND	13*	1,3*	71
19-30	210	29*	ND	13*	1,3*	71
31-50	210	29*	ND	13*	1,3*	71

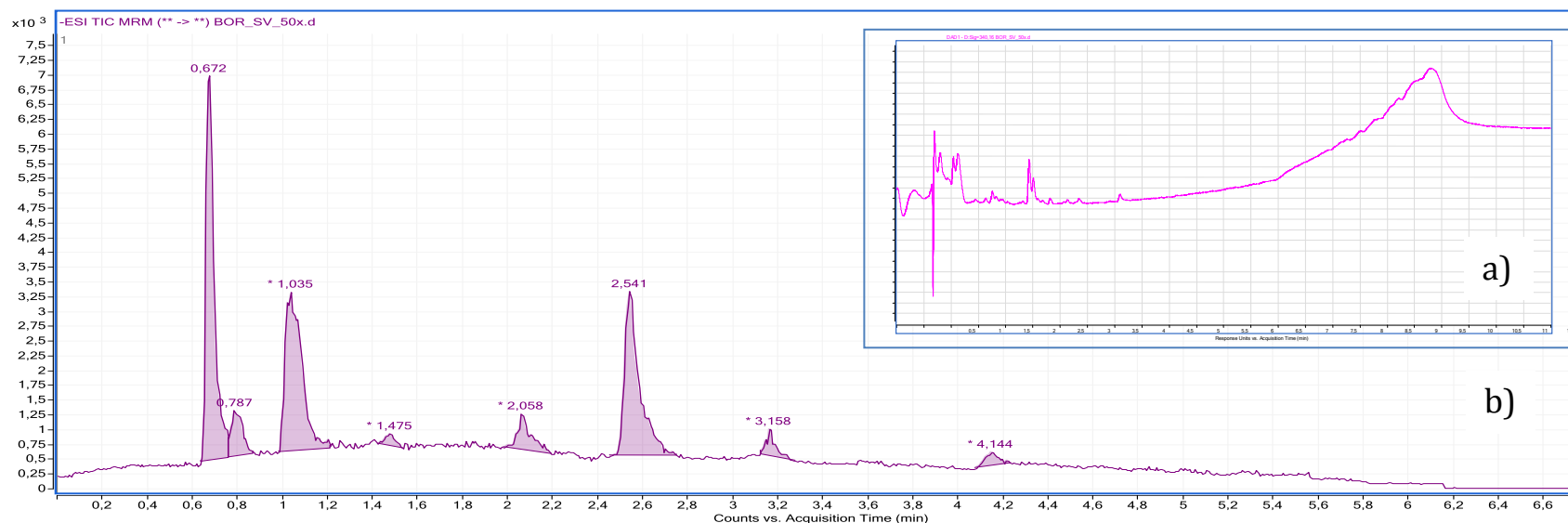
RDA – preporučena dnevna potreba; AI – adekvatan unos (označen zvezdicom); UH – ugljeni hidrati; DF – prehrambena vlakna; LA – linolna kiselina; LNA – α -linolenska kiselina; ND – nije definisano

Prilog 2. Preporučeni unosi za pojedince, mikro- i makroelementi (NRC, 2004)

RDA/ AI*						
Starosno doba	Ca (mg/dan)	Fe (mg/dan)	K (g/dan)	Mg (mg/dan)	Na (g/dan)	Zn (mg/dan)
Odojčad (meseći)						
0-6	200*	0,27*	0,4*	30*	0,12*	2*
7-12	260*	11	0,7*	75*	0,37*	3
Deca (godine)						
1-3	700	7	3,0*	80	1,0*	3
4-8	1000	10	3,8*	130	1,2*	5
Muškarci (godine)						
9-13	1300	8	4,5*	240	1,5*	8
14-18	1300	11	4,7*	410	1,5*	11
19-30	1000	8	4,7*	400	1,5*	11
31-50	1000	8	4,7*	420	1,5*	11
50-70	1000	8	4,7*	420	1,3*	11
> 70	1200	8	4,7*	420	1,2*	11
Žene (godine)						
9-13	1300	8	4,5*	240	1,5*	8
14-18	1300	15	4,7*	360	1,5*	9
19-30	1000	18	4,7*	310	1,5*	8
31-50	1000	18	4,7*	320	1,5*	8
50-70	1200	8	4,7*	320	1,3*	8
> 70	1200	8	4,7*	320	1,2*	8
Trudnice (godine)						
≤ 18	1300	27	4,7*	400	1,5*	12
19-30	1000	27	4,7*	350	1,5*	11
31-50	1000	27	4,7*	360	1,5*	11
Dojilje (godine)						
≤ 18	1300	10	5,1*	360	1,5*	13
19-30	1000	9	5,1*	310	1,5*	12
31-50	1000	9	5,1*	320	1,5*	12

RDA – preporučena dnevna potreba; AI – adekvatan unos (označen zvezdicom)

Prilog 3. LC/MS/MS analiza polifenolnih jedinjenja tropa borovnice

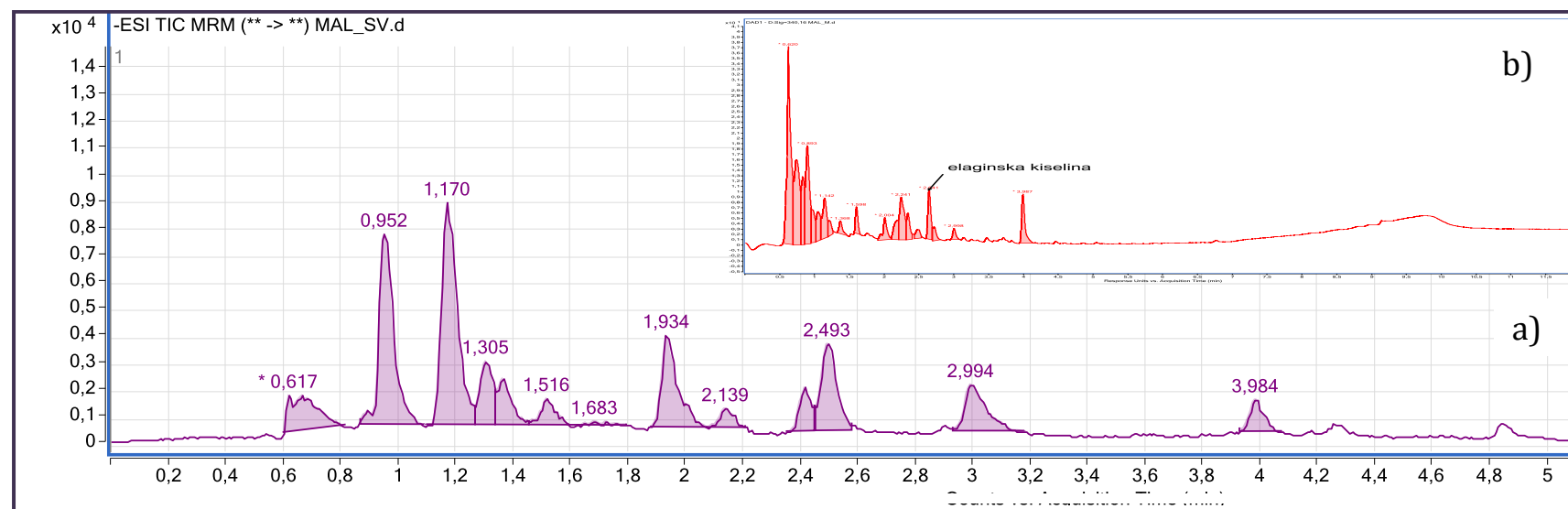


c)

Pik	Jedinjenje	t_R (min)	m/z prekursora	m/z produkta	V_{frag} (V)	V_{col} (V)
1	hinska kiselina	0,59	191	85	150	20
2	galna kiselina	0,70	169	125	90	10
3	protokatehinska kiselina	0,91	153	109	105	9
4	hlorogenska kiselina	0,94	353	191	100	10
5	kafena kiselina	1,31	179	135	100	10
6	<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,85	163	119	90	9
7	hiperozid	2,33	463	300	200	30
8	kvercitrin	2,95	447	300	190	27
9	kvercetin	3,90	301	151	130	15
10	izoramnetin	5,02	315	300	160	21

a) TIC i b) DAD hromatogram; c) tabelarni prikaz optimizovanih parametra za jedinjenja detektovanih u uzorcima (V_{frag} – napon fragmentora; V_{col} – napon koliziona ćelije)

Prilog 4. LC/MS/MS analiza polifenolnih jedinjenja tropa maline



c)

Pik	Jedinjenje	t_R (min)	m/z prekursora	m/z produkta	V_{frag} (V)	V_{col} (V)
1	hinska kiselina	0,67	191	85	150	20
2	galna kiselina	0,75	169	125	90	10
3	katehin	0,90	289	245	150	10
4	protokatehinska kiselina	0,97	153	109	105	9
5	hlorogenska kiselina	1,00	353	191	100	10
6	epikatehin	1,19	289	245	150	10
7	<i>p</i> -OH-benzoeva kiselina	1,32	137	93	80	10
8	kafena kiselina	1,39	179	135	100	10
9	<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,96	163	119	90	9
10	sinapinska kiselina	2,16	223	193	100	17
11	ferulna kiselina	2,19	193	134	90	11

Nastavak tabele

Pik	Jedinjenje	t_R (min)	m/z prekursora	m/z produkta	V_{frag} (V)	V_{col} (V)
12	hiperozid	2,44	463	300	200	30
13	kvercetin-3-O-Glc	2,52	463	300	210	30
14	kvercitrin	3,02	447	300	190	27
15	kvercetin	4,01	301	151	130	15

a) TIC i b) DAD hromatogram; c) tabelarni prikaz optimizovanih parametra za jedinjenja detektovanih u uzorcima (V_{frag} – napon fragmentora; V_{col} – napon kolizione ćelije)

Prilog 5. Izgled ocenjivačkog lista korišćen prilikom senzorske ocene bezglutenskog keksa

Senzorska ocena

KEKSA SA DODATKOM VOĆNOG TROPA

Datum ocene:

Ocenjivač:

Šifra

POSTUPAK SENZORSKE OCENE KEKSA:

a) REDOSLED OCENJIVANJA SVOJSTAVA:

- 1 KORAK:** Sagleda se vizuelno izgled: oblik i stanje gornje površine.
- 2 KORAK:** Proizvod se stavi neposredno ispred nosa i pomiriše keks sa gornje i donje površine.
- 4 KORAK:** Odlomljena polovina keksa se stavi u usta, neposredno ispod kutnjaka, kako bi se zagrizom/pritiskom utvrdila tvrdoća komada keksa. Daljom manipulacijom keksa u ustima, žvakanjem, nakon prestanka žvakanja i tokom gutanja, sagledavaju se preostala teksturna svojstva keksa (žvakljivost, izdvajanje/dezintegracija čestica, apsorpcija pljuvačke, osećaj koji izdvojene čestice stvaraju u ustima, adhezivnost za nepce i zbijenost oko zuba).
- 5 i 6 KORAK:** Tokom konzumiranja ostvaruje se percepcija ukusa (slano, slatko, gorko, kiselo...) kao i arome (sklop ukusa pri konzumiranju i mirisa nakon izdisanja retronazalnim putem kroz nos).

b) PAUZE IZMEĐU OCENE UZORAKA I NAČIN ISPIRANJA USTA/NEPCA:

Sredstvo za ispiranje: mlakom vodom **OBAVEZNO** isprati usta nakon završetka ocene jednog uzorka i napraviti pauzu za nastavak ocene u trajanju do 3 minuta.

Vreme između ocene pojedinih uzoraka: do 3 minuta.

NAPOMENA: Molim Vas da ocenite svako navedeno svojstvo, stavljanjem ocene u odgovarajuće polje **ili** da zaokružite broj koji se odnosi na opaženi nivo kvaliteta prilikom ocene uzorka keksa.

SVOJSTVO	Nivo kvaliteta	OPIS NIVOVA KVALITETA	Ocena (1-5)
IZGLED KEKSA (vizuelno)	5	Odgovarajući svojstven oblik, gornja površina glatka i bez pukotina.	
<ul style="list-style-type: none"> • Oblik • Stanje gornje površine 	4	Neznatno odstupanje oblika, neznatno prisustvo pukotina.	
	3	Manje odstupanje od oblika, gornja površina hrapava sa vidljivim pukotinama.	
	2	Izrazito odstupanje od oblika, gornja površina izrazito hrapava sa izraženim pukotinama.	
	1	Deformisan oblik, gornja površina skroz ispucala.	
TEKSTURA			
(pri prvom zagrizu)	5	Odlične čvrstoće.	
<ul style="list-style-type: none"> • čvrstoća 	4	Vrlo dobre čvrstoće.	
	3	Dobre čvrstoće.	
	2	Malo tvrd, malo guminozan.	
	1	Tvrd, guminozan.	
(pri žvakanju, nakon žvakanja, prilikom gutanja)	5	Odlične žvakljivosti; ravnomerna dezintegracija čestica tokom žvakanja; brzo omekšavanje u ustima: prijatan osećaj prisustva čestica u ustima; bez adhezivnosti.	
<ul style="list-style-type: none"> • žvakljivost, • izdvajanje čestica • adhezivnost/ upakovanost oko zuba 	4	Vrlo dobra žvakljivost; ravnomerna dezintegracija čestica tokom žvakanja; malo sporije omekšava u ustima; prijatan osećaj prisustva čestica u ustima; blago adhezivan.	
	3	Dobra žvakljivost; neravnomerna dezintegracija čestica tokom žvakanja; sporo omekšava u ustima; malo neprijatan osećaj prisustva čestica u ustima; adhezivan.	
	2	Loše žvakljivosti; loša dezintegracija čestica tokom žvakanja; izrazito sporo omekšava u ustima; Potreban veći broj žvakova, izrazito sporo omekšava u ustima; čestice u ustima doprinose osećaju hrapavosti/grebanja u ustima i grlu; adhezivan.	

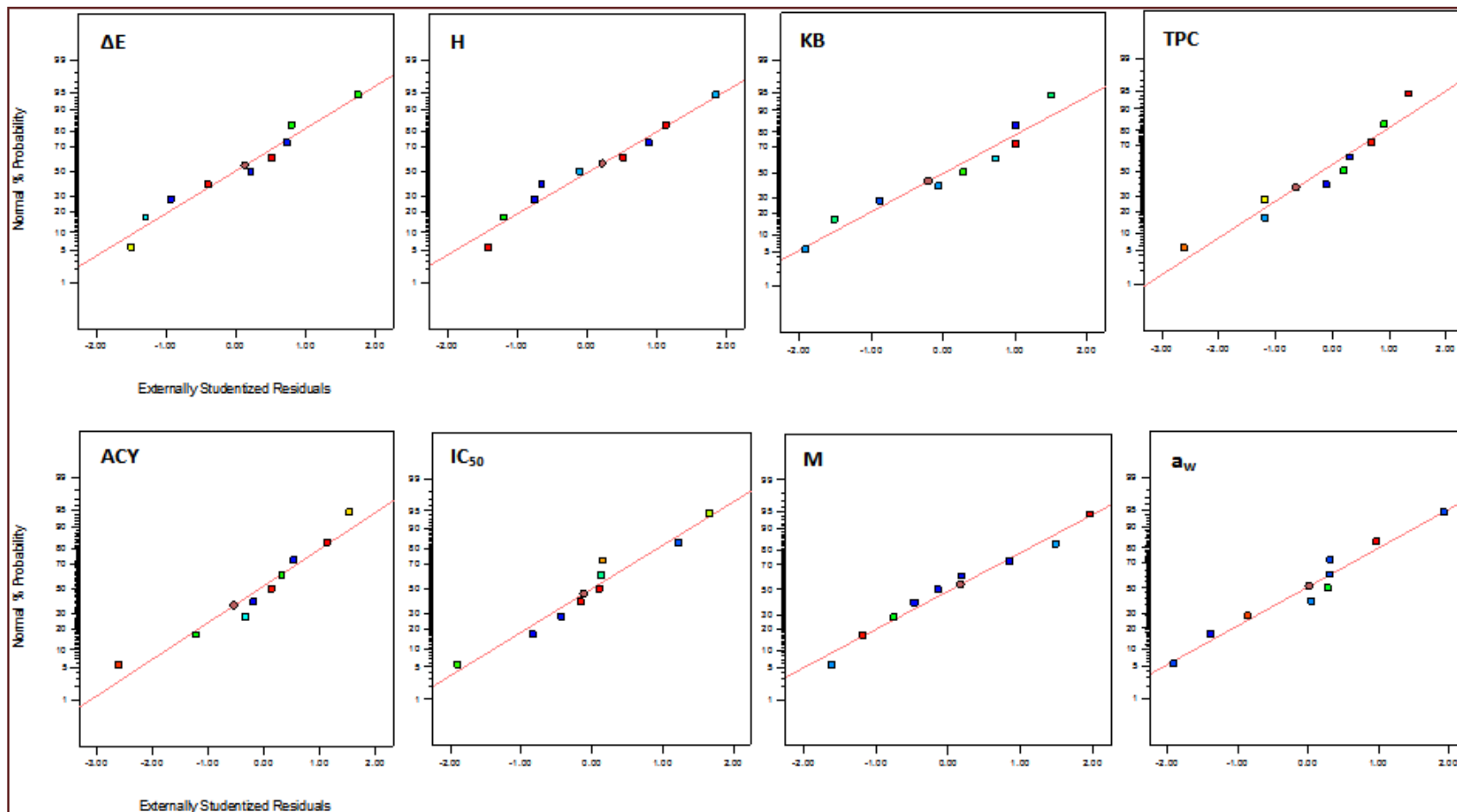
	1	Neodgovarajuća žvackljivosti; potuno odsustvo dezintegracije čestica tokom žvakanja; izrazito sporo omekšava u ustima; izražen osećaj hrapavosti/gruboće čestica u ustima i grlu; izrazito adhezivan, sa upakovanim/zbijenim ostacima keksa oko zuba.	
MIRIS (olfaktorno)	5	Svojstven, zaokružen, aromatičan, stalan tokom dužeg vremena	
	4	Svojstven miris, slabije zaokružen, aromatičan.	
	3	Svojstven, slabije zaokružen, slabije aromatičan.	
	2	Svojstven sa neznatnim primesama stranog mirisa, slabo aromatičan.	
	1	Stalan, neprijatan miris.	
UKUS (oralno)	5	Sladak, sa slabim primesama kiselosti.	
	4	Neznatno odstupanje od slatkog ukusa, sa slabim primesama kiselosti.	
	3	Znatna odstupanja od slatkog ukusa, sa primesama kiselosti i gorčine.	
	2	Značajna odstupanja od slatkog ukusa; izražen kiseo i gorak ukus.	
	1	Nesvojstven stran ukus, neprihvatljiv.	
AROMA (kombinacija mirisa i ukusa tokom konzumiranja)	5	Prijatna, postojana.	
	4	Prijatna, slabije postojana.	
	3	Umerena, nepostojana.	
	2	Neutralna.	
	1	Nedovoljno aromatičan, neprihvatljiv.	

Prilog 6. Optimizacija formulacije bezglutenskog keksa: vrednosti Pearsonovih koeficijenata korelacije između određivanih parametara

	ΔE	H	TPC	ACY	IC ₅₀	M	a _w	AP	SH	MTF	O	T	F
ΔE	1	-0,942	-0,998	-0,998	0,988	0,918	0,885	0,465	-0,946	0,775	-0,406	-0,743	-0,536
H	-0,942	1	0,943	0,930	-0,974	-0,734	-0,688	-0,285	0,961	-0,778	0,577	0,605	0,452
TPC	-0,998	0,943	1	0,998	-0,987	-0,917	-0,887	-0,490	0,944	-0,799	0,448	0,769	0,524
ACY	-0,998	0,930	0,998	1	-0,980	-0,931	-0,902	-0,488	0,940	-0,780	0,410	0,768	0,542
IC ₅₀	0,988	-0,974	-0,987	-0,980	1	0,857	0,814	0,412	-0,956	0,784	-0,473	-0,702	-0,515
M	0,918	-0,734	-0,917	-0,931	0,857	1	0,992	0,653	-0,783	0,695	-0,182	-0,811	-0,523
a _w	0,885	-0,688	-0,887	-0,902	0,814	0,992	1	0,703	-0,732	0,716	-0,185	-0,810	-0,455
AP	0,465	-0,285	-0,490	-0,488	0,412	0,653	0,703	1	-0,240	0,725	-0,269	-0,613	0,119
SH	-0,946	0,961	0,944	0,940	-0,956	-0,783	-0,732	-0,240	1	-0,670	0,505	0,700	0,644
MTF	0,775	-0,778	-0,799	-0,780	0,784	0,695	0,716	0,725	-0,670	1	-0,692	-0,634	-0,004
O	-0,406	0,577	0,448	0,410	-0,473	-0,182	-0,185	-0,269	0,505	-0,692	1	0,509	0,074
T	-0,743	0,605	0,769	0,768	-0,702	-0,811	-0,810	-0,613	0,700	-0,634	0,509	1	0,637
F	-0,536	0,452	0,524	0,542	-0,515	-0,523	-0,455	0,119	0,644	-0,004	0,074	0,637	1

ΔE – razlika u boji keksa nakon 6 meseci skladištenja; H (g) – čvrstoća keksa; TPC (mg/100 g s.m.) – sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola; ACY (mg/100 g s.m.) – sadržaj monomernih antocijana; IC₅₀ (mg/ml) – koncentracija ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50% DPPH'; M (%) – vlaga keksa; a_w – aktivnost vode; AP – izgled keksa; SH – tekstura pri prvom zagrizu; MTF – tekstura pri žvakanju; O – miris; T – ukus; F – aroma

Prilog 7. Grafici normalne raspodele ostataka (reziduala)



ΔE – razlika u boji keksa nakon 6 meseci skladištenja; H (g) – čvrstoća keksa; TPC (mg/100 g s.m.) – sadržaj ukupnih rastvorljivih polifenola; ACY (mg/100 g s.m.) – sadržaj monomernih antocijana; IC_{50} (mg/ml) – koncentracija ekstrakta pri kojoj je neutralisano 50% DPPH[•]; M (%) – vlaga keksa; a_w – aktivnost vode

Prilog 8. Lista komercijalno dostupnih keksova korišćenih za uporednu analizu nutritivnog profila

Oznaka keksova	Proizvođač	Proizvod
1	Newtons	Fruit things blueberry
2	Belvita	Mixed berry bites
3	Kellogg's	Nutri-grain soft baked blueberry breakfast
4	Kellogg's	Nutri-grain soft baked mixed berry breakfast bars
5	Great value	Fruit & grain bar
6	Belvita	Blueberry breakfast biscuits
7	Nature Valley	Whole wheat with blueberry cookies
8	Weetabix	Breakfast biscuits blueberry
9	Mc Vities	Red berry breakfast biscuits
10	Sainsbury's	Breakfast biscuit mixed
GF 1	Udi's	Gluten free dark chocolate brownie bites
GF 2	Udi's	Soft baked cookies - peanut butter coconut
GF 3	Pamela's	Gluten free simple bites mini cookies
GF 4	Paleo	Vanilla blueberry natural grain-free cookies
GF 5	Gourmet	Oatmeal cookies with cranberries, pistachios & orange essence
GF 6	Lucy's	Ginger snaps cookie
GF 7	Nairins	Gluten free herb & seeded oatcakes
GF 8	Nairins	Oats & syrup biscuit breaks
GF 9	Nairins	Gluten free oats & fruit biscuit breaks
GF 10	Betty croker	Gluten free sugar cookies